

**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TİBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
BİYOKİMYA BİLİM DALI**

**HEPATİT e ANTİJENİNE (HBeAg) ÖZGÜ  
MONOKLONAL ANTİKOR GELİŞTİRİLMESİNDE  
ALTERNATİF YÖNTEMLER**

**DOKTORA TEZİ**

**İBRAHİM SÖĞÜT**

**Danışmanlar**

**Prof. Dr. Güngör KANBAK  
Doç. Dr. Aynur BAŞALP**

**EYLÜL-2011**



**T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI  
BİYOKİMYA BİLİM DALI**

**HEPATİT e ANTİJENİNE (HBeAg) ÖZGÜ  
MONOKLONAL ANTİKOR GELİŞTİRİLMESİNDE  
ALTERNATİF YÖNTEMLER**

**DOKTORA TEZİ**

**İBRAHİM SÖĞÜT**

**Danışmanlar**

**Prof. Dr. Güngör KANBAK**

**Doç. Dr. Aynur BAŞALP**

**TÜBİTAK KAMAG-1007 programı  
105G056 no'lu proje tarafından desteklenmiştir.**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

İbrahim SÖĞÜT'ün Doktora Tezi olarak hazırladığı "**Hepatit e Antijenine (HBeAg) Özgü Monoklonal Antikor Geliştirilmesinde Alternatif Yöntemler**" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

16.09.2011

Üye: Prof. Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ


Üye: Prof. Dr. GÜNGÖR KANBAK

Üye: Doç. Dr. Hülya SİVAS

Üye: Doç. Dr. Aynur BAŞALP

Üye: Yrd. Doç. Dr. Fahrettin AKYÜZ

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 23/09/2011... tarih ve 888/4121... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Ferruh YÜCEL  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

### HEPATİT e ANTİJENİNE (HBeAg) ÖZGÜ MONOKLONAL ANTİKOR GELİŞTİRİLMESİNDE ALTERNATİF YÖNTEMLER

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre dünyada yaklaşık iki milyar kişi HBV ile enfektedir ve 350 milyondan fazla kişi kronik HBV hastasıdır. Hepatit B virüsü (HBV); yüzey antijeninden (HBsAg) oluşan dış zarf, kısmen çift zincirli DNA, kor protein (HBcAg), hepatit e antijeni (HBeAg) ve DNA'ya bağlı polimerazdan oluşur. Bu tez çalışmasının amacı, hepatit B hastalığının şiddeti ve seyri hakkında önemli bilgiler edinilmesini sağlayan HBeAg'ye özgü monoklonal antikorun (mAb), klasik hibridoma teknolojisi ile üretilmesidir. Yine HBeAg'ye karşı monoklonal antikor geliştirme çalışmalarında immünize farelerin değerlendirilmesi amacıyla yönelik olarak organ olarak dondurulmuş dalak ve lenf düğümlerinden elde edilen hücrelerle hibridoma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca ticari antijenle immünizasyonlara alternatif olarak yüzeyinde HBeAg eksprese eden fajlarla BALB/c fareleri immünize edilmiş ve HBeAg'ye karşı monoklonal antikor geliştirmek üzere bu farelerle füzyon çalışmaları yapılmıştır.

Tez çalışmalarında hibridoma teknolojisi ile elde edilen 16F8 monoklonal antikorunu HBeAg'ye özgü iken, 12E5 monoklonal antikorunu HBcAg ile daha iyi reaksiyon vermiş ancak belli oranlarda HBeAg'ye de bağlanma özelliği göstermiştir. HBeAg'ye özgünlüğü nedeniyle 16F8 monoklonal antikorunun enzimlerle işaretlenerek ticari kitlerde kullanılma potansiyeli bulunmaktadır. Organ olarak dondurulmuş dalak ve lenf düğümlerinden elde edilen hücrelerle yapılan füzyonlarda 3 aylık dondurma süresi sonunda bile antikor sentezleme ve çoğalma yeteneğini koruyan hibrit hücreler elde edilmiştir. Yine tez çalışmasında klasik adjuvantlara alternatif olarak M13 filamentöz faj üzerinde eksprese edilen HBeAg ile immünizasyonlar yapılmış ve rekombinant fajlarla HBeAg'ye özgü monoklonal antikor geliştirmek üzere hibridoma çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Anti-HBeAg, Dondurma (kryoprezervasyon), HBeAg, HBV, Monoklonal Antikor, Rekombinant M13 Faj

## **SUMMARY**

### **ALTERNATIVE METHODS FOR DEVELOPING MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HEPATITIS e ANTIGEN (HBeAg)**

According to the World Health Organization's (WHO) report, more than 350 million people are chronic HBV patients and approximately two billion people are infected with HBV. HBV is composed of surface antigen (HBsAg) that makes up the outer envelop, partially double-stranded DNA, core protein (HBcAg), e antigen (HBeAg) and DNA-dependent polymerase. In this thesis, main aim was to develop monoclonal antibodies against HBeAg, which is a crucial marker for the prognosis of the disease. In order to make use of the already-immunized mice, spleen and lymph nodes of those mice were dissected and frozen as whole organs. As an alternative for immunizing mice with commercial antigens, BALB/c mice were immunized with HBeAg-expressing phages.

With hybridoma technology, 16F8 monoclonal antibodies that were specific for HBeAg were developed. 12E5 monoclonal antibody had affinity for both HBcAg and HBeAg, yet it had better specificity for the former. After tagging, 16F8 monoclonal antibody can be involved in commercial kits for HBeAg detection. Even after 3 months of freezing, cells isolated from frozen spleen and lymph nodes had the capacity for proliferation and antibody production. Immunizing mice with M13 filamentous phage that expresses HBeAg on its surface is found to be an alternative for immunizations carried with adjuvants.

**Key Words:** Anti-HBeAg, Cryopreservation, HBeAg, HBV, Monoclonal Antibody, Recombinant M13 Phage

## İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
ÖZET	v
SUMMARY	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
ŞEKİL DİZİNİ	xii
TABLO DİZİNİ	xiv
SİMGE VE KISALTMALAR	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Viral Hepatit	3
2.2. Hepatit B Virüsü	3
2.3. Hepatit B Hastalığının Epidemiyolojisi	9
2.4. Hepatit B Virüsünün Bulaşma Yolları	11
2.5. Hepatit B Patogenezi	13
2.6. Hepatit B Serolojisi	16
2.6.1. HBsAg	16
2.6.2. Anti – HBs	17
2.6.3. Anti-HBc IgM ve anti-HBc IgG	18
2.6.4. HBeAg ve anti-HBe	18
2.6.5. Hepatit B viral DNA (HBV-DNA)	19
2.7. Viral Hepatit B'de Klasik Tablolar Dışındaki Serolojik Bulgular	20
2.7.1. Tek başına HBsAg pozitifliği	20
2.7.2. Tek başına anti-HBs pozitifliği	21
2.7.3. HBsAg negatif bulunan Hepatit B olguları	21
2.7.4. Tek başına anti-HBc pozitifliği	21
2.7.5. Anti-HBs oluşmuş kişilerde HBsAg'nin tekrar ortaya çıkması	22
2.7.6. Anti-HBs (+), Anti-HBc (+), HBV-DNA (+) Olgular	22



2.8. Hepatit e antijenine özgü monoklonal antikor üretimi	22
2.9. Hibridoma çalışmalarında organ olarak dondurulmuş dalak ve lenf düğümlerinin kullanılması	28
2.10. Yüzeyinde HBe antijeni eksprese eden M13 bakteriyofajı ile yapılan immünizasyonlar sonrası monoklonal antikor geliştirilmesi	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1. Gereç	40
3.1.1. Aletler	40
3.1.2. Kimyasal maddeler	42
3.1.3. Tamponlar	43
3.1.4. Besiyeri	44
3.1.5. Hücreler	44
3.1.6. Antijenler	45
3.1.7. Rekombinant Faj	45
3.2. Yöntem	45
3.2.1. İmmünizasyon	45
3.2.1.1. HBeAg ile immünizasyon	45
3.2.1.2. Rekombinant faj ile immünizasyon	46
3.2.2. ELISA Testi	46
3.2.3. Füzyon	47
3.2.3.1. Besleyici hücrelerin hazırlanması	47
3.2.3.2. Myeloma hücrelerinin füzyon için hazırlanması	47
3.2.3.3. İmmünize olmuş fareden dalak hücrelerinin eldesi	48
3.2.3.4. İmmünize olmuş fareden lenf düğümü hücrelerinin eldesi	49
3.2.3.5. Hücre sayımı	50
3.2.3.6. Füzyon	51
3.2.4. Füzyon takibi	51
3.2.5. Hibritlerin alt klonlarına ayrılması	52
3.2.6. Dalak ve lenf düğümlerinin organ olarak dondurulması	53

3.2.7. Dondurulmuş dalak ve lenf düğümlerinin füzyon için açılması	53
3.2.8. Monoklonal antikorların aktivite tayini ve karakterizasyonu (Çapraz reaksiyon testi)	54
3.2.9. Antikor izotiplerinin belirlenmesi	54
3.2.10. Monoklonal antikorların saflaştırılması	55
3.2.10.1. Hibrit hücrelerin geniş ölçekte üretimi	55
3.2.10.2. Amonyum sülfat çöktürmesi	55
3.2.10.3. İmmün afinite kolon kromatografisi (Protein A ve Protein G)	55
3.2.11. Epitop analizi	56
4. BULGULAR	57
4.1. İmmünizasyonlarda Kullanılacak Ticari HBeAg'nin Dozunun Belirlenmesi	57
4.1.1. Füzyonda kullanılacak farenin seçimi	58
4.2. Klasik Hücre Füzyonu	61
4.3. Monoklonal Antikorların Çapraz Reaksiyon Testi	67
4.4. Monoklonal Antikorların Alt İzotipleri	70
4.5. Monoklonal Antikorların Saflaştırılması	72
4.6. Monoklonal Antikorumun Farklı Seyreltme Oranlarında Antijene Bağlanma Miktarlarının Belirlenmesi	74
4.7. Monoklonal Antikorların Epitop Analizi	78
4.8. Organ Olarak Dondurulmuş Dalak ve Lenf Düğümlerinin Füzyon Çalışmasında Kullanılması	86
4.8.1. Dondurulan organlar ile yapılan füzyonların sonuçları	87
4.9. Yüzeyinde Hepatit B e Antijeni Eksprese Eden M13 Bakteriyofajı ile Yapılan İmmünizasyonlar Sonrası Monoklonal Antikor Geliştirilmesi	90
4.9.1. Yüzeyinde Hepatit B e antijeni eksprese eden M13 bakteriyofajı ile yapılan immünizasyonlar sonrası füzyon çalışmaları	91

5. TARTIŞMA	93
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	101
7. KAYNAKLAR DİZİNİ	102
8. EKLER DİZİNİ	116
9. ÖZGEÇMİŞ	117

## ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1.	Hepatit B Virüsünün şematik gösterimi.....	4
Şekil 2.	HBV’de protein kodlayan genler.....	5
Şekil 3.	HBeAg oluşumu.....	6
Şekil 4.	HBV replikasyonunun evreleri.....	9
Şekil 5.	Dünyada HBV Prevalansı.....	10
Şekil 6.	Hepatit B virüsünün hepatoselüler karsinoma.....	14
Şekil 7.	HBV virüsünün vücuttan temizlenme mekanizması.....	15
Şekil 8.	HBV maruziyetinden sonraki haftalarda seroloji titrelerine göre semptomların değişimi.....	20
Şekil 9.	Monoklonal antikor elde edilmesi.....	25
Şekil 10.	Aminopterinin <i>de novo</i> yolunu inhibe etmesi.....	27
Şekil 11.	Faj gösterim yöntemi.....	36
Şekil 12.	M13 Escherichia coli bakteriofajı ve proteinleri.....	38
Şekil 13.	FO Myeloma hücrelerinin kültür ortamındaki görüntüsü.....	48
Şekil 14.	Faredeki dalak ve lenf düğümleri.....	50
Şekil 15.	Füzyondan 10 gün sonra hibrid hücrenin belirlenmesi ve çoğaltılması.....	52
Şekil 16.	İmmünizasyonlarda kullanılan HBeAg dozunun belirlenmesi.....	57
Şekil 17.	HBeAg ile immünize edilen farelerde Ag’ye özgün antikor yanıtlarının belirlenmesi.....	58
Şekil 18.	HBeAg ile immünize edilen farelerde Ag’ye özgün antikor yanıtlarının belirlenmesi.....	59
Şekil 19.	HBeAg ile immünize edilen farelerde Ag’ye özgün antikor yanıtlarının belirlenmesi.....	59
Şekil 20.	HBeAg ile immünize edilen farelerde Ag’ye özgün antikor yanıtlarının belirlenmesi.....	60

<b>Şekil 21.</b>	HBeAg ile immünize edilen farelerde Ag'ye özgün antikor yanıtlarının belirlenmesi.....	61
<b>Şekil 22.</b>	16F8 monoklonal antikorunun çapraz reaksiyon testi.....	67
<b>Şekil 23.</b>	12E5 monoklonal antikorunun çapraz reaksiyon testi.....	68
<b>Şekil 24.</b>	18E10 monoklonal antikorunun çapraz reaksiyon testi.....	68
<b>Şekil 25.</b>	1C6 monoklonal antikorunun çapraz reaksiyon testi. ....	69
<b>Şekil 26.</b>	8C10 monoklonal antikorunun çapraz reaksiyon testi.....	70
<b>Şekil 27.</b>	16F8 monoklonal antikorun saflaştırılması.....	73
<b>Şekil 28.</b>	12E5 monoklonal antikorunun saflaştırılması.....	74
<b>Şekil 29.</b>	16F8 monoklonal antikorunun farklı seyreltme oranlarında antijene bağlanma miktarlarının belirlenmesi.....	75
<b>Şekil 30.</b>	12E5 monoklonal antikorunun farklı seyreltme oranlarında antijene bağlanma miktarlarının belirlenmesi.....	76
<b>Şekil 31.</b>	ELISA'da 16F8 monoklonal antikorunu tanımak için kullanılacak antijenin optimum dozunun belirlenmesi.....	77
<b>Şekil 32.</b>	ELISA'da 12E5 monoklonal antikorunu tanımak için kullanılacak antijenin optimum dozunun belirlenmesi.....	78
<b>Şekil 33.</b>	Biotinlenen peptit dizilerine, 16F8 monoklonal antikorunun bağlanarak substrat ile görünür hale gelmesi.....	81
<b>Şekil 34.</b>	Biotinlenen peptit dizilerine, 12E5 monoklonal antikorunun bağlanarak substrat ile görünür hale gelmesi.....	85
<b>Şekil 35.</b>	HBeAg ile immünize edilen farelerde Ag'ye özgün antikor yanıtlarının belirlenmesi.....	86
<b>Şekil 36.</b>	Rekombinat e faj immünizasyonu (1. Grup) sonucunda farelerde oluşan hepatit e antikorunun seviyesinin belirlenmesi.....	90
<b>Şekil 37.</b>	Rekombinat e faj + incomplete freund's adjuvant immünizasyonu (2.Grup) sonucunda farelerde oluşan hepatit e antikorunun seviyesi.....	91

## TABLO DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b>	HBV'nin bulaşma yolları ve ilgili risk gruplarının özetlenmesi.....	12
<b>Tablo 2.</b>	ABD'de organ nakli ile önlenebilecek yıllık ölüm sayısı.....	28
<b>Tablo 3.</b>	Protein A ve Protein G kolonlarının insan ve farede antikor bağlama dereceleri.....	56
<b>Tablo 4.</b>	Birinci füzyon sonucu.....	62
<b>Tablo 5.</b>	İkinci füzyon sonucu.....	62
<b>Tablo 6.</b>	Üçüncü füzyon sonucu.....	63
<b>Tablo 7.</b>	Dördüncü füzyon sonucu.....	63
<b>Tablo 8.</b>	Beşinci füzyon sonucu.....	64
<b>Tablo 9.</b>	Altıncı füzyon sonucu.....	64
<b>Tablo 10.</b>	Yedinci füzyon sonucu.....	65
<b>Tablo 11.</b>	Sekizinci füzyon sonucu.....	65
<b>Tablo 12.</b>	Dokuzuncu füzyon sonucu.....	66
<b>Tablo 13.</b>	Onuncu füzyon sonucu.....	66
<b>Tablo 14.</b>	16F8 monoklonal antikorunun alt izotipleri.....	70
<b>Tablo 15.</b>	12E5 monoklonal antikorunun alt izotipleri.....	71
<b>Tablo 16.</b>	18E10 monoklonal antikorunun alt izotipleri.....	71
<b>Tablo 17.</b>	1C6 monoklonal antikorunun alt izotipleri.....	71
<b>Tablo 18.</b>	8C10 monoklonal antikorunun alt izotipleri.....	72
<b>Tablo 19.</b>	Hepatit B virüsünün bütün antijenlerine özgü biotinlenmiş peptit kütüphanesinde e antijeninin epitop dizisi.....	79
<b>Tablo 20.</b>	16F8 monoklonal antikorunun amino asit dizilimi.....	82
<b>Tablo 21.</b>	Hepatit B virüsünün bütün antijenlerine özgü biotinlenmiş peptit kütüphanesinde c antijeninin epitop dizisi.....	82
<b>Tablo 22.</b>	Organ olarak dondurulmuş dalak ve lenf düğümlerinden yapılan birinci füzyon çalışması sonuçları.....	87

<b>Tablo 23.</b>	Dondurulmuş dalak ve lenf düğümlerinden yapılan ikinci füzyon çalışması sonuçları.....	88
<b>Tablo 24.</b>	Dondurulmuş dalak ve lenf düğümlerinden yapılan üçüncü füzyon çalışması sonuçları.....	89
<b>Tablo 25.</b>	Rekombinant e faj immünizeli farenin dalak ve lenf düğümlerinden yapılan birinci füzyon çalışmasının sonuçları....	91
<b>Tablo 26.</b>	Rekombinant e faj+IFA immünizeli sağ kulağı işaretli farenin dalak ve lenf düğümlerinden yapılan ikinci füzyon çalışmasının sonuçları.....	92
<b>Tablo 27.</b>	Rekombinant e faj+IFA immünizeli sağ kulağı delik farenin dalak ve lenf düğümlerinden yapılan üçüncü füzyon çalışmasının sonuçları.....	92

## SİMGE VE KISALTMALAR

HBV	Hepatit B virüsü
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
HBsAg	Hepatit B virüsü yüzey antijeni
HBcAg	Hepatit B virüsü kor antijeni
HBeAg	Hepatit B e antijeni
anti-HBsAg	HBsAg'ye karşı oluşan antikor
anti-HBcAg	HBcAg'ye karşı oluşan antikor
anti-HBeAg	HBeAg'ye karşı oluşan antikor
HAV	Hepatit A virüsü
HEV	Hepatit E virüsü
HCV	Hepatit C virüsü
HDV	Hepatit Delta virüsü
HGV	Hepatit G virüsü
DMSO	Dimetil sülfoksit
S geni	Yüzey proteini kodlayan gen
C geni	Kapsit proteinlerini kodlayan gen
X geni	X proteinini kodlayan gen
P geni	DNA polimerazı kodlayan gen
NK	Doğal öldürücüler
HSK	hepatoselüler karsinomaya
CD8+	Cluster of differentiation 8
CD4+	Cluster of differentiation 4
CTL	Sitotoksik T lenfosit
IgM, IgG	İmmün globulin M
IgG	İmmün globulin G
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
ALT	Alanin aminotransferaz
ELISA	Enzim linked immunosorbent assay
PEG	Polietilen glikol



HAT	Hipoksantin aminopterin timidin
HGPRT	Hipoksantin guanin fosforibozil transferaz
TK	Timidin kinaz
APC	Adjuvantların antijen sunucu hücreleri
FCA	Freund'un Complete Adjuvantı
IFA	Freund'un Incomplete Adjuvant
MPL	Monofosforil lipid A
16F8	HBeAg'ye özgü monoklonal antikor
12E5	HBcAg'ye ve HBeAg'ye özgü monoklonal antikor
PEG-4000	Polietilen glikol-4000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Monopotasyum fosfat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dipotasyum fosfat
NaCl	Sodyum klorür
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
ZnCl <sub>2</sub>	Çinko klorür
KOH	Potasyum hidroksit
PNPP	4-paranitrofenilfosfat
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sodyum fosfat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Disodyum hidrojen fosfat
HCl	Hidroklorik asit
dH <sub>2</sub> O	Distile su
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
NaHCO <sub>3</sub>	Sodyum bikarbonat
FBS	Fetal bovine serumu
NaHCO <sub>3</sub>	Sodyum bikarbonat
HT	Hipoksantin timidin
rEfaj	Rekombinant e faj

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatit B virüsü (HBV); akut ve kronik hepatit ile karaciğer sirozu ve karaciğer kanserinin başlıca etmenidir ve günümüzde halen önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre dünyada yaklaşık iki milyar kişi HBV ile enfektedir ve 350 milyondan fazla kişi kronik HBV hastasıdır. Her yıl Hepatit B enfeksiyonuna bağlı hastalıklar sonucunda 500.000 ile 700.000 kişi ölmektedir. Sağlık Bakanlığı verilerine göre ülkemizde yaklaşık dört milyon HBV taşıyıcısı bulunmaktadır (161,162).

Hepadnaviridae ailesinin bir üyesi olan Hepatit B virüsü (HBV) küçük, zarflı, kısmi çift zincirli, insanlarda ve hayvanlarda enfeksiyon oluşturan bir DNA virüsüdür. Bütün HBV virüsüne Dane parçacığı denir (88,144). Hepatit B virüsü yüzey antijeninden (HBsAg) oluşan dış zarf, nükleokapsit veya kor kısmını çevreler. HBV'nin iç koru kısmen çift zincirli DNA, kor protein (HBcAg), hepatit e antijeni (HBeAg) ve DNA'ya bağlı polimeraz içerir (62).

Hepatit B enfeksiyonu olan hastalarda hastalığın farklı dönemlerinde HBsAg ve antikor (anti-HBsAg), HBeAg ve antikor (anti-HBeAg) ve HBc antikor (anti-HBcAg) takip edilmekte, buna göre hastalığın seyri belirlenmektedir. HBeAg, klinik açıdan enfeksiyonun tanısında, viral replikasyon seviyesinin ve şiddetinin belirlenmesinde kullanılır. HBV ile enfekte hastaların serumlarında 6 aydan fazla HBsAg, HBeAg ve yüksek seviyede HBV DNA bulunması enfeksiyonun kronikleşme evresinde olduğunun belirtisidir (106). Örneğin, hastalığın orta döneminde HBeAg azalırken, anti-HBeAg düzeyi artmaktadır. HBeAg'si yüksek olan hastaların enfeksiyonu çevrelerine bulaştırma riski yüksektir (98,148).

Çalışmanın amacı, Hepatit B hastalığının şiddeti ve seyri hakkında önemli bilgiler edinilmesini sağlayan HBeAg'ye özgü monoklonal antikor (mAb) üretiminin

sağlanmasıdır. HBeAg'ye karşı mAb geliştirme çalışmalarında bilinen klasik yöntemin yanı sıra alternatif yaklaşım olarak dondurulmuş dalak ve lenf düğümlerinin füzyon çalışmasında kullanılması ve yüzeyinde HBeAg'yi eksprese eden fajlarla yapılan immünizasyonlar sonrası HBeAg'ye özgü monoklonal antikorlar geliştirilmesi amaçlanmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

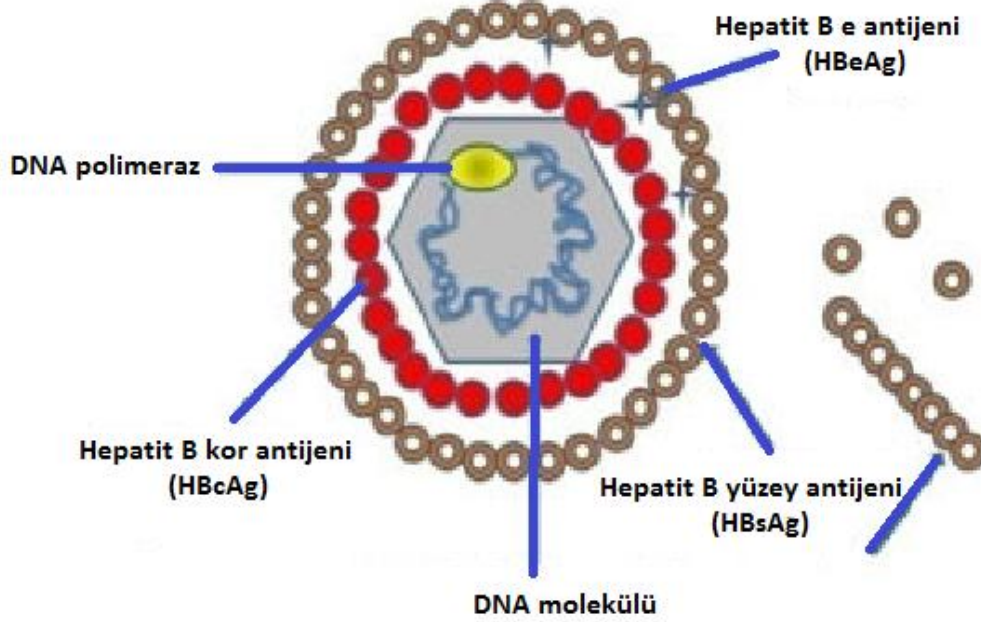
### **2.1. Viral Hepatit**

Karaciğeri etkileyen sistemik enfeksiyonlar olan viral hepatitler antijenik yapıları farklı altı hepatit virüsü tarafından tetiklenebilmektedir. Hepatit A virüsü (HAV) ve hepatit E virüsü (HEV) karakteristik olarak enterik, oral-fekal yolla bulaşan, kronik hepatite yol açmayan virüslerdir. Diğer dört virüs ise zarflı hepatit B virüsü (HBV), hepatit C virüsü (HCV), hepatit Delta virüsü (HDV) ve hepatit G virüsü (HGV)'dür. Bu virüsler lipid yapıda bir zarf tabakasına sahip olduklarından canlı virüsün karaciğerden safra aracılığıyla bağırsak yoluna geçişi engellenmektedir dolayısıyla oral-fekal yolla bulaşma mümkün değildir. Kan yoluyla bulaşan HBV, HCV ve HDV ile kronik karaciğer hastalığı, siroz ve karaciğer kanseri gelişebilmektedir. Bu bakımdan viral hepatitler tüm dünyada önemli sağlık sorunu oluşturmaktadır (9).

### **2.2. Hepatit B Virüsü**

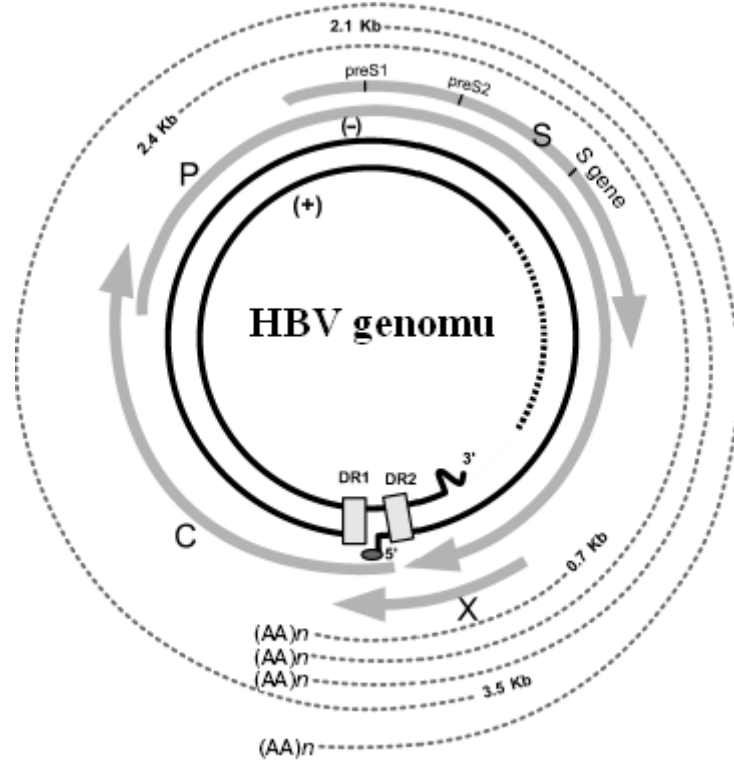
Hepatit B virüsü M.Ö beşinci yüzyılda Hippocrates tarafından “epidemik sarılık” olarak tarif edilmiştir. Hepatit B yüzey antijeni, 1966 yılında Blumberg tarafından “Avustralya antijeni (AuAg)” olarak tanımlanmıştır (6,17). Dane ve arkadaşları ise 1970 yılında kısmen saflaştırdıkları serum örneklerinden elektron mikroskobu kullanılarak elde edilen sonuçlar doğrultusunda üç değişik partikül tanımlamıştır. Enfeksiyöz özelliğe sahip 42 nm çapındaki yapıya “Dane partikülü” adı verilmiştir. Sonraki yıllarda ise kor antijen, DNA polimeraz ve viral DNA tanımlanmıştır (30,118).

Hepadnaviridae ailesinin bir üyesi olan Hepatit B virüsü (HBV) küçük, zarflı, kısmi çift zincirli, insanlarda ve hayvanlarda enfeksiyon oluşturan, hepatotropik bir DNA virüsüdür (Şekil 1). Bu virüs ailesi woodchuck hepatit virüsü, duck hepatit B virüsü ve diğer bir takım avian ve memeli virüslerini içermektedir (50).



Şekil 1. Hepatit B virüsünün şematik gösterimi (Bkz EK-1)

Bütün Hepatit B virüsüne Dane parçacığı adı verilir. Virüsün 3200 bazdan oluşan uzun (L veya negatif) ve 1800–2700 baz içeren kısa (S veya pozitif) olmak üzere iki zincirden meydana gelen genomu vardır. Bu zincirler ortak baz çiftlerine sahiptir, sirküler bir yapı halinde bulunmakla beraber her birinin 3' ve 5' uçları birleşik olmadığından aslında lineer moleküllerdir. HBV'de genetik bilginin tamamı uzun zincir üzerinde kodlanmış olup, bu sarmal S, C, X, P kısaltmaları ile gösterilen dört değişik proteini kodlayabilen genlere sahiptir (Şekil 2). Uzun sarmaldaki S geni yüzey proteinlerini, C geni kapsit proteinlerini, X geni X proteinini ve P geni DNA polimerazı kodlamaktadır. Ancak başlangıç kodonları farklı olduğu için S geni üzerinde pre-S1, pre-S2 ve S olmak üzere üç; C geni üzerinde ise prekor ve kor olmak üzere iki bölge bulunmaktadır (88,104,144).



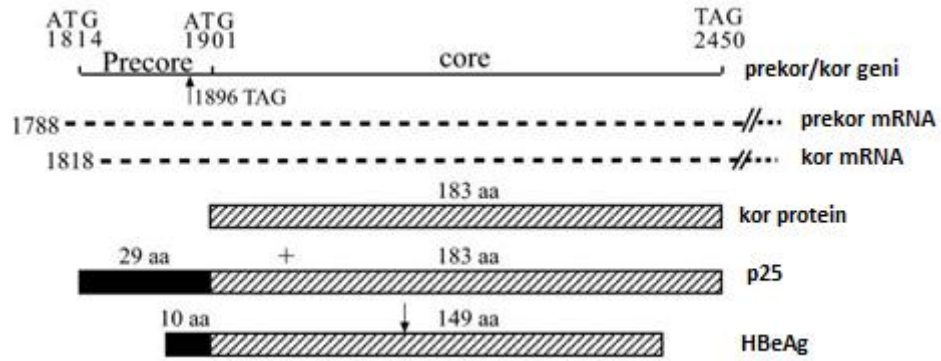
Şekil 2. HBV’de protein kodlayan genler (Bkz EK-2)

Hepatit B virüsü yüzey antijeninden (HBsAg) oluşan dış zarf, nükleokapsit veya kor kısmını çevreler. HBV’nin iç koru kısmen çift zincirli DNA, kor protein (HBcAg), hepatit e antijeni (HBeAg) ve DNA’ya bağlı polimeraz içerir. HBV enfeksiyonunun serolojik tanısında HBsAg, anti-HBs, anti-HBc, HBeAg ve anti-HBe belirteçlerinden yararlanılır (62).

Yüzey antijeni HBsAg küçük, ortanca ve büyük olmak üzere üç farklı formda bulunmaktadır. Ana ya da küçük protein, S geninin S bölgesinde kodlanır ve 226 amino asitlik (24 kDa) bir peptid ile glikozillenmiş formundan oluşur. S geninin pre-S2 ve S bölgeleri tarafından kodlanan ortanca (middle, orta) protein 281 amino asitten oluşur (33 kDa) ve pre-S2 bölgesinde ilave bir glikozillenme kısmına sahiptir. 389–400 amino asitten oluşan (39 kDa) büyük polipeptid ise S geninin pre-S1, pre-S2 ve S bölgeleri tarafından kodlanır fakat genellikle pre-S2 glikozilasyon kısmı eksiktir. Enfeksiyon sırasında HBsAg fazla miktarda üretilir ve enfekte olmuş kişilerin kanında spiral ve

tübüler parçacıklar halinde dolaşır. HBsAg, Hepatit B virüsüne maruz kalınmasından 30–60 gün sonra serumda belirlenebilmektedir (62).

22kDa büyüklüğündeki kor protein HBV'nin C geni tarafından kodlanır. C geninin içerdiği pre-kor dizisi HBeAg olarak adlandırılan bir polipeptid kodlar. Kor proteinin proteolitik kesimi ile yaklaşık 17 kDa büyüklüğünde ve viral DNA bağlanma domaini eksik olan HBeAg'nin kesilmiş formları oluşur. Ribozomlarda gerçekleşen translasyonun sonunda kor proteinine göre 29 aminoasit daha uzun olan HBeAg öncül bölgesi oluşmaktadır (Şekil 3). Bu öncül bölgenin 19 aminoasiti sinyal bölgesi görevi görürdüktan sonra C-terminal kısımdaki arjininden kesilmekte ve kalan kısım HBeAg'yi oluşturmaktadır. HBeAg çözünebilir bir protein olduğundan kanda serbest halde dolaşabilir ya da albumin,  $\alpha$ -antitripsin ve immünoglobuline bağlanabilir. HBeAg, kanda dolaşan sağlam viral partiküllerin ve HBV DNA'sının varlığını ortaya koyduğu için güvenilir bir belirteçdir. (4,46,148).



Şekil 3. HBeAg oluşumu (Bkz. EK-3)

HBV replikasyonunun revers transkripsiyon mekanizmasında hata olma olasılığı yüksektir dolayısıyla diğer DNA virüslerinden farklı olarak HBV'de mutasyon oranı 10 kat daha fazladır. HBV enfeksiyonunun doğal gidişatında en önemli seçici güç konakçının immün tepkisidir. Anti-HBe geliştirilmesi ve HBV viremisindeki azalmanın bir sonucu olarak anti-HBe'nin kaçak mutantları seçilir. HBeAg ekspresyonu viral

replikasyon için gerekli olmadığından, virüs HBeAg ekspresyonunu azaltarak ya da tamamen durdurarak anti-HBe immünesinden saklanabilir (148).

HBV'nin A-H şeklinde gruplandırılan sekiz farklı genotipi bulunmaktadır. Bu gruplandırmada karakteristik coğrafik dağılımlar rol oynamaktadır. Ülkemizde D genotipi baskındır (37).

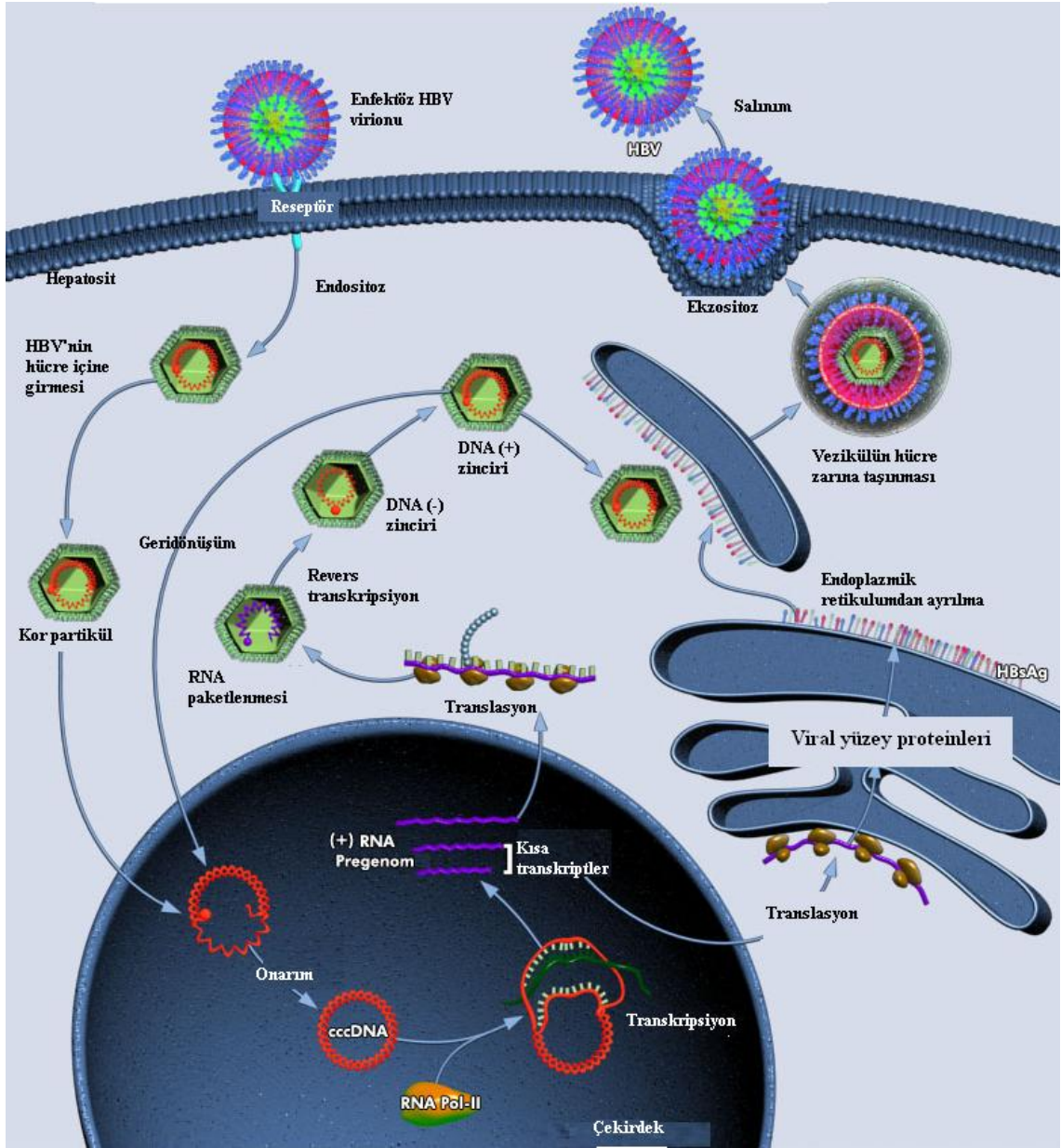
HBV genomunun prekor bölgesinde prekor mutasyonlar veya kor-promoter mutasyonları belirlenmiştir. HBV'nin mutant formları ile enfekte olan kişilerde HBV enfeksiyonu görülmesine karşın HBeAg transkripsiyonu veya translasyonu yapılamamaktadır. Bu tip mutasyonlar genellikle virüse yaşamlarının erken dönemlerinde maruz kalmış bireylerde doğal süşun enfeksiyonunu takiben gelişmektedir.

Prekor mutantları, HBeAg serakonversiyonu sırasında açığa çıkmakta ve HBeAg sentezini engelleyen prekor bölgesinde mutasyon taşımaktadır ancak enfektöz viral partikül üretimi devam etmektedir. Prekor mutasyon, 1896. nükleotidin G yerine A olarak değişmesi (G1896A) sonucu HBeAg transkripsiyonunun başlayacağı yerde durdurma kodonu şifrenmesi ile oluşur. Prekor dizisindeki stop kodon mutasyonları sonucu oluşan HBV mutantlarında HBV DNA seviyesi ve serum aminotransferaz aktivitesi yüksektir. Kronik karaciğer hasarı biyopsi ile saptanabilmektedir ancak hasta kanında HBeAg'si belirlenemez. Bu durum, *varyantların enfeksiyonu* olarak tanımlanmıştır (148). Bu tip mutasyon B, C ve D genotiplerinin daha baskın olduğu coğrafik bölgelerde (Asya ve Akdeniz) daha sık görülmektedir. Bu bölgelerdeki kronik hepatit B hastalarının %50'sinden fazlasında bu mutasyon görülmektedir. A genotipinin yaygın olduğu Kuzey Amerika ve Avrupa'da prekor mutasyonunun daha az görülmesinin nedeni, genotip A'da HBV genomunun 1858. C nükleotidiyle 1896. G nükleotidinin küçük bir döngü yaparak birbirlerine tamamlayacak gibi sıkı şekilde bağlı olmasıdır (148). Mutasyon olması ancak her iki nükleotide de mutasyon gerçekleşmesine bağlıdır dolayısıyla A genotipinin yaygın olduğu bölgelerde prekor mutasyonu nadir görülmektedir (81).



Kor-promoter mutasyonları hem HBeAg mRNA'sındaki, hem de kor protein mRNA'sının üretiminden sorumlu promoter üzerindeki nokta mutasyonlarıyla karakterizedir. Kor promoter mutantları transkripsiyonel azalmaya bağlı olarak daha az miktarda HBeAg üretirler (148). En sık görülen kor promoter mutasyonunda A1672T ve G1764A nükleotitleri değişmektedir ve bu durum HBeAg anlatımında düşüşe sebep olurken viral genom replikasyonunu desteklemektedir. Bu virolojik özellikler kor promoter mutantlarının *in vivo*'da daha çok patojenite göstermelerine sebep olmaktadır ve karaciğere daha fazla zarar vermektedir. Akut enfeksiyonda karaciğer hasarında yığılma olması hastalığın fulminant hale gelmesine neden olur. Kronik enfeksiyondaki artan hasar hepatositlerde fibrozu başlatır ve hastalığın karaciğer kanserine dönüşme riskini arttırır (132).

HBV, karaciğer hücrelerine özgü reseptörler aracılığıyla hücrelere girer ve esas olarak hepatositleri enfekte eder. HBV'nin konakçı hücreye bağlanmasında endoneksin karboksipeptidaz, fibronektin, transferin reseptörü, apolipoprotein H, polimerize insan serum albumini, pre-S2 glikan HBV bağlayan faktör, L ve M proteinleri rol alır. HBV, büyük olasılıkla reseptöre bağımlı endositoz yoluyla hücre içine girmekte, ardından viral DNA ile nükleokapsid viriondan ayrılmakta ve işlenmeden konak hücre çekirdeğine taşınmaktadır (Şekil 4). Kısmen çift zincirli ve her iki ucu serbest halde bulunan DNA'nın kısa zincirinin eksik olan bölümü endojen DNA polimeraz tarafından tamamlanır. Bu sırada uzun zincirin 5' ve 3' uçları arasındaki açıklık da onarılarak tümüyle çift zincirli, kovalan, uçları kapalı, sirküler yapıda bir HBV-DNA (cccDNA) meydana gelir (3,34). cccDNA'nın RNA Pol-II ile transkripsiyonu sonucunda ortaya çıkan farklı boyutlardaki transkriptlerin translasyonu ve revers transkripsiyonu ile virüs DNA'sının negatif zinciri sentezlenmiş olur. Negatif zincirin kalıp olarak kullanılması ile pozitif zincir sentezlenerek kısa transkriptlerin translasyonu ile oluşturulan viral yüzey proteinleri birleştirilir ve hücre zarına taşınır, ekzositoz ile hücre dışına salınır.

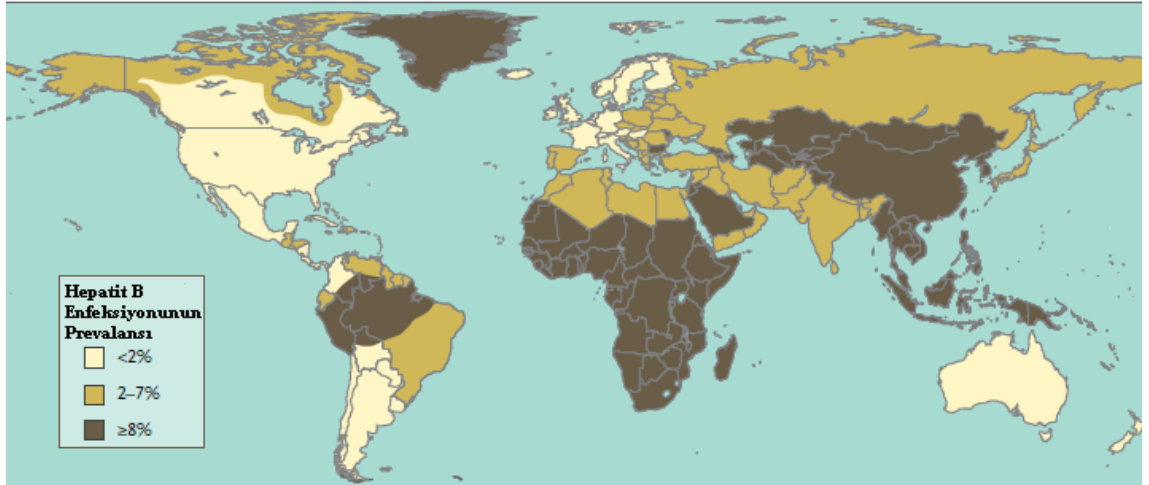


Şekil 4. HBV replikasyonunun evreleri (Bkz. EK-4)

### 2.3. Hepatit B Hastalığının Epidemiyolojisi

Hepatit B virüsü epidemiyolojisi ülkelerin gelişmişlik düzeyi ile paralellik göstermektedir. Gelişmekte olan ülkelerde hepatit B enfeksiyonu gelişmiş ülkelere göre daha sık görülmektedir (39). Dünya, kronik HBV enfeksiyonunun prevalansına göre yüksek, orta ve düşük sıklıkta hastalık görülen bölgeler olmak üzere üç kısma ayrılabilir (61) (Şekil 5). Asya, Pasifik (Japonya, Avustralya, Yeni Zelanda

dışında), Afrika, Amazonlar, Orta Doğu'nun belirli kısımları ve Doğu Avrupa'da bazı ülkelerde yüksek endemik durum görülmektedir. Bu bölgelerde popülasyonun %60-90'ı 40 yaşına gelmeden HBV ile enfekte olmaktadır ve nüfusun %8-20'si HBV taşıyıcısıdır. Çin, Senegal, Tayland gibi ülkelerde bebeklerde enfeksiyon oranı çok yüksektir. Panama, Papua Yeni Gine, Solomon Adaları, Greenland gibi ülkelerde bebeklerde enfeksiyon oranları nispeten düşüktür ancak hastalık erken çocuklukta görülmektedir. Kuzey Amerika, Güney Amerika'nın bazı kısımları ve Batı Avrupa'da endemik durum düşüktür, taşıyıcı oranı %2'den azdır ve popülasyonun %20'sinden azında HBV enfeksiyonu görülür. Belirtilen ülkelerin dışındaki bölgelerde orta dereceli endemik durum görülmektedir (87). Gençler ve erişkinlerin risk altında olduğu bu gruba Türkiye de dahildir (39).



Şekil 5. Dünyada HBV Prevalansı (Bkz. EK-5)

Türkiye'de yapılan epidemiyolojik çalışmalar, Hepatit B'nin hijyen koşullarının kötü olmasından ötürü çocukluk ve gençlik çağında aile ve toplum içinde horizontal yolla alındığını ve 18-20 yaşlarında toplumun taşıyıcılık oranına ulaşıldığını göstermektedir (142). Horizontal yol ile bulaşmanın engellenmesi için HBsAg pozitif bireylerin aile fertlerinin, kalabalık ortamlarda yaşayan bireylerin (öğrenciler, kışla, hapisane) eğitimi ve aşılması önemlidir. Öğrenciler horizontal bulaşma açısından ciddi risk taşımaktadırlar. Kardeşler, akrabalar, arkadaşlar arasında ve özellikle de aynı evde yaşayanlar arasında geçiş söz konusudur. Kalabalık yaşam şartları (yatılı okul,

kışla, hapishane, yurt), kötü hijyen ve düşük sosyo-ekonomik durum HBV'nin bulaşma oranını arttırmaktadır (142).

HBV enfeksiyonu, güvenli ve etkili aşılardan sayesinde 1982'den beri önlenebilir bir hastalık olma niteliği taşımaktadır. Aşı, kronik enfeksiyon gelişimini %95 oranında önlemektedir (46,97). Kronik hepatit B hastalarının dörtte birinden fazlası karaciğer ile ilgili hastalıklardan ölmektedir. 1980'lerin sonlarında her yıl bir milyondan fazla kişi hepatit B nedeniyle kaybedilmektedirken günümüzde bu sayı 250 bine kadar düşmüştür (153). Bunda başarılı şekilde uygulanan aşı kampanyalarının rolü önemli bir faktördür.

#### **2.4. Hepatit B Virüsünün Bulaşma Yolları**

Perinatal bulaşma, yüksek oranda HBV taşıyıcılığının bulunduğu bölgelerde en önemli bulaşma yoludur (Tablo 1). Taşıyıcı anneden çocuğa geçiş genellikle doğum sırasında veya doğumdan sonra HBV ile enfekte maternal sıvılarla bebeğin teması sonucu olur. HBV plasentadan geçemez dolayısıyla anne ve fetüs arasındaki bariyerde herhangi bir yırtılma olmadığı takdirde fetüsü enfekte edemez. Doğum sırasında bulaşma cilt sıyrıkları, mukoza penetrasyonu, vajinal kanaldan geçiş sırasında anne kanının yutulması, sezeryan sırasında anne kanıyla temas ile plasenta hasarı sonucu fetüs ile maternal dolaşımın karışması gibi nedenlerle ortaya çıkar (50). Yenidoğan döneminde virüsün alınması, immün sistemin henüz gelişmemiş olması nedeni ile sıklıkla kronikleşme ile sonuçlanmaktadır.

Düşük endemisite bölgelerinde uyuşturucu bağımlıları, sağlık personeli, polis, çamaşırhane personeli ve enfekte kan ile sık temas eden diğer meslek gruplarında da bulaşma görülür. HBV temasta bulunduğu herhangi bir yüzeyde yaklaşık bir hafta canlı kalabilir ve bu süreç içerisinde virüs enfekte etme özelliğini kaybetmez. HBV deriyi ya da mukoz membran bariyerini geçemez. Bu bariyerdeki herhangi bir sıyrıma, önemsiz gözüke de, virüsün taşınması için yeterlidir. Sağlık çalışanları, özellikle cerrahlar, patologlar, diş hekimleri ile hemodiyaliz üniteleri ve onkoloji üniteleri çalışanları bu

yolla HBV ile enfekte olma açısından yüksek riske sahiptirler. Sağlık çalışanlarında kanla temasın arttığı ölçüde risk de artmaktadır. Donörlerin taranması ve kanın viral inaktivasyonu neticesinde HBV'nin kan ve kan ürünleri ile geçişi azalmıştır.

HBV taşınımının bir diğer yolu ise erken çocuklukta hastalığın çocuktan çocuğa kan yoluyla bulaşmasıdır (61). Akut HBV hastalarının tamamında HBeAg pozitifdir. HBeAg-pozitif kişilerde yüksek derecede enfekte virionlar ve HBV DNA'sı bulunmaktadır dolayısıyla dikkat edilmeden kan ya da vücut sıvılarıyla temas edilmesi enfeksiyonun bulaşmasına neden olacaktır. Cinsel yolla bulaşma, tüm endemisite bölgeleri için geçerli olmakla beraber düşük endemisite bölgeleri için daha önemli bir bulaşma yoludur. Homoseksüeller arası cinsel temas HBV için en riskli cinsel bulaşma şeklidir. Çok eşli ve cinsel yolla bulaşan başka hastalığı olan kişilerde risk daha fazladır. HBV enfeksiyon riski partner sayısının artmasına paralel olarak artmaktadır.

**Tablo 1.** HBV'nin bulaşma yolları ve ilgili risk gruplarının özetlenmesi

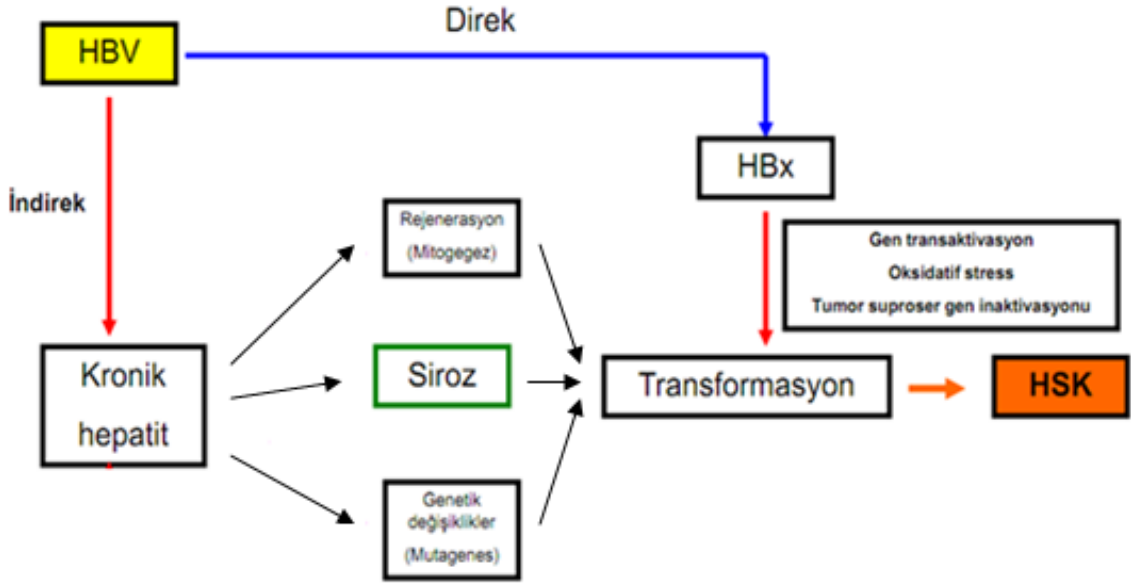
<p style="text-align: center;"><b>Perinatal bulaşma</b></p> <p style="text-align: center;">-HBV taşıyıcısı annelerin bebekleri</p> <p style="text-align: center;"><b>Perkütan (parenteral) bulaşma</b></p> <p style="text-align: center;">-Hemodiyaliz hastaları</p> <p style="text-align: center;">-Damar içi uyuşturucu bağımlıları</p> <p style="text-align: center;">-Dövme yaptırnanlar</p> <p style="text-align: center;">-Sağlık personeli</p> <p style="text-align: center;">-Çoğul transfüzyon yapılan hastalar</p> <p style="text-align: center;"><b>Cinsel temasla bulaşma</b></p> <p style="text-align: center;">-Erkek eşcinseller</p> <p style="text-align: center;">-HBV taşıyıcılarının cinsel partnerleri</p> <p style="text-align: center;">-Çok partnerli heteroseksüeller</p> <p style="text-align: center;"><b>Horizontal bulaşma</b></p> <p style="text-align: center;">-Kötü hijyen ve düşük sosyoekonomik durum</p>
---

## 2.5. Hepatit B Patogenezi

Hepatit B virüsünün enfekte ettiği tek tür insandır. Virüs hepatotropik olmasına rağmen viral partiküller çeşitli dokularda ve vücut sıvılarında da bulunmaktadır. HBV karaciğer hücrelerine direkt olarak sitotoksik etkide bulunmamaktadır ancak konakçının virüse immunolojik tepkisi sonucunda hepatositlerde hasar meydana gelmektedir (121).

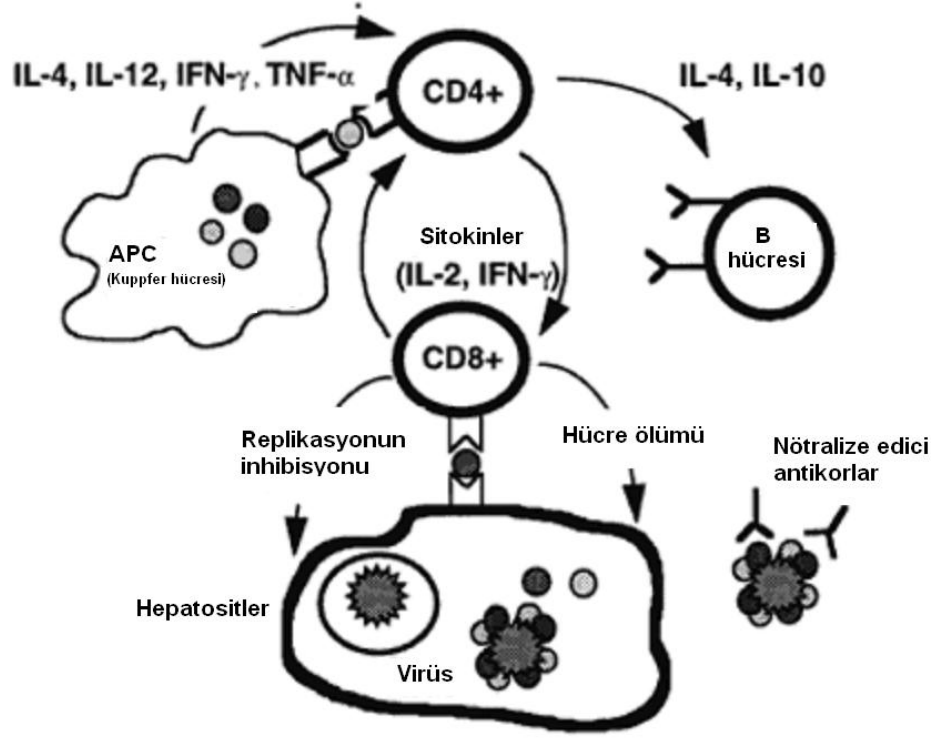
HBV enfeksiyonuna tepki olarak ortaya çıkan immunolojik olaylar arasında sitokin üretimi (alfa ve gama interferonlar), sitotoksik yanıt (doğal öldürücüler (NK), sitotoksik T-hücresi ve antikora bağımlı hücre sel sitotoksikite) ve T-helper yanıtı bulunmaktadır. Virüse verilen yanıt sonucunda vücutta antikor üretimi başlamaktadır. T-hücresi yanıtındaki bozukluklar kronik HBV enfeksiyonuna neden olmaktadır (102). Kronikleşme, temelde hastanın hangi yaştaiken enfeksiyonu kaptığına bağlıdır.

Kronik HBV enfeksiyonu; karaciğer hücrelerinin nekrozunu ve enflamasyonunu sıklıkla tetiklemekte, genlerde cis- ve trans- aktivasyonu destekleyerek hepatoselüler karsinomaya (HSK) yol açmaktadır (43). HBV enfeksiyonunun hepatokarsinojenez üzerindeki etkisini açıklamak için birçok teori ortaya atılmış olsa da henüz detaylı bir mekanizma belirlenememiştir. Bazı HBV hastalarında siroz yokken dahi HSK gelişebilmektedir, dolayısıyla HBV'nin direkt kanserojen etkisi olduğu düşünülmektedir. HBV'ye bağlı HSK geliştiren hastalarının birçoğunda, HBV genomunun hücrenin DNA'sına entegre olduğu görülmüştür (73) (Şekil 6). HSK oluşumunun indirekt mekanizmasında kronik hepatiti takip eden siroz, mutagenез ve rejenerasyon sonucunda hücrelerin transformasyonu söz konusudur. Bu durum oksidatif stres, ilgili genlerin transaktivasyonu ve tümör supresor genlerin inaktivasyonu ile sonuçlanarak HSK'ya neden olmaktadır.



Şekil 6. Hepatit B virüsünün hepatoselüler karsinomya (HSC) neden olması (Bkz. EK-6)

Yenidoğan enfeksiyonlarının %90'ından fazlasında kronik enfeksiyon görülürken, erişkinlerin yalnızca %5'inde hastalık kalıcı hale gelmektedir. Hücrel bağışıklık sisteminin henüz gelişmemesi ya da bağışıklık tepkilerinin baskılanması yenidoğanları daha savunmasız bırakmaktadır. Enfektöz virionların inokulasyonunu takiben 1-6 ay içinde konakçının kan dolaşımında HBsAg görülmektedir. Akut faz adı verilen bu dönemde kanda yüksek oranda virus bulunmaktadır ve bulaşıcılık çok fazladır. Bu fazda, HBV'nin anneden çocuğa dikey olarak geçme riski oldukça yüksektir (19). Hamileliğin son üç aylık döneminde aşılama olmadığı takdirde akut HBV'nin fetüse taşınma olasılığı %78'dir. Daha büyük çocuklarda ve erişkinlerde virüs üretimi HBV'ye özgü CD8+ ve CD4+ lenfositleri tarafından sitolitik ve nonsitolitik mekanizmalarla engellenmektedir (122) (Şekil 7).



Şekil 7. HBV virüsünün vücuttan temizlenme mekanizması (Bkz. EK-7)

Virüsün hepatosite girmesinden sonra HBV enfeksiyonu, bazı immünolojik belirteçlerin belirlediği dört evrede gelişir. Birinci evre immunotolerans ile karakterize edilmektedir. Bu dönemde hastalık asemptomatiktir ve HBV DNA'sı ile HBsAg'si yüksek titrelerde bulunmasına karşılık transaminaz seviyesi normal ya da az derecede yüksektir. Bu evrede HBeAg/Anti-HBe serokonversiyonu nadiren görülür. Hepatositlerdeki HBcAg yalnızca hücre çekirdeği içine yerleşmiştir ve karaciğer biyopsisinde normal ya da minimal bulgular elde edilmektedir. İkinci evrede aktif, semptomik hepatit mevcuttur. İlk evreye göre HBV DNA ve HBsAg titreleri daha düşük olmakla birlikte hala pozitifdir ve bu evrede transaminaz seviyesi yükselmiştir. İkinci evrede HBcAg çekirdeğin dışında hepatosit sitoplazmasında da gözlenebilmektedir. Hastaların büyük kısmından alınan kan örneklerinde HBeAg'nin varlığının sürdüğü görülmektedir. Biyopside belirgin enflamatuvar bulgular elde edilebilmektedir. Üçüncü evrede konakçı immün yanıt geliştirmektedir. Bu evrede HBsAg halen pozitifken HBeAg ve HBV DNA negatif hale gelmektedir. Üçüncü evrede hepatositlerde HBcAg görülmezken sitoplazmada HBsAg mevcuttur.



Transaminaz seviyesi ikinci evreye göre daha düşüktür ve karaciğer biyopsilerinde nekroenflamatuvar aktivitede azalma görülmektedir. Dördüncü evre virüsün kandan temizlenmesi ve bağışıklığın tam olarak oluşmasıyla karakterizedir. HBsAg (-), anti-HBs (+), HBV-DNA (-), anti-HBc (+), HBeAg (-), anti-HBe (+) olup transaminazlar normaldir (2).

HBV enfeksiyonunun akut ya da kronik olmasının belirlenmesinde sitotoksik T lenfositleri (CTL) yanıtı kilit rol oynamaktadır. Daha önce viral temizlenmenin virüse özgü CTL'ler aracılığıyla sitolitik yoldan yürütüldüğü düşünülürken son yıllardaki çalışmalar virüse özgü CTL'lerin karaciğerde hücreyi öldürmeden bazı sitokinler aracılığıyla HBV replikasyonunu durdurabildiğini göstermiştir. Virüsün immün sistem elemanlarından kurtulmak için iki temel yol izlediği düşünülmektedir. Birincisinde virüs antijenik değişim, immün sistemden korunmuş yerlerde saklanma gibi yollarla T hücreleri tarafından tanınmaktan kurtulmaktadır. İkincisinde ise Th1 sitokin işlevselliğindeki azalma ya da virüse özgü T hücrelerindeki duyarsızlaşma sonucu konakçının immün cevabında baskılanma söz konusudur. Bu noktada HBV enfeksiyonunun devamlılığı ve konakçının immunogenetik yapısı arasındaki bağlantı üzerinde durulmaktadır (31).

## **2.6. Hepatit B Serolojisi**

### **2.6.1. HBsAg**

HBsAg yüzey antijeni pozitif bulunan bir kişi ya akut bir B hepatit geçirmektedir, ya kronik bir hepatit durumu söz konusudur ya da taşıyıcıdır. Bu olasılıklardan hangisinin mevcut olduğu ancak yapılacak testlerle ortaya koyulabilmektedir. HBsAg açısından pozitif olan bir kişide viral replikasyonun mutlaka sürmekte olduğu sonucu çıkarılmamalıdır. Bazı çalışmalarda asemptomatik taşıyıcılarda HBsAg pozitif olduğu halde, infeksiyöz virüs partiküllerinin bulunmadığı gösterilmiştir. Böyle olgularda, hepatit B viral genomunun karaciğerde hepatositler içine tamamen ya da kısmen entegre

olarak, karaciğer hücreleri tarafından HBsAg üretiminin sürdürüldüğü düşünülmektedir (130).

HBsAg sıklıkla serumda bulunmaktadır. Ancak tükürük, süt, beyin omirilik sıvısı (BOS), semen, vaginal sekresyon gibi vücut sıvılarında da daha düşük konsantrasyonlar bulunabilmektedir. Genellikle, Hepatit B virüsü ile teması izleyen dönemde, henüz transaminaz düzeyinde artış olmadan inkübasyon döneminin sonuna doğru (ortalama 75 gün), semptomlar belirmeden 2-7 hafta önce serumda HBsAg'yi saptamak mümkündür (Şekil 8). Aynı dönemde, viral replikasyona işaret eden göstergeler (HBV-DNA, HBeAg) de kanda belirmektedir. Bu ilk dönemde hastalık çok bulaşıcıdır. HBsAg'nin serumda pozitif olarak saptanmasından yaklaşık dört hafta sonra klinik hepatit tablosu ortaya çıkmaktadır. HBsAg, yaklaşık üç ay pozitif olarak saptanabilir. Daha uzun süreli HBsAg pozitifliği genellikle kronik HBV enfeksiyonu yönünden izlemeyi gerektirir (Şekil 8) (77). Bazı vakalarda ise HBsAg'nin altı ay, hatta dokuz ay kadar pozitif saptandıktan sonra kaybolduğu da görülmektedir. Genel olarak, HBsAg'nin altı aydan uzun süreli pozitifliği durumunda, hastanın kronik hepatit ya da taşıyıcılık yönünden izlenmeye alınması önerilmektedir (128).

### **2.6.2. Anti - HBs**

HBsAg'nin kaybolmasından kısa bir süre sonra, HBsAg'ye karşı oluşmuş antikorlar olan anti-HBs ortaya çıkar. Hastalığın başlangıcından yaklaşık 3 ay sonra kanda anti-HBs belirir (Şekil 8). HBsAg'nin kaybolması ile anti-HBs oluşumu arasında bir süre bulunmaktadır ki, ne HBsAg, ne de anti-HBs'nin pozitif olarak saptanamadığı bu döneme pencere dönemi (window period) adı verilir. Bu dönemde akut hepatit B tanısını koydurabilecek tek serolojik gösterge, anti-HBc IgM pozitifliğidir. Bu süre, 2 hafta ile 1 yıl arasında değişebilir. Eğer kanda anti-HBc IgM'ye bakılmaz ise, akut hepatit B enfeksiyonu gözden kaçırılabilir. Anti-HBs, normal koşullarda bağışıklık ve iyileşmeyi gösterir ve vakaların çoğunda yaşam boyu kalıcıdır. Anti-HBs ile birlikte anti-HBc IgG'nin de pozitif olması Hepatit B sonucu geçirilen bağışıklığı, yalnızca anti

HBs pozitifliği ise aşılama sonucu gelişen bağışıklığı gösterir (131). Ayrıca, HBsAg taşıyıcıların % 10-40'ında da düşük titrede anti-HBs saptanabilmektedir. Bu durumun farklı subtiplerle aynı zamanda enfeksiyon gelişmesine bağlı olduğu düşünölmektedir.

### **2.6.3. Anti-HBc IgM ve Anti-HBc IgG**

Anti-HBc IgM ve IgG, Hepatit B kor antijenine karşı oluşan antikordlardır ve semptomların başlaması ile ortaya çıkmaktadırlar (Şekil 8). Anti-HBc IgM pozitifliği, ortalama 4-8 ay kadar sürmektedir, sonrasında yerini anti-HBc IgG'ye bırakır (113). Anti-HBc IgG yıllar boyu, genelde yaşam boyunca pozitif olarak saptanmaktadır. HBsAg taşıyıcılarında genellikle anti-HBc IgG yüksek titrede devam etmektedir. Anti-HBs pozitifliği ile birlikte, anti-HBc IgG'nin düşük titrelere pozitif olarak bulunmasını çok eskiden geçirilmiş hepatit B enfeksiyonuna bağlayan görüşler vardır. HBsAg kaybolmuş ancak anti-HBs de henüz oluşmamış olan pencere dönemindeki akut hepatit B olgularında hastalığın tanısını koydurabilecek tek serolojik gösterge anti-HBc IgM'dir (Şekil 8).

Anti-HBc IgM'nin akut hepatit B döneminden sonra da ısrarlı olarak pozitif olarak devam etmesi, hastalığın kronikleşmesi yönünde şüphe doğurmaktadır. Kronik HBV enfeksiyonunda da, düşük titrede anti-HBc IgM pozitifliği saptanabilir (23).

### **2.6.4. HBeAg ve Anti-HBe**

HBeAg, virüsün koru içinde bulunan, çözünebilir bir antijendir. Bu nedenle serumda saptanabilmektedir. HBeAg, HBsAg ile yaklaşık aynı dönemde belirir ve 10 hafta kadar pozitif olarak saptanır (Şekil 8). HBsAg'den daha önce kaybolur. HBeAg pozitifliğinin devam etmesi, hastalığın kronikleşeceği yönünde ön bulgulardan birisidir (Şekil 8). HBeAg, viral replikasyonun sürmekte olduğunu ve infektiviteyi gösterir (85).

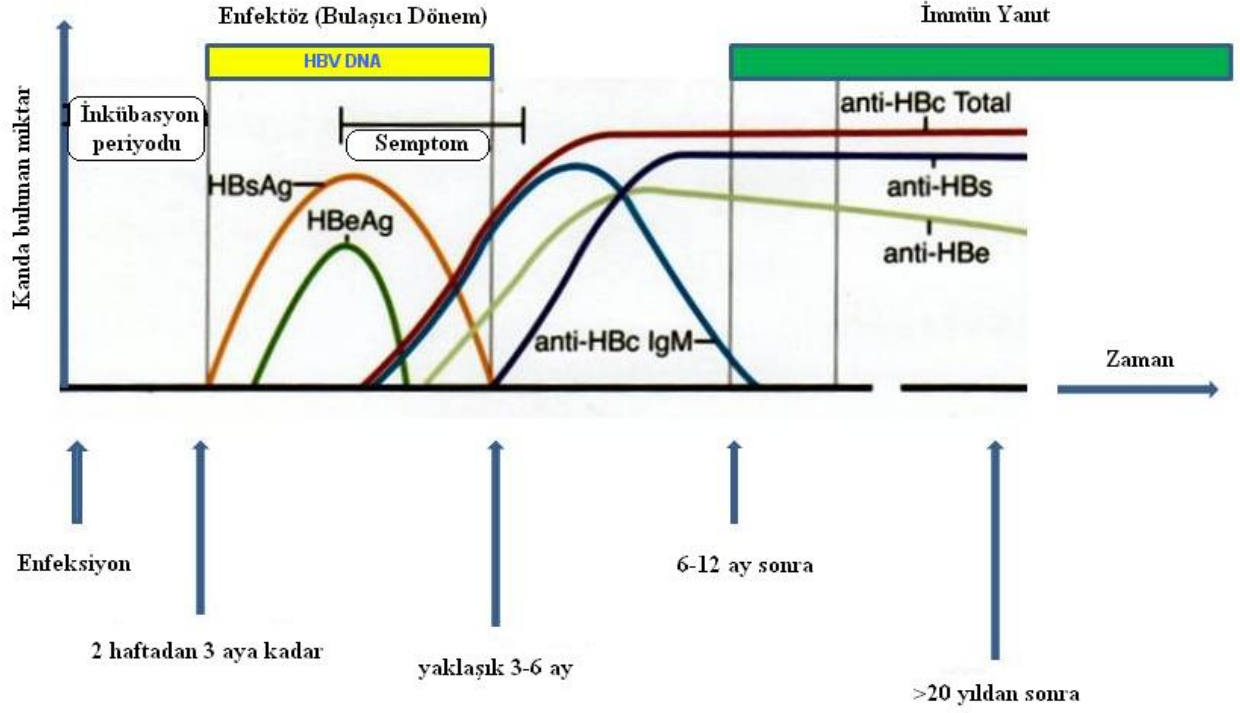
HBeAg'den anti-HBe'ye dönüşüm iyileşme belirtisi olarak kabul edilmektedir. Ancak son yıllarda yapılan bazı araştırmalarda, HBeAg negatif ve anti-HBe pozitif bulunan bazı olgularda serokonversiyon varlığına rağmen, PCR ile HBV-DNA pozitif olarak bulunmuştur. Anti-HBe serokonversiyonuna rağmen vireminin devam etmesi, pre-kor bölgesindeki bazı mutasyonlara bağlanmaktadır (86).

### **2.6.5. Hepatit B Viral DNA (HBV-DNA)**

Son dönemde, Hepatit B'nin kronikleşme seyri hakkında daha açık bir fikre sahip olma gereksinimi başta olmak üzere, Hepatit B tanısı ile ilgili çeşitli durumlarda HBV-DNA'sı araştırılmaktadır. Bulguların ısrarlı olarak Hepatit B'yi düşündürdüğü ancak HBsAg negatif bulunan örneklerde HBV-DNA'ya bakılabilir. HBsAg negatif, anti-HBe pozitif olan ancak ALT düzeyi yüksek seyreden olgularda HBV-DNA bakılabilir (59). Ayrıca, interferon uygulanan hastalarda, tedaviye yanıtın izlenmesi ve doz ayarlaması amacıyla HBV-DNA düzeyine bakılması gerekmektedir. HBV-DNA tayini hibridizasyon ya da PCR (polimeraz chain reaksiyonu) yöntemleri ile yapılmaktadır (96). PCR yöntemi daha duyarlı olup, teorik olarak ortamdaki tek bir genomun bile ölçümünü sağlama yeteneğindedir. PCR yöntemi ile HBV-DNA miktarı defalarca çoğaltılarak ölçülebilir düzeylere ulaştırılmaktadır.

HBV-DNA'nın pozitif bulunması esas olarak aktif virüs ve replikasyon varlığı anlamına gelmektedir. Son dönemde PCR gibi teknikler ile replikatif fazdaki aktif ve komple DNA yerine yer yer çeşitli inaktif DNA parçacıklarının da ölçüme tabi tutulduğu ve bu nedenle, her HBV-DNA pozitifliğinin replikasyon anlamına gelmediği görüşü ileri sürülmektedir (20).

## Kanda bulunan HBV antijen ve antikorları



Şekil 8. HBV maruziyetinden sonraki haftalarda seroloji titrelere göre semptomların değişimi (Bkz. EK-8)

## 2.7. Viral Hepatit B'de Klasik Tablolar Dışındaki Serolojik Bulgular

Hem kişiye ait immün yanıtta faktörlere bağlı olarak, hem de son yıllarda daha ileri tanı tekniklerinin de gelişmesiyle, klasikleşmiş tablolar dışında serolojik seyirlere de rastlanmaktadır.

### 2.7.1. Tek Başına HBsAg Pozitifliği

Bu durum oldukça seyrek görülür. HBsAg (+) serum transfüzyonu yapılan kişilerde görülebilir, Hepatitin erken döneminde de kısa süreli saptanabilir. Ancak

izleyen dönemde kısa sürede anti-HBc IgM ve HBeAg'nin de pozitifleşmesi beklenir. Bu durum gerçekleşmiyor ise, testin güvenilirliği gözden geçirilmelidir (9,78).

### **2.7.2. Tek Başına Anti-HBs Pozitifliği**

Bu durum aşılananlarda, Hepatit B hiperimmüoglobulini uygulananlarda ya da kan veya kan ürünleri uygulananlarda görülebilir. Ayrıca, hiç aşılanma öyküsü olmayanlarda da görülebilir. Bunların, viremi ve replikasyon mevcut olmayan, yalnızca HBsAg pozitifliği bulunan başka bir kişiye ait bir materyal ile temas sonucu aşı gibi antijenik uyarı alarak ortaya çıkabileceği düşünülmektedir (9, 78).

### **2.7.3. HBsAg Negatif Bulunan Hepatit B Olguları**

Araştırmalarda, HBsAg negatif bulunan bazı olgularda, diğer tüm serolojik göstergeler de negatif olmasına rağmen, PCR ile HBV-DNA pozitif olarak bulunmuştur. Bu serumların inoküle edildiği şempanzelerde Hepatit ortaya çıkmıştır. Bu durum, kan transfüzyonları yönünden önemlidir. Çünkü HBsAg negatif bulunan birtakım kanların verildiği olgularda, diğer tüm göstergeler de negatif olmasına karşın, Hepatit B enfeksiyonu ortaya çıkmaktadır. Bu tür olguların ileri araştırmalarında, HBV-DNA pozitif olarak bulunmuştur (9, 78).

### **2.7.4. Tek başına Anti-HBc Pozitifliği**

Bu durumdaki kişilerde diğer antikörleri sentezlemede bir eksiklik söz konusu olabilir. Bu durum, bir transfüzyon sonucu ortaya çıkabilir, ya da yalancı pozitiflik söz konusu olabilir. Ancak tek başına anti-HBc pozitifliği % 10 dolayında görülebilmektedir (9, 78).

### **2.7.5. Anti-HBs Oluşmuş Kişilerde HBsAg'nin Tekrar Ortaya Çıkması**

Ender görülen bir durumdur. Akut viral hepatit B geçirmiş ve bağışıklık oluşmuş kişilerde, çoğunlukla immunosüpresyon uygulanan durumlarda anti-HBs kaybolmakta ve HBsAg tekrardan ortaya çıkmaktadır. Bu durum, Hepatit B viral DNA'sının bazı hücrelerde saklı kaldığı ve uygun ortamı bulunca tekrar replikasyona başladığı şeklinde yorumlanmaktadır (9, 78).

### **2.7.6. Anti-HBs (+), Anti-HBc (+), HBV-DNA (+) Olgular**

Hepatit B geçirildikten sonra ve anti-HBs oluşuktan sonra, beş yıl sonra bile HBV-DNA'nın pozitif olarak bulunduğu bazı olgular saptanmıştır. Çok seyrek olmakla birlikte, anti-HBs pozitifliği durumunda da HBV-DNA pozitifliği gözlenebilmektedir. Ancak böyle bir tablonun nedenleri ve pratikte hangi sonuçlara yol açtığı henüz netlik kazanmamıştır (9, 78).

## **2.8. Hepatit e Antijenine Özgü Monoklonal Antikor Üretimi**

B lenfositleri kemik iliğinden üretilen hücrelerdir ve organizmada antikor üretiminden sorumludurlar. Her bir B lenfosit tek bir antijene, hatta tek bir antijenin bir epitopuna özgü antikor üretir. Sadece bir antijene özgü antikora monospesifik antikorlar ya da monoklonal antikorlar adı verilmektedir. Normal koşullarda antikor üreten B lenfositleri plazma hücresi olarak adlandırılır ve kısa bir yaşam süresine sahiptirler (ortalama 4-5 gün). Ancak antikor üreten B lenfositleri *in vitro* koşullarda hibridoma teknolojisi ile ölümsüzleştirilebilirler. Bu yöntemde B lenfositlerini ölümsüzleştirmek için sürekli bölünme yeteneğine sahip myeloma hücreleri (kemik iliği kanser hücreleri) kullanılmaktadır.

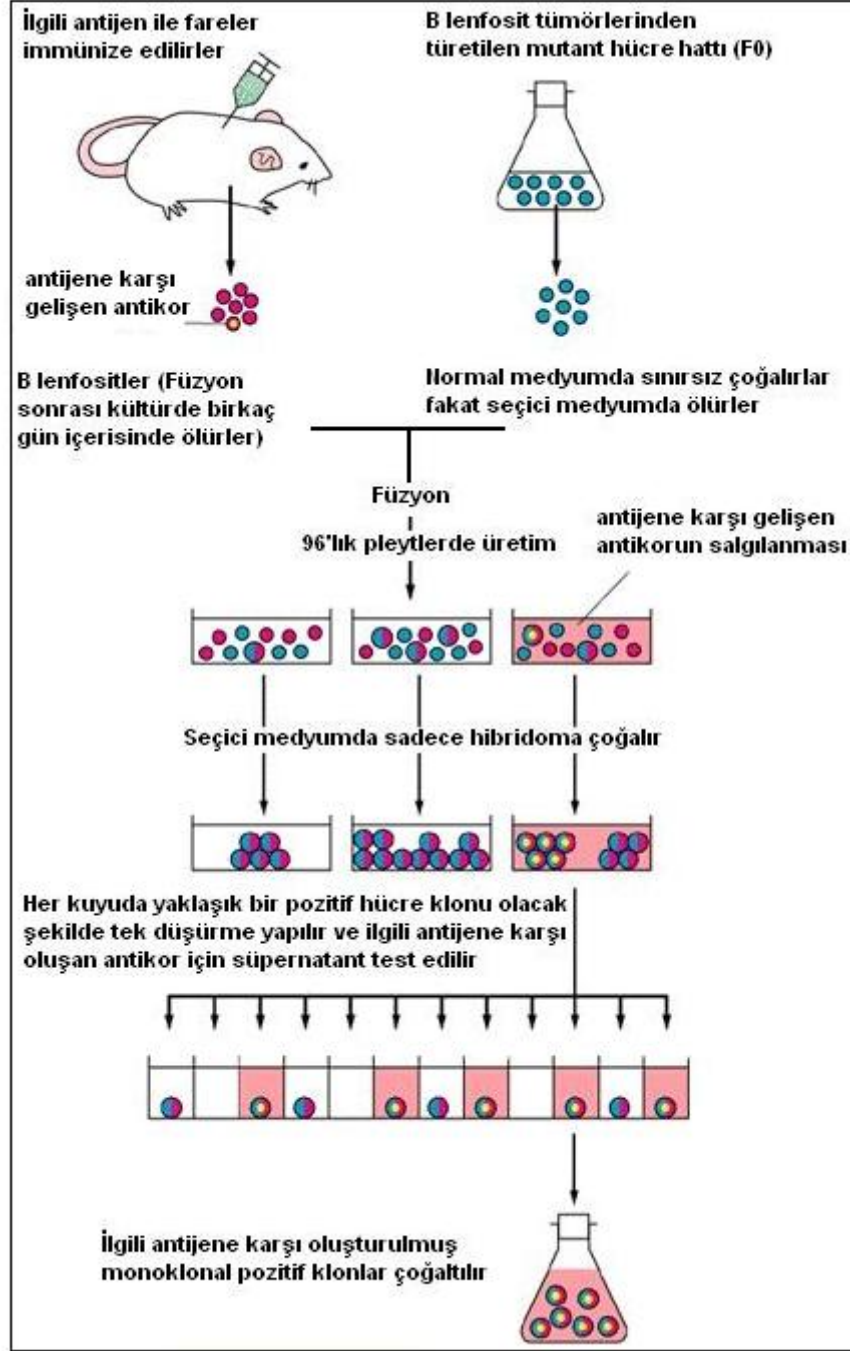
Myeloma hücresi ile antijenlere özgü plazma hücrelerinin yani iki somatik hücrenin sitoplazma ve çekirdeklerinin tamamen birbirine kaynaşması anlamına gelen “hücre füzyonu” ile monoklonal antikor üretimi ilk kez 1966 yılında Sinkovic ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Ancak bu deney tekrarlanamamıştır. Sonraki yıllarda devam eden araştırmalar sonucunda 1973 yılında Georges Köhler ve Cesar Milstein ilk kez mutant fare myeloma hücrelerini, bir antijenle bağışıklanmış deney hayvanının dalak hücresiyle birleştirerek monoklonal antikor üretimi sağlayan “Hibridoma Teknolojisini” tanımlamıştır. Bu yöntemle, B-lenfositlerinin özgül antikor yapıcı özelliği ile myeloma hücrelerinin ölümsüzlük özelliğine sahip hibrit hücrelerin *in vitro* koşullarda, tek bir epitopa karşı yüksek özgünlükte ve sonsuz miktarda monoklonal antikor sentezleyebileceği gösterilmiştir (76,84). 1975 yılında Köhler ve Milstein tarafından gerçekleştirilen bu çalışma 1984 yılında Nobel Tıp Ödülü’ne değer görülmüştür (76).

Hibridoma teknolojisinde, myeloma hücreleri ile istenilen antikoru üreten bağışık bir hayvanın dalak lenfositlerinin “hücre füzyonuna” tabi tutulması sonucunda kompleks bir antijenin tek bir epitopuna karşı monoklonal antikor üreten ölümsüz hibrit (melez) hücreler elde edilmektedir (16). Böylece kısa ömürlü B-lenfositleri hücre kültür ortamında birer antikor üretim merkezine dönüştürülmektedir.

Monoklonal antikor eldesi (Şekil 9) için kolay çoğalabilmeleri, küçük olmaları, bakım ve beslenmelerinin kolay ve ucuz olması ve immünizasyon sonrası iyi immün yanıt vermeleri sebebiyle fareler ve sıçanlar tercih edilmektedir. Antijenik uyarımda diğer soylara göre daha iyi immün yanıtı vermeleri nedeniyle genellikle BALB/c fare genetik soyu kullanılmaktadır. İlgili antijene karşı ortaya çıkan yanıtın yüksek olması için bağışıklanacak hayvanın genç olması (6-8 haftalık) tercih edilmektedir (57). İmmünizasyonlarda kullanılan hayvanlar in-bred olmalarına rağmen farelerin antijenik uyarıma karşı geliştirdikleri immün yanıt birbirinden farklı olabilmektedir. Bunun yanı sıra immünizasyon süresi içerisinde hayvanlar stres, şok ve çeşitli çevresel etkilerden dolayı ölebilmektedir. Dolayısıyla bu gibi aksaklıkları önlemek için immünize edilecek hayvan grupları genellikle 3-5 adet fareden oluşturulmaktadır. Monoklonal antikor



çalışmalarının başlangıcında istenilen antijene karşı antikor üretimini sağlamak için fareler belirli dozlarda antijen ile immunize edilerek en yüksek düzeyde bağışıklanan fare indirekt ELISA yöntemi ile seçilir. Antikor titresi iyi olan farenin dalağında ve lenf düğümlerinden antikor üreten B lenfositleri izole edilir, aynı zamanda *in vitro* koşullarda hücre kültürü ortamında yine BALB/c kökenli myeloma (kanser) hücreleri çoğaltılır. İmmünizasyonda BALB/c soyu fareler kullanıldığı için myeloma hücrelerinin de BALB/c kökenli olması çalışmanın verimini artırır. Farklı türlere ait hücrelerden kökenlenen hibrit klonları kromozom kayıplarına uğrayacakları için devamlı karakter değiştiririler ve antikor sentezleme kapasiteleri azalır. Hibridoma çalışmalarında kullanılan tipik mutant hücre soyları SP2/0-AG14, P3X63Ag8.653, S194/5.XXO.BU.1 ve F0'dır. Bu myeloma hücre soylarının hepsi BALB/c temellidir; immunoglobulin salgılamamakta ve yaygın olarak füzyon için kullanılmaktadırlar (32,138).



Şekil 9. Monoklonal antikor elde edilmesi (Bkz. EK-9)

Füzyon çalışmalarında hücreleri birleştirici ajan olarak polietilen glikol (PEG) kullanılır. Füzyona tabi tutulmuş hücreler kültür plaklarında 10 gün seçici HAT (hipoksantin aminopterin timidin) kültür ortamında inkübe edilerek füzyon oluşturamamış hücrelerin ölmesi beklenir. Füzyondan sonra hücre kültürü ortamında; B

lenfosit+B lenfosit hibrit hücreleri, myeloma+B lenfosit hibrit hücresi, myeloma+myeloma hibrit hücresi, füzyona uğramamış B lenfosit hücreleri, füzyona uğramamış myeloma hücreleri ve diğer hücreler bulunmaktadır. Sürekli olarak monoklonal antikor üretme yeteneğine sahip olan myeloma+B lenfosit hibrit hücrelerinin kültür ortamındaki diğer hücrelerden ayrılması için HAT'lı besiyeri kullanılır (138).

Hibridoma hücrelerinin kültür ortamında seçilmesi için myeloma hücrelerinin timidin kinaz (TK) veya hipoksantin guanin fosforibozil transferaz (HGPRT) enzimi negatif olmalıdır. Fare myeloma hücre dizilerinden HGPRT (-) hücrelerinin seçimi için HGPRT aracılığıyla DNA'ya bağlanma özelliğine sahip toksik baz analogları olan 8-azoguanin veya 6-tioguanin kullanılmaktadır. Füzyon işlemi sonrasında kültürde bulunan hücrelerden hibridoma ve myeloma hücreleri dışındaki hücreler yaşam süreleri sınırlı olduğu için ölmektedir. Myeloma hücreleri hibritlerden daha fazla sayıda çoğalacağından hibridomaları özgün olarak seçmek gerekmektedir (8,70).

Aminopterin, nükleik asitlerin biyosentezinde (*de novo* sentezi) dihidrofolat redüktaz enzimini bloke eden bir kimyasaldır (Şekil 10). Hücelere aminopterin uygulanması sonucunda HGPRT'ye sahip normal hücreler hücre dışı hipoksantin ve timidin kaynaklarını kullanarak alternatif yol (salvage) üzerinden nükleotid sentezini (pürinleri yapmak için hipoksantini, pirimidinleri yapmak için timidini) gerçekleştirirler. HGPRT (-) myeloma hücreleri HAT besiyerinde çoğaltıldıklarında DNA sentezleyemediklerinden yaşayamamakta, füzyon sonucu oluşan hibridoma hücreleri ise yaşamlarını sürdürebilmektedirler. Kısacası, HAT'lı ortamda, HGPRT (-) olan myeloma+myeloma hibrit hücreleri ve füzyona uğramamış myeloma hücreleri füzyon sonrası onuncu güne kadar geçen sürede kültürde ölmektedirler. Füzyona uğramamış B lenfositleri ve füzyona uğramış B lenfosit+B lenfosit hibrit hücreleri ölümsüzlük özelliği kazanmadıkları için füzyon sonrası dört veya beşinci günde kendiliğinden ölmektedir (1).



## 2.9. Hibridoma Çalışmalarında Organ olarak Dondurulmuş Dalak ve Lenf Dügümlerinin Kullanılması

Organ yetmezliği vakaları her geçen gün artmakta olup, organ nakli için uygun organ bekleyen hastaların bazılarında kısa zamanda organ nakledilirken bazıları yıllarca beklemek zorunda kalmakta, bazıları ise beklerken yaşamlarını yitirmektedirler. Organ naklindeki temel amaç organ yetmezliği nedeniyle yaşamının sonuna gelmiş bir hastanın hayatını kurtarmak, yaşam süresini ve kalitesini arttırmaktır. Organ naklinde donör (verici) canlı veya ölü (kadavra) olabilir (79). Canlı vericilerden olduğu kadar kadavra vericilerden de böbrek, karaciğer, pankreas, incebağırsak gibi organların nakilleri yapılabilmekte ve nakil yapılan hastalar yaşantılarını sürdürebilmektedir. Ancak nakil tekniklerindeki gelişmelere rağmen dünyada ve yurdumuzda yeterli sayıda organ bağışının olmaması nedeniyle, organ nakli olmayı bekleyen pek çok hastaya organ naklinin yapılamadığı bilinmektedir (103). Tablo 2’de ABD’de bir yıl içinde nakil yapıldığı takdirde kurtarılabilecekken nakil yapılmadığı için kaybedilen kişi sayısı görölmektedir.

**Tablo 2.** ABD’de organ nakli ile önlenebilecek yıllık ölüm sayısı (Bkz. EK-11)

Organ	Organ Nakli ile Önlenebilir Organ Yetmezliği Nedeniyle Ölen Kişi Sayısı (Yıllık)
Kalp	710,760
Akciğer	122,009
Böbrek	37,251
Karaciğer	16,214
Toplam	886,234
Toplam, günde	2,428
Tüm sebeplere bağlı yıllık ölümlere göre yüzde	%36.2

Farklı ülkelerde, birçok araştırmacı tarafından gerek ülke genelinde gerek bölgesel olarak yürütölen çalışmaların sonuçları halkın dinsel, sosyal, kültürel farklılıklarına karşın organ bağışına genelde olumlu baktığını ortaya koymaktadır. Organ bağışı ve nakli konusunda dinin kısıtlayıcı fazla bir etkisinin görölmediği ancak eğitim, cinsiyet ve sosyo-ekonomik düzey gibi demografik özelliklerin rolü olduğu, eğitim ve sosyo-ekonomik düzeyi yüksek olanlar ile erkeklerde organ naklini kabul edenlerin oranlarının diğerlerine göre daha yüksek olduğu bildirilmektedir (124,127,158).

Ölkemizde ise organ bağışı ve nakli konusunda geniş kapsamlı çalışmalara ilişkin bir veri bulunmamasına rağmen, bazı araştırmacıların bölgesel çalışmalar yaptıkları görölmektedir. Bal ve arkadaşları, Uşak ve çevresinde katılımcıların %92.4'ünün organ bağışına genelde olumlu baktıklarını, organ bağışına olumlu bakmayan bireylerin dahi bir başkasının organı ile yaşama fikrine olumlu baktıklarını, katılanların %65'inin organ bağışının nereye ve nasıl yapılacağını bilmediklerini belirtmektedirler (10). Gürpınar, Trabzon ve çevresinde toplumun %62.8'nin organ bağışına olumlu baktıklarını bildirmektedir. Gürpınar, böbrek nakli başta olmak üzere kornea, karaciğer, kalp ve kemik iliği nakillerinin toplumun büyük bir kesimi tarafından bilindiğini, çevresinde organa gereksinim duyan kişiler olan katılımcıların bilgilerinin daha fazla olduğunu belirtmektedir (22). Organ bağışlamayı düşünmeyenlerin (% 37.2), % 33.3'ü dini ve geleneksel nedenleri gösterirken, %41.3'ü hiçbir neden göstermemiştir. Korku ve konu hakkında bilgisi olmama diğer nedenler olarak gösterilmiştir (22).

1949 yılında Polge ve arkadaşları tarafından gliserolün donmaya karşı koruyucu etkisi olduğunun belirlenmesinden itibaren insan hücre ve dokularının dondurulması fikri büyük ilgi görmüştür (115). Dondurma (kryoprezervasyon) canlılığın devamlılığının sağlanabilmesi amacıyla hücre, doku veya organların özel işlemler sonrasında çok düşük sıcaklıklarda muhafaza edilmesidir. -196°C'deki sıvı nitrojende tüm kimyasal reaksiyonlar, biyolojik işlemler, fiziksel hücre içi ve hücre dışı aktiviteler duraklatılmaktadır (42). Teorik olarak, dondurma işleminden geçmiş bir organ zaman sınırı olmaksızın saklanabilmektedir. Günümüzde dondurma konusunda ulaşılan noktada homojen hücre popölasyonlarının ya da tek katmanlı dokuların dondurulması

için optimum koşulların belirlenmesi ve dondurulan hücrelerin çözünmesiyle yeniden aktif hücre eldesi mümkündür (136,143). Ancak kompozit dokuların ve organların bütün olarak dondurulması konusunda henüz tam anlamıyla başarı elde edilememiştir.

Homojen hücre gruplarında, dondurma işlemi ile hücrelerin üç boyutlu yapısı sabitlenerek tüm kimyasal reaksiyonlar durdurulmaktadır ancak bu işlemin asıl amacı birçok dokudan oluşan kompozit organlarda dıştan içe her doku bileşeni için uygun dondurma koşulunu sağlamaktır. Organdaki farklı hücresel bileşenlerin dondurulmasındaki asıl problem doku matriksinin üç boyutlu yapısının hem dondurma, hem de çözünme esnasında korunmasını sağlayacak uygun kryoprezervatifin ve uygun koşulların belirlenmesinin güçlüğüdür (93). Kryoprezervatiflerin söz konusu dokular için özel olması, dokuyu oluşturan hücrelere giriş ve çıkış yollarının bilinmesi ve hücreler için toksik etki yaratmaması gerekmektedir (82).

0°C ile -25°C arasında hücrelerin enzimatik aktiviteleri yavaşlamakta ancak tamamen durmamakta, -40°C'nin altında ise fizyokimyasal değişimler tamamen durdurulmaktadır. Hücrelerin kryoprezervatiflerin varlığında dondurularak daha uzun süre saklanabilmeleri için sıcaklığın -130°C'nin altına düşürülmesi gerekmektedir. Ancak normal koşullarda canlılığını +37°C'de sürdüren hücrelerin, -196°C'deki başka bir ortama alınması hücre içindeki suyun %95'inin kaybolmasıyla hücre içi ve hücre dışındaki ortamda elektrolit konsantrasyonunda değişiklik meydana gelmesine (35,125), hücre içinde buz kristalleri oluşması ile hücrelerin baskılanmasına ve hatta hücre içindeki yapıların zarar görmesine sebep olmaktadır.

Düşük sıcaklıklarda hücre zarının geçirgenlik katsayısı değişmekte, bu durum da sitoplazmik su kaybına (dehidrasyon) sebep olmaktadır. Dehidrasyon iki tür hücresel lezyonla sonuçlanabilmektedir. Birincisinde dehidrasyon ile hücre dışındaki tuz konsantrasyonu artar ve ortamdaki değişiklik hücre zarının büyük kısmını oluşturan protein ve lipoprotein komplekslerinin yapısına zarar verir. İkinci durumda ise tampon görevi gören tuzların kristalizasyonu pH değişikliğine neden olur ve önemli işlevleri olan birçok protein denature olur (92). Mazur ve arkadaşları, sıvı transferinin yalnızca

zarlar arası bir geçişten ibaret olmadığını, asıl problemi zar yapısındaki değişikliklerin oluşturduğunu göstermişlerdir (114,146).

1950'lerin sonlarında Smith ve Farrant Gine domuzunun uterusunu *in vitro* ortamda dondurup ardından erittiklerinde uterusu kasılma olduğunu belirlemiş ancak bu organ ile nakil denemesi yapmamışlardır (134). Hamilton, Holst ve Lehr ise 1973'te köpek bağırsağının belirli parçalarını sıvı nitrojende dondurup çözdükten sonra nakil yapıldığında bu parçalardan bazılarının uzun süre hayatta kaldığını göstermiştir (55). 2002'de rat yumurtalıklarının bütün halde dondurulduktan sonra çözünmesi ve vasküler anastomozu ile nakli sonrasında nakledilen yumurtalıklardan çok azının canlı kaldığı, bunlardan birinin ise olgun yumurta oluşumunu sağlayarak yavrulamada etkili olduğu rapor edilmiştir (157). Ancak kemirgen yumurtalıkları vasküler anastomoz olmasa dahi dondurma, çözme ve nakil işlemlerine dayanabildiğinden bu çalışma organların bütün olarak dondurulması konusunda uygun bir model değildir (54,58). Özellikle son yirmi yılda üreme tıbbı, hayvan besiciliği ve nesli tükenmekte olan hayvan türlerinin korunması gibi alanlarda organların dondurulması üzerinde yoğun şekilde çalışılmış ve bu çalışmalar ile organların dondurulması konusunda gelişme kaydedilmiştir (41,45,49,53,65,72,164). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda hayati öneme sahip herhangi bir organ (özellikle kalp, karaciğer ya da böbrek) dondurma, çözme ve nakil işlemleri sonrasında işlevsellik göstermemiştir (109). Bu başarısızlığın birçok nedeni vardır ancak en önemlisi damar hasarıdır (63,108,116). Köpek bağırsağı ile yapılan deneyde de kuşkusuz damar hasarı görülmektedir ancak bu durumun doku üzerinde oluşturduğu basınç perfüzyonu engelleyecek düzeyde olmadığından telafisi mümkündür. Hayati organlarda damar hasarı kalıcı damar tıkanıklığına ve doku nekrozuna yol açmaktadır dolayısıyla bu durumun önüne geçilmeden organda işlevsellik söz konusu değildir.

Bu tez çalışmasında organ dondurma alanına hizmet eden çalışmalar gerçekleştirilmiş, ilk defa bütün halde dondurulmuş organlar (dalak ve lenf düğümleri) kullanılarak hibridoma teknolojisi ile çözünme sonrasında dahi antikor üretebilen ve çoğalabilen B lenfositlerinin varlığı gösterilmiştir. Düşük moleküler ağırlığı (17 kDa) ve



HBeAg ile ortak protein yapısı nedeniyle HBeAg'ye karşı monoklonal antikor geliştirilmesi zordur dolayısıyla HBeAg oldukça kıymetli ve pahalıdır (1mg liyofilize HBeAg ~3000\$). Monoklonal antikor elde etmek üzere yürütülecek hibridoma çalışmalarında immünizasyonlar genellikle en az dört fare ile başlatılmaktadır. Buradaki amaç, söz konusu antijene karşı etkin antikor yanıtı elde etme olasılığını arttırmaktır. Bir fare ile gerçekleştirilen füzyon çalışması ortalama 3-4 ay sürmektedir. Füzyon sonrası antikor üreten hibrit hücrelerinin belirlenmesi çalışmalarının zor olması ve uzun zaman almasından dolayı genellikle aynı anda birden fazla füzyon çalışması tercih edilmemektedir. Ayrıca bu süreçte diğer immünize fareler yaşlanmakta ve çalışmalarda kullanılamaz hale gelmektedirler. Füzyon deneyi sonucunda bulunan antikor üreten hibrit hücrenin devamlı kültürlerde çoğaltılmasının başarı oranı düşüktür ve pH, sıcaklık, nem, besiyeri gibi birçok koşula bağlıdır.

Bu çalışmada HBeAg ile immünize edilen farelerin dalak ve lenf düğümleri bütün organ olarak dondurulmuş ve dondurulmuş organlardan elde edilen hücrelerle hibridoma çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde hem zaman kaybının, hem de hücre materyallerinin boş yere harcanmasının önüne geçilecek, füzyonun istenilen zamana ertelenmesi mümkün olacaktır. Klasik hibridoma yönteminde immünize farelerden lenfositler taze olarak izole edilerek myeloma hücreleriyle füzyona sokulmaktadır. Ancak bu çalışmada HBeAg ile immünize edilen farelerin dalak ve lenf düğümleri dondurularak farklı zaman aralıklarında çözülmüştür. Dondurulmuş dokulardan izole edilen lenfositler, FO myeloma hücreleriyle füzyona uğratarak antikor sentezleyen canlı hibrit hücre elde edilmiştir. Daha önce çeşitli gruplar dondurulmuş hücrelerden hibridoma hücrelerini üretmiştir (14,89) ancak bu çalışma organ olarak dondurulmuş dalak ve lenf düğümlerinden elde edilen lenfositler ile antikor üreten hibrit hücreler elde edilmesi açısından dünyada ilktir.

## 2.10. Yüzeyinde Hepatit B e Antijeni Eksprese Eden M13 Fajla Yapılan İmmünizasyonlar Sonrası Monoklonal Antikor Geliştirilmesi

Antijenler, doğal kaynaklardan izole edilebildikleri gibi biyokimyasal ve biyosentetik kaynaklar ile rekombinant DNA teknolojilerinden faydalanılarak da saf olarak üretilebilirler. Antijenler genellikle küçük polipeptitlerdir (<10 kDa) ve bu boyut immün yanıt oluşturulması için yeterli olmayabilmektedir, dolayısıyla antijenler çoğunlukla immünojenik taşıyıcı proteinlere konjuge edilerek daha iyi immünojenler haline getirilmektedir. Bir antijene karşı etkin hümorale yanıt elde edilmesinde antijenin niteliği kadar aşı veya immünizasyonlarda kullanılan adjuvantların seçimi de önem taşımaktadır.

Aşılar; zayıflatılmış veya ölü bakteri ve virüs aşuları, mikroorganizmaların ürünleriyle hazırlanan aşular ve yeni geliştirilen aşular (rekombinant vektör aşuları, sentetik peptit aşuları ve DNA aşuları) olmak üzere dört farklı grupta incelenebilmektedir. Bakteri ve virüslerin zayıflatılması veya öldürülmesi ile hazırlanan aşular saflaştırma işleminden geçirilmediğinden mevcut adjuvant özelliği korunarak aşılanan kişide immün yanıt oluşturmaktadır. Protein sentezi, protein saflaştırılması ve rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmeler daha saf ve özellikleri tanımlanmış antijen üretimine ve bu antijenlerin insan aşularında kullanılmasına olanak sağlamıştır. Ancak aşı antijenlerinin saflaştırılması beklenmedik etki görülme olasılığını azaltırken aşının adjuvant özelliğini de azaltmakta ve dolayısıyla immün yanıt seviyesinde düşüşe neden olmaktadır (152).

Adjuvantlar aşı formülasyonuna katılarak aşı antijenlerinin immünojenitesini arttırıcı etki yapan taşıyıcı maddelerdir. Bir aşının immünojenitesi o aşının, aşılanan kişide immün yanıt ortaya çıkarma yeteneğidir. 1925 yılında Ramon, atlarda difteri antitoksini üretme çalışmasında aşı antijenlerinin immün yanıt oluşturmada adjuvantların destekleyici etkisi olduğunu tesadüfen fark etmiştir (120). 1926'da Glenny ve arkadaşları alüminyum tuzlarının adjuvant olarak kullanılabileceği fikrini

ortaya koymuşlardır (51). ‘Alum adjuvantları’ olarak da adlandırılan bu adjuvantlar dünya çapında lisanslı aşılarda kullanılmasına izin verilen tek adjuvantlardır.

Adjuvantlar antijene karşı immün yanıt oluşturacak hücrelerin aktifleştirilmesinde, immün yanıtın arttırılmasında ve sürdürülmesinde rol oynamaktadır. Bir antijene karşı antikor üretilmesi ve immün yanıtın sürdürülebilmesi için belirli aralıklarla ya da sürekli olarak antijen takviyesine ihtiyaç vardır. Adjuvant, enjeksiyon bölgesinde antijen deposu oluşturarak az miktarda antijenin uzun zamanda salınımını sağlayabilmektedir. Ancak, sürekli salınımın sağlandığı adjuvant formlarında dahi bir noktada antijen miktarı ve dolayısıyla antikor seviyesi azalmaktadır. Bu noktada, tetikleyici doz (rapel) olarak adlandırılan ikinci antijen enjeksiyonu yapılarak hayvandaki immün yanıt arttırılabilmektedir. (29,60,133).

Adjuvant, immün yanıtta rol oynayan çeşitli hücreleri direkt ya da dolaylı yoldan aktifleştirebilmektedir. Tüm emülsiyon adjuvantlarının yapısında bulunan yüzey-aktif maddeler hem yağ-su emülsiyonlarını stabilize etmekte, hem de immün yanıtın ortaya çıkmasında görevli hücrelerin aktivasyonunda yer almaktadır. Birçok bakteri, başta makrofaj olmak üzere immün sistem hücrelerini aktive eden kısımlara sahiptir. Aktifleştirilmiş makrofaj, T ve B hücrelerinin aktive edilmesine yardım etmektedir. Bazı adjuvantlar bakteri, bakteri bileşenleri ya da bakteri bileşenlerinin türevlerini içererek immün yanıt oluşumunda görev almaktadır. Makrofajların uyarılması antikor tepkisinin oluşmasını sağlarken, bu uyarılmanın normalden fazla olması enflamasyona sebep olmaktadır (126).

Adjuvantların antijen sunucu hücreler (APC) ve özellikle dendritik hücreler üzerindeki etkileri araştırılmaktadır (117). Dendritik hücreler aşı antijenlerine karşı immün yanıt oluşturulmasında birincil APC’lerdir ve yalnızca bu APC’ler naif T hücrelerinde antijen sunumu sağlarlar. Bu yüzden, doğal ve kazanılmış immün yanıt arasındaki birincil hücresel bağlantıyı dendritik hücreler sağlamaktadır (117). Mikrobiyal ya da non-mikrobiyal adjuvantlar antijen alımını, işlenmesini ve dendritik hücrelerin çeşitli türlerinde sunumunu desteklemektedir. Örneğin, non-mikrobiyal

adjuvantların bir örneği olan su içinde yağ adjuvant emülsiyonunda antijen içeren yağ damlacıkları makrofajlar tarafından tutularak lenf düğümlerine veya dalağa taşınır ve burada naif T hücrelerinde antijen sunumunu sağlayarak kazanılmış immün yanıtı başlatırlar (36,66,101).

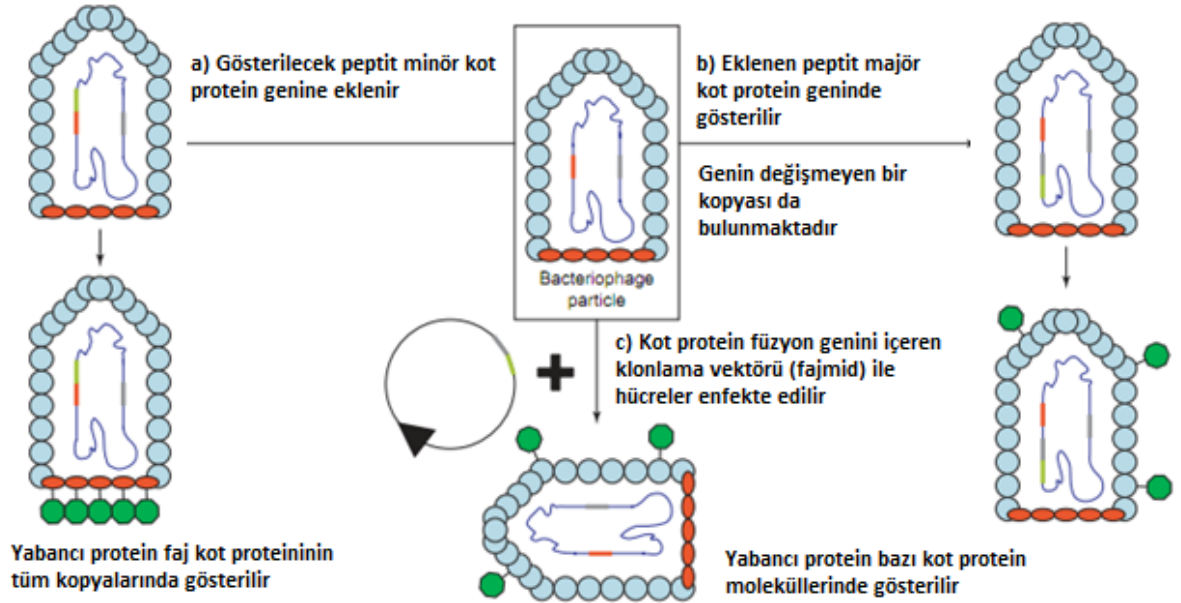
Freund'un Complete Adjuvantı (FCA), Freund'un Incomplete Adjuvant (FIA), Montanide ISA adjuvantı, Ribi'in adjuvant, Hunter'ın TiterMax, alüminyum tuzu adjuvantları, Gerbu adjuvantı, enkapsüle adjuvantlar, bakteri DNA'sındaki metillenmemiş CpG oligodeoksinükleotitleri, sitokin adjuvantları, MF59 adjuvantı, monofosforil lipid A (MPL) adjuvantı, mukozal adjuvantlar aşı üretiminde kullanılan adjuvantlardır. Alüminyum tuzu adjuvantları dünya çapında kullanımda olan lisanslı aşılarla bulunan tek adjuvanttır. Laboratuvar hayvanlarında, düşük miktarda antijen ile yüksek kalitede ve yüksek seviyede immün yanıt elde edilmesi gerekmektedir bu sebeple deneysel çalışmalarda genellikle Freund'un complete adjuvantı tercih edilmektedir (13).

Belirli bir adjuvantı aşıya dahil ederken adjuvant kullanımının faydaları ile adjuvant kullanımının neden olabileceği potansiyel zararlar değerlendirilerek fayda ve zarar dengesi kurulması gerekmektedir. Formülasyonunda adjuvant bulunan aşılarla lokal enflamasyonlar ve apse oluşumu görülebilmektedir (15). Hayvan modellerinde, adjuvantların neden olduğu sistemik reaksiyonlardan bazıları ateş, arjuvant artiriti ve tavşanlarda iridosiklittir (5). İnsanlarda çeşitli gruplarla eş zamanlı olarak yapılan çalışmalarda ortaya çıkması beklenen toksik etkiler görülmemiştir (105). İnsanlarda görülen yan etkiler genellikle ateş ve enjeksiyon bölgesindeki yangından ibarettir. Bu reaksiyonlar adjuvant ve biyolojik olarak aktif aşı antijenleri arasındaki sinerjiden kaynaklanabilmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmeler, alternatif adjuvant geliştirme çalışmalarını başka bir boyuta taşıyarak *faj gösterim (display)* yönteminin bu çalışmalarda daha etkin bir şekilde kullanımına olanak sağlamıştır (83). Bakteriyofajlar yalnızca bakterileri enfekte edebilen virüslerdir, ökaryotik konakçılarda çoğalamamaları

onları bilimsel çalışmalarda kullanılmaları için elverişli hale getirmektedir. Faj partikülü kendi başına bir adjuvant gibi davranmaktadır dolayısıyla immün sistem viral yapıdaki faj partikülünü bir tehlike olarak algılayarak savunma hücrelerini faj üzerine yönlendirmektedir. Bu durumda, faj ile birlikte adjuvant kullanılmasına gerek kalmamaktadır (107). Hayvan aşılama da faj içerikli aşı kullanımının immün yanıtın etkinlik süresini uzattığı ve adjuvantsız aşıya göre belirgin derecede yüksek yanıt oluşturduğu görülmüştür (25,26,48,95).

Faj gösterim yönteminde; gösterimi sağlanacak heterolog peptit ya da proteinin DNA dizisi faj kılıf protein genine yerleştirilerek istenilen proteinin transkripsiyonu ve faj yüzeyinde gösterimi sağlanmaktadır (135) (Şekil 11). Faj gösterim yönteminde M13 ve *Escherichia coli* filamentli fajları ile *E.coli* lambda ve T7 fajları deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (12,159). Fajları saflaştırmak hem kolay, hem de ucuz olduğundan faj gösterimi, istenilen proteinlerin ya da antikorların saflaştırılmasında da tercih edilen bir yöntemdir.



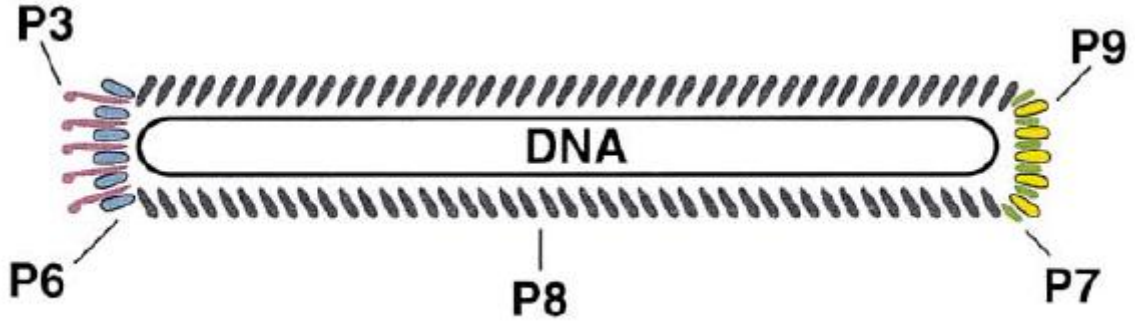
Şekil 11. Faj gösterim yöntemi (Bkz. EK-12)

Faj gösterimi kütüphanelerinin çok çeşitli kullanım alanları bulunmaktadır. Örneğin; gösterimi sağlanan peptitler, antikolar gibi hedef proteinlere bağlanma özelliklerinden faydalanılarak izole edilebilir. Bu proteinlerden daha sonra reseptör-ligand etkileşimlerinin inhibisyonunda ya da farklı bir mekanizmada agonist olarak teröpatik fayda sağlanabilir (38). Bu proteinlerin yönlendirilmiş evrimi ile enzimatik aktiviteleri ya da bağlanma özellikleri geliştirilebilir, enzimin aktif bölgesinde rastgele değişiklikler yapılarak tüm kütüphane enzim aktivitesinde artış olup olmadığı yönünden kontrol edilebilir (44). Faj gösterim yönteminin diğer potansiyel kullanım alanları üzerine birçok derleme mevcuttur (12,156,159).

Fajlar aşılama için iki farklı şekilde dahil edilebilmektedir; birincisinde direkt olarak yüzeyinde gösterimi sağlanmış aşı antijenleri taşıyan fajlar ile aşılama yapılmaktadır, ikinci yöntemde ise genomuna DNA aşı ekspresyon kaseti dahil edilen faj partikülleri kullanılmaktadır (24,94). Kılıf proteinine transkripsiyonel yerleştirme yapılmasının yanı sıra, fajlar büyüdükten sonra da faj yüzeylerine istenilen proteinlerin konjuge edilebildiği ve bu yöntemin farklı antijenlerin gösterimine olanak sağladığı belirlenmiştir (100). Faj partikülleri doğal olarak immün sistemi tetiklediğinden (24,74), faj kılıf proteininde bulunan antijen bu doğal adjuvant ile konjuge olacak, immünizasyon öncesi farklı bir taşıyıcı moleküle ihtiyaç duyulmayacaktır.

Yaklaşık 1µm uzunluğundaki ve 10 nm çapındaki M13 *Escherichia coli* bakteriofajı filamentli yapıdadır, tek zincirli DNA korundan ve onu çevreleyen protein yapıdaki kılıftan oluşmaktadır (90) (Şekil 12). Kılıf protein beş farklı proteinden oluşsa da büyük bir kısmını 2700 kopyaya sahip gen-8 majör kılıf proteini (protein-8 ya da p8) oluşturmaktadır (151). Minör kılıf proteinleri olarak adlandırılan diğer proteinler partikül başına 5 kopyaya sahiptir; protein-7 ve protein-9 (P7 ve P9) partikülün bir ucunu, protein-6 ve protein-3 (P6 ve P3) ise diğer ucunu oluşturmaktadır. Tüm kılıf proteinleri fajın yapısal stabilitesinin sağlanmasında önemli rol oynaktadır ancak P3 bunun dışında konakçı hücrenin tanınması ve enfeksiyonu için de gereklidir. P3 en büyük ve karmaşık kılıf proteindir ve üç farklı domainden oluşur (7). N-terminal domaininde enfeksiyon sırasında viral DNA'nın *E.coli*'ye translokasyonu sağlanırken

ikinci domain *E.coli* yüzeyindeki F pilusuna bağlanarak konakçının tanınmasına yardımcı olur (68,137), C-terminal domaini ise diğer faj kılıf proteinleri ile etkileşerek P3'ün faj kılıfı ile birleşmesini sağlar (119).



Protein	Amino asit sayısı	Moleküler ağırlık	Fajdaki kopya sayısı	Gösterim tipi
P3	406	42,500	~5	N C
P6	112	12,300	~5	C
P7	33	3,600	~5	N
P8	50	5,200	~2,700	N C
P9	32	3,600	~5	N

Şekil 12. M13 *Escherichia coli* bakteriofajı ve proteinleri (Bkz. EK-13)

M13 bakteriofajı kullanılarak gerçekleştirilen faj gösterim çalışmalarında genellikle kopya sayısının fazla olması sebebiyle P8 protein ile istenilen protein dizisinin füzyonu tercih edilmektedir. P8 ile yüzeyde gösterimi sağlanan fazla sayıda kopyalı proteinlerin birbirine çok yakın olması gösterimin kalitesini etkilediğinden P8 proteinine eklenen diziler kısa olmalıdır (6-8 amino asitlik). P3 proteininde ise böyle bir problem yoktur, istenilen proteinin tüm dizisinin faj yüzeyinde gösterimi sağlanabilir. Ancak bu durumda da P3 proteini 5 kopyaya sahip olduğundan yalnızca 5 kopya ile gösterim olmaktadır (71).

Bu tez çalışmasının ikinci bölümünde HBeAg M13 bakteriyofajına klonlanarak faj yüzeyinde tüm HBeAg'nin gösteriminin sağlanması istendiğinden P3 proteini ile birlikte ekspresyonu sağlanmıştır. Daha sonra BALB/c fareleri HBeAg'yi eksprese eden rekombinant fajlarla immünize edilerek, önce farelerde HBeAg'ye karşı gelişen antikor yanıtı izlenmiş ve daha sonra bu farelerle füzyon çalışması gerçekleştirilerek HBeAg'ye karşı monoklonal antikor geliştirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.



### **3. GEREÇ ve YÖNTEMLER**

#### **3.1. GEREÇ**

##### **3.1.1. Aletler**

- % 5 CO<sub>2</sub>, % 96 Nem, 37 °C Sıcaklık Koşullarını Sağlayabilen İnkübatör (Thermo Heraeus Cytoperm 2)
- Steril Hücre Kültürü Odası
- Steril Laminer Akımlı Kabin (Herasafe)
- Invert Mikroskop (Olympus CKX41)
- Yüksek Hızlı Santrifüj (Sorvall RC5C Plus)
- Masaüstü Santrifüj (5415R Eppendorf)
- Düşük Hızlı Santrifüj (Hermle Z300)
- Sıcak Su Banyosu (Memmert)
- Buzdolabı +4 °C, -20 °C (Arçelik)
- Derin Dondurucu -80 °C (Thermo)
- Derin Dondurucu -150 °C (Thermo)
- ELISA Okuyucu (BIO-RAD Model 3550 Microplate Reader)
- ELISA Okuyucusunun Yazıcısı ( OKIDATA, Microline 182 Plus)
- Spektrofotometre (Bio-Rad)
- Nanodrop (Thermo)
- Manyetik Karıştırıcı (Yellow Line MSH Basic)
- Vortex (Bio Vortex )
- Pipet Tabancası (Eppendorf Easypet)
- Tek Kullanımlık Pipet 2 Ml, 5 Ml, 10 Ml, 25 Ml (TPP)
- Sekiz Kanallı Pipet (Eppendorf)
- Mikropipetler 1-10 µl, 25-250 µl, 100-1000 µl (Eppendorf)
- Tek Kullanımlık Pipet Ucu 1-10, 25-250, 100-1000 µl (Greiner Bio-One)

- Dondurma Tüpleri (Nunc)
- Makas, Pens (Hammacher)
- Süzgeç (BD Falcon, Cell Strainer)
- Otoklavlanabilir Cam Şişeler 10-1000 cc (Schott DURAN)
- Kültür Kapları 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 150 cm<sup>2</sup> (TPP)
- Füzyon Kültür Plakları, 96 Kuyulu (TPP)
- Çok Kuyulu Hücre Kültür Plakları 6, 24 (TPP)
- Santrifüj Tüpleri 10 ml, 15 ml, 50 ml (TPP)
- ELISA Plakları (TPP)
- Petri Kapları (TPP)
- Thoma Lamı, Hemositometre (Neubauer)
- Hücre Kazıyıcı, Cell Scrapper (TPP)
- Enjektör 1 cc, 2 cc, 5 cc, 10 cc (Set Inject)
- Diyaliz Membranı (Sigma 23 mm X 15 mm)
- Protein G ve A Immün Afinit Kolonu (GE Healthcare)
- 0,22 µm ve 0,45 µm Filtre (Millex HV)
- 1,5 ml ve 2 ml'lik Tüpler (Eppendorf)
- Fraksiyon Ayırma Makinesi, Fraction Collector (BIO-RAD Model 2110)
- Peristaltik Pompa (Rainin RP-1)
- Biyosilyon Şişeler (Techne)
- Bulaşık Makinesi (Arçelik)
- pH Metre (WTW Series Inolab)
- ELISA Plak Yıkayıcı 12 Kuyuluk (Nunc-Immuno Wash)
- Lateks Eldiven (Broche)
- Nitril Eldiven (Supreno Plus)

### 3.1.2. Kimyasal Maddeler

- Anti-fare IgG-AP konjugatı (Sigma)
- Anti-fare IgM-AP konjugatı (Sigma)
- Anti-fare Polivalen Antikoru Alkalen Fosfataz (AP) Konjugatı (Sigma)
- Freund's Complete, FCA (Sigma)
- Freund's Incomplete Adjuvantı, IFA (Sigma)
- Bovine Serum Albumin, BSA (Sigma)
- Transferrin (Sigma)
- Fetal Bovine Serum, FBS (Biochrom AG)
- Hepatit e Antijeni, HBeAg (Fitzgerald)
- Hepatit c Antijeni, HBcAg (Fitzgerald)
- Hepatit s Antijeni, HBsAg (Fitzgerald)
- Gentamisin ( Gibco)
- 8-azoguanin ( Gibco)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM (Sigma)
- Dimetil Sülfoksit, DMSO (Sigma)
- Hipoksantin aminopterin timidin, HAT (Gibco)
- Hipoksantin timidin, HT (Gibco)
- Polietilen Glikon-4000, PEG-4000 (Merck)
- Para-nitro-fenil-fosfat, PNPP (Sigma)
- Yağsız Süt Tozu (Fluka)
- Tween 20 (Sigma)
- Amonyum Sülfat,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Merck)
- Sodyum Klorür, NaCl (Merck)
- Hepes (Sigma)
- Sodyum Bikarbonat,  $\text{NaHCO}_3$  (Sigma)
- Glisin (Sigma)
- Magnezyum Klorür,  $\text{MgCl}_2$  (Sigma)
- Çinko Klorür,  $\text{ZnCl}_2$  (Sigma)

- Tris (Sigma)
- Potasyum Hidroksit, KOH (Merck)
- Hidroklorik Asit, HCl (Sigma)
- Dipotasyum Fosfat,  $K_2HPO_4$  (Merck)
- Monopotasyum Fosfat,  $KH_2PO_4$  (Merck)
- Sodyum Fosfat,  $NaH_2PO_4$  (Merck)
- Disodyum Hidrojen Fosfat,  $Na_2HPO_4$  (Merck)

### 3.1.3. Tamponlar

**PEG çözeltisi:** 25ml'lik otoklavlanabilir şişenin içine 1 ml PBS ve 1 ml distile su koyulduktan sonra üzerine 2 gr PEG-4000 ilave edildi. Çözelti otoklav edildikten sonra kullanım anına kadar 37°C'de saklandı.

**PBS (Fosfat tamponu):** 10 mM  $KH_2PO_4$  ve 10 mM  $K_2HPO_4$  hazırlanarak pH 7.2'ye ayarlandı. Daha sonra çözeltinin üzerine 0.15 mM NaCl ilave edilerek karıştırıldı.

**PBS-Tween 20 Tamponu:** 1 litre fosfat tamponuna %0.05 Tween-20 eklendi ve bir süre vorteks ile karıştırılarak hazır hale getirildi.

**Substrat Tamponu:** 1mM  $MgCl_2$ , 1 mM  $ZnCl_2$ , 0.1 M glisin çözeltisi pH 10.4 olacak şekilde KOH ile ayarlandı. 1 ml substrat tamponunun üzerine 1 mg PNPP ilave edilerek kullanıma hazır hale getirildi. Substrat tamponu karanlık ortamda saklandı.

**Protein-G ve Protein A immün afinite kolon kromatografisinde kullanılan tamponlar**  
**Bağlama (binding) Tamponu:** 200 mM  $NaH_2PO_4$  ve 200 mM  $Na_2HPO_4$  hazırlandı, pH 7.0'ye ayarlandı.

**Elüsyon Tamponu:** 0.1 M glisin-HCl pH 2.7 olacak şekilde hazırlandı.

**Denge Tamponu (nötralize edici):** 1 M Tris-HCl pH 9.6 olacak şekilde hazırlandı.

### 3.1.4. Besiyeri

**DMEM besiyeri:** 13.4 gr DMEM (4.5 gr/L glukoz, 25 mM HEPES), 5.96 gr HEPES ve 2 gr NaHCO<sub>3</sub> pH 7.2 olacak şekilde 1 litre steril distile su içinde hazırlandı. Besiyeri steril ortamda 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edildi. %10 (v/v) olacak şekilde FBS ilave edilip gentamisin (50 µg/ml) eklendikten sonra kullanıma hazır hale gelen besiyeri +4°C'de saklandı. Kullanım sırasında DMEM besiyeri belli bir süre oda sıcaklığında tutularak oda sıcaklığına gelmesi sağlandı ve oda sıcaklığında kullanıldı.

**HAT besiyeri:** İstenilen miktarda FBS ilave edilerek hazırlanan besiyerinin içinde %2 HAT (50X) olacak şekilde çözelti hazırlandı.

**HT besiyeri:** İstenilen miktarda FBS ilave edilerek hazırlanan DMEM besiyerinin içinde %2 HT (50X) olacak şekilde çözelti hazırlandı.

**Hücre dondurma çözeltisi:** Hücre dondurulacağı sırada taze olarak hazırlandı. Hücre dondurma çözeltisi % 80 FBS, %10 DMEM besiyeri ve %10 DMSO olacak şekilde hazırlandı.

### 3.1.5. Hücreler

HBeAg'ye karşı monoklonal antikor eldesi için yapılan hibridoma çalışmasında kullanılan hücreler; Myeloma hücresi (F0; ATCC CRL 1646) ve BALB/c farenin dalak ve lenf düğümlerinden elde edilen lenfosit hücreleridir. Yapılan füzyon çalışmasından en iyi sonucu alabilmek için bağışıklanmamış BALB/c farenin periton içi sıvısındaki besleyici hücrelerden de yararlanılmaktadır.

### **3.1.6. Antijenler**

HBeAg (Fitzgerald, Cat: 30-AH18)

HBcAg (Fitzgerald, Cat: 30-AH39)

HBsAg (Fitzgerald, Cat: 30-AH16 ve 30-AH17)

Bu çalışmada HBeAg, çalışmanın ana amacı olarak fare immunizasyonlarında, HBeAg'ye özgü mAb'ların geliştirilmesinde ve ELISA'da HBeAg'ye karşı oluşmuş özgün antikor yanıtını ölçmede kullanıldı. HBcAg ve HBsAg, çapraz reaksiyon testlerinde kullanıldı.

### **3.1.7. Rekombinant Faj**

HBeAg'ye özgü mAb'ların geliştirilmesinde alternatif yöntem olarak yüzeyinde HBeAg eksprese eden fajlarla immunizasyonlar sonrası monoklonal antikor geliştirilmeye çalışıldı. HBeAg'ye ait genin M13 fajına klonlanması ve HBeAg'nin P3 proteini üzerinde ekspresyonu TÜBİTAK-MAM GMBE İmmünogenetik Laboratuvarı tarafından, TARAL 1007 projesi kapsamında (105G056) gerçekleştirildi.

## **3.2. YÖNTEM**

### **3.2.1. İmmünizasyon**

#### **3.2.1.1. HBeAg ile immünizasyon**

Sekiz haftalık BALB/c fareler iki hafta aralıklarla üç defa 10 µg HBeAg (Cat: 30-AH18, Fitzgerald, USA) ile immunize edildi. İlk immünizasyonda Freund's complete

adjuvant (Sigma, USA) ikinci ve üçüncü immünizasyonlarda ise Freund's incomplete adjuvant (Sigma, USA) uygulandı. HBeAg'ye özgü antikor yanıtı için farelerin kuyruklarından kan alındı ve indirekt ELISA ile kontrol edildi. Füzyon için seçilen fareye hatırlatma immünizasyonu için sistemik yollardan PBS içinde 10 µg HBeAg uygulandı.

### **3.2.1.2. Rekombinant faj ile immünizasyon**

İmmünizasyonda iki farklı grup oluşturuldu ve bu gruplar üç hafta aralıklarla üçer defa immünize edildi. İlk gruba  $10^{11}$  rekombinant e faj (rEfaj), diğerine  $10^{11}$  rEfaj + Freund's incomplete adjuvantı uygulandı. Farelerin kuyruklarından elde edilen kan örneklerinden ELISA ile anti-HBeAg yanıtına bakıldı. Füzyonda kullanılmak üzere seçilen farelere hatırlatma immünizasyonu için sistemik yoldan PBS içinde  $10^{11}$  rekombinant e faj (rEfaj) uygulandı.

### **3.2.2. ELISA Testi**

96'lık mikrotiter ELISA plakları PBS (10 mM, pH 7.2) içinde 400 ng/ml olacak şekilde 100 µl HBeAg (Fitzgerald, USA) ile kaplanıp +4 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. PBS-Tween-20 tamponu ile yıkama işleminden sonra %1 olarak hazırlanan yağsız süt tozu bloklama çözeltisi bütün kuyulara dağıtılıp (150 µl) 37 °C'de bir saat inkübe edildi. İkinci kez gerçekleştirilen yıkama işleminden sonra çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanmış (1/50, 1/100, 1/200, 1/400) fare serumu veya hibridoma hücre üst sıvısından her kuyuya 100 µl eklendi ve 37 °C'de bir saat bekletildi. Plaklar PBS-Tween-20 tamponu ile tekrar yıkandıktan sonra, bağlanan antikorlar 1/1000 seyreltilmiş anti-mouse IgG-AP, IgM-AP veya polyvalent antikor-AP (Sigma, USA) ile işaretlendi, 37°C'de bir saat bekletilen ELISA plakları yıkandı ve 1 mg/ml oranında PNPP/substrat tamponu çözeltisi eklendi. Plaklar bir saat oda sıcaklığında karanlıkta

birakıldı. Oluşan renk değişimi, ELISA okuyucusu ile 405 nm'de 30 dakika ve bir saatlik okumalarla belirlendi.

### **3.2.3. Füzyon**

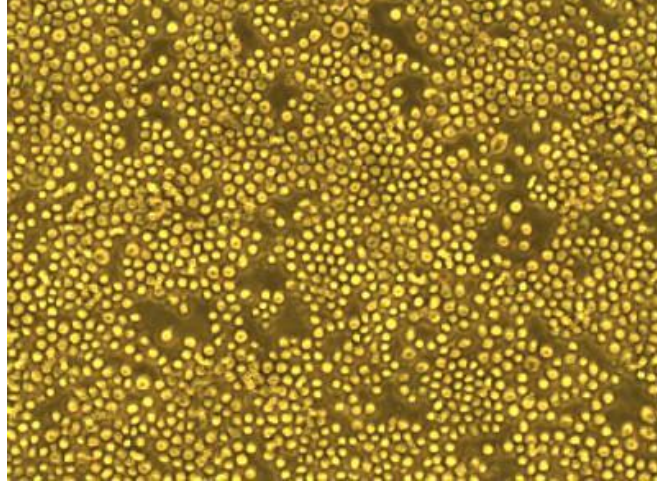
#### **3.2.3.1. Besleyici hücrelerin hazırlanması**

Periton içi besleyici hücreler füzyondan bir gün önce hazırlandı. Daha önce bağışıklanmamış bir fare dislokasyon yöntemi ile öldürüldü ve %70'lik alkol ile dezenfekte edildi. Sırt üstü yatırılarak steril kabin içerisinde, steril pens ve makas yardımıyla karın bölgesi yanlara doğru açılan farenin üst derisi boynuna doğru çekilerek periton zarı açığa çıkarıldı. Periton içerisinde yağsız ve kontaminasyonun olmayacağı bir bölgeye, enjektörün ucu organlara değmeyecek şekilde 5 ml serumsuz DMEM enjekte edildi, verilen sıvı enjektöre geri çekildi. Enjektör içindeki peritona ait besleyici hücreler %20 FBS'li DMEM besiyeri içine alındı. Çalışılacak hücre kültür plağı sayısına bağlı olarak, her kuyuya 100 µl hacimdeki besiyerinin içinde yaklaşık 6.000-10.000 hücre olacak şekilde dağıtıldı.

#### **3.2.3.2. Myeloma hücrelerinin füzyon için hazırlanması**

Füzyondan yaklaşık 10 gün önce F0 myeloma hücreleri %10 FBS içeren hücre kültür kaplarında çoğaltıma alındı (Şekil 13). Myeloma hücrelerinin çoğalması işleminin başında besiyerine azoguanin (20 µg/ml) eklenerek HGPRT (+) hücrelerin seçimi sağlandı. Füzyon günü hücreler pasajlanarak 50 ml'lik santrifüj tüpü içerisine alındı. Hücreler, PBS tamponunda 1250 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek iki defa yıkandı. Çöken hücrelerin üzerine 45 ml PBS eklendi, hücrelerin sayımları yapıldı ve son yıkamadan sonra hücreler 25 ml PBS içine alındı.





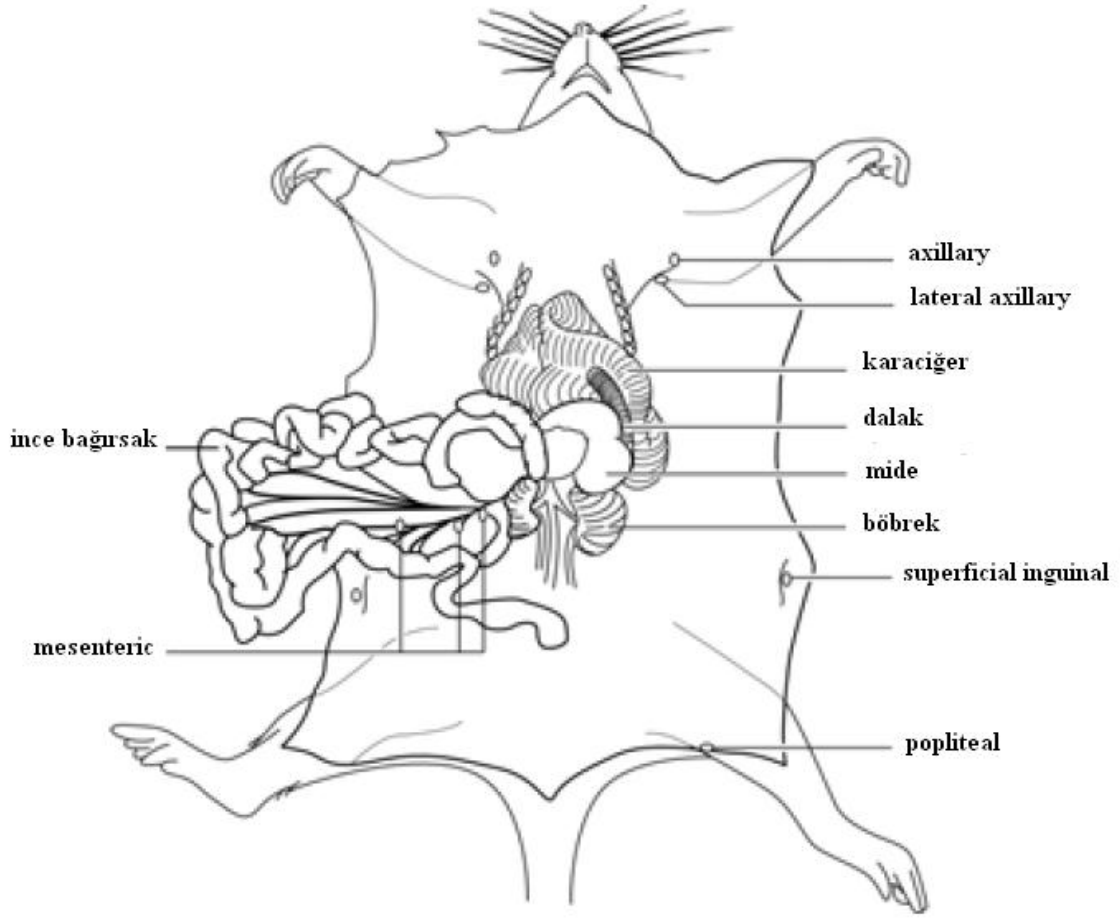
Şekil 13. FO Myeloma hücrelerinin kültür ortamındaki görüntüsü (10X)

### 3.2.3.3. İmmünize olmuş fareden dalak hücrelerinin eldesi

HBeAg ile bağışıklanan fareler arasında en yüksek antikor yanıtı veren fare ELISA yöntemi ile belirlendi. Füzyondan dört gün önce hatırlatma (rapel) amacı ile HBeAg adjuvant kullanılmadan fareye intraperitoneal, intravenöz, el-ayak avuç içlerine sistemik olarak enjekte edildi. Hatırlatma yapılan fare dislokasyon yöntemi ile öldürüldükten sonra %70'lik alkol ile dezenfekte edildi. Steril laminar akımlı kabin içerisinde bağışıklanmış fare sırt üstü yatırılarak göğüs hizasından makas yardımıyla kesildi ve üst derisi kenarlara doğru açıldı (Şekil 14). Lenf düğümü toplama işlemi bittikten sonra kesilmiş olan peritonda kaburganın altındaki dalak, yağ dokusundan arındırılması için 5 ml PBS bulunan petri kabına alındı. Burada yabancı dokulardan temizlendikten sonra içinde 10 ml PBS bulunan diğer petri kabına aktarıldı. Tek kullanımlık steril süzgeç içerisinde 2 ml steril enjektör pistonunun tersi ile ezilerek dalak hücreleri açığa çıkarıldı ve pipet yardımı ile süspanse edildi. Dalak hücrelerinin bulunduğu PBS tamponu 45 ml'ye getirildi, 1250 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek iki defa yıkandı. Çöken hücreler 45 ml'lik PBS içerisine alınarak hücre sayımı yapıldı, son yıkamadan sonra hücreler 25 ml PBS içine alındı.

#### **3.2.3.4. İmmünize olmuş fareden lenf düğümü hücrelerinin eldesi**

Klasik hibridoma yönteminde çalışma kolaylığı sağlaması nedeniyle dalak kullanılır. Ancak laboratuvarımızda kıymetli antijenlerle çalışıldığında çalışmayı riske atmamak için farenin lenf düğümleri de alınmaktadır (11). Steril laminar akımlı kabin içerisinde bağışıklanmış fare sırt üstü yatırılarak göğüs hizasından makas yardımıyla kesildi ve üst derisi kenarlara doğru açıldı (Şekil 14). Bütün vücuda dağılmış olan lenf düğümleri (çene ve koltuk altında iki çift, deri üzerinde bir çift, bağırsakta dört adet) petride bulunan 5 ml PBS içerisine aktarıldı ve yağ dokusundan arındırıldı. Elde edilen tüm lenf düğümleri içerisinde 10 ml PBS bulunan yeni bir petri kabına aktarıldı, tek kullanımlık steril süzgeç içerisinde 2 ml steril enjektör pistonunun tersi ile ezilerek hücreler açığa çıkarıldı ve pipet yardımı ile süspanse edildi. Lenf düğümü hücrelerinin bulunduğu PBS tamponu 45 ml'ye getirildi, hücreler 1250 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek 2 kez yıkandı. Çöken hücreler 45 ml PBS içerisine alınarak hücre sayımı yapıldı, son yıkamadan sonra hücreler 25 ml PBS içine alındı.



Şekil 14. Faredeki dalak ve lenf düğümleri (Bkz. EK-14)

### 3.2.3.5. Hücre sayımı

Myeloma, dalak ve lenf hücreleri süspanse edilip PBS ile 45 ml'ye tamamlandıktan sonra Thoma lamı üzerine karışımdan 10 µl alınarak 25 kareye düşen hücreler sayıldı. Aşağıdaki formüle göre hücre sayısı belirlendi:

$$10^4 \times A \times B = C$$

$10^4$  = Sabit katsayı

A = Hücrelerin içinde bulunduğu hacim (45 ml)

B = Sayılan hücre sayısı

C = Toplam hücre sayısı

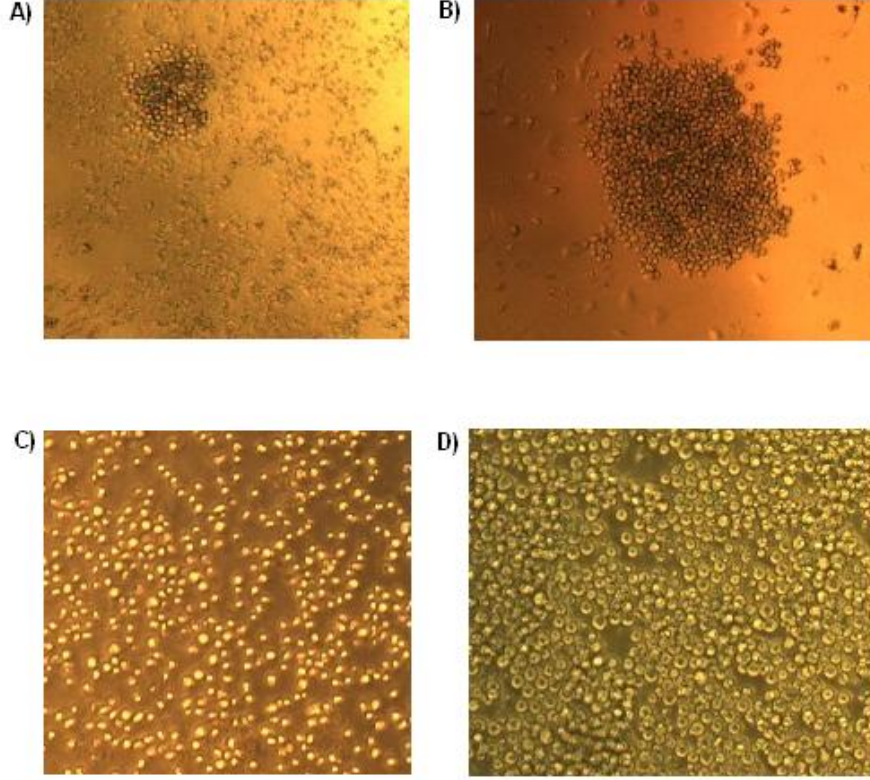
### 3.2.3.6. Füzyon

Tezin ana hedefi HBeAg'ye özgü mAb üretiminin sağlanmasıdır. Klasik füzyon çalışmasında hücre sayımı yapılan F0 myeloma hücreleri ile dalak ve lenf düğümlerinden elde edilen hücreler çoğunlukla 1:4 oranında birleştirildi. Organ olarak dondurulmuş dalak ve lenf düğümleriyle yapılan füzyon çalışmalarında ve yüzeyinde HBeAg'si eksprese eden M13 fajı ile gerçekleştirilen immünizasyonlar sonrası farelerin dalak ve lenf düğümleriyle yapılan füzyonlarda 1:2 oranı kullanılmıştır. Füzyonlarda birleştirilen hücreler 1250 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üst kısmı atılarak, çöken hücre karışımına 37°C'de kullanıma hazır olarak bekletilen %50 konsantrasyondaki 1 ml polietilen glikol 4000 (PEG-4000) bir dakika içerisinde oldukça yavaş şekilde eklendi. Hücreleri bulunduran tüp bir dakika iki el arasında yuvarlanarak karıştırıldı, daha sonra sırasıyla 4 ml serumsuz DMEM bir dakika içinde, 20 ml serumsuz DMEM ve 20 ml %15 FBS içeren DMEM besiyeri ikişer dakika içinde yavaşça hücrelerin üzerine ilave edildi. Karışım 37°C sıcaklıktaki CO<sub>2</sub> inkübatöründe bir saat bekletildikten sonra santrifüj edildi. Çöken hücreler %2 HAT'lı %20 FBS içeren DMEM besiyeri içerisinde süspanse edildi. Süspanse edilen hücreler bir gün önce hazırlanmış besleyici hücre içeren kültür plaklarının üzerine 150 µl/kuyu olacak şekilde dağıtıldı (27).

### 3.2.4. Füzyon Takibi

Füzyondan 10 gün sonra hücre üst sıvılarından 100 µl alınıp hücrelerin üzerine 100 µl %2 HAT'lı %10 FBS içeren DMEM seçici besiyeri ilave edildi. 15. gün aynı şekilde %2 HT'li besiyeri eklendi. Hücrelerin gelişme durumuna bağlı olarak normal besiyerine geçildi. Füzyondan yaklaşık 10 gün sonra hibrit hücrelerin HAT besiyerinde canlı, büyük ve belirgin şekilde geliştiği, bölünerek üzüm salkımına benzer klon oluşturmaya başladığı mikroskopik çalışmayla gözlemlendi (Şekil 15). Füzyon plakları invert mikroskopta tek tek kontrol edilerek hibrit hücreler belirlendi. Füzyon sonrası

elde edilen monoklonal antikorlar üreten hibrit hücrelerin belirlenmesi için indirekt ELISA yöntemi kullanıldı.



**Şekil 15.** Füzyondan 10 gün sonra hibrid hücrenin belirlenmesi ve çoğaltılması. A) Füzyon pleytindeki kuyuda bulunan hibrid hücrenin 10. gündeki durumu, 4x. B) Füzyon pleytindeki kuyuda bulunan hibrid hücrenin 10. gündeki durumu, 10x. C) Hibrid hücrenin besiyerinin değiştirilmesi sonucu 15. gündeki durumu, 10x. D) Hibrid hücrenin 22. gündeki durumu, 10x.

### 3.2.5. Hibritlerin Alt Klonlarına Ayrılması

ELISA yöntemiyle pozitif reaksiyon veren ve monoklonal antikor ürettiği belirlenen hibrit hücrelerin tek klondan oluşan hibrit soyunu elde etmek için sınırlı seyreltme (limiting dilution) işlemi uygulandı (27). Bir kuyuda birden fazla hibridoma kolonisi bulunabileceği için sentezlenen antikor poliklonal özellikte olabilir. Seçilen kuyudaki hücreler sınırlı seyreltme yöntemi ile her kuyuya bir hücre düşecek şekilde

yeni kültür plaklarına dağıtılarak tek hücreden köken alan hibridoma kolonisinin gelişmesi sağlanır.

### **3.2.6. Dalak ve Lenf Düğümlerinin Organ Olarak Dondurulması**

HBeAg'ye özgü mAb'ların geliştirilmesinde organ olarak dondurulmuş dalak ve lenf düğümleri füzyon çalışmalarında kullanıldı. Dislokasyon yöntemiyle öldürülen farelerin dalak ve lenf düğümleri oda sıcaklığındaki PBS (10 mM, pH 7.2) içine alınarak temizlendi. Bütün dokular (dalak ve her bir fareden 10-12 lenf düğümü) dondurulmak üzere iki ml'lik dondurma tüplerine (cryovial) transfer edildikten sonra üzerlerine %10 DMEM, % 80 FBS (Fetal Bovine Serum) ve % 10 DMSO (Dimetilsülfoksit) içeren hücre dondurma çözeltisi eklendi. Kontrollü ve yavaş (dakikada 1°C azalan) dondurma işlemi yapabilmek için dondurma tüpleri oda sıcaklığında bulunan izopropanollü hücre soğutma kabına (Nunc, Nalgene) koyulduktan sonra -80°C dondurucuda bir gün bekletildi. Daha sonra dondurma tüpleri (cryovialler) uzun süreli depolama işlemi için -150°C dondurucuya aktarıldı. Üç aylık süreç içerisinde her ay, dondurulan dalak ve lenf düğümlerini içeren dondurma tüplerinden biri çözülerek elde edilen hücreler füzyon çalışmasında kullanıldı.

### **3.2.7. Dondurulmuş dalak ve lenf düğümlerinin füzyon için açılması**

Dondurulmuş dalak ve lenf düğümlerini içeren dondurma tüpleri -150°C dondurucudan çıkarıldı, oda sıcaklığında bir dakika, 37°C'ye ayarlanmış su banyosunda üç dakika bekletilerek çözülmeye bırakıldı. Dalak ve lenf düğümleri hızlı bir şekilde önceden hazırlanmış, içinde PBS olan petri içerisine alınarak durulandıktan sonra dokular yeni bir petriye aktarıldı. Dokular tek kullanımlık steril süzgeçlerde ezildi ve hücreler süspansiyon haline getirildi. Hücreler PBS içerisinde 1250 rpm'de iki kez yıkanarak santrifüj edildi. Son yıkamadan sonra pelletlerin üzerine 10 ml PBS eklenerek hücreler sayıldı.

### **3.2.8. Monoklonal Antikorların Aktivite Tayini ve Karakterizasyonu (Çapraz Reaksiyon Testi)**

Elde edilen monoklonal antikorların karakterizasyonu için kullanılan yöntemlerden biri, söz konusu monoklonal antikorun farklı antijenler veya epitoplara ile aynı reaksiyonu verip vermediğinin analizidir. Antikor aktivitesi pozitif olan hibrit hücrelerin farklı proteinlerle yaptığı çapraz reaksiyonlarını görmek için ELISA plakları farklı proteinlerle kaplandı ve indirekt ELISA testi yapıldı. ELISA plakları kuyu başına 100 µl olacak şekilde (400 ng/ml) HBeAg, HBcAg, HBsAg, BSA, Transferrin, insan serumu (1/50 ve 1/100 olacak şekilde) ve süt tozu (%1) ile kaplandı, plaklar +4°C'de gece boyu inkübe edildi. PBS-Tween-20 tamponu ile yıkama işleminden sonra kuyucuklar 150 µl %1'lik süt tozu ile 37°C'de bir saat bloke edildi. Plaklar yıkandıktan sonra her bir kuyuya 100 µl hibrit üst sıvısı eklendi ve 37°C'de bir saat bekletildi. Yıkamadan sonra, alkalen fosfataz ile konjuge edilmiş 1/1000 dilüsyonda anti-mouse polivalent antikor eklenildi. 37°C'de bir saat bekletilen plaklar yıkanarak kuyulara 1 mg/ml oranında PNPP/substrat tamponu çözeltisi eklendi. Plaklar oda sıcaklığında bir saat karanlıkta bırakıldı. Oluşan renk değişimi, ELISA okuyucusu ile 405 nm'de 30 dakika ve bir saatlik okumalarla belirlendi.

### **3.2.9. Antikor İzotiplerinin Belirlenmesi**

İzotip belirleme, tanı sistemlerinde kullanılacak antikorların işaretlenmesi, kullanılacak ikinci antikorun Ig sınıfına karar verilmesi ve saflaştırma yönteminin belirlenmesi gibi çalışmalar için gerekli olmaktadır. Elde edilen monoklonal antikorun sınıf ve alt sınıfları indirekt ELISA ile belirlendi. Ticari antikor konjugatları (alkalin fosfat işaretli anti-mouse IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b ve IgM antikorları, AbD Serotec, Kidlington, UK) ile yapılan testler sub-isotyping kit (Boehringer Mannheim, GmbH, Germany) ile tekrarlandı.

### **3.2.10. Monoklonal Antikorların Saflaştırılması**

#### **3.2.10.1. Hibrit hücrelerin geniş ölçekte üretimi**

Monoklonal antikor üreten hibrit hücrelerden geniş ölçekte antikor elde etmek için değişik büyüklüklerde (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 150 cm<sup>2</sup>) hücre kültürü kapları kullanıldı. Hibrit hücreler %5 FBS içeren DMEM besiyerinde üretilip, üst sıvıları alınarak 1250 rpm'de santrifüj edildikten sonra supernatant +4°C'de saklandı.

#### **3.2.10.2. Amonyum sülfat çöktürmesi**

Elde edilen supernatantın üzerine soğuk ortamda, 30 dakika içerisinde, bir karıştırıcı üzerinde %45 oranında amonyum sülfat eklendi. Gece boyu +4°C'de karıştırıldıktan sonra 10.000-13.000 rpm'de bir saat +4°C'de santrifüj edildi. Pellet 3-5 ml PBS ile çözüldükten sonra PBS'e karşı gece boyu +4°C'de diyaliz edildi.

#### **3.2.10.3. İmmün afinite kolon kromatografisi (Protein-A ve Protein-G)**

İmmün afinite kolon kromatografisinde kullanılacak kolon tipi monoklonal antikor üreten hibrit hücrelerin alt tiplerine göre seçildi. Kolon, kolon hacminin beş katı kadar bağlama tamponu ile yıkandı. FBS'li besiyerinde üretilip, amonyum sülfat çöktürme uygulanarak diyaliz edilen monoklonal antikor üreten hibrit üst sıvısı 0.45 µm filtreden geçirildikten sonra mAb'ın alt tipine göre Protein-A veya Protein-G immün afinite kolonuna yüklendi (Tablo 3). Daha sonra bağlama tamponu tekrar eklenerek, kolon sonrası kesimler 1'er ml olmak üzere fraksiyon toplama ünitesi üzerindeki tüplerde biriktirildi. Tüplerin 280 nm'de absorbans değerleri ölçülerek, protein değerleri sıfırı gösterinceye kadar kolondan bağlama (binding) tamponu geçirildi. Ardından proteinin yoğun olarak kolondan çıkmasını sağlayan (antikorun kolondan sökülmesini



sağlar) elüsyon tamponu geçirildi. Antikorlar 75 µl denge (neutralizing) tamponu içeren tüplerde birer ml olmak üzere toplandı. İşlem, 280 nm’de protein değeri tekrar sıfırı gösterinceye kadar devam ettirildi. Kolon, kolon hacminin iki katı kadar %20’lik etanol ile yıkanarak +4°C’de saklandı. Kolon sonrası tüpler, ELISA ile test edilerek aktivite alınan antikor kesimleri belirlendi. Saflaştırılan monoklonal antikorlar 1 mg/ml olacak şekilde -20°C’de saklandı. Daha sonra antikorun en iyi çalışma dilüsyon aralığı belirlendi.

**Tablo 3.** Protein A ve Protein G kolonlarının insan ve farede antikor bağlama dereceleri (Bkz. EK-15)

Tür	Alt sınıf	Protein A bağlama	Protein G bağlama
İnsan	IgA	Değişken	-
	IgD	-	-
	IgE	-	-
	IgG <sub>1</sub>	++++	++++
	IgG <sub>2</sub>	++++	++++
	IgG <sub>3</sub>	-	++++
	IgG <sub>4</sub>	++++	++++
	IgM	Değişken	-
Fare	<b>IgG<sub>1</sub></b>	<b>+</b>	<b>++++</b>
	IgG <sub>2a</sub>	++++	++++
	<b>IgG<sub>2b</sub></b>	<b>+++</b>	<b>++++</b>
	IgG <sub>3</sub>	++	+++
	IgM	Değişken	-

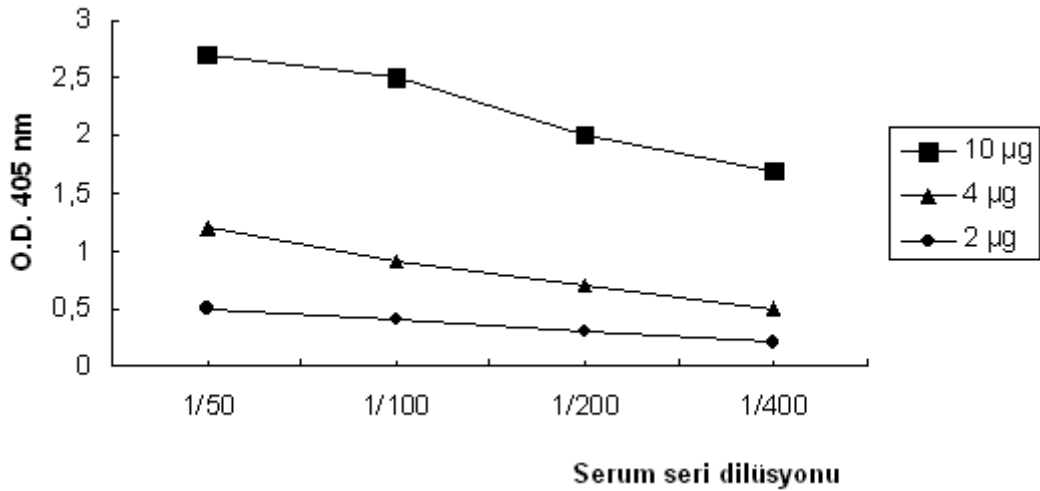
### 3.2.11. Epitop Analizi

16F8 anti-HBe monoklonal antikorlarının epitop analizi ProImmune Ltd. (Oxford, UK) tarafından yapıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. İmmünizasyonlarda Kullanılacak Ticari HBeAg'nin Dozunun Belirlenmesi

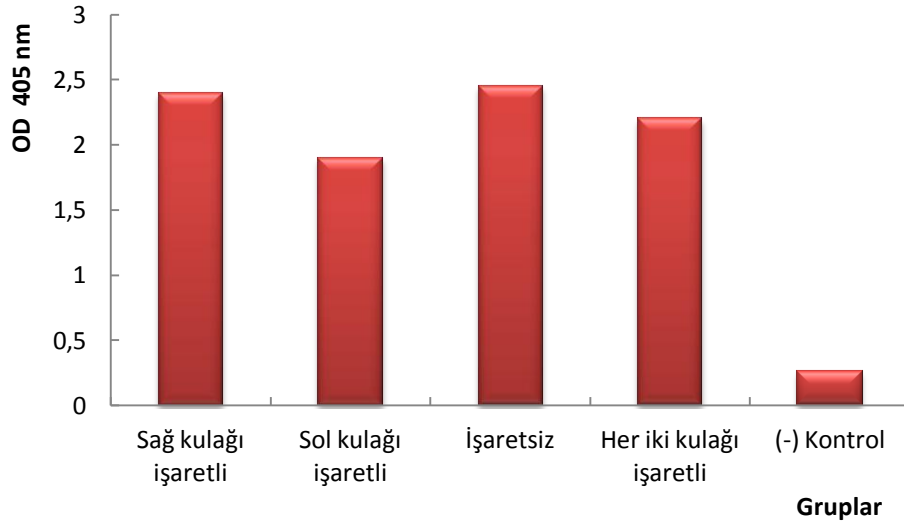
HBeAg'ye karşı monoklonal antikor üretmek için kullanılan klasik yöntem, 1975 yılında Köhler ve Milstein tarafından geliştirilen "hibridoma teknolojisi" ile antikor üreten B lenfositlerinin *in vitro* koşullarda ölümsüzleştirilmesidir (6). Hibridoma teknolojisi kullanılarak HBeAg'ye özgü monoklonal antikor elde etmek için yapılan çalışmada önce ticari HBeAg ile immünizasyonlarda kullanılacak antijen dozunun belirlenmesi amacıyla fareler 2, 4 ve 10 µg HBeAg ile iki hafta aralıklarla üç defa immünize edildi. Daha sonra farelerin kuyruklarından alınan kandan elde edilen çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanmış (1/50, 1/100, 1/200, 1/400) fare serumları ELISA ile kontrol edildi (Şekil 16). İmmün yanıtı en yüksek seviyede uyaran antijen miktarı 10 µg olarak belirlendi.



Şekil 16. İmmünizasyonlarda kullanılan HBeAg dozunun belirlenmesi

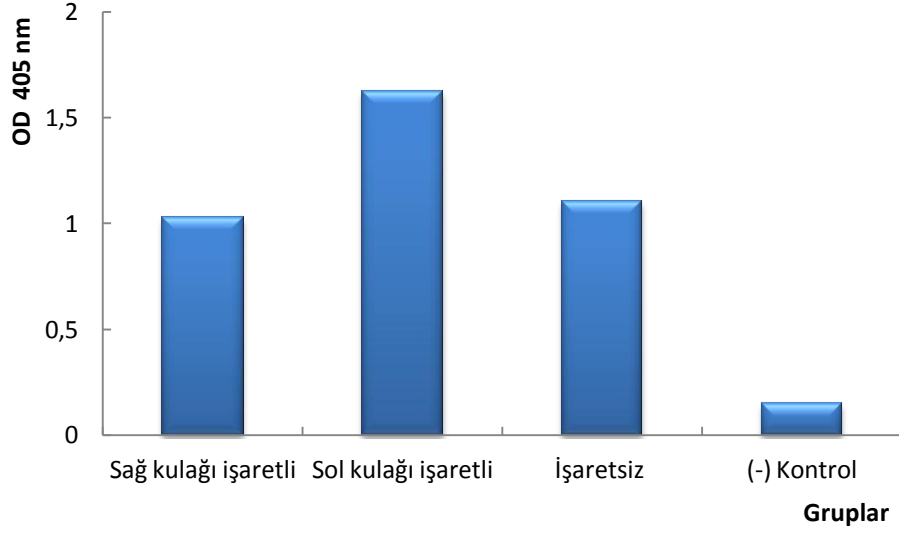
#### 4.1.1. Füzyonda Kullanılacak Farenin Seçimi

Üç veya dört adet BALB/c fare, HBe antijeni (10 µg HBeAg) ile ikişer hafta aralıklarla üç defa immünize edildi. İlk immünizasyon “*Freund’s complete*” adjuvantı, ikinci ve diğer immünizasyonlar ise “*Freund’s incomplete*” adjuvantı ile gerçekleştirildi. Füzyon çalışmalarında, özellikle afinitesi ve özgünlüğü yüksek monoklonal antikor oluşturmak üzere füzyon öncesi son immünizasyon adjuvantsız bir şekilde farenin el-ayak içlerine, periton içine ve kuyruğuna intravenöz olarak yapıldı. Üçüncü immünizasyon sonrasında farelerden kan alınıp HBeAg’ye karşı gelişmiş bir antikor yanıtının oluşup oluşmadığına ELISA yöntemi ile bakıldı (80). Farklı füzyon çalışmaları için gerçekleştirilen immünizasyonlar sonrasında farelerde HBeAg’ye karşı gelişen antikor yanıtları aşağıda sırayla verilmektedir.



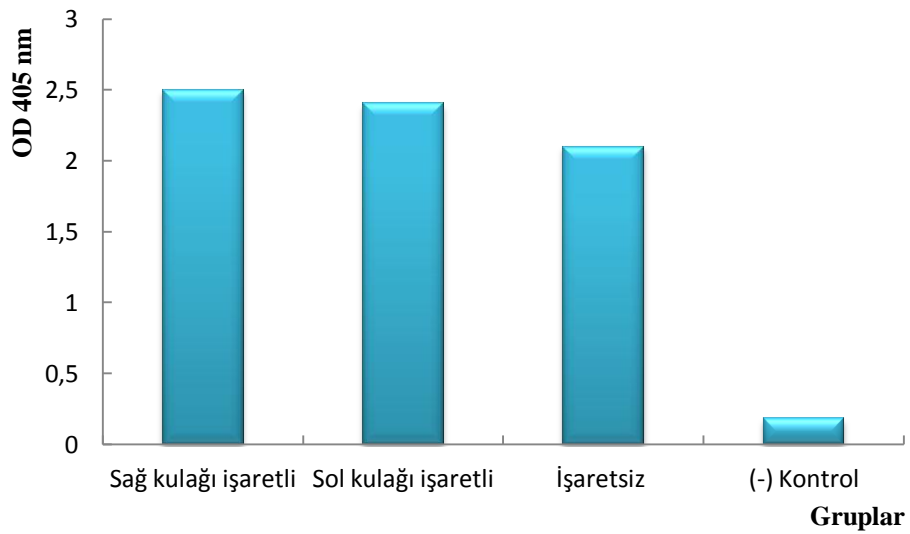
Şekil 17. HBeAg ile immünize edilen farelerde Ag’ye özgün antikor yanıtlarının belirlenmesi

ELISA sonrasında birinci ve ikinci füzyonlarda sırasıyla kulağı işaretsiz ( $OD_{405} = 2,48$ ) ve sağ kulağı işaretli ( $OD_{405} = 2,44$ ) farelerin füzyon işleminde kullanılmasına karar verildi (Şekil 17). Seçilen farelerden elde edilen lenfositler ile gerçekleştirilen füzyon işlemi sonucunda HBeAg’ye özgü monoklonal antikor (mAb) elde edilemediğinden yeni grup fareler ile immünizasyonlar başlatılmıştır.



**Şekil 18.** HBeAg ile immünize edilen farelerde Ag'ye özgün antikor yanıtlarının belirlenmesi

ELISA sonrasında üçüncü ve dördüncü füzyonlarda sırasıyla kulağı işaretsiz ( $OD_{405} = 1,2$ ) ve sol kulağı işaretli ( $OD_{405} = 1,68$ ) farelerin füzyon işlemine kullanılmasına karar verildi (Şekil 18). Seçilen farelerden elde edilen lenfositler ile gerçekleştirilen füzyon işlemi sonucunda HBeAg'ye özgü mAb elde edilemediğinden yeni grup fareler ile immünizasyonlar başlatılmıştır.



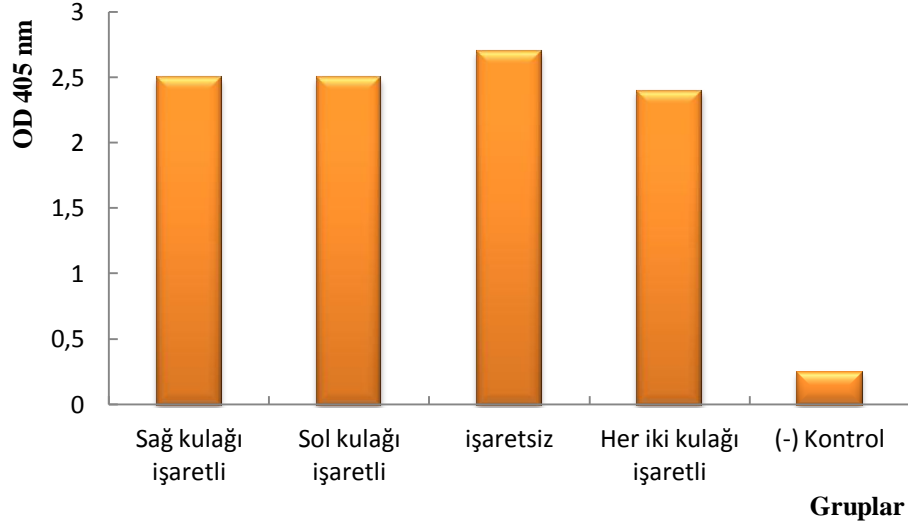
**Şekil 19.** HBeAg ile immünize edilen farelerde Ag'ye özgün antikor yanıtlarının belirlenmesi

ELISA sonrasında beşinci ve altıncı füzyonlarda sırasıyla sol kulağı işaretli ( $OD_{405} = 2,35$ ) ve sağ kulağı işaretli ( $OD_{405} = 2,48$ ) farelerin füzyon işleminde kullanılmasına karar verildi (Şekil 19). Seçilen farelerden elde edilen lenfositler ile gerçekleştirilen füzyon işlemi sonucunda HBeAg'ye özgü mAb elde edilemediğinden yeni grup fareler ile immünizasyonlar başlatılmıştır.



**Şekil 20.** HBeAg ile immünize edilen farelerde Ag'ye özgün antikor yanıtlarının belirlenmesi

ELISA sonrasında yedi, sekiz ve dokuzuncu füzyonlarda sırasıyla sağ kulağı işaretli ( $OD_{405} = 2,6$ ), sol kulağı işaretli ( $OD_{405} = 2,68$ ) ve kulağı işaretsiz ( $OD_{405} = 2,45$ ) farelerin füzyon işleminde kullanılmasına karar verildi (Şekil 20). Seçilen farelerden elde edilen lenfositler ile gerçekleştirilen füzyon işlemi sonucunda HBeAg'ye özgü mAb elde edilemediğinden yeni grup fareler ile immünizasyonlar başlatılmıştır.



Şekil 21. HBeAg ile immünize edilen farelerde Ag'ye özgün antikor yanıtlarının belirlenmesi

ELISA sonrasında onuncu füzyonda kulağı işaretli (OD<sub>405</sub> = 2,67) olan farenin kullanılmasına karar verildi (Şekil 21).

#### 4.2. Klasik Hücre Füzyonu

HBeAg'ye özgü monoklonal antikor eldesi için füzyona alınan farelerin dalak ve lenf düğümlerindeki hücrelerin tümü myeloma hücreleriyle birleştirildi (füzyon). Bu amaçla yapılan 10 füzyon çalışması aşağıda sırayla tablolar halinde verilmektedir:

**Tablo 4.** Birinci Füzyon Sonucu

Lenfositler	500 x 10 <sup>6</sup>
Myeloma hücreleri	100 x 10 <sup>6</sup>
Kuyu sayısı	768
Hibrit hücre sayısı	694
Antikor aktivitesi veren hibrit hücre sayısı	22
HBVc antijenine özgü monoklonal antikor	-
HBVe antijenine özgü monoklonal antikor	-

Birinci füzyon sonucunda 694 hibrit hücrelerinden HBeAg'ye karşı antikor aktivitesine sahip 22 adet hibrit hücre gözlendi fakat HBeAg'ye özgü antikor üreten hibrit hücre elde edilemedi (Tablo 4).

**Tablo 5.** İkinci Füzyon Sonucu

Lenfositler	460 x 10 <sup>6</sup>
Myeloma hücreleri	65 x 10 <sup>6</sup>
Kuyu sayısı	768
Hibrit hücre sayısı	141
Antikor aktivitesi veren hibrit hücre sayısı	12
HBVc antijenine özgü monoklonal antikor	-
HBVe antijenine özgü monoklonal antikor	-

İkinci füzyon sonucunda 141 hibrit hücrelerinden HBeAg'ye karşı antikor aktivitesine sahip 12 adet hibrit hücre gözlendi fakat HBeAg'ye özgü antikor üreten hibrit hücre elde edilemedi (Tablo 5).

**Tablo 6.** Üçüncü Füzyon Sonucu

Lenfositler	210 x 10 <sup>6</sup>
Myeloma hücreleri	75 x 10 <sup>6</sup>
Kuyu sayısı	768
Hibrit hücre sayısı	716
Antikor aktivitesi veren hibrit hücre sayısı	17
HBVc antijenine özgü monoklonal antikor	-
HBVe antijenine özgü monoklonal antikor	-

Üçüncü füzyon sonucunda 716 hibrit hücrelerinden HBeAg'ye karşı antikor aktivitesine sahip 17 adet hibrit hücre gözlemlendi fakat HBeAg'ye özgü antikor üreten hibrit hücre elde edilemedi (Tablo 6).

**Tablo 7.** Dördüncü Füzyon Sonucu

Lenfositler	350 x 10 <sup>6</sup>
Myeloma hücreleri	130 x 10 <sup>6</sup>
Kuyu sayısı	768
Hibrit hücre sayısı	390
Antikor aktivitesi veren hibrit hücre sayısı	18
HBVc antijenine özgü monoklonal antikor	1(12E5)
HBVe antijenine özgü monoklonal antikor	1(12E5)

Dördüncü füzyon sonucunda 390 hibrit hücrelerinden HBeAg'ye karşı antikor aktivitesine sahip 18 adet hibrit hücre gözlemlendi, HBeAg'ye ve HBcAg'ye özgü antikor üreten 12E5 hibrit hücresi elde edildi (Tablo 7). Fakat HBeAg'ye daha özgün monoklonal antikor elde edebilmek için füzyonlara devam edildi.



**Tablo 8.** Beşinci Füzyon Sonucu

Lenfositler	210 x 10 <sup>6</sup>
Myeloma hücreleri	60 x 10 <sup>6</sup>
Kuyu sayısı	768
Hibrit hücre sayısı	257
Antikor aktivitesi veren hibrit hücre sayısı	7
HBVc antijenine özgü monoklonal antikor	-
HBVe antijenine özgü monoklonal antikor	-

Beşinci füzyon sonucunda 257 hibrit hücrelerinden HBeAg'ye karşı antikor aktivitesine sahip 7 adet hibrit hücre gözlemlendi fakat HBeAg'ye özgü antikor üreten hibrit hücre elde edilemedi (Tablo 8).

**Tablo 9.** Altıncı Füzyon Sonucu

Lenfositler	180 x 10 <sup>6</sup>
Myeloma hücreleri	90 x 10 <sup>6</sup>
Kuyu sayısı	960
Hibrit hücre sayısı	526
Antikor aktivitesi veren hibrit hücre sayısı	8
HBVc antijenine özgü monoklonal antikor	2 (1C6, 8C10)
HBVe antijenine özgü monoklonal antikor	-

Altıncı füzyon sonucunda 526 hibrit hücrelerinden HBeAg'ye karşı antikor aktivitesine sahip 8 adet hibrit hücre gözlemlendi, HBcAg'ye özgü antikor üreten 2 adet (1C6, 8C10) hibrit hücresi elde edildi (Tablo 9). HBeAg'ye özgü monoklonal antikor elde etmek için füzyonlara devam edildi.

**Tablo 10.** Yedinci Füzyon Sonucu

Lenfositler	48 x 10 <sup>6</sup>
Myeloma hücreleri	24 x 10 <sup>6</sup>
Kuyu sayısı	384
Hibrit hücre sayısı	200
Antikor aktivitesi veren hibrit hücre sayısı	8
HBVc antijenine özgü monoklonal antikor	-
HBVe antijenine özgü monoklonal antikor	-

Yedinci füzyon sonucunda 200 hibrit hücrelerinden HBeAg'ye karşı antikor aktivitesine sahip 8 adet hibrit hücre gözlendi fakat HBeAg'ye özgü antikor üreten hibrit hücre elde edilemedi (Tablo 10).

**Tablo 11.** Sekizinci Füzyon Sonucu

Lenfositler	75 x 10 <sup>6</sup>
Myeloma hücreleri	35 x 10 <sup>6</sup>
Kuyu sayısı	384
Hibrit hücre sayısı	63
Antikor aktivitesi veren hibrit hücre sayısı	1
HBVc antijenine özgü monoklonal antikor	-
HBVe antijenine özgü monoklonal antikor	-

Sekizinci füzyon sonucunda 63 hibrit hücrelerinden HBeAg'ye karşı antikor aktivitesine sahip 1 adet hibrit hücre gözlendi fakat HBeAg'ye özgü antikor üreten hibrit hücre elde edilemedi (Tablo 11).

**Tablo 12.** Dokuzuncu Füzyon Sonucu

Lenfositler	153 x 10 <sup>6</sup>
Myeloma hücreleri	75 x 10 <sup>6</sup>
Kuyu sayısı	576
Hibrit hücre sayısı	404
Antikor aktivitesi veren hibrit hücre sayısı	10
HBVc antijenine özgü monoklonal antikor	-
HBVe antijenine özgü monoklonal antikor	-

Dokuzuncu füzyon sonucunda 404 hibrit hücrelerinden HBeAg'ye karşı antikor aktivitesine sahip 10 adet hibrit hücre gözlemlendi fakat HBeAg'ye özgü antikor üreten hibrit hücre elde edilemedi (Tablo 12).

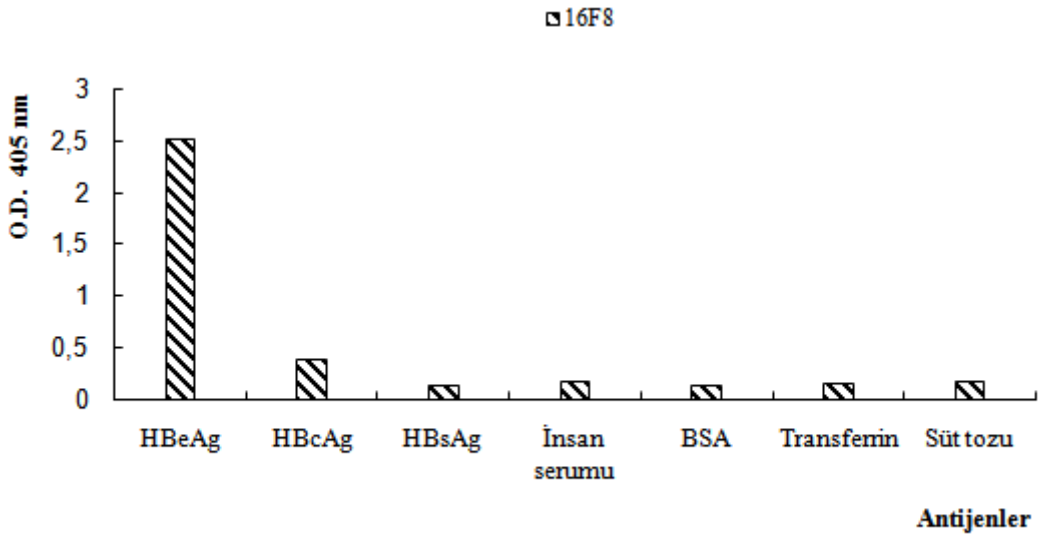
**Tablo 13.** Onuncu Füzyon Sonucu

Lenfositler	425 x 10 <sup>6</sup>
Myeloma hücreleri	110 x 10 <sup>6</sup>
Kuyu sayısı	768
Hibrit hücre sayısı	629
Antikor aktivitesi veren hibrit hücre sayısı	65
HBVc antijenine özgü monoklonal antikor	1 (18E10)
HBVe antijenine özgü monoklonal antikor	1 (16F8)

Onuncu füzyon sonucunda 629 hibrit hücrelerinden HBeAg'ye karşı antikor aktivitesine sahip 65 adet hibrit hücre gözlemlendi, HBeAg'ye ve HBcAg'ye özgü antikor üreten hibrit hücreleri (sırasıyla 16F8 ve 18E10) elde edildi (Tablo 13).

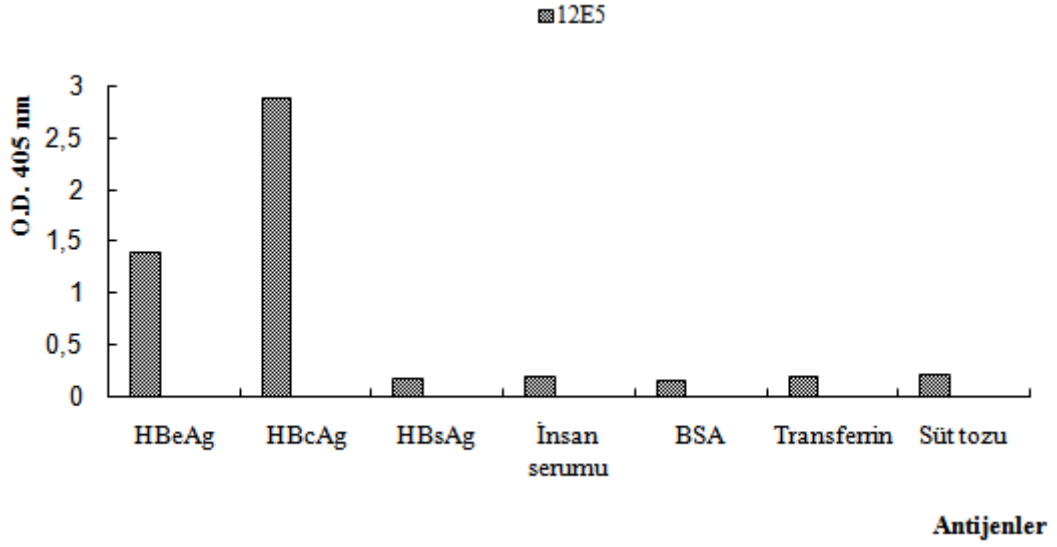
### 4.3. Monoklonal Antikorların Çapraz Reaksiyon Testi

Çapraz reaksiyon testi, antikor ile özgün olduğu antijene yapısal benzerlik gösteren veya test edilecek ortamda çapraz reaksiyon yaratması olası farklı antijenlerle reaksiyonların belirlenmesidir. HBeAg'ye karşı antikor aktivitesi pozitif olan 16F8 hibrit hücreesindeki çapraz etkileşimleri görebilmek için farklı proteinleri ELISA plağına kaplayarak yapılan indirekt ELISA testinin sonuçları Şekil 22'te gösterilmiştir. Buna göre; 16F8 hibrit hücresi HBeAg'ye karşı yüksek antikor yanıtı verirken, plağa kaplanan diğer antijenlere karşı belirgin düzeyde antikor yanıtı oluşturmamaktadır.



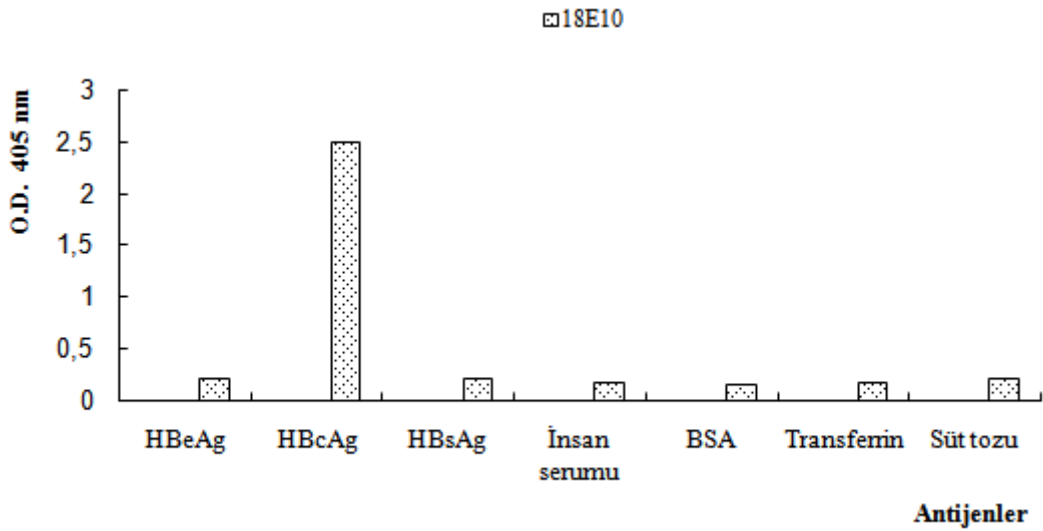
Şekil 22. 16F8 monoklonal antikorunun çapraz reaksiyon testi

HBeAg'ye karşı antikor aktivitesi pozitif olan 12E5 hibrit hücreesindeki çapraz etkileşimleri görebilmek için ELISA plağına farklı proteinler kaplanarak yapılan indirekt ELISA testinin sonuçları Şekil 23'te gösterilmiştir. Buna göre; 12E5 hibrit hücresi hem HBcAg'ye, hem de HBeAg'ye karşı yüksek antikor yanıtı verirken, plağa kaplanan diğer antijenlere karşı belirgin düzeyde antikor yanıtı oluşturmamaktadır.



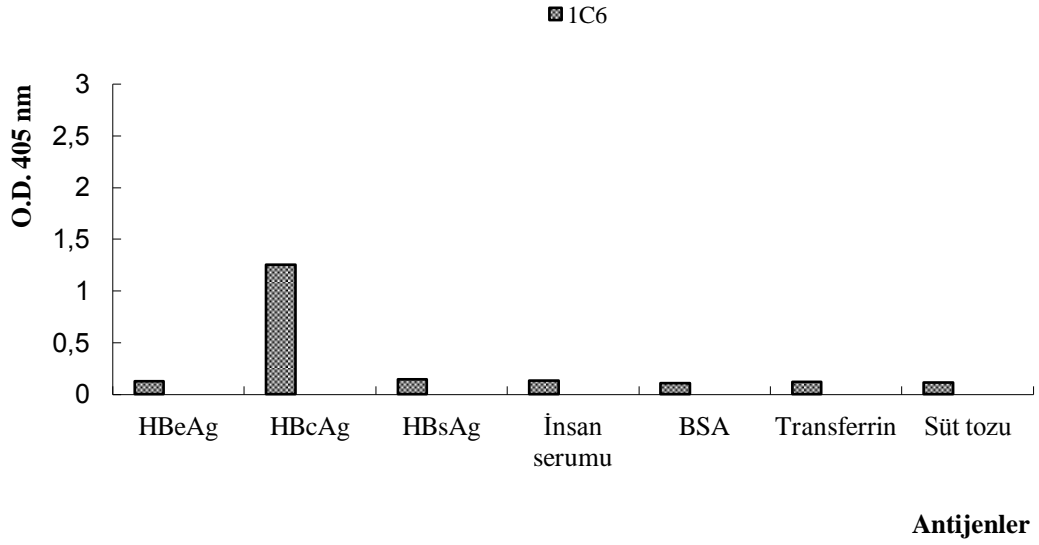
Şekil 23. 12E5 monoklonal antikorunun çapraz reaksiyon testi

HBcAg'ye karşı antikor aktivitesi pozitif olan 18E10 hibrit hücreesindeki çapraz etkileşimleri görebilmek için ELISA plağına farklı proteinler kaplanarak yapılan indirekt ELISA testinin sonuçları Şekil 24'te gösterilmiştir. Buna göre; 18E10 hibrit hücresi HBcAg'ye karşı yüksek antikor yanıtı verirken, plağa kaplanan diğer antijenlere karşı belirgin düzeyde antikor yanıtı oluşturmamaktadır.



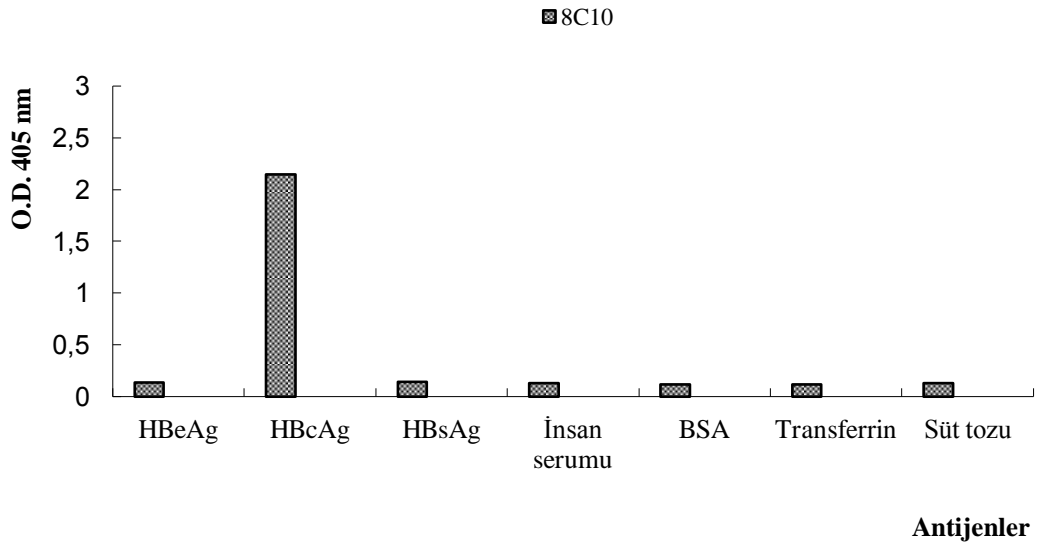
Şekil 24. 18E10 monoklonal antikorunun çapraz reaksiyon testi

HBcAg'ye karşı antikor aktivitesi pozitif olan 1C6 hibrit hücreindeki çapraz etkileşimleri görebilmek için ELISA plağına farklı proteinler kaplanarak yapılan indirekt ELISA testinin sonuçları Şekil 25'te gösterilmiştir. Buna göre; 1C6 hibrit hücresi HBcAg'ye karşı yüksek antikor yanıtı verirken, plağa kaplanan diğer antijenlere karşı belirgin düzeyde antikor yanıtı oluşturmamaktadır.



Şekil 25. 1C6 monoklonal antikorunun çapraz reaksiyon testi

HBcAg'ye karşı antikor aktivitesi pozitif olan 8C10 hibrit hücreindeki çapraz etkileşimleri görebilmek için ELISA plağına farklı proteinler kaplanarak yapılan indirekt ELISA testinin sonuçları Şekil 26'da gösterilmiştir. Buna göre; 8C10 hibrit hücresi HBcAg'ye karşı yüksek antikor yanıtı verirken, plağa kaplanan diğer antijenlere karşı belirgin düzeyde antikor yanıtı oluşturmamaktadır.



Şekil 26. 8C10 monoklonal antikorunun çapraz reaksiyon testi

#### 4.4. Monoklonal Antikorların Alt İzotipleri

Elde edilen monoklonal antikorların sınıf ve alt sınıfları indirekt ELISA ile belirlendi. Elde edilen bütün monoklonal antikorların alt izotipleri aşağıda tablolar halinde verilmektedir.

Tablo 14. 16F8 monoklonal antikorunun alt izotipleri

Hibrid hücreler	Alt izotipe özgü anti-mouse immünoğlobulinler								
	IgG	IgM	IgA	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	λ	K
16F8	2,53	0,18	0,18	2,15	0,19	0,23	0,16	0,16	1,6

Ticari konjugatlar ve ticari sub-isotype kit kullanılarak 16F8 monoklonal antikorunun alt tipinin IgG1 olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 15.** 12E5 monoklonal antikorunun alt izotipleri

	Alt izotipe özgü anti-mouse immüoglobulinler								
Hibrid hücreler	IgG	IgM	IgA	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	$\lambda$	K
12E5	2,93	0,17	0,18	0,15	0,16	2,45	0,19	0,18	1,8

Ticari konjugatlar ve ticari sub-isotype kit kullanılarak 12E5 monoklonal antikorunun alt tipinin IgG2b olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 16.** 18E10 monoklonal antikorunun alt izotipleri

	Alt izotipe özgü anti-mouse immüoglobulinler								
Hibrid hücreler	IgG	IgM	IgA	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	$\lambda$	K
18E10	0,19	2,43	0,17	0,17	0,18	0,17	0,17	0,23	0,8

Ticari konjugatlar ve ticari sub-isotype kit kullanılarak 18E10 monoklonal antikorunun alt tipinin IgM olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 17.** 1C6 monoklonal antikorunun alt izotipleri

	Alt izotipe özgü anti-mouse immüoglobulinler								
Hibrid hücreler	IgG	IgM	IgA	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	$\lambda$	K
1C6	0,11	1,48	0,15	0,21	0,19	0,23	0,16	0,16	0,7

Ticari konjugatlar ve ticari sub-isotype kit kullanılarak 1C6 monoklonal antikorunun alt tipinin IgM olduğu belirlenmiştir.



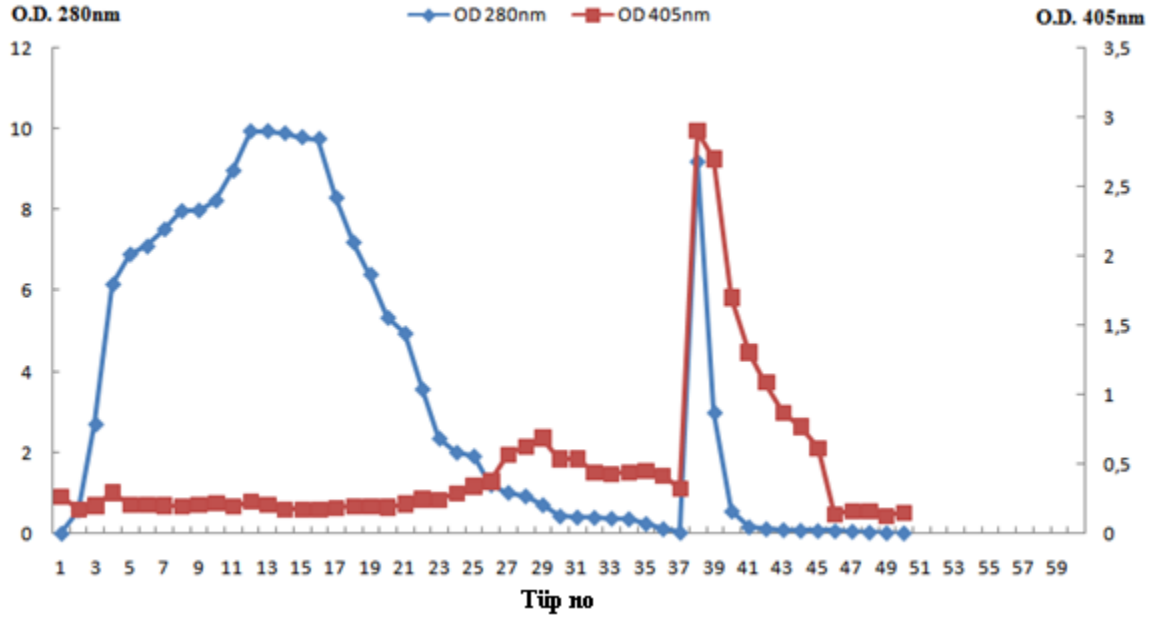
**Tablo 18.** 8C10 monoklonal antikorunun alt izotipleri

Hibrid hücreler	Alt izotipe özgü anti-mouse immüoglobulinler								
	IgG	IgM	IgA	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	$\lambda$	K
8C10	0,13	2,25	0,13	0,20	0,18	0,22	0,14	0,13	1,1

Ticari konjugatlar ve ticari sub-isotype kit kullanılarak 8C10 monoklonal antikorunun alt tipinin IgM olduğu belirlenmiştir.

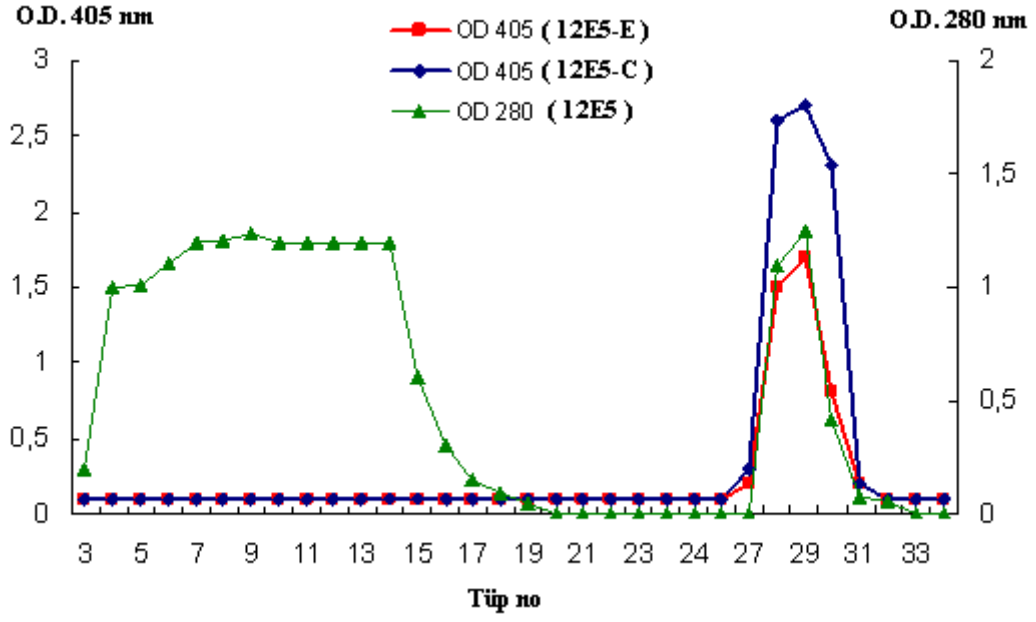
#### 4.5. Monoklonal Antikorların Saflaştırılması

16F8 HBeAg'ye özgü monoklonal antikor geniş ölçekte üretildikten sonra üst sıvıları amonyum sülfat ile çöktürüldü. 16F8 monoklonal antikorunun izotipi IgG1 olduğundan Protein-G afinite kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Kolon sonrası biriktirilen bütün kesimlere indirekt ELISA testi uygulandı. Sonuç olarak 38. ve 39. tüpler hem protein içeriği, hem de HBe antikor bakımından yüksek bulundu (Şekil 27). İki tüpten toplam 9 mg/ml protein elde edildi ve 1 mg/ml olacak şekilde bölündükten sonra -20°C'de saklandı.



Şekil 27. 16F8 monoklonal antikorun saflaştırılması

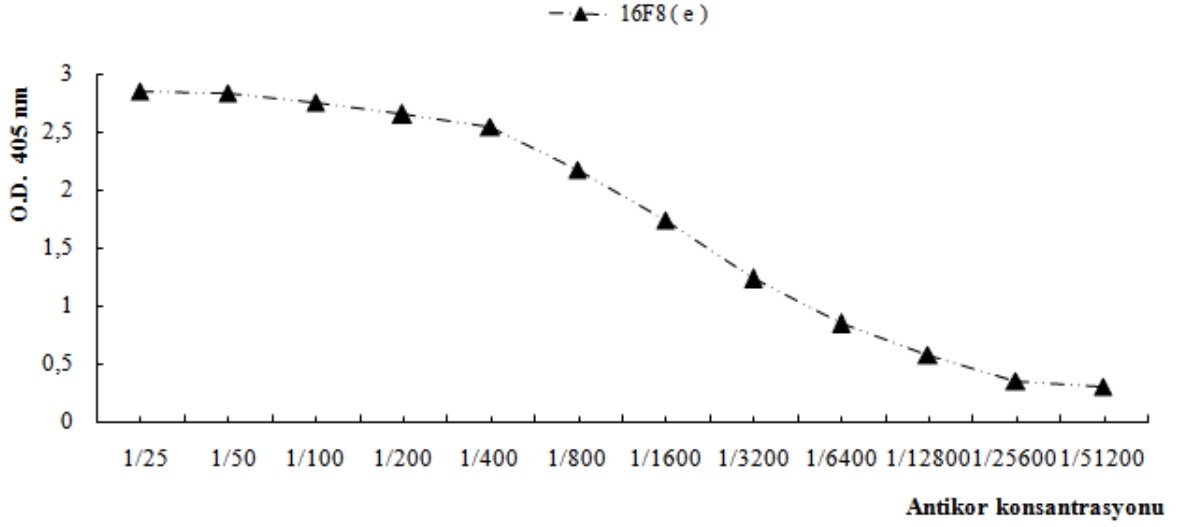
12E5 HBcAg'ye ve HBeAg'ye özgü monoklonal antikorunu geniş ölçekte üretildikten sonra üst sıvıları amonyum sülfat ile çöktürüldü. 12E5 monoklonal antikorunun izotipi IgG2b olduğundan Protein-A afinite kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Kolon sonrası biriktirilen bütün kesimlere indirekt ELISA testi uygulandı. Sonuç olarak 28, 29 ve 30. tüpler hem protein içeriği, hem de HBe antikor bakımından yüksek bulundu (Şekil 28). Üç tüpten toplam 5 mg/ml protein elde edildi ve 1 mg/ml olacak şekilde bölündükten sonra -20°C'de saklandı.



Şekil 28. 12E5 monoklonal antikorunun saflaştırılması

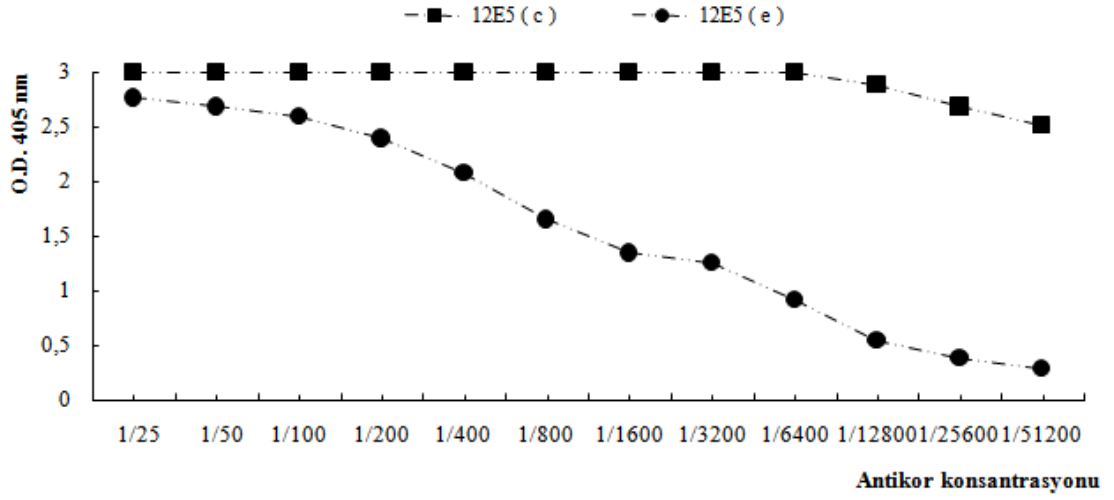
#### 4.6. Monoklonal Antikoronun Farklı Seyreltme Oranlarında Antijene Bağlanma Miktarının Belirlenmesi

16F8 HBeAg'ye özgü monoklonal antikorunun optimum seyreltme oranını belirlemek için, 1 mg/ml olarak -20°C'de sakladığımız 16F8 stokları Şekil 29'da gösterildiği gibi seyreltilti. 16F8 monoklonal antikorunun optimum seyreltme oranı 1:1000 olarak bulundu.



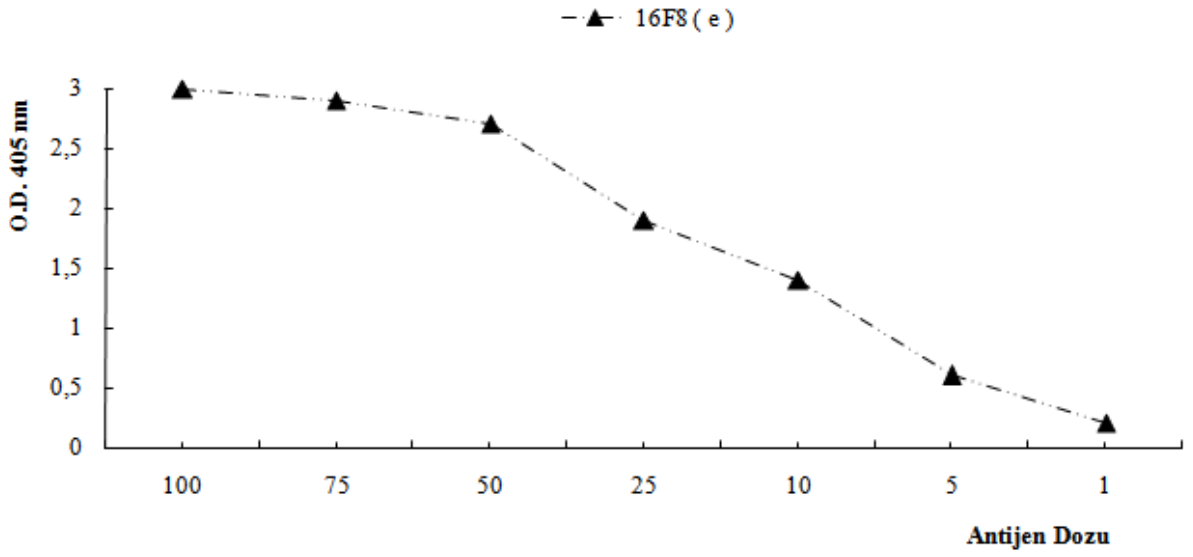
**Şekil 29.** 16F8 monoklonal antikorunun farklı seyreltme oranlarında antijene bağlanma miktarlarının belirlenmesi. ELISA plakları HBeAg (40 ng/kuyu) ile kaplandı ve saflaştırılan 16F8 monoklonal antikorunu 1/25 - 1/51200 oranında PBS ile seyreltilerek kuyucuklara koyuldu.

12E5 monoklonal antikorunun optimum seyreltme oranını belirlemek için, 1 mg/ml olarak -20°C'de sakladığımız 12E5 stokları Şekil 30'da gösterildiği gibi seyreltildi. 12E5 monoklonal antikorunu hem c antijenini hem de e antijenini tanıdığı için farklı dilüsyonlar yapıldı. Optimum seyreltme oranları c antijenine 1:10.000, e antijenine 1:1000 olarak bulundu.



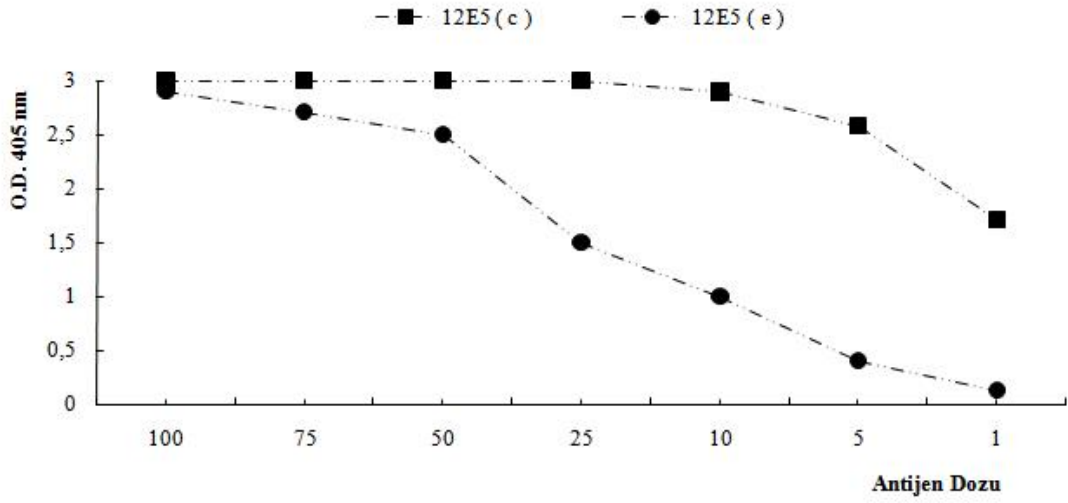
**Şekil 30.** 12E5 monoklonal antikorunun farklı seyreltme oranlarında antijene bağlanma miktarlarının belirlenmesi. ELISA plakları hem HBcAg hem de HBeAg (40 ng/kuyu) ile kaplandı ve saflaştırılan 12E5 monoklonal antikorunu 1/25 - 1/51200 oranında PBS ile seyreltilerek kuyucuklara koyuldu.

Bir sonraki adımda ELISA plakları farklı miktarlarda HBeAg ile kaplandı. 1:1000 oranında PBS ile seyreltme yapılan 16F8 monoklonal antikorunu ELISA plaklarının kuyucuklarına koyuldu. Antikoru tanıyabilen optimum antijen düzeyi Şekil 31'de gösterildi. 16F8 monoklonal antikorunu tanıyan optimum antijen dozu 100 ng/ml olarak bulundu.



**Şekil 31.** ELISA’da 16F8 monoklonal antikorunu tanımak için kullanılacak antijenin optimum dozunun belirlenmesi. ELISA plakaları farklı miktarlarda antijen ile kaplandı ve 16F8 monoklonal antikorunun (1/1000) antijene bağlanma özgünlüğü test edildi.

ELISA plakaları farklı miktarlarda hem HBcAg ve hem de HBeAg ile kaplandı. 1:1000 oranında PBS ile seyreltme yapılan 12E5 monoklonal antikorunu hem HBcAg hem de HBeAg kaplı ELISA plakalarının kuyucuklarına koyuldu. Antikoru tanıyabilen optimum antijen düzeyi Şekil 32’de gösterildi. 12E5-C monoklonal antikorunu tanıyan optimum antijen dozu 10ng/ml, 12E5-E monoklonal antikorunu tanıyan optimum antijen dozu 100 ng/ml olarak bulundu.



**Şekil 32.** ELISA'da 12E5 monoklonal antikorunu tanımak için kullanılacak antijenin optimum dozunun belirlenmesi. ELISA plakaları farklı miktarlarda c ve e antijen ile kaplandı ve 12E5 monoklonal antikorunun antijene bağlanma özgünlüğü test edildi.

#### 4.7. Monoklonal Antikorların Epitop Analizi

16F8 monoklonal antikorunun epitop analizi ProImmune Ltd. (Oxford, UK) tarafından yapıldı. İlk olarak insan Hepatit B virüsünün bütün antijenlerine özgü 15 amino asitlik sekanslar halinde 10 amino asiti üst üste gelecek şekilde biotinlenmiş peptit kütüphanesi oluşturuldu (Tablo 19). 16F8 monoklonal antikorunun 79-119 ile numaralandırılmış peptitler arasında görüntü elde edileceği düşünüldü.

**Tablo 19.** Hepatit B virüsünün bütün antijenlerine özgü biotinlenmiş peptit kütüphanesinde e antijeninin epitop dizisi

I.D.	Location	Peptide
<b>HBsAg</b>		
1	1	MGGWSSKPRKGMGTN
2	6	SKPRKGMGTNLSVFN
3	11	GMGTNLSVFNPLGFF
4	16	LSVFNPLGFFPDHQL
5	21	PLGFFPDHQLDPAFG
6	26	PDHQLDPAFGANSNN
7	31	DPAFGANSNNPDWDF
8	36	ANSNNPDWDFNPIKD
9	41	PDWDFNPIKDHWPAA
10	46	NPIKDHWPAAQVGV
11	51	HWPAAQVGVGAFGP
12	56	NQVGVGAFGPGFTPP
13	61	GAFGPGFTPPHGGIL
14	66	GFTPPHGGILGWSPQ
15	71	HGGILGWSPQAQGIL
16	76	GWSPQAQGILTTVST
17	81	AQGILTTVSTIPPPA
18	86	TTVSTIPPPASTNRQ
19	91	IPPPASTNRQSGRQP
20	96	STNRQSGRQPTPISP
21	101	SGRQPTPISPPLRDS
22	106	TPISPPLRDSHPQAM
23	111	PLRDSHPQAMQWNST
24	116	HPQAMQWNSTAFHQT
25	121	QWNSTAFHQTLDQPR

I.D.	Location	Peptide
26	126	AFHQTLDQPRVRGLY
27	131	LQDPRVRGLYLPAGG
28	136	VRGLYLPAGGSSSGT
29	141	LPAGGSSSGTVNPAP
30	146	SSSGTVNPAPNIASH
31	151	VNPAPNIASHISSIS
32	156	NIASHISSISARTGD
33	161	ISSISARTGDPVTNM
34	166	ARTGDPVTNMENITS
35	171	PVTNMENITSGFLGP
36	176	ENITSGFLGPLLVLQ
37	181	GFLGPLLVLQAGFFL
38	186	LLVLQAGFFLLTRIL
39	191	AGFFLLTRILTIQPS
40	196	LTRILTIQPSLDSWW
41	201	TIQPSLDSWWTSLNF
42	206	<i>LDSWWTSLNFLGGSP*</i>
43	211	TSLNFLGGSPVCLGQ
44	216	LGGSPVCLGQNSQSP
45	221	VCLGQNSQSPSNHS
46	226	NSQSPSNHSPTSCP
47	231	TSNHSPTSCPPICPG
48	236	PTSCPPICPGYRWMC
49	241	PICPGYRWMCLRRFI
50	246	YRWMCLRRFIIFLFI
51	251	<i>LRRFIIFLIFLLCL*</i>



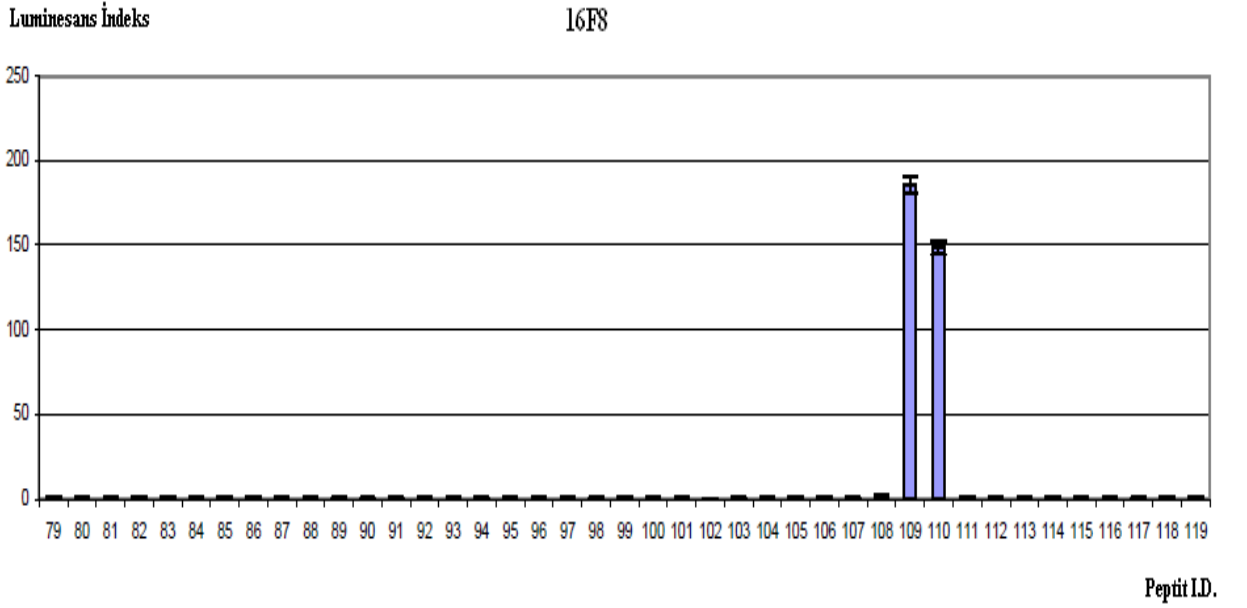
I.D.	Location	Peptide
52	256	IFLFILLCLIFLLV*
53	261	LLLCLIFLLVLLDYQ*
54	266	IFLLVLLDYQGMLPV
55	271	LLDYQGMLPVCPLIP
56	276	GMLPVCPLIPGSTTT
57	281	CPLIPGSTTTSTGPC
58	286	GSTTTSTGPCKTCTT
59	291	STGPCKTCTTPAQGN
60	296	KTCTTPAQGNMFPS
61	301	PAQGNMFPSCCCTK
62	306	SMFSPCCCTKPTDGN
63	311	CCCTKPTDGNCTCIP
64	316	PTDGNCTCIPISSW
65	321	CTCIPISSWAFKAF
66	326	IPSSWAFKFLWEWA
67	331	AFAKFLWEWASVRF
68	336	LWEWASVRFWSL
69	341	SVRFWSL
70	346	WLSL
71	351	VPFVQW
72	356	WVGLSPTVWLSAIW
73	361	SPTVWLSAIWMMWYW
74	366	LSAIWMMWYWGPSLY
75	371	MMWYWGPSLYSIVRP
76	376	GPSLYSIVRPFIPLL
77	381	SIVRPFIPLLPIFFC
78	386	FIPLLPIFFCLWVYI
<b>HBeAg</b>		
79	1	MQLFHLCLIISCTCP
80	6	LCLIISCTCPTVQAS
81	11	SCTCPTVQASKLCLG
82	16	TVQASKLCLGWLWGM
83	21	KLCLGWLWGM
84	26	WLWGM
85	31	DIDPYKEFGATVELL
86	36	KEFGATVELLSFLPS
87	41	TVELLSFLPSDFFPS
88	46	SFLPSDFFPSVRDLL
89	51	DFFPSVRDLLDTASA
90	56	VRDLLDTASALYREA
91	61	DTASALYREALESPE
92	66	LYREALESPEHCSPH
93	71	LESPEHCSPHHTALR
94	76	HCSPHHTALRQAILC

I.D.	Location	Peptide
95	81	HTALRQAILCWVELM
96	86	QAILCWVELM
97	91	WVELM
98	96	TLATWVGNNLQDPAS
99	101	VGNNLQDPASRDVV
100	106	QDPASRDVVNYVNT
101	111	RDLVVNYVNTNMGLK
102	116	NYVNTNMGLKIRQLL
103	121	NMGLKIRQLLWFHIS
104	126	IRQLLWFHISCLTFG
105	131	WFHISCLTFGRET
106	136	CLTFGRET
107	141	RET
108	146	EVLVSEGLAMRTPPA
109	151	FGVWIRTPPAYRPPN
110	156	RTPPAYRPPNAPILS
111	161	TRPPNAPILSTLPET
112	166	APILSTLPETT
113	171	TLPETTVRRDRGR
114	176	TVRRDRGRSPRRR
115	181	RDRGRSPRRRTPSPR
116	186	SPRRRTPSPRRRSQ
117	191	TPSPRRRSQSPRRR
118	196	RRRSQSPRRRSQSR
119	201	OSPRRRRSOSRESOC
<b>HBcAg</b>		
120	1	MDIDPYKEFGASVEL
121	6	YKEFGASVELLSFLP
122	11	ASVELLSFLPSDFFP
123	16	LSFLPSDFFPSVRDL
124	21	SDFPSVRDLLDTAA
125	26	SVRDLDTAAALYRE
126	31	LDTAAALYREALESP
127	36	ALYREALESPEHCSP
128	41	ALESPEHCSPHHTAL
129	46	EHCSPHHTALRQAIL
130	51	HHTALRQAILCWGEL
131	56	RQAILCWGELMNLAT
132	61	CWGELMNLATWVGSN
133	66	MNLATWVGSNLEDPA
134	71	WVGSNLEDPASREL
135	76	LEDPASRELVSVYN
136	81	SRELVSVYVNVNMGL
137	86	VSVYVNVNMGLKIRQL

.D.	Location	Peptide
138	91	VNMGLKIRQLLWFHI
139	96	KIRQLLWFHISCLTF
140	101	LWFHISCLTFGRETQ
141	106	SCLTFGRETQVLEYLV
142	111	GRETQVLEYLVSFGVW
143	116	LEYLVSFGVWIRTQP
144	121	SFGVWIRTQPAYRPP
145	126	IRTPQAYRPPNAPIL
146	131	AYRPPNAPILSTLPE

I.D.	Location	Peptide
147	136	NAPILSTLPETTQVR
148	141	STLPETTQVRRRGRS
149	146	TTVRRRGRSPRRRT
150	151	RRGRSPRRRTQSPRR
151	156	PRRRTPSPRRRSQS
152	161	PSPRRRSQSPPRRR
153	166	RRSQSPRRRSQSRE
154	171	QSPRRRSQSREPOC

Biotinlenen peptitler 0.2  $\mu$ M konsantrasyonda streptoavidin ile kaplandı ve ELISA plaklarına bloklandı. 1  $\mu$ g/ml konsantrasyonda antikor eklendi. Peptid bağlı antikorlar anti-human poliklonal antikor ile işaretlendi, horseradish peroksidaz ve chemiluminescent substrat ile görünür hale getirildi (Şekil 33).



Şekil 33. Biotinlenen peptit dizilerine, 16F8 monoklonal antikorunun bağlanarak substrat ile görünür hale gelmesi

16F8 monoklonal antikoruna iki antijen diziliminde pozitif sonuç verdi (109-110). 16F8 epitop dizilimi Tablo 20'de gösterilmiştir.

**Tablo 20.** 16F8 monoklonal antikorunun amino asit dizilimi

Epitop	Peptidler	Amino asit dizilimi
1	109-110	FGVW <u>IRTPPAYRPP</u> NA <u>PILS</u>

12E5 monoklonal antikorlarının epitop analizi de ProImmune Ltd. (Oxford, UK) tarafından yapıldı. İnsan Hepatit B virüsünün bütün antijenlerine özgü 15 amino asitlik sekanslar halinde 10 amino asiti üst üste gelecek şekilde biotinlenmiş peptit kütüphanesi oluşturuldu (Tablo 21). 12E5 monoklonal antikorunun 120-154 ile numaralandırılmış peptitler arasında görüntü elde edileceği düşünüldü.

**Tablo 21.** Hepatit B virüsünün bütün antijenlerine özgü biotinlenmiş peptit kütüphanesinde c antijenin epitop dizisi

I.D.	Location	Peptide
<b>HBsAg</b>		
1	1	MGGWSSKPRKMGMTN
2	6	SKPRKMGMTNLSVPN
3	11	GMTNLSVPNPLGFF
4	16	LSVPNPLGFFPDHQL
5	21	PLGFFPDHQLDPAFG
6	26	PDHQLDPAFGANSNN
7	31	DPAFGANSNNPDWDF
8	36	ANSNNPDWDFNPIKD
9	41	PDWDFNPIKDHWPAA
10	46	NPIKDHWPAAANQVGV
11	51	HWPAANQVGVGAFGP
12	56	NQVGVGAFGPGFTPP
13	61	GAFGPGFTPPHGIL
14	66	GFTPPHGILGWSPQ
15	71	HGGILGWSPQAQGIL
16	76	GWSPQAQGILTTVST
17	81	AQGILTTVSTIPPPA
18	86	TTVSTIPPPASTNRQ
19	91	IPPPASTNRQSGRQP
20	96	STNRQSGRQPTPISP
21	101	SGRQPTPISPPLRDS
22	106	TPISPPLRDSHPQAM
23	111	PLRDSHPQAMQWNST
24	116	HPQAMQWNSTAFHQT
25	121	QWNSTAFHQTLDPR

I.D.	Location	Peptide
26	126	AFHQTLQDPRVRLY
27	131	LQDPRVRLYLPAGG
28	136	VRGLYLPAGGSSSGT
29	141	LPAGGSSSGTVNPAP
30	146	SSSGTVNPAPNIASH
31	151	VNPAPNIASHISSIS
32	156	NIASHISSISARTGD
33	161	ISSISARTGDPVTNM
34	166	ARTGDPVTNMENITS
35	171	PVTNMENITSGFLGP
36	176	ENITSGFLGPLLVLQ
37	181	GFLGPLLVLQAGFFL
38	186	LLVLQAGFFLLTRIL
39	191	AGFFLLTRILTIPQS
40	196	LTRILTIPQSLDSWW
41	201	TIPQSLDSWWTSLNF
42	206	<i>LDSWWTSLNFLGGSP*</i>
43	211	TSLNFLGGSPVCLGQ
44	216	LGGSPVCLGQNSQSP
45	221	VCLGQNSQSPTSNSHS
46	226	NSQSPTSNSHSPTSCP
47	231	TSNSHSPTSCPPICPG
48	236	PTSCPPICPGYRWMC
49	241	PICPGYRWMCLRRFI
50	246	YRWMCLRRFIIFLFI
51	251	<i>LRRFIIFLIFLLCL*</i>

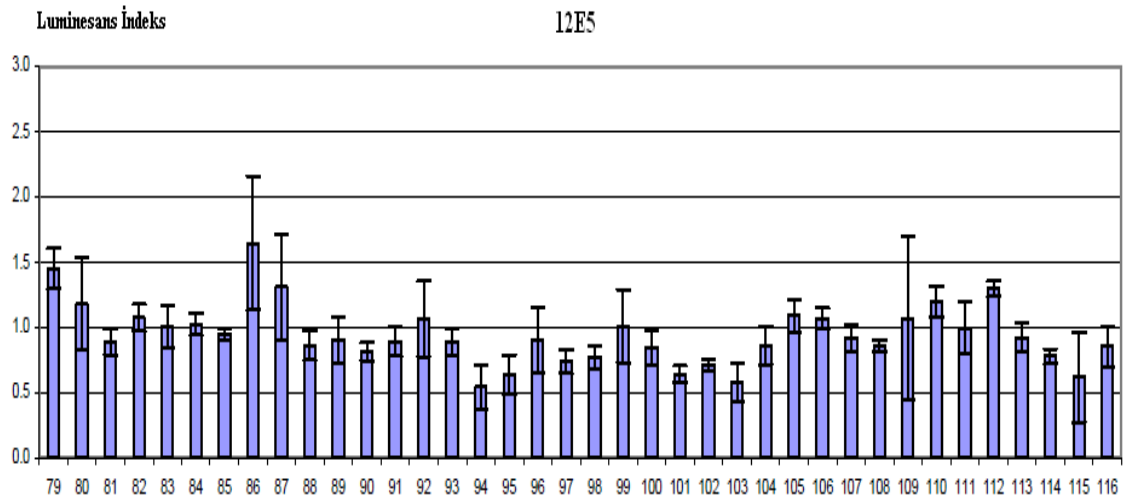
I.D.	Location	Peptide
52	256	IFLFILLCLIFLLV*
53	261	LLLCLIFLLVLLDYQ*
54	266	IFLLVLLDYQGMLPV
55	271	LLDYQGMLPVCPLIP
56	276	GMLPVCPLIPGSTTT
57	281	CPLIPGSTTTSTGPC
58	286	GSTTTSTGPCKTCTT
59	291	STGPCKTCTTPAQGN
60	296	KTCTTPAQGNSMFPS
61	301	PAQGNSMFPSCCCTK
62	306	SMFSPCCCTKPTDGN
63	311	CCCTKPTDGNCTCIP
64	316	PTDGNCTCIPISSW
65	321	CTCIPISSWAFKAF
66	326	IPSSWAFKFLWEWA
67	331	AFAKFLWEWASVRFS
68	336	LWEWASVRFSWLSLL
69	341	SVRFSWLSLLVPFVQ
70	346	WLSLLVPFVQWVGL
71	351	VPFVQWVGLSPTVW
72	356	WVGLSPTVWLSAIW
73	361	SPTVWLSAIWMMWYW
74	366	LSAIWMMWYWGPSLY
75	371	MMWYWGPSLYSIVRP
76	376	GPSIYSTVRPFPII
77	381	SIVRPFIPLLPIFFC
78	386	FIPLLPPIFFCLWVYI
<b>HBeAg</b>		
79	1	MQLFHLCLIISCTCP
80	6	LCLIISCTCPTVQAS
81	11	SCTCPTVQASKLCLG
82	16	TVQASKLCLGWLWGM
83	21	KLCLGWLWGMIDIDPY
84	26	WLWGMIDIDPYKEFGA
85	31	DIDPYKEFGATVELL
86	36	KEFGATVELLSFLPS
87	41	TVELLSFLPSDFFPS
88	46	SFLPSDFFPSVRDLL
89	51	DFFPSVRDLLDTASA
90	56	VRDLLDTASALYREA
91	61	DTASALYREALESPE
92	66	LYREALESPEHCSPH
93	71	LESPEHCSPHHTALR
94	76	HCSPHHTALRQAILC

I.D.	Location	Peptide
95	81	HTALRQAILCWVELM
96	86	QAILCWVELMTLATW
97	91	WVELMTLATWVGNNL
98	96	TLATWVGNNLQDPAS
99	101	VGNNLQDPASRDLVV
100	106	QDPASRDLVVNYVNT
101	111	RDLVVNYVNTNMGLK
102	116	NYVNTNMGLKIRQLL
103	121	NMGLKIRQLLWFHIS
104	126	IRQLLWFHISCLTFG
105	131	WFHISCLTFGRETVL
106	136	CLTFGRETVLEYLVS
107	141	RETVLEYLVSFVGI
108	146	EYLVSFVGIWIRTPPA
109	151	FGVGIWIRTPPAYRPPN
110	156	RTPPAYRPPNAPILS
111	161	YRPPNAPILSTLPET
112	166	APILSTLPETTIVRR
113	171	TLPETTVRRRDRGR
114	176	TVRRRDRGRSPRRR
115	181	RDRGRSPRRRTPSPR
116	186	SPRRRTPSPRRRSQ
117	191	TPSPRRRSQSPRRR
118	196	RRRSQSPRRRSQSR
119	201	OSPRRRRSOSRFSOC
<b>HBcAg</b>		
120	1	MDIDPYKEFGASVEL
121	6	YKEFGASVELLSFLP
122	11	ASVELLSFLPSDFFP
123	16	LSFLPSDFFPSVRDL
124	21	SDFFPSVRDLLDTAA
125	26	SVRDLDTAAALYRE
126	31	LDTAAALYREALES
127	36	ALYREALESPEHCSP
128	41	ALESPEHCSPHHTAL
129	46	EHCSPHHTALRQAIL
130	51	HHTALRQAILCWGEL
131	56	RQAILCWGELMNLAT
132	61	CWGELMNLATWVGSN
133	66	MNLATWVGSNLEDPA
134	71	WVGSNLEDPASRELV
135	76	LEDPASRELVSVYVN
136	81	SRELVSVYVNVNMGL
137	86	VSVYVNVNMGLKIROL

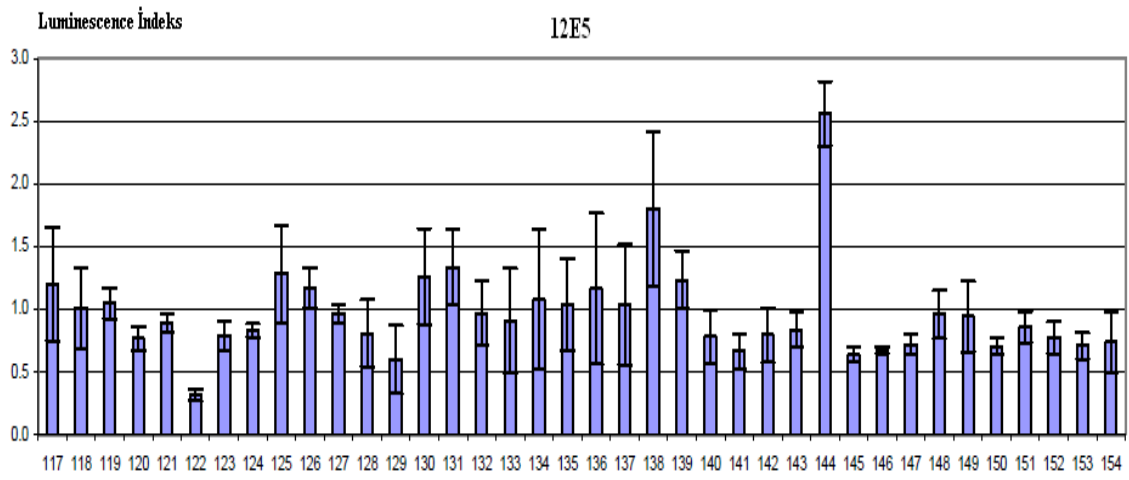
.D.	Location	Peptide
138	91	VNMGLKIRQLLWFHI
139	96	KIRQLLWFHISCLTF
140	101	LWFHISCLTFGRETV
141	106	SCLTFGRETVLEYLV
142	111	GRETVLEYLVSFGVW
143	116	LEYVSTFGVWIRTPO
144	121	SFGVWIRTPOAYRPP
145	126	IRTPOAYRPPNAPIL
146	131	AYRPPNAPILSTLPE

I.D.	Location	Peptide
147	136	NAPILSTLPETTIVR
148	141	STLPETTIVRRRGRS
149	146	TTVRRRGRSPRRRT
150	151	RRGRSPRRRTSPRR
151	156	PRRRTSPRRRRSQS
152	161	PSPRRRRSQSPRRRR
153	166	RRSQSPRRRRSQSRE
154	171	QSPRRRRSQSREPOC

Biotinlenen peptitler 0.2  $\mu$ M konsantrasyonda streptoavidin ile kaplandı ve ELISA plaklarına bloklandı. 1  $\mu$ g/ml konsantrasyonda antikor eklendi. Peptit bağlı antikorlar anti-human poliklonal antikor ile işaretlendi, horseradish peroksidaz ve chemiluminescent substrat ile görünür hale getirildi (Şekil 34).



Peptit I.D.



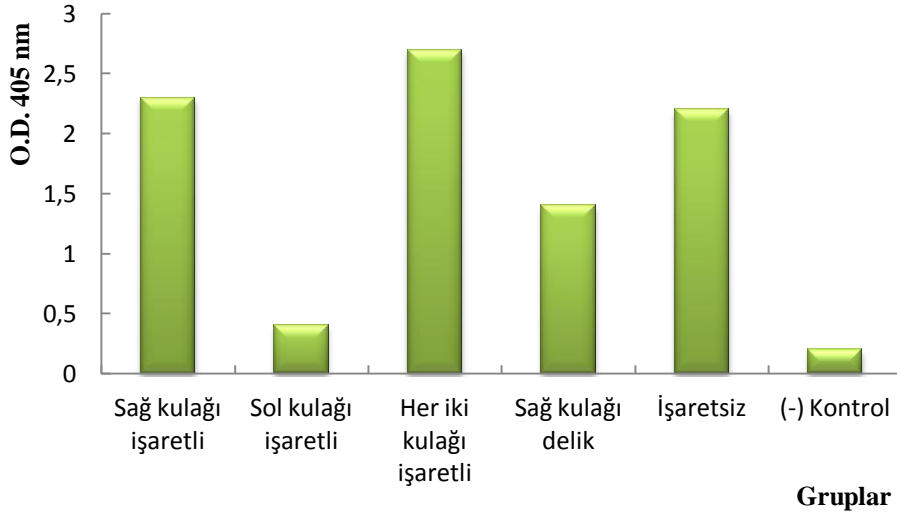
Peptit I.D.

**Şekil 34.** Biotinlenen peptit dizilerine, 12E5 monoklonal antikorunun bağlanarak substrat ile görünür hale gelmesi

12E5 monoklonal antikoru sadece bir antijen diziliminde çok zayıf pozitif sonuç verdi (I.D.144). 12E5 epitop dizilimi düz (lineer) bir şekilde dizilime sahip değildi bu nedenle kesintili (discontinuous) epitop olabileceği kanısına varıldı.

#### 4.8. Organ Olarak Dondurulmuş Dalak ve Lenf Dügümlerinin Füzyon Çalışmasında Kullanılması

HBeAg ile immünize farelerin dondurulmuş dalak ve lenf düğümleri kullanılarak hücreler izole edildikten sonra anti-HBe monoklonal antikoru eldesi için füzyon deneyleri yapıldı. Bu amaca yönelik 5 adet 8 haftalık BALB/c fare, 10µg HBeAg ile ikişer hafta aralıklarla immünize edildi. İlk immünizasyon *Freund's complete* adjuvantı, ikinci ve diğer immünizasyonlar ise *Freund's incomplete* adjuvantı ile gerçekleştirildi. Farelerden kan alınıp ilgili antijene karşı gelişmiş bir antikor yanıtının oluşup oluşmadığına ELISA'da bakıldı (Şekil 35). Bu farelerin dışında 4 fareye kontrol füzyonları için farklı tarihlerde aynı immünizasyon protokolü uygulandı.



Şekil 35. HBeAg ile immünize edilen farelerde Ag'ye özgün antikor yanıtlarının belirlenmesi

HBeAg ile immünize edilen sol kulağı işaretli fare dışında iyi antikor yanıtı veren diğer farelerin lenf düğümleri ve dalağı dondurma besiyeri içine alınarak bir gün -80°C'de bekletilip, daha sonra -150°C dondurucuda saklandı. Dondurma deneylerinde kullanılması planlanan üç adet fare için üç aylık bir program yapıldı ve her ay bir farenin lenf düğümü ile beraber dalağı füzyona alındı. Dondurma sonrası birinci, ikinci

ve üçüncü ayın sonunda yapılan füzyon çalışmalarında, cryo tüplerde muhafaza edilen lenf düğümleri ve dalak oda sıcaklığına çıkartıldı, 1 dakika elde, 3 dakika 37 °C'deki su banyosunda olmak üzere çözümleri sağlandı. Kullanılmadan önce organlar fosfat tamponunda (PBS, 10 mM, pH 7,2) yıkandı. Organlar iyice çözüldükten sonra steril tek kullanımlık süzgecin arasında lenf düğümleri ve dalak parçalanarak hücreler elde edildi. Daha sonra, elde edilen hücreler Thoma lamında sayılıp myeloma hücreleri ile füzyona alındı.

#### 4.8.1. Dondurulan Organlar ile Yapılan Füzyon Sonuçları

-150°C dondurucuda bir ay bekletilen dondurulmuş organlar ile yapılan birinci füzyon sonuçları Tablo 22'de verilmiştir.

**Tablo 22.** Organ olarak dondurulmuş dalak ve lenf düğümlerinden yapılan birinci füzyon çalışması sonuçları

Hücreler	Dondurulmuş Organ	Kontrol
Lenfositler	60 x 10 <sup>6</sup>	400 x 10 <sup>6</sup>
Myeloma hücreleri	30 x 10 <sup>6</sup>	190 x 10 <sup>6</sup>
Kuyu sayısı	288	768
Hibrit hücre sayısı	57	206
Antikor aktivitesine sahip hibrit hücre sayısı	4	7
HBVe antijenine özgü monoklonal antikor	-	-

Bu çalışmada -150°C dondurucuda bir ay bekletilen dondurulmuş organlar ile füzyon yapılmasına rağmen 57 adet çoğalabilen hibrit hücre elde edildi, bulunan hibritlerden 4 tanesinin hem aktif olarak çoğalabildiği, hem de antikor üretebildiği görüldü (Tablo 22). Kontrol grubunda ise 206 hibrit elde edildi, bulunan hibritlerden 7 tanesinin aktif hibrit olduğu görüldü. Antikor aktivitesine sahip hibrit hücre sayısı,



yüzde başarı oranı olarak hesaplandığında dondurulmuş organlardan yapılan füzyonun daha başarılı olduğu sonucuna varıldı.

-150°C dondurucuda iki ay bekletilen dondurulmuş organlar ile yapılan ikinci füzyon sonuçları Tablo 23'te verilmiştir.

**Tablo 23.** Dondurulmuş dalak ve lenf düğümlerinden yapılan ikinci füzyon çalışması sonuçları

<b>Hücreler</b>	<b>Dondurulmuş Organ</b>	<b>Kontrol</b>
Lenfositler	30.5 x 10 <sup>6</sup>	325 x 10 <sup>6</sup>
Myeloma hücreleri	16 x 10 <sup>6</sup>	170 x 10 <sup>6</sup>
Kuyu sayısı	192	672
Hibrit hücre sayısı	37	97
Antikor aktivitesine sahip hibrit hücre sayısı	-	5
HBVe antijenine özgü monoklonal antikor	-	-
HBVc antijenine özgü monoklonal antikor	-	1 (3G3)

Bir ay -150°C dondurucuda bekletilen dondurulmuş organlar ile yapılan füzyon çalışmasında iyi sonuçlar almamıza rağmen iki ay bekletilen dondurulmuş organlar ile yapılan füzyon çalışmasında 37 adet hibrit hücre elde edildi fakat antikor üretme yeteneğine sahip olan hibrit hücre elde edilemedi (Tablo 23). Çalışmada farklı zamanlarda satın alınan ve farklı lot numaralarına sahip serumların (FBS) kullanılmasının füzyon veriminin düşük olmasında etkili olduğu düşünülmektedir.

-150°C dondurucuda üç ay bekletilen dondurulmuş organlar ile yapılan üçüncü füzyon sonuçları Tablo 24'te verilmiştir.

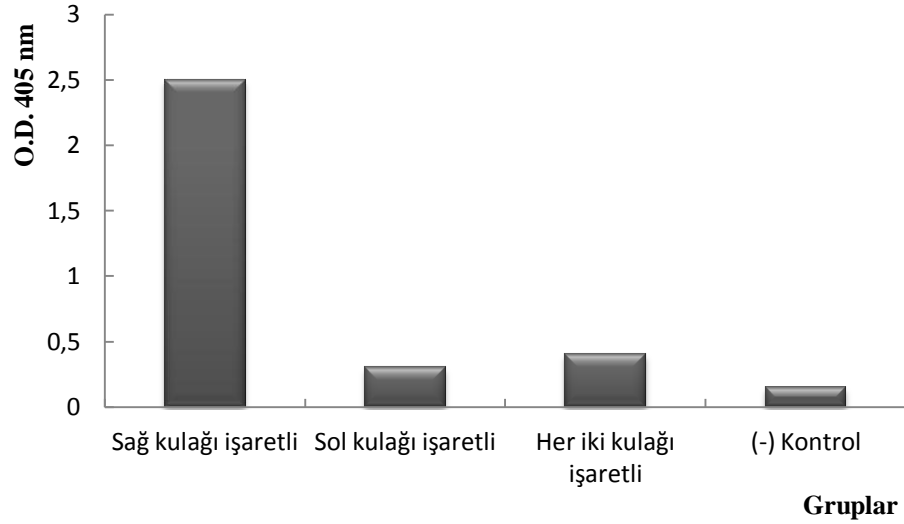
**Tablo 24.** Dondurulmuş dalak ve lenf düğümlerinden yapılan üçüncü füzyon çalışması sonuçları

<b>Hücreler</b>	<b>Dondurulmuş Organ</b>	<b>Kontrol</b>
Lenfositler	50 x 10 <sup>6</sup>	290 x 10 <sup>6</sup>
Myeloma hücreleri	25 x 10 <sup>6</sup>	145 x 10 <sup>6</sup>
Kuyu sayısı	192	696
Hibrit hücre sayısı	168	1094
Antikor aktivitesine sahip hibrit hücre sayısı	11	23
HBVe antijenine özgü monoklonal antikor	-	-

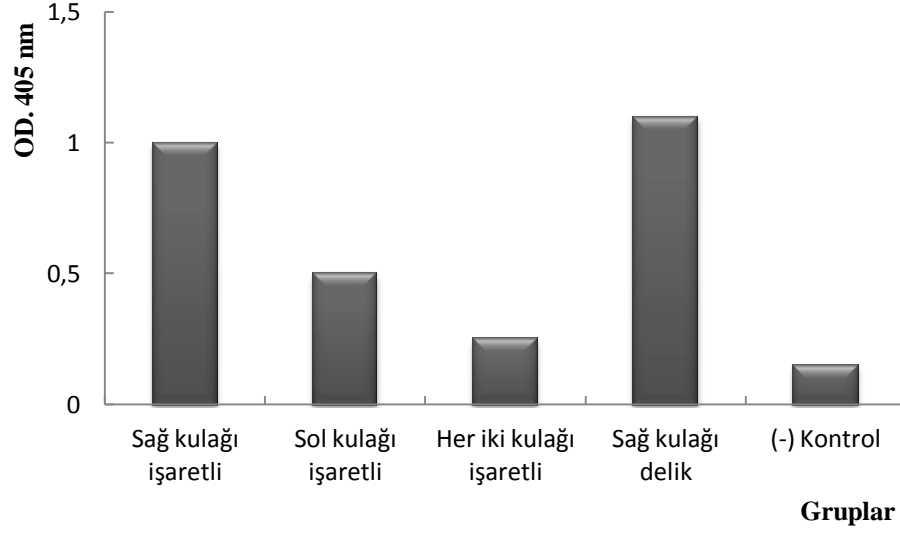
Bu çalışmada -150°C dondurucuda üç ay bekletilen dondurulmuş organlar ile füzyon yapılmasına rağmen 168 adet çoğalabilen hibrit hücre elde edildi, bulunan hibritlerden 11 tanesinin hem aktif olarak çoğalabilmekte hem de antikor üretme yeteneğini korumakta olduğu görüldü (Tablo 24). Kontrol grubunda ise 1094 hibrit elde edildi, bulunan hibritlerden 23 tanesinin aktif hibrit olduğu görüldü. Antikor aktivitesine sahip hibrit hücre sayısı, yüzde başarı oranı olarak hesaplandığında dondurulmuş organlardan yapılan füzyonun daha başarılı olduğu bulundu. Ancak füzyon çalışmalarında HBeAg'yi özgün tanıyan monoklonal antikor elde edilemedi. Füzyon çalışmalarında mAb eldesi zordur, bu tez çalışmasında yapılan 10 adet klasik füzyon sonucunda HBeAg'ye özgü sadece 1 mAb elde edilebilmiştir. Üç aylık dondurma, saklama ve çözme işleminin, immünize farelerden elde edilen dondurulmuş lenf düğümü ile dalağı olumsuz olarak etkilemediği, çoğalabilen ve antikor üretme yeteneğini koruyan hücrelerin canlılığını sürdürdüğü gösterildi. Bu yöntemin organ dondurma çalışmalarında alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

#### 4.9. Yüzeyinde Hepatit B e Antijeni Eksprese Eden M13 Bakteriyofajı ile Yapılan İmmünizasyonlar Sonrası Monoklonal Antikor Geliştirilmesi

TÜBİTAK-MAM GMBE İmmünogenetik Laboratuvarı tarafından, TARAL 1007 projesi kapsamında (105G0656) yapılan yüzeyinde HBeAg'yi eksprese eden M13 fajlarla immünize çalışmaları gerçekleştirildi. İmmünizasyon sonuçları Şekil 36 ve Şekil 37'de gösterilmektedir. Buna göre rekombinant e faj ile immünize edilen birinci grup farelerden sağ kulağı işaretli farede, rekombinant e faj + incomplete freund's adjuvantı ile immünize edilen ikinci grupta ise sağ kulağı işaretli ve sağ kulağı delik farelerde e antijenine karşı yüksek antikor yanıtı elde edilmiştir.



Şekil 36. Rekombinant e faj immünizasyonu (1. Grup) sonucunda farelerde oluşan hepatit e antikorunun seviyesinin belirlenmesi.



**Şekil 37.** Rekombinant e faj + incomplete freund's adjuvant immünizasyonu (2. Grup) sonucunda farelerde oluşan hepatit e antikorunun seviyesi

#### 4.9.1. Yüzeyinde Hepatit B e Antijeni Eksprese Eden M13 Bakteriyofajı ile Yapılan İmmünizasyonlar Sonrası Füzyon Çalışmaları

Birinci füzyon çalışmasında 1. Grup immünizasyonda antikor yanıtı yüksek bulunan sağ kulağı işaretli fare kullanıldı (Şekil 36). Füzyon sonuçları Tablo 25'de gösterilmektedir.

**Tablo 25.** Rekombinant e faj immünizeli farenin dalak ve lenf düğümlerinden yapılan birinci füzyon çalışmasının sonuçları

Füzyon Sonucu	
Lenfositler	4.1 x 10 <sup>8</sup>
Myeloma hücreleri	2 x 10 <sup>8</sup>
Kuyu sayısı	960
Hibrit hücre sayısı	854
Antikor aktivitesine sahip hibrit hücre sayısı	11
HBVe antijenine özgü monoklonal antikor	-

İkinci ve üçüncü füzyon çalışmasında 2. Grup immünizasyonda antikor yanıtı yüksek bulunan sağ kulağı işaretli ve sağ kulağı delik fare kullanıldı (Şekil 37). Füzyon sonuçları Tablo 26 ve 27’de gösterilmektedir.

**Tablo 26.** Rekombinant e faj+IFA immünizeli sağ kulağı işaretli farenin dalak ve lenf düğümlerinden yapılan ikinci füzyon çalışmasının sonuçları

<b>Füzyon Sonucu</b>	
Lenfositler	310 x 10 <sup>6</sup>
Myeloma hücreleri	150 x 10 <sup>6</sup>
Kuyu sayısı	768
Hibrit hücre sayısı	527
Antikor aktivitesine sahip hibrit hücre sayısı	9
HBVe antijenine özgü monoklonal antikor	-

**Tablo 27.** Rekombinant e faj+IFA immünizeli sağ kulağı delik farenin dalak ve lenf düğümlerinden yapılan üçüncü füzyon çalışmasının sonuçları

<b>Füzyon Sonucu</b>	
Lenfositler	130 x 10 <sup>6</sup>
Myeloma hücreleri	100 x 10 <sup>6</sup>
Kuyu sayısı	672
Hibrit hücre sayısı	117
Antikor aktivitesine sahip hibrit hücre sayısı	1
HBVe antijenine özgü monoklonal antikor	-

Bu çalışmada toplam 1498 adet hibrit hücre elde edildi. Bu hibrit hücrelerin 21 tanesinin antikor aktivitesi olduğu belirlendi. Ancak füzyon çalışmalarında HBeAg’yi özgün tanıyan monoklonal antikor elde edilememiştir.

## 5. TARTIŞMA

Dünyada en çok görülen enfeksiyon hastalıklarından biri olan hepatit B, hafif ve belirti göstermeyen bir enfeksiyondan, sirozla primer hepatosellüler karsinoma gibi çok daha ağır karaciğer hastalıklarına kadar çeşitli tablolara neden olabilmektedir. Son 40 yılda hepatit B'nin etiyolojisi, geçmişi, epidemiyolojisi ve halk sağlığı kontrolü açısından bilgi birikimi elde edilmesi ile hastalığın ciddiyetine dikkat çekilmiş ve dünya genelinde hepatit B yayılımının kontrolü için 150'den fazla ülkede hepatit B aşısı ulusal aşılama programlarına dahil edilmiştir. Ülkelerin aşılama politikasındaki bu değişiklik ile günümüzde kronik HBV enfeksiyonu hastası olan yenidoğan sayısının ve bununla bağlantılı olarak HBV'den kaynaklanabilen siroz, karaciğer kanseri gibi vakaların zamanla azalması beklenmektedir (91). Dünya genelinde 2 milyar insanın ( dünya nüfusunun yaklaşık 1/3'ünün) Hepatit B ile enfekte olduğu ve bu kişilerin 400 milyonunda enfeksiyonun kronik Hepatit B hastalığına dönüştüğü bilinmektedir (28). Her yıl yaklaşık 1 milyon insan Hepatit B ve onun neden olduğu sorunlar nedeni ile yaşamını yitirmektedir.

Akut, kronik ve şiddetli (fulminant) tipleri bulunan HBV enfeksiyonunda hastanın hastalığın hangi evresinde olduğunu belirlemek için serolojik testlerden yararlanılmaktadır (91). Hastalığın farklı aşamalarında antijenlerin (HBsAg ve HBeAg) ve antikorların (anti-HBsAg, anti-HBeAg ve anti-HBcAg) düzeyleri farklılık gösterdiğinden bu değerlerin takip edilmesiyle hastalığın seyri hakkında bilgi sahibi olmak mümkündür (149). HBsAg ile beraber veya HBsAg seviyesinin artmasından çok kısa bir süre sonra serumda beliren HBeAg hem akut, hem de kronik hepatitte viral DNA ile aktif replikasyonun varlığını yansıttığından bulaşıcılığın belirteci olarak kabul edilmektedir (33). HBeAg seviyesi iyileşen olgularda ortalama 10 hafta içerisinde, HBsAg seviyesindeki düşüşü takiben düşmektedir (129). HBV enfeksiyonu taşıyan hastaların serumlarında HBsAg ve HBeAg seviyeleri ile HBV DNA'sı konsantrasyonunun 6 aydan uzun süre yüksek seyrini koruması enfeksiyonun kronikleşme evresinde olduğunu belirtmektedir (98,148). Akut HBV hastalarında zaman içinde HBeAg seviyesindeki düşüşe paralel olarak anti-HBeAg seviyesinde artış

görülmektedir. Anti-HBe seviyesi yüksek olan hastalarda hastalığın bulaşma riski azalmaktadır (140).

Bu tez çalışmasında, Hepatit B hastalığının şiddeti ve seyrini izlemek üzere klasik hibridoma teknolojisi kullanılarak HBeAg'ye özgü monoklonal antikorlar geliştirilmiş ve karakterize edilmiştir. Klasik hibridoma yönteminde temel amaç bir fareye ilgili antijenin enjekte edilmesi yoluyla farenin B lenfositlerinden, verilen antijene karşı antikor üretmelerini sağlamak ve daha sonra bu hücreler ile myeloma hücrelerini birleştirerek hücre kültür ortamında sürekli çoğalarak antikor üreten hibrit hücreler geliştirmektir (76).

İmmünizasyonlarda kullanılacak antijen dozunun belirlenmesi, uygun adjuvant seçimi, antijen-adjuvant karışımının hazırlanması, immunizasyon yolunun ve enjeksiyon hacminin belirlenmesi hibridoma tekniği ile monoklonal antikor elde edilmesinde dikkat edilmesi gereken kritik aşamalardır. Bu tez çalışmasında fare immünizasyonunda kullanılacak antijen dozunu belirlemek amacıyla farelere 2 µg, 4 µg ve 10 µg olmak üzere üç farklı dozda HBeAg uygulanarak en iyi yanıtın 10 µg antijen dozunda elde edildiği belirlendi ve immünizasyonlara bu doz ile devam edildi. Farklı araştırma gruplarının yaptığı çalışmalarda, HBeAg'ye karşı immün yanıt oluşturmak için yapılan immünizasyonlarda yüksek dozda antijene ihtiyaç duyulduğu görülmektedir (75,163). Bu durum, kullanılan antijenin saflaştırma sırasında maruz kaldığı işlemlere bağlı olarak immün yanıt seviyesinin düşmesi ile bağlantılı olabilir.

Hepatit B virüsünün C geni tarafından sentezlenen mRNA üzerinde farklı konumlarda bulunan iki AUG başlangıç kodunundan başlayan iki ayrı translasyon sonucunda elde edilen HBe ve HBc antijenleri farklı özelliklere sahiptir. 5' Ucuna daha yakın olan AUG kodonu ile başlayan dizinin translasyonu ile HBeAg sentezlenirken, 3' ucuna daha yakın olan kısımdan HBcAg sentezlenmektedir (123). Kor proteinin proteolitik kesimi sonucunda oluşan HBeAg'nin kesilmiş formları ribozomda farklılaşarak olgun HBeAg'yi oluşturmaktadır (148). Aynı dizinin farklı konumundan translasyonu dolayısıyla ortaya çıkan protein yapısındaki yüksek derecede benzerliğin

sebebi olduğu ortak epitop varlığı ve HBcAg'ye göre daha düşük moleküler ağırlığa sahip olması HBeAg için monoklonal antikor geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Yapılan çalışmalarda HBeAg için geliştirildiği düşünölen monoklonal antikorlar genellikle HBcAg ile de çapraz reaksiyon vermektedir (147).

Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen on füzyon sonucunda üç füzyondan HBeAg ve HBcAg için özgün olan beş hibrit hücre (16F8, 12E5, 18E10, 1C6 ve 8C10) elde edilmiştir (Tablo 7,9,13). Diğer antijenlerle çapraz reaksiyon verip vermediği kontrol edilen 16F8 hibrit klonunun HBeAg'ye özgü yüksek antikor yanıtına sahip olduğu (Şekil 22), 18E10, 1C6 ve 8C10 hibrit klonlarının ise HBcAg için yanıt oluşturdukları belirlenmiştir (Şekil 24-26). 12E5 hibrit klonu, HBe ve HBc antijenlerinin her ikisi ile de reaksiyon vermektedir ancak daha çok HBcAg'yi tanımaktadır (Şekil 23). 16F8, 18E10, 1C6, 8C10 ve 12E5 monoklonal antikorlarının immunoglobulin tiplerinin sırasıyla IgG1, IgM, IgM, IgM ve IgG2b olduğu ve kappa hafif zincir tipine sahip olduğu sub-izotipleme kiti ve anti-mouse immunoglobulin alkalın fosfataz konjugatları ile belirlenmiştir (Tablo 14-18). Elde edilen monoklonal antikorların saflaştırılmasında immünoglobulin tipi belirleyici olmuştur. Buna göre 16F8 monoklonal antikorunu protein G affinite kromatografisi ile saflaştırılırken, 12E5 monoklonal antikorunun saflaştırılmasında protein A affinite kromatografisi kullanılmıştır (Şekil 27 ve Şekil 28).

Hibridoma ve klinik teşhis çalışmalarda kullanılmak üzere saflaştırılan 16F8 monoklonal antikorunu için en uygun seyreltme miktarının belirlenebilmesi amacıyla, 1 mg/ml stoklar halinde hazırlanan 16F8 monoklonal antikorunu Şekil 29'de belirtilen şekilde farklı oranlarda seyreltilmiştir. 16F8 monoklonal antikorunun HBeAg'ye bağlanma oranının seyreltme oranının artmasıyla azaldığı görölmüş ve en uygun seyreltme oranının 1/1000 olduğuna karar verilmiştir. İkinci adım olarak, ELISA plakları farklı miktarlarda HBeAg ile kaplanarak 16F8 monoklonal antikorunu için belirlenen seyreltme oranında (1/1000) optimum HBeAg konsantrasyonunun 100 ng/ml olduğu belirlenmiştir (Şekil 31). 12E5 monoklonal antikorunu göz önüne alındığında ise 1/1000 oranında (Şekil 30) seyreltme ve 10 ng/ml HBcAg kaplanmasının antikorunu



HBeAg'ye bağlanması için yeterli olduğu ancak HBeAg söz konusu olduğunda 100 ng/ml HBeAg'ye ihtiyaç duyulduğu görülmüştür (Şekil 32).

Lineer B hücresi epitop haritalama analizi ile 16F8 monoklonal antikorunun amino asit dizisinin FGVWIRTPPAYRPPNAPILS olduğu (Tablo 20), bu dizinin HBeAg proteininin 156-165. aminoasitlerine denk geldiği belirlenmiştir (HBeAg'nin amino asit dizisi GenBank Nüklotid Dizi Veritabanı'nda O915321 giriş kodu ile elde edilmiştir). Elde edilen diziler ile veritabanlarındaki dizilerin karşılaştırılması sonucunda 16F8 monoklonal antikorunun HBeAg- $\beta$  epitopuna sahip olduğu anlaşılmıştır. Veritabanlarında HBe proteini için HBeAg- $\beta$ , HBeAg-1 ve HBeAg-2 olmak üzere üç ana epitop tanımlanmıştır; bunlardan HBeAg- $\beta$  ve HBeAg-1'in lineer epitop olduğu, HBeAg-2'nin ise konformasyonel epitop olduğu bilinmektedir. Literatürde HBe proteini için HBeAg- $\beta$ 'nin baskın epitop olduğu belirtilmiştir (163).

12E5(c) için gerçekleştirilen lineer B hücresi epitop haritalama analizi sonucunda SFGVWIRTPQAYRPP dizisinde zayıf bir bağlanma görülmüş (Şekil 34), bu zayıf bağlanmanın 16F8 monoklonal antikorundaki lineer epitopun aksine kesintili konformasyonel epitopun varlığına işaret ettiği belirlenmiştir (HBeAg'nin amino asit dizisi Fitzgerald Industries tarafından 30-AH39 ürün kodu ile belirtilmiştir). Veritabanlarında HBeAg için tanımlanan altı epitoptan beşinin konformasyonel epitop olduğu bilinmektedir (56). Bu durum kapsid proteini ile antikor arasındaki boyut farkına bağlı olarak alt üniteler ve dimer interfazları arasında etkileşime neden olmakta ve erişilebilir yüzey döngülerini azaltmaktadır dolayısıyla antikor ile antijen arasındaki bağlantı güçlü olamamaktadır.

Bu tez çalışmasında klasik hibridoma yöntemine alternatif yaklaşım olarak dondurulmuş dalak ve lenf düğümleri füzyon çalışmasında kullanılmıştır. 1949 yılında gliserolün donmaya karşı koruyucu etkisinin belirlenmesinden itibaren hücre, doku ve organların dondurulması (kryoprezervasyonu) üzerine birçok çalışma yapılmış, bu yöntemden biyoloji ve tıpta yararlanılmaya çalışılmıştır. Ancak doku ve organların

bütün olarak dondurulması konusunda hala bir takım zorluklar yaşanmaktadır (82,92,93,111)

Günümüzde dondurma konusunda gelinen noktada tek katmanlı dokular ve homojen hücre gruplarının dondurulması için sağlanması gereken optimum koşulların belirlenmesinde sıkıntı yaşanmamakta ancak farklı türdeki hücrelerden oluşan dokuların ve organların bütün halde dondurulması söz konusu olduğunda başarı sağlanamamaktadır. Organların dondurulmasında karşılaşılan temel sorun dondurulacak organ için uygun kroyozervatifin bulunamaması, kullanılan kryoprezervatifin organın iç kısımlarındaki hücrelere etki edememesi ve bazı durumlarda hücreler için toksik tehdit oluşturmasıdır (82). Günümüzde bazı organlar vücut dışında, soğuk ortamda ve kısa süreli (48 saate kadar) korunabilmektedir. Organ ve dokuların uzun süreli dondurulabilmesi organ bankalarına destek sağlayarak gerekli durumlarda organ erişilebilirliğinin yolunu açacak, organ yetmezliğine bağlı ölümlerin önüne geçilmesine olanak sağlayacaktır.

Doku ve organların boyutlarının dondurma ve çözme işleminde kısıtlayıcı rol oynadığı, hücre dışında oluşan buzun mekanik hasara neden olduğu, dondurma sırasında hücre içindeki su kaybının (dehidrasyon) elektrolit dengelerini bozduğu ve tüm bunların organ bütünlüğünü etkilediği bilinmektedir (110,112). Bu etkiler göz önünde bulundurulduğunda organların fiziksel ve kimyasal bazı özelliklerinin donma ve çözünmeye bağlı olarak değişebileceği düşünülmüştür.

Bu tez çalışmasında, ilk defa organ olarak bütün halde dondurulmuş dalak ve lenf düğümlerinden elde edilen hücreler hibridoma teknolojisine uygulanarak çoğalmaya devam eden ve antikör üretebilen B lenfositlerinin varlığı gösterilmiştir. Bu amaçla HBeAg ile üç defa immünize edilen BALB/c farelerden elde edilen dalak ve lenf düğümleri bütün doku halinde, düşük moleküler ağırlığı ve penetrasyon kabiliyeti nedeniyle kryoprotektan olarak tercih edilen DMSO ile dondurulmuştur (72). Dalak ve lenf düğümleri -150°C'de derin dondurucuda üç ay saklanarak farklı zamanlarda çözülmüştür. Her organ ayrı ayrı dondurulmasına rağmen çalışmaların başarısı

açısından füzyon sırasında bu organlardan elde edilen hücreler karıştırılarak kullanılmıştır. Bu sonuçlar ile lenf düğümü ve dalak organ olarak üç ay süreyle dondurulduğunda bile, bu organlardan elde edilen B lenfositlerin çoğalma ve antikor sentezleme kapasitelerini koruduğu belirlenmiştir.

Tablo 22-24'de antikor üreten hibrit hücre sayısının toplam lenfositlere oranının dondurulmuş dokuda taze dokuya göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Füzyonlardan elde edilen hibridoma hücrelerinin sayısından çok, üç aylık dönemde dondurulmuş dokulardan elde edilen hibridoma hücrelerinin çoğalıp antikor üretip üretmediği üzerinde durulması gerekmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmada, dalak ve aortik allograft yalnızca iki hafta dondurulmuş ve dondurulan dokudaki antijenite değişimini araştırılmıştır (145). Elde edilen sonuçlarda Sınıf I ve Sınıf II antijenite açısından, dondurulmuş ve taze dokular arasında bir fark görülmemiştir.

Klasik hibridoma yönteminde taze olarak hazırlanan dalak hücreleri kullanılmaktadır. Şimdiye kadar yalnızca iki farklı grubun (14,89) hibridoma çalışmalarında immünize farelerden ve ratlardan elde edilen dalak hücrelerini dondurduktan sonra kullandığı bilinmektedir. Ancak bu tez çalışmasında, immünize farelerden elde edilen dalak ve lenf düğümleri bütün organ olarak -150°C'de derin dondurucuda dondurulmuş, üç aya kadar saklanmış ve belirli aralıklarla bu organlardan izole edilen hücreler hibridoma teknolojisinde kullanılmıştır. Dondurma sonucunda hücrelerin antikor üretimini devam ettirebildiği görülmüştür. Bu konuda yapılan yayının hakemleri tarafından da bu yöntemin kriyobiyojji çalışmalarında hücre fonksiyonunun belirlenmesi için alternatif bir yöntem olarak kullanılabilceği belirtilmiştir (139).

HBeAg'ye karşı monoklonal antikor geliştirme çalışmalarında, ticari HBeAg ile immünizasyona alternatif olarak, yüzeyinde HBeAg eksprese eden fajlarla BALB/c fareleri immünize edilmiş ve fareler füzyon çalışmalarında kullanılmıştır. Protein ve peptid kütüphanelerinin faj gösterimi ile anlatımı, ligand ve reseptörlerin seçimi ve izolasyonu açısından oldukça güçlü bir teknolojidir. Filamentöz bakteriyofaj, antikor yanıtlarının belirlenmesi konusundaki çalışmalarda model sistem olarak kullanılması

açısından önem teşkil etmektedir (18,47,69). Faj gösterim yönteminde M13 ve *Escherichia coli* filamentöz fajları ile *E.coli* lambda ve T7 fajları deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (12,159). Filamentöz bakteriyofajlar peptidler, antijenler ve diğer haptenlerin taşınmasında kullanılabilir yüksek immünojenisiteye sahip partiküllerdir. Fajın kendisi T-hücresi tepkisi gösterirken (160), viriona bağlı lipopolisakkarit (LPS) ile de immünojenisitesi artar (40,52). Faj partikülü kendi başına bir adjuvant gibi davrandığından, faj ile yapılan çalışmalarda adjuvant kullanılmasına gerek kalmamaktadır (67). Fajın fiziksel ve biyolojik özellikleri onu protein gösterimi için uygun hale getirmektedir. Fajları saflaştırmak hem kolay, hem de ucuz olduğundan faj gösterimi, istenilen proteinlerin ya da antikorların saflaştırılmasında da tercih edilen bir yöntemdir.

Van Houten ve arkadaşları, bakteriyofaja konjuge edilmiş sentetik bir peptidin klasik taşıyıcı ovalbumine göre daha iyi antikor tepkisi oluşturduğunu göstermişlerdir (150). Filamentöz faj yüzeyinde monoklonal Fab fragmanlarının gösteriminin sağlandığı birçok çalışma yapılmıştır (21,154) ancak şimdiye kadar faj yüzeyinde HBeAg eksprese edilmemiştir. Birçok çalışmada da *E. Coli* ekspresyon sisteminde rekombinant olarak HBeAg anlatımının sağlandığı ve elde edilen antijenin serolojik teşhis testleri ile analiz edildiği bilinmektedir (64,165).

Kılıf protein beş farklı proteinden oluşsa da büyük bir kısmını 2700 kopyaya sahip majör kılıf proteini (P8) oluşturmaktadır (95,99,141) ve dolayısıyla P8 proteinine konjuge edilerek gösterimi sağlanan antijenin miktarı da artmaktadır. Ancak, P8'e klonlanan dizinin kısa (yaklaşık 6-8 amino asitlik) olması gerekmektedir çünkü bu konumda fazla sayıda protein, faj yüzeyine çok yakında ve bir arada bulunmaktadır (95,155). Bu çalışmada, HBeAg'inin tüm antijen olarak faj yüzeyinde ekspresyonunun sağlanması için faj yüzeyinde 3-5 kopyaya sahip P3 proteininin kullanılması tercih edilmiştir. Şekil 36 ve 37'de belirtildiği gibi, yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar fajların hem adjuvant (Incomplete Freund's Adjuvant-IFA) varlığında, hem de adjuvant olmadığında rekombinant HBeAg'ye karşı immünojenik yanıt oluşturulmasında etkili olduğunu göstermiştir. Rekombinant fajlara karşı elde edilen yanıtın, ticari antijene

karşı gelişen yanıt kadar iyi olduğu tespit edilmiştir. Fajlar büyük moleköl ağırlığına sahiptirler ve bu nedenle poliklonal antikor yanıtı uyandırırılar. Tablo 25-27'de görüldüğü gibi bu çalışmada antikor aktivitesi veren hibrit hücreler elde edilebilmiştir ancak bunlardan monoklonal antikor üreten hücre elde edilememiştir. Bunun nedeninin HBeAg ve HBcAg'nin amino asit dizisindeki aşırı benzerlik olduğu düşünölmektedir (147).

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada klasik hibridoma teknolojisi kullanarak 16F8 ve 12E5 monoklonal antikorları üretilmiş ve karakterize edilmiştir. 16F8 monoklonal antikoru HBeAg-β lineer epitopuna sahiptir ve yüksek seyreltme oranlarında (1/1000), düşük miktarda HBeAg'ye (100 ng/ml) bağlanabilmektedir. Bu nedenle 16F8 monoklonal antikoru, HBeAg'yi belirlemek için klinik teşhiste kullanılabilir. 12E5 monoklonal antikoru ise 16F8 monoklonal antikorundaki lineer epitopun aksine kesintili konformasyonel epitopa sahiptir. 12E5 monoklonal antikoru yüksek seyreltme oranında (1/1000), düşük miktarda HBeAg'ye (10 ng/ml) bağlanabildiği ancak HBeAg'ye bağlanması için 100 ng/ml HBeAg'ye ihtiyaç duyulduğu görülmüştür.

Hibridoma teknolojisinde alternatif yöntem olarak dondurulmuş dalak ve lenf düğümleri ile yapılan füzyon çalışmasında, üç aylık dondurma süresinin sonunda dahi hücrelerin füzyon sonucunda hibrit hücreler oluşturarak antikor üretimini devam ettirebildiği belirlenmiştir. Alanında bir ilk olan bu dondurma çalışmasının organ dondurma çalışmalarını bir adım daha ileriye götürdüğü düşünülmektedir. Bu konuda yapılan yayının hakemleri tarafından da bu yöntemin kriyobiyoloji çalışmalarında canlılığın ve hücre fonksiyonunun belirlenmesi için alternatif bir yöntem olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

HBeAg'ye karşı monoklonal antikor geliştirme çalışmalarında ticari antijenle yapılan immünizasyonlara alternatif olarak, yüzeyinde HBeAg ekspres eden fajlarla immünizasyonlar gerçekleştirilmiş ve bu farelerle füzyon çalışması yapılmıştır. Çalışmada HBeAg'ye karşı monoklonal antikor elde edilememesine rağmen bu yöntemle 1498 hibrit hücre geliştirilmiş, 21 hibrit hücrenin ise antikor ürettiği belirlenmiştir. Fajların immün yanıtı tetikleyecek kadar büyük olmasına rağmen HBeAg ile HBeAg dizileri arasındaki büyük benzerlikler dolayısıyla bu yöntem ile monoklonal antikor üretilmemiştir. Ancak yeni füzyon çalışmaları ile monoklonal antikor üreten hibrit hücre klonu elde edilmesi mümkündür.

## 7. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Abbott, C. and Povey, S., 1995, Making somatic cell hybrids In: Somatic cell Hybrids: the basics, Oxford University Press, Oxford, 13-16 p.
2. Akçam, F., 2003, Hepatit B Virüsü Enfeksiyonu, Sted, 12, 6, 211 p.
3. Akhan, S., Gürel, E. ve Sayan, M., 2009, Kronik hepatit B hastalarının beş yıllık tedavi sonuçlarının değerlendirilmesi, Klimik Dergisi, 22, 3, 82-87 s.
4. Akhan, S.C., Gurbuz, Y. and Uckardes, H., 2009, The association between biochemical parameters and extent of disease in patients with chronic hepatitis B, Türk Klin J Med Sci., 29, 1, 36-41 p.
5. Allison, A.C. and Byars, N.E., 1991, Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects, Mol Immunol., 28, 279-284 p.
6. Alter, H.J. and Blumberg, B.S., 1966, Further studies on a “new” human isoprecipitin system (Australia antigen), Blood, 27, 3, 297-309 p.
7. Armstrong, J., Perham, R.N. and Walker, J.E., 1981, Domain structure of bacteriophage fd adsorption protein, FEBS Lett, 135, 167–172 p.
8. Asai, D.J. and Wilder, J.K., 1993, Making monoclonal antibodies In: Methods in cell biology. Antibodies in cell bioplogy, Asai, D.J. (Ed.), Academic Press, USA, 37, 57-69 p.
9. Badur, S. and Akgün, A., 2001, Diagnosis of hepatitis B infections and monitoring of treatment, Journal of Clinical Virology, 21, 229-237 p.
10. Bal, C., Hamarat, B., Çolak, E., 2000, Uşak ilinde organ bağıışı hakkındaki bilgi, tutum ve davranışlar, I. İstatistik Kongresi Bildiri Kitabı, Antalya.
11. Basalp, A. and Yucel, F., 2003, Development of mouse hybridomas by fusion of myeloma cells with lymphocytes derived from spleen, lymph node, and bone marrow, Hybrid Hybridomics, 22, 5, 329-331 p.
12. Benhar, I., 2001, Biotechnological applications of phage and cell display, Biotechnol. Adv., 19, 1–33 p.
13. Bennet, B., Check, I.J., Olsen, M.R. and Hunter, R.L., 1992, A comparison of commercially available adjuvants for use in research, Journal of Immunological Methods, 153, 31-40 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

14. Bennick, A., Grøn, B. and Brosstad, F., 1991, Hybridomas can successfully be prepared from frozen/thawed spleen cells, *Hybridoma*, 10, 761–765 p.
15. Bernier, R.H., Frank, J.A.J. and Nolan, T.F.J., 1981, Abscesses complicating DTP vaccination, *Am J Dis Child.*, 135, 826-828 p.
16. Bigehan, H., 2005, *Temel mikrobiyoloji ve bağışıklık bilimi*, Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi, İzmir, 11. Baskı, 395 s.
17. Blumberg, B.S., 1977, Australia antigen and the biology of hepatitis B, *Science*, 197, 4298, 17-25 s.
18. Boeke, J.D., Model, P. and Zinder, N.D., 1982, Effects of bacteriophage  $\phi$ 1 gene III protein on the host cell membrane, *Mol. Gen. Genet.*, 186, 185–192 p.
19. Bradley, J.S., 2006, Hepatitis. In: Remington SS, Klein JO, Wilson CB, Baker CJ (eds). *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. 6th edition, Philadelphia, PA, IL: Elsevier Saunders, 823-843 p.
20. Brechot, C., Degos, F., Lugassy, C., Thiers, V., Zafrani, S. and Franco, D., 1985, Hepatitis B virus DNA in patients with chronic liver disease and negative tests for hepatitis B surface antigen, *N Engl J Med.*, 312, 270-276 p.
21. Burton, D.R., Barbas, C.F., Persson, M.A., Koenig, S., Chanock, R.M. and Lerner, R.A., 1991, A large array of human monoclonal antibodies to type 1 human immunodeficiency virus from combinatorial libraries of asymptomatic seropositive individuals, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 10134-10137 p.
22. Can, G., Torun, P. ve Gürpınar, S.S., 1997, Trabzon il merkezinde halkın organ nakli ve bağışıklık konusundaki bilgi ve davranışları, *Hacettepe Toplum Hekimliği Bülteni*, 18, 3, 5-6 s.
23. Chu, C.M., Liaw, Y.F., Pao, C.C. and Huang, M.J., 1989, The etiology of acute hepatitis superimposed upon previously unrecognized asymptomatic HBsAg carriers, *Hepatology*, 9, 452-456 p.
24. Clark, J.R. and March, J.B., 2004, Bacterial viruses as human vaccines?, *Expert Rev. Vaccines*, 3, 463–476 p.
25. Clark, J.R. and March, J.B., 2004, Bacteriophage-mediated nucleic acid immunisation, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 40, 1, 21-26 p.
26. Clark, J.R. and March, J.B., 2006, Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials, *Trends Biotechnol*, 24, 5, 212-218 p.



KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

27. Colligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W., 1991, Antibody detection and preparation, *Current Protocols in Immunology*, Vol 2, Suppl 1, John Wiley, New York, 1-15 p.
28. Conjeevaram, H.S., Lok, A.S.F., 2003, Management of chronic hepatitis B, *J Hepatol.*, 38, 90-103 p.
29. Cooper, P.D., McComb, C. and Steele, E.J. 1991, The adjuvanticity of Algamulin, a new vaccine adjuvant, *Vaccine*, 9, 408-415 p.
30. Dane, D.S., Cameron, C.H. and Briggs, M., 1970, Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis, *Lancet*, 1, 7649, 695-698 p.
31. De Meyer, S. and Gong, Z.J., 1997, Organ and species specificity of HBV infection: a review of literature with a special reference to preferential attachment of HBV to human hepatocytes, *J Viral Hepat.*, 22, 9-11 p.
32. Delves, P.J., 1997, Preparing immunogens In: *Antibody production essential techniques* Rickwood D (Ed), John Wiley and Sons, LTD. UK., 18-26 p.
33. Dienstag, J.L. and Isselbacher, K.J., 1994, Acute hepatitis, Isselbacher, K.J., Braunwald, E., Wilson, J.D., Martin, J.B., Fauci, A.S., Kasper, D.L. (Ed), *Harrison's principles of internal medicine*, 13th ed. New York: McGraw-Hill, 1458-1478 p.
34. Dienstag, J.L., 2008, Hepatitis B Viral Infection, *The New England Journal of Medicine*, 359, 1486-1500 p.
35. Diller, K.R. and Raymond, J.F., 1990, Water transport through a multicellular tissue during freezing: a network thermodynamic modeling analysis, *CryoLetters*, 11, 151-162 p .
36. Dupuis, M., Denis-Mize, K., LaBarbara, A, Peters, W., Charo, I.F., McDonald, D.M. and Ott, G., 2001, Immunization with the adjuvant MF59 induces macrophage trafficking and apoptosis, *Eur J Immunol.*, 31, 2910-2918 p.
37. Echevarria, J.M. and Avellon, A., 2006, Hepatitis B virus genetic diversity, *Journal of Medical Virology*, 78, 36-42 p.
38. Erdag, B., Balcioglu, B. K., Kumbasar, A., Celikbicak, O., Zeder-Lutz, G. , Altschuh, D., Salih, B. and Baysal, K., 2007, Novel short peptides isolated from phage display library inhibit vascular endothelial growth factor activity, *Molecular biotechnology*, 35, 51-64 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

39. Erden, S., Büyüköztürk, S., Çalangu, S., Kardes, B.A., Kaysı, A., Yılmaz, G., Badur, S. ve Palanduz, S., 2000, Poliklinik hastalarında HBsAg, anti-HBs ve anti-HCV prevalansı, *Türk Mikrobiyol Cem Derg.*, 30, 131-134 s.
40. Eriksson, F., Tsagozis, P., Lundberg, K., Parsa, R., Mangsbo, S.M., Persson, M. A., Harris, M.A. and Pisa, P., 2009, Tumor-specific bacteriophages induce tumor destruction through activation of tumor-associated macrophages, *J Immunol*, 182, 5, 3105–3111 p.
41. Fabbri, R., Pasquinelli, G., Keane, D., Mozzanega, B., Magnani, V., Tamburini, F. and Venturoli, S., 2009, Culture of cryopreserved ovarian tissue: state of the art in 2008, *Fertility and Sterility*, 91, 1619–1629 p.
42. Fahy, G.M., Wowk, B., Wu, J., Phan, J., Rasch, C., Chang, A. and Zendejas, E., 2004, Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances, *Cryobiology*, 48, 157–178 p.
43. Feitelson, M.A., 1999, Hepatitis B virus in hepatocarcinogenesis, *J. Cell Physiol.*, 181, 188–202 p.
44. Fernandez-Gacio, A. Uquen, M. and Fastrez, J., 2003, Phage display as a tool for the directed evolution of enzymes, *Trends Biotechnol.* 21, 408–414 p.
45. Franchini, M., Zanini, D., Bosinelli, A., Fiorini, S., Rizzi, S., D'Aloja, C., Vassanelli, A., Gandini, G. and Aprili, G., 2009, Evaluation of cryopreserved donor skin viability: the experience of the regional tissue bank of Verona, *Blood Transfusion* 7, 100–105 p.
46. Ganem, D. and Schneider, R., 2001, Hepadnaviridae: the viruses and their replication, In: Knipe D, Howley P, eds. *Fields Virology*, 2923–2970 p.
47. Gao, C., Mao, S., Lo, C.L., Wirsching, P., Lerner, R.A. and Janda, K.D., 1999, Making artificial antibodies: a format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 6025–6030 p.
48. Gaubin, M., Fanutti, C., Mishal, Z., Durrbach, A., De Berardinis, P., Sartorius, R., Del Pozzo, G., Guardiola, J., Perham, R.N. and Piatier-Tonneau, D., 2003, Processing of filamentous bacteriophage virions in antigen-presenting cells targets both HLA class I and class II peptide loading compartments, *DNA Cell Biol.*, 22, 1, 11-18 p.
49. Gavish, Z., Ben-Haim, M. and Arav, A., 2008, Ovarian function 6 years after cryopreservation and transplantation of whole sheep ovaries, *Rejuvenation Research*, 11, 765–772 p.
50. Gitlin, N., 1997, Hepatitis B: diagnosis, prevention, and treatment. *Clinical Chemistry*, 43, 1500-1506 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

51. Glenny, A., Pope, C., Waddington, H. and Wallace, U., 1926, The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum, *J Pathol Bacteriol*, 29, 31-40 p.
52. Grabowska, A.M., Jennings, R., Laing P., Darsley, M., Jameson, C.L., Swift, L. and Irving, W.L., 2000, Immunisation with phage displaying peptides representing single epitopes of the glycoprotein G can give rise to partial protective immunity to HSV-2, *Virology*, 269, 1, 47–53 p.
53. Grazul-Bilska, A.T., Banerjee, J., Yazici, I., Borowczyk, E., Bilski, J.J., Sharma, R.K., Siemionov and M., Falcone, T., 2008, Morphology and function of cryopreserved whole ovine ovaries after heterotopic autotransplantation, *Reproductive Biology and Endocrinology* 6, 1–15 p.
54. Gunasena, K.T., Villines, P.M., Critser, E.S. and Critser, J.K., 1997, Live births after autologous transplant of cryopreserved mouse ovaries, *Hum Reprod*, 12, 101–106 p.
55. Hamilton, R., Holst, H.I. and Lehr, H.B., 1973, Successful preservation of canine small intestine by freezing, *J Surg Res*, 14, 313–318 p.
56. Haris, A., Belnap, D.M., Watts, N.R., Conway, J.F., Cheng, N., Stahl, S.J., Vethanayagam, J.G., Wingfield, P.T. and Steven, A.C., 2006, Epitope diversity of hepatitis B virus capsids: quasi-equivalent variations in spike epitopes and binding of different antibodies to the same epitope, *J Mol Biol*, 355, 562-576 p.
57. Harlow, E. and Lane, D., 1988, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory, USA
58. Harp, R., Leibach, J., Black, J., Keldahl, C. and Karow, A., 1994, Cryopreservation of murine ovarian tissue, *Cryobiology*, 31, 336–343 p.
59. Hendricks, D.A., Stowe, B.J., Hoo, B.S., Kolberg, J., Irvine, B.D. and Neuwald, P.D., 1995, Quantitation of HBV DNA in human serum using a branched DNA (bDNA) signal amplification assay, *Am J Clin Pathol.*, 104, 537-540 p.
60. Herbert, W.J., 1978, Mineral-oil adjuvants and the immunization of laboratory animals. In: *Handbook of Experimental Immunology* D.M. Weir, ed., 3rd edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford, A3.1-A3.15.
61. Hollinger, F.B. and Liang, T.J., 2001, Hepatitis B Virus. In: Knipe DM et al., eds. *Fields Virology*, 4th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2971-3036 p.
62. Horvat, R.C. and Tegtmeier, G.E., 2003, Hepatitis B and D viruses, Murray, P.R. (Ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 1, 96, 1464-1479 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

63. Hunt, C.J., 1984, Studies on cellular structure and ice location in frozen organs and tissues: the use of freeze-substitution and related techniques, *Cryobiology*, 21, 385–402 p.
64. Inada, T., Misumi, Y., Seno, M., Kanazaki, S., Shibata, Y., Oka, Y. and Onda, H., 1989, Synthesis of hepatitis B virus e antigen in *E. Coli*, *Virus research*, 14,1,27-47 p.
65. Ishine, N., Rubinsky, B. and Lee, C.Y., 2000, Transplantation of mammalian livers after freezing: vascular damage and functional recovery, *Cryobiology*, 40, 84–89 p.
66. Ismaili, J., Rennesson, J., Aksoy, E., Vekemans, J., Vincart, B., Amraoui, Z., Van Laethem, F., Goldman, M. and Dubois, P.M., 2002, Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells, *J Immunol.*, 168, 926-932 p.
67. Jacobson, T., 2008, Development and Evaluation of a Phage Display Based Vaccine against Prostate Cancer, Master Tesis, Royal Institute of Technology, The School of Biotechnology, Stockholm, Sweden, 2008.
68. Jakes, K.S., Davis, N.G. and Zinder, N.D., 1988, A hybrid toxin from bacteriophage f1 attachment protein and colicin E3 has altered cell reseptor specificity, *J Bacteriol.*, 170, 4231–4238 p.
69. Jespers, L. S., Messens, J. H. and De Keyser, A., 1995, Surface expression and ligandbased selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI, *BioTechnology*, 13, 378–382 p.
70. Kaufman, P.B., 1995, Preparation of monoclonal and polyclonal antibodies against specific proteins In: *Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine*, 1 st ed. Ckese, L.J., Kaufman, P.B., Podila, G.K., Tsai, C.J., Wu W.F., Kim, D. (Eds.), CRC Press, Boca Raton, 455-465 p.
71. Kay, B.K., Winter, J. and McCafferty, J., 1996, Phage display of peptides and proteins. A laboratory manual, Academic press inc., San Diego, Carlifornia, ISBN: 978-0-12-402380-2.
72. Keros, V., Rosenlund, B., Hultenby, K., Aghajanova, L., Levkov, L. and Hovatta, O., 2005, Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants, *Hum Reprod*, 20, 1676–1687 p.
73. Kew, M.C., 1996, Hepatitis B and C viruses and hepatocellular carcinoma, *Clin. Lab. Med.*, 16, 395–406 p.
74. Kleinschmidt, W.J., Douthard, R.J. and Murphy, E.B., 1970, Interferon production by T4 coliphage, *Nature*, 228, 27–30 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

75. Korec, E., Dostalova, V., Korcova, J., Mancal, P., Konig, J., Borisova, G., Cibinogen, V., Pumpen, P., Gren, E. and Hlozanek, I., 1990, Monoclonal antibodies against hepatitis B e antigen: production, characterisation, and use for diagnosis, *J Virol Methods*, 28, 165-170 p.
76. Köhler, G. and Milstein, C., 1975, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, 256, 495-497 p.
77. Krugman, S., Overby, L.R., Mushahwar, I.K., Ling, C.M., Frösner, G.G. and Deinhardt, F., 1979, Viral hepatitis type B: Studies on natural history and prevention re-examined, *N Engl J Med*, 300, 101-106 p.
78. Kurt, H., 2001, Viral Hepatit, Kılıçturgay, K., Badur, S., (Ed.), 3, 129-135 s.
79. Kutlay, N., 1994, Yaşayanla Yaşayan Etik Açından Organ ve Doku Aktarımı, Türkiye Organ Nakli Derneği II. Bilimsel Transplantasyon Kongresi, Ankara, 245-255 s.
80. Lequin, R., 2005, Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin. Chem.*, 51, 12, 2415–2418 p.
81. Les, I., García-Martinez, R., Cordoba, J., Quintana, M., Esteban, R. and Buti, M., 2009, Current trends in chronic hepatitis B management: results of a questionnaire, *Eur J Gastroenterol Hepatol.*, 21, 10, 1177-83 p.
82. Levin, R.L. and Miller, T.E., 1981, An optimum method for the introduction and removal of permeable cryoprotectants: isolated cells, *Cryobiology*, 18, 32-48 p.
83. Li, Z, Hong, G, Hu, B, Liang M, Xu, J and Li L, 2007, Suitability of yeast- and Escherichia coli-expressed hepatitis B virus core antigen derivatives for detection of anti-HBc antibodies in human sera, *Protein Expression and Purification*, 56, 293-300 p.
84. Liddell, J.E. and Cryer, A.A., 1991, Practical guide to monoclonal antibodies. Myeloma cells, lymphocytes, fusion, John Wiley & Sons Ltd., England, Chap 3, 67 s.
85. Lieberman, H.M., LaBrecque, D.R., Kew, M.C., Hadziyannis, S.J. and Shafritz, D.A., 1983, Detection of hepatitis B virus DNA directly in human serum by a simplified molecular hybridization test: Comparison to HBeAg/anti-HBe status in HBsAg carriers, *Hepatology*, 1983, 3, 285-291 p.
86. Lok, A.S. and Lai, C.L., 1988, A longitudinal follow-up of asymptomatic hepatitis B surface antigen-positive Chinese children, *Hepatology*, 5, 1130-1133 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

87. Mahoney, F.J. and Kane, M., 1999, Hepatitis B vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA, eds. Vaccines, 3rd ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 158-182 p.
88. Mahoney., F.J., 1999, Update on diagnosis, management and prevention of hepatitis B virus infection, Clin Microbiol Rev., 12, 351–66 p.
89. Marusich, M.F., 1988, Efficient hybridoma production using previously frozen splenocytes, Journal of Immunological Methods, 114, 155–159 p.
90. Marvin, D.A., 1998, Filamentous phage structure, infection and assembly, Curr Opin Struct Biol., 8, 150–158 p.
91. Mast, E.E. and Ward, J.W., 2008, Hepatitis B vaccines, Vaccines, 5th ed, Plotkin, S., Orenstein, W., Offit, P. (Eds.), USA, 13, 205-242 p.
92. Mazur, P., 1963, Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing, J Gen Physiol, 47, 347-369 p.
93. McNally, R.T. and Mc Gaa, G., 1988, Cryopreserved tissues for transplant, In: McGrath JJ, Diller KR. Low temperature biotechnology. New York: American Society of Mechanical Engineers, 91-106 p.
94. Melita, B., Irving, M. B., Pan, O. and Scott, J., 2001, Random-peptide libraries and antigenfragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics, Curr. Opin. Chem. Biol, 5, 314–324 p.
95. Meola, A., Delmastro, P., Monaci, P., Luzzago, A., Nicosia, A., Felici, F., Cortese, R. and Galfrè, G., 1995, Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage, J. Immunol, 154, 3162–3172 p.
96. Michalak, T.I., Pasquinelli, C., Guilhot, S. and Chisari, F.V., 1994, Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis, J Clin Invest., 93, 230-239 p.
97. Milich, D.R., 1997, Immune response to the hepatitis B virus: infection, animal models, vaccination, Viral Hepat Rev., 3, 63–103 p.
98. Milich, D. and Liang. J., 2003, Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection, Hepatology, 38, 1075–1086 p.
99. Minenkova, O.O., Ilyichev, A.A., Kishchenko, G.P. and Petrenko, V.A., 1993, Design of specific immunogens using filamentous phage as the carrier, Gene, 128, 85-88 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

100. Molenaar, T.J., Michon, I., Haas, S.A.M., Van Berkel, T.J.C., Kuiper, J. and Biessen, E.A.L., 2002, Uptake and processing of modified bacteriophage M13 in mice: implications for phage display, *Virology*, 293, 182–191 p.
101. Morefield, G.L., Sokolovska, A., Jiang, D., HogenEcsh, H., Robinson, J.P. and Hem, S.L., 2005, Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells in vitro, *Vaccine*, 23, 1588-1595 p.
102. Mulligan, M.J. and Stiehm, E.R., 1994, Neonatal hepatitis B infection: clinical and immunologic considerations, *J Perinatol*, 14, 2-9 p.
103. Ors, Y., 1994, Organ Aktarımının Temel Etik Yönleri, *Tübitak Bilim ve Teknik Dergisi*, 57, 324-357 s.
104. Ozdener, H., 1997, Hepatit virüslerinin moleküler biyolojisi, *Viral Hepatit Dergisi*, 1, 1-18 s.
105. Page, W.F., Norman, J.E. and Benenson, A.S., 1993, Long-term follow-up of army recruits immunized with Freund's incomplete adjuvanted vaccine, *Vaccine Res.*, 2, 141-149 p.
106. Pan, C.Q. and Zhang, J.X., 2005, Natural History and Clinical Consequences of Hepatitis Virus Infection, *Int. J. Med. Sci.*, 2, 36-40 p.
107. Paschke, M., 2006, Phage display systems and their applications, *Appl. Microbiol Biotechnol*, 70, 2–11 p.
108. Pegg, D.E. and Diaper, M.P., 1982, The mechanism of cryoinjury in glycerol-treated rabbit kidneys. In: Pegg DE, Jacobsen IA, Halasz NA, eds. *Organ Preservation, Basic and Applied Aspects*, Lancaster, UK: MTP Press, 389–393 p.
109. Pegg, D.E., 1987, Ice crystals in tissues and organs. In: Pegg DE, Karow AM Jr, eds. *The Biophysics of Organ Cryopreservation*, New York: Plenum, 117–140 p.
110. Pegg, D.E., 2002, The history and principles of cryopreservation, *Seminars in Reproductive Medicine* 20, 5–13 p.
111. Pegg, D.E., 2006, The preservation of tissue for transplantation, *Cell Tissue Banking* 7, 349–358 p.
112. Pegg, D.E., 2007, *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols* (eds.), JG Day and GN Stacey, Humana Press, Totova, NJ, 39-57 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

113. Perillo, R.P, Chau, K.H., Overby, L.R. and Decker, R.H., 1983, Anti-hepatitis B core immunoglobulin M in the serologic evaluation of hepatitis B virus infection and simultaneous infection with type B delta agent, and non-A non-B viruses, *Gastroenterology*, 85, 163-167 p.
114. Pitt, R.E., 1992, Thermodynamics and intra-cellular ice formation. In: Steponkus P, ed. *Advances in Low-Temperature Biology (Vol 1)*. London: JAI Press, 63-99 p.
115. Polge, C., Smith, A.U. and Parkers, A.S., 1949, Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures, *Nature*, 164, 666-667 p.
116. Pollack, G.A., Pegg, D.E. and Hardie, I.R., 1986, An isolated perfused rat mesentery model for direct observation of the vasculature during cryopreservation, *Cryobiology*, 23, 500-511 p.
117. Pulendran, B. and Ahmed, R, 2006, Translating innate immunity into immunological memory; implications for vaccine development, *Cell*, 124, 849-863 p.
118. Purcell, R.H., 1993, The discovery of the hepatitis viruses, *Gastroenterology*, 104, 955-963 s.
119. Rakonjac, J., Feng, J. and Model, P., 1999, Filamentous phage are released from the bacterial membrane by a two-step mechanism involving a short C-terminal fragment of pili, *J Mol Biol.*, 289, 1253-1265 p.
120. Ramon, G., 1925, Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidiphtherique, *Bull Soc Centr Med Vet*, 101, 227-234 p.
121. Ranger-Rogez, S. and Denis, F., 2004, Hepatitis B mother-to-child transmission, *Expert Rev Anti Infect Ther.*, 2, 133-145 p.
122. Rehermann, B., 2003, Immune responses in hepatitis B virus infection, *Semin Liver Dis*, 23, 21-38 p.
123. Robinson, W.S., 1995, Hepatitis B virus and hepatitis D virüs, Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R., (Eds.), *Principles and Practice of infections Diseases*, 4th ed., New York, Churchill Livingstone, 1406-1439 p.
124. Rowinski, W., Ostrowski, K., Adadynski, L., Barcikowska, B., Lao, M., Lisik, W., Lagiewska, B., Madej, K., Michalak, G. and Walaszewski, J., 1996, Factors limiting renal transplantation program in Poland, *Ann Transplant*, 1, 1, 18-22 p.



KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

125. Rubinsky, B., 1989, The energy equation for freezing of biological tissue, *J Heat Transf*, 111, 988-997 p.
126. Rudbach, J.A., Cantrell, J.L. and Ulrich, J.T., 1988, Molecularly engineered microbial immunostimulators. *In: Technological Advances in Vaccine Development*. R. Alan (ed.), Liss, Inc.: NY, pp. 443-454 p.
127. Sanner, M., 1994, A comparison of public attitudes toward autopsy, organ donation, and anatomic dissection. A Swedish survey, *JAMA*, 271, 4, 284- 288 p.
128. Scolnick, E.M., McLean, A.A., West, D.J., McAleer, W.J., Miller, W.J. and Buynak, E.B., 1984, Clinical evaluation in healthy adults of a hepatitis B vaccine made by recombinant DNA, *JAMA*, 251, 2812-2815 p.
129. Serter, D., 1997, Hepatit virüsleri ve viral hepatitler, Serter, D. (Ed), *Virüs riketsiya ve klamidya hastalıklarında*. 1. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 175-206 s.
130. Servoss, J.C., Freidman, L.S. and Dienstag, J.L., 2005, Diagnostic approach to viral hepatitis, Thomas HC, Lemon B, Zucherman AJ, editors. *Viral Hepatitis: Blackwell*, 50-64 p.
131. Shiels, M.T., Taswell, H.F., Czaja, A.J., Gerin, J.L., Purcell, R.H. and Ludwig, J., 1987, Frequency and significance of concurrent hepatitis B surface antigen and antibody in acute and chronic hepatitis B, *Gastroenterology*, 93, 675-680 p.
132. Shindo, M., Hamada, K., Koya, S., Sokawa, Y. and Okuno, T., 1999, The clinical significance of core promoter and precore mutations during the natural course and interferon therapy in patients with chronic hepatitis B, *Am J Gastroenterol.*, 94, 2237-2245 p.
133. Siskind, G.W., Dunn, P. and Walker, J.G., 1968, Studies on the control of antibody synthesis II. Effect of antigen dose and of suppression by passive antibody on the affinity of antibody synthesized, *Journal of Experimental Medicine*, 127, 55-66 p.
134. Smith, A.U., 1961, The effects of glycerol and of freezing on mammalian organs. In: Smith AU, ed. *Biological Effects of Freezing and Supercooling*. London: Edward Arnold, 247-269 p.
135. Smith, G.P., 1985, Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface, *Science*, 228, 1315-1317 p.
136. Stacey, G.N. and Masters, J.R., 2008, Cryopreservation and banking of mammalian cell lines, *Nature Protocols*, 3, 1981-1989 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

137. Stengele, I., Bross, P., Garces, X., Giray, J. and Rasched, I., 1990, Dissection of functional domains in phage fd adsorption protein. Discrimination between attachment and penetration sites, *J Mol Biol.*, 212, 143–149 p.
138. Stevart, S.J., 2001, Monoclonal antibody production In: Basic methods in antibody production and characterization. Howard, G.C. and Bethell, D.R., (Eds), CRC press, USA, 51-69 s.
139. Sogut, I., Hatipoglu, I., Serhatli, M., Cevik, S.I., Durali, D. and Basalp, A., 2011, Cryopreservation of spleen and lymph nodes as a source of mononuclear cells to be used for the development of monoclonal antibody producing hybridoma cells, *CryoLetter*, 32, 3, 266-274 p.
140. Tabak, F., 1998, Virüs hepatitlerinin epidemiyolojisi, Yücel, A., Tabak, F., (Ed). Günümüzde virüs hepatitleri'nde. 2. Baskı. İstanbul: İstanbul Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği; 21-30 s.
141. Tan, G.H., Yusoff, K., Seow, H.F. and Tan, W.S., 2005, Antigenicity and immunogenicity of the immunodominant region of hepatitis B surface antigen displayed on bacteriophage T7, *J. Med. Virol.*, 77, 475-480 p.
142. Tasyaran, M.A., 2003, HBV Enfeksiyonu Epidemiyolojisi, Tekeli, E., Balık, İ., (Ed.), *Viral Hepatit*, 121-128 s.
143. Terry, C., Dhawan, A., Mitry, R.R. and Hughes, R.D., 2006, Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: state of the art, *Cryobiology*, 53, 149–159 p.
144. Thiollais, P., Poursel, C. and Dejean, A., 1985, The Hepatitis B virus, *Nature*, 317, 489–95 p.
145. Tomita, Y., Yoshikawa, M., Zhang, O., Uchida, T., Nakashima, Y., Sueishi, K., Nomoto, K. and Yasui, H., 2003, Immune and non-immune factors in cryopreserved tissues, *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 22, 560–567 p.
146. Toner, M., 1993, Nucleation of ice crystals inside biological cells. In: Steponkus P, ed. *Advances in Low-Temperature Biology (Vol 2)*. London: JAI Press, 1-51 p.
147. Tong, S., Diot, C., Gripon, P., Li, J., Vitvitski, L., Trepo, C. and Guguen-Guillouzo, C., 1991, In vitro replication competence of a cloned hepatitis B virus variant with a nonsense mutation in the distal pre-C region, *Virology*, 2, 733-737 s.
148. Tong, S., Kim, K.H., Chante, C., Wands, J. and Li, J., 2005, Hepatitis B Virus e Antigen Variants, *Int J Med Sci.*, 2, 1, 2–7 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

149. Tsitsilonis, O.E., Thrasyvoulides, A., Balafas, A., Voutsas, J.F., Papamichail, M. and Lymberi, P., 2004, Serological detection of hepatitis B viral infection by a panel of solid-phase enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34, 811-822 p.
150. Van Houten, N.E., Zwick, M.B., Menendez, A. and Scott, J.K., 2006, Filamentous phage as an immunogenic carrier to elicit focused antibody responses against a synthetic peptide, *Vaccine*, 24,19, 4188-4200 p.
151. Vidova, B., Godany, A. and Sturdik, E., 2008, Phage Display – A Tool For Detection and Prevention Against Pathogens, *Nova Biotechnologica*, 8, 23-33 p.
152. Vogel, F.R and Hem, S.L., 2008, Vaccines “Immunologic adjuvants”, Plotkin, S.A., Orenstein, W.A., Offit, P.A., (ed), 59-71 p.
153. Waldorf, M.D., 2004, Hepatitis B. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases: The Pink Book*, 8th ed. CDC, Atkinson, W., Hamborski, J., Wolfe, C., (Ed.), 191-212 p.
154. Walker, J. and Banting, G., 1996, Production of Phage-Display Antibodies for Epitope Mapping, *Methods in Molecular Biology*, 66, 391-405 p.
155. Wan, Y., Wu, Y., Bian, J., Wang, X., Zhou, W., Jia, Z., Tan, Y. and Zhou, L., 2001, Induction of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes response in vivo by filamentous phage display vaccine, *Vaccine*, 19, 2918-2923 p.
156. Wang, L. F. and Yu, M., 2004, Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics, *Curr. Drug Targets*, 5, 1–15 p.
157. Wang, X., Chen, H., Yin, H., Kim, S., Lin Tan, S. and Gosden, R.G., 2002, Cryopreservation: Fertility after intact ovary transplantation, *Nature*, 415, 385 p.
158. Whyte, A., 1997, The Ultimate Gift, *Nursing Times*, 9, 6, 26-30 p.
159. Willats, W.G., 2002, Phage display: practicalities and prospects, *Plant Mol. Biol.*, 50, 837–854 p.
160. Willis, A.E., Perham, R.N. and Wraith, D., 1993, Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. *Gene*, 128, 1, 79–83 p.
161. World Healty Organization (WHO), 2004, Hepatitis B, World Healty Organization Fact Sheet.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

162. World Health Organization (WHO), 2010, Viral Hepatitis, World Health Assembly, 63.
163. Yan, L.C., Jing, C.Y., Huang, C.F., Ji, Y.Y., Yao, G., Cai, X.F. and Sun, B., 2007, Monoclonal antibody against non-dominant epitopes of HBV e Ag was raised by antigen-antibody coimmunisation, *J Biotechnol.*, 129, 620-627 p.
164. Zeng, W., Snedaker, A.K., Megee, S., Rathi, R., Chen, F., Honaramooz, A. and Dobrinski, I., 2009, Preservation and transplantation of porcine testis tissue, *Reproduction, Fertility and Development*, 21, 489-497 p.
165. Zhou, F., Sui, L., Luo, K. and Hou, J., 2002, Cloning and expression and purification of hepatitis B e-antigen precursor in *Escherichia coli*, *Chin Med J.*, 115, 5, 722-725 p.

## 8. EKLER DİZİNİ

- EK-1.** Cooper & Klimek, 1987
- EK-2.** Ryu, W. S. (2003) *J. Biochem. Mol. Biol.*, 36, 138-143.
- EK-3.** Hepatitis B Virus e Antigen Variants , *Int J Med Sci.*, 2005
- EK-4.** <https://www.qiagen.com/geneglobe/pathwayview.aspx?pathwayID=217>
- EK-5.** Hepatitis B Viral Infection, *The New England Journal of Medicine*, 2008
- EK-6.** Uğur Arslan, *Karsinojen Mikroorganizmalar Viral Etkenler*  
<http://www.tmc-online.org>
- EK-7.** Karami, A., Najaji, A., Alabian, S., M., Kiarudi, M., Y., 2007, *Immunology of HCV and HBV in Renal Failure and Transplantation*, *Hepatitis Monthly*, 7, 2, 93-101 p.
- EK-8.** [http://static.wikidoc.org/5/59/HBV\\_serum\\_markers.png](http://static.wikidoc.org/5/59/HBV_serum_markers.png)
- EK-9.** *Molecular Biology of the Cell*, 3rd edition, 1994
- EK-10.** Fleming, A., Copp, A.J., *Science*, 280, 5372, 2107-2109 p.
- EK-11.** Anderson, R.N., 2002, *Deaths: leading causes for 2000*, *Natl Vital Stat Rep.*, 50, 16, 1-85 p.
- EK-12.** Clark, J.R. and March, J.B., 2006, *Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials*, *Trends Biotechnol*, 24, 5, 212-218 p.
- EK-13.** Sachdev S. Sidhu, 2001, *Engineering M13 for phage display*, *Biomolecular Engineering*, 18, 57-63 p.
- EK-14.** *Current Protocols in immunology*, *Removal of Lymphoid Organs*
- EK-15.** [http://www.gelifesciences.com/apatrix/upp00919.nsf/Content/B7A1BAD977A2AF13C1257628001D1ECD/\\$file/11003558AA.pdf](http://www.gelifesciences.com/apatrix/upp00919.nsf/Content/B7A1BAD977A2AF13C1257628001D1ECD/$file/11003558AA.pdf)

## 9. ÖZGEÇMİŞ

### GENEL

DÜZENLEME TARİHİ		25/09/2011
ADI SOYADI İBRAHİM SÖĞÜT	DOĞUM TARİHİ 12/04/1982	MEDENİ HALİ Evli
YAZIŞMA ADRESİ 1) Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD. ESKİŞEHİR 2) TÜBİTAK- Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Aşı Teknolojisi Laboratuvarı, PK:21, 4170 Gebze-KOCAELİ		
TEL: 05066321126	E-MAIL ibrahim.sogut@gmail.com	

### EĞİTİM

ÖĞRENİM DÖNEMİ	DERECE	ÜNİVERSİTE	ÖĞRENİM ALANI
2008-2011	PhD	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Biyokimya AD.
2005-2008	MSc	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Biyokimya AD.
2001-2005	BSc	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi	Biyoloji BL.

### MESLEKTE DENEYİM

GÖREV DÖNEMİ	GÖREV TÜRÜ	KURULUŞ
2010-	TÜBİTAK-1001 Projesinde Burslu Araştırmacı	TÜBİTAK-GMBE, Gebze-KOCAELİ

15.03.2007-01.01.2010	TÜBİTAK-1007 Projesinde Burslu Araştırmacı	TÜBİTAK-GMBE, Gebze-KOCAELİ
25.01.2006-12.03.2007	Biyolog	ESOGU Tıp Fakültesi Kan Merkezi ve Hematoloji Laboratuvarı

### UZMANLIK ALANLARI

UZMANLIK ALANI	ANAHTAR SÖZCÜKLER
Biyokimya	Alkol Toksisitesi ve Metabolizması, Oksidatif Stres, Fetal Alkol Sendromlu Deney Hayvanı Modellemeleri, Apoptosis
İmmünoloji	Hepatit B, Monoklonal Antikor üretimi, T-B-Dentritik hücreler, Aşı

### SEÇİLMİŞ YAYINLAR

YAZAR(LAR)	MAKALENİN BAŞLIĞI	DERGİ	CİLT/SAYI/ SAYFA	TARİH
<b>Sogut I.,</b> Hatipoglu I., Kanbak G., Basalp A.	Development and characterization of monoclonal antibodies specific for hepatitis B e antigen and hepatitis B core antigen	Hybridoma	In press	2011
Bahadır A.O., Balcioglu B.K., Uzyol K.S., Hatipoglu I., <b>Sogut I.,</b> Basalp A., Erdag B.	Phage displayed HBV core antigen with immunogenic activity	Appli Biochem Biotechnol	DOI 10.1007/s12010-011-9365-1	2011

<b>Sogut I.,</b> Hatipoglu I., Serhatli M., Safak Isil Cevik S.I., Durali D., Basalp A.	Cryopreservation of spleen and lymph nodes as a source of mononuclear cells to be used for the development of monoclonal antibody producing hybridoma cells	CryoLetters	32(3): 266-274	2011
<b>Sogut I.</b> and Kanbak G.	In vitro effects of ethanol with aspirin on rat brain synaptosomes: the potential protective role of betaine	Int. J. Neurosci.	120(12): 774-83	2010
Saatcılar C., Akcael E.K., <b>Sogut I.,</b> Basalp A., Karabay A., Yucel F.	Monoclonal antibodies against hepatitis B core antigen	Hybridoma	27(4): 319-320	2008

### ÜYELİKLER

ÜYELİK DÖNEMİ	ÜYELİK TÜRÜ	KURULUŞ
2004-	Üye	Biyologlar Derneği

### ÖDÜLLER ve BURSLAR

ÖDÜLÜN ADI	ALINDIĞI KURULUŞ	YILI
Kongreye Tam Burslu Katılım Ödülü	European Science Foundation and Japan SPS Frontier Science Conference for Young Researchers/The Netherlands	2011
TARAL 1001 Bursu	TÜBİTAK	2010-2011
Kongre Özel Başarı Ödülü	Low Temperature Medicine/Japan	2009



TARAL 1007 Bursu	TÜBİTAK	2007-2008-2009
------------------	---------	----------------

## DİĞER

### *Ulusal Kongreler*

**Sogut I., Kanbak G.,** Değişik dozlarda etanol ve aspirinin birlikte kullanımının rat beyin sinaptozomları üzerine olan *in vitro* etkisi ve betainin olası koruyucu rolünün araştırılması, XXI.Ulusal Biyokimya Kongresi, İstanbul, 28-31 Ekim 2009 (Sözlü sunum).

**Sogut I.,** Hatipoğlu I., Saatçılar C., Akcael E., Yucel F., Basalp A., HBVe ve HBVc antijenine karşı monoklonal antikor geliştirme çalışmalarında dalak, lenf düğümü ve intraperitoneal hücrelerin kullanılması, 5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, 24-28 Haziran 2008 (Poster No:32).

Saatçılar C., Akcael E., **Sogut I.,** Basalp A., Yucel F., Yarışimli kit sistemlerinde kullanmak üzere hepatit B kor antijenine karşı monoklonal antikor geliştirilmesi, 5. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, 24-28 Haziran 2008 (Poster No:33).

### *Uluslararası Kongreler*

**Sogut I.,** Hatipoğlu I., Kanbak G., Basalp A., Development and Characterization of Anti-HBe Monoclonal Antibody, European Biotechnology Congress, İstanbul, 28 Eylül-1 Ekim 2011 (Sözlü sunum).

Hatipoğlu I., **Sogut I.,** Sivas H., Basalp A., The effect of vaccine+antibody complex on the stimulation of dendritic cells, Cancer Immunology and Immunotherapy: Building on Success, NIH, USA, Eylül 22-23, 2011 (Poster).

Basalp A., **Sogut I.,** Hatipoğlu I., Durali D., Development of monoclonal antibodies for diagnosis and therapy of hepatitis B infection, Science technique and innovation technologies in the epoch of great revival, Türkmenistan, 10-12 Haziran 2011 (Sözlü sunum).

**Sogut I.,** Hatipoğlu I., Ozdemir A., Balcioglu K.B., Uzyol S., Erdag B., Basalp A., Development of monoclonal antibodies to hepatitis B core antigen displayed on filamentous bacteriophage, ESF-JSPS Cutting Edge Immunology and Its Clinical Application, The Netherlands, 01-06 Mart 2011 (Poster).

Hatipoglu I., Balcioglu K.B., Ozdemir A., **Sogut I.**, Uzyol S., Aksu S., Durali D., Erdag B., Basalp A., Antigenicity and immunogenicity of hepatitis B surface antigen displayed on pIII protein of filamentous bacteriophage M13, ESF-JSPS Cutting Edge Immunology and Its Clinical Application, The Netherlands, 01-06 Mart 2011 (Poster).

**Sogut I.**, Hatipoglu I., Serhatlı M., Nalbant I., Erman B., Durali D., Basalp A., Generation of antibody producing hybrid cells from spleen and lymph nodes cryopreserved as whole organs, The 36th Annual Meeting of the Japan Society for Low Temperature Medicine, Japan, 27 Kasım 2009 (Sözlü sunum).

**Sogut I.**, Hatipoglu I., Akcael E., Yucel F., Manav A.I., Kocaaga H., Basalp A., Production of monoclonal antibody against r-HBeAg and development of serological diagnostic kit, Federation of European Biochemical Societies (FEBS), Czech republic, 4-8 Temmuz 2009 (Poster).

Hatipoglu I., **Sogut I.**, Akcael E., Manav A.I., Kocaaga H., Yucel F., Basalp A., Production and characterization of monoclonal antibodies against rHBeAg, IUBMB LIFE, 61(3), 352-352, 5-8 Mayıs 2009 (Poster).

**Sogut I.**, Hatipoglu I., Ozdemir A., Balcioglu K.B., Erdag B., Basalp A., Generation of M13 Phage Specific Monoclonal Antibody by HBe Antigen Expressing Phage Immunization, Federation of European Biochemical Societies (FEBS), Greece, 28 Haziran-3 Temmuz 2008 (Poster).

Balcioglu K.B., Ozdemir A., Hatipoglu I., **Sogut I.**, Basalp A., Erdag B., Expression of hepatitis B surface antigene on phage as PIII fusion protein, XIV. International Congress of Virology (IUMS), 10-15 Ağustos 2008 (Sözlü sunum, No:1207).

### ***Kurslar ve Eğitimler***

Advances In Immunology and Cancer Biology, Boğaziçi Üniversitesi, İstanbul, 15-17 Nisan 2011

Cutting Edge Immunology and Its Clinical Application, European Science Foundation and Japan SPS Frontier Science Conference for Young Researchers, The Netherlands, 1-6 Mart 2011

II. DETAE Günleri, İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE), İstanbul, 8-9 Kasım 2010

XXI. Ulusal Biyokimya Kongresi, İstanbul, 28-31 Ekim 2009

IV. Kök Hücre Sempozyumu, Türkiye Bilimler Akademisi (TÜBA), Ankara, 26-27 Haziran 2009

III. International Congress of Molecular Medicine, İstanbul, 5-8 Mayıs 2009

V. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara Mikrobiyoloji Derneği ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilimdalı, Ankara, 25-28 Haziran 2008

Programlı Hücre Ölümü Sempozyumu, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı, İstanbul, 9 Nisan 2008

Kök Hücre Biyolojisinde Güncel Kavramlar ve Klinik Uygulamalar Sempozyumu, Türkiye Bilimler Akademisi (TÜBA) ve Hacettepe Üniversitesinin Birlikteliğiyle, Ankara, 5 Ekim 2007

Hücre Füzyonu Yöntemi ile Monoklonal Antikor Üretimi, Türkiye Bilimsel ve Teknoloji Araştırma Kurumu Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü (TÜBİTAK MAM, GMBE), Kocaeli, 4-8 Haziran 2007

Apoptosis, Hastalıklarla İlişkisi ve Güncel Belirleme Yöntemleri, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 7-8 Aralık 2006

III. Deneysel Hayvan Çalışmaları Temel Eğitim Günleri, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıbbi-Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi (TICAM), Eskişehir, 20-22 Ekim 2004

#### ***Araştırmacı Olarak Çalıştığı Projeler***

2010-2011, TÜBİTAK-1001, Terapötik İmmünizasyonların HBV Antijenlerine Toleransın Geliştiği Bir Ortamda Hücresel Cevaba Olan Etkilerinin ve Moleküler Mekanizmalarının İncelenmesi

2007-2010, TÜBİTAK-1007, Hepatit B Enfeksiyonunun Tanısında Serolojik ve Moleküler Yöntemler Kullanılarak Tanı Kitlerinin Geliştirilmesi

#### ***Araştırmacı Olarak Destek Verdiği Projeler***

2011- , TÜBİTAK-1002, Aşı-Antikor İmmün Kompleksi ile Yüklenen Farklı Alt Tipteki Dendritik Hücrelerin Transgenik HBV Farelerdeki Teröpatik Etkilerinin Araştırılması

2010-2011, TÜBİTAK-1002, Prenatal Alkol Kullanımı Sonucunda Rat Beyinlerinde Oluşan Nöroapoptozun Folik Asit ve Betain ile Önlenmesinin Araştırılması

***Destek Verdiği Kurslar***

Moleküler İmmünoloji Teknikleri Uygulamaları Eğitimi, 23-27 Mayıs 2011, Antikor Konusu (TÜBİTAK-MAM, Gebze/Kocaeli)

Hücre Füzyonu Yöntemi ile Monoklonal Antikor Üretimi. 4–8 Haziran 2007, Füzyon Konusu, (TÜBİTAK-MAM, Gebze/Kocaeli)

