

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**STAPHYLOCOCCAL ENTERETOKSİN B (SEB)'NİN
İMMÜNOJENİTESİNİ ARTIRMAYA YÖNELİK YAKLAŞIMLARIN
GELİŞTİRİLMESİ**

Elif YOLAÇ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Haziran-2012

T.C
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**STAPHYLOCOCCAL ENTERETOKSİN B (SEB)'NİN
İMMÜNOJENİTESİNİ ARTIRMAYA YÖNELİK YAKLAŞIMLARIN
GELİŞTİRİLMESİ**

Elif YOLAÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Selma Öztürk

KOCAELİ
2012

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

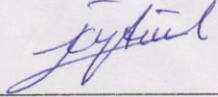
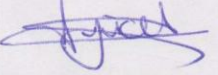
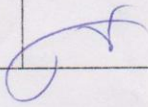
Tez Adı: STAPHYLOCOCCAL ENTERETOKSİN B (SEB)'NİN İMMÜNOJENİTESİNİ
ARTIRMAYA YÖNELİK YAKLAŞIMLARIN GELİŞTİRİLMESİ

Tez yazarı: Elif YOLAÇ

Tez savunma tarihi: 04.06.2012

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Selma ÖZTÜRK

Bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
ÜYE(DANIŞMAN):	Doç. Dr. Selma ÖZTÜRK	
ÜYE:	Doç. Dr. Fatıma YÜCEL	
ÜYE:	Yard. Doç. Naci ÇİNE	

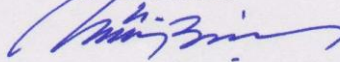
ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

2.8.2012

Prof. Dr. Ümit BİÇER

Enstitü Müdürü



Özet

Staphylococcal Enterotoksin B (SEB)'nin İmmünojenitesini Artırmaya Yönelik Yaklaşımların Geliştirilmesi

Stafilokokal besin zehirlenmesi enterojenik stafilokokların ürettiği enterotoksinler tarafından meydana gelir. Süt ve süt ürünleri; üretim, depolama, paketlenme veya tüketim safhalarında mikroorganizmaların gelişimi için mükemmel bir ortam oluşur. Sütü en sık kontamine eden Stafilokok türü, *Staphylococcus aureus*'dir. *Staphylococcus aureus* tarafından üretilen en iyi bilinen iki toksin Stafilokoksik enterotoksin A (SEA) ve Stafilokoksik enterotoksin B (SEB)'dir. Stafilokokal enterotoksinler, eş zamanlı olarak antijen sunan hücrelerdeki (APC) MHC sınıf II proteinlerine ve T hücrelerindeki T hücre reseptörlerine (TCR) bağlanan protein yapısındaki süperantijenlerdir. Bu antijenlerin belirtilen reseptörlere bağlanmaları immün sistemin anormal bir biçimde aktive olmasına yol açar. Yanıt nonspesifik T hücrelerinin aşırı uyarılması ile başlar, bunu takip eden apoptozis immünsupresyona yol açabilir. Bu yanıt, diyare ve abdominal kramplar gibi besin zehirlenmesi semptomlarını oluşturan çok miktarda inflamatuvar sitokinlerin ortaya çıkmasına sebep olur. Bu nonspesifik immün aktivasyon, antijene spesifik antikor yanıtlarının bozulmasına, azalmasına yol açar. Enterotoksinlerin sağlık risklerini engellemek için, süt ve süt ürünlerinin tüketiminden önce enterotoksinleri saptamaya yönelik testler geliştirilmelidir. AB standartlarına uyumlu olarak bu toksinler rutin olarak antikor bazlı test sistemleri (ELISA) ile test edilmektedir ve bu sistemler yerel olarak üretilmedikleri için bu sistemlerin temini ülke için büyük bir mali yük getirmektedir. Stafilokokal Enterotoksin B (SEB) için yerel teşhis yöntemlerinin geliştirilmesinde öncelik SEB spesifik antikorların üretilmesidir.

Bu çalışmada SEB spesifik antikorların üretilmesi için bazı deneysel stratejiler değerlendirilmiştir. Bu çerçevede SEB'in yapısı DTT ve katyonizasyon ile değiştirilmiştir. Son ürünler 6-8 haftalık BALB/c farelerine immünize edilmiştir. SEB spesifik immün yanıtlar ELISA ile değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: SEB, süperantijen, antikor üretimi

Abstract

Improving The Approaches To Increase The Immunogenicity Of Staphylococcal Enterotoxin B (SEB)

Staphylococcal food poisoning is caused by enterotoxins produced by enterogenic staphylococcus. Milk and other dairy products provide a perfect environment for the growth of microorganisms during production, storage, packaging or consumption. One of the most common Staphylococcal species that contaminates milk is *Staphylococcus aureus* and the two well-known enterotoxins produced by *Staphylococcus aureus* are Staphylococcal enterotoxin A (SEA) and Staphylococcal enterotoxin B (SEB). Staphylococcal enterotoxins are superantigens, proteins that simultaneously bind MHC class II molecules on Antigen Presenting Cells (APCs) and T cell receptors (TCR) on T cells causing abnormal activation of immune system. The response starts with overstimulation of non-specific T cells and subsequent apoptosis may result in immune suppression. This response is accompanied by inflammatory cytokine burst causing the typical food poisoning symptoms, diarrhea and abdominal cramps. This non-specific immune activation leads to diminished (deteriorated) antigen-specific antibody responses. To prevent the health risks of enterotoxins, detection methods are required to be developed ready to be tested before consumption of milk and other dairy products. In accordance with EU standards, these toxins are routinely tested with antibody-based test systems (ELISA), and since these systems are not produced locally, import of these test systems brings a big financial burden for the country. For the local production of diagnostics systems for Staphylococcal Enterotoxin B (SEB), the first prerequisite is the production of SEB specific antibodies. In this study, some experimental strategies were evaluated for the generation of SEB specific antibodies. In this context, the structure of SEB was unaltered or altered by DTT

and cationization and the final products were immunized into 6-8 weeks old BALB/c mice. The SEB-specific immuneresponses were evaluated with ELISA Assays.

KeyWords: SEB, superantigen, antibody production

TEŞEKKÜR

İmmünoloji alanında çalışabilme şansını bana tanımış olan ve bilimsel konulardakiengin bilgisiyle bu zorlu yolda ilerlememe yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Selma Öztürk'e çok teşekkür ederim. Tez çalışmalarım süresince tüm bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve öğreten Doç. Dr. Fatma Yücel'e, Fatma Betül Güloğlu'na VE Özlem Ertekin'e çok teşekkür ederim. Çalışmalarımın tümünde TÜBİTAK MAM GMBE Tanı Teknolojisi Laboratuarı imkanlarını kullandım. Bu imkanlardan yararlanmamı sağlayan tüm kuruluş yetkililerine çok teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi birikimlerini içtenlikleriyle paylaşan Uz. Tek. Harun Kocaağa ve Uz. Tek. İhsan Manav'a, bu günlere beni getiren, her anımda yanımda olup bana güç veren ve desteklerini benden esirgemeyen, benim için hayattaki en önemli varlıklar olan Sevgili ANNEM, BABAM ve KARDEŞLERİME sonsuz teşekkürler...

Saygılarımla

Elif YOLAÇ

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER DİZİNİ	
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>S. aureus</i> ve Enterotoksinleri	4
2.2. SE İçeren Besinlere Dayalı Riskler	4
2.2.1. Sağlık Üzerindeki Etkiler	5
2.2.2. Ekonomik Kayıplar	6
2.3. Besinlerin SE İçeriği ile İlgili Çalışmalar	7
2.4. SE'lerin Tanısı	10
2.4.1. Kromotografik yöntemler	10
2.4.2. İmmünolojik Yöntemler	10
2.4.2.1. Antikor Üretimi	11
2.4.2.1.1. Hibridoma Teknolojisi	14
2.4.2.1.2. Antikor Üretiminde Kullanılan Diğer Teknikler	15
2.4.2.1.2.1. Bakterilerde Rekombinant Antikor Tekniği ile Üretim	16
2.4.2.1.2.2. Bitkilerde Rekombinant Antikor Tekniği ile Üretim	16
2.4.2.1.2.3. Elektrofüzyon Tekniği ile Üretim	16
2.4.2.2. SE'lere Karşı Monoklonal Antikor Üretimi	17
2.4.2.2.1. Süperantijenler	17
2.4.2.2.1.1. Stafilotoksik Süperantijenler	19
2.4.2.2.2. Süperantijenlere Karşı İmmün Yanıt Oluşumu	22
2.4.2.3. SEB'in Modifikasyonu	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. GEREÇLER	27
3.1.1. Laboratuvarda Kullanılan Gereçler	27
3.1.1.1. Elektroforezde Kullanılanlar	27
3.1.1.2. ELISA'da Kullanılanlar	27
3.1.2. Laboratuvarda Kullanılan Sarf Malzemeler	31
3.1.2.1. Steril, Tek Kullanımlık Malzemeler	31
3.1.2.2. Kimyasallar	31
3.1.2.2.1. SEB Modifikasyonunda Kullanılan Kimyasallar	31
3.1.2.2.2. Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar	32
3.1.2.2.3. ELISA Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar	33
3.1.2.3. Çözeltiler	34
3.1.2.3.1. SEB Modifikasyonunda Kullanılan Çözeltiler	34
3.1.2.3.2. Elektroforezde Kullanılan Çözeltiler	34
3.1.2.3.3. ELISA Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler	35
3.1.3. Diğer Laboratuvar Gereçleri	36

3.2. YÖNTEMLER	37
3.2.1. SEB Modifikasyonu	37
3.2.1.1. SEB'in İndirgenmesi	37
3.2.1.1.1. SEB'in DTT ile İndirgenmesi	37
3.2.1.1.2. SEB'in DTT-GuanidinHCl ile İndirgenmesi	37
3.2.1.1.3. SEB'inPapain ile İndirgenmesi	38
3.2.1.1.4. SEB'inCnBr ile İndirgenmesi	39
3.2.1.2. SEB Katyonizasyonu	40
3.2.2. Modifiye SEB Moleküllerinin Karakterizasyonu	40
3.2.2.1. SEB Moleküllerinin Karakterizasyonu	40
3.2.2.1.1. Jel Hazırlama	40
3.2.2.1.2. Örnek Hazırlama	42
3.2.2.1.3. Örnek Yükleme ve Yürütme	42
3.2.2.1.4. Jelde Yürütülen Örneklerin Gümüş Boyama ile Görüntülenmesi	42
3.2.2.2. SEB KatyonizasyonununKarakterizasyonu	43
3.2.3. Farelerin SEB ile Bağışıklanması	43
3.2.4. İmmünize Fare Serumlarında İmmün Yanıt Kontrolü	46
3.2.4.1. Dolaylı ELISA Yöntemi	47
4. BULGULAR	49
4.1. İmmünojenik SEB Hazırlama	49
4.1.1.1. SEB'in DTT ile İndirgenmesi	49
4.1.1.2. SEB'in DTT-GuanidinHCl ile İndirgenmesi	50
4.1.1.3. SEB'inPapain ile İndirgenmesi	52
4.1.1.4. SEB'inCnBr ile İndirgenmesi	52
4.1.2. SEB'inKatyonizasyon ile Modifikasyonu	53
4.2. SEB Spesifik İmmün Yanıtın Kontrolü	54
4.2.1. Nativ SEB ile İmmünize Edilmiş Farelerde İmmün Yanıtın Kontrolü	54
4.2.2. Modifiye SEB Molekülleri ile İmmün Yanıtın Kontrolü	56
4.2.2.1. DTT-GuanidinHCl ile İndirgenmiş SEB ile Enjeksiyon Yapılan Farelerde İmmün Yanıtın Kontrolü	56
4.2.2.2. c SEB ile İmmünize Edilen Farelerde İmmün Yanıtın Kontrolü	60
5. TARTIŞMA	63
6. SINIRLILIKLAR	67
7. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
KAYNAKLAR DİZİNİ	75
ÖZGEÇMİŞ	81

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AP: Alkalenfosfataz

APS: Amonyum fersülfat

APC: AntigenPresentingCells (Antijen sunan hücre)

BCR: B hücre reseptörü

β Met: Beta metionin

BSA: Bovine Serum Albumin (Sığır serum albumini)

c BSA: CatonizedBovine Serum Albumin (Kasyonize sığır serum albumini)

CD4:MHCclass II-presentedantigen

CD8:MHC class I-presented antigen

CFA: ComplateFreundadjuvant (Freund'un tam adjuvantı)

CnBr: Cyanogenbromide

DCs: DentriticCells (Dentritik hücreler)

DTT:Dithiothreitol

DMSO: Dimetilsülfoksit

DMEM: Dulbecco's Minimum EssentialMedium (Dulbecco'nun minimum zorunlu medyum)

EDA MES: Ethylenediamine A Mess (Ethylenediamine tamponu)

EDC: 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimidehydrochloride

ELFA: EnzymeLinkedFluorecentAssay (Enzime bağlı floresan testi)

ELISA:EnzymeLinkedİmmunosorbentAssay (Enzime bağlı bağışık testi)

EMIT:EnzymeMultipliedImmunoassayTechnique (Enzim Çoğaltılmasında Kullanılan İmmünizasyon Tekniği)

FASP: FastSequenceSimilarity Protein

FCS: FetalCattle Serum (Fetal Sığır Serumu)

FDA: FoodandDrug Administration (Amerikan Gıda ve İlaç Daresi)

g: Gravity (ağırlık)

GC: GasChromatography (Gaz kromatografisi)

HAT: Hipoksantin-Aminopterin-Timidin
HLA-DR1: Human Leukocyte Antigens DR 1 (insan lökosit antijeni DR 1)
HPLC: High Performance Liquid Chromatography (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi)
IAA: Iodoacetamine
IFA: Incomplete Freund Adjuvant (Freund'un tam olmayan adjuvantı)
Ig: İmmunoglobulin
KLH: Keyhole limpet hemocyanin
LC: Liquid chromatography (Sıvı kromatografisi)
MAb: Monoclonal Antibody (monoklonal antikor)
MHC I: Major histocompatibility complex I (büyük histolojik uyum kompleksi I)
MHC II: Major histocompatibility complex II (büyük histolojik uyum kompleksi II)
MS: Mass Spectrometry (Kütle spektrometresi)
NK: Natural Killer (doğal öldürücü)
PAb: Polyclonal Antibody (poliklonal antikor)
PBS: Phosphate Buffered Saline (Fosfat tamponu)
PEG: Polyethyleneglycol
PNPP: Paranitrofenil fosfat
RIA: Radioimmunoassay (Yüksek frekans bağışıklık testi)
RPLA: Reverse Passive Latex Agglutination assay (Pasif ters lateks aglütinasyon testi)
SAg: Super Antigen (Süper antijen)
SDS: Sodium dodecyl sulphate (Sodyum dodesil sülfat)
SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Denatüre Edici Jel Elektroforezi)
SE: Stafilokokal enterotoksin
S. aureus: Staphylococcus aureus
SEB: *Staphylococcus aureus* enterotoksin B
SEA: *Staphylococcus aureus* enterotoksin A
SEC: *Staphylococcus aureus* enterotoksin C
SED: *Staphylococcus aureus* enterotoksin D
SEE: *Staphylococcus aureus* enterotoksin E
TCR: T Cell Receptor (T hücre reseptörü)
TEMED: Tetrametil Etilen Diamin
TFA: Trifluoroacetic acid

TLC:Thin Liquid Chromatography (İnce tabaka kromatografisi)

TNBS: 2,4,6-trinitrobenzene sulfonicacid

TSST: ToxicShockSyndrome (toksik şok sendromu)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	4
Şekil 2.2. Haşlanmış deri sendromu görünümü.....	6
Şekil 2.3.Hibridoma teknolojisi ile monoklonal antikor üretimi.....	15
Şekil 2.4. Bilinen antijenler ve süperantijenlerin MHC II ile oluşturdukları bağlanma bölgeleri farklılıklarının şematik gösterimi.....	18
Şekil 2.5. SEB'in HLA DR ile oluşturduğu kompozisyonun gösterimi.....	21
Şekil 2.6. SEB ve MHC II etkileşim bölgelerinin gösterimi.....	21
Şekil 2.7.DTT'nin iki trioldisülfid değişimi reaksiyonu yolu ile tipik disülfid bağımlı indirgenmesi.....	23
Şekil 2.8.Dithiothreitol.....	23
Şekil 2.9. Papain'ın polipeptitfragmentlere ayrılması.....	25
Şekil 2.10.Cyanogenbromide ile protein indirgenmesi	25
3.1. PAGE sistemi (SIGMA, Bio-Rad).....	27
Şekil 3.2. ELISA okuyucu (Bio Rad).....	28
Şekil 3.3. ELISA yıkama ünitesi.....	28
Şekil 3.4.Magnetik karıştırıcı (ColeParmer).....	29
Şekil 3.5. Vorteks (Scientific Endustries).....	29
Şekil 3.6. pH metre (Inolab).....	30
Şekil 3.7. Su banyosu (Scientific).....	30
Şekil 3.8. Pipetler (Eppendorf).....	31
Şekil 3.9. Dolaylı ELISA yöntemi	48
Şekil 4.1. DTT ile muamele edilen SEB örneklerinin %12'lik jelde elektroforetikanalizi.....	50
Şekil 4.2. Oda sıcaklığında farklı sürelerde DTT-GuanidinHCl ile muamele edilen SEB örneklerinin %15'lik jelde elektroforetik analizi.....	51
Şekil 4.3. 37°C'de DTT-GuanidinHCl ile muamele edilen SEB örneklerinin	

%15 'lik jelde elektroforetik analizi.....	51
Şekil 4.4. Papain ile muamele edilen SEB örneklerinin %15'lik jelde elektroforetik analizi.....	52
Şekil 4.5. SEB katyonizasyonu.....	53
Şekil 4.6. Nativ SEB ile immünize edilen iki adet farenin gösterdiği bağışık yanıt.....	55
Şekil 4.7. SEB ve SEA ile birlikte bağışıklanmış iki farenin gösterdiği bağışık yanıt.....	56
Şekil 4.8. SEB-DTT-GuanidinHCl ile immünize edilmiş 3. kafes farelerinin gösterdiği bağışık yanıt.....	57
Şekil 4.9. SEB-DTT-GuanidinHCl ile immünize edilmiş 4. kafes farelerinin gösterdiği bağışık yanıt.....	58
Şekil 4.10. SEB-DTT-GuanidinHCl ile immünize edilmiş 5. kafes farelerinin gösterdiği bağışık yanıt.....	59
Şekil 4.11. 1., 2., 3. ve 4. immünizasyonlar sonucunda farelerin serumlarında immün yanıtın kontrolü.....	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. SEB'in aminoasit dizilimi	20
Çizelge 2.2. DTT'nin nicel ve nitel özelliklerinin ifadesi.....	23
Çizelge 3.1. SEB'in DTT ile indirgenmesi.....	37
Çizelge 3.2. SEB'in DTT-GuanidinHCl ile İndirgenmesi.....	38
Çizelge 3.3. SEB'in papain ile indirgenmesi.....	39
Çizelge 3.4. SEB'in CnBr ile indirgenmesi.....	39
Çizelge 3.5. %12'lik ve %15'lik alt jelin hazırlanışı.....	41
Çizelge 3.6. %5'lik üst jelin hazırlanışı.....	41
Çizelge 3.7. Farelere nativ protein immünizasyon programı.....	44
Çizelge 3.8. DTT GuanidinHCl ile indirgenmiş SEB immünizasyonu.....	45
Çizelge 3.9. Farelere modifiye protein immünizasyon programı.....	46
Çizelge 4.1. Nativ SEB ile immünize fareler için ELISA kurgusu.....	54
Çizelge 4.2. SEB + SEA ile immünize fareler için ELISA kurgusu.....	55
Çizelge 4.3. DTT-GuanidinHCl ile immünize edilmiş 3. kafes fareleri için ELISA kurgusu.....	57
Çizelge 4.4. DTT-GuanidinHCl ile immünize edilmiş 4. kafes fareleri için ELISA kurgusu.....	58
Çizelge 4.5. DTT-GuanidinHCl ile immünize edilmiş 5. kafes fareleri için ELISA kurgusu.....	59
Çizelge 4.6. c SEB ile immünize farelerde immün yanıtın kontrolü kapsamında uygulanan plan.....	61

1. GİRİŞ

Türkiye ve dünyada yapılan istatistikler, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) enterotoksin B (SEB) kaynaklı gıda zehirlenmesinin özellikle süt tüketimi sırasında sık rastlanılan bir durum olduğunu göstermektedir. SEB canlılarda yüksek ateş, bulantı ve kusma ile seyreden özellikle yaşlı ve çocuklarda ölümle sonuçlanabilen emarelere yol açmaktadır (Le Loir, 2003).

Süt yüksek besin değeri ile temel bir gıda maddesidir. Sütün yanı sıra süt ürünleri de içerdikleri vitamin, protein ve mineraller ile metabolizma düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Ancak, işleme, taşıma ve depolama işlemleri sırasında katkı ya da bulaşanlar ile süt ve süt ürünlerinin kalitesi önemli ölçüde etkilenmekte, yasaklı katkı maddeleri (koruyucu, kıvam artırıcı vb.) ve bazı kimyasal, mikrobiyal kirliliklerin oluşturdukları sağlık riskleri nedeni ile denetlenmektedir. Ülkemizde AB standartları gereğince süt üretimi aşamasında bulaşanlar ve kalıntılar için gerekli mikrobiyolojik kontroller gerçekleştirilmektedir.

Süt, mikrobiyal etmenlerle çoğunlukla sağım sırasında kirlenmektedir. Sütün sağlıklı tüketimini engelleyen önemli mikrobiyal kirlilik *S. aureus* enterotoksinleridir. Sütte yaygın biçimde bulunan enterotoksinler; SEB, *S. aureus* enterotoksin A (SEA), *S. aureus* enterotoksin C (SEC), *S. aureus* enterotoksin D (SED) ve *S. aureus* enterotoksin E (SEE)'dir.

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nin, 23.09.2002 tarihinde, 24885 sayılı resmi gazetede yayınlanan 2002/63 no.'lu Gıda Maddelerinde Belirli Bulaşanların Maksimum Seviyelerinin Belirlenmesi Hakkındaki Tebliğ'inde, muhtemel risk oluşturmaya bağlı olarak, sütün enterotoksinler açısından test edilmesi ve sütte kesinlikle bulunmaması gereği belirtilmiştir (Ref:<http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2002-63.html>). İlgili mevzuat kapsamında enterotoksinler immünolojik test sistemleri (ELISA) ile tanımlanmaktadır.

İmmünolojik test sistemlerinin hazırlaması testin en önemli unsuru olan antikorların etkin biçimde üretilmesine bağlıdır. Süperantijenik yapıdaki enterotoksinler, immünojenik yapılarına karşın, bağışıklık sistemini non-spesifik olarak aktive etme özellikleri nedeniyle özgül B ve CD4 T hücrelerinin aktivasyonu ve dolayısı ile, analitlere özgü antikor üretilmesi açısından sorun teşkil etmektedir.

Tez çalışmasında, SEB spesifik antikor yanıtı geliştirmeye yönelik, bu sorunların üstesinden gelecek yaklaşımlar ele alınmıştır. Çalışmada SEB, farklı yöntemlerle modifiye edilerek deney hayvanlarına (BALB/c) immünize edilmiş ve immün yanıtlar kontrol

edilmiştir. Nativ toksin ve modifiye toksin ile immünize fare yanıtlarından sağlanan sonuçlar tartışılmıştır. Araştırmanın, SEB'e karşı hümorale immün yanıt sağlama yönündeki çalışmalara katkı sağlayacağı ümit edilmektedir.

1.1. Amaç

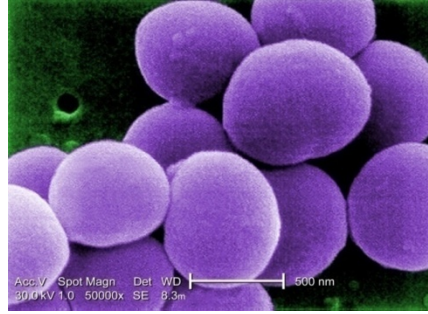
Bu çalışmada, sütte önemli bir kirletici ajan olarak bulunabilen SEB'in tanısında kullanılacak, SEB spesifik monoklonal antikorların geliştirilmesine yönelik yeni stratejileri içeren çalışmalar yer almaktadır. SEB'in diğer antijenlerden farklı olarak hücre içi işlemlerden geçmeden, T hücre reseptörü (TCR) ile etkileşiminden kaynaklanan hümmoral yanıtın elde edilmesindeki güçlüklerin aşılabilmesi için, toksin proteinin yapısı üzerinde gerçekleştirilen modifikasyonlar ile immünize edildikleri farelerde hümmoral immün yanıtın artırılması amaçlanmaktadır.

Modifiye SEB antijeni ile immünize edilen farelerin serumlarından sağlanan pozitif immün cevaplara yönelik sonuçların, SEB'e karşı monoklonal antikor geliştirme çalışmaları kapsamında literatüre de katkı sağlanması ümit edilmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *S. aureus* ve Enterotoksinleri

Staphylococcus aureus suşları Robert Koch (1878 yılında) tarafından tanımlanmış, Pasteur tarafından 1880 yılında sıvı besiyerinde üretilmiştir. Suşlara kümelenmeler oluşturmaları nedeniyle grekçe “üzüm salkımı” anlamına gelen “*staphyle*” teriminden türetilen *Staphylococcus* adı verilmiştir. Şekil 2.1’de gösterilen *S. aureus*’un fare ve kobaylar için patojen olduğunu ilk olarak Alexander Ogston vurgulamıştır (Mandell, 2000).



Şekil 2.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus; konak hücre morfolojisini ve/veya fonksiyonunu etkileyen çok sayıda ekstrasellüler toksin üretebilir. Bunlardan bir kısmı toksik etkilerini enzimatik aktivite ile gösterirken, diğerleri süperantijen özellikleri nedeniyle sitokin salınımını indükler. Ayrıca, bu toksinler sayesinde stafilokoklar yoğun inflamatuvar yanıt olan bölgelerde üremelerini sürdürebilirler. Stafilokokal enterotoksinler (SE), 100°C’ye 30 dakika dayanabilen, ısıya dirençli polipeptit yapısında maddelerdir. Özellikle yüksek CO₂’li atmosfer ortamında karbonhidratlı ve proteinli besiyerlerinde üreyen stafilokoklar tarafından oluşturulurlar. Enterotoksinlerin; SEA, SEB, SEC (*staphylococcus aureus* enterotoksin C1, C2), SED, SEE ve *staphylococcus aureus* enterotoksin F (SEF) olmak üzere 7 immünolojik tipi vardır.

S. aureus kökenlerinin %35-50’sinin bu toksinleri oluşturabildikleri saptanmıştır (Mandell, 2000). Enterotoksinlere gıdalardan en fazla süt ve süt ürünlerinde rastlanmaktadır. Sütte yaygın olarak bulunan enterotoksinler; SEA, SEB, SEC, SED, SEE’dir (Yılmaz, 2010). Bu enterotoksinler genellikle süt ve süt ürünlerinin tüketilmesi yoluyla alınırlar.

2.2. SE İçeren Besinlere Dayalı Riskler

Özellikle süt kaynaklı besinlerdeki SE’lerin mevcudiyeti ve bu SE’li besinlerin tüketimi sağlık ve ekonomik açıdan risk kaynağıdır. Son yıllarda yapılan birçok

araştırma da stafilokokların endüstriyel besinlerden özellikle süt ve süt ürünlerindeki varlığını doğrulamaktadır. Süt, yeterli ve dengeli beslenme için gerekli olan hayvansal protein, yağ, laktoz, vitamin ve mineral maddeleri yeterli miktarda içeren, özellikle bebek ve çocukların kemik ve diş gelişimleri sürecinde önemli yeri olan, vücut fonksiyonlarını düzenleyen, temel bir gıda maddesidir. Süt, ancak kaliteli ve sağlıklı biçimde tüketildiği ölçüde bu özellikleri ile mükemmel bir besin kaynağıdır. Çünkü aynı zamanda, nötral pH'sı, içerdiği laktoz, sitrik asit, süt yağı, azot, mineral maddeler ve yüksek su içeriği ile birçok mikroorganizmanın gelişmesi için de mükemmel bir ortam oluşturur (Gran, 2003). Üretim şartları, saklama, depolama, ambalaj sağlıklı süt kalitesini etkileyen önemli etmenlerdir.

Süte bulaşabilen mikroorganizmalar, mikrobiyal gelişmeyi önleyici muhafaza yöntemleri uygulanmadığı takdirde hızla gelişerek bozulmaya neden olurlar. Sütte bulunabilecek kontaminantların bir kısmı tanımlanmamış olmakla birlikte, temel olarak kimyasal (dioxin, PCBs, pestisit vb. kalıntılar) ve mikrobiyal kirlilikler olarak sınıflandırılabilir. Etkileri açısından ise; endokrin bozucular, allerjenler, kanserojenler, sinir, sindirim ve bağışıklık sistemini etkileyiciler olarak da tanımlanabilirler.

Süt ve süt ürünlerine bakteriyel (antrax, brusella, listeria, tüberküloz, salmonella, camphylobakter, staphylococcal intoksikasyon), viral (adenovirus, Tick-borne ensefalitis), riketsiyal (Q-fever), protozoal (toksoplazmozis, giardiozis, amebiazis) bulaşmalar söz konusu olabilir. Mikrobiyal kirlenme genellikle çevredeki (hava, toprak, su ve gübre kaynaklı) ve sağım sırasındaki (meme kanalı, meme başları ve meme lobunun dış yüzeyi kaynaklı) kötü koşullar ile oluşabilir (Behraves, 2009).

Sütü kontamine eden en önemli mikroorganizmalardan birisi olan *S. aureus* ve toksinleri sütte sıklıkla bakteriyel kontaminant olarak bulunmaktadır. *S. aureus* suşlarının oluşturduğu mikrobiyal kirlilik, bir taraftan ürünlerde bozulmaya neden olurken diğer taraftan ürettiği toksinler nedeniyle tüketilmesi halinde canlılar için sağlık riski oluşturmaktadır.

2.2.1. Sağlık Üzerindeki Etkiler

Stafilokokların gıdalardaki miktarının 106 kob/g veya daha yüksek sayıya ulaşması durumunda stafilokoklar tarafından sentezlenen enterotoksinlerin bu gıdalardaki varlığı insan sağlığı açısından risk oluşturmaktadır. Bu gıdaların alimenter yol ile alınması insanlarda gıda zehirlenmesine yol açmaktadır (Atanassova, 2001). Bu tablo stafilokok üremiş ve enterotoksin oluşmuş besinlerin yenmesini izleyen 2-6 saat içinde bulantı, kusma ve ishal ile başlar (Bilgehan, 2000). Stafilokokal gıda zehirlenmesi olgularında ölüm

nadirdir. Ancak çocuklar ve yaşlılarda ölüm oranının %0.03'ten %4.4'e kadar değişebildiği ifade edilmektedir (Holmberg, 1984).

SE'ye maruz kalınması durumunda oluşabilen bir semptom olan haşlanmış deri sendromu (yenidoğanlar için Ritter hastalığı), stafilokokların eksfoliyatif toksinine bağlı olarak ortaya çıkan ve deride yaygın büller ve soyulmayla karakterize bir klinik tablo ile seyretmekte ve en çok 5 yaşın altındaki çocuklarda görülmektedir (Mandell, 2000, Collier, 1998). Şekil 2.2'de haşlanmış deri sendromu gösterilmektedir. SE'ye maruz kalınması durumunda oluşabilen bir diğer yaygın hastalık da, *S. aureus*'un toksin salgılayan suşlarıyla kolonizasyon veya enfeksiyonu sırasında ortaya çıkan ateş, diyare, eritrodermi, mental konfüzyon ve ciddi refrakter hipotansiyonla karakterize bir klinik tablo ile seyreden toksik şok sendromu (TSST)'dur (Mandell, 2000, Tünger, 2004).



Şekil 2.2. Haşlanmış deri sendromu görünümü

2.2.2. Ekonomik Kayıplar

SE'lerin süt, peynir, et, kümes hayvanları, yumurta, salata, şekerlemeler ve kremalardaki mevcudiyeti ekonomik açıdan büyük bir risk kaynağıdır. Ürünlerde SE'lerin mevcudiyeti; gerek SE kaynaklı ürün kayıpları, gerekse bu ürünlerin tüketimi sonucu oluşan tedavi giderleri nedeniyle hem üretici hem de tüketiciyi ekonomik kayba sürükler. SE'lerin özellikle sütteki mevcudiyeti, süt kaynaklı besinlerin fazla olması ve sık tüketilmesi nedeniyle büyük bir risk oluşturur. Bileşimi ve niteliği nedeniyle bozulmaya ve kontaminasyona uğramaya uygun bir gıda maddesi olan süt ve süt ürünlerinde bulunan kontaminasyon etmenlerinin teşhisi için dünya çapında uygulanan birçok süt analiz sistemi mevcuttur. Süt örneklerinde tespit edilecek olan SE kontaminasyon etmenleri, ELISA testi gibi immünolojik analizlerin uygulanmasını gerektirir. Sütte SE analizleri için gerekli olan materyal, numunelerin elde edilmesi ve harcanması dünyada ekonomik anlamda kayıplara neden olmaktadır.

ABD'de stafilokokal gıda zehirlenmelerinin ürün kaybı ve tedavi giderleri nedeni ile her yıl yaklaşık 1.5 milyar dolarlık harcamaya neden olduğu belirtilmektedir (Su, 1996).

Aynı nedenle oluşan gıda kaynaklı hastalıklardan ABD’de her yıl 6-80 milyon insanın etkilendiği ve böylelikle yıllık yaklaşık 5 milyar dolarlık ekonomik kayıp meydana geldiği bildirilmektedir (Buzby, 1997). Türkiye’de süt ineği yetiştiriciliğinin temel sorunlarından olan *S. aureus* kaynaklı mastitis, hasta ineklerin elden çıkarılması, satış değerindeki ve süt miktarlarında azalma gibi nedenlerle önemli ekonomik kayıplara yol açan bir hastalıktır. Türkiye’de *S. aureus*’a bağlı subklinik mastitis oranının yüksek olması (%73.78) nedeniyle çiftçilik alanındaki ekonomik kayıpların çoğunu *S.aureus* kaynaklı kontaminasyonların oluşturduğu tespit edilmiştir (Kalkan, 2002).

SE’lerin hem sağlık hem ekonomi alanındaki olumsuz etkilerinin belirlenmesiyle birlikte, besinlerdeki dağılımı ve oluşturduğu etkilerin bölgelere göre dağılımı ile ilgili çeşitli istatistiksel çalışmalar yapılmıştır.

2.3. Besinlerin SE İçeriği ile İlgili Çalışmalar

Stafilokokal gıda zehirlenmeleri dünyada sık rastlanan ve ülkeden ülkeye farklılık gösteren bir durumdur. Stafilokoka bağlı ilk gıda zehirlenmesi 1884 yılında ABD’de tanımlanmıştır. O yıllarda, Cheddar peynirinin tüketiminden sonra çeşitli hastalık vakaları ortaya çıkmış ve analizler sonucunda peynir örneklerinden yüksek düzeyde stafilokok türleri izole edilmiştir. Sonraki yıllarda (1914) mastitisli ineklerden sağılan sütün tüketilmesi sonucu, Filipin’li çiftçilerde stafilokokal zehirlenme tespit edilmiştir. Özellikle süt ve süt ürünlerinde görülen stafilokokların sağlık alanındaki etkileri sonucu stafilokokların endüstriyel besinlerdeki içeriği ile ilgili çeşitli istatistiksel araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda yapılan ilk istatistiksel araştırmaya göre stafilokok kaynaklı hastalık görülme oranının; İngiltere’de 1969 ve 1990 yılları arasında %8 iken (Wieneke, 1993), ABD’de 1975 ve 1982 yılları arasında %1.4 (Genigeorgis, 1989), Fransa’da ise 1999 ve 2000 yılları arasında %32 olduğu tespit edilmiştir (Le Loir, 2003).

Avrupa’nın güneyinde, İtalya’da yapılan bir araştırmada, marketlerden alınan 11384 gıda *S. aureus* varlığı yönünden incelenmiştir. 437 adet çiğ süt örneğinden 168 adedinin, 102 ısıtılmış süt örneğinden 2 adedinin koagülaz pozitif *S. aureus* içerdiği tespit edilmiştir (Normanno, 2005). Kuzeyde Norveç’te yapılan bir araştırmada ise gıda zehirlenmesinden sorumlu olduğundan şüphelenilen ve çiğ inek sütü kullanılarak yapılmış olan patates püresinde 8×10^8 kob/g düzeyinde *S. aureus* tespit edilmiştir. Araştırmacılar çiğ sütün elde edildiği işletmenin süt tankından almış oldukları örneklerde de etkeni izole etmişlerdir (Jorgensen,2005).

Orta Avrupa’da, Slovakya’da çeşitli tarımsal işletmelerden toplanılmak üzere 75 adet subklinik ve klinik olarak hasta olduğu belirlenen hayvanlardan alınan çiğ süt örnekleri

incelenmiştir. Bunlardan 32 adet *S. aureus* izolatu elde edilmiş, 32 izolattan 15'nin SEC, 15'nin SED, ikisinin SEA ve SEB enterotoksin kodlayan genleri taşıdıklarını tespit edilmiştir (Tkaaikova, 2003).

Londra'da bulunan Gıda Hijyeni Laboratuvarı'nın resmi rakamlarına göre 1969 ve 1990 yılları arasında SE'lerin neden olduğu 359 adet gıda zehirlenme vakası tespit edilmiştir (Wieneke, 1993).

Gıda kaynaklı mikrobiyolojik hastalıklar içinde *S. aureus* zehirlenme oranının Macaristan'da %40, Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) %45 ve Japonya'da %25-30 olduğu tahmin edilmektedir. Japonya'da en fazla zehirlenmeye neden olan toksin tipinin %62 oranıyla SEA olduğu belirlenmiştir (Nakazawa, 1992).

S. aureus, bir çok ülkede yaygın gıda zehirlenmesi olgularına neden olan ikinci veya üçüncü patojen olarak dikkati çekmektedir (Atanassova, 2001). ABD'de zehirlenmeye neden olan gıdaların %77,8'inde SEA ve %10'unda SEB tespit edildiği bildirilmiştir (Balaban, 2000).

Nijerya'nın doğusunda yapılan bir çalışmada; yaygın olarak tüketilen kırmızı et, balık ve sebzedden oluşan 880 gıda örneğinden izole edilen 552 (%62) koagülaz pozitif *S. aureus* suşundan 269'unun (%48) enterotoksijenik olduğu saptanmış ve bunlar içerisinde en fazla SEA oluşturanların bulunduğunu bildirilmiştir. Aynı çalışmada incelenen balık örneklerinde ise SEB ve SEA enterotoksinleri dominant olarak bulunmuştur (Sokari, 1991).

Slovakya'nın doğusunda yapılan bir çalışmada, endüstriyel olarak üretilen gıdalardan izole edilen *S. aureus* suşlarından; %5,9'unun SEA, %23,5'inin SEB ve %9,8'inin ise hem SEA hem de SEB ürettiği tespit edilmiştir (Holeckova, 2002).

Türkiye'de, Kayseri çevresindeki çeşitli mandıra ve işletmelerden gelen çiğ süt örnekleri ile ELISA yöntemi kullanılarak yapılan SE araştırmasında, çalışılan toplam 60 çiğ süt numunesinden; 19'unda SEA, 3'ünde SEB, 9'unda SEC, 6'sında SED tespit edilmiştir ancak hiç birinde SEE tespit edilmemiştir. Yine aynı bölgede incelenen çiğ süt örneklerinin %50'sinde *S. aureus* ve aynı örneklerin %61'inde SE'lerin bulunması nedeniyle bu oranın Türk Gıda Kodeksi'nde belirtilen limitlere uygun olmadığı belirlenmiştir (Yılmaz,2009).

Yine Kayseri ilinde yapılan çalışmada incelenen 100 adet çiğ süt numunesinin 60'ında (%60) *Staphylococcus* spp. üremesi tespit edilmiştir. İncelenen 300 adet izolata yapılan katalaz ve koagülaz testi ile 42'sinin (%14) *S. aureus* olduğu belirlenmiştir. Belirlenen 42 adet *S. aureus* izolatının incelenmesi sonucunda 31 izolatta (%73.8) enterotoksin

genlerinin varlığı tespit edilmiştir. Bu enterotoksinlerin sırasıyla 12'sinin (%38.7) SEA, 2'sinin (%6.5) SEB, 5'inin (%16.1) SEC, 10'unun (%32.3) SED ve 2'sinin (%6.5) hem SEA hem de SED gen dağılımına sahip olduğu belirlenmiştir. Belirlenen 42 adet izolata ait çiğ sütlerin ELISA tekniği ile incelenmesi sonucunda ise 28 örnekte (%66.6) SE varlığı belirlenmiştir. Uygulanan ELISA testleri sonucunda numunelerdeki SE'lerin sırasıyla; 10'unun (%35.7) SEA, 2'sinin (%7.1) SEB, 5'inin (%17.8) SEC, 9'unun (%32.2) SED ve 2'sinin (% 7.1) hem SEA hem de SED olduğu tespit edilmiştir. *S. aureus* izole edilmeyen çiğ sütlerde, SE varlığına rastlanılmamıştır (Ertaş, 2010).

Ankara'da yapılan çalışmada toplam 100 kremalı pasta numunesi stafilocok enterotoksini içermeleri bakımından incelenmiştir. Sade kremalı örneklerin %4'ünde, kakaolu kremalı örneklerin %12'sinde ve meyveli kremalı örneklerin %9'unda olmak üzere %25 kremalı pastadan izole edilen koagulaz pozitif (+) stafilocokların enterotoksin oluşturma özelliğinde olduğu tespit edilmiştir (Kısa, 1996).

Burdur'da 50 peynir ve 50 dondurmanın SE içeriklerinin incelendiği bir araştırmada 50 peynir örneğinin 3 tanesinde (%6) toksine rastlanmış olup, 50 dondurma örneğinde SE'ye rastlanmamıştır (Tascil, 2011). Yine Ankara'da markette bulunan 50 biftek, 50 kıymalık sığır eti, 50 hindi eti, 50 tavuk, 50 türk beyaz peyniri, 50 ingiliz peyniri, 25 krem peynir ve 25 şişe patörize süt örneklerinden oluşan 300 yiyecek örneği analiz edilmiştir. 300 örneğin 72'sinde SE varlığı ELISA yöntemi ile tespit edilmiştir. Biftekte %16 (7 adedinde SEA, 5 adedinde SEC, 2 adedinde SED), kıymalık ette% 64 (32 SEA, 2SEC), hindi etinde %36 (13 adedinde SEB, 8 adedinde SED), tavuk etinde %28 (14 SEC, 6 SED) oranında stafilocok enterotoksinlere rastlanmıştır (Koluman, 2011).

Aynı bölgede halkın tüketimine sunulan toplam 214 adet peynirin SE içerikleri belirlenmiş ve incelemeye alınan tulum peynirinin %24.3, beyaz peynirin %19.5 ve kaflar peynirinin ise %5.5 oranında enterotoksijenik stafilocok türleri ile kontamine olduğu tespit edilmiştir (Küplülü, 2004).

İzmir ilinde satışa sunulan peynirlerin SE içeriğinin araştırıldığı bir çalışmada, çeşitli firma ve mandıralara ait beyaz, kaşar, tulum ve Van otlu peynirleri incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda örneklerde en çok tespit edilen enterotoksin tipinin %58.8 oranıyla SEA olduğu, bunu sırasıyla; SEB (%41.2), SEC (% 11.8) ve SED (%5.9)'nin izlediği tespit edilmiştir (Demirel, 2004).

Ülkemizde stafilocokların ürünlerdeki mevcudiyeti ve SE'lerin belirlenmesi ile gerçekleştirilen araştırmalar genellikle durum analizine yönelik istatistiksel çalışmalar olup, önleyici veya korunmaya yönelik araştırmaların azlığı dikkat çekicidir.

2.4. SE'lerin Tanısı

Mikroorganizmaların gelişimi için mükemmel bir ortam olan süt ve süt ürünlerindeki SE varlığının belirlenmesi, süt yolu ile alınan SE'lerin canlılar için sağlık ve ekonomi açısından büyük risk oluşturması nedeniyle önem taşımaktadır. Sütte bulunan çeşitli bileşenlerin analizi ve kontaminantların tespitinde ince tabaka kromatografisi (TLC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC-LC/MS), gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS) gibi kromatografik ve ELISA gibi immünojenik yöntemler kullanılmaktadır. Sütte SE analizi çalışmalarında ise kromatografik yöntemler yerine antijen ve antikor arasındaki bağın özgünlüğüne bağlı olarak ELISA, EMIT (Enzyme Multiplied Immunotechnique) gibi immünojenik tanı yöntemleri tercih edilmektedir. Ayrıca AB yasaları gereği, süt ve süt ürünlerinin üretim aşamasında Türkiye'de zorunlu olarak ELISA tabanlı testler ve HPLC sistemleri gibi teşhis testleri kullanılmaktadır (<ftp://ftp.kkgm.gov.tr/AB/Genel/>).

2.4.1. Kromatografik yöntemler

Süt analizi çalışmalarında başvurulan kromatografik yöntemlerden TLC, GC ve HPLC, süt özütlerindeki antibiyotik kalıntılarının tespiti gibi karışımın kaç bileşenden oluştuğunun belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda maddelerin niteliksel analizleri için sıkça kullanılmaktadır. Süt analizi çalışmalarında başvurulan bir diğer metot olan GC'de, maddelerin kütlece oranları, saf olup olmadığı ve reaksiyonun ilerleyişi görünebilir. Bu nedenle sütte bulunan ve gıdaya aromasını veren etanol, asetoin gibi uçucu aroma analizlerinin gerçekleştirilmesi çalışmalarında kullanılan bir metot olan GC metodu ile, sütteki bileşenlerin kantitatif (nicel) yorumu gerçekleştirilebilir. Pastörize ve UHT sütlerde oksitetrasiklin, penisilin gibi antibiyotik kalıntılarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen bir çok çalışmada aminoasitler, proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar, ilaçlar ve pestisitlerin kantitatif tayininde yararlanılan HPLC yöntemine başvurulmaktadır.

Sütlerde gıda güvenliği ve toplum sağlığı yönünden yapılan çalışmalarda kromatografik yöntemler, bileşenlerin analizi ve çeşitli kontaminantların tesbiti için tercih edilmektedir. Sütte bulunan aminoasit, protein, nükleik asit, karbonhidrat, ilaç ve pestisit analizi çalışmalarında kromatografik yöntemlerden oldukça yararlanılmasına rağmen sütte SE analizi çalışmalarında bu yöntem kullanılmamaktadır.

2.4.2. İmmünojenik Yöntemler

Sütteki enterotoksinlerin saptanması amacı ile kullanılan immünojenik analiz yöntemleri antijen-antikor etkileşimi esasına dayanır. Bu amaçla gerçekleştirilen ilk immünojenik yöntemlerden immünodifüzyon teknikleri, enterotoksinin jel içinde difüze

olması ve homologunun antikor ile reaksiyona girerek görünür presipitat oluşturması temeline dayanır. Çiftli jel immünodifüzyon tekniği, şüpheli örneklerde toksin saptanması amacı ile kullanılmıştır. Bu metot yarı kantitatif olup, 5-10 µg/ml enterotoksini bir gece içinde saptayabilir. Son zamanlarda gerçekleştirilen yöntemlerden RIA (radioimmunoassay) sütte enterotoksin saptanması için geniş ölçüde kullanılmıştır. Bu metot antikor molekülü üzerinde bağlanma bölümlerinde, örneklerde işaretlenmemiş toksin ile standart radyoaktif olarak işaretlenmiş toksinin yarışması esasına dayanır. Genel olarak hızlı (3-4 saat) ve 1-10 ng/gr düzeyinin altında toksinleri saptayabilen bir yöntemdir (Tranter, 1990).

Örnek materyal içerisinde özgül antijen veya bilinen bir antikor olduğunda materyal içerisindeki özgül antijenin saptanmasına olanak tanıyan ELISA bazlı immünolojik yöntemler, sütteki kontaminasyon oranının, özellikle içerdiği enterotoksin miktarının saptanması amacı ile gerçekleştirilen ve birçok çalışmada kullanılan tekniklerdir. Enzim aracılığı ile kromojenik substratların katalizlenmesi ve görsel olarak değerlendirilmesi esasına dayanır. ELISA testinin dolaylı, dolaysız ve sandiviç ELISA gibi farklı şekilleri mevcuttur.

ELISA tekniğinin uygulaması çok zahmetli olduğu için son zamanlarda bazı ELISA testleri (VIDAS, Assurance EIA, Transia Elisamatic II, Detex vb.) tamamen otomatik hale getirilmiştir. Antikora dayalı bu sistemler ile sütteki SE'ler kısa sürede otomatik olarak teşhis edilmektedir. Sonuç olarak, SE'lerin saptanmasında en kolay, hızlı ve güvenilir yöntemin ELISA metodu olduğu kabul edilmektedir (Kısa, 1996, Cretenet, 2011).

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nin, 03.04.2009 tarihinde, 27189 sayılı resmi gazetede yayınlanan AB direktiflerine uygun standartlar gereğince sütte kontaminasyon sebebi olan etkenin tanımlanması için gerekli biyokimyasal, immünolojik ve serolojik yöntemlerin uygulanması, standardizasyon ve sonuçlarının yorumlanmasının gerekliliğinden, uygulanacak immünolojik yöntemlerden ELISA testinin geçerliliğinden ve uygulanabilirliğinden bahsedilmektedir (www.kkkm.gov.tr).

2.4.2.1. Antikor Üretimi

İlgili mevzuatlar doğrultusunda enterotoksin tanısında kullanılan tanı sistemleri immünolojik tabanlıdır. İmmünolojik tanı sistemlerinde yer alan komponentler içinde en temel öge antikorlardır. Patojen mikroorganizmaları ve toksinlerini belirlemek için kullanılan ELISA yönteminde antikor ve antijen arasındaki etkileşim esastır. Bu yöntemde antijen ya da antikor bir enzimle işaretlenmekte ve immünolojik reaksiyon, enzimatik bir aktivite sonucu ölçülmektedir. Böylece özgül antikor kullanılarak örnekteki antijenin

miktarı, özgül antijen kullanarak örnekteki antikorun miktarı belirlenebilmektedir (Uçan, 2010).

Memelilerde yabancı antijenlere karşı korunma amacıyla doğal olarak üretilmekte olan antikorlar, in vitro koşullarda da (hücre kültüründe, dış ortamda) başarılı bir şekilde üretilmektedir. Antikorlar üretim şekline göre poliklonal (PAb) ve monoklonal antikor (MAb) olarak ikiye ayrılır. Bir antijen insan veya hayvan vücuduna girdiğinde, farklı antikor salgılayan farklı B hücreleri bu antijenin farklı epitoplarına bağlanarak aktifleşirler. Aktifleşen bu hücreler daha sonra bu antijenin tüm epitoplarına bağlanabilecek farklı antikorlardan çok sayıda üretirler. Böylece farklı B hücreleri tarafından üretilen bu antikora PAb adı verilir. Sonuç olarak PAb'lar, birçok farklı B lenfosit klonundan üretilen, hepsi aynı antijenin farklı determinantına bağlanan antikorlardır. Bir fare veya tavşana birkaç hafta aralıklarla birkaç defa aynı antijenin verilmesi daha sonra hayvandan kan alınıp, çökertilmesi ve serum alınması ile elde edilirler. MAb'ler ise sadece bir epitopa karşı reaksiyon gösteren antikorlardır ve sadece bir adet B lenfosit dayanan hücre klonundan elde edilirler.

MAb'lerin elde edilme yöntemi ilk 1975'te César Milstein, Georges Köhler ve Niels Jerne tarafından tanımlanmıştır (Köhler, 1975). Ülkemizde 1985 yılında gerçekleştirilen "Biyoteknoloji Alanında Türkiye Araştırma Geliştirme Politikası" ile birlikte MAb üretimini içinde barındıran Biyoteknoloji'nin dünyada kazandığı önem yankı bulmuş ve DPT tarafından belirlenen kalkınma hedefleri arasında Biyoteknoloji birinci öncelikli desteklenecek bilim dalları arasına konmuştur. Bu konuyla ilgili olarak TÜBİTAK tarafından 1984 yılında "Biyoteknoloji İhtisas Komitesi" kurulmuş ve hazırlanan rapor doğrultusunda 1985 yılında TÜBİTAK Marmara Bilimsel ve Endüstriyel Araştırma Merkezi Biyoloji Bölümü bünyesinde bir Biyoteknoloji Merkezi kurulmuştur. TÜBİTAK'ta 1988'den itibaren, hibridoma, MAb üretim çalışmalarını içine alan biyoteknolojik çalışmalar gerçekleştirilmiştir (<http://www.mam.gov.tr/gmbe/index.html>).

Hastalıklarla savaşmayı sağlayan antikorların büyük miktarlarda ve saf olarak elde edilmesi, sağlık alanının gelişmesinde büyük bir etkiye sahiptir. Bu amaç için kullanılan klasik yöntem, laboratuvar hayvanlarına antijen verilmesi sonrasında antikorların toplanmasıdır. Fakat bu yöntemle elde edilen antiserum içerisinde istenmeyen birçok maddenin bulunması ve bu nedenle de elde edilen kullanılabilir antikor miktarının oldukça düşük olması büyük bir sorun oluşturur. MAb teknolojisi ise antikorların saf halde ve oldukça büyük miktarlarda üretilmesine olanak tanıdığından tıp, tarım, veterinerlik, çevre mühendisliği alanında kullanılan tanı sistemlerinin geliştirilmesinde yaygın biçimde tercih

edilmektedir. MAb'lar tanı amaçlı üretimin yanı sıra kanser ve diğer hastalıklara karşı tedavi amaçlı çalışmalarda da yoğunlukla yer almaktadır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından değerlendirip onaylanmış olan monoklonal antikor bazlı birçok efektif ilaç üretilmektedir.

MAb teknolojisi ile antikorların saf halde ve oldukça büyük miktarlarda üretilmesi olanaklı hale gelmiştir. MAb üretiminde öncelikle, hedef antikorları doğal olarak üreten hücreler elde edilir. Daha sonra bu hücelere sonsuz bölünme yeteneği kazandırılır ve kültür ortamında, hedef antikoru üretecek hibrid (melez) hücreler geliştirilir. Bu şekilde doğal hücreler, kültür ortamında birer antikor fabrikasına dönüştürülmüş olur. Bir antijenik determinant için uyarılmış B hücresine sürekli olarak çoğalabilme yeteneğinin kazandırılması ve böylece devamlı yüksek titrede ve etkinlikte antikor sentezlenmesi gerçekleştirilir. Kemik iliğinde oluşan ve hücre kültüründe üretilmeye uygun olan bir tümör tipi olan myeloma hücreleri, antikor üretme yeteneğine sahip olan dalak hücreleri ile kaynaştırıldıklarında, oluşan hibrid hücreler büyük miktarlarda MAb üretebilir. Bu şekilde, iki farklı hücre tipinin istenen özellikleri birleştirilmiş olur. Sürekli olarak bölünme yeteneği ve büyük miktarlarda saf antikor üretebilme yeteneğine sahip olan "hibridoma" adı verilen hücreler elde edilir. Hibridoma tekniği olarak adlandırılan bu yöntemle oluşan hücreler, tek bir tip hibrid hücreden türedikleri için sentezledikleri antikorlar MAb olarak adlandırılırlar.

MAb'ların kullanımının avantajı, yalnızca tek bir epitopa (antijenik determinanta) karşı özgül olmaları ve çok güçlü immünokimyasal köprüler oluşturmalarından kaynaklanmaktadır. Bu sebeple monoklonal antikorlar antijene spesifik bir bağlanım gösterir. Ancak, proteinler arasında benzer epitopik yapılar mevcut ise çapraz reaksiyonlar sonucunda yalancı pozitiflikler belirlenebilmektedir. Poliklonal antikorların kullanılması durumunda aynı sebeple gerçekleşen yalancı pozitiflik ihtimali daha fazla olmaktadır. Bu sonuç, ekonomik kayıpları da beraberinde getirmektedir. Bu nedenle çalışmalarda monoklonal antikor üretim teknikleri yaygın olarak uygulanmaktadır (Fower, 1995).

MAb eldesi hibridoma tekniği dışında, bakteri ve bitkilerin kullanılmasıyla gerçekleştirilen rekombinant antikor üretim tekniği ile sağlanabilir. Bitki ile rekombinant antikor üretim tekniği; spesifik bitkilerin hedef dokularına DNA (gen) aktarılması, bakteri ile rekombinant antikor üretim tekniği; B lenfositin antijen bağlayıcı antikor parçasının genlerinin eklendiği bakteri, fajlarca enfekte edilmesi, hibridoma tekniği ise, belirli hayvanlardan yararlanılarak sonsuz çoğalabilen tümör hücreleri ve bu hücelere karşı

antikor oluşturacak olan B hücrelerinin füzyonunun gerçekleştirilmesi esasına dayanmaktadır.

Tanı teknolojileri kapsamında kullanılmakta olan monoklonal antikorlar genellikle hibridoma teknolojisi kullanılarak üretilmektedir.

2.4.2.1.1. Hibridoma Teknolojisi

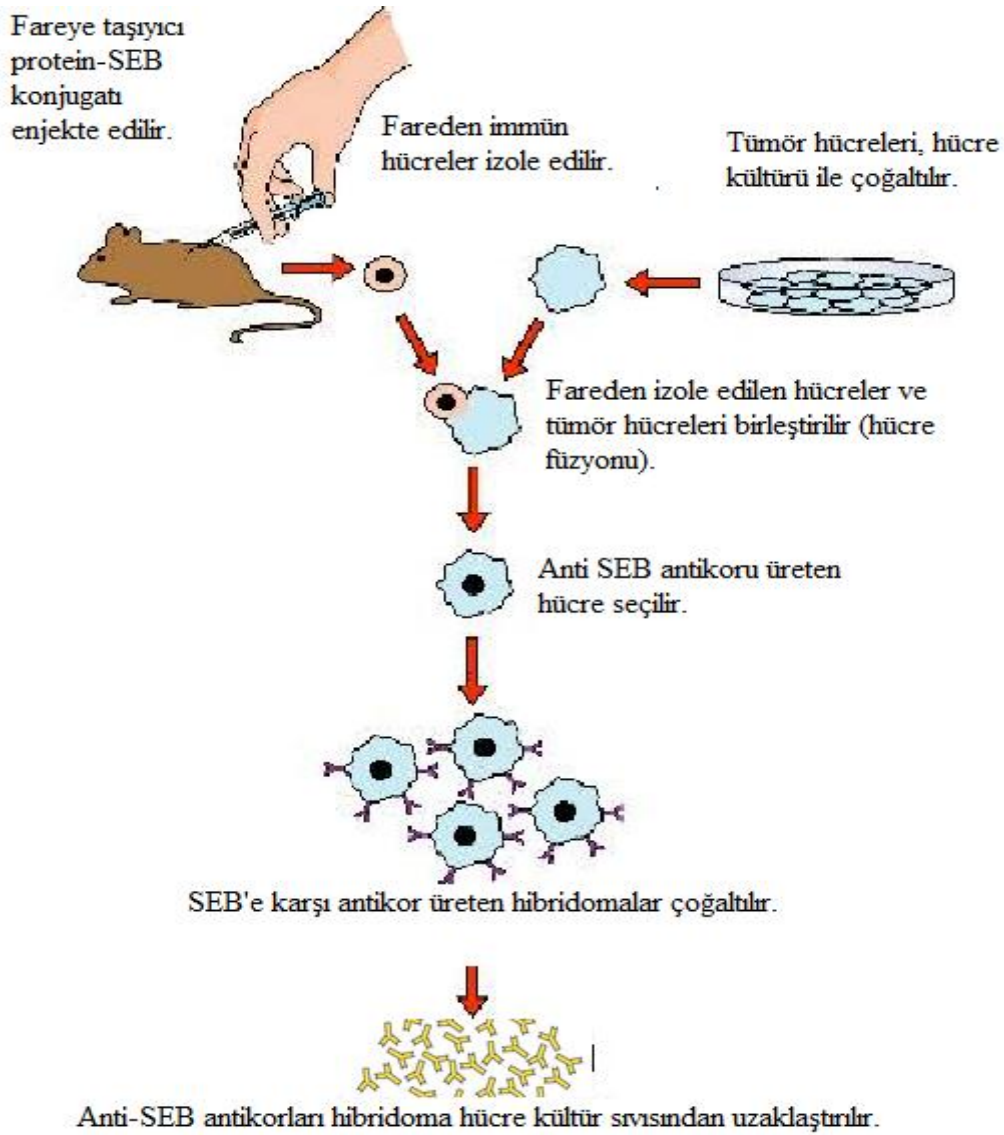
Antikorların büyük miktarda, saf ve özgül olarak üretilmesi tarihte araştırmacıların çalışmalarına konu olmuştur. Georges Köhler ve Cesar Milstein, ilk kez mutant fare myeloma hücresi ve bir antijen ile bağışıklanmış deney hayvanının dalak hücresi ile birleştirilmesi sonucunda monoklonal antikor sentezlenmesinin sağlandığı bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. “Hibridoma Teknolojisi” olarak tanımladıkları yöntemle, B lenfositlerinin özgül antikor yapıcı özelliği ile myeloma hücrelerinin ölümsüzlük özelliğine sahip hibrit hücrelerini özel şartlarda üretilip tek bir epitopa karşı yüksek özgüllükte ve yüksek miktarda monoklonal antikor sentezleyebileceklerini göstermişlerdir (Öztürk, 2011).

Hibridoma teknolojisinde, myeloma hücreleri ile antikor üreten bağışık bir hayvanın dalak lenfositlerinin “hücre füzyonu”na tabi tutulması ardından gerçekleştirilen uygulamalar sonucunda kompleks bir antijenin tek bir belirleyici grubuna (epitop) karşı monoklonal antikor üreten ölümsüz melez hücreler elde edilir.

Aşağıda maddeler halinde ifade edilen Hibridoma teknolojisinin aşamaları şekil 2.3’de şematik olarak tanımlanmaktadır (Yücel, 2007).

1. Fareye taşıyıcı protein-SEB konjugatı enjekte edilir. Antijene karşı bağışık yanıtlar fare serumundaki antikor düzeyinden ELISA testi ile belirlenir.
2. En yüksek düzeyde bağışıklanmış olan farenin dalağından, antikor üreten B lenfositleri (immün hücreler) izole edilir, fare kemik iliği kanser hücresi olan myeloma hücreleri (tümör hücreleri) besiyerinde çoğaltılır.
3. Hibridoma oluşturmak için Polyethylene glycol (PEG) ajanı kullanılarak fareden izole edilen hücreler ve myeloma hücreleri füzyona tabi tutulur.
4. Anti SEB antikor üreten hücreler seçilir. Bu aşamada Azoguanin eklenerek ortamda mutant myeloma hücrelerinin ayrılması sağlanır. Hibrit hücreler diğerlerinden seçici hipoksantin-aminopterin-timidin (HAT) kültür ortamı kullanılarak ayrılır.
5. Oluşan hibrit klonları içinden ilgili antijene karşı antikor sentezleyen hibridoma kolonilerinin kültür üst sıvılarındaki antijene karşı aktiviteleri ELISA yöntemi ile test edilerek aktif klonlar seçilir.
6. Hibridomalar in vitro veya in vivo koşullarda geniş ölçekte üretilir.

7. Antikorlar, fare asit sıvıdan veya kültür üst sıvılarından saflaştırılır.



Şekil 2.3. Hibridoma teknolojisi ile monoklonal antikor üretimi

2.4.2.1.2. Antikor Üretiminde Kullanılan Diğer Teknikler

MAB üretiminin sağlanması hibridoma teknolojisi dışında, elektrofüzyon tekniği veya bitki ve bakterilerin kullanılmasıyla gerçekleştirilen rekombinant antikor uygulaması ile mümkün olmaktadır. Rekombinant antikorlar, antikorların antijen bağlanma bölgelerindeki domainlerinin (scFv, Fab parçası gibi) genetik olarak manipüle edilebildiği yapılardır ve rekombinant antikor uygulamasının temeli bu oluşumdur. Elektrofüzyon tekniği ise füzyon aşamasında oluşturulacak olan elektriksel alanın hücreleri polarize edilmesi esasına dayanmaktadır.

2.4.2.1.2.1. Bakterilerde Rekombinant Anikor Tekniği ile Üretim

Bakterilerde rekombinant antikor üretim aşamasında yararlanılan çeşitli gram pozitif (*Bacillus brevis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Lactobacillus zae/casei*, *Lactobacillus paracasei*) ve gram negatif (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*) bakteriler mevcuttur. *Escherichia coli* rekombinant protein üretimi için yaygın olarak kullanılan sistemlerden biridir. Fareleri kullanmaksızın gerçekleştirilen bu teknikte "ipliksi faj" adı verilen ve bakterileri enfekte etme özelliği taşıyan, uzun ve ipliksi bir virüsten yararlanır. Bu teknik ile insan B lenfosit hücrelerinden yalıtılan DNA, bir bakteri virüsünün (faj) değişikliğe uğratılmış genetik yapısına (genomuna) (örneğin, *Escherichia coli*) eklenerek, bakterinin ipliksi fajlarca enfekte edilmesi sağlanır. Bu yolla sağlık alanında tedavi amaçlı monoklonal antikor eldesi çalışmaları mevcuttur.

Monoklonal antikor eldesinde kullanılan faj tekniğinin aşamaları şöyledir;

1. Antijene spesifik antikorları kodlayan antijen bağlayıcı genler bakterilere verilir ve bakteri fajlarca enfekte edilir.
2. Enfekte olan bakteride kendini kopyalayan faj, B lenfositin antikor genlerince kodlanan proteinleri de otomatik olarak sentezleyerek, her birinin ucunda farklı antikor parçası bulunan yeni fajlar oluşturur.
3. İstenen hedef antijene (örneğin; kanser hücrelerinin yüzeyindeki almaçlara) özgül olarak bağlanabilen antikor parçalarını taşıyan fajlar toplanır.
4. İşlem birkaç kez tekrarlanarak, seçilen fajların genleri bakteriye yeniden eklenir ve spesifik antikor parçaları çoğaltılır.

2.4.2.1.2.2. Bitkilerde Rekombinant Antikor Tekniği ile Üretim

Bakterilerle rekombinant antikor üretimi dışında, bitkilerde antikor üretim tekniği; ekonomik olması, üretim alanı kontrol edilebilir ve büyütülebilir olması, maliyetinin ucuz olması dolayısıyla daha fazla avantaja sahiptir. Bitkilerin totipotent özelliği, hayvan patojenlerinden kaynaklanabilecek kontaminasyon riski olmaması, yenilebilir aşı niteliğinde olması ve mukozal bağışıklık sağlaması bu üretim tekniğinin bir diğer avantajlarından. Bu teknikte *agrobacterium*, elektroporasyon, biyolistik cihazı ile hedef dokulara (bitki hücresine) antijene spesifik modifiye edilmiş genomik bakteri DNA'sı (gen) aktarımı gerçekleştirilir. Bu yolla tedavi amaçlı antikor eldesi mümkün olmaktadır.

2.4.2.1.2.3. Elektrofüzyon Tekniği ile Üretim

Elektrofüzyon, hassas hücreler için daha kolay adapte edilebildiğinden insan monoklonal antikorlarının üretiminde kullanılan bir yöntemdir. Hibridoma çalışmaları füzyon aşamasında kullanılan PEG ile az sayıdaki hücreyle hızlı füzyon zor olmasına

rağmen, elektrofüzyon ile mümkündür. Elektrofüzyon süresince pronase- ve DNase- ile muamele edilen bağışık lenfositler ve myeloma hücreleri, 2:1 oranında inkübe edilir ve elektriksel uyarılara maruz bırakılır. Elektrofüzyon öncelikle bir dalgalı elektrik alanının (10kHz-1MHz) uygulamasıyla gerçekleşir. Bu elektriksel alan hücrelerin polarize olmasına ve yakın temastaki membranlarla “dizi zincirleri”nin oluşmasına sebep olur. Daha yüksek voltajda kısa uyarılar, membran kararsızlığına sebep olur ve komşu hücrelerin membranlarının kaynaşması ile füzyonu başlatır (Stacey, 2000).

2.4.2.2. SE'lere Karşı Monoklonal Antikor Üretimi

S. aureus tarafından üretilen enterotoksinler immün sistemde antijen olarak tanınmayarak spesifik olmayan T hücre proliferasyonunu uyaran fonksiyonlara sahip olmaları nedeniyle süperantijen (SAg) olarak adlandırılan yapı grubuna girerler. SAg'ler, immün sistemde antijen olarak tanınan yapılardan farklı bir işleyişe neden olurlar.

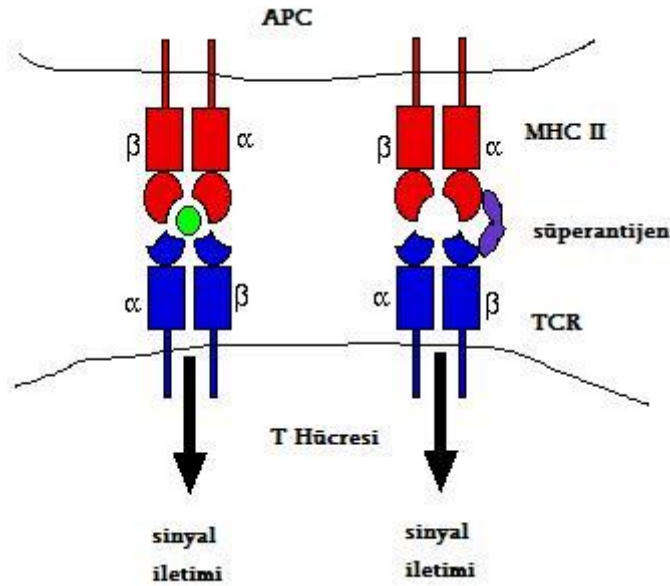
Klasik olarak organizmada reaktif immün cevap başlatabilen maddelere immünojen, immün cevap sonucunda kendisine karşı antikor oluşturabilen maddelere antijen adı verilir. Yabancı bir antijene karşı immün cevap oluşabilmesi için yardımcı T lenfositleri tarafından tanınması gerekir. T lenfositleri, TCR aracılığıyla etki gösterirler ve Major Histocompatibilite Complex'i (MHC) tanıyan moleküllerdir. Sitokin salınmasına neden olurlar ve letal sitotoksik efektör fonksiyonları vardır. Antijenler, antijen sunan hücreler (APC) aracılığıyla istirahat halindeki CD4 T lenfositlerine sunulur. İnsan TCR si, APC üzerindeki MHC class I (MHC I) veya class II (MHC II) molekülleri ile etkileşime girecek olan yabancı antijenleri tanırlar. MHC'nin bağlama kovukları ile etkileşime girecek olan yabancı peptit antijeninin insan TCR leri tarafından tanınması için TCR de hem teta hem de beta değişken (V) kısımlarının bulunması gerekir. SAg olarak adlandırılan yabancı büyük moleküllerse TCR'ler ile birbirinin reseptörü gibi davrandığından bu kurala uymazlar.

2.4.2.2.1. Süperantijenler

SAg terimini ilk kez White ve arkadaşları kullanmıştır. SAg'ler, antijen sunan hücreler üzerinde bulunan MHC class II'ye bağlanan ve konvansiyonel antijenlere göre daha düşük konsantrasyonlarda belirli TCR-V beta veya TCR-V gama sıraları taşıyan, T lenfositlerinin büyük bir kısmını stimule ederek T hücrelerini proliferasyona sevk edebilen antijenler olarak tanımlanmıştır. İmmün sistemin homeostazisinde belirgin değişimlere neden olurlar. Bilinen antijenlerden özel V beta gen segmentleri taşıyan çok sayıda T lenfositlerini selektif olarak çoğaltmaya sevk edebilme kapasitelerinin olması nedeniyle ayrılırlar. Pikomolar konsantrasyonlarda dahi etki göstererek interlökin-II, interferon gamma ve

tümör nekrotizan faktör dahil çok büyük miktarlarda sitokin salınmasını indüklerler. Spesifik T hücrelerinde aktivasyona, proliferasyona, anerji ve hücre ölümüne neden olabildiklerinden en güçlü T mitojenleri olarak kabul edilirler. Bakteriler, mikoplazmalar, retrovirüsler ve parazitler tarafından üretilirler.

Genel olarak bilinen antijenler MHC bağlanma yeri olan CDR 3 kısmına bağlanmaktadır. SAg'ler bilinen polipeptit antijenlerden farklı olarak MHC bağlanma yeri CDR 1 ve CDR 2 den uzak bir yerdeki TCR-V beta kangalının ayrı bir bölümüne bağlanır böylelikle intraselüler işlemde geçmeksizin selektif olarak ve yüksek afinite ile MHC class II moleküllerinin antijeni bağlandıkları kovukların dış yanına bağlanmış olurlar. TCR-Vbeta bölgesi ile reaksiyona girer. Şekil 2.4'te bilinen antijenler ve süperantijenlerin MHC II ile oluşturdukları bağlanma bölgeleri farklılıklarının şematik gösterimi ile bu durum özetlenmiştir. SAg'lerin yardımcı moleküller olmadan T lenfositlerini stimüle edip CD 4 ve CD 8 T lenfositlerinin proliferasyonunu uyarabilmeleri bu bağlanmadan kaynaklanmaktadır. Antijen sunan hücreler üzerindeki MHC class II süper antijen kompleksleri uygun TCR-V beta gen ürünleri taşıyan T lenfositlerinin proliferasyona sevk eder. Süperantijenlerin ölçümlere göre T lenfositlerinin stimülasyona cevap verme frekansını %5 ile %25 oranında arttırdığı tespit edilmiştir (Labrecque, 1993).



Şekil 2.4. Bilinen antijenler ve süperantijenlerin MHC II ile oluşturdukları bağlanma bölgeleri farklılıklarının şematik gösterimi

SAg'ler, MHC II ile oluşturdukları bu yapı nedeniyle, monoklonal antikor üretme çalışmaları kapsamında, farelere yapılan immünizasyonlar ile inaktif hale getirilmeleri için gerekli hümorale immünite oluşumunu sağlayamazlar (Hau, 2003). Bu nedenle SAg'lere karşı, monoklonal antikor üretme çalışmalarında immünizasyon işleminden önce hümorale yanıt oluşumunun sağlanması amacı ile çeşitli yöntemlerle süperantijenlerin MHC II ile oluşturdukları bu yapıyı bozabilecek modifikasyonları sağlanır.

2.4.2.2.1.1. Stafilotoksik Süperantijenler

SAg yapıdaki SE'ler, insanlarda ve deney hayvanlarında besin zehirlenmesi ve şoka neden olan *S. aureus*'ların sekrete ettiği stafilotoksik özellik gösteren proteinlerdir. *S. aureus* tarafından sentezlenerek dış ortama verilen toksinler etkilerini sindirim sistemlerinde gösterdiklerinden "enterotoksin" olarak adlandırılmıştır (Lubitz, 2005). Süt kontaminantları olarak sık karşılaşılan ve dünyada sorun teşkil eden stafilotoksik SAg'lerden SEB; biyolojik silah olarak kullanılabilmesi ve gerek ekonomi gerek sağlık alanındaki olumsuz etkileri nedeniyle önemli bir araştırma konusudur.

Stafilotoksik SAg'lerden olan SEB, dondurulmamış et, süt, süt ürünleri ve unlu mamüllerde üreyen, insan ve hayvanların deri ve mukozal membranlarında bulunan hareketsiz, gram pozitif kok morfolojisinde bir bakteri olan *S. aureus* tarafından sentezlenerek dış ortama verilir. Bu toksin geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahiptir ve giriş yoluna bağlı olarak (sindirim, solunum veya mukozal) farklı klinik sendromlara neden olmaktadır (Lubitz, 2005). SEB, iki farklı sıkı paketlenmiş domaine sahiptir ve SH gruplarının düzensiz bağlanması ile oluşan karışık bir üçüncül şekli vardır. Birçok disülfid köprüsü oluşumları içeren disülfid ilmeğine sahiptir. SEB'in bulaşımı sonucunda semptom olarak beliren kusmada, disülfid ilmeği'nin etkisi olduğu tahmin edilmektedir (Hovde, 1994). SEB, 28.494 Da moleköl ağırlığına sahiptir ve salınımını düzenleyen *entB* geninin kodlama bölümü yaklaşık 900 nükleotit içerir. SEB prekürsör proteinleri 267 aminoasitten (31,400 Da) oluşur ve 27 aminoasitlik N-terminal sinyal peptidini içine alır. Çizelge 2.1'de SEB'in aminoasit dizilimi gösterilmektedir. *S. aureus*'un klinik izolatları içinde SEB geninin kromozomal yapıda olduğu bildirilmektedir (Johns, 1988). SEB, parçalanmaya karşı dirençli, pH değişimine ve proteolitik sindirime dayanıklı olan bir SAg'dir (Fraser, 1993).

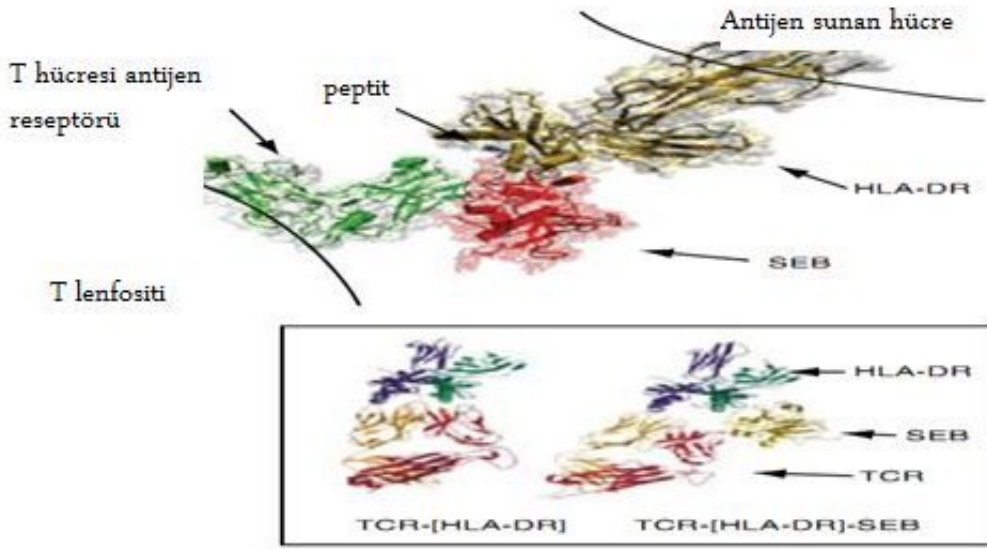
Çizelge 2.1. SEB'in aminoasit dizilimi (Johns, 1988)

	Aminoasit dizilimi
1	MKKLSTVİİİ LİLEİVFHNİ NYANSQPDPK İDELNKVSDY KSNKGTMGNV MNL YMSPPE
61	GRGVİNSRQF LSHDLİFPIE YKSYNEVKTE LENTELANNY KGKKVDİFGV PYFYTCİİPK
121	SEPDİNQNFG GCCMYGGLTF NSENERDKL İTVQVTİDNR QSLGFTİTTN KNMVTİQELD
181	YKARHWLTKE KKLYEFDGSA FESGYİKFE KNNTSFWFDL FPKKELVPFV PYKFLNİYGD
241	NKVVDSKSİK MEVFLNTH

SEB, MHC II'deki insan lökosit antijeni DR-1 (HLA-DR1) ile Kd'si 100-1000 nM olan bağlanma bölgesine sahiptir (Mollick, 1991, Fraser, 1992). Bu bölgede çeşitli aminoasitler bulunur ve SEB HLA-DR1 bağlanma bölgesini oluştururlar.

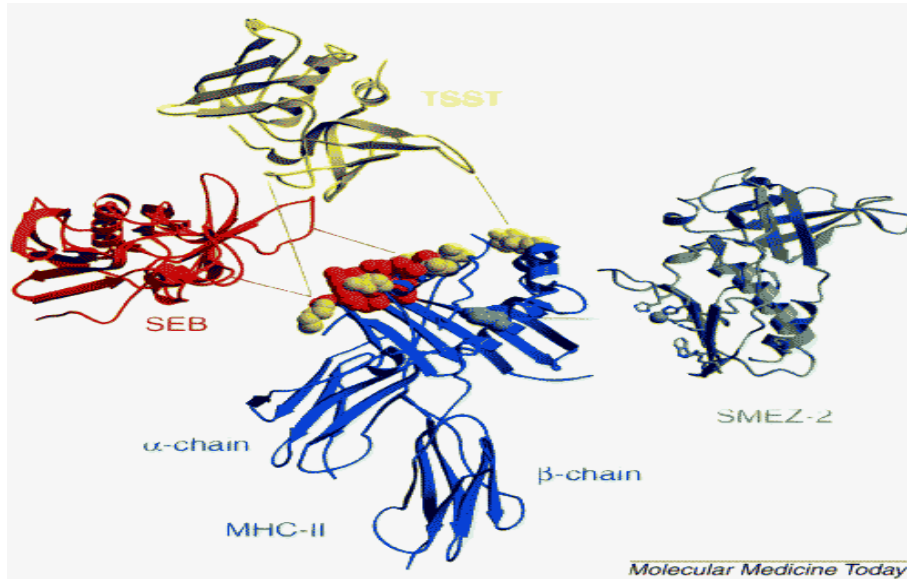
SEB'de etkileşime giren her aminoasit ve ona karşılık gelen uygun aminoasitler arasında farklı mesafeler söz konusudur. Bu bölgedeki SEB'e ait aminoasitler ve MHC'de karşılık gelen aminoasitler Van der Waals kuvveti, hidrojen bağı ve tuz köprüsü gibi çeşitli şekillerde etkileşime girerler. Bu etkileşimler, SEB'in SAğ olarak kararlılığında önemlidir. Örneğin SEB'deki Tyr 94 aminoasidi MHC II molekülü ile Van der Waals etkileşimi oluşturur. Kararlılığı sağlamakta rol oynayan bir etkileşim de, SEB'deki Glu 67'nin, MHC klas II'deki Lys 39 ile tuz köprüsü oluşturması sonucu oluşan yüksek bağlanma gücüdür (Schad, 1995).

SEB, konvansiyonel antijenlerden farklı olarak TCR beta kangalının ayrı bir bölümüne bağlanır ve TCR beta bölgesi ile reaksiyona girer. İntraselüler işlemde geçmeksizin selektif olarak ve yüksek afinite ile MHC class II moleküllerinin antijene bağlandıkları kovukların dış yanına bağlanırlar. Şekil 2.5'de SEB ve HLA DR ile oluşturduğu kompozisyonun gösterimi ile bu durum özetlenmiştir.



Şekil 2.5. SEB'in HLA DR ile oluşturduğu kompozisyonun gösterimi (Ulrich, 1995)

MHC II, ekstraselüler ve SEB'in bağlandığı intraselüler bölgeden oluşur. SEB, farklı bağlanma bölgeleri bulunan MHC II ile etkileşime gireceği bölgeye, insandaki HLA-DR1 molekülünün basit translasyonu ile taşınır (Fraser, 1993). Şekil 2.6'da, SEB ve MHC II'nin etkileşim bölgeleri belirtilerek bu durum özetlenmiştir. MHC II molekülünde maviyle gösterilen yer ekstraselüler kısım, kırmızı ile gösterilen yer ise SEB ile etkileşimde olan kısımdır.



Şekil 2.6. SEB ve MHC II etkileşim bölgelerinin gösterimi

2.4.2.2.2. Süperantijenlere Karşı İmmün Yanıt Oluşumu

Yaygın olarak ifade edilen antijenlerden farklı olarak süperantijenik enteretoksinler, APC'ler tarafından küçük peptid parçalarına ayrılmadan MHC sınıf II moleküllerine bağlanarak TCR ile bir trimoleküler form oluşturduklarından kendilerine karşı hümmoral yanıt oluşumu baskılanabilmektedir (Munson, 1998). SEB'in MHC II'ye ve TCR'ye bağlanan kısımları ve bu interaksiyon için önemli olan aminoasitler kristalografik, sentetik peptid ve genetik mutasyon çalışmaları ile detaylı olarak araştırılmıştır (Jett, 1994). Bu çalışmada bilinen antijenlerinkinden farklı olması nedeniyle SEB'e karşı hümmoral yanıt oluşumunu sağlamak için, anti-SEB'e antikorları tarafından tanınabilecek epitoplari fazla etkilemeden, SEB'in TCR ve MHC II'ye bağlanmasında önemli olan konformasyonel yapıyı bozacak şekilde proteinin yapısal olarak değiştirilmesi öngörülmektedir. Teorik olarak bu sayede, proteinin MHC sınıf II moleküllerine bağlanmasının önleneyeği ve APC'ler tarafından işlendikten sonra sunulabileceği ve SEB'e karşı immün hümmoral yanıt oluşumunun sağlanabileceği düşünölmektedir. Ancak diğer taraftan yapısal değişikliğe uğratılmış SEB ile immünize edilen farelerden elde edilecek antikorların nativ SEB'i tanıması önemli olduğu için modifikasyonların bunu engellemeyecek düzeyde sınırlı olması gerekmektedir.

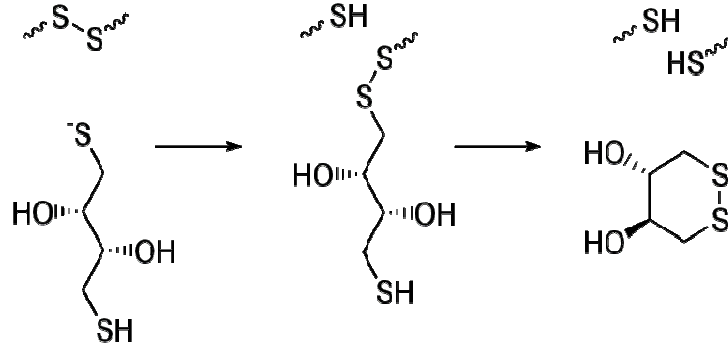
2.4.2.2.3. SEB'in Modifikasyonu

Protein yapıdaki SEB'de, indirgeme ve katyonizasyon yöntemleri kullanılarak yapısal değişiklik sağlanmıştir. Proteolitik enzimler veya kimyasallar kullanılarak MHC II ile SEB etkileşimini değiştirecek nitelikte, ama sınırlı düzeyde toksinin parçalanması, bir yandan immünojenitesi için gerekli moleküler büyüklüğün saklı kalmasını, diğer yandan MHC II ile etkileşimini bozarak hümmoral immün yanıt oluşumu sağlanabilecektir.

SEB'in İndirgenmesi:

SEB, iki farklı sıkı paketlenmiş domaine sahiptir ve SH gruplarının düzensiz bağlanması ile oluşan karışık bir üçüncül yapısı vardır. Bu sıkı yapısından dolayı intestinal lümende bulunan; proteaz, tripsin, kimotripsin ve papaine karşı direnci büyüktür. Bu direnci kırmak için proteinin disülfid bağlarının indirgenmesine yönelik çeşitli çalışmalar mevcuttur (Papageorgiou, 1998). Bizim çalışmamızda SEB'in modifikasyonu için ayrıca kimyasal ajan olarak dithiothreitol (DTT), DTT-guanidin HCl, cyanogen bromide (CnBr) ve proteolitik enzim olarak papain kullanılmıştir.

DTT: Suda çözünebilir bir reaktif olan DTT, proteindeki disülfid bağlarını alkilasyona uğratarak ayırır, indirger. Şekil 2.7’de DTT’nin iki triol disülfid değişimi reaksiyonu yolu ile tipik disülfid bağı indirgemesi gösterilmektedir (Konigsberg, 1972).

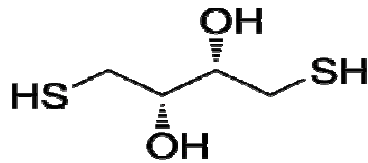


Şekil 2.7. DTT’nin iki triol disülfid değişimi reaksiyonu yolu ile tipik disülfid bağı indirgemesi

Çizelge 2.2’de Disülfid bağlarının nicel olarak azalmasını sağlayan DTT’nin nicel ve nitel özellikleri, Şekil 2.8’de ise DTT’nin moleküler yapısı gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. DTT’nin nicel ve nitel özelliklerinin ifadesi

Moleküler formülü	C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂
Molekül ağırlığı	154.25 g mol ⁻¹
Görüntüsü	Beyaz akışkan
Erime noktası	42-43 °C
Kaynama noktası	125-130 °C (2 mmH’da)



Şekil 2.8. Dithiothreitol

DTT, disülfid karşılıklı değiş tokuş reaksiyonlarına katılır (Zhang, 1988). Biyolojik membranlardan kolaylıkla geçer. Özellikle enzim varlığında oluşacak olan enzimatik parçalanmaya kolaylık sağlar (Klonne, 1988). DTT, protein S-S indirgenmesi için klasik olarak 1-10 mM konsantrasyonlarında kullanılır.

DTT, biyokimyasal uygulamalarda biyomoleküllerin sülfidril gruplarını indirgen halde tamamen muhafaza eder, disülfidlerin, sülfidril oluşturmak üzere miktarını azaltır, ayrıca protein yapı ve fonksiyon çalışmaları kapsamında yapılan analizlerde proteinleri indirger (Kaji, 1993; Gailis, 1994).

SH bağları ile düzensiz bir şekilde bağlı üçüncül yapıya sahip olan SEB'deki protein zincirleri arasında kuvvetli S-S, S-H bağları oluşur ve bu yapı zincirler arasına su moleküllerinin girmesini önler ayrıca termik stabilitelelerini artırarak çok sağlam yapılar oluşturmalarını sağlar. SEB, 19 rezidülden oluşan disülfid ilmeği içerir ve bu ilmek, proteine esneklik sağlar. DTT, sistein aminoasitini indirgeyerek bu molekülün hem kendi içinde hem de diğer aminoasitlerle oluşturabileceği S-S bağları ile etkileşime girmesini engeller.

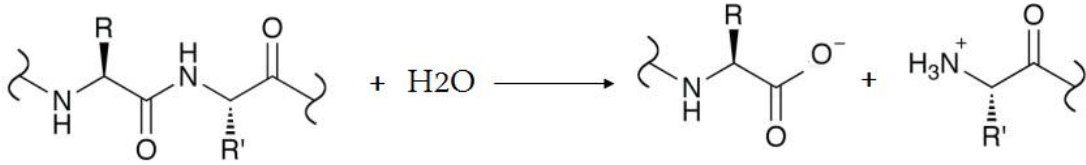
SEB'in DTT ile modifikasyonunda, SEB'deki sistein aminoasitlerinin arasında ve disülfid ilmekte varolan disülfid bağlarının parçalanmasıyla, SEB'in MHC II ile oluşturduğu kompozisyonun değiştirilmesi ve anti SEB aktivitesi alınması ümit edilmektedir. SEB'deki Glu 67 ile MHC II'deki Lys 39 aminoasitlerinin etkileşimi sonucu oluşan ve SEB ile MHC II kompozisyonuna yüksek kararlılık sağlayan tuz köprüsünün de bu yolla engellenebileceği düşünülmüştür.

DTT-Guanidin HCl: Guanidin HCl'nin SEB proteini ile etkileşimi halinde proteine ikincil yapı özelliğini kazandıran nonkovalent etkileşimlerin ortadan kaldırılması, proteinde sadece birincil yapıya has olan kovalent etkileşimlerin kalması beklenir. Böylece DTT ile etkileşimi sonucunda disülfid bağların alkilasyonu ve ayrılması sonucu konformasyonu değişmeden indirgenmiş olan proteinin Guanidin HCl ile daha basit bir yapı kazanması sağlanır (Park, 2001). Bu indirgenme kaynaklanan değişime bağlı elde edilen anti SEB (indirgenmiş SEB) antikollarının nativ SEB ile reaktif olup olmayacağını karakterize edilmesi gereği kaçınılmazdır.

Papain (papaya proteinase): Papain, papaya proteinase olarak bilinen proteolitik bir enzimdir. Endopeptidases, aminopeptidases, dipeptidyl peptidase gibi çeşitli aktivitelere sahiptir (Rawlings, 1994). Proteinleri, peptid bağlarını ayırarak küçük polipeptit ve/veya aminoasit haline getirerek indirger. Şekil 2.9'da papainin polipeptit fragmentlere ayrılması gösterilmektedir.

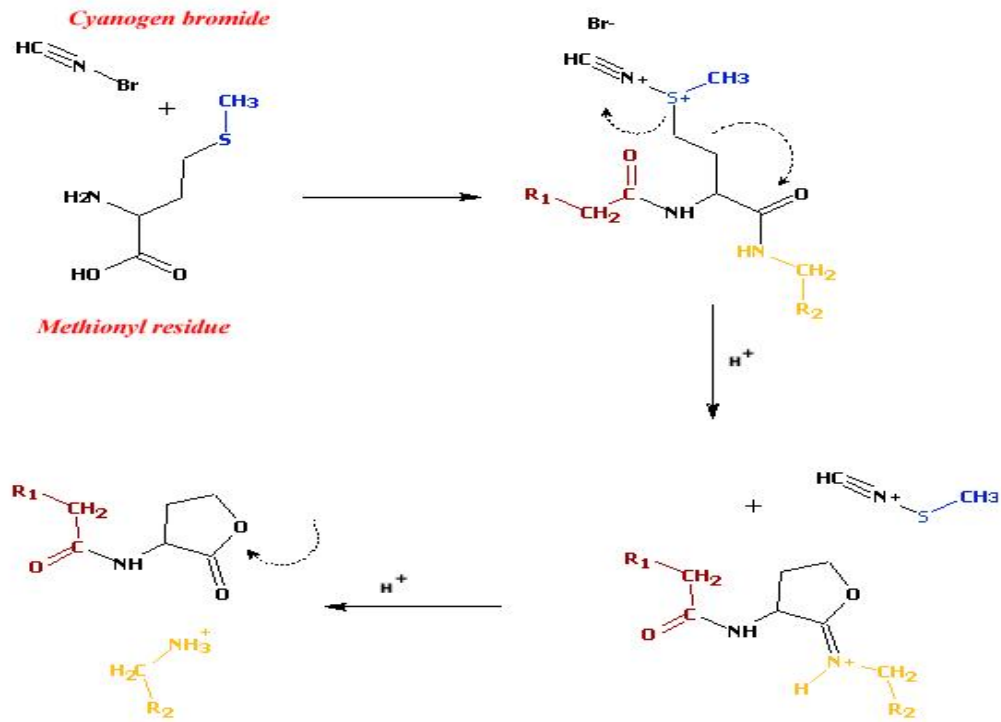
SEB'deki; Glu 67, Asp 209, Glu 67, Try 89, Ser 96 aminoasitleri sırası ile MHC II'deki; Lys 39, Gln 57, Lys 39, Lys 39, Ala 64 aminoasitleri ile etkileşime girerek SEB ve MHC II arasındaki bağlantı bölgesini oluşturur (Stuart, 1979). Papainin, SEB'in yapısındaki aminoasitler arası disülfid bağlarını indirgeyerek SEB'in MHC II ile

oluşturduğu bağlantı bölgesine etki etmesi beklenir. Doğal (native) papain, indirgeyici etkisini 8 M üre içinde gösterir. Bu işlemin gerçekleşmesi spesifik bir disülfid bağın açılmasını gerektirir (Shapira, 1968).



Şekil 2.9. Papain'in polipeptit fragmentlere ayrılması

CnBr: CnBr, proteinleri metionin rezidüllerinin C terminal ucundaki peptit bağlarını hidroliz ederek parçalar ve proteinler indirgenir. Şekil 2.10'da, CnBr ile gerçekleştirilen protein indirgenmesi gösterilmektedir. SEB'in yapısında 9 tane metionin aminoasiti bulunduğu için, CnBr'ün, SEB'de metionin aminoasiti barındıran bu bölgelere etki etmesi beklenir. Çalışmada CnBr'ün, SEB'deki methionin aminoasiti içeren rezidürlere (MHC II'ye bağlanacak olan) etki etmesi umut edilmiştir.



Şekil 2.10. Cyanogen bromide ile protein indirgenmesi (Proteinchemist, 2003)

SEB Katyonizasyonu:

SEB'in yapısal değişikliğe uğratarak immün sistemde işlenmesini ve hümorale yanıt sağlanmasını mümkün kılmak üzere farklı bir yaklaşım olarak katyonizasyon yöntemi uygulanması tasarlanmıştır. Katyonizasyon, taşıyıcı proteinde bulunan B hücre epitoplalarının çoğunu korurken, baskılayıcı T hücre indüksiyonu için gerekli determinantları yıkmakta, böylece proteinin APC'ler tarafından alınmasını kolaylaştırmaktadır (Muckerheide, 1990, Michael, 1991, Apple, 1988). Katyonizasyon amino asitlerin yan zincirlerinin yanı sıra SEB'in pI değerini ve komformasyonunu da değiştirmesi beklenmiştir. SEB modifikasyonunda ele alınan bu yaklaşım ile pozitif yüklü proteinlerin immün sistemi daha güçlü uyarmaları dikkate alınmıştır (Apple, 1988). SEB'de radikal grubu COOH içeren; 24 tane aspartik asit ve 12 tane glutamik asit olmak üzere toplam 36 tane COOH içeren asidik aminoasit mevcuttur. SEB radikal grubunda COOH bulunan aminoasitlerinin bu bölgeleri, katyonizasyon işlemi ile amin grubuna çevirerek MHC II'ye bağlanacak kritik bölgelerin değiştirilmesi umut edilmiştir. Ancak diğer modifikasyon yöntemlerinde olduğu gibi katyonize SEB'e karşı geliştirilecek olan antikorların sütteki nativ SEB'i tanınması için gerekli olan epitoplarn bozulması ihtimaline bağlı olarak elde edilecek immün yanıtın ve antikorların bu açıdan karakterize edilmeleri gereği bulunmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

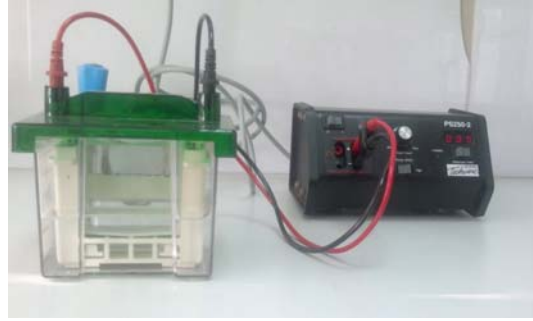
3.1. GEREÇLER

Bu tez çalışmasında temel olarak protein yapısındaki SEB molekülünün modifikasyonu, humoral yanıt oluşumunun kontrolü için farelere enjeksiyonu, immunize farelerin serumlarında SEB spesifik antikor yanıtının kontrolü gerçekleştirilmiştir. SEB protein modifikasyonu için, moleküler ve biyokimyasal çalışmaların yapıldığı bir laboratuvar, farelerin barınması için hayvan geliştirme ünitesi ve hücre kültür çalışmaları için steril kültür odası kullanılmıştır.

3.1.1. Laboratuvarda Kullanılan Cihazlar

3.1.1.1. Elektroforedde Kullanılanlar

Poliakrilamid Jel Elektforez Sistemi (PAGE): Çalışmamızda proteinleri ve modifiye protein fragmentlerini molekül ağırlığına göre ayırmak amacıyla “SIGMA” marka güç kaynağı ve “Bio-Rad” marka Jel elektforezi aygıtından oluşan PAGE sistemi kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. PAGE sistemi (SİGMA, Bio-Rad)

3.1.1.2. ELISA'da Kullanılanlar

ELISA Okuyucu: ELISA sonuçlarının sayısal olarak değerlendirilmesi için “Bio Rad Model 3550” marka ELISA okuyucu kullanılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. ELISA okuyucu (Bio Rad)

ELISA Yıkama Ünitesi: Platelere; antijen çözeltisi ile gece boyu inkübe edilmesi, kazein/süt tozu ile kaplama işlemi ve hibridoma üst sıvısı (antikor) kaplanması aşamaları arasında 3 kez, antimouse polivalent konjugat kullanımından sonra 5 kez PBS-TWEEN 20 yıkama tamponu ile yıkanması işleminde, laboratuvarımızda bulunan ELISA yıkama ünitesi kullanılmıştır. Bu ünite; 1000 ml yıkama tamponu alma kapasitesine sahip olan erlen, “Nunc” marka plate yıkama aparatı ve yıkanan plate sırasında oluşan atık suyun depolanmasını sağlayan 750 ml sıvı alma kapasitesine sahip olan erlen bulunmaktadır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. ELISA yıkama ünitesi

Spektrofotometre: Işık kaynağı olan spektrometre ve ışık detektörü olan fotometreden ibaret olan spektrofotometre prensibi hazırlanan çözeltiden belirli spektrumlarda ışık geçirilmesi ve bu ışığın ne kadarının çözelti tarafından absorblandığını bulması esasına dayanır. Çözeltinin içinden geçebilen (çözelti tarafından absorblanmayan) ışığın yoğunluğu tespit ederek çözelti içeriğindeki aranan maddenin miktarı hakkında verdiği kantitatif bilgiye dayalı olarak, hazırlanan çözeltilerdeki madde miktarı hakkında bilgi edinmek için çalışmalarımızda “Bio-Rad” marka spektrofotometre kullanılmıştır.

Magnetik Karıştırıcı: Çözeltilerin kendi içinde homojen olarak dağılmasını sağlamak amacıyla “Cole Parmer” marka magnetik karıştırıcı kullanılmıştır (şekil 3.4).



Şekil 3.4. Magnetik karıştırıcı (Cole Parmer)

Vorteks: Çözeltilerin kendi içinde homojen olarak dağılmasını sağlamak amacıyla tüplerdeki küçük miktarda örnekleri karıştırmak için “Scientific Endustries” marka vorteks kullanılmıştır (şekil 3.5).



Şekil 3.5. Vorteks (Scientific Industries)

pH Metre: Tamponların pH'ı, “Inolab” marka pH metre kullanılarak ayarlanmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. pH metre (Inolab)

Derin Dondurucu ve Buzdolabı: Kültür medyumları, antibiyotik vb. 1 aya kadar +4°C buzdolapları, fetal sığır serumu (FCS), SEB ve SEA -20°C’de saklanmıştır. Hücrelerin dondurulması sırasında -70°C 24-48 saat saklamalarda, ve ayrıca -196°C “Union Carbide Nitrogen Tanks” marka sıvı azot tankları uzun süreli dondurmalarda kullanılmıştır.

Su banyosu: FCS inaktivasyonu için 37°C “Scientific” marka su banyosu kullanılmıştır (şekil 3.7).



Şekil 3.7. Su banyosu (Scientific)

Otomatik Pipetler: Akışkan madde aktarımı amacı ile 1000, 200, 100 ve 10 µl’lik pipetler ve 300 µl’lik multipipetler kullanılmıştır (şekil 3.8). Kullanılan pipetlerin markası “Eppendorf Research” tır.



Şekil 3.8. Pipetler (Eppendorf)

3.1.2. Laboratuvarda Kullanılan Sarf Malzemeler

3.1.2.1. Steril, Tek Kullanımlık Malzemeler

ELISA Plakları: Çalışmamızda ELISA “Nunc” ve “TPP Company” marka kültür kapları kullanılmıştır.

Pipetler: Çalışmamızda 1000, 200, 100 ve 10 µl’lik pipetler ve 300 µl’lik multipipetler “Eppendorf research” marka pipetler, hüce kültürü çalışmaları boyunca özellikle füzyon aşamasında 5 ve 25 mm’lik “Eppendorf” marka tek kullanımlık pipetler kullanılmıştır.

Cam Şişe: Çalışmalar süresince gerekli olan solüsyonlar “Schott” marka 50-1000 cc’lik otoklavlanabilir cam şişede saklanmıştır.

3.1.2.2. Kimyasallar

3.1.2.2.1. SEB Modifikasyonunda Kullanılan Kimyasallar

İndirgenme Çalışmalarında;

1. Çalışmamızda, SEB’in indirgenmesini sağlamak amacı ile bu kesim ajanları kullanılmıştır;

DTT; Fermentas, R0862

Papain; PIERCE, 20341

CnBr; Sigma, C9142

2. Guanidin HCl; Sigma, G4630

3. SEB; Sigma, S4881

4. Sodyum klorid; Merck, 1.06404.1000

5. Sodyum azide; Merck, 1.06688.0100

6. Formik asit; Sigma, F0507

7. Sodyum hidroksit; Merck, 1.06462.1000

8. MgCl₂; Sigma, 8266

9. Glikoz; Sigma, G7528
10. Iodoacetamine (IAA); Sigma, I1149
11. Trifluoroacetic acid (TFA); Sigma, T6508
12. Tris; Sigma, T6066

Katyonizasyon Çalışmalarında;

1. SEB; Sigma, S4881
2. Ethylenediamine A (EDA); Fluka, 39391
3. 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimide hydrochloride (EDC); Aldrich, 39391
4. MES; Acros Organics, 274140500
5. 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS); Fluka, 92822
6. NaHCO₃; Sigma, S5761
7. Glisin; Sigma, G5417
8. HCl; Carlo Erba, 403272

3.1.2.2.2. Elektroforez Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar

1. N, N, N', N'-tetrametil etilenamid (TEMED); Sigma, T7024/ BIO-RAD, 161-0801
2. Tris; Sigma, T6066
3. Bisakrilamit; BIO-RAD, 161-0201
4. Acrylamide; BIO-RAD, 161-0107
5. Comassie Brilliantblau G250; AppliChem, A3480,0025
6. Amonyum persulfat; BIO-RAD, 161- 0700/Sigma, A3678
7. İsopropil alkol; Carlo Eiba, 309505
8. %30 Acrylamide; BIO-RAD, 161-0107
9. Methanol; Riedldeflan, 24229/Merck, 1.06008.2500
10. Ethanol; Merck, 1.00986.2500/Roche, 04883560001
11. Glisin; Sigma, G5417
12. HCl; Carlo Erba, 403272
13. NaCl; Merck, 106400
14. Sodyum azide; Merck, 1.06688.0100
15. Formaldehit; Merck, 1.04003.2500
16. Sodyum karbonat; Fluka, 9830
17. AgNO₃; Sigma, S7276
18. Na₂S₂O₃; Merck, 109147
19. Asetik asit; Merck, 100063
20. MgCl₂; Sigma, M8266

21. Sodium dodesil sülphate (SDS); Sigma, L4390
22. Gliserol; Sigma, G8773
23. Bromphenolblau; Fluka, 18030
24. 2-Merkaptoetanol; Sigma, M6250
25. Asetik asit; Merck, 100063
26. Beta metionin (β Met); Sigma, 01310
27. Tris; Sigma, T6066
28. Bovine Serum Albumin (BSA); Sigma, D5648
29. Ovalbumin; Sigma, A6075
30. Marker; BIO-RAD, 161-0318/BIO-RAD, 161-0305
31. SEB; Sigma, S4881

3.1.2.2.3. ELISA Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar

1. Anti-mouse polyvalent immunoglobulins (IgG-IgM-IgA) alkalin fosfat konjugat; Sigma, 0162
2. Complete Freund adjuvant (CFA); Sigma, F5881
3. Incomplete Freund Adjuvant (IFA); Sigma, F5506
4. Bovine Serum Albumin (BSA); Sigma, B2518
5. Skim Milk Powder; Fluka, 70166
6. Kazein; Sigma, C5679
7. Antimouse polyvalent; Sigma, A0162
8. Antimouse IgG; Ap Sigma, A3438
9. Para nitrophenyl phosphate (PNPP); Merck, N3254
10. K_2HPO_4 ; Ridel, Rh-04248
11. KH_2PO_4 ; Merck, 1.04873.1000
12. Glisin; Sigma, G8898
13. Tween 20; Sigma, P2287
14. SEB; Sigma, S4881
15. SEA; Sigma, S9399
16. NaCl; Merck, 1.06404.1000
17. KOH; Sigma, P5958
18. Sitrik asit; Sigma, 251275
19. Glukoz; Sigma, G8270
20. Sodium sitrat; Sigma, S4641
21. Fosfat tamponu; Sigma, P3813

22. ZnCl₂; Sigma, Z0173

3.1.2.3. Çözeltiler

3.1.2.3.1. SEB Modifikasyonunda Kullanılan Çözeltiler

İndirgenme Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler;

DTT ile İndirgenmede Kullanılan Çözeltiler;

DTT: 1,55 mg DTT, 100 µl dH₂O'da çözündürüldü.

SEB: 1 mg SEB, 1 ml 50 mM Tris-HCl (pH:7.0) içinde çözündürüldü.

DTT-Guanidin HCl ile İndirgenmede Kullanılan Çözeltiler;

İndirgenme tamponu: 0,15 gr DTT, 0,95 gr guanidin HCl, 0,4 gr NaOH, 10 ml dH₂O'da çözülerek hazırlandı.

SEB: 50 mM Tris-HCl (pH:7.0) içindeki 10 µl SEB (1 µg) üzerine 10 µl indirgenme tamponu eklendi.

Papain ile İndirgenme Kullanılan Çözeltiler;

Papain: 250 µg/ml immobilize stok papain çözeltisi.

SEB: 1 mg SEB, 1 ml 50 mM Tris-HCl (pH:7.0) içinde çözündürüldü.

CnBr ile İndirgenmede Kullanılan Çözeltiler;

Formik asit: %85'lik 100 µl formik asit

SEB: 1 mg SEB, 100 µl formik asit içinde çözündürüldü. Bundan 27 µl alındı üzerine 540 µg CnBr eklendi.

Reaksiyon Durdurma Çözeltileri:

TFA: 4 ml TFA, 96 ml dH₂O'ya eklenerek %4 TFA içeren stok oluşturuldu.

IAA: 5,6 mg IAA, 150 µl dH₂O'da çözülerek stok oluşturuldu.

Katyonizasyon Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler;

EDA-MES Tamponu: 97,5 µg MES 4 ml suda çözündürüldü, pH'ı 4,75'e ayarlandı (0,1 M MES). Su ile 5 ml'ye tamamlandıktan sonra 5 ml MES tamponuna 670 µl EDA eklendi. Bu çözelti kullanılırken protein konsantrasyonuna göre miktarı ayarlandı (360 µg SEB için 70.5 µl).

TNBS Çözeltisi: 95 ml dH₂O'ya 5 ml TNBS eklenerek %5 TNBS içeren stok çözelti hazırlandı.

NaHCO₃ Tamponu: 0,42 gr NaHCO₃ tartıldı, 50 ml distile suda çözülerek 0.1 M NaHCO₃ hazırlandı, HCl ile pH'ı 8.5'e ayarlandı.

3.1.2.3.2. Elektroforezde Kullanılan Çözeltiler

Yürütme Çözeltisi: Çözelti, 192 mM Glisin, %0.1 SDS, pH:8.olacak şekilde;

372.1 gr glisin, 15 gr tris, 5 gr SDS 500 ml distile suda çözüldürüldü, HCl ile çözeltilinin pH'ı 8.3'e ayarlandı. +4°C'de saklandı. Kullanılacağı zaman, oda sıcaklığına ulaştığında distile su ile 10 kat seyreltildi.

2 X Yükleme Çözeltisi: pH'ı 6.8 olan 1 M Tris-HCl'den 500 µl alındı. Üzerine 0,2 gr SDS ve 500 µl β met, 1,16 ml gliserol, 1 mg brom fenol blue eklendi. dH₂O ile 10 ml'ye tamamlandı. Kullanılacağı zaman, oda sıcaklığına ulaştığında örnek ile 1:1 oranında (v/v) karıştırılarak kullanıldı.

Tris-HCl Çözeltisi: 50 Mm Tris-HCl tamponu için 0,1 M NaCl, 1mM MgCl₂ ve %0,1 Sodyum azid (w/v) (200ml)'de çözüldü. HCl ile pH'ı 8 olacak şekilde ayarlandı ve dH₂O ile 200 ml'ye tamamlandı.

Jel Boyama (Gümüş Boyama) Tamponları:

Sabitleyici Tampon: %50 metanol, %12 asetik asit, 0.5 ml %37 oranında formaldehit karışımından oluşur.

Yıkama Çözeltisi: %50 EtOH

Ön Muamale Çözeltisi: Na₂S₂O₃.5H₂O (0.2gr/l)

Bant Sabitleme Çözeltisi: AgNO₃ (2gr/l), 0.75 ml %37 formaldehit.

Geliştirme Çözeltisi: Na₂CO₃ (60gr/L), 0.5 ml %37 formaldehit, Na₂S₂O₃.5H₂O (4 mg/l)

Durdurma Çözeltisi: %50 metanol ve %12 asetik asit (Yücel, Öztürk, Başalp, Akçael, 2007).

Örnek Yükleme Çözeltisi: 500 µl 62.5 mM Tris-HCl (Ph:6.8)'ye, %2 sodyumdedosil sülfat (SDS), %20 gliserol, %5 β merkaptotanol %0.01 brom fenol blue eklenerek hazırlandı.

3.1.2.3.3. ELISA Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

50 X PBS çözeltisi: 500 mM K₂HPO₄ 400 ml (baz) ve 500 mM KH₂PO₄ 200 ml (asit) hazırlandı, 400 ml 500 mM K₂HPO₄ üzerine, pH 7.2'ye gelinceye kadar KH₂PO₄ ilave edildi. Buzdolabında en fazla 1 ay saklandı. Kullanılırken 10 mM olacak şekilde 50 kat seyreltildi ve 0.15 M NaCl ilave edildi.

Bloklama Çözeltisi: 10 mM fosfat tamponu (PBS) içine %1 oranında süt tozu veya bovine serum albumine (BSA) karıştırılarak hazırlandı.

Substrat Çözeltisi: 1 mM ZnCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.1 M glisin, 5 M KOH içerecek şekilde hazırlanan çözeltilinin pH'ı 10.4'e ayarlandı. Kullanılırken 1 mg/ml olacak şekilde PNPP ilave edilerek, birkaç dakika içinde kullanıldı.

Yıkama çözeltisi: Fosfat tamponuna %0,05 Tween 20 eklenerek +4°C'de 4 haftaya kadar saklandı.

Anti-koagulant: 2.3 gr sodium sitrat, 0.8 gr sitrik asit, 2.2 gr glukoz 100 ml dH₂O'da çözüldü. Stok olarak 50'şer µl'lik küçük hacimlere bölünerek -20°C'de, 1 sene saklandı.

3.1.3. Diğer Laboratuvar Gereçleri

Çalışmalarımız süresince SDS-PAGE sonrası boyama, yıkama işlemi sırasında petri kabına koyarak çalkalayıcıya koyduğumuz jelin sıçramasını engellemek için stretch film; malzemeleri otoklavlarırken kullandığımız alüminyum folyo; tüplere koyduğumuz toksin gibi akışkan maddelerin buzdolabında saklanması sırasında uçmasını engellemek için parafilm; western blot'da membran ile jel transfer aşamasında dolgu maddesi olarak strafor gibi malzemelerden yararlanılmıştır.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. SEB Modifikasyonu

SEB'e karşı antikor üretimi amacıyla, SEB'in immünojenitesinin artırılması için MHC II ve TCR ile oluşturduğu üçlü kompleks oluşumunu engelleyecek yöntemlerle konformasyonel yapısı değiştirildi. SEB modifikasyonu ya DTT, DTT-Guanidine HCl papain, CnBr ile indirgenerek veya katyonizasyon ile amin gruplarının sayısı artırılarak sağlandı. Modifikasyonda kullanılan yöntemler aşağıda belirtilmektedir.

3.2.1.1. SEB'in İndirgenmesi

SEB'in indirgenmesi için, DTT, DTT-Guanidin HCL, papain, CnBr ile disülfid köprülerini etkileyecek yöntemler kullanıldı.

3.2.1.1.1. SEB'in DTT ile İndirgenmesi

SEB'in DTT ile indirgenmesi için oluşturulan deney düzenindeki şartlar çizelge 3.1'de belirtilmektedir. DTT ve SEB çizelgede belirtilen miktar ve koşullarda hazırlanarak inkübe edildi.

Çizelge 3.1. SEB'in DTT ile indirgenmesi

DTT (1,55 mg/100 µl)	SEB (1 mg/ml)	Tris-HCl (50mM,pH:7.0)	İnkübasyon sıcaklığı	İnkübasyon süresi	IAA
1,8 µl	20 µl	9,2 µl	60°C	15 dk	2,18 µl

3.2.1.1.2. SEB'in DTT-Guanidin HCl ile İndirgenmesi

SEB'in indirgenmesinde, proteindeki hidrofobik aminoasitlerin çözünürlüğünü artırarak hidrofobik etkileşimin ve H bağlarının bozulmasını sağlayan guanidin HCl ile S-S, S-H bağlarının ayrılmasını sağlayan DTT karışımı kullanıldı.

SEB'in indirgenmesi için optimal reaksiyon şartları aşağıdaki gibi optimize edildi;

Stoklar:

SEB: 1µg/µl (50 mM Tris-HCl, pH:7 içinde)

DTT- Guanidin HCl: 0, 97 M DTT, 0,001 M guanidin HCl, 0,01 M NaOH, 10 ml dH₂O'da çözülerek hazırlandı.

TFA: %4'lük stok

10 µg SEB çözeltisi üzerine 10 µl indirgeme tamponu (DTT- Guanidin HCl) eklenerek, oda sıcaklığında ve 37°C sıcaklıkta 8 farklı sürede (5, 10, 15, 30, 60, 90, 120,

150 dakika) inkübe edildi. İnkübasyonlar sonunda her bir örneğe 20 µl TFA eklenerek reaksiyonlar durduruldu. Deney düzeni çizelge 3.2’de belirtilmektedir.

Çizelge 3.2. SEB’in DTT-Guanidin HCl ile İndirgenmesi

SEB (µl)	DTT- Guanidin HCl (µl)	İnkübasyon (dk)		TFA (µl)
		37°C’de	Oda sıcaklığı’nda	
10	10	5	5	20
10	10	10	10	20
10	10	15	15	20
10	10	30	30	20
10	10	60	60	20
10	10	90	90	20
10	10	120	120	20
10	10	150	150	20

3.2.1.1.3. SEB’in Papain ile İndirgenmesi

Endopeptidases, aminopeptidases, dipeptidyl peptidase gibi aktivitelere sahip olan papain kesim ajanı, SEB’in yapısındaki aminoasitler arası disülfid bağlarının ayrılması, sınırlı düzeyde indirgenmesi için yöntem aşağıdaki gibi uygulandı;

Stoklar:

Papain: 250 µg/ml immobilize papain

Tris-HCl: 50 mM Tris-HCl pH’ı 7

SEB: 1 mg/ml

kullanıldı. SEB’in papain ile indirgenme şartlarının optimize edilmesi için çizelge 3.3’de belirtildiği şekilde deney planı oluşturuldu.

Çizelgede belirtildiği şekilde 20 µg SEB üzerine farklı konsantrasyonlarda papain eklenerek 37°C’de 60 dk inkübe edildikten sonra, karışımlar 2500 rpm’de santrifüj edilerek reaksiyon durduruldu. İmmobilize (agaroz immobilize) papain kullanıldığı için inkübasyon sonucunda örnekler 2500 rpm’de santrifüj edilerek papainden kurtarıldı ve üst kısım elektroforetik olarak incelendi.

Çizelge 3.3. SEB'in papain ile indirgenmesi

Örnekler	SEB (µl)	Papain (µl)	Tris-HCl (µl)	İnkübasyon sıcaklığı (°C)	İnkübasyon süresi (dk)	Reaksiyon Durdurma
1.Tüp	20	0	10	37	60	2500 rpm'de santrifüj
2.Tüp	20	0,8	9,2			
3. Tüp	20	2	8			
4. Tüp	20	4	6			
5. Tüp	20	8	2			

3.2.1.1.4. SEB'in CnBr ile İndirgenmesi

CnBr kesim ajanının SEB'de metionin aminoasiti barındıran bölgelere etki etmesi beklenmiştir. SEB'in CnBr ile indirgenmesi için reaksiyon koşulları çizelge 3.4'de belirtilmektedir.

Stoklar:

SEB: 100 µl formik asit içinde çözündürülmüş 1 mg SEB'den (1mg/100 µl) 27 µl alındı.

CnBr: 540 µg

Formik asit: 100 µl

Çizelge 3.4. SEB'in CnBr ile indirgenmesi

SEB (µg)	Formik Asit (µl)	CnBr (µg)	İnkübasyon (°C)	İnkübasyon (dk)	Örnek (µl)	Reaksiyon Durdurma (H ₂ O, µl)
270	27	540	37	15	3	30
				30		
				45		
				60		
				90		
				120		
				240		
				360		

- 1) 1 mg SEB, 100 µl formik asit içinde çözüldü. Bundan 27 µl alındı üzerine 540 µg CnBr eklendi.
- 2) 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360 dakikalık sürelerde reaksiyon hacminin (27 µl) 1/9'u kadar örnek (3 µl) her bir zaman diliminde ayrı bir tüp içine tübe alındı
- 3) Herbir örneğe 30 µl su eklenerek reaksiyon durduruldu.
- 4) Örnekler SDS PAGE'de incelendi.

3.2.1.2. SEB Katyonizasyonu

SEB proteinlerinin katyonizasyonu Hermanson ve arkadaşlarının uyguladıkları yöntemde ufak değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi (Hermanson, 1992).

Nativ SEB'in, EDA-MES solusyonu içinde EDC ile gerçekleştirilen reaksiyon sonucu katyonizasyonu aşağıdaki basamaklar halinde gerçekleştirildi;

1. 360 µg SEB, 70,5 µl EDA-MES çözeltisi içinde çözüldü.
2. 1,5 µl EDC (EDA-MES çözeltisi ile 1/10 oranında seyreltilmiş), hazırlanan SEB solüsyonuna eklendi ve solüsyon oda sıcaklığında 300 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi.
4. 1 saat sonra reaksiyon 2,16 µl sodyum asetat (4M, pH:4,8) eklenerek durduruldu.
5. MES tamponu (0,1 M, pH: 4,8) ile hacim 500 µl'ye tamamlandı. Solüsyon, her birinin moleküler ağırlık sınırı 10 kDa olan porlardan oluşan filtre (Vivaspin 500) ile 14,000g'de santrifüj edilerek süzüldü. İşlem 5 kere PBS ile yıkanarak tekrarlandı ve böylece EDA ve EDC ortamdan uzaklaştırıldı (ortamdaki yük artışı engellendi ve katyonize SEB (c SEB) saflaştırılmış oldu.
6. Son konsantrasyon 1 mg/ml olacak şekilde yıkamalar sonucu PBS içine alınan c SEB, -20°C'de saklandı.

3.2.2. Modifiye SEB Moleküllerinin Karakterizasyonu

3.2.2.1. SEB Moleküllerinin Karakterizasyonu

Yapısal değişikliğe uğratılan SEB molekülleri, sodyum dodesil sülfat poliaktilamid jel elektroforezi (SDS PAGE) yöntemi kullanılarak karakterize edildi. Uygulamada kullanılan yöntem aşamaları aşağıda belirtilmektedir.

3.2.2.1.1. Jel Hazırlama

PAGE sisteminde kullanılan jeller poliakrilamidin bis akrilamid ile polimerize edilmesi sonucu oluşturulur. Poliakrilamid ve bis akrilamid konsantrasyonları jelin yoğunluğunu, viskozitesini, elastikiyetini ve mekanik dağılımını belirler. Bu konsantrasyonların artırılmasıyla, oluşan ağın sıklığı da artmakta, buna bağlı olarak gözenek çapı azalmakta ve daha küçük boyuttaki moleküllerin ayırımına da imkan sağlanmaktadır (Tanbay, 2010).

Farklı modifikasyonların analizi için farklı konsantrasyonlarda (%12 veya %15) jeller hazırlandı. Modifiye edilen SEB fragmentlerinin ayrılmasında kullanılan alt (ayırıcı) jelin içeriği çizelge 3.5'te, proteinlerin yüklenmesinde kullanılan üst (stacking) jelin içeriği ise çizelge 3.6'da belirtilmektedir.

Çizelge 3.5. %12'lik ve %15'lik alt jelin hazırlanışı

Jele eklenen karışımlar ↓	← Eklenen miktar (ml) →	
	%12	%15
H ₂ O	4,0	2,3
Akrilamit+Bisakrilamit (%30)	3,3	5,0
1,5 M TRIS (pH = 8,8)	2,5	2,5
%10 SDS	0,1	0,1
%10 APS	0,1	0,1
TEMED	0,004	0,004

Çizelge 3.6. %5'lik üst jelin hazırlanışı

Jele eklenen karışımlar	Eklenen miktarlar (ml)
H ₂ O	6,8
Akrilamit+Bisakrilamit (%30)	1,7
1,5m TRIS (pH = 8,8)	1,25
%10 SDS	0,1
%10 APS	0,1
TEMED	0,01

Hazırlanan ayırıcı jel pipet yardımı ile jel kasetindeki iki cam arasına döküldü. İki cam arasına dökülen alt jelin üzerine bütanol eklenmek suretiyle jelin camda düz satıh oluşturması sağlandı ve jelin donması beklendi. Sonrasında bütanol filtre kağıdı ile emdirildi ve alt jel üzerine pipet yardımı ile üst jel döküldü. Üst jel donmadan, üst jelin üzerine örneklerin yükleneceği kuyuların açılmasını sağlayan tarak yerleştirildi. Jelin donmasının ardından tarak çıkarıldı, jel sistemi PAGE cihazına yerleştirildi ve üzerini kaplayıncaya kadar, distile su ile yürütme tamponu ile dolduruldu.

3.2.2.1.2. Örnek Hazırlama

Jelde yürütülecek örnekler ve marker proteinler tüplere 3 µg/3µl olacak şekilde hazırlandıktan sonra 3 µl 2 X yükleme çözeltisi ile karıştırıldı ve 3 dk kaynatıldı. Böylece yükleme tamponuyla birlikte nativ veya modifiye her bir örnek toplam 6 µl hacim içinde jele yüklendi. Modifiye SEB fragmentlerinin molekül ağırlıklarını belirleyebilmek için standart marker proteinler kullandı.

3.2.2.1.3. Örnek Yükleme ve Yürütme

Örnekler, jel sisteminde bulunan tarağın üst jelden çıkarılmasıyla oluşan kuyucuklara pipet yardımı ile yavaşça yüklendi. Sistem güç kaynağına bağlanarak 100 volt akım geçecek şekilde ayarlandı. Yükleme çözeltisindeki bromofenol mavisinden kaynaklanan mavi bant, jelin altına 0.2 cm kalıncaya kadar yürüdükten sonra akım durduruldu. Jelin çıkarılması işlemi sırasında kuyulara yüklenen örneklerin sırasını belirlemek için, jelin alt kenarlarından birinin ucundan küçük bir parça kesilerek işaret koyuldu. Jelde yürütülen örneklerin difüzyona uğramaması için, jel hemen fiksasyon (sabitleme) ortamına alındı ve bantların görüntülenmesi için boyama işlemi başlatıldı (Shapiro, 1967).

3.2.2.1.4. Jelde Yürütülen Örneklerin Gümüş Boyama ile Görüntülenmesi

Proteinler veya fragmentlerinin jelde görünür hale gelmesi için gümüş boyama işlemi gerçekleştirildi. Yöntem, aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi;

- 1) Sabitleme: Jel, 100 ml için 50 ml metanol, 12 ml asetik asit, 0,5 ml %37'lik formaldehit içeren solüsyonda en az 1 saat çalkalandı.
- 2) Yıkama: Jel, 100 ml için 50 ml EtOH içeren ortamda üç defa 20'şer dakika çalkalandı.
- 3) Ön muamele: Jel $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.2 gr/L) içeren ortamda 1 dakika çalkalandı.
- 4) Çalkalama: Jel, d H_2O içeren ortamda üç defa 20'şer saniye çalkalandı.
- 5) Bantların sabitlenmesi: Jel, AgNO_3 (2 gr/L) 100 ml için 0.75 ml %37 oranında formaldehit içeren solüsyonda 20 dakika çalkalandı.
- 6) Çalkalama: Jel, d H_2O içeren ortamda iki defa 20'şer saniye çalkalandı.
- 7) Geliştirme: Jel, 100 ml için Na_2CO_3 (60 gr/L), 0.5 ml %37 oranında formaldehit, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4 mg/L) içeren solüsyonda 10 dakika çalkalandı.
- 8) Yıkama: Jel, d H_2O içeren ortamda iki kere, ikişer dakika yıkandı.
- 9) Durdurma: Jel, 100 ml için 50 ml methanol 12 ml asetik asit solüsyonunda 10 dakika izlenerek karıştırıldı.
- 10) Yıkama: Jel, 100 ml için 50 ml methanol solüsyonuna konuldu (Wright, 1996).

3.2.2.2. SEB Katyonizasyonunun Karakterizasyonu

SEB'e uygulanan katyonizasyon işleminin sonucunda SEB'de bulunan aminoasitlerin karboksil gruplarının, amin grubuna dönüşmesi beklenmektedir. Bu prensip göz önünde bulundurularak, reaksiyon başarısı 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) ile test edildi (Hermanson, 2008). Yöntem, aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi;

- 1) Glisin, pH'ı 8.5 olan 0.1 M NaHCO_3 ile ardışık 2 kat seyreltilerek 8 farklı konsantrasyonda 333 μl 'lik hacim içinde 8 tüpte hazırlandı (10 μg -0,078 μg).
- 2) 1,5 ml NaHCO_3 (pH 8.5) çözeltisi içine 3 μl TNBS çözeltisi eklendi. Bu karışımdan içinde farklı konsantrasyonlarda glisin bulunan 8 tübün her birine 166'şar μl konuldu.
- 4) 3.33 μl cSEB (1 mg/ml) ve 3.33 μl nativ SEB ayrı ayrı tüplerde 333 μl NaHCO_3 eklenerek hazırlandı. Tüplerin her birine, içinde 3 μl TNBS çözeltisi ve 1,5 ml NaHCO_3 (pH 8.5) çözeltisi bulunan karışımdan 166'şar μl konuldu, karıştırıldı.
- 5) Kontrol olarak bir başka tüp içine, içinde 3 μl TNBS ve 1,5 ml NaHCO_3 (pH 8.5) çözeltisi bulunan karışımdan bir miktar (yaklaşık 1 ml) konuldu
- 6) Tüm örnekler 37°C'de karanlık ortamda 2 saat inkübe edildi.
- 7) İnkübasyon sonrasında örneklerin absorpsiyon değeri spektrofotometrede (335 nm ve 280 nm'de) ölçüldü.

İşlemlerin sonunda glisin aminoasiti bulunduran örneklerin absorpsiyon değerleri standart eğrisi çizmek için kullanıldı. Bu standarttan yola çıkarak c SEB'in amin taşıyan grupları belirlendi.

Reaksiyon sonunda TNBS'nin amin gruplarını bağlayıcı etkisinden yararlanılarak, glisin aminoasiti ve c SEB proteinindeki amin gruplarının karşılaştırılması sağlandı.

3.2.3. Farelerin SEB ile Bağışıklanması

8 haftalık BALB/c türü farelere nativ ve modifiye halde SEB molekülleri ile immünizasyon gerçekleştirildi. İmmünizasyon sürecinde antijen, farelere iki haftalık aralıklarla enjekte edildi. Birinci enjeksiyon aşamasında antijen ile birlikte Freund'un tam adjuvantı (CFA), ikinci, üçüncü, dördüncü ve beşinci immünizasyonlarda ise Freund'un tam olmayan adjuvantı (IFA) kullanılarak enjeksiyon gerçekleştirildi. Farelere uygulanan tüm immünizasyonlarda enjeksiyon periton içine (intraperitoneal-IP) yapıldı. Nativ formda SEB, SEA ile birlikte her bir fareye 2 veya 8 μg , indirgenmiş ve katyonize halde SEB, her bir fareye 2 μg , 5 μg , 10 μg , 20 μg , 8 μg olarak farklı miktarlarda 100 μl PBS içinde 100 μl CFA veya IFA ile karıştırıldıktan sonra enjekte edildi. Toplam 17 fareye enjeksiyon yapıldı.

İmmünizasyon çalışmaları süresince farklı şekillerde ön işleme tabi tutulmuş SEB örneklerine bağlı olarak fareler, farklı kafeslerde bulundurulmak suretiyle çeşitli gruplara ayrıldı. En yüksek bağışık yanıtı sağlayan farenin tespit edilmesi amacı ile her grupta (kafeste), immünizasyona tabi tutulacak olan en fazla 3 adet BALB/c türü fare bulunduruldu. Farklı işlemlere tabi tutulacak fare grupları içeren her kafese bir numara verildi. Kafes içindeki farelerin birbirinden ayırt edilmesi amacıyla farelerin bir kısmının sağ bir kısmının sol kulakları kesildi, bir kısmında ise herhangi bir işaret yapılmadı. Çizelge ve şekillerde farelerden sağ kulağı kesik fareler “SAK”, sol kulağı kesik fareler “SOK” ve işaret yapılmayan fareler “NK” olarak kısaltılmıştır.

Nativ SEB ile gerçekleştirilen immünizasyonda; 1. kafesteki, 1 normal kulaklı, 1 sağ kulağı kesik olmak üzere 2 adet fareye; fare başına 2 µg olmak üzere toplam 3 kez native SEB immünize edildi. 2 adet fare için; 4 µg/µl SEB üzerine önce 196 µl PBS eklendi ve sonra 200 µl adjuvant (CFA veya IFA) eklenerek 200'er µl enjekte edildi. SEB ve SEA karışımı ile enjeksiyon için; 2. kafesteki, 1 normal kulaklı ve bir sağ kulağı kesik olmak üzere 2 adet farenin her bir fare için 1 µg SEB ve 1 µg SEA PBS içinde iken, aynı hacimde (200 µl) adjuvan eklenerek immünizasyonlar gerçekleştirildi. Farelere nativ proteinlerin immünizasyon programları çizelge 3.7’de gösterilmektedir.

Çizelge 3.7. Farelere nativ protein immünizasyon programı

Ag adı	Kafes no.	Fare no	Ag Miktarı	Adjuvant Miktarı
Nativ SEB	1	1 (SAK)	2 µg/100 µl	100 µl CFA/IFA
		2 (NK)	2 µg/100 µl	
SEB+SEA	2	1(SAK)	1 µg SEA+ 1 µg SEB (/100 µl)	
		2(NK)	1 µg SEA+ 1 µg SEB (/100 µl)	

DTT Guanidin HCl ile indirgenmiş SEB ile gerçekleştirilen immünizasyonda; 3., 4., 5. kafeslerdeki 9 fareye (3 normal kulaklı, 3 sağ kulağı kesik, 3 sol kulağı kesik/4 normal kulaklı, 4 sağ kulağı kesik, 4 sol kulağı kesik/5 normal kulaklı, 5 sağ kulağı kesik, 5 sol kulağı kesik) 5 kez indirgenmiş SEB immünize edildi. Çizelge 3.8’de belirtilen miktarlarda antijen, PBS ve adjuvant uygulandı.

Çizelge 3.8. DTT Guanidin HCl ile indirgenmiş SEB immünizasyonu

3, 4 ve 5. kafeslerdeki fareler			
Normal kulak (5 mg)	20 µl SEB-DTT	80 µl PBS	100 µl Adjuvant
Sağ kulak (10 mg)	40 µl SEB-DTT	60 µl PBS	100 µl Adjuvant
Sol kulak (20 mg)	80 µl SEB-DTT	20 µl PBS	100 µl Adjuvant

c SEB ile uygulanan immünizasyonlarda; 6. kafeste bulunan (1 normal kulaklı ve 1 sağ kulağı kesik) 7. kafeste bulunan (1 normal kulaklı ve 1 sağ kulağı kesik) 4 fareye 5 immünizasyon uygulandı.

6. kafeste bulunan 2 fare için uygulanan ilk dört immünizasyonda, 4 µg/µl c SEB üzerine önce 196 µl PBS eklendi ve sonra 200 µl adjuvant (CFA veya IFA) eklenerek 200'er µl enjekte edildi. Son immünizasyonda ise 20 µg/µl c SEB üzerine önce 180 PBS eklendi ve sonra 200 µl adjuvant eklenerek 200'er µl enjekte edildi.

7. kafeste bulunan 2 fare için uygulanan ilk dört immünizasyonda, 16 µg/µl c SEB üzerine önce 184 µl PBS eklendi sonra 200 µl adjuvant eklenerek 200'er µl enjekte edildi. Son immünizasyonda ise, 20 µg/µl c SEB üzerine önce 180 PBS eklendi ve sonra 200 µl adjuvant eklenerek 200'er µl enjekte edildi.

Farelere modifiye proteinlerin immünizasyon programları çizelge 3.9'da gösterilmektedir.

Çizelge 3.9. Farelere modifiye protein immünizasyon programı

Ag Adı	Kafes no.	Fare no	Ag Miktarı	Fare başına adjuvant Miktarı
DTT-Guanidin HCl ile indirgenmiş SEB	3	1 (NK)	5 µg/100 µl	100 µl CFA/IFA
		2 (SAK)	10 µg/100 µl	
		3 (SOK)	20 µg/100 µl	
	4	4 (NK)	5 µg/100 µl	
		5 (SAK)	10 µg/100 µl	
		6 (SOK)	20 µg/100 µl	
	5	7 (NK)	5 µg/100 µl	
		8 (SAK)	10 µg/100 µl	
		9 (SOK)	10 µg/100 µl	
c SEB	6	1 (NK)	20 µg/100 µl	
		2 (SAK)	ve 4 µg/100 µl	
	7	3 (NK)	20 µg/100 µl	
		4 (SAK)	ve 16 µg/100 µl	

3.2.4. İmmünize Fare Serumlarında İmmün Yanıt Kontrolü

Nativ ve modifiye SEB örnekleri ile immünize edilen farelerin serumlarında anti-SEB antikorlarının gelişimi dolaylı ELISA testleri ile kontrol edildi.

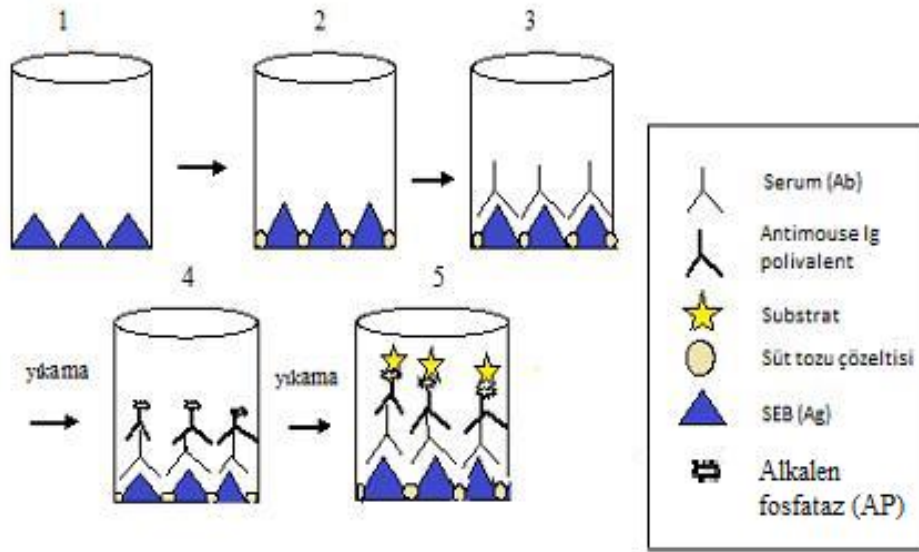
Fare Serumlarının Hazırlanması:

Fare serumlarındaki antikor aktivitelerinin belirlenmesi için farenin kuyruk ucu yaklaşık 0.5 mm kesilerek kanatıldı ve 10 µl sodyum sitrat içeren tüp içine pipetle alınan yaklaşık 10 µl kandan, santrifüj edilerek (10000 g'de, 30 sn) serum ayrıldı. Serumlar ELISA testlerinde PBS ile farklı oranlarda seyreltilerek kullanıldı.

3.2.4.1. Dolaylı ELISA Yöntemi

İmmünize antijen (nativ veya modifiye SEB) ve immünize edilen farenin serumundaki antijene spesifik antikor (anti-SEB) ilişkisi, dolaylı ELISA ile belirlendi. Kuyulara 50 ng nativ veya modifiye SEB 100 µl PBS içinde gece boyu 4°C’da bekletilerek kaplandı. Ağ kaplı bu plaklar yıkandıktan sonra nonspesifik bağlanmaların engellenmesi amacıyla süt tozu (%1’lik) ile doyuruldu. 37°C’de 60 dk. bekletildikten sonra yıkanan plaklara farklı oranda seyreltilmiş fare serumu eklendi. 37°C’de 60 dk. bekletildikten sonra kuyular yıkama tamponu ile yıkandı. Yıkama sonrasında alkalen fosfataz (AP) ile işaretli 2.ab-enzim konjugatı eklendi. İnkübasyon ve yıkamanın ardından AP’in özgül substratı paranitrofenil fosfat (PNPP) eklendi ve karanlıkta, enzim ile reaksiyona giren substratın parçalanma oranına bağlı olarak oluşan renk değişimi gerçekleşinceye kadar (ortalama 45 dk.) inkübe edildi, ELISA okuyucuda antikor varlığı tespit edildi. Yöntemde işlem sırası , aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi;

1. 96 kuyulu-ELISA plakları 100 µl SEB ve modifiye SEB örneği ile kaplandı. Gece boyu +4°C’de inkübe edildi. Plak 3 kez PBS-TWEEN 20 ile yıkandı.
 2. Kuyular %0,2’lik 200 µl süt tozu çözeltisi ile kaplanarak 1 saat 37°C’de bekletildi.
 3. Antikor içeriği belirlenecek olan serum PBS içerisinde seyreltilerek, hazırlanan plana göre 100 µl içerisinde kuyulara kaplandı ve 37°C’de 1 saat bekletildi. Plak, yıkama tamponu ile 3 kez yıkandı.
 4. Kuyular 100 µl içerisinde 1/1000 seyreltilmiş anti-mouse polivalent (IgG, IgA, IgM)-AP ile kaplandı ve 37°C’de 1 saat inkübe edildi. Kuyular 5 kez yıkandı.
 5. Substrat tamponu ile 1 mg/1 ml oranında seyreltilen substrattan (p-nitrophenyl fosfat) kuyucuklara 100’er µl ilave edildi. Oda sıcaklığında, karanlıkta 45 dk inkübe edildi. Antikor düzeyine göre renk değişimi 405 nm’de ELISA okuyucuda belirlendi.
- Uygulanan bu yöntem şekil 3.9’da gösterilmektedir



Şekil 3.9. Dolaylı ELISA Yöntemi

(Şekildeki silindir, ELISA plağındaki tek bir kuyucuğu simgelemektedir).

İmmünize fare serumlarında anti-SEB antikorlarının gelişiminin kontrolüne yönelik gerçekleştirilen dolaylı ELISA testlerinde, testlerin güvenilirliğinin belirlenmesi amacıyla immünize edilmeyen fare serumu kontrol olarak kullanıldı. Dolaylı ELISA testlerinde kuyu başına kaplanan SEB miktarı, seyreltilen fare serumu ve polivalent konjugat oranı farklılık gösterdi.

4. BULGULAR

SEB'e karşı antikor yanıtı geliştirme çalışmaları SEB'in süperantijenik yapısına bağlı olarak farklı stratejileri içeren bir program ile yürütüldü. SEB; DTT, DTT-Guanidin HCl, Papain ve CnBr ile sınırlı düzeyde (immün yanıt oluşmasını engellemeyecek düzeyde) fragmentlerine ayrılarak veya EDA-EDC kullanılarak katyonizasyon reaksiyonu ile modifiye edildi.

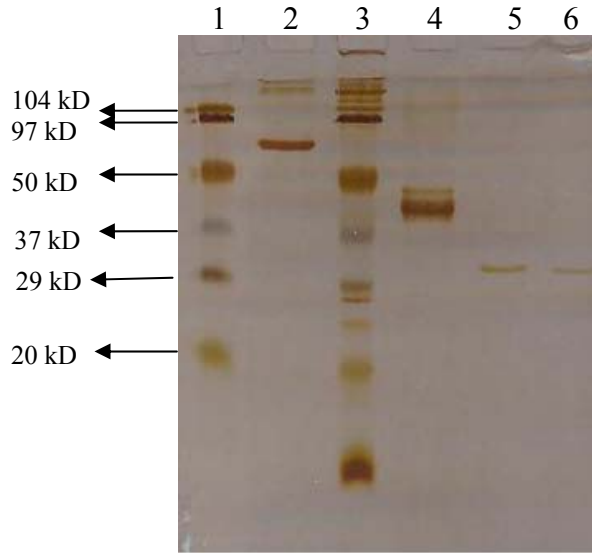
4.1. İmmünojenik SEB Hazırlama

SEB'e karşı antikor yanıtı geliştirme çalışmaları SEB'in süperantijenik yapısına bağlı olarak farklı stratejileri içeren bir program ile yürütüldü. Bu kapsamda SEB indirgenerek veya katyonize edilerek modifiye edildi. Modifikasyon sonuçları karakterize edilerek değerlendirildi.

4.1.1. SEB'in İndirgenmesi

4.1.1.1. SEB'in DTT ile İndirgenmesi

SEB'in "3.2.1.1.1.'de belirtildiği şekilde uygulanan şartlarda DTT ile muamelesi sonrasında, proteinin indirgenme kontrolü %12'lik SDS PAGE ile incelendi (şekil 4.2). 10 µg/100 µl yoğunluğunda 20 µg SEB proteininin 1,8 µl DTT ile 60 °C'de ve 15 dakika süreyle oluşturulan inkübasyon şartlarında SDS PAGE ile incelenmesi sonucunda SEB'in ayrılmadığı, indirgenmenin gerçekleşmediği gözlemlendi. Şekil.4.1.'de gözlenebileceği gibi (6 nolu kuyu) yalnız başına DTT ile muamele sonucunda proteinde herhangi bir indirgenme gözlenmedi.



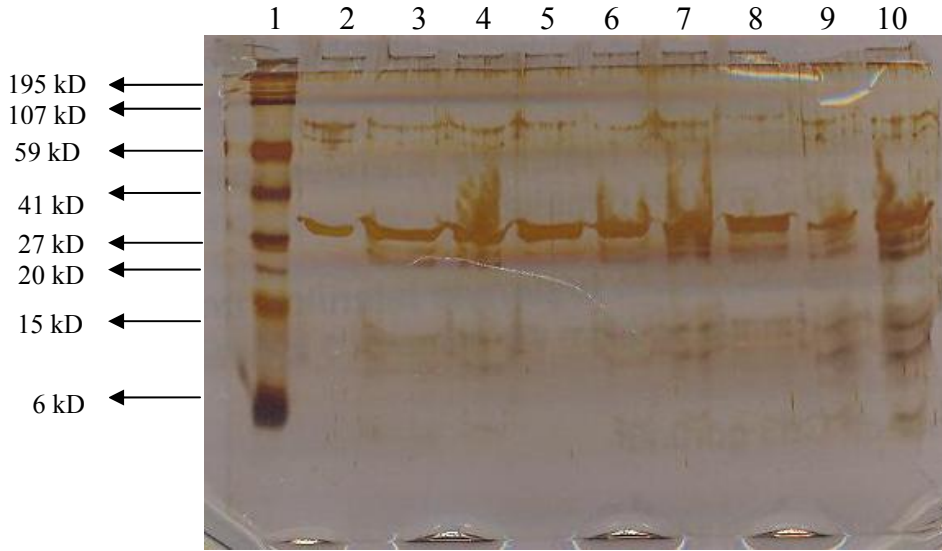
Şekil 4.1. DTT ile muamele edilen SEB örneklerinin %12'lik jelde elektroforetik analizi

(1) Marker (104, 97, 50, 37, 29, 20 kD), (2) BSA (59 kD), (3) Marker (195, 107, 59, 41, 27, 20, 15, 6 kD), (4) Ovalbumin (45 kD), (5) Nativ SEB, (6) DTT ile muamele edilen SEB

4.1.1.2. SEB'in DTT-Guanidin HCl ile İndirgenmesi

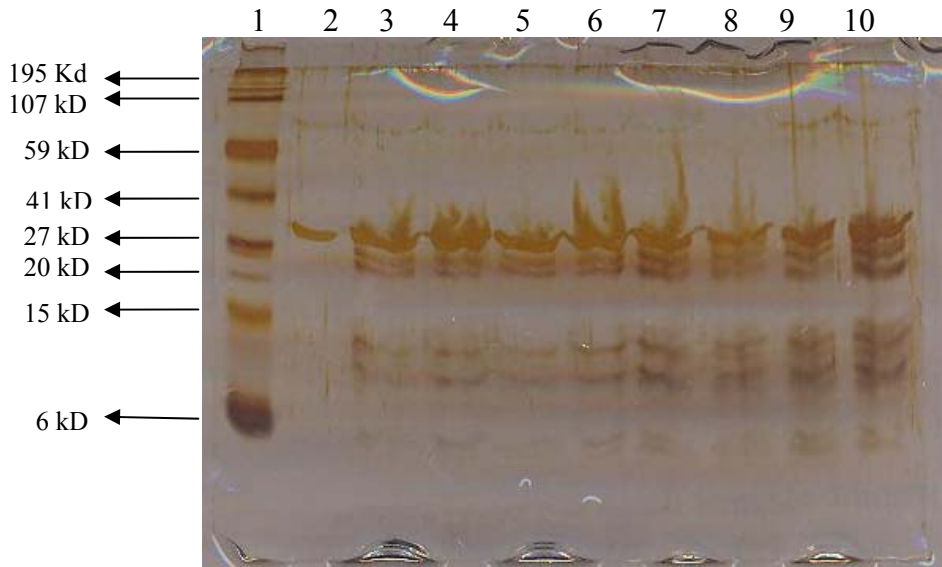
SEB "3.2.1.1.2.'de belirtildiği şekilde uygulanan şartlarda DTT-Guanidin HCl ile sıcaklıklarda ve farklı sürelerde DTT-Guanidin HCl ile muamele edilerek indirgeni. Reaksiyon sonucu proteinin indirgenme kontrolü %15'lik SDS PAGE ile incelendi. DTT sınırlı düzeyde guanidin HCl ile birlikte kullanıldığında proteinde indirgenme gözlemlendi.

Şekil 4.2'de oda sıcaklığında, Şekil 4.3'te ise 37°C'deki inkübasyonlar sonucu indirgenmeler belirtilmektedir.



Şekil 4.2. Oda sıcaklığında farklı sürelerde DTT-Guanidin HCl ile muamele edilen SEB örneklerinin %15'lik jelde elektroforetik analizi.

(1) Marker (195, 107, 59, 41, 27, 20, 15 ve 6 kD), (2) Nativ SEB, (3) 5dk., (4) 10 dk., (5) 15 dk., (6) 30 dk., (7) 60 dk., (8) 90 dk., (9) 120 dk., (10) 150 dk.



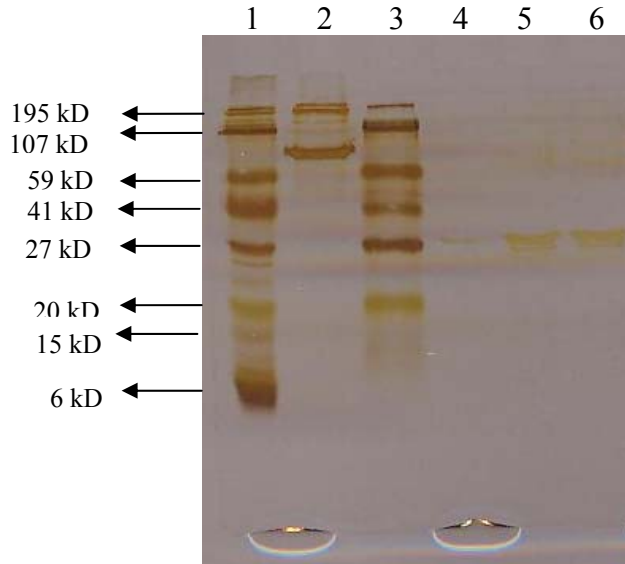
Şekil 4.3. 37°C'de DTT-Guanidin HCl ile muamele edilen SEB örneklerinin %15'lik jelde elektroforetik analizi

(1) Marker (195, 107, 59, 41, 27, 20, 15 ve 6 kD), (2) Nativ SEB, (3) 5dk., (4) 10 dk., (5) 15 dk., (6) 30 dk., (7) 60 dk., (8) 90 dk., (9) 120 dk., (10) 150 dk.

Farklı sürelerde ve koşullarda gerçekleştirdiğimiz SEB'in DTT-Guanidin HCl ile inkübasyonu sonrası SDS PAGE ile incelenmesi sonucunda, SEB'in DTT-Guanidin HCl ile indirgenmesi için en ideal bekleme süresinin 150 dakika, en ideal reaksiyon ısısının 37°C olduğu sonucuna varıldı.

4.1.1.3. SEB'in Papain ile İndirgenmesi

SEB'in "3.2.1.1.3." de belirtildiği şekilde uygulanan şartlarda papain ile muamele edilmesi sonucunda proteinin indirgenme kontrolü %15'lik SDS PAGE ile incelendi. Şekil 4.4'de papain ile indirgenen SEB proteininin %15'lik jelde elektroforetik olarak ayırımından sonraki profili sunulmaktadır. Görüntüden anlaşılacağı üzere uygulanan şartlarda papain ile proteinin indirgenmesi mümkün olmamıştır.



Şekil 4.4. Papain ile muamele edilen SEB örneklerinin %15'lik jelde elektroforetik analizi

(1) Marker (195, 107, 59, 41, 27, 20, 15 ve 6 kD), (2) BSA (59 kD), (3) Marker (104, 97, 50, 37, 29, 20 kD), (4) SEB (1 µg), (5) Papain ile muamele edilmiş SEB (2 µg), (6) Papain ile muamele edilmiş SEB (4 µg)

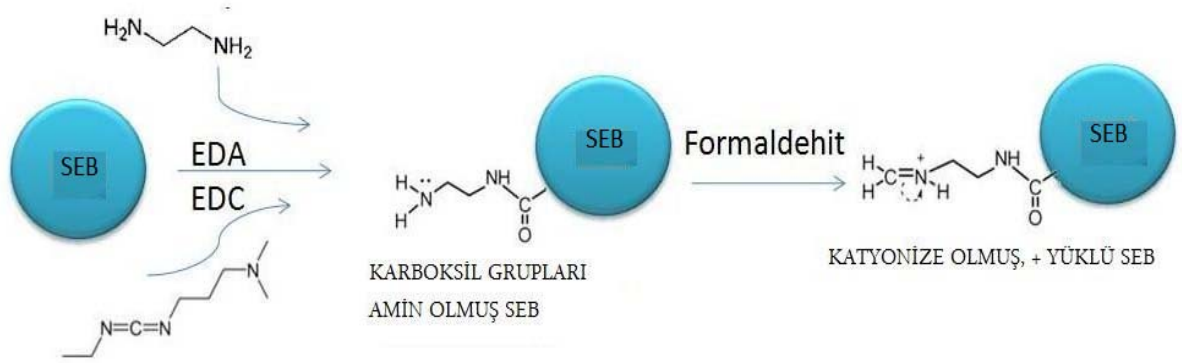
4.1.1.4. SEB'in CnBr ile İndirgenmesi

SEB'in "3.2.1.1.4." de belirtildiği şekilde uygulanan şartlarda CnBr ile muamelesi sonrasında, yapısındaki değişiklikler %15'lik SDS PAGE ile incelendi. Sonuçlar uygulanan şartlarda proteinin çok küçük parçalara bölündüğünü ve bu nedenle %15'lik jelde bile elektroforetik olarak gözlenememesinin çok küçük parçalara ayrılmasından

kaynaklandığını göstermiştir. Proteinin sınırlı miktarda indirgenbilmesi için papain miktarının indirgenmesi ile optimizasyon çalışmasının yapılması gereği düşünülmüş ancak, yeterli antijen bulunmaması nedeniyle çalışma gerçekleştirilememiştir. Jelde bant gözlenemediği için veri sunulmamıştır.

4.1.2. SEB'in Katyonizasyon ile Modifikasyonu

SEB'in katyonizasyonu Domen ve arkadaşlarının 1992 yılında çıkan patentinde verilen yöntemin modifikasyonu ile gerçekleştirilmiştir (Patricia Domen & Hermanson, 1992) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. SEB katyonizasyonu

Bu reaksiyonlarda proteinin yapısında bulunan asidik aminoasitlerdeki pozitif yüklü karboksil grupları ethylene daimine (EDA) ve 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimide hydrochloride (EDC) molekülleri kullanılarak amine edildi. Bu sayede proteindeki net pozitif yük artırıldı. Katyonizasyonun başarısı, c SEB'deki amin gruplarının sayılmasıyla test edildi. 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate (TNBS)'nin amin gruplarını bağlayıcı özelliğinden yararlanılarak glisin aminoasitindeki amin gruplarının standart alındığı ve c SEB proteinlerinin amin gruplarının miktarının belirlendiği deneyde, c SEB moleküllerinin katyonizasyon oranı başarılı bulundu.

Yeni eklenen amino grupların miktarının belirlenmesi yolu ile katyonizasyonun başarısı TNBS metodu ile ölçüldü. TNBS proteinlere bağlandığında kromojenik bir türev oluşturarak amino grupların miktarını ölçmede kullanılmaktadır. Amin grupları taşıyan moleküllere TNBS bağlı iken 335 nm'de maksimum absorbance vermektedir (Habeeb, 1966; Kakade and Liener, 1969). Katyonize proteinlerin amin gruplarının sayısı native proteinler ile karşılaştırılarak artış hesaplanabilmektedir. Bu yöntemle ilgili veri sunulmamaktadır.

4.2. SEB Spesifik İmmün Yanıtın Kontrolü

SEB immünize edilen farelerde SEB spesifik immün yanıtın sağlanabilmesi için farklı yaklaşımlar izlendi. SEB, nativ halde (Nativ SEB, nativ SEB + SEA) veya proteinin indirgenme (DTT-Guanidine HCl ile) ve katyonizasyon (pI değerini artırarak) işlemleri ile modifiye edildikten sonra farelere enjekte edildi. İmmün yanıtın kontrolü aşamasında sonuçlar, dolaylı ELISA yöntemi ile test edildi.

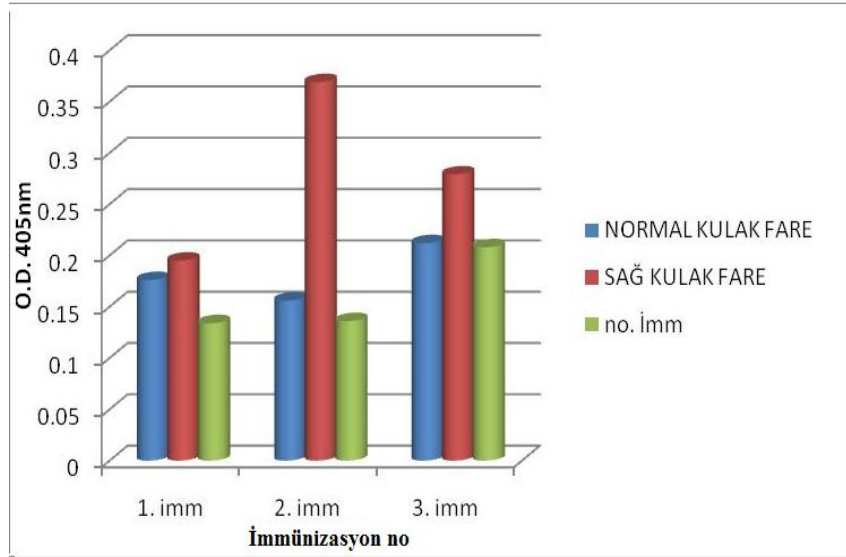
4.2.1. Nativ SEB ile İmmünize Edilmiş Farelerde İmmün Yanıtın Kontrolü

SEB farelere, yalnız başına veya SEA ile karıştırılarak “3.2.3.’de belirtilen uygulama planına göre enjekte edildi.

Ticari yolla temin edilen nativ SEB, 2 adet fareye 3 kez immünize edildikten sonra serumlarındaki antikör yanıtları şekil 4.6’da belirtilmektedir. ELISA testi ile kontrolleri çizelge 4.1.’de belirtildiği şekilde kurgulanmıştır.

Çizelge 4.1. Nativ SEB ile immünize fareler için ELISA kurgusu

İmm. no	SEB (50 ng/kuyu)			No Ag (PBS kaplı)		
	1.	2.	3.	1.	2.	3.
Fare serumları						
No imm.	1/500	1/500	1/100	1/500	1/500	1/100
1 SAK	1/500	1/500	1/100	1/500	1/500	1/100
1 NK	1/500	1/500	1/100	1/500	1/500	1/100



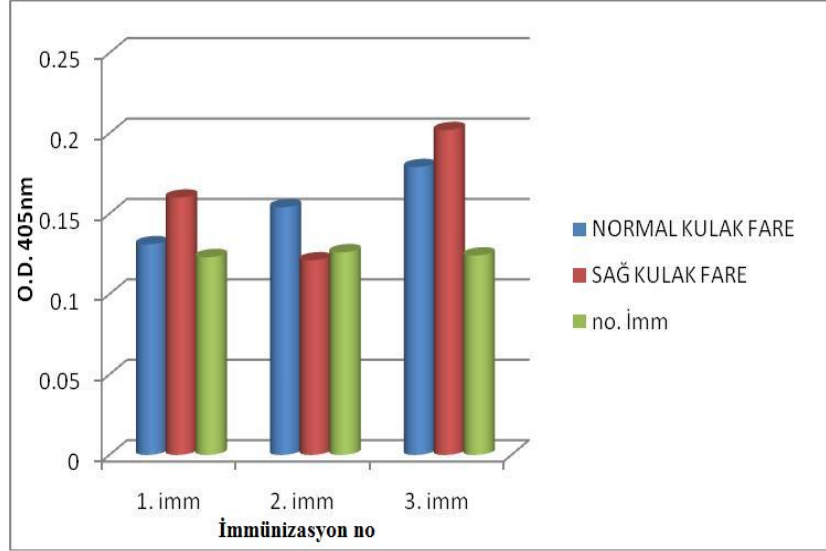
Şekil 4.6. Nativ SEB ile immünize edilen iki adet farenin gösterdiği bağışık yanıt

BALB/c türü 1. kafesteki normal ve sağ kulağı kesik 2 adet farenin kan serumlarının dolaylı ELISA testi ile değerlendirilmesi sonucunda farelerden hiç biri SEB antijenine karşı yeterli bağışık cevap göstermedi.

Nativ SEB, SEA ile karıştırılarak 2 adet fareye 3 kez immünize edildikten sonra serumlarındaki antikor yanıtları şekil 4.7’de belirtilmektedir. ELISA testi ile kontrolleri Çizelge 4.2.’de belirtildiği şekilde kurgulanmıştır.

Çizelge 4.2. SEB + SEA ile immünize fareler için ELISA kurgusu

İmm. no	SEB+SEA (50 ng/kuyu)			No Ag (PBS kaplı)		
	1.	2.	3.	1.	2.	3.
Fare serumları						
No imm.	1/500	1/500	1/100	1/500	1/500	1/100
2 SAK	1/500	1/500	1/100	1/500	1/500	1/100
2 NK	1/500	1/500	1/100	1/500	1/500	1/100



Şekil 4.7. SEB + SEA ile bağışıklanmış iki farenin gösterdiği bağışık yanıt

2 nolu kafeste SEA+SEB immünize normal kulak ve sağ kulağı kesik farelerin kan serumlarının dolaylı ELISA testi ile değerlendirilmesi sonucunda SEA'ya karşı immün yanıt alınırken, SEB'e karşı yanıt gözlenemedi.

4.2.2. Modifiye SEB Molekülleri ile İmmün Yanıtın Kontrolü

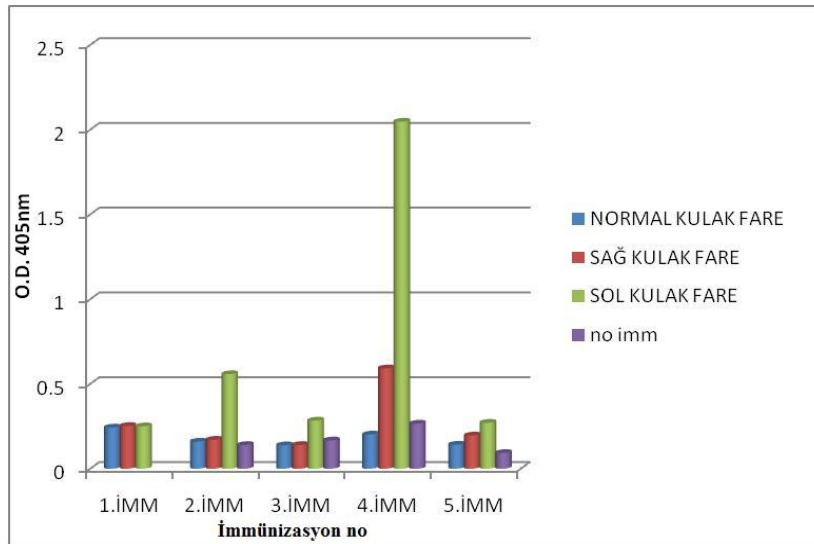
SEB, indirgenme (DTT-Guanidine HCl ile) ve katyonizasyon işlemleri ile modifiye edildikten sonra, "3.2.3.'de belirtilen uygulama planına göre farelere enjekte edildi. DTT ve papain ile indirgenme reaksiyonları sonucunda SEB indirgenemediği için bu yöntemlere bağlı immünizasyonlar gerçekleştirilmedi.

4.2.2.1. DTT-Guanidin HCl ile İndirgenmiş SEB ile Enjeksiyon Yapılan Farelerde İmmün Yanıtın Kontrolü

DTT-Guanidin HCl ile indirgenmiş SEB, her birinde 3'er farenin bulunduğu (3., 4. ve 5. kafes) farelere 5 kez immünize edildi. DTT-Guanidin HCl ile indirgenmiş SEB ile immünize edilen 3., 4. ve 5. kafeslerdeki farelerin dolaylı ELISA testi ile kontrolleri sırasıyla çizelge 4.3., 4.4 ve 4.5'de belirtildiği şekilde kurgulanmış olup, gösterdikleri bağışık yanıtlar şekil 4.8, 4.9 ve 4.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. DTT-Guanidin HCl ile immünize edilmiş 3. kafes fareleri için ELISA kurgusu

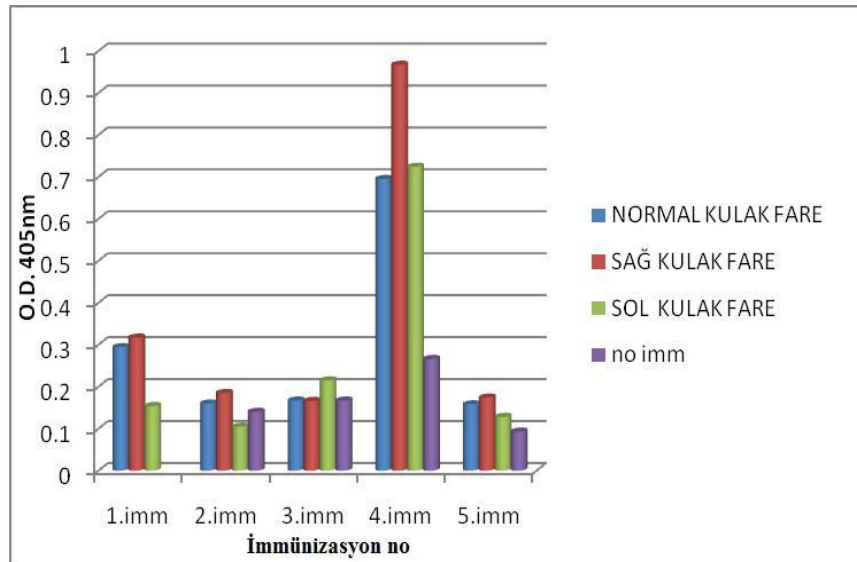
Imm. no Fare serumları	SEB DTT-Guanidin HCl (50 ng/kuyu)					No Ag (PBS kaplı)				
	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.
No imm.	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000
3 SAK	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000
3 SOK	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000
3 NK	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000



Şekil 4.8. SEB-DTT-Guanidin HCl ile immünize edilmiş 3. kafes farelerinin gösterdiği bağışık yanıt

Çizelge 4.4. DTT-Guanidin HCl ile immünize edilmiş 4. kafes fareleri için ELISA kurgusu

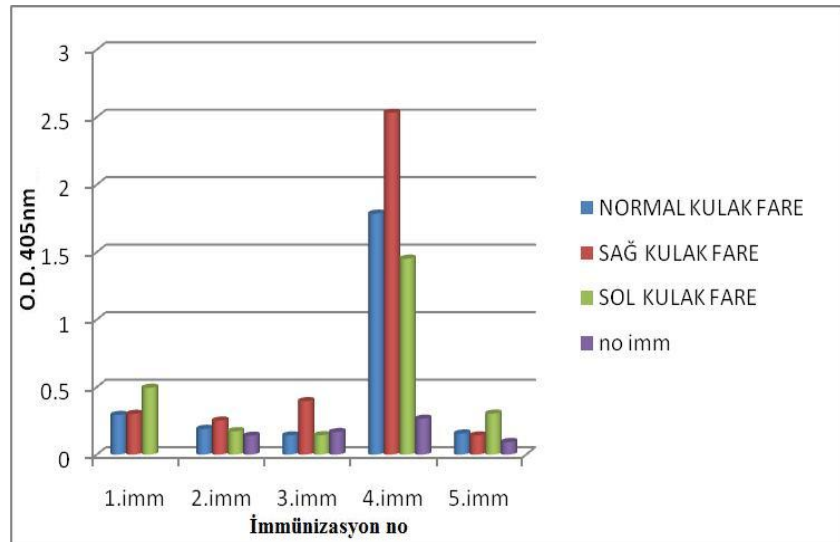
İmm. no Fare serumları	SEB DTT-Guanidin HCl (50 ng/kuyu)					No Ag (PBS kaplı)				
	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.
No imm.	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000
4 SAK	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000
4 SOK	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000
4 NK	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000



Şekil 4.9. SEB-DTT-Guanidin HCl ile immünize edilmiş 4. kafes farelerinin gösterdiği bağışık yanıt

Çizelge 4.5. DTT-Guanidin HCl ile immünize edilmiş 5. kafes fareleri için ELISA kurgusu

İmm. no Fare serumları	SEB DTT-Guanidin HCl (50 ng/kuyu)					No Ag (PBS kaplı)				
	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.
No imm.	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000
5 SAK	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000
5 SOK	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000
5 NK	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000	1/100	1/100	1/250	1/250	1/1000



Şekil 4.10. SEB-DTT-Guanidin HCl ile immünize edilmiş 5. kafes farelerinin gösterdiği bağışık yanıt

3., 4. ve 5. kafeslerin her birinde bulunan 1 normal, 1 sağ kulağı kesik ve 1 sol kulağı kesik olmak üzere toplam 9 farenin DTT ile indirgenmiş SEB örnekleri ile immünizasyonu sonrasında kan serumlarının dolaylı ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. 3. kafeste

bulunan sol kulağı kesik farenin gösterdiği sınırlı antikor yanıtı dışında, hiç birinden SEB'e karşı aktif yanıt alınmamıştır. 3., 4. ve 5. kafeslerdeki farelerin 4. İmmünizasyon sonucunda ELISA testinde belirlenen yüksek antikor cevabı, 3. kafeste bulunan sol kulağı kesik fare serumu ile aşağıdaki çizelgede belirtildiği şekilde tekrarlanmış ve 5. immünizasyon sonrasındaki ELISA testinde gözlenemediği için dikkate alınmamıştır.

4.2.2.2. c SEB ile İmmünize Edilen Farelerde İmmün Yanıtın Kontrolü

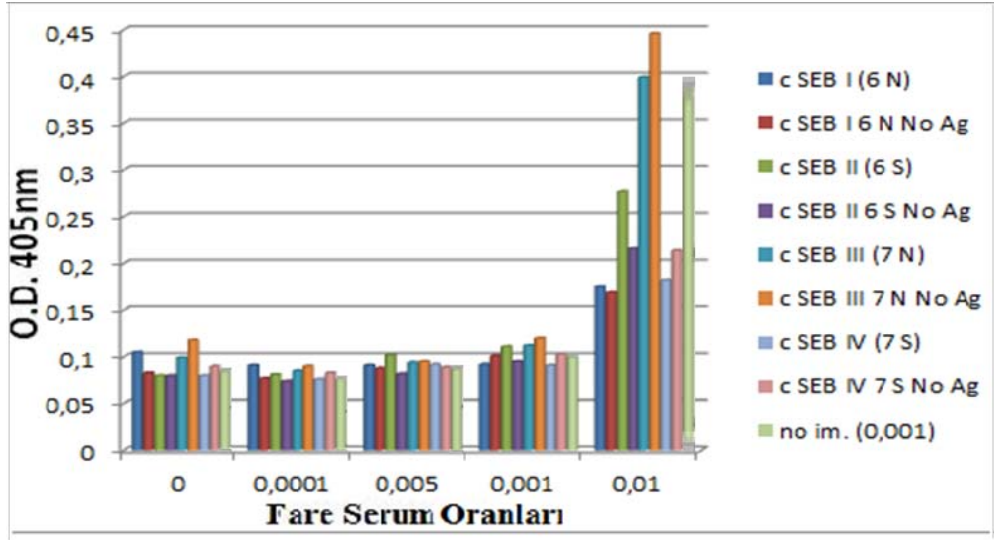
Her immünizasyondan yaklaşık iki hafta sonra kan alınıp ELISA testi ile fare serumlarında anti-SEB aktivitesi incelendi. 1., 2. ve 3. immünizasyonlardan sonraki testlerden farklı olarak ELISA plaklarının kuyuları katyonize SEB (c SEB) ile değil nativ SEB ile kaplandı. İmmünize edilmemiş ve c SEB immünize edilmiş farelerin serumları 1/1000 oranında seyreltilerek yapılan kontrollerde c SEB immünize farelerde de anti-SEB aktivitesi gözlenmedi. 1/100 oranında serum seyreltmeleri ile yapılan kontroller sonucunda elde edilen değerlerde de no immünize fare ile karşılaştırıldığında serumda spesifik cevap gözlenmedi, sonuçlar dikkate alınmadı.

ELISA testlerinin kurgusu çizelge 4.6'da sunulmaktadır. Çizelgede belirtilen "6NK" ve "6SAK", "7NK" ve "7SAK" sembolleri sırasıyla; 6. kafeste normal kulaklı fare, 6. kafeste sağ kulağı kesik fare, 7. kafeste normal kulaklı fare, 7. kafeste sağ kulağı kesik farelerin kan serumlarını, "Nativ" ise immünize edilmemiş farelerin kan serumlarını ifade etmektedir.

Çizelge 4.6. c SEB ile immünize farelerde immün yanıtın kontrolü kapsamında uygulanan plan

Kaplanan antijen ↓	← Eklenen serum →											
	-	1/1000	1/10000	1/5000	1/1000	1/100	-	1/1000	1/10000	1/5000	1/1000	1/100
c SEB (1 µg/1 µl)	PBS	Nativ	6NK	6NK	6NK	6NK	PBS	Nativ	6SAK	6S	6SAK	6SAK
-Ag	PBS	Nativ	6NK	6NK	6NK	6NK	PBS	Nativ	6SAK	6S	6SAK	6SAK
c SEB (1 µg/1 µl)	PBS	Nativ	7NK	7NK	7NK	7NK	PBS	Nativ	7SAK	7S	7SAK	7SAK
-Ag	PBS	Nativ	7NK	7NK	7NK	7NK	PBS	Nativ	7SAK	7S	7SAK	7SAK

c SEB ile immünize farelerin serumlarında antikor düzeyleri Şekil 4.11’de belirtilmektedir. Bu verilere göre nativ SEB’e karşı en yüksek antikor aktivitesi 2. immunizasyondan sonra gözlenmiş fakat bu aktivite 3. immunizasyonlardan sonra düşmüştür. 4. immunizasyondan sonraki ELISA’da nativ SEB’e karşı antikor yanıtı gözlenmemiştir.



Şekil 4.11. 1., 2., 3. ve 4. immünizasyonlar sonucunda farelerin serumlarında immün yanıtın kontrolü

Grafikte yatay eksen, c SEB immünize ve immünize olmamış fare gruplarının farklı konsantrasyonlardaki serumları, dikey eksen ise bu serumların spektrofotometrede (405 nm.’de) gösterdiği değerler ifade edilmektedir.

5. TARTIŞMA

Gıda zehirlenmelerinde ortaya çıkan en önemli toksin olan SEB bu özelliği ile potansiyel olarak biyolojik ajan olarak değerlendirilmektedir. Bu kapsamda SEB, kapasite düşürücü olarak dikkate alınmaktadır. Kompleks üçüncül yapısı ile oldukça dayanıklıdır. Gıda yolu ile oluşturduğu riskin önlenmesi için öncelikle etkin bir tanı sistemi ile gıdaların analizi gereklidir. SEB mevcut sınırlamalara ve en etkin teşhis olmasına bağlı olarak immünolojik testlerle tanımlanmaktadır.

Herhangi bir analitin teşhis ve tanısı için kullanılacak immünolojik testlerde ilgili analite özgü geliştirilmiş olan antikorlar kullanılmaktadır. İmmünolojik tanı sistemlerinin önemli bir unsuru olan antikorların in vitro koşullarda üretilebilmesi için farelere enjekte edilmeleri gereklidir. Farelerden immün yanıt sağlanabilmesi analitin antijenik özelliğine bağlı olup, immünojenik olmayan antijenlere karşı antikor yanıtı elde edilememektedir. İmmünojenik antijenler konakçıya yabancıdır, belirli molekül büyüklüklerine sahiptirler, karmaşık yapıdadırlar, immün sistem tarafından işlenebilir durumdadır. İmmün sistem, T hücre bağımlı proteinler gibi immünojenik bir antijen ile karşılaştığı zaman, ancak küçük bir T hücre popülasyonu ($1/10^4$ - 10^5 kadar) antijeni tanımak üzere aktive olur (monoklonal/oligoklonal cevap). Ancak, süperantijenler T hücrelerinin %25 kadarını poliklonal olarak aktive ederler ve immünojenik olmalarına karşın, bağışıklık sistemini spesifik olmayarak aktifleştirir. Süperantijenlere maruz kalma sonucu hastalıklar, aktive olmuş çok sayıda T hücresi tarafından sitokinlerin salınması ve immün sistemin hiperaktivasyonu sonucu gelişmektedir (Abbas, 2007, Labrecque, 1993, Hau, 2003)

Kolaylıkla fagosite olan antijenler genellikle daha immünojeniktirler. Çünkü çoğu antijen için immün yanıt gelişimi antijenin fagosite olması, işlenmesi ve APC'ler tarafından yardımcı T hücrelerine sunulmasını gerektirir (T hücre bağımlı antijenler). Dolayısı ile süperantijenlere özgü B ve CD4 T hücrelerinin aktivasyonu ve antikor üretimi sorun teşkil ettiği için süperantijen spesifik immün yanıt geliştirilmesi ve antikor üretimlerine yönelik yaklaşımlar literatürde önemli bir yer almaktadır.

Bu çalışmada, SEB tanısında kullanılan immünolojik tanı sistemlerinin, temel unsuru olan anti-SEB antikorlarının üretimi amacı ile SEB'in immünojenitesini artırmaya yönelik yaklaşımlar incelendi. Bu kapsamda değerlendirilen sonuçlara bağlı olarak SEB proteininin süperantijenik özelliğinden kaynaklanan üçlü kompleks oluşumunu engelleyecek, spesifik olmayan immün yanıt gelişiminin ortadan kaldırılması amacıyla, yapısı sınırlı biçimde değiştirildi. SEB'in farklı ajanlarla indirgenmesi ve amin gruplarının sayısı artırılarak

katyonizasyonu gerçekleştirildi. Modifiye proteinler elektroforetik olarak incelendikten sonra yapısal değişikliğe uğratılmış moleküller farelere enjekte edildi. İmmünize edilen farelerden elde edilen sonuçlar, nativ süperantijen SEB'e özgü immün yanıt ve spesifik antikör geliştirilmesine yönelik araştırıldı.

Modifiye edilmiş moleküller ile immünize edilen farelerden elde edilen yanıtların, immünizasyonda kullanılan formları ile reaktif olmalarının yanı sıra nativ proteine de özgün biçimde bağlanabilmeleri kritik bulundu.

Antijenik olma özelliği açısından SEB'in immünojenliği sağlanırken yapılan indirgeme çalışmalarının diğer kritik bir özellik olan molekül büyüklüğü açısından sorun oluşturmaması gerekmektedir. İmmünojenite için molekülün büyüklüğü önemli bir kriterdir. Proteinin 4-5 kD'dan daha küçük parçalara ayrılması immünojenik olmasını engelleyecektir. SEB'in APC'ler tarafından alınarak sunulmasına engel olan süperantijenik yapısının bozulması amacıyla indirgenmesi, bu etkileşim bölgesini ortadan kaldırmaya yönelik yaklaşımlar arasında değerlendirilmiştir. Bu nedenle gerek DTT, Guanidin HCl ve CnBr gibi kimyasal indirgeme ajanları, gerekse papain gibi proteolitik bir enzim kullanılırken, immünojeniteyi olumsuz etkileyecek boyutta SEB'in ileri derecede parçalanmamasına dikkat edilerek sınırlı düzeyde indirgenmesi arzu edilmiştir. Bunun sağlanması amacıyla her bir ajan ile optimal modifikasyon şartlarının oluşturulması gereği bulunmaktadır. Ancak, çalışmamızda toksin teminine yönelik sıkıntılar nedeniyle bu mümkün olamamış, hem işlenmeden MHC ile bağlanmasını önleyecek, hem de immünojenite için gerekli molekül büyüklüğünü koruyabilecek protein fragmentlerinin seçilmesini sağlayacak düzeyde tekrarlar yapılamamıştır.

Diğer taraftan ilgili modifikasyonlar ile elde edilen indirgenmiş SEB fragmentlerinin immünizasyonları sonucu elde edilecek antikörlerin nativ formdaki SEB'i tanıması gereklidir. Çünkü sütte bulunabilecek SEB'i tanımak üzere modifiye SEB ile immünize farelerden elde edilecek anti SEB antikörlerinin nativ formdaki SEB ile reaktif olması gereklidir. Yine yeterince toksin temininin sıkıntılına bağlı olarak indirgenme sonucu fragmentlerin yapısal karakterizasyonları incelenememiştir. Bu çalışma modifiye SEB ile immünize farelerden elde edilen yanıtların nativ SEB ile reaktivitesinin açıklanabilmesinde olduğu kadar, nativ SEB ile alınmayan yanıtların açıklanması için de gerekli görülmektedir.

Süperantijenik yapısı nedeniyle vücutta antijen olarak algılanmayan ve bu nedenle vücutta antijene karşı hümmoral immün yanıt oluşumu sağlanamayan SEB, biyolojik silah olarak kabul edilmektedir. Türkiye'ye SEB toksininin gönderilmesi, kısıtlanmış ve

böylelikle çalışmalarımızda materyal sıkıntısı yaşanmıştır. Toksin teminindeki sıkıntıların ortadan kalkmış olması halinde, SEB'e karşı antikor üretebilmek için proteindeki yapısal değişikliklerin yanı sıra, diğer farklı yöntemler de kullanılabilir.

Literatürde SEA ve SEB'in birlikte farelere enjekte edilmesiyle gerçekleştirilen immünizasyonlarda antikor üretildiğine dair yöntemler sunulmuştur. Örneğin, ilk üç immünizasyonda 10 µg SEA ve 10 µg SEB ile intraperitoneal, füzyondan önceki son immünizasyonda ise 100 µg SEA ve 100 µg SEB ile birlikte intrasplenik olarak immünizasyon sonucunda başarı sağlanabilmiştir (Bin ve arkadaşları, Yee Shine, 1988). Bizim çalışmamızda da, farklı bir strateji ile SEA ve SEB birlikte enjekte edilmiş, ancak antijen miktarının kısıtlı kalmasına bağlı olarak antikor yanıtı sağlanamadığı düşünülmüştür. SEB'e karşı antikor yanıtı sağlanan diğer çalışmalarda intrasplenik enjeksiyon yönteminin kullanılmamış olması nedeniyle bu yöntem anti-SEB antikorlarının geliştirilmesinde kritik bulunmamıştır. Diğer bir çalışmada, dalak dokusuna yerleştirilen immünojen sonucunda dalak hücrelerinin büyümesi ile gerçekleştirilen intrasplenik immünizasyonun başarı sağlandığı belirtilmiş, ancak uygulamanın farklı beceriler gerektirmesi sebebiyle pratik bulunmadığı için gerçekleştirilmemiştir (Nilson, 1990). Enteretoksinlerin eş zamanlı immünizasyonu ile enteretoksinler, adjuvant gibi davranırlar. Çalışmada, SEB ve SEA'nın eş zamanlı immünizasyonu ile, birbirlerinin immün yanıtlarını etkilemelerinin yararlı olacağı düşünüldü.

Her ne kadar literatürdeki bazı çalışmalarda immünizasyon için kullanılan dozlar, bizim çalışmamızda kullanılan değerlerden daha yüksek olsa da, SEB ile immünize edilen farelerin histopatolojik olarak incelenmesi sonucunda SEB enterotoksinin bağışıklık sistemini etkileyebileceği letal dozun 1.6 µg olduğu bilgisine dayalı olarak, immün yanıt sağlanamamasının, kullandığımız dozların yetersizliğinden kaynaklanan bir sonuç olmadığı düşünülmektedir (Savransky, 2003).

Marti Jett ve arkadaşlarının (Jett, 1994) SEB'in MHC II'ye bağlanmasını engellemeye yönelik olarak uygulanan metotlarda, SEB kaynaklı T hücre proliferasyonunu engellemeye yönelik yaklaşımlar denenmiştir. Bu çalışmada SEB kaynaklı proliferasyonu engelleyen 4 farklı sentetik peptid grubu kullanılmışlardır. Bunlar; SEB'in MHC II'ye bağlanma bölgesini içine alan 1-30, T hücre reseptör bölgesi ile bağlantılı olan 61-92 sistin ilmiğindeki düzlemsel dizilere karşılık gelen 93-112 ve yüksek korunmuş dizi içeren (KKKVANTAQEL) 130-160 aminoasitlik dizilerdir. "KKKVANTAQEL" dizisi içeren sentetik SEB peptidinin MHC II'deki 125 I-SEB bağlantı bölgesini engellediği ve proliferasyonu %62 oranında azalttığı gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak antiserum

etkisinin, “KKKVANTAQEL” dizisi içeren sentetik SEB peptidi yakınlarında artış gösterdiği ve SEB kaynaklı proliferasyonun engellenmesinin en çok bu bölümde gerçekleştirildiği görülmüştür. Bu sentetik peptitlerin KLH ile konjugasyonu sonrasında tavşana subkutan olarak immünize edilmiş ve SEB kaynaklı proliferasyonun engellendiği gösterilmiştir. Ayrıca çalışmada, SEB’e mutasyonlar uygulanmış ve SEB’in aminotermal ucunun (9-23’üncü bölümler) MHC II ve TCR etkileşiminde önemli olduğu belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da direk SEB’in modifikasyonu ile MHC II ile bağlanma bölgesini engellemek ve süperantijen olan SEB’in immün sistem tarafından antijen olarak algılanması öngörülmüş ancak kısıtlı imkanlar nedeniyle SEB’in immünijenesini artırmaya yönelik yaklaşımlar optimize edilememiştir.

Metzroth ve arkadaşları da (Metzroth, 1993), SEB’in konformasyonu ve süperantijenik yapısını engellemeye yönelik bir çalışma ile 3 boyutlu yapının bozulmasını sağlayarak immünojenite sağlamışlardır.

Bu çalışmada SEB’in katyonizasyon reaksiyonu sonrasında karakterizasyonu için uygulanabilecek diğer bir yöntem rotofor ile izoelektrik noktasındaki değişimin incelenmesidir. Katyonizasyon ile izoelektrik noktasında beklenen artış nedeni ile iyon değiştirici kromatografi ile proteinin katyonize olmasına bağlı olarak nativ proteinden ayrılması beklenir. Türkiye’ye SEB toksininin gönderilmesi, bu toksinin biyolojik silah olarak kabul edilmesi nedeniyle kısıtlanmış olduğundan çalışmamızda toksin temininde zorluk yaşanmıştır. SEB miktarının yeterli olmayışından dolayı katyonizasyon reaksiyonunun başarısına yönelik uygulanabilecek olan iyon değiştirici kromatografik yöntem ve rotofor ile ayırıştırma ve analiz işlemleri gerçekleştirilememiştir.

6. SINIRLILIKLAR

Türkiye’de SEB toksininin ithalat yolu ile temin edilmesi, biyolojik silah olarak kabul edilmesi nedeniyle kısıtlandırılmış olduğu için çalışmalarımızda materyal sıkıntısı yaşanmıştır. Bu nedenle SEB’in immünojenitesinin artırılmasına yönelik farklı uygulamalar gerçekleştirilememiş, uygulanan deneylerde gerekli olduğu ön görülen optimizasyon işlemleri yeterli derecede yapılamamıştır.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

SEB'in modifikasyon sonrası enjeksiyonu ile immünizasyon etkinliği çalışmalarına başlanmadan önce nativ SEB ile immün yanıt elde edilmek üzere immünizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Daha önce yayınlanmış bazı çalışmalarda SEB'in hem immün yanıtı aktif edici (T ve myeloid hücreleri) hem de baskılayıcı (Treg aktivasyonu, T hücrelerinin anerjisi ve B hücrelerinin apoptozu) fonksiyonları bulunmuş ve bunun uzun süreli ve yüksek dozda SEB'e maruz kalma ile bağlantılı olabileceği tahmin edilmiştir. Bu çalışmalarda nativ SEB 10-100 µg arasında bir miktarda, adjuvanlı veya adjuvansız, değişik immünizasyon aralıklarında verilerek SEB'e antikor üretilebilmiştir. Yeterince SEB temin edilebilmesi halinde farklı dozların, farklı immünizasyon yöntemleri uygulanarak (adjuvanlı ve adjuvansız) farklı enjeksiyon bölgelerinden immünizasyon yapılarak anti-SEB antikorlarının üretilmesi kapsamında değerlendirilmesi mümkün olabilecektir. Mevcut imkanlar ölçüsünde uygulanan yöntemler ile sonuç alınamayınca modifikasyon çalışmaları başlatılmıştır.

SEB farklı kimyasallar (DTT, Guanidin HCl, CnBr) ve proteolitik enzim kullanılarak indirgenmeye çalışılmış, ancak sadece DTT-Guanidin HCl ile sınırlı düzeyde indirgenmesi mümkün olmuştur. Tek başına DTT ile indirgeme SEB'de beklenen sonucu sağlayamadığı için, diğer bir kıyasal olarak CnBr kullanılmıştır. Bu kesim için oluşturulan yöntemde CnBr ile proteinin yıkımı sağlanmış ancak fragmentler elektroforetik analizde gözlenemeyecek kadar küçük parçalara (>1000 dalton) bölünmüş, bu küçük parçaların immünojenite açısından yetersizliği göz önüne alınarak immünizasyonda kullanılamamıştır. Enzimatik yıkım yöntemi uygulanmak üzere kullanılan papain ile de SEB fragmentlerine ayıramadığı için immünizasyonda kullanılacak materyal sağlanamamıştır.

SEB'in indirgeme çalışmalarının dışında COOH gruplarının modifikasyonu ile molekül yapısı değiştirilmiştir. EDA-EDC kullanılarak gerçekleştirilen katyonizasyon işleminden sonra TNBS ile amin gruplarının sayısında belirlenen artışa bağlı olarak, MHC II ile etkileşiminin olumsuz etkilenmesinden kaynaklanacağı umulmuş ve farelere enjekte edilmiştir.

Çalışmalarda, farelerle yapılan immünizasyon planında; nativ SEB ile 3, nativ SEB ve SEA antijeninin birlikte verilmesiyle 3, DTT-Guanidin HCl ile 5, c SEB ile 5 kez immünizasyon gerçekleştirmiştir.

Bazı immünizasyonlar sonucunda bazı farelerin serumlarında gözlenen anti-SEB aktivitesi, ardışık immünizasyonlardan sonra tekrarlanan ELISA'larda kararlı biçimde yükselmediği için dikkate alınmamıştır.

SEB'in immün sistemde tanınmasını sağlamak için rekombinant (mutant enterotoksinler) antijenlerin geliştirilmesi ya da daha önce başka araştırmacılar tarafından üretilmiş ise bunların eldesi SEB hümmoral yanıt sağlanması açısından bir çözüm olabilir. Bu yöntemle süperantijenin non-spesifik olarak MHC-II, TCR ve B hücre reseptörü (BCR)'ne bağlanan aminoasit dizileri değiştirilecek (3 boyutlu yapısını değiştirmeyecek şekilde) fakat hala immünojenik olarak fonksiyon göstererek epitoplara özgül B ve T hücrelerini aktif hale getirebilecektir.

MHC II tetramerler enterotoksinlere in vitro kültür sisteminde bağlanır. Bu bileşim B hücreleri için immünojen olarak kullanılmak üzere fareler B subsetlerini aktif edecek adjuvanlarla (TLRs, cytokines, APCs, vb.) beraber immünize edilir. CD4 T hücrelerini aktif hale getirmek için de in vitro kültür sisteminde enterotoksin-pulsed dendritic cells (DCs) i.v. yöntemiyle farelere transfer edilebilir. Bu yöntemle enterotoksinlerin MHC II'ye bağlanan kısımları bloke edilmiş olur ve non-spesifik T hücrelerinin aktivasyonu en aza indirilmiş olur.

SEB-MHC II bağlantı bölgesindeki aminoasitlerden MHC II'deki lizin 39 ve SEB'deki glutamin 67'nin oluşturduğu tuz köprüsünün, bu protein kompleksine kararlılık sağlamasından yola çıkarak, tuz köprüsünün oluşumunu engellemek için radikal grubunda karboksil grubu olan bir aminoasit ile SEB'in immünizasyondan önce gerçekleştirilecek preinkübasyonu ile MHC II-SEB kompleksi bağlantı noktası gölgelenebilir ve protein kompleksinin stabilitesi azaltılabilir. Böylece süperantijenlere özgü olan, MHC II ile oluşturdukları bağlantı noktası kaybedilmiş olur ve parçaladığımız diğer SEB kısımları, konvansiyonel antijenlerin bağlandığı gibi bağlanarak immün yanıt sağlanabilir.

MHC II'deki lizin bağlanma bölgesinin, SEB'in yapısı dışındaki bir başka glutamin 67 aminoasidi ile bağlanmasını sağlamak SEB-MHC II bağlanma bölgesini gölgeleyebilir. Bunun için bazı ilaçların yapılış mantığı olan, kana belirli aminoasiti vererek oluşturulan tedavi yöntemi gibi, kana glutamin 67 aminoasiti vermek suretiyle serumda bu aminoasitin oranını arttırmak ve bu yolla kan serumunda artmış bulunan glutamin ile MHC II deki lizin ile bağlanmasını sağlamak, SEB-MHC II kompleksinin engellenmesi adına bir çözüm olabilir.

Çalışmamızda, CnBr ile kesimi gerçekleştirilmiş SEB proteininin oluşan küçük parçalarının; KLH (keyhole limpet hemocyanin), BSA (Bovine serum albumin) gibi belirli

proteinler ile konjuge edilmesi ile hapten oluşumu engellenebilir. Böylelikle vücudun antijen olarak kabul edebileceği bir yapı haline gelmiş olan proteinin immünizasyonu sonucunda antikor üretilmesi gerçekleştirilebilir.

Literatürde (Calvano, 1984), stafilokok kaynaklı toksik şok sendromuna neden olan TSST 1 toksin fragmentindeki bazı aminoasit dizilimlerinin, mitojenik aktivite göstermesiyle T hücre proliferasyonunu sağladığı belirtilmiştir. B Blomster Hautamaa ve arkadaşları (Blomster, 1986), bu etkiye sebep olan düzenleyici bölgenin 33 ve 158'deki iki metionin aminoasiti arasında bulunduğunu belirtmiştir. Lipman ve arkadaşlarının (Lipman, 1985) yapmış olduğu çalışmada bu bölgenin 91 aminoasitlik bir bölüm olduğu ve Valin 88 ile metionin 158 ile çevrelendiğini gösterilmiş, protein dizi benzerliklerini hızlı bir şekilde karşılaştıran (FASTP) bilgisayar programı ile bu bölgenin SEB ve SEA'da benzer bir şekilde bulunduğunu göstermiştir. Bu çıkarımlara göre, bu bölgelerin mitojenik aktiviteye neden olabileceği söylenebilir. Mitojenik aktiviteye neden olan bu bölgeye yapılan müdahale, T hücre proliferasyonun gerçekleşmesini önleyebilir.

Literatürde (Metzroth, 1993), proteinin N ve C terminal uçlarında gerçekleştirilen bir takım delesyonların sonucunda T hücre uyarımının engellendiği belirtilmiştir. Buelow ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada (Buelow, 1992), SEB'deki NH₂ terminal ucunun delesyonu halinde proliferasyonun oluşmayacağı gösterilmiştir. Protein parçalama yöntemlerinin kullanılması dışında, SEB proteinin özellikle C-terminal ve N-terminal bölümlerinde gerçekleştirilecek mutasyonlar SEB'in TCR ve MHC II etkileşim bölgeleri hakkında bize bilgi vermekle beraber, başarılı bir sonuç almamızı sağlayabilir. Belirli bölümlerinde oluşturulabilecek mutasyonlar ile MHC II ve SEB bağlantı bölgesine müdahale edilebilir.

Bin ve arkadaşlarının (Bin, 2010) yapmış olduğu çalışmada BALB/c farelerinin immünizasyonu SEA ve SEB'in birlikte verilmesi koşuluyla intraperitoneal, sonuncu bağışıklama şekli ise intrasplenik olarak gerçekleştirilmiş ve her iki antijene karşı antikor oluşumu sağlanmıştır. Biz her immünizasyonda intraperitoneal bağışıklama yöntemi kullanarak SEA ve SEB ile bağışıkladığımız BALB/c türü farelerden SEA'ya karşı aktivite elde ederken, SEB'e karşı aktivite elde edemedik. Dalak dokusuna yerleştirilen immünojen sonucunda dalak hücrelerinin büyümesi ile gerçekleştirilen intrasplenik immünizasyon yöntemini kullanmamız aktif sonuç almamızı sağlayabilir.

Johns ve arkadaşlarının (Johns, 1988) yapmış olduğu çalışmada stafilokok bakterilerin enterotoksin oluşumuna sebep olabilecek gen bölgeleri southern hibrit yöntemi ile belirlenmeye çalışılmış ve bu genin (ent B), bağlantılı genetik elementler ile birlikte, en az

28.8 kilobazlık bir DNA alanda olduğunu ve bir ent B elementinin, ent B geninin yaklaşık 1.5 kb aşağı yönünde olduğunu ortaya çıkarmıştır. Çalışmalarımız staphylococcus bakterisini kültürde çoğaltıp, enterotoksin üreten genin lokasyonunu bulmak üzerine yönlendirilebilir. Stafilokok bakterilerde bulunan stafilokok enterotoksin üretiminden sorumlu gene uygulanabilecek müdaheler sonucu, enterotoksin üzerinde modifiye gerçekleştirilebilir. Böylece süperantijenik özellik ortadan kaldırılabilir.

Jett ve arkadaşları (Jett, 1994) sentetik toksin peptit fragmentleri kullanarak yapmış oldukları çalışmada, SEB'in tüm aminoasitlerini barındıran ve her biri 30 aminoasit içeren 13 seri sentetik peptit ile içinde mononuklear hücreler ve T lenfositleri bulunan kültür ortamında T lenfositlerinin proliferasyonu incelenmiş ve çok sıkı korunmuş olan "KKKVTAQEL" dizisi ile çevrilen ya da bu diziyi içeren bölümlerin, T hücre proliferasyonunu etkisizleştirdiğini görmüştür. Literatürde, bu etkinin en çok tavşanın immün sisteminde gerçekleştirildiği bilgisi verilmiştir. SEB'in lenfosit proliferasyonun etkisizleştirilmesini sağlayan bölgeleri tespit edip bu bölgeleri, immünizasyon aşamasında kullanarak T lenfositlerinin proliferasyonunu durdurma yoluna gidilebilir. Ayrıca seçeceğimiz hayvanın BALB/c yerine tavşan olması, başarıya ulaşmamızı sağlayabilir.

Yee Shine ve arkadaşları, Spero ve arkadaşlarının (Spero, 1975) yapmış olduğu çalışmadan uyarladıkları SEB'in tripsin ile kesimini gerçekleştirmişlerdir. Kesim esnasında bizim uyguladığımız kesimlerden farklı olarak, SEB'i indirgeyip karboksiamidometilasyonundan sonra SEB'i iki sistin arasındaki moleküle; Lys-Thr'deki 97 ve 98. pozisyonlara duyarlı hale getirmiştir. Ayrıca Yee Shine ve arkadaşları, V8 proteoaz enzimi ile SEB'i küçük fragmentlere ayırmıştır. Larkin ve arkadaşlarının (Larkin, 2010) yapmış olduğu çalışmada da; SEB'deki histidin moleküllerinin karboksimetilasyonu gerçekleştirmiş, böylelikle yapılan modifikasyonun SEB'deki süperantijeniteyi minimize ettiği, enterotoksik etkiyi ortadan kaldırdığı belirtilmiştir. Çalışmamızda, SEB'in kesim uygulamalarından önce histidin aminoasitlerinin karboksimetilasyonunu sağlama yoluna gidilebilir. Literatürde mevcut olan bu gibi farklı kesim ajanlarını kullanmamız ve belirli aminoasitleri hedef alarak yaptığımız parçalama işlemlerini uygulamak, çözüm olabilir.

BALB/c dışında, fare türü olan CBA, C3H/HeJ, sıçan (Sprague-Dawley), dağ gelinciği, keçi ve tavşan gibi hayvanlarla immünizasyon gerçekleştirmek bir çözüm olabilir. Larkin ve arkadaşlarının (Larkin, 2010) çalışmalarında değindikleri bu hayvan ırkları, literatürde SEB'in immünizasyonu söz konusu olduğunda kullanılabilen BALB/c dışındaki çeşitli hayvan ırklarıdır. Çalışmamızda, immünizasyon için tercih edilen canlı

seçimini değiştirmek, immünizasyonun verimliliğini olumlu yönde etkileyecek bir yol olabilir.

Larkin ve arkadaşları (Larkin, 2010) yapmış oldukları çalışmada, Streptococcal ve Staphylococcal süperantijenler olarak belirtilen *Streptococcal pyogenes* ve *S. aureus* bakterileri suşlarının toksinlerinin, immün sistemde eş değer bir etkiye sahip olduklarını ortaya çıkarmışlardır. BALB/c fare türlerine, SEB ve streptococcus bakterisine ait toksinlerin birlikte verilmesi ile gerçekleşecek olan immünizasyon sonucunda, bu toksinler arasında MHC II bölgesine bağlanma sürecinde gerçekleşecek olan rekabet, yalnızca bir toksine karşı alınabilecek hümorale cevap oluşumu ile sonuçlanabilir. Böylelikle SEB enterotoksine karşı bir hümorale yanıt oluşumu söz konusu olabilir.

Alüminyum veya boehmite ve alüminyum hidroksifosfat gibi alüminyum içeren bileşiklerinin adjuvant olarak kullanımına, antijen emilmesinin istendiği durumda başvurulabilir. Son araştırmalar bu bileşiklerin farelerdeki T hücresi kümelenmesi stimülasyonu ve sitokin gen eksikliğinde kullanıldığını göstermiştir (Lindblad, 2004). Literatürde alüminyumlu bileşiklerin, IgE'yi stümule ettiği ve canlı içi (in vivo) ortam adjuvatları mücadelecisi durumunu açığa çıkardığı belirtilmiştir. Th1 tipi immün yanıtı teşvik etmek için aşılarda, IL-12 ile birlikte verilerek canlıda immün cevap oluşumunda kullanılır. Adjuvan olarak alüminyum ve boehmite alüminyum bileşiklerini kullanmak, antikor oluşumunu sağlayabilir.

Warren ve arkadaşlarının (Warren, 1974) yapmış olduğu çalışma ise SEB'in biyolojik aktivitesini bozmak için gerçekleştirilen disülfid ilmiğini yok etme esasına dayanmaktadır. 92 ve 112. sistin aminoasitlerindeki disülfid köprüsünün proteinin katlanma mekanizmasındaki önemini keşfetmişlerdir. Çalışmalarında tripsin, DTT gibi kesim işlemleri uygulamış sonrasında ise 8 M üre içinde iyodoasetamid ve iyodoasetik ile bir alkilizasyon işlemi uygulamışlardır ve sonucunda karboksimetillenmiş enterotoksin eldesi sağlanmışlardır. Sistin aminoasidine yönelik bu gibi kationizasyon işlemlerini deneyerek proteinin katlanma mekanizmasını önleyebilir, SEB'in immünijenitesini arttırmak amacıyla, bu yolla linear hale getirdiğimiz SEB'i parçalamaya yönelik işlemleri uygulayabiliriz.

Valcry Yu. Alakhov ve arkadaşlarının (Alakhov, 1992) yapmış olduğu çalışmada, SEB'in amino ucunun mitojenik aktiviteden sorumlu olduğu, sistin ilmiğinin içerdiği aminoasitlerin ise proteolize duyarlı olduğu belirlenmiştir. Çalışmada SEB aminotermal uçtaki aminoasit dizileri "Edman degradasyon yöntemi" kullanarak parçalanmıştır. Biz de, proteinlerin N-terminal ucunu kullanarak aminoasitleri tek tek elde etmeye olanak sağlayan

ve tekrarlayan kimyasal degradasyon döngüsüyle 20 aminoasitlik sekans yapmanın mümkün olduğu “Edman degradasyon yöntemi” ni kullanarak, literatürde mitojenik etkiden sorumlu olduğu belirtilen SEB amino ucuna müdahale edebiliriz. Böylece süperantijenik etkiyi ortadan kaldırabiliriz.

Literatürde SEB’in süperantijen olmasından kaynaklanan etkilerini ortadan kaldırmaya yönelik T hücrelerine uygulanan delesyon ya da kas içi, omurilik içi aşılama yöntemleri gibi çeşitli çalışmalar mevcuttur. Tseng ve arkadaşlarının (Tseng, 1995) yapmış olduğu çalışmada; SEB’in solunumsal toksikozu ve oluşturduğu toksik şok sendromuna bağlı hastalıkları engellemek için zerrecik halinde SEB toksini içeren aşı ile bu hastalıkları barındıran maymunlar aşılama gerçekleştirilmiştir. Toksik olmayan degrade edici poli (DL-lactide-co-glycolide) adjuvant zerrecikleri ve SEB toksini içeren yapıdan oluşturulmuş olan aşı ile SEB’in güçlü immünojen etki gösterdiği maymun türlerinde yüksek antikor oluşumu sağlanmaya çalışılmıştır. Bu çalışmada maymunların bir kısmı aşılama yapılmayıp bir kısmı için de mukozal ve mukozal olmayan aşılama yöntemi gerçekleştirilmiş ve her iki grup da hava yollu bulaşan yüksek öldürücü dozda SEB’e maruz bırakılmıştır. Aşı yapılan maymunların bir kısmına kas içi bir kısmına ise beyin omurilik sıvısına olmak üzere, mikrozerrecik halinde SEB içeren ek aşı yapılmıştır. Ek aşının beyin omurilik sıvısına uygulanmış olan maymunların, SEB’e karşı daha yüksek oranda antikor oluşturduğu, bunun sonucunda bu maymunların daha az hastalık oranına ve daha yüksek hayatta kalma süresine sahip olduğu görülmüş, koruyucu bağışıklığın dolaşımdaki ve solunum yollarındaki antikor seviyeleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Aşılama sonrası kanda, SEB-aktif olmayan T hücrelerinde belirgin bir şekilde azalma görülmemiştir. Bu çalışmanın sonucunda, mikrozerrecik olarak omurilik sıvısına yapılan ek aşılamanın, antikorun koruyuculuğunu ortaya çıkarttığını, antikorların, SEB ile havasal temas halinde, SEB’e karşı direnci arttırdığını göstermiştir. Williams ve arkadaşlarının (Williams, 1995) yapmış olduğu çalışmada ise aşılama yöntemi haricinde, T hücre V β 8⁺ bölgesine uygulanan delesyonlar ile BALB/c fare türlerinde SEB’e karşı humoral yanıt alınması sağlanmaya çalışılmıştır. Çalışmada, fare türlerinin SEB süperantijeni ile muamelesi sonucunda oluşan T hücre toleransı, canlı organizmadaki (in vivo) V beta 8+ T hücre bölgesinin delesyonu, dış ortamdaki (in vitro) ise T hücrelerinin enerjisi ile karakterize edilmiştir. SEB’in BALB/c türü farelere immünizasyon yolu ile verilmesiyle farelerin oluşturacağı humoral bağışıklıkla ilgili çalışma yapmışlardır. İlerki aşılama, SEB’e karşı spesifik antikor miktarının arttığını ve humoral cevabın hızlandığını görmüşlerdir. Bu gözlemler, ikincil humoral yanıtın özelliği olarak ifade edilmiştir. T hücreleri ile bağlantılı

ikincil yanıtın T hücrelerinin eksik olduğu farelerde görüldüğü, bu yanıtın IgM, IgG1 ve IgG2b antikor izotiplerinden oluştuğunu, Th hücrelerinin B hücrelerine antikor yanıt oluşturmada yardımcı olduğu gösterilmiştir. Dış ortamda (in vitro) yapılan çalışmada antikor yanıt alınamaması fakat aynı zamanda canlı içinde (in vivo) antikor yanıt alınabilmesinin nedeni olarak, canlıdaki gecikmiş tip hipersensitivitede B hücrelerine yardımcı olan T hücreleri (Th) etkili olduğu belirtilmiştir. Uygulayacağımız belirli delesyon ve omurilik sıvısı, kas içi gibi farklı bölgelere uygulayacağımız aşılama yöntemleri sonucunda başarı elde edilebilir.

KAYNAKLAR

- Abbas A., Lichtman A. (1997) Temel İmmünoloji. İstanbul Medikal Yayıncılık Ltd. Şti. 34104, İstanbul-Türkiye
- Aizenman E. et al. (1989) Neuro 2, 1257
- Alakhov V., Klinsky E., Sveshnikov P., Pozdnyakova L., Shemchukova O., Severin E. Kolosov M., Maurer I., Moskaleva E. (1992) Identification of functionally active fragments of staphylococcal enterotoxin B. Eur. J. Biochem. 209. 823-8288
- Antil N. J., Chorney V. (1967) Nature 214, 1028
- Apple j., Domen L., Muckerheide A., Michael G. (1988) Cationization of protein antigens, Vol. 140, 3290-3295, No. 10
- Atanassova V., Meindl A., Ring C. (2001) Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. J Food Prot, 63, 1144-1153.
- Behravesh, C, B. (2009) Public Health Risks of Consuming Raw Milk Products-Surveillance and Prevention Efforts in the United States.146 th Annual AVMA Convention, Raw Milk Conundrum, Seattle,WA – USA
- Balaban N., Rasooly A. (2000) Staphylococcal enterotoxins. International Journal of Food Microbiology, 61: 1-10.
- Bick Y. A. E., Jackson W. D. (1968) Nature 217, 479
- Bilgehan H. (2000) Klinik Mikrobiyolojik Tedavi. Baris Yayınları 3. Baskı, Bornova, İzmir.
- Bin L., Yongxia Z., Aiping L., Youxiang Z., Fusheng C., Xiaohong W. (2010) Production of a Monoclonal Antibody by Simultaneous Immunization of Staphylococcal Enterotoxin A and B. Appl Biochem Biotechnol DOI 10.1007/s12010-011-9177-3.
- Blomster-Hautamaa D. A., Novick R. P., Schlievert P. M. (1986) Localization of biologic functions of toxic shock syndrome toxin-1 by use of monoclonal antibodies and cyanogen bromide-generated toxin fragments. J. Immunol. 137:3572-3576
- Bohn E. W. et al. (1974) 174, Biochem. Biophys. Res. Commun.59, 243
- Buelow R., O'Hehir R. E., Schreifels R., Kummerehl T. J., Riley G., Lamb J. R. (1992) The Journal of Immunology, Vol 148, Issue 1 1-6, by American Association of Immunologists Localization of the immunologic activity in the superantigen Staphylococcal enterotoxin B using truncated recombinant fusion proteins
- Buzby J. C., Roberts T. (1997) Economic costs and trade impacts of microbial foodborne illness. World Health Stat Q 50, 57-66.
- Calvano S. E., Quimby F. W., Antonacci A. C., Reiser R. F., Bergdoll M. S., Dineen P. (1984) Analysis of the mitogenic effects of toxic shock toxin on human peripheral blood mononuclear cells in vitro. Clin. Immunol. Immunopathol. 33:99-110.
- Collier L., Balcows A., Susman M. (eds), Topley W. (1998) Microbiology and Microbial Infections . Noble WC. Staphylococcus Disease. New York: Oxford University:231.

- Cretenet M., Even S., Le Loir Y. (2011) Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. *Dairy Sci. & Technol.* (2011) 91:127–150
- Demirel N. N., Karapınar M. (2004) Incidence of *Staphylococcus aureus* and its enterotoxins in various cheeses sold at retail markets of Izmir city. *Akademik Gıda*, 2 (10) 25-28
- Ertaş N., Gönülalan Z. (2010) Kayseri İlinde Satılan Çiğ Sütlerde *Staphylococcus aureus* ve Enterotoksinlerinin Varlığı Üzerine Araştırmalar. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*
- Fower S. J. (1995) Use of monoclonal antibodies for Western blotting with enhanced chemiluminescent detection. In: Davis WC. (ed) *Monoclonal Antibody Protocols*. Humana Press, New Jersey: 115-127)
- Fraser J. D., Urban R. G., Strominger J. L., Robinson H. (1992) Zinc regulates the function of two superantigens. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89, 5507-5511.
- Fraser J., Arcus V., Kong P., Baker E., Proft T. (1993) superantigens- powerful modifiers of the immune system. *Cell*, Volume 74, Issue 3, 529 -540
- Gailis L. (1994) *Merck Index* 12, 3441.
- Genigeorgis C. A. (1989) Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *International Journal of Food Microbiology*, 9: 327-360.
- Gran H. M., Wetlesen A., Mutukumira A. N., Rukure G., Narvhus C. A. (2003) Occurrence of pathogenic bacteria in raw milk, cultured pasteurized milk and naturally soured milk produced at small-scale dairies in Zimbabwe. *Food Control*; 14: 539-544.
- Hau J., Hendriksen M., 2003. Production of monoclonal and polyclonal antibodies. *ILAR Journal* Vol 46 (3).
- Hermanson G. (2008) *Bioconjugate Techniques*. Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Rockford, Illinois, USA.
- Holeckova B., Holoda E., Fotta M., Kalinacova V., Gondol J., Grolmus J. (2002) Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 9 (2) 179-82
- Holmberg S. D., Blake P. A., Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. *J Am Med Assoc* 1984; 251: 487-489.
- Hovde C. J., Marr J. C., Hoffmann M. L., Hackett S. P., Chi Y. I., Crum K. K., Stevens D. L., Stauffacher C. V., Bohach G. A. (1994) Investigation of the role of the disulphide bond in the activity and structure of staphylococcal enterotoxin C1. *Mol. Microbiol.* 13 pp. 897–909.
- Huang Y., Bergdoll S. (1970) The Primary Structure of Staphylococcal Enterotoxin B, *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 245, No. 14, 3518-3525, U.S.A.
- Jett M., Neill R., Welch C., Boyle T., Bernton E., Gemski P. (1994) Identification of Staphylococcal Enterotoxin B Sequences Important for Induction of Lymphocyte Proliferation by Using Infection and Immunity, p. 3408-3415
- Jett M., Brinkley W., Neill R., Gemski P., Hunt R. (1990) *Staphylococcus aureus* enterotoxin B challenge of monkeys: correlation of plasma levels of arachidonic acid cascade products with occurrence of illness. Department of Molecular Pathology, Walter Reed Army Institute of Research, Washington, D.C. 20307-5100.
- Johns M. B., Khan S. A. (1988) Staphylococcal enterotoxin B gene is associated with a discrete genetic element. *J Bacteriol*, 170, 4033-4039.

- Jorgensen H. J., Mathisen T., Lovseth A., Omeo K., Ovale K. S, Loncarevic S. (2005) An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk Fems Microbiol Lett 15:252(2):267-72.
- Kaji E. H., Lodish H. F. (1993) J.of Biochemistry 2, 68(29), 22188-22194, 22195-22202
- Kalkan C., Rişvanlı A. (2002) İneklerde Stafilokokkal Mastitisler Üzerine Çalışma. Vel. Bil. Derg. 18.3: 51-56
- Keil-Dlouha V. (1971) Proteolytic activity of pseudotrypsin. FEBS Lett. 16, 291–95.
- Kısa Ö., Albay A., Erol İ ve ark. (1996) Kremalı pastalardan izole edilen koagülaz pozitif stafilokokkların enterotoksin oluşturma özelliklerinin VIDAS yöntemiyle belirlenmesi. Ankara Üniv Vet Fak Dergisi 43: 405-411
- Klonne D. R., Johnson D. R. (1988) Toxicol.Lett. 42, 199
- Koluman A., Unlu T., Dikici A., Tezel A., Akçelik E., Zeynep T., Burkan Z. (2011) Presence of *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Enterotoxins in Different Foods. Kafkas Univ Vet Fak Derg 17 (Suppl A): S55-S60
- Konigsberg W. (1972) Reduction of disulfide bonds in proteins with dithiothreitol, Methods Enzymol. 25 185–188
- Küplülü Ö., Sarımehtemoğlu B., Çelik T. H. (2004) Determination of the enterotoxigenicity of coagulase positive staphylococci isolated from cheese by ELISA. Milchwissenschaft, 59 (1/2) 17-19.
- Labrecque N., Thibodeau J., Sekaly RP. Interactions between staphylococcal superantigens and MHC Class II Molecules. Semin Immunol 1993;5(1):23-32.
- Larkin E., Krakauer T., Ulrich R., Stiles B. (2010) Staphylococcal and Streptococcal Superantigens: Basic Biology of Conserved Protein Toxins. The Open Toxinology Journal, 3, 69-81
- Le Loir Y., Baron F., Gautier M. (2003) *Staphylococcus aureus* and food poisoning. Genetics and Molecular Research, 2 (1) 63-76.
- Lindblad E. (2004) Aluminium compounds for use in vaccines. Immunology and Cell Biology 82, 497–505.
- Lipman, D. J., Pearson W. (1985) Rapid and sensitive protein similarity searches. Science 227:1435-1441.
- Lubitz V. (2005) K. J. E. Dag. Bioterrorism: Field Guide to Disease Identification and initial Patient Management, Taylor & Francis
- Mandell G. L., Bennett J. E., Dolin R. (2000) Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases. Waldvogel FA: *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). New York: hurchill Livingstone; 2069-2092.
- Metzroth B., Marx T., Linnig M., Fleischer B. (1993) Concomitant Loss of Conformation and Superantigenic Activity of Staphylococcal Enterotoxin B Deletion Mutant Proteins, 61(6): 2445–2452
- Mollick J. A., Chintagumpala M., Cook R. G. and Rich R. R. (1991) Staphylococcal exotoxin activation of T-cells. Role of exotoxin-MHC class II binding affinity and class II isotype. J. Immunol., 146, 463-468. Cell Immunol. 1990 Apr 15;127(1):67-77.
- Muckerheide A, Pesce AJ, Michael JG. (1990) Cationization of protein antigens. V. Effect of the degree of cationization on patterns of immune responsiveness, Cell Immunol. 1990 Apr 15;127(1):67-77.
- Munson S. H., Tremaine M. T., Betley M. J., Welch R. A. (1998) Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*, 66(7): 3337-48.

Nakazawa Y., Hosono A. (1992) Functions of Fermented Milk. Elsevier Science Published Ltd. 245 s, New York.

Nilson B. O., Larsson A. (1990) Intrasplenic immunization with minute amounts of antigen. Immunology Today Volume 11, 1990, Pages 10-12, Sweden

Normanno G., Firinu A., Virgilio S., Mula G., Dambrosio A., Poggiu A., Decastelli L., Mioni R., Scuota S., Bolzoni G., Di Giannatale E., Salinetti A.P, La Salandra G., Bartoli M., Zuccon F., Pirino T., Sias S., Parisi A., Quaglia M.C., Celano G.V. (2005) Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. Journal of Food microbiology;98:73-79.

ÖZTÜRK S. (2011) Süt ve Süt Ürünlerinde İstenmeyen Maddelerin Analizleri –Biyosensörler. <http://www.foodsektor.com> Syf: 22&Mkl:159885

Papageorgiou A., Tranter H., Acharya K.. (1998) Crystal structure of microbial superantigen staphylococcal enterotoxin B at 1.5 Å resolution: implications for superantigen recognition by MHC class II molecules and T-cell receptors. J Mol Biol, 277(1):61-79

Park Y., Cao Z., Zhou H. (2001) Reactivation Kinetics of Guanidine Hydrochloride-Denatured Creatine Kinase Measured Using the Substrate Reaction. Journal Of Protein Chemistry Volume 20, Number 1, 67-72

Picciolo G. L., Kaplan D. S. (1984) U.S. Pat.Appl. 619.325; Adv. Appl. Microbiol. 30.197

Rawlings N. D., Barrett A. J. (1994). "Families of cysteine peptidases". Meth. Enzymol. 244: 461–486.

Reynolds I. J. et al. (1990) Br. J. Pharmacol. 101, 178

Rice R. H. et al. (1977) Stabilization of bovine trypsin by reductive methylation. Biochem. Biophys. Acta 492, 316–21.

Sakai T., et al. (1983) British Journal of Industrial Medecine 40 (1), 61-66

Savransky V., Rostapshov V., Pinelis D., Polotsky Y., Korolev S., Komisar J., Fegeding K. (2003) Murine Lethal Toxic Shock Caused by Intranasal Administration of Staphylococcal Enterotoxin B Toxicologic Pathology, 31:373–378

Schad A. E. M., Zaitseva, Zaitsev V. N., Dohisten M., Kalland T., Schlievert P. M., Ohlendorf D. H., Svensson L. A., (1995) Crystal structure of the superantigen staphylococcal enterotoxin type The EMBO Journal vol.14 no.14 pp.3292-3301

Schroeder, W. A., Shelton J., and Shelton R. (1969) An Examination of Conditions for the Cleavage of Polypeptide Chains with CyanogenBromide.

Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV Jr. (1967). "Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.". Biochem Biophys Res Commun. 28 (5): 815–820.

Sokari T. (1991) Distribution of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat foods in eastern Nigeria. Int J Food Microbiol, 12, 275-280.

Spero L., Metzger J. F, Warren J. R, Griffin B. Y (1975) Biological activity and complementation of the two peptides of staphylococcal enterotoxin B formed by limited tryptic hydrolysis. Journal of Biological Chemistry 250:5026- 5032.

Stacey, A. (2000) Animal Cell Types, Hybridoma Cells, In: Encyclopedia of Cell Technology, Spier, R.E.(ed.), John Wiley & Sons Ltd., 83-89.

Stuart D., Levine M., Muirhead H., Stammers D. (1979) The crystal structure of cat pyruvate kinase at a resolution of 2.6 Å, J. Mol. Biol. 134, pp. 109–142.

Su Y. C., Wong A. C. L. (1996) Detection of staphylococcal enterotoxin H by an enzyme-linked immunosorbant assay. *Journal of Food Protection*, 59 (3) 327-330.

Stuart D., Levine M., Muirhead H. and Stammers D. (1979) The crystal structure of cat pyruvate kinase at a resolution of 2.6 Å, *J. Mol. Biol.* 134, pp. 109–142.

Tanbay E. (2010) Protein Ayırma Safılaştırma Yöntemleri, Elektroferez ve İki Yönlü Elektroferez. Yüksek Lisans Tezi. Erciyes Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü.

Taşcıl F., Sahindokuyucu F., Ozturk D. (2011) Detection of *Staphylococcus* species and staphylococcal enterotoxins by ELISA in ice cream and cheese consumed in Burdur Province

Tkaaikova L., Tesfaye A., Mikula I. (2003) Detection of the Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxin By PCR. *Acta Veterinaria Brno* 72: 627–630.

Tranter H.S., Brehm R.D. (1990) Production, purification, identification of the Staphylococcal enterotoxins. *J. Appl. Bacteriol. Sym. Suppl.* 109S-122S

Tseng J., Komisar J., Trout R., Hunt R., Chen J., Johnson A., Pitt L., Ruble D. (1995) Humoral Immunity to Aerosolized Staphylococcal Enterotoxin B (SEB), a Superantigen, in Monkeys Vaccinated with SEB Toxoid-Containing Microspheres, p. 2880–2885

Tünger A., Ulusoy S., Usluer G., Ünal S. (2005) Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara; 9- 68.

Uçan U. S., Aras Z., Zorlutuna M. (2010) Detection of canine brucellosis by a rapid agglutination test using *Rhizobium tropici* as antigen. *Revue Med Vet*, 161: 51-6.

Ulrich RG., Bavari S., Olson MA. (1995) Staphylococcal enterotoxins A and B share a common structural motif for binding class II major histocompatibility complex molecules, *Nat Struct Biol.*, 2(7):554-60.

Warren J., Spero L., Metzger J. (1974) Stabilization of native Structure By The Closed Disulfide Loop Of Staphylococcal Enterotoxin B. *Biochimica et Biophysica Acta*, 359 351-363

Wieneke A. A., Roberts D., Gilbert R. J. (1993) Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-90. *Epidemiology and Infection*, 110 (3) 519-531.

Wilkinson J. M. (1986) Fragmentation of Polypeptides by Enzymic Methods. In: *Practical Protein Chemistry: A Handbook*. A. Darbre, ed., John Wiley and Sons, New York, N.Y.

Williams A., Hudson M., Ramp W., Nicholson N., Nousiainen M. (1995) Internalization of *Staphylococcus aureus* by cultured osteoblasts. *Cilt 19, Basım 6, sayfa 409-419*

Wright, S.F. and A. Upadhyaya (1996) Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparison with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci.* 116611:: 557755--558855.

Yee-Shin Lin, Largen M. T., Newcomb J. R., Rogers T. J. (1988) Production and characterisation of monoclonal antibodies specific for staphylococcal enterotoxin B

Yotis W., Catsimpoolas N., Bergdoll Merlin S., and Schantz Edward J. (1973) Scanning Density Gradient Isoelectric Focusing of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins B and C₁. *Cilt 9, No. 5, U.S.A.*

Yücel F., Öztürk S., Başalp A., Akçael E. (2007) Hücre Füzyon Yöntemi ile Monoklonal Antikor Üretimi. Kocaeli, TÜBİTAK.

Zhang R., Snyder G. H. (1988) *Biochemistry* 27, 3785

www.kkgm.gov.tr

<ftp://ftp.kkgm.gov.tr/AB/Genel/>

<http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2002-63.html>

<http://arsiv.mmo.org.tr/pdf/10608.pdf>

<http://www.patentstorm.us/patents/4840714/fulltext.html>

<http://www.scribd.com/doc/31483907/Laboratuvar-faresi>

<http://www.mam.gov.tr/gmbe/index.html>

ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

- Adı Soyadı: Elif Yolaç
- Doğum tarihi ve yeri: 13.07.1984, Hamburg/Almanya
- Uyuşu: T.C.
- Medeni Durumu: Bekar
- İletişim Adresi: Şeker Evleri, 866. Sokak No:3, Sakarya.
- Telefon: Gsm: 0541 363 9695
- E-posta: elifyolac@gmail.com
- Yabancı Dili/Seviye: İngilizce/Upper Waystage II (Ref: Wall Street Institute)
- Bilgisayar Bilgisi/Seviye: Microsoft Office, Microsoft Word/İyi derece

2. Eğitimi (tarih sırasına göre)

- Şeker İlköğretim Okulu (1992-1996)
- Dr. Nuri Bayer Ortaokulu (1996-1999)
- Sakarya Anadolu Lisesi (1999-2003)
- Zonguldak Karaelmas Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2004-2009)
- Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik ve Moleküler Biyoloji Bölümü (2009-2012)
- Yeditepe Üniversitesi Sürekli Eğitim Merkezi (Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası) (2011)
- TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü (Hibridoma Teknolojisi ve Antikora Dayalı Tanı Sistemlerinin Geliştirilmesi Kursu) (2011)

3. Staj Bilgileri

- Embriyoloji (Tüp Bebek) Laboratuvarı/Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi
- Androloji Laboratuvarı/Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi
- Proteomiks Laboratuvarı/Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi
- Zooloji Laboratuvarı/Zonguldak Karaelmas Üniversitesi
- Tanı Teknolojileri Laboratuvarı/TÜBİTAK MAM GMBE

4. Sosyal Aktiviteler

- Toplum Gönüllüleri Vakfı (TOG)
- Tra-Kuş Gözlem Kulübü