

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

Yağ asiti Bağlanma Proteini 4 (FABP4/aP2)'e Karşı Monoklonal Antikorlar geliştirmesi

Afsar ABBASI TAGHİDİZAJ

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Erkan YILMAZ

Haziran

2016

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Afsar Abbasi Taghidizaj

İmzası

ONAY

Doç. Dr. Erkan YILMAZ danışmanlığında Afsar Abbasi Taghidizaj tarafından hazırlanan bu çalışma 24/06/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

İmza:

Üye: Doç. Dr. Erkan YILMAZ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Türker DUMAN

İmza:

Üye: Prof. Dr. Cemalettin AYBAY

İmza:

Üye: Doç. Dr. Aytakin AKYOL

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Yağ Asiti Bağlanma Proteini 4 (Fabp4/Ap2)'e Karşı Monoklonal Antikorlar
Geliştirmesi

Afsar ABBASI TAGHİDİZAJ

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Doç. Dr. Erkan YILMAZ

Rekombinant proteinler ve antikorlar, terapötik veya tanısal kullanımı için bir çok konakçı organizma da üretilmektedir.

Ölümsüz tek tip antikor hücre üretim tekniği, hedef moleküle karşı antikor üreten B lenfositler ve uygun myeloma hücrelerinin füzyonu ile gerçekleştirilmektedir. Kaynaşan melez hücreler (Hibridoma hücreleri), kanser hücreleri gibi hızla çoğalır ve istenen antikorları büyük miktarda üretebilir.

FABP4 ve aP2 olarak bilinen yağ asit bağlayıcı protein (FABP), en iyi karakterize edilmiş hücre içi lipid taşıma proteinlerden biridir ve yağ asitlerinin hücre içi ulaşım ve adipoz doku metabolizmasında anahtar rol oynamaktadır. FABP4 glukoz homeostazisini düzenleyen yeni bir adipokindir ve metabolik sendromun çeşitli özellikleri FABP4 tarafından obezite ile bağlantılı olduğu bilinmektedir.

Bu çalışmada, metabolik ve inflamatuvar yollarındaki merkezi rol alan ap2 lipid şaperonuna karşı monoklonal antikorların geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada FABP4 proteininin immunojenik molekülünün rekombinant DNA teknolojisi ile monoklonal antikor üretimi gerçekleştirilmiştir. Rekombinant His-FABP4 bakteriler içinde ifadenmiş, afinite saflaştırılması yapılmıştır. Bağışıklama için Balb/C dişi fareler kullanılmıştır ve antikor oluşum süreci enzime bağlı immünosorbent test (ELISA) sistemi ile takip edilmiştir. Daha sonra immünize olmuş dalak hücreleri ile

miyeloma hücresi füzyon edilerek hibrid hücre oluşturulmuştur. Hibrid hücreleri Balb/C karın boşluğuna enjekte ederek ascites elde edilmiştir.

Üretilen monoklonal antikorların aktivitelerini Western Blot ve İmmünohistokimya yöntemleri ile sorgulanmıştır. Sonuç olarak ürettiğimiz monoklonal antikorların, yağ asit bağlayıcı protein ve lipit metabolizması üzerinde başarılı bir şekilde çalışmıştır. Yakın gelecekte, bu antikorların metabolik sendrom için olası bir tedavi regimlerinde kullanım olasılıkları ve faydalı olacağı sorgulanacaktır.

Anahtar Kelimeler: FABP4, Rekombinant Protein, Western Blot, Monoklonal Antikor



ABSTRACT

PHD THESIS

DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST FATTY ACID BINDING PROTEIN 4 (FABP4 / AP2)

AFSAR ABBASI TAGHIDIZAJ

ANKARA UNIVERSITY BIOTECHNOLOGY INSTITUTE

SUPERVISOR: DOÇ. DR. ERKAN YILMAZ

Recombinant proteins and antibodies can be use for therapeutic or diagnostic purposes which produced in many different host organisms.

The technique for the production of immortal cell making single antibody, fusing target antibody-forming B lymphocyte precursor with a suitable myeloma cells. The fused hybrid cells (called hybridomas), as a cancer cell will reproduce rapidly and will produce large amounts of the desired antibodies.

Fatty acid binding protein (FABP4) is a well characterized intracellular lipid transport protein and plays a key role in the intracellular fatty acid transport and adipose tissue metabolism. FABP4 as a adipokine that regulates glucose homeostasis and has various features for metabolic syndrome associated with obesity.

In this thesis, we intended to develop of monoclonal antibodies against aP2, a lipid chaperone, that play a central role in metabolic and inflammatory pathway.

In this study, production of monoclonal antibodies against immunogenic FABP4 protein made by recombinant DNA technology. Recombinant His-FABP4 was expressed in e.coli and purified. Balb/C mice used for immunization and serum anti-FABP4 antibodies determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Hybridoma cells created by fusion of splenocytes and myeloma partner cells. After selection of antibody producing cell clones, injecting hybridomas into the peritoneal cavity in Balb/C mice ascites fluids was obtained.

We have selected fifteen hybridoma clones that produced antibodies specific for FABP4, as shown by western blotting and immunocytochemistry. As a result we produced MAbs that has

worked successfully and will be useful for the scientific community working on fatty acid binding proteins and lipid metabolism. In near future, therapeutic approach for this antibody maybe a possibility in metabolic syndrome.

Keywords: FABP4, recombinant proteins, Western blot, Monoclonal Antibodies, Hibridoma



TEŞEKKÜR

Teşekkürler Türkiye

Teşekkürler SARIKAMIŞ şehitleri

Teşekkürler ÇANAKKALE şehitleri

Teşekkürler ATAM, Teşekkürler PAŞAM

Doktora çalışmam boyunca hocalığının yanında dürüst kişiliği ile semimi bir arkadaş gibi her zaman yanımda olan Doç. Dr. Erkan YILMAZ'dan çok teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasında gerek bilgi ve önerileriyle gerek yardımseverlikleri ve hoşgörülerıyla katkılarını esirgememiş olan, Yrd. Doç. Dr. Doruk ENGİN'e, Gülizar Aydoğan'a, Benan Pelin SERMİKLİ'ye, Alperen TUNCER'e ve Pelin KOLÇAK'a çok teşekkür ederim.

Aileme (Rahmetli babam, annem, eşim ve kardeşlerime) çok teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmayı proje olarak destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)"ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

<u>ETİK BEYAN</u>	<u>i</u>
<u>İÇİNDEKİLER.....</u>	<u>viii</u>
<u>ŞEKİLLER DİZİNİ.....</u>	<u>XV</u>
<u>ÇİZELGELER DİZİNİ.....</u>	<u>XVIII</u>
<u>SİMGELER DİZİNİ</u>	<u>XX</u>
<u>1. GİRİŞ</u>	<u>1</u>
<u>2. KURAMSAL TEMELLER.....</u>	<u>3</u>
2.1. YAĞ ASİT TAŞIYICI PROTEİNLERİ (FABPs)	3
2.1.1. YAĞ ASİT TAŞIYICI PROTEİN (FABP4).....	5
2.1.2. YAĞ ASİDİ BAĞLAYICI PROTEİN(FABP4): OBEZİTE, İNSÜLİN DİRENCİ VE METABOLİK SENDROM	7
2.2. REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ	10
2.3. GEN TRANSFERİ	11
2.4. GEN İZOLASYONU	11
2.5. GENİ TAŞIYACAK UYGUN ARAÇ; VEKTÖRLERE AKTARIM	12
2.5.1. PLASMİD VEKTÖRLER	12
2.5.2. BAKTERİYOFAJLAR	13
2.5.3. KOZMİD VEKTÖRLER	14
2.6. LİGASYON	15
2.7. TRANSFORMASYON.....	15
2.8. İSTENİLEN GENİ TAŞIYAN BAKTERİLERİN SEÇİMİ (SELEKSİYON).....	16
2.9. PROTEİN İFADESİNİN İNDÜKLENMESİ.....	17

2.10. PROTEİN SAFLAŞTIRMASI	18
2.11. ANTİKOR TEKNOLOJİSİ.....	21
2.11.1. İMMUN SİSTEM	21
2.11.2. ANTİJENLER.....	22
2.11.3. ANTİKORLAR	24
.2.11.4 ANTİKOR SENTEZLENMESİ.....	26
2.11.4.1. Yan Zincirler Teorisi	26
2.11.4.2. Kalıp Teorisi (= Direktif Teori).....	27
2.11.4.3. Klonal Teori (= Selektif Teori, Doğal Klon Seçimi).....	27
2.11.5. ANTİKOR ÇEŞİTLİLİĞİNİN GENETİK TEMELİ.....	28
2.11.5.1. Her farklı antikor sentezi için bir gen (çok gen teorisi).....	29
.2.11.5.2 Somatik mutasyon teorisi.....	29
2.11.5.3. Somatik rekombinasyon teorisi	29
2.11.6. ANTİKOR SINIFLANDIRMASI.....	31
2.11.7. POLİKLONAL ANTİKORLAR.....	33
2.11.8. MONOKLONAL ANTİKORLAR	34
2.11.8.1. Kimerik Antikorlar	37
2.11.8.2. İnsansı Antikorlar	38
2.11.8.3. İnsan Antikorları	39
2.11.8.3.1. Faj Gösterim Tekniği.....	40
2.11.8.3.2. Transgenik Fare Tekniği.....	41
2.11.9. İMMUNOJEN HAZIRLANMASI.....	42
2.11.10. ADJUVAN SEÇİMİ.....	43

2.11.11. ENJEKSİYON.....	44
2.11.12. BAĞIŞIKLAMA (İMINUNİZASYON)	45
2.11.13. ANTİKOR GÖRÜNTÜLEME (SCREENİNG)	45
2.11.14. ANTİKOR TİTRASYONU	46
2.11.15. MYELOMA HÜCRELERİ.....	46
2.11.16. KAYNAŞTIRMA (FUSİON) İŞLEMİ VE HİBRİD OLUŞUMU.....	47
2.11.17. ANTİKOR ÜRETİMİNİN KONTROLÜ.....	48
2.11.18. ANTİKOR İZOTİPLENDİRMESİ	48
2.11.19. HİBRİDLERİN KÜMELENDİRİLMESİ (KLONLAMA), SAKLANMASI VE FAZLA MİKTARDA ÜRETİLMESİ	49
2.11.20. ÇAPRAZ REAKSİYON(CROSS-LİNKİNG):	49
2.11.21. U937 HÜCRE HATTI.....	50
2.11.22. AFİNİTE ETİKETLER VE ÖZELLİKLERİ	50
2.11.22.1. Afinite etiketleri.....	51
2.11.22.2. Çözünürlük etiketleri	51
<u>3. GEREKÇE VE AMAC.....</u>	53
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	55
4.1. MATERYAL	55
4.1.1. GENEL REAKTİFLER	55
4.1.2. KULLANILAN FABP4 ÖRNEKLERİ.....	55
4.1.3. PZR REAKTİFLERİ.....	56
4.1.4. RESTRİKSİYON ENZİMLERİ	57
4.1.5. GUANİDİN DNA SAFLAŞTIRMA PROTOKOL BİLEŞENLERİ	57
4.1.6. BAKTERİ KÜLTÜR ORTAMI VE BESİYERİ	57

4.1.7. BAKTERİ SUŞLARI VE PLAZMİTLER.....	58
4.1.8. TRANSFORMASYON, PLAZMİT İZOLASYON REAKTİFLERİ	58
4.1.9. PROTEİN PURİFİKASYON, DESALTING PROTOKOLÜ	59
4.1.10. PROTEİN İZOLASYON VE TAYİN REAKTİFLERİ.....	60
4.1.11. FARELER	60
4.1.12. HAYVAN İMMUNİZASYONU	60
4.1.13. ELİSA ÇÖZELTİLERİ	61
4.1.14. HİBRİDOMA REAKTİFLERİ	61
4.1.15. SDS-PAGE'DE AYIRMA VE YIĞMA JEGİ	61
4.1.16. JEL ELEKTROFOREZ YÜRÜTME TAMPONU	62
4.1.17. WESTERN REAKTİFLERİ.....	62
4.1.18. ANTİKOR TIPLENDİRME REAKTİFLERİ.....	63
4.1.19. İMMÜNOSİTOKİMYA VE İMMÜNOHİSTOKİMYA REAKTİFLERİ	63
4.2. YÖNTEM.....	64
4.2.1. PET28A VEKTÖRÜNDEN HEDEF GENİN ÇOĞALTILMASI.....	64
4.2.1.1. Primer tasarımı.....	64
4.2.1.2. PZT reaksiyonu	64
4.2.1.3. Agaroz Jelde Yürütme	65
4.2.1.4. Guanidin DNA Saflaştırılması.....	65
4.2.1.5. Plazmit ve PZT ürünlerinin kesilmesi	66
4.2.1.6. Ligasyon.....	66
4.2.1.7. Moleküler transformasyon.....	67
4.2.1.8. Kültür stoklanması.....	67

4.2.1.9. Transformasyon	68
4.2.1.10. Alkalen lizis midi prep ile plazmid izolasyonu	69
4.2.1.11. Agoroz jel elektroforezi	69
4.2.2. MONOKLONAL ANTİKOR ÜRETİMİ	70
4.2.2.1. BL-21 hücre lizatı hazırlanması.....	70
4.2.2.2. Protein konsantrasyon tayini.....	70
4.2.2.3. Affinite Kromatografisi ile Protein Saflaştırması.....	71
4.2.2.4. Protein desalting protokolü.....	72
4.2.2.5. Antijen Hazırlanması	72
4.2.2.6. Bağışıklandırma	72
4.2.2.7. Antikor titrasyonu(ELİSA).....	73
4.2.2.8. Fareden dalak alınması	74
4.2.2.9. Besiyeri hazırlanması.....	74
4.2.2.10. Makrofaj eldesi	75
4.2.2.11. Füzyon	75
4.2.2.12. Klon saptanması ve seçimi	76
4.2.2.13. SDS(sodyum dodesil sülfat) poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)	76
4.2.2.14. Örneklerin hazırlanması, yüklenmesi ve yürütülmesi	77
4.2.2.15. Coomassie boyaması.....	77
4.2.3. WESTERN BLOT.....	77
4.2.3.1. SDS-PAGE jelin dökülmesi.....	77

4.2.3.2. Örneklerin hazırlanması.....	78
4.2.3.3. Jele örneklerin yüklenmesi ve yürütülmesi	78
4.2.3.4. Proteinlerin PVDF membrana transferi	79
4.2.3.5. Membranın bloklaması	79
4.2.3.6. Birincil antikor uygulaması	79
4.2.3.7. İkincil antikor uygulaması	80
4.2.3.8. Membranın görüntülenmesi.....	80
4.2.4. İMMÜNOSİTOKİMYA(ICC) VE İMMÜNOHİSTOKİMYA(IHC).....	80
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	83
5.1. REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİLMESİ	83
5.1.1. FABP4 GENİNİN NÜKLEOTİT VE AMİNO ASİT DİZİSİ.....	83
5.1.2. FABP4 GENİNİN ANTİJENİK BÖLGELERİN TESPİTİ.....	84
5.1.3. PET28A VEKTÖRÜNDEN FABP4 BÖLGESİNİN ELDESİ.....	85
5.1.4. PROTEİN PURİFİKASYON ÜRÜNLERİNİN SDS-PAGE SİSTEMİNDE GÖZLENMESİ	87
5.1.5. PROTEİN PURİFİKASYONU	88
5.2. ANTİKOR TABANLI BULGULAR.....	90
5.2.1. ANTİKOR TİTRASYONU	90
5.2.2. HİBRİDOMA OLUŞUMU	91
5.2.3. ELISA TESTİ VE KLON ELDE EDİLMESİ.....	92
5.2.4. ASCİTES SIVISINDAN WESTERN BLOT.....	94
5.2.5. ASCİTES SIVISININ FABP4 AİLESİNDEN OLAN FABP5,6 ÖRNEKLERİNİN ÇAPRAZ REAKSİYON TESLTLERİ.....	95
5.2.6. ANTİKOR İZOTİPLENDİRMESİ	97
5.2.7. İMMÜNOSİTOKİMYA(ICC) VE İMMÜNOHİSTOKİMYA(IHC).....	98

<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>102</u>
6.1. TARTIŞMA VE SONUÇ	102
<u>7. KAYNAKLAR</u>	<u>109</u>
<u>8. EKLER.....</u>	<u>125</u>
<u>9. ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>127</u>
<u>10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>128</u>



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Lak operon ve düzenleyici genleri(93)	17
Şekil 2.2. Antikor yapısı(114)	25
Şekil 2.3. Klonal seçim teori şeması(117).....	28
Şekil 2.4. Somatik rekombinasyon şeması(121)	30
Şekil 2.5. Antikor sınıflandırması(125).....	31
Şekil 2.6. Hibridoma hücre oluşturma basamakları(130)	36
Şekil 2.7. kimerik antibadi(mavi; antijene bağlanan fare kökenli değişken bölge, kırmızı; efekör fonksiyonu gösteren insan kökenli sabit bölge)(132).....	37
Şekil 2.8. İnsansı antibadi(Fab kolundaki ağır ve hafif zincirlerin uç kısımlarındaki (CDR)(137).....	38
Şekil 2.9. İnsansı veya CDR-aşılı antikor(132).....	39
Şekil 2.10. İnsan antikor(132)	40
Şekil 2.11. O= Fare, Xi= Kimerik, Zu= İnsanlaştırılmış, U= İnsan. Örneğn; fare antikorlu olan tositumomab, kimerik olan rituximab, insanlaştırılmış olan bevacizumab ve tam insan antikorlu olan panitumumab(143).	42
Şekil 2.12. Hibridoma Üretimi(155).....	47
Şekil 4.1. pET28a Vektör Haritası(174).....	56
Şekil 5.1. FABP4 geninin nükleotit dizisi(178)	83
Şekil 5.2. FABP4 amino asit dizisi(179).....	83
Şekil 5.3. FABP4 protein dizisinin EMBOSS web sitesinde antijenik bölge analizi(180)	84

Şekil 5.4. pET28a vektöründen elde edilen FABP4 touch down PZT %2'lik jel görüntüsü	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 5.5. hap2 kloni tarama.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 5.6. plazmid izolasyonu	86
Şekil 5.7. Kolonleri IPTG ile indükleyerek elde edilen protein lizatlarından SDS-PAGE	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 5.8. BL21 22°C' üreme eğrisi grafiği ve optimal indükleme zamanı ve bulanıklığı..	88
Şekil 5.9. His Pur Ni-NTA ile saflaştırılan rekombinant proteini	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Şekil 5.10. Yukarıdaki ölçülen standart verileri kullanılarak Excel dosyasında Standart Eğri grafiği $f(x) = ax + b$ şeklinde çizdirilmiştir. Standart eğri grafiği (BCA sonucunda elde edilen değerler ile excell'de çizilmiştir.)	90
Şekil 5.11. Füzyon ve klon oluşturan hücreler	92
Şekil 5.12. a)Ascites oluşması b)Ascites oluşmadan önce.....	93
Şekil 5.13. A/a2 klonu	94
Şekil 5.14. A/c1 klonu	94
Şekil 5.15. A/c2 klonu	94
Şekil 5.16. B/f6 klonu	95
Şekil 5.17. B/f5 klonu	95
Şekil 5.18. C/c8 klonu	95
Şekil 5.19. B/f6 klonu	95
Şekil 5.20. B/f5 klonu	96

Şekil 5.21. C/b8 klonu.....	96
Şekil 5.22. A/a2 klonu	96
Şekil 5.23. A/c2 klonu	96
Şekil 5.24. C/c8 klonu	96
Şekil 5.25. Antikor izotiplendirme deneyi sonucu plate görünümü.....	97
Şekil 5.26. U937 hücrelerine uygulanan C/c8 antikor(20X).....	98
Şekil 5.27. U937 hücrelerine uygulanan C/c8 antikor(20X).....	99
Şekil 5.28. U937 hücrelerine uygulanan B/f6 antikor(20X).	99
Şekil 5.29. U937 hücrelerine uygulanan B/f6 antikor(20X).	100
Şekil 5.30. U937 hücrelerine uygulanan A/a2 antikor(20X).....	100
Şekil 5.31. U937 hücrelerine uygulanan A/a2 antikor(20X).....	101

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Hücre içi FABP ailesi	4
Çizelge 2.2. Bakteri hücrelerinin çözülmesinde kullanılan bazı yöntemler.....	19
Çizelge 2.3. Monoklonal antikor üretimi için kullanılacak hayvanların yaşları	44
Çizelge 2.4. Farklı hayvan türlerinde bir bölgeye enjekte edilecek antijen-adjuvan karışımının maksimum hacimleri	45
Çizelge 4.1. pET28A vektör özellikleri	55
Çizelge 4.2. Genel PZT protokolü	56
Çizelge 4.3. Genel PZT Sıcaklık dongusu	57
Çizelge 4.4. Guanidin bazlı saflaştırma tamponu	57
Çizelge 4.5. LB sıvı besiyeri içeriği	58
Çizelge 4.6. LB katı besiyeri içeriği.....	58
Çizelge 4.7. Transformasyonda kullanılan TSS içeriği ve protokolu	59
Çizelge 4.8. Alkalen lizis I çözelti protokolu.....	59
Çizelge 4.9. Alkalen lizis II çözelti protokolu.....	59
Çizelge 4.10. Alkalen lizis III çözelti protokolu	59
Çizelge 4.11. Rekombinant proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan His afinite etiketi... 60	
Çizelge 4.12. Bakteriyel protein izolasyonu çözeltisi	60
Çizelge 4.13. Farklı hayvanlarda antijen/adjuvan miktarı(mililitre) ve yolu	61
Çizelge 4.14. % 12'lik ayırma jeli.....	62

Çizelge 4.15. %5'lik Hizalama jeli	62
Çizelge 4.16. 5X jel elektroforez yürütme tamponu	62
Çizelge 4.17. 1 X transfer tamponu.....	63
Çizelge 4.18. Sekonder antikor içeriği	63
Çizelge 4.19. FABP4 dizisine tasarlanan primerler	64
Çizelge 4.20. Touch down PZT koşulları	65
Çizelge 4.21. Restriksiyon enzim ile gerçekleşen kesim protokol bileşenleri	66
Çizelge 4.22. Ligasyon protokol bileşenleri.....	67
Çizelge 4.23. Antijen türüne göre miktar ve adjuvan.....	72
Çizelge 4.24. Bağışıklandırma evresi.....	73
Çizelge 5.1. FABP4 proteininden 6 antijenik bölge tespiti.....	84
Çizelge 5.2. İmmünizasyon sonrası ELİZA testi	91
Çizelge 5.3. Elde edilen hibrid hücre supernatantından ELISA değerleri	92
Çizelge 5.4. Antikor izotiplendirmesi sonucu spektrofotometrede ölçülen değerler	97

SİMGELER DİZİNİ

APS	Ammonium per sulfate
ASCT2	Nötral amino asit taşıyıcısı
cDNA	Komplementer DNA
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment Crystallizable Region
HAT	Hypoxanthine-aminopterin-thymidine
FABP4	Fatty Acid Binding Protein
HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
Ig	İmmünoglobulin
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani broth
MCS	Multiple Cloning Site
mRNA	mesajcı Ribo Nükleik Asit
PEG	Polietilen glikol
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TEMED	Tetramethylethylenediamine
sIgA	Salgısal İmmunoglobulin A
VEGF:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
RXR:	Retinoid X Reseptörü
PAI-1:	Plazminojen Aktivatör İnhibitor
Tip-1 PI3K:	Fosfatidil İnozitol 3-kinaz

PKA:	Protein Kinaz A
NF-κB:	Nükleer Faktör kappa B
NF-κB-IKK:	Nükleer Faktör Kappa B İnhibitor Kappa Kinaz
LXR:	Liver X Reseptor
MAP Kinaz:	Mitojen Aktive Eden Protein Kinaz
iNOS:	İndüklenebilen Nitrik oksit sentaz ve COX2
JNK/ IKK:	c-Jun N-Terminal Kinaz / İnhibitor Kappa Kinaz
HSL:	Hormon Duyarlı Lipaz
IGF-1:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IL-1:	İnterlökin-1
IL-6:	İnterlökin-6
IRS-1:	İnsülin Receptor Substrat-1
İHK:	İmmunohistokimya
AMP-K:	Adenosine Monofosfat Aktive Eden Protein Kinaz
A-FABP:	Adiposit Yağ Asidi Bağlayıcı Protein
E-FABP:	Epidermal Yağ asidi Bağlayıcı Protein
ELISA:	Enzim Bağlı İmmunosorbent Ölçüm
COX-2:	Siklooksijenaz-2

1. GİRİŞ

Hücrelere yağ asiti trafiği kompleks ve dinamik bir işlemdir ve hücrel fonksiyonlar üzerinde etkilidir. Yağ asitleri, enerji kaynağı ve metabolik düzenlemeler için sinyal niteliğindedir ve “Yağ asiti bağlanma proteini” (FABP) denen bir aracı vasıtasıyla taşınırlar (1,2). FABP’ler 14-15 kDa ağırlığında çok miktarda eksprese edilen proteinlerdir. Tersinir olarak hidrofobik ligand’lara bağlanırlar, doymuş ve doymamış uzun-zincir yağ asitleri, Eikozanoid’lere ve diğer lipidlere yüksek afinite ile bağlanırlar (3,4). Özellikle adipöz ve makrofaj yağ asiti taşıyıcı proteinleri (A-FABP ve E-FABP), obezite, diyabet ve ateroskleroz gibi metabolik hastalıkların oluşumunda merkezi bir rol oynar (5,6).

Adiposit ve makrofaj FABP’leri, metabolik ve enflamatuar yolları ile bağlantılıdır. Bu FABP’ler; obezite, insulin direnci, tip 2 diyabet, yağlı karaciğer, ateroskleroz ve astım üzerine etkileyici etkiler göstermektedir(7).

A-FABP(FABP4)’si genetik olarak silinmiş fare modelinin metabolik sendromun etkilerine karşı korunduğu deneysel kanıtlarla gösterilmiştir. Bu yüzden A-FABP’nin fonksiyonlarının değiştirilmesi yada durdurulması metabolik sendromun komponentleri olan insulin direnci, tip-2 diyabet, ve ateroskleroz’un farmakolojik ajanlarla tedavi edilmesi şansını ortaya çıkarmıştır. Küçük molekül kimyasal inhibitörlerle metabolik hastalıkların önlenmesi ve tedavi edilmesi yolunda başarı sağlanmıştır (8–10).

Son yıllarda monoklonal antikorların dünya ilaç pazarındaki artışı ve bu artışın 1997-2011 arasında yaklaşık %44 arasında olduğu görülmektedir. Ayrıca dünya ilaç pazarının yaklaşık %10’un monoklonal antikorların oluşturması bu sektörün ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. 2013 yılında ilaç sektöründeki monoklonal antibadi pazarı 75 milyar Amerikan dolarına ulaştı ve 2020 yılında bu rakam 125 milyar dolar tahmin edilmektedir. (11).

Laboratuvar hayvanlarında antikor (Abs) üretimi birçok araştırma projelerinin vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir. Amaç, bağışıklanan hayvanların refahı ile tutarlı bir şekilde yüksek titreli, yüksek afiniteli bir antiserumun elde edilmesidir (12). Hibridoma teknolojisi ile hücre soylarının oluşturulması ve monoklonal antikorların sentezlenme yöntemi 1975’te

César Milstein, Georges Köhler ve Niels Jerne tarafından mümkün kılınmıştır. Hücre kültüründe gelişen bu hibrid hücreler sadece tek bir antijenik yapıyı tanıdıklarından seçicilikleri yüksektir. Bu özelliklerden dolayı monoklonal antikorların kullanım alanları çok geniştir. Bu antikorlar tedavi, tanı ve araştırma amaçlı olarak kullanılmaktadır (13). Monoklonal antikorlar genellikle standart tedavilere de ek olarak klinik faydaları gösterilmiştir (14).

Biyoteknolojinin temeli olan Rekombinant DNA Teknolojisi, bir genomdaki binlerce gen içerisinde tek bir genin ayırt edilmesini, tanımlanmasını ve DNA molekülü olarak klonlanmış bu genin büyük miktarlarda üretilmesini mümkün kılmaktadır. Antikorlar, enzimler, proteinler, antijenler ve daha bir çok biyolojik ürün bu teknoloji ile üretilmektedirler (15,16).

A-FABP'ye karşı geliştirilecek olan monoklonal antikorlar gibi biyolojik ajanlar hassas şekilde bu proteini tanıyacak ve bağlanacaktır. Metabolik sendromlu olgularda A-FABP seviyelerinin ölçülmesine dayanan bir test sistemi oluşturmak çok önemli bir belirteç olabilir ve hatta ileride bu moleküllerin tedavi amaçlı kullanılması mümkündür.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Yağ Asit Taşıyıcı Proteinleri (FABPs)

Yağ asidi bağlayıcı proteinler (FABPs) hücre içi lipid şaperonları olarak hücrelerde lipid cevabını düzenleyen ve aynı zamanda metabolik ve inflamatuvar yolları ile güçlü bir şekilde bağlantılı bir grup moleküllerdir (17). FABP protein ailesi bütün memeli hücrelerinde çok miktarda ifade olan 14-15 kDa sitoplazmik proteinlerdir (18). FABP'ler yüksek afinite ile doymuş ve doymamış uzun zincirli yağ asitleri (karbon sayısı 14'den fazla olan), eikozonoidler ve diğer lipidler gibi hidrofobik ligandlara geri dönüşümlü olarak bağlanırlar. Yağ asidi trafiği hücre fonksiyonu çeşitli yönlerden etkileyen karmaşık ve dinamik bir süreçtir. 1972'de keşfedilen FABP'lerin dokuz tipi tanımlanmıştır (17-19). FABP'ler hücreyi fazla miktarda yağ asitlerinden koruyarak membran bütünlüğünü sağlarlar. Ayrıca hücrede yağ asitlerinin ve diğer yağ arabulucularının taşınmasını da gerçekleştirirler (4,20,21).

Birincil yapılarına rağmen, bütün Intracellular lipid binding protein (İLBP)'ler üçüncül yapıları yüksek ölçüde korunmuş vaziyette bulunmaktalar. Bu protein ailelerinde paraloglarda %25 ve Ortologlarda ise %90 dizi benzerliği bulunmaktadır. Ortak yapısal özelliği bakımından paralel olmayan iki 5'li teller toplam 10-şeritli beta-variller istiridiye şeklinde ve iki kısa alfa heliks bağlanma boşluğu oluşturmaktadırlar. Portal alanı olarak kabul edilen bu cisim açılması ile tüm İLBP'lerde ortak bir yapısal motif oluşturan sarmal dönüşlü heliks N-terminal etki alanı görünmektedir. Anti paralel 10 telden oluşan bu kovan İLBP'lerin belirgin özellikleri olarak kalisin üst familyası içinde yer alan lipid bağlayıcı protein boşluğu oluşturmaktadırlar (22,23).

Tirozin ve Serin-OH bağlarının ve su molekülünün yanısıra, İLBP paketi ligandların karboksil grubunu protonlaştırarak bir veya iki arjinin bölgesinden elektrostatik etkileşimi ile boşluk bölgesinde oturmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte, bireysel İLBP-türleri arasında önemli farklar, kinetik bağ ve afinite ile birlikte ligandların taşınmasını da etkilemektedir. İLBP'ler boşluğunda olan su, ligandların bağlanması için gereklidir.

Yağ asit bağlayıcı proteinler (FABPs), çok yönlü proteinler olarak hücrelerdeki lipid akışı, trafiği, sinyalizasyon ve metabolizmasını modüle etmektedirler. Genel olarak FABP'lerin

spesifik bir liganda seçiciliği yoktur ve afiniteleri ligand hidrofobisitesi ile ilişkilidir. FABP'ler sitoplazmada lipid yapıdaki ligandları bağlar, çekirdeğe taşır ve PPAR ailesine kanalize ederek ilgili genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesini sağlarlar (24,25).

Adipoz farklılaşma markeri olan FABP4 ifadesi özellikle insülin ve insülin-benzeri büyüme faktörü 1(IGF-1), deksametazon ve yağ asitleri ile indüklenmektedir ve peroksizom proliferatör aktive reseptör γ (PPAR γ) aktivasyonu için negatif rol oynamaktadır (26). FABP4'ün mRNA'sı transkripsiyonel olarak insulin, yağ asitleri ve " peroksizom proliferatör aktive reseptör-gama (PPARg) agonistleri tarafından kontrol edilmektedir. FABPs ayrıca transkripsiyonel programları aracılığı ile lipitleri nükleer reseptörü olan PPAR'lara sunarak lipid algılama ve tepki mekanizmaları ile ilişkilendirilmiştir (27).

Farklı organlar, dokular ve hücre tiplerinde tespit edilen FABP ailesinin başlıca 9 üyesi tablo 2'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Hücre içi FABP ailesi

GEN	ADI	ALTERNATİF ADLARI	EKSPRESE OLDUĞU DOKULAR
FABP1	Liver FABP	L-FABP	Karaciğer, barsak, pankreas, böbrek, akciğer, mide
FABP2	Intestinal FABP	I-FABP	Barsak, karaciğer
FABP3	Heart FABP Mammary derived growth inhibitör	H- FABP MDGI	Kalp, iskelet kası, beyin, böbrek, akciğer, mide, testis, aorta, adrenal bez, meme, plasenta, over, kahverengi yağ dokusu
FABP4	Adiposit FABP	A-FABP aP2	Adiposit, makrofaj, dentritik hücreler
FABP5	Epidermal FABP Keratinosit FABP Psoriasis associated FABP	E-FABP K- FABP PA-FABP mal1	Deri, dil, adiposit, makrofaj, dentritik hücreler, meme, beyin, barsak, böbrek, karaciğer, akciğer, kalp, iskelet kası, testis, retina, lens, dalak
FABP6	Ileal FABP Ileal bile acid-binding protein	Il-FABP, I-FABP, Gastrotropin Gastrotropin	İleum, over, adrenal bez, mide
FABP7	Beyin FABP MDIG-related gene	B-FABP MRG	Beyin, glia, retina, meme
FABP8	Myelin FABP Periferik myelin protein 2	M-FABP PMP2	Periferik sinir sistemi, schwann hücresi
FABP9	Testis FABP	T- FABP	Testis, tükrük bezi, meme

2.1.1. Yağ Asit Taşıyıcı Protein 4 (FABP4)

Bu yağ asit bağlayıcı protein, adiposit, ALBP, AFABP, yağ asit bağlayıcı protein 4 (FABP4), adiposit lipit bağlama proteini, adiposit tipi yağlı asit bağlayıcı protein olarak tanımlanmıştır. FABP4 geni 4 ekson ve 3 introndan oluşmuştur. İnsan adiposit yağ asidi bağlayıcı protein geninin (FABP4) Somatik Hücre Hibrid ve Floresan in situ hibridizasyon teknikleri kullanarak 8q21'de lokalize bir gen olduğu belirlenmişti. FABP4 14-15 kD sitoplazmik proteinlerdir ve 132 amino asitten oluşmaktadır(28,29).

A-FABP (FABP4, aP2) yağ dokusunda, monosit ve makrofajlarda yüksek miktarda ifade olan küçük lipid bağlayıcı proteindir (17,30). FABP4 tüm FABP ailesi içinde en iyi karakterize edilmiş ve dikkat çeken biyolojiye sahip izoformdur. Adipositler makrofajlardan 10000 kat daha fazla FABP4 ifade ederler. İntrasitoplazmik lipid şaperonu olan FABP4 aktif karaciğer glikoz metabolizmasını kontrol etmek için kan akışına salgılanmaktadır (93). Ayrıca, FABP4 metabolik ve inflamatuvar yanıt sistemleri ile bütünleşmektedir (94). Bu proteinin ifadesi adipositlerin farklılaşması sırasında büyük ölçüde düzenlenir ve mRNA'sı transkripsiyonel olarak insulin, yağ asitleri ve PPAR γ agonistleri tarafından kontrol edilmektedir(17).

PPAR'lerin üç izoformu (α,β,γ) lipid metabolizması ve enerji homeostazısında önemli rol almaktadırlar. Adipositlerde, A-FABP'in PPAR γ aktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir (31,32). PPAR ailesinin her üç üyesine bağlanan ligandlar, çoğunlukla NF- κ B'yi baskılayarak, proinflamatuvar sitokinlerinin üretimini önlemektedir. PPAR'ler gibi, LXR lipid metabolizmasının düzenlenmesi için bir şekilde karşılıklı inflamatuvar aracılardan üretimini engellemektedir (33). Bu yolak ile bağlantılı ve lipid yanıtlarını koordine eden diğer lipid şaperonlar ise adipositler ve makrofajlardır. Adiposit ve makrofajlarında yağ asidi bağlayıcı proteinler (FABPs) ap2 ve MAL1 (FABP5)'den yoksun hayvanlar, PPAR γ ligandları ile tedavi edilen fare ve insanların fenotipinde benzerlik göstermektedir. Bu FABPs ve PPAR'lar lipidlerin biyolojik etkilerini kontrol etmesi benzer yollar üzerinde hareket olabileceğini akla getirmiştir (34,35).

Ayrıca hormon duyarlı lipaz ile etkileşerek katalitik aktivitesini düzenlemektedir. Bunun dışında c-Jun N-terminal kinases (JNK) / inhibitor of kappa kinase (IKK) ve adipositteki

insülin aktivitesi yoluyla enflamatuar yanıtları inhibe eden birçok sinyal yolağına entegre olmaktadır. A-FABP, yağ asidi girişini düzenlemenin yanında uzak hedef dokularda etki eden adiposit lipid hormon üretiminin kontrolünde de önemli rol oynar (17). Makrofajlarda A-FABP proteini, IKK/NF-kB yolağı ile enflamatuar etkisinin yanında PPAR γ inhibisyonuna neden olur. Farelerde A-FABP yokluğunda makrofajlarda birçok proenflamatuar sitokin (TNF α , IL1b, IL6, MCP-1 gibi) ve enzimlerin (iNOS, COX2 gibi) üretiminin ve fonksiyonunun azaldığı gösterilmiştir (17,36).

FABP4 proteinlerinin metabolik ve inflamatuvar yolaklarındaki rolü; metabolik sendrom, kronik inflamasyon ve obeziteyle ile bağlantılı olduğu hayvan çalışmalarında gösterilmiştir (37). FABP4 eksikliği olan farelerde makrofajlardan kolesterol çıkışının arttığı gösterilmiştir. Hem makrofajlarda hem de adipositlerde özellikle de endoplazmik retikulumda, lipid sinyallerini organel yanıtına entegre etme açısından A-FABP'in rolü önemlidir. A-FABP eksikliği olan farelerde, genetik veya diyete bağlı obezite durumunda, hiperinsülinemi ve insülin direncinin düştüğü gösterilmiştir (8,17). Ancak A-FABP'in insülin duyarlılığı üzerine etkileri zayıf farelerde görülmemiştir. Obezlerde yağ dokuda makrofaj infiltrasyonunun artması bu farklılığın nedeni olabilir. A-FABP eksikliğinde TNF- a, IL1b, IL6 gibi inflamatuvar sitokinlerin ve iNOS ve COX2 gibi proinflamatuvar enzimlerin üretimi baskılanmaktadır(17,38).

A-FABP yağ hücrelerinden salınır ve kan dolaşımında bol miktarda bulunmaktadır. Ancak dolaşımdaki aktivitesi tartışılmaktadır. Yüksek serum A-FABP düzeylerinin obezite, meme kanseri gelişimi ve prognozu ile ilişkili olduğu bazı çalışmada gösterilmiştir (39). Mesane tümörlerinde, A-FABP ekspresyonunun azalması tümör evresi ve derecesi ile ilgili buluşlar vardır (40). Adipositlerde A-FABP'in kaybı, E-FABP'in artan ekspresyonu ile kompanze edilmektedir. Ancak bu kompanzasyon makrofajlarda görülmemesi ile birlikte yeterli olmadığı söylenmektedir (18). E-FABP normal yağ dokusunda çok az oranda bulunur. A-FABP eksik olan farelerden elde edilen adipositlerde lipolizin *in vivo* ve *in vitro* etkinliği azalmıştır. İlk başlarda bunu sebebini A-FABP'in hormon duyarlı lipazı bağlama ve aktive etme yeteneğinden kaynaklandığı düşünülse de, *in vivo* deneylerinde henüz kanıtlanmamıştır (41). A-FABP eksikliğinde bu potansiyel mekanizmanın lipolizi nasıl değiştirdiği de bilinmemektedir.

A-FABP'in dendritik hücrelerde de ifade edildiği gösterilmiştir. Makrofajlarda total A-FABP eksikliği, apolipoprotein E eksikliği olan farelerde ateroskleroza karşı ciddi bir koruma sağlamıştır. Yüksek kolesterol içeren batı diyetlerinin verilip verilmemesiyle bu durum değişmemektedir. AFABP eksikliğini ateroprotektif etkisinin predominant olarak makrofaj içindeki fonksiyonlarından kaynaklandığı kemik iliği transplantasyon çalışmaları ile gösterilmiştir. Bu çalışmalar A-FABP'in metabolik ve enflamatuar yanıtları entegre etme yeteneği ve makrofajlarda ve adipositlerdeki farklı aktiviteleri sayesinde metabolik sendromun komponentlerinin gelişmesinde merkezi bir rol oynadığını göstermiştir (17).

FABP'ler lipid ligandları PPAR'lerine ileten proteinlerdir. Sitoplazmada lipid yapıdaki ligandları bağlar, çekirdeğe taşır, PPAR ailesine kanalize ederek ilgili genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesini sağlarlar. Adiposit FABP'ler PPAR γ , kalp ve karaciğer tipleri PPAR γ ile, epidermal tip ise PPAR α ile etkileşir (42,43).

Adiposit Yağ asit bağlayıcı protein (FABP4), metabolik ve enflamatuar yolları düzenleyen ve fare modellerinde inhibisyonu, tip 2 diabetes mellitus ve ateroskleroza iyileştirebilir. FABP4 proteini aktif yağ hücreleri tarafından salgılanır ve obezite ile düzeyleri artmaktadır. İnsanlarda, dolaşımdaki FABP4 seviyeleri obezite, metabolik hastalıklar ve kardiyak fonksiyon bozukluğu ile ilişkili olarak artmaktadır (44).

FABP4 protein ifadesinden yoksun farelerde yağ hücrelerinin lipolizi azalmaktadır. Ancak FABP4 ifadesi artmış transgenik farelerde yağ hücrelerinin lipolizi artmaktadır. Ayrıca genetik olarak FABP4' den yoksun farelerde (obezitenin genetik veya diyetten kaynaklanmayan) obezite kaynaklı insülin direncinde önemli derecede korunma görülmektedir (95, 96). Buna ek olarak, şiddetli hiperkolesterolemi modelinde FABP4 eksikliği açık bir şekilde aterosklerotik lezyon oluşumunu azaltmaktadır (97).

2.1.2. Yağ Asidi Bağlayıcı Protein(FABP4): Obezite, İnsülin direnci ve Metabolik Sendrom

Geçtiğimiz 50 yıl içinde, insan obezite oluşumu dünya çapında muazzam bir şekilde artmıştır. Obeziteden etkilenen ülkeler sadece Yüksek gelirli ülkeler değil aynı zamanda gelişmekte olan ülkelerde de endişe verici bir artış görülmektedir. Son dönemde insan

obezitesindeki görülen artış, fazla enerji alımı ve azalan enerji harcaması ile salığa zararlı adipoz dokunun artışı ile sonuçlanmıştır (45).

Son zamanlarda düşük dereceli metabolik uyarımı ve kronik inflamasyon çeşitli metabolik bozukluklarda; obezite, insülin direnci, tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalık dahil olmak üzere bir çok hastalıkta rapor edilmiştir (46). Ayrıca obezite, metabolik sendrom (MS), tip 2 diyabet (T2D), ailesel kombine hiperlipidemi, lipodistrofi sendromları ve kardiyovasküler hastalarında plazmadaki FABP4 konsantrasyonunun arttığını göstermiştir (47).

Metabolik sendrom; insülin direnci, obezite, diabetes mellitus (DM) , dislipidemi (HL), hipertansiyon (HT) ve koroner arter hastalığı (KAH), hipertansiyon gibi sistemik bozuklukların birbirine eklendiği ölümcül bir hastalıktır. Adiposit/makrofaj yağ asit bağlayıcı protein 4 (FABP4) adipozite ve metabolik sendrom için belirteç olarak (MS) bilinmektedir (48).

Metabolik, enflamasyon ve doğuştan gelen bağışıklık süreçleri lipidler tarafından koordine edilir ve düzenlenir. Birkaç transkripsiyon faktörleri, özellikle peroksizom proliferatör aktive reseptör-(PPAR) ve karaciğer X reseptörü (LXR) ailesi, bu yolağın modüle edilmesinde önemli oldukları görülmektedir. Bu transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu makrofajlar ve adipositlerdeki iltihaplanmaya karşı çeşitli genlerin ekspresyonunu inhibe eder (49).

Metabolik sendrom; obezite, insülin direnci, tip 2 diyabet, hipertansiyon, dislipidemi ve ateroskleroz gibi enflamatuvar anormallikler kümesidir. FABP4'ün inflamasyon, obezite, metabolik sendrom, Tip 2 Diyabet (Diabetes Mellitus) ve insülin direnci ile ilişkili olduğunu gösteren araştırmalar bulunmaktadır (50). Deneysel çalışmalar, obez sıçanlarda FABP'ların sistemik glukoz metabolizması ve insülin etki mekanizmasını düzenlediğini göstermektedir. FABP4 eksikliğinin sıçanlarda obezitenin indüklediği insülin direncine ve Tip 2 Diyabete karşı koruyucu olduğu belirlenmiştir (51).

Adipositlerde depolanmış olan trigliseritler Hormone-sensitive lipase(HSL) veya hormona duyarlı lipaz aracılığıyla yağ asitleri ve gliserole dönüştürülür. Yağ asitleri birçok

organizma için önemli enerji kaynağıdır. Artmış glukoz sıklıkla yağ asidine çevrilerek biriktirmektedir. Adipoz doku enerji hemoztazisinin önemli bir düzenleyicisi ve insülin dirençliliğinin gelişiminde rol oynaması özelliği ile bilinmektedir (52,53). Adipoz dokuda inflamasyon oluşumu, insülin dirençliliği gelişiminde en önemli faktörlerden biri olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (54,55).

Yağ doku kitlesinin artması ve buna paralel olarak gelişen insülin direnci ile birlikte lipolizin artması adipoz dokusundan serbest yağ asiti ve sitokinlerin salınmasına, sonuç olarak glukoz alımının azalmasına ve hepatik glikoz üretiminin artmasına sebep olmaktadır. Bu daha sonra insülin direncini telafi etmek için insülin salgılanmasını teşvik etmektedir. Hiperinsülinemi ayrıca reseptör duyarsızlaştırma yoluyla hedef bölgelerde insülin direncini artırır ve dolaylı olarak lipogenesis üzerindeki etkileri göstermeye başlamaktadır. Bu kısır döngü sonunda; kronik hiperglisemi, hasarlı glukoz ile uyarılmış insülin salgılanması (β -hücre patolojileri) ve diyabet gelişimine neden olur.

Obez farelerin adipoz dokusundan aşırı ifade olan tümör nekroz faktörü alfa'nın (TNF- α) bulunmasından sonra, obezite, diyabet ve kronik inflamasyon arasındaki olan bağ belli olmuştur (56). TNF-alfa, bir proinflamatuvar sitokindir ve insülin etkisinin önleyicileri gibi birçok çeşitli sinyal iletim basamaklarını aktif etmektedir. Obez fare modellerinde TNF-alfa'nın fonksiyon eksikliği, insülin duyarlılığı ve glikoz dengesinde gelişme göstermiştir. Bu durum, enflamatuvar cevabı, obezitede insülin etkisinin düzenlenmesinde önemli rolü sahiptir. TNF-alfa, aynı zamanda obez insanların adipoz ve kas dokularında aşırı miktarda ifade olmaktadır ve dışarıdan uygulandığında insülin direncine neden olmaktadır (57–59).

Obezitenin diyabet ve insülin direnci ile yakın ilişkide olduğu uzun süredir bilinmektedir. Tip 2 diyabeti olan bireylerin %80'inden fazlasında obezite görünmektedir ve obez bireylerin çoğunluğu insülin ve glikoz metabolizmasında çeşitli derecelerde anormallikler göstermektedir. Tip 2 diyabet gelişimi sırasında, sistemik insülin direncinin, kütle ve insülin bozukluğu etkisinin ilk önce kas dokularında görüldüğü sebebi ile dikkatler kas üzerinde yoğunlaşmıştır. Ama genetik kemirgen modellerindeki son çalışmalar adipoz doku ve pankreatik adacıklarının sistemik insülin direncinin ve tip 2 diyabet gelişimini etkileyen baskın dokular olduğunu ortaya koymuştur (60–64). Bu fikir doğrultusunda, ap2 (adipoz yağ asit bağlayıcı protein) genetik eksikliği olan farelerde bulunmuştur. Ap2

ifadesi farklılaşan adipoz ve aktif makrofajlarda tespit edilmiştir. Obezite diyet modelinde, aP2 eksikliği esas olarak insülin duyarlılığına sebep olmaktadır (9,65).

Yapılan mutant hayvan deneylerinde aP2 eksikliği gösteren hayvanların metabolik bozukluklarının olmadığını göstermiştir. aP2^{-/-} fareler yüksek kalorili ve yağlı diyetle sokulduklarında ise kontrol farelerine göre daha fazla kilo almalarına rağmen ilginç bir şekilde insülin direnci ve diabet görülmemiştir (8).

2.2. Rekombinant Protein Üretimi

Rekombinant DNA teknolojisi; son yıllarda bilim insanlarının ilgisini kazanmış DNA tabanlı önemli bir araçtır. Rekombinant DNA teknolojisi, verici bir konaktan genleri tanımlamak, izole etmek, manipüle etmek, ve yeniden ifadelendirmek gibi amaçları olan bir teknolojidir. İlgili genin izole edilmesi ve çoğaltılması metoduna, genin klonlanması denilmektedir. Klonlama ile ilgili gen bölgesini, canlı organizmalarda kendi kendine çoğalabilen vektör, plasmit ya da virus gibi taşıyıcılar içerisine sokarak rekombinant DNA oluşturulmuş olunur (66).

Rekombinant DNA molekülleri prokaryotik ya da ökaryotik bir konak hücreye yerleştirilir. Konak hücrenin çoğalması ile birlikte hedeflenen gen bölgesini içine almış vektör de çoğalır. Böylece, konaktaki yabancı DNA molekülü sayıca artmış olur (67). Bu teknoloji ile konak organizmaya girmiş iki farklı türden DNA moleküllerinin bir araya gelmesi ile tıpta, tarımda ve endüstride bir değeri olan yeni genetik kombinasyonlar üretilir. Bu şekilde kes-yapıştır teknolojisi olan yönteminin farklı amaçları olabilir. Bilinen gen ürünlerinin fonksiyonu ve regülasyonu ile ilgili temel anlayışlar geliştirmek, hücre içi genetik bozuklukları düzeltmek, hastalığa duyarlı konaklarda yabancı genler ifadelemek, geniş kullanımlar için çok miktarda protein üretmek rekombinant teknolojisinin amaçlarından bazılarıdır (67,68).

Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilen proteinlere rekombinant protein adı verilmektedir. Rekombinant protein teknolojisi özellikle ilaç sektöründe yoğun olarak kullanılmaktadır. Diyabet, hemofili, hepatit, miyokard infarktüs ve çeşitli kanserler gibi dikkat çeken hastalıklar rekombinant terapötik üretimine dahildir. İnsülin gibi basit protein

ile başlayarak daha sonra büyüme hormonu rekombinant biyofarmasötik ilaçlar son yıllarda oldukça artmıştır.

Rekombinant protein üretiminin başarılı olmasını sağlayan bir diğer faktör ise taşıyıcı sistemin belirlenmesidir. Günümüzde rekombinant protein üretimi amacıyla kullanılmakta olan bakteri, maya, böcek ve memeli hücre hatlarına kadar geniş çeşitlilikte taşıyıcı ve protein üretici sistemler bulunmaktadır. En önemli iki rekombinant biyomoleküller, insulin ve eritropoietin, sırasıyla E. coli ve Chinese hamster ovary (CHO) hücreleri kullanılarak elde edilmiştir. Rekombinant protein teknolojisi ile yüksek kalitede ve saflıkta aynı zamanda kısa sürede ve düşük maliyette protein elde etmek bu teknolojinin ne kadar öneme sahip olduğunu göstermektedir.

2.3. Gen Transferi

Genetik mühendisliği tekniklerinden faydalanarak genetik materyalin temeli olan deoksiribonükleik asidin (DNA) yapısına belirli uzunlukta özel gen dizilerinin nakledilme işlemine gen transferi denmektedir. Gen transferi teknolojisinin önemi moleküler biyoloji ve genetik mühendisliği alanında yapılan çalışmalar ile birlikte günden güne artmaktadır. Bu teknoloji sadece akademik araştırmalarda kullanılmamakta, aynı zamanda endüstriyel uygulamalarda giderek artan ve gelişen bir teknoloji ile yerini almaktadır. Rekombinant protein teknolojisi ile gen transferi yaparken dört temel adımdan geçilir (69,70).

2.4. Gen İzolasyonu

Rekombinant DNA teknolojisinde, canlı hücreleri bazı kimyasal maddeler ve enzimler kullanarak hücre zarını yıkıp DNA'nın ortaya çıkma işlemidir. Geni taşıyan DNA parçalarını elde etmek için yapılan işlemdir. Bu yöntemle ilgilenilen geni taşıyan DNA parçaları elde edilmektedir (71). Hedeflenen gen bölgesini klonlamak için konak hücreden sekansın izole edilmesi gerekir. Toplam haberci RNA (mRNA) izolasyonundan sonra komplement DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilir. Bir diğer izolasyon yöntemi olarak gen kütüphanlerini kullanarak etiketlenmiş gen kopyası ve mRNA dizisine sahip olunursa, bütün genomdaki klonlar arasında araştırılan geni içeren klon saptanabilir (70,72).

2.5. Geni Taşıyacak Uygun Araç; vektörlere aktarım

Mikroorganizmalar arasında gen klonlamasında bir çok aracı moleküllerden (vektör) yararlanılmaktadır. Bunların amaca yönelik ve bilinçli olarak seçilmesi ve kullanılması gereklidir. Özellikle, restriksiyon haritalarının, baz sıralarının, gen fonksiyonlarının, hücre içi replikasyon mekanizmalarının, spesifik markerlerinin, vs. diğer özelliklerinin çok iyi bilinmesi ve tanınması klonlamanın başarısı için ilk adımı oluşturmaktadır. Gen klonlamasında başlıca 3 temel vektörden yararlanılmaktadır (73).

2.5.1. Plasmid Vektörler

Bazı prokaryotik (bakteriler) ve ökaryotik organizmalarda (maya, filamentöz mantar, mavi algler, vs.), hücrenin büyük kromozomundan ayrı olarak sitoplazma içinde ya serbest olarak (plasmid) veya hücre kromozomu ile birleşmiş halde (episom), DNA karakterinde ekstrakromozomal genetik elementler bulunmaktadır (73).

Kromozomdan bağımsız olarak, kendi kendini replike edebilen, çift sarmallı, halkasal DNA molekülüne plasmid denir. Plazmitler bakterilerin hayati fonksiyonları kontrol eden genler haricinde esansiyel olmayan genler içerirler. Plazmitler genellikle bakterilerde bulunurlar; ancak çok nadir olarak *Saccharomyces cerevisiae* gibi ökaryotik hücrelerde de bulunabilirler. 1.000 ile 1.000.000 baz çifti uzunluğu arasında değişmektedirler. Bağımsız olarak hücre bölünmesinde kendisini eşleyerek çoğalabilir ya da plazmit önce ana DNA'ya kaynaşabilir, sonra hücre bölünmesi ile birlikte çoğalabilir. Ancak bu kaynaşma sırasında hücrenin bazı özellikleri etkilenmektedir (74,75).

Genetik biliminde kullanılan bu plazmitlere vektör adı verilir. İfadeleme, uygun genetik altyapıya sahip bir vektör kullanılarak tetiklenmektedir. İfade vektörlerinin genetik elementleri replikasyon orijini (ori), antibiyotik direnç belirteci, transkripsiyonel promotorlar, translasyon başlangıç bölgeleri (TIRs) ve transkripsiyonel ve translasyonel sonlandırıcılarıdır (76,77).

Heterojenik protein üretilmesi için kullanılan sistemler arasından, gram- negatif bakteri *E.coli* ile çalışmak bir çok organizmaya göre tercih sebebidir. Hızlı büyümesi, ucuz

koşullarda yetiştirilmesi, genetik alt yapısının çözümlenmesi, klonlama vektörlerin rahatlıkla çoğalması ve mutant akrabalarının bulunması bu teknolojiye kullanılma nedenlerindedir (76,78).

En çok kullanılan plazmitlerden pBR322, ampisilin ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı immnun bölgeler içerirler. 6000 baz çiftine kadar DNA molekülünü taşıyabilirler. pET ekspresyon vektörleri de pBR322 plazmitinden türemiştir. Klonlama ve E.coli'de *in vivo* rekombinant protein ifadenmesi için yaygın olarak kullanılan ekspresyon vektörlerden bir tanesi de pET ekspresyon sistemleridir. Bu vektörlerin yaygın olarak kullanılma nedeni, T7 bakteriyofaj genine sahip olmasıdır. Bu genin kodladığı T7 RNA polimeraz ile yüksek seviyede transkripsiyon ve translasyon yapılması tetiklenmektedir. pET vektörleri antibiyotik dirençlilik geni, lacI genine ve T7 promotor ve lac operatörüne sahiptir. Bu sistemde, ilgili bölgenin protein kodlayan kısmı T7 promotorunun ve 10 leader dizisinin aşağı kısmına klonlanır ve E. coli suşlarına transforme edilir. T7 RNA polimerazın lacUV5 promotorundan ifade edildiği kromozom entegre kasetin isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ile indüklenmesi ile protein ifadenmesi sağlanır.

Protein ifadenmesi için kullanılacak bir diğer yöntem polimeraz ifadeleyen bakteriyofaj lambda CE6 ile hücreyi enfekte etmektir. T7 RNA polimeraz suşlarda olmadığı için klonlanmış hedef genin bazal ifadenmesi oldukça düşüktür. IPTG, vektörde aktif T7 RNA polimeraz çalışmasının tetikleyerek, konağın RNA polimerazı ile transkripsiyon açısından yarışır. Böylece, hedef protein birkaç saat içerisinde hücre içerisindeki ifadelenen proteinlerin çoğunu oluşturacaktır. Lac represör (LacI) T7 RNA polimerazın promotora gidip bağlanmasını engeller. İlgili genin proteine dönüşmesi için IPTG varlığında LacI'nın bağlı olduğu operatör DNA dizisinden düşer ve bunun yokluğunda, T7 RNA polimerazın T7 promotorunu tanması ile transkripsiyon başlar. Eğer bakteri orta log büyüme fazında indüklenirse (OD600nm 0.6-0.9), protein maksimum seviyede üretilmektedir (79–81).

2.5.2. Bakteriyofajlar

Bakteriyofajlar bakterileri enfekte eden virüsler olarak diğer bir klonlama vektörüdür. Uzunluk olarak plazmidlerden daha büyük DNA parçalarının klonlanmasında

kullanılmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisinde en sık kullanılan fajlardan birisi olan lambda fajının genom büyüklüğü 50 kilobaz olup bunun yaklaşık 20 kb lık bölümü klonlamada kullanılabilir (82,83).

Fajların bir çoğu kendi konakçılarında lizis (virulent fajlar) meydana getirmelerine rağmen diğer bir kısmı içinde buldukları bakterilerde herhangi bir zarar verici etkiye bulunmazlar (Örn. E. coli 'ye ait lambda fajı, C. diphtheriae ait beta fajı, vs.). Bu tür fajlar bakterinin genomu ile kaynaşır ve onun bir devamı haline gelerek birlikte ve eş zamanlı olarak replike olurlar. Her hücre bölünmesi sırasında bakteri DNA'sı ile birlikte kardeş hücreye aktarılır (profaj). Lambda fajı ve beta fajı birer profajdır.

Vektör olarak, genellikle, E. coli 'ye ait fajlardan (Lambda, M13. vs.) ve ayrıca fajmid ve kosmidlerden de yararlanır (82,84).

2.5.3. Kozmid Vektörler

Kozmid vektörler dizilerinin yarısını fajdan diğer yarısını da plazmidlerden alan hibrid bir vektördür. Klonlanacak DNA dizisinin araya sokulacağı cos (cos= cohesive ends) bölgesini lambda fajından alan kozmidler, replikasyon orjini, restriksiyon tanıma ve kesim bölgesi ile ampisiline direnç genlerini plazmidten almaktadır. Bu vektörler, 30-44 kb uzunluğundaki DNA parçalarının klonlanmasında kullanılan fajmid vektördür. DNA dizisinin tespiti için kullanılan diğer bir fajmid vektör ise M13 bakteriyofajıdır. Bu klonlama vektörleri, belirli özelliklerin kazandırılması ve klonlanacak DNA bölgesi uzunluğunun artırılması amacıyla laboratuarda dizayn edilmiş sentetik DNA molekülleridir. İki cos bölgesine ve iki markere (ampr, kanr) sahip olan kosmidlere çift cos bölgeli kosmid vektörler denir. Kosmidler iki restriksiyon enzim ile aynı anda kesildiğinde iki lineer parça elde edilir ve her birinde bir cos bölgesi bir marker bölgesi bulunur. Yabancı gen DNA'sı, iki cos bölgesi arasına yerleştirilir. Diğer işlemler aynen tek cos bölgeli kosmidde olduğu gibi yürütülür (83).

2.6. Ligasyon

Ligasyon, rekombinant DNA teknolojisinde klonlanacak olan geni taşıyan DNA parçaları ile vektör DNA'sının bir enzim aracılığıyla birbirlerine bağlanması işlemine denir. Ligasyon işlem için ligaz aktivitesine sahip enzimler kullanılmaktadır.

DNA ligazlar, rekombinant DNA dizilerinin oluşturması için çok önemli bir araçtır. Çünkü DNA ligazları kullanmadan restriksiyon enzimleri ile elde edilen DNA parçalarının bir plazmit içine yerleştirilmesi mümkün değildir. Uçları birleştirilen DNA moleküllerinin uçları "yapışkan" veya küt olabilir. DNA ligazlar bir DNA molekülünün 3' hidroksil ucu ile diğerinin 5' fosfat ucu arasında fosfodiester bağ oluşturmaktır. Katalizledikleri reaksiyonlar için yüksek enerjili ATP veya NAD kofaktörlerini kullanırlar. Başarılı bir ligasyon (birleştirme) reaksiyonu için en uygun sıcaklığın bulunması gereklidir. Bir çok reaksiyon, bakteriofaj T4'ten elde edilen T4 DNA ligazı ile katalizlenmektedir (85).

2.7. Transformasyon

Genler bir bakteri hücresinden diğerine üç ayrı mekanizma ile nakledilebilir. Bu mekanizmalar; Konjügasyon, Transdüksiyon ve Transformasyon olarak bilinmektedir. Transformasyon, DNA teknolojisi kullanılarak hücre dışı DNA'nın hücre tarafından içeri alınması ve genoma entegre edilmesi olayıdır. Transformasyon sonucunda alınan DNA ile birlikte (hücresinin genotipine müdahale edilerek) fenotipi de değişmektedir. Kısaca, ekzogenik bir DNA molekülünün hücre içine alınıp hücre ile bütünleşmesidir. Transformasyonun ilk aşamasında 0° de yüksek konsantrasyonda katyonların varlığında ekzogenik DNA bakteri yüzeyine yapışır ve bağlanır. Sıcaklık 0°C'den 42°C'ye çıkarıldığında, hücre duvarından sitoplazmaya girer. Ekzogenik DNA, DNAaz' e karşı dirençli hale gelir. Sonunda içeri girmiş yabancı DNA molekülü, bakteride hayatını devam ettirebilmek için ya kendi başına kararlı bir replikon oluşturur ya da yerleşmiş replikon ile homolog rekombinasyon yapar (86).

Transformasyon işlemine başlamadan önce belirli gen bölgesi ligaz enzimi aracılığıyla vektör ile birleştirilir. Genellikle nükleik asitler, örneğin plazmitler uyarıcı bir etki olmadan bakteri hücrelerinin içine giremezler. Bu yüzden transforme olacak hücre membranlarının düzenlenmesi, dışarıdan gelecek molekülleri hücre içine kolaylıkla

alabilmeleri için kompetan hücre olmaları gerekir. Hücre, Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , ya da Rb^{+} gibi katyonların herhangi biri ile muamele edildiğinde kompetan hale gelmektedir. Kompetan hücre hazırlamak için farklı metotlar vardır; kalsiyum klorür ($CaCl_2$), rubidium klorür ($RbCl$) ve transformasyon stok solusyonu (TSS) metotları en çok bilinen ve kullanılan metotlardır. TSS çözeltisini kullanarak E.coli hücrelerini kompetan hale getirmek hem hızlı, hem kolay hem de yüksek oranda transformasyon verimliliği oluşturur. E. coli'nin hemen hemen tüm suşları TSS ile kompetan hale getirilebilir ve bu hücreler yıllarca verimliliğini kaybetmeden kararlı halde $-80^{\circ}C$ 'de yaşayabilirler. TSS içerisinde Luria-Bertani (LB) broth, poli etilen glikol (PEG), dimetil sülfoksit (DMSO) ve Mg katyonları bulunur (86–88).

2.8. İstenilen Geni Taşıyan Bakterilerin Seçimi (Seleksiyon)

Rekombinant DNA teknolojisi ile yeni gen parçalarını taşıyan ve ayrıca istenilen özellikleri taşıyan klonları diğerlerinden ayırma işlemine, rekombinant seçimi adı verilmektedir.

Konak hücrenin bir parçası olan rekombinant DNA molekülleri hücre ikileşmesi ile çoğalır ve bu şekilde taşınan gen parçalarının çok sayıda kopyasını elde edilir. Konak hücre içerisinde arzu edilen geni almış olan rekombinant hücrelerin seçilebilmesi gen klonlamasında en önemli basamaklardan biridir. Bunun sebebi ise, rekombinant DNA oluşturulması ve transformasyon sırasında başarı olasılığının genellikle çok yüksek olmamasıdır. Genetik seçimde uygulanan iki teknik vardır:

- Konak hücrelerde taşıyıcının varlığının seçimi
- Taşıyıcıya sokulmuş DNA parçasındaki genin seçimi

Konak hücreye transforme edilmiş yabancı DNA molekülünü içeren vektöre sahip kolonileri, transforme olmamış kolonilerden ayırt edebilmek için vektör üzerinde bulunan antibiyotik genleri ile seçicilik sağlanabilir. Bu genler sayesinde, vektörü almış koloniler antibiyotik içerisinde bulunduğu besiyerinde dirençlilik genine sahip olduğu için yaşarken, transforme olmamış kolonilerde antibiyotik dirençlilik geni olmadığı için ortamda yaşayamazlar. Sonuç olarak dirençlilik genleri rekombinant genin konağa girip girmediğini görüntülemek amacıyla vektör üzerinde bulunurlar (89). İçeri alınan plazmitin

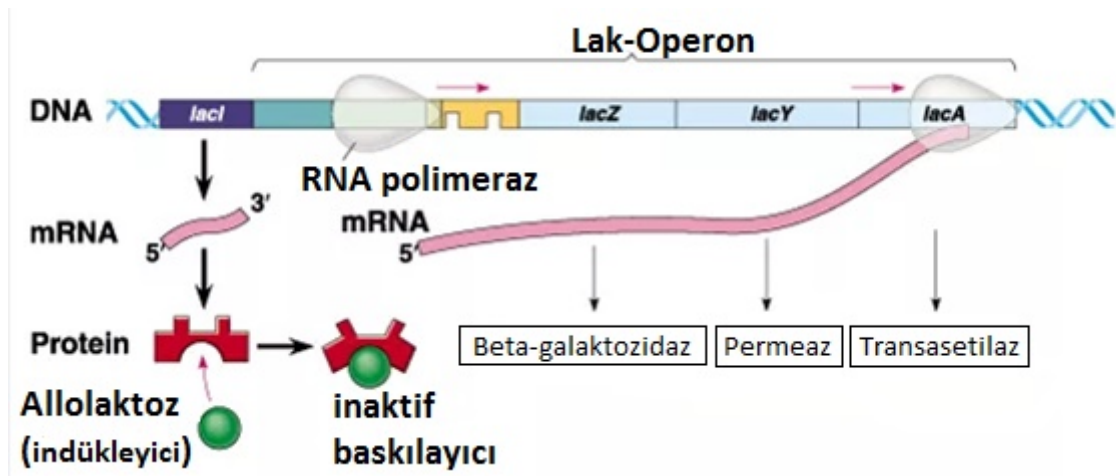
hedef gen dizisini içermeyebilir. Bunu anlamak için de Lac sistemi kullanılabilir ya da koloni polimeraz zincir reaksiyonu ile genin içeri girip girmediği kontrol edilir (67,79).

Antibiyotiklerin yaptığı antibakteriyel hareket bakteride dört farklı mekanizmaya etki eder. Hücre duvarı biyosentezinde, nükleik asit metabolizmasında ve tamirinde, protein sentezinde yer alan enzimlerin düzenlenmesini ya da inhibisyonunu sağlayarak antibakteriyel özellik kazanırlar. Rekombinant teknolojisinde en çok karşılaşılan antibiyotikler; ampisilin, tetrasiklin, kanamisin, neomisin, kloramfenikol'dür. Kanamisin 30S ribozomal alt ünitesine bağlanarak mRNA'nın yanlış okunmasına neden olur. Bu yanlış okuma anormal peptitlerin hücre içerisinde birikmesine ve sonunda bakteri hücresinin ölümüne neden olur. Aminoglikozid grubu bir antibiyotiktir; Streptomyces kanamyceticus bakterisinden izole edilmiştir ve sülfatlı formunda kullanılır (90,91).

2.9. Protein İfadesinin İndüklenmesi

İlk olarak Jacques Monod (92) tarafından keşfedilen edilen gen denetim sisteminin, glukozun yokluğunda E.coli tarafından ifade edilen proteinlerle ve laktöz metabolizmasıyla ilişkili (laktöz var) olan lac operonudur.

Ortamda **laktöz yoksa** regülatör genin ürettiği baskılayıcı protein, operatör bölgeye bağlanır ve promotor bölgeye RNA polimerazın bağlanması engellenir. **Transkripsiyon gerçekleşmez**. Ortamda **laktöz varsa**, baskılayıcı proteine laktöz bağlanır, operatör bölge boş kalır, RNA Pol. promotora bağlanır ve **transkripsiyon gerçekleşir** (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Lak operon ve düzenleyici genleri (93).

E. coli'de lac operonunun düzenlenmesi gen ifadenmesinin transkripsiyon seviyesinde negatif olarak kontrolü için gerekli bir paradigmadır. Lac operonunun kontrolü diğer negatif olarak bakteriyel sistemlerin düzenlenmesine göre daha etkilidir. İndükleyici varlığında, Lac enzimleri 1000 kat artabilirken, gal operonu 20 kattan az indüklenir. Lac operonun baskılanması ile lac promotörüne RNA polimerazın bağlanmasını direk olarak engellenmiş olur. IPTG allolaktozu taklit eden bir moleküldür. Laktoz ise lac operonun transkripsiyonunu tetikleyen bir metabolittir. IPTG yapısındaki sülfür atomu hücre tarafından hidrolize olmayan kimyasal bir bağ yaratır. Böylece, hücre onu metabolit olarak kullanamaz, parçalayamaz ve IPTG konsantrasyonu sabit olarak kalır (94).

Lac operatör dizisinin önünde T7 promotörün yerine E.coli'nin RNA polimerazının bağlanabileceği lac promotör dizisi vardır. Promotörün önünde ise lac operonunu açılıp kapanmasını kontrol eden repressor bölgesi bulunur (95). Laktoz yokluğunda, lacI operatör bölgeye bağlanır ve DNA'yı 40° bükür. Bu bükülme, T7 RNA polimerazın promotör bölgesine bağlanmasını engeller. Ortamda bulunan IPTG, lac represörüne bağlanır ve lac operatöründen tetramerik represörü çıkarır. Böylece lac operonunda genlerin (beta galaktosidaz gibi) transkripsiyonuna izin verilmiş olunur (96,97).

2.10. Protein Saflaştırması

Proteinler çeşitli kaynaklardan elde edilerek endüstriyel ve laboratuvar ölçeğindeki saflaştırılmalarında genellikle aynı yöntemler takip edilmektedir. Proteinlerin fizikokimyasal yapıları saflaştırma yönteminin seçilmesinde önemli rol almaktadır. Bunlardan: çözünme kabiliyeti, molekül ağırlığı ve yüküdür. Rekombinant proteinlere bir "etiket" takılarak ilgili proteinin ortamdaki daha kolay ayrılmasını sağlayacak bir özellik katmaktadır (98).

Belirli hücreler tarafından ifade edilen proteinler hazır hale gelmeleri için arındırılıp saflaştırılmaları gerekmektedir. Bu işleme "**downstream processing**" adı verilmektedir. PH değişimi ile kolayca etkilenen proteinler denatüre olarak biyolojik aktivitelerini kaybederler. Biyofarmasötiklerin çoğu nötral pH'ta veya 5-8 arasındaki pH'larda stabilite olmaktadır. Bu yüzden saflaştırmak için distile su ile hazırlanan tampon çözeltiler kullanılır (99).

proteinlerin üretildiği kaynaktan geri kazanımı en önemli aşamalardan biridir. Canlı bir hücre tarafından üretilen proteinler genellikle ortama salgılanır ve hücre-dışı (ekstraselüler) proteinlerdir. Bunun aksine rekombinant bakteriler tarafından üretilen proteinler hücre içine salgılanır ve hücre içi proteinlerdir. Her iki durumda yapılacak ilk işlem hücrelerin toplanmasıdır. Bunun için genellikle santrifüjleme bazen de mikrofiltrasyon yöntemi uygulanmaktadır. Ürün hücre dışındaysa hücreler inaktive edilerek (otoklavlama ile) atılır, protein sıvı kısmından daha ileri tekniklerle saflaştırılır. Hücre içinde olan ürünleri elde etmek için, hücre çöktürülmesi yapılır ve daha sonra hücre zarı parçalanarak hücre içeriğiyle birlikte söz konusu proteinin açığa çıkması sağlanır.

Hücre sıvısında dağılmış halde bulunan rekombinant proteinlerin ekstraksiyonu konusundaki problemlerden dolayı birçok yöntem geliştirilmiştir. Hücreleri parçalayarak fraksiyonlarına ayırma yöntemleri, temelde hücre sınırlarının çeşitli fiziksel ya da kimyasal tekniklerle yok edilmesini kapsar. Bakteri hücre duvarının parçalanmasında kullanılan teknikler Tablo 1’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Bakteri hücrelerinin çözülmesinde kullanılan bazı yöntemler

1- Kimyasallar: Deterjanlar, Antibiyotikler, Organik çözücüler(örn: aseton, toluen) ve denatüre edici ajanlar (örn: üre, guanidin)
2- Alkali maddeler
3- Sonikasyon
4- Homojenizasyon
5- Abraziflerle çalkalama (cam bilyeler)
6- Lizozimler

Proteinlerin hücre ve dokudan saf halde izole edilmesi oldukça önemlidir. Özellikle proteinin konsantrasyonu düşük ise hücre içerisindeki diğer proteinlerden ayırmak için ve saf halde elde etmek için saflaştırılacak proteine uygun yöntemin seçilmesi gerekir. Saflaştırılmada farklı yöntemler kullanılmaktadır. Saf veya safa yakın protein eldesi için bu yöntemlerden bir veya birkaçı arka arkaya kullanılmaktadır (100,101).

Proteinleri izole edebilmek için öncelikle yapılması gereken bazı adımlar vardır. İlk olarak, izole edilecek proteinin fazla miktarda üretilbileceği doku veya hücre grubu seçilir. Proteini fazla miktarda üretmiş hücre veya dokular uygun tampon çözeltiler ile homojenize edilir. Bu tampon çözelti hücre membranı ve nükleus membranını parçalar, böylece

proteinler açığa çıkar. Tampon kullanılarak proteinin kimyasal yollarla açığa çıkması sağlanırken yüksek frekansta ses dalgaları etkisine bırakarak (sonikasyon) mekanik bir hücre parçalama yöntemi de ardından yapılabilir. Oluşan homojenat belirli hızlarda santrifüj edilir ve hücre partiküllerinden uzaklaştırılır. Sonunda protein karışımı içeren bir süpernatant oluşur ve bu süpernatant saflaştırma yöntemleri için başlangıç materyali olur (100,101).

Protein saflaştırma yöntemlerini dört temel başlık ile incelemek mümkündür. Bunlar;

- kromatografik yöntemler,
- elektroforetik yöntemler,
- santrifügasyon yöntemleri,
- diyaliz ultrafiltrasyon

Affinite kromatografisi kromatografik yöntemlerin içerisinde saflaştırılmada kullanılan en yaygın ve hızlı yöntemlerden bir tanesidir. Tek basamakta oldukça saf bir protein eldesi mümkündür. Bu yöntemde polisakkarit yapısındaki koenzim bağlı agaroz tanecikleri kolon dolgu maddesi olarak kullanılır (102,103).

Enzimler proteinlerin uç kısımlarına tasarlanmaktadır ve protein karışımı kolona uygulandığında agaroz taneciklerindeki koenzimin serbest ucuna spesifik olarak bağlanır. Protein süpernatantında diğer proteinler koenzim serbest ucuna bağlanma özelliğine sahip değildir bu yüzden kolondan uzaklaşırlar. Hedef proteini kolondan almak için sistemdeki ile aynı ancak daha yoğun konsantrasyonda serbest koenzim içeren bir çözelti kolona ilave edilir. Kolondaki entegre koenzim ile çözültideki koenzim arasındaki rekabetten dolayı proteinler ilave edilen çözültideki koenzime bağlanarak kolondan alınır. Sonuç olarak, koenzime spesifik olan enzim proteini diğer proteinlerden tek bir basamakta saflaştırılır (104).

Affinite kromatografisinde en çok tercih edilen sistem hareketsiz metal affinite kromatografisi (IMAC)'dir. IMAC sisteminde, agaroz matriks üzerinde hareketsiz olarak duran geçiş metalleri (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) ile histidin işaretli hedef protein arasında bağlar oluşur. Histidin bu metal iyonları ile en güçlü bağı oluşturacak bir amino asittir. Histidin-imidazol çemberinde, elektron verici gruplar sayesinde nikel ile koordinasyon

bağları oluşur. Bu şekilde purifiye edilecek protein kolona tutunur ve histidin ile yarışacak olan yüksek konsantrasyonda imidazol ile muamele edilir. Hedef protein tek aşamada elde edilmiş olur. Elde edilen protein hiçbir zaman % 100 saf değildir. Bu yüzden, kolondan sonra tuzlardan arındırmak için ‘desalting’ işlemi yapılır. Desalting yapmak için molekül büyüklüğüne göre (size exclusion) kromatografi, dializ-ultrafiltrasyon ve tampon değişimi gibi farklı teknikler vardır. Desalting işlemi proteinin sadece tuzdan değil, deterjan, nükleotit ve lipit gibi diğer yabancı maddelerden de uzaklaştırılmasını sağlar (104,105).

Protein saflaştırmasında kullanılan *Staphylococcus aureus* bakteriyel kaynaklı Protein A ve *Streptococcus* kaynaklı protein G poliklonal ve monoklonal antikorların Fc bölgesine bağlanırlar. Affinite protein saflaştırmasında yaygın olarak kullanılan protein G ve A çeşitli IgG izotiplerine bağlanarak proteinlerin saflaştırmasında, izolasyonunda ve fraksiyonlanmasında görev almaktalar. Protein G geniş bir PH aralığında poliklonal antikorlara bağlanmaktadır ve protein A’ya bağlanmayan veya zayıf bağlanan koyun, inek ve at IgG’leri protein G ile saflaştırılmaktadır. Protein G’ler bazı IgG izotiplerin Fc bölgesinin dışında çok zayıfta olsada Fab kısmında tutunabilirler(99,103).

2.11. Antikor Teknolojisi

2.11.1. İmmün Sistem

Mikroorganizma, protein ve polisakkarid gibi yabancı ve zarar verici her türlü yapılara karşı direnci oluşturan hücrelerin, dokuların ve moleküllerin tümüne immün sistem denir. Bu hücrelerin ve moleküllerin oluşturdukları koordineli reaksiyonlara immün yanıt denir. Organizmaya verildiklerinde kendilerine karşı humoral ya da hücresel bağışık yanıt oluşumunu tetikleyen moleküller İMMUNOJEN olarak adlandırılır. İmmün yanıt geliştirmeyen ama spesifik immün ürünlerinin reseptörlerine bağlanan herhangi bir moleküle antijen denir. Her immünojen bir antijendir; ancak her antijen bir immünojen değildir.

İmmün sistem vücudun hemen her yerinde karşılaştığı sayısız yabancı yapılara karşı savunma yapmak zorundadır. Bu nedenle immün sistem hücrelerinin kan, lenf ve dokular arasında dolaşabilme ve gerekli bölgelerde yerleşebilme özellikleri savunmada dinamik bir ağ oluşturmaktadır. Bağışıklık sistemi Santral Lenfoid Organları (Kemik İliği, Timus ve Fabricius Kesesi ve buna eşdeğer organlar) ve Periferik Lenfoid Organları (Lenf

Düğümleri, Dalak ve Mukoza ile ilgili Lenfoid Dokular (= Kapsülsüz Lenfoid Dokular)) olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır. Bağışıklık tepkimesine hazır hale gelen olgun T ve B lenfositleri periferik lenfoid organlarında yerleşmektedirler ve antijenik bir uyarım olduğunda bağışıklık yanıtı periferik organlardan gerçekleşmektedir. Dolayısıyla immün hücreler santral organlarda oluşur, periferik organlarda görev yaparlar.

Antijenin konağa giriş yeri, bağışıklık yanıtını etkilemektedir. Deri yoluyla vücuda giren antijenler bu dokudaki makrofajlar ile tanınmaktadır. Dolayısıyla lenfatik yoldan bölgesel lenf düğümlerine taşınır ve immün yanıt hem antijenin giriş yerinde hemde ilgili lenf bezinden başlar. Kan dolaşımı ile giren antijenler dalaktaki makrofajlar tarafından tanınmaktadır. Solunum yolu, gastrointestinal kanal mukozasından girenler ise bölgedeki mukozla ilgili lenfoid doku ile temas eder ve burada gerekli immün yanıt gelişir. İmmün yanıt nerede başlamış olursa olsun kan ve lenf yolu ile diğer bölgelere ulaşır. Bu sistem yabancı hücrelerin, virüslerin ya da makro moleküllerin vücuda yerleştikten sonra nötralizasyonu için evrimleşmiştir. İmmün sistemin kullandığı doğal bağışıklık ve edinsel bağışıklık olmak üzere iki ana savunma sistemi vardır. Vücuda ilk defa giren yabancı moleküllere öncelikle doğal bağışıklık hücreleri saldırırlar. Doğal bağışıklık çok eski bir immün sistem olarak tüm vertebralarda görünmekte ve türler arasında korunmuştur. Bu bağışıklıkta önceden oluşmuş olan proteinler ve hazırda var olan hücreler kullanılarak immün savunmanın ilk basamağı olan erken yanıt oluşturulmaktadır. Doğal immunitede ilk bariyerler deri, müköz membranlar ve derimüköz membran sekresyon tabakalarıdır. İkinci bariyerimmün sistemdemonosit, makrofaj, dendritik hücre, doğal katil hücre (NK), eozinofil, bazofil, nötrofil ve mast hücreleri etkili olmaktadır. Edinsel bağışıklık ise hücre yüzey reseptörlerini sentezleyen ya da yabancı moleküllere karşı protein salgılayan lenfositler tarafından kontrol edilir. İki bağışıklık sisteminde; doğal immün sistemde tekrarlanmış bir yanıt oluşturulmazken edinsel bağışıklık sistemi özellikli moleküllere karşı hareket eder ve sürekli bir yanıt vardır (106–108).

2.11.2. Antijenler

Organizmanın bağışıklık sistemini harekete geçirip antikorların yapımına neden olan ve hücre yüzey molekülleri ile birleşmeye geçen maddelere antijen denir. Antijen ile antikor arasındaki tepkime kimyasal bir temele dayanmaktadır, ancak antijen molekülü her zaman

bu birleşmeye katılmaz. Antijen molekülünün yüzeylelerinde, antikor sentezinde rol alan kimyasal yapılar bulunur. Bu yapılara epitop denir ve özgül antikorlar ile birleşmeyi sağlamaktadır. Her bir antijen uç boyutlu ve kimyasal yapılarına göre aynı veya farklı birçok epitop bulundurmaktadır. Epitopların sayısı, antijenlerin büyüklüğün ve karmaşıklığını belirlemektedir. Bu nedenle çok sayıda epitopu olan bir antijen kendine karşı birden fazla özgül antikor ile birleşme yeteneğine sahiptir. Dolayısıyla antijenler multivalandır. Antijen-antikor arasında ne kadar uyum fazla ise birleşme gücü o kadar fazla olacaktır. Ayrıca antijen-antikor birleşmesi çok özgül olsada kimyasal olarak kuvvetli bir bağlanma değildir.

Bir maddenin antijenik özelliği gösterebilmesi için bazı özellikleri bulundurması gerekir. Bunlardan; yabancılık, kompleks kimyasal yapı ve heterojenite, molekülün sertliği, konakta kalıcı olma, moleküler büyüklüğü, elektriki yük, antijenin dozu ve giriş yolu, emilebilir olması, çözünebilir olması ve konakçıya ait özellikler; genetik ve yaş gibi özellikleri ifade etmek mümkündür.

Antijenler, protein, karbonhidrat, lipid, nükleik asit yapısında olabilir. Timus (T lenfosit) bağımlı olan antijenler protein yapısındadır. Timus bağımsız olan antijenler ise lipid, polisakkarid yapısındadır. Mikroorganizmaların çeşitli hücre kısımları, izoantijenler (kan grubu antijenleri ve doku uygunluğu antijenleri) aynı türe ait farklı yapıda olan antijenler örnek antijenlerdir. Normal şartlarda vücudun kendine ait antijenlere (otoantijenler) otoantikor cevap oluşmaz. Bazı patolojik durumlarda otoantijenlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerinde değişime uğrar ve otoantikor cevap oluştuğunda otoimmün hastalıklar gelişebilir.

Hapten, tek başına antikor yanıtı oluşturmayan, bir taşıyıcı moleküle bağlandıkları zaman antijen özelliği gösteren ve immün yanıtı oluşturan moleküllerdir. B hücreleri antijen üzerinde olan epitopları tanıırken, T hücreleri antijen sunan hücrelerin yüzeyinde olan ve ilk başta MHC sınıf I ve II tarafından tanınan özel amino asit dizilerini tanımaktadır (109,110).

2.11.3. Antikorlar

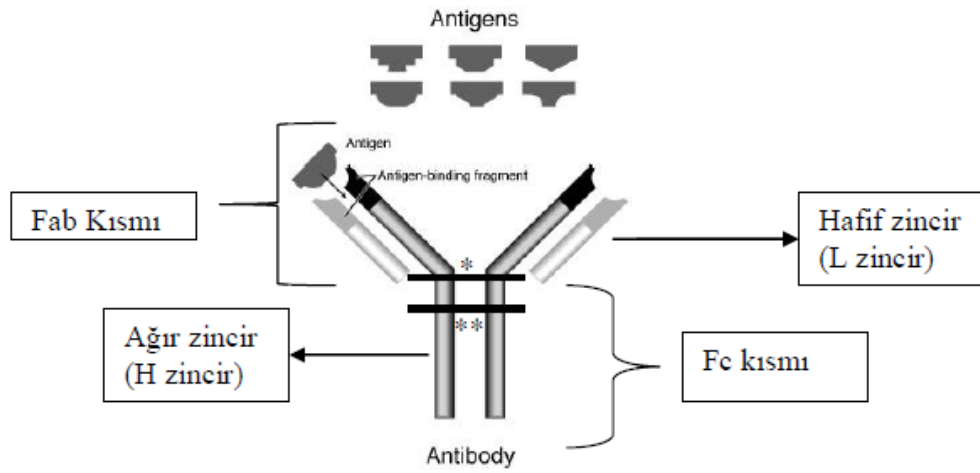
Canlıların kendi kalıtsal yapılarına yabancı olan moleküllere karşı plazma hücrelerinden üretilen ve bu yabancı maddeler ile spesifik birleşme gösteren globulinlerdir. Antikorlar veya İmmünglobulin molekülü 2 ağır ve 2 hafif zincirden oluşur. Hafif zincir 25 kDa, ağır zincir 50 kDa ağırlığında olup birbirlerine disülfid bağları ile bağlanır (Şekil 2.2). Her bir ağır zincirde yine kendi aralarında disülfid bağı ile bağlıdırlar. Bu yapıyı üç tane protein domaininden ikisi özdeş olup, Y yapısının kollarını oluştururlar. Her bir kol, antijene bağlanma bölgesine sahiptir. Gövde kısmı ise immun yanıtın oluşmasında önemlidir. Bu üç protein kısmı birbirinden proteaz papain muamelesiyle ayrılır. Antijen bağlanma bölgelerini içeren iki kısım Fab fragman olarak isimlendirilirken, bağışıklığın düzenlenmesinde yer alan gövde kısmı Fc fragmanı olarak tanımlanır. Fab ve Fc fragmanları arasında kalan bölgeye ise hinge denir. Bu kısım iki antijen bağlanma bölgesine hareketliliği verir. Bu şekilde hareketlilik antijene bağlanma bölgelerinin farklı antijen konformasyonları ile kompleks oluşturabileceğinin kanıtıdır (111,112).

Antikorlar, biyolojik özellikleri, yapı, hedefe özgüllük ve dağılımları açısından çeşitli izoformlar ve imünoglobulin izotipleri halinde bulunmaktadır. Bu nedenle, imünoglobulin izotip değerlendirilmesi karmaşık humoral immün yanıtı için yararlı bilgiler sağlar. İmmünglobulinler alternatif splicing sonucunda, B hücrelerinden salgılanan antikor üretimi ve yüzeye bağlı B-hücre reseptörleri olarak iki ana biçimde kategorize edilir. IgM ve IgD, B hücreleri tarafından antijen reseptörlerine karşı ifade olan ilk antikorlardır. Memelilerin plasentalından IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM olmak üzere beş ana antikor izotipleri tespit edilmiştir. Antikor izotipleri, antikorun ağır zincir sabit bölgesinin (Fc) 'de amino asit sekansındaki farklılıklara göre sınıflandırılır. IgG ve IgA Antikor izotipleri ayrıca ağır zincir sekanslarındaki küçük amino asit farklılıklarına göre alt gruplara sınıflandırılmaktadırlar (örneğin, insan IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 ve IgA2). Antikor ağır zincire ek olarak, antikor hafif zincirinin sabit bölgesinin amino asit dizisinde farklılıklarda alt sınıflara ayrılabilir. Hafif zincirler kappa (κ) ya da lambda (λ) olarak iki tipi vardır. Bir hafif zincir sabit ve değişken alan olarak iki dominantı vardır.

Bir imünoglobulin molekülünde ya iki adet lambda yada iki adet kappa bulunur ve her ikisi de aynı imünoglobulin molekülünde bulunmaz. İmmünglobulinin iki adet aynı yapıya sahip Değişken (variable) antijen bağlayan bölgesi (Fab: Fragment antigen binding) ve bir

adet sabit (constant) fagozitelere komplemana bağlanabilen bölgesi (Fc: Fragment crystallizable) bulunur. Antijen bağlayan bölgede hem hafif hem de ağır zincir bulunur. Değişken bölgedeki amino asit diziliş farklılığı antijen cevabın spesifik olmasını sağlar. Fc parçasında ise sadece ağır zincir bulunur ve immünglobulin tipini belirler (111).

Ağır zincirin değişken bölgeleri üç ayrı gen ve hafif zincirler iki ayrı gen tarafından kodlanır ve sentez ribozomlarda olur (Ağır zinciri için kromozom 14, için kromozom 2 ve için kromozom 22). Ağır ve hafif zincirleri'nin bir araya gelmesi endoplazmik retikulumda gerçekleşir (113).



*: Papain enzim kesim yeri **: Pepsin enzim kesim yeri

Şekil 2.2. Antikor yapısı (114).

Antikorlar vücuda yabancı moleküller girdiğinde onlara yanıt oluşturan konak tarafından üretilmiş proteinlerdir. Önemli yapısal ve fonksiyonel özellikleri olan glikoprotein ailesi içerisindeki proteinlerdir. Fonksiyonel açıdan, antikorlar antijenlere, özelleşmiş hücrelere ve bağışıklık sistemindeki bazı proteinlere bağlanarak karakterize olurlar. Bu karakterizasyon savunma sisteminin askerlerinden B hücreleri tarafından yapılır. Her patojene karşı özel bir antikor üretilebilmesi için B hücrelerinin milyonlarca antikor üretme kapasitesi vardır. Vücudun yaklaşık olarak 100 milyon farklı antikor üretebileceği tahmin edilir. Bu kadar çeşitli antikor yapılması immünoglobülin genlerinin değişik kombinasyonlarda düzenlenmesinde saklıdır. Antikorlar antijenlere, özelleşmiş bazı hücrelere ya da immun sistemin proteinlerine bağlanma yeteğine sahip moleküllerdir.

Vücuda giren yabancı antijenler öncelikle makrofajlar gibi antijen sunan hücreler tarafından fagositoz yolu ile hücre içine alınırlar. Bu tip hücrelerin içine giren antijenler küçük parçalara ayrıştırılırlar. Antijen fragmanlarının her biri bu hücrelerin yüzeylelerinde bulunan MHC (major histocompatibility complex) class II glikoproteinleri aracılığı ile T yardımcı hücrelerine ya da direk B hücrelerine sunulurlar. Bu şekilde B hücrelerinin antikor sentezlemesi başlamış olur (111,112).

2.11.4. Antikor Sentezlenmesi

Bağışıklık sistemin temel hücreleri olan lenfositler, kalıtsal olarak immün yanıtı ile ilgili ürünleri sentezleme yeteneğine sahiptirler. Farklı kimyasal yapıya sahip antijen molekülünün vücuda girmesi ile birlikte makrofajlar, T ve B lenfositleri arasındaki iletişim kurularak antikor cevabı oluşmaktadır. Çeşitli hormon ve enzimleri salgılayan özel hücreler gibi, lenfositler de antijenle tetiklendiği zaman immünooglobulin (antikor) ve diğer immün yanıt ürünlerini sentezlerler. Antijenle uyarılan B-lenfositleri, plazma hücrelerine dönüşerek Ig'leri sentezlerler.

Bağışıklık yanıtı oluşumunda halen çözümlenemeyen konu, antijene karşı özgül ve çok sayıda farklı Ig'lerin nasıl sentezlendiğidir. Ayrıca uzun yıllardan beri araştırmacıları meşgul eden diğer bir konu ise bağışıklık sistemi doğadaki tüm antijenlere karşı immün yanıt oluştururken, kendi vücuduna karşı immün yanıtının oluşturulmaması ve sessiz kalmasıdır.

Antikorların nasıl sentezlendiği konusunda bugüne kadar ileri sürülen varsayımlar şunlardır (115).

2.11.4.1. Yan Zincirler Teorisi

Bu teori 1897'de P. Ehrlich tarafından ortaya konulmuştur. Ehrlich, ileri sürdüğü yan zincirler teorisinde; üç grupta incelediği antikorların (I , II ve III grup reseptörler olarak), antigenlerle birleşme özelliklerinin, tanıda faydalanılan çeşitli Serolojik reaksiyonları meydana getirdiğini açıklamıştır. Ehrlich, antikorlarla antigenlerin birleşme olayını, kuvvetli bir asidi nötr hale getirme reaksiyonuna benzetmiştir. Bu teoriye göre hücreler besin maddelerini yakalayabilmek için her besin maddesine uygun algaçlar (reseptörler)

geliştirmişler. Antijenler, hücrelerdeki bu reseptörle ile benzer yapıda ise onlarla birleşirler. Birleşme sonucu reseptörün görevi bozular. Dolayısıyla hücrenin beslenmesi de bozular. Hücre kendi yaşamını sürdürebilmek için çok sayıda reseptör üretmeye başlar ve bunların fazlası dolaşıma geçer. Dolaşıma geçen moleküllere antikor denmektedir (115,116).

Ancak daha sonraki antikor ve antigenlerin bazı durumlarda birbirlerine tutunmamaları, Ehrlich'in bu teorisini şüpheye düşürdü.

2.11.4.2. Kalıp Teorisi (= Direktif Teori)

Brienl, Mudd ve F. Haurowitz bilim insanları tarafından bir birinden ayrı olarak ortaya atılmış bir teoridir. Bu teoriye göre antikorlar, antigenlerin uyarımıyla ile organizma hücreleri tarafından yeniden senteze edilen globülinlerdir. Antigenlerin bu etkisi, hücreler tarafından yeniden senteze edilecek olan globülinlere bir kalıp görevi yapmış oldukları şeklinde izah edilmektedir. Globülinler ile antigenlerin birleşmesinden meydana gelen antigen-antikor kombinasyonunun birbirinden ayrıldığı farz edilmektedir. Uygun Ig sentezi için antijenlerin bazı parçaları hücrede kalır ve böylece özgül antikorlar sentezlenir. Başka bir deyişle hücrenin antikorunu salgıladığı ve daha evvel ayrılmış olan antigenin de hücre etrafında yeniden daha özgül ve çok miktarda senteze edilecek globülinlere tekrar birer kalıp görevini yapması kabul edilmektedir.

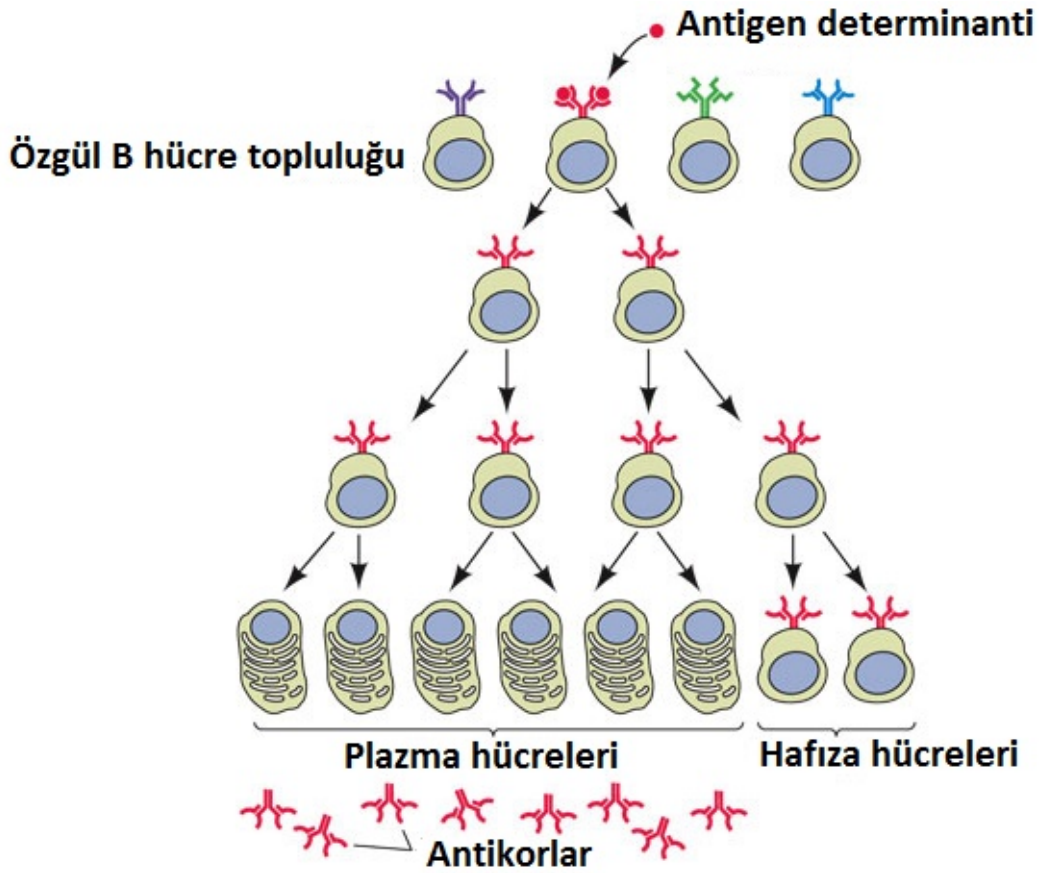
Ayrıca bu teoriye göre, yabancı antijen molekülleri organizmaya girdiklerinde antikorların sentezlendiği bölgeye doğru göç ederler. Antijen bir kalıp gibi kullanılır ve antijenin bağlandığı bölgelere özel antikorun amino asit dizilişi ona göre şekillenir. Ancak yapılan çalışmalarda Ig sentezleyen hücrelerde antijene rastlamadıkları için bu teoride geçerliliğini kalmamıştır (115,116).

2.11.4.3. Klonal Teori (= Selektif Teori, Doğal Klon Seçimi)

Bu teori 1955'te Jerne tarafından ve 1957'de Burnet tarafından ortaya konulmuştur ve günümüzde de destek görmektedir. Bu teori çok sayıda lenfosit hücre arasından özel bir tip hücreyi seçmek prensibine dayanmaktadır. Belirli bir antijene karşı oluşan antikorlardan biri veya bir grubu tek bir antijen veya benzer yapıdaki bir grup antijen determinantı ile

birleşerek immün cevap verebilme yeteneğindedir. Böylece canlılarda, herbiri bir antijene yanıt verebilecek birbirinden farklı çok sayıda lenfosit bulunduğu kabul edilmektedir. Organizmaya giren antijen kendisine uyan hücreyi (B-lenfosit) bulur, bağlanır uyarır ve sadece onu seçmiş olur. Uyarım neticesinde lenfositler hızla çoğalmaya başlar (Şekil 2.3.). Böylece belli bir antijene karşı özgül antikor sentezleyebilen bir hücre kümesi (klonu) meydana gelmiş olur (115,116).

Ancak lenfosit yüzeyindeki Ig reseptör farklılığının nasıl oluştuğu bu teori ile izah edilememektedir.



Sekil 2.3. Klonal seçim teori şeması (117).

2.11.5. Antikor Çeşitliliğinin Genetik Temeli

Genetik alanındaki gelişmeler, birçok yaşamsal olayın gen tarafından yönettiğini göstermiştir. Milyonlarca çeşitli antikor molekülünün hangi genetik mekanizma ile açıklanabileceği uzun süre araştırılmıştır. Genetik temelli antikor çeşitliliği 3 farklı teori ile ortaya konulmuştur.

2.11.5.1. Her farklı antikor sentezi için bir gen (çok gen teorisi)

Bir milyar farklı antikor sentezlenen insan vücudunda bu sayıda da gen olması gerekirdi ki bu ne bir lenfosit hücresine sığar nede insandaki toplam gen sayısına tekabül eder.

2.11.5.2. Somatik mutasyon teorisi

Antijen uyarımı ile az sayıda genin mutasyona uğraması ve antikor sentezinin farklılığının ortaya çıkmasını ileri süren "somatik mutasyon teorisi" teorisi de çok inandırıcı bulunmamıştır.

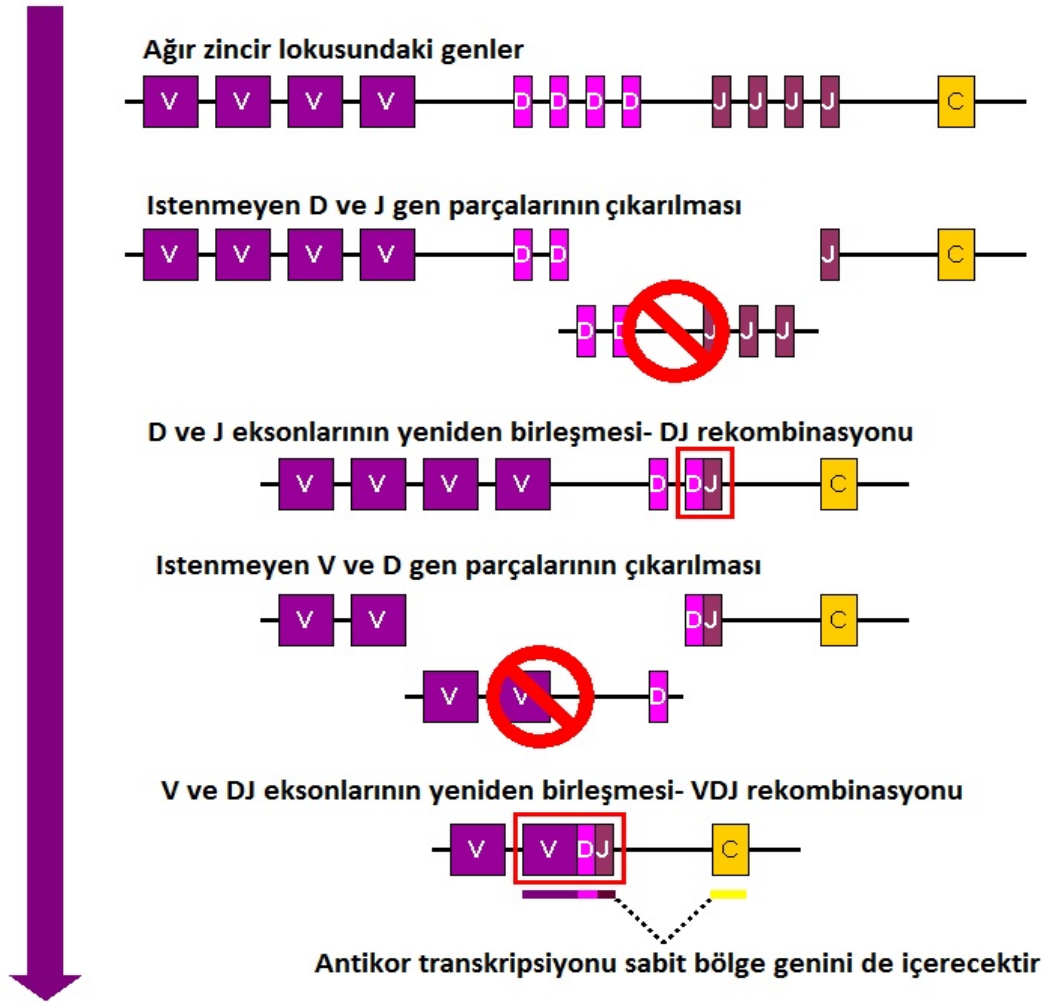
2.11.5.3. Somatik rekombinasyon teorisi

Günümüze kadar antikor çeşitliliğini açıklayan teoriler içinde "Somatik rekombinasyon teorisi" gerçeğe en yakın olanıdır. V (D) J rekombinasyonu (somatik rekombinasyon olarak da bilinir), bağışıklık sisteminin immunoglobulin (Ig) ve T hücre reseptörlerinin (TCR) üretiminin erken evrelerindeki genetik rekombinasyon mekanizmalarıdır. 1976 yılında Tonegawa'nın çalışmaları fare embriyo hücrelerinde, antikorun V ve C bölgelerini sentezleyen genler birbirinden uzakta çok uzakta olduğu, antikor sentezleyen plazma hücrelerinde ise bu genlerin birarada bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca Ig molekülünün antijene tutunan ve değişken bölgesi olan V geni çok sayıda bulunurken sabit C bölgeleri için bir veya birkaç gen bölgesi bulunmuştur. B lenfositlerin gelişme sürecinde V genlerinden bir kısmı yer değiştirerek DNA zincirinde yeniden düzenlenme olayı gerçekleşmiştir. Buna ek olarak V genlerinde yüksek sıklıkta mutasyon olduğu belirlenmiştir. Böylece antijenik uyarım sonucu gelişen B lenfositleri çoğalırken genlerdeki rekombinasyon yanında, V gen bölgesi mutasyonları da oluşur ve antijene en iyi uyum sağlayan antikor çeşitleri sentezlenmiş olur (115,116,118).

İnsan genomunda kodlanan değişken bölgeler için çoklu gen kombinasyon tipini içerirler. Örneğin immunoglobulin ağır zincir 44 değişken (V) gen bölgesi 27'den fazla Çeşitlilik (D) geni ve 6 birleşme (J) geni içermektedir. Hafif zincir ayrıca bir çok sayıda V ve J genlerine sahiptir ancak D geni içermez. Bu bölgesel genlerin DNA tekrar-düzenlemelerindeki mekanizmayla, muazzam büyüklükte antikor dağarcığını oluşturmak mümkündür; her bir antikorun antijene bağlanma değişken ucunda yaklaşık 100 amino asit

bulunmaktadır, bu amni asitlerin farklı yerleşme kombinasyonlarına bağlı olarak $10^6 - 10^7$ antijen tanıma yeteneğine sahiptir (119,120).

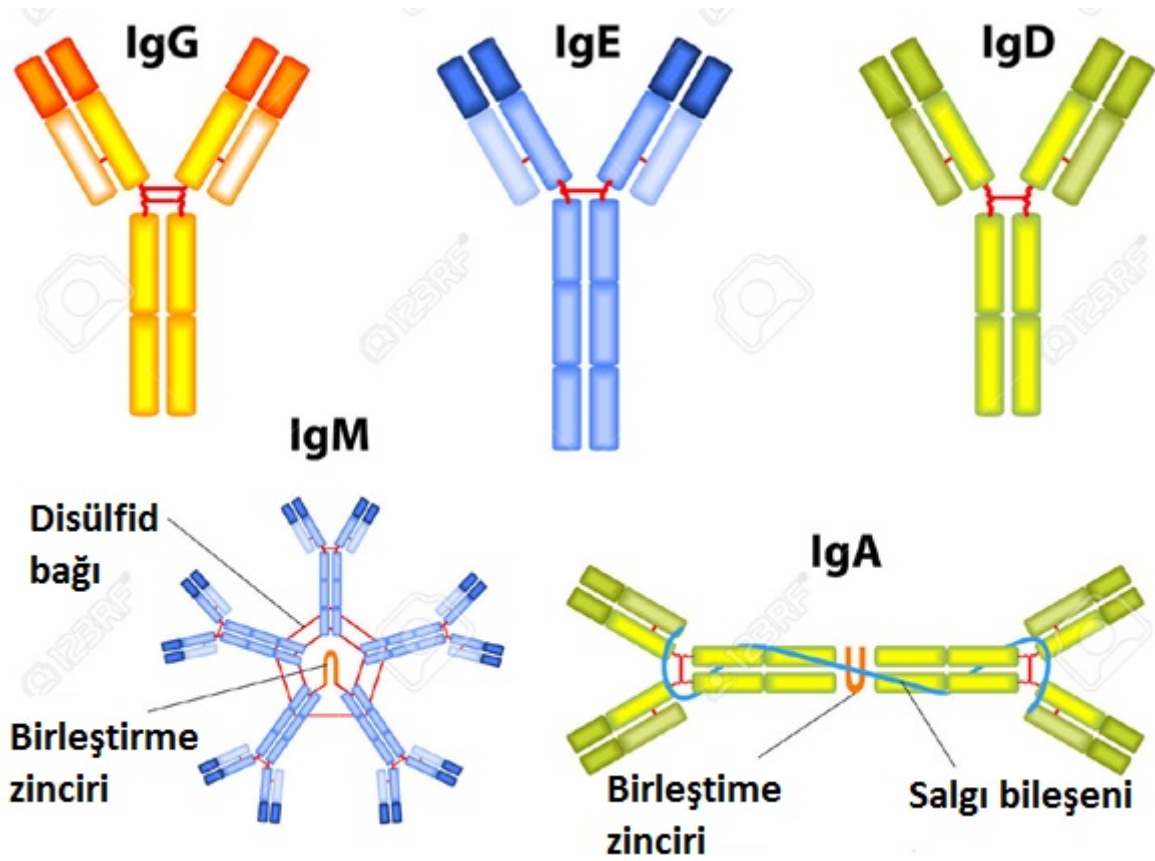
B hücrelerinin gelişim süresindeki ilk rekombinasyon durumu ağır zincir lokusunda gerçekleşmektedir. Bu durumda D ve bir J gen bölümünün birleşmesi ile meydana gelir. Bu iki gen birleşmesi ile diğer DNA kısımları silinir. Oluşan yeni D-J rekombinasyon kompleksine bir V geninin katılmasıyla düzenlenmiş yeni bir VDJ geninin oluşumuyla tamamlanmaktadır. Oluşmuş olan yeni VDJ geninin V ve D parçaları arasındaki tüm genler hücrenin genomundan çıkartılır. İmmünooglobulin hafif zincirinin lokusunun Kappa (κ) ve Lambda (λ) zincirleri, D bölgesine sahip olmayan bir hafif zincir farklılığı dışında, oldukça benzer bir süreçle üretilir. Başka bir deyişle, hafif zincirlerin rekombinasyonu için ilk basamak, birinci transkripsiyon esnasında V ve J zincirlerinin VJ kompleksi oluşturmak üzere değişmez diziden önce eklenmesidir (121).



Şekil 2.4. Somatik rekombinasyon şeması (121).

2.11.6. Antikor Sınıflandırması

Plazma hücreleri tarafından üretilen çeşitli antikorlar izotiplerine göre sınıflandırılmaktadır. İşlev ve antijen yanıtına göre farklılık göstermektedirler. Antikorların ağır zincirlerde olan sabit bölgedeki (Fc) farklı amino asit dizilerine doğrultusunda beş çeşit ağır zincir vardır ve IgG, IgM, IgA, IgD, ve IgE olarak isimlendirilmektedir (122–124).



Şekil 2.5. Antikor sınıflandırması (125).

IgG molekülleri gamma ağır zincir yapılarına, IgM'ler mu, IgA'lar alfa, IgE'ler epsilon ve IgD'ler delta zincirlerine sahiptirler. Beş farklı ağır zincir çeşiti var iken, kappa ve lambda olmak üzere sadece iki çeşit hafif zincir bulunmaktadır. İmmunoglobulin G izotipinin bazı alt grupları da vardır. Örneğin bu alt gruplar insan ve farede farklılıklar göstermektedir. İnsan IgG dört farklı alt gruba sahiptir: IgG1, IgG2, IgG3, ve IgG4. Fare IgG'nin ise IgG1, IgG2a, IgG2b ve IgG3 olmak üzere dört alt grubu vardır (122–124,126).

IgG

Y harfi şeklinde olup, monomer yapıdadır. Bu immunoglobulin plazma B hücreleri tarafından sentezlenir. Plazenta yoluyla anneden fetüse geçen tek Ig'dir. Doğumun ilk haftasında bebeği enfeksiyonlardan korumada ve bağışıklık sisteminin güçlenmesinde yardımcı olur. Bebeğin kendi özgül immunoglobülinlerini üretmesi doğum ile başlar ve iki yaşına kadar devam eder (122–124,126).

IgM

Ig'ler arasında en büyük ağırlığa sahip makroglobulindir. Beş temel IgG molekülünü benzeyen yapının birbirlerine disülfid bağları ile bağlanması ile oluşan yıldıza benzer bir yapısı vardır. Antijen uyarımına karşı ilk sentezlenen ama yarı ömrü kısa olan bir moleküldür. Kısa ömürlü bir antikor olduğundan serumda kısa bir süre sonra miktar olarak azalır ve IgG molekülü görevi üstlenir (122–124,126).

IgA

Genel yapısı IgG molekülüne benzer ve iki monomerin birbirine J bağlayıcı polipeptit zinciri ile bağlanması sonucu dimer yapısındadır. Gözyaşı, tükürük, solunum, sindirim, ve genital sistem salgıları ve sütte bulunur. Sekretuar dokularda mukoza altındaki plazma hücreleri tarafından salgılanırlar ve salgısal parça ile epitel hücrelerince birleştirilirler. Bu yüzden salgısal IgA ismini de alırlar. Dışarıdan giren mikroorganizmaların mukozayı istila etmelerine, o bölgeye yerleşmelerine ve enfeksiyon oluşmasına sIgA molekülleri engel olur. Besin olarak alınan zararlı makromoleküller ile kompleks oluşturarak emilimini engellerler (122–124,126).

IgD

Serumda az miktarda vardır ve görevi tam olarak bilinmemektedir. Bir hipoteze göre B hücrelerinin farklılaşmasında görev alırlar. Çoğunlukla B lenfositlerinin yüzeyinde bulunur ve antikor üretilmesini tetiklemesi ile bilinir. Isı ve proteolitik enzimler ile kolayca degrade olabilen immunoglobülin çeşididir (122–124,126).

IgE

Serumda en az miktarda bulunan Ig'dir. Fc bölgesinin mast hücrelerine ve bazofil lökositlere bağlanabilmesi bu antikorun en belirgin özelliğidir. Parazitik Helmint enfeksiyonları, astım, saman nezlesi ve alerjik durumlarında bu antikorun üretim seviyesi artar (122–124,126).

2.11.7. Poliklonal Antikorlar

Birçok farklı B lenfosit klonuyla üretilen, hepsi aynı antijenin farklı determinantına bağlanan antikorlara (bir antijen üzerinde birden fazla epitopu tanıyan antikorlara poliklonal antikora) veya plazma hücrelerinin bir çok tipinden (klonlarından) türemiş veya üretilmiş antikora poliklonal antikor denir. Böylece antijenin üzerindeki farklı epitopları tanıyan farklı antikorların üretilmesi ile farklı klon B hücreleri meydana gelir (127).

Poliklonal antikorlar genel olarak IgG, IgM ve IgA antikor izotiplerini içerirler. Poliklonal antikorlar immunopresipitasyon, histokimya, ELISA, hastalıkların teşhisi, immunoturbidimetrik metotlar, western blot tekniği, bioçip teknolojisi alanlarında araştıma amaçlı kullanılabilen genişçaplı amaçları olan antikorlardır. Monoklonal antikor üretimine göre hem daha çabuk hem de daha ucuz bir yöntemdir. Poliklonal antikorların bazı dezavantajları da vardır. Örneğin, çok fazla spesifik olmayan bağlanmalar gerçekleştirerek herhangi bir antijen üzerindeki farklı epitoplara bağlanarak antijeni tanıyabilirler. Bu özelliği ile tanınması mümkün olmayan antijenlerin tanıyabilirler. Poliklonal antikorlar çapraz tepkime ve düşük özgünlük gibi dezavantajlara da sahiplerdir (12).

Antikor üretiminde serum, ascites sıvısı ve hibridoma hücrelerin supernatantları kullanılır. Serum yaygın olarak poliklonal antikor üretiminde kullanılır. Hibridoma supernatantı ise monoklonal antikor üretimi için kullanılır. Ascites sıvısı ise hem poliklonal hem de monoklonal antikor üretiminde kullanılabilir. Ascites sıvısı, peritoneal tümörden gelişen fareden alınan intraperitoneal sıvıdır (122).

Genellikle, laboratuvarlarda poliklonal antikor üretimi için tavşan kullanılır. Çünkü tavşan, fareye göre daha çok miktarda serum içerir. Bu yüzden fareden poliklonal antikoru çok miktarda toplamak oldukça zordur. Harlow ve Lane fareden poliklonal antikor üretimini

mümkün olup olmadığını tartışmışlardır ancak ayrıntılı bir yöntem oluşturamamışlardır (106,122). Harlow ve ekibi, fareden yüksek miktarlarda poliklonal antikor üretebilecekleri basit bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yönteme göre, immunize olmuş fareler arzu edilen antikoru içeren ascites sıvısını üretmek için tetiklenebilirler. Böylece, serumdan elde edilen düşük miktardaki antikor eldesinden kurtulunur. Tek bir immunize edilmiş fareden 5-15 ml arasında ascites sıvısı alabildiklerini göstermişlerdir. Üretilen antikorlar iyi titrasyona sahipse, bu antikorlar bir çok amaç için yeterli olmaktadır. Antijen miktarın kısıtlı olmadığına, antikor miktarını artırmak ve fareler arasındaki varyasyonu minimize etmek için aynı anda birkaç fare immunize edilebilir (122,128).

2.11.8. Monoklonal Antikorlar

Hibridoma teknolojisi ile oluşan hibrid hücreleri tarafından üretilen homojen antikor topluluklarıdır. Monoklonal Antikorlar, bağışıklanmış fare veya ratlardan elde edilen dalak hücreleri ile lenfoid tümör hücrelerinden (miyeloma) geliştirilen melez hücreler tarafından üretilmektedir. Monoklonal antikorların üretiminde hibridoma teknolojisi ile birlikte rekombinant DNA teknolojisi de kullanılmaktadır (129).

Monoklonal antikorlar, antijenlerin sadece bir epitopuna karşı oluşan antikorlardır ve sadece bir B-Lenfosite dayanan hücre klonundan elde edilirler. Monoklonal antikorların elde edilme yöntemi 1975'te César Milstein, Georges Köhler ve Niels Jerne tarafından tanımlanmıştır (13). Son yıllarda gerek araştırma gerekse klinik ve laboratuvarlar için tek bir epitopa karşı oluşmuş monoklonal antikorlara çok ihtiyaç duyulmuştur. 1975 yılında Milstein ve Köhler adlı araştırmacılar, bir myeloma hücresi ile antijenik uyarım sonucu oluşmuş plazma hücresini birleştirmeyi ve hibrid (melez) hücreler elde etmeyi başardılar. Hibrid hücreler hem doku kültürü halinde üretilebiliyor hem de uyarıldıkları antijene karşı antikor sentezlemeye devam ediyorlardı. Bu hücrelerin daha da titiz bir şekilde saflaştırılmasıyla antijenin tek bir epitopu için antikor sentezleyen klonlar ayrılabilmiş ve istenilen özgüllükte monoklonal antikorlar sentez edilmiştir. Hücre kültüründe gelişen bu hücreler sadece tek bir antijenik yapıyı tanıdıklarından seçicilikleri yüksektir.

Rekombinant DNA teknolojisi yöntemi aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır: Çoğaltılması istenen gen önce restriksiyon endonükleaz enzimi ile orijinal kromozomdan kesilip bir vektöre aktarılır. Bu vektör transformasyon yoluyla bir maya ya da bakteri içine

sokulur ve daha sonra kültürü yapılarak istenen gen veya protein gerekli miktarlarda üretilir.

Hibridoma tekniğinde üç ana başlık bulunmaktadır:

- Sadece bir epitopa özgü antikor üreten salgılayan ve yaşam süreleri sınırlı olan B-lenfositler
- Hızla üreyen ve bölünme kontrolünü kaybetmiş ölümsüz tümör hücreleri
- Belli şartlarda aynı organizmaya ait farklı hücreler birleştirilerek her iki hücrenin özelliklerini taşıyabilen melez hücreler (hibridoma) elde edilebilir

İşlevleri antikor üretimi olan B-lenfositleri ile neoplastik myeloma hücrelerinin hibridizasyonu sonucu ortaya çıkan melezler, Her iki tip hücrenin özelliklerini taşıyan hibridomalar, doku kültürlerinde çok miktarda mAb oluştururlar. Hibridomalar ana lenfosit hücrelerinin sentezlediği antikorun aynısını oluşturabilir ve ana myeloma hücresi gibi *in vitro* olarak üreyebilirler.

Normal B lenfositlerine benzemeyen miyolema hücreleri ise hızlı bir şekilde bölünmeye devam eder ve hiçbir antijenin stimüle etkisi bulunmadan tek bir tip Ig molekülünü salgırlar. Normal B lenfositleri *in vitro* koşullarda birkaç saatten fazla canlı kalamamalarına rağmen, miyolemalar diğer neoplastik hücreler gibi hücre kültür ortamlarında ölümsüz (immortal) olarak kalabilirler.

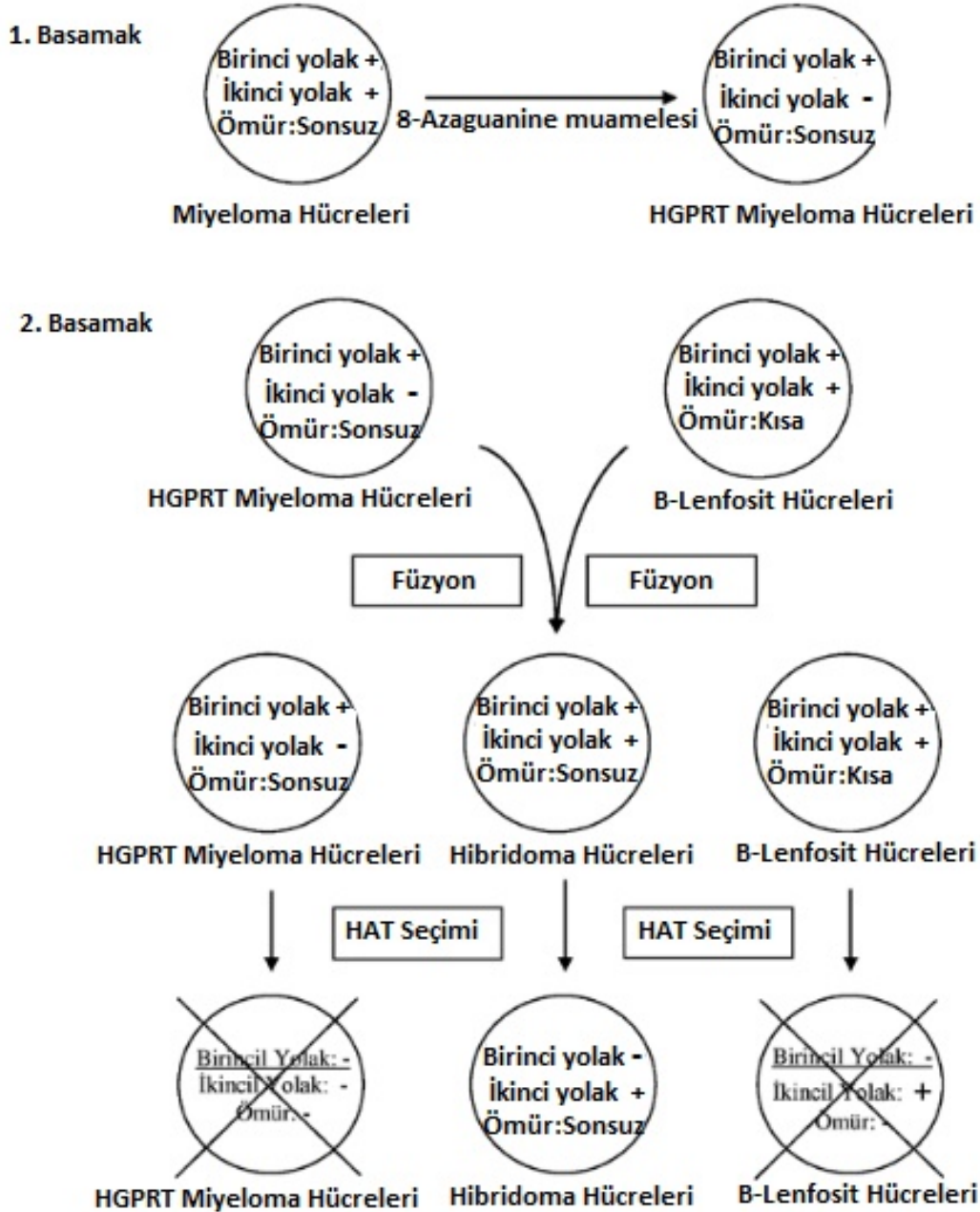
Normal memeli hücreleri iki farklı yoldan DNA moleküllerini sentezlerler:

- De novo (yeni baştan sentez) metabolik yolu ile nükleik asitler, pürin ve pirimidin bazlarından, deoksiriboz ve inorganik fosfattan oluştururlar.
- Salvaj (kurtarma) metabolik yolunda ise, benzer nükleotidlerin dönüştürülmesi ile doğru nükleik asitlerin sentezi sağlanır.

Özgül antikor oluşturmak için aşağıdaki İşlemler uygulanmaktadır;

- Fareler, belirli bir antijene karşı antikor üretmek için antijen ile bağışıklanır.
- Antikor üreten B lenfosit hücreleri dalaktan izole edilir.
- Lenfoid kanser hücreleri olan myeloma hücreleri toplanır.

- PEG aracılığı ile hibridoma hücreler birleştirilir ve birleşmeyen hücreler ölür.
- Hibridomalar kültür plaklarında bölünmek üzere bırakılır.
- Antikor sentezleyen klonlar ELİSA yöntemi ile seçilir.
- Hibridoma hücreleri *in vitro* (hücre kültürü) veya *in vivo* (farede sıvı acit oluşumu) koşullarda geniş çapta üretilir.
- Fare asit sıvıdan veya kültür üst sıvılarından antikorlar saflaştırılır.

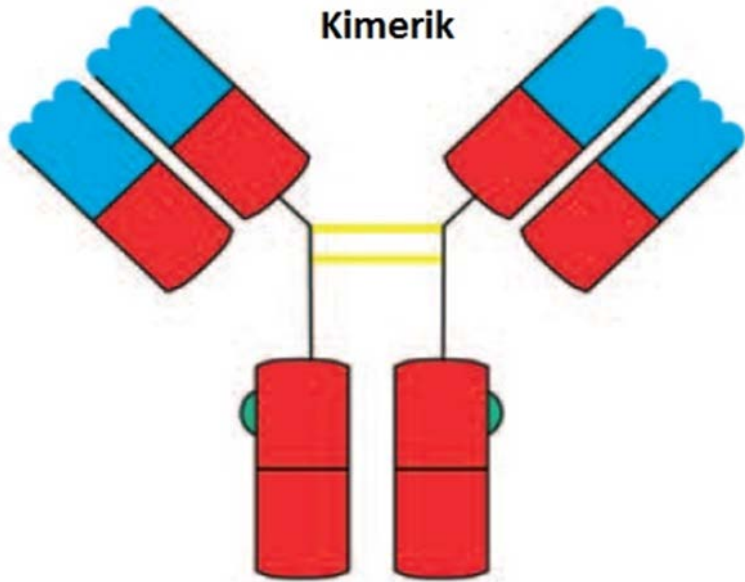


Şekil 2.6. Hibridoma hücre oluşturma basamakları (130)

Geleneksel yöntem olarak bilinen somatik hücre füzyon tekniği ile geliştirilen hibridomalardan üretilen fare kökenli monoklonal antikorlar fare denemelerinde başarı ile tamamlansada insan denemelerinde HAMA (insanda anti-fare antikorlarının oluşumu) adı verilen vücudun kendi antikorlarının gelişmesine, dolayısıyla monoklonal antikorların hedeflerine ulaşmadan önce yok edilmesine sebep olmuştur. Bu nedenle, hem HAMA (insanda anti-fare antikorlarının oluşumu) cevabının oluşmasını hem de fare antikorlarının bağışıklık sistemi tarafından vakitsiz bir şekilde etkisizleştirilmesini önlemek amacıyla, fare antikorlarının “**insanlaştırılması**” için çeşitli teknikler geliştirilmiş bulunuyor (131).

2.11.8.1. Kimerik Antikorlar

1975 yılında Kohler ve Milstein tarafından fare monoklonal antikor yöntemi geliştirilmiştir; ancak insan tedavisinden kullanılan bu fare antikorları insanlarda immün cevabına sebep olmuştur (HAMA). Bunu takip eden yıllarda, genetik mühendisliğini kullanarak düşük immünojenite gösteren (düşük anti-antibadi reaksiyon gösteren), insan vücudunda yarı ömri artırılmış ve insan efekör fonksiyonlarını yeterli derecede takviye edilmiş insanlaşmış antibadi üretilmiştir.

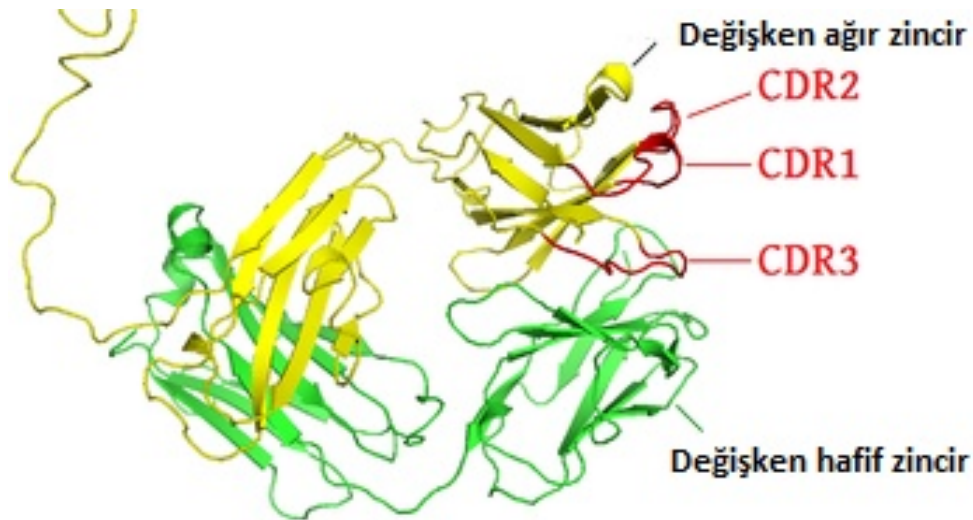


Şekil 2.7. Kimerik antikor (mavi; antijene bağlanan fare kökenli değişken bölge, kırmızı; efekör fonksiyonu gösteren insan kökenli sabit bölge)(132).

Antibadi moleküllerin antijenlere bağlayıcı ve efektör fonksiyonel gösteren alanlarının değişebilen yapısal parçalar olduğu sebebi ile bu yaklaşım olasıdır. Bu teknik farenin antijen bağlayıcı değişken etki alanını insan antikorumun sabit etki alanına eşleştirerek miyolema hücrelerinin rekombinant mühendisliği ile antibadi inşa etmektir. 1984 yılında, kimerik monoklonal antikolar %66 insan dizisi içeren ve % 34 fare dizisinin birleşmesi ile geliştirilmiştir. Günümüzde FDA tarafından da kabul edilen tedavi amaçlı monoklonal antikoların yaklaşık yarısı bu yöntem ile geliştirilmiştir(133,134).

2.11.8.2. İnsansı Antikorlar

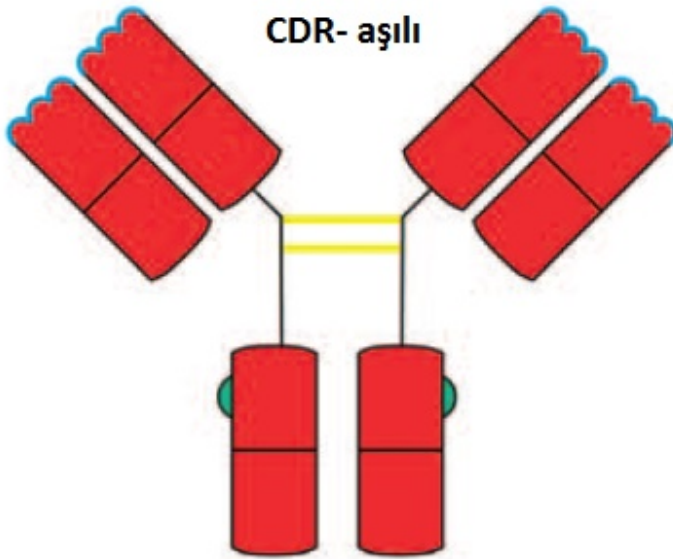
Rekombinasyon ile sağlanan kimerik antikor üretimi sonucunda, sorunun çözümüne yönelik kısmi katkı sağlamıştır. Bu şekilde kimerize edilen (kısmi olarak insanlaştırılan) antikolar ilaç pazarına sunulmuş ve başarılı tedavilere imkân sağlamış olsalar da, uygulandığı hastaların bu antikolara karşı HAMA'ya kıyasla daha seyrek de olsa HACA (insan anti-kimerik antikor) veya HAHA (insan anti-insanlaştırılmış antikor) yanıtı geliştirebildikleri saptanmıştır. Kimerizasyon oranının immünojenite ile doğru orantılı olduğunun fark edilmesi üzerine araştırmacılar hümanizasyon yüzdesini arttırabilecekleri çalışmalara yönelmişlerdir. 1988 ve 1991 yılları arasında, fare antikolarlarının insan koşullarına uyum sağlaması için komplementer belirleyici bölge(CDR) kullanılarak aşılama ve kaplama teknikleri başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir ve fare dizi oranı % 5-10'e düşürülmüştür (134–136).



Şekil 2.8. İnsansı antikor (Fab kolundaki ağır ve hafif zincirlerin uç kısımlarındaki (CDR)(137).

Bu yöntemde genetik mühendisliği uygulamaları ile insan antikorunun antijene bağlanan değişken bölgesi Fareye ait antikorunun değişken bölgesinin antijene bağlanan bölgesi ile değiştirilmiştir. Başka bir deyişle sadece fare antikorunun antijene bağlanan önemli altı değişken bölgesi olan komplementer belirleyici bölgesinin(CDR) peptid lopları insan antikorunun değişken bölgeleri ile değiştirilmiştir. Bu yoldan elde edilen antikorlara yeniden şekillendirme veya CDR- aşılama antikorları denir ve kısmi olarak orijinal hayvan antikorları gibi (genelde Fare) spesifik antijenlere afinite göstermektedirler(138).

İnsansı antikor protein mühendisliği deneylerini kapsayan, fare ekzon mAb'sinin değişken kısmını kodlayan ve insan ekzon antipodisinin ağır ve hafif kısmının sabit bölgesini kodlayan kimerik genleri fizyon yapılarak inşa edilmiştir. Bu inşa edilen yapı hem insanda efektör fonksiyonu olan bir antikor hemde antiglobulinlerin protein bölgelerine karşı olası tepkimeleri azaltmış olmaktadır. Ama aynı zamanda hala antiglobulinlerin değişken bölgelere karşı bir tepki gösterme olasılığı görülmektedir.

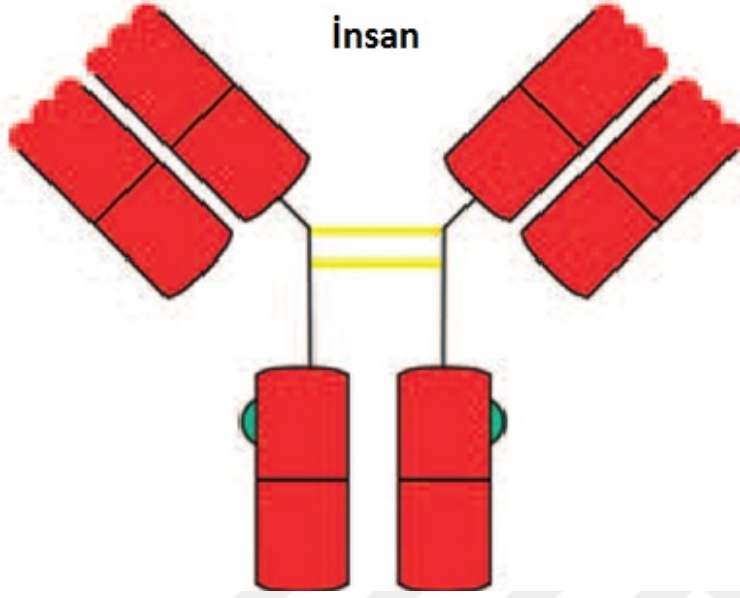


Şekil 2.9. İnsansı veya CDR-aşılı antikor molekülü (132).

2.11.8.3. İnsan Antikorları

İn-vitro monoklonal antikorların keşfinden sonra bilim adamları kimerik antikorların yan etkisini azaltmak için tam insan antikor üretimini hedeflemişlerdir. İnsan monoklonal antikorlar üretimi, insan tedavisinde önemli yere sahip olduğu için günümüzde

geliştirilmekte olan antikorlar tamamı ile insan protein zincirleri içerecek şekilde geliştirilmektedir. Transjenik fare ve faj gösterim tekniği terapötik insan monoklonal antikorl üretiminde en yaygın ve umut verici teknikler arasında bulunmaktadır.



Şekil 2.10. İnsan antikor molekülü (132).

2.11.8.3.1. Faj Gösterim Tekniği

Geleneksel monoklonal antikor üretim tekniğinde kullanılan farelerde her bir hedef moleküle karşı antikor oluşumunu gerçekleştirilmesi bu yöntemin sınırlayıcı bir yönü olarak bilinmektedir. Faj gösterim teknolojisinde, hibridoma teknolojisi gibi antijene özgün B hücrelerinin ölümsüzleştirme ihtiyacı duyulmaması bu teknolojilerinin kullanımı, hastalıkların tanı ve tedavisinde çok önemli gelişmelere neden olmuştur (139).

Moleküler gösterim teknoloji kavramı, genotip (antikor değişken bölge genleri) ve fenotip arasında fiziksel bir bağlantının (antijen bağlama) kurulması ve bağlanması istenen protein kodlayan genlerin seçilmesine izin vermek tekniğine dayanmaktadır. İlk olarak, bir antikorun değişken bölgesinden geniş bir havuza ulaşmak için bazı yöntemler izlenmektedir. Kısmen dejenere olan oligonükleotidler antikorun değişken bölge genlerinin 5' ve 3' ucuna takılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği ile çoğaltılıp hibridomaların değişken gen bölgesinden bir havuz yapılmıştır. İkincisi, bütün antikorlar (tam antikor), fonksiyonel olarak bakterilerde ifade edilemediği için, antikor fragmanları, fonksiyonel olarak, Escherichia coli içinde ifade edilmiş oldular (çünkü, tam bir immunglobulin geni, tek bir

DNA sekansı halinde bulunmayıp ayrı ayrı genlerin reorganizasyonu sonucu oluşabilmektedir). PCR amplifikasyonu için kullanılan oligonükleotidlerin kesim bölgesi sağlanarak, scFv antikor kütüphanesi E.coli içinde sentezleme için klonlanabilir(140).

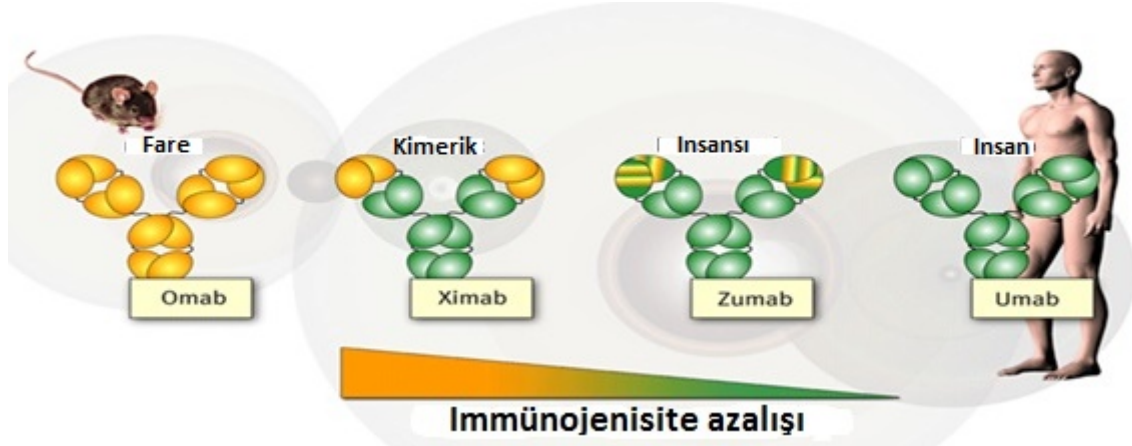
Antikor sentezleyen hibridomalar veya immunize edilmiş farelerin dalaklarından sağlanan B-hücreleri (veya plasma hücreleri) içinden immunglobulin molekülünün VH ve VL zincir fragmentleri ayrı ayrı PCR yöntemi ile izole edilir. Bir fajmide takılarak bakteriye (*E.coli*) yerleştirilir. Fajmid taşıyan E.coli kolonileri M13 helper fajı ile infekte edilir. Bakteriye transfer edilen rekombinant molekül (ScFv-DNA sekansı + fajmid) hücre içinde, sentez edilmeye başlar. Bu sırada faj replikasyonu da başlar, tam faj molekülleri oluşarak bakteri hücresinden dışarı çıkarlar. Dışarı çıkan ve içinde ScFv-gen sekansı taşıyan faj partiküllerinin yüzeyindeki g3p proteinine bağlı olarak bir veya birkaç antikor eksprese edilir. Bakteriden dışarı çıkan fajların ucunda antikor molekülünün varlığı, immunolojik yöntemlerle (ELISA, vs) kontrol edilir ve ucunda antikor molekülü taşıyan fajla, E. coli tekrar infekte edilir. Koloniler alınarak saf olarak üretilir ve fazla miktarda antikor taşıyan faj partikülleri elde edilir.

2.11.8.3.2. Transgenik Fare Tekniği

Modern biyoteknolojinin, genetik modifiye mikroorganizmalara önemli alternatifleri transjenik hayvanlardır. Transgenik hayvanlar kendi genomunda başka bir organizmaya ait rekombinant bir geni içermekte olan hayvanlardır. Temel olarak fare embriyonik kök hücrelerine insan immünoglobülin (Ig) genlerinin aktarılması esasına dayanmaktadır. Transgenik hayvan yöntemi ile üretilen antikorlar bir protein üretme fabrikasına dönüştürülmüş hayvanlardır ve oldukça bol ve saf antikor elde edilmektedir. Seçilmiş antikorlara ait genleri taşıyan transgenik hayvan ve bitkiler elde edilir. Transgenik yöntemlerle üretilen-memeli hayvanların sütünde, istenilen monoklonal antikorlar elde edilebilir. Bu yöntem ile geliştirilmiş ve insan antikor salgılayan farelerin immunizasyonu sonrası yapılan işlemler klasik hibridoma işlemleri ile bire bir aynıdır ve tamamen insan antikor olarak değerlendirilmektedir. Bu süreçte, öncelikle fare embriyonik kök hücre hatlarında Ig-ağır zinciri ile Ig-hafif zinciri genleri inaktif edilerek geliştirilen fare embriyo hatlarında Ig üretmeyen ırk elde edilir. Bunun yanında diğer bir farenin Ig-ağır zinciri ile Ig-hafif zincirinin yanına insan Ig-ağır zinciri ile Ig-hafif zinciri eklenir ve böylece hem insan hemde fare Ig-ağır zinciri ve Ig-hafif zincirini üreten diğer bir ırk elde edilmiş olur.

Daha sonra bu fareleri çiftleştirerek sadece insan immüoglobülini sentezleyen fare ırkı seçilerek immünizasyon işlemine devam edilmektedir.(141,142)

Şekil 2.11.'de görüldüğü gibi fare antikorundan insan antikoruna doğru immünojenitenin azalışı gösterilmektedir.



Şekil 2.11. O= Fare, Xi= Kimerik, Zu= İnsanlaştırılmış, U= İnsan. Örneğn; fare antikoruna olan tositumomab, kimerik olan rituximab, insanlaştırılmış olan bevacizumab ve tam insan antikoruna olan panitumumab (143).

Kullanılabilir spesifik antikor oluşturmak için; immünojenin hazırlanması, immünizasyon, hibridoma oluşturulması ve toplanması (monoklonal antikor için)/ serum ya da ascites sıvısının toplanması, antikorun hedef antijene yönelik üretildiğinin gösterilmesi (antibody screening), izotiplendirme, saflaştırma ve spesifik bir metotta direk bir kullanımı için işaretlendirme yapma yapılacak işlemleri kapsamaktadır. Poliklonal antikorlar serumdan direk elde edilebilir. Monoklonal antikorlar için immünize olmuş hayvandan antikor salgılayan dalak hücreleri ile ölümsüz myelom hücrelerinin füzyonu gerçekleştirilir ve hücre kültürü süpernatantında spesifik antikorları salgılayan monoklonal hibridoma hücre hatları yaratılır (129).

2.11.9. İmmünojen Hazırlanması

İmmünojenin özellikleri immünizasyon aşamasında önemlidir. Hazırlanan immünojen kullanılacak hayvanda toksik etki yaratmamalıdır. Aseptik koşullarda hazırlanmalı, steril toksinlerden ve pirojenlerden arındırılmış olmalıdır. Özellikle, herhangi kimyasal rezidu, endotoksin veya diğer toksik kontaminantlar minimize edilmelidir. pH ise fizyolojik koşullara uygun olmalıdır. Protein yapısındaki çoğu immünojen, mikrogözenekli selüloz

asetat filtreleri (0.22 μ por \mathcal{C} apında) yardımı ile sterilize edilmelidir. İyi bir antikor cevabı oluşturmak için enjekte edilecek immunojen miktarı, immunize edilecek hayvanın soyuna, adjuvan türüne, enjeksiyon miktarı ve sıklığına ve son olarak immunojenin immunojenitesine bağılı olarak değişmektedir. İmmunojen durumu ve büyüklüğüne bağılı olarak üretilen antikorun miktarı ve kalitesi değişebilmektedir. Küçük polipeptitleri ve protein yapısında olmayan moleküllerin enjeksiyonunda immun yanıt oluşturabilmek için kendisinden daha büyük immunojenik yapıda taşıyıcı bir proteine ihtiyaç vardır. İmmunojene karşı oluşacak olan cevabın baskılanmaması için uygun taşıyıcı molekül seçilmelidir. İmmunojenin konformasyonu bazı durumlarda önemli olabilmektedir (144).

Bir maddenin antijen niteliği gösterebilmesi için bazı özelliklere sahip olması gerekir. Yabancılık, molekül büyüklüğü, kompleks kimyasal yapı, molekülün yapısal sertliği, çözünebilirlik ve metabolize edilebilme, emilim ve atılım hızı, elektrik yükü ve genetik yapı, tür, yaş, ...; antijenin verildiği canlıya ait olan bu özellikler maddenin antijenitesini etkiler (145).

2.11.10. Adjuvan Seçimi

Latince "adjuvare" (yardım eden, güçlendiren) anlamına gelmektedir. Kendileri immünojen olmayan, antikor oluşturmayan ancak verildikleri antijeninin immünojenitesini artıran, güçlendiren maddelerdir. Adjuvanlar immun cevabın oluşmasını güçlendirmek için ve antikor üretiminin sürekli olması için gerekli moleküllerdir. Adjuvan aynı zamanda immunojenin dalak ve/ veya immun yanıt oluşumunda hücreler arası iletişimin gerçekleştiği lenf nodlarına dağılmasına yardımcı olur. Adjuvanlar direkt ya da indirekt olarak makrofaj ya da T yardımcı lenfositleri gibi çeşitli hücreleri aktive edebilirler. Üretilen antikorun sürekliliğini, alt sınıfını ve antijene bağlanma derecesini etkileyebilirler. Zamanla adjuvan sayesinde enjekte edilen bölgede immunojenin yavaş bir şekilde dağılımı ve immun sistemi stimüle etmesi ile immunojen depolanabilir. Adjuvanların laboratuvar hayvanları için stres ya da acı oluşturmamasına araştırmacıların dikkat etmeleri gerekmektedir.

İmmunojen küçük bir molekül ise tek başına immun yanıt genellikle tetikleyemeyeceği için adjuvana ihtiyaç duyulabilir. Yüksek konsantrasyonda antijen, adjuvan kullanmayı gerektirmeyebilir. Kullanılırken immunojen/ adjuvan karışımı küçük hacimlerde kolaylıkla

enjekte edilebilir. Antikor üretiminde istenmeyen sonuçların ortaya çıkmasında adjuvanın sürekli uygulanması etkili olabilir. Yaygın olarak kullanılan adjuvanlar; Freund's tamamlanmış (Complete)/ tamamlanmamış (Incomplete) adjuvanı, Quil A, Ribi, TiterMax ve mineral tabanlı alüminyum hidroksit, alüminyum fosfat ve kalsiyum fosfat gibi adjuvanlar vardır (146,147).

2.11.11. Enjeksiyon

Enjeksiyon subkutanöz (SC), intramüsküler (IM), deri içi (ID), intraperitoneal (IP), ya da damarıçi (IV)'nden yapılabilmektedir. Sübkütenaz (derialtı) enjeksiyon yöntemi yağ yada vizkoz jel adjuvanlarla enjekte edilirken tercih edilir. Damarıçi enjeksiyon, fare ve sıçan gibi küçük hayvanlarda yağ bazlı ve vizkoz adjuvanlarda ilk tercih olmamalıdır. Deri içi enjeksiyon ise çoğunlukla tavşanlar ve büyük hayvanlarda uygulanır. Adjuvan ile karıştırılmış örneklerin intraperitoneal olarak enjeksiyonu tercih edilmez çünkü hayvanda inflamasyona, karın zarı enfeksiyonuna, davranışsal değişikliklere sebep olabilir (147).

İmmunize edilecek hayvanın bağışıklık durumu immunizasyon sonucunu etkiler. Bu yüzden hayvanın yaşı önemlidir. Poliklonal antikor üretimi için genç deney hayvanlarının kullanılması önerilir. Erken yaşlarda bağışıklık sistemi olgunlaşmadığı için vücuda giren antijene karşı daha hızlı bir yanıt oluşacaktır (147). İmmunizasyon için kullanılacak hayvanların yaşları ile ilgili bilgiler Çizelge 2.3.' de verilmiştir.

Çizelge 2.3. Monoklonal antikor üretimi için kullanılacak hayvanların yaşları

Hayvan	Yaş
Fare	6 haftalık
Sıçan	6 haftalık
Tavşan	3 aylık
Kobay	3 aylık
Tavuk	3-5 aylık
Keçi	6-7 aylık
Koyun	7-9 aylık

Hayvana yapılacak olan enjeksiyon hacmi mümkün olduğu kadar az olmalıdır. Adjuvan ile birlikte vurulacak olan maksimum miktarlar Çizelge 2.4.'de gösterilmiştir (147).

Çizelge 2.4. Farklı hayvan türlerinde bir bölgeye enjekte edilecek antijen-adjuvan karışımının maksimum hacimleri

Türler	Maksimum Enjeksiyon Hacmi	İlk Enjeksiyon Bölgesi	Sonraki Enjeksiyon Bölgesi
Fare, Hamster	100 µl	s.c.	s.c.
Fare, Hamster	50 µl	i.m.	i.m.
Kobay, Sıçan	200 µl	s.c., i.m.	s.c., i.m.
Tavşan	250 µl	s.c., i.m.	s.c., i.m.
Kuzu, Keçi	500 µl	s.c., i.m.	s.c., i.m.
Tavuk	500 µl	s.c., i.m.	s.c., i.m.

s.c.=subktonöz, i.m. = intramusküler

2.11.12. Bağışıklama (İmmünizasyon)

İmmunojenin üretilmesinden sonraki aşamada hayvanların immunize edilmesi için gerekli koşulların hazırlanması gerekir. Antijen hazırlama metodu, adjuvan kullanımı, enjeksiyonun hangi bölgeye yapılacağı, enjeksiyon miktarı ve hangi sıklık ile yapılacağı immünizasyon protokolü boyunca ayrı ayrı düşünülmesi gereken durumlardır (122). Monoklonal antikor üretimi için gerekli olan immünizasyon protokolü, normalde antiserum elde edilmesinde kullanılan yol ile aynıdır. Fakat monoklonal antikor üretiminde bağışıklama işlemi için saf antijen kullanmak zorunlu değildir ve saflaştırma işlemi kontrol aşamasında yapılır. Kuvvetli antijenler, melezleme çalışmasından 4 gün önce tek doz şeklinde; zayıf antijenler ise, sonuncu enjeksiyon hücre melezlemesinden 4 gün önce olacak şekilde aralıklı birkaç enjeksiyon ile B-lenfositlerinin elde edileceği deneme hayvanlarına verilir (129,146,148).

2.11.13. Antikor Görüntüleme (Screening)

Hayvanda gelişen antikor örneklerinin hedef antijene spesifik olarak gelişip gelişmediğini anlamak için yapılan işlemler 'antibody screening' olarak isimlendirilmektedir. İmmünizasyon işlemi süresince yüksek seviyede antijen spesifik poliklonal antikor üreten hayvanların immunize olup olmadığını tanımlamak için screening yapılır. Eğer amaç monoklonal antikor yapmak ise yeterince immunize edilmiş hayvanlar ile işleme devam

edilir. Screening işlemi poliklonal antikorlar için serum, monoklonal antikorlar için hücre kültürü süpernatanı kullanarak ELISA yöntemi ile yapılır (149,150).

2.11.14. Antikor Titrasyonu

Yeterli miktarda antijen ile yeterli süre hayvanın immunize edilmesi sonucunda hayvanın verilen antijene karşı immunize olduğunu kanıtlamak için ELISA yöntemi ile antikor titrasyonu yapılır. Alınan değerlere göre hayvanın immunize olduğuna karar verildikten sonra üretilmek istenen antikorun poliklonal mı monoklonal mı olacağına göre işlemlere devam edilir. Hayvandan alınan kandan elde edilen serumda poliklonal antikorlar bulunurken, monoklonal antikor üretimi için farklı adımlara ihtiyaç duyulur (12,122,147). 1988 yılında Overkamp ve arkd. hayvanın karınıçi boşluğunda kendiliğinden üremiş olan ascites sıvısının poliklonal antikorca zengin olduğu yaptıkları çalışmalarda göstermişlerdir (151).

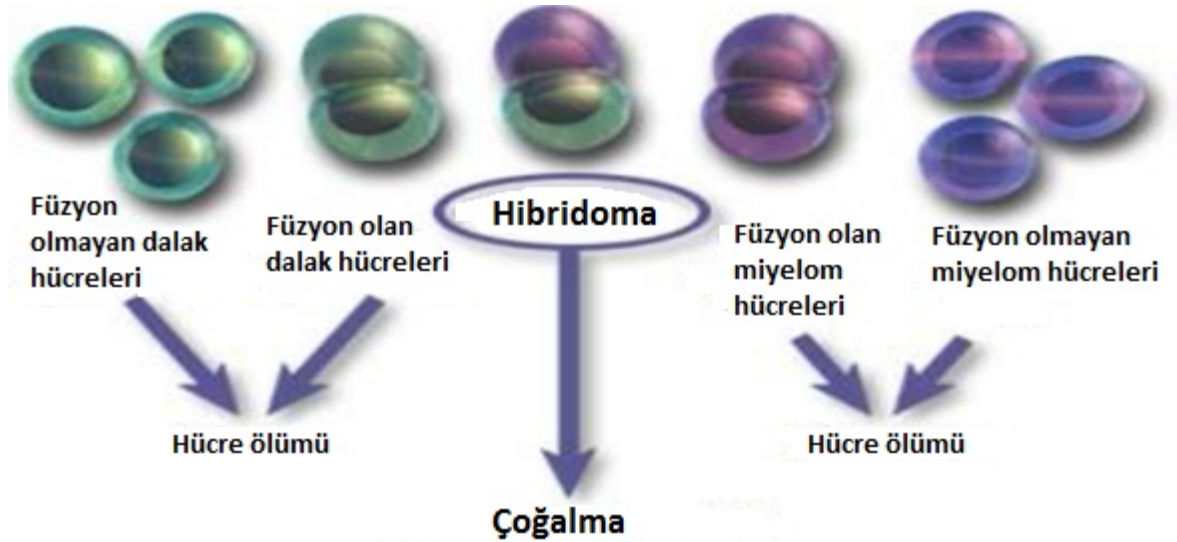
2.11.15. Myeloma hücreleri

Monoklonal antikor üretimi fare ve ratların B-lenfositleri myeloma tümörlerinden elde edilen hücre hatlarının geliştirilmesi ile mümkün olmuştur (13). İn vivo yolla kolaylıkla oluşturulabilen myelomalardan elde edilen bu hücreler *in vitro* olarak da üreyebilmektedirler. Bir pürin metabolizması enzimi olan hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz enziminden yoksun olan bu hücreler, hipoksantin, aminopterin ve timidin (HAT) içeren kültürlerde üreyemezler. Ayrıca myeloma hücreleri kendi immunoglobulinlerini sentezleme yeteneğini kaybetmişlerdir. Monoklonal antikor üretiminde, fare ve rat myeloma hücreleri kullanılmaktadır. Rat myeloma hücreleri, daha büyük olmaları ve daha kolay kaynaşmaları (fusion) nedeniyle fare myeloma hücrelerine tercih edilirler. Ayrıca, fare myelomaları ile insan ve diğer türlerin B-lenfositlerinden elde edilen melez hücreler, *in vitro* kültürlerde kromozamlarını ve antikor sentezleme yeteneklerini kaybederler. Fare myeloma ve rat lenfosit melezleri, rat-rat ve fare-fare hibridleri kadar dayanıklıdır. İyi bir myeloma hücre hattı sürekli ve kolay üreyebilmeli, hızlı üreyen hibritler oluşturmalı, yüksek konsantrasyonda Ig sentezlemeli, kendine ait antikor sentezi yapmamalı, HAT (hipoksantin, aminopterin ve timidin) ortamında yalnız başına üreyememesi için HGPRT (Hipoksantin Guanin Phospho Ribozil Transferaz) veya TK (Timidin Kinaz) enzimi

hasarı olmalıdır. Hibridizasyon çalışmalarında en çok Balb-c farelerinden elde edilen X63, SP2jO ve ratlardan elde edilen YB2/30 hücre hatları kullanılmaktadır (129,148,152).

2.11.16. Kaynaştırma (Fusion) işlemi ve hibrid oluşumu

Füzyon eritme, birleştirme anlamındadır. İki ayrı hücrenin uygun ortamda birleştirilip bazı ortak özelliklerini bir araya getirmektir. İki farklı hücrenin birleştirilme işlemi olan füzyon, monoklonal antikor üretiminin en önemli aşamasıdır. Son antijen enjeksiyonundan 3-4 gün sonra, bağışık kılınmış fare veya ratın dalağında lenfosit süspansiyonu hazırlanır (153). Bu hücreler, myeloma hücreleri ile polietilen glikol (PEG) bulunan bir test tüpünde birkaç dakika bekletilirler (154). Standart bir fusion için ortamda 1×10^8 lenfosit ve 2×10^7 myeloma hücrelerinin bulunması geceklidir. Hücreler mikrotitrasyon kapları içindeki kültür vasatında 37°C de inkübe edilirler. Bundan sonra, hibridleri selektif olarak üretmek için hipoksantinaminopterin-timidin (HAT) vasatı kullanılır. Kaynaşmamış parental myeloma hücreleri HAT besiyerinde üreyemezler. Normal lenfositler de, *in vitro* üreme yeteneklerinin olmaması nedeniyle kısa sürede ölürler. Bu durumda, HAT besiyerinde sadece hibrid hücreler üreyebilmektedirler. Bu hibrieller, HAT besiyerinde üreyebilme özelliklerini hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz enzimine sahip olan ana lenfosit hücrelerinden, *in vitro* üreyebilme özelliklerini ise ana myeloma hücrelerinden almışlardır (129,144,148,153).



Şekil 2.12. Hibridoma Üretimi (155).

2.11.17. Antikor üretiminin kontrolü

Standart bir fusion denemesi için, mikrotitrasyon kabındaki çukurun herbirine 0.2 ml hücre karışımı konur (156). Her çukur 1-5 hibrid hücre içerebilir ve bu hibridler değişik oranlarda ürerler. Hızlı üreyen melez hücreler 10 gün içinde gözle görülebilen koloniler oluştururlar. Yavaş üreyen hücrelerin bu duruma gelmeleri ise 3-4 haftalık bir zaman alır. Bu üreme dönemi sırasında, HAT içeren besiyeri düzenli olarak yenilenmelidir.

Füzyon işlemi rastgele bir oluşum olduğu için fusion işleminden sonra oluşan hibrid hücrelerinin tamamı antikor üretmeye bilir ve antikoe sentezleyen hibrid hücre oranı % 1-50 arasında değişmektedir. Hibridoma hücreleri tarafından belirli antijene karşı üretilen antikorlar besiyerinin üst sıvısında toplanır (120). Antikorların üst sıvıda olup olmadığını 2-3 gün gibi kısa bir sürede kontrol edilmesi iki yönden önem taşımaktadır. Mikrotitrasyon kabının çukurlarında hızla üreyen melez hücreler metabolizma artıklarının çoğalması nedeniyle ölebilirler. Diğer yönden, antikor üretmeyen hücreler hızla çoğalarak, antikor üretenleri baskılayabilirler. Üst sıvıdaki antikorların belirlenmesi amacıyla kullanılan antijenin özelliğine göre, radyoimmunoassay, ELİSA ve hemolitik plak deneyi gibi duyarlı testlerden yararlanılmaktadır (122,129,157).

2.11.18. Antikor İzotiplendirmesi

Antijenin antikor ile stimülasyonundan sonra B hücrelerinin her birklonu aynı V alt yapılarına (domain) sahip olmalarına rağmen farklı isotipler üretebilmektedirler. Naif B hücreleri hem IgM hem de IgD olmak üzere iki çeşit reseptörü de hücre zarlarında bulunduruacak şekilde üretirler. Antijenle karşılaşan T yardımcı hücreleri aracılığı ile sunulan CD40 reseptörü ve salgılanan sitokinlere göre antikorun ağır zincir kısmında izotip dönüşümü (switching) meydana gelir. İzotip dönüşümü sonucunda IgM ve IgD ifade eden B hücrelerinin farklı soyları antijenin en iyi şekilde yok edilmesini sağlayacak isotipleri ve alt grupları üretirler (158). Özet olarak, T yardımcı hücreleri tarafından B hücrelerine sunulan farklı enfeksiyöz reaktiflerine göre dönüşüm gerçekleşmektedir. Örneğin, polisakkarit antijenleri genellikle IgM izotiplerini uyarırlar. Virüs ve bakterilere cevap olarak ise IgG üretilir. Bağırsak parazitlerinin çoğuna karşı genelde IgE antikor, mukozalyolla geçen antijenlere karşı ise IgA antikorisotip dönüşümleri sağlanır. Antikor üretilip, spesifite ve aktivite testleri yapıldıktan sonra hangi izotip antikorların üretildiğini

gözlemek için ticari kitler (ELISA, membran kitleri) yardımı ile izotiplendirme testleri yapılır. Bu kitler farklı türlere göre antikorların sınıf ve alt sınıflarının saptarlar. Örnek verilirse, farede üretilen antikor izotipini saptamak için kullanılacak kitte ağır zincir izotipini saptamak için IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM anti- immunoglobulin antikorları kullanılırken, zayıf zincirleri tanımlamak için kappa ve lambda anti-immunoglobulinleri kullanılmaktadır (158).

2.11.19. Hibridlerin Kümelenilmesi (Klonlama), Saklanması Ve Fazla Miktarda Üretilmesi

Üst sıvısında antikor bulunan çukurlardaki melez hücreler, monoklonal antikor üreten hücre hatlarını elde etmek için kümelenirler. Üreme potansiyeli gösteren hibrid hücre topluluklarından hazırlanan yeni bir süspansiyonla herbir hücrenin yalnız başına üremesinin sağlanmasına klonlama veya kümelenme denir. Kümelenme işlemi, mikrotitrasyon kaplarında sınırlı sulandırma ile veya yumuşak agar üzerinde üretilerek yapılır (159). Kümelenmiş hibrid hücre hatları, DMSO (Dimetil sülfoksit) içinde sıvı nitrojenle dondurulup saklanırlar ve gerektiğinde tekrar kullanılabilirler (2). Elde edilen hibrid hücre hatları *in vitro* olarak, 1 ml besiyerinde 10-100 mikrogram monoklonal antikor oluşturabilirler (156). Bu antikorlar, ortamdaki metabolizma artıklarından biyokimyasal yöntemlerle ayrılırlar. Hibrid hücre hatları, *in vivo* olarak, fare ve ratların karın boşluklarında ascites tümörleri oluşturma özelliğine sahiptirler. Hibrid hücrelerden köken alan bu tümörler büyük miktarlarda monoklonal antikor sentezleyebilirler. Böyle bir deneme hayvanından toplanan ascites sıvısının 1 ml'sinde 5-20 mg miktarında monoklonal antikor bulunabilir (120). Hibrid hücreler ile üretimde kullanılan rodentlerin doku uyumu iyi ise bu hücreler daha kolay üreme olağanına sahip olurlar (129).

2.11.20. Çapraz Reaksiyon (Cross-Linking):

Antijen-antikor birleşmesi spesifik bir olaydır. Fakat birbirine benzeyen gruplar arasında da birleşme olabilir. Buna çapraz reaksiyon adı verilir. Bir antijen molekülünde çok sayıda epitop bulunduğunu bilinmektedir. Bu epitopların bazıları başka bir antijen yüzeyindeki epitoplara benzeyebilir ve bir antijene karşı oluşmuş antikorlar başka antijen epitopları ile de bağlanabilirler.

2.11.21. U937 Hücre Hattı

U937 hücreleri, biyomedikal araştırmalarda kullanılan bir model hücre hattıdır. Bu hücreler 37 yaşındaki bir erkek hastanın histiositik lenfomasından izole edilmiştir ve monositlerin davranış ve farklılaşmasını incelemek için kullanılmaktadır.

Histiosit hücreleri insan bağışıklık sisteminin bir bölümünü oluşturmaktadır. Histiositler kök hücrelerin çoğalması ile kemik iliğinden türer ve kana monosit olarak geğerler. Kanda dolaşan bu monositler çeşitli organlarda farklılaşarak histiositlere dönüşürler. Bu hücreler yapışmayan ve benzer yapı gösteren hücre hattı olarak kan monositlerinin bir çok biyokimyasal ve morfolojik özelliklerine sahiptirler.

Monoblastlardan normal olarak kemik iliğinde bulunan ve genelde normal periferik kanda görünmez. Monoblastik ve olgunlaşmamış monosit özelliklerine sahip olan bu hücreler, tetiklenerek monosit / makrofaj benzeri hücelere farklılaşma özelliği göstermektedirler.

U937 hücreleri forbol miristat asetat (PMA) ile muamele edildiklerinde, izoenzim, CR3 ifadesi ve diğer fenotipik işaretleyiciler içeren doku makrofaj özelliklerini gösteren yapışkan, replikatif olmayan hücelere dönüşmektedir. Bu özelliklerinden dolayı bu hücreler hücre içi markerler araştırmalarında kullanılmaktadır (160).

2.11.22. Afinite etiketler ve özellikleri

Afinite veya epitop etiketleri son derece güçlü araçlardır ve genellikle hedef protein dizileri onlara eklenmiştir. Başlangıçta afinite etiketleri rekombinant proteinleri saflaştırması için icat edilmiş olsada, řu anda western blot, immünohistokimya (IHC), immünopresipitasyon (IP), sitometri akışı (FCM), protein lokalizasyonu ve benzeri gibi durumlarda kullanılmaktadır.

Heksahistidin etiketi (6His), FLAG etiketi, Strep II etiket, streptavidin bağlama peptidi (SKB) etiketi, kalmodulin-bağlanma peptidi (CBP), glütation S-transferaz (GST), maltoz bağlayıcı protein (MBP), S-etiketi, HA etiketi ve c-myc etiketi dahil olmak üzere sık kullanılan çeşitli afinite veya epitop etiketleri vardır (161,162).

Her etiket kendine özgü avantajları ve dezavantajları vardır. Genel olarak, rekombinant proteinlerin üretimini artırmak için kullanılan bu etiketler saflaştırma ve çözünürlük etiketleri olarak ayrılmaktadırlar.

2.11.22.1. Afinite etiketleri

Enzimler, protein bölgeleri ya da küçük polipeptidler olarak yüksek spesifite ile Karbonhidratlar, küçük biyomoleküller, metal şelatları, antikorlar ve benzeri gibi çeşitli sübstratlara bağlanarak proteinlerin hızlı ve etkili saflıkta temizlenmelerini sağlamaktadırlar.

2.11.22.2. Çözünürlük etiketleri

Bir proteinin düzgün katlanmasını ve çözünürlüğünü arttırmakla birlikte, saflaştırmayı kolaylaştırmak için bir afinite etiketi ile birlikte sık sık kullanılmaktadır.

Bazı durumlarda, örneğin GST ya da MBP gibi büyük boyutlu afinite etiketi, önemli dercede füzyon partneri olan protein yapısı ve biyolojik aktivitesi üzerinde etki bırakmaktadırlar (163).

Afinite etiketleri, yapay polipeptidler olarak genellikle hedef proteinin N-veya C-terminal üzerinde uygun bir açık okuma çerçevesine peptidi şifreleyen cDNA sekansı etiketinin sokulması ile gerçekleşmektedir (161).

Ayrıca, afinite etiketleri hedef proteinin katlanmasını, verimi ve çözünürlüğü artırarak ve rekombinant protein saflaştırmasında kolaylık sağlamaktadır. Küçük boyutlu etiketler (örneğin, 6 x His, FLAG, Strep II ve CBP) rekombinant proteinlerin yapı, aktivite ve özelliklerine daha az etki gösterdikleri için uzaklaştırmalarına gerek yoktur. MBP ve GST gibi büyük boy etiketleri, protein çözünürlüğü ve ifade verimliliği üzerinde olumlu etkileri göstermektedirler, ama immünojenisite ve aşırı ifade gösteren hücrelerde metabolik enerjinin daha çok tüketiminden dolayı küçük boyutlu etiketleri ile karşılaştırıldığında önemli sakıncaları vardır (163).

His-etiketli proteinler, afinite ligandları olan şelat metal iyonları ile kolayca saflaştırılabilir. Afinite saflaştırması için esas sabitleştirilmiş metal afinite kromatografisi tanınmaktadır. His-eklentisi, nötre yakın tampon şartlarında (fizyolojik pH ve iyonik kuvvet) IMAC

reçinesine çok iyi bağlanarak, belirli konsantrasyonları içeren imidazol bağlama tamponu ile füzyon proteinleri elüe edilebilir. 6His etiketlerinin; daha küçük boyut, elektrik yükün olmaması, düşük toksisite ve immünojenite seviyeleri gibi birçok meziyetleri vardır. His etiketleri E.coli hücre ekstralerinden orta saflıkta, düşük maliyet ve yüksek kapasiteli reçineleri ile verimli füzyon proteinleri elde etmesine rağmen memeli hücre ekstralerinden nispeten zayıf saflaştırma sağlamaktadır (164). polihistidin etiketi 6 histidin aminoasit, 0.84 kDa ve tutuma matrisi olarak nikel/kobalt gibi metal iyonları kullanılmaktadır.

Glutasyon-S-transferaz (GST) etiketi hareketsiz glutatyona güçlü bağlanan iyi kurulmuş afinite etiketlerinden bir diğeridir. GST'ler genellikle bakterilerde bulunmayan ökaryotik organizmalarda mevcut olan çok fonksiyonlu sitozolik protein ailesi olduğu için prokaryotik ifade kullanımında en uygun olan bir etikettir. GST etiketi, MBP etiketine benzer şekilde, uzundur ve füzyon proteinlerinin çözünürlüğünü arttırmak için E. coli içinde kullanılmaktadır. GST proteinleri hareketsiz glutasyon tarafından tutunur ve daha sonra indirgenmiş glutasyon kullanarak, denatüre olmayacak koşullar altında elüe edilir (163,165–167). Glutasyon S-transferaz (GST) etiketi 211 aminoasit, 26 kDa ve tutunma matrisi olarak glutasyon kullanılmaktadır.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Biyoteknolojinin temeli olan rekombinant DNA Teknolojisi, bir genomdaki binlerce gen arasından tek bir genin ayrıştırılmasını, tanımlanmasını ve bu genin klonlanmış DNA molekülü olarak büyük miktarlarda üretilmesini mümkün kılmaktadır. Antikorlar, enzimler, proteinler, antijenler ve daha birçok biyolojik ürün bu teknoloji ile üretilmektedirler (168).

Antikor üretim teknolojisinin giderek geliştiği ve ihtiyaç duyulduğu bu yüzyılda antikor teknolojisinin uygulama yöntemlerini öğrenmek ve farklı yaklaşımlar geliştirmek hem terapötik uygulamalarda hem de bilimsel çalışmalarda kullanılmasına önemli katkılar sağlayacaktır. Antikorların oldukça önemli İki özelliği, çeşitli hastalıklarla savaşmada onları son derece etkin kılar;

- 1) Her bir antikorun sadece tek bir antijene bağlanma özgüllüğü göstermesi
- 2) Bağışıklık sistemini bir kez uyaran bazı antijenlere karşı ömür boyu dayanıklılık sağlanmaktadır (Örneğin; kızamık ve suçiçeği gibi çocuk hastalıklarına karşı vücudun ürettiği antikorlar, hayat boyu bu hastalıklara karşı vücutta direnç oluşmasını sağlar)

Monoklonal antiadileri önemli kılan diğere bir husus ise tedaviye yönelik kullanımının artmasıdır. Bu alanda özellikle insansılaştırılmış antikor üretiminde son yıllarda büyük bir rekabet başlamıştır. 1997-2011 yılları arasında monoklonal antikorların dünya ilaç pazarındaki payının yaklaşık %44 oranında artış gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca dünya ilaç pazarının yaklaşık %10'un monoklonal antikorların oluşturması bu sektörün ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. 2012 yılında ilaç sektöründeki monoklonal antikor pazarı USD 78 milyara ulaşmıştır. 2011 yılında ise sadece 6 monoklonal antikor (Infliximab, Etanercept, Bevacizumab, Rituximab, Adalimumab ve Trastuzumab), bu pazardaki payı %60 seviyesine ulaşmıştır (169–171).

A-FABP'si genetik olarak silinmiş fare modelinin metabolik sendromun etkilerine karşı korunduğı deneysel kanıtlarla gösterilmiştir. Bu yüzden A-FABP'nin fonksiyonlarının

değiştirilmesi yada durdurulması metabolik sendromun komponentleri olan insulin direnci, tip-2 diyabet, ve ateroskleroz'un farmakolojik ajanlarla tedavi edilmesi şansını ortaya çıkarmıştır. Küçük moleküllü kimyasal inhibitörlerle metabolik hastalıkların önlenmesi ve tedavi edilmesi yolunda başarı sağlanmıştır (8–10).

A- FABP eksik olan farelerde, genetik veya diyetle bağlı obezite durumunda, insulin direnci ve hiper-insülinemide azalma görülür. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, A-FABP inhibisyonunun insulin direnci, diyabet, yağlı karaciğer ve ateroskleroza karşı potansiyel terapötik etkileri gösterilmiştir. Başka bir deyişle A- FABP'nin plazmadaki miktarı obez, metabolik sendrom ve tip 2 diyabet de artış göstermektedir (172,173).

Bu araştırmanın amacı rekombinant olarak üretilen FABP4'e karşı monoklonal antikor üretmektir. Bilinen klasik protokol doğrultusunda elde edilecek monoklonal antikor'ların FABP4 ve diğer izotipler ile reaktiviteleri kontrol edilerek kullanım genişliğinin belirlenmesi de hedeflenmiştir. Böylelikle bu antikorların terapötük ve diagnostik kullanım potansiyellerine ilgili olarak ileride yapılacak çalışmalara ışık tutulması hedeflenmiştir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Materyal

Proje kapsamında, 06 Mart 2013 tarihli ve 2013-6-42 karar no'lu etik kurulu onayı (EK 1) alınmıştır.

4.1.1. Genel reaktifler

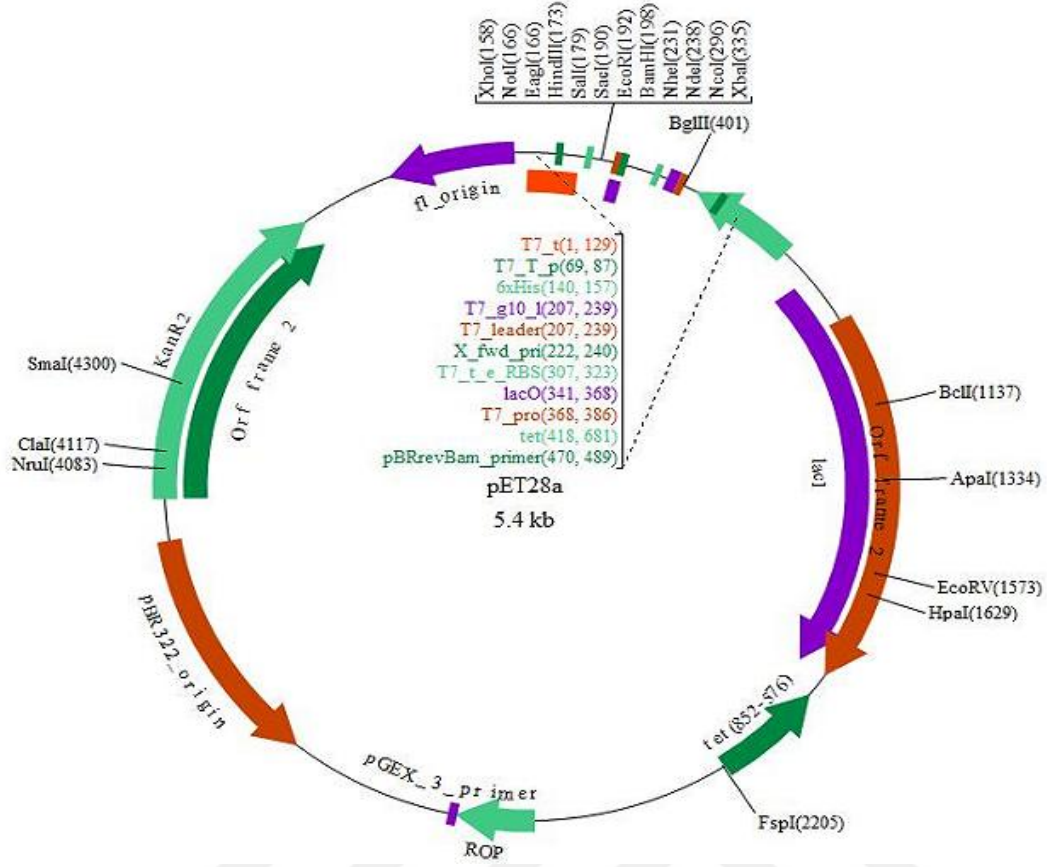
Genel laboratuvar kimyasalları olarak Fischer Scientific, Applichem, Merck, Promega, Sigma Aldrich, Ambresco, Biorad, *In vitro* gen firmalarının ürünleri kullanılmıştır.

4.1.2. Kullanılan FABP4 örnekleri

İnsan A-FABP'lerini kodlayan vektörler(pET28a vektörleri) Prof. Dr. Gökhan HOTAMIŞLIGİL'den alınmıştır(Çizelge 4.1.). pET28a-haP2 (~5360 bç) vektöründe hedef genin (FABP4) N-terminal ucunda polihistidin-tag(HİS-tag) protein füzyonu bulunmaktadır. FABP4'un klonlama işlemleri ise üzerinde N-terminal histidin, trombin ve T7 promotor bölgesi bulunan, kanamisin direnç kasedine sahip PET ekspresyon sistemlerine mensup pET-28a vektörü ile yapılmıştır.

Çizelge 4.1. pET28A vektör özellikleri

Çeşit	İsim	Başlangıç Pozisyonu	Sonlanma Pozisyonu
Multiple Klonlama Bölgesi	MCS (XhoI, NotI, EagI,HindIII, SalI, SacI, EcoRI, BamHI, NheI, NdeI, NcoI)	158	203
Bakteri orjini	f1 orjini	4903	5358
Bakteri replikasyon orjini	Ori	3270	3889
promotor	T7 promotor	368	386
Represör geni	LacI	896	1852
Seçici markör	KanR	3995	4807
Tag	6xHis tag	140	157
Trxn regülasyon elementi	Lac operatör	347	363
Trxn terminasyon sekansı	T7 terminatör	26	72



Şekil 4.1. pET28a Vektör Haritası(174)

4.1.3. PZR reaktifleri

Q5 High Fidelity DNA polymerase (BioLabs, M0491) kiti içerisindeki reaktifler PZR ürünü olarak kullanılmıştır. PZR reaksiyonu Biorad DNA Engine Thermal Cycler cihazında gerçekleştirilmiştir. pET28a-haP2 (~5360 bç) 2.82 µg/µl konsantrasyonundaki stoğu 1000 kat sulandırılarak kalıp DNA olarak kullanıldı.

Çizelge 4.2. Genel PZT protokolü

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon	
H2O		ul
Tampon	1	x
MgCl2	3	mM
dNTP	0.3	mM
İleri primer	0.3	mM
Geri primer	0.3	mM
Taq DNA/Stream polimeraz	0.050	U/ul
Kalıp DNA(plazmid)	0.003	ug

Çizelge 4.3. Genel PZT Sıcaklık dongusu

Basamak	Sıcaklık(°C)	Zaman(s)	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94	120	1
Denatürasyon	94	20	40
Bağlanma	59	60	
Uzama	72	60	
Uzama	72	300	1

4.1.4. Restriksiyon enzimleri

EcoRI (BioLabs, R0101S) ve NotI (BioLabs, R0189S) restriksiyon endonükleazları ve tampon çözeltileri plazmit kesiminde kullanılmıştır.

4.1.5. Guanidin DNA saflaştırma protokol bileşenleri

Moleküler klonlama işlemleri sırasında elde edilen PZT ve kesim ürünlerinin içerlerindeki gereksiz dNTP, enzim, tuz ve diğer kontaminasyonların uzaklaştırılmasını sağlamak için DNA saflaştırma bileşenleri çizelge 4.4.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Guanidin bazlı saflaştırma tamponu

Mallzeme	Stok	Çalışan yoğunluk
GuHCl	8.00 M	5 M
Na ₂ SO ₃	2000 mM	50 mM
Bromtimol mavisi	100 X	0.2 X
NaAsetat pH 5,2	3000 mM	50 mM
DNA		
H ₂ O		

4.1.6. Bakteri kültür ortamı ve besiyeri

Tez boyunca kullanılan *E.coli* suşlarının sürekliliği Luria-Bertani (LB) sıvı ve katı besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Transformasyon ve ekspresyon öncesi besiyeri olarak, zenginleştirilmiş SOC besiyeri kullanılmıştır. Klonlama sırasında ve sonrasında vektore uygun secici antibiyotik kullanılmıştır. Bakteri vektörü olan pET28a için 50 µg/ml çalışan konsantrasyona sahip kanamisin secici antibiyotiği kullanılmıştır. Bakteri kültürlerinin inkubasyonu 37°C sıcaklığında, ekspresyonu ise oda sıcaklığında yapılmıştır.

Çizelge 4.5. LB sıvı besiyeri içeriği

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
Tripton	10 g/l
Maya	5 g/l
NaCl	0.5 g/l
NaOH	0.001 N

Çizelge 4.6. LB katı besiyeri içeriği

Malzeme	Çalışan Konsantrasyon
Tripton	10 g/l
Maya	5 g/l
NaCl	0.5 g/l
Agar	15 g/l
NaOH	0.001 N
LB-kanamisinli katı besiyeri için	0.05 mg/ml
H ₂ O	

4.1.7. Bakteri suşları ve plazmitler

FABP4 üretimi amacıyla bakteri konakçı hücresi olarak E.coli (K12) suşları kullanılmıştır. Klonlanma ve protein üretimi gibi konularda üretim kolaylığı ve düşük maliyet sebebiyle sıklıkla E.coli'ler tercih edilmektedir. Transformasyon verimini artırmak amacıyla öncelikle zengin içeriği olmayan ve maliyetsiz besiyerinde kolayca üreme yeteneğine sahip olan E.coli'nin JM109 suşu tercih edilmiştir. Daha sonra, ekspresyon deneylerinde kullanıma uygun olmadıkları için bu amaçla tez kapsamında, bakteri konakçı hücresi kullanılarak FABP4 ekspresyonu BL21(DE3) suşu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.1.8. Transformasyon, plazmit izolasyon reaktifleri

Transformasyon boyunca gerekli LB Broth (Conda, #1231), laboratuvarında hazırlandı. TSS çözeltisi(LB broth, PEG, DMSO and Mg⁺²) ve SOC besiyeri (20 g/L Triptofan, 5 g/L Maya Özütü, 4,8 g/L MgSO₄, 3.603 g/L dekstroz, 0.5g/L NaCl, 0.186 g/L KCl), buz kabı, 42°C'ye ısıtılmış su banyosu, cam tüp malzemeleri ve öze kullanıldı.

Çizelge 4.7. Transformasyonda kullanılan TSS içeriği ve protokolü

TSS İçeriği	Malzemeler Çalışan	Konsantrasyon
	MgSO ₄	10 mM
	MgCl ₂	10 mM
	DMSO	% 5
	PEG-6000	% 10
Hazırlanışı (10 ml için)	<ul style="list-style-type: none">• 1g PEG6000 tartılır ve 6-7 ml LB içerisinde çözülür.• Üzerine 100 µl 1 M MgCl₂ ve 100 µl MgSO₄ eklenir. Total hacim 9.5 ml'ye LB ile tamamlanır.• Bu çözelti 0.2'lik filtreden süzülüp, steril edilir.• Üzerine 475 µl DMSO (steril) eklenir.• Çözelti, vorteksenerek kullanıma hazır hale getirilir.	

Çizelge 4.8. Alkalen lizis I çözelti protokolü

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Tris-Cl(pH 8.0)	25 mM
Glukoz	50 mM
EDTA (pH 8.0)	10 mM

Çizelge 4.9. Alkalen lizis II çözelti protokolü

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
NaOH	0.2 N
SDS	%1
Bu çözelti taze hazırlanıp kullanılmalıdır. Önce NaOH, suya eklenir. Sonrasında üzerine SDS yavaşça koyulur.	

Çizelge 4.10. Alkalen lizis III çözelti protokolü

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Glasiyel Asetik Asit	11.5 ml
5M Potasyum Asetat	60 ml
H ₂ O	28.5 ml

4.1.9. Protein purifikasyon, desalting protokolü

Protein purifikasyonu için HisPur Ni-NTA Resin ve Kitleri (Thermo Scientific, #88221) ve desalting protokolü için D-Salt Poliakrilamid plastik desalting kolonları (PierceTM, #89849) kullanılmıştır. Polihistidin etiketi 6 histidin aminoasit, 0.84 kDa ve tutuma matrisi olarak nikel/kobalt gibi metal iyonları kullanılmaktadır.

Çizelge 4.11. Rekombinant proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan His afinite etiketi

Afinite etiket	Uzunluk(aa)	Boyut(kDa)	Matris
Hexahistidine (6x His)	6	0.84 kDa	Metal iyon(Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+})

4.1.10. Protein izolasyon ve tayin reaktifleri

Protein izolasyonu için modified RIPA çözeltisi (pH 7,2) hazırlanmıştır. MRIPA 50 mM Tris (Sigma, #A2264), %1 Triton X 100 (Sigma, #9002-93-1), %0,2 sodyum deoxcholate (Sigma, #302-95-4), %0,2 SDS (Fisher Scientific, #134135), 1mM EDTA (Gerbu, #1034) reaktiflerinden oluşmaktadır. Sonics Vibra Cell sonikatör cihazı metot sırasında kullanılmıştır. Protein yoğunluk tayininde BCA protein assay kit kullanılmıştır (Pierce,#23225).

Çizelge 4.12. Bakteriyel protein izolasyonu çözeltisi

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
Tris Tampon pH 8.0	50 mM
Triton X-100	% 1
sodyum deoxcholate	% 0.2
SDS	%0.2
EDTA	1 mM
H2O	

4.1.11. Fareler

Bu çalışmada 3 tane BALB-c fare kullanılmıştır. Her 3 fare de aynı zamanda FABP4 ile aşılanmış ve antikor seviyeleri ölçülmüştür.

4.1.12. Hayvan immunizasyonu

İmmünizasyon planı antijenin doğasına bağlı olarak değişmektedir. Periton için kullanılan rotalar, genellikle antijen/yardımcı madde karışımları 0.5ml kadar kullanılmaktadır. Tam Freund adjuvanı (CFA)/antijen karışımları primer immünizasyon ile sınırlı olmalıdır ve tam olmayan Freund adjuvanı (İFA), birincil aşılardan sonra 14 ile 28 gün arasında kullanılmalıdır. Farklı hayvan türleri için, sulu bir antijen / adjuvan karışımının enjekte edilmesi için önerilen maksimum hacmi (mL) ve enjeksiyon yeri çizelge 4.13.'de

verilmiştir. Freund's complete (Sigma, F5881) ve incomplete adjuvanları (Sigma, F5506) fare immunizasyonunda antijen ile belli oranlarda karıştırılarak hayvanlara verilmiştir.

Çizelge 4.13. Farklı hayvanlarda antijen/adjuvan miktarı(mililitre) ve yolu

Enjeksiyon yolu						
Hayvan	s.c.	i.d.	i.m.	i.p.	i.v.	
Fare	0.5	NR	NR	1.0	0.2	
Sıçan	0.5-1.0	NR	NR	5.0	0.5	
Kobay	1.0	NR	NR	5.0-10.0	0.5-1.0	
Tavşan	1.5	0.05	0.2-0.5	10.0-20.0	1.5	
Koyun/geçi	2.0	0.05	2.0	NA	30.0	
Sığır	2.0	0.05	2.0	NA	NG	

NR, tavsiye edilmez; NA, kabul edilmez; NG, verilmez

4.1.13. ELİSA çözeltileri

Kaplama tamponu: 10 µg/ml FABP4 rekombinant proteini sodyum karbonat tampon çözeltisinde hazırlandı. Bloklama tamponu: PBS-T içinde hazırlanmış %5'lik süt tozu kullanıldı.

4.1.14. Hibridoma reaktifleri

RPMI besiyeri (glutaminsiz, phenollü) (Lonza, BE 12-167F), Fetal SığırSerum (Lonza, DE 14-801F), Penisillin/Streptomisin, 10,000 units/ml (Lonza, DE-17602E), L-glutamin (Lonza, BE 17-605E), HAT Media Supplement Hybri-Max (Sigma, H0262), HT Media Supplement(50X) Hybri-Max (Sigma, H0137), Polietilen glikol solusyonu Hybri-Max, %50 (w/v), steril-filtreli BioReagent (Sigma, P7181) malzemeleri kullanılmıştır.

4.1.15. SDS-PAGE'de ayırma ve yığma jeli

%12'lik ayırma ve %5'lik hizalama jelin içerikleri çizelge 4.14. ve 4.15. da verilmiştir.

Çizelge 4.14. % 12'lik ayırma jeli

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
1.5 M Tris-Cl pH 8.8	2.53 ml
Akrilamid	4 ml
SDS %10	100 ul
APS	100 ul
TEMED	4 ul
H2O	4 ml
Toplam hacim	10 ml

Çizelge 4.15. %5'lik Hizalama jeli

Malzemeler	Çalışan Konsantrasyon
0.5 M Tris-Cl pH 6.8	2.760 ml
Akrilamid	657 ul
SDS %10	40 ul
APS	40 ul
TEMED	4 ul
H2O	2.760 ml
Toplam hacim	4 ml

4.1.16. Jel elektroforez yürütme tamponu**Çizelge 4.16.** 5X jel elektroforez yürütme tamponu

Kullanılan kimyasal	Kullanılan miktar
Tiris	15 g
Gilisin	72 g
SDS	5 g
Toplam hacim (PH= 8.3)	1 litre

4.1.17. Western reaktifleri

Elektroforez sistemi (Bio-rad Mini Protean Tetra vertical, #165-8000) western protokolü için kullanılan sistemdir. Poliakrilamid jel hazırlarken akrilamid 4K solüsyonu (Applichem, A1672), Tris (Sigma, A2264), SDS (Fisher Scientific, #134135), amonyum persülfat (APS) (Gerbu, #1708), Temed (Scharlan, TE0050) reaktifleri uygun konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Koşma tamponu (pH 8,3) 250 mM glisin, 25 mM tris, %0.1 SDS ve transfer tampon (pH 9.3) 48 mM tris, 39 mM glisin (Fisher Scientific, BP381-1) , 0.04% SDS, 20% metanol içermektedir. Yıkamalar için kullanılan PBS-Tween (pH 7.5); 80 mM disodyum hidrojen (MERCK, #106587), 20 mM sodyum fosfat monobasic

monohidrat (Sigma, #10049-21-5), 100 mM sodyum klorür (Fisher Scientific, BP 358-1) ve %0.1 Tween 20 (Sigma, P9416) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Western Blot yönteminde kullanılan 1 X transfer tampon içeriği çizelge 4.17.'de verilmiştir. Ayrıca Rekombinant protein üretiminin her aşamasında yapılan western blot yönteminde kullanılan sekonder antikor içeriği çizelge 4.18.'de verilmiştir.

Çizelge 4.17. 1 X transfer tamponu

Kullanılan kimyasal	Kullanılan miktar
Tris	5.8 g
Gilisin	2.9 g
SDS	0.37 g
Metanol	200 ml
Toplam hacim (PH= 9.2)	1 litre

Çizelge 4.18. Sekonder antikor içeriği

Malzemeler	Çalışan Konstrasyon
Anti-Fare poli-HRP Antikoru	0.8 µg/ml
PBS	(1X)

4.1.18. Antikor tiplendirme reaktifleri

Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit (Pierce, #37503) kullanılmıştır. Ultra saf su ile kitin içerisinden çıkan solusyonlar hazırlanmıştır.

4.1.19. İmmünohistokimya ve immünohistokimya reaktifleri

Hücre ve doku boyaması için; deiyonize H₂O, fiksatif: PBS(1x) içinde 4% formaldehid, PBS: 0.137 M NaCl, 0.05 M NaH₂PO₄ (pH 7.4), Hücre kültür medyumunu (RPMI), primer antikor(ascites), bloking buffer(%10 süt tozu veya bovine serum albumin (BSA)), %3 Triton X-100, 7-aminoactinomycin D (1 mg toz 7AAD için 50 milrolitre soğuk etanol ve 950 mikrolitre 1x PBS ekleyerek, Cat #129935, Calbiochem, San Diego, CA,) %96 Metanol, %2 Gelatin, Wash buffer: 1X PBS içinde 0.1% BSA, Fluorescein isothiocyanate sekonder antikor (FITC), Lam ve Lamel kullanılmıştır.

4.2. Yöntem

4.2.1. pET28a vektöründen hedef genin çoğaltılması

İmmünopresipitasyon gibi çalışmalarda, saflaştırma ve görüntülemeye kolaylık sağlanması ve kimerik GST gibi etiketlerin zor şartlarından kurtulmak amacıyla HİS etiketli pET28a vektörü kullanılmıştır. Hedef gen(FABP4) dizisine Primer tasarlayarak PZT yöntemi ile çoğaltılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen ürünler restriksiyon enzimleri ile kesilip Guanidin DNA saflaştırma protokolü uygulanmıştır. Bunun sonucunda hem vektörün içinde insertın yer alıp almadığını hemde sonraki klonlamalar için FABP4 depolamış olduk. Daha sonra Nanodrop'ta DNA miktarı ve saflığı ölçülür. Bu ürünler -80oC dolapta saklanır.

4.2.1.1. Primer tasarımı

pET28a vektöründen FABP4 dizisini çoğaltmak için primerler, PearlPrimer ve CLC Sequence Viewer programları yardımı ile tasarlanmıştır. Çoğaltılmak istenen hedef dizi sonradan yapılacak restriksiyon deneylerinde enzimler yardımı ile kesileceği için, 5' primer uçlarına enzimin tanıyacağı diziler eklenmiştir. Çizelge 4.19. primer tasarımını göstermektedir. Sentromer firmasında tasarlanan primerler sağlanmıştır. Liyofilize halde gelen primerler DNaz ve RNazsız suda 100 pmol/µl konsantrasyonda çözülür. PZR reaksiyonları için 10 pmol'e diluye edilir. Primerler -20oC'de saklanır.

Çizelge 4.19. FABP4 dizisine tasarlanan primerler

Primer	Dizisi (5'-3')	Bağlanma Sıcaklığı
FABP4-F	5'-ATT <u>GAATTC</u> ATGTGTGATGCTTTTGTAGGTAC -3' EcoRI	60°C
FABP4-R	5'-ATT <u>GCGGCCGC</u> TGCTCTCTCATAAACTCTCGTG-3' NotI	60°C

4.2.1.2. PZT reaksiyonu

Primerlerin bağlanma sıcaklığını doğru tespit etmek için touchdown PZT gerçekleştirilir. Böylece spesifik olmayan amplifikasyonun azalması sağlanır. PZT'nin erken sikluslarında hedefe bağlanma(annealing) sıcaklığı daha yüksek ısı ile başlanır. Primer bağlanma sıcaklığı her siklusta yavaş yavaş azaltılarak optimum sıcaklığa kadar ulaşılır ve kalan sikluslar bu sıcaklık ile tamamlanır. Bu yaklaşım ilk sikluslarda daha spesifik bir bağlanma

sağladığına göre doğru ürünler artmış olur ve non spesifikler ürünler önlenmiş olur. Çizelge 4.20.'de gösterilen bileşenler (enzim hariç) -20 dolabından çıkarılır ve eriyene kadar beklenir. Bileşenlerin tamamı eridiğinde vortekslenir. Çizelge 4.2.'de ki bileşenlerin miktarlar sırası ile eklenir ve sonunda bileşenler pipet ile iyice karıştırılır. DNaz-free tüp ve pipet uçları kullanılır. Hazırlanan tüpler buz üzerinden alınır cihaza koyulur.

Çizelge 4.20. Touch down PZT koşulları

Basamak	Sıcaklık(°C)	Zaman(s) Döngü	Sayısı
Denatürasyon	94	120	1
Denatürasyon	94	40	40
Bağlanma	65* → 55*	60	
Uzama	72	60	
Uzama	72	300	1

*Optimizasyon değişimi

Elde edilen sonuçlar neticesinde PZT optimizasyonuna devam edildi. 4.20. Çizelgesinde görüldüğü gibi primer bağlanma sıcaklığı 55°C inmiş oldu. Hazırlanan reaksiyona diğerinden farklı olarak 5X GC High Enhancer Reaksiyon tamponu eklenmiştir. Kurulan bu reaksiyon ile birlikte optimizasyon gerçekleşmiş ve elde edilen ürünün reamplifikasyonu yapılarak daha fazla miktarda elde edilmeye çaba gösterilmiştir

4.2.1.3. Agaroz Jelde Yürütme

PZT'nin gerçekleşip gerçekleşmediği anlamak için ürünler %2 agaroz jel elektroforezi ile analiz edilmiştir. 2 gr agaroz tartılarak 1xTAE içinde mikrodalga fırın içerisinde çözülür. Jel dökülüp donduktan sonra 4 µl 5x yükleme tamponu, 6µl PZT örneklerinden eklenerek 80V'da 60 dakika yürütülmüştür. Stok Etidyum Bromür'den saf su ile karıştırılarak hazırlanmış ve etrafı kapalı kutu içerisine koyulmuştur. Jel 30 dakika Etidyum Bromür içerisinde inkübe edilir. Etidyum Bromür boyamasından sonra Biorad VersaDoc 1000 görüntüleme cihazında görüntüsü alınmıştır.

4.2.1.4. Guanidin DNA Saflaştırılması

DNA saflaştırması PZT'den gelen primer, dNTPler, enzimler, tuzlar gibi diğer kontaminasyonların uzaklaştırılmasını sağlamak için yapılır. +4°C dolabından malzemeler alınır ve buz üzerinde erimesi beklenir. Başka bir eppendorf tüp içerisinde Çizelge 4.3.'te

gösterilen bileşen miktarlarda koyulur. Sodyum-asetat eklendiğinde tüpteki karışım sarı renge dönüşmelidir. Sonunda hazırlanan karışım filtrelili tüpe aktarılır. 2000 g' de 30 saniye santrifüj (sıcaklığı +4°C) edilir. Aşağı düşen sıvıdan kurtulunur. Filtre 500 µl 2-propanol ile 2000 g'de 30 saniye de iki defa yıkanır. Aşağı inen süpernatandan kurtulunur. Silika filtre 10,000 g'de 2 dakika santrifüj ederek kurutulur. Filtrenin altı temiz bir eppendorf tüp ile değiştirilir. Filtreye değmeneden üzerine gelecek şekilde 50 µl DEPC'li su eklenir ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir. 10,000 g'de 2 dakika santrifuj ile saf ürün elde edilir. Filtredeki tüm örneği toplamak ve yoğunlaştırmak için alttaki örnek filtreye tekrar yüklenerek işlem iki defa tekrarlanır.

4.2.1.5. Plazmit ve PZT ürünlerinin kesilmesi

Hedef bölgeyi vektörün(pET28a) içine sokabilmek için hem vektörün hem de PZT ürünün restriksiyon enzimleri ile tanıma bölgelerinden kesilmesi gerekir. Kesim çizelge 4.21.'da verilen EcoRI ve NotI restriksiyon enzimleri kullanarak gerçekleştirilmiştir. Kesim işlem bileşenleri çizelge 4.21'de gösterildiği miktarda tüp içerisine koyulur, 37oC de 2 saat kesilmeye bırakılır. PZT cihazının kapağı ısıtılmadan çalıştırılır.

Çizelge 4.21. Restriksiyon enzim ile gerçekleştirilen kesim protokol bileşenleri

Tepkime hacmi 50 µl	Stok	Tüp	Hacim (µl)	
H2O			41.65	0.5
pET28A plazmit FABP4 PCR ürünü	5.4 µg/µl	0.07 µg/µl	10 µg	3 µg
Kesim tampon	10x	1x	5	
BSA	1000 µg/ml	10 µg/ml	0.5	
EcoRI	10 U/µl	10 U	1	
NotI	10 U/µl	10 U	1	

Kesilen ürünlerin saflaştırılması için Guanidin DNA saflaştırma protokolü uygulanır. Nanodrop'ta DNA miktarı ve saflığı ölçülür. Bu ürünler -80oC dolapta saklanır.

4.2.1.6. Ligasyon

Ligasyon işleminde en çok dikkat edilecek işlemlerden biri vektör / insert oranıdır. Yapılan deneylerde sırasıyla 1:1, 1:5 ve 1:10 olarak vektör / insert konsantrasyonları denenmiştir. Promega biomath web sitesinden plazmit/DNA uzunluğu ve ölçülen OD değeri girilerek stok konsantrasyon hesaplanır. Vektör / insert oranı 1:10 yapıldığında başarılı bir

transformasyon gerçekleştirdiği sonucu yapılan deneyler sonucunda karar verilmiştir. 4.22. çizelgesinde verilen miktarlarda tüplere sırasıyla malzemeler eklenir. Cihaz kapağı ısıtılmadan 22oC’de 2 saat inkübe edilir. Ürün -80oC dolapta saklanır.

Çizelge 4.22. Ligasyon protokol bileşenleri

Tepkime hacmi 20 µl	Stok	Tüp	1X
H2O			7.82
T4 ligaz tamponu	10 X	1 X	2
Vektör 1:10	0.0014 pmol/µl	0.010 pmol/µl	7.14
Insert	0.049 pmol/µl	0.0100 pmol/µl	2.04
T4 ligaz	5 U/ µl	5 U	1

4.2.1.7. Moleküler transformasyon

İnsan A-FABP genini kodlayan pET28a-hap2 vektörü E.coli JM109 suşuna yüksek verimlilikle transforme edilmiştir. Uygun bir şekilde klonlandığı tespit edilen klonlardan Alkalen lizis yöntemi ile plazmit izole edilmiş ve bu plazmitler, ekspresyon suşu olan BL21 *E.coli* suşuna transforme edilmiştir. Transformasyonu başarılı olan koloniler ekspresyon denemelerine tabi tutulmuşlardır. Ekspresyon sonrasında besiyerinden arındırılan hücreler protein ekstraksiyon tamponu ile parçalanmıştır. Elde edilen protein çözeltilisinden hücre parçaları uzaklaştırıldıktan sonra ekspresyonlar SDS-PAGE denemeleri ile desteklenmiştir.

4.2.1.8. Kültür stoklanması

Tez boyunca kullanılan Escherichia coli bakterileri katı ve sıvı besiyerlerinde aseptik şartlara uygun olarak çoğaltılmıştır. Önceden -80°C sıcaklıkta stokları yapılan JM109, BL21(DE3) suşlarını çoğaltmak amacıyla katı Luria-Bertani (LB) besiyerine ekimleri yapıldı ve 37°C sıcaklıkta gece boyu inkübasyona bırakıldı.

Uremesi gerçekleşen her bir suş(JM109, BL21) -80oC sıcaklıkta stoklamak amacıyla %30 gliserol içeren LB sıvı besiyerine ekimi yapılmıştır. Katı besiyerinden stok yapılacak kültürler steril oze yardımıyla toplanarak 2 ml mikrosantrifuj tüplerindeki 500 µl %30 gliserol içeren LB buvyon içerisinde homojen bir şekilde suspanse edilip -80oC sıcaklığına kaldırılmıştır. Sıvı besiyerinden stok yapılacak kültürler ise, uremiş kültürden alınan ml bakteri veya maya supansiyonu pellet elde etmek amacıyla 13,300 G’de 5 dk santrifuj

edilmiştir. Ardından üstteki besiyeri uzaklaştırılarak kalan bakteri pelleti 500 µl %30 gliserol içeren LB buvyon içerisinde homojen olarak suspanse edilip -80oC sıcaklığına kaldırılmıştır.

4.2.1.9. Transformasyon

pET28a-hap2 (His işaretli) plazmitlerinin *E.Coli* JM109 hücrelerine transformasyonları için *E.Coli* JM 109 gliserol bakteri stoğundan 10 µl alınmış ve 20 ml LB besiyerinde 37°C’de çalkalayıcı etüvde 1 gece bekletilerek çoğaltılmıştır. Transformasyondan önce 50 ml besiyerine 500 µl *E-Coli* JM109 ilave edilmiş 37°C çalkalayıcı etüvde yaklaşık 3 saat kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda spektrofotometride 600 nm’de ölçüm yapıldığında OD’si 0.5’in üzerinde olacak şekilde ayarlanmıştır (OD değeri 0.8 üzerine çıkmamalıdır). Yani erken eksponansiyel fazda iken transformasyona başlanmıştır. 50 ml besiyeri santrifüj tüpüne alınıp +4°C de 580 g’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve pelletin 10 katı hacminde TSS çözeltisi eklenmiştir. Yavaşça suspanse edilmiştir. Tüpe hafifçe vurularak bu işlem yapılmıştır. Sonrasında buz üzerinde 30 dakika bekletilmiştir. TSS içerisindeki *E-Coli*’den 100 µl alınmış ve içerisine 3 µg plazmid eklenmiştir. Plazmidi ekledikten sonra 60 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. 60 dakikanın sonunda 42°C’ye ayarlanmış su banyosunda 90 saniye bekletilip sıcaklık şoku yapılmıştır. Hemen buz üzerine alınmış ve üzerine 900 µl SOC besiyeri eklenmiştir. 37°C çalkalamalı etüvde 1 saat bekletilmiştir. Ardından seçici antibiyotik olarak 50 µg/ml oranında Ampicillin / kanamisin içeren LB agar dökülmüş petrilere 100µl’sinin steril bir şekilde bek alevi kullanılarak drigalski spatülü ile ekimi yapılmıştır. Gece boyu 37°C’ye bırakılan petrilere plazmidi almış bakteriler koloni oluşturmuştur. Seçilmiş kolonilere 50µg/ml Ampicilin’li / kanamisin’li sıvı LB besiyerine ekim yapılmıştır. 6 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. Bu kolonilerin bir kısmı bırakılıp bir kısmından plazmid izolasyonu yapılmıştır.

PZT sonucunda pozitiflik gösteren kolonilerden elde edilen plazmitler, BL21 hücrelerine hedef dizinin translasyonu ve protein eldesi için transforme edilir. Transformasyon protokolü kullanılan organizmanın BL2 olması dışında tamamı aynıdır. Burada 12 sağlıklı koloni 50 ml LB Amp / Kan içerisine inokule edilir ve 37°C’de kültüre edilir. Uygun bulanıklık gözlemlendikten sonra 2X IPTG’li besiyeri (%2 tripton, 1 mM IPTG, 0,05 mg/ml

Amp, LB / Kan, LB) üzerine ilave edilir ve overnight 30°C'de çalkalamalı inkübatörde kültür edilir. Koloniler içerisinde genel protein içeriğini gözlemlemek için protein izolasyonu ve ardından SDS-PAGE yapılır.

4.2.1.10. Alkalen lizis midi prep ile plazmid izolasyonu

50 µg/ml Amp / Kan eklenmiş 10 ml LB'ye transformasyonu yapılmış ve seçici antibiyotik ile seçilmiş bakteriler inoküle edilmiştir. Bir gece 37°C çalkalayıcı etüvde inkübasyona bırakılmış sonrasında 2.000 g'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilip besiyeri uzaklaştırılmıştır. Pellet 200 µl soğuk alkelen liziz 1 çözeltisinde vorteksenerek süspansiyon edilmiş ardından taze hazırlanmış alkelen liziz 2 çözeltisinden 400 µl eklenip 5 defa ters yüz edilerek karıştırılmıştır. Sonrasında 300 µl alkelen liziz 3 çözeltisi eklenmiş ve 5 kez ters yüz edilmiştir. Buz üzerinde 3-5 dakika inkübasyona bırakılıp ardından maksimum hızda 4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası 600 µl süpernatant temiz bir tüpe aktarılıp eşit hacimde fenol kloroform eklenmiş ve vorteksenmiştir. Maksimum hızda +4°C'de 2 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz temiz bir tüpe dikkatlice alınıp. 600 µl izopropanol eklenmiş ve vorteksenmiştir. -20°C ye kaldırılıp gece boyu bekletilmiştir. Maksimum hızda 5 dakika santrifüj edilmiş ve pellet düşürmeden izopropanol uzaklaştırılıp üzerine 1 ml etanol eklenip maksimum hızda 2 dakika santrifüj edilmiştir. Son olarak etanol uzaklaştırılıp 100 µl DNAaz içermeyen RNaz'lı suda pellet çözülmüştür. (20 µg/ml RNaz) Nanodrop'da plazmid DNA miktarları ölçülmüş ve plazmid DNA'sının kalite tayini için agoroz jelde yürütülmüştür.

4.2.1.11. Agoroz jel elektroforezi

Plazmid DNA'sı % 0,8 lik agoroz jelde değerlendirilmiştir. %0.8 lik jel için 0,8 g agar tartılmış ve 100 ml 1X TAE (40mM Tris, 20mM asetik asit ve 1mM EDTA) tamponu içerisinde agoroz tamamen eriyene kadar mikrodalgada kaynatılmıştır. Jel tabağına önceden uygun taraklar konularak, hazırlanmış olan agoroz jel tabağına dökülmüştür. Hava kabarcığı oluşmamasına özen gösterilmiştir. Jelin polimerleşmesinin ardından jel tabağı ile birlikte elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Elektroforez tankı 1X TAE tamponu ile jelin üzerini tamamen kaplayacak şekilde doldurulmuş ve plazmid DNA'sından 4 µl alınıp 1 µl yükleme tamponu (bromfenol mavisi ve gliserol içeren) ile karıştırılarak jelle yüklenmiştir. 80 V'da 1:30 saat yürütülmesinden sonra 5mg/ml etidyum bromür içerisinde

15 dakika boyanması beklenmiştir. Görüntüleme ultraviyole ışık altında yapılmış ve fotoğraflanmıştır.

4.2.2. Monoklonal antikor üretimi

4.2.2.1. BL-21 hücre lizatı hazırlanması

Kültüre edilmiş BL-21 hücreleri falkon tüplere aktarıldıktan sonra 5,000 g'de 10 dakika soğuk santrifüjde (+4°C) çevrilir. Besiyerinden kurtulunur. Oluşan pelletin ufak bir kısmı steril kürdan ile alınır yükleme tamponu ile karıştırılarak SDS-PAGE'te kullanılmak üzere ayrılır. Kalan pellet 2-5 ml lizis tamponda (50mM Tris, 400mM NaCl, %10 Gliserol, %1 Triton X100, %1 SDS, dH₂O) iyice karıştırıldıktan sonra cam tüplere aktarılır. 15 dakika soğuk odada santrifüj edilir. Ardından buz üzerinde ultrasonikatörde 20 saniye (toplamda 3-4 dakika) tutularak bütün hücrelerin tamamen parçalanması sağlanır. Maksimum hızda 13.000 g'de +4°C' de 15 dakikalık santrifüjün ardından süpernatant temiz bir tüpe alınır ve protein tayini yapılır.

4.2.2.2. Protein yoğunluk tayini

Protein tayini için BCA (bikinkoninik asit) protein tayin yöntemi kullanılmıştır. BSA'dan. 2mg/ml, 1mg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml lık standart protein çözeltileri HPLC H₂O içerisinde hazırlanmış ve İkişer tekrar yapılarak standart protein çözeltilerinden 25 er µl kuyucuklara dağıtılmıştır. Ayrıca blank için iki wele sadece HPLC H₂O ve PBS konulmuştur. Hücre lizatları 1/5 oranında HPLC H₂O ile seyreltikten sonra 25' er µl 96 lık plate kuyucuklarına ikişer tekrar olarak dağıtılmıştır. BCA kiti içerisindeki A ve B reaktif 1/50 oranında karıştırılıp her bir kuyucuğa 200 µl ilave edilmiştir. Ardından 37°C' de 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır ve daha sonra ise 562 nm'de spektrofotometride okutturulmuştur. Çıkan değerler excelle aktarılmış ve standartların değerlerinden standart eğri grafiği excelle çizdirilmiştir. Regrasyon tahmin denklemi excell tarafından hesaplanmıştır. Ayrıca r² değeri de hesaplanmıştır. r² değeri ne kadar 1'e yakın olursa sonuçlar okadar güvenilir demektir. Denklem üzerinde y değeri yerine hücre lizatlarımızın absorbans değerleri koyularak x değerleri hesaplanmıştır. X değeri herbir örneğin protein yoğunluğunu gösteririr ancak bu değer seyreltmiş değerdir. Bu yüzden

çıkan sonuçlar seyreltme faktörü ile çarpılmalıdır. Böylece elimizdeki hücre lizatlarının protein yoğunluk değerleri hesaplanmıştır.

4.2.2.3. Affinite Kromatografisi ile Protein Saflaştırması

Kolonilerden protein eldesi yapıldıktan sonra SDS poliakrilamid jelde hangi koloninin daha iyi proteini ifade edebildiğine karar verilir. Seçilen koloni daha büyük hacimde IPTG'li besiyerinde kültüre edilir lizis protokolü uygulanır. Elde edilen protein lizati örneği affinite kromatografisi'nde kullanılır. HisPur Ni-NTA Resin ve kiti kullanılır. Kitin verdiği talimatlar doğrultusunda protokol uygulanır. Kolon yapısını muhafaza etmek için içerisinde solüsyona sahiptir. Kolon +4oC dolaptan çıkarılır, 50 ml hacmindeki falkon tüpe yerleştirilir. 700 g'de 2 dakika santrifüj yapılarak sıvıdan kurtulunur. Kolon kapağı açılarak üzerine 6 ml dengeleme (Equilibration) tamponu (PBS- 10mM imidazol) eklenir. 700 g'de 2 dakikasentrifüj edilir, kolon düşük yoğunlukta imidazol ile nonspesifik bağlanmaları engellemek ve PBS tamponu ile kolonun pH'sını ayarlamak için muamele edilmiştir. Hazırlanan 6 ml protein ekstraktı kolona ilave edilir. Kolonun ucuna kitin içerisinden çıkan bir tıpaç takılır ve yine falkon tüpe yerleştirilir. Oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda inkübe edilir. Burada hedef proteine bağlı histidin tag'ler imidazol ve kolondaki nikel ile kompleks oluşturacak ve kolona tutulmasını sağlayacaktır. İnkübasyon sonunda temiz falkona yerleştirilmiş kolon 700 g'de 2 dakika çevrilir. Alta geçen sıvı flow through 1 olarak isimlendirilir ve hedef protein dışındaki proteinlerin bir kolona tutunmadan aşağı iner. 6 ml hazırlanan yıkama tamponu (PBS-50mM imidazol) ile 700 g'de 2 dakika santrifüj edilir. Bu işlem iki defa tekrarlanır. Purifiye edilmek istenen proteinleri kolondan ayırt etmek için 6 ml Elüsyon tampon (PBS-200Mm imidazol) kolona ilave edilir. Kolonun ucuna tıpaçı takılır ve 10 dakika oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda inkübe edilir. Sonrasında temiz bir falkon içerisine yerleştirilerek 700 g'de 2 dakika santrifüj edilir. Kolondaki histidin tag'li proteinler imidazol ile bağlanma yarışına girerler ve imidazol daha yoğun olduğu için kolondaki nikel iyonlarına daha çok bağlanma affinitesi gösterir. Bu şekilde hedef protein yaklaşık %90 oranında purifiye halde elde edilir. Bu işlem 2 defa daha tekrarlanır. Elde edilen protein çözeltisindeki tuzlardan kurtulmak için desalting işlemi yapılır.

4.2.2.4. Protein desalting protokolü

Saflaştırılmış proteini tuzdan uzaklaştırmak için Pierce D-Salt Poliakrilamit Plastik Desalting kolonları kullanılmıştır. Kolon 15 ml falkon tüp içerisine yerleştirilir. Kolon içerisinde %0.02 sodyum azid bulunan saklama solüsyonu 1000 g'de 10 dakika santrifüj ile uzaklaştırılır. Kolonu hazır hale getirmek için 0,2 M amonyum bikarbonat (pH 8.0) dengeleme tamponundan kolona 4 ml eklenir. 10 dakika orbital çalkalayıcıda inkübe edilir. Sonrasında 1000 g'de 10 dakika santrifüjlenir. Düşen sıvıdan kurtulunur. Kolonun ağzı tıpaç ile kapatıldıktan sonra 2 ml protein solüsyonu kolona aktarılır. Oda sıcaklığında 10 dakika orbital çalkalayıcıda inkübe edilir. Temiz bir falkona kolon yerleştirilir ve 1000 g'de 10 dakika santrifüj ile protein solüsyonu elde edilir. Spektrofotometrede 280 nm proteinin absorpsiyon değeri ölçülür. Kolonlar birkaç defa daha kullanılabilmesi için, PBS (100mM sodyum fosfat, 150mM NaCl, pH 7.4) tamponu ile 2 defa yıkanır. 4 ml 0.15 M NaCl ve % 0.02 sodyum azid içerisinde kolon saklanır.

4.2.2.5. Antijen Hazırlanması

Her Balb/C dişi fare için 100 µg ekstrasellüler FABP4 rekombinat proteini ve freund complete adjuvan 1 birim olacak şekilde toplamda 400µl hazırlanır. Complete freund adjuvanı sadece ilk immunizasyon aşamasında kullanılır. Bir sonraki immunizasyonlarda antijen: freund incomplete adjuvan oranı 1: 9 olarak hazırlanır. Antijen türü protein ise 10-100 µg protein adjuvan(CFA/IFA) içinde karıştırılarak enjekte edilir. Asid sıvısı toplamak amacı için hayvana enjekte edilecek antijen türü hücre ise hayvan başına 0,5 – 5,0 x 10⁷ sayıda hücre PBS içinde enjekte edilir.

Çizelge 4.23. Antijen türüne göre miktar ve adjuvan

Antijen	Adjuvant	
Proteinler	10-100 µg her enjeksiyonda, hayvan başına	Freund's (CFA/IFA)
Hücreler	0.5-5.0x10 ⁷ hücre her enjeksiyonda, hayvan başına	PBS

4.2.2.6. Bağışıklandırma

Bağışıklık kazandırma aşamasında 3 tane Balb-c faresi kullanıldı. Saf FABP4 proteini adjuvanla birlikte çizelge 4.24.'da belirtilen miktarda fare peritonuna enjekte edildi.

3 adet dişi Balb/C fareye birinci günde freund complete adjuvan içerisinde hazırlanmış 100µg FABP4 rekombinat proteinin intraperitonel enjeksiyonu yapılır. 15 gün sonra İkinci enjeksiyon freund incomplete adjuvan içerisinde hazırlanmış 50µg antijen intraperitonel olarak gerçekleştirilir. Bu işlem 15 gün sonra bir kez daha tekrarlandıktan sonra 36. günde hem karın içi boşluktan toplanan sıvılar hem de kuyruk veninden alınan kandaki serumların enzim ilişkili immune sorbent deneyi (ELISA) yapılarak 200.000 dilüsyonda yeterli pozitiflik görüldüğü saptanmıştır. 42. günde füzyon öncesi istirahat veya üçüncü enjeksiyon gerçekleşmiştir. 56. günde adjuvansız son enjeksiyon yapıldıktan sonra 3-4 gün ara ile 59-60. gün dalaktan hasat yapılarak füzyon işi gerçekleştirilmiştir. Füzyon işi daha sonra yapılacaksa toplanan sıvılar hem de kuyruk veninden alınan kandaki serum -20°C’de uygun saklama koşullarında saklanır.

Çizelge 4.24. Bağışıklandırma evresi

Gün	Manipulasyon	Adjuvant	Uygulama yeri	Miktar(Antijen/adjuvan)
1	Primer bağışıklanma	CFA	karın içi	100 µg/ml / 200 µl
15	İlk güçlendirici	IFA	karın içi	50 µg/ml / 100 µl
30	İkinci güçlendirici	IFA	karın içi	50 µg/ml / 100 µl
36	Serum titrasyonu (Eliza)			
42	Üçüncü güçlendirici	IFA	karın içi	50 µg/ml / 100 µl
56	Son enjeksiyon	IFA	karın içi	50 µg/ml
59	Dalak hasatı ve füzyon			

4.2.2.7. Antikor titrasyonu(ELİSA)

10 µg/ml FABP4 rekombinant proteini PBS (10 mmol/L Na₂HPO₄, 2 mmol/L KH₂PO₄, 2,7 mmol/L KCl, 137 mmol/L NaCl Ph:7,4) içerisinde hazırlanmıştır. 96’lık ELİSA platede kuyucuk başına 100 µl dağıtılıp 1 gece inkübasyon süresinin ardından PBS-tween (PBS’e 1/1000 tween 20 eklenir) ile 3 kez yıkanmıştır. Bloklama için %5 (W/V) BSA kullanılmış ve her kuyucuğa 200 µl bloklama çözeltisi ilave edilmiştir 1 saat 37 °C’de 1 saat oda sıcaklığında inkübasyonuna bırakılmıştır. Ardından poliklonal antikor olarak kullanılacak poliklonal ascites ve serum örneklerinin 1/10.000, 1/50.000, 1/100.000, 1/250.000, 1/500.000, 1/750.000 ve 1/1000.000 oranında dilüsyonlar hazırlanmıştır. Dilüsyonlar PBS ile yapılmıştır. PBS negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Hazırlanan primer antikorlardan her kuyucuğa 100 µl eklenmiş ve oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. 2 saatin ardından PBS tween ile 3 kez

yıkanmıştır. Sekonder antikor olarak 1/5.000 oranında PBS içinde dilüe edilmiş HRP işaretli anti mouse IgG (cell signaling anti mouse IgG HRP linked) antikorunu kullanılmıştır. PBS içinde dilüe edilen sekonder antikordan kuyucuklara 100'er µl eklenmiş ve çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Bu sürenin ardından PBS tween çözeltisiyle 3 kez yıkama yapılmıştır. HRP (horseradish peroxidase)'nin substratı TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)'den 100'er µl eklenmiş ve karanlıkta 15-20 dakika bekletilmiştir. Son olarak 2M Sülfirik asit çözeltisinden 50 ul eklenmiş ve 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik plate okuyucuda ölçümü yapılmıştır.

4.2.2.8. Fareden dalak alınması

Monoklonal antikor üretimi için immunize edilmiş farenin B hücrelerinin en çok bulunduğu dalağının alınması öncelikle yapılması gereken adımlardan bir tanesidir. İmmünizasyon için Balb/C dişi fare (8-10 haftalık) kullanılmıştır. d0, d15, d30, d42, d56 günlerinde 50-100 µg FABP4 proteinin ekstrasellüler kısmının ifade edilmesiyle elde edilen antijen enjekte edilmiştir. Adjuvan olarak Freund's adjuvanı kullanılmıştır. 36. günün sonunda fare serumundan ELISA yapılır; titrasyon değeri ölçülür. Hayvanın yeterince immunize olduğuna karar verildikten sonra ilgili hayvan antijen ile boost edilir. Son enjeksiyonda adjuvan kullanılmadan sadece ilgili protein yüksek dozajda hayvanın intraperitoneal bölgesinden enjekte edilir (100 µl). Böylece hayvanın çok miktarda antikor geliştirilmesi hedeflenmiş olur. Hayvan sakrifiye edildikten sonra %70 alkol ile temizlenir ve açılır. Aseptik teknikler kullanılarak dalak alınır ve petri dish içine aktarılır. Mesh üzerinde küçük parçalara kesilir. Yağ ve bağ dokudan uzaklaştırılmaya çalışılır. 10 ml enjektörün arka kısmı (plunger) ile iyice ezilir ve steril 15 ml falkon içerisine transfer edilir. 10 ml serumsuz besiyeri ile 3 defa 800 rpm'de 5 dakika yıkanır. Supernatan'dan kurtulunur. FBS ile iyice karıştırılıp resuspend edildikten sonra içerisinde 100 µl DMSO bulunan criyotüp içerisine 900 µl aktararak ağzı sıkıca kapatılıp, karıştırılır ve çabucak -80°C dolaba kaldırılır.

4.2.2.9. Besiyeri hazırlanması

RPMI 1640 besiyeri içerisine ilk olarak % 10 fetal sığır serumu eklenmiş daha sonra 200 mM L-glutaminden son yoğunluk 2mM olacak şekilde ilave edilmiştir. Son olarak 100x

yoğunluğundaki penisilin streptomisin (1 mililitrede penisilin 10, 000 ünite, streptomisin 10 mg' dir.) besiyerine eklenip besiyeri iyice karıştırılmıştır. Hücreler üzerine ilave edilecek besiyerinin sıcaklığı 37 °C olmalıdır.

4.2.2.10. Makrofaj eldesi

Farelerin karın boşluğuna 5-10 ml sterilize edilmiş PBS enjekte edildi. Bir kaç dakika bekledikten sonra karın boşluğuna tekrar girilerek enjekte edilen PBS sıvısı alınır. Alınan sıvı 96'lık plakalara dağıtılır ve %5 lik CO₂ içeren 37 °C derecelik etüvde 2 gün bekletildi.

4.2.2.11. Füzyon

Füzyondan 6 gün önce myeloma (F0) hücre hattı sıvı azotta çıkarılıp kültüre edilir. 5 tane T75 flask içerisinde myeloma hücreleri RPMI besiyeri içerisinde büyütülür. Füzyondan iki gün önce farelerin periton içi sıvısı PBS ile yıkanarak makrofaj toplanır. Yapılan deneyde 3 adet Balb/C fare kullanılmıştır. Periton içinin çalkalanması sonucu PBS tekrar steril enjektör yardımı ile 50 ml falkon içinde toplanır. PBS'in bulanıklaştığı gözlenir çünkü içerisinde artık çoğunluğu makrofaj olmak üzere immun hücreler bulunur. 400g'de 10 dakika santrifüj edilip %10 serum içeren RPMI içerisinde resuspend edilir ve 24 well plate'lere dağıtılır. Bir fareden ortalama 3×10^6 makrofaj alınır. Yaklaşık 5 fare 10 adet 24 well plate için yeterlidir.

Füzyon günü splenositler -80°C dondurucudan çıkarılıp 37°C su banyosunda çözünme sağlanır. Serumsuz besiyerinde iki defa 400g'de 5 dakikasentrifüj edilip yıkandıktan sonra %10 serum içeren RPMI içerisinde resuspend edilir. Thoma lamında hem splenosit hem de F0 hücrelerinin sayımı yapılır. (Bir dalak yaklaşık 5×10^7 ile 2×10^8 arası lenfosit içerir.) Thoma lamı ile sayım yapıldığında 7.5×10^7 splenosit gözlenmiştir. hücrelerin bir kez dondur-çöz nedeni ile hücre sayısı düşmüştür. F0 hücreleri de serumsuz besiyeri ile 400g'de 5 dakika yıkandıktan sonra thoma lamında sayıldıktan sonra her iki hücre tipinden de 1:1 oranında yaklaşık 1 milyona yakın hücre ayrılmıştır. F0 ve splenositler 50 ml falkon içerisinde birleştirilir. 800g'de 5 dakikasentrifüj edilir ve süpernatanı dikkatlice çekilir. 500 µl %50 PEG'i 1 dakikada çevirip karıştırarak verilir ve 1 dakika daha karıştırılır. 10 ml serumsuz besiyeri çekilir ve ilk 1 ml 1 dakikada karıştırılarak verilir. Kalan 9 ml karıştırarak 2 dakikada içinde karıştırılmıştır. Karışım 400g'de 5 dakikasentrifüj edilir.

Supernatan dikkatlice uzaklaştırılır ve 10 ml %20 FBS içeren besiyeri resuspend edilir. Toplam plate hacmine göre besiyeri hacmi hesaplanır. 50X HAT medium eklenir. 200 µl her bir kuyuya eklenmiştir. Plate'ler %5 CO₂'li 37°C inkübatöre kaldırılmıştır.

İki gün sonra taze 1X HAT içeren 300 µl besiyeri her bir kuyuya eklenmiştir. 4. günde ise kuyularda tüm besiyerleri çekilir ve üzerine taze HAT içermeyen RPMI besiyeri eklenir. F0 hücrelerinin 4. günün sonunda tamamen öldükleri gözlenmiştir.

4.2.2.12. Klon saptanması ve seçimi

96 kuyulu plaklara mikroskop altında bakarak klon oluşup oluşmadığı incelenmiştir. Hücre altları iki günde bir yeni besiyeri ile değiştirilmiştir. Oluşan klonların antikor seviyeleri ELİSA yöntemi ile kontrol edilmiştir. ELİSA yöntemi bölüm 4.2.22.'deki protokol gibi ölçülmüştür fakat klon oluşan kuyucuklarda primer antikor yerine sararmış hücre sıvı alınmıştır. Yüksek pozitiflik gösteren hücreler sırasıyla 24'lük, 6'lık plaklara alınır ve son olarak 75'lik flasklara aktarılır. Alt klonlama için hücreler mikroskop altında her kuyuya bir hücre düşecek şekilde tek hücre 96'lık plaklara transfer edildi ve bu aşamadan sonra serum miktarı %10'a indirildi ve son olarak ELİSA yöntemi ile kontrol edilen tek kloniler 75'lik flasklara aktarıldı. Uygun nitelikte antikor salgılayan klonların serum seviyesini düşürerek çoğaltılıp üst sıvıları veya klonlar fare karın boşluğuna verilerek asitleri toplandı.

4.2.2.13. sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE)

Kullanılacak jelin yüzdesine, sayısına ve miktarına bağlı olarak hesaplamalar yapılır. Yürütme jeli olarak % 12 lik SDS PAGE hazırlanmıştır. 10 ml için 3.264 ml H₂O, %30 luk akrilamid (29,2 g akrilamid, 0,8 g bisakrilamid) stok çözeltisinden 4 ml, 1,5 M tris tamponundan (pH 8,8) 2.532 ml, %10 SDS stok çözeltisinden 100µl konulmuştur. Polimerizasyon reaksiyonunda başlatıcı olarak amonyum persülfat (APS) kullanılır. APS %10 olacak şekilde 30 mg tartılıp 300 µl H₂O'da çözülmüştür. 100 µl taze hazırlanmış APS ve 10 µl TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamin) ilave edilir. Yürütme jeli karıştırılıp uygun şekilde yerleştirilmiş camlar arasına her jel için 5 ml hızlıca polimerleşme gerçekleşmeden dökülür. Üzeri % 20 izopropanol ile kapatılır. Jel polimerize

olduktan sonra izoproponol dökülür ve distile su ile yıkandı. Kurutma kâğıdı ile su iyice kurutuldu. Üst jel yani istifleme (stacking) jeli %5 lik hazırlandı. Total 4 ml hacim için 2.760 ml H₂O, 657 µl %30 stok akrilamid, 500 µl 0,5 M tris tamponu (pH: 6,8) , 39 µl %10 SDS çözeltisi, 39 µl taze hazırlanmış APS, 4 µl TEMED eklendi. Karıştırılıp yürütme jelinin üzerine dökülür ve üzerine çalışmamız için uygun tarak yerleştirilip polimerleşmesi beklendi.

4.2.2.14. Örneklerin hazırlanması, yüklenmesi ve yürütülmesi

BL21 hücre lizatlarından elde edilen protein örnekleri ayrı ayrı jelde yürütüldü. Hücre lizatları jele yüklenirken her kuyucuğa eşit miktarda protein yüklemek önemlidir. Bu yüzden hücre lizatlarının protein tayin sonuçlarına bakılıp en az konsantrasyonda protein içeren hücre lizatı esas alınarak her kuyucuğa eşit miktarda protein gelecek şekilde hesaplama yapıp ardından uygun miktarda hücre lizatları örnek tamponu (Laemmli tamponu, % SDS, 20% gliserol, 10% 2-merkaptoetanol, 0.004% brom fenol mavisi ve 0.125 M Tris HCl, pH 6,8) içerisinde 95°C'de 5 dakika kaynatıldı.

4.2.2.15. Coomassie boyaması

Örnekler yürütüldükten sonra jel dikkatlice sistemden çıkarıldı. Coomassie brilliant blue R-250 ile boyanmadan önce %20 izoproponol %10 asetik asit içeren fiksatif içinde 45 dakika fiksasyona bırakıldı. Ardında coomasiie brilliant blue R250 boyası (3g/L coomassie brilliant blue R-250, %45 methanol, %10 glasiyel asetik asit, %45 dH₂O) ile gece boyu boyandı. Ertesi gün fazla boyadan kurtulmak için destain çözeltisine (50ml glasiyel asetik asit, 100 ml methanol, 370 ml H₂O) alınıp arka plandaki boya gidene kadar bekletildi (yaklaşık 20-25 dakika). Ardından jel VersoDoc cihazında coomassie boya sekmesi seçilerek görüntülendi.

4.2.3. Western blot

4.2.3.1. SDS-PAGE jelin dökülmesi

Kullanılacak jelin miktarına, yüzdesine ve sayısına bağlı olarak hesaplamalar yapılmıştır. Yürütme jeli olarak % 12 lik SDS PAGE hazırlanmıştır. 10 ml için 3.264 ml H₂O, %30 luk akrilamid (29.2 g akrilamid, 0.8 g bisakrilamid) stok çözeltisinden 4 ml , 1.5 M tris

tamponundan (pH 8.8) 2.532 ml, %10 SDS stok çözeltisinden 100µl konulmuştur. Polimerizasyon reaksiyonunda başlatıcı olarak amonyum persülfat (APS) kullanılmıştır. Amonyum per sülfatın (APS) %10 olacak şekilde 30 mg tartılıp 300 µl H₂O'da çözülmüştür. 100 µl taze hazırlanmış APS ve 10 µl TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamin) ilave edilmiştir. Yürütme jeli karıştırılıp uygun şekilde yerleştirilmiş camlar arasına her jel için 5 ml hızlıca polimerleşme gerçekleşmeden dökülmüştür. Üzeri % 20 izopropanol ile kapatılmıştır. Jel polimerize olduktan sonra izopropanol dökülmüş ve distile su ile yıkanmıştır. Kurutma kâğıdı ile su iyice kurutulmuştur. Üst jel yani istifleme (stacking) jeli %5 lik hazırlanmıştır. Total 4 ml hacim için 2.760 ml H₂O, 657 µl %30 stok akrilamid, 500 µl 0,5 M tris tamponu (PH: 6.8) , 39 µl %10 SDS çözeltisi, 39 µl taze hazırlanmış APS, 4 µl TEMED eklenmiştir Karıştırılıp yürütme jelinin üzerine dökülür ve üzerine çalışmamız için uygun tarak yerleştirilip polimerleşmesi beklenmiştir.

4.2.3.2. Örneklerin hazırlanması

Hücre lizatları ile elde edilen protein örnekleri ayrı ayrı jelde yürütülmüştür. Hücre lizatları jele yüklenir iken her kuyucuğa eşit miktarda protein yüklemek oldukça önemlidir. Bu yüzden hücre lizatlarının protein tayin sonuçlarına bakılıp en az konsantrasyonda protein içeren hücre lizatı baz alınarak her kuyucuğa eşit miktarda protein gelecek şekilde hesaplama yapıp ardından uygun miktarda hücre lizatları örnek tamponu (Laemmli tamponu) içerisinde 95°C' de 5 dakika kaynatılmıştır. Örnek tamponu 4% SDS, % 20 gliserol, 10% 2-merkaptoetanol, 0.004% brom fenol mavisi ve 0.125 M Tris HCl içerir. pH 6,8 civarındadır.

4.2.3.3. Jele örneklerin yüklenmesi ve yürütülmesi

Jel tankının içerisi yürütme tamponu (25 mM Tris, 192 mM glycine, % 0,1 SDS) ile doldurulup Jel tankın içerisine yerleştirilmiştir. Hazırlanan jelin tarağı dikkatlice çıkarılıp örnekler tarakların oluşturduğu kuyucuklara yüklenmiştir. Yürütme tamponunu jelin her tarafına temas etmesi akımın geçmesi açısından oldukça önemlidir. Elektrotlar dikkatlice güç kaynağına bağlanmış ve yürütme her jel için 15 mili amperde yaklaşık 2 saat olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.2.3.4. Proteinlerin PVDF membrana transferi

Jelin yürütmesi tamamlanmasının ardından jel dikkatlice çıkarılmış ve jele uygun büyüklükte PVDF membran kesilmiştir. PVDF membran 3-5 dakika metanolde bekletilerek kuru olan membranın rehidrasyonunu sağlanmıştır. Jel ve membran soğuk transfer tamponu (48 mM Tris, 39 mM glycine, 0.04% SDS, 20% methanol) içerisine alınmış ve yaklaşık 10 dakika yavaşça çalkalanmıştır. Transfer esnasında kullanılacak kurutma kâğıdı ve süngerler transfer tamponunda ıslatılmıştır. Transfer için bio rad ıslak transfer düzeneği kullanılmıştır. Proteinler eksi yükle yüklendikleri için jelden membrana geçişin eksiden artıya yönüne doğru olacağı göz önüne alarak jel ve membran ona göre yerleştirilmiştir. Kurutma kâğıtları ve sünger hem alt hem üst kısma yerleştirilip. Kurutma kâğıtları, jel ve membran yerleştirildikten sonra hava kabarcığı kalmamasına özen gösterilmiştir. Transferde tankın içine buz kalıbı konulmuştur. Tankın içerisine kurutma kâğıdı, jel ve membranı koyduğumuz aparatlar yerleştirilip güç kaynağına elektrotlar dikkatlice bağlanıp 100V'da 2 saat transfer gerçekleştirilmiştir. Membrana transfer olmuş protein bantlarını görmek için membran ponceau S boyasıyla 5 dakika kadar boyanmış ve membrane distile H₂O ile yıkanmıştır.

4.2.3.5. Membranın bloklaması

Membranla antikorlar arasındaki nonspesifik bağlanmaları en aza indirmek için uygulanır. %5 yağsız süt tozu PBS tween içerisinde hazırlanmıştır. Kullanılan antikorlar süt tozu kullanıldığında iyi çalışmadığı için bloklama için %5 BSA kullanılmıştır. Bloklama bir saat oda sıcaklığında çalkalyıcı üzerinde gerçekleştirilmiştir.

4.2.3.6. Birincil antikor uygulaması

Kullanılan primer antikorlar; FABP4 monoklonal ascites, ticari FABP4 ve aktin/tubulin olmuştur. Membran 1/5.000 dilüsyonunda hazırlanmış FABP4 antikoru ile 3 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Diğer antikorlar 1/1.000 dilüsyonlarda hazırlanmıştır ve gece boyu +4°C'de inkübe edilmiştir. Primer antikor uygulamasının ardından membran 3 kez 10'ar dakika PBS tween ile yıkanmıştır.

4.2.3.7. İkincil antikor uygulaması

Birincil antikor ve ikincil antikorun aynı hayvana karşı üretilmiş olması çok önemlidir. Yani birincil antikor hangi hayvandan alındıysa ikincil antikorda da yine o hayvana ait olmalıdır. FABP4'e karşı ürettiğimiz monoklonal antikorlar farede üretildiği için sekonder antikor olarak HRP işaretli anti mouse IgG 1/5.000 oranında dilüe edilerek kullanılmıştır. Aktin antikorunu için de yine HRP işaretli anti mouse IgG (cell signaling 7076) 1/5.000 oranında dilüe edilerek kullanılmıştır. Dilüsyonlar tweenli PBS içinde çözölen %5 BSA bloklama tamponu ile yapılmıştır. Sekonder antikor içerisinde membran yaklaşık 1 saat oda sıcaklığında çalkalıcı üzerinde bekletilip ardından PBS tween ile 3 kez 10' ar dakika yıkanma yapılmıştır.

4.2.3.8. Membranın görüntülenmesi

SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate kiti içerisindeki luminol ve peroksit içeren çözeltiler bire bir oranında karıştırılmıştır. 250µl kadar membranın üzerine konup üzeri streç film ile örtölüp karanlıkta 5 dakika bekletilmiştir. Bazı durumlarda direk hiç bekletilmeden görüntü alınmıştır. Görüntü Kodak 4000MM image Station cihazından alınmıştır.

4.2.4. İmmünositokimya (ICC) ve immünohistokimya (IHC)

Hücre ve dokudaki bazı enzimlerin ya da makromoleküllerin konumlarını incelemeye bir tekniktir. Bu teknik, incelenecek olan bir makromeleküle karşı geliştirilmiş olan bir antikorun aktivitesini test etmektedir. Bu teknikte antiserumdaki antikorların doku ya da hücre antijenlerine bağlandıkları gösterilmektedir. ICC ve IHC teknikleri, tanı immünsitolojisi, erken teşhis immünsitolojisi ve enfeksiyöz ajanların tespiti bağlamında ele alınmaktadır(175).

İmmünositokimya (ICC) bir hücrenin kompartmanlarının içinde proteinlerin dağılımı ve lokalizasyonunu anlamak için kullanılan bir tekniktir. ICC tekniği, uygun bir antikorunu işaretleyerek, hücre popülasyonlarında korunmuş belirli antijenleri tespit etmektedir.

Hücreler toplandıktan sonra, morfolojisi, yapısı ve hedef epitoplarnın antijenitesini muhafaza etmek için fikse edilir. Çeşitli antikor boyama yöntemleri ile aydınlatıcı

görüntüler elde etmek mümkündür. Konjuge edilmiş immünofloresan bir antikor yaygın bir görüntüleme yöntemidir.

Daha öncede belirttiğimiz gibi U937 hücreleri forbol miristat asetat (PMA) ile muamele edildiklerinde, izoenzim, CR3 ifadesi ve diğer fenotipik işaretleyiciler içeren doku makrofaj özelliklerini gösteren yapışkan, replikatif olmayan hücelere dönüşmektedir. Bu özelliklerinden dolayı bu hücreler hücre içi markerler araştırmalarında kullanılmaktadır (160, 176, 177).

U937 hücre hatları 75-cm² kültür şişelerinde , %10 inaktif edilmiş FBS, antibiyotik içeren 1640 RPMI medyum, 37°C ve 5% CO₂ ortamında PMA ile 4 saat uyarılmıştır. Uyarılan U937 hücreleri PMA ile uyarılma sonucu yapışkan hale geldikleri için skraper ile kaşıyarak toplandı ve daha sonra 15 ml falkona alınarak santrijüj edildi. Hücrelerin daha iyi temizlenmesi için PBS ile yıkandıktan sonra PBS'li %4 formaldehid ile 20 dakika boyunca oda sıcaklığında fikse edildi ve 1.5 ml tüpte 30 saniye çevrildi. Süpernatantı döküp hücre pelleti 1 mL deiyonize H₂O süspanse edilir. Bu işlem bir daha tekrarlanıyor ve pellet üzerine 200 µl deiyonize H₂O ile süspanse edilir.

Daha sonraki aşamalarda yıkamalar sebebi ile hücrelerin kopmasını engellemek için ve hücreleri Lam üzerine yapıştırmak amacıyla Lam üzerine %2'lik jelatin döküp koruması beklendi. Süspanse hücre pelletinden 5-10 µl jelatinli lamın üzerine koyup, simir yapılı ve hücrelerin lam üzerin yayılması gerçekleştirilir. Daha sonra hafif sıcaklık ile buharlaşması bekleniyor ve sonra hücreler mikroskop altında incelenir. Eğer hücrelerde kristalleşme varsa deiyonize su ile yıkanarak giderilmesi sağlanıyor. Bu aşamada hücreler bekletilmek isteniyorsa buharlaşması engellenmek için etrafı kapatılıb 2-8 °C'de 3 ay boyunca saklanabilir.

Lam üzerinde fikse edilmiş U937 hücreleri yıkama tamponu ile yıkıyor ve spesifik olmayan boyaları %10 BSA ile bloklama yapılmıştır. Ascitler olarak elde ettiğimiz monoklonal antikorlarımızı birincil antikor olarak 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe ettik ve yıkama işlemini gerçekleştirdik. Daha sonra floresan işaretli sekonder antikorumuzu karanlık yerde bir saat boyunca inkübe ettik. Bu aşamadan sonra bütün işlemler karanlık ortamda yapılmaktadır. Tekrar yıkama işlemi gerçekleştirildi ve çekirdek markeri olarak 7-aminoactinomycin D (7AAD) boyası 15 dakika sıcak ortamda inkübe edilmiştir. Direk görüntü alacağımız ve saklamak istemediğimiz için mounting medium

ve ışıktan korunması için lamın etrafını kapatmadan hemen yıkama işlemini gerçekleştirip flüoresan mikroskopta görüntüleme işlemi yapılmıştır.



5. ARAŞTIRMA BULGULARI

Rekombinant FABP4 proteinin üretilmesi, monoklonal antikor üretim teknolojisi ve FABP4 ifade düzenlenmesi olarak sonuçlar 3 başlıkta ele alınmıştır.

5.1. Rekombinant protein üretilmesi

5.1.1. FABP4 geninin nükleotit ve amino asit dizisi

```
1  gggtcacagc accctcctga aaactgcagc ttcctttctca ccttgaagaa taatcctaga
61  aaactcaciaa aatgtgtgat gctttttagt gtacctggaa acttgtctcc agtgaaaact
121 ttgatgatta tatgaaagaa gtaggagtgg gctttgccac caggaaagtg gctggcatgg
181 ccaaacctaa catgatcatc agtgtgaatg gggatgtgat caccattaaa tctgaaagta
241 cctttaaaaa tactgagatt tccttcatac tgggccagga atttgacgaa gtcactgcag
301 atgacaggaa agtcaagagc accataacct tagatggggg tgtcctggta catgtgcaga
361 aatgggatgg aaaatcaacc accataaaga gaaaacgaga ggatgataaa ctgggtgggg
421 aatgcgatc gaaaggcgtc acttcacga gagtttatga gagagcataa gccaaaggac
481 gttgacctgg actgaagttc gcattgaact ctacaacatt ctgtgggata tattgttcaa
541 aaagatatgg ttgttttcca tgatttagca agcaactaat tttctcccaa gctgatttta
601 ttcaatatgg ttacgttggg taaataaact ttttttagat ttagaagggt atgtaatgat
661 gtattcattg tgcttatgat gtattcctag tcataactga gtgaaggaaa tgggaaattt
721 gcattatttc tttgttctga tatgaataat aacatatttc ataataattc aaggtaaaaa
781 gggatatcta tggatttccc taggtaggag ataacaagta tgtaccatta ctgaatat
```

Şekil 5.1. FABP4 geninin nükleotit dizisi(178)

399 bç'likten oluşan FABP4 proteini 132 amino asit içermektedir. Nükleotit dizisi http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core:g=ENSG00000170323;r=8:81478419-81483263;t=ENST00000256104 ve amino asit dizisi <http://www.uniprot.org/uniprot/P15090> sayfasından alınmıştır.

```
10      20      30      40      50
MCDAFVGTWK LVSSENFDDY MKEVGVGFAT RKVAGMAKPN MIISVNGDVI
60      70      80      90     100
TIKSESTFKN TEISFILGQE FDEVTADDRK VKSTITLDGG VLVHVQKWDG
110     120     130
KSTTIKRKRE DDKLVVECVM KGVSTRVYE RA
```

Şekil 5.2. FABP4 amino asit dizisi(179)

5.1.2. FABP4 geninin Antijenik bölgelerin tespiti

h-FABP4 proteinine karşı üretilen monoklonal antikörlerin, hFABP4 ve bu aileden olan diğer homolog proteinlerin(çaozaz reaksiyon) hanki bölgesi ile reaksiyon verdiklerini incelemek için antijenik bölge tespiti yapılmıştır. Bu amaçla FABP4 proteinin amino asit dizisini EMBOSS antijenik web sitesine (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/antigenic>) yükleyerek analiz edilmiştir(Şekil 5.3.). Bu web sitesinden çıkan Analiz sonucunda FABP4 proteinine karşı toplamda 6 antijenik bölge tespit edilmiştir.

EMBOSS explorer

antigenic

Find antigenic sites in proteins ([read the manual](#))

Unshaded fields are optional and can safely be ignored. ([hide optional fields](#))

Input section

Select an input sequence. Use one of the following three fields:

1. To access a sequence from a database, enter the USA here:
2. To upload a sequence from your local computer, select it here:

```
MCDAFVGTWKLVSSSENFDDYMK EVGVGFATRKVAGMAKPNMII SVNGDVI  
TIKSESTFKNTEISFILGQEFDEVTDADRKVKSTITLDGGVLVHVQKWDG  
KSTTIKRRKREDDKLVVECVMKGVTSRIVYERA
```
3. To enter the sequence data manually, type here:

Required section

Minimum length of antigenic region

Output section

Output report format

Run section

Email address:

If you are submitting a long job and would like to be informed by email when it finishes, enter your email address here.

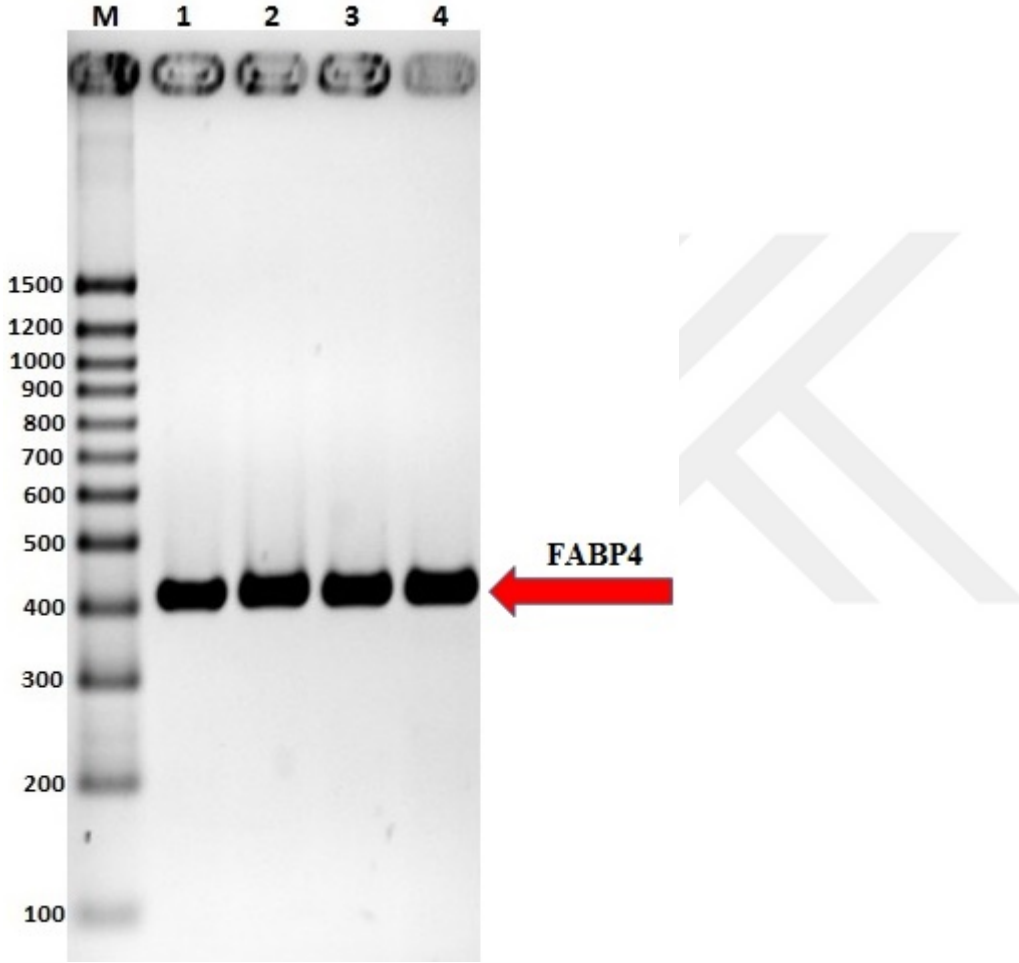
Şekil 5.3. FABP4 protein dizisinin EMBOSS web sitesinde antijenik bölge analizi(180)

Çizelge 5.1. FABP4 proteininden 6 antijenik bölge tespiti

Rezidu pozisyonu	Sekans	Skor	Max Skor Pozisyonu
112->122	DKLVVECVMKG	1.227	116
88->97	DGGVLVHVQK	1.207	94
4->14	AFVGTWKLVS	1.089	9
23->32	EVGVGAFATRK	1.083	27
64->69	SFILGQ	1.078	66
42->53	IISVNGDVITIK	1.064	46

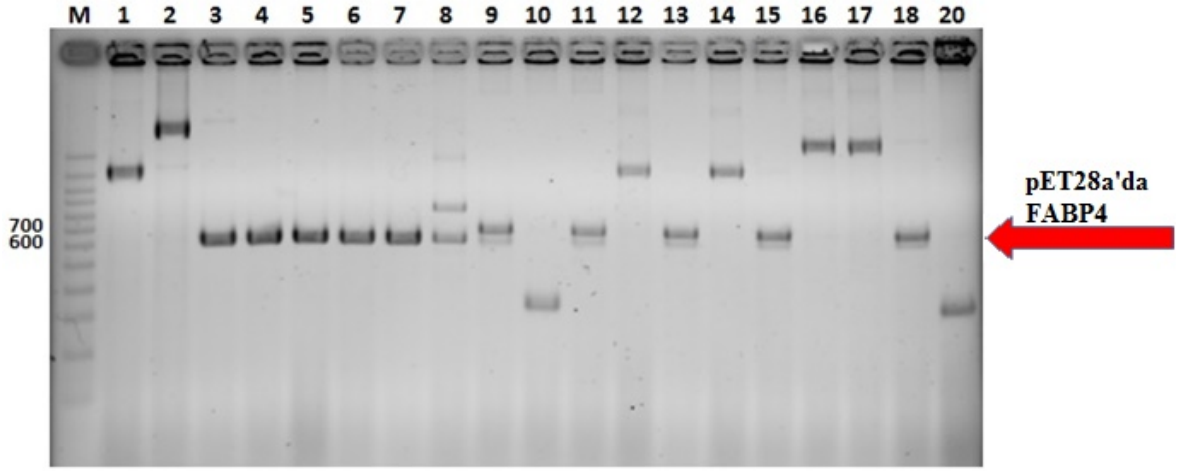
5.1.3. pET28a vektöründen FABP4 bölgesinin eldesi

Uygun primer tasarlayarak pET28a vektöründen FABP4 ürününün boyunu test etmek için PZT yapılmış ve FABP4 gen bölgesi çoğaltılmıştır. Bu amaçla gradient PZT ile uygun bağlanma sıcaklığı belirlendikten sonra FABP4 geni özgün olmayan bantlardan kurtulmak amacıyla touch down PZT yapılmıştır ve yaklaşık 400 baz çifti boyutunda(399) beklenen bant doğru yerde elde edilmiştir (Şekil 5.4).



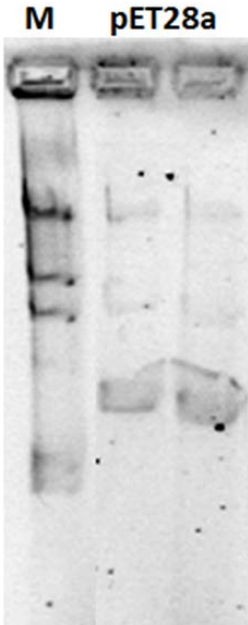
Şekil 5.4. pET28a vektöründen elde edilen FABP4 touch down PZT %2'lik jel görüntüsü, 1,2,3 ve 4 kuyucuğa tekrarlı aynı PCR ürünü yüklenmiştir ve FABP4 segmenti 396 bp bölgesinde bant vermiştir.

pET28a-hap2 plazmidlerini E.coli JM109 bakterilerine transforme ederek çoğaltılmıştır. elde edilen klonilerden T7 primerleri ile kloni PZT yapılmıştır ve Elde edilen ürünler %2 gelde yürütülmüştür. T7 primerlerinin boş pET28a'da ampfiye ettiği bant ile FABP4 proteini birlikte yaklaşık 700 bp tahmin edilmektedir.



Şekil 5.5. Vektöre insert edilmiş FABP4 parçasını kontrol etmek için 20 kloniden kloni PCR taraması yapılmıştır ve 3, 4, 5, 6 ve 7. klonileri seçilmiştir.

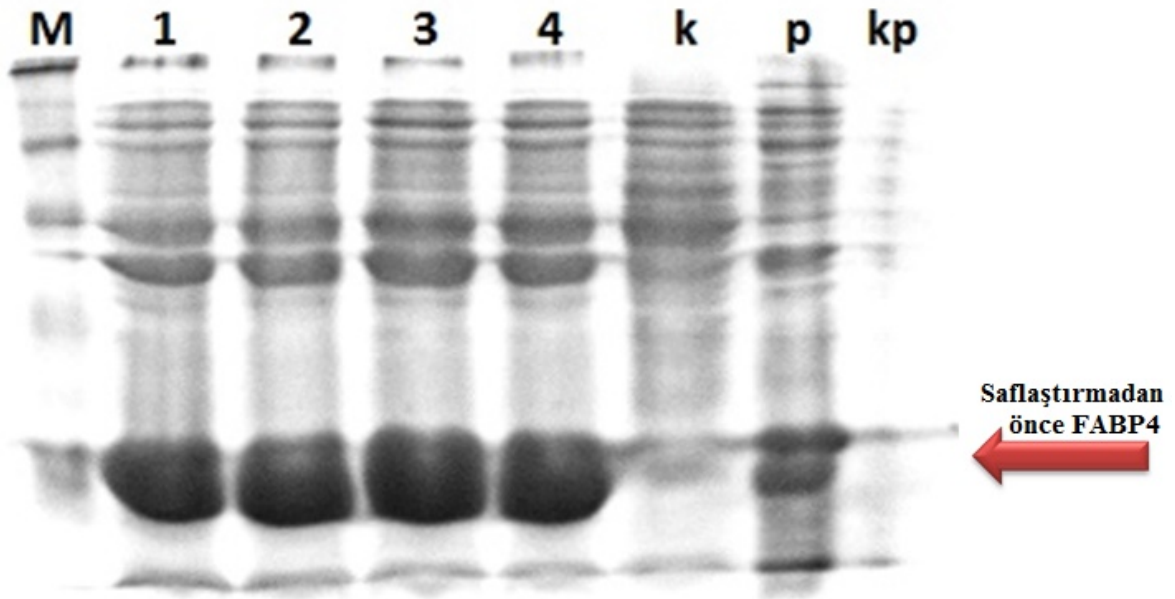
Koloni PZR sonucu belirlenen koloniler seçilmiştir ve FABP4 gen dizisini içeren plazmitler alkalin lizis protokolü ile izole edilmiştir. Hazırlanmış bu plazmitler BL-21 E.coli hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda LB Kan+ agar plate üzerindeki koloniler, LB Kan+ içerisinde 37°C'de overnight büyütülmüştür ve total protein eldesi gerçekleştirilmiş ve SDS jelde yürütülmüştür. Şekil 5.6.'da FABP4 plazmiti %0.8'lik agaroz jelde yürütülmüştür.



Şekil 5.6. plazmid izolasyonu

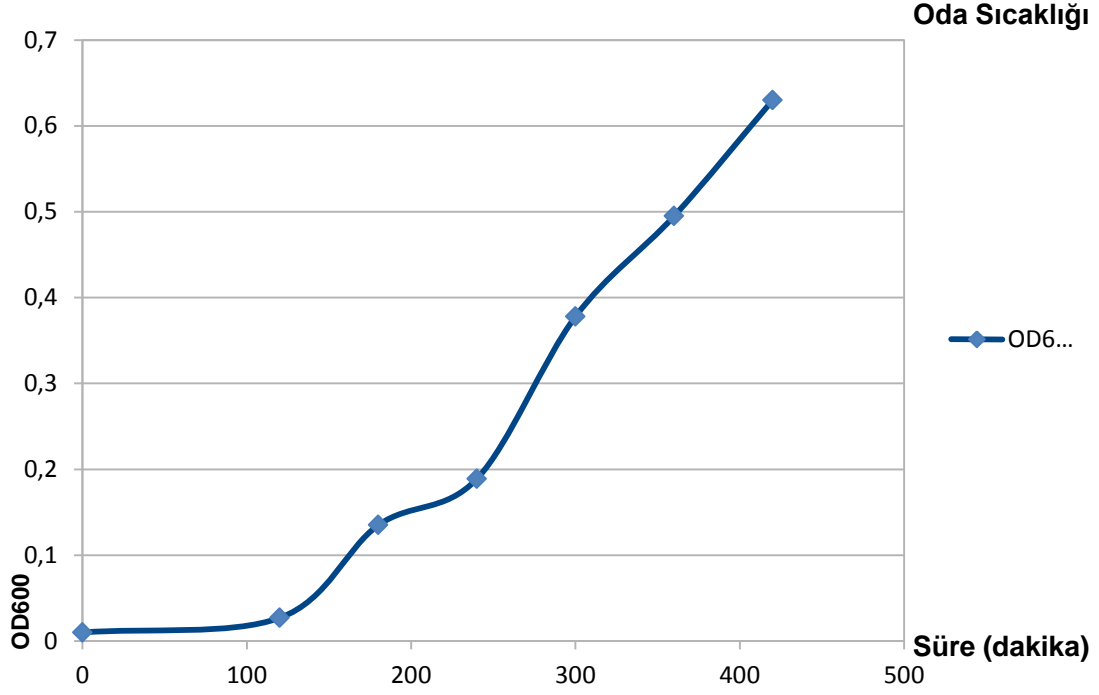
5.1.4. Protein Purifikasyon Ürünlerinin SDS-PAGE Sisteminde Gözlenmesi

Başarılı bir şekilde FABP4 plazmitinin BL-21 hücrelerine başarılı transformasyonun olup olmadığını test etmek için ön ekspresyon çalışmaları başlatılmıştır. elde edilen BL21 hücreleri OD_{600} nm'de 0.6 bulanıklığa yetiştikten sonra gece boyu oda sıcaklığında 0.2 IPTG konsantrasyonunda indüklenmiştir. Bu kolonilerden hangisinin daha iyi bir protein ifadenmesine sahip olduğunu anlamak için SDS-PAGE sisteminde yürütülmüştür. Elde edilen SDS-PAGE jel görüntüsü(Şekil 5.7.) neticesinde 15 kDa büyüklüğünde FABP4 proteini doğru yerde görünmüştür.



Şekil 5.7. Kolonleri IPTG ile indükleyerek elde edilen protein lizatlarından SDS-PAGE, M; marker, 1- 4; FABP4 lizatları, K; kontrol, P; plate ve Kp; kontrol plate

Her dört klonide de benzer ve doğru yerde protein ifadesinin görüldüğü için bakteriyel ekspresyona hazır 1 numaralı FABP4 içerikli transformant BL21 hücresi, yeni kültüre aktarılarak tazelenir. Tazelenen yeni BL21 hücresi 37°C'de çalkalamalı inkübasyonda üreme eğrisi grafiğine göre indüklenmektedir. Optimal indükleme zamanı olan erken eksponansiyel faza (OD_{600} 0.6) ulaştığında indüklenmişlerdir(Şekil 5.8.).

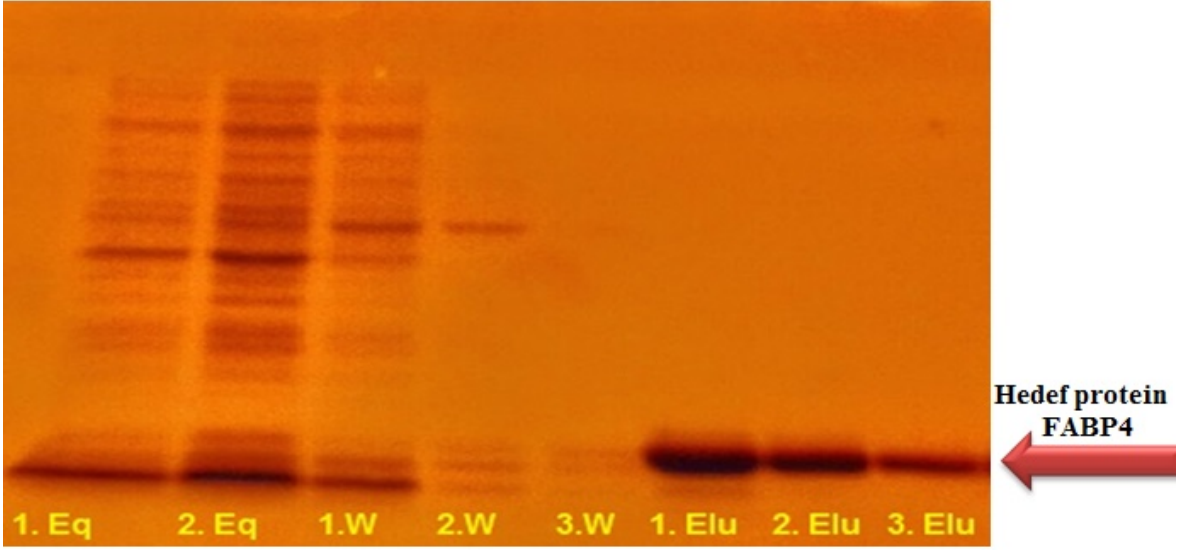


Şekil 5.8. BL21 22°C' üreme eğrisi grafiği ve optimal indükleme zamanı ve bulanıklığı

5.1.5. Protein Purifikasyonu

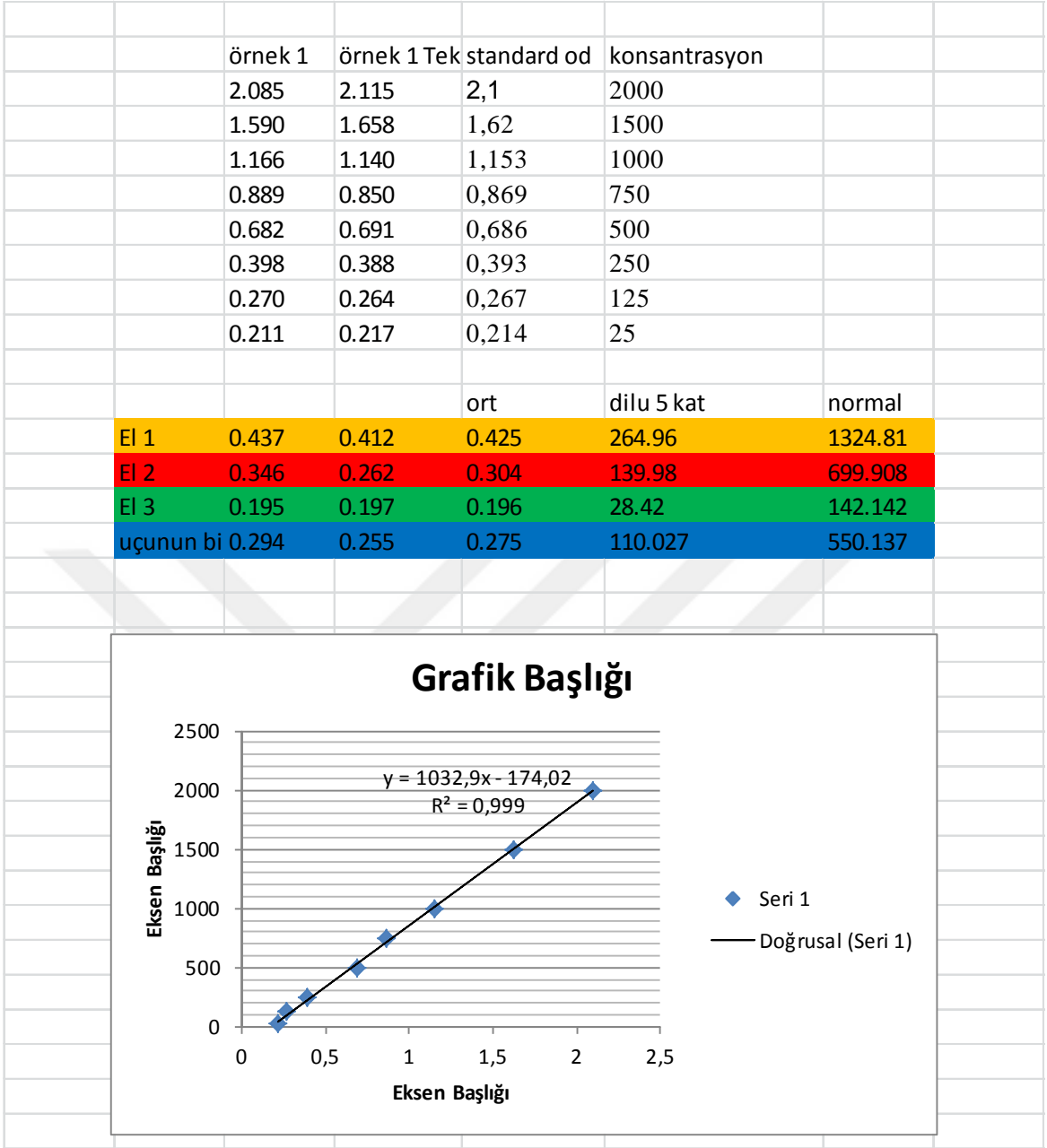
Özel hazırlanmış nikel-NTA kolon nitrilotriasetik asit (NTA) şelasyon kısmı ile türetilmiş agaroz boncuklardan ve nikel iyonlarının (Ni^{2+}) yüklendiği bir sistemden oluşmaktadır. Hareketsiz metal afinitine kromatografisi (IMAC) yönteminin rekombinant His-tag protein saflaştırma için kullanılmasının nedeni olağanüstü bağlanma kapasitesi ve performans gerçekleştirmesidir.

Rekombinant FABP4 proteinin saflaştırılması için yukarıda bahsedilen kolonilerden bir tanesi seçilmiştir (1. koloni). Bu koloni LB kan besiyeri içinde kültüre edilmiştir. Her saatte bir OD değeri ölçülmüştür ve OD değeri 0.6'e ulaştığında kültüre 2 mM IPTG eklenmiştir. Gece boyu oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Hürelere lizis yapıldıktan sonra Thermo Scientific His Pur Ni-NTA kolonu kullanılarak kitten çıkan protokolü takip ederek saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Desalting işlemi de gerçekleştirildikten sonra poliakrilamid jelde yürütülmüştür (Şekil 5.9.).



Şekil 5.9. His Pur Ni-NTA ile saflaştırılan FABP4 rekombinant proteini

Elüsyon 1, 2 ve 3'de saf rekombinant proteinin elde edildiği görülmektedir. Protein miktarını tayini için BCA yöntemi kullanılmıştır(Şekil 5.10.).



Şekil 5.10. Yukarıdaki ölçülen standart verileri kullanılarak Excel dosyasında Standart Eğri grafiği $f(x) = ax + b$ şeklinde çizdirilmiştir. Standart eğri grafiği (BCA sonucunda elde edilen değerler ile excell'de çizilmiştir.)

5.2. Antikor Tabanlı Bulgular

5.2.1. Antikor Titrasyonu

Rekombinant FABP4 proteini saf olarak elde edildikten sonra 3 adet balb-c fareye complete freund adjuvant (CFA) içinde 200 µl rekombinant (FABP4/aP2) (50-100 µg/ml) proteininin karın içi enjeksiyonu yapılmıştır. Hayvanların antijene karşı yeterince

immunize olduğunu anlamak için kuyruklarından alınan 100 µl kan 1000 rpm’de 10 dakikasantrifüj edilerek serum kısmı alınmıştır. Daha sonraki zerklerde tuberkülsuz Freund’s adjuvan (IFA) 3’er hafta arayla verilmiştir. Anti-A_FABP antikörlerinin titrasyonu ELISA ile takip ederek titrasyon 1/1000.000 ölçeğine ulaştığında adjuvan olmaksızın son boost enjeksiyon yapıp 3 gün beklendikten sonra dalak alınmıştır. İmmünizasyon ve ELİSA sonucu rekombinant (FABP4/aP2) proteinine karşı yüksek antikör değeri gösteren farenin dalağı alınarak hibridoma füzyonuna hazırlanmıştır.

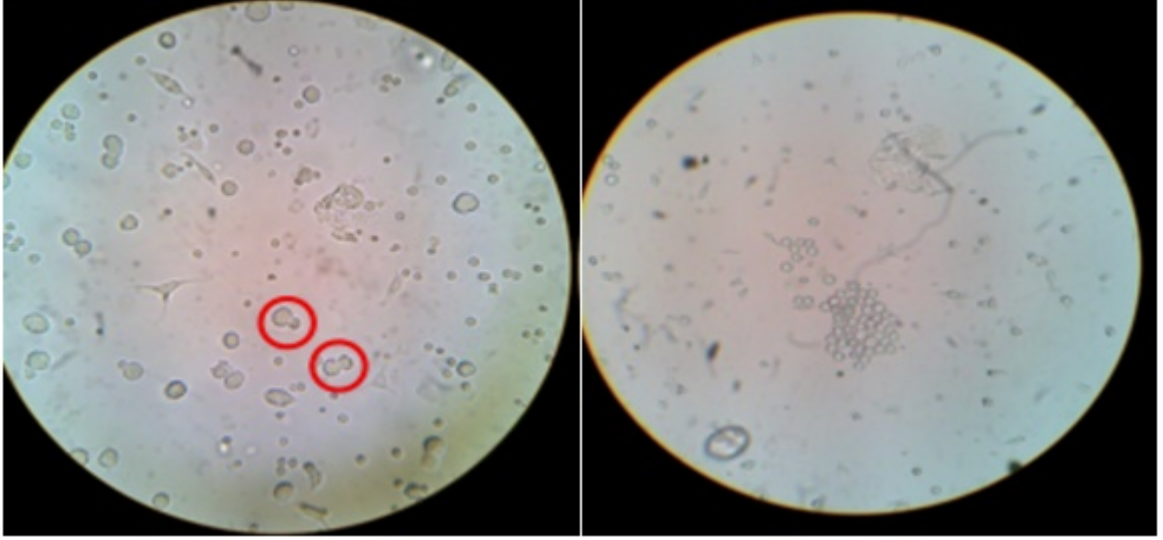
Çizelge 5.2. İmmünizasyon sonrası ELİZA testi

Absorbance @ 450 (1.0s) (A)							
0.000							
	Fare 1	Fare 1	Fare 2	Fare 2	Ticari Ab	Ticari Ab	
1/10,000	2,252	2,319	2,101	2,121	2,567	2,651	
1/50,000	1,839	1,915	1,747	1,698	2,081	2,109	
1/100,000	1,358	1,415	1,342	1,311	1,536	1,643	
1/250,000	0,771	0,753	0,855	0,915	1,087	1,102	
1/500,000	0,387	0,406	0,514	0,523	0,592	0,603	
1/750,000	0,299	0,313	0,302	0,300	0,375	0,398	
1/1,000,000	0,231	0,211	0,218	0,207	0,258	0,286	
Kontrol	0,067	0,077	0,081	0,076	0,089	0,084	

ELİSA ölçümü ile saptanan antikör titresi bakımından daha iyi olan 1. Farenin splenositleri hibridoma eldesinde kullanılmıştır.

5.2.2. Hibridoma oluşumu

Monoklonal antikör üretmek için elimizdeki son immunize edilmiş farenin dalağı alınarak, füzyon gerçekleştirilmiştir. Alınan dalak, doku parçalama eleğinde parçalandıktan sonra elde edilen splenositler, Polietilen glikol (PEG) varlığında F0 myeloma partner hücreleri ile füzyon yapılmıştır. Füzyon gerçekleştikten sonra seçici ortamda yaşayabilen hibridomalar toplanmıştır. Füzyon işlemini takiben HAT (hipoksantin, Timidin ve Aminopterin) varlığında seçim yapılmıştır. Şekil 5.9’de füzyon işlemi sonrası myelom ve B hücresinin membranlarının birleştiği görülmektedir. Füzyon olmuş hücrelerin 7-10 gün içinde klon oluşturmaktadır.



Şekil 5.11. Füzyon ve klon oluşturan hücreler

5.2.3. ELISA testi ve klon elde edilmesi

Füzyon sonrası klon oluşumu gözlenen kuyulardaki hücrelerin supernatantları defalarca ELİSA sistemi ile test edilmiştir. Negatif kontrol ve diğer kolunlar içinde daha yüksek pozitiflik gösteren hücreler seçildi. FABP4 proteinine karşı 15 farklı monoklonal antikor klon elde edildi.

Çizelge 5.3. Elde edilen hibrid hücre supernatantından ELISA değerleri

	1	2	3	4	klonlar	Değerler	
A	3,691	3,849	3,822	0,794	map2	B/b6	3,986
						A/c2	3,955
						B/a6	3,944
						A/f1	3,933
B	3,841	0,789	0,420	α- m	A/a2	3,849	
					C/b8	3,844	
					A/c1	3,841	
C	0,960	0,649	0,626	α- h	L/b4	3,822	
					B/f5	3,780	
					C/c7	3,691	
D	3,944	2,737	3,986	2B6	B/d5	3,553	
					C/f8	2,831	
					B/f6	2,827	
E	3,933	3,955	3,844	α-h	C/e8	2,737	
					C/a8	2,718	
F	3,780	2,827	0,435	Serum	A/d8	0,789	
					A/a2	0,420	
					D/a2	0,960	
					A/b5	0,649	
G	2,831	0,884	0,672	medium	A/f4	0,629	
					A/f8	0,435	
					B/d8	0,884	
H	2,718	3,553	0,641	PBS	B/c7	0,672	
					A/e8	0,641	

Hibridoma hücre hatları *in vitro* şartlarına uyum sağlayamadıkları için hibrid hücre hatları fare ve ratların karın boşluklarında ascites oluşturma özelliğine sahiptir. Ayrıca hibrid hücrelerin *in vitro* şartlarda 1 mililitresinde 10-100 µg monoklonal antikor oluşurken bu oran *in vivo* şartlarda 5-20 mg'a artmaktadır.

Hibrid hücreleri yaşadıkları sürece kültür ortamına salgıladıkları monoklonal antikor süpernatanı ELİSA yöntemi ile ölçülüp, pozitif olan klonları BALB/C dişi farelere vererek ascit elde edilmiştir. BALB/c farelerde ascite sıvısı oluşturmak için pristane veya inkomplement adjuvan ile uyarılmıştır. Pristane veya inkomplement immünsupresor ve tümör uyarıcı etkisi ile oluşumu hızlandırmaktadır. Fareler 200µl pristane ile prime edilerek 7-10 gün beklendikten sonra hibrid hücreler farelerin karın boşluklarına injekte edilmiştir ve "Ascite" sıvısının oluşumu beklenmiştir. Enjeksiyondan 4-8 gün sonra fare asit yapmaya başlar ve zaman içerisinde asit oluşumunu görünür hale gelir. 20-30 gün aralığında farelerin karın boşluklarında şişme gözlenmiştir. periton civarında tümör yapılanması olan fareler bir süre sonra ölmüştür.

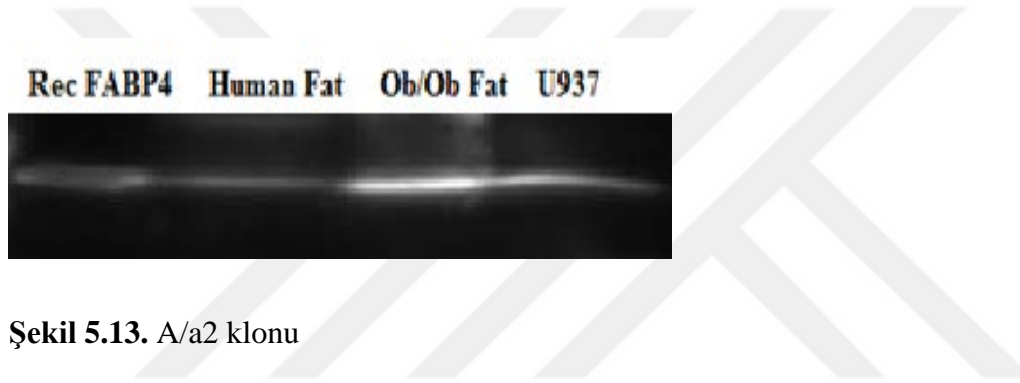


Şekil 5.12. a)Ascites oluşması b)Ascites oluşmadan önce

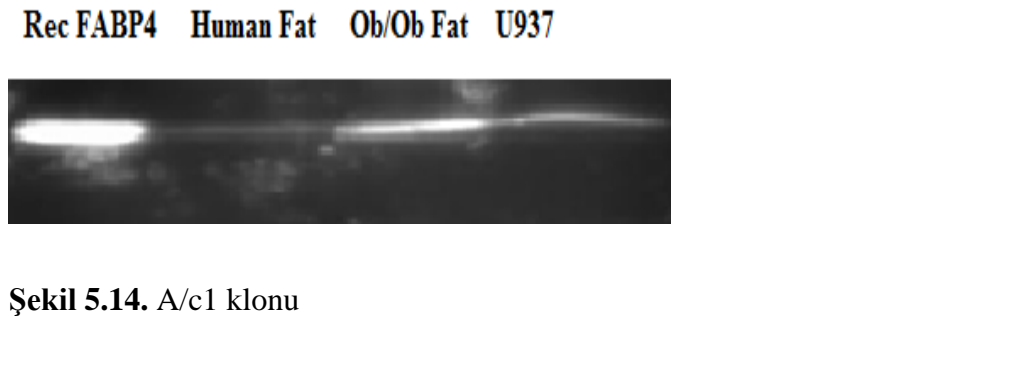
5.2.4. Ascites Sıvısından western blot

Enjeksiyondan yaklaşık bir ay sonra farelerin karın içinde sıvı birikmiştir. Biriken bu sıvı ascites sıvısı olarak bilinmektedir. Fareden alınan ascites sıvısı insan yağ dokusu(H Fat), Obez fare yağ dokusu(Ob/Ob Fat), U937 monosit hücre lizatu ve rekombinant olarak üretilmiş FABP4 proteini kullanılarak western blot yapılmıştır. Hedeflenen antikorun doğru antijene bağlanıp bağlanmadığı test edilmiştir.

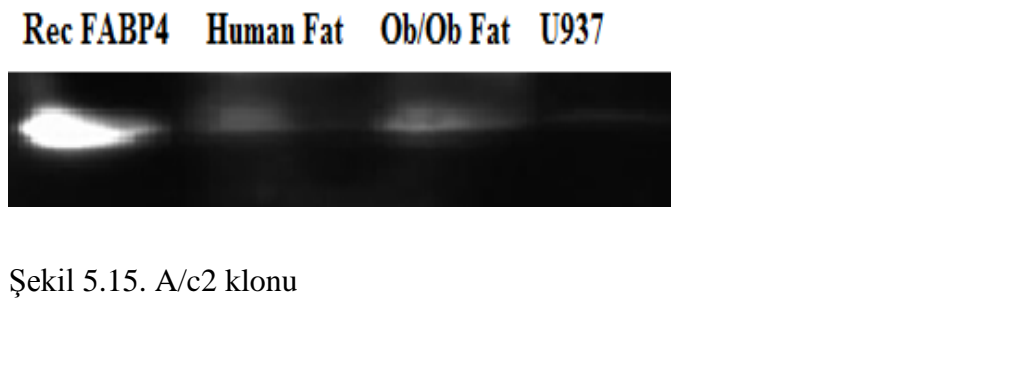
Beklenen sonuç, yukarıda bahsedilen insan yağ dokusu(H Fat), Obez fare yağ dokusu(Ob/Ob Fat), U937 monosit hücre lizatu ve rekombinant protein örneklerinde 15kDa ağırlığındaki protein tanınmasıdır.



Şekil 5.13. A/a2 klonu

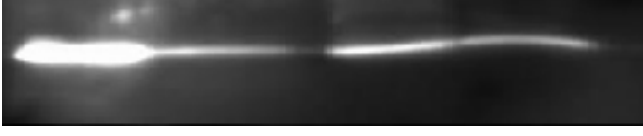


Şekil 5.14. A/c1 klonu



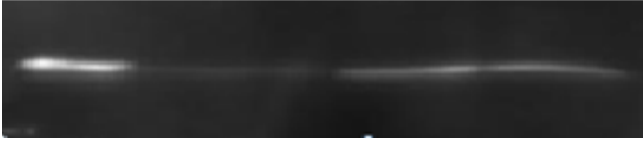
Şekil 5.15. A/c2 klonu

Rec FABP4 Human Fat Ob/Ob Fat U937



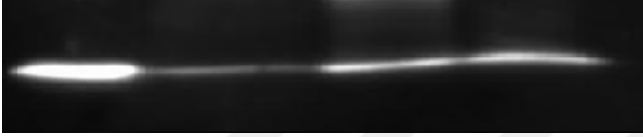
Şekil 5.16. B/f6 klonu

Rec FABP4 Human Fat Ob/Ob Fat U937



Şekil 5.17. B/f5 klonu

Rec FABP4 Human Fat Ob/Ob Fat U937

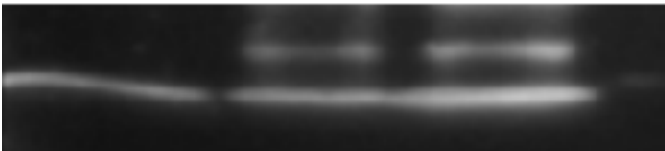


Şekil 5.18. C/c8 klonu

5.2.5. Ascites Sıvısının FABP4 ailesinden olan FABP5,6 örneklerinin çapraz reaksiyon testleri

Antijen-antikor birleşmesi spesifik bir tepkime olmasına rağmen birbirine benzeyen gruplar arasında da birleşme mümkündür. FABP5,6 rekombinant proteinlerinin pET28a plazmidinde ütilmiştir ve saflaştırma yapmadan elde ettiğimiz Ascit sıvısı ile çapraz reaksiyonlarına bakılmıştır.

FABP4 FABP5 FABP6



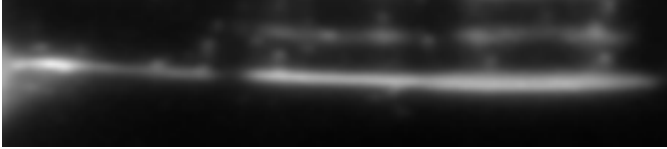
Şekil 5.19. B/f6 klonu

FABP4 **FABP5** **FABP6**



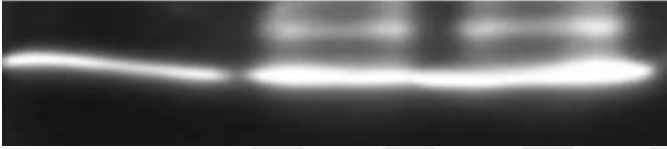
Şekil 5.20. B/f5 klonu

FABP4 **FABP5** **FABP6**



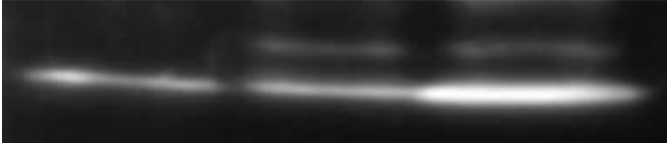
Şekil 5.21. C/b8 klonu

FABP4 **FABP5** **FABP6**



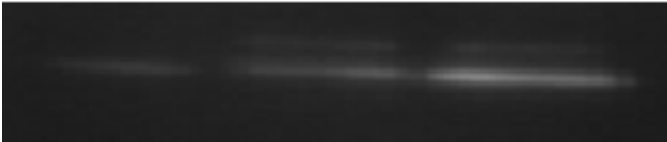
Şekil 5.22. A/a2 klonu

FABP4 **FABP5** **FABP6**



Şekil 5.23. A/c2 klonu

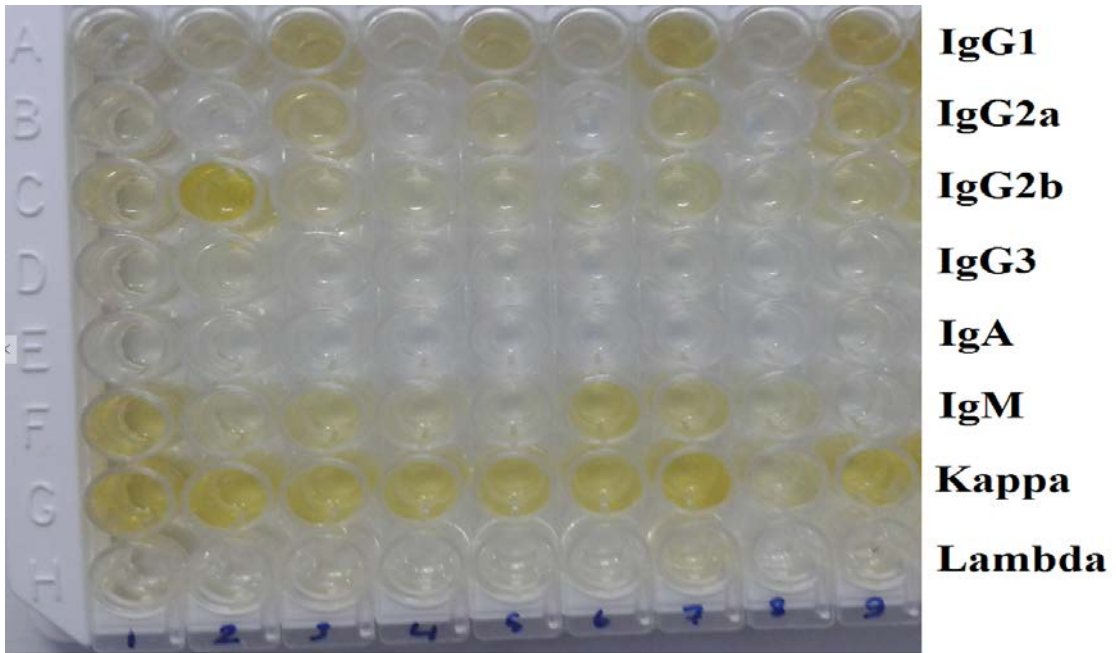
FABP4 **FABP5** **FABP6**



Şekil 5.24. C/c8 klonu

5.2.6. Antikor İzotiplendirmesi

Hayvandan alınan ascites sıvısı örneklerinde immunoglobulin proteinlerden hangi sınıfı ve altsınıflarının üretildiğini anlamak için izotiplendirme deneyi ELISA sistemine dayalı olarak yapıldı. Şekil 5.28.'deki plate üzerinde 1. ve 9. kolon hizasındaki örnekler ascites sıvısı örnekleridir. Protokol sonundakit içerisinde çıkan stop solüsyonu eklendiğinde mavi renk sarı renge dönmektedir ve reaksiyon durmaktadır. Bu aşamadan sonra spektrofotometrede 450 nm'de okumalar yapılmıştır (Tablo 5.1-1). Protokole göre 0.2 değerinin üzerinde çıkan değerler pozitif kabul edilecektir.



Şekil 5.25. Antikor izotiplendirme deneyi sonucu plate görünümü

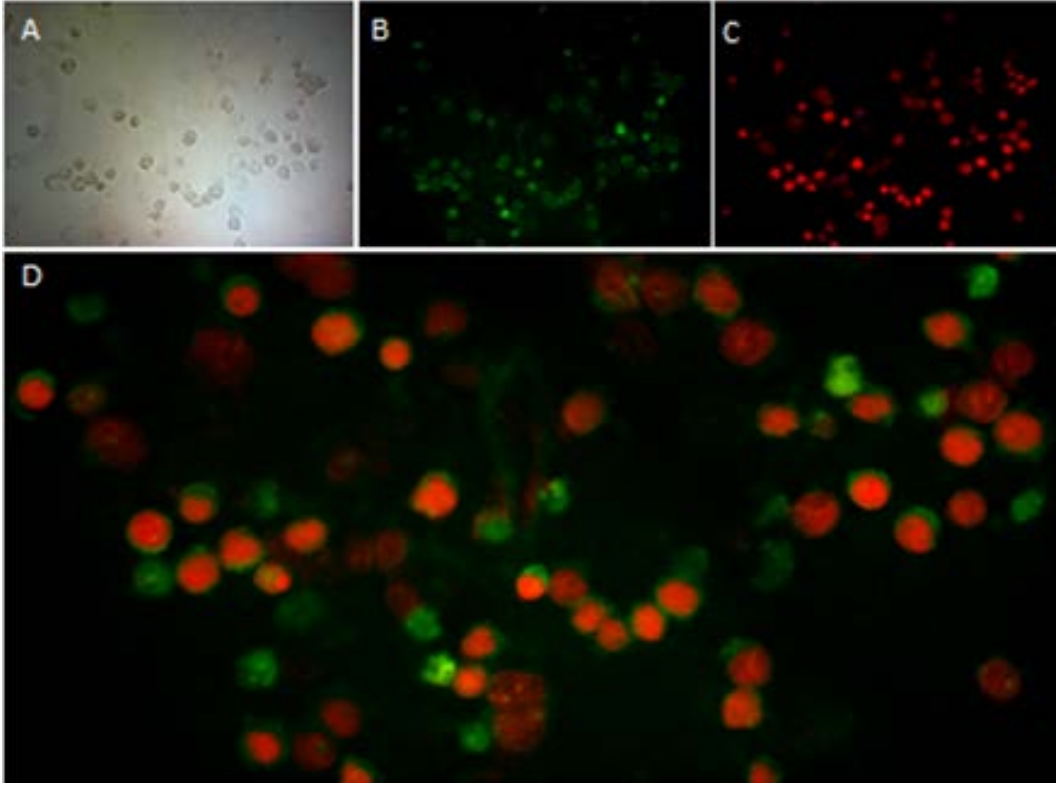
Çizelge 5.4. Antikor izotiplendirmesi sonucu spektrofotometrede ölçülen değerler

Ig tipleri	A/c1	A/c2	A/a2	B/b6	B/f6	C/b8	C/c8	B/f5	2B6
IgG1	0,148	0,235	0,630	0,152	0,587	0,285	0,866	0,186	0,604
IgG2a	0,222	0,061	0,526	0,161	0,452	0,228	0,552	0,209	0,540
IgG2b	0,352	1,646	0,369	0,256	0,238	0,421	0,517	0,282	0,336
IgG3	0,158	0,176	0,159	0,235	0,086	0,222	0,272	0,074	0,100
IgA	0,109	0,086	0,162	0,204	0,190	0,206	0,212	0,141	0,200
IgM	0,758	0,273	0,429	0,300	0,302	0,814	0,628	0,383	0,183
Kappa	1,014	0,933	0,832	0,737	0,717	0,824	1,278	0,418	0,943
Lambda	0,105	0,074	0,096	0,057	0,086	0,065	0,200	0,053	0,113

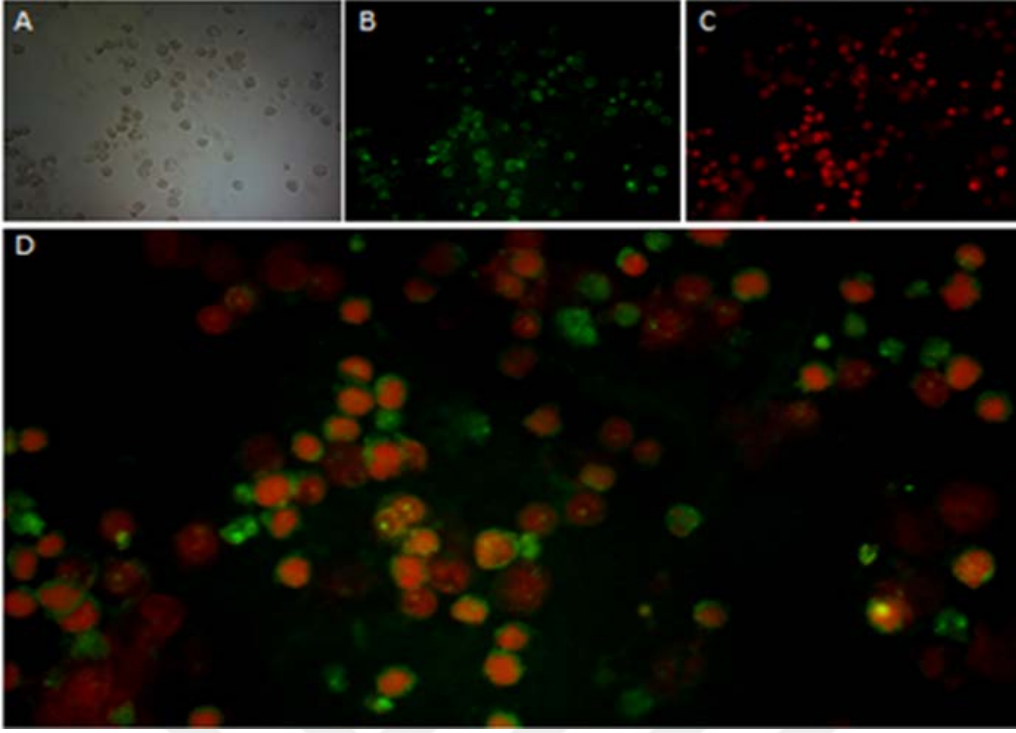
5.2.7. İmmünohistokimya(ICC) ve immünohistokimya(IHC)

Hücreler ve dokularındaki proteinler antijen kabul edilerek, dışarda özel olarak üretilen antikorlar ile anahtarkilit, koenzim-substrat örneğinde olduğu gibi Antijen-Antikor kompleksi oluşturmaktadır. Bu kompleks özel boyalar ile boyanır ve görülür hale getirilir.

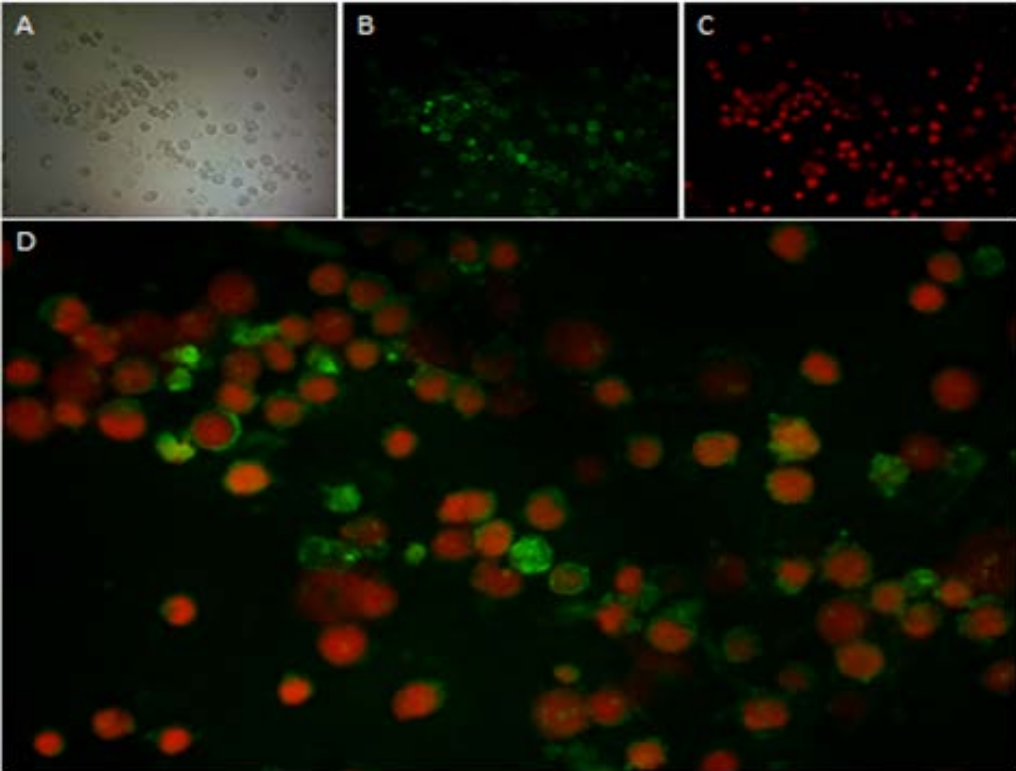
FABP4 proteinine karşı üretilen antikor klonlarını western blot ile confirme ettikten sonra U937 hücrelerini PMA ile uyararak makrofaj hücrelerine dönüştürüldü ve makrofaj hücrelerini toplayarak immünohistokimya boyaması uygulandı.



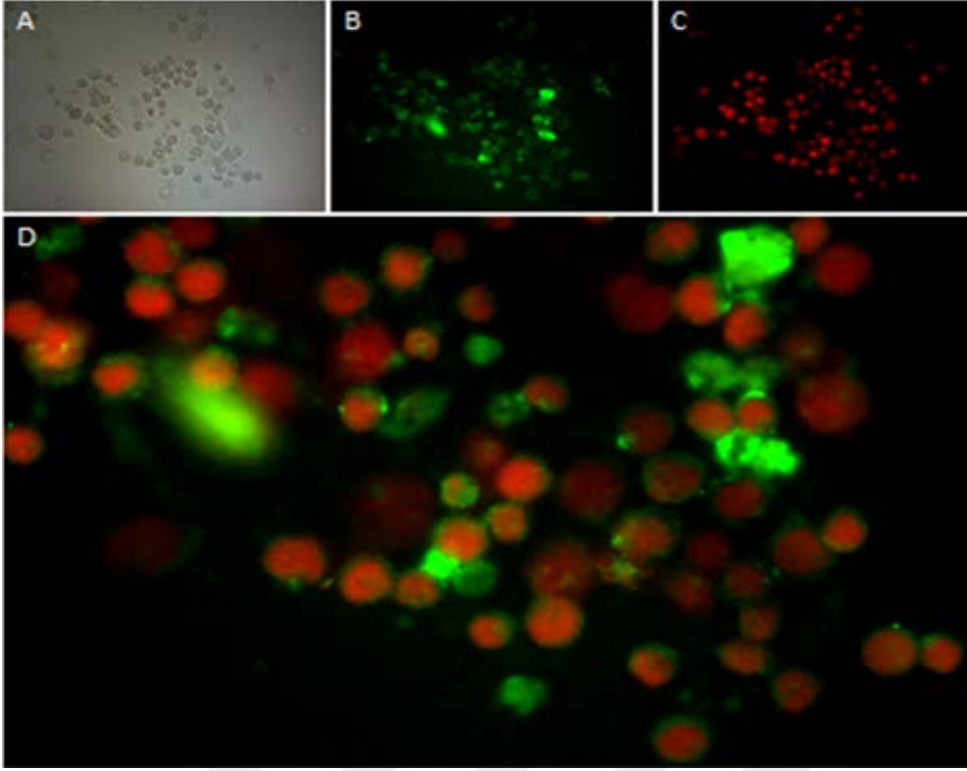
Şekil 5.26. U937 hücrelerine uygulanan C/c8 antikorunu(20X).



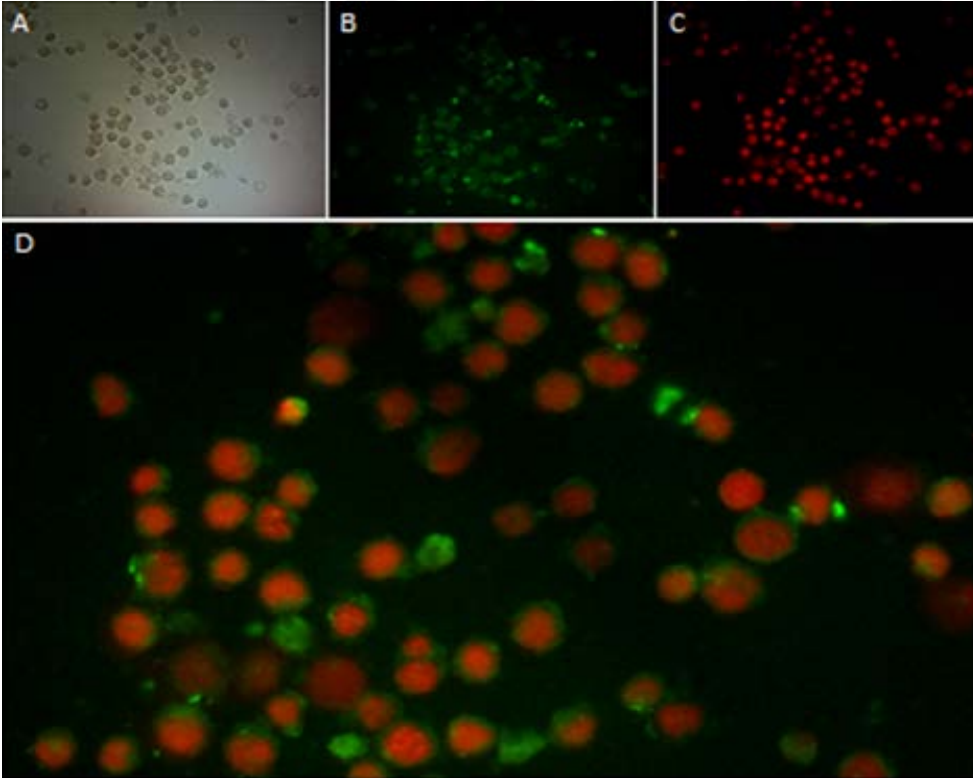
Şekil 5.27. U937 hücrelerine uygulanan C/c8 antikoru(20X).



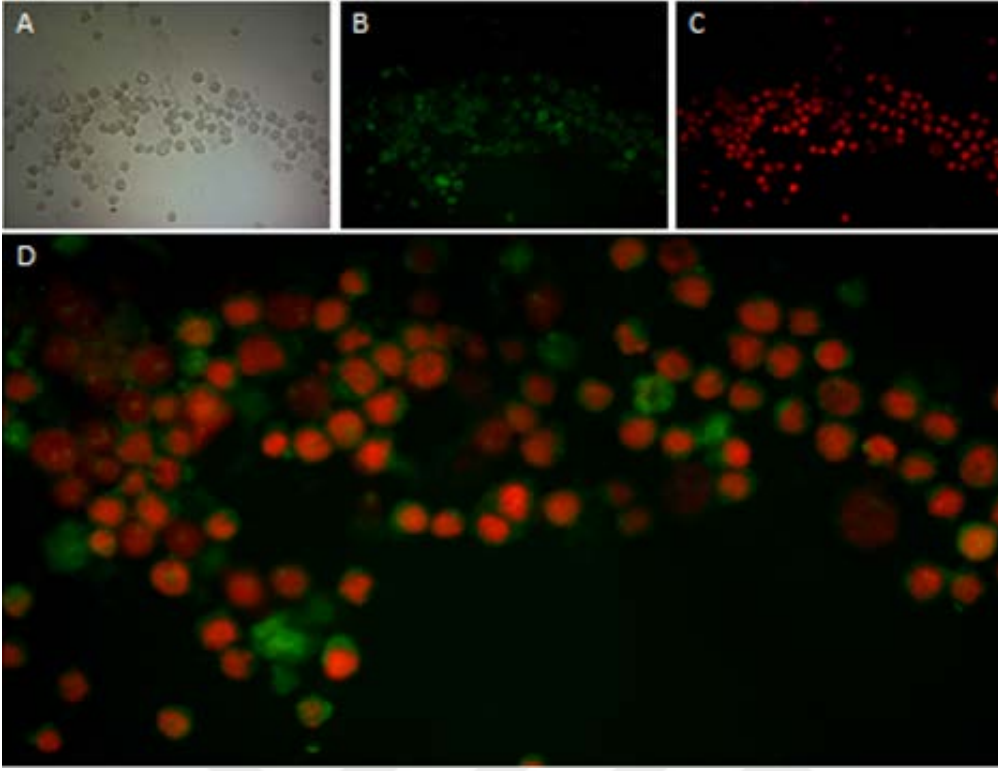
Şekil 5.28. U937 hücrelerine uygulanan B/f6 antikoru(20X).



Şekil 5.29. U937 hücrelerine uygulanan B/f6 antikoru(20X).



Şekil 5.30. U937 hücrelerine uygulanan A/a2 antikoru(20X).



Şekil 5.31. U937 hücrelerine uygulanan A/a2 antikoru(20X).

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. Tartışma ve Sonuç

Obezite, insülin direnci ve tip 2 diyabet; anormal sitokinlerin salgılanması, akut faz reaksiyonlarının artması ve diğer arabulucular ile inflamasyon sinyal yolağındaki ağı aktifleştirerek kronik inflamasyon ile yakından ilişkidirler (152,160).

Metabolizma ve bağışıklık sistemi birbirine yakından bağlantılıdır. Aşırı ve yetersiz beslenme bağışıklık fonksiyonunu etkilemektedir. Açlık ve yetersiz beslenme bağışıklık fonksiyonunu bastırarak enfeksiyon yatkınlığını artırabilir. Obezite, anormal bağışıklık aktivitesi ve enflamatuar hastalıklar riskini artıran ateroskleroz, diyabet, solunum yolu iltihabı ve yağlı karaciğer durumları ile bağlantılıdır(57).

Lipidler ayrıca enerji kaynağı ve yapısal olarak hücre zarlarının şekillendirmesinde, hücre içi ve hücre dışı sinyal molekülleri veya hormon düzenlemeleri gibi çeşitli biyolojik roller oynamaktadır. Örneğin, lipidler proteinlerin işlevi ve lokalizasyonunda görev almaktadır. Ayrıca serbest yağ asitleri, insülin ile uyarılan fosfoinositid 3-kinaz yolağını inhibe ederek ve enflamatuar moleküllerin aktivasyonunu artırarak hormon etkisini düzenlemektedir(44,181–183).

Yağ doku kitlesinin artması ve buna paralel olarak gelişen insülin direnci ile birlikte lipolizin artması adipoz dokusundan serbest yağ asiti ve sitokinlerin salınmasına, sonuç olarak glikoz alımının azalmasına ve hepatik glikoz üretiminin artmasına sebep olmaktadır. Bu daha sonra insülin direncini telafi etmek için insülin salgılanmasını teşvik etmektedir. Hiperinsülinemi ayrıca reseptör duyarsızlaştırma yoluyla hedef bölgelerde insülin direncini artırır ve dolaylı olarak lipogenesis üzerindeki etkileri göstermeye başlamaktadır. Bu kısır döngü sonunda; kronik hiperglisemi, hasarlı glukoz ile uyarılmış insülin salgılanması (β -hücre patolojileri) ve diyabet gelişimine neden olur. Yağ dokusu kaynaklı proinflamatuvar arabulucular, doğrudan insülin direnci, damar yaralanması ve aterojeneze katkıda bulunabilir. Metabolik sendrom ve endotel disfonksiyonlarda, adipokinler olarak bilinen bu proinflamatuvar ara bulucular obezite ve insülin direnci arasındaki bağlantıyı sağlamaktadır(184,185).

Inflamatuvar yolakları, ayrıca hedef hücrelerdeki c-Jun amino terminal kinazın (JNK) ve IKK ve insülin etkisinin aktivasyonu da dahil olmak üzere, FABPs tarafından etkilenmektedir. Ap2 ve MAL1 eksikliği olan fareler; obezite, insülin direnci, karaciğer yağlanması ve ateroskleroz gibi metabolik sendroma karşı korunmaktadırlar(1,5,8). İlginç bir şekilde, aP2 lokusunun nadir bir genetik değişimi ile ortaya çıkan işlev kaybı insanlarda da çok benzer bir şekilde koruyucu fenotip göstermektedir(186). Klinik öncesi ortamda, inflamatuvar sinyal yollarının, genetik, biyokimyasal ve farmakolojik hedeflemesi ile insülin etkisini artırmaktadır(57). Örneğin, önleyici bir peptid kullanılarak JNK hedeflenerek sentetik küçük molekül inhibitörleri veya RNA interferans (RNAi) tabanlı teknolojiler çeşitli fare modellerinde insülin etkisini iyileştirmek için gösterilmiştir(187,188). Ayrıca JNK yolağının insan hastalığı ile alakalı olduğuna dair güçlü genetik kanıtlar vardır(189).

Yağ asit bağlayıcı protein 4 (FABP4) glukoz homeostazisini düzenleyen bir adipokindir. Gebe olmayan bireylerde metabolik sendromun çeşitli özellikleri FABP4 tarafından obezite ile bağlantılı olduğu bilinmektedir. Yağ asitleri (FA) ve bunların ürünleri metabolizma ve sinyalizasyon gibi çeşitli hücrel süreçlerde rol oynamaktadır. Yağ-asidi CoA ligazlar beta oksidasyon substratı, karmaşık lipitler ve sinyal molekülleri oluşumunda katkıda bulunmaktadırlar(190). Adiposit yağ asit bağlayıcı protein 4 (FABP4) insülin duyarlılığı düzenleyicisi olarak da bilinmektedir ve insülin duyarlılık biyomarkeri olarak hizmet verebilmektedir(191).

Son zamanlarda organizmaya ağır yan etki vermeden tedavi amaçlı gibi temel biyolojik tepki yollarının arayüzünü işleme yöntemleri geliştirilmiştir. Peptid ve lipidler pratik olarak metabolik ve inflamatuvar yollar arasındaki kesişme noktasında önemli terapötik hedeflerden sayılmaktadırlar.

Peptidler için, en belirgin hedef sitokinler, kemokinler ve bunların reseptörleri öne çıkmaktadır. Bu yaklaşımın en güzel örnekleri JNK ve IKK yollar olacaktır. IKK inhibisyonu yoluyla, yüksek doz salisilatlar obez fareler ve diyabetik insanlarda hem de glikoz metabolizmasını iyileştirmektedir. IKK inhibisyonu yoluyla, glikoz metabolizması hem obez farelerde hem de diyabetik insanlarda iyileştirilmektedir(192–194).

FABP fonksiyonunu modifiye eden farmakolojik ajanların geliştirilmesi lipid sinyal yollarının, enflamatuar cevapların ve metabolik düzenlenmesinin doku veya hücreye spesifik kontrolünü ve bu sayede çoklu yeni ilaç sınıfları geliştirilmektedir. FABP'ler küçük moleküller ile hedeflenerek, adiposit ve makrofajların fonksiyonunu önlemektedir ve farelerde tip 2 diyabet ve ateroskleroz tedavisi için kullanılabilmektedir(5,35,195).

İnsanlardaki aP2'nin metabolik işlevlerinin fare modellerine benzer olabileceği düşünülerek FABP4 araştırmaları fare modeli üzerinden geliştirilmiştir. Hotamişligil ve arkadaşları ap2 molekülünün, TNF-alfa ifadesinin yağ asit metabolizması ile ilişkilendirerek, şişmanlığı insülin direncine bağlayan yolağın merkezinde olduğunu ileri sürmüşlerdir (8,196). Furuhashi ve arkadaşları ateroskleroz ve tip 2 diyabet tedavisi için FABP4/aP2 proteinini inhibe edilmesini bir strateji olarak araştırmışlardır(10). Yine de hotamişligil ve arkadaşları tarafından yapılan bir diğer araştırmada ob / ob-aP2 - / - hayvanlar ob / ob kontrol grubu ile karşılaştırıldığında insülin duyarlılıkları daha fazla bulunmuştur. Bu hayvanlar aynı zamanda plazmadaki trigliserid ve kolesterol düzeylerinde düşüş göstermektedirler(44).

Son zamanlarda, FABP4 önleyicilerinin küçük serisi tespit edilmiştir. Bunlar; karbazol-tabanlı ve indol-tabanlı inhibitörleri; benzilamino-6- (triflorometil) pirimidin-4 (1 H) inhibitörleri ve bir bifenil azol inhibitörü (aynı zamanda **BMS309403** olarak da bilinir) gibi bileşiklerden oluşmaktadır(17).

Lipidler ile ilgili yollar arasında, tedavide başarı göstermiş ana örnek olarak **tiyazolidindionlar(TZDs)** bilinmektedir. Tiazolidinedionlar, nükleer reseptör peroksizom proliferatör aktive edici reseptörler (PPARalfa, gama, delta) ile kuvvetli insülin duyarlılığını gösteren ve tip 2 diyabet için son derece etkili oral ilaçlar olarak bilinmektedir. PPARy sinyalizasyonu, enerji dengesini ve metabolik hastalıklarında önemli ilerlemeler vurgulamaktadır ve aynı zamanda TZD tabanlı tedavi için yeni açıklamalar sağlamıştır(197,198).

Statinler HMG-CoA redüktaz inhibitörleri sınıfı olarak hiperkolesterolemi hastalarının tedavisinde kullanılmaktadır. A-FABP ekspresyonu *in vitro* olarak kolesterolü azaltan **statinler** tarafından baskılanmaktadır. Statinler, hücrel kolesterol düzeylerini azaltarak makrofaj FABP4 ekspresyonunu inhibe etmektedir(199).

Deazaksantin bazlı türevlerinin bir serisi, geleneksel olarak hazırlanıp glikoz tüketimi, adiponection ve leptin ifadesi değerlendirilmiştir. N-(2-(4-(1-allyl-2,4-dioxo-2,3,4,5-tetrahydro-1Hpyrrolo(3,2-d)pyrimidin-6-yl)phenoxy)ethyl)picolinamide(8g) adlandırılan bu bileşiğin biri *in vitro* deneylerinde umut verici bir şekilde glukoz düşürücü aktivite göstermiştir(200). Daha sonra 8g bir inhibitör olarak trigliseridler birikimini ve 3T3-L1 adipositlerdeki FABP4 ifadesini inhibe ettiği bulunmuştur. Makrofajlarda, 8g, hem FABP4 hemde proinflamatuvar sitokinlerin üretimini engellemiştir(201).

Burak ve arkadaşları tedaviye yönelik olarak FABP4 proteinine karşı(anti-aP2) **monoklonal antikor(CA33)** geliştirmişlerdir ve CA33 antikorunun tedavi sonuçları glikoz toleransını ve insülin duyarlılığını büyük bir ölçüde artırmıştır(202).

Bu çalışmada immunojenik FABP4 rekombinant protein olarak üretilmesi ve insan FABP4 proteinine karşı antikor geliştirilmesi amaç edinilmiştir. 3 dişi Balb/C farelere çeşitli zaman aralıklarında (0, 14, 28, 36, 42, 56, 59 gün) laboratuvarında üretilen immunojenik insan rekombinant FABP4 protein aşılanmıştır (89). Yaklaşık 42 gün sonra farenin kuyruk veninden alınan kan örneği primer antikor olarak kullanılmıştır ve antikor titrasyonuna bakılmıştır. Antikorumun 1:250.000'e kadar titre olması hayvanın yeterince immunize olduğunun bir göstergesidir. Yapılan ELISA sonucunda serum sıvındaki antikorlar 1:1.000.000'a kadar titre vermiştir.

Tez süresince FABP4 proteinine karşı monoklonal antikor yapılmıştır ve fareler immunize edilerek dalakları alınmıştır. Hibridoma hücreleri daha önce immunize edilmiş hayvanların (genellikle fare, rat ve tavşan) yaşam süresi kısa olan belirli antikor salgılayan B-hücreleri ile ölümsüz Miyeloma hücre hattının birleşmesi ile üretilmektedir.

Monoklonal antikor üretimi hem fare karın içinde (ascites) hem de *in vitro* metodu ile yapılmaktadır. Hücre kültüründe çoğaltılan hibrid hücrelerin supernatant antikor değerlerine ELİSA yöntemi ile bakılmıştır ve yüksek değer gösteren 15 klon seçilmiştir. Seçilen klonlar fare karın boşluğuna injekte edilerek Ascites elde edilmiştir.

Bu şekilde klon başına bir monoklonal antikor üretimi yapıp 3 hayvandan 30 ml kadar ascites sıvısı elde edilmiştir. Western blot deneylerinde kullanılan bu antikor içeren sıvı

1/5000 oranında en uygun bir şekilde çalışmıştır. Bu yöntem ile az sayıda hayvan kullanılarak çok miktarda ve kaliteli monoklonal antikor üretilmiştir.

FABP ailesinin birincil yapılarına rağmen, üçüncül yapıları yüksek ölçüde korunmuş vaziyette bulunmaktalar. Bu protein ailelerinde paraloglarda %25 ve Ortologlarda ise %90 dizi benzerliği bulunmaktadır(22,23). FABP4 ve FABP5 arasında %52 aminoasit benzerliği görünmekte ve birçok yağ asidine benzer afinite ve seçiciliği ile bağlanmaktadır. Ayrıca hotamişligil ve arkadaşları FABP4 ve FABP5 proteinlerinin metabolik işlevlerinin aynı olduğunu ve adipositlerdeki FABP4 yokluğu FABP5 tarafından telafi edildiğini söylemektedirler(17). Bu doğrultuda elde ettiğimiz monoklonal antikorların FABP ailesinin diğer üyeleri olan FABP5 ve FABP6 proteinleri üzerinde de çapraz reaksiyon denenmiştir. Denenmiş olan monoklonal antikorumuz her üç izoformuda tanımıştır.

Antikor üretilip, spesifite ve aktivite testleri yapıldıktan sonra hangi izotip antikorların üretildiğini gözlemek için izotiplendirme testleri yapılır. Farede üretilen antikor izotipini saptamak için kullanılacak kitte ağır zincir izotipini saptamak için IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2, IgA, IgM anti- immunoglobulin antikorları kullanılırken, zayıf zincirleri tanımlamak için kappa ve lambda anti-immunoglobulinleri kullanılmaktadır. İzotiplendirme deneyini ascites veya karın boşluğundan alınan sıvı ile yapılmıştır. IgG1 immunoglobulin izotipi, protein ve polipeptid antijenlerine karşı timus aracılı immün tepkisini göstermektedir ve toplam immunoglobulinlerin %60-65'ini kapsamaktadır. IgG2 Karbonhidrat / polisakarit antijenlerine karşı yaygın bir bağışıklık tepkisidir ve toplam immunoglobulinlerin %20-25'ini oluşturmaktadır. (158). IgM immunoglobulin izotipi ağırlıklı olarak lenf sıvısı ve kanda bulunan ve hastalığın erken dönemlerinde oldukça etkili bir nötrleştirme ajandır.

Elde ettiğimiz monoklonal antikor izotiplendirme değerlendirmesine bakıldığında A/a2, B/f6 ve C/c8 klonlar protein antijenlerine karşı gelişen antikorlar ağır zincir izotipi(IgG1) ve hafif zincir izotipi(kappa) daha yüksek değerleri göstermektedir. Bu klonlar görüldüğü gibi western blot sonuçlarında da iyi afinite göstermişlerdir. A/c2 klonu IgG2 ağır zincir izotip ve kappa hafif zinci izotip değerlerini yüksek çıktığı için bu antikorun karbonhidrat / polisakarit antijenlerine karşı gelişimi olduğunu ima etmesine bakmayarak western blot

sonucu kuvvetli antikor olduğunu göstermektedir. Hibridoma hücreleri tarafından salgılanan antikorların, hibridleri selektif olarak üretmeden (ölmeden önce) dalak hücrelerinden üretilen antikorlar ile karışması mühtemeldir. Bununla birlikte, birden fazla izotiplerin ve güçlü bir IgM sinyali görmek mümkündür. Ama hibridoma hücrelerinde sadece IgM ağır zincir görmek çok istenilen bir durum olmadığı için ellenmesi gerekmektedir. A/c1, B/b6 ve c/b8 klonlarında IgM izotipinin yanında diğer IgG izotoplarının da görünmesi hibridoma hücrelerine ait olduğunu kanıtlamıştır.

U937 hücrelerinin forbol miristat asetat (PMA) ile indükledikten sonra hücre farklılaşmasına girdiklerini, makrofaj özelliklerini gösterdiklerini ve FABP4,5 proteininin makrofaj markerleri olarak incelendiği kaynaklarda gösterilmiştir. Çalışmamızda U937 hücre hatlarını PMA ile tetiklediğimizden sonra FABP4 ifadesinin gözlemlemeye yönelik western blot yöntemi ile protein varlığına bakılmıştır. Burada hücre lizatlarında yüksek FABP4 ekspresyonu gözlenmiştir. Daha sonra bu hücrelerde immunofloresan boyaması yapılmıştır ve immünohistokimya sonuçlarında protein ifadesi gözlemlenmiştir.

Bu çalışmalarda, diyabet, insülin direnci ve yağlı karaciğer hastalığı için aP2 hedefli tedavilerin güçlü klinik öncesi bir destek olduğu ve bu amaçla kullanılabilir bir aday molekülü olduğu sunulmaktadır. Bulgularımız, hibridoma teknolojisi ile FABP4'e karşı elde ettiğimiz monoklonal antikorların, aP2 molekülünü önlemesini mümkün kılmıştır ve tip 2 diyabet ve ateroskleroz ve obez gibi metabolik hastalıkların tedavisi için, güçlü terapötik maddelerin yeni bir sınıf yol açabildiğini ortaya koymaktadır.

Deneylerimizde kullanılmak üzere elimizde FABP4 monoklonal antikorca zengin ascites örnekleri bulunmaktadır. Sonuç olarak monoklonal antikor teknolojisi laboratuvarımızda uygulanmış ve hedef antikor üretilmiştir. Oluşturulan antikorların üretimi, ELISA, Western blot ve Immunostain dahil olmak üzere çeşitli immünoanalizlerde kullanmak üzere verimli bir şekilde çalışmaktadır. Üretilmiş olan antikorlar karakteristikleri açısından onları sağlıklı ve hasta bireylerin işlevsel FABP4 araştırmalarında faydalı kılacağı düşünülmektedir.

İnsan tedavisinde kullanılacak olan monoklonal antikorların daha uyumlu, uzun süreli etki, spesifite ve affiniteye sahip olmaları için, günümüzde fare antikorlarının yerine yeni teknoloji yöntemleri ile insansı antikorlar kullanılmaktadır. Bu bağlamda ürettiğimiz anti-

FABP4 fare monoklonal antikorların insanlarda immün yanıtı oluşturmayan ve biyoteknolojik ilaçlar olarak daha etkili olmaları için yeni insan monoklonal antikorların üretilmesinde ileriye atılacak bir adım sayılmaktadır.



7. KAYNAKLAR

1. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders : Article : Nature. [kaynak 25 Aralık 2015]; Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.nature.com/nature/journal/v444/n7121/full/nature05485.html>
2. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 13 Aralık 2001;414(6865):799–806.
3. Coe NR, Bernlohr DA. Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta BBA - Lipids Lipid Metab*. 22 Nisan 1998;1391(3):287–306.
4. Zimmerman AW, Veerkamp JH. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci CMLS*. Temmuz 2002;59(7):1096–116.
5. Maeda K, Cao H, Kono K, Gorgun CZ, Furuhashi M, Uysal KT, vd. Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell Metab*. ubat 2005;1(2):107–19.
6. Cao H, Maeda K, Gorgun CZ, Kim H-J, Park S-Y, Shulman GI, vd. Regulation of metabolic responses by adipocyte/macrophage Fatty Acid-binding proteins in leptin-deficient mice. *Diabetes*. Temmuz 2006;55(7):1915–22.
7. Birsen Tuğlu Sezer Uysal. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*. 2011 [kaynak 26 Aralık 2015]; Tarihinde adresinden erişildi: <http://tkb.dergisi.org/text.php3?id=148>
8. G S Hotamisligil RSJ. Uncoupling of Obesity from Insulin Resistance Through a Targeted Mutation in aP2, the Adipocyte Fatty Acid Binding Protein. *Science*. 1996;274(5291):1377–9.
9. Uysal KT, Scheja L, Wiesbrock SM, Bonner-Weir S, Hotamisligil GS. Improved glucose and lipid metabolism in genetically obese mice lacking aP2. *Endocrinology*. Eylül 2000;141(9):3388–96.
10. Furuhashi M, Tuncman G, Görgün CZ, Makowski L, Atsumi G, Vaillancourt E, vd. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature*. 21 Haziran 2007;447(7147):959–65.
11. Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market. *mAbs*. 20 Aralık 2014;7(1):9–14.
12. Hanly WC, Artwohl JE, Bennett BT. Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. *ILAR J*. 01 Ocak 1995;37(3):93–118.
13. Köhler G, Milstein C. Pillars Article: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256 (5517): 495–497. *J Immunol*. 03 Ocak 2005;174(5):2453–5.

14. Drewe E, Powell RJ. Clinically useful monoclonal antibodies in treatment. *J Clin Pathol*. Şubat 2002;55(2):81–5.
15. Overton TW. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discov Today*. Mayıs 2014;19(5):590–601.
16. Chan SY. Improved recombinant protein production [Internet]. EP0254076 A1, 1988 [kaynak 26 Aralık 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.google.com.ar/patents/EP0254076A1>
17. Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. Haziran 2008;7(6):489.
18. Storch J, Corsico B. The Emerging Functions and Mechanisms of Mammalian Fatty Acid-Binding Proteins. *Annu Rev Nutr*. 2008;28(1):73–95.
19. Ockner RK, Manning JA, Poppenhausen RB, Ho WK. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues. *Science*. 07 Temmuz 1972;177(4043):56–8.
20. Makowski L, Hotamisligil GS. The role of fatty acid binding proteins in metabolic syndrome and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. Ekim 2005;16(5):543–8.
21. Kaikaus RM, Bass NM, Ockner RK. Functions of fatty acid binding proteins. *Experientia*. 15 Haziran 1990;46(6):617–30.
22. Smathers RL, Petersen DR. The human fatty acid-binding protein family: Evolutionary divergences and functions. *Hum Genomics*. 01 Mart 2011;5(3):170–91.
23. Marcelino AMC, Smock RG, Gierasch LM. Evolutionary coupling of structural and functional sequence information in the intracellular lipid-binding protein family. *Proteins*. 01 Mayıs 2006;63(2):373–84.
24. Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta*. Ağustos 2011;1812(8):1007–22.
25. Garin-Shkolnik T, Rudich A, Hotamisligil GS, Rubinstein M. FABP4 attenuates PPAR γ and adipogenesis and is inversely correlated with PPAR γ in adipose tissues. *Diabetes*. Mart 2014;63(3):900–11.
26. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 30 Aralık 1994;79(7):1147–56.
27. Schroeder F, Petrescu AD, Huang H, Atshaves BP, McIntosh AL, Martin GG, vd. Role of fatty acid binding proteins and long chain fatty acids in modulating nuclear receptors and gene transcription. *Lipids*. Ocak 2008;43(1):1–17.

28. Prinsen CFM, de Bruijn DRH, Merkx GFM, Veerkamp JH. Assignment of the Human Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein Gene (FABP4) to Chromosome 8q21 Using Somatic Cell Hybrid and Fluorescence in Situ Hybridization Techniques. *Genomics*.ubat 1997;40(1):207–9.
29. Prinsen CFM, Olde Weghuis D, Geurts van Kessel A, Veerkamp JH. Identification of a human heart FABP pseudogene located on chromosome 13. *Gene*. 09 Temmuz 1997;193(2):245–51.
30. Simón I, Escoté X, Vilarrasa N, Gómez J, Fernández-Real JM, Megía A, vd. Adipocyte Fatty Acid-binding Protein as a Determinant of Insulin Sensitivity in Morbid-obese Women. *Obesity*. 01 Haziran 2009;17(6):1124–8.
31. Prieur X, Röszer T, Ricote M. Lipotoxicity in macrophages: evidence from diseases associated with the metabolic syndrome. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids*. Mart 2010;1801(3):327–37.
32. Sell H, Eckel J. Chemotactic cytokines, obesity and type 2 diabetes: in vivo and in vitro evidence for a possible causal correlation? *Proc Nutr Soc*. Kasım 2009;68(4):378–384.
33. Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med*. Şubat 2003;9(2):213–9.
34. Rosen ED, Spiegelman BM. PPAR γ : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem*. 12 Ekim 2001;276(41):37731–4.
35. Makowski L, Boord JB, Maeda K, Babaev VR, Uysal KT, Morgan MA, vd. Lack of macrophage fatty-acid-binding protein aP2 protects mice deficient in apolipoprotein E against atherosclerosis. *Nat Med*. Haziran 2001;7(6):699–705.
36. Bourlier V, Bouloumie A. Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance. *Diabetes Metab*. Eylül 2009;35(4):251–60.
37. Reinehr T, Stoffel-Wagner B, Roth CL. Adipocyte fatty acid-binding protein in obese children before and after weight loss. *Metabolism*. Aralık 2007;56(12):1735–41.
38. Hertzfel AV, Smith LA, Berg AH, Cline GW, Shulman GI, Scherer PE, vd. Lipid metabolism and adipokine levels in fatty acid-binding protein null and transgenic mice. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 01 Mayıs 2006;290(5):E814–23.
39. Hancke K, Grubeck D, Hauser N, Kreienberg R, Weiss JM. Adipocyte fatty acid-binding protein as a novel prognostic factor in obese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 16 Ekim 2009;119(2):367–77.
40. Boiteux G, Lascombe I, Roche E, Plissonnier M-L, Clairotte A, Bittard H, vd. A-FABP, a candidate progression marker of human transitional cell carcinoma of the bladder, is differentially regulated by PPAR in urothelial cancer cells. *Int J Cancer*. 15 Nisan 2009;124(8):1820–8.

41. Shen W-J, Sridhar K, Bernlohr DA, Kraemer FB. Interaction of rat hormone-sensitive lipase with adipocyte lipid-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 11 Mayıs 1999;96(10):5528–32.
42. Michalik L, Wahli W. PPARs Mediate Lipid Signaling in Inflammation and Cancer. *PPAR Res* [Internet]. 2008 [kaynak 25 Aralık 2015];2008. Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2606065/>
43. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, vd. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *Pharmacol Rev*. 12 Ocak 2006;58(4):726–41.
44. Hotamisligil GS, Bernlohr DA. Metabolic functions of FABPs—mechanisms and therapeutic implications. *Nat Rev Endocrinol*. Ekim 2015;11(10):592–605.
45. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory Mechanisms in Obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29(1):415–45.
46. Furuhashi M, Saitoh S, Shimamoto K, Miura T. Fatty Acid-Binding Protein 4 (FABP4): Pathophysiological Insights and Potent Clinical Biomarker of Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Clin Med Insights Cardiol*. 02 Şubat 2015;8(Suppl 3):23–33.
47. Queipo-Ortuño MI, Escoté X, Ceperuelo-Mallafre V, Garrido-Sanchez L, Miranda M, Clemente-Postigo M, vd. FABP4 Dynamics in Obesity: Discrepancies in Adipose Tissue and Liver Expression Regarding Circulating Plasma Levels. *PLoS ONE*. 05 Kasım 2012;7(11):e48605.
48. Terra X, Quintero Y, Auguet T, Porras JA, Hernández M, Sabench F, vd. FABP 4 is associated with inflammatory markers and metabolic syndrome in morbidly obese women. *Eur J Endocrinol*. 04 Ocak 2011;164(4):539–47.
49. Glass CK, Ogawa S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. Ocak 2006;6(1):44–55.
50. Maeda K, Uysal KT, Makowski L, Görgün CZ, Atsumi G, Parker RA, vd. Role of the Fatty Acid Binding Protein *mal1* in Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*. 02 Ocak 2003;52(2):300–7.
51. Makowski L, Hotamisligil GS. Fatty Acid Binding Proteins—The Evolutionary Crossroads of Inflammatory and Metabolic Responses. *J Nutr*. Eylül 2004;134(9):2464S–2468S.
52. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Mayıs 2008;9(5):367–77.
53. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 14 Aralık 2006;444(7121):840–6.

54. Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, vd. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*. 25 Ağustos 2006;313(5790):1137–40.
55. Özcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A-H, Iwakoshi NN, Özdelen E, vd. Endoplasmic Reticulum Stress Links Obesity, Insulin Action, and Type 2 Diabetes. *Science*. 15 Ekim 2004;306(5695):457–61.
56. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 01 Ocak 1993;259(5091):87–91.
57. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*. 02 Mayıs 2005;115(5):1111–9.
58. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature*. 09 Ekim 1997;389(6651):610–4.
59. Ventre J, Doebber T, Wu M, MacNaul K, Stevens K, Pasparakis M, vd. Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice. *Diabetes*. Eylül 1997;46(9):1526–31.
60. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, vd. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*. 26 Şubat 1998;391(6670):900–4.
61. Taylor SI. Deconstructing Type 2 Diabetes. *Cell*. 02 Nisan 1999;97(1):9–12.
62. Kahn BB, Rossetti L. Type 2 diabetes — who is conducting the orchestra? *Nat Genet*. Kasım 1998;20(3):223–5.
63. Lauro D, Kido Y, Castle AL, Zarnowski M-J, Hayashi H, Ebina Y, vd. Impaired glucose tolerance in mice with a targeted impairment of insulin action in muscle and adipose tissue. *Nat Genet*. Kasım 1998;20(3):294–8.
64. Kulkarni RN, Brüning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell*. 05 Şubat 1999;96(3):329–39.
65. Bernlohr DA, Doering TL, Kelly TJ, Lane MD. Tissue specific expression of p422 protein, a putative lipid carrier, in mouse adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 30 Ekim 1985;132(2):850–5.
66. Cederbaum SD, Fareed GC, Lovett MA, Shapiro LJ. Recombinant DNA in Medicine. *West J Med*. Ağustos 1984;141(2):210–22.
67. Garrett. Recombinant DNA Technology and Molecular Cloning. 2000 [kaynak 25 Aralık 2015]; Tarihinde adresinden erişildi: <http://tr.scribd.com/doc/130937889/Recombinant-DNA-Technology-and-Molecular-Cloning#scribd>

68. Carroll WL. Introduction to recombinant-DNA technology. *Am J Clin Nutr.* 08 Ocak 1993;58(2):249S–258S.
69. Watt PC, Sawicki MP, Passaro E. A review of gene transfer techniques. *Am J Surg.* Mart 1993;165(3):350–4.
70. Wurm FM. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol.* Kasım 2004;22(11):1393–8.
71. Gen yalıtımı. İçinde: Vikipedi [Internet]. 2011 [kaynak 26 Aralık 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: https://tr.wikipedia.org/w/index.php?title=Gen_yalıtımı&oldid=9743379
72. Shih TY, Martin MA. A General Method of Gene Isolation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Haziran 1973;70(6):1697–700.
73. Klonlamada kullanılan vektörler - Mikrobiyoloji [Internet]. [kaynak 26 Aralık 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAAAF6AA849816B2EF2CFAACA57CB3F9E6>
74. De Gelder L, Williams JJ, Ponciano JM, Sota M, Top EM. Adaptive Plasmid Evolution Results in Host-Range Expansion of a Broad-Host-Range Plasmid. *Genetics.* Nisan 2008;178(4):2179–90.
75. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 01 Ocak 1990;96(1):23–8.
76. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol.* Ekim 1999;10(5):411–21.
77. Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren P-A, Ståhl S. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem.* 01 Nisan 2002;35(2):91–105.
78. Emery AEH. *An Introduction to Recombinant DNA.* Taylor & Francis; 1984. 244 s.
79. Charles E. Bell & Mitchell Lewis. Access : A closer view of the conformation of the Lac repressor bound to operator : *Nature Structural & Molecular Biology.* 2000 [kaynak 25 Aralık 2015]; Tarihinde adresinden erişildi: http://www.nature.com/nsmb/journal/v7/n3/full/nsb0300_209.html
80. Daber R, Stayrook S, Rosenberg A, Lewis M. Structural Analysis of Lac Repressor Bound to Allosteric Effectors. *J Mol Biol.* 20 Temmuz 2007;370(4):609–19.
81. Sørensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 26 Ocak 2005;115(2):113–28.

82. Kaufman RJ. Overview of vector design for mammalian gene expression. *Mol Biotechnol.* Ekim 2000;16(2):151–60.
83. Doç.Dr.H.Ümit LÜLEYAP. Moleküler Genetiğin Esasları [Internet]. [kaynak 29 Aralık 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <https://www.nobelkitabevi.com.tr/turkce-tip-kitaplari/7018-Molekuler-Genetigin-Esaslari.html>
84. Prof. Dr. Mustafa Arda. Gen Klonlaması (Moleküler Klonlama) - Mikrobiyoloji [Internet]. [kaynak 29 Aralık 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAAF6AA849816B2EF79299488453EF356>
85. Lehman IR. DNA ligase: structure, mechanism, and function. *Science.* 29 Kasım 1974;186(4166):790–7.
86. Chen I, Dubnau D. DNA uptake during bacterial transformation. *Nat Rev Microbiol.* Mart 2004;2(3):241–9.
87. Froger A, Hall JE. Transformation of Plasmid DNA into E. coli Using the Heat Shock Method. *J Vis Exp JoVE* [Internet]. 01 Ağustos 2007 [kaynak 25 Aralık 2015];(6). Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2557105/>
88. Chan W-T, Verma CS, Lane DP, Gan SK-E. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of Escherichia coli. *Biosci Rep* [Internet]. 12 Aralık 2013 [kaynak 25 Aralık 2015];33(6). Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3860579/>
89. Wiley: The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics and Cellular Interactions, 2nd Edition - Roger A. Garrett, Alistair T. Matheson, Peter B. Moore, et al [Internet]. [kaynak 25 Aralık 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-1555811841.html>
90. Alonso A, Sánchez P, Martínez JL. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol.* ubat 2001;3(1):1–9.
91. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* Haziran 2010;8(6):423–35.
92. Jacob F, Perrin D, Sanchez C, Monod J. [Operon: a group of genes with the expression coordinated by an operator]. *Comptes Rendus Hebd Séances Académie Sci.* 29 Şubat 1960;250:1727–9.
93. Chhabra DN. Lac operon On [Internet]. *Biochemistry for Medics - Lecture Notes.* 2013 [kaynak 08 Haziran 2016]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.namrata.co/lac-operon-regulation-of-gene-expression-in-prokaryotes/lac-operon-on/>

94. Eron L, Block R. Mechanism of Initiation of Repression of In Vitro Transcription of the Lac Operon of Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A. Ağustos 1971;68(8):1828–32.
95. Hansen LH, Knudsen S, Sørensen SJ. The Effect of the lacY Gene on the Induction of IPTG Inducible Promoters, Studied in Escherichia coli and Pseudomonas fluorescens. Curr Microbiol. 01 Haziran 1998;36(6):341–7.
96. Miller JH, Klenk H-D, Rott R, Scott JR, Norrild B, Becht H, vd. Genetic analysis of the lac repressor. Berlin; New York: Springer-Verlag; 1980.
97. Jacob F, Monod J. On the Regulation of Gene Activity. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 01 Ocak 1961;26:193–211.
98. Siegelman HW, Wieczorek GA, Turner BC. Preparation of calcium phosphate for protein chromatography. Anal Biochem. 01 Aralık 1965;13(3):402–4.
99. Milne JJ. Scale-up of protein purification: downstream processing issues. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2011;681:73–85.
100. Hoffmann A, Roeder RG. Purification of his-tagged proteins in non-denaturing conditions suggests a convenient method for protein interaction studies. Nucleic Acids Res. 25 Kasım 1991;19(22):6337–8.
101. Bornhorst JA, Falke JJ. [16] Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. Methods Enzymol. 2000;326:245–54.
102. Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Séraphin B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. Nat Biotechnol. Ekim 1999;17(10):1030–2.
103. Harris EL, Angal S. Protein purification applications : a practical approach /. 1990.
104. Cuatrecasas P. Cuatrecasas, P.: Protein purification by affinity chromatography. Derivatization of agarose and Polyacrylamide beads. J. biol. Chem. 245, 3059-3065. J Biol Chem. 1970;245(12):3059–65.
105. Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. Nature. 18 Aralık 1975;258(5536):598–9.
106. Abbas & Lichtman & Pillai. Cellular and Molecular Immunology: with STUDENT CONSULT Online Access, 7e. 7 edition. Philadelphia: Saunders; 2011. 560 s.
107. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. Elsevier Health Sciences; 2012. 342 s.
108. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. Cell.ubat 2006;124(4):783–801.

109. Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Antigen recognition by T cells. 2001 [kaynak 05 Ocak 2016]; Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27098/>
110. Sirskyj D, Diaz-Mitoma F, Golshani A, Kumar A, Azizi A. Innovative bioinformatic approaches for developing peptide-based vaccines against hypervariable viruses. *Immunol Cell Biol.* Ocak 2011;89(1):81–9.
111. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and Function of Immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* Şubat 2010;125(2 0 2):S41–52.
112. biochemistryquestions. Immunoglobulins: structure and functions. [Internet]. The Biochemistry Questions Site. [kaynak 05 Ocak 2016]. Tarihinde adresinden erişildi: <https://biochemistryquestions.wordpress.com/2009/05/26/immunoglobulins-structure-and-functions/>
113. Graziani M, Merlini G, Petrini C, IFCC Committee on Plasma Proteins, SIBioC Study Group on Proteins. Guidelines for the analysis of Bence Jones protein. *Clin Chem Lab Med.* Mart 2003;41(3):338–46.
114. Bilgen GF. NoTBuDuRRR [Internet]. [kaynak 08 Haziran 2016]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://notbudur.blogspot.com/2015/06/immunoloji-bagsklk-immun-sistemin.html>
115. Fischer DS. Theories of Antibody Formation: A Review. *Yale J Biol Med.* Ağustos 1964;37(1):1–30.
116. Jerne NK. THE NATURAL-SELECTION THEORY OF ANTIBODY FORMATION. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 Kasım 1955;41(11):849–57.
117. AIDS&Immunity [Internet]. [kaynak 08 Haziran 2016]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://course1.winona.edu/kbates/aids&immunity.htm>
118. Dudley DD, Chaudhuri J, Bassing CH, Alt FW. Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv Immunol.* 2005;86:43–112.
119. Li A, Rue M, Zhou J, Wang H, Goldwasser MA, Neuberg D, vd. Utilization of Ig heavy chain variable, diversity, and joining gene segments in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia: implications for the mechanisms of VDJ recombination and for pathogenesis. *Blood.* 15 Haziran 2004;103(12):4602–9.
120. Yelton DE, Scharff MD. Monoclonal antibodies. *Am Sci.* Ekim 1980;68(5):510–6.
121. V(D)J rekombinasyonu. İçinde: Vikipedi [Internet]. 2016 [kaynak 26 Nisan 2016]. Tarihinde adresinden erişildi: [https://tr.wikipedia.org/w/index.php?title=V\(D\)J_rekombinasyonu&oldid=16692228](https://tr.wikipedia.org/w/index.php?title=V(D)J_rekombinasyonu&oldid=16692228)

122. Wright K. Antibodies a laboratory manual: By E Harlow and D Lane. pp 726. Cold Spring Harbor Laboratory. 1988. \$50 ISBN 0-87969-314-2. Biochem Educ. 01 Ekim 1989;17(4):220–220.
123. Salfeld JG. Isotype selection in antibody engineering. Nat Biotechnol. Aralık 2007;25(12):1369–72.
124. Stavnezer J, Amemiya CT. Evolution of isotype switching. Semin Immunol. Ağustos 2004;16(4):257–75.
125. Inc D. Antikor sınıflandırma [Internet]. Depositphotos. [kaynak 08 Haziran 2016]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://tr.depositphotos.com/42786051/stock-illustration-antibody-classification.html>
126. Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd. - Therapeutic Antibodies - Preparation of therapeutic antibody [Internet]. [kaynak 25 Aralık 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: http://www.kyowa-kirin.co.jp/antibody/english/about_antibody/production.html
127. Leenaars M, Hendriksen CFM. Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations. ILAR J. 01 Ocak 2005;46(3):269–79.
128. Kurpisz M, Gupta SK, Fulgham DL, Alexander NJ. Production of large amounts of mouse polyclonal antisera. J Immunol Methods. 09 Aralık 1988;115(2):195–8.
129. Müjgan;DİKER I. Monoklonal Antikorlar. Ank Üniversitesi Vet Fakültesi Derg. 1984;31(1):1.
130. duyuru_171_6.pdf [Internet]. [kaynak 09 Haziran 2016]. Tarihinde adresinden erişildi: http://sagbil.kocaeli.edu.tr/dosyalar/duyuru_171_6.pdf
131. Schroff RW, Foon KA, Beatty SM, Oldham RK, Morgan AC. Human Anti-Murine Immunoglobulin Responses in Patients Receiving Monoclonal Antibody Therapy. Cancer Res. 02 Ocak 1985;45(2):879–85.
132. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. Proc Natl Acad Sci U S A. Kasım 1984;81(21):6851–5.
133. Chadd HE, Chamow SM. Therapeutic antibody expression technology. Curr Opin Biotechnol. 01 Nisan 2001;12(2):188–94.
134. Recombinant Antibodies for Immunotherapy [Internet]. Cambridge University Press. [kaynak 09 Haziran 2016]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.cambridge.org/us/academic/subjects/life-sciences/biotechnology/recombinant-antibodies-immunotherapy?format=HB>
135. Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. Nature. 24 Mart 1988;332(6162):323–7.

136. Padlan EA. A possible procedure for reducing the immunogenicity of antibody variable domains while preserving their ligand-binding properties. *Mol Immunol*. 01 Nisan 1991;28(4):489–98.
137. Complementarity determining region. İçinde: Wikipedia, the free encyclopedia [Internet]. 2016 [kaynak 09 Haziran 2016]. Tarihinde adresinden erişildi: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Complementarity_determining_region&ol=1 did=718049956
138. Saldanha JW. Humanization of Recombinant Antibodies. İçinde: *Recombinant Antibodies for Immunotherapy* [Internet]. Cambridge University Press; 2009. Tarihinde adresinden erişildi: <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9780511596773.004>
139. Kretzschmar T, von Rüden T. Antibody discovery: phage display. *Curr Opin Biotechnol*. Aralık 2002;13(6):598–602.
140. Hoogenboom HR, Chames P. Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunol Today*. Ağustos 2000;21(8):371–8.
141. Lonberg N. Fully human antibodies from transgenic mouse and phage display platforms. *Curr Opin Immunol*. Ağustos 2008;20(4):450–9.
142. Kellermann SA, Green LL. Antibody discovery: the use of transgenic mice to generate human monoclonal antibodies for therapeutics. *Curr Opin Biotechnol*. Aralık 2002;13(6):593–7.
143. PEPTİT VE PROTEİN YAPIDA BİYOTEKNOLOJİ ÜRÜNÜ İLAÇLAR [Internet]. [kaynak 09 Haziran 2016]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://docplayer.biz.tr/1426372-Peplit-ve-protein-yapida-biyoteknoloji-urunu-ilaclar.html>
144. Melton DW, Konecki DS, Brennan J, Caskey CT. Structure, expression, and mutation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nisan 1984;81(7):2147–51.
145. Prof.Dr. Filiz AKŞİT, Prof.Dr. Yurdanur AKGÜN, Prof.Dr. Nuri KİRAZ. Genel Mikrobiyoloji Ve İmmünoloji. Anadolu Üniversitesi; 289 s.
146. Jennings VM. Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production. *ILAR J*. 01 Ocak 1995;37(3):119–25.
147. Leenaars PP, Hendriksen CF, de Leeuw WA, Carat F, Delahaut P, Fischer R, vd. The Production of Polyclonal Antibodies in Laboratory Animals. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 35. *Altern Lab Anim ATLA*. Şubat 1999;27(1):79–102.
148. Antibodies C on M of PM, Research I for LA, Council NR. Monoclonal Antibody Production. National Academies Press; 1999. 74 s.

149. A.M. Campbell. Monoclonal Antibody Technology: The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas | 978-0-444-80592-8 | Elsevier [Internet]. [kaynak 25 Aralık 2015]. Tarihinde adresinden erişildi: <https://www.elsevier.com/books/monoclonal-antibody-technology-the-production-and-characterization-of-rodent-and-human-hybridomas/campbell/978-0-444-80592-8>
150. Angelika Lueking MH. Protein Microarrays for Gene Expression and Antibody Screening. *Anal Biochem.* 1999;270(1):103–11.
151. D Overkamp SM-A. Production of Polyclonal Antibodies in Ascitic Fluid of Mice: Technique and Applications. *J Immunoassay.* 1988;9(1):51–68.
152. Galfrè G, Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol.* 1981;73(Pt B):3–46.
153. Köhler G, Milstein C. Pillars Article: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256 (5517): 495–497. *J Immunol.* 03 Ocak 2005;174(5):2453–5.
154. Pontecorvo G. Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. *Somatic Cell Genet.* Ekim 1975;1(4):397–400.
155. HYBRIDOMA TECHNOLOGY FOR PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES - Google'da Ara [Internet]. [kaynak 09 Haziran 2016]. Tarihinde adresinden erişildi: <https://www.google.com.tr/search?q=HYBRIDOMA+TECHNOLOGY+FOR+PRODUCTION+OF++MONOCLONAL+ANTIBODIES&biw=1280&bih=587&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=0ahUKEwjgt7a04prNAhVHOBQKHSdxAjYQsAQILA&dpr=1#imgrc=dRXVXX4e2LwH6M%3A>
156. Antczak DF. Monoclonal antibodies: technology and potential use. *J Am Vet Med Assoc.* 15 Kasım 1982;181(10):1005–10.
157. Schröder J. Monoclonal antibodies: a new tool for research and immunodiagnostics. *Med Biol.* Haziran 1980;58(3):140–8.
158. Zhu C, Lee V, Finn A, Senger K, Zarrin AA, Du Pasquier L, vd. Origin of Immunoglobulin Isotype Switching. *Curr Biol.* 22 Mayıs 2012;22(10):872–80.
159. Milstein C. Monoclonal antibodies. *Sci Am.* Ekim 1980;243(4):66–74.
160. Tsukamoto H, Nagasawa K, Ueda Y, Mayumi T, Furugo I, Tsuru T, vd. Effects of cell differentiation on the synthesis of the third and fourth component of complement (C3, C4) by the human monocytic cell line U937. *Immunology.* Aralık 1992;77(4):621–3.
161. Waugh DS. Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol.* 01 Haziran 2005;23(6):316–20.

162. Arnau J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif.* Temmuz 2006;48(1):1–13.
163. Zhao X, Li G, Liang S, Zhao X, Li G, Liang S. Several Affinity Tags Commonly Used in Chromatographic Purification, Several Affinity Tags Commonly Used in Chromatographic Purification. *J Anal Methods Chem J Anal Methods Chem.* 29 Aralık 2013;2013, 2013:e581093.
164. Lichty JJ, Malecki JL, Agnew HD, Michelson-Horowitz DJ, Tan S. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expr Purif.* Mayıs 2005;41(1):98–105.
165. Harper S, Speicher DW. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2011;681:259–80.
166. Wang C, Castro AF, Wilkes DM, Altenberg GA. Expression and purification of the first nucleotide-binding domain and linker region of human multidrug resistance gene product: comparison of fusions to glutathione S-transferase, thioredoxin and maltose-binding protein. *Biochem J.* 15 Şubat 1999;338 (Pt 1):77–81.
167. Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* 15 Temmuz 1988;67(1):31–40.
168. Cho MS, Yee H, Chan S. Establishment of a human somatic hybrid cell line for recombinant protein production. *J Biomed Sci.* Aralık 2002;9(6 Pt 2):631–8.
169. Maggon K. Monoclonal antibody “gold rush”. *Curr Med Chem.* 2007;14(18):1978–87.
170. Liu JKH. The history of monoclonal antibody development – Progress, remaining challenges and future innovations. *Ann Med Surg.* Aralık 2014;3(4):113–6.
171. Marks LV. *The Lock and Key of Medicine: Monoclonal Antibodies and the Transformation of Healthcare.* Yale University Press; 2015. 345 s.
172. Lázaro I, Ferré R, Plana N, Aragonès G, Girona J, Merino J, vd. Lifestyle Changes Lower FABP4 Plasma Concentration in Patients With Cardiovascular Risk. *Rev Esp Cardiol Engl Ed.* Şubat 2012;65(2):152–7.
173. Aragonès G, Ferré R, Lázaro I, Cabré A, Plana N, Merino J, vd. Fatty acid-binding protein 4 is associated with endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis.* 01 Kasım 2010;213(1):329–31.
174. Download plasmid map of pET28a [Internet]. [kaynak 09 Haziran 2016]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.biovisualtech.com/bvplasmid/pET28a.htm>
175. Skoog L, Tani E. Immunocytochemistry: an indispensable technique in routine cytology. *Cytopathol Off J Br Soc Clin Cytol.* Ağustos 2011;22(4):215–29.

176. Virok D, Loboda A, Kari L, Nebozhyn M, Chang C, Nichols C, vd. Infection of U937 Monocytic Cells with Chlamydia pneumoniae Induces Extensive Changes in Host Cell Gene Expression. *J Infect Dis.* 11 Ocak 2003;188(9):1310–21.
177. Chicca A, Marazzi J, Nicolussi S, Gertsch J. Evidence for bidirectional endocannabinoid transport across cell membranes. *J Biol Chem.* 05 Ekim 2012;287(41):34660–82.
178. Transcript: FABP4-001 (ENST00000256104) - cDNA sequence - Homo sapiens - Ensembl genome browser 84 [Internet]. [kaynak 09 Haziran 2016]. Tarihinde adresinden erişildi: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000170323;r=8:81478419-81483263;t=ENST00000256104
179. FABP4 - Fatty acid-binding protein, adipocyte - Homo sapiens (Human) - FABP4 gene & protein [Internet]. [kaynak 09 Haziran 2016]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://www.uniprot.org/uniprot/P15090>
180. EMBOSS: antigenic [Internet]. [kaynak 09 Haziran 2016]. Tarihinde adresinden erişildi: <http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/antigenic>
181. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, vd. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest.* Ocak 1999;103(2):253–9.
182. Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, vd. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science.* 01 Haziran 2001;292(5522):1728–31.
183. Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee J, vd. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest.* Ağustos 2001;108(3):437–46.
184. Chen L, Chen R, Wang H, Liang F, Chen L, Chen R, vd. Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance, Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance. *Int J Endocrinol Int J Endocrinol.* 28 Mayıs 2015;2015, 2015:e508409.
185. Cao H, Sekiya M, Erikci M, Burak MF, Mayers JR, White A, vd. Adipocyte lipid chaperone aP2 is a secreted adipokine regulating hepatic glucose production. *Cell Metab.* 07 Mayıs 2013;17(5):768–78.
186. Tuncman G, Erbay E, Hom X, De Vivo I, Campos H, Rimm EB, vd. A genetic variant at the fatty acid-binding protein aP2 locus reduces the risk for hypertriglyceridemia, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 02 Mayıs 2006;103(18):6970–5.
187. Kaneto H, Nakatani Y, Miyatsuka T, Kawamori D, Matsuoka T, Matsuhisa M, vd. Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nat Med.* Ekim 2004;10(10):1128–32.

188. Liu G, Rondinone CM. JNK: bridging the insulin signaling and inflammatory pathway. *Curr Opin Investig Drugs Lond Engl* 2000. Ekim 2005;6(10):979–87.
189. Waeber G, Delplanque J, Bonny C, Mooser V, Steinmann M, Widmann C, vd. The gene MAPK8IP1, encoding islet-brain-1, is a candidate for type 2 diabetes. *Nat Genet. Mart* 2000;24(3):291–5.
190. Li LO, Klett EL, Coleman RA. Acyl-CoA synthesis, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta. Mart* 2010;1801(3):246–51.
191. Tso AWK, Xu A, Sham PC, Wat NMS, Wang Y, Fong CHY, vd. Serum adipocyte fatty acid binding protein as a new biomarker predicting the development of type 2 diabetes: a 10-year prospective study in a Chinese cohort. *Diabetes Care. Ekim* 2007;30(10):2667–72.
192. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, vd. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of I κ B β . *Science. 31 Ağustos* 2001;293(5535):1673–7.
193. Hundal RS, Petersen KF, Mayerson AB, Randhawa PS, Inzucchi S, Shoelson SE, vd. Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J Clin Invest. Mayıs* 2002;109(10):1321–6.
194. Gao Z, Zuberi A, Quon MJ, Dong Z, Ye J. Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. *J Biol Chem. 04 Temmuz* 2003;278(27):24944–50.
195. Aouadi M, Tencerova M, Vangala P, Yawee JC, Nicoloso SM, Amano SU, vd. Gene silencing in adipose tissue macrophages regulates whole-body metabolism in obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A. 14 Mayıs* 2013;110(20):8278–83.
196. Bernlohr DA, Coe NR, Simpson MA, Hertzler AV. Regulation of gene expression in adipose cells by polyunsaturated fatty acids. *Adv Exp Med Biol. 1997*;422:145–56.
197. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, vd. PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med. Mayıs* 2013;19(5):557–66.
198. Kliewer SA, Xu HE, Lambert MH, Willson TM. Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology. *Recent Prog Horm Res. 2001*;56:239–63.
199. Hu W, Zhou X, Jiang M, Duan Y, Chen Y, Li X, vd. Statins synergize dexamethasone-induced adipocyte fatty acid binding protein expression in macrophages. *Atherosclerosis. Haziran* 2012;222(2):434–43.
200. Chen J, Ma L, Huang L, Xie C, Pei H, He L, vd. Discovery of a Potent 9-Deazaxanthine-based Agent for the Treatment of Obesity-Related Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Chem Biol Drug Des. 01 Temmuz* 2015;86(1):66–79.

201. Pei H, Xie C, Liu Y, Shao M, Chen J, Li D, vd. Therapeutic potential of a synthetic FABP4 inhibitor 8g on atherosclerosis in ApoE-deficient mice: the inhibition of lipid accumulation and inflammation. RSC Adv [Internet]. 11 Mayıs 2016 [kaynak 25 Mayıs 2016]; Tarihinde adresinden erişildi: <http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/ra/c6ra05637g>
202. Burak MF, Inouye KE, White A, Lee A, Tuncman G, Calay ES, vd. Development of a therapeutic monoclonal antibody that targets secreted fatty acid-binding protein aP2 to treat type 2 diabetes. Sci Transl Med. 23 Aralık 2015;7(319):319ra205-319ra205.



8. EKLER

EK-1: Etik Kurul Formu



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ :06/03/2013
TOPLANTI NO :2013-6
DOSYA NO :2013-33
KARAR NO :2013-6-42

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr.Erkan Yılmaz'ın yaptığı ve araştırmacı olarak Uzm.Biyolog Afsar Abbasi Tagidizaj, Araş.Gör.Gülizar Aydoğdu ve Ahmet Alperen Tuncer'in katıldığı, "Yağ asiti Bağlanma Proteini 4 (FABP4/aP2)'e Karşı Poliklonal ve Monoklonal Antikorlar geliştirmesi" başlıklı araştırma projesinin içeriği kurulumuzca incelenmiş olup, söz konusu çalışmanın Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliğiyle karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Fare
Hayvan Sayısı : 3
Geçerlilik Süresi : 01/07/2013 - 01/07/2014

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof.Dr.Oğuz SARİMEHMETOĞLU (Başkan)	Parazitoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof.Dr.Eyüp Sabri AKARSU (Başkan Vekili)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY (Üye)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Zoooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	

Adres: Ankara Üniversitesi Rektörlüğü 06100 - Tandoğan / ANKARA Tel: 0 (312) 212 60 40 - 50 Faks: 0 (312) 212 60 49

Yrd.Doç.Dr.Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Uzm.Vet.Hek.Atilla İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuarı	Tıp Fakültesi	E	
Vet.Hek.Dr.Akife KAYA (Üye)	Referans Veteriner Kliniği	Serbest	K	
Uzm.Vet.Hek.Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Afsar ABBASI TAGHİDİZAJ

Doğum Yeri: Erdebil

Doğum Tarihi: 02.10.1977

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce, Farsca, Azerbaycan Türkçesi

Eğitim Durumu

Lise: Kahramanmaraş Anadolu Lisesi (1992-1999)

Lisans: Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji (1999-2005)

Yüksek Lisans: Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Genetik (2005-2008)

Çukurova Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü Ortaöğretim Öğretmenliği (2005-2007)

İş Tecrübesi

Kurum: BAP 08B333013

Venöz Tromboembolizme Proteomik Yaklaşım

Görevi: Öğrenci Tezi

Yılları: 2008-2010

Kurumu: BAP 13L4143003

Obtaining Polyclonal and monoclonal antibodies against Fatty acid binding protein4(FABP4/aP2), Investigation of the Role of Metabolic Syndrome, 13L4143003.

Görevi: Öğrenci Tezi

Yılları: 2013-2015

Kurumu: TUBİTAK 1150347

Türkiye Orijinli Pestiviral Rekombinant Proteinlere Karşı BVDV Enfeksiyonunun Tanısı Amaçlı Monoklonal Antikor Üretimi

Görevi: Proje Bursiyeri

Yılları: 2015-2016

10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Doktora Öncesi Yayınlar

ABBASI, T.A., Evaluation of the impact on different types of human cancer cell of Lichen secondary compounds. Turk Hij Den Biyol Derg: 2013; 70(4): 215 – 226.

KONGRE-TOPLANTI BİLDİRİLER

Recombinant Protein of Immunogen Sequence of Human ASCT2 and ASCT2 Polyclonal Antibody Production III. Molecular Biology Congress. Sept, 2014.

Ankara Biotechnology Days (poster presentation) Nov 8-10, 2010.

National Biotechnology Congress, Antalya/Turkey, Dec 14-16, 2009.

Ankara Biotechnology Days Nov 13-14, 2008.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Sözlü Bildiriler