T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİSTİK FİBROZİSİN ERKEN TANISINA YÖNELİK IRT2' YE KARŞI MONOKLONAL ANTİKOR ÜRETİLMESİ

TUĞÇE NUR ERALP

YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. BANU MANSUROĞLU

EŞ DANIŞMAN
DOÇ. DR. FATIMA YÜCEL

İSTANBUL, 2016

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİSTİK FİBROZİSİN ERKEN TANISINA YÖNELİK IRT2' YE KARŞI MONOKLONAL ANTİKOR GELİŞTİRİLMESİ

Tuğçe Nur Eralp tarafından hazırlanan tez çalışması 29.11.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Doç. Dr. Fatıma YÜCEL

TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Sezgin ÇELİK

Yıldız Teknik Üniversitesi

Yard. Doç. Dr. Melike ERSÖZ

İstanbul Bilim Üniversitesi

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

ÖNSÖZ

Kistik Fibrozisin Erken Tanısına Yönelik IRT2' ye Karşı Monoklonal Antikor Geliştirilmesi konu başlıklı yüksek lisans tez yolculuğum süresince engin bilgi ve deneyimi ile bu yolda ilerlememde yardımcı olan danışman hocam Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU' na sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. Prof. Dr. Sezgin ÇELİK' e beni bu yolda desteklediği için büyük şükranlarımı sunuyorum.

Bana bu eşsiz tecrübeyi tanıyan, TÜBİTAK MAM GMBE Tanı Teknolojileri Laboratuvarındaki her anımın bende güzel anılar bırakmasını sağlayan, engin tecrübelerini cömertçe paylaşan, bu meşakkatli yolda güler yüzü, sabrı, ilgisiyle yol gösteren, ufkumu açan, en yoğun anında bile vakit ayıran tez eş danışmanım, Doç. Dr. Fatıma YÜCEL' e yönetim ve ilgilerinden dolayı teşekkürü borç bilirim.

Çalışmalarımda; değerli deneyimlerinden yararlandığım Dr. Esin AKÇAEL'e, Dr. Özlem ERTEKİN'e ve MSc Şerife Şeyda PİRİNÇÇİ' ye teşekkür ederim.

Tüm sevecenliği, nezaketi ile bana deneyimini, bilgi birikimini ve yardımlarını sunan Uzman Teknisyen Harun KOCAAĞA' ya ve Şakir SEKMEN' e çok teşekkür ederim.

Benim bu eşsiz yolda en güzel anılarımın oluşmasını sağlayan MSc İlke SÜDER ile MSc Şeyma ÖZEN' e, Dr. Fatma Betül GÜLOĞLU'na en derin sevgilerimi sunuyorum. Laboratuvarda en sevdiğim MSc Nihan MALERİ' ye, İlham BAHHAR' a, Mustafa DİVYAPICIGİL' e, MSc Bengü ERGENOĞLU' na, destekçim, ablam Şenay DURSUN' a, bitmeyen arkadaşlığımız ve mutluluk kaynaklarım olduğu için Ali İNAN' a, Buse BAHAR'a, Gözde DİNÇ' e, Harbiye HACIBEKTAŞOĞLU' na, Kamer SARAYDAR' a, Kübra AKALIN' a, Mir Aykan AKKAYA' ya, Sinem GÜNERİ' ye, Sinem KADIOĞLU' na, MSc Utku ÖZBEY' e, Zeynep DURDU'ya teşekkür ediyorum.

En büyük teşekkürü bana Biyoloji dersini sevdiren ve desteklerini esirgemeyen lise öğretmenim Yıldırım Beyazıt BOZKURT' a sunuyorum.

Sağladıkları burs imkânı ile yüksek lisans çalısmama büyük katkısı bulunan TÜBİTAK ARDEB' e teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince beni destekleyen biriciğim babanneme, anneciğime, mesafeler uzakta olsa hep gülümseten, destek olan, moral veren ve ufkumu açan babama, canım kardeşlerime gösterdikleri sonsuz özveri, destek, güven, sevgi ve ilgi için çok teşekkür ederim.

Kasım, 2016

Tuğçe Nur Eralp

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ iv

KISALTMA LİSTESİ vii

ŞEKİL LİSTESİ ix

ÇİZELGE LİSTESİ xii

ÖZET xiii

ABSTRACT xiv

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 2
1.3 Hipotez 3

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER 5

2.1 Kistik Fibrozis 5
2.1.1 Sınıf I Mutasyonları 10
2.1.2 Sınıf II Mutasyonları 11
2.1.3 Sınıf III Mutasyonları 12
2.1.4 Sınıf IV Mutasyonları 13
2.1.5 Sınıf V Mutasyonları 13
2.1.6 Sınıf VI Mutasyonları 14
2.2 Kistik Fibrozisin Tanısında IRT ve Diğer Tanı Yöntemleri 14
2.2.1 İmmünoreaktif tripsinojen IRT2 Proteini 16
2.3 Antikor Yapıları 18
2.4 In vitro Antikor Üretimi: Hibridoma Teknolojisi 26

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD 31

3.1 Materyal 31
3.2 Metod 38
3.2.1 Çözeltilerin Hazırlanması 38
3.2.2 Kullanılan Yöntemler.....42

BÖLÜM 4

DENEYSEL SONUÇLAR 54

4.1 İmmünizasyonda Kullanılan IRT2 Antijen Yapısının İncelenmesi 54
4.1.1 Antijen ve Fare Serum Dilüsyonu Optimizasyon Testi 54
4.2 İmmünizasyonlar-Fare ve Tavşan Sonuçları.....56
4.3 Füzyonlar.....63
4.4 Elde Edilen Monoklonal Antikorların Karakterizasyonu.....67
4.5 Elde Edilen Monoklonal Antikorların Saflaştırılması.....69

SONUÇ VE ÖNERİLER 73

KAYNAKLAR.....76

ÖZGEÇMİŞ 83

SİMGE LİSTESİ

Balb/c	Bagg’s Albino
bp	Baz çifti
Da	Dalton
kDa	Kilo Dalton
M	Molar
Mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mmol	milimol
nm	Nanometre
β	Beta
κ	Kappa
µ	Mü
ɣ	Gamma
Λ	Lambda
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
°C	Santigrat Derece

KISALTMA LİSTESİ

ABC	ATP Binding Casette
AP	Alkalen Fosfataz
APC	Antigen Presenting Cell
APS	Amonyum Per Sülfat
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
dH_2O	Distile su
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DTT	DiThioThreitol
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplazmik Retikulum
Fab	Fragment antigen binding (antijen bağlayan bölge)
FBS	Fetal Bovine Serum
Fc	Fragment crystallizable (kristalize olabilen bölge)
GMBE	Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü
H_2O	Su
HAT	Hipoksantin, Aminopterin, Timidin
HCl	Hidroksi klorik asit
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit
HGPRT	Hipoksantin-Guanin Fosforibozil Transferaz
HT	Hipoksantin, Timidin
ICL	Intracellular Loop
IEC	Ion Exchange Chromatography
Ig	İmmunoglobulin
IgA	İmmünoglobulin A
IgD	İmmünoglobulin D
IgE	İmmünoglobulin E
IgG	İmmünoglobulin G
IgM	İmmünoglobulin M
IRT2	Immün Reaktif Tripsinojen- 2
KOH	Potasyum hidroksit
MAM	Marmara Araştırma Merkezi
MHC	Major Histocompatibility Complex
MSD	Membrane Spanning Domain
NaOH	Sodyum Hidroksit
NBD	Nucleotide Binding Domain

NK	Doğal katil hücreler (Natural Killer)
NMD	Nonsense Mediated Decay
OD	Optik Yoğunluk (Optical Density)
PAP	Pancreatitis Associated Protein
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEG	Polietilen glikol
PNNP	Para-Nitrofenilfosfat
PVDF	Poliviniliden florid (Polyvinylidene fluoride)
RD	Regulatory Domain
SDS- PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamit Jel Elektroforezi
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SEC	Size Exclusion Chromatography
TBS	Tris Buffered Saline
TCR	T Hücre Reseptorü
TEMED	Tetrametil etilen diamin
UV	Ultra Viyole

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1 Kistik fibrozisin belirtileri, klinik bulguları ve hastalığın seyrini belirleyen etmenler. 6
Şekil 2. 2 CFTR Klor kanalının moleküler modeli. Doğal tip CFTR proteininin ortogonal hali, kanal yapısı ve ribbon modeli şeklinde gösterimi. 1.membran geçen bölge (MSD1) mavi, 1.nükleotid bağlama domaini (NBD1) açık mavi, 2.membran geçen bölge (MSD2) kırmızı, 2. nükleotid bağlama bölgesi (NBD2) kehribar, düzenleyici bölge (RD) gri, nükleotid bağlama domainin düzenleyici ek kısmı ise yeşille gösterilmiştir. 508. Fenilalanin aminoasiti ve nükleotidlerin NBD dimerlerine bağlanmış hali de yapıda görülmektedir (Karbon: beyaz, Azot: mavi, Oksijen: kırmızı, Fosfor: turuncu) [17]. 8
Şekil 2. 3 CFTR por yapısında ATP konformasyonel değişimleri tetiklemesi. 9
Şekil 2. 4 CFTR sentezi ve fonksiyonuna mutasyonların etkisi [17]. 13
Şekil 2. 5 Kistik fibrozisin ter testiyle başlatılan tanısının devamında izlenen algoritma [56]. 16
Şekil 2. 6 IRT2 lokusu [65]. 17
Şekil 2. 7 IRT yapıları. Sağdaki yapının PDB numarası 3P95, soldaki yapının ise 4WXV' dir [68], [69]. 17
Şekil 2. 8 Immunoglobulinlerin yapısal özellikleri ve glikozilasyon bölgeleri. IgM, IgG, IgD, IgE, IgA1 ve IgA2 yapıları [74]. 19
Şekil 2. 9 Tavşan IgG yapısının kimyasal olarak ya da papain yada pepsinle fragmente edilmesi [75]. 20
Şekil 2. 10 IgG domainlerinin şematik gösterimi. [75]. 21
Şekil 2. 11 IgG yapısının 3 boyutlu modeli.X- Ray krsitalografi ve eleKtron mikroskobisi (a) IgG yapısının basit moleküler yapısı. (b) Domainlerin etkileşimi [75].. 22
Şekil 2. 12 IgA Kristal yapısı [78]. 25
Şekil 2. 13 IgG2a Kristal yapısı [79], [80]. 26
Şekil 2. 14 Monoklonal antikor üretimi ile geleneksel antisera üretiminin karşılaştırması [75]. 27
Şekil 2. 15 Monoklonal antikorların üretiminde kullanılan standart protokol. Hipoksantin (H), Timidin (T), Aminopterin (A), Timidin Kinaz (TK) ile simgelenmektedir [75]. 29
Şekil 3. 1 Füzyondan önce açılan F0 hücreleri (20X). 46
Şekil 3. 2 Laminar akımlı kabinde strafor üzerine sabitlenen Balb/ c fare. 47
Şekil 3. 3 Besleme amaçlı alınan feeder hücrelerin 96' lık plaklara alındıktan sonraki görüntüsü (10X). 47

Şekil 3. 4 Peritonu kesilerek dalağı alınmakta olan bir Balb/c fare.....48
Şekil 3. 5 IRT2 ile immünize edilmiş Balb/C fareden içerisinde steril PBS bulunan steril petriye alınan dalak 48
Şekil 3. 6. Füzyondan 10 gün sonra tespit edilen bir hibrit (10X). 49
Şekil 3. 7 Antikorların saflaştırılması için hazırlanan kromotografi ve kolon düzeneği.....52
Şekil 4. 1 RayBiotech ve PROSPEC IRT2 antijenlerinin reducing %15 SDS-PAGE' de gösterilmesi (1: Thermo Page Ruler Prestained Protein Ladder, 2: 500 ng RayBiotech+ PEFABLOCK , 3: 500 ng RayBiotech, 4: 750 ng PROSPEC, 5: 1500 ng PROSPEC). 55
Şekil 4. 2 RayBiotech ve PROSPEC IRT2 antijenlerinin immunoblotlama ile gösterilmesi (1: Thermo Page Ruler Prestained Protein Ladder, 2: 500 ng RayBiotech+ PEFABLOCK , 3: 500 ng RayBiotech, 4: 750 ng PROSPEC, 5: 1500 ng PROSPEC). 55
Şekil 4. 3 ELISA kaplamalarında kullanılacak antijen miktarının ELISA ile optimizasyonu. 56
Şekil 4. 4 50 µg Prospec IRT2 ile immünize edilen farelerin ELISA sonuçları. Fare immünizasyon serilerinden elde edilen serumların 1:1000 dilüsyonda kontrol edilmiş ELISA sonuçları (1.fare: SaK, 2.fare: SoK, 3.fare: SSK, 4. fare: NK, NI: Hiç immünize edilmemiş fare). 58
Şekil 4. 5 50 µg IRT2 ile immünize edilen farelerin ELISA sonuçları. Fare immünizasyon serilerinden elde edilen serumların 1:1000 dilüsyonda kontrol edilmiş ELISA sonuçları (1.fare: SaK, 2.fare: SoK, 3.fare: SSK, 4. fare: NK, NI: Hiç immünize edilmemiş fare). 58
Şekil 4. 6 50 µg IRT2 ile immünize edilen farelerin ELISA sonuçları. Fare immünizasyon serilerinden elde edilen serumların 1:1000 dilüsyonda kontrol edilmiş ELISA sonuçları (1.fare: SaK, 2.fare: SoK, 3.fare: SSK, 4. fare: NK, 5.fare: SaVK, NI: Hiç immünize edilmemiş fare). 59
Şekil 4. 7 5 µg IRT2 ile immünize edilen farelerin ELISA sonuçları. Fare immünizasyon serilerinden elde edilen serumların 1:1000 dilüsyonda kontrol edilmiş ELISA sonuçları (1.fare: SaK, 2.fare: SoK, 3.fare: SSK, 4. fare: NK, 5.fare: SaVK, NI: Hiç immünize edilmemiş fare). 60
Şekil 4. 8 25 µg IRT2 ile immünize edilen farelerin ELISA sonuçları. Fare immünizasyon serilerinden elde edilen serumların 1:1000 dilüsyonda kontrol edilmiş ELISA sonuçları (1.fare: SaK, 2.fare: SoK, 3.fare: SSK, 4. fare: NK, 5.fare: SaVK, NI: Hiç immünize edilmemiş fare). 60
Şekil 4. 9 50 µg IRT2 ile immünize edilen farelerin ELISA sonuçları. Fare immünizasyon serilerinden elde edilen serumların 1:1000 dilüsyonda kontrol edilmiş ELISA sonuçları (1.fare: SaK, 2.fare: SoK, 3.fare: SSK, 4. fare: NK, NI: Hiç immünize edilmemiş fare). 61
Şekil 4. 10 150 µg RayBiotech IRT2 ile immünize edilen tavşanın serumlarının ELISA sonuçları. Tavşan immünizasyon serilerinden elde edilen serumların 1: 1000 dilüsyonda kullanılmasıyla elde edilmiştir. 63
Şekil 4. 11. .....
5. füzyona alınan SSK faresi ve kafesteki diğer farelerin ELISA sonuçları (1.fare:SoK, 2.fare:SSK, 3.fare: NK, No I: hiç immünize edilmemiş fare; PAb: Poliklonal fare serumu). 65
Şekil 4. 12 5.füzyon sonucu elde edilen antikorların IRT2 antijenine karşı verdiği cevaplar. 66
Şekil 4. 13 3E7, 6E7 ve 6G7' nin İsoStrip ile belirlenen alt tipleri. 69

Şekil 4. 14 Saflaştırması yapılan IgG2a tipi 3E7 ve 6G7 antikorlarının absorbans sonuçları (EB: Elüsyon tamponu). 71
Şekil 4. 15 Elde edilen antikorların ε değerleri. 71

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2. 1 Sık görülen CFTR mutasyonları ve yüzdeleri [31]. 10
Çizelge 3. 1 Genel Laboratuvar Ekipmanları 31
Çizelge 3. 2 Hücre Kültüründe Kullanılan Ekipmanlar 33
Çizelge 3. 2 Hücre Kültüründe Kullanılan Ekipmanlar (devamı) 34
Çizelge 3. 2 Hücre Kültüründe Kullanılan Ekipmanlar (devamı) 35
Çizelge 3. 3 Hücre Kültüründe Kullanılan Canlı Materyaller 35
Çizelge 3. 4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler 35
Çizelge 3. 4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler 36
Çizelge 3. 4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler 37
Çizelge 3. 4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler 38
Çizelge 3. 5 SDS PAGE alt jel içeriği 39
Çizelge 3. 6 SDS PAGE üst jel içeriği 39
Çizelge 3. 6 SDS PAGE üst jel içeriği (devamı) 40
Çizelge 4. 1 IRT2 ile bağışıklanan farelerin immünizasyon bilgileri 57
Çizelge 4. 2 IRT2 antijeni ile bağışıklanan tavşanın immünizasyon bilgileri 62
Çizelge 4. 3 Yapılan füzyonlar hakkında genel bilgiler 64
Çizelge 4. 4 Beşinci füzyon bilgileri 65
Çizelge 4. 5 Elde edilen antikorların çapraz reaksiyonlarının sonuçları 68
Çizelge 4. 6 Elde edilen hücrelerin salgıladığı antikorların izotipleri 69
Çizelge 4. 7 Amonyum Sülfat çöktürme öncesi ve sonrası üst sıvılarla ilgili bilgiler 70

ÖZET

KİSTİK FİBROZİSİN ERKEN TANISINA YÖNELİK IRT2' YE KARŞI MONOKLONAL ANTİKOR GELİŞTİRİLMESİ

Tuğçe Nur ERALP

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU

Eş Danışman: Doç. Dr. Fatıma YÜCEL

Kistik fibrozis otozomal çekinik geçiş gösteren, beyaz ırkta en sık rastlanan genetik hastalıktır. Dünyada prevalansı yaklaşık olarak her 3000 bebekte 1 olarak saptanmıştır. Pankreas, bağırsak, akciğer, ter bezleri ve dış salgı bezleri gibi vücudun birçok önemli sistem ve organını aynı anda etkileyebilen bu rahatsızlıkta, sindirim sistemi ve solunum sistemi kalın ve yapışkan bir mukoza salgısıyla tıkanır. Hastaların yaşam süresinin ortalama 37 sene ile sınırlandığı bu hastalıkta, etkin tedavilerin erken başlatılabilmesi için erken tanının önemi giderek artmaktadır. Yenidoğanda kandaki, İmmunoreaktif Tripsinojen (IRT) düzeyi, normal yenidoğan kanına gore 5 ile10 kat daha fazladır.IRT bir yenidoğan tarama aracıdır ve yenidoğan tarama programlarında ilk incelenmeye başlanan belirteç olmuştur Bu hastalığın erken tanısı Amerika, Yeni Zelanda ve birçok Avrupa ülkesinde yenidoğan tarama programında uygulamadadır. Tarama programlarında, bebeklerin topuk kanından IRT düzeylerine bakılmakta, bazı ülkelerde ise DNA testi ile gen mutasyonu incelenmektedir. Ülkemizde de 2015 yılı itibariyle, T.C. Sağlık Bakanlığı Yenidoğan Ulusal Tarama Programında yenidoğan topuk kanı örneklerinde Kistik Fibrozis hastalığının taranması zorunlu testler arasına alınmış ve IRT analizlerine başlanmıştır. Kistik fibrozisin tanısında kullanılan ELISA temelli tanı kitleri yurt dışından ithal edilmekte ve ülke ekonomisine büyük külfet oluşturmaktadır. Bu sorunları aşmak amacıyla konu ile ilgili ülkemizde yapılan çalışmalar da oldukça yetersizdir. Bu nedenle tümüyle yurt dışından satın alınan, yılda yaklaşık 1 270 000 yeni doğan bebek için

yapılacak ve tekrar testleriyle birlikte yaklaşık 2 000 000 adete ulaşacak olan IRT test kiti ihtiyacı ülkemiz için çok önemlidir.

Bu tez çalışmasında Kistik fibrozisin tanısına yönelik geliştirilmesi planlanan yerli ELISA kitlerinde kullanılmak üzere IRT2' ye karşı monoklonal ve poliklonal antikorlar üretildi.Bu amaçla, ticari olarak temin edilen IRT2 antijeni ile 6-8 haftalık BALB/c türü fareler immünize edildi. Hibridoma teknolojisi kullanılarak güçlü antikor yanıtı alınan fareler ile 7 ayrı füzyon çalışmaları gerçekleştirildi. Füzyonlarda, B lenfosit kaynağı olarak dalak organı kullanıldı. Dalak hücreleri ile fare myeloma hücreleri, polietilen glikol varlığında birleştirildi. Füzyon çalışmaları sonucunda 3 adet klonun ürettiği antikorun IRT2 antijeni ile özgün reaksiyon verdiği dolaylı ELISA yöntemi ile belirlendi.

Sonuç olarak; elde ettiğimiz bu monoklonal antikorlar kullanılarak yenidoğan kanlarında IRT2 nin tespiti için hızlı, basit, güvenilir ve hassas sistemler olan ELISA tanı sistemlerinin geliştirilmesi mümkün olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Hibridoma teknolojisi, IRT2 antijeni, Kistik Fibrozis, Monoklonal antikor, Tanı kitleri

ABSTRACT

MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION AGAINST IRT2 FOR CYSTIC FIBROSIS EARLY DIAGNOSIS

Tuğçe Nur ERALP

Deparment of Molecular Biology and Genetics

MSc Thesis

Adviser: Assoc.Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Co-Adviser: Assoc.Prof. Dr. Fatıma YÜCEL

Cystic fibrosis is an autosomal recessive genetic disease and has an incidence rate of one in 3.000 infants in worldwide. Cystic fibrosis affects multiple systems and organs simultaneously; including lungs, pancreas, bowls, sweat glands and external glands where in lungs and digestive system, causes obstruction with a viscous mucosal secretion. Most life threatining part of the disease is malnutrition. Cystic fibrosis affects multiple systems and organs simultaneously; including lungs, pancreas, bowls, sweat glands and external glands where in lungs and digestive system, causes obstruction with a viscous mucosal secretion.Disease's survival to a median predicted age of ~37 years for children born with cystic fibrosis today. It is important to early detection of disease for start in effective treatment strategy. In recent years, cystic fibrosis was included in the neonatal screening programs in many countries such as USA, New Zealand and any other European countries. In these screening programs, immun reactive trypsinogen levels are tested from the heel bleedings of the newborns, in the other hand some countries screen genetic mutation analysis. In our country, after 2015, there is no cystic fibrosis diagnosis test. Since 2015, Health Ministry of Turkish Republic included cystic fibrosis tests to the obligatory National Neonatal Screening Program, and heel bleedings of the newborn were tested for IRT levels. But, neonatal cystic fibrosis scrrening tests are imported and this is an economical inconvenience for our country. There is no sufficient labor in the diagnosis technology area. Therefore, a need around 2.000.000 IRT test kits in order to test

approximately 1270 000 babies per year with replicas, poses a great importance for our country.
With this purpose, commercially obtained IRT2 antigen is used for immunisation of 6-8 weeks old BALB/c mice in the experiments. By using hybridoma technology, seven fusion studies were carried out with the high immune response giving mice. The spleen was used as a lymphocyte source in the fusion studies. Spleen and myeloma cells were fused in the presence of polyethylenglycol. As a result of fusion, 3 positive hybrid clones were obtained and produced spesific monoclonal antibody against IRT2 by indirect ELISA.
In conclusion, using this monoclonal antibody it will be possible to develope quick, easy and cheap ELISA diagnostic systems to detect the IRT 2 in newborn bloots.
According to this, the aim of this thesis study as a first time in our country is to produce monoclonal and polyclonal antibody against IRT2 antigen. Using the hybridoma technology process, we obtained original and high affinity monoclonal and polyuclonal antibodies. Antibodies were purified and characterized.

Keywords: Hybridoma technology, IRT2 antigen,Cystic fibrosis , Monoclonal antibody, Diagnosis kit.

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

İlk kez 1938 yılında çocuk doktoru Dorothy H. Andersen tarafından tanımlanıp ve "pankreasın kistik fibrozisi" olarak bilinen "mukovisidozis" hastalığı, Kafkas ırkında en sık görülen genetik hastalıktır. Otozomal çekinik olarak kalıtılıp, solunum sistemi ve sindirim sistemiyle beraber salgı bezlerinde de etkisi görülen, en yaygın ölümcül kalıtsal hastalıklardandır. Dünyada ve ülkemizdeki sıklığı 3000 kişide bir olarak belirtilmektedir [1], [2].

Akraba evliliğinin halen sık olduğu ülkemizde sıkça görülen kistik fibrozis, ilerleyen dönemde vücudun birden çok sistem ve organını aynı anda etkilemektedir. Kistik fibroziste sodyum emilimi arttığından dolayı klor absorpsiyonu hücrede bozulur. Hava yolu yüzeyinde oluşan dehidratasyon, sillerin fonksiyonuna da etki ederek bozar ve solunum sisteminde de mukus birikmesine sebep olur. İleri aşamada kronik bakteriyel enfeksiyon başlar. Ölümün en yaygın sebebi, tekrarlayan akciğer enfeksiyonlarıdır [3], [4]. Bağırsaklarda, pankreasta ve safra yollarında tutulum olur; bu sebeple dengesiz beslenme belirtileri ortaya çıkar. Klor salınımındaki bozulma sonucunda birçok bağırsak hastalığı oluşur [5]. Hastaların böbrekleri de bu rahatsızlıktan etkilenir. Kistik fibrozis hastalarında metabolik alkaloz çizelgesine rastlanmakla beraber, idrar konsantrasyonunda da iyon dengesizliğine bağlı olarak bozukluklar gözlenir [6]. Hastalarda yaşam sağlığını etkileyen diğer bir önemli belirteçse pankreatik kanallarda oluşan tıkanmadır. Koyu ve yapışkan mukusun kanalları tıkamasıyla pankreasın sindirim enzimlerinde yetersizlik meydana gelir. Pankreas kanallarında biriken salgılar kanallarda gerilemeye ve ekzokrin salgı yapan pankreas dokusunun fibrozisine neden

olur. Pankreatit gelişimi ardından, Langerhans adacıklarındaki hücrelerde meydana gelen kayıp endokrin insülin salgısının azalmasına ve ileriki zamanlarda insülin direnci ve diyabete sebep olur [7].

Kistik fibrozisli hastaların tanısı için sıklıkla kullanılan üç yöntem mevcuttur. Yenidoğan tarama testi çok pahalı olmamakla beraber, yenidoğan bebeklerin topuk kanları örneğinden immunreaktif tripsinojenin (IRT) analizini temel alır. Kistik fibrozisli yenidoğanlarda IRT miktarları yüksek olmakla beraber, bebeklerde birkaç hafta içerisinde bu değer düşme gösterebilir, hatta normale dönebilir. Bu nedenle tarama özgünlüğünün artırılması amacıyla IRT yüksekliği saptanan bebeklerde ikinci bir IRT taraması veya kistik fibrozis gen mutasyonu analizi yapılır. Her iki geninde de mutasyon saptanan yenidoğanlara hastalığın tanısı konur. Bazı durumlarda ter testi ile sonucun doğrulaması da istenebilir ve ardından ter testi yapılır. Bu gende tek mutasyon taşıyan hastalarda ise ter testi sonucuna göre taşıyıcı bireyler ve hasta bireylerin ayrımı gerçekleştirilir [8- 10].

Son 30 yılda birçok ülkede kistik fibrozis hastalığının tanısı yenidoğan tarama testleri arasına alınmıştır. Ülkemizde ise kistik fibrozisin erken tanısı, Sağlık Bakanlığının katkısıyla ve hastalığın ciddiyetinden dolayı 2015' ten itibaren yenidoğan tarama programının zorunlu testleri arasına alınmıştır. 2015'te Türk Halk Sağlığı Kurumu ,Ulusal Yenidoğan Tarama Programı teknik şartnamesinde TSH (Tiroid Uyarıcı Hormon), fenilketonüri ve biotinidaz ile birlikte kistik fibrozis hastalığıda taranması şartı yer almıştır [11].

Kistik fibrozisli hastaların kanından IRT miktarı saptaması ELISA temelli sistemler aracılığıyla yapılmaktadır. Monoklonal veya poliklonal antikor kullanımına dayalı ELISA testleri daha fazla kan örneğinin test edilmesine olanak vermektedir ve diğer birçok teste göre daha güvenilir sonuçlar vermektedir. Bu nedenle artık hemen her laboratuvarda rutin uygulanan bir yöntem halindedir [12].

1.2 Tezin Amacı

Kistik fibrozis gibi genetik hastalıklarda etkin tedavilerin erken başlatılabilmesi için erken tanının önemi giderek artmaktadır. Bu hastalığın tanısı Amerika, Yeni Zelanda ve birçok Avrupa ülkesinde yenidoğan tarama programında uygulamadadır. Tarama programında bebeklerin topuk kanından IRT düzeyleri, bazı ülkelerde ise DNA testi ile

gen mutasyonu incelenmektedir. Ülkemizde 2014 yılı ve öncesinde yeni doğan tarama programında yer almayan kistik fibrozis tanı testi, 2015 yılı itibariyle T.C. Sağlık Bakanlığı Yenidoğan Ulusal Tarama Programında zorunlu testler arasına eklenmiştir. Yenidoğan topuk kanı örneklerinde hastalığın taraması için IRT analizlerine başlanmıştır. Kistik fibrozisin tanısında kullanılmak üzere geliştirilen tanı kitleri yurt dışından ithal edilmekte ve ülke ekonomisine büyük külfet oluşturmaktadır. Bu sorunları aşmak amacıyla konu ile ilgili ülkemizde yapılan çalışmalar da oldukça yetersizdir. Bu nedenle tümüyle yurt dışından satın alınan, yılda yaklaşık 1 270 000 yeni doğan bebek için yapılacak ve tekrar testleriyle birlikte yaklaşık 2 000 000 adete ulaşacak olan IRT ELISA test kiti ihtiyacı ülkemiz için çok önemlidir. Tezde kistik fibrozisin erken tanısı için ELISA temelli serolojik testlerde kullanılmak üzere monoklonal ve poliklonal anti- IRT2 antikorlarının geliştirilmesi ve karakterize edilmesi amaçlanmıştır. İlgili test sistemlerinin geliştirilmesine yönelik tez sonuçları uygulamaya aktarıldıkça, bir yandan dışa bağımlılık azalacak, diğer yandan ilgili pazarda rekabete bağlı olarak maliyetlerin düşmesi söz konusu olabilecek ve bu çerçevedeki proje sonuçlarından kaynaklanan ürünlerin ihraç edilebilmeleri de mümkün olabilecektir.

1.3 Hipotez

Bu çalışma sonucunda; kistik fibrozisin tanısı için üretilen monoklonal ve polikonal anti- IRT2 antikorlarının serolojik yöntemler arasında en basit ve yaygın tipi olan ELISA sistemlerinde uygulanabilirliğinin ölçümü ve spesifikliğin belirlenmesi için monoklonal antikorların elde edilmesi sağlanacaktır. Buna göre bu çalışma içinde hedefe ulaşabilmek için;

- Hibridoma çalışmalarında antijen olarak uygulanması amacıyla çeşitli IRT2 antijenlerinin kullanımı ve karakterizasyonu,
- Literatürde antikor üretiminde rutin olarak kullanılan 6-8 haftalık Balb/c farelerin immünizasyonlarının periyodik olarak yapılması ve ELISA yöntemi ile immünizasyon kontrollerinin gerçekleştirilmesi,
- Füzyonun en önemli elemanlarından olan F0 myeloma hücrelerinin devamlı kültürünün elde edilmesi,
- Balb/C türü farelerin peritonundan elde edilen makrofaj hücrelerinin ve makrofaj kültür metabolitlerinin hibrid hücrelerinin gelişiminin desteklenmesi amacıyla eldesi ve kullanılması,

- ELISA ile en yüksek immün cevabı verdiği belirlenen farelerden elde edilen dalaktan B hücrelerinin eldesi ve myeloma hücreleri ile füzyonlarının gerçekleştirilmesi,
- Füzyon sonrası hücrelerin seçici besiyerlerinde kültürlerinin yapılarak, monoklonal olarak IRT2 antijenine karşı spesifik yanıtı olan hücrelerin eldesi,
- IRT2 antijenlerine karşı spesifik yanıt veren hücre klonlarının tek düşürülüp monoklonal antikor sentezleyen hücrelerin eldesi, bu hücrelerin büyük ölçekte çoğaltılarak saklanması ve IRT2 antijenine karşı monoklonal antikor üreten hücre hatlarının elde edilmesi,
- IRT2 antijenine karşı monoklonal antikor üreten hücre hatlarının ELISA test sistemleri ile özgünlüğünün kontrol edilmesi ve kültür ortamından saflaştırılması,
- IRT2 antijenine karşı üretilen fare monoklonal ve tavşan poliklonal antikorlarının ileride farklı enzimatik veya kimyasal yapılarla birleştirilmesi, sandviç ELISA sistemi gibi çeşitli tanı sistemlerinde test edilmesi stratejileri tez sürecinde belirlenmiştir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

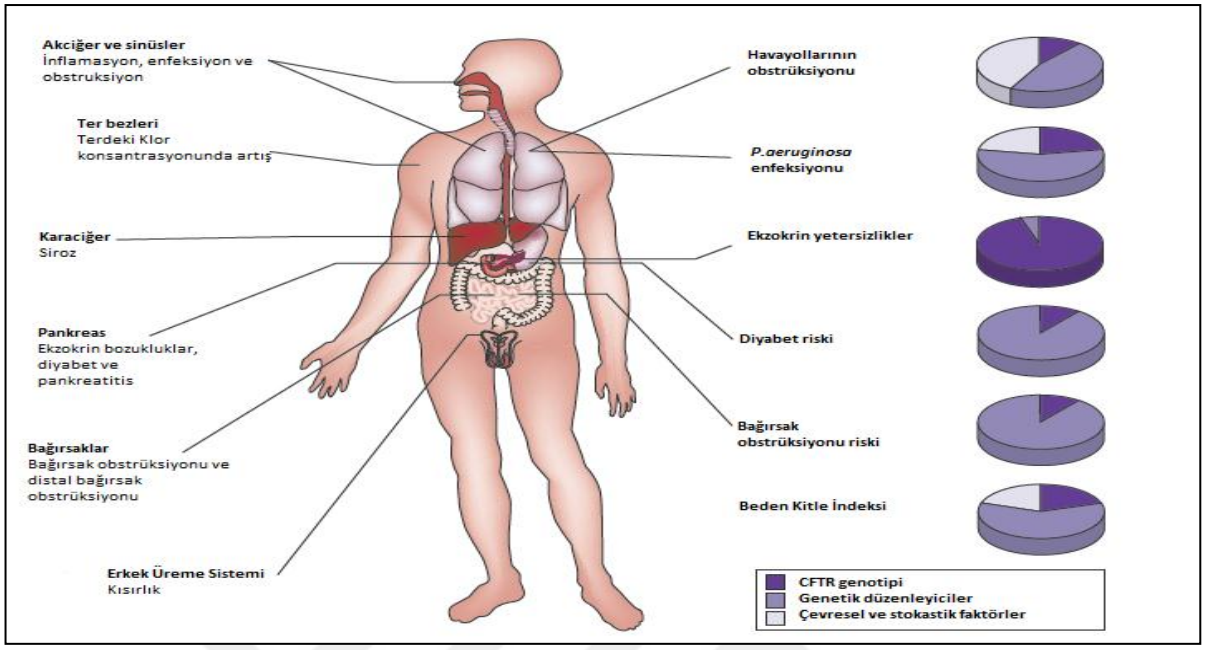
2.1 Kistik Fibrozis

Kistik Fibrozis (OMIM 219700) dünya çapında 70 000 bireye etki eden otozomal resesif bir hastalıktır. Tüm ırklarda görülen bu hastalık en çok Avrupalılarda etkisini göstermektedir. Akciğer ve hava yollarındaki ve pankraes duktusundaki anormal viskoz salgılar kistik fibrozisli hastalarda enflamasyona öncülük etmekte, doku hasarına sebep olmakta ve bu durumda hem organların hem de organ sistemlerinin yıkımına sebep olabilmektedir [13].

Pankreatik enzimlerin dışarıdan sağlanması ve multidisipliner takımların işbirliği sayesinde yeni etkin terapilerin oluşturulabilmesiyle sağkalım yaşı 37' ye kadar çıkabilmiştir [13]. Şekil 2.1' de kistik fibrozisin temel belirtileri ve bu belirtilerine katkıda bulunan genetik belirleyiciler görülmektedir.

Organ sistemlerinin düzgün çalışmasını sağlayan bir durum olan salgı bezlerinin ince ve akışkan sıvısı kistik fibroziste 7.kromozomda bulunan CFTR proteininde meydana gelen mutasyon sonucunda yoğun, yapışkan ve kıvamlı hale gelmektedir. Bu nedenle hastalar enfeksiyona açık hale gelmektedir. Epitelyal dokular içeren ter bezi, safra, bağırsaklar ve erkek üreme sistemi gibi yapılarda hastalıktan etkilenmektedir. Pankreatik ekzokrin fonksiyonunun kaybı, yetersiz beslenme ve zayıf gelişmeye neden olmakta ve bu nedenle tedavi altında olmayan hasta bireyler hayatının ilk yarısında yaşamını yitirebilmektedir. Kistik fibroziste sodyum emilimi arttığından dolayı Klor absorpsiyonu hücrede bozulur. Hava yolu yüzeyinde oluşan dehidratasyon, sillerin fonksiyonuna da etki ederek bozar ve solunum sisteminde de mukus birikmesine sebep

olur. İleri aşamada kronik bakteriyel enfeksiyon başlar. Ölümün en yaygın sebebi, tekrarlayan akciğer enfeksiyonlarıdır [13, 14].



Şekil 2. 1 Kistik fibrozisin belirtileri, klinik bulguları ve hastalığın seyrini belirleyen etmenler

Bağırsaklarda, pankreasta ve safra yollarında tutulum olur; bu sebeple hastada dengesiz beslenme belirtileri ortaya çıkar. Klor salınımındaki bozulma sonucunda da kistik fibrozise ek olarak birçok bağırsak hastalığı oluşur. Hastaların böbrekleri de bu rahatsızlıktan etkilenir. Kistik fibrozis hastalarında metabolik alkaloz tablosuna rastlanmakla beraber, idrar konsantrasyonunda da iyon dengesizliğine bağlı olarak bozukluklar gözlenir [3-6], [14].

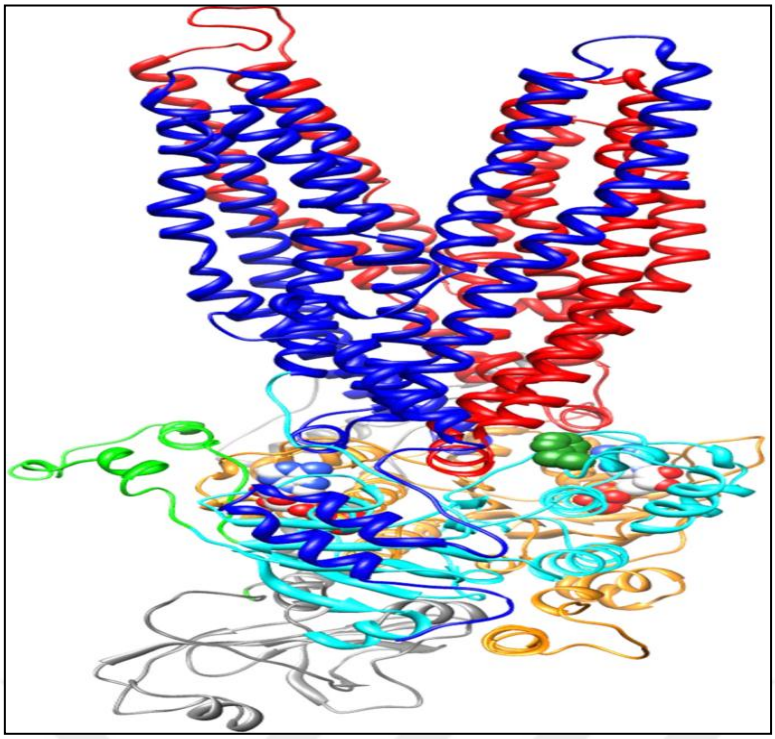
2.1.1 CFTR proteini ve CFTR mutasyonları

Kistik fibrozis vücutta özellikle tübül ve kanal yapılarındaki epitelyal dokuların apikal kısmına (lümenle yüzyüze olan) bakan Klor kanallarının fonksiyonlarındaki bozulma olarak tanımlanır [15]. Bu bozuklukta apikal membranlardaki Klor impermeabilitesi epiteller boyunca sıvı taşınımını engellemekte, epitelyal sıvıların miktarı ve içeriğini değiştirerek organlarda çeşitli defektlere sebebiyet vermektedir. Epitel dokularda meydana gelen bu olay kistik fibroziste görülen havayolu solunum hastalığı, terde tuz tadının olması, pankreas yetersizliği, meconium ileus ve erkeklerde kısırlık gibi olaylara da açıklık getirmektedir [16].

Kistik fibrozis çocuklarda ve genç yetişkinlerde kronik obstruktif akciğer hastalığına ve pankreasın ekzokrin fonksiyonunun bozulmasına sebep olan en önemli medikal problemlerden biridir Bugün dünyada 70 000' den fazla birey kistik fibrozis hastalığıyla baş etmektedir [17].

25 yıl önce defekte uğramış kistik fibrozise neden olan gen; Collins, Riordan ve Tsui tarafından tanımlanmış ve klonlanmıştır. Genin ürünü olan protein ise CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) olarak isimlendirilmiştir [18]. Bu büyük başarı sonrasında çalışmalar bu proteinin asıl görevinin ne olduğunun anlaşılması ve proteinin yapısının keşfedilmesiyle beraber bu proteini hedef alan rasyonel terapilerin geliştirilmesi üzerinden devam etmiştir [19]. Klor kanalı olarak keşfinin ardından CFTR yapısındaki mutasyonlar da moleküler seviyede tanımlanmaya başlanmıştır [20]. Bugünlerde ise kistik fibrozisle alakalı terapilerin büyük kısmı gendeki mutasyonun sebep olduğu hastalığın semptomlarını hedef almaktadır. 2011 senesinden yalnızca ivacaftor (kalydeco) G551D mutant CFTR proteinini hedef almaktadır [21].

Yapısı, fonksiyonu ve düzenlenmesi göz önünde bulundurulduğunda CFTR proteinin bir ABC (ATP Binding Casette) taşıyıcısı olduğu ortaya çıkarılmıştır . ABC taşıyıcıları iki adet membran geçen domain (MSD) ve iki adette nükleotid bağlanma domaini (NBD) içermektedir [22]. MSD' lerce oluşturulan yolaklarda NBD' ler, hücre membranından birçok substratın geçmesini ve iyonların pompalanmasını ATP hidrolizinden sağladıkları enerjiyle sağlarlar [22, 23].Bununla beraber CFTR yapısı, NBD' sinde ATP bağlanması ve yıkılması süreçleri boyunca, Klor iyonuna düşük iletkenlik gösteren, diğer ABC taşıyıcılarından daha farklı özellikler sergileyen bir proteindir. Proteinin bu yapısı içsel olarak düzensiz bir yapı sergileyen düzenleyici bölge (RD) aracılığıyla oldukça sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir [24].



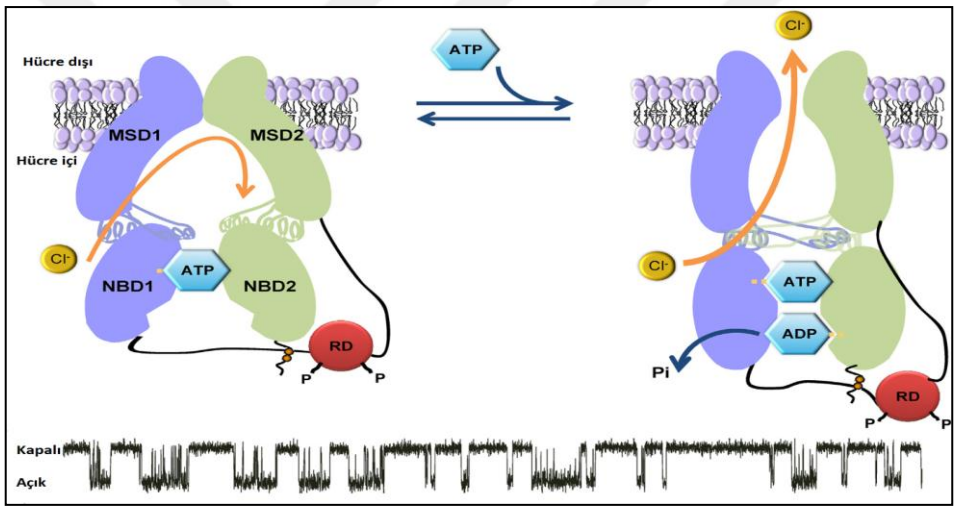
Şekil 2. 2 CFTR Klor kanalının moleküler modeli. Doğal tip CFTR proteininin ortogonal hali, kanal yapısı ve ribbon modeli şeklinde gösterimi. 1.membran geçen bölge (MSD1) mavi, 1.nükleotid bağlama domaini (NBD1) açık mavi, 2.membran geçen bölge (MSD2) kırmızı, 2. nükleotid bağlama bölgesi (NBD2) kehribar, düzenleyici bölge (RD) gri, nükleotid bağlama domainin düzenleyici ek kısmı ise yeşille gösterilmiştir. 508. Fenilalanin aminoasiti ve nükleotidlerin NBD dimerlerine bağlanmış hali de yapıda görülmektedir (Karbon: beyaz, Azot: mavi, Oksijen: kırmızı, Fosfor: turuncu) [17]

Çalışmalarda NBD' nin “head to tail” dimerik yapısı açığa çıkarılmakla beraber dimerin ara yüzünde ATP bağlanma bölgelerinin varlığı da kanıtlanmıştır (Şekil 2.2 ve 2. 3), [17]. NBD1' lerden birindeki ATP bağlama bölgeleri NBD1' in Walker A ve Walker B motifleri ile NBD2' nin LSGGQ motifinden oluşurken (1.bölge), diğer bölge NBD2' deki Walker motifleri ve NBD1' deki LSGGQ motifini (2.bölge) içermektedir (Şekil 2. 2 ve 2. 3). Bu iki bölge birbirine benzer olmakla beraber fonksiyon olarak birbirlerinden ayrılır [25], [26]. 1. ATP bağlama bölgesi ATP' ye çok sıkı şekilde bağlanma özelliğine sahip olmakla beraber hidroliz aktivitesi neredeyse yoktur. Diğer yandan 2.ATP bağlama bölgesi ATP' yi çok hızlı hidroliz edebilir [26].

Yapılan fonksiyonel çalışmalar sonucundaysa CFTR' nin 6.transmembran segmentinin (M6) proteinin iletim ve geçirgenliğinde dominant bir role sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır [27]. Protein kanalın açılma kinetiği ve mekanizması üzerinde yapılan

çalışmalarda ise açılmanın transmembran segmentlerin dönüşü ile mi yoksa komşu transmembran segmentler arasındaki tuz köprülerinin kırılması neticesinde mi meydana geldiği halen netleşmemiştir [28], [29].

CFTR geninde 2014 yılına kadar delesyon, insersiyon ile beraber çerçeve kayması, missens ve nonsens mutasyonları da içeren 2000' den çok mutasyon tanımlanmıştır [30], [31], (Çizelge 2. 1). Birçok mutasyona rastlanma sıklığı oldukça düşük olup bu istisnayı bozan tek mutasyon tipi 3 baz çiftinin delesyonunu içeren 508. Fenilalaninde meydana gelen mutasyondur (f508del). Kistik fibrozis hastalarının yaklaşık olarak %70'i her iki kromozomunda da bu mutasyonu taşırken, %90' u delesyonun yalnız bir kopyasını bulundurmaktadır [16], [31]. Diğer bir çok mutasyonun dünyada frekansı %1- 5 arasında değişirken, 20' den az mutasyonun frekansı çok nadir olup %0.1 düzeyindedir [17].



Şekil 2. 3 CFTR por yapısında ATP konformasyonel değişimleri tetiklemesi

Kistik fibrozisin genotipi ve klinik fenotipi ise oldukça değişkendir [32], [33]. Hastaların %85' i pankreatik yetersizlikten muzdarip olup, diğer hasta bireylerde bu durum pankreas yetmezliğine sebep olmamaktadır. Bununla beraber tanısı zor olan birkaç tip hastada hayatlarının ileriki dönemlerinde yine pankreatik yetmezlik görülmemekle beraber daha normale yakın bir akciğer ve solunum profiline rastlanmaktadır Bu tip hastalar atipik kistik fibrozisli olarak adlandırılır [33]. Belirtilerin çok az bir kısmı ise tek bir organda CFTR fonksiyonsuzluğundan ileri gelmekte olup bu

bireyler kistik fibrozis tanısından ayrı tutulur ve CFTR ilişkili rahatsızlıkları olan bireyler olarak ayrı bir kategoride bulunurlar [33].

Çizelge 2. 1 Sık görülen CFTR mutasyonları ve yüzdeleri [31]

Mutasyon	**Yüzde**
ΔF508	66.0
G551D	1.6
R533X	0.7
G542X	2.4
W1282X	1.2
R117H	0.3
N1303K	1.3
ΔI507	0.2
1717-1G->T	0.6
R1162X	0.3
621+1G->T	0.7
R344W	0.1

2.1.1 Sınıf I Mutasyonları

Sınıf I olarak adlandırılan CFTR mutasyonları nonsens, çerçeve kayması ve splicing mutasyonlarını içerir. Bu gruptaki mutasyonlar CFTR biyosentezini önler (Şekil 2. 4), [17]. Bu gruptaki nonsens mutasyonlar prematüre sonlanma kodonu (PTC) oluşmasına sebep olur. Translasyon olması gerekenden önce sonlanır ve mRNA "nonsense mediated decay"e (NMD) uğrar. Sonuçta ya hiç CFTR proteini oluşmaz yada çok az bir kısmı hücre membranına ulaşarak görevini devam ettirebilir. CFTR geninde meydana gelen mutasyonların bütüne oranı %8 civarıdır [30]. Yaygın örneklerinden olan G542X, kistik fibrozisli bireylerde en sık rastlanan mutasyonlardan olup Akdeniz' de oldukça sık

görülür. W182X mutasyonu ise en sık Alman ve Polonya Yahudileri' nde görülmektedir [34]. Yapılan çalışmalarda PTC baskılanmasının CFTR proteinin tamamının işlevsel şekilde oluşmasına ve hücre membranına sağlıklı bir şekilde ulaşmasına öncülük ettiği ispatlanmıştır. Bu konuda süren tartışmalarda yalnız PTC baskılanmasının yeterli olmayacağı aynı zamanda NMD' ninde baskılanması gerektiği üzerinde durulmaktadır [35].

2.1.2 Sınıf II Mutasyonları

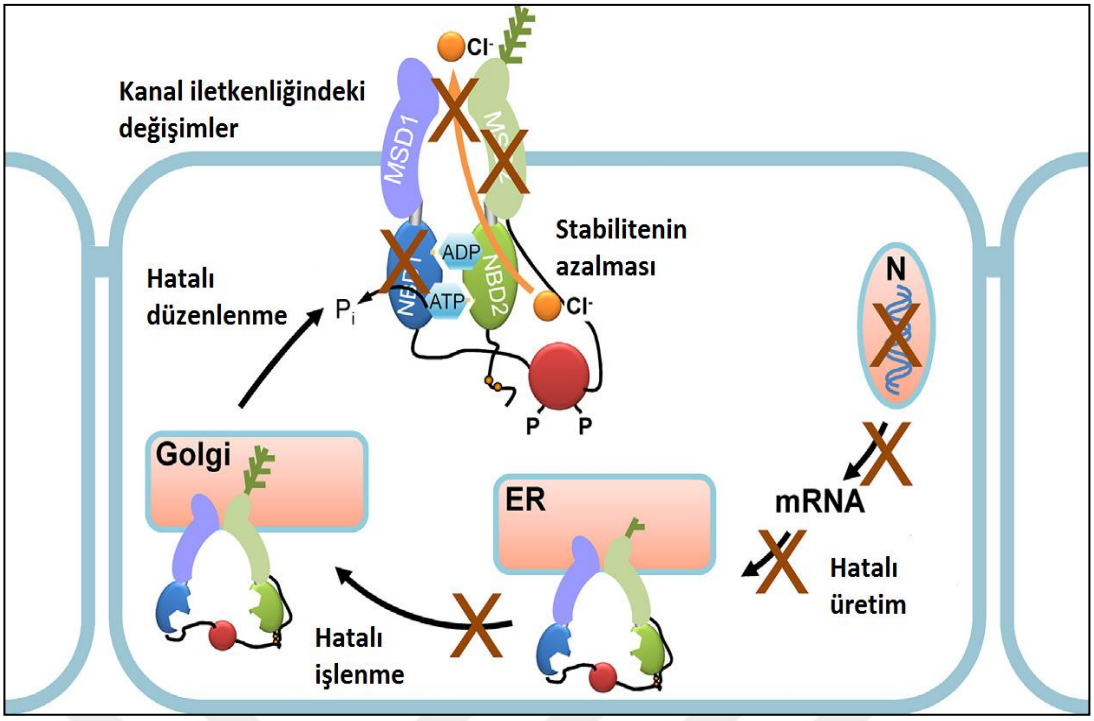
Sınıf II' de yer alan mutasyonlar CFTR proteinin yanlış işlenmesini içermekte olan grup mutasyonlarıdır [17], (Şekil 2. 4). Yanlış işlenme sonucunda plazma membranı işlevsel olan fonksiyonel proteinden yoksun kalır. Bu gruptaki mutasyonların en önemli örneği NBD1 bölgesinde meydana gelen F508del- CFTR mutasyonudur. Bu mutasyon sonucu protein yanlış katlanır. Yanlış katlanan polipeptit, endoplazmik retikulumun (ER) kalite kontrol mekanizmasında rol oynayan proteinlerce tanınır, protein ubikuitinlenir. Ardından bu yapı proteazoma yıkım için yönlendirilir [36].

Yapılan çalışmalarda F508del mutantı proteinlerinin çok az bir kısmının plazma membranına göç ettiği görülmüştür. Diğer yandan her ne kadar membrana ulaşabilen protein görülse bile, yapı stabil olmadığından ve birçok kanal yapısı bozukluğu sergilediğinden ulaşan proteinlerin yetersiz ve işlevsiz kalmakta olduğu açığa çıkarılmıştır [37- 39]. Yapılan termodinamik ve yapısal analizler sonucunda NBD1-F508del mutantı proteinlerin agregasyona meyilli bir yapı sergilediği de ortaya çıkmıştır [40]. Diğer yapısal çalışmalarda ise F508' in protein içerisinde NBD ve MSD ara yüzünde anahtar bir bölgede olduğu saptanmıştır [41], [42]. Burada meydana gelen bölgesel ve yapısal bozulmanın; domainler arası etkileşimleri yok ettiği, proteinin topografisini bozduğu, CFTR' nin düzgün şekilde katlanmasını önlediği ve ardından patolojik bir kaskadın başlamasına sebep olduğunu göstermiştir. F508del tarafından oluşan bu bozulmanın tamiri NBD1' in mutasyon sonucu yanlış katlanmasının kurtulması ve NBD1- ICL4 ara yüzünün stabilize edilebilmesiyle ancak mümkün olabilmektedir [42]. Yapılan tüm bu çalışmalar sonucunda F508del-CFTR' nin yol açtığı bozukluklardan kurtarılmayı sağlayacak yeni küçük molekül kombinasyonlarının gerekliliği üzerinde durulmaktadır [43].

2.1.3 Sınıf III Mutasyonları

Sınıf III mutasyonlarına sahip CFTR proteinleri düzgün olarak işlenirler ve plazma membranı da uygun yerleşim gösterirler [17], (Şekil 2. 4). Bu proteinlerde meydana gelen bozulma ise CFTR porunun iletkenliğini ve geçirgenliğinin azalması ile ilişkilidir. Kanal kapısının bozulması kanalın fonksiyonunda oldukça önemli etkiler meydana getirir. Bu bölgedeki en önemli mutasyon G551D mutasyonu olup, en sık rastlanan 3. CFTR mutasyonudur. G551D mutasyonu sonucunda hastalık ciddi bir hal alabilir [16]. Aynı zamanda bu fenotip İvacaftor ile de tedavi edilebilen ilk CFTR mutasyonu olma özelliğini taşımaktadır [21].

G551D mutasyonu, 2.ATP bağlanma bölgesindeki LSGGQ motifinde oluşmaktadır. Bu kısım ATP' nin Ɣ Fosfatıyla etkileşimde kilit bir roldedir [44].



Şekil 2. 4 CFTR sentezi ve fonksiyonuna mutasyonların etkisi [17]

2.1.4 Sınıf IV Mutasyonları

R117H, R334W ve R347P mutasyonları bu sınıfta ele alınır [17], (Çizelge 2.1 ve Şekil 2. 4). Bu gruptaki mutasyonlar CFTR porundan iyonların akışını engeller. Mutantlarda protein doğru şekilde işlenmesine rağmen, doğal tip CFTR' a göre anyonların akışı oldukça yavaş gerçekleşir. R117H için bu azalma %15 civarındayken, R347P için %70 kadardır [45].

CFTR proteininin MSD' sinde meydana gelen bu mutasyonlar yalnız pordaki Klor akışını yavaşlatmakla kalmazlar, bununla beraber HCO_3- gibi anyonların taşınmasına da etki eder. HCO_3- taşınımını hücrede denetleyen pH akışının CFTR' da meydana gelen mutasyonlar sonucu değişimi bu iyonun akışını yavaşlatabilir, hatta durdurabilir [46].

2.1.5 Sınıf V Mutasyonları

Bu sınıfta yer alan CFTR mutasyonları proteinin sentezinde azalmaya neden olur [20]. Bu gruptaki mutasyonlar CFTR promotorunde meydana gelerek transkripsiyonu etkileyerek, CFTR transkriptlerinin alternatif splicing bölgelerinde ve aminoasit sekansında değişiee neden olarak organizmada etkilerini gösterebilir. Sonuçta, normal fonksiyonda CFTR kanalları oluşmasına rağmen gerekenden az sayıda CFTR por varlığı saptanır [17].

2.1.6 Sınıf VI Mutasyonları

CFTR proteinin C terminusunun kısalmasına sebep olan nonsens ve çerçeve kayması mutasyonlarıyla bilim dünyası tanıştığından beri, bu tip mutasyonların CFTR proteinin plazma membranındaki stabilitesini azalttığını gösteren yayınlar çoğalmaya başlamış ve 6. Tip mutasyon sınıfı da CFTR mutasyonlar sınıfına dahil edilmiştir [47], [48]. Q142X mutasyonu CFTR proteininde 70 aminoasitin kesilmesine sebep olmakta ve sonuçta boyutça daha küçük CFTR proteini ortaya çıkmaktadır [17], (Şekil 2.4). Yapılan çalışmalarda bu mutasyonun CFTR işlenmesi yada hücre içi taşınmasını etkilemediğini; fakat olgun CFTR proteinin stabilitesini azalttığı ispatlanmıştır [48].

Farklı toplumlarda CFTR mutasyonlarına rastlanma sıklığı ve mutasyonların dağılımı farklıdır. Bunun zıttına F508del gibi bazı mutasyonların rastlanma sıklığı ise bütün dünyada oldukça yüksek olabilmektedir. Mutasyonların analizi için birden çok teknik kullanılsa bile kistik fibrozisin %1-5' i arasındaki hastada her 2 alelde de aynı mutasyonlara rastlanmaktadır. Mutasyonun hastada saptanamaması bireyin kistik fibrozisli olmadığını göstermez. Mutasyonların saptanması IRT miktarlarına ve hastalığın seyrine etki ettiğinden CFTR' de meydana gelen değişimler göz önünde bulunudurulmalıdır [14].

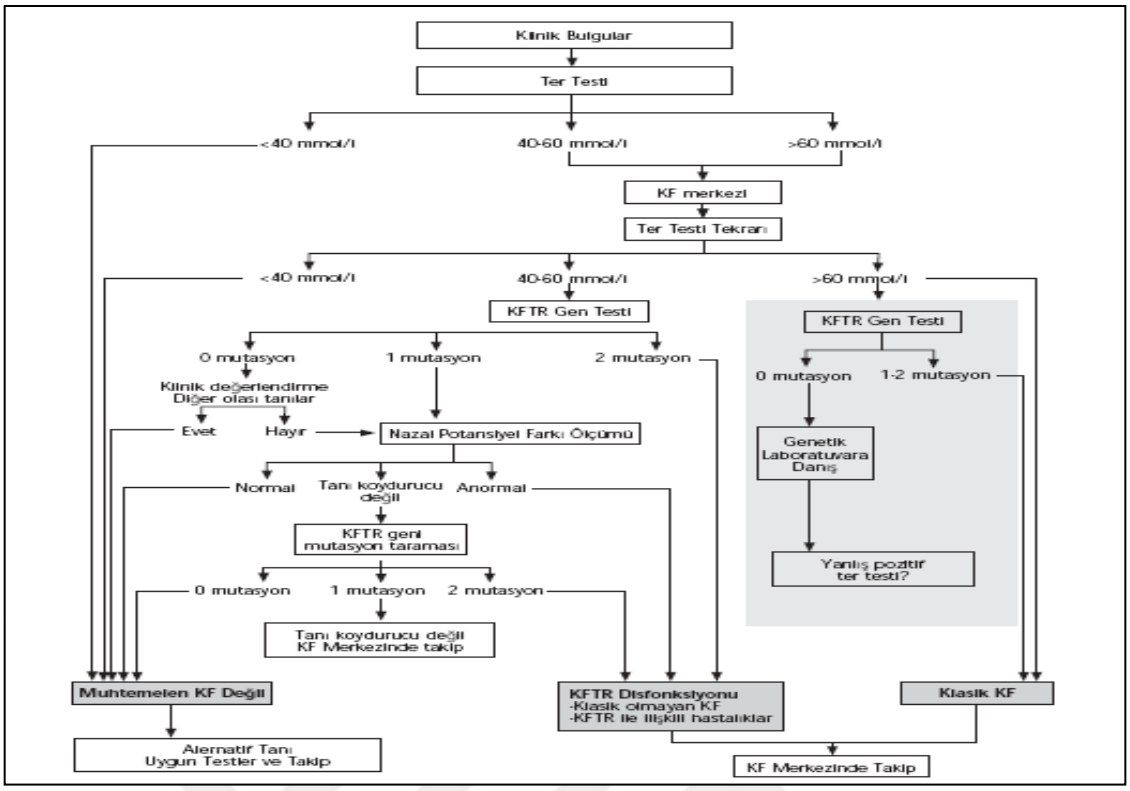
2.2 Kistik Fibrozisin Tanısında IRT ve Diğer Tanı Yöntemleri

ELISA Temelli Yöntemler: İlk kez 1979' da kistik fibrozisin yenidoğanlarda tanısı için, kurutulmuş kan spotlarından radio immunoassayi ile IRT tayini yapılmıştır [49]. Kistik fibrozisli bebeklerde yaşamlarınn ilk birkaç haftasında IRT miktarı 5 ila 10 kat yükselmektedir. Bu bilgiden yola çıkarak uzun bir süre yenidoğanların topuk kanları alınarak test edilmiştir. İlk birkaç hafta sonrasında IRT miktarında meydana gelen azalma nedeniyle başka testlerinde yapılması tercih edilmeye başlanmıştır. Pozitif çıkan IRT testinin ardından ikinci bir IRT2 taraması yada DNA testiyle doğrulamalar yapılmaya başlanmıştır. Bilinen tüm bu stratejilere rağmen hala uluslararası olarak oturtulmuş stratejiler ne yazık ki mevcut değildir [50].

1983' te Amerikan Kistik Fibrozis Derneği, erken tanının faydaları ve riskleri üzerinde bilgilendirme yaparak yenidoğanlarda erken tanının önemini gösteren bir açıklama yapmıştır [51]. Bu açıklamanın ardından bir çok farklı ülkede de kistik fibrozisin erken tanısıyla alakalı yayınlar ard arda gelmeye başlamıştır [52]. Farrell, yenidoğanlarda

erken tanı sayesinde kistik fibrozisli bireylerin yanlış beslenmesinin önüne geçilebileceğini açığa çıkarmıştır [53]. Yapılan diğer bir sistematik çalışmada kistik fibrozisin erken tanısı amacıyla iki rastgele kontrollü denemeler ön plana çıkarılmıştır [54]. Ardından İngiltere IRT' nin tespitinin ardından DNA analizini içeren erken tanı testiyle kistik fibrozis erken tanısı yapan ülkelerin ilklerbaşında yer almıştır [55].

Ter Testi: Yenidoğanlarda IRT2 tayini ilk aşama olmakla beraber ardından gelen DNA analizi ve ter testi de kistik fibrozisin tanısının önemli basamaklarındandır. Kistik fibrozisli hastalarda ter testi ilk defa 1959'ta tanımlanmış ilk tanı testi olup, günümüzde halen altın standart olarak kabul görmektedir. Tipik klinik bulguları olan kistik fibrozlu hastaların çok büyük çoğunluğunda ter testi çok yüksek doğruluğu olan bir tanı aracıdır. Atipik kistik fibrozisli bulgularda ise bu test net sonuçlar ortaya koyamamaktadır. Standart ter testi olan Gibson ve Cooke Testi uygun merkezlerde uygulama gerektiren bir testtir. Bu test ancak 2 haftadan gün almış ve ağırlığı 3 kilogramın üstünde olan bebeklere uygulanabilmektedir. Ter testi için ortak bir algoritma belirlenmiştir ve standart olarakta bu algoritma kullanılmaktadır (Şekil 2.5), [56]. 6 aylıktan büyük çocuklarda terdeki Klor konsantrasyonunun 60mmol/litre olması kistik fibrozis için tanı koydurucu bir etmendir. Klor düzeyinin 160 mmol/l üzerinde olması normal olmadığından testin tekrarını gerektirir [56- 63].



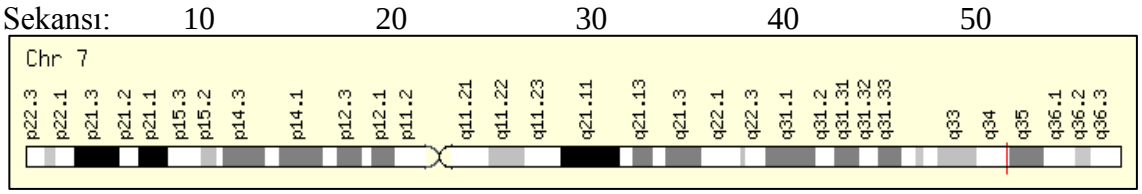
Şekil 2. 5 Kistik fibrozisin ter testiyle başlatılan tanısının devamında izlenen algoritma [56]

DNA Mutasyon Analizi: Farklı toplumlarda CFTR mutasyonlarına rastlanma sıklığı ve dağılımı farklı olmakla beraber özellikle ülkemizde bu dağılım çok büyük farklılıklar gösterir. Az sayıda mutasyonun rastlanma sıklığı %0,1' in altındadır. Bunun zıttına F508del gibi bazı mutasyonların rastlanma sıklığı ise bütün dünyada oldukça yüksek olabilmektedir. Mutasyonların analizi için birden çok teknik kullanılsa bile kistik fibrozisin %1-5' i arasındaki hastada her 2 alelde de aynı mutasyonlara rastlanmaktadır. Mutasyonun hastada saptanamaması bireyin kistik fibrozisli olmadığını göstermez. Özellikle ülkemizde genetik analizlerin sınırlılığı göz önüne alınırsa bu oranlar daha da çok değişmektedir. Kistik fibroziste fenotip, hem CFTR genotipinden hemde çevresel faktörlerden etkilenmektedir (Şekil 2.1), [14], [56], [64].

2.2.1 İmmünoreaktif tripsinojen IRT2 Proteini

Tripsin ailesine ait olan bu serin proteaz yapısı protein anyonik tripsinojen yada PRSS2 olarakta bilinir (Şekil 2.6), [65]. 247 aminoasitten oluşur ve molekül ağırlığı yaklaşık olarak 26488 Daltondur. T hücre reseptörü β lokusu kümesi içerisinde kodlanır. Bu ailedeki diğer protein üyeleri gibi peptidleri lizin yada arjininlerinden keser. Normal

şartlardaki pankreas özsuyunda yüksek seviyelerde bulunur; ancak upregülasyonu pankreatitis ve kistik fibrozis gibi hastalıklarda karakterizedir [65], [66].



Şekil 2. 6 IRT2 lokusu [65]

MNLLLILTFV AAAVAAPFDD DDKIVGGYIC EENSVPYQVS LNSGYHFCGG

60 70 80 90 100

SLISEQWVVS AGHCYKSRIQ VRLGEHNIEV LEGNEQFINA AKIIRHPKYN

110 120 130 140 150

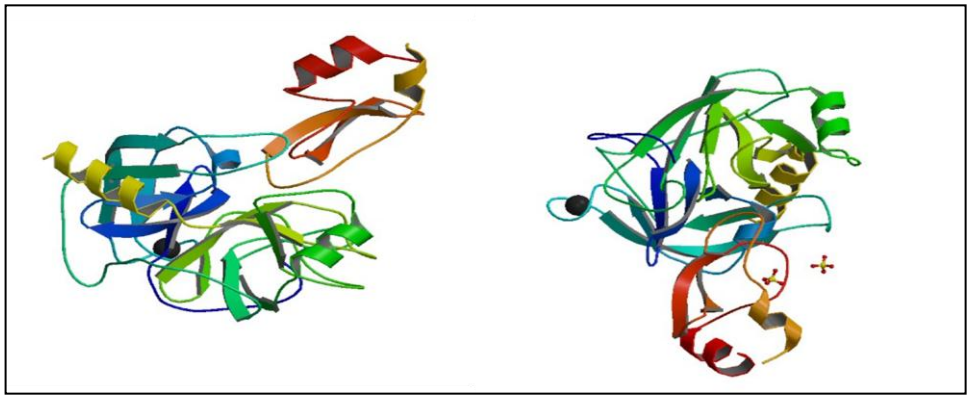
SRTLDNDILL IKLSSPAVIN SRVSAISLPT APPAAGTESL ISGWGNTLSS

160 170 180 190 200

GADYPDELQC LDAPVLSQAE CEASYPGKIT NNMFCVGFLE GGKDSCQGDS

210 220 230 240 247

GGPVVSNGEL QGIVSWGYGC AQKNRPGVYT KVYNYVDWIK DTIAANS şeklindedir [67]. Proteinin 3 boyutlu yapısı saf halde literatüre aktarılmamış olmakla beraber diğer izoformların başka bileşiklerle kompozisyonunu içeren 3 boyutlu bilgiler mevcuttur (Şekil 2.7), [68], [69].



Şekil 2. 7 IRT yapıları. Sağdaki yapının PDB numarası 3P95, soldaki yapının ise 4WXV' dir [68], [69]

Fizyolojik şartlarda tripsinojen yapısının tripsine dönüşümü enterokinaz enzimi aracılığıyla olmaktadır. Zimojen formun aktif forma dönüşümü sağlayan diğer bir süreç ise tripsinin otokatalitik aktivitesidir. Tripsinin otokatalitik aktivitesi sonucunda, tripsinojen hekzapeptitlerinden kesilerek aktif tripsin formuna dönüşebilmektedir [70].

H_2O + Tripsinogen —Tripsin→ Tripsin + Hekzapeptit

Diğer yandan tripsin formları sıcaklığa da oldukça hassastır. Fosfat tamponunda bulunan 1 mg/ml tripsin solüsyonu aktivitesinin %90' ını 5 dakika içerisinde kaybetmektedir [71].

Kistik fibrozisli bebeklerde yaşamlarının ilk birkaç haftasında IRT miktarı 5 ila 10 kat yükselmektedir. Bu bilgiden yola çıkarak uzun bir süre yenidoğanların topuk kanları alınarak test edilmiştir. İlk birkaç hafta sonrasında IRT miktarında meydana gelen azalma nedeniyle başka testlerinde yapılması tercih edilmeye başlanmıştır. Pozitif çıkan IRT testinin ardından ikinci bir IRT2 taraması yada DNA testiyle doğrulamalar yapılmaya başlanmıştır.

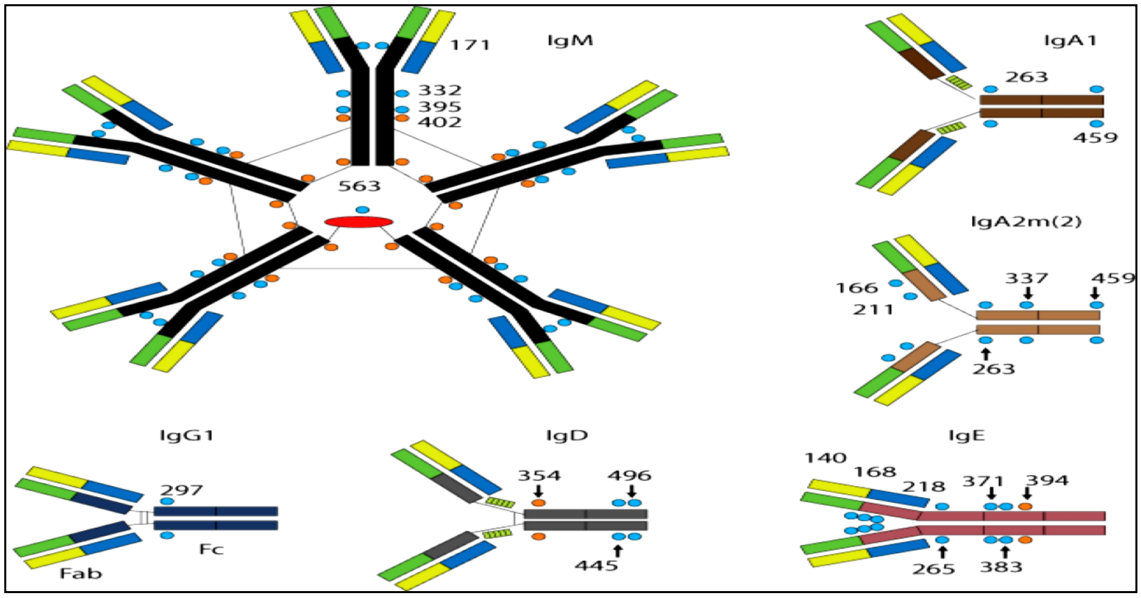
Sağlıklı bireylerde IRT1 protein miktarının IRT2 miktarına oranı 3.0' dır [72]. Kistik fibroziste kanalların mukusla tıkanması sebebiyle kandaki IRT2 miktarı da yükselmektedir. IRT1 formu yüksek konsantrasyonlarda bulunurken, pankreatitis gibi patolojik durumlarda IRT2 formu artış göstermektedir [66]. IRT2' nin kistik fibroziste IRT1' den daha anlamlı olabileceği üzerinde duran yayınlar mevcuttur [73].

2.3 Antikor Yapıları

Serumda bulunan proteinleri tanıyabilen ve antijenler tarafından oluşumu indüklenen proteinler antikor olarak adlandırılır. Tüm antikorlar globüler proteinleri içeren immunoglobulin ailesine aittir. Antikorların temel fonksiyonları organizmanın kendine ait olmayan moleküllere bağlanmaktır. Bilinen en farklı aminoasit yapısına sahip olan antikorların kimyasal yapısı; bağlanma etkinliği, bağlanma spesifitesi ve biyolojik aktivitesine etki eder. Bir memeli hücresi, 100 milyon kadar antijenik determinant ve yapay antijeni tanıma ve cevap verme kapasitesine sahip antikorlar üretebilir. Antikor yapılarındaki amino asit sekansının farklılıkları, her bir antikorun spesifik olarak belli epitoplara bağlanmasını sağlar. Antikorun değişken bölgesi onun biyolojik aktivitesini belirlemede önemlidir. Bu bölge antijenik yapıya verilen cevabın; komplemen sistem,

alerji yada fagositozla mı cevap verileceğine etki eder. Her üç aktivite de antikor antijene bağlandığı an belirlenir [74], [75].

1939' da, Tiselius ve Kabat immunize edilmiş serumu elektroforeze tabi tutmuş ve albumin, alfa globulin, beta-globulin ve gamma-globulin fraksiyonlarını ayırt etmişlerdir. Serumdaki varlığı da göz önünde bulundurularak immunoglobulin (Ig) ve IgG terimleri ortaya atılmıştır. Ayırma kolonları varlığında da ağır IgM ve diğer IgA, IgE, IgD, IgG yapılarıyla beraber hafif zincir dimerleri izole edilmiştir [74], (Şekil 2. 8).

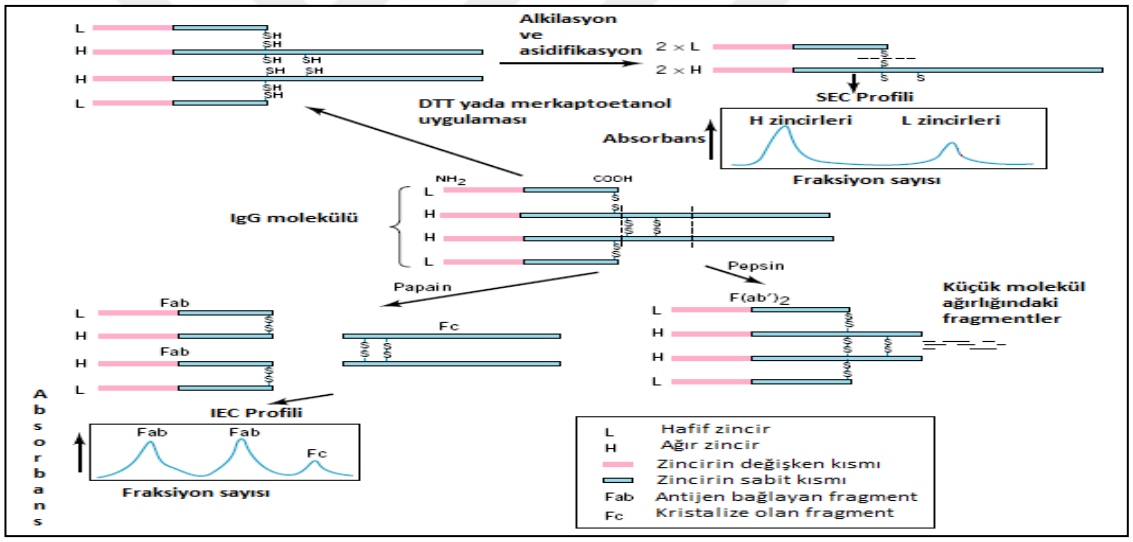


Şekil 2. 8 Immunoglobulinlerin yapısal özellikleri ve glikozilasyon bölgeleri. IgM, IgG, IgD, IgE, IgA1 ve IgA2 yapıları [74]

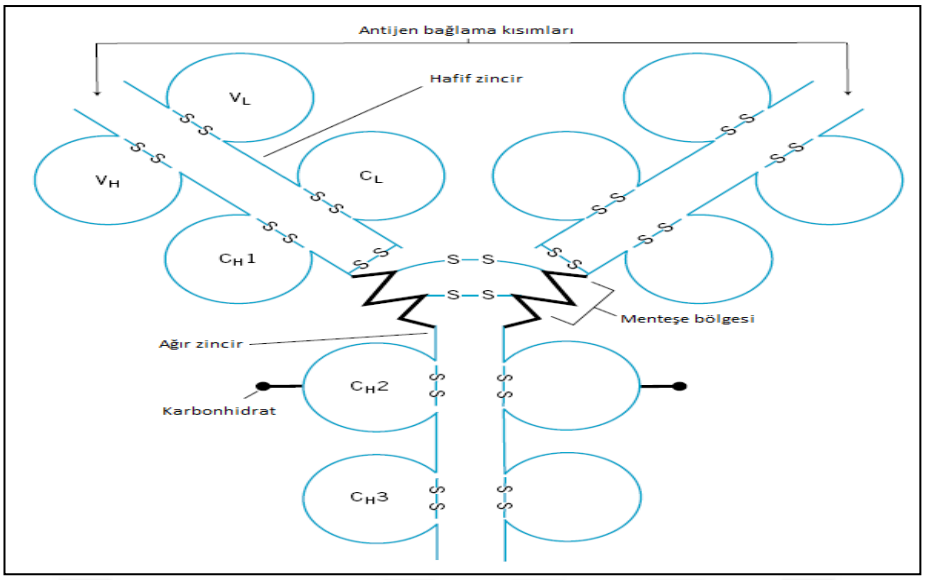
60'lı yılların başında İngiltere' den Rodney Porter ve Amerika' dan Gerald Edelman antikorların kimyasal yapısını ortaya çıkarmıştır. Edelman ve Porter' ın IgG molekülünün karakterizasyonuna yaklaşımları farklıdır. Edelman IgG molekülünü kimyasal çözücüler kullanarak ayrımlandırırken, Porter proteinleri degrade eden enzimlerden yararlanmıştır. Edelman, IgG alt ünitelerini elde etmek için tavşan IgG' sini disülfit bağlarını yıkan DTT (1,4-Dithiothreitol) uygulamış, diğer yandanda yıkılmış disülfit bağlarının tekrar bir araya gelmesini önleyen alkilleyici ajan iyodoasetamit ve kovalent olmayan etkileşimleri bozan denature edici bir ajanı da tavşan IgG' lerine uygulamıştır. Uygulama yapılan proteinleri SEC (Size Exclusion Chromatography)' ten geçirmiş ve eşit molar oranlarında iki alt üniteyi ayrımlandırmıştır. 50 kDa' luk alt üniteyi ağır zincir (H zinciri), 23 kDa' luk daha küçük alt üniteyi ise hafif zincir (L zinciri) olarak dizayn etmiştir. IgG molekülünün

ağırlığının 150 kDa olmasından yola çıkarak bu proteinin 2 H zinciri ve 2 L zincirinin disülfit bağıyla bir araya gelen zincirlerden oluştuğu sonucuna varmıştır [75].Porter ise tavşan IgG' sini indirgeyici bir ajan olan sistein varlığında proteolitik bir enzim olan papainle muamele etmiştir. IgG papainin etkisiyle peptit bağlarından hidrolize olmuş ve sonuçta 3 fragment yapı oluşmuştur (I, II ve III). Her üç fragmentin benzer molekül ağırlığına sahip olduğunu gözlemiştir. Üç fragmentten ikisinin yapısal olarak örtüştüğünü ve antijene bağlanma aktivitelerinin benzer olduğunu saptamış ve bu iki fragmenti Fab olarak adlandırmıştır. Serbest IgG molekülünün bivalent olduğunu ve herbirinin antijen yapısına bağlanabildiğini görmüş ve bu gözlemlerinden yola çıkarak Fab fragmentlerinin univalent olduğu sonucuna varmıştır.

Papain muamelesi gören üçüncü fragmentin antijene bağlanmadığını görüp diğer yandan bu fragmentin soğukta kristalize olduğunu gözlemlemiş ve bu kısma Fc ismini vermiştir. Fab: Fc oranını 2.0 olarak belirlemiştir [75].



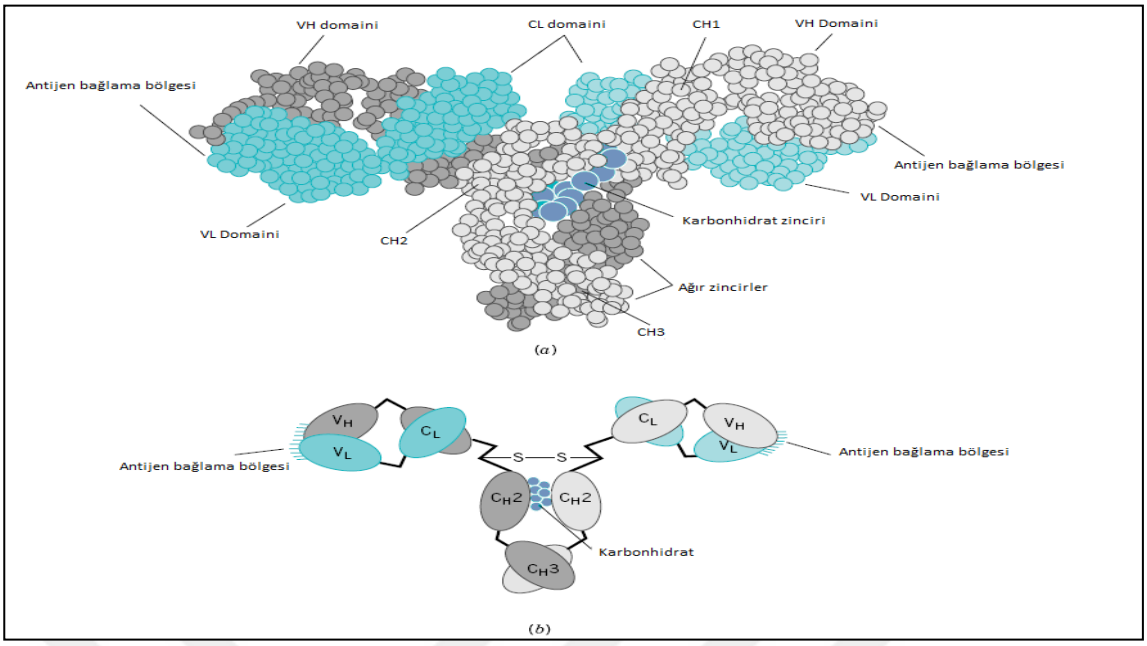
Şekil 2. 9 Tavşan IgG yapısının kimyasal olarak ya da papain yada pepsinle fragmente edilmesi [75]



Şekil 2. 10 IgG domainlerinin şematik gösterimi [75]

Edelman, Porter' ın sonuçlarını insan IgG yapısını kesip elektroforetik olarak ayrımladığında tekrar gözlemlemiş ve insan IgG yapısının antijenik olarak farklı iki bölgeden oluştuğunu ve bu bölgelerin tavşandan alınan sonuçlarla örtüştüğünü görmüştür (Şekil 2.9), [75]. Alfred Nisonoff pepsin kullanarak IgG molekülünün kesimini yapıp Porter' a benzer sonuçlar elde etmiştir [76].

Ardından gelen çalışmalarda antikorların kompleks globular proteinler olup bazı yapısal tekrarlara sahip oldukları açığa çıkarılmıştır. Edelman her antikor zincirinin homolog olarak tekrar eden homoloji ünitelerine sahip olduğunu ve bu ünitenin yaklaşık 110 aminoasitten oluştuğunu kanıtlayıp bu domainlere "immunoglobulin domainleri" adını vermiştir (Şekil 2. 10). Her proteinin immunoglobulin geninin super ailesine benzer yapısal motiflerinin olduğunu da ortaya koymuştur. IgG' nin hafif zincirinin VL (light variable) ve CL (light constant) domainlerinden, ağır zincirinin ise dört domainden oluştuğunu göstermiştir. Bu domainler 1VH (heavy variable) ve 3 adet CH (heavy constant) bölgesinden oluşmaktadır. CH domainleri CH1, CH2 ve CH3 yada Cg1, Cg2 ve Cg3 olarak adlandırılmıştır (Şekil 2. 10), [75].



Şekil 2.11 IgG yapısının 3 boyutlu modeli.X- Ray krsitalografi ve eleKtron mikroskobisi (a) IgG yapısının basit moleküler yapısı. (b) Domainlerin etkileşimi [75]

Ağır zincirin V kısmının hafif zincirin V kısmıyla benzerliği saptanmıştır. 3 C bölgesinin birbirine yüksek derecede homoloji gösterdiğini ve hafif zincirin C bölgesiyle de benzerliklerinin olduğu görülmüştür. Proteinlerin tersiyer yapılarında iki adet β çarşaf yapısı bulunmaktadır. Her domain sandviç benzeri bir yapıya sahiptir ve hidrofobik bir iç kısımları mevcuttur. Tabakalar birbirine özellikle proteinin merkezinde olacak şekilde disülfit bağlarıyla kovalent olarak bağlıdır. VL zincirine bakıldığında ise bazı lopların sandviçten dışarı doğru uzandığı görülmüş ve bu bölgeler sonraki çalışmalarda CDR' ler olarak saptanmıştır. Bu bölgenin büyüklüğü ve şekli aminoasit rezidüleri tarafından belirlenmektedir. Ağır ve hafif zincirler IgG molekülü içerisinde çok sayıda kovalent olmayan etkileşimler sayesinde bir arada durmakta olduğu da saptanmıştır. Bu etkileşimler, VL ve VH, CLve CH1, CH2 ve CH2 ile CH3 ve CH3 arasında meydana gelmektedir (Şekil 2.11), [75].

2.3.1 İzotip, İdiyotip ve Allotip Kavramları

Antikor sınıflarını tanımlayan ağır zincirin antijenik determinantları izotipik belirleyiciler olarak adlandırılır. Antikor molekülü tek başına bir izotipi ifade etmekte olup bu tipler C bölgelerinden ayırt edilirler. Antijenik belirleyiciler IgG, IgA, IgM, IgD ve IgE için sırasıyla Yunanca ϒ, α, μ, δ ve ε ile ifade edilir.Diğer izotipik ağır zincirler bir sınıfın içerisindeki antikor alt sınıflarını ifade eder. IgG; g1, g2, g3 ve g4 ya da

IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4 alt sınıflarına sahiptir. İnsanda normal serumdaki IgG proporsiyonları %65, 25, 5, ve 5' tir. IgA ise a1 ve a2 yada IgA1 ve IgA2 şeklinde dizayn edilir. Hafif zincirin antijenik belirleyicileri ise κ yada λ ile ifade edilir. İnsanda κ C bölgesi için bir gen varken, λ en az 4 adet fonksiyonel gen bölgesine sahiptir. Bu 4 bölge sırasıyla λ1, λ2, λ3 ve λ6 olarak adlandırılır. Hafif zincirin antijenik determinantları ise antikor sınıfı yada alt sınıfını belirlemede elzem değildir; çünkü κ ve λ zincirleri tüm sınıflar ve alt sınıflarla ilişkili yapılardır [75].

İdiyotipik belirleyiciler ise antikor molekülünün V bölgesinde antijen bağlama bölgesine yakın bir yerde bulunur. Bu belirleyiciler antikorları farklı idiyotiplere göre ayırır ve genelde aynı antijenik determinant karşı farklı spesifitesi olan antikorlar olarak gösterilir. Her birey farklı antikorlara farklı idiyotipte antikorlar ürettiğinden idiyotipler kişiye özeldir. İdiyotip, ağır ve hafif zincirin düzenlenmesine ve antikor kombinleme bölgesinin yapısına göre farklılıklar sergiler [75].

Allotipik belirleyiciler, tek alelde kodlanırlar ve immünoglobulin genlerinin alel formlarına spesifik antijenik determinantlardır. Bireyler arasında hafif ve ağır zincirlerinin aminoasit sekansı açısından çok az fark bulunmaktadır. Her ne kadar birçok durumda çok sayıda aminoasit değişikliği meydana gelse de; tek bir aminoasitin değişimi bile allotipik determinant oluşumuna sebep olur. Bireyler arasındaki allotipik değişimler, allotipik determinantlara karşı antikorlar kullanılarak saptanır ve genelde bireyler arasındaki varlığı polimorfizmler sayesinde oluşur [75].

2.3.2 Antikor Sınıfları

Taşınan ağır zincirin yapısına göre 5 sınıf immunoglobulin tipi mevcuttur. Sınıf değişimi (class switching) süreci sayesinde B hücreleri gelişimleri sırasında bir antikoru üretirken, diğer antikor alt tipini üretime geçebilir. Sınıf değişimi sayesinde farklı efektör fonksiyon ve yapılara sahip antikorların oluşumu sağlanır [74], [77]. IgM, IgG, IgA, IgD ve IgE izotipleri aminoasit zincir uzunluğu, karbonhidrat bağlantıları ve disülfit bağları sayesinde ayrımlandırılır. Bazıları multimerik yapılar oluşturur [74].

Bütün B hücreleri antikor sentezi yaşamlarına IgM tipi immunoglobulinleri sentez ederek başlar. Bu hücreler kemik iliğinden ayrıldıktan sonra; fakat antijenle karşılaşmadan önce zara yerleşik ve aynı antijen bağlama bölgelerine sahip IgM ve IgD yapılarından antikorlar üretir. Antijen yada T hücreleriyle uyarım sonrasında bazı B hücreleri, birincil antikor yanıtın baskın öğesi olan IgM salgılamak üzere etkinleşirler.

İmmün yanıtın daha geç evrelerinde, antijenik yapıların ve T hücrelerininde salgıladığı sitokinlerin etkisiyle IgG, Ig E ve IgA tiplerini üretmek üzere stimüle edilirler. Bu hücrelerse antikor üreten etkin hücrelere ve onlara karşılık gelen antikor sınıflarını yüzeylerinde eksprese eden bellek hücrelerine farklılaşırlar. IgG, IgE ve IgA tipleri hem antijenlerin uyarımı sonrasında üretildiklerinden hem de sekonder bağışıklık yanıtına hakim olduklarından ikincil antikor sınıfları olarakta adlandırılırlar. Her antikor sınıfı vücudumuza yabancı olan her tür maddeye yani antijenlere farklı cevaplar verecek şekilde saldırmak üzere özelleşmiştir [77].

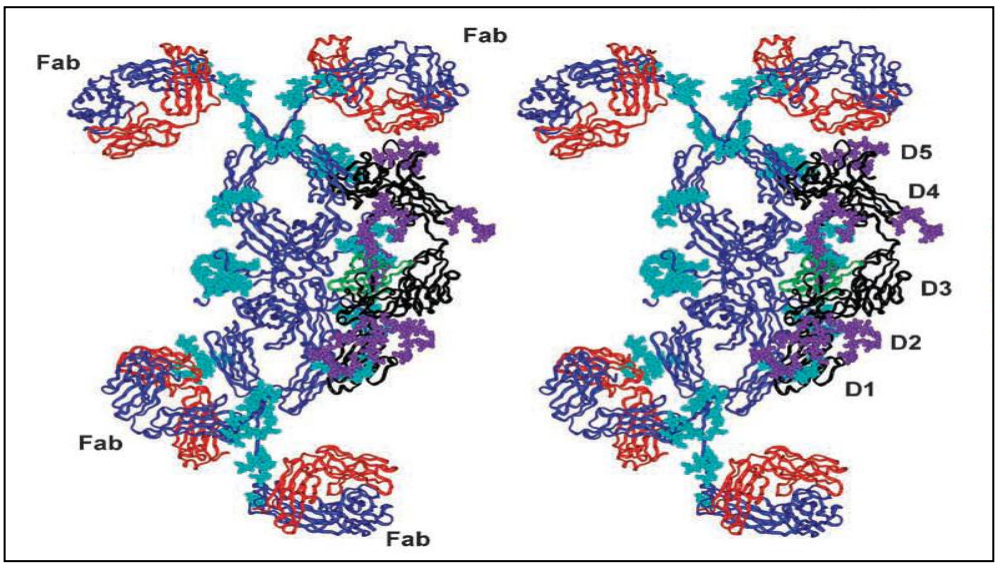
Antikor sınıfını ağır zincirin sabit bölgesi belirlediğinden B hücrelerinin antijen bağlama bölgelerini değişime uğratmadan ürettiği antikorun sınıfını değiştirebilme yeteneklerini aynı VH bölgesini (ağır zincirin antijen bağlayan bölgesini oluşturan kısım) kodlayan dizinin farklı CH kodlayan dizilerle ardışık olarak bir araya gelebilmesi özelliği sağlamaktadır. Bu özellik sayesinde canlıda çevresel antijenlerce seçilmiş antijen bağlama yeri, farklı antikor sınıfları arasında paylaşılarak her sınıfa ait farklı biyolojik özelliklerin edinimi sağlanmış olur. Bir B hücresi IgM ve IgD üretmekten, IgG, Ig E ve IgA tiplerini üretmek üzere stimüle edildiğinde sınıf değişim rekombinasyonu (class switching recombination) olarak adlandırılan geri dönüşsüz bir değişime uğrar. Bu değişim gen bölgelerinde VDJ kodlayan dizi ile hücrenin eksprese etmesi için seçilen CH kodlayıcı dizisi arasında tüm CH kodlayan dizilerin o bölgeden kesilip çıkarılmasına sebep olur. Sınıf değişim rekombinasyonu VDJ eklenmesinden birkaç yönüyle farklılık arz eden bir süreçtir. Ilk olarak bu rekombinasyon kodlanmayan dizilerle ilişkili olup, kodlanan dizilerin etkilenmesi mümkün değildir. Ikinci olarak bu süreçte farklı enzim yapıları ve farklı rekombinasyon dizileri kullanılır. Üçüncü farklılık bu değişimin antijen uyarımı sonrasında gerçekleşmesi, dördüncü farklılık ise yardımcı T hücrelerine bağımlı olarak gerçekleşen bir süreç olmasıdır [75], [77].

IgM bilinen en büyük antikor yapısı olup moleküler ağırlığı 960 kDa civarındadır. 5 adet Ig molekülünün basit şekilde disülfit bağlarıyla etkileşmesi sayesinde oluşmakta olan bu yapıdaki her bir Ig molekülü yine 2 ağır ve 2 hafif zincirden oluşmaktadır. Yapı J zinciri olarak adlandırılan küçük peptit yapısı sayesinde stabilize olur. Pentamerik yapıda olan IgM doğal olarak 10 tane antijen bağlama bölgesine sahiptir. Bu özelliği sayesinde antikorlara daha yüksek avidityeyle bağlanır. IgM yapıları afinite olgunlaşması geçirmediklerinden çoğunlukla düşük afiniteli yapılardır. Yüksek moleküler ağırlıkları

nedeniyle dokulara kolaylıkla penetre olamazken, temel olarak serumda bulunur (Şekil 2.8), [74], [75].

IgD yapısı membrana bağlı şekilde kalıp çoğunlukla hücrenin aktivasyonunu etkiler. IgD yapısı (175 kDa) kan serumunun %1' den az kısmını oluşturur. Yaklaşık miktarı 40 mg/ml' dir. Fonksiyonu net olarak bilinmemekle beraber, B hücrelerinde mevcut olan ana reseptörlerdendir. B hücresi olgunlaştığında diğer antikor yapılarıyla sınıf değişimi yapar. C bölgesindeki d-zinciri 3 domaine ayrılır ve bu yapı 383 amino asit reszidüsü içermektedir. Antikorun menteşe bölgesi 64 aminoasitten oluşur. Menteşe bölgesinin diğer antikor sınıflarından daha uzun olmasıyla diğer antikor sınıflarından ayrılır (Şekil 2. 9), [75].

IgA yapısı ,vücut salgılarından en bol bulunan antikor sınıfı olma özelliğini taşımaktadır.2 adet Ig molekülünden oluşur. Dimerik yapı kısa polipeptid zinciri olan J yapısı ve iki adet disülfit bağı sayesinde stabilize olur. Ek olarak yapıda sekretuar parka olarak adlandırılan kısım epidermisin içerisine yapının taşınmasını kolaylaştırır. Dimerik IgA formu, hem fagositik hücreler aktif olmadığı zaman hem de komplement sistem aktif olmadığında vücut salgılarında bol miktarda bulunur. Temel fonksiyonu, komplement sistemi yeterince aktive edemeyen antijenleri nötralize etmektir. Kristal yapısı Şekil 2. 12' de görülmektedir [74], [78].



Şekil 2. 12 IgA Kristal yapısı [78]

IgG yapısı serum Iglerinin yaklaşık olarak %75' ini oluşturan primer antikor yapısıdır. İki ağır iki hafif zincirden oluşur ve iki adet antijen bağlama bölgesine sahiptir. Farklı

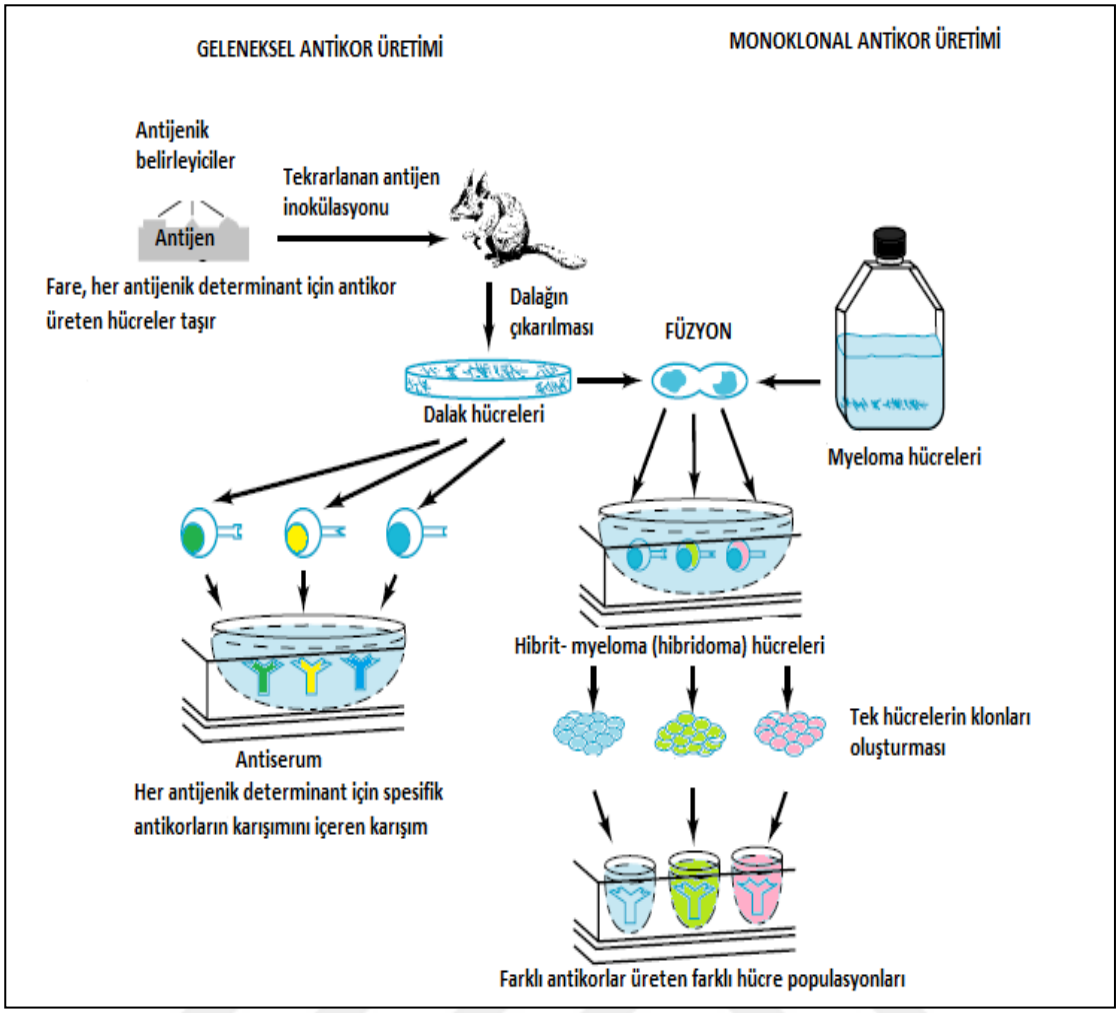
IgG subizotipleri farelerde mevcuttur: IgG1, IgG2a, IgG2b ve IgG3. Bu antikor yapısı ilk antijen karşılaşmasını takiben 10- 14 gün içerisinde oluşturulur. IgG aynı zamanda yüksek etkinlikte komplement sistem aktifleşmesini tetikleme özelliğine sahiptir ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı savunmada önemli rolleri vardır. Plasentaya penetre olabilen tek Ig olma özelliğini de taşımaktadır [74], [79]. Ig2a kristal yapısı Şekil 2. 13' te görülmektedir [79], [80].



Şekil 2. 13 IgG2a Kristal yapısı [79], [80]

2.4 *In vitro* Antikor Üretimi: Hibridoma Teknolojisi

Normal bir kan serumu her ml' sinde 10^{16} antikor molekülü içerir. Antikorların deney hayvanlarından alınabilmesinden yola çıkarak antikorların identifiye edilebilmesi ve etiketlenebilmesi mümkün olmaktadır. Bu durumda ortaya çıkan tek zorluk serum içeriğinin çeşitliliğidir (Şekil 2. 14), [75].



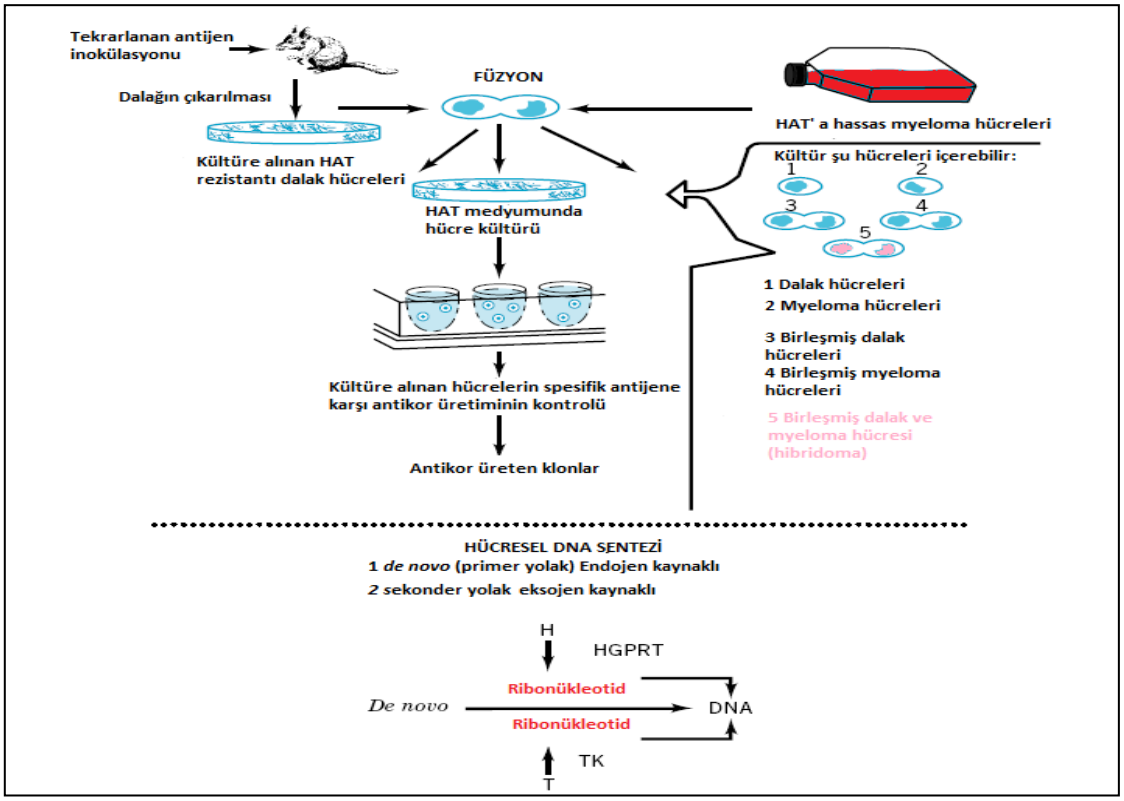
Şekil 2. 14 Monoklonal antikor üretimi ile geleneksel antisera üretiminin karşılaştırması [75]

Hibridizasyon tekniklerinin gelişmesi immortalize edilmiş ve spesifik antikor üreten hücrelerin üretimine olanak vermektedir. İmmortalize B hücrelerinin tek bir izotipinden üretilen spesifik antikorlara "monoklonal antikor" ismi verilmektedir. Normalde antikor üreten hücreler bir dizi olgunlaşma sürecinden geçtiklerinden hücre kültüründe özelliklerini ve canlılıklarını devam ettiremezken, myeloma hücreleri ölümsüz hücrelerdir. Bu özelliklerden yola çıkarak "Myeloma hücrelerinden elde edilen immünoglobulinleri neden kullanılamıyor?" sorusu açığa çıkmıştır. Myeloma immunoglobulinlerinin kullanılmama sebebi antijen spesifitelerinin bilinmemesi ve antijene spesifik myeloma hücrelerinin üretiminin zor olmasıdır. İkinci problemin üstesinden gelmek amacıyla immün yanıt boyunca spesifik bir antijene yanıt olarak oluşturulan antikor üreten B hücrelerinin myelomalarla kombine edilebileceği görüşü ortaya çıkmıştır [75].

Georges Kohler ve Cesar Milstein antikor üreten hücreleri myeloma hücreleriyle birleştirmiştir. Sonuçta oluşan hücrelere hibrit- myeloma yani hibridoma adını vermiştir [81]. Hibridoma hücreleri, myeloma hücrelerinin ölümsüzlüğü ile B hücrelerinin

spesifik antijene karşı antikor üretimi özelliklerini bir arada bulunduran hücre hatlarıdır. 1975' te Kohler ve Milstein Nature' deki makalelerinde açıkladıkları çığır açıcı deneyleriyle 1984' te Nobel Tıp Ödülünü almışlardır (Şekil 2. 15), [75]. Hibridomaların eldesi amacıyla modifiye edilen Köhler ve Milstein'in metodunda, ikincil pürin nükleotit sentez yolağı baskılanmış myeloma hücreleriyle kültürde daha kısa ömürlü olan B lenfositlerin birleşmesi sağlanır. Yöntemin esası; birincil nükleotit sentez yolağını baskılayacak kültür ortamında yalnızca hibrit hücrelerinin hayatta kalmasının sağlanması esasına dayanır. Füzyon öncesinde myeloma hücreleri 8-azoguanin ile 1 hafta- 10 gün muamele edilir. Bu süreç boyunca, sekonder pürin sentezi yolağında görevli HGPRT enziminin sentezlendiği gen bölgesi mutasyona uğrar ve HGPRT enziminin doğru sentez edilmemesi sağlanır. İkinci işlem basamağındaysa primer pürin sentezi yolağınında hasara uğratılması aracılığıyla birleşemeyen hücrelerin ölmeleri sağlanır. Füzyon işleminde sekonder yolağı bloke olmuş ölümsüz myelomalarla her iki yolağı aktif B hücreleri PEG (PoliEtilenGlikol) gibi ajanlarla birleştirilir [75]. PEG ilavesiyle hücre membranında gözenekler oluşturulur ve iki hücrenin de birbiriyle birleşmesi sağlanır. Füzyondan sonra hücreler HAT (hipoksantin-aminopterin-timidin) seçimi için kültüre alınır. Bu aşamada mutajen ajan olarak sıklıkla aminopterin kullanılmasına karşın, aminopterin yerine metotreksat ya da azaserin de tercih edilebilir. HAT seçimindeki yöntem de ise mutajen, hücrelerin primer pürin sentezi yolağını bloke ederek, sekonder yolağı kullanmaya yönlendirir. Bu sayede, işlemin birinci basamağında ikincil yolağı bloke edilmiş olan myelomalar ölür. Seçilim amaçlı yapılan bu kültür 7 gün ile 10 gün arasında sürdürülür. Bu süreçte sınırlı yaşam ömrüne sahip B lenfositler de ölür. Geriye yalnızca ikincil yolağı kullanabilen hibridoma hücreleri kalır [82].

HAT inkübasyonu boyunca, besiyerinde kullanılan hipoksantin, pürin türevi olarak; timidin ise, pirimidin türevi olarak DNA sentezinin desteklenmesi amacı ile kullanılır. HAT besiyerinde inkübasyonun ardında hücreler DNA sentezini teşvik edici HT besi yerine alınır. Hayatta kalan hibridoma hücrelerinin gelişimi için HT besiyerinin bir süre daha kullanımına devam edilir [75], [82].



Şekil 2. 15 Monoklonal antikorların üretiminde kullanılan standart protokol. Hipoksantin (H), Timidin (T), Aminopterin (A), Timidin Kinaz (TK) ile simgelenmektedir [75]

Belirlenen antijene spesifik antikor üreten hücrelerin identifiye edilebilmesi için sıklıkla indirek ELISA kullanılır. Uygun antikorları üreten hücre klonların tespitinin ardından çoğunlukla limited dilüsyon yapılır. Bu şekilde her hücre kuyucuğuna 1- 10 hücre düşmesi sağlanır. Yeterince büyüyüp klon üreten hücre kuyularının üst sıvısı antikor üretimi açısından yine indirek ELISA ile test edilir. Hibridomalar daha büyük şişelere daha yüksek miktarda antikor üretebilmek için alınabilir. Her bir litre hücre üst sıvısından 10 ile 100 mg kadar antikor saflaştırılabilir. Alternatif olarak hibridoma hücreleri farenin peritoneal kavitesine de zerk edilerek hücrelerin antikor üretmesi sağlanabilir. Fareden alınan karın sıvısından her ml için 1 ile 25 mg arasında antikor elde edilebilir. Kulağa basit gelse bile spesifik bir antijene karşı yüksek afiniteli antikorların üretimi 3 ila 6 ay kadar süre alabilmektedir [75], [82].

Monoklonal antikorların bir çok uygulama alanı mevcuttur. İmmunolojik araştırmalarda bu yöntem yeni bir çağ açmıştır ve özellikle belirli immunoassaylerin oluşturulmasında hibridoma metodu temel olarak kullanılmaya devam etmektedir [82].

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

Çizelge 3. 1 Genel Laboratuvar Ekipmanları

Ekipman ve Sarf Malzeme	Üretici Firma
+4 Dolap	Bosch
10, 50, 100, 1000 µl'lik mikropipetler	Thermo
-20 Dolap	Bosch
300 µl 'lik çok kanallı pipetler	Thermo
50 cc şişe	Schott
250 cc şişe	Schott
500 cc şişe	Schott
1000 cc şişe	Schott
1000-5000 µl pipet ucu	Eppendorf
50-1000 µl pipet ucu	Eppendorf
10-200 µl pipet ucu	Eppendorf
0,1-10 µl pipet ucu	Eppendorf

Çizelge 3. 1 Genel Laboratuvar Ekipmanları (devamı)

Blotlama cihazı	BioRad
Buz makinesi	Scotsman AF100
Çalkalayıcı	BioSan
ELISA 96 kuyulu plakları	Nunc
ELISA çoklu plak okuyucusu (spektrometre)	BioTek Instruments
ELISA çoklu plak yıkama cihazı	BioTek Instruments
Fraksiyon ayırım makinesi	BioRad
Güç kaynağı	BioRad
Hassas terazi	Precisa Gravimetrics AG
Hava akımlı kabinler	Heraus
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	VELP Scientifica
İzotiplendirme Kiti	Roche
Jel Elektroforez Sistemi	BioRad
Lateks eldiven	Broche
Liyofilizatör	Martin Christ
Manyetik karıştırıcı	Sigma- Aldrich
Masaüstü Santrifüj	Eppendorf
Mini masaüstü santrifüj	LMS Harmony
Orbital Karıştırıcı	Edmund Bühler
Otoklav	Sistek
Peristaltik Pompa	Pharmacia
pH metre	Mettler Toledo
Protein A kolonu	GE
Pudrasız Eldiven	Broche

Çizelge 3. 1 Genel Laboratuvar Ekipmanları (devamı)

PVDF membran	Thermo
Santrifüj tüpü 0,2 ml	Eppendorf
Santrifüj tüpü 1,5 ml	Eppendorf
Santrifüj tüpü 2 ml	Eppendorf
Sıcak su banyosu	Nüve
Sıvı Azot tankı ve azot taşıma tankları	Union Carbide Nitrogen
Spektrometre	Biochrom Libra
Tek kullanımlık pipet uçları	Eppendorf
Ultrasantrifüj	Hitachi
Ultrasonik banyo	Bandelin
Vorteks	Scientific Industries

Çizelge 3. 2 Hücre Kültüründe Kullanılan Ekipmanlar

Ekipman ve Sarf Malzeme	**Üretici Firma**
+4 Dolap	Bosch
0,1-10 ul pipet ucu	Eppendorf
0,22 µm şırınga filtresi	Millipore
1 ml enjektör	SET
1,8 ml kriyotüp	VWR
10 ml serolojik pipet	TPP
10, 50, 100, 1000 µl'lik mikropipetler	Thermo
1000 cc şişe	Schott
1000-5000 µl pipet ucu	Eppendorf
10-200 µl pipet ucu	Eppendorf

Çizelge 3. 2 Hücre Kültüründe Kullanılan Ekipmanlar (devamı)

1-2,5-5-10-50 cc'lik enjektör	Ayset
15 ml falkon	TPP
175 cm^2 hücre petrisi	NUNC
2 ml serolojik pipet	TPP
-20 Dolap	Bosch
20 ml enjektör	SET
25 cm hücre kazıyıcı	Costar
25 cm^2 filtreli hücre petrisi	TPP
250 cc şişe	Schott
30 cm hücre kazıyıcı	TPP
300 µl 'lik çok kanallı pipetler	Thermo
39 cm Hücre kazıyıcı	Costar
40 cm hücre kazıyıcı	Greiner
5 ml serolojik pipet	TPP
50 cc şişe	Schott
50 ml enjektör	SET
50 ml falkon	TPP
500 cc şişe	Schott
50-1000 µl pipet ucu	Eppendorf
75 cm^2 filtreli hücre petrisi	BD Falcon
96 kuyucuklu hücre plağı	Corning
Ezici	Sigma
Hemasitometre	Bright Line
Inverted mikroskop	Olympus

Çizelge 3. 2 Hücre Kültüründe Kullanılan Ekipmanlar (devamı)

Işık mikroskopu	Olympus
Karbondioksitli inkübatör	Heraus
Laminar Hava Akış Kabini	Esco
Makas	Sigma
Masaüstü Santrifüj	Eppendorf
Otomatik pipet	Eppendorf
Pens	Sigma
Tüp kutusu	Isolab
Vakum filtrasyon	VWR

Çizelge 3. 3 Hücre Kültüründe Kullanılan Canlı Materyaller

Kullanılan Materyal	**Temin edildiği yer**
Fo hücre	ATCC (CRL-1646)
Fare	Balb/C
Makrofaj hücreleri	Balb/C
Dalak hücreleri	Balb/C

Çizelge 3. 4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Madde Adı	**Üretici Firma**
4X Laemmli Sample Buffer	BioRad
50X HAT	Gibco
50X HT	Gibco

Çizelge 3. 4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler (devamı)

8- Azoguanin	Sigma
Acrylamide	BioRad
Albumin Bovine	Sigma
Amonyum PerSülfat	Sigma
Amonyum Sülfat	Merck
Anti Fare Ig(G,A,M)−Alkalin Fosfataz Konjugatı	Sigma
Anti Fare IgG Alkalen Fosfataz Konjugatı	Sigma
apo-Transferrin	Sigma
Asetik asit	Merck
BCIP/ NBT Substrate	Sigma
Bis-N,N'-Methylene Bis-Acrylamide	BioRad
Çinko Klorit	Sigma
DiSodyumHidrojenFosfatHeptaHidrat	Merck
DMEM	Sigma
DMSO	Sigma- Aldrich
Etanol	Merck
FCS	Biochrom
Formaldehyde solution about 37%	Merck
Freunds' Adjuvant, complete	Sigma
Freunds' Adjuvant, incomplete	Sigma
Gentamycin	Gibco
Glacial Asetik Asit	Merck
Glisin	Sigma
Glukoz	Sigma

Çizelge 3.4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler (devamı)

HCl	Merck
Hemoglobin	Sigma
HEPES	Sigma
Human hemoglobin	Sigma
IRT2 antijeni	Prospec
IRT2 antijeni	RayBiotech
IsoStrip Monoclonal Antibody Isotyping Kit	Roche
K_2HPO_4	Merck
KH_2PO_4	Merck
KOH	Sigma
Magnezyum Klorit	Sigma
Methanol	Merck
$MgCl_2$	Sigma
$NaBH_4$	Sigma
NaCl	Sigma
$NaHCO_3$	Sigma
NaIO4	Sigma
NaOH	Merck
PAP Antijeni	Sino Biological
PEG4000	Merck
p-nitrophenyl fosfat	Sigma
PNPP	Sigma
Protein A	GE
SDS	Sigma
Sitrik Asit	Sigma

Çizelge 3.4 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler (devamı)

Skim Milk powder	Fluka
Sodyum Bikarbonat	Sigma
Sodyum DiHİdrojen Fosfat	Merck
Sodyum Sitrat	Sigma
Sodyum Tiyosülfat Pentahidrat	Merck
TEMED (N,N,N',N' Tetra Metil Etilen Diamin	Sigma
Trisma Base	Sigma
TriSodium Sitrat DiHidrat	Merck
Trypan Blue	Biologycal Industry
Tween 20	Sigma
Thermo Page Ruler Prestained Protein Ladder	Thermo
$ZnCl_2$	Sigma

3.2. Metod

3.2.1 Çözeltilerin Hazırlanması

SDS PAGE Jel içeriğinin Hazırlanması

- %10' luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat) Çözeltisi: 10 gram SDS, 100 ml distile su içerisinde çözdürülerek hazırlandı.
- %30 Akrilamid/ Bisakrilamid karışımı 29,1 gram akrilamid ile 0,9 gram Bis-akrilamid 100 ml dH_2O içerisinde karanlıkta çözdürülerek hazırlandı.
- %10 APS (Amonyum Per Sülfat), 1 ml dH_2O içerisine 0,1 gram APS eklenerek jel dökmeden önce taze hazırlandı.
- 1 M ve 1,5 M Tris çözeltileri sırasıyla 18,15 ve 6,05 gram Trisma Base dH_2O içerisine eklendikten sonra pH' ları HCl ile ayarlanarak hazırlandı.

- 10 X Yürütme Tamponu: 72,1 gram Glisin, 15,15 gram Trisma- Base, 5 gram SDS karıştırıldıktan sonra pH:8,3'e ayarlandı. Ardından hacim 500 ml' ye dH_2O ile tamamlandı. Jeller yürütülmeden önce dH_2O ile 1X' e seyreltilerek kullanıldı.

Çizelge 3. 5 SDS PAGE alt jel içeriği

Alt Jel içeriği	**%12' lik jel**		**%15' lik jel**	
Toplam Hacim	10 ml	20 ml	10 ml	20 ml
H_2O	3,3 ml	6,6 ml	2,3 ml	3,4 ml
%30 Akrilamid/Bisakrilamid Karışımı	4 ml	8 ml	5 ml	10 ml
1,5 M Tris HCl pH: 8.8	2,5 ml	5 ml	2,5 ml	5 ml
%10 SDS	0,1 ml	0,2 ml	0,1 ml	0,2 ml
%10 APS	0,1 ml	0,2 ml	0,1 ml	0,2 ml
TEMED	0,004 ml	0,008 ml	0,004 ml	0,008 ml

Alt jelin dökülmesinin ardından jel üzerine izopropanol eklendi. Jelin donmasının ardından izopropanolden arındırılıp üst jel döküldü.

Çizelge 3. 6 SDS PAGE üst jel içeriği

%5 Üst Jel içeriği	**5 ml**	**10 ml**
H_2O	3,4 ml	6,8 ml
%30 Akrilamid/Bisakrilamid Karışımı	0,83 ml	1,7 ml
1 M Tris HCl pH: 6.8	0,63 ml	1,25 ml

Çizelge 3. 6 SDS PAGE üst jel içeriği (devamı)

%10 SDS	0,05 ml	0,1 ml
%10 Amonyum Persülfat	0,05 ml	0,1 ml
TEMED	0,005 ml	0,01 ml

Gümüş Boyama Çözeltilerinin Hazırlanması

- Fiks Tamponu; %50 MetOH, %12 Asetik Asit, 0,5 ml %37 Formaldehit ile (1 litre için) çeker ocak altında hazırlandı.
- 1.yıkama tamponu; 1 litre çözelti için 500 ml EtOh, 500 ml dH2O içerecek şekilde hazırlandı.
- Ön muamele tamponun hazırlanması için 0,2 g $Na_2S_2O_3$. 5H2O 1 litre çözelti için tartılarak hazırlandı.
- Bant fiksleme solüsyonu $AgNO_3$ (2g/l) ve 0.75 ml %37 Formaldehit çeker ocak altında hazırlandı.
- Geliştirme aşamasındaki tampon 60 g/l Na_2CO_3, 4 mg/l $Na_2S_2O_3$ ve 0,5 ml %37 Formaldehit ile çeker ocak içerisinde hazırlandı.
- Son yıkama tamponu 1 litre için 500 ml MetOH ile 500 ml dH_2O içerecek şekilde hazırlandı.

İmmunblotlama Çözeltilerinin Hazırlanması

- Genel amaçlı kullanılan fosfat tamponunun hazırlanması için 150 mM KH_2PO_4 ve 150 mM K_2HPO_4 çözeltileri hazırlandı. KH2PO4 solüsyonunun pH' sı K_2HPO_4 ile 7,2' ye ayarlandı.
- PBS için 10 mM fosfat tamponu ve 150 mM NaCl kullanıldı.
- TBS için 9.68 g Tris-Base ve 32 g NaCl tartılıp dH_2O içerisine eklendi. Ardından pH: 7. 6' ya ayarlandı.
- TBS T çözeltisi için 1 litre TBS çözeltisi içerisine 0,5 ml Tween eklendi.
- Transfer tamponu için 0.592 g Trisma-Base ve 0.293 g Glisin tartıldı. Ardından hazırlanan %10' luk SDS' ten 337 µl eklendikten sonra pH: 9.2' ye ayarlanıp ardından 20 ml Metanol, 100 ml' lik çözelti içerisine eklendi.

- Bloklama Solüsyonu: %1' lik çözeltinin hazırlanması için 20 ml PBS içerisine 0,2 gram yağsız süt tozu eklenip vortekslenerek hazırlandı.
- Substrat: 10 ml dH_2O içerisine 1 tablet BCIP/NBT Substratı çözdürülerek hazırlandı.

İmmünizasyon ve kan alımları için gerekli çözeltilerin hazırlanması

- İmmünizasyonda, belirlenen antijen miktarı için Freunds' complete adjuvan ile PBS içerisindeki antijenin karışımı 1:1 olacak şekilde hesaplandı. İlk immünizasyon complete adjuvanla ardından gelen immünizasyonlar, Freunds' incomplete adjuvanla yapıldı. Füzyona alınacak fareye yapılan rapel ise yalnız PBS ve belirlenen antijen karışımıyla yapıldı.
- Kan alımında Sodyum Sitrat: 2.3 gram sodyum sitrat, 0.8 gram sitrik asit ve 2.2 gram glikozun 100 ml distile suda çözüldü ve -20ºC'de saklandı.

ELISA için gerekli çözeltilerin hazırlanması

- Yıkama çözeltisinin hazırlanması amacıyla, PBS çözeltisine %0,05 (v/v) olacak şekilde Tween20 eklendi.
- Bloklama solüsyonu %1 yağı alınmış süt tozu içerecek şekilde PBS ile hazırlandı.
- Substrat Tamponu: 0, 027 gram $ZnCl_2$, 0,04 gram $MgCl_2$ ve 1,5 gram glisin 200 ml dH_2O içerisinde çözülerek pH: 10, 4' e KOH yardımıyla ayarlandı.
- ELISA aşamasında substrat çözeltisi; 1 mg/ml para-nitrofenil fosfat, substrat tamponunda çözdürülürerek kullanılacağı zaman taze olarak hazırlandı.

Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

- DMEM Hazırlanması: 13, 36 gram DMEM, 2 gram Sodyum Bikarbonat ve 5, 96 gram HEPES 1 litre otoklavlanmış dH2O içerisinde çözdürüldü. Çözelti pH' ı NaOH ile 7,2' ye ayarlandıktan sonra hücre kültüründe kullanılmadan önce vakum filtrasyon sistemi ile süzülmesi gerçekleştirildi.
- Farklı hücrelerin büyüme medyumlarının hazırlanması amacıyla 80 % DMEM, 20 % FBS, 50 µg/ml Gentamicin, %10 FBS, %90 DMEM, 50 µg/ml Gentamicin veya %5 FBS, %95 DMEM, 50 µg/ml Gentamicin ile taze hazırlandı.
- PEG Hazırlanması: 2 gram PEG, 1 ml PBS, 1ml dH_2O içerisine hazırlandı. Füzyondan önce otoklavlandı. 37^oC' de muhafaza edildi.

- HAT medyumu için %2' lik (40ml/L) HAT (50x) büyüme medyumuna ilave edildi.
- HT medyumu için %2 HT (50x) (20ml/ l) büyüme medyumuna eklendi.
- Dondurma Medyumu: % 20 FCS, %80 DMEM ve %10 Dimetil Sülfoksit (DMSO) eklenerek hazırlandı.

Antikorların Saflaştırılması İçin Gerekli Çözeltilerin Hazırlanması

- Antikorların çöktürme işlemi için doymuş Amonyum Sülfat çözeltisi hazırlandı. Bu amaçla belirlenen miktarda çözelti için dH_2O içerisine çökme gözlenene kadar amonyum sülfat eklendi.
- Bağlama reaksiyonu için 20 mM Sodyum Fosfat tamponu hazırlandı.
- Elüsyon tamponu için 0,1 M Glisin hazırlanıp, pH' ı HCl ile 2,7' ye ayarlandı.
- Denge tamponu 1M Trisma Base ile hazırlanıp, pH' ı HCl ile 9' a ayarlandı.

Tüm çözeltiler kullanılmadan önce ultrasonik banyoda degaze edildi.

3.2.2 Kullanılan Yöntemler

3.2.2. 1 Jel Elektroforezi ve İmmünblotlama

Jellerin Yürütülmesi

Proteinler 4X Laemmli Buffer ile uygun seyreltme yapıldıktan sonra hazırlanan jele yüklendi. Protein nativ halinde bırakılacaksa yalnız Laemmli Bufferına alındı. Denatürasyon yapılacaksa Laemmli buffer içerisine beta merkaptoetanol eklemesi gerçekleştirildi. Ardından 95^oC' de 3 dakika inkübasyonu yapıldı. Hazırlanan jeller elektroforez sistemine alındı ve uygun miktarda tank tamponu eklendi. 90V' ta proteinlerin üst jeli geçmesinin ardından güç kaynağı 120 V' a alındı ve belirlenen yere kadar proteinlerin yürütülmesi gözlendi.

Gümüş Boyama

Fiksleme Tamponunun 1 saat ya da gece boyu çalkalayıcıda inkübasyonu gerçekleştirildi. 3 kez herbiri 20'şer dakika olacak şekilde %50 EtOH ile yıkamanın ardından jel 1 dakika boyunca ön muamele tamponunda muameleye bırakıldı. Ardından 3 kez 20'şer saniye dH_2O ile jel yıkandı. 20 dakika boyunca bant fiksleme solüsyonunda jel çalkalayıcıya alındı. Ardından jel 2 defa 20 saniye boyunca dH2O ile çalkalamaya alındı. Geliştirme aşaması protein bantları görünene kadar yapıldı.

Ardından 2 kez 2' şer dakika boyunca jeller dH_2O ile yıkandı. Geliştirmenin durması için 10 dakika boyunca jel durdurma tamponunda inkübe edildi. Jel görüntüleri tarama ardından değerlendirildi.

İmmünblotlama

İmmunblotlama uygulaması için yürütülen SDS- PAGE jeller Transblot cihazında transfer tamponu yardımıyla PVDF membrana geçirildi. Ardından bu membran TBS tamponu ile 30 dakika, 37^oC de dengelendi ve bir gece +4 ºC de %1' lik süt çözeltisinde bloklandı. Ertesi gün 3 kez TBS Tween ile yıkanan membran TBS içinde 1/1000 oranında sulandırılan uygun ticari monoklonal ve elde ettiğimiz poliklonal antikorlar ile 1 saat oda sıcaklığında muamele edildi. 3 kez 15' er dakika TBS- T solüsyonuyla yıkamanın ardından 1/ 2500-1/5000 dilüsyonda hazırlanmış alkalen fosfatazla işaretlenmiş anti-fare-polivalent ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Membranlar 3 kez 15' er dakika TBS- T ile son olarakta 1 kez 5 dakika TBS ile yıkandı. Yıkamalar sonunda membran, substrat solüsyonu içerisine konarak 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi ve değerlendirmeleri yapıldı.

3.2.2.2 İmmünizasyonlar

Antijenlerin hazırlanması ve fare- tavşan immünizasyonu

Toplamda 6 seride immünizasyon gerçekleştirildi. Herbir seride 4-5 adet 6- 8 haftalık Balb C tipi dişi fareye 14 günde bir immünizasyon yapılacak şekilde planlama yapıldı. İlk seride farelere Prospec antijeni 50µg verildi. Diğer 5 seride RayBiotech' ten alınan IRT2 antijeni ise 3 farklı konsantrasyonda (5, 25 ve 50µg)ve 14 günde bir olacak şekilde deri altından enjekte edildi. İlk immunizasyon Complete Freunds' adjuvanı ile yapıldı. Ardından gelen diğer tüm immünizasyonlar incomplete Freunds' adjuvanı ile yapıldı. Adjuvan ile PBS içerisindeki antijenin karışımı 1: 1 olacak şekilde hesaplandı. Fare işaretlemesi işleminde kulağı işaretsiz fare (NK), sağ kulağı işaretli fare (SaK), sol kulağı işaretli fare (SoK), her 2 kulağı da işaretlenmiş fare (SSK) ve sağ kulağı V şeklinde işaretlenmiş fareler (SaVK) oluşturuldu. Fareler füzyona alınmadan önce rapel immünizasyonları füzyondan 4 gün önce intravenöz olacak şekilde uygulandı. Son rapel immünizasyonunda antijen yalnız PBS içerisinde çözündürülerek farelere verildi. Rapel immünizasyonlarındaki antijen miktarı normal koşullarda belirlenen antijen miktarının yarısı olacak şekilde uygulandı.

Tavşan immünizasyonlarında RayBiotech firmasından alınan IRT2 antijeni 150 µg doz olacak şekilde hayvana uygulandı. İmmünizasyonlar 14 günde bir tekrarlanırken, antikor titre tayini için kan örnekleri her immünizasyondan 10 gün sonra alındı. İlk immunizasyon bağışıklık sisteminin daha güçlü uyarımını sağlamak amacıyla adjuvan yapıyla beraber öldürülmüş *Mycobacterium tuberculosis* içeren Complete Freunds' adjuvanı ile 1:1 karıştırılmış örnekle yapıldı. Ardından gelen tüm immünizasyonlar *Mycobacterium* içermeyen incomplete Freunds' adjuvanı ile yapıldı. Alınan kan örnekleri hazırlanan sodyum sitrat çözeltisine alınıp, santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı serum olarak alınıp ilerideki deneyler için –20°C' de saklandı.

İmmün Yanıt Kontrolü

Fare ve tavşan immün yanıtlarının kontrolü için indirek ELISA yöntemi kullanıldı. Kaplanacak plaklardaki antijen miktarının optimizasyonu sonucunda kuyucuk başına 100 ng IRT2 antijeni kaplandı. Farenin kuyruk ucu etanol uygulaması ardından çok az kesilerek kanı alındı ve 15 µl sodyum sitrat çözeltisine ilave edildi. Yaklaşık 2 dakika boyunca maksimum hızda santrifüj edildikten sonra elde edilen serum dolaylı ELISA ile test edilene kadar -20ºC'de saklandı. 96 Kuyu; 100 µl, 100 nanogram antijen çözeltisi ile (PBS ile dilüe edilmiş) kaplanıp gece boyu +4°C'de bekletildi. Kuyular 3 defa yıkama tamponu ile yıkandı. Kuyular 300 µl PBS ile seyreltilmiş %1'lik yağı alınmış süt tozu çözeltisi ile bloklandı ve 1 saat +37°C'de veya 2 saat oda sıcaklığında bekletildi. Kuyular 3 defa yıkama tamponu ile yıkandı. 100 µl, 1/100, 1/1000 ve 1/5000 dilue serumlar (PBS ile) yüklendi ve 1 saat +37°C' de bekletildi. Kuyular 3 defa yıkama tamponu ile yıkandı. 100 µl, 1/2000 oranında (PBS ile dilüe edilmiş) Alkalen fosfataz enzimi ile işaretli keçide geliştirilmiş anti fare polivalenti eklenerek 1 saat +37°C'de bekletildi. Kuyular 5 defa yıkama tamponu ile yıkandı. Substrat tamponuna, 1 mg/1ml oranında substrat (p-nitrophenyl fosfat) konularak her kuyuya 100 µl ilave edildi. Ardından karanlıkta ve oda sıcaklığında 30 ve 60 dakika inkübe edilip 405 nm'de ELISA okuyucusunda absorbansları okutuldu.

Antijen Kaplama Optimizasyonu

Bu amaçla dolaylı (indirek) ELISA) yöntemi kullanıldı. Bu deneyin yapılması amacıyla plaklar 1 gece öncesinden 10, 50, 100, 250 ve 500 ng Raybiotech antijeni / kuyu olacak şekilde belirlenen antijenle kaplandı. Gece boyu bekletilen plaklar plak yıkama solüsyonuyla 3 kez yıkandı ve ardından 2 saat boyunca oda sıcaklığında bloklama

solüsyonunda inkübe edildi. İnkübasyon ardından 3 kez yıkanan plaklara antikor olarak poliklonal fare serumu 1: 100, 1: 500, 1: 1000, 1: 5000 ve 1:10000 dilüsyonlarda hazırlanarak kullanıldı. 1 saat boyunca 37 ^{o}C'de inkübe edilen örneklere ikincil antikor olarak 1: 2000 oranında polyvalent eklendi. 1 saat 37 ^{o}C'de inkübasyonun ardından 5 kez yıkanan plaklara 1mg/ ml olacak şekilde karanlıkta substrat eklenmesinin ardından 30 dakika ve 60 dakikalık süreçlerde 405 nm' de spektrofotometrik olarak okumalar gerçekleştirildi. Sonuçlar pozitif ve negatif kontrollerde göz önüne alınarak değerlendirildi.

3.2.2.3 Hücre Kültürü

Dondurulmuş Hücrelerin Açılması

-196°C'de sıvı azot tanklarındaki dondurulmuş hücreler; 37°C'de çözülerek üzerine önceden hazırlanmış uygun sıcaklıktaki PBS' in eklenmesinin ardından santrifüj tüplerine alındı. 1000 rpm' de 7 dakika tüpler santrifüj edildi. Ardından çöken hücreler %10 FBS içeren hücre besi yeri ile birlikte T25 içerisindeki hücre kültürü ortamına alındı.

Hücrelerin Sayımı

PBS yardımı ile yıkanan ve belli bir hacimde steril santrifüj tüpünde mevcut olan hücrelerden mikro pipet yardımı ile 10-20 µl alındı. 1:1 oranında tripan blue ile seyreltme ardından hemositometreye dikkatlice konularak 25 kareye düşen hücre miktarı sayıldı. 10^4 X hücre hacmi (ml) X sayılan hücre miktarı kullanılarak hücre sayısı hesaplandı ve ardından uygulamaları yapıldı.

Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler belli bir çoğalma evresinden sonra hücre kültür kabından kaldırılarak yıkama işlemi gerçekleştirilir. Bu amaçla, sararan hücre kültür üst sıvısı steril bir kaba alındı. Kültür şişesine, yüzeyini kaplayacak oranda PBS tamponu ilave edildi. Scraper yardımı ile hücreler nazikçe kazınarak PBS tamponu ile birlikte santrifüj tüpüne alındı. 1000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. İki kez yıkama işleminden sonra pelletteki hücrelere %10 FBS içeren besiyerinin eklenmesinin ardından hücreler yeni kültür kabına alındı.

Hücrelerin Dondurulması

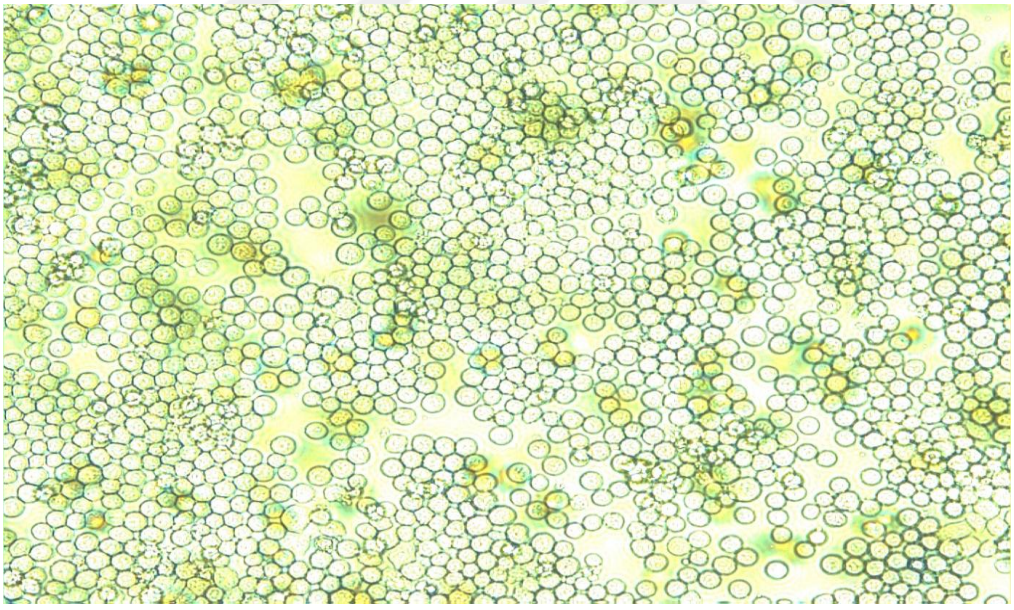
Hücrelerin uzun süre muhafaza edilmesi amacıyla dondurma işlemi gerçekleştirilir. Bu amaçla hücreler yıkama işlemine alındıktan sonra, hücre pelleti dondurma medyumuna

alındı. her bir dondurma tüpünde 1.5 ml olacak şekilde pipet yardımıyla dağıtıldı. Hücreler dondurma medyumuna alınarak her bir dondurma tüpünde $1x10^6$-$5x10^6$ hücre/1,5 ml olacak şekilde dağıtıldı. Dondurma tüpleri önce 1 saat -20^oC' de bekletildi. Ardından –80^oC' ye alınan hücreler, bir gece -80°C' de bekletildikten sonra uzun süre saklanabilmeleri için -196^oC sıcaklığındaki sıvı azot tanklarına kaldırıldı.

3.2.2.4 Füzyon Çalışmaları

Myeloma Hücrelerinin Füzyona Hazırlanması

Füzyondan yaklaşık 14 gün önce Fo (CRL- 1646, ATCC) hücreleri açıldı ve morfolojileri ile durumları kontrol edildi (Şekil 3. 1). Füzyondan 10 gün önce, myeloma hücrelerinin besi yerine Azoguanin (20 µg/ml) ilave edilerek HGPRT mutantı olan hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Füzyon günü, üst sıvısı dökülen hücreler pasajlanarak 2 kez 7 dakika 1000 rpm'de santrüfüj edilerek yıkanıp, füzyon sırasında myeloma/dalak hücresi oranı belirleyebilmek için Fo hücre sayım işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 3. 1 Füzyondan önce açılan F0 hücreleri (20X)

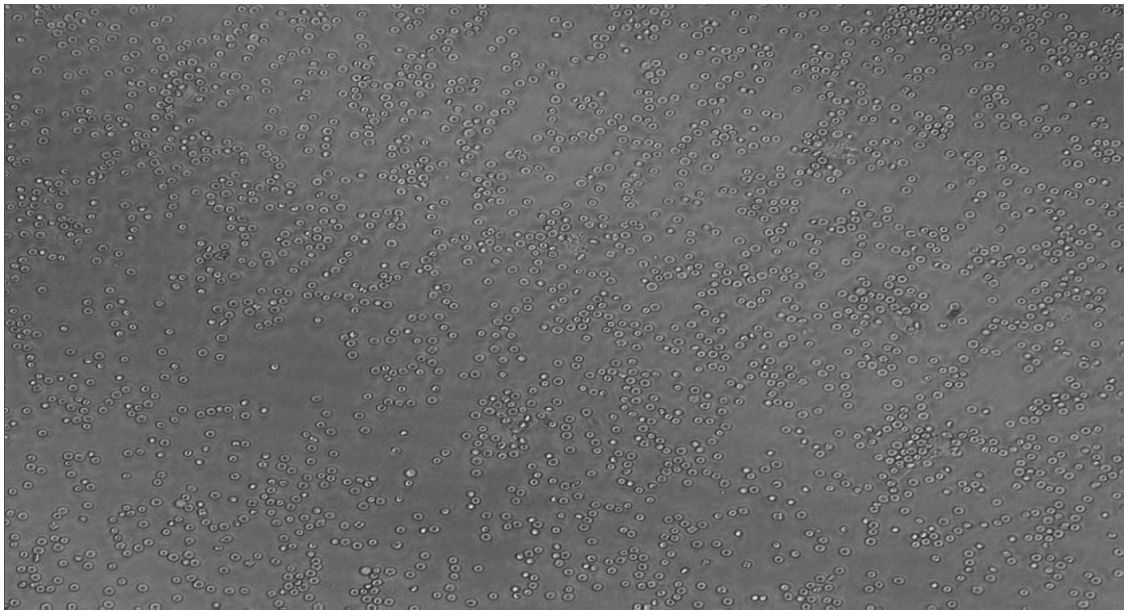
Besleyici Hücrelerin Füzyona Hazırlanması

Füzyondan bir gün önce hibrit hücrelerin gelişimi için immünize edilmemiş herhangi bir fare servikal dislokasyon ile öldürülüp, içinde % 70 etil alkol bulunan behere alındı. Laminar akımlı kabinde strafor üzerinde fare sırt üstü toplu iğne ile sabitlendi (Şekil 3. 2). Tam karnının üzerinden pens ile tutarak yukarı ve yanlara doğru kesiler yapılarak,

bacaklarından ve kuyruğundan tutarak farenin derisi yukarı doğru yüzüldü ve peritonu zarar görmeden açığa çıkarıldı. 5 cc'lik enjektör ile 5 ml sadece DMEM besi yeri peritondan içeriye dikkatlice verildi. İlk etapta girdiğimiz yerden çekebildiğimiz kadar DMEM besi yeri geri çekildi. %80 DMEM, %20 FCS ve 50 µg/ml gentamisin içeren besi yerine elde ettiğimiz hücre karışımlı DMEM ilave edilerek her bir kuyuda 100 µl olacak şekilde, hücreler çoklu pipet yardımı ile 96 kuyuluk hücre kültür plaklarına dağıtıldı. Hücrelerin morfolojileri ve yoğunlukları mikroskopta kontrol edildi (Şekil 3. 3).



Şekil 3. 2 Laminar akımlı kabinde strafor üzerine sabitlenen Balb/ c fare



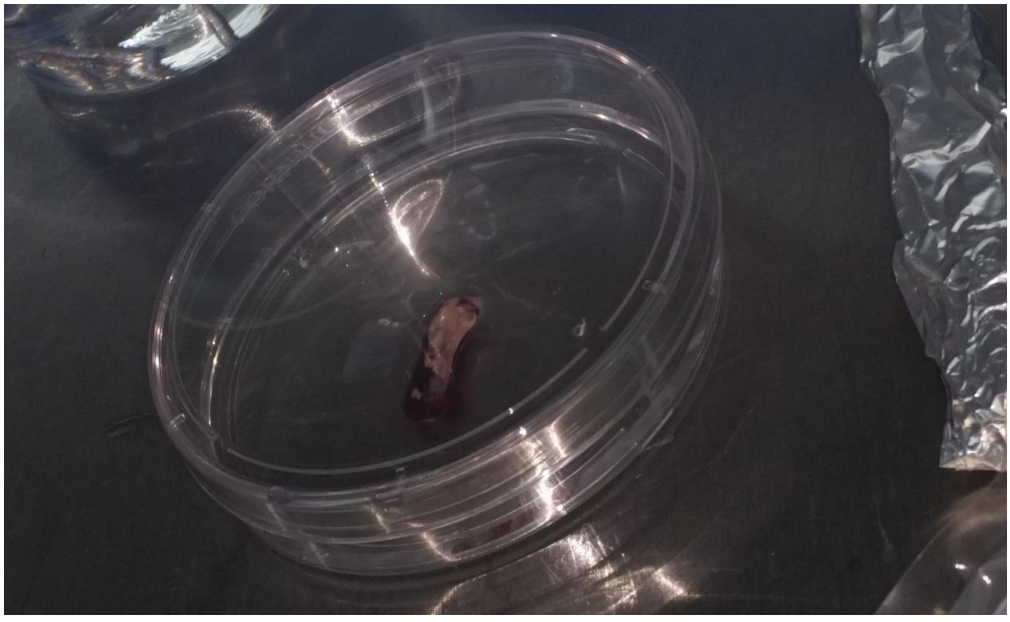
Şekil 3. 3 Besleme amaçlı alınan feeder hücrelerin 96' lık plaklara alındıktan sonraki görüntüsü (10X)

Bağışıklanmış B hücrelerinin füzyona hazırlanması

İmmünizasyonlar sonucunda dolaylı ELISA yöntemiyle en yüksek yanıt aldığımız fare servikal dislokasyon ile öldürülüp, içinde %70 etil alkol bulunan behere alındı. Laminar akımlı kabinde strafor üzerinde fare sırt üstü toplu iğne ile sabitlendi. Tam karnının üzerinden pens ile tutarak yukarı ve yanlara doğru kesiler yapıldı. Peritonu keserek sol tarafından dalağı açığa çıkarılarak alındı (Şekil 3. 4).



Şekil 3. 4 Peritonu kesilerek dalağı alınmakta olan bir Balb/c fare



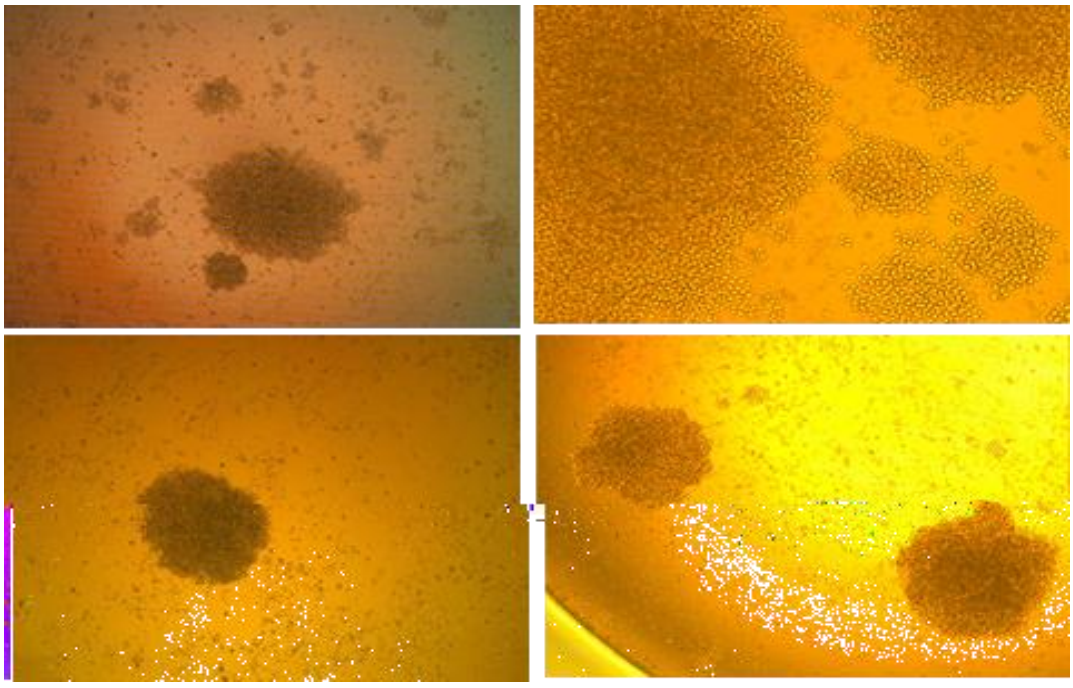
Şekil 3. 5 IRT2 ile immünize edilmiş Balb/C fareden içerisinde steril PBS bulunan steril petriye alınan dalak

Yağlarından ayrılan dalak, içerisinde PBS tamponu bulunan steril petride (Şekil 3. 5) süzgeç ve baget yardımı ile ezildi. Elde edilen hücreler süspanse edilerek santrifüj

tüpüne alınıp, 2 kez yıkandı ve hemasitometrede sayıldı. Aynı fareden ELISA'larda pozitif kontrol amaçlı üzere kalbinden kan alınarak serumu santrifüjle ayrıldıktan sonra 20°C'de saklandı.

Myeloma ve Bağışıklanmış Dalak Hücrelerinin Birleştirilmesi (Füzyon)

İki kez yıkanan ve sayımları yapılan F0 ve dalak hücreleri 1/10–1/3 oranında olacak şekilde santrifüj tüpünde birleştirildi. 1000 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve kalan pellete, 1dakika içerisinde 1ml PEG yavaş yavaş ilave edildi. Daha sonra 3 dakika içerisinde 3 ml sadece DMEM, 10 dakika içerisinde 20 ml sadece DMEM ilave edildi. Karışım 5 dakika 37°C' deki CO_2 inkübatörde bekletildi. 5 dakika sonunda hücrelerin içerisinde yer aldığı tüp santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı, HAT seçici besi yeri ilave edilerek bir gün önce besleyici hücre alınmış her kuyuya 150 µl/kuyu olacak şekilde multi pipet yardımı ile 96 kuyuluk hücre kültür plaklarına dağıtıldı. Hücrelerin morfolojileri ve olası kontaminasyon durumları bir sonraki gün ve diğer günler içerisinde plaklar kontrol edildi. İlk 10 gün füzyon plakları CO_2 inkübatör de dinlenmeye bırakıldı. Füzyondan sonraki 10. gün hibrit taraması yapıldı (Şekil 3. 6). Hibrit gözlenen kuyulardan 100 µl üst sıvı alındı ve bu kuyulara 100 µl/kuyu HAT seçici besi yeri ilave edildi. 12. gün aynı şekilde HAT seçici besi yeri çekildi ve HT seçici besi yeri ilave edildi. Hücrelerin gelişimine bağlı olarak sonrasında normal besi yerine geçildi.



Şekil 3. 6. füzyondan 10 gün sonra tespit edilen bir hibrit (10X)

3.2.2.5 Hibridoma Kültürü

Hibrit Hücrelerin Takibi

Füzyon plaklarının kuyuları, füzyondan 10 gün sonra invert mikroskop ile hibrit hücre olan kuyuları belirlemek amacı ile tarandı. Hibrit tespit edilen kuyulardaki hücre kültür üst sıvıları, antikor taraması için dolaylı ELISA yöntemi ile test edildi. 96 Kuyu; 100 µl PBS içerisinde hazırlanmış, 100 nanogram IRT2 antijen çözeltisi ile kaplanıp gece boyu +4ºC'de bekletilen plaklar 3 defa yıkama tampon ile yıkandı. Kuyular 300 µl %1'lik süt tozu çözeltisi ile bloklandı ve 1 saat +37 ^{o}C'de veya 2 saat oda sıcaklığında bekletildi. Kuyular 3 defa yıkama tamponu ile yıkandı.100 µl üst sıvı örnekleri kuyucuklara eklendi ve 1 saat +37°C'de bekletildi. Kuyular 3 defa yıkama tamponu ile yıkandı. Kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde, PBS ile hazırlanan 1/2000 oranında alkalen fosfataz enzimi ile işaretli anti fare polivalent yüklendi. 1 saat +37°C'de bekletildi. Kuyular 5 defa yıkama tamponu ile yıkandı. Substrat tamponuna, 1/1 oranında substrat eklenip 100 µl her bir kuyuya yüklendi. 30 ve 60 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletilip 405 nm' de ELISA okuyucusunda okutuldu.

Tek Düşürme (Limited Dilüsyon) Yöntemi

Füzyon sonucu ELISA yöntemiyle IRT2 antijenine karşı özel antikor ürettiği tespit edilen hibrit hücrelerden tek klondan oluşan hücreler elde etmek amacıyla tek düşürme işlemi yapıldı. Bu hücreler daha sonra her bir kuyuya bir hücre düşecek şekilde 100'er µl 96 kuyuluk hücre kültür plaklarına dağıtıldı. Dolaylı ELISA ile 10 gün sonra hibrit çıkan kuyuların üst sıvıları test edildi ve uygun cevabı veren monoklon yeniden tek düşürmeye tabi tutuldu.

İndirekt ELISA Testi ile Çapraz Reaksiyon Kontrolü

IRT2 antijenine karrşı geliştirilen monoklonal antikorların spesifitesini belirlemek amacıyla çapraz reaksiyon testi yapıldı. Çapraz reaksiyon testleri için kuyular 100 ng insan transferrini, insan serum albümini, insan hemoglobini, PAP antijeni ve 1:1000 oranında seyreltilmiş insan serumuyla kaplandı. Gece boyu bekletilen plaklar plak yıkama solüsyonuyla 3 kez yıkandı ve ardından 2 saat boyunca oda sıcaklığında bloklama solüsyonuyla inkübe edildi. İnkübasyon ardından ile 3 kez yıkanan plaklara antikor olarak IRT2 antijenine spesifik yanıt verdiği düşünülen hücre üst sıvıları eklendi. 1 saat boyunca 37 ^{o}C'de inkübe edilen örneklere 1: 2000 oranında polyvalent eklendi. 1 saat 37°C' de inkübasyonun ardından 5 kez yıkanan plaklara 1mg/ ml olacak

şekilde karanlıkta substrat eklenmesinin ardından 30 dakika ve 60 dakikalık süreçlerde 405 nm' de spektrofotometrik olarak okumalar gerçekleştirildi. Sonuçlar pozitif ve negatif kontrollerde göz önüne alınarak değerlendirildi.

Hibridomaların Geniş Ölçekli Üretimi

Hibritlerden yüksek miktarda antikor elde etmek için 96 kuyucuklu plaklardan sırasıyla 24'lü hücre plaklarına, 6' lı plaklara ve T25' lere hücreler alındı. Ardından 75 ve 150 cm^2'lik hücre kültür kaplarından yararlanıldı. Her plak ve kültür kabına geçişte hücre üst sıvılarındaki antikor üretiminin devamlılığını görebilmek için dolaylı ELISA ile antikor yanıtlarına bakıldı.

3.2.2.6 Antikorların Karakterizasyonu ve Saflaştırması

Antikorların İzotipinin Belirlenmesi

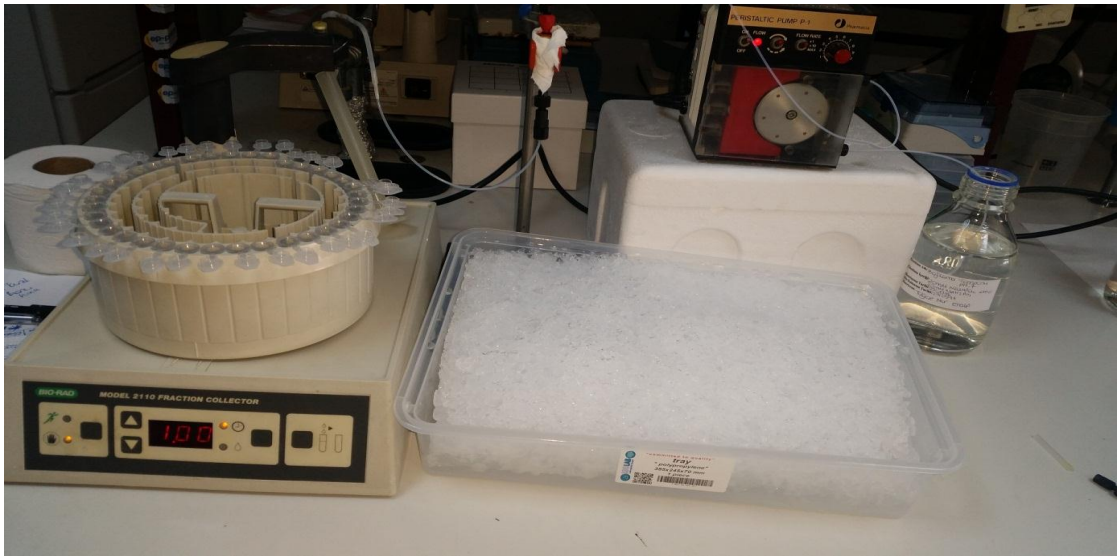
Antikor izotipi belirlenmesi amacıyla Roche isostrip mouse monoclonal antibody isotyping kit kullanıldı. Bu amaçla antikorun olduğu üst sıvı reaksiyon tüpünde 1:100 oranında PBS ile seyreltildi, ardından kitin içerisindeki stripler bu karışım içerisinde 5 dakika inkübe edildi. Bantlar görünür olduğunda örnek tüpünden stripler çıkarıldı ve sonuçlar kaydedildi.

Monoklonal Antikorların Saflaştırılması

Yeterli miktarda monoklonal antikor üreten hücre üst sıvısının toplanmasının ardından saflaştırma çalışmalarına başlandı.

A) **Amonyum sülfat ile çöktürme:** Hibrit üst sıvıları üzerine, hücre üst sıvısının 1,1 katı miktarında doyurulmuş amonyum sülfat çözeltisi +4°C'de manyetik karıştırıcı yardımı ile 60 dakika içerisinde eklendi. 2 saat +4°C'de manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılmaya devam edilerek inkübe edildi. Çözeltinin uygun şişelere alınmasının ardından ultrasantrifüjde 10000 rpm de, +4°C'de, 30 dakika boyunca santrifüj edildi. Pellet PBS yardımı ile çözüldükten sonra 10 mM fosfat tamponu ve 150 mM NaCl içeren PBS'e karşı gece boyu +4ºC'de diyaliz edildi.

B) **İmmünoaffinite Kromatografisi ile Saflaştırılması**: Monoklonal antikorların, serumda bulunan diğer proteinlerden ayrılabilmesi için Protein A bağlı katı faz üzerinde immünoaffinite kromatografisi uygulandı. Kolonun hazırlanabilmesi için kolon hacminin 5 katı kadar bağlama tamponu ile yıkandı (Şekil 3. 7).



Şekil 3. 7 Antikorların saflaştırılması için hazırlanan kromotografi ve kolon düzeneği

Kolon öncesi protein fraksiyonları 10 dakika boyunca 13200 rpm' de santrifüje alındı. Santrifüjden sonraki üst kesim alınarak yükleme için ayrıldı. Ardından bağlama tamponu eklenerek kolon sonrası kesimler fraksiyon cihazından 1,5 ml'lik tüplere toplandı. Tüplerin 280 nm absorbans değerleri spektrofotometre yardımı ile ölçüldü. Spektrofotometrede ölçülen absorbans değeri sıfırı gösterene kadar kolona bağlama tamponu yüklendi. Spektrofotometrede sıfır değeri gözlemlendikten sonra antikoru toplayabilmek için kolona elüsyon tamponu yüklendi. Antikorlar, 75 µl denge tamponu içeren tüplerde 1 ml'lik hacimlerde, 1,5 ml' lik eppendorf tüplere toplandı. 280 nm'de ki absorbans değeri tekrar sıfır değeri verene kadar devam edildi. Son olarak kolon hacminin iki katı hacminde %20 etanol ile yıkandıktan sonra kolon etiketlenerek +4oC'de saklandı. Saflaştırmanın ardından kolon fraksiyonlarıyla, antikor aktivitesi ve antikor elüsyonlarının tespiti amacıyla indirek ELISA yapıldı. Absorbans ölçüm sonuçlarından yola çıkarak konsantrasyon hesaplamaları yapıldı.

Antikorların Liyofilizasyonu ve Ekstinksiyon Katsayılarının Hesaplanması

1 Molar çözeltinin 1cm. lik küvette verdiği absorbans molar ekstinksiyon katsayısı olarak adlandırılmaktadır. Birçok bileşik karakteristik absorbisyon spektrumu verir. Bilinmeyen bir bileşiğin absorbisyon spektrumu bileşiğin kalitatif karakterizasyonunu sağlar. Böylece bileşik saptanabilir. Saflaştırılan antikorlardan konsantrasyonları belirlenen ve yüksek olan fraksiyonlar bir araya toplanıp falkon içerisine alındı ve ağzı parafilmle kapatıldı. Liyofilizatörde gün boyu liyofilizasyonun ardından liyafilizasyon sonlandırılarak örnekler alındı. Liyofilize edilen örneklerden 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1

mg/ml, 0,5 mg/ml, 0, 25 mg/ml, 0,125 mg/ml lik konsantrasyonlarda antikor örnekleri hazırlanarak 280 nm' de absorbansları ölçüldü ve çıkan grafikteki eğimden yola çıkarak ekstinksiyon katsayıları belirlendi.

BÖLÜM 4

DENEYSEL SONUÇLAR

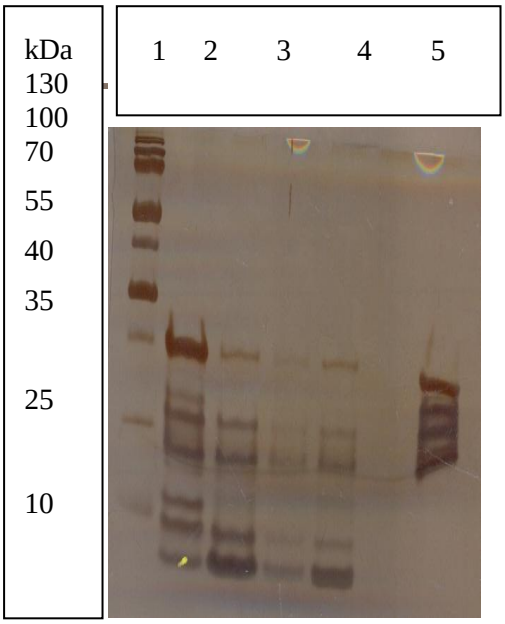
4.1 İmmünizasyonda Kullanılan IRT2 AntijenYapısının İncelenmesi

İmmünizasyon çalışmalarında kullanılan IRT antijeni (Immün Reaktif Tripsin 2) ilk olarak ticari olarak Prospec (Pro-770-b) firmasından temin edildi ve çalışmaların bir bölümü bu antijenle yürütüldü. Sonraki aşamada IRT2 antijeni RayBiotech (228-13214-3) firmasından satın alındı.

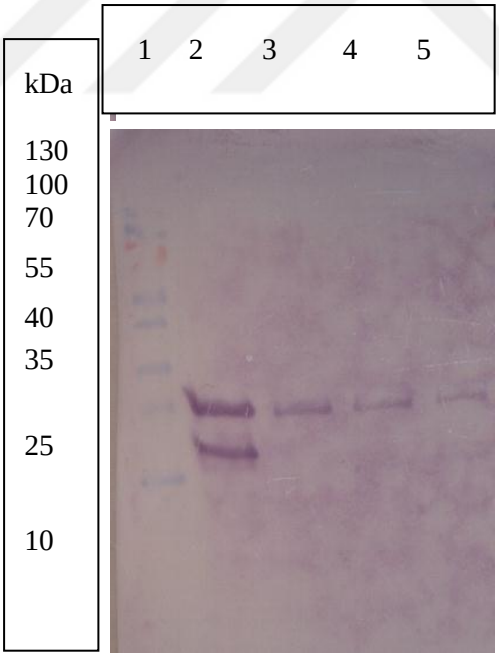
Antijenin otokatalitik bir proteaz olması ve termal koşullardan etkilenme potansiyeli nedeniyle stabilitesinin korunması amacıyla her iki IRT2 antijeni de temininden hemen sonra 1µg/ 1µl olacak şekilde küçük miktarlarda hazırlandı ve ve eppendorflar içerisinde -20°C'de muhafaza edildi.

Antijenin stabilitesinin termal koşullardan etkilenmesi ve otokatalitik bir proteaz olması nedeniyle enzimin stabilitesinin korunması amacıyla deney sırasında kullanılacak stoklar daima -20°C'de saklandı ve bir kez kullanılan antikor sonrasında stabilite değişimini de kayıt altında tutmak amacıyla +4°C' de tutuldu.

İmmünizasyonlara başlamadan önce, Prospec ve RayBiotech firmalarından alınan IRT antijenleri ile yapılan %15 lik Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS PAGE), gümüş boyama ve spesifik antikor varlığında gerçekleştirilen immunblotlama çalışmaları sonucunda Şekil 4. 1 ve 4. 2' deki sonuçlar elde edildi. Marker olarak Thermo Page Ruler Prestained Protein Ladder kullanıldı ve boyama sonrası şekillerde görüldüğü gibi yaklaşık 24 kDa ağırlığındaki IRT antijenlerinin literatürde belirtilen mevcut protein yapı ve özelliklerin de olduğu görüldü. Her iki antjende farklı immünizasyon serilerinde kullanıldı.



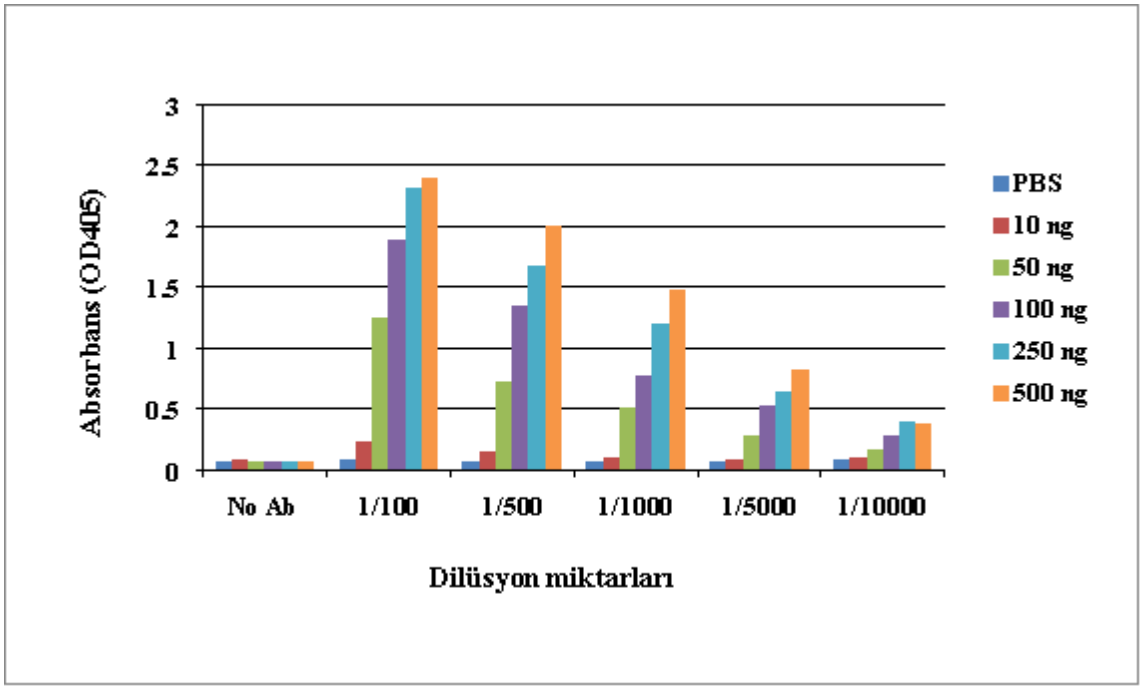
Şekil 4. 1 RayBiotech ve PROSPEC IRT2 antijenlerinin reducing %15 SDS-PAGE' de gösterilmesi (1: Thermo Page Ruler Prestained Protein Ladder, 2: 500 ng RayBiotech+ PEFABLOCK , 3: 500 ng RayBiotech, 4: 750 ng PROSPEC, 5: 1500 ng PROSPEC)



Şekil 4. 2 RayBiotech ve PROSPEC IRT2 antijenlerinin immunoblotlama ile gösterilmesi (1: Thermo Page Ruler Prestained Protein Ladder, 2: 500 ng RayBiotech+ PEFABLOCK , 3: 500 ng RayBiotech, 4: 750 ng PROSPEC, 5: 1500 ng PROSPEC)

4.1.1 Antijen ve Fare Serum Dilüsyonu Optimizasyon Testi

Çalışmalarda kullanılan antijen yapının serumdaki antikor ile en optimal birleşme konsantrasyonunun belirlenebilmesimesi amacıyla ELISA yöntemi kullanılarak antijenin kaplama optimizasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda IRT2 antijen miktarları,ile farklı dilüsyonlara tabi tutulmuş bağışıklanmış fare serumları denenerek antijen optimizasyonu yapıldı (Şekil 4. 3).



Şekil 4. 3 ELISA kaplamalarında kullanılacak antijen miktarının ELISA ile optimizasyonu

Deney sonucunda ELISA plaklarında kaplamada kullanılacak antijen miktarının kuyucuk başına 100 ng IRT2 antijeni olacak şekilde yapılması kararlaştırıldı.

4.2 İmmünizasyonlar-Fare ve Tavşan Sonuçları

IRT2 antijenine karşı monoklonal antikor üretmek amacıyla her seride 4-5 fare olacak şekilde 6 kafesteki farelere, poliklonal antikor eldesi amacıyla da 1 adet tavşana belirtilen şekillerde ve belirtilen aralıklarda immünizasyonlar yapıldı. 6- 8 haftalık Balb-C tipi farelere Prospec antijeni 14 günde bir olacak şekilde 50µg doz olarak uygulandı. RayBiotech firmasından temin edilen IRT2 antijeni ise 3 farklı konsantrasyonda (5, 25 ve 50µg doz) ve 14 günde bir olacak şekilde deri altından enjekte edildi. Farelerin işaretlemesi amacı ile kulağı işaretsiz fare (NK), sağ kulağı işaretli fare (SaK), sol kulağı işaretli fare (SoK), her 2 kulağı da işaretlenmiş fare (SSK) ve sağ kulağı V

şeklinde işaretlenmiş farelerin (SaVK) kulakları makasla işaret bırakılarak gerçekleştirildi.

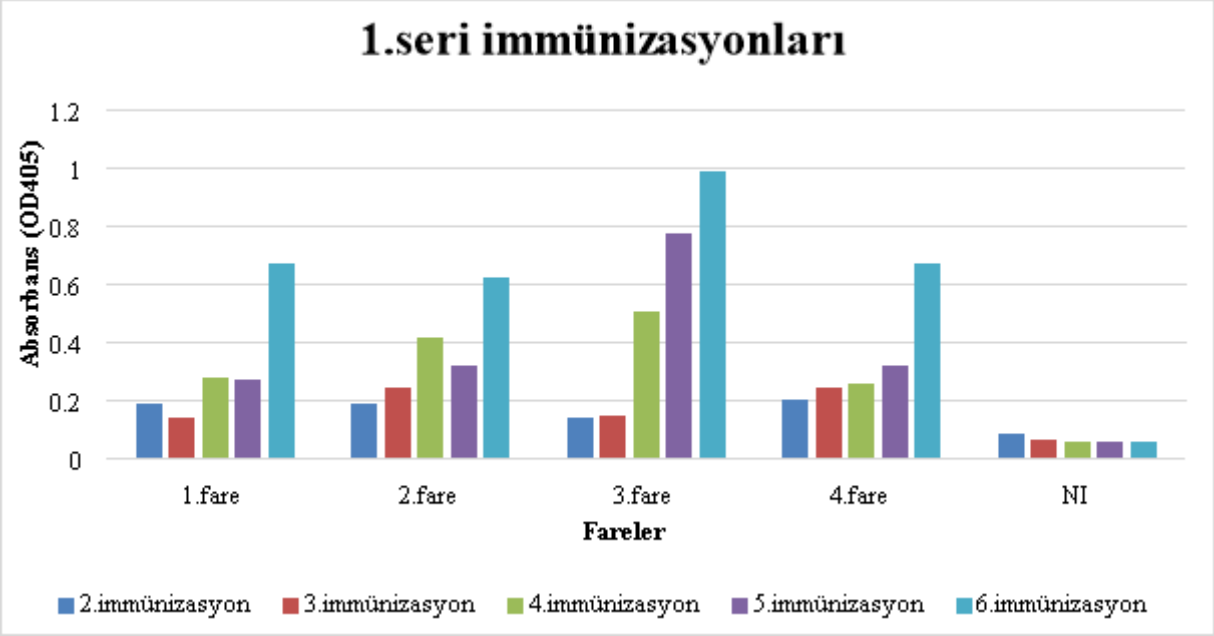
İmmünizasyon için birden fazla farenin bağışıklanmasının bir sebebi de her fareden istenilen düzeyde immünolojik yanıt alınamamasıdır. Dolaylı ELISA yöntemi ile test edilen tüm kafes fareleri arasında kafesteki farelerin yaklaşık yarısı IRT2 antijenine yüksek yanıt verirken, diğerlerinden yüksek antikor yanıtı alınamadı. Kafes ismi, fare sayısı ve belirlenen immünizasyon tarihleri Çizelge 4. 1' deki gibidir:

Çizelge 4. 1 IRT2 ile bağışıklanan farelerin immünizasyon bilgileri

İmmünizasyon Serileri	**1.seri**	**2.seri**	**3.seri**	**4.seri**	**5.seri**	**6.seri**
Antijen	IRT2 (Prospec)	IRT2 (RayBiotech)	IRT2 (RayBiotech)	IRT2 (RayBiotech)	IRT2 (RayBiotech)	IRT2 (RayBiotech)
Antijen miktarı	50 µg	50 µg	50 µg	5 µg	25 µg	50 µg
İmmünizasyon tipi	İntraperitonal	İntraperitonal	İntraperitonal	İntraperitonal	İntraperitonal	İntraperitonal

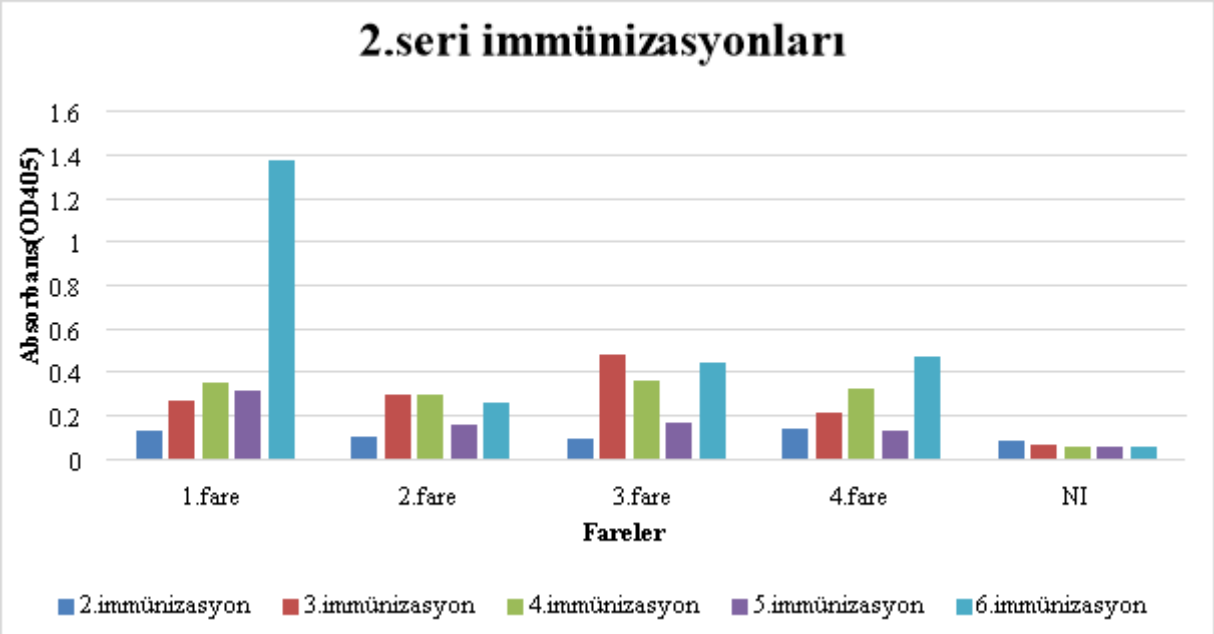
İmmün yanıtların kontrolü için dolaylı ELISA yöntemi kullanılmıştır.

1.serideki fareler PROSPEC antijeniyle bağışıklandırıldı (Şekil 4. 4). Yüksek düzeyde aktivite veren fareler füzyon çalışmalarında kullanıldı.



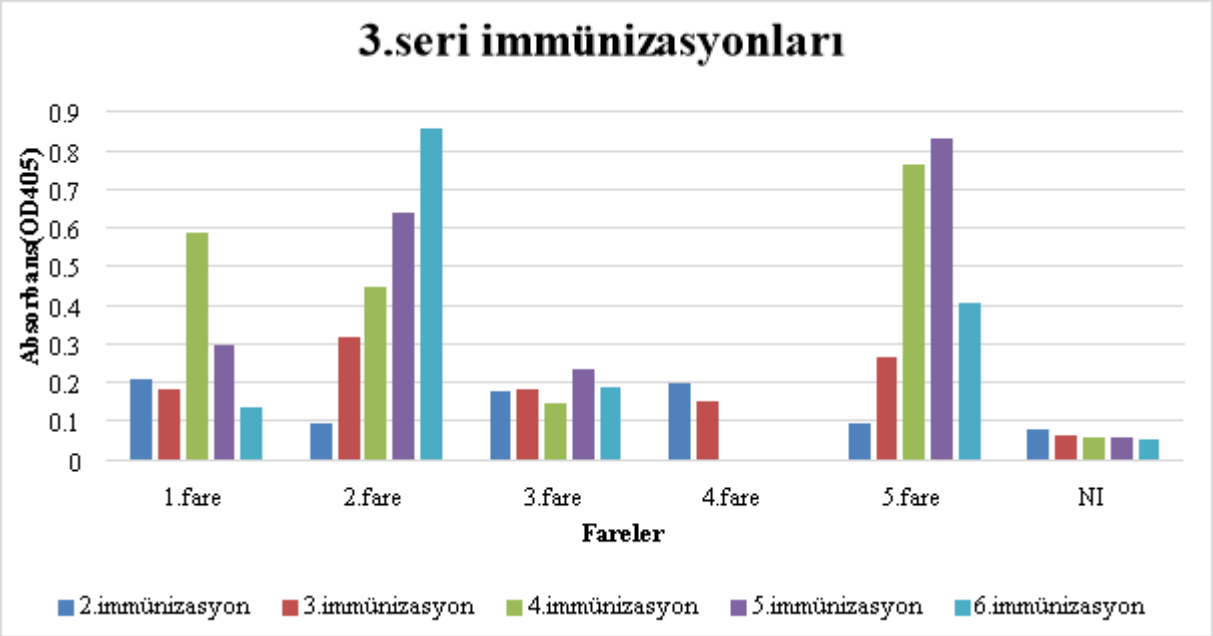
Şekil 4. 4 50 µg Prospec IRT2 ile immünize edilen farelerin ELISA sonuçları. Fare immünizasyon serilerinden elde edilen serumların 1:1000 dilüsyonda kontrol edilmiş ELISA sonuçları (1.fare: SaK, 2.fare: SoK, 3.fare: SSK, 4. fare: NK, NI: Hiç immünize edilmemiş fare)

2.kafesteki fareler 50 µg RayBiotech IRT2 antijeniyle bağışıklandı (Şekil 4. 5). Yüksek düzeyde aktivite veren fareler füzyon çalışmalarında kullanıldı.



Şekil 4. 5 50 µg IRT2 ile immünize edilen farelerin ELISA sonuçları. Fare immünizasyon serilerinden elde edilen serumların 1:1000 dilüsyonda kontrol edilmiş ELISA sonuçları (1.fare: SaK, 2.fare: SoK, 3.fare: SSK, 4. fare: NK, NI: Hiç immünize edilmemiş fare)

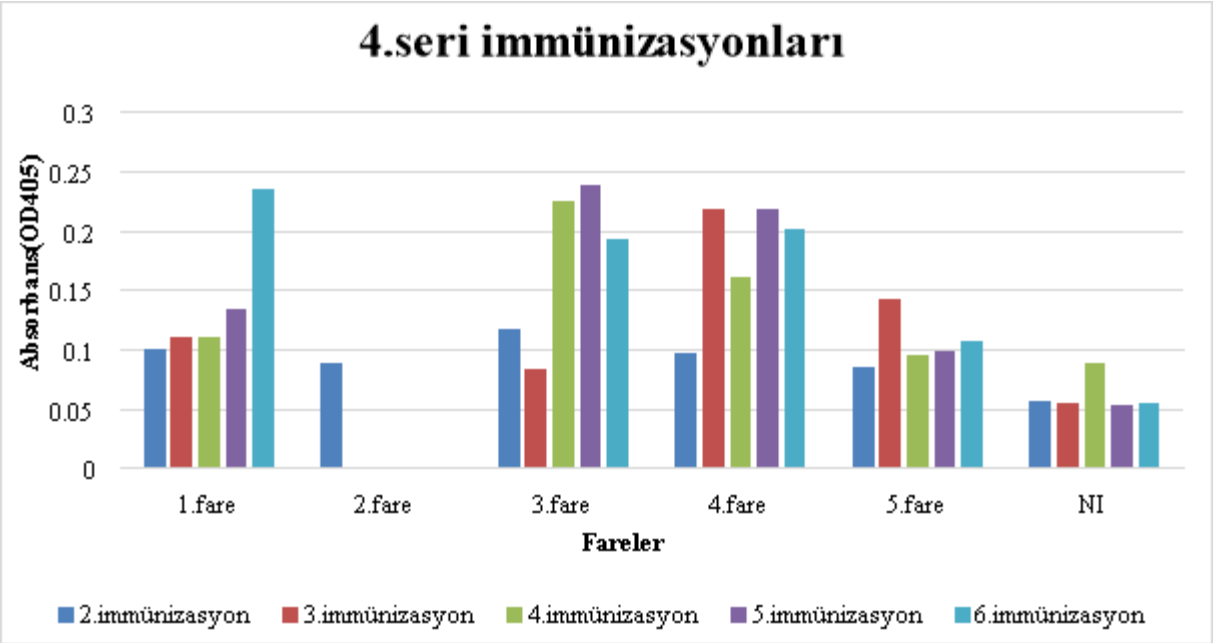
3.serideki fareler 50µg RayBiotech IRT2 antijeniyle bağışıklandı (Şekil 4. 6). Yüksek düzeyde aktivite veren fareler füzyon çalışmalarında kullanıldı.



Şekil 4. 6 50 µg IRT2 ile immünize edilen farelerin ELISA sonuçları. Fare immünizasyon serilerinden elde edilen serumların 1:1000 dilüsyonda kontrol edilmiş ELISA sonuçları (1.fare: SaK, 2.fare: SoK, 3.fare: SSK, 4. fare: NK, 5.fare: SaVK, NI: Hiç immünize edilmemiş fare)

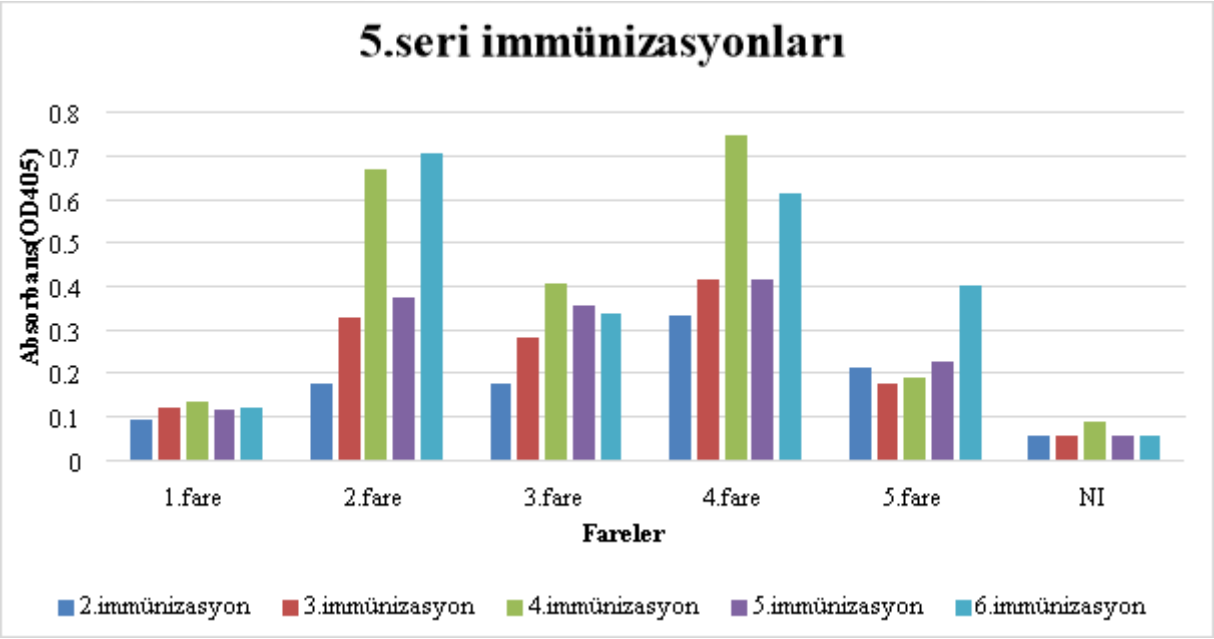
4. kafesteki fareler 5 µg RayBiotech IRT2 antijeniyle bağışıklandı (Şekil 4. 7). Bu seriden beklenen yanıt alınamadığından füzyona alınan fare olmadı.

4.serideki farelerin yanıtları yüksek olmadığından devam edilecek serilerdeki immünizasyonların 25 ve 50 µg' lık dozlarda olması kararlaştırıldı.



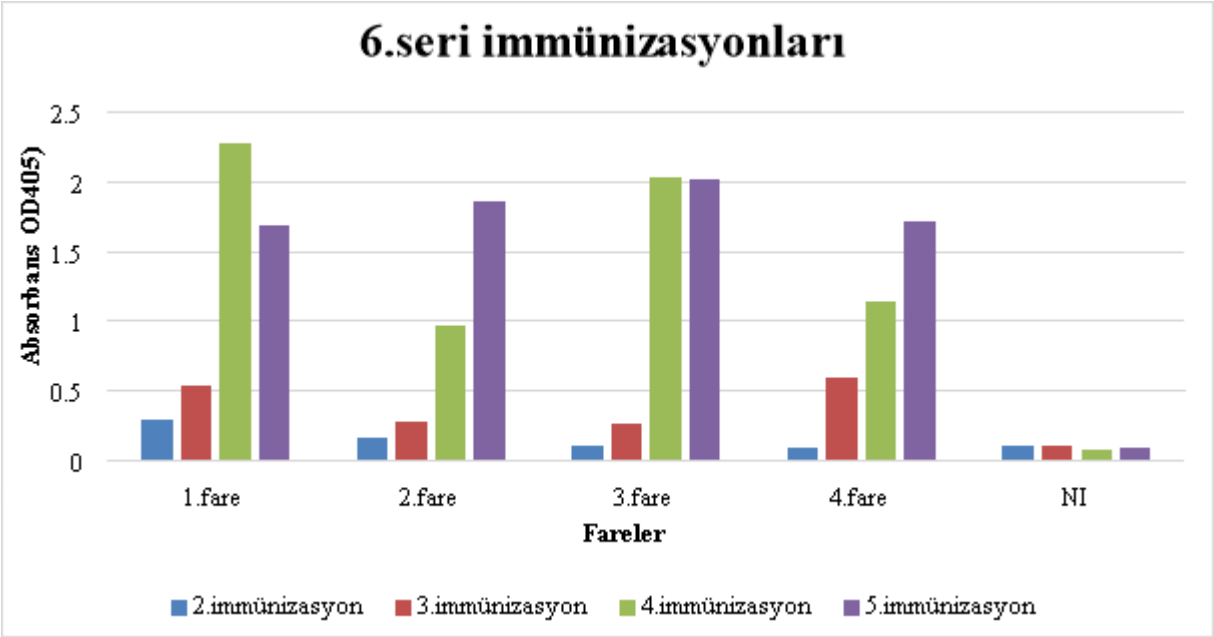
Şekil 4. 7 5 µg IRT2 ile immünize edilen farelerin ELISA sonuçları. Fare immünizasyon serilerinden elde edilen serumların 1:1000 dilüsyonda kontrol edilmiş ELISA sonuçları (1.fare: SaK, 2.fare: SoK, 3.fare: SSK, 4. fare: NK, 5.fare: SaVK, NI: Hiç immünize edilmemiş fare)

5. kafesteki fareler 25 µg RayBiotech IRT2 antijeniyle bağışıklandı (Şekil 4. 8). Bağışıklık yanıtı yüksek olan fareler füzyona alındı.



Şekil 4. 8 25 µg IRT2 ile immünize edilen farelerin ELISA sonuçları. Fare immünizasyon serilerinden elde edilen serumların 1:1000 dilüsyonda kontrol edilmiş ELISA sonuçları (1.fare: SaK, 2.fare: SoK, 3.fare: SSK, 4. fare: NK, 5.fare: SaVK, NI: Hiç immünize edilmemiş fare)

6. kafesteki fareler 50 µg RayBiotech IRT2 antijeni ile bağışıklandı (Şekil 4. 9). Yüksek düzeyde aktivite veren fareler füzyon çalışmalarında kullanıldı.



Şekil 4. 9 . 50 µg IRT2 ile immünize edilen farelerin ELISA sonuçları. Fare immünizasyon serilerinden elde edilen serumların 1:1000 dilüsyonda kontrol edilmiş ELISA sonuçları (1.fare: SaK, 2.fare: SoK, 3.fare: SSK, 4. fare: NK, NI: Hiç immünize edilmemiş fare)

İmmünizasyon grupları sonucunda, fareler içerisinde IRT antijenine karşı en yüksek antikor yanıtı veren fareler dolaylı ELISA metodu ile belirlendi. Grafiklere bakıldığında Raybiotech IRT2 ile yapılan immunizasyonlarla antikor cevaplarının yükseldiği görülebilmektedir. Immunizasyon grupları farklı zamanlarda başlatıldığından, farelerin yaşları da gözönüne alınarak en yüksek yanıt veren fareler sırasıyla füzyon işlemine alındı.

4.2.1 Tavşan İmmünizasyonları

IRT2 antijenlerine karşı tavşanlarda poliklonal antikor geliştirilmesi çalışmaları kapsamında, 3 aylık, 1 adet tavşana, ilgili antijenlerle bağışıklama çalışmaları yapıldı. RayBiotech IRT2 antijeni 150 µg doz olacak şekilde subcutenous olarak tavşanlara uygulandı. İlk immunizasyon da 1:1 oranında antijen ve Complete Freunds' adjuvanı kullanılırken diğer immünizasyonlarda incomplete Freunds' adjuvanı aynı oranda kullanıldı. İmmünizasyonlar iki hafta ara ile gerçekleştirildi. Her immünizasyondan 10 gün sonra toplanan kan örnekleri hazırlanan sodyum sitrat çözeltisine alınıp, santrifüj edildikten sonra serumlar dolaylı ELISA ile test edildi. Serum örnekleri her immünizasyondan 10 gün sonra test edilmiştir. Çizelge 4. 2 'de IRT2 antijeni ile bağışıklanan tavşanın immünizasyon bilgileri yer almaktadır.

Çizelge 4. 2 IRT2 antijeni ile bağışıklanan tavşanın immünizasyon bilgileri

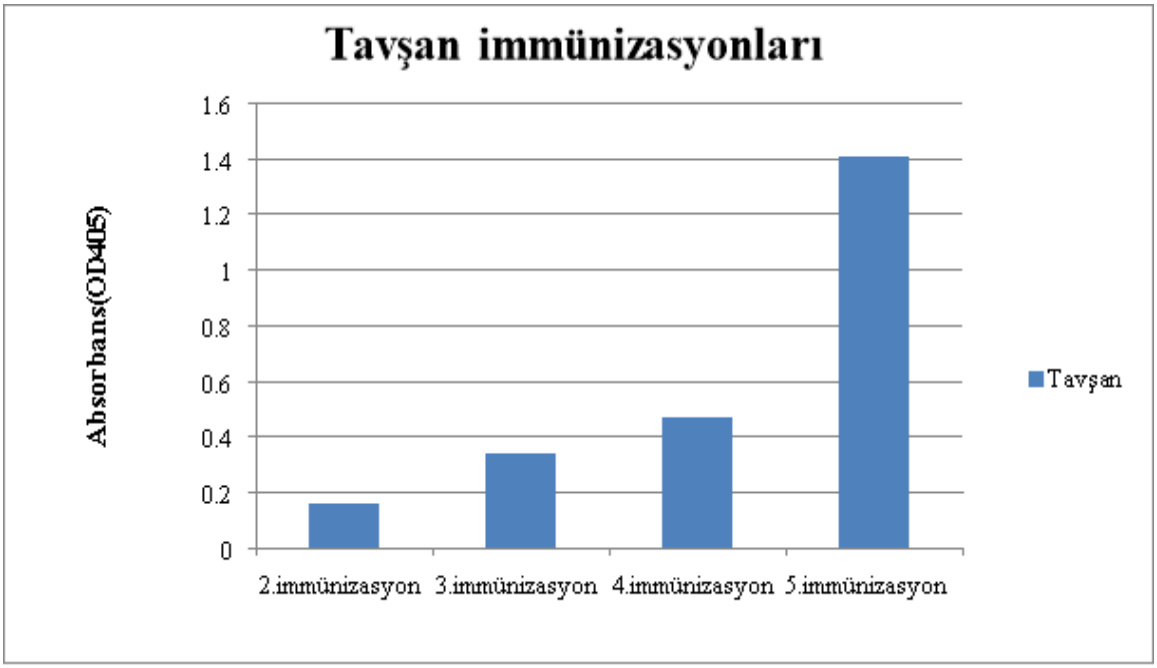
Antijen	**IRT2 (Raybiotech)**
Antijen miktarı	150 µg
Uygulama şekli	Subkutan
1.immünizasyon	27.05.2016
2.immünizasyon	10.06.2016
3.immünizasyon	01.07.2016
4.immünizasyon	22.07.2016
5.immünizasyon	08.08.2016

4.2.1.1 Tavşanın İmmün yanıt kontrolü:

İmmün yanıtların kontrolü için fare immün yanıt kontrolünde de kullanılan dolaylı ELISA yöntemi kullanıldı. Farelerin immun yanıt kontrolü için yapılan ELISA testinden farklı olarak, birincil antikor aşamasında 1:1000 dilue edilen tavşan serumu, sekonder antikor aşamasında 1: 2000 seyreltilerek kullanılan AP işaretli Anti-Rabbit IgG kullanıldı. Karanlıkta substrat eklenmesinin ardından 30 dakika ve 60 dakikalık

süreçlerde 405nm'de spektrofotometrik olarak okumalar gerçekleştirildi. Sonuçlar pozitif ve negatif kontrollerde göz önüne alınarak değerlendirildi.

150 µg IRT2 ile immünize edilen ve 1:1000 dilue edilen tavşan serumlarının ELISA sonuçları Şeki 4.10.'da verilmektedir. Grafikten görüldüğü gibi, 5.immunizasyon sonrasında tavşanda IRT 'ye karşı poliklonal antikor cevabı OD405'de 1,4 seviyelerine ulaşmıştır. ELISA optimizasyon çalışmaları amacıyla tavşanın kanı alınıp ilerideki deneyler için -20oC' de saklandı



Şekil 4. 10 150 µg RayBiotech IRT2 ile immünize edilen tavşanın serumlarının ELISA sonuçları. Tavşan immünizasyon serilerinden elde edilen serumların 1: 1000 dilüsyonda kullanılmasıyla elde edilmiştir

4.3 Füzyonlar

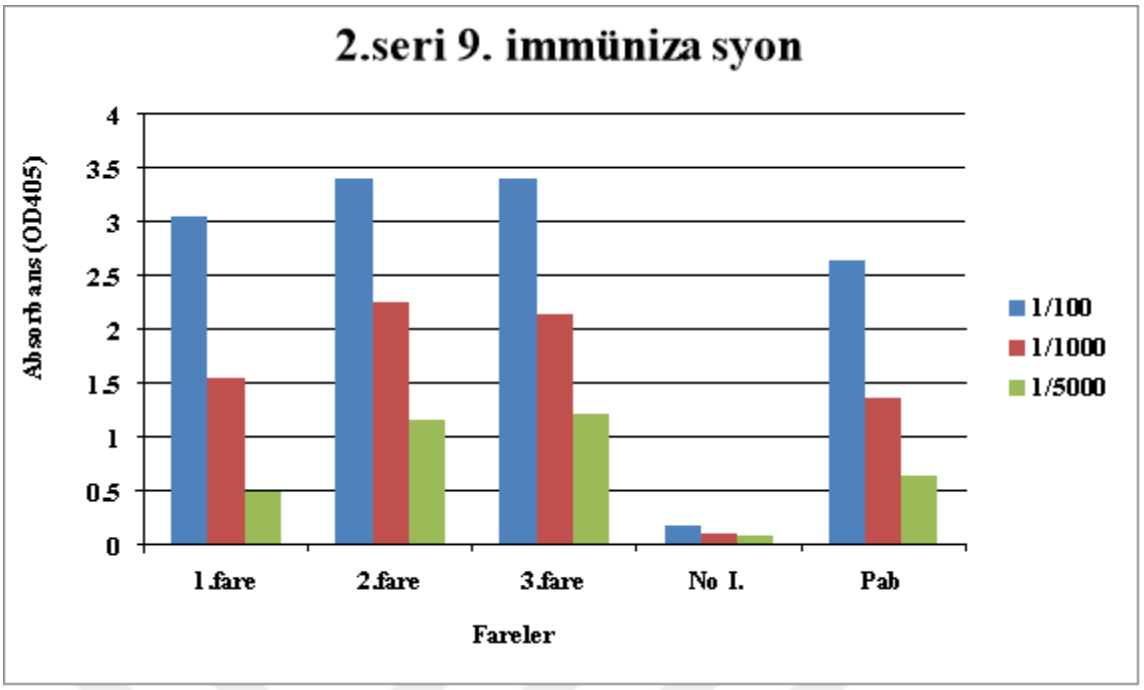
IRT2 ile bağışıklanan fareler arasında, bu antijene en yüksek immün yanıt veren farelerle 7 adet füzyon çalışması gerçekleştirildi. Elde edilen hibritlerin yanıtlarının kontrolü indirek ELISA protokolü ile gerçekleştirildi. Yapılan bütün füzyonlara ait sayısal veriler Çizelge 4. 3'te verilmiştir.

Çizelge 4. 3 Yapılan füzyonlar hakkında genel bilgiler

Füzyon No	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Füzyona seçilen fare	1.seri SSK faresi	1.seri SoK faresi	1.seri NK faresi	2.seri SaK faresi	2.seri SSK faresi	2.seri NK faresi	5.seri NK faresi
Füzyon tarihi	06/10/2015	19/11/2015	04/12/2015	07/04/2016	03/06/2016	30/06/2016	29/07/2016
Dalak hücresi sayısı (Balb/c)	318. 10^6	300. 10^6	175. 10^6	310. 10^6	370. 10^6	580. 10^6	370. 10^6
F0 sayısı (ATCC CRL1646)	155.10^6	154. 10^6	87,5. 10^6	115. 10^6	120. 10^6	127,5. 10^6	120. 10^6
Dalak/ F0 oranı	1/2	1/2	1/2	1/3	1/3	1/5	1/3
Test edilen hibrit sayısı	265	203	378	Kontaminasyon oldu	250	750	91
Antikor aktivitesine sahip hücre sayısı	14	15	9	0	3	12	0
IRT2' ye karşı monoklonal antikor üreten hücre sayısı	0	0	0	0	3	0	0
Elde edilen hibrit hücre hatları	-	-	-	-	3E7, 6E7, 6G7	-	-

4.3.1 5 numaralı füzyon çalışması

2.serideki SSK faresine 9.immünizasyon ardından fare füzyona alındı. Füzyonun bilgileri Çizelge 4. 4' te, füzyona alınan farenin bilgileri ise Şekil 4. 11' de verilmektedir.

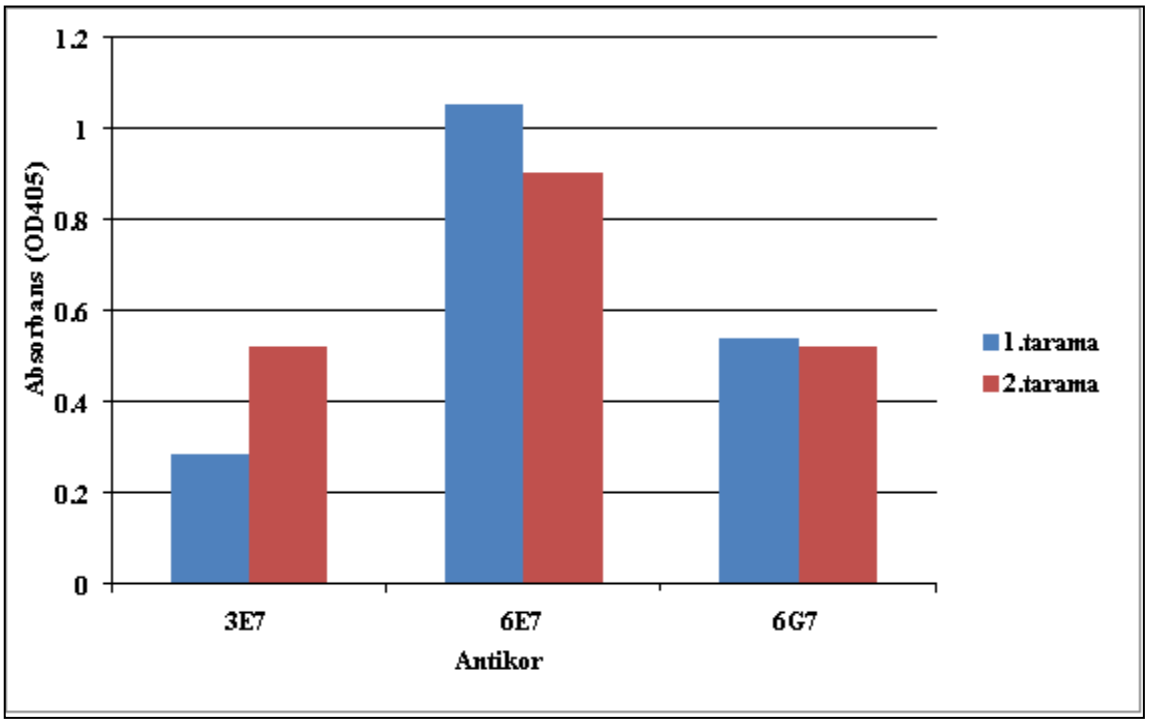


Şekil 4. 11. 5. füzyona alınan SSK faresi ve kafesteki diğer farelerin ELISA sonuçları (1.fare:SoK, 2.fare:SSK, 3.fare: NK, No I: hiç immünize edilmemiş fare; PAb: Poliklonal fare serumu)

Çizelge 4. 4 Beşinci füzyon bilgileri

Füzyona girilen fare	2.seri SSK faresi
Dalak hücre sayısı	370. 10^6
Fo sayısı	120. 10^6
Dalak/ Fo oranı	1/3
Test edilen hibrit sayısı	250
Antikor aktivitesine sahip hibrit sayısı	3
IRT2' ye karşı monoklonal antikor üreten hücre sayısı	3
Elde edilen hibrit hücre hatları	3E7, 6E7, 6G7

IRT2' ye karşı monoklonal antikor üreten hibridoma klonları, daha büyük hücre kültür plaklarına (24 gözlü kostar, 75 cm^2 şişe, 150 cm^2) aktarılarak çoğaltıldı ve herhangi bir kontaminasyon riskine karşı, hızlı bir şekilde dondurularak öncelikle -70ºC'de bir gece bekletildikten sonra -196ºC'de sıvı azot tanklarına kaldırıldı. Bu antikorların yanıtları en az 2 kez kontrol edilmiştir (Şekil 4. 12). Geniş ölçek üretim amaçlı daha büyük kültür plaklarına alındıktan sonra antikor yanıtlarının devamlılığı indirek ELISA ile yeniden kontrol edildi.



Şekil 4. 12 5.füzyon sonucu elde edilen antikorların IRT2 antijenine karşı verdiği cevaplar

Daha da iyi yanıt veren antikorların elde edilebilmesi için füzyon çalışmalarına devam edilmesine karar verildi.

4.3.2 Yapılan Diğer Füzyonlar

1.füzyon sonucunda; 265 klon elde edildi. ELISA testlerinde 14 adet antikor aktivitesi gösteren hibrit bulundu. Tekrarlanan ELISA kontrol çalışmalarında hücrelerin antikor aktivitesini kaybettiği, 1E9 isimli klonun aktivitesini sürdürürken diğer proteinler ve antijen olmayan kuyularla gerçekleştirilen ELISA testlerinde çapraz reaksiyon verdiği gözlendi. Bu füzyon çalışmasında elde edilen hibrit hücrelere ait antikorların IRT2'ye özgün olmadıkları belirlendiği için füzyon çalışmaları diğer farelerle sürdürüldü.

2. Füzyon çalışmasında; 203 klon elde edildi. Elde edilen 15 adet antikor üreten hibritin tekrarlanan ELISA çalışmalarında antikor aktivitesini kaybettiği gözlendi.

3. Füzyon çalışmasında; 378 klon elde edildi. ancak IRT2' ye karşı antikor yanıtı gözlenen 9 hibritte, ilerleyen ELISA çalışmalarında yanıt alınmamaya başlandı. Bu füzyon çalışmasından da beklenilen sonuç elde edilemedi.

4. Füzyon çalışmasında; füzyon çalışması sonrasında hücreler kontrol edildiğinde bakteri kontaminasyonu saptandı ve bu nedenle füzyon devam ettirilmedi.

5. Füzyon çalışmasında; 250 hibrid klon elde edildi. ELISA çalışmalarında bu klonlar arasından antikor aktivitesi gösteren 4 adet hibrid hücre klonu tespit edildi. Bu hücrelerden bir tanesi (1B1) antikor aktivitesini kaybederken, diğer 3 adet hibritin (3E7, 6E7, 6G7) IRT2 antijenine karşı antikor yanıtını sürdürdüğü belirlendi. Yüksek afiniteli farklı özelliklerde antikorların elde edilmesi amacıyla, immun cevabı yüksek fareler kullanılarak füzyon çalışmalarına devam edildi.

6. ve 7. Füzyon çalışmasında, 841 klon elde edildi. ilk ELISA testlerinde bu klonlar arasında 12 tane antikor üreten hibrit hücre belirlendi. Tekrarlanan ELISA testlerinde bir kısmının çapraz reaksiyon verdiği bir kısmınında antikor aktivitesini kaybettiği tespit edildi.

4.4 Elde Edilen Monoklonal Antikorların Karakterizasyonu

4.4.1 Çapraz Reaksiyonların Belirlenmesi

5.füzyon sonrasında elde edilen 3E7, 6E7 ve 6G7 antikorlarının IRT2 antijenine karşı yanıtları ve diğer proteinlere karşı çapraz yanıtları dolaylı ELISA yöntemiyle belirlendi. Kan serumunda serbest halde bulunan IRT2' nin miktarının spesifik olarak kantitatif olarak ölçümü istendiğinden Pankreatitle ilişkili protein (PAP) (100 ng), transferin (100 ng/ kuyu), hemoglobin (100 ng/ kuyu), insan serum albumini (100 ng/ kuyu), ve insan serumu (1:1000 dilüsyon) ile de çapraz reaksiyonlarına bakıldı. Çapraz reaksiyonlara ait veriler Çizelge 4. 5' te gösterilmiştir.

Çizelge 4. 5 Elde edilen antikorların çapraz reaksiyonlarının sonuçları

	PBS	IRT2	PAP	İnsan Serumu	Hemoglobin	Transferrin	İnsan Serum Albumini
6E7	0,109	2,527	0,092	0,205	0,103	0,099	0,106
6G7	0,114	0,825	0,095	0,232	0,091	0,091	0,094
3E7	0,12	0,999	0,104	0,199	0,098	0,099	0,104
*Pab	0,304	2,523	0,427	0,346	0,362	0,336	0,313
**PBS	0,086	0,084	0,077	0,2	0,082	0,097	0,083

*Pab : Fare poliklonal antikoru

**PBS: Fosfat tamponu

Sonuçta elde ettiğimiz her 3 antikorunda test edilen antijenik yapılar içerisinde yalnızca IRT2' ye spesifik olduğu saptandı (Çizelge 4. 5).

4.4.2 Antikor İzotipinin Belirlenmesi

Elde edilen 3 monoklonal antikorun karakterizasyonu çalışmalarında; IRT2 antijenine özgün 3E7, 6E7 ve 6G7 monoklonal antikorlarının immünoglobulin tipleri Roche IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping antikor alt tipi belirleme kiti ile belirlendi. Yapılan çalışmada; 3E7 ve 6G7 isimli monoklonal antikorların immünglobulin tipinin IgG2a, hafif zincirinin ise κ (kappa) tipinde olduğu belirlendi. En yüksek yanıtı aldığımız 6E7 antikorunun immünglobulin alt tipi IgM, hafif zinciri ise κ (kappa) tipinde belirlendi (Şekil 4. 13 ve Çizelge 4. 6).



Şekil 4. 13 3E7, 6E7 ve 6G7' nin İsoStrip
ile belirlenen alt tipleri

Çizelge 4. 6 Elde edilen hücrelerin salgıladığı antikorların izotipleri

Monoklonal antikor	Immünglobülin tipi
3E7	IgG2a, κ
6E7	IgM, κ
6G7	IgG2a, κ

4.5 Elde Edilen Monoklonal Antikorların Saflaştırılması

Monoklonal antikor saflaştırması, konsantre edilmesi ve daha rahat saklanabilmesi amacıyla amonyum sülfat çöktürme ve daha ileri aşama olan Protein-A Immünoaffinite kolonu çalışmaları IgG izotipli antikorlar için yapıldı. Bu amaçla geniş ölçekte üretime geçilen hücrelerin üst sıvıları toplandı. Ardından protein ve antikorları ayırmak için Amonyum Sülfat çöktürme yapıldı. Çöktürme ve diyaliz ile ilgili bilgiler Çizelge 4. 7 ' de verilmiştir.

Çizelge 4. 7 Amonyum Sülfat çöktürme öncesi ve sonrası üst sıvılarla ilgili bilgiler

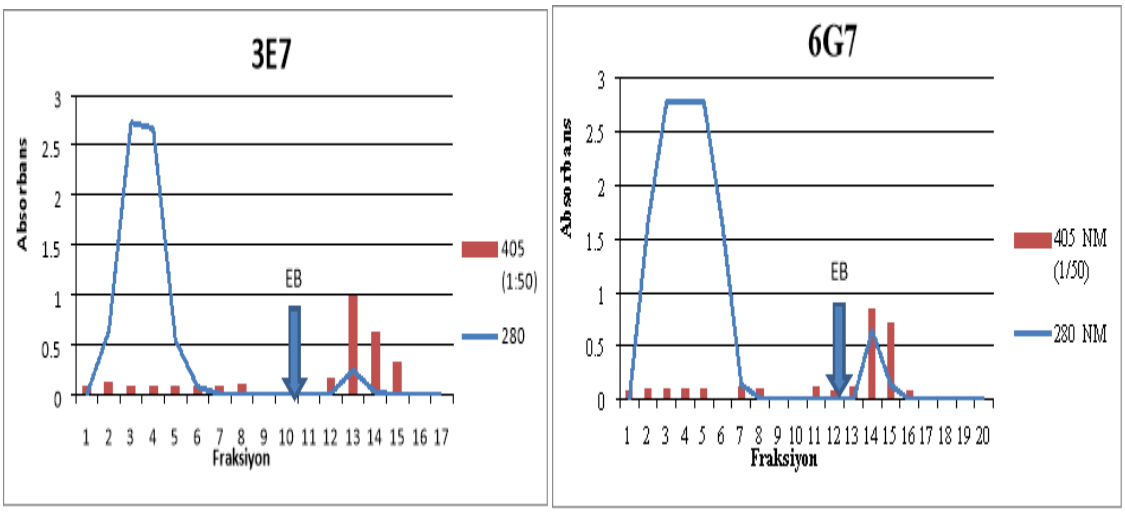
Monoklonal antikor	İlk hacim	Son hacim	Son hacim/ ilk hacim
3E7	150 ml	10 ml	1/ 15
6E7	310 ml	20 ml	1/ 15,5
6G7	145 ml	10 ml	1/ 14,5

IgG2a alt tipine sahip proteinlerin gece boyu diyalizinin ardından 3E7 ve 6G7 monoklonal antikorları Protein A kolonuyla pürifiye edildi. 2 ml ve 4 ml' lik fraksiyonlarla denemenin ardından 6G7 antikoru 3 ml' lik fraksiyonlar halinde saflaştırılırken 3E7 antikoru 2 ml' lik fraksiyonlarla saflaştırıldı. Bağlanma, yıkama ve elüsyon aşamalarının her birinde protein konsantrasyonları 280 nm' de belirlendi. Saflaştırmanın ardından kolon fraksiyonlarıyla, antikor aktivitesi ve antikor elüsyonlarının tespiti amacıyla indirek ELISA yapıldı (Şekil 4. 23).

ELISA sonuçları ve 280 nm' deki konsantrasyonve göz önüne alındığında antikorların saflaştırılabildiği saptandı. Grafiklerde de görüldüğü üzere 3E7 ve 6G7 monoklonal antikorlarının Elüsyon tamponunun kolona yüklenmesinin ardından gelen 3 fraksiyon tüpünde alınabildiği saptandı (Şekil 4. 23).

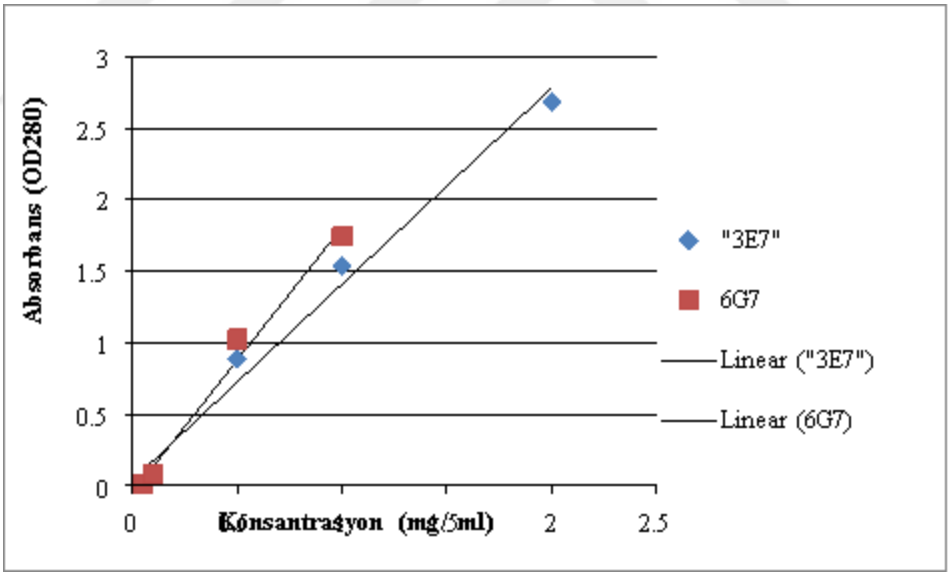
Saflaştırılmış antikorların miktarları 1 mg/ml' de bulunan IgG antikorunun miktarının 1,43 olmasından yola çıkarak hesaplandı (Proteinin absorbansı/ 1,43 (sabit sayı)= 1 ml' deki protein miktarı).

Hesaplama sonucunda 13. fraksiyondaki 3E7 miktarı 0,173 mg/ml iken, 14. fraksiyondaki 6G7 miktarı 0,45 mg/ml olarak bulundu.



Şekil 4. 14 Saflaştırması yapılan IgG2a tipi 3E7 ve 6G7 antikorlarının absorbans sonuçları (EB: Elüsyon tamponu)

Liyofilize edilen örneklerden 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0, 25 mg/ml, 0,125 mg/ml lik konsantrasyonlarda antikor örnekleri hazırlanarak 280 nm' de absorbansları ölçüldü ve çıkan grafikteki eğimden yola çıkarak ekstinksiyon katsayıları belirlendi (Şekil 4. 15).



Şekil 4. 15 Elde edilen antikorların ε değerleri

2 mg/ml ve 4 mg/ml antikor konsantrasyonunda her 2 antikorunda absorbans değeri 3' ün üzerinde çıktığından spektrometrede ölçüm alınamadı. 1 mg/ml ve diğer seyreltmeler üzerinden yola çıkarak belirlenen grafikteki eğime bakılarak ε (molar ekstinksiyon katsayısı) değerleri belirlendi. 3E7 antikorunun değeri 1,369 iken, 6G7 antikorunun değeri 1,89 olarak belirlendi.

İleride yapılan çalışmalarda, işaretlemelerde ve kit denemelerinde ekstinksiyon katsayılarında yararlanılarak antikorların miktarları belirlendi.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Kistik fibrozis otozomal çekinik geçiş gösteren, beyaz ırkta en sık rastlanan genetik hastalıktır. Dünyada prevalansı yaklaşık olarak her 3000 bebekte 1 olarak saptanmıştır. Pankreas, bağırsak, akciğer, ter bezleri ve dış salgı bezleri gibi vücudun birçok önemli sistem ve organını aynı anda etkileyebilen bu rahatsızlıkta, sindirim sistemi ve solunum sistemi kalın ve yapışkan bir mukoza salgısıyla tıkanır [14]. Hastaların ömrünü kısaltan asıl etmense pankreatik ekzokrin fonksiyonların azalmasıyla yetersiz beslenmedir. Hastalığın erken teşhis edilmediği durumlarda etkin tedaviye başlanılmaması sebebi ile hastaların ömrü kısalmakta ve yaşam kaliteleri bozulmaktadır. Hastaların yaşam süresinin ortalama 37 sene ile sınırlandığı da bilinen gerçekler arasındadır [13], [14].

Bu nedenle hastalıkta etkin tedavilerin erken başlatılabilmesi için erken tanının önemi giderek artmaktadır. Bu hastalığın tanısı Amerika, Yeni Zelanda ve birçok ülkede yenidoğan tarama programında uygulamadadır. Tarama programında bebeklerin topuk kanından IRT düzeyleri, bazı ülkelerde ise DNA testi ile gen mutasyonu incelenmektedir. Yeni doğan tarama programında yer almayan kistik fibrozis tanı testi 2015 yılı itibariyle T.C. Sağlık Bakanlığı Yenidoğan Ulusal Tarama Programında zorunlu testler arasına eklenmiştir [11]. Yenidoğan topuk kanı örneklerinde hastalığın taraması için IRT analizlerine başlanmıştır; fakat kistik fibrozisin tanısında kullanılmak üzere geliştirilen tanı kitleri yurt dışından ithal edilmekte ve bu da ülke ekonomisine külfet oluşturmaktadır. Bu sorunları aşmak amacıyla konu ile ilgili ülkemizde yapılan çalışmalar da oldukça yetersizdir. Bu nedenle tümüyle yurt dışından satın alınan, yılda yaklaşık 1 300 000 yeni doğan bebek için yapılacak ve tekrar testleriyle birlikte yaklaşık 2000.000 adete ulaşacak olan IRT test kiti ihtiyacı ülkemiz için çok önemlidir.

Bu tez çalışmasında yerli olarak ilk kez IRT2’ ye karşı monoklonal ve poliklonal antikor üretilmiştir. IRT 2’ ye karşı immunizasyonla beraber hibridoma teknolojisi de kullanılarak

özgün ve yüksek afiniteli ve poliklonal ve monoklonal antikorlar geliştirilmiş, geliştirilen antikorlar saflaştırılıp karakterize edilmiştir.

Hedefe ulaşmak için aşağıdaki çalışmalar gerçekleştirilmiştir;

- Monoklonal antikorların eldesi için; uygun antijenlerin seçimi, fare türünün seçimi, adjuvan seçimiyle birlikte immünizasyon şekli ve miktarı gibi birçok önemli safha mevcuttur. Bu çalışmada B lenfosit donörü olarak dişi Balb/c fareleri, myeloma hücresi olarak da ticari olarak temin edilmiş olan fare kökenli Fo myeloma hücreleri (ATCC CRL1646) seçilmiş ve kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan hem complete hemde incomplete Freunds' adjuvanı güçlü immün sistem uyarıcı özelliği olan, hümoral yanıtı indükleyen ve fare immünizasyonlarında uygun bir adjuvan olarak görülmektedir. Bunun sebebi Freund adjuvanı ile immünize edilen hayvanlarda bu immün cevabın çok uzun süreler korunduğu ve içeriğindeki mikobakteri lizatının T hücrelerini aktifleştirerek B hücrelerinin stimülasyonunu ve olgunlaşmasını indüklediğinin bilinmesidir.
- 6-8 haftalık Balb/c fareleri IRT2 antijenleri ile farklı miktarlarda intraperitonel olarak immünize edilmiştir. Füzyondan önce son hatırlatma amaçlı yapılan immünizasyonlarda ise bağışıklanan miktarların yarısı oranında adjuvan kullanılmadan fareye intravenöz olarak verilmiştir. ELISA sonucunda en yüksek yanıtı verdiği saptanan fareler füzyona alınmıştır. 5. füzyon sonunda IRT2 antijenine karşı en yüksek immun yanıtı veren kuyucuklardaki hücreler seçilmiş ve bu grupların kültürleri genişletilip bir kısmı dondurulmuştur.
- Pozitif sonuç alınan kuyuların tek düşürme çalışmalarında ise IRT2 spesifik monoklonal antikor üretilmesinde ilk olarak hibridoma klonlarının gelişimleri, farelerden alınan peritonel hücrelerle desteklenmiştir.
- Ardından yapılan çalışmalarda IRT2' ye spesifik geliştirildiği düşünülen monoklonal antikorların çapraz reaksiyonlarına bakılmıştır ve antikorların IRT2 antijenine karşı yanıtları en yüksek çıkmıştır. Kistik fibroz tanısında son yıllarda kullanılmaya başlanan PAP belirtecine ve insan kanında ve serumunda bulunan proteinlere karşı her 3 IRT2 antikorununda çapraz reaksiyon vermediği saptanmıştır.
- Bir sonraki çalışmada üretilen antikorların alt tipleri belirlenmiştir. Deney sonucunda 3E7 ve 6G7 klonlarının IgG2a alt tipli, 6E7 antikorunun ise IgM alt tipli olduğu saptanmıştır. Belirlenen izotiplere göre antikorların saflaştırılmasına yönelik çalışmaları yapılmıştır.

- Saflaştırma işlemleri için yüksek miktarda üst sıvı gerekli oluğundan bu hücreler büyük çapta kültüre alınmış ve her seferinde üst sıvıları toplanmıştır. Hücre kültür süpernatantı biriktirilerek amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve protein A afinite kromatografisi gerçekleştirilmişir. Saflaştırma işlemleri sonrası gerçekleştirilen UV spektrofotometre analizlerinde antikor miktarları saptanmıştır.

Sonuçta bu çalışmada ülkemizde ilk kez IRT2 antijenine karşı monoklonal antikor üreten hücre hattı elde edilmiş, kriyoprezervasyonu gerçekleştirilmiştir ve tavşan poliklonal antikorları ELISA tabanlı sistemlerde kullanılmak üzere saklanmıştır.

Ülkemizde IRT2' ye karşı ilk defa elde edilen bu monoklonal antikorlar ileride çeşitli enzimatik ve kemilüminesans ajanlarla konjuge edilerek ELISA sistemlerinde kullanılacaktır.

KAYNAKLAR

[1] Andersen, D.H., (1938). ”Cystic Fibrosis of the Pancreas and its Relation to Celiac Disease- Clinical and Pathologic Study“, American Journal of Disease of Children, 56(2):344-399.

[2] Romeo, G.,Devoto M. ve Galietta L.J.V., (1989). “Why is the Cystic Fibrosis Gene so Frequent?” Human Genetics, 84(1):1-5.

[3] Boucher, R.C., (2007). ”Airway Surface Dehydration in Cystic Fibrosis: Pathogenesis and Therapy”, Annual Review Medicine, 58: 157-170.

[4] Goss C.H., ve Burns J.L., (2007). “Exacerbations in Cystic Fibrosis. 1: Epidemiology and Pathogenesis”, Thorax, 62:360-367.

[5] Greger, R., (2000). ”Role of CFTR in the Colon”, Annual Review of Physiology, 62:467-491.

[6] Jouret, F. ve Devuyst, O., (2009). ”CFTR and Defective Endocytosis: New Insights in the Renal Phenotype of Cystic Fibrosis”, Pflugers Archive,457:1227-1236.

[7] Krysa, J. ve Steger, A., (2007). ”Pancreas and Cystic Fibrosis: the Implications of Increased Survival in Cystic Fibrosis”, Pancreatology, 7:447-450.

[8] Farrell, F.M., Rosenstein, B.J. ve White, T.B., (2008). “Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report”, Journal of Pediatry, 153:4-14.

[9] Ridge, P. G., Miller, C., Bayrak-Toydemir, P., Best, D. H., Mao, R., Swensen, J. J. ve Voelkerding, K. V. (2013). “Cystic Fibrosis Testing in a Referral Laboratory: Results and Lessons from a Six-Year Period”, Journal of Clinical Bioinformatics,3:3.

[10] Baumer, J. (2003). “Evidence Based Guidelines for the Performance of the Sweat Test for the Investigation of Cystic Fibrosis in the UK”, Archives of Disease in Childhood, 88(12):1126–1127.

[11] Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (2015), Yayın No: 67414668/234.01.02, Ankara.

[12] Method Performance for Measuring Immunoreactive Trypsinogen (IRT) in Dried BloodSpots, https://www.aphl.org/conferences/proceedings/Documents/2011/2011_APHL_NBS_Genetic_Testing_Symposium/007-Mei, 1 Ekim 2016.

[13] MacKenzie, T. ve diğerleri, (2014). “Longevity of Patients with Cystic Fibrosis in 2000 to 2010 and beyond: Survival Analysis of the Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry”, Annals of Internal Medicine, 161:233-241.

[14] Cutting, G.R. (2015). “Cystic Fibrosis Genetics: from Molecular Understanding to Clinical Application”, Nature Reviews Genetics, 16:45–56.

[15] Quinton, P.M., (1999). "Physiological Basis of Cystic Fibrosis: a Historical Perspective". Physiological Reviews , 79:3–22.

[16] Welsh, M.J., Ramsey, B.W., Accurso, F. ve Cutting, GR., (2001). Cystic Fibrosis, the Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. 8th edt.,Mc- Graw Hill, New York.

[17] Wang, Y., Wrennall, A.J., Cai, Z., Li, H. ve Sheppard, D.N., (2014). "Understanding how Cystic Fibrosis Mutations Disrupt CFTR Function: from Single Molecules to Animal Models", The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 52:47-57.

[18] Riordan, J.R. ve diğerleri, (1989). "Identification of the Cystic Fibrosis Gene: cloning and Characterization of Complementary DNA", Science, 245:1066-1073.

[19] Bear, C.E., Li, C.H., Kartner, N., Bridges, R.J., Jensen, T.J., Ramjeesingh, M. ve Riordan, J.R., (1992). "Purification and Functional Reconstitution of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR)", Cell, 68:809–818.

[20] Zielenski, J. ve Tsui, L.C., (1995). "Cystic Fibrosis: Genotypic and Phenotypic Variations". Annual Reviews Genetics, 29:777–807.

[21] Ramsey, B.W. ve diğerleri, (2011). "A CFTR Potentiator in Patients with Cystic Fibrosis and the G551D Mutation", New England Journal of Medicine, 365:1663–1672.

[22] Holland, I.B., Cole, S.P.C., Kuchler, K. ve Higgins, C.F., (2003). ABC Proteins: From Bacteria to Man, Academic Press, London.

[23] Gadsby, D.C., Vergani, P. ve Csanády, L., (2006). "The ABC Protein Turned Chloride Channel whose Failure Causes Cystic Fibrosis", Nature, 440:477–483.

[24] Bozoky, Z., Krzeminski, M., Chong, P.A. ve Forman-Kay, J.D., (2013). "Structural Changes of CFTR R Region Upon Phosphorylation: A Plastic Platform for İntramolecular and İntermolecular İnteractions, FEBS Journal, 280(18):4407–4416.

[25] Dawson, R.J.P., ve Locher KP., (2006). "Structure of a Bacterial Multidrug ABC Transporter", Nature, 443:180–185.

[26] Lewis, H.A. ve diğerleri, (2004). "Structure of Nucleotide-Binding Domain 1 of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator", EMBO Journal, 23:282–293.

[27] Linsdell, P., (2006). "Mechanism of Chloride Permeation in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Chloride Channel", Experimental Physiology, 91:123-129.

[28] Bai, Y., Li, M. ve Hwang, T.C., (2010). "Dual Roles of the Sixth Transmembrane Segment of the CFTR Chloride Channel in Gating and Permeation", The Journal of General Physiology, 136:293–309.

[29] Rahman, K.S., Cui, G., Harvey, S.C. ve McCarty, N.A., (2013). "Modeling the Conformational Changes Underlying Channel Opening in CFTR". PLOS ONE, 8:74574.

[30] Cystic Fibrosis Mutation Database, http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/, 10 Ekim 2016.

[31] Rosenstein, B.J., ve Cutting, G.R., (1998). ”The Diagnosis of Cystic Fibrosis: A Consensus Statement”, Journal of Pediatry, 32:589- 595.

[32] Bombieri, C. ve diğerleri, (2011). ”Recommendations for the Classification of Diseases as CFTR-Related Disorders”. Journal of Cystic Fibrosis, 10:86–102.

[33] Sosnay, P.R. ve diğerleri, (2013). “Defining the Disease Liability of Variants in the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene”, Nature Reviews Genetics, 45:1160-1167.

[34] Howard, M., Frizzell, R.A. ve Bedwell, D.M., (1996). “Aminoglycoside Antibiotics Restore CFTR Function by Overcoming Premature Stop Mutations”, Nature Medicine, 2:467–469.

[35] Linde, L. ve diğerleri, (2007). “Nonsense-Mediated mRNA Decay Affects Nonsense Transcript Levels and Governs Response of Cystic Fibrosis Patients to Gentamicin”. The Journal of Clinical Investigation, 117:683–692.

[36] Farinha, C.M., Matos, P. ve Amaral, M.D., (2013). “Control of cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Membrane Trafficking: not just from the Endoplasmic Reticulum to the Golgi”, FEBS Journal, 280(18):4396–4406.

[37] Rowe, S.M., Miller, S. ve Sorscher, E.J., (2005). “Cystic Fibrosis”, New England Journal of Medicine, 352:1992–2001.

[38] Kälin, N., Claaß, A., Sommer, M., Puchelle, E. ve Tümmler, B., (1999).”ΔF508 CFTR Protein Expression in Tissues from Patients with Cystic Fibrosis”, The Journal of Clinical Investigation, 103:1379–89.

[39] Lukacs, G.L. ve diğerleri,(1993). “The -F508 Mutation Decreases the Stability of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in the Plasma Membrane: Determination of Functional Half-Lives on Transfected Cells”. The Journal of Biological Chemistry,268(15):21592– 21598.

[40] Protasevich, I. ve diğerleri,(2010). “Thermal Unfolding Studies Show the Disease Causing F508del Mutation in CFTR Thermodynamically Destabilizes Nucleotide-Binding Domain 1”, Protein Science, 19:1917–1931.

[41] Lewis, H.A. ve diğerleri,(2005). “Impact of the -F508 Mutation in First Nucleotide-Binding Domain of Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator on Domain Folding and Structure”, The Journal of Biological Chemistry, 280:1346–1353.

[42] Lewis, H.A. ve diğerleri,(2010). “Structure and Dynamics of NBD1 from CFTR Characterized Using Crystallography and Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry”, Journal of Molecular Biology, 396:406–430.

[43] Okiyoneda, T. ve diğerleri,(2013).”Mechanism-Based Corrector Combination Restores -F508-CFTR Folding and Function”, Nature Chemical Biology, 9:444–454.

[44] Bompadre, S.G., Sohma, Y., Li, M. ve Hwang, T.C.,(2007). “G551D and G1349D, two CF-associated Mutations in the Signature Sequences of CFTR, Exhibit Distinct Gating Defects”, The Journal of General Physiology, 129:285-298.

[45] Sheppard, D.N., Rich, D.P., Ostedgaard, L.S., Gregory, R.J., Smith, A.E. ve Welsh, M.J.,(1993). “Mutations in CFTR Associated with Mild-Disease-Form Cl−Channels with Altered Pore Properties”, Nature, 362: 160–164.

[46] Tang, L., Fatehi, M. ve Linsdell, P.,(2009). "Mechanism of Direct Bicarbonate Transport by the CFTR Anion Channel", Journal of Cystic Fibrosis, 8:115–121.

[47] Welsh, M.J. ve Smith A.E., (1993). "Molecular Mechanisms of CFTR Chloride Channel Dysfunction in Cystic Fibrosis", Cell, 73:1251–1254.

[48] Champigny, G., Imler, J.L., Puchelle, E., Dalemans, W., Gribkoff, V., Hinnrasky, J., (1995). "A Change in Gating Mode Leading to Increased Intrinsic Cl−Channel Activity Compensates for Defective Processing in a Cystic Fibrosis Mutant Corresponding to a Mild Form of the Disease", EMBO Journal, 14:2417– 2423.

[49] Pollitt, R., (1998). "Screening for Cystic Fibrosis", Seminars in Neonatology, 3:9–15.

[50] Wald, N. ve Morris, J., (1998). "Neonatal Screening for Cystic Fibrosis", British Medical Journal, 316:404–405.

[51] Neonatal Screening for Cystic Fibrosis: Position Paper, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6634283, 6 Ekim 2016.

[52] Dankert-Roelse, J. ve te Meerman, G., (1995). "Long Term Prognosis of Patients with Cystic Fibrosis in Relation to Early Detection by Neonatal Screening and Treatment in a Cystic Fibrosis Centre", Thorax, 50:712–718.

[53] Farrell, P. ve diğerleri, (1997). "Nutritional Benefits of Neonatal Screening for Cystic Fibrosis", New England Journal of Medicine, 337(14):963–969.

[54] Merelle, M.E., Nagelkerke, A.F., Lees, C.M. ve Dezateux, C., (2001). "Newborn Screening for Cystic Fibrosis (Cochrane Review). In: The Cochrane Library" John Wiley & Sons, Ltd, 2004, Chichester, UK.

[55] Southern, K.W., (2004). "Newborn Screening for Cystic Fibrosis: the Practical Implications", Journal of the Royal Society of Medicine , 97:57–59.

[56] De Boeck, K., Wilschanski, M., C Castellani, C., Taylor, H., Cuppens, J., Dodge, M.vve Sinaasappel, C., (2006). "Cystic Fibrosis: Terminology and Diagnostic Algorithms on Behalf of the Diagnostic Working Group", Thorax, 61:627–635.

[57] Farrell, F.M. ve diğerleri, 3rd edt.; Cystic Fibrosis Foundation. (2008). "Guidelines for Diagnosis of Cystic Fibrosis in Newborns through Older Adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report", Journal of Pediatry, 153:4-14.

[58] Wallis, C., (2007)."Diagnosis of Cystic fibrosis. In: Hodson M, Geddes D, Bush , A.; eds. Cystic fibrosis." 3rd ed. Hodder Arnold, 2007:99-108, London.

[59] Baumer JH., (2003). "Evidence Based Guidelines for the Performance of the Sweat Test for the Investigation of Cystic Fibrosis in the UK", Archives of Disease in Childhood, 88:1126- 1127.

[60] Beauchamp, M. ve Lands LC., (2005). "Sweat Testing: a Review of Current Technical Requirements", Pediatric Pulmonology, 39:507-511.

[61] Desax, M.C., Ammann, R.A., Hammer, J., Schoeni M.H. ve Barben, J., Swiss Paediatric RespiratoryGroup., (2008). "Nanoduct Sweat Testing for Rapid Diagnosis in Newborns, Infants and Children with Cystic Fibrosis", European Journal of Pediatry, 167:299-304.

[62] LeGrys, V.A., Yankaskas, J.R,. Quittell, L.M., Marshall,B.C. ve Mogayzel, P.J. Jr.; Cystic Fibrosis Foundation., (2007). "Diagnostic Sweat Testing: the Cystic Fibrosis Foundation Guidelines", Journal of Pediatry, 151:85-89.

[63] Lezana, J.L., Vargas, M.H., Karam-Bechara, J., Aldana, R.S. ve Furuya, M.E., (2003). "Sweat Conductivity and Chloride Titration for Cystic Fibrosis Diagnosis in 3834 Subjects", Journal of Cystic Fibrosis, 2:1-7.

[64] Castellani, C. ve diğerleri, (2008). "Consensus on the Use and Interpretation of Cystic Fibrosis Mutation Analysis in Clinical Practice", Journal of Cystic Fibrosis, 1:179-196.

[65] GeneCards, PRSS2, http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PRSS2, 10 Ekim 2016.

[66] Itkonen, O., Koivunen, E., Hurme, M., Alfthan, H., Schroder, T. ve Stenman, U-H., (1990). "Time Resolved Immunofluorometric Assays for Trypsinogen 1 and 2 in Serum Reveal Preferential Elevation of Trypsinogen-2 in Pancreatitis", Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 125(8):712–718.

[67] UniProt, P07478, http://www.uniprot.org/uniprot/P07478#structure, 10 Ekim 2016.

[68] RSCB PDB, Human cationic trypsin K97D mutant in complex with bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI), http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4wxv, 10 Ekim 2016.

[69] RSCB PDB, Human mesotrypsin complexed with bovine pancreatic trypsin inhibitor variant (BPTI-K15R/R17D), http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3p95, 10 Ekim 2016.

[70] Russo, S.F. ve Wahl, E.T., (1987). "Autocatalytic Activation of Trypsinogen by Trypsin", Journal of Chemical Education, 64:83- 84.

[71] Simon, M.L., László, K., Kotormán, M. ve Szajáni, B., (2001). "A Comparative Study of the Conformational Stabilities of Trypsin and Chymotrypsin", Acta Biologica Szegediensis, 45:43-49.

[72] Durie P.R., Gaskin K.J., Geokas M.C., O'Rourke M. ve Largman C., (1983). "Plasma Immunoreactive Anionic Pancreatic Trypsin in Cystic Fibrosis", Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 1:337–343.

[73] Lindau- Shepard B.A., ve Pass, K.A., (2010). "Newborn Screening for Cystic Fibrosis by Use of a Multiplex Immunoassay", Clinical Chemistry, 56:445–450.

[74] Schroeder, H.W.Jr. ve Cavacini, L., (2010). "Structure and Function of Immunoglobulins", Journal of Allergy and Clinical Immunology, 125:41-52.

[75] Elgert K.D.,(2009).Immunology: Understanding The Immune System, 2nd Edition. Wiley-Blackwell, 2009.

[76] Nisonoff, A., (1985). Introduction to Molecular Immunology, 2nd edt., Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, Sunderland.

[77] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. ve Walter, P., (2008). Hücrenin Moleküler Biyolojisi. 4. Baskı. TÜBA, Ankara.

[78] Bonner, A., Furtado, P.B., Almogren, A., Kerr, M.A. ve Perkins S.J., (2008). "Implications of the Near-Planar Solution Structure of Human Myeloma Dimeric IgA1 for Mucosal Immunity and IgA Nephropathy", Journal of Immunology., 180:1008–1018.

[79] Harris, L.J., Larson, S.B., Hasel, K.W. ve McPherson, A., (1997). "Refined Structure of an Intact IgG2a Monoclonal Antibody", Biochemistry, 36(7):1581–1597.

[80] 1IGT: Structure of Immunoglobulin, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=6071, 10 Ekim 2016.

[81] Kohler, G. ve Milstein, C., (1975). "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity", Nature, 256:495-497.

[82] Greenfield E.A., (2014), Antibodies: A Laboratory Manual, 2nd edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Tuğçe Nur ERALP

Doğum Tarihi ve Yeri : 12.10.1991 Fatih-İstanbul

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : tugcenureralp@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	**Alan**	**Okul/Üniversite**	**Mezuniyet Yılı**
Y. Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Yıldız Teknik Üniversitesi	2016
Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi	2014
Lise	Fen Bilimleri	Ayten Kemal Akınal Anadolu Lisesi	2009

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	**Firma/Kurum**	**Görevi**
2015-2016	TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi-Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü	1003 Projesi Yüksek Lisans Bursiyeri

YAYINLARI

Makale

1. Eralp, T.N., Bahhar, İ., Akcaoglu, E., Mansuroglu B. ve Yucel F., (2016). "MAM-6E7, MAM-3E7, MAM-6G7 (Anti- Recombinant Human Trypsin-2)". Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy, 35(6):(basıma kabul edildi).

ÖDÜLLERİ

1. TÜBİTAK MAM, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Tanı Teknolojileri Laboratuvarı. 1003 Yüksek Lisans Bursiyeri 15 Ekim 2015- 15 Ocak 2017.