

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

**EPİTOP MASKELENMESİ YÖNTEMİ İLE İMMÜN YANITIN
YÖNLENDİRİLMESİNDE IgG ve Fab ETKİNLİĞİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

111443

DOKTORA TEZİ
(İMMÜNOLOJİ PROGRAMI)

BAŞAK KAYHAN

111443

Tez Danışmanı : Doç Dr. Cemalettin AYBAY

ANKARA

2001

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa Numarası
İÇİNDEKİLER	1
KISALTMALAR	2 - 3
ÖZET	4 - 5
İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY)	6 - 7
GİRİŞ	8 - 9
GENEL BİLGİLER	10 - 19
GEREÇ ve YÖNTEMLER	20 - 45
BULGULAR	46 -74
TARTIŞMA	75 - 83
SONUÇ	84 - 85
KAYNAKLAR	86 - 92
ÖZGEÇMİŞ	93

KISALTMALAR

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklaması</u>
aa	: Aminoasit
Ag	: Antijen
AHA1b/98	: Anti-insan albumin IgG1 monoklonal antikor üreten hibridoma hücresi
ASH	: Antijen Sunucu Hücre
BALB/c	: Deneylerde kullanılan inbred fare ırkı
BLR	: B lenfosit reseptörü
BSA	: Sığır serum albumini (Bovine serum albumin)
CAY-IFN γ 38	: Anti insan IFN γ IgG1 monoklonal antikor üreten hibridoma hücresi.
CAY-IL2G	: Anti insan IL2 IgG1 monoklonal antikor üreten hibridoma hücresi
CBB	: Karbonat-bikarbonat tamponu
CD	: Hücre farklılaşmasını gösteren membran molekülleri (Cluster of Differentiation)
EDTA	: Etilen diamin tetra asetat
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
Fab	: İmmünoglobulin molekülünün antijen bağlayan kısmı (Fragment of antigen binding)
Fc	: İmmünoglobulin molekülünün kristalize edilebilen kısmı (Fragment crystallizable)
Fc ϵ R	: IgE antikorunun Fc kısmına bağlanan reseptör
Fc γ R	: IgG molekülünün Fc kısmına bağlanan reseptör.
FCS	: Buzağı fetusundan elde edilen serum (Fetal calf serum)
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografi (High Performance Liquid Chromatography)
HRPO	: Yaban turpu peroksidaz enzimi (Horseradish peroxidase)
ICAM	: Hücreler arası adezyon molekülü (Intracellular adhesion molecule)
IFN	: İnterferon
Ig	: İmmünoglobulin
IL	: İnterlökin
ITAM	: İmmünoreseptör tirozin aktivasyon motifi
kDa.	: Kilodalton

λ	: Dalga boyu (Lambda)
LFA	: Lökosit fonksiyonu ile ilişkili antijen (Leukocyte function-associated antigen)
LPS	: Lipopolisakkarit
mAb	: Monoklonal antikor
MHC	: Doku uygunluk kompleksi (Major Histocompatibility Complex)
mIg	: B lenfosit yüzey immünoglobulin
nm	: Nanometre
OD	: Optik Dansite
Ort	: Ortalama
PBS	: Fosfat ile tamponlanmış tuz çözeltisi (Phosphate buffered saline)
PBS-10	: %10 FCS içeren 10mM PBS
PBS-BSA	: ELISA bloklama tamponu, %3 BSA içeren 10mM PBS
PBS-T	: ELISA yıkama tamponu, % 0.03 Tween 20 içeren 10mM PBS
RIA	: Radio-Immunoassay
RPMI-1640	: Roswell Park Memorial Enstitüsü (Institute) tarafından geliştirilmiş besiyeri.
RPMI-10	: %10 FCS içeren RPMI 1640
SAS	: Doymuş (Sature) Amonyum Sülfat
SD	: Standart sapma (Standard Deviation)
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamit Jel Elektrophorez
Td Ag	: T hücrelerine bağımlı antijenler
TEMED	: N.N.N',N'-Tetramethyl – ethylenediamin
Th	: Yardımcı T lenfositleri
Ti Ag	: T hücrelerinden bağımsız antijenler
TMB	: 3,3',5,5' Tetrametil benzidin
TLR	: T lenfosit reseptörü
UV	: Ultraviole
v/v	: Hacim/hacim sulandırma oranı (Volume / Volume)

ÖZET

1975 yılında Köhler ve Milstein monoklonal antikor (mAb) üretimine yönelik hibridoma teknolojisini tanımladılar. Bu tekniğin bazı avantajları şunlardır : (i) Her hibrid hücre, antijen yüzeyinde tek bir epitopa özgül antikor üretir, (ii) hibrid hücre ölümsüz olduğundan sınırsız miktarda antikor üretim kaynağıdır, (iii) değişik metodlarla mAb'lar kullanılarak yüksek miktarlarda saf antijen üretimi sağlanabilir.

Mikrobik enfeksiyonların tanısında sıklıkla serumda özgül antijen(ler) veya antikor(lar) saptanır. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) bu tanı yöntemlerinden bir tanesidir. Değişik ELISA yöntemlerinde özgül antijen(ler) saptamak için sıklıkla iki farklı mAb kullanılmaktadır. Ancak immün yanıtın sıklıkla baskın olan immünojenik epitopa yönelik olmasından dolayı farklı epitoplara özgül iki mAb üretmek zordur. Bazı makalelerde antijen yüzeyindeki farklı epitoplara özgül antikor üretiminde, immünojenik epitopun özgül mAb ile maskelenmesiyle oluşan immün kompleks yapının aşılama kullanılması durumunda organizmada farklı epitoplara özgül antikorların gelişebileceği belirtilmektedir. Ancak, antijenle beraber pasif olarak verilen IgG izotipindeki antikor immün yanıtı baskılayabilmektedir. IgG bağımlı baskılamada antijen – immünoglobulin G (IgG) kompleksinin eş zamanlı olarak B-lenfosit reseptörüne (antijen aracılığı ile) ve B lenfosit Fc γ reseptörüne (Fc γ RIIB) (antijene bağlı IgG'nin Fc aracılığı ile) bağlanması B-lenfosit uyarımının Fc γ RIIB aracılığı ile engellenmesine neden olmaktadır.

Pasif olarak verilen antikorun immün yanıtı baskılama özelliği klinikde de değişik uygulamalarda yer almaktadır. Bazı aşılar (kabakulak ve kızamık gibi) bebeklere bir yaşından önce uygulanmaz. Bunun nedeni anne kaynaklı IgG izotipindeki antikorların doğumdan sonra bebekte en az 6 aya kadar aktivitesini sürdürebilmesidir. Bebek bir yaşını doldurmadan aşılama yapıldığında yetersiz immün yanıt gelişebilmektedir. Ayrıca

gebelikte anne ile fetusun Rh uyumsuzluklarında Rh(-) annenin fetus kaynaklı Rh(+) kan hücrelerine karşı antikor yanıtını engellemek için anti-RhD Ig kullanılmaktadır.

Bu çalışmada BALB/c farelere ayrı ayrı “antijen(hIFN γ)+IgG”, “antijen(hIFN γ)+Fab” ve “antijen(hIFN γ)” verildikten sonra her gruptaki farelerin plazmalarındaki antikor düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçülerek karşılaştırıldı. Denek sayısı 3 olan PBS grubu dışında tüm gruplar 5 adet fareden oluşmaktadır. Grupların plazma antikor düzeyleri karşılaştırıldığında “hIFN γ +IgG” ile aşılama yapılan grupta hIFN γ ’ya karşı antikor yanıtının baskılandığı saptandı. Diğer taraftan “hIFN γ +Fab” ile aşılama yapılan grubun antikor yanıtında anlamlı bir baskılamamanın olmadığı saptandı. Bu verilere göre değişik epitoplara özgül mAb oluşturmak için önerilen epitop maskelenmesi yönteminde IgG yerine Fab fragmanlarının kullanılması ile daha olumlu sonuçların alınabileceği düşünüldü.

YABANCI DİLDE ÖZET

In 1975, Köhler and Milstein described the hybridoma technology for generating monoclonal antibodies (mAb). Some of the advantages of this technique are: (i) Each hybrid cell produces only one antibody which recognizes a specific epitope on the antigen. (ii) As the hybrid cell is immortal, it provides an unlimited supply of antibody. (iii) Purifying of the specific antigen in large quantities could be performed with various methods by using mAb.

Microbial infections are frequently diagnosed by detecting specific antigen(s) or antibody(ies) in serum. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is one of the diagnostic methods. In different ELISA methods frequently two different mAb are used in order to demonstrate specific antigen(s). However, generating two different mAb is rather difficult as the immune response is usually directed against epitope which is the most immunogenic. However, antibodies which recognize particularly well-presented or immunodominant epitopes are formed especially. In some articles, it was regarded that to generate a different set of antibodies against the antigen, immunogenic epitopes are masked with specific monoclonal antibodies from a first immunization, then the organism can generate a different set of antibodies against the antigen when it meets the antigen / antibody complex a second time. However, passive administration of IgG antibody together with an antigen specifically suppresses the immune response. IgG mediated suppression results from simultaneous interaction of the antigenic portion of the complex with membrane Ig molecules on specific B cells and of the antibody portion of the complex with Fc γ receptors (Fc γ RIIB) on the same B lymphocytes.

The ability of passively administered antibody to suppress the immune response has certain clinical consequences and applications as well. Certain vaccines (e.g. mumps and measles) are not generally given to infants before one year of age. This is because levels of maternally- derived IgG remain high for at least six months after birth;

the presence of such passively transferred IgG at the time of vaccination would result in the development of an inadequate immune response in baby. In the cases of Rhesus incompatibility the administration of anti-RhD antibody to Rh negative (-) mothers prevents primary sensitization by fetally derived Rh positive (+) blood cells, presumably by removing the foreign antigen (fetal erythrocytes) from the maternal circulation.

In this study, plasma antibody levels of BALB/c mice immunized either with “antigen+IgG”, “antigen+Fab” or “antigen” were compared. Except for PBS group, all groups consisted of 5 BALB/c mice. When plasma antibody levels were compared, it was observed that antibody response was suppressed in “hIFN γ +IgG” immunized group. However, antibody levels in “hIFN γ +Fab” – immunized group were found to be not significantly suppressed. According to the results obtained from this study using “Ag+Fab” instead of “Ag+IgG” for epitope-masking seemed to be more convenient to generate mAb against different epitopes.

GİRİŞ

Kemik iliğinde günde 10^{10} - 10^{11} B lenfosit yapılmaktadır. Bunların çoğunun yaşam süresi kısadır. Periferik kanda dolaşan uyarılmamış B lenfositler eğer antijen ile karşılaşmaz ise birkaç haftada apoptoza (programlanmış hücre ölümü) uğrarlar. Antijenin istirahat halindeki B-lenfosit reseptörleri ile çapraz bağlanması sonucu B-lenfositler istirahat halinden çıkarak antijene özgül antikor sentezleyen plazma hücrelerine ve bellek hücrelerine dönüşür ¹.

Multivalan antijenlere karşı heterojen nitelikte poliklonal antikor yanıtı oluşmaktadır. Ancak günümüzde tek tip özgüllük gösteren B-lenfosit klonlarının ayrılması ve kültürde üretilmesi ile sadece belirli epitopu tanıyan antikorlar elde edilebilmektedir. Tek bir B lenfosit klonundan sentezlendikleri için belirli epitopa özgül tek tip immünoglobulin yapısı gösteren bu moleküllere monoklonal antikorlar (mAb) denir ².

İlk kez 1975 yılında Cesar Milstein ve Georges Köhler fare myeloma hücrelerini antijen ile immünize edilmiş fare dalak hücreleriyle birleştirerek monoklonal antikor üretimine yönelik 'hibridoma' tekniğini tanımlamışlardır ³.

Monoklonal antikorlar, antijenik yapıların saflaştırılmasında, antikorların yapısal ve fonksiyonel yönden incelenmesinde, hücre yüzey reseptörlerinin tanınmasında, ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) ve RIA (Radio-Immuno Assay) gibi serolojik yöntemlerin oluşturulmasında, radyoaktif madde ile işaretli monoklonal antikorlar ile tümör hücrelerinin immünohistokimyasında, aşı üretiminde ve immünoterapide kullanılmaktadır ⁴. Özellikle yüzeyinde aynı epitoptan birden fazla içermeyen multivalan antijenlerin saptanmasına yönelik testlerde iki farklı epitopa özgül mAb'ların kullanılması gerekmektedir. Teorik olarak antijen yüzeyindeki tüm epitoplara karşı antikor yanıtı gelişebilmesine karşın hibridoma tekniğinin immünizasyon

aşamasında multivalan antijenlerin kullanılması sonucunda sıklıkla immunodominant epitoplara özgül mAb elde edilebilmektedir. Multivalan antijenlerin yüzeyindeki farklı epitoplara özgül mAb üretiminde değişik yöntemler kullanılmaktadır Bunlar arasında deney hayvanlarında neonatal dönemde immünodominant epitopa yönelik tolerans oluşturma, aşılama sonrası siklofosamid kullanarak tolerans oluşturma ve hedef antijen yüzeyindeki immünodominant epitopların özgül antikörleri ile maskelenmesi yöntemleri bulunmaktadır⁵⁻⁷.

Literatürlerde, immünodominant epitopun maskelenmesi amacıyla antijen-immünoglobulin G (IgG) kompleksi ile yapılan aşılama işlemiyle farklı bir epitopa özgül mAb salgılayan hibridoma elde edilebileceği bildirilmektedir⁸. Ancak aşılama için kullanılan antijen-IgG kompleksinin eş zamanlı olarak B-lenfosit reseptörüne (antijen aracılığı ile) ve B lenfosit Fc γ reseptörüne (Fc γ RIIB) (antijene bağlı IgG'nin Fc aracılığı ile) bağlanması B-lenfosit uyarımının Fc γ RIIB aracılığı ile engellenmesine neden olmaktadır. Bu nedenle, literatürde önerilen ve antijen-IgG ile yapılan epitop maskelenmesi yönteminin diğer epitoplara karşı antikör yanıtını baskılayacağı öngörülerek, bu çalışmada daha etkin bir yöntem oluşturulması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, laboratuvarımızda üretilen, anti-insan interferon gamma (α -hIFN γ) IgG monoklonal antikoru salgılayan değişik hibridoma hücrelerinden CAY-IFN γ 38 seçilerek bu hibroma hücresinden salgılanan α -hIFN γ IgG1 mAb'un kendisi ve Fab kısmı elde edildi. Antijen olarak rekombinant insan IFN γ kullanıldı. IFN γ 'ya karşı immün yanıtın farklı epitoplara karşı yönlendirilmesinde "IFN γ -IgG" yerine "IFN γ -Fab" kompleksinin daha etkin olacağı düşüncesi ile sadece IFN γ ile aşılama da dahil edilerek üç farklı aşılama yöntemi karşılaştırıldı.

GENEL BİLGİLER

1. B LENFOSİT UYARIMI

Yabancı antijenlerin özgül şekilde tanınması kazanılmış immün yanıtın en temel özelliklerindendir. Antijen tanınması olayında, immünoglobulinler, T-lenfosit antijen reseptörü ve doku uygunluk kompleksinden ["Major Histocompatibility Complex" (MHC)] kodlanan antijenler olmak üzere 3 farklı molekül doğrudan rol oynamaktadır. Bu moleküllerin ilk ikisinde farklı antijenik yapıların tanınmasını sağlayan çeşitliliğe değişik mekanizmalar neden olmaktadır ⁹.

İmmünoglobulinler memelilerin serum ve doku sıvılarında bulunan glikoprotein yapıda moleküllerdir. Bazı immünoglobulin molekülleri B-lenfosit yüzeyinde bulunurlar ve bunlar özgül antijen için reseptör görevi görürler. Bir kısmı da plasmada, doku aralarındaki sıvıda ve lenf sıvılarında serbest halde bulunurlar ⁹.

Antijene özgül yüksek miktarda antikorun oluşması az sayıdaki özgül B lenfositlerin uyarımıyla gerçekleşir. Heterojen havuz içerisindeki az sayıdaki özgül B lenfositlerin antijenle karşılaşp hızla çoğalmasına klonal seleksiyon denir. Henüz uyarılmamış özgül B lenfositlerin antijenle bağlanması B lenfosit yüzeyindeki IgM ve IgD izotipindeki yüzey immünoglobulinleriyle (mIg) gerçekleşir ve bu moleküller B lenfosit reseptörü (BLR) olarak tanımlanmaktadır. B lenfosit yüzeyindeki mIgM ve mIgD'nin sitoplazmik kuyrukları çok kısa olduğu için antijenle bağlanma sonrası oluşan uyarıyı hücre içerisine iletemezler. Uyarının hücre içine iletiminden mIg'lerin yanında, birbirlerine disülfid bağıyla bağlı Ig-alfa (Ig α , CD79a) ve Ig-beta (Ig β , CD79b) heterodimeri sorumludur. İşlevsel bir BLR, yüzey immünoglobulini ve CD79a/CD79b heterodimerinden oluşmaktadır. B lenfositleri, mIg'leri ile antijeni yakalayıp CD79a/CD79b heterodimerleriyle uyarıyı hücre içine iletmektedir. Ig- α 'nın 61 ve Ig- β 'nın 48 aminoasitten (aa) oluşan sitoplazmik kuyrukları vardır. Kuyrukları üzerinde

immünoresptör tirozin aktivasyon motifi (ITAM) olarak tanımlanan bir bölge bulunmaktadır. Reseptör-ligand etkileşimini takiben Src protein tirozin kinaz ailesinden olan lyn uyarılarak Ig- α ve Ig- β heterodimerindeki tirozin dizilerinde fosforilasyon sağlanmaktadır¹⁰⁻¹².

Antijen-BLR bağlanması sonucu B lenfosit uyarımı antijenin yapısına ve aynı zamanda B lenfositin çevresinden aldığı sinyallere bağlıdır. B lenfosit uyarımında antijenin yapısal nitelikleriyle ilintili olarak yardımcı T lenfositleri ("T helper"Th) rol almaktadır. Özellikle protein yapıdaki antijenlere karşı özgül antikor yanıtının oluşabilmesi için T lenfositlerden salgılanan sitokinlere ihtiyaç bulunurken bazı antijenler Th hücrelerinin yardımı olmaksızın B lenfosit uyarımını sağlamaktadırlar. Th hücrelerinin yardımı olmaksızın B lenfosit uyarımını sağlayabilen antijenlere T hücrelerine bağımsız (Ti) antijenler denir. Ti-antijenler Ti-Tip1 ve Ti-Tip2 olmak üzere iki gruba ayrılır. Ti-Tip1 antijenlere karşı IgM izotipinde antikor yanıtı olmaktadır ve antikor yanıtının oluşabilmesi için T lenfosit yardımına (sitokin salgılanması) ihtiyaç duyulmaz. Gram negatif bakteri hücre duvarının önemli bir komponenti olan lipopolisakkarit (LPS), Ti-Tip1 antijen için bir örnektir. Ti-Tip2 antijenler ise hücre duvarında yineleyen polisakkarit üniteleri (polisakkarit kapsüllü mikroorganizma) veya polimerik proteinler (bakteriyel flajel) gibi yineleyen epitoplara içeren antijenlerdir. B lenfosit yüzeyinde mIg'leri ile çok sayıda çapraz bağlar kurarak B-lenfositleri aktif hale geçirirler. Ti-Tip2 antijenlerine antikor yanıtının oluşabilmesi için az da olsa yardımcı T lenfosit yardımına ihtiyaç duyulmaktadır^{2,13}.

Bir çok protein yapıdaki antijene özgül antikor yanıtının gelişebilmesi için B lenfosit yanısıra MHC molekülleri aracılığı ile ve işlenmiş şeklinin CD4(+) Th ile de temas etmesi gerekir. Bu temas sonrası yardımcı T lenfositlerden sitokinler salgılanmaktadır. Divalan ve oligovalan T lenfosit bağımlı ("T-dependent", Td) antijenlerin B lenfosit mIg bağlanması ile oluşan sinyal B lenfosit aktivasyonu için

nispeten zayıftır. Etkin bir immün yanıt oluşabilmesi için gerekli olan ikinci sinyal antijene özgül B lenfosit ile Th arasındaki hücresel temas ile gerçekleşir. Bu temas B lenfosit yüzeyindeki CD40 proteininin T lenfosit yüzeyindeki CD40 ligand (CD40L) gibi diğer bazı yardımcı moleküllerin karşılıklı kenetlenmesi ile sağlanır ¹⁴.

2. İMMÜN YANITIN DÜZENLENMESİ

İmmün sistem, organizmayı yabancı maddelere ve patojen ajanlara karşı korumaktadır. İmmün sistemin en önemli özelliği bazı kontrol mekanizmalarıyla immün yanıtı sınırlayabilmesi veya düzenleyebilmesidir. İmmün yanıtın etkinliğini antijenin ve antikorun bazı özellikleri, immün kompleksin niteliği, antijen sunucu hücre tipi, organizmanın genetik yapısı ve değişik aşamalarda etkin olan kontrol mekanizmaları belirlemektedir ¹⁵.

2.1. İmmün Yanıtın Düzenlenmesinde Antijenin Rolü

İmmün sistemin aktivasyonu için ortamda bulunması zorunlu olan ilk uyarıcı faktör, antijendir. Antijenin yapısı, dozu ve organizmaya veriliş yolu gelişen immün yanıtın yönünü ve sonucunu önemli ölçüde etkilemektedir.

2.1.1. Antijen Yapısı

Protein veya glikoprotein yapıdaki antijenler, antijen sunucu hücreler (ASH) tarafından işlenerek lenfositlere sunulur. Bunlara karşı hem hücresel hem de salgısal immün yanıt gelişir. Ancak lipid ve polisakkarit karakterindeki antijenler ASH tarafından işlenemedikleri ve MHC molekülleriyle sunulamadıkları için bunlara karşı etkin bir immün yanıt oluşmaz. Td antijen niteliğinde olan antijenlere karşı özgül IgM sonrası IgG açığa çıkar, affinite artışı ve hafıza B lenfosit gelişimi olur. Ti-Tip1 ve Ti-Tip2 antijen grubunda yer alan lipid ve polisakkarit karakterindeki antijenlere karşı ise daha çok düşük affiniteli IgM ve az miktarda IgG2 oluşabilmektedir. Antikor izotipinde değişiklik, affinite artışı ve hafıza B lenfosit gelişimi olmamaktadır. Bu nedenle, Ti-Tip1 ve Ti-Tip2

grubundaki antijenlere karşı sekonder immün yanıt gelişimi gözlenmez. Allerjen özelliği gösteren bazı antijenlere karşı ise IgE ağırlıklı yanıt gelişmektedir. Hücre içi mikroorganizmalara (*Leishmania tropica* gibi parazit veya *Brucella abortus* gibi bakteriler ile genel olarak virüsler) karşı ağırlıklı olarak hücresel immün yanıt, çözünür yapıdaki protein antijenlere karşı ise salgısal immün yanıt oluşmaktadır ².

2.1.2. Antijenin Dozu ve Giriş Yolu

Minimum eşik düzeyini aşması şartıyla organizmaya verilen antijen antikor yanıtına neden olurken, yüksek veya çok düşük dozlardaki antijene karşı immünolojik yanıt gerçekleşmez. Çok yüksek dozlarda veya periodik aralıklarla düşük dozlarda antijen verilmesi özgül T ve B lenfosit toleransına neden olabilmektedir. Bazı antijenler deri altına veya deri içine enjekte edildiğinde immün yanıt oluşmakta; nasal, oral veya yüksek dozda intravenöz yoldan verildiğinde ise immünolojik toleransa neden olabilmektedir ².

2.1.3. Antijen Sunucu Hücrelerin Rolü

Etkin bir immün yanıtın gelişebilmesi için antijenin ASH tarafından işlenmesi ve MHC molekülü ile T lenfositlerine sunulması ve T lenfosit reseptörlerine (TLR) bağlanması gerekir. Ancak etkin bir immün yanıtın gelişebilmesi için bu faktörlerin yanı sıra hücreler arası bağlanmayı kuvvetlendiren adezyon molekülünün ligandları ile etkileşime girmesi, değişik sitokinlerin salgılanması, yardımcı uyarım molekülünün membranda ifadenmesi ve ligandı ile etkileşime girmesi de gerekir ¹⁵. Antijen sunucu hücre işlevi gören B lenfosit üzerindeki CD80 (B7-1) ile T lenfosit yüzeyindeki CD28 molekülü arasındaki bağlanma en önemli yardımcı sinyal oluşturan etkileşimlerden biridir. Ayrıca ASH yüzeyindeki ICAM-1 (CD54) ve LFA-3 (CD58), T lenfosit yüzeyinde LFA-1 (CD11a/CD18) ve CD2'ye bağlanarak yardımcı sinyal oluşturmaktadır ¹⁶.

2.1.4. Sitokinlerin Rolü

T lenfosit ve yardımcı hücrelerden salgılanan sitokinler immün yanıtı hem uyarıcı hem de azaltıcı yönde etkilerler. Bunun en belirgin örneği sitokinlerin yardımcı T lenfositler üzerine olan çift yönlü etkisidir. Örneğin $CD4^+$ yardımcı T lenfositleri (Th) salgıladıkları sitokin profili açısından fonksiyonel alt gruplara ayrılır. Th_0 lenfositler bipotansiyel hücreler olup, Th_1 ve Th_2 lenfositlerine farklılaşır. Th_1 hücrelerinden IL-2 ve $IFN\gamma$, Th_2 hücrelerinden ise IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 ağırlıklı sitokinler salgılanır. Antijenik uyarım sonrası baskın olan Th tipi gelişen immün yanıtı etkiler. Daha çok hücresel ağırlıklı immün yanıtın gelişiminde Th_1 , salgısal immün yanıtın gelişiminde ise Th_2 tipi immün yanıt etkili olmaktadır. Genel olarak hücre içi mikroorganizmalara karşı Th_1 , paraziter antijenlere ve allerjenlere karşı Th_2 ağırlıklı immün yanıt gelişmektedir. Th_1 'lerden salgılanan $IFN\gamma$ makrofaj yüzeyinde MHC sınıf-II ve yardımcı sinyal oluşumuna neden olan moleküllerin artışına neden olmaktadır¹⁷. Bu etkiler makrofajları daha etkin ASH yapar. Th_1 alt grubunun baskın olduğu immün yanıtta salgılanan IL-2 ve $IFN\gamma$ ile sitotoksik T lenfosit ve NK (Natural Killer – Doğal Öldürücü Hücre) aktivitesinde artış olmaktadır¹⁸. Allerjenlere karşı gelişen IgE izotipindeki antikor yanıtında Th_2 hücrelerinden salgılanan IL-4 önemli rol oynamaktadır¹⁹. Çünkü IL-4 ve IL-13, IgE izotip dönüşümüne (class switching) neden olan sitokinlerdir²⁰. Th alt grupları karşılıklı olarak salgıladıkları sitokinler aracılığı ile birbirleri üzerine inhibitör etki göstererek immün yanıtı farklı kutuplara yönlendirebilmektedir. Th_1 hücrelerden salgılanan $IFN\gamma$, Th_2 tipi hücre proliferasyonuna engel olmaktadır. Th_2 hücrelerden salgılanan IL-10 ise Th_1 hücrelerinden $IFN\gamma$ üretimine engel olmaktadır^{20, 21}. Th alt grupları antikor yanıtının farklı şekilde oluşmasına neden olur. Th_2 hücrelerinden salgılanan IL-4 ve IL-13 IgE oluşmasına, IL-10 ise IgA oluşmasına neden olur²¹.

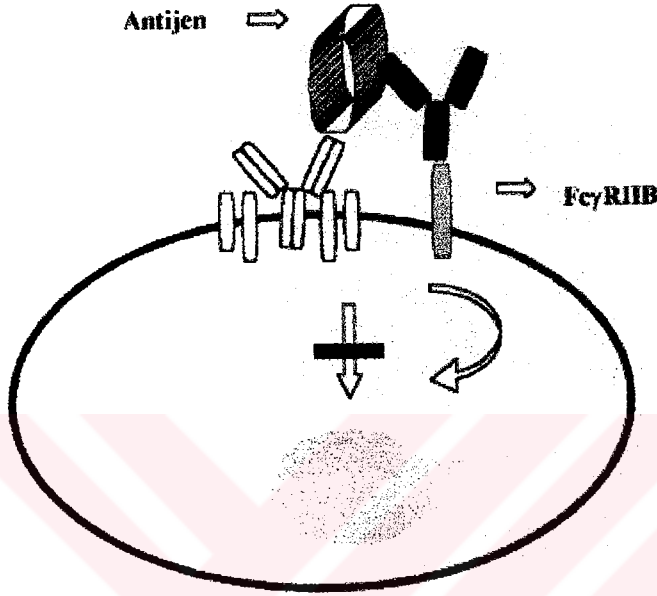
2.1.5. İmmün Komplekslerin Rolü

Antikorların özgül oldukları antijenlere karşı gelişen immün yanıtı düzenleyici etkisinin olduğu uzun süredir bilinmektedir. İlk olarak 1909 yılında Smith T. isimli araştırmacının yaptığı çalışmada kobaylara verilen fazla miktardaki antitoksinin difteri toksinine karşı gelişen immün yanıtı inhibe ettiği gösterilmiş ancak nedeni açıklanamamıştır. Yaklaşık 60 yıl sonra Henry ve arkadaşları bunun nedeninin sedimentasyon katsayısı 7S olan IgG molekülü olduğunu belirtmişlerdir ²²⁻²³.

Antikorların immün yanıtı düzenleyici etkileri son derece çarpıcıdır. Miktarına bağlı olarak sinjeneik (syngeneic) antikorlar %99.9 oranında baskılamaya veya 1000 kat artışa neden olabilmektedir. IgM ve IgE izotipindeki antikorlar immün yanıtı artırıcı etki gösterirlerken; IgG'nin çift yönlü etkisi bulunmaktadır ²². IgE'nin protein yapıdaki özgül antijenle beraber deney farelerine verildiğinde yüzeyinde CD23 (FcεRII) taşıyan B-lenfositlerin IgE/Ag kompleksini endositoz yoluyla hücre içerisine aldıkları ve antijenik peptidler şeklinde yardımcı T lenfositlerine sundukları ve antikor yanıtında artış olduğu belirtilmiştir ²⁴⁻²⁶. IgM bağımlı antikor yanıtındaki artış ise IgM'nin komplemanı aktive edebilme özelliği ile gerçekleşmektedir ^{27, 28}. IgG bağımlı artışın potansiyel moleküler mekanizması henüz tam olarak açıklık kazanmamıştır. IgG bağımlı artışın da kompleman ile gerçekleşebileceği öngörülmesine rağmen ²⁹, bir çalışmada komplemanı aktive etme özelliği nokta mutasyonlar ile ortadan kaldırılmış IgG2a izotipindeki antikorun da kontrol grubu kadar etkili olduğu saptanmıştır ³⁰.

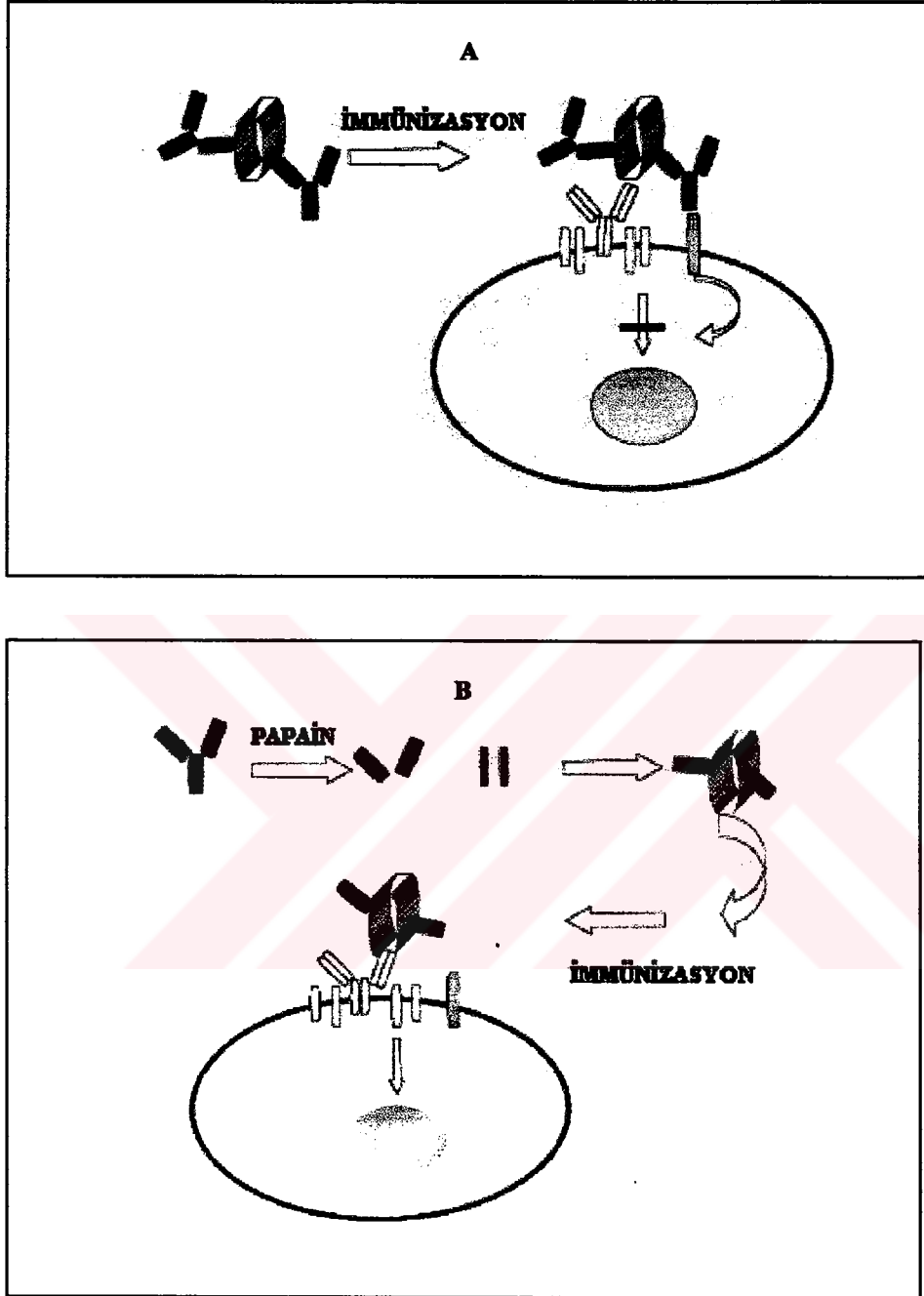
İmmün yanıtın baskılanmasında rol alan tek antikor izotipi IgG'dir. Tüm IgG alt gruplarının hem primer antikor yanıtını baskıladığı hem de sekonder antikor yanıtı için gerekli olan hafıza hücrelerin gelişimini engellediği belirtilmiştir ³¹. İmmün kompleks yapıda yer alan IgG'nin antikor yanıtını baskılaması temel olarak, B-lenfosit yüzeyindeki FcγRIIB (CD32) ve mIg'leri vasıtasıyla B lenfosit uyarımını inhibe etmesiyle gerçekleşir.

B lenfosit reseptörleri ile Fc γ RIIB eşzamanlı olarak “antijen-IgG” kompleksi aracılığı ile çapraz bağlantı yaptığında B-lenfosit uyarımı engellenmektedir ² (Şekil 1)



Şekil 1. Fc γ RIIB ile B-lenfosit uyarımının engellenmesi

Bu çalışmada antijen üzerindeki belirli bir epitop (epitop X) özgül IgG antikoruna ile kapatıldığında ve bu şekildeki kompleks ile aşılama yapıldığında X epitopu ve diğer epitoplara özgül B-lenfosit antikor yanıtının olmayacağı veya düşük düzeyde olacağı öngörülmüştür (Şekil 2A). Bunun nedeni X epitopunun özgül IgG aracılığı ile örtülmüş olması ve X epitopu dışındaki epitoplara yanıt verecek B lenfositlerin ise Fc γ RIIB üzerinden inhibe edilebileceğidir. Bu nedenle X epitopu dışındaki epitoplara karşı etkin antikor yanıtının olabilmesi için aşılamanın “antijen-Fab” ile yapıldığında daha iyi olacağı düşünülmüştür. Bu amaçla, epitop maskelenmesinde kullanılacak olan IgG izotipindeki antikorun papain enzimi ile parçalanması sonrasında efektör fonksiyonlarından sorumlu olan Fc parçasının ayrılması sağlanarak (Şekil 2B), kalan Fab parçası ile özgül epitopun maskelenmesi ve “antijen-Fab” kompleksi ile aşılama X dışındaki diğer epitoplara antikor yanıtının “antijen-IgG” kompleksi ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.



Şekil 2. Antijen-IgG veya antijen-Fab kompleksinin antikor yanıtı üzerine etkisi. Antijen- IgG ile aşılama sonucu B-lenfosit uyarımının engellenmesi (A). Antijen-Fab ile aşılama sonrası B-hücre uyarımı (B).

3. İNTERFERONLAR

Yaklaşık 40 yıl önce Isaacs ve Lindenmann tarafından tanımlanmış olan interferonlar, virüslere karşı hücrenin özgül olmayan bir reaksiyonu olup, RNA ve protein sentezini doğrudan etkilerler ³². Anti-viral etki yanında, anti-proliferatif ve immüno-regülatör etkileri de vardır. İnterferonlar fagositozu artırır, ayrıca fagositer hücrelerin çoğalmasına ve salgısal ürünlerinin artmasına neden olur; opsonize olmuş yapıların daha kuvvetli fagositozunu sağlar ³³.

İnterferonlar farklı ailelerden oluşmuştur. İki ana grup altında incelenir:

Değişik türlerde saptanmış olan Tip 1 interferonlar, amino asit dizilimleri ve immünojenik özelliklerine göre IFN-alfa (IFN- α), IFN-beta (IFN- β), IFN-omega (IFN- ω), IFN-delta (IFN- δ) ve IFN-tau (IFN- τ) olarak alt sınıfa ayrılmaktadır ³². IFN- α ve IFN- ω lökositlerden, IFN- β fibroblastlardan, IFN- δ bazı embriyonel yapılardan ve IFN- τ ise trofoblastlardan salgılanmaktadır. Alfa, beta ve omega IFN insanda 9 no'lu kromozomdan kodlanmaktadır. Tip 1 interferonlar çok çeşitli hedef hücreleri etkileyerek “anti-viral, anti-proliferatif ve immünomodulator” etki gösterirler. Tip 1 interferonların biyolojik fonksiyonları 4 ana grup altında incelenebilir ³².

- a. Tip 1 IFN viral replikasyonu önler. Tip 1 interferonun anti-viral etkisi asıl olarak çevredeki hücrelere “parakrin” etki şeklindedir.
- b. Tip 1 IFN hücre proliferasyonunu engeller. Özellikle IFN- α bazı tümörler (hairy cell leukemia) için anti-proliferatiftir. IFN- β ise normal hücre büyümesinin fizyolojik inhibitörüdür.
- c. Tip 1 IFN NK hücrelerinin litik potansiyelini artırır.
- d. Tip 1 IFN MHC sınıf I molekül ekspresyonunu artırırken, MHC sınıf II ekspresyonunu baskılar.

Tip 2 İnterferon, IFN γ veya immün interferon olarak adlandırılır. 30 yıl önce tanımlanan IFN- γ daha çok mitojenler veya antiijenler ile uyarılmış T lenfositlerinden

üretir. NK hücreleri de antijenle karşılaştıklarında veya endotoksinle uyarıldığında IFN- γ sentezlerler. Konakçı savunmasında inflamatuvar olaylarda anahtar rol oynayan IFN- γ , T-lenfositlerinde MHC sınıf II antijenlerinin artmasını sağlar. Ayrıca, T-lenfosit yüzeyinde IL-2 reseptörlerinin artmasına yardımcı olur ve IL-2 sentezini artırır. B-lenfositlerini proliferasyona zorlar, makrofajları aktive eder. Mediator salgılamada da IFN γ 'nın aktive edici etkisi vardır; özellikle IL-1 salgılamasını uyarır³².

İnterferon gamma geni insanda 12, farede ise 10 numaralı kromozomda yer alır. Homodimerik yapıdadır ve dimerik yapıyı oluşturan birbirine benzeyen altı adet alt ünite birbirlerine asimetrik olarak yerleşim gösterirler. Genel olarak α -helikal tarzda bir yapıya sahiptir (Şekil 3). İnsan IFN γ 'nın aa.(aminoasit) dizilimi fare IFN γ 'nın aa dizilimi ile yaklaşık %40 benzerlik göstermektedir. Ayrıca, fare IFN γ 'nın 26 numaralı amino asitinde delesyon bulunmaktadır³⁴. İnsan rekombinant interferon γ 'nın farelerde toksik bir reaksiyona neden olmadığı saptanmıştır³⁵. Özellikle insan IFN γ 'ya karşı mAb'ların elde edildiği değişik çalışmalarda farelerin aşılmasında sıklıkla insan rekombinant IFN γ kullanılmaktadır^{36,37}. Dolayısıyla fareyi aşmak için dimerik yapıdaki insan IFN γ 'sı antijen olarak kullanılabilir.



Şekil 3. Homodimer yapılı insan interferon γ ³⁴.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

1. GEREÇLER

1.1. Kullanılan Cihazlar Listesi

1. Hücre kültür inkübatörü: %5 CO₂'li, 37°C nemli ortam (NUAIRE Auto Flow CO₂-Water Jacketed Incubator, Plymouth MN, A.B.D.).
2. Güvenlik kabini- Steril Laminar Akımlı Kabin (NUAIRE Biological Safety Cabinet, Class II Type A/B3, Plymouth MN, A.B.D.).
3. 'Inverted' mikroskop (Nikon TMS; Japonya).
4. Işık mikroskobu (Nikon LaboPhot 2, Japonya).
5. Soğutmalı santrifüj (Benchtop centrifuge, HERMLE ZK-380, Gosheim, Almanya).
6. Mikrosantrifüj (MicroCen 13D, Herolab, Almanya).
7. Isıtmalı, rotorlu su banyosu (Techne Shaking Bath SB-16, Princeton NJ., A.B.D.).
8. Sıvı azot tankı (Taylor Wharton 35 HC, serial no: 503-018-F3, Indianapolis IN., A.B.D.).
9. ELISA okuyucusu (Pasteur Diagnostics LP-400, Paris, Fransa).
10. Otomatik ELISA yıkayıcısı (Pasteur Diagnostics LP-35, Paris, Fransa).
11. Yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) sistemi: Waters 650 Advanced Protein Purification System; Waters 600E System Controller; Waters System Interfere Module; Waters 490E Programmable Multiwavelength UV Detector, Maksima 820 Chromatography Workstation Version 3.0 Bilgisayar Programı (Waters, Millipore Corp., Milford, MA., A.B.D.).
12. Otoklav (Pressiontravail, 2.5atm., 1953-2056, M. Scheerer S.A., Bern, İsviçre).
13. Distile su cihazı (Seralpur PRO 90C, SERAL, Ransbach-Baumbach, Almanya).
14. pH metre (3010 pHmeter, Jenway, A.B.D.).
15. -80°C derin dondurucu (Jouan VX 530 Series 2, Fransa).

16. Elektroforez güç kaynağı (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, A.B.D.).
17. SDS-PAGE Elektroforez tankı (El yapımı).
18. Liyofilizatör cihazı (Benchtop 3L, Virtis Company Inc., New York, A.B.D.).
19. Hassas terazi (Electronic Balance, A&D Company Limited, Tokyo, Japonya).
20. 10µl - 100µl'lik otomatik pipet (Costar, Costar GmbH, Bodenheim, Almanya).
21. 100µl - 1000µl' lik otomatik pipet (Costar, Costar GmbH, Bodenheim, Almanya).
22. 50µl – 200µl' lik otomatik çok kanallı pipet (Socorex, Swiss).

1.2. Kullanılan Gereçler Listesi

1. Thomma lamı (Hausser Scientific, A.B.D.).
2. Dializ membranı (Spectra/por, m.w. cutoff 12000-14000, katalog no: 132676, Spectrum Medical Industries Inc., A.B.D.).
3. Kolon (0.9x30 cm boyutlarında, C6169 Sigma Chem. Co., A.B.D.).
4. 96 kuyucuklu, düz tabanlı, yüksek bağlama kapasiteli ELISA mikroplakları (High Binding Capacity, Greiner, 655061, Nürtingen, Almanya).
5. 96 kuyucuklu, U tabanlı, steril polipropilen mikroplaklar (M-4404; Sigma St. Louis, MO, A.B.D.)
6. 14 ml.'lik konik tabanlı, kapaklı, steril, polipropilen tüpler (Greiner, 188.271, Nürtingen, Almanya).
7. 50 ml.'lik konik tabanlı, kapaklı, steril, polipropilen tüpler (Greiner, 227.261, Nürtingen, Almanya).
8. Serolojik polipropilen tüpler (12x75 mm., Tip Sorvall – 110441; LP Italiana SPA, Milano, İtalya).
9. 1.5 ml.'lik kapaklı mikrosantrfüj tüpleri (Greiner, Nürtingen, Almanya).
10. Steril hücre kültür şişeleri (250ml; Greiner, 658170, Nürtingen, Almanya).
11. Enjektör filtresi (0.20µm, F-8148, Millipore filter, Millex-GS; Sigma).

12. Enjektör filtresi (0.45µm. 022678; Semadeni AG., Ostermudingen, Almanya.).
13. Pasteur pipetleri (Superior Marienfield, 32330503, Almanya).
14. 1ml.'lik steril enjektör (Sterijen; Hayat Tıbbi Aletler San., Çorum, Türkiye)
15. 2ml.'lik steril plastik enjektör (Sterijen; Hayat Tıbbi Aletler San., Çorum, Türkiye)
16. 10ml.'lik steril plastik enjektör (Medplast Sağlık Araç. A.Ş.; Ankara, Türkiye)
17. 20ml.'lik steril plastik enjektör (FE-Farma Tıp Malz. A.Ş., Elazığ, Türkiye)
18. 50ml.'lik steril plastik enjektör (Se-Inject; Tıbbet A.Ş., İstanbul)
19. 50µl.'lik Hamilton enjektör, Model 705N (Sigma, Z10,894-4, St.Louis, MO, A.B.D.).

1.3. Kimyasal ve Biyolojik Maddeler

1. 2, 6, 10, 14-Tetramethyl pentadecane; (Pristane, Sigma, T -7640, St. Louis, MO, A.B.D.).
2. (NH₄)₂SO₄ (Amonyum sülfat, Sigma, A-2939, St.Louis, MO, A.B.D.).
3. NaCl (Sodyum klorür, Merck, 6400.5000, Darmstadt, Almanya).
4. NaOH (Sodyum hidroksit, Merck, 6462.1000, Darmstadt, Almanya).
5. NaH₂PO₄·2H₂O (Monosodyum fosfat dihidrat, Merck, 6345.1000, Darmstadt, Almanya).
6. Na₂HPO₄ (Disodyum hidrojen fosfat, Merck, 6586.2500, Darmstadt, Almanya).
7. Na₂CO₃ (Sodyum karbonat, Merck, A931998, Darmstadt, Almanya).
8. NaHCO₃ (Sodyum bikarbonat, Sigma, D-4019, St. Louis, MO, A.B.D.).
9. C₂H₃O₂Na (Sodyum asetat, Merck, 9023840, Darmstadt, Almanya).
10. H₃PO₄ (Fosforik asit, Sigma, P- 6560, St. Louis, MO, A.B.D.).
11. HCl (Hidroklorik asit, Sigma, H-7020, St. Louis, MO, A.B.D.).
12. H₂SO₄ (Sülfürik asit, %95-98'lik, Merck, 9023840, Darmstadt, Almanya).
13. C₆H₈O₇ (Sitrik asit, Sigma, C-0759, St.Louis, MO, A.B.D.).
14. EDTA (Ethylene diamine tetracetate, disodium salt, dihydrate; Sigma. E-5134, St.Louis, MO, A.B.D.).

15. $C_4H_{11}NO_3$ (Trizma[®] base, Tris(hydroxymethyl) aminomethane; Sigma, T-1503, St.Louis, MO, A.B.D.).
16. Acrylamide (Sigma, A-8887, St. Louis, MO, A.B.D.).
17. N, N'- methylene-bis-acrylamide (Sigma, M-7256, St. Louis, MO, A.B.D.).
18. H_2NCH_2COOH (Glycine, Merck, 500.188, Darmstadt, Almanya).
19. $C_{12}H_{25}O_4SNa$ (Lauryl sulfat - Sodyum dodecylsulfate, Sigma, L-5750, St.Louis, MO, A.B.D.).
20. $(NH_4)_2S_2O_8$ (Amonyum Persulfat, Sigma, A-6761, St. Louis, MO, A.B.D.).
21. $C_3H_8O_3$ (Glycerol, Sigma, G-7757, St.Louis, MO, A.B.D.).
22. $C_6H_{16}N_2$ (N.N.N',N'-Tetramethyl – ethylenediamine, Sigma, T-9281, St.Louis, MO, A.B.D.).
23. %30'luk H_2O_2 (Hidrojen peroksit, Aldrich, 21676-3, Almanya).
24. $C_2H_4O_2$ (Asetik asit, Merck, 04134156, Darmstadt, Almanya).
25. CH_3OH (Methanol, Merck, 17800308, Darmstadt, Almanya).
26. Carbonic anhydrase (Sigma, C-2273, St.Louis, MO, A.B.D.).
27. Sığır albumin (Sigma, A-7517, St. Louis, MO, A.B.D.).
28. β - Galactosidase (Sigma, G-6017, St. Louis, MO, A.B. D.).
29. Sığır serum albumin (BSA) (Sigma, A-3803, St. Louis, MO, A.B.D.).
30. Fetal buzağı serum (FCS) (Seromed, S-0113, Biochrom KG, Berlin, Almanya).
31. Horseradish peroxidase (HRPO) ile işaretli anti-mouse IgG (Antikorum Fc bölgesine özgül) (Sigma, A-2554, St. Louis, MO, A.B.D.).
32. HRPO ile işaretli anti-mouse IgG (Antikorum Fab bölgesine özgül, bütün fare immünoglobülin izotiplerine bağlanabilmekte, Sigma, A-9917, St. Louis, MO, A.B.D.)
33. Bromphenol Blue (Sigma, B-6131, St.Louis, MO, A.B.D.).
34. %0,4'lük Tripan mavisi solüsyonu (Merck, 11732, Darmstadt, Almanya).
35. Coomassie Brilliant Blue R250 (Merck, Darmstadt, Almanya)

36. Tween-20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate; Sigma, P-1379, St.Louis, MO, A.B.D.).
37. BALB/c fare (Harlan Inc., England).
38. Hi-Trap Protein G kolonu, 1ml.'lik (Mab Trap® GII kit, Pharmacia, Uppsala, İsviçre).
39. Sephacryl S200 HR Jel filtrasyon matriksi (Pharmacia, Uppsala, İsviçre).
40. Heparin (Liquemine, 2500IU/5ml., Roche.).
41. $C_{16}H_{20}N_2 \cdot 2HCl$ (TMB, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine Dihydrochloride, Sigma, T-8768, St.Louis, MO, A.B.D.)
42. Papain (Sigma, P-4762, St.Louis, MO, A.B.D.)
43. $C_3H_7NO_2S$ (L-cysteine, Sigma, C-7755, St. Louis, MO, A.B.D.)
44. C_2H_4INO (Iodoacetamide, Sigma, I-6125, St.Louis, MO, A.B.D.)
45. $C_4H_{10}O$ (Isobutyl Alkol, Sigma, I-0273, St.Louis,MO, A.B.D.)

1.4. Kullanılan Monoklonal Antikorlar

1. Anti-insan albumin (A-HA1b/98) ³⁸
2. IgG1 izotipinde Anti-insan interleukin2; α -hIL2 (CAy-IL2G) ³⁹.
3. IgG1 izotipinde Anti-insan İnterferon gamma, α -hIFN γ -38 (CAy-IFN γ -38) ⁴⁰.
4. IgG2a izotipinde standard antikor (anti-insan IFN γ , nötralizan antikor, Saflaştırılmış fare monoklonal IgG2a, Catalog Number: MAB285, 500mg, Lot: KWO15061, R&D Systems, Minneapolis, MN 55413 A.B.D.).

1.5. Kullanılan Antijenler

1. Rekombinant insan IFN γ (Immuneron®), 1mg. Study No: NCI, Activity : $2.4 \times 10^7 U$, Lot No: 10M37 A, Biogen Research Corp., Cambridge, MA 02142)
2. Rekombinant insan IFN γ (Boehringer Ingelheim, 0.1mg/0.5ml, Ingelheim am Rhein, Almanya).

3. Rekombinant insan IL-2 (Proleukin™, 18 milyon aldesl kin/flakon,Roche)

1.6. Hazırlanan Solusyonlar

1. 10mM PBS (Phosphate Buffered Saline),: 1,9mM NaH₂PO₄.2H₂O + 8,1mM Na₂HPO₄ + 154mM NaCl, pH 7.4.
2. Kromatografi “ alıřma tamponu”: 10mM PBS + 0,2M NaCl, pH7.4.
3. Kromatografi “elüsyon tamponu”: 0,1M Sitrik asit, pH 2.6.
4. ELISA “yıkama tamponu” (PBS-T): %0.03 Tween 20 içeren 10mM PBS, pH 7.4.
5. ELISA “bloklama tamponu” (PBS-BSA): %3 BSA içeren 10mM PBS, pH 7.4.
6. ELISA “substrat tamponu”: TMB ve H₂O₂ içeren Sitrat-Fosfat Tamponu pH5.
7. Karbonat-bikarbonat tamponu (CBB): 15mM NaCO₃ + 35mM NaHCO₃, pH 9.6.
8. Sodyum asetat tamponu (Na-asetat), pH 4.5.
9. IgG “parçalama tamponu”: 10mM PBS içerisinde 0,02M EDTA + 0,02M Sistein
10. Jel sabitleştirici solusyon: %50 Methanol+%10 Asetik Asit+%40 Distile su.
11. Jel boyama solusyonu: %50 Methanol+%0.05 Coomasie R250+%10 Asetik Asit+%40 Distile Su.
12. Jel dekalorizasyon (boya çıkarma) solusyonu: %5 Methanol+%7 Asetik Asit + %88 Distile Su.
13. Jel saklama solusyonu: Distile su içerisinde %7’lik Asetik Asit.
14. Asetat-EDTA Tamponu : 0,1M Na-Asetat+0,003M EDTA, pH 5.5.
15. 4x Tris.Cl/SDS, pH 6.8 : 0.5M Tris.Cl+%0.4 SDS
16. 4x Tris.Cl/SDS, pH 8.8 : 1.5M Tris.Cl+%0.4 SDS
17. 2x SDS/ rnek Tamponu : 25ml 4xTris.Cl/SDS, pH6.8+20ml. gliserol+4g SDS+1mg Bromfenol mavisi karışımına 100ml.’ye tamamlanacak şekilde distile su eklendi.
18. 5x Elektroforez Tamponu : 15.1g Tris baz+72.0g glisin+5.0g SDS 1000ml.’ye tamamlanacak şekilde distile su eklendi.

2. YÖNTEMLER

2.1. Anti-hIFN γ IgG1 Monoklonal Antikor Saflaştırılması

Anti-hIFN γ IgG1 monoklonal antikor salgılayan ve laboratuvarımızda üretilen CAy-IFN γ -38 hibridoma hücrelerinin⁴⁰, BALB/c farelere intraperitoneal verilmesi ile oluşturulan asit sıvısından Protein G affinite kromatografisi yöntemi ile aşağıda özetlendiği şekilde saflaştırıldı.

2.1.1. Anti-hIFN γ IgG1 İçeren Peritoneal Asit Sıvısının Oluşturulması:

Hibridoma hücre kültür süpernatanlarına göre asit sıvısında 100-1000 kat daha fazla antikor oluşmaktadır⁴². Bu yüzden, çalışmalarda kullanılmak üzere yeterli miktarda α -hIFN γ IgG1 elde edebilmek için CAy-IFN γ -38 hibridoma hücreleri BALB/c farelere intraperitoneal verilerek asit sıvısı oluşturuldu.

Bu amaçla ilk önce, tümör oluşumunu hızlandırmak için 6 adet 8 haftalık dişi ve 10 adet 14 haftalık erkek BALB/c farelere 0.5ml pristan intraperitoneal verildi. 5 gün sonra, canlılık yüzdesi yaklaşık %94 olan yaklaşık 2.5×10^6 /ml sayıdaki CAy-IFN γ -38 hibridoma hücresinden her bir fareye 0.5 ml hücre intraperitoneal verildi. Hücrelerin enjeksiyonundan 9 gün sonra 2 dişi fareden 12.5 ml peritoneal asit sıvısı toplandı. Pristan kalıntısını ortamdaki uzaklaştırmak için asit sıvısı 400xg'de 10 dakika santrifüj edilerek cam pamuğundan geçirildi. Toplanan yaklaşık 11 ml'lik süpernatanın 0.5 ml'si -80°C'de saklanırken kalan 10.5 ml üzerine 20mM Tris-HCl pH 8.0 eklenerek 50 ml'ye tamamlandı. Bu karışım sürekli karıştırılarak üzerine 50 ml doymuş amonyum sülfat (Saturated ammonium sulfate "SAS") çözeltisinden 50 ml eklendi ve gece boyunca +4°C'de çökelmeye bırakıldı.

$$\text{SAS} / (\text{SAS} + \text{Karışım}) (v/v) = \%50.$$

Ertesi gün, çözelti 1500xg'de 40 dakika santrifüj edildi. Çökeltinin distile su ile çözülmesi sonucu oluşan 10 ml'lik çözelti pH7.2 olan +4°C'deki 1lt'lik 10mM PBS'e

karşı 4 saatte bir değiştirilerek gece boyunca diyaliz edildi. Diyaliz edilen örnek 1500xg'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra 0.45µm'lik por çaplı enjektör filtresinden süzüldü ve 5 ml 10mM'lık PBS eklenerek 15 ml'ye tamamlandı. Amonyum sülfat ile çöktürme sonrası süpernatandaki ve çökteltideki özgül antikor miktarları ELISA yöntemiyle ölçüleceğinden her iki fraksiyondan 0.5'er ml ayrılarak -80°C de saklandı.

2.1.2. Asit Sıvısından Protein G Affinite Kromatografisi ile Anti-hIFN γ IgG1 Saflaştırılması :

Protein G'nin fare kaynaklı IgG1'e protein A'dan daha kuvvetli bağlanması nedeniyle⁴², asit sıvısından α -hIFN γ IgG1'in protein G affinite kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı.

1ml'lik Hi-Trap Protein G Sepharose kolonu (Mab Trap[®] GII Kit, Pharmacia) sıvı kromatografi sistemine (HPLC sistemi, Waters 600E System Controller, Millipore Corp., Milford, MA, A.B.D.) bağlandı ve çalışma tamponu (10 mM PBS + 0,2 M NaCl, pH 7.4) ile dengelendi. Protein G kolonuna 0,5ml/dak. sabit akım hızında her defasında yaklaşık 15 ml'lik örnekten 2 ml yüklendi. Kolona uygulanan örnek içerisindeki proteinlerin oluşturduğu pikler 280 nm dalga boyu kullanılarak "Waters System Interface Module" (Millipore) yardımıyla 30 dakikalık süre içerisinde "Maksima 820 Chromatography Workstation Version 3.30" (Dynamic solutions, Millipore, serial Number 30000 M/4) bilgisayar programında görüntülendi. 2 ml örnek yüklendikten sonra kolon çalışma tamponu ile yıkandı. Protein G'ye bağlanan α -hIFN γ IgG1'in serbestleştirilmesi için 2 ml 0,1M sitrik asit pH 2,6 kullanıldı. Elde edilen pik bölgesi (21³⁰-25³⁰ arası = 2 ml) toplandı ve 0.9 ml 1M Trizma[®] base ile nötralize edildi. Ön çalışmayla, α -hIFN γ IgG1'in çıktığı zaman aralığı belirlendikten sonra çalışma tamponu ile kolon yıkanarak α -hIFN γ IgG1 içeren yaklaşık 13 ml'lik örnek 2'şer ml'lik kısımlara bölünerek 6 defa daha sisteme yüklendi. Her çalışma sonrası kolon çalışma tamponu ile yıkanarak yeni çalışma için hazır duruma getirildi. 0,1M sitrik asit pH 2,6

uygulanmasının ardından ön çalışma ile belirlenen dakikalar arasında α -hIFN γ IgG1 içeren pik 2'şer ml'lik fraksiyonlar halinde toplanıp 0.9 ml 1M Trizma[®] base ile nötralize edildikten sonra havuzlandı. Havuzlama sonrası yaklaşık 20 ml'lik α -hIFN γ IgG1 solusyonu 0,45 μ m por çaplı filtreden geçirildikten sonra +4°C'de 1lt'lik 10mM PBS'e karşı 4 saatte bir değiştirilerek gece boyunca diyaliz edildi. Diyaliz sonrası α -hIFN γ IgG1 solusyonu 0.5'er ml'lik preparatlar şeklinde -80°C'de saklandı.

2.1.3. Protein Miktarının Ölçümü

Protein G kolonundan saflaştırılan α -hIFN γ IgG1 solusyonundaki protein miktarı, protein standardı olarak kullanılan sığır serum albuminin (BSA) 280nm'deki absorbans değerleri ile karşılaştırılarak saptandı⁴³. Bu amaçla, standart olarak kullanılacak olan BSA, 10mM PBS ile sulandırılarak 0,11mg/ml, 0,33mg/ml ve 1mg/ml'lik konsantrasyonlarda hazırlandı. Protein miktarı ölçülecek olan 20ml'lik α -hIFN γ IgG1 solusyonundan 0.5 ml alınarak 10mM PBS ile ½ oranında sulandırıldı. Daha sonra sırasıyla 0,11mg/ml, 0,33mg/ml ve 1mg/ml'lik konsantrasyonlardaki BSA ve ardından ½ oranında dilüe edilmiş α -hIFN γ IgG1 solusyonlarından 0,5 ml sıvı kromatografi sistemine (HPLC sistemi, Waters 600E System Controller, Millipore Corp., Milford, MA, A.B.D.) 1ml/dak sabit akım hızında yüklendi. Yüklenen standartlar ve örnek içerisindeki protein maddelerinin oluşturduğu pikler 280 nm dalga boyu kullanılarak "Waters System Interface Module" (Millipore) yardımıyla 25 dakikalık süre içerisinde "Maksima 820 Chromatography Workstation Version 3.30" bilgisayar programında görüntülendi. Okuma sonuçları, konsantrasyonu bilinen BSA titrasyonları ile yapılan standart eğriye göre karşılaştırılarak, örneklerin protein konsantrasyonları hesaplandı.

2.2. Saflaştırma Sonrası Özgül Anti-hIFN γ IgG1 Monoklonal Antikor Miktarının ELISA Yöntemi ile Ölçülmesi.

Protein G kolonundan saflaştırılıp protein tayini yapılmış α -hIFN γ -38 IgG1 solusyonundaki özgül antikor miktarı standart α -hIFN γ (R&D) kullanılarak ELISA yöntemi ile saptandı. Bu çalışmada aynı zamanda saflaştırma öncesi asit sıvısındaki antikor miktarı, amonyum sülfat ile çöktürme sonrası üst sıvıdaki ve çökteltideki antikor miktarları ve saflaştırma sonrası elde edilen piklerdeki antikor miktarları da çalışılarak karşılaştırıldı.

Çalışmanın bir gün öncesinde yüksek bağlama kapasiteli, düz tabanlı, 96 çukurlu plağın tüm çukurlarına 10mM PBS ile 2 μ g/ml konsantrasyona ayarlanan hIFN γ (Immuneron)'dan 50 μ l/çukur dağıtıldı ve plak +4°C'de gece boyunca enkübasyona bırakıldı.

Enkübasyon sonunda plak otomatik ELISA yıkama cihazında 3 kez distile su ile yıkandıktan sonra plağın tüm çukurlarına 150 μ l/çukur bloklama tamponu (10mM PBS pH 7,2 içerisinde %3BSA) dağıtıldı ve 37°C ortamda 30 dakika enkübe edildi. Enkübasyon sonunda plak otomatik ELISA yıkama cihazında 5 kez yıkama tamponu (PBS-T) ile yıkanarak kullanıma hazır duruma getirildi.

Detayları aşağıda tanımlandığı gibi 96 çukurlu polipropilen plakta 10mM PBS kullanılarak örneklerin 1/10 seri dilüsyonları hazırlandı. Dilüsyon sonrası polipropilen plağın her çukurundan 100 μ l/örnek sıra ile alınarak kullanıma hazır duruma getirilmiş 96 çukurlu çalışma plağına aynı konfigürasyonda aktarıldı ve 37°C'lik ortamda 1 saat enkübasyona bırakıldı. Enkübasyon süresinin sonunda plak otomatik ELISA yıkayıcısı ile 5 kez PBS-T ile yıkandıktan sonra plağın yarısına (1-6. striplerdeki çukurlara) %10 FCS içeren 10mM PBS ile 1/6000 oranında sulandırılmış HRPO işaretli anti-fare IgG Fab özgül konjugattan, kalan yarısına (7-12. striplerdeki çukurlara) ise %10 FCS içeren 10mM PBS ile 1/6000 oranında sulandırılmış HRPO işaretli anti-fare IgG Fc

özgül konjugattan 100µl/çukur dağıtıldı ve 37°C'lik ortamda 1 saat enkübasyona bırakıldı. Enkübasyon sonunda otomatik ELISA yıkama cihazı kullanılarak plak 5 kez PBS-T ile yıkandı. Daha sonra fosfat-sitrat tamponunda çözülen TMB içerisine kullanmadan hemen önce %30'luk H₂O₂'den %0.1 oranında eklenerek hazırlanan substrat tamponundan 100µl/çukur dağıtıldı ve plak oda sıcaklığında, karanlıkta 30 dakika bekletildi. Sürenin sonunda 1M H₂SO₄ durdurma solusyonundan plaktaki tüm çukurlara 50'şer µl eklenerek plak 10 dakika içerisinde $\lambda=450 / 620 \text{ nm}$ 'de spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

Tablo 1. CAy-IFN γ -38 asit sıvısından antikor saflaştırılması esnasında elde edilen değişik örneklerin hIFN γ (Immuneron) kaplı ELISA plağına dağıtım konfigürasyonu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X1	X2	X3	X4	X5	X6
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

X1: 10.5 ml CAy-IFN γ -38 asit sıvısının 10mM PBS ile 1/10 dilüe edilmiş şekli. Aşağıya doğru (B→H) konsantrasyonu 1/10 azalmakta.

X2: %50 SAS çöktürme ve santrifüj sonrası üstte kalan kısım (yaklaşık 100 ml). Aşağıya doğru (B→H) konsantrasyonu 1/10 azalmakta.

X3: %50 SAS çöktürme, santrifüj ve dializ sonrası 15 ml'ye tamamlanmış çöktürmenin 10mM PBS ile 1/10 dilüe şekli. Aşağıya doğru (B→H) konsantrasyonu 1/10 azalmakta.

X4: Protein G kolonuna yüklenen 2 ml işlenmiş asit sıvısının 6¹⁵-16¹⁵. dakikalar arasındaki kolona bağlanmadan çıkan kısmının 10mM PBS ile 1/10 dilüe edilmiş şekli. Aşağıya doğru (B→H) konsantrasyonu 1/10 azalmakta.

X5: Protein G kolona yüklenen 2 ml işlenmiş asit sıvısından kolona bağlanmış olan ve 0.1M sitrik asit ile 21³⁰-25³⁰. dakikalar arasında serbestleştirilen 2ml pik fraksiyonun 0.9ml 1M Trizma ile nötralize edildikten sonra (2.9 ml) 10mM PBS ile 1/10 dilüe edilmiş şekli. Aşağıya doğru (B→H) konsantrasyonu 1/10 azalmakta.

X6: Standart anti-hIFN γ mAb'ın 10mM PBS ile 1µg/ml'ye ayarlanmış konsantrasyonu. Aşağıya doğru (B→H) konsantrasyonu 1/10 azalmakta.

Çalışılan örneklerdeki α -hIFN γ , katı fazdaki IFN γ 'ya bağlanmaktadır. Katı fazdaki IFN γ ile α -hIFN γ etkileşim içerisinde ise, üzerine eklenen enzim işaretli anti-fare Ig Fc veya Ig Fab konjugat bağlamaktadır. Substrat eklendiğinde, enzimatik reaksiyon gerçekleşmekte ve renklenmeye neden olmaktadır. Her çukurdaki renklenme düzeyi $\lambda =$

450/620 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirildi ve konsantrasyonu bilinen R&D'nin değişik titrasyonlardaki OD değerleri ile örneklerin OD değerleri karşılaştırılarak örneklerdeki α -hIFN γ IgG miktarları hesaplandı.

2.3. α -hIFN γ 38 IgG1'in Parçalanması

Antikor molekülleri iki adet ağır ve iki adet hafif tipteki dört polipeptid zincirden oluşmaktadır. Antikor moleküllerinde, herbir ağır zincir birbirleriyle ve birer hafif zincire disülfid bağları ile bağlanmıştır. Bu disülfid bağları çeşitli proteolitik enzimler vasıtasıyla enzim tipine bağlı olarak değişik bölgelerden parçalanarak antikorların genel olarak Fab ve Fc parçalarına ayrılmasına neden olmaktadır. IgG'nin papain enzimi ile parçalanması sonucunda Fab adı verilen monovalan veya F(ab)₂ adı verilen bivalan parçalar oluşabilmektedir ^{44, 45}.

2.3.1. α -hIFN γ 38 IgG1'in Papain Enzimi Kullanılarak Parçalanması.

Papain enziminin L-sistein benzeri tiol grubunda yer alan moleküllerin varlığında antikor molekülünü 3 parçaya böldüğü bilinmektedir. Bu parçalardan ilk ikisi birbiri ile eş yapılı olup Fab (Fragment antigen binding: Antijen bağlayan kısım) olarak adlandırılır. Üçüncü parçanın ise antijenle bağlanma özelliği olmayıp, soğukta kolaylıkla kristalize olur. Bu nedenle üçüncü parçaya Fc (Fragment crystallizable: Kristalize olabilen kısım) denir.

α -hIFN γ 38 IgG1'in papain enzimiyle parçalanması sonucunda Fab fragmentleri elde edilmesi amaçlanmıştır. Ancak, antikorun papain enzimiyle parçalanma süresi antikorun izotipine ve kaynağına bağlı olarak değişmektedir ⁴⁶. Bu amaçla ilk olarak α -hIFN γ 38 IgG1'in papain enzimi ile parçalanma süresi saptandı.

Papain enzimi taze hazırlanmış parçalama tamponunda 0.1mg/ml'lik konsantrasyonda hazırlandı. α -hIFN γ IgG1'in Fab ve Fc parçalarına ayrılmasında papain enziminin uygun olan etki süresinin saptanması amacıyla 2 saat, 4 saat, 8 saat, 16 saat, 24

saat, 36 saat, 48 saat, kontrol ve parçalama tamponu kontrolü olmak üzere 9 ayrı grup hazırlandı. 2 saat, 4 saat, 8 saat, 16 saat, 24 saat, 36 saat ve 48 saatlik grupların herbirine 10mM PBS içerisinde konsantrasyonu 2mg/ml'ye ayarlanan α -hIFN γ IgG1'den 200 μ l dağıtıldı. Bu gruplara papain/antikor oranı 1/20 olacak şekilde 200 μ l yeni hazırlanmış papain enzimi dağıtıldı. Ayrıca parçalama tamponu ve papain içermeyen kontrol grubuna 2mg/ml konsantrasyondaki α -hIFN γ IgG1'den 350 μ l ve 10mM PBS'den 350 μ l dağıtıldı. Parçalama tamponunun α -hIFN γ IgG1 üzerine etkisini saptamak amacıyla 2mg/ml konsantrasyondaki α -hIFN γ IgG1'den 500 μ l içeren gruba 500 μ l papainsiz parçalama tamponu dağıtıldı. Tüm gruplar 37°C'lik su banyosunda enkübasyona bırakıldı. Her gruba enkübasyon süresinin sonunda final konsantrasyonu 0.03M olacak şekilde 0.3M iodoasetamid eklendi ve karıştırıldı. Antikorların parçalanmasında en uygun süre SDS-PAGE yöntemi ile tespit edilinceye kadar örnekler -80°C'de saklandı.

Ayrıca diğer bir çalışmada da papain enziminin 1 saatten daha kısa sürelerdeki etkisini saptamak amacıyla antikorum papain enzimiyle 15 dakika, 30 dakika ve 60 dakikalık sürelerde enkübasyonu yapıldı. 15, 30 ve 60 dakikalık grupların herbirine 10mM PBS ile konsantrasyonu 2mg/ml'ye ayarlanan α -hIFN γ IgG1'den 200 μ l dağıtıldı. Bu gruplara papain/antikor oranı 1/20 olacak şekilde 200 μ l yeni hazırlanmış papain dağıtıldı. Parçalama tamponunun α -hIFN γ IgG1 üzerine etkisini saptamak amacıyla 2mg/ml konsantrasyondaki α -hIFN γ IgG1'den 150 μ l içeren gruba da 150 μ l papainsiz parçalama tamponu dağıtıldı. Dağıtım sonrası tüm gruplar 37°C'lik su banyosunda enkübasyona bırakıldı. Her gruba enkübasyon süresinin sonunda final konsantrasyonu 0.03M olacak şekilde 0.3M iodoasetamid eklendi ve SDS-PAGE yöntemiyle değerlendirilmek üzere -80°C'de saklandı.

2.3.2. α -hIFN γ 38 IgG1'in Parçalanmasında L-sisteinsiz (Papain aktive edilerek L-sistein ortamdan uzaklaştırılmakta) ve L-sisteinli Ortamda (Temel yöntem) Parçalama Yöntemlerinin Karşılaştırılması.

α -hIFN γ 38 IgG1'in papain enzimiyle parçalanmasında en uygun yöntemin saptanması amacıyla IgG'nin papain enzimiyle parçalanmasında kullanılan temel yöntem ile alternatif yöntem olan L-sistein ile papainin aktive edilerek ortamdan L-sistenin uzaklaştırıldığı parçalama yöntemleri karşılaştırıldı.

IgG'nin papain enzimiyle parçalanmasında aktive edilmiş papain kullanımı alternatif bir yöntemdir. Bu yöntemde papain enzimi kullanılmadan önce L-sistein ile aktive edilmekte ve daha sonra kromatografik yöntem kullanılarak L-sistein ortamdan uzaklaştırılmakta ve ardından aktive edilmiş papain kullanılmaktadır. Bu yöntem, çoğunlukla IgG1'den F(ab)₂ fragmanlarının veya IgG2a ve IgG2b'den Fab fragmanlarının elde edilmesinde kullanılmaktadır ⁴⁵.

Aktive edilmiş papain ile α -hIFN γ 38 IgG1'in parçalanmasında ilk olarak asetat-EDTA tamponunda çözülmüş 2mg/ml papain içerisine yeni hazırlanmış 0.5M L-sisteinden final konsantrasyonu 0.05M olacak şekilde uygun miktarda eklenerek karışım 37°C'lik su banyosunda 30 dakika enkübasyona bırakıldı. Enkübasyon süresinin sonunda aktive edilmiş papainden L-sisteini ayırmak için jel filtrasyon kromatografi yöntemi uygulandı. Sephadex G-25 Fine jeli kullanılarak hazırlanan jel filtrasyon kromatografi kolonu HPLC sistemine bağlandı. Cam kolona (0,8x30 cm) jelin oturtulmasından sonra, asetat-EDTA tamponu pH5.5 ile kolon pH'sı dengelendi. Akım hızı 0.75ml/dakika'ya ayarlanarak L-sistein-papain karışımının 1 ml'si sisteme yüklendi. Kromatografi işlemi esnasında oluşan pikler 214 nm ve 280 nm'ye ayarlanmış UV dedektör ve bilgisayar programı ile görüntülendi. 12-15. dakikalar arasında oluşan L-sisteinden arındırılmış papain içeren pik (=2.25 ml) 1ml'lik fraksiyonlar şeklinde bölünüp -80°C'de saklandı. Jel filtrasyon kromatografi yöntemiyle L-sisteinden arındırılmış aktive papain ile

konsantrasyonu asetat-EDTA pH5.5 tamponunda 1mg/ml'ye ayarlanmış α -hIFN γ 38 IgG1; papain/antikor oranı 1/40 olacak şekilde karıştırılarak 37°C'lik su banyosunda 2 saat enkübyasyona bırakıldı. Enkübyasyon süresinin sonunda kontrol grubu ile beraber her iki gruba da 0.3M iodoasetamid'den final konsantrasyonu 0.03M olacak şekilde uygun miktarda eklendi ve SDS-PAGE yöntemiyle değerlendirilmek üzere -80°C'de saklandı.

2.3.3. Papain ile Parçalama Sonrası Örneklerin SDS-PAGE Analizi.

SDS-PAGE kullanılarak fare monoklonal antikorların enzimle ayrılan parçaları kolayca ayırt edilebilmektedir. Bu yüzden α -hIFN γ 38 IgG'nin papain enzimiyle parçalanması sonrası oluşan parçaları ayırt etmek ve papain ile parçalama yönteminde en etkin süreyi tespit edebilmek için SDS-PAGE kullanılmıştır ⁴⁷.

Bu amaçla ilk olarak, %10'luk ayırıcı (seperating) jel hazırlandı. 150 ml'lik kap içerisinde 15 ml %30 acrylamide/%0.8 bisacrylamide, 11,25 ml 4x Tris-Cl/SDS pH 8.8 ile 18.75 ml distile su karıştırıldı ve vakum yardımıyla çözünmüş gazları çıkarıldıktan sonra 150 μ l %10'luk amonyum persülfat ve 30 μ l TEMED eklenerek polimerizasyon sağlandı. Jel, iyice temizlenip sisteme yerleştirilmiş iki cam plak arasına Pasteur pipeti yardımıyla dökülerek yaklaşık 8cm yükseklikte jel dolumu sağlandıktan sonra jelin üst tabakasına yaklaşık 1cm kalınlığında isobutyl alkol döküldü. Hava ile teması kesilen jel oda sıcaklığında yaklaşık 60 dakika bekletilerek polimerizasyonu sağlandı. Daha sonra üst kısımdaki isobutyl alkol döküldü ve üst kısım 1x Tris-Cl/SDS pH 8.8 ile yıkandı. Ardından konsantre edici (stacking) jel hazırlandı. 50 ml'lik tüp içerisinde 1.3 ml %30 acrylamide/%0.8 bisacrylamide, 2.5 ml 4x Tris-Cl/SDS pH 6.8 ve 6.1 ml distile su karıştırıldı ve vakum yardımıyla çözünmüş gazları çıkarıldıktan sonra 50 μ l %10 amonyum persulfat ve 10 μ l TEMED eklenerek ayırıcı jel üzerine yaklaşık 3cm yükseklikte stacking jel dökülerek 1.5mm kalınlıktaki tarak yerleştirildi. Stacking jel'in polimerizasyonu için 45 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu süre içerisinde örnekler 1/1 oranında bromphenol mavisi (2xSDS/Örnek Tamponu) ile karıştırılarak 30 dakika kaynar

su içerisinde bekletildi. Sürenin sonunda tarak çıkartılarak açılmış olan kuyucuklar 1x SDS/Elektroforez tamponu ile yıkanarak polimerize olmamış monomerler uzaklaştırıldıktan sonra kuyucuklar 1x SDS/Elektroforez tamponu ile dolduruldu. Daha sonra 50µl'lik Hamilton enjektörü kullanılarak standartlardan ve her bir örnekten 25µl uygun kuyucuklara dağıtılarak sistem güç kaynağına bağlandı. Örnekler 10.5 cm boyunda, 15 cm eninde ve 1.5mm kalınlıktaki jel'de 40mAmp akımda 4 saat süresince yürütüldü. Sürenin sonunda jel dikkatlice yerinden çıkartılarak Coomassie Brilliant mavisi ile boyandı. Boyama işleminde jel 100ml. sabitleştirici solusyonunda 1 saat bekletildikten sonra 30 dakika Coomassie boyama solusyonunda bekletildi. Boyama sonrası jel sabitleştirici solusyon ile yıkanarak 1 saat boya çıkarıcı solusyonda bekletildi. Bir gece boyunca 4 defa değiştirilen boya çıkarıcı solusyon ertesi gün döküldü ve jel %7'lik asetik asit içerisinde saklandı.

2.4. Protein G Affinite Kromatografi Yöntemiyle α -hIFN γ 38 IgG1 Fab Fragmanlarının Saflaştırılması.

SDS-PAGE yöntemiyle α -hIFN γ IgG1'in papain enzimiyle parçalanmasında uygun sürenin 4 saat olduğu saptandıktan sonra Fab fragmanları saflaştırıldı. Protein G'nin fare kaynaklı IgG1'in Fab fragmanlarını bağlaması nedeniyle, α -hIFN γ IgG1'in papain enzimi ile Fab ve Fc parçalarına ayrılması sonrası Fab parçalarını saflaştırmak için protein G ile affinite kromatografi yöntemi kullanıldı ^{42, 48, 49,50, 51}.

Bu amaçla, papain/antikor oranı 1/20 olacak şekilde total Ig konsantrasyonu 3mg/ml olan (α -hIFN γ -38 IgG1 miktarı ise 1mg/ml) IgG örneğinden 5ml ile 0.1 mg/ml konsantrasyondaki 7.5ml papain karıştırıldı. Karışım 4 saat boyunca 37°C'lik su banyosunda bekletildi. Enkübasyon süresinin sonunda karışıma final konsantrasyonu 0.03M olacak şekilde 0.3M'lık iodoasetamid'den 1.25 ml eklendi ve iyice karıştırıldı. Iodoasetamid ile papain enziminin aktivitesi durdurulduktan sonra karışımdaki Fab

parçalarını saflaştırmak amacıyla 1ml'lik Hi-Trap Protein G Sepharose kolonu (Mab Trap® GII Kit, Pharmacia) HPLC sistemine bağlandı ve çalışma tamponu (10 mM PBS + 0,2 M NaCl, pH 7,4) ile dengelendi. Protein G kolonuna 0,5ml./dak sabit akım hızında 13.75 ml örnekten her defasında 5 ml yüklendi. Örnek içerisindeki IgG1 Fab parçalarının oluşturduğu ve protein G'ye bağlı kalan havuz kolonun çalışma tamponu ile yıkanması sonrasında 2 ml 0,1M sitrik asit pH 2,6 ile serbestleştirildi. Elde edilen pik bölgesi (25³⁰-28. dakikalar arası= 1.25 ml) toplandı ve 575 µl 1M Trizma® base ile nötralize edildi. Kolon çalışma tamponu ile yıkandıktan sonra 40. dakikada kalan 8.75 ml'lik örnekten 5ml yüklendi. Kolona 2ml 0.1M sitrik asit uygulanması sonrası 60³⁰-63. dakikalar arasında Fab parçalarını içeren pik bölgesi (1.25 ml) toplandı ve 575 µl 1M Trizma® base ile nötralize edildi. Saflaştırma ve nötralizasyon işlemleri sonrası elde edilen ve Fab parçalarını içeren sıvı 250µl'lik örnekler halinde bölünerek -80°C'de saklandı.

2.5. Protein G'ye Bağlanan ve Bağlanmayan Fraksiyonların Antijene Karşı Özgüllüğünün Araştırılması.

Fab parçalarını saflaştırmak amacıyla kullanılan protein G affinite kromatografi işleminde kolona bağlanmadan çıkan 7⁰⁰-18³⁰ ve 42⁰⁰-53³⁰ dakikaları arasındaki havuzlanmış pikler ile 25³⁰-28⁰⁰ ve 60³⁰-63⁰⁰ dakikalar arasındaki sitrik asit ile serbestleştirilmiş kolona bağlı piklerin hIFN γ (Immuneron), hIL2 (Proleukin) ve HSA (İnsan serum albumin) kaplı katı faza bağlanma özellikleri karşılaştırıldı.

Bu amaçla, yüksek bağlama kapasiteli 96 çukurlu ELISA plağının farklı kuyucuklarına 10mM PBS'de 2µg/ml konsantrasyona ayarlanan Immuneron'dan, 5µg/ml konsantrasyona ayarlanan Proleukin (hIL2)'den veya 10µg/ml konsantrasyona ayarlanan insan serum albuminden 50µl./çukur şeklinde dağıtımları yapılarak bir gece boyunca +4°C'de bekletildi. Ertesi gün plak 3 kez distile su ile yıkandıktan sonra her bir çukura 150µl./çukur bloklama tamponu (10mM PBS pH 7.2 içerisinde %3BSA) dağıtılarak

37°C'lik nemli ortamda 30 dakika enkübasyona kaldırıldı. Enkübasyon süresinin sonunda plak 5 kez yıkama tamponu ile yıkanarak kullanıma hazır duruma getirildi.

Protein G affinite kromatografisi sonrası elde edilen pikler %10 FCS içeren 10mM PBS (PBS-10) içerisinde 1/10 oranında sulandırıldı ve aynı tampon içerisinde 1/10 seri dilüsyonları yapıldıktan sonra hIFN γ , hIL-2 veya HSA kaplı katı fazlara 100 μ l/çukur dağıtıldı. Kontrol amacıyla plağın belirli çukurlarına Immuneron kaplı kısımda CAy-IFN γ -38 hücre kültür süpernatanı, Proleukin kaplı kısımda CAy-IL2G hücre kültür süpernatanı ve HSA kaplı kısımda A-HA1b/98 hücre kültür süpernatanından 100 μ l/çukur dağıtıldı. Kör (blank) olarak belirli çukurlara 100 μ l/çukur PBS-10 dağıtıldı ve plak 37°C'lik nemli ortamda 1 saat enkübasyona bırakıldı. Enkübasyon sonunda plak 5 kez otomatik ELISA yıkayıcısında PBS-T ile yıkandı. Daha sonra konjugat olarak PBS-10 içerisinde 1/6000 oranında sulandırılmış anti-fare Ig (Fab-spesifik) konjugattan 100 μ l/çukur tüm çukurlara dağıtıldı. ELISA işlemi yukarıda tanımlandığı şekilde tamamlandı.

2.6. IFN γ Kaplı Fazla Etkileşime Giren Protein G'ye Bağlanan Fraksiyonun Fab- ve Fc- Spesifik Konjugatlarla Reaksiyon Düzeyinin Karşılaştırılması.

Yukarıda tanımlandığı şekilde bir gece bekletilerek kullanıma hazır duruma getirilen Immuneron veya Boehringer kaplı plaklara PBS-10 içerisinde seri dilüsyonu yapılan α -hIFN γ IgG1 Fab örneklerinden 100 μ l/well dağıtılarak 37°C'lik ortamda 1 saat enkübasyona bırakıldı. Enkübasyon sonunda plak otomatik yıkayıcı ile 5 kez PBS-T ile yıkandı. Yıkama sonrası PBS-10 içerisinde 1/6000 oranında sulandırılmış HRPO işaretli anti-fare Ig (Fc-spesifik) veya anti-fare Ig (Fab-spesifik) konjugatlarından 100 μ l/çukur dağıtımı yapıldıktan sonra 37°C'de 1 saat enkübasyona bırakıldı. Enkübasyon süresinin sonunda ELISA işlemi yukarıda tanımlandığı gibi tamamlandı.

2.7. Aşılama

Aşılama için, her grupta 5 adet 8-10 haftalık dişi BALB/c fare olacak şekilde 4 grup hazırlandı. Immuneron preperatında insan albumini olması nedeniyle aşılama işlemi için Boehringer Firmasına ait insan albumini içermeyen hIFN γ preperatı kullanıldı. Gruplarda yapılan aşılama işlemi aşağıda tanımlandığı şekilde gerçekleştirildi.

1. Grup (IgG-Ag Grubu): Bu gruptaki farelere enjekte edilecek hIFN γ ve α -hIFN γ IgG miktarları molar oranına göre hesaplandı. hIFN γ homodimer yapılı bir moleküldür. α -hIFN γ IgG'nin homodimer yapılı hIFN γ 'ya bağlanmasını sağlayacak 2 adet X epitopu bulunmaktadır. X epitopları arasındaki mesafe ve konfigürasyonun uygun olup olmadığı bilinmediği için 2 adet Fab içeren α -hIFN γ IgG'den bir molekülün bu işlevi yapabileceği bilinmemektedir. Bu nedenle, homodimer yapılı bir hIFN γ molekülündeki 2 adet X epitopunu kapatabilmek için 2 adet α -hIFN γ IgG molekülü kullanılması gerektiğine karar verildi. Dolayısıyla X epitoplarını kapatmada bir molekül hIFN γ için en az bir molekül α -hIFN γ IgG gerekmektedir. Monomer yapılı hIFN γ 'nın molekül ağırlığı 25-30kDa, monomerik IgG'nin moleküler ağırlığı ise 150 kDa'dır. Bu nedenle belirli miktardaki hIFN γ 'yı nötralize etmek için (X epitoplarını kapatabilmek için) en az 5 katı ağırlıkta α -hIFN γ IgG kullanılması gerekmektedir (Bir molekül hIFN γ için bir molekül IgG kullanılmalıdır).

Aşılama için kullanılacak olan 0.1mg/0.5ml konsantrasyondaki hIFN γ ile 0.5mg/0.5ml konsantrasyona ayarlanmış α -hIFN γ IgG'den eşit hacimlerde karıştırıldı ve 1 saat 37°C'de enkübasyona bırakıldı. Enkübasyon sonunda 1 ml'lik hIFN γ - α -hIFN γ IgG karışımı 1ml Complete Freund's adjuvantı ile karıştırıldı. Yeteri sertlikteki homojen karışımdan her bir fareye 200 μ l intraperitoneal enjekte edildi. 15 gün sonra aynı şekilde hazırlanan hIFN γ - α -hIFN γ IgG karışımı 1ml Incomplete Freund's adjuvantı ile karıştırılarak fare başına 200 μ l intraperitoneal (i.p) enjeksiyon tekrarlandı.

2. Grup (Fab-Ag Grubu): Bu gruptaki farelere enjekte edilecek hIFN γ ve α -hIFN γ IgG Fab miktarları molar oranlarına göre hesaplandı. Dolayısıyla 0.1mg/0.5ml hIFN γ ile 0.2mg/0.5ml α -hIFN γ IgG Fab örneklerinden eşit hacimlerde karıştırılarak 1 saat 37°C'de enkübasyona bırakıldı. Enkübasyon sonunda karışım 1ml Complete Freund's adjuvant ile karıştırıldı ve homojen bir karışım elde edilince her bir fareye i.p. 200 μ l enjekte edildi. 15 gün sonra aynı miktarda IFN γ ve α -hIFN γ IgG Fab karıştırılarak 1 saat 37°C'de enkübe edildikten sonra 1ml Incomplete Freund's adjuvant ile karıştırıldı ve homojen bir karışım elde edilince herbir fareye 200 μ l i.p. enjekte edildi.

3. Grup (Ag Grubu): Bu gruptaki fareler sadece hIFN γ ile aşılanmıştır. 300 μ l hIFN γ (0.2mg/ml) ile 300 μ l PBS karıştırıldı. Daha sonra 600 μ l Complete Freund's adjuvant ile karıştırılarak herbir fareye 200 μ l i.p. enjekte edildi. 15 gün sonra aynı şekilde hazırlanan IFN γ -PBS karışımı 600 μ l Incomplete Freund's adjuvant ile karıştırıldı ve herbir fareye 200 μ l i.p. enjekte edildi.

4. Grup (PBS Kontrol Grubu): Bu gruptaki fareler negatif kontrol olarak kullanılacağından yukarıda tanımlanan şekilde sadece PBS ile i.p. enjeksiyon yapıldı.

İkinci aşılama işlemi yapıldıktan 15 gün sonra tüm gruplardaki farelerden kan örnekleri toplandı. Her bir farenin kuyruğundan 3-4 mm kesilerek 200 μ l kan alındı ve 1 damla heparin içeren 800 μ l serum fizyolojik ile 1/5 oranında sulandırıldı. Daha sonra 1500xg'de 5 dakika santrifüj edilen plasma örnekleri 100 μ l/ependorf şeklinde bölünerek çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı.

2.8. Plasma Örneklerindeki Antikor Düzeylerinin Ölçümü.

Plasma örneklerindeki antikor düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçüldü. Örneklerdeki toplam antikor yanıtının düzeyini ölçebilmek amacıyla ELISA çalışmasında bütün fare immünoglobulin izotiplerine bağlanabilen, antikorun Fab bölgesine özgül olan

Fab spesifik konjugat kullanıldı. Örneklerdeki özgül IgG yanıtının düzeyini ölçmek amacıyla ELISA çalışmasında antikorun Fc parçasına özgül Fc spesifik konjugat kullanıldı.

2.8.1. Toplam Antikor Yanıtı Düzeylerinin Ölçümü

Çalışmanın bir gün öncesinde yüksek bağlama kapasiteli, düz tabanlı, 96 çukurlu plakların tüm çukurlarına 10mM PBS ile 2µg/ml konsantrasyona ayarlanan hIFN γ (Boehringer)'dan 50µl/çukur dağıtıldı ve plak +4°C'de gece boyunca enkübasyona bırakıldı.

Enkübasyon sonunda plaklar otomatik ELISA yıkama cihazında 3 kez distile su ile yıkandıktan sonra plakların tüm çukurlarına 150µl/çukur bloklama tamponu (10mM PBS pH 7,2 içerisinde %3BSA) dağıtıldı ve 37°C ortamda 30 dakika enkübe edildi. Enkübasyon sonunda plaklar otomatik ELISA yıkama cihazında 5 kez yıkama tamponu (PBS-T) ile yıkanarak kullanıma hazır duruma getirildi.

Detayları Tablo 7'de tanımlandığı şekilde değişik oranlarda dilüsyonları yapılmış plasma ve kontrol örneklerinden 100µl/çukur dağıtımı yapıldı. 37°C'lik ortamda 1 saat enkübasyon sonrası 5 kez yıkama yapılarak PBS-10'da 1/6000 dilüe edilmiş Fab-spesifik konjugattan 100µl/çukur dağıtım yapılarak plaklar tekrar 37°C'lik ortamda 1 saat enkübasyona bırakıldı. Enkübasyon sonunda otomatik ELISA yıkama cihazı kullanılarak plak 5 kez PBS-T ile yıkandı. Daha sonra fosfat-sitrat tamponunda çözülen TMB içerisine kullanmadan hemen önce %30'luk H₂O₂'den %0.1 oranında eklenerek hazırlanan substrat tamponundan 100µl/çukur dağıtıldı ve plak oda sıcaklığında, karanlıkta 15 dakika bekletildi. Sürenin sonunda 1M H₂SO₄ durdurma solusyonundan plaktaki tüm çukurlara 50'şer µl eklenerek plak 10 dakika içerisinde $\lambda=450 / 620$ nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

Tablo 7: Fare plasma örnekleri ve kontrol örneklerinin hIFN γ kaplı plağa dağıtım şeması.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS A1	PBS A2	PBS A3	PBS A4	PBS A5	PBS B1	PBS B2	PBS B3	PBS B4	PBS B5	PBS C1	PBS C2
B	PBS A1/10	PBS A2/10	PBS A3/10	PBS A4/10	PBS A5/10	PBS B1/10	PBS B2/10	PBS B3/10	PBS B4/10	PBS B5/10	PBS C1/10	PBS C2/10
C	PBS A1/10 ²	PBS A2/10 ²	PBS A3/10 ²	PBS A4/10 ²	PBS A5/10 ²	PBS B1/10 ²	PBS B2/10 ²	PBS B3/10 ²	PBS B4/10 ²	PBS B5/10 ²	PBS C1/10 ²	PBS C2/10 ²
D	PBS A1/10 ³	PBS A2/10 ³	PBS A3/10 ³	PBS A4/10 ³	PBS A5/10 ³	PBS B1/10 ³	PBS B2/10 ³	PBS B3/10 ³	PBS B4/10 ³	PBS B5/10 ³	PBS C1/10 ³	PBS C2/10 ³
E	PBS C3	PBS C4	PBS C5	PBS K1	PBS K2	PBS K3	PBS RD	PBS Poz.	PBS PBS	PBS PBS	PBS PBS	PBS PBS
F	PBS C3/10	PBS C4/10	PBS C5/10	PBS K1/10	PBS K2/10	PBS K3/10	PBS RD/10	PBS Poz./10	PBS PBS	PBS PBS	PBS PBS	PBS PBS
G	PBS C3/10 ²	PBS C4/10 ²	PBS C5/10 ²	PBS K1/10 ²	PBS K2/10 ²	PBS K3/10 ²	PBS RD/10 ²	PBS Poz./10 ²	PBS PBS	PBS PBS	PBS PBS	PBS PBS
H	PBS C3/10 ³	PBS C4/10 ³	PBS C5/10 ³	PBS K1/10 ³	PBS K2/10 ³	PBS K3/10 ³	PBS RD/10 ³	PBS Poz./10 ³	PBS PBS	PBS PBS	PBS PBS	PBS PBS

PBS: Phosphate-Buffered Saline 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar. /çukur well.

A1, A2, A3, A4, A5; 3. Gruptaki (Ag Grubu) 1, 2, 3, 4, 5 no'lu fare plazmalarının PBS ile 1/500 1/5000, 1/50000 ve 1/500000 dilüe edilmiş şekillerinden 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar.

B1, B2, B3, B4, B5; 2. Gruptaki (Fab-Ag Grubu) 1, 2, 3, 4, 5 no'lu fare plazmalarının PBS ile 1/500 1/5000, 1/50000 ve 1/500000 dilüe edilmiş şekillerinden 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar.

C1, C2, C3, C4, C5; 1. Gruptaki (IgG-Ag Grubu) 1, 2, 3, 4, 5 no'lu fare plazmalarının PBS ile 1/500 1/5000, 1/50000 ve 1/500000 dilüe edilmiş şekillerinden 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar.

K1, K2, K3; 4. Gruptaki (PBS Kontrol Grubu) 1, 2, 3 no'lu fare plazmalarının PBS ile 1/500 1/5000, 1/50000 ve 1/500000 dilüe edilmiş şekillerinden 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar.

RD: 1 μ g/ml konsantrasyondaki 990 μ l standard α -hIFN γ IgG2a (PBS içerisinde) ile 1/5 dilüe 10 μ l immün olmayan fare plasması karışımından 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar.

Poz.: 990 μ l CAY-IFN γ -38 kültür süpernatanı ile 1/5 dilüe 10 μ l immün olmayan fare plasması karışımından 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar.

2.8.2. Özgöl IgG Yanıtı Düzeylerinin Ölçülmesi

Bir gün önceden kullanıma hazır duruma getirilen Boehringer kaplı 96 çukurlu ELISA plaklarına Tablo 8 ve Tablo 9'da tanımlandığı şekilde PBS ile 1/50 sulandırılmış α -hIFN γ IgG Fab veya sadece PBS'den 100 μ l/çukur dağıtıldı. Plaklar 37°C'lik ortamda 30 dakika enkübasyona bırakıldı. Enkübasyon sonrası yıkama yapılmadan plaklara Tablo 8 ve Tablo 9'de tanımlandığı şekilde değişik oranlarda dilüsyonu yapılmış plasma ve kontrol örneklerinden 100 μ l/çukur dağıtımı yapıldı. 37°C'lik ortamda 1 saat enkübasyon sonrası 5 kez yıkama yapılarak PBS-10'da 1/6000 dilüe edilmiş Fc-spesifik konjugattan 100 μ l/çukur dağıtım yapılarak tekrar plaklar 37°C'lik ortamda 1 saat enkübasyona bırakıldı. ELISA çalışmasının bundan sonraki aşamaları daha önce tanımlandığı şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 8: Fare plasma örnekleri ve kontrol örneklerin Fab veya PBS ile ön enkübasyon yapılmış hIFN γ kaplı 1. plağa dağıtım şeması.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS A1	Fab/50 A1	PBS A2	Fab/50 A2	PBS B1	Fab/50 B1	PBS B2	Fab/50 B2	PBS B3	Fab/50 B3	PBS C1	Fab/50 C1
B	PBS A1/10	Fab/50 A1/10	PBS A2/10	Fab/50 A2/10	PBS B1/10	Fab/50 B1/10	PBS B2/10	Fab/50 B2/10	PBS B3/10	Fab/50 B3/10	PBS C1/10	Fab/50 C1/10
C	PBS A1/10 ²	Fab/50 A1/10 ²	PBS A2/10 ²	Fab/50 A2/10 ²	PBS B1/10 ²	Fab/50 B1/10 ²	PBS B2/10 ²	Fab/50 B2/10 ²	PBS B3/10 ²	Fab/50 B3/10 ²	PBS C1/10 ²	Fab/50 C1/10 ²
D	PBS A1/10 ³	Fab/50 A1/10 ³	PBS A2/10 ³	Fab/50 A2/10 ³	PBS B1/10 ³	Fab/50 B1/10 ³	PBS B2/10 ³	Fab/50 B2/10 ³	PBS B3/10 ³	Fab/50 B3/10 ³	PBS C1/10 ³	Fab/50 C1/10 ³
E	PBS C2	Fab/50 C2	PBS C3	Fab/50 C3	PBS PBS	Fab/50 PBS	PBS K1	Fab/50 K1	PBS RD	Fab/50 RD	PBS Poz	Fab/50 Poz
F	PBS C2/10	Fab/50 C2/10	PBS C3/10	Fab/50 C3/10	PBS PBS	Fab/50 PBS	PBS K1/10	Fab/50 K1/10	PBS RD/10	Fab/50 RD/10	PBS Poz/10	Fab/50 Poz/10
G	PBS C2/10 ²	Fab/50 C2/10 ²	PBS C3/10 ²	Fab/50 C3/10 ²	PBS PBS	Fab/50 PBS	PBS K1/10 ²	Fab/50 K1/10 ²	PBS RD/10 ²	Fab/50 RD/10 ²	PBS Poz/10 ²	Fab/50 Poz/10 ²
H	PBS C2/10 ³	Fab/50 C2/10 ³	PBS C3/10 ³	Fab/50 C3/10 ³	PBS PBS	Fab/50 PBS	PBS K1/10 ³	Fab/50 K1/10 ³	PBS RD/10 ³	Fab/50 RD/10 ³	PBS Poz/10 ³	Fab/50 Poz/10 ³

PBS: Phosphate-Buffered Saline 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar. /çukur well.

Fab/50: PBS ile 1/50 dilüe edilmiş α -hIFN γ -38 IgG1 Fab parçasından 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar.

A1 ve A2; 3. Gruptaki (Ag Grubu) 1 ve 2 no'lu fare plazmalarının PBS ile 1/500 1/5000, 1/50000 ve 1/500000 dilüe edilmiş şekillerinden 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar.

B1, B2 ve B3; 2. Gruptaki (Fab-Ag Grubu) 1, 2 ve 3 no'lu fare plazmalarının PBS ile 1/500 1/5000, 1/50000 ve 1/500000 dilüe edilmiş şekillerinden 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar.

C1, C2 ve C3; 1. Gruptaki (IgG-Ag Grubu) 1, 2 ve 3 no'lu fare plazmalarının PBS ile 1/500 1/5000, 1/50000 ve 1/500000 dilüe edilmiş şekillerinden 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar.

K1; 4. Gruptaki (PBS Kontrol Grubu) 1no'lu fare plazmalarının PBS ile 1/500 1/5000, 1/50000 ve 1/500000 dilüe edilmiş şekillerinden 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar.

RD: 1 μ g/ml konsantrasyondaki 990 μ l standard α -hIFN γ IgG2a (PBS içerisinde) ile 1/5 dilüe 10 μ l immün olmayan fare plazması karışımından 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar.

Poz: 990 μ l CAY-IFN γ -38 kültür süpernatanı ile 1/5 dilüe 10 μ l immün olmayan fare plazması karışımından 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar.

Tablo 9: Fare plasma örnekleri ve kontrol örneklerin Fab veya PBS ile ön enküasyon yapılmış hIFN γ kaplı 2. plağa dağıtım şeması.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS A3	Fab/50 A3	PBS A4	Fab/50 A4	PBS A5	Fab/50 A5	PBS B4	Fab/50 B4	PBS B5	Fab/50 B5	PBS C4	Fab/50 C4
B	PBS A3/10	Fab/50 A3/10	PBS A4/10	Fab/50 A4/10	PBS A5/10	Fab/50 A5/10	PBS B4/10	Fab/50 B4/10	PBS B5/10	Fab/50 B5/10	PBS C4/10	Fab/50 C4/10
C	PBS A3/10 ²	Fab/50 A3/10 ²	PBS A4/10 ²	Fab/50 A4/10 ²	PBS A5/10 ²	Fab/50 A5/10 ²	PBS B4/10 ²	Fab/50 B4/10 ²	PBS B5/10 ²	Fab/50 B5/10 ²	PBS C4/10 ²	Fab/50 C4/10 ²
D	PBS A3/10 ³	Fab/50 A3/10 ³	PBS A4/10 ³	Fab/50 A4/10 ³	PBS A5/10 ³	Fab/50 A5/10 ³	PBS B4/10 ³	Fab/50 B4/10 ³	PBS B5/10 ³	Fab/50 B5/10 ³	PBS C4/10 ³	Fab/50 C4/10 ³
E	PBS C5	Fab/50 C5	PBS	Fab/50 PBS	PBS K2	Fab/50 K2	PBS RD	Fab/50 RD	PBS Poz.	Fab/50 Poz.	PBS K3	Fab/50 K3
F	PBS C5/10	Fab/50 C5/10	PBS	Fab/50 PBS	PBS K2/10	Fab/50 K2/10	PBS RD/10	Fab/50 RD/10	PBS Poz./10	Fab/50 Poz./10	PBS K3/10	Fab/50 K3/10
G	PBS C5/10 ²	Fab/50 C5/10 ²	PBS	Fab/50 PBS	PBS K2/10 ²	Fab/50 K2/10 ²	PBS RD/10 ²	Fab/50 RD/10 ²	PBS Poz./10 ²	Fab/50 Poz./10 ²	PBS K3/10 ²	Fab/50 K3/10 ²
H	PBS C5/10 ³	Fab/50 C5/10 ³	PBS	Fab/50 PBS	PBS K2/10 ³	Fab/50 K2/10 ³	PBS RD/10 ³	Fab/50 RD/10 ³	PBS Poz./10 ³	Fab/50 Poz./10 ³	PBS K3/10 ³	Fab/50 K3/10 ³

PBS: Phosphate-Buffered Saline 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar. /çukur well.

Fab/50: PBS ile 1/50 dilüe edilmiş α -hIFN γ -38 IgG1 Fab parçasından 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar.

A3, A4, ve A5: 3. Gruptaki (Ag Grubu) 3, 4 ve 5 no'lu fare plazmalarının PBS ile 1/500 1/5000, 1/50000 ve 1/500000 dilüe edilmiş şekillerinden 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar.

B4 ve B5: 2. Gruptaki (Fab-Ag Grubu) 4 ve 5 no'lu fare plazmalarının PBS ile 1/500 1/5000, 1/50000 ve 1/500000 dilüe edilmiş şekillerinden 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar.

C4 ve C5: 1. Gruptaki (IgG-Ag Grubu) 4 ve 5 no'lu fare plazmalarının PBS ile 1/500 1/5000, 1/50000 ve 1/500000 dilüe edilmiş şekillerinden 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar.

K2 ve K3: 4. Gruptaki (PBS Kontrol Grubu) 2 ve 3 no'lu fare plazmalarının PBS ile 1/500 1/5000, 1/50000 ve 1/500000 dilüe edilmiş şekillerinden 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar.

RD: 1 μ g/ml konsantrasyondaki 990 μ l standard α -hIFN γ IgG2a (PBS içerisinde) ile 1/5 dilüe 10 μ l immün olmayan fare plasması karışımından 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar.

Poz.: 990 μ l CAy-IFN γ -38 kültür süpernatanı ile 1/5 dilüe 10 μ l immün olmayan fare plasması karışımından 100 μ l dağıtım yapılan çukurlar.

2.9.İstatistiksel Değerlendirme

Gruplar arasında istatistiksel karşılaştırma Microstat bilgisayar istatistik programı kullanılarak bağımsız örneklerin T testi (Unpaired samples T test) ile, grup içi istatistiksel karşılaştırma ise bağımlı örneklerin T-testi (Paired samples T test) ile değerlendirildi. Standarda göre örneklerin değerlendirilmesi Microstat bilgisayar istatistik programı kullanılarak regresyon-korelasyon analizi ile yapıldı ⁵².

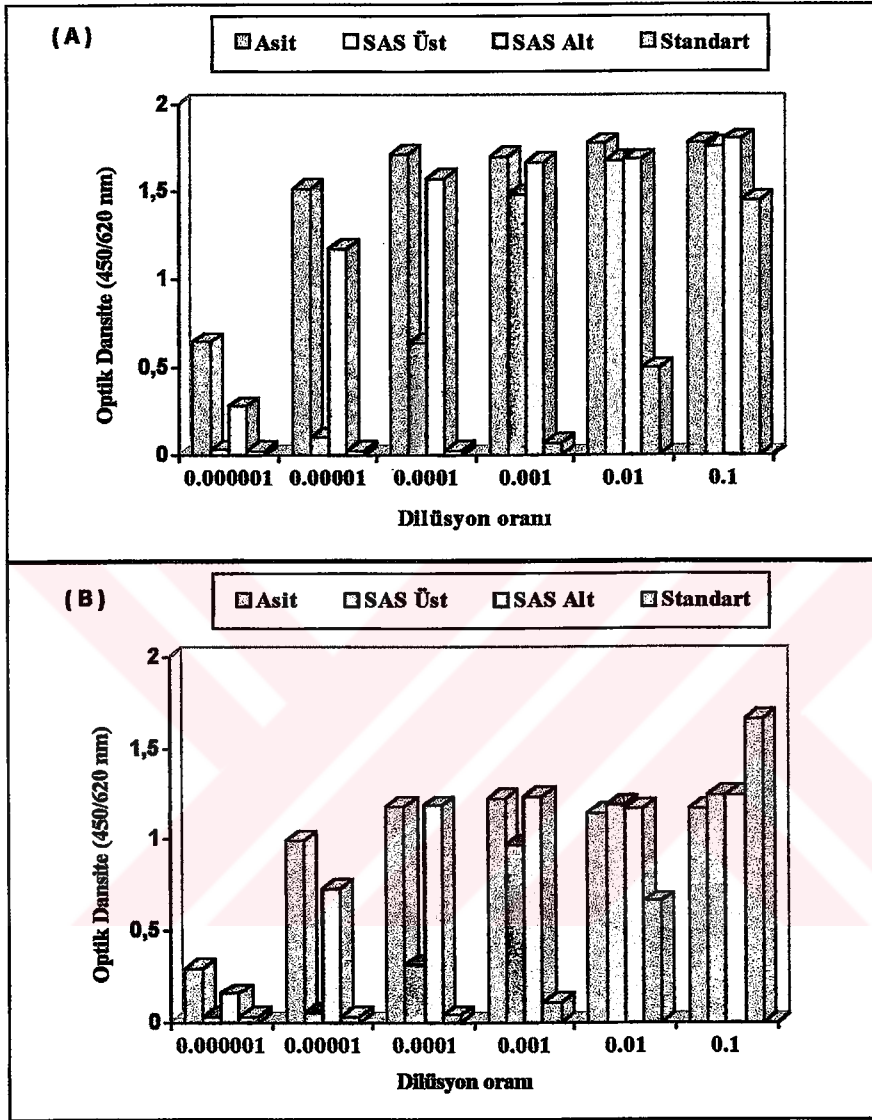


3. BULGULAR

3.1. Fare Asit Sıvısından %50 SAS Çöktürme Yöntemi ile α -hIFN γ 38 IgG1 içeren Protein havuzunun elde edilmesi.

α -hIFN γ 38 IgG1 salgılayan CAy-IFN γ 38 hibridoma hücrelerinin BALB/c farelere intraperitoneal verilmesi ile oluşan asit sıvısındaki α -hIFN γ 38 IgG1 ve %50 SAS çöktürme işlemi ile elde edilen özgül antikor miktarlarına ait sonuçlar Şekil 4'de sunuldu. R&D kaynaklı standart α -hIFN γ IgG2a kullanılarak yapılan ELISA çalışmasında Fab-spesifik konjugat (Şekil 4A) veya Fc-spesifik konjugat (Şekil 4B) kullanılarak oluşturulan OD-konsantrasyon değerleri arasındaki yüksek düzeyde korelasyon saptandı (Fab-spesifik konjugat için $r=0.9724$, $p=0.00549$, Fc-spesifik konjugat için $r=0.9588$, $p=0.00998$).

10 ml'lik asit sıvısı ile 15 ml'lik SAS Alt ve 100ml'lik SAS Üst örneklerine ait seri sulandırım sonucu 0.00001 dilüsyondaki OD değerleri karşılaştırıldığında asit sıvısındaki α -hIFN γ -38 IgG1 mAb'un çoğunluğu %50'lik SAS çöktürme işlemi ile elde edilmektedir (Şekil 4A ve 4B).



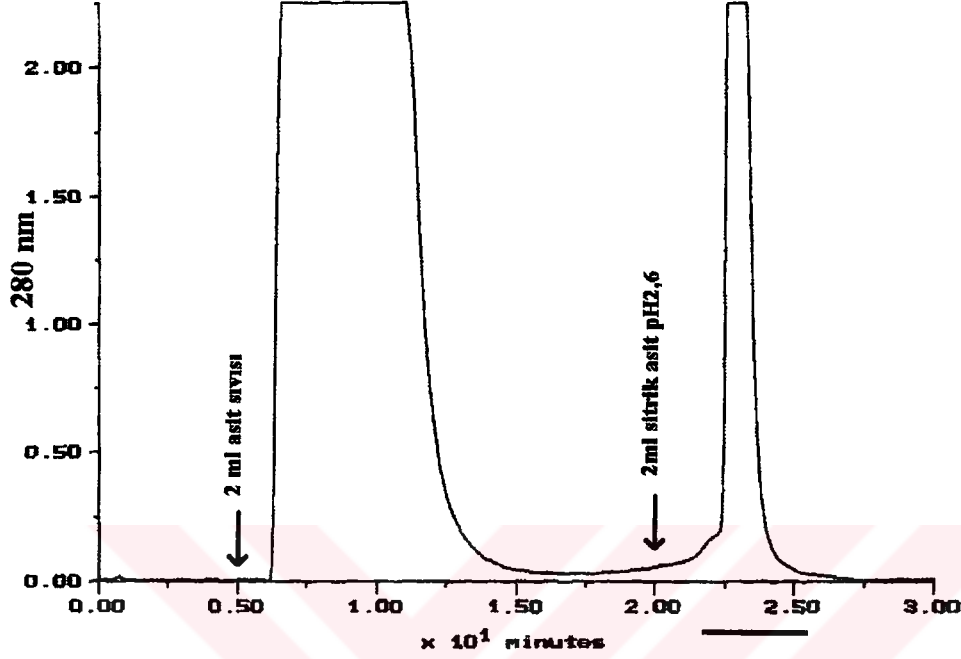
Şekil 4. Asit sıvısından %50 SAS çöktürme işlemi ile ayrılan α -hIFN γ -38 IgG mAb içeren protein havuzundaki özgül antikor düzeyi. Asit sıvısının kendisi ve SAS ile ayrılan fraksiyonlardaki α -IFN γ -38 mAb düzeyleri R&D kaynaklı standart α -hIFN γ IgG2a mAb eşliğinde hIFN γ (Immuneron) kaplı katı fazda Fab- (A) veya Fc-spesifik konjugat (B) kullanarak karşılaştırıldı. Son nokta sulandırma oranlarındaki (0.00001 veya 0.000001) çökteltinin (SAS Alt) verdiği OD değerleri ile asit sıvısına ait OD değerleri karşılaştırıldığında özgül antikorun çoğunluğunun %50 SAS çöktürme işlemi ile edildiği saptanmaktadır.

3.2. SAS Çöktürme İşlemi Sonrası Elde Edilen Örnekten Protein G Afinite Kromatografi Yöntemi ile IgG Havuzunun Saflaştırılması.

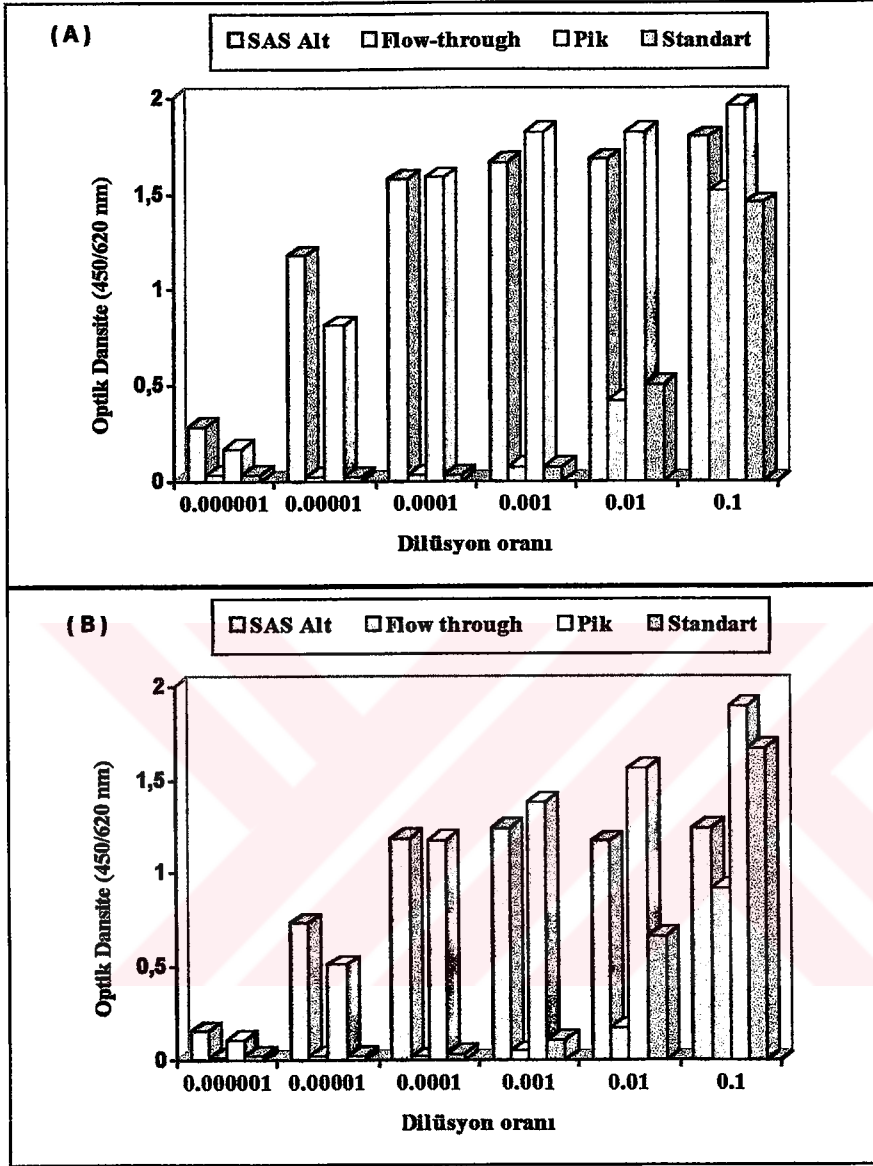
%50 SAS çöktürme işlemi ile elde edilen örnek içerisinde IgG dışında, IgM ve albumin gibi ilişkisiz proteinler de bulunmaktadır. IgG dışındaki ilişkisiz proteinlerden arındırılmış ve sadece IgG içeren örnek elde etmek amacıyla protein G afinite kromatografi yöntemi uygulandı. Bu amaçla çalışmada kullanılan Sepharose matriksine bağlı Protein G'nin biyoteknolojik yöntemle albumine bağlanabilen kısmı bulunmamaktadır. Ayrıca protein G fare kaynaklı IgM molekülüne bağlanmamaktadır.

Şekil 5'de tanımlandığı gibi, 15 ml'lik dializ edilmiş SAS Alt örneğinden kolona her defasında 2ml yüklendiğinde (6 kez yükleme yapıldı) protein G'ye bağlanmadan çıkan (6^{15} - 16^{15} . dakikalar arası, Flow-through) kısımda önemli miktarda ilişkisiz protein bulunmaktadır. Protein G'ye bağlanan IgG fraksiyonu ise 0.1M sitrik asit ile etkin şekilde serbestleştirilerek (21^{30} - 25^{30} . dakikalar arasındaki fraksiyon) saflaştırılabilmektedir. Sitrik asite bağlı düşük pH etkisiyle IgG moleküllerinin denatüre olması ise 1M Trizma ile pH8'e ayarlanarak engellenmektedir. Böylece antijene olan bağlanma özelliği korunmaktadır (Şekil 6).

15 ml'lik dializ edilmiş SAS Alt örneğinden her defasında 2ml olmak üzere 6 kez yükleme yapılarak (toplam 12 ml'lik kısmı) pH 8'e ayarlanmış 17.4 ml IgG havuzu elde edildi. IgG havuzundaki özgül antikor düzeyi konsantrasyonu bilinen standart antikor ile elde edilen OD değerleriyle karşılaştırma yapılarak belirlendi. hIFN γ kaplı ELISA plağında R&D kaynaklı standart α -hIFN γ IgG2a antikorun 0.001 dilüsyonda verdiği OD değeri (Fab konjugatla OD450/620=0.072, Fc konjugatla OD450/620=0.107), protein G ile saflaştırılan antikor örneği ile 1000 kat daha fazla sulandırımında elde edilmektedir (Fab konjugatla OD450/620=0.163, Fc konjugatla OD450/620=0.107). Bu nedenle, protein G ile saflaştırılan IgG fraksiyonu içerisinde standart antikor konsantrasyonunun (1 μ g/ml) en az 1000 katı miktarda (1mg/ml) özgül antikor bulunduğu saptandı (Şekil 6 ve Tablo 10).

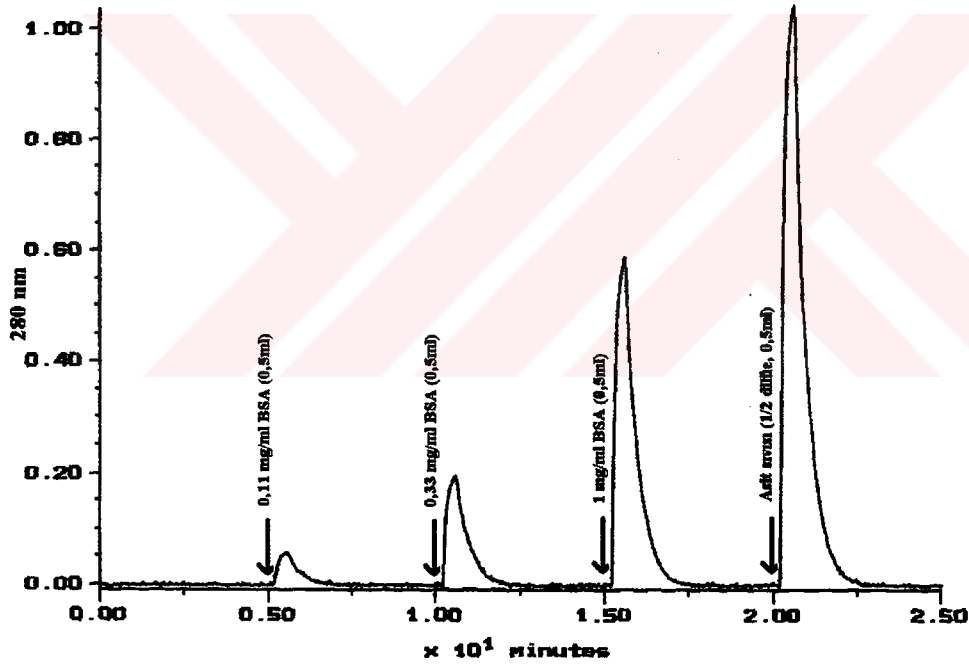


Şekil 5. Protein G affinite kromatografi yöntemiyle fare asit sıvısından α -hIFN γ 38 IgG1 içeren IgG havuzunun saflaştırılması. 1 ml'lik Protein G kolonuna 0,5ml./dak. sabit akım hızında her defasında 2ml olmak üzere yaklaşık 15 ml'lik işlenmiş asit sıvısı sırayla yüklendi. Herbir 2ml'lik örneğin yüklenmesi sonrasında kolon çalışma tamponu (10mM PBS + 0.2M NaCl, pH 7,4) ile yıkandı. Kolona bağlı IgG molekülleri 2ml 0,1 M sitrik asit pH2,6 ile serbestleştirildi. 21³⁰-25³⁰. dakikalar arasındaki 2ml'lik pik fraksiyonları toplandı ve 1 M Trizma® base'den 0.9ml eklenerek pH 8'e ayarlandı.



Şekil 6. Protein G affinite kromatografi yöntemi ile α -hIFN γ -38 IgG mAb içeren IgG havuzundaki özgül antikor düzeyi. %50 SAS çöktürme işlemi ile elde edilen örnek (SAS Alt) protein G kolona yüklendiğinde matrikse bağlanmadan çıkan (Flow-through) fraksiyonun 0,0001 dilüsyondaki OD değeri blank (kör) düzeyine düşmektedir. Matrikse bağlı ve 0.1M sitrik asit ile serbestleştirilen pık fraksiyonunun OD değeri 0,000001 dilüsyonda bile blank OD değerinden daha yüksektir ve kolona yüklenen aynı dilüsyondaki SAS Alt örneğinin OD değerine yakındır. Dolayısıyla protein G kolonuna yüklenen örnek içerisindeki özgül antikorun en az %90'ı saflaştırılabilmektedir.

Protein G affinite kromatografi yöntemi ile elde edilen IgG pikindeki total protein miktarı değişik konsantrasyondaki BSA örneklerinden elde edilen 280nm'deki standard eğriye göre karşılaştırılarak ölçüldü (Şekil 7). Protein G affinite kromatografi yöntemi ile elde edilen IgG pikindeki total protein (IgG) miktarının 3mg/ml, özgül antikor miktarının ise 1mg/ml olduğu saptandı (Tablo 10). Asit sıvısından saflaştırılan ve total IgG içeriğinin 1/3'ü α -hIFN γ 38 IgG1olan örnek, epitop analiz çalışmasında ve epitop maskelenmesi ile aşılama işleminde gerekli olan IgG Fab parçalarının elde edilmesinde kullanıldı.



Şekil 7. Protein G affinite kromatografi yöntemiyle fare asit sıvısından elde edilen IgG havuzundaki protein miktarının BSA standard eğrisine göre karşılaştırılarak belirlenmesi. Çalışma tamponu içerisinde 0.11mg/ml, 0.33mg/ml ve 1mg/ml konsantrasyona ayarlanmış BSA solusyonlarından ve ½ dilüe edilmiş IgG havuzundan akım hızı 1ml/dak. olacak şekilde sırasıyla 0.5 ml yükleme yapıldı ve 280 nm'ye ayarlanmış UV dedektör ile görüntüleme yapıldı.

Tablo 10. Protein G ile Saflaştırılan IgG havuzunun Özellikleri

	Total Protein Miktarı (mg/ml)^a	Anti-IFNγ Düzeyi (mg/ml)^b
IgG Havuzu (17.4ml)	3	1

^a $\lambda=280\text{nm}$ 'de değişik konsantrasyonlardaki BSA ile elde edilen standard eğriye göre hesaplandı.

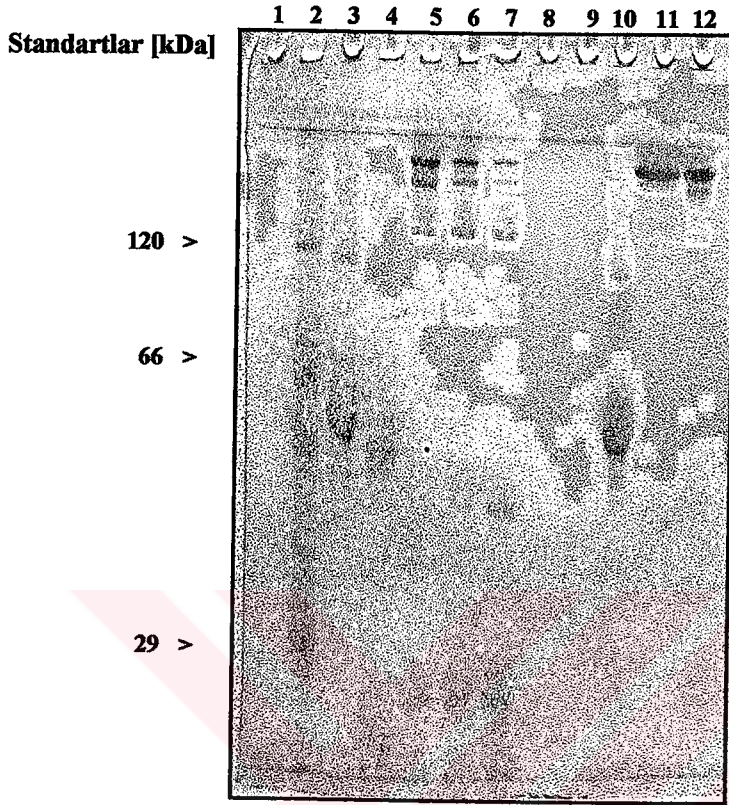
^b ELISA yöntemi ile değişik konsantrasyonlardaki R&D kaynaklı $\alpha\text{-hIFN}\gamma$ IgG2a ile elde edilen standard OD eğrisine göre hesaplandı.

3.3. $\alpha\text{-hIFN}\gamma 38$ IgG1 İçeren ve Protein G ile Saflaştırılan IgG Havuzunun Papain Enzimi ile Parçalanması ve SDS-PAGE Analizi.

Birinci aşamada papain enziminin L-sisteinli ortamda 15, 30 ve 60. dakikada IgG preperatını parçalama etkinliği ve daha önceden aktive edilmiş papain enziminin L-sisteinsiz ortamda 120 dakikada IgG preperatını parçalama etkinliği araştırıldı.

Şekil 8'de tanımlanan SDS-PAGE'de 11. ve 12. sıralar kontrol IgG preperatına ve daha önceden aktive edilmiş papainin L-sisteinsiz ortamda IgG preperatına 120 dakikalık süredeki etkisine ait analiz sonuçlarıdır. Şekil 8'de 12. sırada görüldüğü gibi daha önceden aktive edilmiş papain enzimi ile Fab ve Fc parçalarının elde edilme işlemi etkin olmamaktadır.

Şekil 8'deki 5., 6., ve 7. sıralar L-sisteinli ortamda IgG preperatının papain enzimi ile 15, 30 ve 60 dakika enkübasyona bırakılarak parçalama işlemine ait analiz sonuçlarıdır. L-sisteinli ortamda papain enzimi zamana bağımlı olarak IgG moleküllerini parçalamaktadır. 150 kDa'luk alandaki protein (IgG) miktarı zamana bağımlı olarak azalma gösterirken Fab ve Fc bölgelerine karşılık gelen 50 ve 25 kDa'luk alanlardaki protein miktarlarında artma saptanmaktadır. Ancak 60. dakikada bile IgG moleküllerinin tamamı parçalanmamaktadır. Bu nedenle Fab ve Fc parçalarının daha etkin şekilde elde edilebilmesi için IgG preperatının papain enzimi ile daha uzun süreli enkübasyona bırakılması gerektiği anlaşıldı.



Şekil 8. IgG preperatının papain enzimi ile kısa süreli enkübyasyon sonunda %10 SDS-PAGE analizi. 10.5x15 cm boyutlarındaki jel 40 mAmp akımda 4.5 saat süre sonunda Coomassie Blue R250 ile boyanarak “dekolorizasyon” yapıldı.

1.Sıra: 2xSDS/Örnek Tamponu

2. Sıra: Standartlar; β -galaktozidaz (120kDa), sığır albumini (66 kDa) ve karbonik anhidraz (29kDa).

3. Sıra: İnsan serum albumini (60 kDa).

4. Sıra: İlişkisiz örnek

5. Sıra: L-sisteinli ortamda papain ile 15 dakika bekletilen IgG preperatı.

6. Sıra: L-sisteinli ortamda papain ile 30 dakika bekletilen IgG preperatı..

7.Sıra: L-sisteinli ortamda papain ile 60 dakika bekletilen IgG preperatı

8. ve 9. Sıra: 2x SDS / Örnek Tamponu

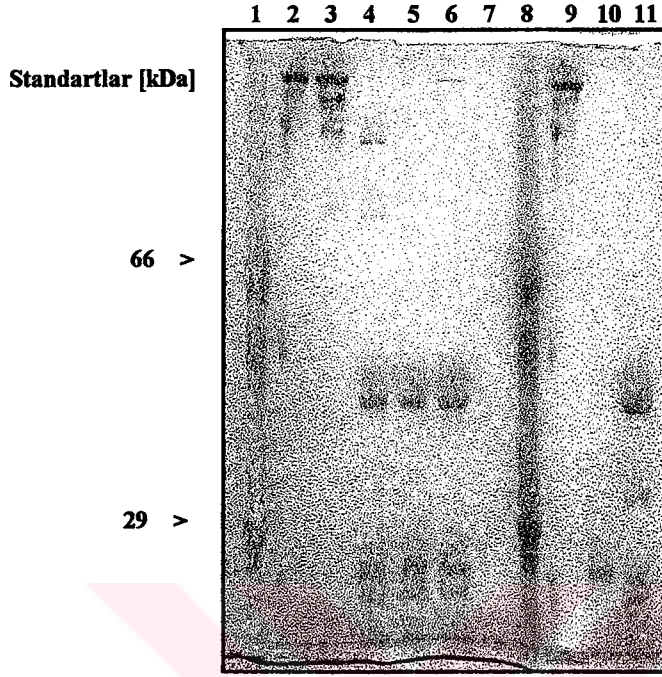
10. Sıra: İnsan serum albumini (60 kDa)

11. Sıra: Normal IgG preperatı

12. Sıra: L-sisteinsiz ortamda aktive papain ile 120 dakika bekletilen IgG preperatı.

Aktive papain ile L-sisteinsiz ortamda ve aktive edilmemiş papain ile L-sisteinli ortamda yapılan kısa süreli enkübasyon sonuçlarından aktive edilmiş papainin kullanılmaması gerektiği ve daha etkin bir parçalama işlemi için enkübasyon süresinin uzatılması gerektiği saptandı (Şekil 8).

İkinci aşamada ise L-sisteinli ortamda IgG preperatı papain ile 2, 4 ve 8 saatlik enkübasyona bırakılarak SDS-PAGE analizi yapıldı (Şekil 9). Kontrol IgG örneği ile karşılaştırıldığında (2. sıra) parçalama tamponunda bazı yüksek molekül ağırlıklı protein bantları saptanmasına karşın (3. sıra), papain içermeyen parçalama tamponunun yalnız başına IgG molekülü üzerine belirgin bir etkisi olmamaktadır. Şekil 9'daki 4., 5., ve 6. sıralar L-sisteinli ortamda IgG preperatının papain enzimi ile 2, 4 ve 8 saatlik parçalama işlemine ait analiz sonuçlarıdır. 2 saatlik sürede molekül ağırlığı 100-120 kDa aralığına karşılık gelen bazı proteinlerin hala örnek içerisinde kaldığı saptanmaktadır. Ancak 4 saatlik enkübasyon sonunda papain enzimi IgG moleküllerini etkin şekilde Fab ve Fc parçalarına ayırmakta ve 2 saatlik enkübasyon süresiyle karşılaştırıldığında üst taraftaki proteinler kaybolmaktadır. Bu nedenle, IgG prepratından Fab ve Fc oluşturulması için papain ile enkübasyon süresinin 4 saat olması gerektiği belirlendi.

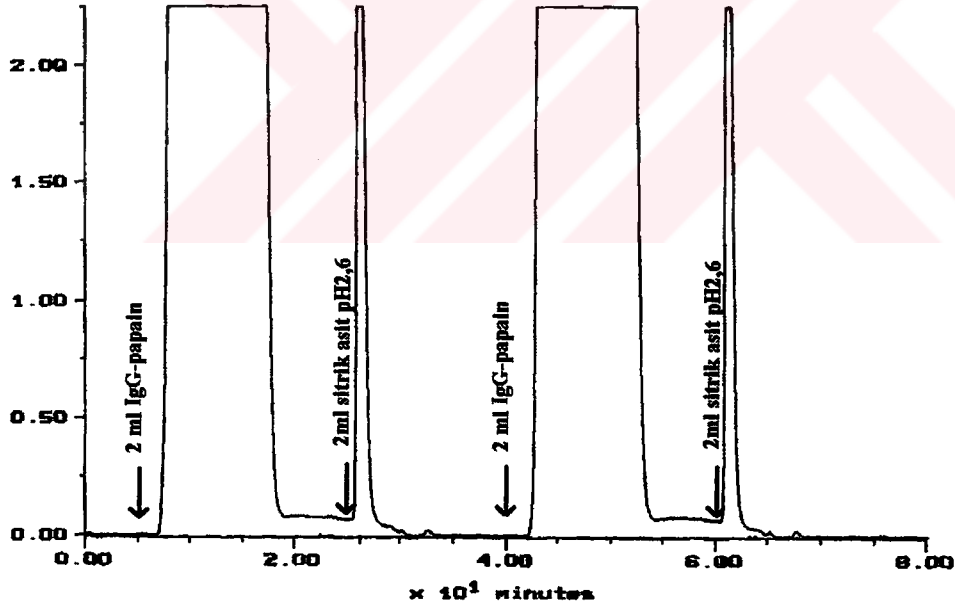


Şekil 9. IgG preperatının papain enzimi ile uzun süreli enkübasyon sonunda %10 SDS-PAGE analizi. 10.5x15 cm boyutlarındaki jel 40 mA akımında 4.5 saat süre sonunda Coomassie Blue R250 ile boyanarak “dekolorizasyon” yapıldı.

1. Sıra: Standartlar; Sığır albumin (66 kDa) ve karbonik anhidraz (29kDa).
2. Sıra: Normal IgG preperatı
3. Sıra: Parçalama tamponunda IgG preperatı.
4. Sıra: L-sisteinli ortamda papain ile 2 saat bekletilen IgG preperatı.
5. Sıra: L-sisteinli ortamda papain ile 4 saat bekletilen IgG preperatı.
6. Sıra: L-sisteinli ortamda papain ile 8 saat bekletilen IgG preperatı.
7. Sıra: 2x SDS/Örnek tamponu.
8. Sıra: Standartlar; Sığır albumin (66 kDa) ve karbonik anhidraz (29kDa).
9. Sıra: Normal IgG preperatı
10. Sıra: Papain ile 4 saatlik parçalama sonrası örneğin protein G kolona bağlanmadan çıkan kısmı (Şekil 10'daki 7-18³⁰ ve 42-53³⁰. dakikalar arasındaki havuz).
11. Sıra: Papain ile 4 saatlik parçalama sonrası örneğin protein G kolona bağlanan ve sitrik asit ile serbestleştirilerek nötralize edilen kısmı (Şekil 10'daki 27³⁰-30 ve 62³⁰-65. dakikalar arasındaki havuz).

3.4. IgG Preperatının Papain ile Parçalanması Sonrasında Protein G Affinite Kromatografi Yöntemiyle Fab ve Fc Parçalarının Saflaştırılması ve SDS-PAGE ile Analizi.

IgG preperatının papain ile 4 saatlik sürede etkin şekilde Fab ve Fc parçalarına ayrılması SDS-PAGE analizi ile saptandıktan sonra deneylerde kullanılmak üzere Fab parçası elde edildi. Bu amaçla 4 saat papain ile enkübe edilen 13.75 ml IgG preperatından her defasında 5ml'si protein G kolona yüklenerek 2 defa IgG Fab parçası saflaştırıldı (Şekil 10). Elde edilen Fab örneğinin deneyler için yeterli olmayabileceği öngörülerek aynı şekilde 5ml α -hIFN γ 38 IgG1 çözülerek papain enzimi ile parçalandıktan sonra protein G affinite kromatografi yöntemi ile saflaştırıldı.



Şekil 10. .Papain ile parçalanmış IgG preperatındaki protein G'ye bağlanan fraksiyonun saflaştırılması. 0,5ml/dak sabit akımda her defasında 5ml örnek yüklendi. Kolona bağlanmadan çıkan "flow-through" fraksiyonlar (2x5.5 ml) ve protein G'ye bağlanan ve 0,1 M sitrik asit pH2,6 ile serbestleştirilen fraksiyonlar (27³⁰-30. ve 62³⁰-65. dakikalar arası) toplandı. Sitrik asit ile serbestleştirilen toplam 2.5 ml fraksiyon üzerine 1.150 ml 1M Trizma® base eklenerek pH 8'e ayarlandı.

Protein G kolona bağlanmadan çıkan “flow-through” kısmı ve bağlanıp 0.1M sitrik asit ile serbestleştirilerek 1M Trizma ile nötralize edilen kısımlar SDS-PAGE ile analiz edildi (Şekil 9). Şekil 9’daki 10. sırada görüldüğü gibi, protein G’ye bağlanmadan çıkan kısımda Fab alanına karşılık gelen bölgede protein bandı saptanamadı. Buna karşılık 25kDa’luk Fc alanına karşılık gelen bölgede protein bandları saptandı. Ayrıca Şekil 9’daki 11. sırada görüldüğü gibi, protein G’ye bağlanan fraksiyonlar içerisinde ağırlıklı olarak Fab parçaları ve değişik moleküler ağırlıktaki Fc parçalarından oluşan kısımlar bulunmaktadır. Bu nedenle Fab parçası olarak kullanılacak örneğin papain ile IgG preperatının parçalandıktan sonra protein G’ye bağlanan fraksiyon olması gerektiği saptandı.

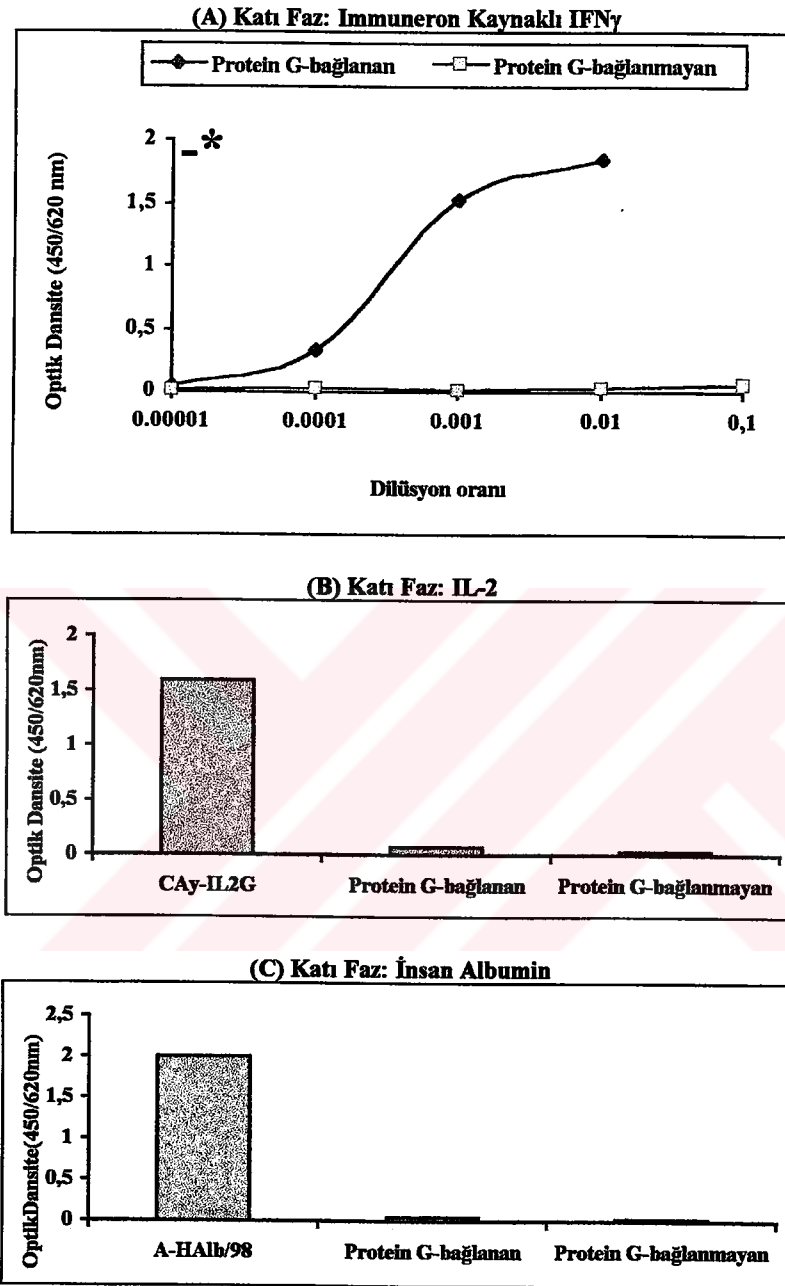
3.5. Protein G’ye bağlanan ve bağlanmayan fraksiyonların antijene karşı özgüllüğü.

Papain ile parçalanmış IgG preperatının protein G’ye bağlanan ve bağlanmayan fraksiyonlarından hangisinde antijene bağlanma özelliğini koruyabilen Fab parçasının olduğu ELISA çalışması ile gösterildi. Bu amaçla değişik oranlarda sulandırılmış protein G’ye bağlanan ve bağlanmayan fraksiyonların hIFN γ (Immuneron) kaplı katı fazda enkübasyonu sonrası Fab-spesifik konjugatla reaksiyonu araştırıldı. Ayrıca reaksiyonun özgül olup olmadığını anlamak için çalışma ilişkisiz antijen olarak seçilen insan IL-2 ve insan serum albumini ile kaplı katı fazlarda da tekrarlandı.

Şekil 10A’da görüldüğü gibi protein G’ye bağlanan fraksiyonda antijene özgül Fab parçalarının olduğu, protein G’ye bağlanmadan çıkan fraksiyonda ise Fab parçalarının olmadığı saptandı. Protein G’ye bağlanan fraksiyonla karşılaştırıldığında, Protein G’ye bağlanmadan çıkan fraksiyonun 10 kat daha fazla konsantrasyonunda bile belirgin bir OD değeri oluşmamaktadır (Şekil 10A). Protein G’ye bağlanan fraksiyonun dilüsyonla orantılı olarak hIFN γ kaplı katı fazda verdiği OD değerleri özgül reaksiyondan kaynaklanmaktadır.

Protein G'ye bağlanan fraksiyon en yüksek konsantasyonda bile IL-2 veya insan albumini ile kaplı katı fazlarda belirgin bir OD değeri vermemektedir İnterlökin-2 kaplı katı fazda (Şekil 10B) veya insan serum albumini kaplı katı fazda (Şekil 10C) protein G'ye bağlanan ve bağlanmadan çıkan fraksiyonun OD değerleri birbirilerine yakın ve düşük değerlerdir. Bu nedenle protein G'ye bağlanan fraksiyonun hIFN γ kaplı fazda oluşturduğu yüksek OD değerleri antijene özgül bağlanabilme özelliğini koruduğunu da göstermektedir.

Bu sonuçlar Şekil 9'daki 10. ve 11. Sırada elde edilen SDS-PAGE verileri ile uyumlu çıktığını gösterdi; protein G'ye bağlanan fraksiyonda 50kDa ağırlığındaki alanda protein bandı oluşturan ve antijene bağlanma özelliği gösteren parçalanma ürünleri bulunmaktadır. Buna karşılık, protein G'ye bağlanmayan (flow-through) fraksiyonda antijene özgül bağlanma gösteren Fab parçaları bulunmamaktadır.



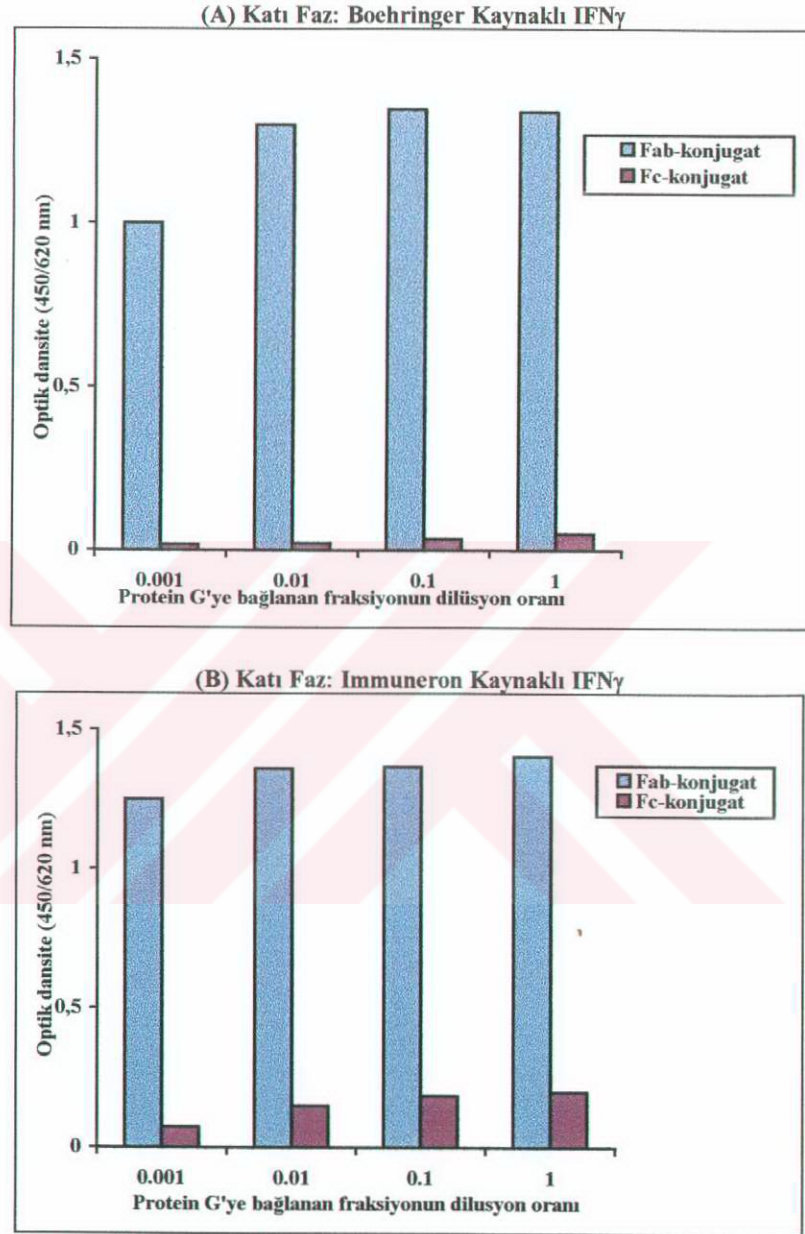
Şekil 10. Protein G'ye bağlanan ve bağlanmayan fraksiyonların antijene karşı özgüllüğünün Fab-spesifik konjugatla gösterilmesi. Protein G'ye bağlanabilen fraksiyon IFN γ kaplı katı fazda (A) dilüsyon ile orantılı OD değeri oluşturmaktadır. İnsan IL-2 kaplı katı fazda (B) veya insan albumin kaplı katı fazda (C) kontrol antikorlar (hibridoma kültür süpernatantları) ile karşılaştırma yapıldığında belirgin bir bağlanma olmamaktadır. Şekil B ve C'de protein G'ye bağlanan ve bağlanmayan fraksiyonların dilüsyon oranları sırasıyla 1/100 ve 1/10'dur. Şekil A'da belirtilen -* işareti kontrol CAy-IFN γ -38 hibridoma kültür süpernatantının verdiği OD değerini (1,900) göstermektedir.

3.6. IFN γ kaplı fazla etkileşime giren protein G'ye bağlanan fraksiyonun Fab- ve Fc-spesifik konjugatlarla reaksiyon düzeyi

Protein G'ye bağlanan ve bağlanmadan çıkan fraksiyonların antijene özgül bağlanması ile ilgili Şekil 10'da tanımlanan çalışma ile sadece protein G'ye bağlanan fraksiyonun katı fazdaki IFN γ 'ya bağlandığı ve Fab-spesifik konjugatla reaksiyona girdiği saptandı.

Ancak protein G'ye bağlanan fraksiyonun daha sonraki epitop kapatması ile ilgili ELISA çalışmalarında Fc-spesifik konjugat kullanılacağından ve Şekil 9'daki SDS-PAGE analizinde Fc fragmantların da saptanmış olmasından dolayı Fc-spesifik konjugatla potansiyel bir etkileşiminin olup olmadığının belirlenmesi gerektiği anlaşıldı.

Bu amaçla hIFN γ kaplı ELISA plağında enkübasyonu yapılan değişik dilüsyonlardaki protein G'ye bağlanan fraksiyonun Fab- ve Fc-spesifik konjugatla bağlanma düzeyleri araştırıldı. Şekil 11'de görüldüğü gibi protein G'ye bağlanan fraksiyon daha önce yapılan ve Şekil 10A'da belirtilen verilere benzer şekilde Fab-spesifik konjugata bağlanmaktadır. Ancak Fc-spesifik konjugatla önemli düzeyde bir etkileşime girmemektedir (Şekil 11). Protein G'ye bağlanan fraksiyon içerisinde Fc fragmantları olduğu halde Fc spesifik konjugatla etkileşime girmemesi katı fazdaki IFN γ ile bağlanmamasından veya katı fazla özgül olmayan bir etkileşime girmiş olsa bile, değişik ağırlıktaki bu Fc fragmanlarının papain işlemi ile artık Fc-spesifik konjugata bağlanma özelliğini kaybetmiş olmasından kaynaklandığını göstermektedir.



Şekil 11. Boehringer kaynaklı hIFN γ (A) veya immuneron (B) kaplı katı faza bağlanan CA γ -IFN γ -38 Fab (protein G'ye bağlanan) fraksiyonunun Fab- ve Fc spesifik konjugatlarla etkileşim düzeyleri. Protein G'ye bağlanan fraksiyonun katı fazdaki özgül antijene bağlandığı Fab-spesifik konjugatla saptanabilmektedir. Zemindeki özgül antijene Fc fragmanlarının bağlanmamasından dolayı veya Fc fragmanlarının zemine özgül olmayan bir şekilde bağlanmış olsa bile papain işlemi ile yapısal değişikliğe uğramış olmasından dolayı Fc-spesifik konjugatla belirgin reaksiyon vermemektedir. Yalancı pozitif sonuç oluşmayacağından veya eşik OD değeri fazla yükseltmeyeceğinden dolayı Fc-spesik konjugat eşliğinde protein G'ye bağlanan fraksiyonun ELISA çalışmalarında kullanılabileceği anlaşılmaktadır.

3.7. Protein G'ye Bağlanan Fraksiyondaki Fab Miktarının Belirlenmesi.

Papain ile parçalama sonrası protein G afinite kromatografi ile saflaştırılan CAy-IFN γ -38 Fab parçasının aşılama çalışmalarında kullanılabilmesi için miktarının belirlenmesi gerekmektedir. Elde edilen Fab fraksiyonundaki özgül Fab (CAy-IFN γ -38 Fab) miktarının belirlenmesinde Tablo 11'de tanımlanan teorik ölçüm yöntemi kullanıldı;

Asit sıvısından protein G afinite kromatografi yöntemi ile saflaştırılan IgG havuzunun toplam IgG konsantrasyonu 3mg/ml, CAy-IFN γ 38 özgül antikor konsantrasyonu ise 1mg/ml olarak daha önceki çalışmada saptanmıştı (Tablo 10). Özgül antikor konsantrasyonu 1mg/ml olan örnekten 5 ml alınarak (toplam özgül antikor miktarı 5 mg'dır) papain ile parçalama işlemi için gerekli ajanlar eklendiğinde 13.75 ml olmaktadır. Papain parçalama işlemi yapılmış ve içerisinde 5 mg özgül antikora eşdeğer Fab ve Fc fragmanları bulunan 13.75 ml örnekten her defasında 5 ml olmak üzere 2 kez protein G'ye yükleme yapılarak toplam 10ml'si kullanıldı. Bu durumda 3.63 mg özgül antikora eşdeğer Fab ve Fc fragmanlarını içeren örnek yüklenmiş oldu. Şekil 9'daki 10. ve 11. Satırlardaki SDS-PAGE verilerine göre protein G'ye bağlanmadan çıkan örnekte Fab fragmanının yok denilecek düzeyde az olması ve Fab fragmanlarının protein G'ye bağlı kalması nedeniyle, 3.63 mg'lık özgül antikora eşdeğer düzeydeki Fab fragmanlarının hepsi 0.1M sitrik asit ile serbestleştirilen ve 1M Trizma ile nötralize edilen toplam 3,65ml'lik örnek içerisinde toplanmış oldu. Bu nedenle 3.65 ml'lik final örnek içerisinde 3.63 mg'lık özgül antikora eşdeğer düzeyde özgül Fab bulunmaktadır.

Ortalama 150kDa ağırlığındaki bir IgG molekülünün ağırlık açısından 2/3'ünü Fab bölgeleri oluşturduğu için, yukarıda tanımlanan işlem ile 3.63 mg'lık özgül antikordan 2.42 mg Fab fragmanı elde edildi. Serbestleştirme ve nötralizasyon sonrası elde edilen 3.65 ml'lik örnek içerisinde 2.42 mg Fab bulunduğu için konsantrasyonu 0.663 mg/ml (663 μ g/ml) olarak hesaplandı.

Tablo 11. CAy-IFN γ -38'in papain ile parçalanma sonrası protein G'ye bağlanan fraksiyondaki Fab miktarının işlem aşamalarına göre teorik olarak hesaplanması.

İşlem aşaması	Volüm	Özgül antikor konsantrasyonu-toplam miktarı (Özgül Fab konsantrasyonu-toplam miktarı)*
1. IgG havuzu	5 ml	1mg/ml — 5mg (Serbest Fab yok)
2. Papain ile parçalama	13.75 ml	0.363 mg/ml — 5mg (0.242 mg/ml — 3.3 mg)
3. Protein G kolona yükleme	10 ml	0.363 mg/ml — 3.63mg (0.242 mg/ml — 2.42 mg)
4. Protein G'den serbestleştirilen bağlanan fraksiyon	2.5 ml	1.452 mg/ml — 3.63 mg (0.968 mg/ml — 2.42 mg)
5. Protein G'den serbestleştirilen bağlanan fraksiyonun Trizma ile nötralizasyonu	3. 65 ml	0.994 mg/ml — 3.63 mg (0.662 mg/ml — 2.42 mg)

*. Fab değerleri özgül antikora ait değerlerin 2/3 ile çarpılması ile belirlendi.

4. Aşılama sonuçları

4.1. Toplam Özgül Antikor Yanıtı Düzeyleri

“Antijen”, “antijen+Fab”, “antijen+IgG” ve “PBS” örnekleriyle aşılama yapılan grupların plasma örneklerinde özgül toplam antikor düzeyleri hIFN γ (Boehringer) kaplı plaklarda karşılaştırıldı. Konjugat olarak HRP işaretli Fab bölgesine özgül anti-fare Ig kullanıldı. Bu konjugat fare IgG’sinin Fc bölgesi hariç Fare IgG subtiplerine, IgA, IgM ve IgE’ye bağlanmaktadır. Böylece her gruptaki özgül toplam antikor düzeyleri ölçülebildi. Çalışmada 10mM PBS ile 1/500, 1/5000, 1/50000 ve 1/500000 sulandırılmış plasma örnekleri kullanıldı. “Antijen”, “antijen+Fab”, “antijen+IgG” gruplarındaki deneklerin 1/50000 ve 1/500000 sulandırılmış plasma örneklerinin verdiği OD değerlerinin özgül antikor bulundurmayan “kontrol” grubunun aynı dilüsyonlardaki plasma örnekleri ile yaklaşık değerler vermesi nedeniyle gruplar arasındaki plasma antikor düzeyleri karşılaştırılırken plasmanın 1/5000 dilüsyonda verdiği OD 450/620nm. değerleri kullanıldı (Tablo 12,13,14,15, Şekil 12). “Antijen+IgG” karışımı ile aşılama yapılan grubun plasma toplam özgül antikor düzeyi “antijen” ve “antijen+Fab” grubuna ait antikor düzeylerinden anlamlı düzeyde (antijen grubu ile karşılaştırıldığında $p=0.0012$, “antijen+Fab” grubu ile karşılaştırıldığında $p=0.0026$) düşük bulundu (Şekil 12). PBS grubunda elde edilen OD değerleri ELISA sistemine ait zemin kirlilik düzeyinin ortalama değeri olarak değerlendirilmektedir. “Antijen+IgG” grubunda saptanabilir düzeyde plasma antikor olmasına karşın, PBS grubu ile karşılaştırıldığında bu farkın istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde olmadığı saptandı ($p=0.150$) (Şekil 12). ELISA çalışmasında kontrol amacıyla CAy IFN γ 38 hibridoma kültür süpernatantının ve R&D kaynaklı anti-hIFN γ IgG2a mAb’ın Boehringer kaynaklı hIFN γ kaplı katı faza bağlanma düzeyleri araştırıldı. Her iki örneğinde değişik dilüsyon oranlarında katı fazdaki hIFN γ ile reaksiyona girdiği gözlemlendi(Tablo 16,17).

4.2. Özgül IgG Yanıtı Düzeyleri

“Antijen”, “antijen+Fab”, “antijen+IgG” ve “PBS” örnekleriyle aşılama yapılan grupların plasma antikor düzeyleri hIFN γ (Boehringer) kaplı plaklarda karşılaştırıldı. Herbir gruptaki deneğe ait plasma örneklerinin IFN γ kaplı plağın PBS ve 1/50 sulandırılmış Fab ile ön enkübasyonu yapılmış çukurlarında Fc spesifik konjugat kullanıldıktan sonra 450/620nm.’de verdikleri OD değerleri saptandı. Böylece, PBS ile sulandırılmış çukurlarda her gruptaki özgül antikor düzeyi, Fab ile ön enkübasyon yapılmış çukurlarda ise Fab’ın bağlandığı epitop dışındaki epitoplara özgül antikor düzeyi araştırıldı (Tablo 18,19,20,21). ELISA çalışmasında hazırlanan sistemin kontrolü amacıyla CAy IFN γ 38 hibridoma kültür süpernatantının ve R&D kaynaklı anti-hIFN γ IgG2a mAb’ın Boehringer kaynaklı hIFN γ kaplı katı faza bağlanmasının Fab ile inhibisyonu da araştırıldı (Tablo 22,23). Tablo 22’de görüldüğü gibi R&D kaynaklı standart anti-hIFN γ ’nın tüm dilüsyon oranlarında IFN γ kaplı katı faza bağlanmasının Fab ile inhibe edildiği gözlemlendi (Şekil 13A). Bu da R&D’nin anti-hIFN γ 38 ile benzer epitopa bağlandığını göstermektedir. Plasma örneklerindeki antikor düzeylerini saptamak amacıyla hazırlanan ELISA sisteminin etkinliği CAyIFN γ 38 hibridoma kültür süpernatantının PBS ve Fab ile ön enkübasyonu yapılmış çukurlarda katı faza bağlanma düzeyleri karşılaştırılarak saptandı. Buna göre CAyIFN γ 38 hibridoma kültür süpernatantının hIFN γ kaplı katı faza bağlanmasının Fab ile inhibisyonu 1, 1/10 ve 1/100 dilüsyon oranlarında belirgin olarak saptandı (Şekil 13B, Tablo 23).

Çalışmada 10mM PBS ile 1/500, 1/5000, 1/50000 ve 1/500000 sulandırılmış plasma örnekleri kullanıldı. “Antijen”, “antijen+Fab”, “antijen+IgG” gruplarındaki deneklerin 1/50000 ve 1/500000 sulandırılmış plasma örneklerinin verdiği OD değerlerinin özgül antikor bulundurmeyen “kontrol” grubunun aynı dilüsyonlardaki plasma örnekleri ile yaklaşık değerler vermesi nedeniyle gruplar arasındaki plasma

antikor düzeyleri karşılaştırılırken plasmanın 1/5000 dilüsyonunda verdiği OD 450/620nm. değerleri kullanıldı(Şekil 14).

Değişik şekilde aşılama yapılan bütün gruplarda PBS ile ön enkübasyon sonrası elde edilen OD değerleri ile aynı grupta zeminin Fab ile kapatılması sonrası elde edilen OD değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanamadı ($p>0.05$).

“Antijen+Fab” ve “antijen” ile aşılama yapılan grupların PBS ve Fab ile ön enkübasyonu yapılan çukurlardaki plasma antikor düzeyleri karşılaştırıldığında grupların OD değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanamadı ($p>0.05$)(Şekil 14).

“Antijen+IgG” karışımı ile aşılama yapılan grubun plasma antikor düzeyi “antijen” veya “antijen+Fab” grubuna ait antikor düzeylerinden anlamlı düzeyde (antijen grubu ile karşılaştırıldığında $p=0.00151$, “antijen+Fab” grubu ile karşılaştırıldığında $p=0.00517$) düşük bulundu (Şekil 14). “Ag+IgG” karışımı ile aşılama yapılan grubun Fab ile ön enkübasyon yapılmış çukurlardaki plasma antikor düzeyi aynı çukurlarda “antijen” veya “antijen+Fab” grubuna ait antikor düzeylerinden anlamlı düzeyde (antijen grubu ile karşılaştırıldığında $p=0.00126$, “antijen+Fab” grubu ile karşılaştırıldığında $p=0.00415$) düşük bulundu (Şekil 14). “Antijen+IgG” grubunda saptanabilir düzeyde plasma antikoruna olmasına karşın, PBS grubu ile karşılaştırıldığında bu farkın istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde olmadığı saptandı ($p=0.158$)(Şekil 14).

Tablo 12. Sadece antijenle aşılanan farelerde plasma toplam özgül antikor düzeyi (OD450/620 nm).

		Plasma dilüsyon oranı			
		1/500	1/5000	1/50000	1/500000
1. Fare	Overflow	2.890	0.461	0.067	
2. Fare	Overflow	1.838	0.177	0.031	
3. Fare	Overflow	2.510	0.285	0.047	
4. Fare	Overflow	2.485	0.307	0.054	
5. Fare	Overflow	2.910	0.587	0.082	
Grup Ort.±SD		2.526±0.194	0.363±0.071	0.056±0.008	

Tablo 13. Antijen-Fab karışımı ile aşılanan farelerde plasma toplam özgül antikor düzeyi (OD450/620 nm).

		Plasma dilüsyon oranı			
		1/500	1/5000	1/50000	1/500000
1. Fare	Overflow	2.780	0.463	0.074	
2. Fare	Overflow	1.316	0.172	0.029	
3. Fare	Overflow	2.900	0.603	0.083	
4. Fare	Overflow	2.650	0.532	0.072	
5. Fare	Overflow	2.998	0.848	0.106	
Grup Ort.±SD		2.528±0.308	0.523±0.109	0.072±0.012	

Tablo 14. Antijen-IgG karışımı ile aşılanan farelerde plasma toplam özgül antikor düzeyi (OD450/620 nm).

		Plasma dilüsyon oranı			
		1/500	1/5000	1/50000	1/500000
1. Fare		1.325	0.161	0.030	0.020
2. Fare	Overflow	0.550	0.060	0.017	
3. Fare		2.002	0.366	0.050	0.017
4. Fare		1.965	0.237	0.023	0.017
5. Fare	Overflow	2.164	0.280	0.041	
Grup Ort.±SD		0.695±0.373	0.088±0.048	0.022±0.004	

Tablo 15. Kontrol (sadece PBS verilen) farelerde plasma konsantrasyonu ile ilişkili kirlilik düzeyi (OD450/620 nm).

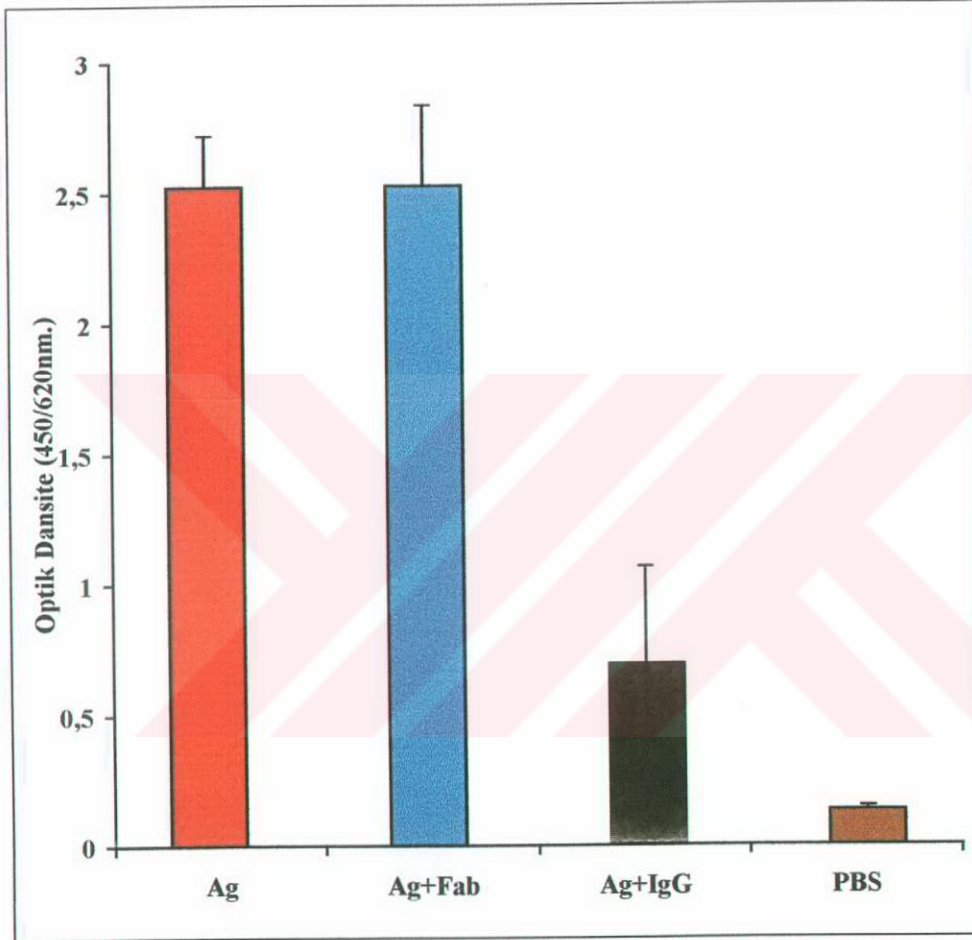
	Plasma dilüsyon oranı			
	1/500	1/5000	1/50000	1/500000
1. Fare	0.250	0.107	0.027	0.014
2. Fare	0.263	0.156	0.036	0.014
3. Fare	0.210	0.136	0.034	0.012
Grup Ort.±SD	0.241±0.027	0.1330±0.014	0.032±0.002	0.013±0.0006

Tablo 16. R&D kaynaklı anti-hIFN γ IgG2a mAb'ın Boehringer kaynaklı hIFN γ kaplı katı faza bağlanması (OD 450/620 nm).

	Konsantrasyon (ng/ml)			
	1000	100	10	1
R&D	1.051	0.176	0.031	0.016

Tablo 17. CAy-IFN γ -38 hibridoma kültür süpernatantının Boehringer kaynaklı hIFN γ kaplı katı faza bağlanması (OD450/620 nm).

	Dilüsyon Oranı			
	1	1/10	1/100	1/1000
CAy-IFNγ-38	0.868	0.524	0.195	0.044



Şekil 12. “Antijen”, “antijen+Fab” veya “antijen+IgG” örnekleriyle aşılama yapılan gruplarda plasma toplam özgül antikor düzeylerinin karşılaştırılması. Plasma toplam özgül antikor düzeyleri plasmanın 1/5000 dilüsyonda verdiği OD450/620nm değerleri olarak belirtildi. “Antijen+IgG” karışımı ile aşılama yapılan grubun plasma toplam antikor düzeyi “antijen” ve “antijen+Fab” grubuna ait antikor düzeylerinden anlamlı düzeyde (antijen grubu ile karşılaştırıldığında $p=0.0012$, “antijen+Fab” grubu ile karşılaştırıldığında $p=0.0026$) düşük bulundu. PBS grubunda elde edilen OD değerleri ELISA sistemine ait zemin kirlilik düzeyinin ortalama değeri olarak değerlendirilmektedir. “Antijen+IgG” grubunda saptanabilir düzeyde plasma antikorunun olmasına karşın, PBS grubu ile karşılaştırıldığında bu farkın istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde olmadığı saptandı ($p=0.150$). Denek sayısı PBS grubunda 3, diğer gruplarda ise 5’dir. Sonuçlar grupların ortalama±standart sapma değerleri olarak sunuldu.

Tablo 18. Sadece antijenle aşılanan farelerde plazma özgül IgG düzeyi (OD450/620 nm).

		Plasma dilüsyon oranı			
		1/500	1/5000	1/50000	1/500000
1. Fare	PBS	Overflow	1.822	0.265	0.085
	Fab	Overflow	1.600	0.223	0.090
2. Fare	PBS	Overflow	0.767	0.135	0.065
	Fab	Overflow	0.836	0.154	0.080
3. Fare	PBS	Overflow	1.394	0.243	0.081
	Fab	Overflow	1.411	0.234	0.090
4. Fare	PBS	Overflow	1.142	0.245	0.074
	Fab	Overflow	1.542	0.189	0.087
5. Fare	PBS	Overflow	2.394	0.335	0.084
	Fab	Overflow	2.721	0.314	0.096
Grup Ort.±SD	PBS		1.503±0.628	0.244±0.071	0.077±0.008
	Fab		1.622±0.685	0.222±0.059	0.088±0.005

Tablo 19. Antijen-Fab karışımı ile aşılanan farelerde plazma özgül IgG düzeyi (OD450/620 nm).

		Plasma dilüsyon oranı			
		1/500	1/5000	1/50000	1/500000
1. Fare	PBS	Overflow	0.708	0.125	0.067
	Fab	Overflow	0.679	0.136	0.076
2. Fare	PBS	Overflow	0.431	0.101	0.066
	Fab	Overflow	0.487	0.118	0.072
3. Fare	PBS	Overflow	1.644	0.198	0.077
	Fab	Overflow	1.542	0.243	0.091
4. Fare	PBS	Overflow	1.474	0.218	0.075
	Fab	Overflow	1.429	0.218	0.091
5. Fare	PBS	Overflow	1.807	0.249	0.081
	Fab	Overflow	1.814	0.279	0.095
Grup Ort.±SD	PBS		1.212±0.606	0.178±0.062	0.073±0.006
	Fab		1.190±0.575	0.198±0.069	0.085±0.010

Tablo 20. Antijen-IgG karışımı ile aşılanan farelerde plasma özgül IgG düzeyi (OD450/620 nm).

		Plasma dilüsyon oranı			
		1/500	1/5000	1/50000	1/500000
1. Fare	PBS	0.355	0.094	0.069	0.062
	Fab	0.350	0.105	0.084	0.074
2. Fare	PBS	0.894	0.150	0.079	0.065
	Fab	0.786	0.145	0.090	0.075
3. Fare	PBS	0.554	0.125	0.080	0.067
	Fab	0.336	0.111	0.082	0.082
4. Fare	PBS	0.471	0.101	0.076	0.061
	Fab	0.496	0.121	0.085	0.068
5. Fare	PBS	Overflow	0.687	0.245	0.074
	Fab	2.745	0.638	0.138	0.077
Grup Ort.±SD	PBS		0.231±0.255	0.109±0.075	0.065±0.005
	Fab		0.224±0.231	0.095±0.023	0.075±0.005

Tablo 21. Kontrol (sadece PBS verilen) farelerde plasma konsantrasyonu ile ilişkili kirlilik düzeyi (OD450/620 nm).

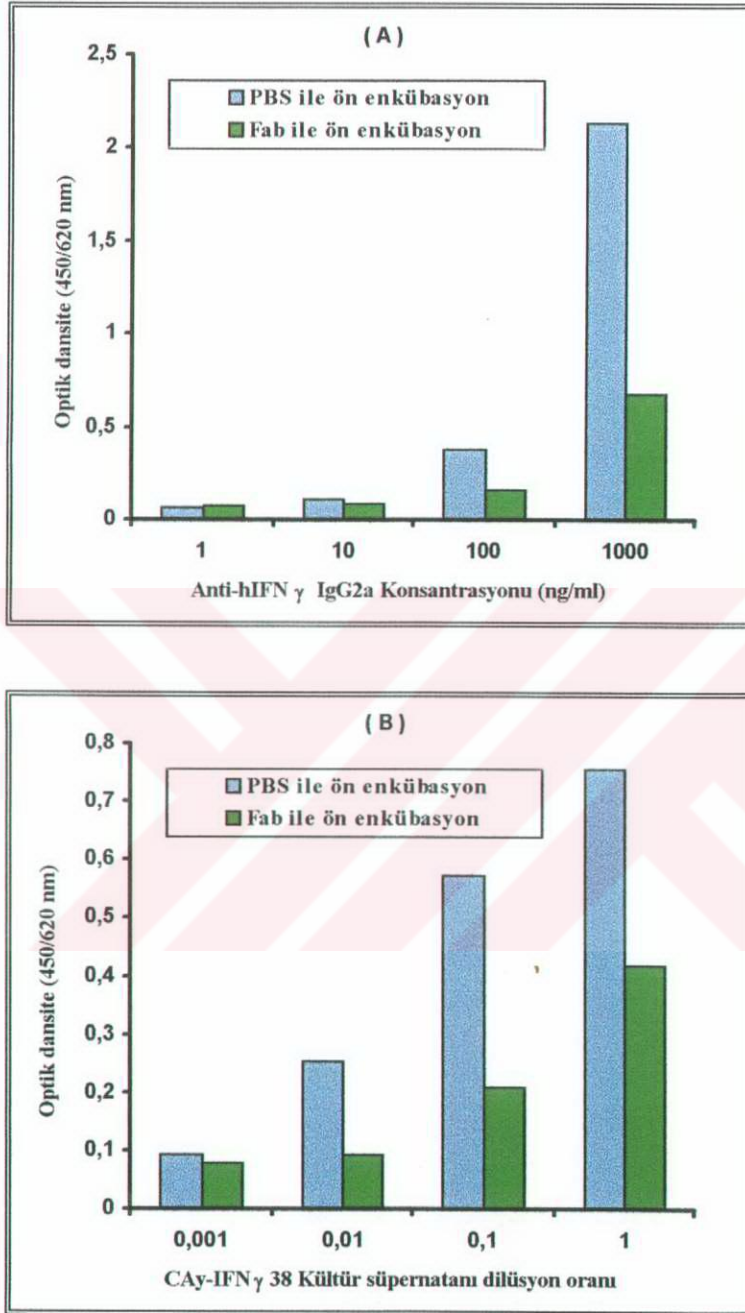
		Plasma dilüsyon oranı			
		1/500	1/5000	1/50000	1/500000
1. Fare	PBS	0.073	0.065	0.067	0.064
	Fab	0.073	0.091	0.074	0.075
2. Fare	PBS	0.061	0.065	0.066	0.062
	Fab	0.075	0.080	0.077	0.071
3. Fare	PBS	0.063	0.065	0.063	0.069
	Fab	0.072	0.078	0.073	0.075
Grup Ort.±SD	PBS	0.065±0.006	0.065±0.00	0.065±0.002	0.065±0.003
	Fab	0.073±0.001	0.083±0.007	0.074±0.002	0.073±0.002

Tablo 22. R&D kaynaklı anti-hIFN γ IgG2a mAb'ın Boehringer kaynaklı hIFN γ kaplı katı faza bağlanmasının Fab ile inhibisyonu (OD 450/620 nm).

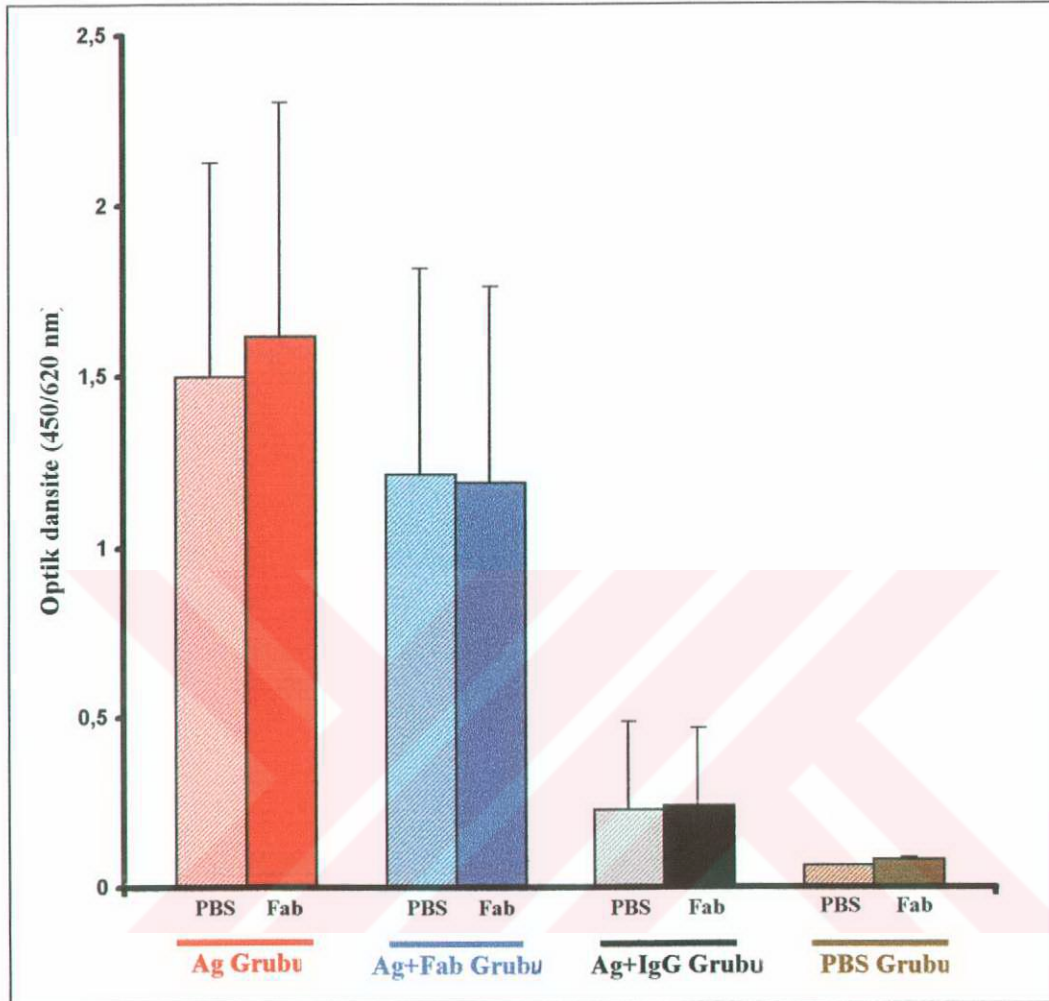
		Konsantrasyon (ng/ml)			
		1000	100	10	1
1. Plak	PBS	2.044	0.416	0.116	0.067
	Fab	0.691	0.169	0.084	0.081
2. Plak	PBS	2.223	0.339	0.097	0.068
	Fab	0.675	0.150	0.082	0.079
Grup Ort. $\pm$ SD	PBS	2.133 $\pm$ 0.126	0.377 $\pm$ 0.054	0.106 $\pm$ 0.013	0.067 $\pm$ 0.0007
	Fab	0.683 $\pm$ 0.011	0.159 $\pm$ 0.013	0.083 $\pm$ 0.001	0.080 $\pm$ 0.001

Tablo 23. CAy-IFN γ -38 hibridoma kültür süpernatantının Boehringer kaynaklı hIFN γ kaplı katı faza bağlanmasının Fab ile inhibisyonu (OD450/620 nm).

		Dilüsyon oranı			
		1	1/10	1/100	1/1000
1. Plak	PBS	0.851	0.654	0.295	0.094
	Fab	0.387	0.213	0.095	0.082
2. Plak	PBS	0.660	0.492	0.213	0.090
	Fab	0.453	0.210	0.091	0.077
Grup Ort. $\pm$ SD	PBS	0.755 $\pm$ 0.135	0.573 $\pm$ 0.114	0.254 $\pm$ 0.058	0.092 $\pm$ 0.002
	Fab	0.420 $\pm$ 0.046	0.211 $\pm$ 0.002	0.093 $\pm$ 0.002	0.079 $\pm$ 0.003



Şekil 13. Antikorum Boehringer kaynaklı hIFN γ 'ya bağlanmasında Fab aracılı inhibisyon. R&D kaynaklı anti-hIFN γ IgG2a, konsantrasyona bağımlı şekilde PBS ile ön enkübasyon yapılmış zemindeki özgül antijene bağlanmaktadır. Ancak 1/50 dilüe CAy-IFN γ 38 Fab fraksiyonu ile ön enkübasyon yapılan zemine bağlanma düzeyi azalmaktadır (A). Benzer şekilde, CAy-IFN γ 38 kültür süpernatanındaki antikorum zemindeki özgül antijene bağlanması Fab fraksiyonu ile ön enkübasyon yapıldığında baskılanmaktadır (B).



Şekil 14. “Antijen”, “antijen+Fab” veya “antijen+IgG” örnekleriyle aşılama yapılan gruplarda plasma IgG düzeylerinin karşılaştırılması. Plasma antikor düzeyleri plasmanın 1/5000 dilüsyonda verdiği OD_{450/620nm} değerleri olarak belirtildi. Değişik şekilde aşılama yapılan bütün gruplarda elde edilen OD değerleri ile aynı grupta zeminin Fab ile kapatılması sonrası elde edilen OD değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Sadece antijen ile aşılama yapılan grup ile “antijen+Fab” karışımıyla aşılama yapılan grubun plasma antikor düzeyleri karşılaştırıldığında “antijen+Fab” grubunda bir miktar düşüklük olmasına karşın bu farkın istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde olmadığı saptandı. “Antijen+IgG” karışımı ile aşılama yapılan grubun plasma antikor düzeyi “antijen” ve “antijen+Fab” grubuna ait antikor düzeylerinden anlamlı düzeyde (antijen grubu ile karşılaştırıldığında $p=0.00151$, “antijen+Fab” grubu ile karşılaştırıldığında $p=0.00517$) düşük bulundu. PBS grubunda PBS ile ön enküasyon yapılmış çukurlardan elde edilen OD değerleri ELISA sistemine ait zemin kirlilik düzeyinin ortalama değeri olarak değerlendirilmektedir. Aynı grupta Fab ile ön enküasyon yapılmış çukurlardan elde edilen OD değerinin daha yüksek bulunmuş olması Fab aracılı zemin kirlilik düzeyinin eklenmesinden kaynaklanmaktadır. “Antijen+IgG” grubunda saptanabilir düzeyde plasma antikoru olmasına karşın, PBS grubu ile karşılaştırıldığında bu farkın istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde olmadığı saptandı ($p=0.158$). Denek sayısı PBS grubunda 3, diğer gruplarda ise 5’dir. Sonuçlar grupların ortalama±standart sapma değerleri olarak sunuldu.

6.TARTIŞMA

Yüz yılı aşkın süredir antijen ile beraber pasif olarak verilen antikorların, antijene karşı özgül antikor yanıtını düzenleyici etkisinin olduğu bilinmektedir. Bu etki antikor yanıtının ya %99.9 oranında baskılanmasına ya da 1000 kat artmasına neden olabilmektedir. İmmün yanıtın düzenlenmesinde çift yönlü olabilen bu etki antikorum izotipine bağlıdır. İmmün kompleks yapıdaki IgM ve IgE izotipindeki antikorlar antijene özgül antikor yanıtını artırıcı etkide bulunurken IgG özgül antikor yanıtını hem arttıran hem de azaltan tek antikor izotipidir ⁵³. Antijen(Ag) – immünoglobulin G (IgG) kompleksinin eş zamanlı olarak B-lenfosit reseptörüne (antijen aracılığı ile) ve B lenfosit Fc γ reseptörüne (Fc γ RIIB) (antijene bağlı IgG'nin Fc aracılığı ile) bağlanması B-lenfosit uyarımının Fc γ RIIB aracılığı ile engellenmesine neden olmaktadır. IgG'nin bu özelliği nedeniyle genellikle yeni doğan çocuklara kızamık ve kabakulak aşıları bir yaşından önce yapılmaz. Bebekte anne kaynaklı IgG izotipindeki antikor düzeyinin en az 6 ay boyunca yüksek düzeylerde olması nedeniyle, bu dönemdeki aşılama bebekte yetersiz immün yanıtın oluşmasına neden olabilmektedir ⁵⁴. Ayrıca, IgG'nin bu özelliği Rh uyuşmazlığına bağlı olarak gelişen Yeni Doğanın Hemolitik Hastalığı (YDHH) olan eritroblastozis fetalis'den korunmak amacıyla kullanılmaktadır. Eritroblastozis fetalis 'de Rh(-) annenin Rh(+) bebeğe gebe kalması sonucu oluşan IgG izotipindeki anti-Rh antikorları plasentadan geçerek fetus eritrositlerini yıkıma uğratırlar. Rh(-) anne, Rh(+) ikinci bebeğe hamile ise bu reaksiyonun oluşma riski yüksektir. Bunu önlemek amacı ile, rutin olarak henüz anti-Rh antikoru gelişmemiş Rh(-) bir kadına doğum, kürtaj, vs. gibi jinekolojik işlemler ya da yanlışlıkla Rh(+) kan verilmesi gibi bir olaydan sonra 72 saat içinde anti-Rh antikorları verilirse bu risk önlenir. ⁵⁵.

Literatürlerde IgG izotipindeki antikorların özgül antikor yanıtını baskılayıcı etkisinin iki farklı mekanizmayla gerçekleştiği belirtilmektedir. Birinci mekanizmada,

pasif olarak verilen özgül IgG antijenik epitopları kapatarak B hücrelerinin antijeni tanımasını ve aktivasyonunu engellemektedir. Bu mekanizmaya göre IgG'nin antikor yanıtını baskılayıcı etkisi Fc parçasından bağımsız olarak gerçekleşmektedir. Bu mekanizmayı destekleyen araştırmacıların bir kısmı antikor yanıtının baskılanmasında IgG'nin $F(ab^1)_2$ fragmentinin IgG kadar etkili olduğunu belirtmişlerdir ²². Karlsson MC ve ark.'larının FcγR (FcγRI+FcγRIIB+FcγRIII)'lerinden yoksun deney farelerinde yaptıkları çalışmada özgül antikor yanıtının baskılanmasında $F(ab^1)_2$ – Ag kompleksinin IgG-Ag kompleksi kadar etkili olduğunu saptamışlardır. Çalışmanın sonucunda IgG bağımlı antikor yanıtının baskılanmasında geçerli olan mekanizmanın Fc parçasına bağımlı olmasından daha çok antijenik epitopların maskelenip B lenfositlerin antijenlere bağlanmasında engelleme mekanizmasının etkili olduğu savunulmaktadır ⁵⁶.

İkinci mekanizma ile IgG'nin antikor yanıtını baskılayıcı etkisi IgG-Ag kompleksinin B lenfosit reseptörü ve FcγRIIB reseptörü ile aynı anda bağlantı kurmasıyla gerçekleşir. Bu mekanizmayı destekleyen araştırmacılara göre IgG'nin baskılayıcı etkisi IgG'nin Fc parçasına bağımlı olarak gerçekleşir. Bu görüşe göre $F(ab^1)_2$ parçaları baskılamaya neden olmamaktadır ve baskılama epitop spesifik değildir ²². Birgitta Heyman'ın $F(ab^1)_2$ parçaları ile IgG'nin antikor yanıtını baskılamasındaki etkinliklerini karşılaştırdığı çalışmada TNP(Trinitrofenol)'ye özgül IgG izotipindeki mAb'ın pepsin enzimiyle $F(ab^1)_2$ parçalarına ayrılması sonrasında, $F(ab^1)_2$ parçalarının SRBC(Sheep Red Blood Cell; Koyun Eritrositleri)-TNP ile beraber splenosit kültür ortamına koyulmasından sonra SRBC'ye özgül antikor yanıtı araştırılmış ve sonuçta $F(ab^1)_2$ bölgelerinin parçalanmamış IgG'ye göre 1000 kat daha az baskılayıcı etkisi olduğu saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada TNP'ye özgül IgG izotipindeki mAb'ın SRBC -TNP ve HRBC (Horse Red Blood Cell; At Eritrositleri) ile beraber koyulduğunda TNP ile beraber SRBC'ye karşı antikor yanıtının da baskılandığı ancak HRBC'ye karşı oluşan antikor yanıtında değişikliğin olmadığı belirtilmiştir ⁵⁷. Heyman'ın elde ettiği ikinci sonuç, Möller

G.'nin araştırmasının sonunda belirttiği antikor yanıtındaki baskılanmanın epitop spesifik olduğu sonucundan tamamen farklıdır ve baskılanmanın antijen spesifik olduğunu göstermektedir⁵⁸. Heyman B. ve ark.'larının yaptıkları diğer bir çalışmada IgG Fc bölgesinde karbohidrat grupları içeren zincirlerin antikor yanıtının baskılanmasında büyük önemi olduğunu belirtmişlerdir. IgG'nin Fc bölgesindeki karbohidrat gruplarından yoksun IgG her ne kadar antijene bağlanma özelliğini kaybetmese de komplemana bağlanma, hücre yüzeyindeki Fc reseptörlerine bağlanabilme özelliklerini kaybeder ve aynı zamanda antikor bağımlı hücrel sitotoksite görevini yerine getiremez. Heyman B. ve ark. 'ları yaptıkları çalışmada özgül IgG ile IgG'nin Fc bölgesindeki karbohidrat zincirlerinden yoksun IgG'nin immün yanıtın baskılanmasındaki etkinliğini karşılaştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda özgül IgG'nin antikor yanıtını baskıladığı ancak karbohidrat zincirlerinden yoksun IgG'nin antikor yanıtını baskılayıcı etkisinin olmadığı belirtilmiştir⁵⁹.

İmmün kompleks yapıda yer alan IgG'nin IgG1, IgG2a, IgG2b ve IgG3 alt gruplarının antikor yanıtını baskılanmada bir farklılık gösterip göstermediği farklı araştırmacılar tarafından araştırılmıştır. Heyman ve ark.'ları yaptıkları çalışmada SRBC'ye özgül 6 farklı IgG izotipinde SRBC'ye özgül mAb'ın antikor yanıtı üzerine etkilerini araştırmışlardır. Kullandıkları IgG izotipindeki mAb'ların dördü IgG3 izotipinde, biri IgG2a ve biri de IgG1 izotipindedir. Çalışmanın sonucunda SRBC'ye özgül antikor yanıtının baskılanmasında sadece IgG1 izotipindeki antikorların değil aynı zamanda IgG2a ve IgG3 izotipindeki antikorların da etkili olduğu belirtilmiştir⁶⁰.

Ayrıca özgül IgG'nin antijenden önce veya sonra verilmesinin immün yanıtın baskılanmasında bir değişikliğe neden olmayacağı belirtilmiştir. Bu yönde yapılan araştırmada özgül IgG, antijen enjeksiyonundan 1 saat önce ve 2.5, 6, 12 saat sonra verildiğinde antikor yanıtının IgG bağımlı baskılanmasında bir değişikliğin olmadığı saptanmıştır⁶¹.

Monoklonal antikorlar tanı amaçlı olarak ELISA veya RIA gibi değişik testlerde kullanılmaktadır. Özellikle yüzeyinde aynı epitoptan birden fazla içermeyen multivalan antijenlerin saptanmasına yönelik testlerde iki farklı epitopa özgül mAb'ların kullanılması gerekmektedir. Ancak, mAb üretim tekniğinde aşılama ve füzyon sonrası sıklıkla immünodominant epitopa özgül antikor salgılayan hibridoma hücreleri elde edilmektedir. Bu nedenle literatürlerde farklı epitoplara özgül mAb'ların üretilmesine yönelik olarak antijen yüzeyindeki belirli bir epitopun özgül mAb ile maskelenmesi sonucu oluşan immün kompleks ile yapılan aşılamanın etkili olacağı belirtilmektedir. Hibridoma teknolojisinde bu yöntem Benkirane ve ark.'ları tarafından insan thyrotropin (hTSH) hormonuna karşı mAb üretiminde kullanılmıştır. hTSH ölçümüne yönelik etkin bir immünoradiometrik yöntem geliştirilebilmesi için hTSH'ın değişik immünojenik epitoplara özgül monoklonal antikorlar gerekmektedir. hTSH'ın immünodominant β_1 ünitesine karşı anti- β_1 hTSH monoklonal antikor üretimi sonrası in vitro şartlarda hTSH-anti- β_1 hTSH mAb immün kompleksi oluşturularak, bu kompleks ile deney hayvanlarında yeniden aşılama yapılmış ve hTSH'ın β_1 immunodominant epitopu dışındaki epitoplarına karşı da özgül monoklonal antikorlar elde ettiklerini belirtmişlerdir ⁶. Ancak Quintana ve ark.'larının yaptıkları çalışmada ise koyun eritrositlerine karşı oluşturulan IgG₁, IgG_{2b}, IgG_{2a} izotipindeki mAb'lar ve koyun eritrositlerinden oluşan kompleks yapının deney farelerine enjekte edilmesi sonucunda herbir monoklonal antikorun özgül olduğu epitopa karşı antikor yanıtının baskılandığı eritrositlerin yüzeyindeki diğer epitoplara özgül antikor yanıtını etkilemediğini belirtmişlerdir ⁶².

Antijen üzerindeki belirli bir epitopun özgül IgG antikoru ile kapatılarak aşılama yapıldığında antijen yüzeyindeki tüm epitoplara karşı antikor yanıtının baskılanacağı çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir. Bu çalışmada da "hIFN γ +IgG", "hIFN γ +Fab", "hIFN γ " ve "PBS" ile yapılan aşılama sonrası tüm gruplardaki antikor yanıtları araştırıldı. Bu sayede antikor yanıtının farklı epitoplara yönlendirilmesine

yönelik olarak aşılama da kullanılacak “Ag+IgG” ya da “Ag+Fab” komplekslerinden hangisinin uygun olacağı araştırıldı. Bu amaçla antijen olarak homodimerik yapıda olan hIFN γ seçilmiştir. Çalışmanın değişik basamaklarında Immuneron ve Boehringer kaynaklı hIFN γ kullanıldı. Ancak Immuneron kaynaklı hIFN γ ’nın insan albumin içermesinden dolayı özellikle aşılama da ve aşılama sonrası sonuçların değerlendirildiği ELISA çalışmasında yanıltıcı sonuçların oluşmasını engellemek amacıyla içeriğinde sadece rekombinant hIFN γ bulunduran Boehringer kaynaklı hIFN γ kullanıldı. IgG-hIFN γ kompleksiyle aşılama için gerekli olan anti-hIFN γ IgG1, laboratuvarımızda üretilen anti-hIFN γ IgG1 monoklonal antikor salgılayan CAy-IFN γ 38 hibridoma hücrelerinden daha önce tanımlandığı şekilde üretildi ve kromatografik yöntemler ile saflaştırıldı (Şekil 5) . Saflaştırma öncesi ve sonrası özgül antikor miktarının ölçümü ve saflaştırma çalışmasının etkinliği ELISA yöntemiyle gösterildi. Çalışma sonucunda protein G kolonuna yüklenen örnek içerisindeki özgül antikoru en az %90’ı saflaştırıldı (Şekil 4,6) .

Fab-hIFN γ kompleksiyle aşılama için gerekli olan anti-hIFN γ IgG1 Fab parçaları anti-hIFN γ 38 IgG1’in papain enzimi ile parçalanmasıyla elde edildi. Ancak, antikoru papain enzimiyle parçalanma süresi antikoru izotipine ve elde edildiği organizmanın türüne bağlı olarak değişmektedir. Bu amaçla ilk önce α -hIFN γ 38 IgG1’in papain enzimi ile parçalanmasında uygun süre tespit edilmiştir. Bu amaçla α -hIFN γ IgG1 papain enzimiyle 2 saat, 4 saat, 8 saat, 16 saat, 24 saat, 36 saat , 48 saatlik sürelerde parçalanmaya bırakıldı. Parçalama işleminde en uygun süre SDS-poliakrilamit jel elektroforez yöntemiyle analiz edildi (Şekil 9). İlk olarak 2, 4, 8 saatlik kısa zaman aralıklarındaki parçalama düzeyi incelenmiştir. 2, 4, 8 saatlik zaman aralıklarında; zamana bağımlı olarak Fab ve Fc parçalarına ait bantlar belirginleşmektedir. Uygun parçalama süresi 150 kDa.’luk bölgede IgG’ye ait band’ın görülmediği zaman aralığıdır. SDS-PAGE sonrası parçalama süresine bağımlı olarak 4 saatlik parçalama sonrası 150kDa.’luk bölgedeki bant kaybolmaktadır. Uzun süre enzimle parçalanmanın Fab

fragmanlarının aktivasyonunu etkileyebileceği düşünülerek optimum parçalanma süresi olan 4 saatlik süre seçilmiştir. 2 saatlik parçalama sonrası yaklaşık 120 kDa.'luk bölgede yer alan band sistein kaynaklı olabileceği düşünüldü (Şekil 9) . Her ne kadar literatürde kısa enkübasyon sürelerinde (4 saate kadar) 120kDa'luk bölgede sistein kaynaklı bant'ların görülebileceği belirtilmekte ise de 2 saatlik parçalanma sonrası oluşan görüntüden emin olabilmek amacıyla benzer koşullarda α -hIFN γ IgG1 15, 30 ve 60 dakikalık sürelerde papain enzimiyle parçalandı ve SDS-PAGE yöntemiyle parçalanma düzeyi analiz edildi. SDS-PAGE sonrası 15, 30 ve 60 dakikalık sürelerde parçalama sonrası 150kDa.'luk bölgede bantların zamana bağımlı olarak kaybolduğu ve 120kDa.'luk bölgede bant'ların bulunduğu görüldü (Şekil 8).

L-sisteine içeren papain enzimiyle L-sisteine ile aktive edildikten sonra L-sistein'den arındırılmış papain enziminin α -hIFN γ IgG1'i parçalama düzeyleri karşılaştırılmıştır. L-sisteine ile aktive edildikten sonra L-sistein'den arındırılmış papain enzimi ile IgG'nin parçalanması yöntemi çoğunlukla IgG1'den F(ab)₂ fragmentlerinin veya IgG2a ve IgG2b'den Fab fragmentlerinin elde edilmesinde kullanılmaktadır. L-sisteine ile aktive edilmiş ve daha sonra kullanım öncesi L-sisteine 'den arındırılmış aktive papain ile 2 saatlik parçalamanın sonrasında yapılan SDS-PAGE analizi sonucunda Fab ve Fc parçalarına ait band'lar saptanamadı (Şekil 8). Bu nedenle önceden aktive edilmiş papain enzimi ile Fab ve Fc parçalarının elde edilme işleminin etkin olmayacağı anlaşıldı.

Papain enzimiyle 4 saatlik parçalama işlemi sonrası Fab parçalarını saflaştırmak amacıyla protein G affinite kromatografisi kullanıldı. Saflaştırma esnasında sadece IgG'nin Fc fragmentlerinin protein G'ye bağlanacağı Fab kısmının ise yükleme sonrası kolondan geçip toplanabileceği düşünülmüştü. Ancak saflaştırma sonrası toplanan piklerin SDS-PAGE'de analizinde Şekil 9'daki 10.sırada görüldüğü gibi, protein G'ye bağlanmadan çıkan kısımda Fab alanına karşılık gelen bölgede beklenen protein bandı

saptanamadı. Protein G'ye bağlanan ve bağlanmayan fraksiyonların antijene karşı özgüllükleri ELISA çalışması ile değerlendirildi. Çalışma sonucunda protein G'ye bağlanan fraksiyonda antijene özgül Fab parçalarının olduğu, protein G'ye bağlanmadan çıkan fraksiyonda ise Fab parçalarının bulunmadığı saptandı (Şekil 10). Bu sonucun şekil 9'daki 10. ve 11. sıralarda elde edilen SDS-PAGE verileri ile uyumlu olduğu saptandı.

Aşılama sonuçları değerlendirilirken Fab parçaları ile özgül epitoplara kapatılarak ve kapatılmadan özgül IgG yanıtı düzeyi Fc spesifik konjugat kullanılarak ölçülmüştür. Bu nedenle ilk olarak kurulacak olan ELISA sisteminde katı fazdaki hIFN γ yüzeyindeki epitopların özgül Fab parçası ile kapatılması için gerekli olan Fab parçasının Fc spesifik konjugat ile verdiği reaksiyon düzeyi saptandı. Boehringer kaynaklı hIFN γ ile kaplanmış plakda Fab parçasının Fc spesifik konjugat ile önemli düzeyde bir etkileşime girmediği saptandı (Şekil 11A). Aşılama sonuçlarının değerlendirildiği ELISA plağında katı fazdaki hIFN γ 'nın Fab parçası ile ön enkübsayonu sonucunda hIFN γ yüzeyindeki epitopların etkin bir şekilde kapatılabilmesi için kullanılacak Fab'ın sulandırım oranının 1/50 olmasına karar verildi.

In vitro ve *in vivo* deney modellerinde immün kompleksin immün yanıtı etkisi çoğunlukla benzer yöntemlerle ölçülmektedir. Bir kontrol grubunun ve bir de deney grubunun bulunduğu deney setinde kontrol grubu sadece antijen ile aşılanırken deney grubu kontrol grubu ile aynı dozda antijen ve özgül antikor ile aşılanır. Deney hayvanlarındaki aktif immün yanıt serumda özgül antikor düzeyinin ölçülmesiyle veya özgül antikor üreten hücrelerin sayısı olarak ölçülür. Bu çalışmada da aşılama sonrası deney hayvanlarında toplam antikor yanıtı ve özgül IgG yanıtı ELISA yöntemiyle ölçüldü. Herbir gruptaki deney hayvanına ait plazma antikor düzeyleri karşılaştırıldı. Ölçümler sonrası IgG-Ag grubu, Fab-Ag ve Ag gruplarındaki herbir deneğin 1/5000 dilüsyondaki OD değerlerinin ortalamaları alınarak sonuçlar karşılaştırıldı.

Herbir gruptaki toplam özgül antikor yanıtını ölçmek için ELISA çalışmasında tüm fare immünoglobulin izotiplerine bağlanabilen Fab spesifik konjugat kullanıldı. Bu sayede, plazmalardaki özgül IgG ve IgM izotipindeki antikor yanıtı düzeyi saptanmıştır. ‘Antijen’ ve ‘Antijen+Fab’ gruplarındaki toplam özgül antikor yanıtı düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$) (Şekil 12). ‘Antijen’ grubu ile ‘Antijen+IgG’ grubunun toplam antikor yanıtı düzeyleri karşılaştırıldığında ‘Antijen+IgG’ grubunun antikor yanıtında en az %75 oranında baskılama olduğu gözlemlendi (Şekil 12).

Özgül IgG yanıtı düzeylerinin ölçüldüğü ELISA çalışmasında herbir gruptaki deneklerin OD değerleri ile aynı grupta zeminin Fab ile kapatılması sonrası elde edilen OD değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0.05$). “Antijen+IgG” karışımı ile aşılama yapılan grubun plazma antikor düzeyi “antijen” ve “antijen+Fab” grubuna ait antikor düzeylerinden anlamlı düzeyde (antijen grubu ile karşılaştırıldığında $p=0.00151$, “antijen+Fab” grubu ile karşılaştırıldığında $p=0.00517$) düşük bulundu (Şekil 14). Ayrıca, “Ag+IgG” karışımı ile aşılama yapılan grubun Fab ile ön enkübasyon yapılmış çukurlardaki plazma antikor düzeyi aynı çukurlarda “antijen” ve “antijen+Fab” grubuna ait antikor düzeylerinden anlamlı düzeyde (antijen grubu ile karşılaştırıldığında $p=0.00126$, “antijen+Fab” grubu ile karşılaştırıldığında $p=0.00415$) düşük bulundu (Tablo 18,19,20). “Antijen+IgG” ve “Antijen” ile aşılama yapılan grupların 1/5000 sulandırımında plazma antikor düzeyleri karşılaştırıldığında “antijen+IgG” ile aşılama yapılan grubun özgül IgG yanıtının yaklaşık %85 oranında baskılandığı, ‘X’ epitopu dışında farklı epitoplara özgül IgG yanıtının ise yaklaşık %90 oranında baskılandığı saptandı (Tablo 18,20). Bu sonuca göre, epitop maskelenmesi için “Antijen+IgG” karışımı kullanıldığında ‘X’ epitopu yanında antijen üzerindeki diğer epitoplara karşıda antikor yanıtı baskılanmıştır. Buna karşın “antijen+Fab” karışımı ile aşılama yapılan grubun plazma antikor düzeyi “antijen” ile aşılama yapılan grubun

antikor düzeyleri ile karşılaştırıldığında her iki grubun OD değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanamadı ($p>0.05$) (Şekil 14). “Antijen+Fab” karışımı ile aşılama yapılan grubun özgül IgG yanıtı “antijen” ile aşılama yapılmış grubun antikor yanıtı ile karşılaştırıldığında “Antijen+Fab” grubunun özgül IgG yanıtındaki %15-20’lik azalmanın nedeni genel antikor havuzunda ‘X’(Fab fragmanının kapattığı epitop) epitopuna özgül antikor oluşmamasından kaynaklandığı düşünülebilir (Şekil 14). “Antijen”, “Antijen+IgG” ve “PBS” ile aşılama yapılan grupların, ELISA plağında Fab ile ön enkübasyonu yapılmış çukurlardaki OD değerleri PBS ile ön enkübasyon yapılmış çukurlardaki OD değerlerine göre biraz daha yüksek bulunmuş olması Fab aracılı zemin kirlilik düzeyinin eklenmesinden kaynaklanmış olabileceği düşünüldü

Bu çalışmada elde edilen veriler, bir antijen üzerinde başka bir epitopa yönelik antikor yanıtı oluşturmak istenildiğinde ve bu amaçla epitop maskelenmesi yöntemi tercih edildiğinde Ag-Ig yerine Ag-Fab kompleksi kullanılmasının daha etkin olacağını göstermektedir.

SONUÇ

Literatürlerde farklı epitoplara özgül mAb salgılayan hibridoma elde edilebilmesi için belirli bir epitopun özgül antikoru ile kapatılarak (maskelenerek) yapılan aşılamanın etkili olacağı belirtilmektedir. Ancak maskeleyme işleminde IgG izotipindeki özgül antikorun kullanılması durumunda, aşılama için kullanılan antijen – immünoglobulin G (IgG) kompleksinin eş zamanlı olarak B-lenfosit reseptörüne (antijen aracılığı ile) ve B lenfosit Fc γ reseptörüne (Fc γ RIIB) (antijene bağlı IgG'nin Fc aracılığı ile) bağlanması B-lenfosit uyarımının Fc γ RIIB aracılığı ile engellenmesine neden olacaktır. Bir kısım araştırmacıya göre ise uyarımın engellenmesinde Fc γ RIIB'nin etkili olmadığı IgG'nin yapısından dolayı epitopların bloke edilerek B lenfositlerinden gizlendiği belirtilmektedir. Bu çalışmada, her iki yaklaşım göz önünde bulundurularak antikor yanıtının farklı epitoplara yönlendirilmesinde “Antijen” ve “Antijen-IgG” veya “Antijen+Fab” karışımları ile yapılan aşılama yöntemlerinin etkinlikleri karşılaştırıldı.

Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre epitop maskelenmesi amacıyla “IFN γ +IgG” karışımı kullanıldığında ‘X’(IgG'nin bağlandığı epitop) epitopu yanında antijen üzerindeki diğer epitoplara özgül antikor yanıtı engellenmektedir. Bu da epitop maskelenmesi için literatürlerde önerildiği gibi IgG kullanılırsa beklenilenin tersine antikor yanıtının düştüğünü göstermektedir. Ancak epitop maskelenmesi amacıyla IgG yerine IgG'nin Fab parçası kullanılarak “IFN γ +Fab” karışımı ile yapılan aşılama sonucunda antikor yanıtında anlamlı bir azalma olmamaktadır. Her ne kadar “IFN γ ” ile aşılama yapılan gruba göre antikor düzeyinde bir miktar azalma olsa da bunun nedeninin genel antikor havuzunda Fab parçası ile maskelenmiş epitopa özgül antikor oluşmamasından kaynaklandığı düşünülebilir.

Dolayısıyla çalışmanın amacı ve sonuçları doğrultusunda bir antijen üzerindeki farklı epitopa karşı mAb elde etmek amacıyla yapılacak epitop maskelenmesinde IgG kullanılması teorik beklentinin tersine antikor yanıtını baskılayıcı

sonuçların oluşmasına neden olurken, Fab parçasının kullanılması antikor yanıtında anlamlı bir azalmaya neden olmamaktadır. Bu nedenle, yüzeyinde benzer epitoplardan birden fazla içermeyen multivalan nitelikteki antijenlerin farklı epitoplarına özgül antikor yanıtının oluşturulabilmesi için aşılamalarda “antijen+IgG” kompleksi yerine “antijen+Fab” kompleksinin kullanılması yararlı olacaktır.



KAYNAKLAR

1. Kuby J : B Cell Maturation, activation and differantiation in immunology,195-222, 3th Edition, W.H. Freeman and Company; New York, (1997).
2. De Franco L. Anthony : B-Lymphocyte activation in “ Fundamental Immunology “ (Paul E.W. , ed.) 225-261, 4th Edition, New York, Lippincott-Raven, (1998).
3. Kohler G, Milstein C : Continous cultures of fused cells secreting antibody of predifined specificity. Nature, 256, 95-97, (1975).
4. Llewelyn MB., Hawkins RE., Russell Sj. : Monoclonal antibodies in medicine: discovery of antibodies. BMJ; 305, 1269-1272, (1998).
5. Golumbeski G., Diamond R. The use of tolerazation in the production of monoclonal antibodies against minor antigenic determinants. Analytical Biochemistry, 154, 373-381, (1986).
6. Benkirane M., Bon D., Cordeil M., Delori P., Delaage M. Immunization with immune complexes: Characterization of monoclonal antibodies against a TSH-antibody complex. Molecular Immunology, 24, 1309-15, (1987).
7. Buige P., Iscaki S., Pillot J. Immune complexes as immunizing agents to increase the number of monoclonal antibody producing hybrids and to deviate the response to poorly immunogenic epitopes. Hybridoma, 9, 519-526, (1990).
8. Baumgarten H. Modulating the immune response by masking especially immunogenic epitopes with antibodies. In “ Monoclonal Antibodies “, (Peters JH, Baumgarten H. ed.), 68-69, Springer-Verlag, (1992).
9. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Jordan S. Puber, Antigen Recognition and lymphocyte activation . In “ Cellular and Molecular Immunology “, 3rd Edition, 38-65.W.B.Saunders Company, New York, (1997).
10. Reth M. Antigen receptor tail clue. Nature, 338, 383-384, (1989).

11. Reth M. Antigen receptors on B-lymphocytes. *Ann. Rev. Immunology*, 10, 97-98, (1992).
12. Kurosaki T. Molecular mechanisms in B cell antigen receptor signalling. *Current Opinion in Immunology*, 9, 309-318, (1997).
13. Mond JJ., Lees A., Snapper C. T cell independent antigens type 2. *Ann.Rev. Immunol.* , 13, 655-692, (1995).
14. Noelle RJ., Snow EC. Cognate interactions between helper T cells and B cells. *Immunol Today*, 11, 361-368, (1990).
15. Nossal GJV. Cellular and molecular mechanisms of B lymphocyte tolerance. *Advances in Immunology*, 52, 283-331, (1992).
16. June CH., Blustone JA, Nadler LM, Thompson CB. The B7 and CD28 receptor families. *Immunology Today*, 15, 321-331, (1994).
17. Leibson HJ, Geftner M, Zlotnik A, Marrock P, Kappler JW. Role of interferon in antibody response. *Nature*, 309, 799-801, (1984).
18. Aral K, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines : Coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann. Rev. Biochemistry*, 59, 783-836, (1990).
19. Pene J, Rousset F, Briere F. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons γ and α and prostoglandin E2. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.*, 85,6880-6884, (1988).
20. Kelso A. Th1 and Th2 subsets: paradigms lost?. *Immunology Today*, 16, 374-379, (1995).
21. Finkelman FD, Holmes J, Katona Im. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Ann. Rev. Immunol.*, 8, 303-333, (1990).
22. Heyman B. Antibody feedback suppression : towards a unifying concept ?, *Immunology Letters*, 68, 41-45, (1999).

23. Henry C., Jerne N. J. Competition of 19S and 7S antigen receptors in the regulation of the primary immune response . *Exp. Med.*, 128, 133-152, (1968).
24. Yu P., Kosco-Vilbois M, Richards M, Kohler G, Lamers MC., Negative feedback regulation of IgE synthesis by murine CD23. *Nature*, 369, 753-756, (1994).
25. Kehry MR, Yamashita LC. Low-affinity receptor (CD23) function on mouse B cells: role in IgE-dependent antigen focusing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 7556-7560, (1989).
26. Gustavsson S, Hjultrom S., Liu T, Heyman B. CD23/IgE mediated regulation of the specific antibody response in vivo. *J.Immunol.*, 152, 4793-800, (1994).
27. Heyman B, Pilstrom L, Shullman MJ. Complement activation is required for IgM-mediated enhancement of the antibody response. *J. Exp. Med.*, 167, 1999-2004, (1988).
28. Heyman B, Wiersma EJ, Kinoshito T. In vivo inhibition of the antibody response by a complement receptor specific monoclonal antibody. 172, 665-68, (1990).
29. Klaus GGB. Generation of memory cells.III. Antibody class requirements for the generation of B-memory cells by antigen-antibody complexes. *Immunology*, 37, 345-351, (1979).
30. Wiersma EJ, Nose M, Heyman B. Evidence of IgG mediated enhancement of the antibody response in vivo without complement activation via the classical pathway.*Eur. J. Immunol.* 20, 2585-2589, (1990).
31. Heyman B, Wigzell H. Specific IgM enhances and IgG inhibits the induction of immunological memory in mice . *Scand. J. Immunol.* 21,255-266, (1985).
32. Warren J. Leonard. " Type 1 cytokines and interferons and their receptors "in *Fundamental Immunology* (William E. Paul, ed.) 754-774, 4th Edition, New York, Lippincott-Raven, (1998).

33. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Jordan S. Pober, Cytokines . in “ Cellular and Molecular Immunology “, 3rd Edition, 250-270.W.B.Saunders Company, New York, (1997).
34. Ealick S, Cook W, Vijay-Kumar S, Carson M, Trotta P, Bugg C. Three dimensional structure of recombinant human interferon γ . Science, 252, 698-702, (1991).
35. Yuan BJ, Fang YQ, Liu JP, Lu GC, Yang YM, Zhou GX, Toxicity of human recombinant interferon-gamma in rats and dogs. Zhongguo Yao Li Xue Bao. 16, 308-10, (1995).
36. Ichimori Y, Suzuki N, Kitada C, Tsukamoto K. Monoclonal antibodies to human interferon-gamma.II: Antibodies with neutralizing activity. Hybridoma, 6, 173-181, (1987).
37. Liang CM, Herren S, Sand A, Jost T. Study of antigenic epitopes recognized by monoclonal antibodies to recombinant interferon-gamma. Biochem. Biophys. Res. Commun., 128, 171-8, (1985).
38. Aybay C., İmir T., Kayhan B. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of human albumin in the nanogram range. Gazi Medical Journal. 10, 63-67, (1999).
39. Aybay C. Production and purification of monoclonal antibodies to human IL-2 and their use in immunoaffinity purification of recombinant human IL-2. Turkish J.Medical Sciences. (Gönderildi)
40. Aybay C. Production of anti-human interferon gamma monoclonal antibodies. Gazi Medical Journal, 11, 107-114, (2000).
41. Baumgarten H, Peters J. : Production of monoclonal antibodies in the peritoneal cavity of the mouse in “ Monoclonal Antibodies “ (Peters J, Baumgarten H. ed.) 225-33, Springer-Verlag, Berlin (1992).

42. Oppermann M. Purifying Monoclonal antibodies and producing antibody fragments. In "Monoclonal Antibodies" (Peters J, Baumgarten H. Ed.)258-274, Springer-Verlag, Berlin, (1992).
43. Harlow Ed, Lane D. Protein quantitation-UV detection in " Antibodies A Laboratory Manual " (Harlow Ed., Lane David , ed.) Cold Spring Harbor Laboratory, , New York, 673-674. (1988).
44. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. Purification and fragmentation of antibodies. In : Current Protocols in Immunology, New York. John Wiley and Sons, 2.8.1-2.8.7, (1994).
45. Zierz R. Producing immunoreactive fragments from mouse monoclonal antibodies in " Monoclonal Antibodies " (Peters JH, Baumgarten H., editors) Springer Laboratory, Berlin, 275-284, (1992).
46. Adamczyk M, Gebler J, Wu J. Papain digestion of different mouse IgG subclasses as studied by electrospray mass spectrometry. J. Immunol. Methods, 237, 95-104, (2000).
47. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. Electrophoretic separation of proteins. In : Current Protocols in Immunology, New York. John Wiley and Sons, 8.4.1-8.9.8, (1994).
48. Erntell M., Myhre EB., Sjobring U., Bjorck L. Streptococcal protein G has affinity for both Fab and Fc fragments of human IgG. Molecular Immunology.25, 121-126, (1988).
49. Kato K, Lian LY, Barsukov IL, Derrick JP, Kim H, Tanaka R, Yoshino A, Shirishi M, Shimada I, Arata Y. Model for the complex between protein G and an antibody Fab fragment in solution. Structure, 3, 79-85 (1995).

50. Derrick JP, Wigley DB. The third IgG-binding domain from streptococcal protein G: An analysis by X-ray crystallography of the structure alone and in a complex with Fab. *J.Mol.Biol.*, 243, 906-918 (1994).
51. Derick JP, Wigley DB. Crystal structure of a streptococcal protein G domain bound to an Fab fragment. *Nature*, 359, 752-754, (1992).
52. Woolson R. : Statistical methods for the analysis of biomedical data, 2nd Ed., John Willey&Sons, New York, U.S.A.
53. Heyman B. Complement and Fc receptors in regulation of the antibody response. *Immunology Letters*, 54, 195-199, (1996).
54. Roitt I, Brostoff J, Male D. Regulation of the immune response. In. “ Immunology “ Fourth ed. Mosby, London, (1998)
55. Beckerman KP. Reproduction and the immune system. In. “Medical Immunology” (Stites DP, Terr AI, Parslow TG. Ed.) Ninth Ed.Appleton&Lange, Connecticut, (1997)
56. Karlsson MC, Wernerson S, Diaz de Stahl T, Gustavsson S, Heyman B. Efficient IgG-mediated suppression of primary antibody responses in Fc γ receptor-deficient mice.*Eur. J. Immunol.* , 96, 2244-2249, (1999).
57. Heyman B. Fc dependent IgG mediated suppression of the antibody response : Fact or Artefact ? *Scand. J. Immunol.* 31, 601-607, (1990).
58. Möller G. Antibody-mediated suppression of the immune response is determinant specific. *Eur.J.Immunol.* 15, 409-412, (1985).
59. Heyman B, Nose M, Weigle WO. Carbohydrate chains on IgG2b: A requirement for efficient immunosuppression. *J. Immunology.* 134, 4018-23, (1985).
60. Heyman B, Wigzell H. Immunoregulation by monoclonal sheep erythrocyte-specific antibodies: suppression is correlated to level of antigen binding not to isotype. *J. Immunology*, 132, 1136-43, (1984).

61. Dresser DW. Feedback by early and late primary antisera on the primary and secondary adoptive immune responses of mice to burro erythrocytes. *Cell. Immunology*. 127, 405-19, (1990).
62. Quintana I, Silveria A, Möller G. Regulation of the antibody response to sheep erythrocytes by monoclonal IgG antibodies. *Eur. J. Immunology*, 17, 1343-1349, (1987).



ÖZGEÇMİŞ

1973 Ankara doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi T.E.D. Ankara Kolejinde tamamladım. Yüksek öğrenimime 1991 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümünde başladım ve 1995 yılında mezun oldum. Lisans üstü öğrenimime 1995 yılında Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı İmmünoloji Bilim Dalında Master programı ile başladım. Master öğrenimimi 1998 yılında tamamladıktan sonra aynı yıl içerisinde Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı İmmünoloji Bilim Dalında İmmünoloji Doktora programına başladım. 2000 yılında Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı İmmünoloji Bilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım. Yabancı dil olarak iyi derecede İngilizce bilmekteyim.