


T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

# İNSAN İMMUNOGLOBULİN G1 BAĞLAYAN MİKROORGANİZMALARIN SAPTANMASI İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

OLKAR ABDULMAJED

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ARALIK 2018


GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

# İNSAN İMMUNOGLOBULİN G1 BAĞLAYAN MİKROORGANİZMALARIN SAPTANMASI İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

**Olkar ABDULMAJED**

**DOKTORA TEZİ**
**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ**
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ARALIK 2018**

Olkar Abdulmajed tarafından hazırlanan İNSAN İMMUNOGLOBULİN G1 BAĞLAYAN MİKROORGANİZMALARIN SAPTANMASI İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / [redacted] ile Gazi Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Prof. Dr. Kayhan Çağlar
Tıbbi Mikrobiyoloji, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/[redacted]

**Başkan :** Prof. Dr. Kayhan Çağlar
Tıbbi Mikrobiyoloji, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/[redacted]

**Üye :** Prof. Dr. Gülendam Bozdayı
Tıbbi Mikrobiyoloji, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/[redacted]

**Üye :** Prof. Dr. Aydın Kararaslan
Tıbbi Mikrobiyoloji, Ankara Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/[redacted]

**Üye :** Prof. Dr. Funda Dğruman Al
Tıbbi Mikrobiyoloji, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/[redacted]

**Üye :** Prof. Dr. Teoman Zafer Apan
Tıbbi Mikrobiyoloji, Kırıkkale Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/[redacted]

Tez Savunma Tarihi: 25/12/2018

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

# ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Olkar Abdulmajed
25.12.2018

# İNSAN İMMUNOGLOBULİN G1 BAĞLAYAN MİKROORGANİZMALARIN SAPTANMASI İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

(Doktora Tezi)

Olkar ABDULMAJED

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Aralık 2018

## ÖZET

Bazı bakterilerin yüzeyinde insan ve diğer memeli organizmalardaki antikorlara ve bazı proteinlere bağlanma özelliğine sahip olan protein yapısında moleküller bulunmaktadır. Şu ana kadar bu moleküller az sayıdaki bakteri türünde saptanmıştır. Stafilokoklardaki protein A molekülü, streptokoklardaki protein G molekülü ve peptostreptokoklardaki L proteini bu moleküllere örnektir. Bu proteinlerin farklı organizmalardaki ve insanlardaki antikor sınıf ve alt sınıflarını bağlama özellikleri, eğilimleri, güçleri ve antikorları bağladıkları bölgeler farklılık göstermektedir. Antikor bağlayan proteinlerin bu özelliklerinden faydalanılarak bu moleküller biyoteknoloji alanında monoklonal antikorların elde edilmesinde ve özelliklerinin incelenmesinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada, mikroorganizmaların yüzeyinde bulunan immunoglobulin bağlayan proteinlerin saptanmasına yönelik orijinal ve pratik bir tarama testinin geliştirilmesi amaçlandı. Son yıllarda insanlarda monoklonal antikorların ilaç olarak sık bir şekilde kullanılmasına bağlı olarak, bu ilaçların vücuttaki metabolizmasını belirlemek için ilaç-anti ilaç ELISA sistemleri (idiyotipik-anti idiyotipik antikor ELISA sistemleri) tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bizde çalışmamızda yöntem olarak, immunoglobulin bağlayan protein taşıyan mikroorganizmaları saptamak için, bu amaca yönelik şimdiye kadar literatürde tanımlananlardan farklı "anti-idiopatik antikor (AİA) tabanlı" bir ELISA ölçüm sistemi geliştirdik. Çalışmamızdaki test antikoru, anti-idiotipik antikor tabanlı ölçüm sistemindeki idiotipik antikordur. Test antikoru olarak kullanılan bu idiotipik antikor, rekombinant insan immunoglobulin G1 kappa (IgG1κ) yapısında ve Tocilizumab (Actemra®) isimli tedavi amaçlı kullanılmakta olan bir ilaçtır. Bu amaçla ELISA plakları anti-idiotipik antikor (anti-Tocilizumab) ile kaplandı. Çalışmamızda mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş ve tiplendirilmiş olan çeşitli bakteri ve mantar izolatları kullanıldı. Mikroorganizmalar çalışma gününe kadar -30ºC'de saklandı. Çalışma günü mikroorganizmaların canlandırılmasını takiben, besiyerinden alınan mikroorganizma, içinde sabit miktarda test antikoru bulunan solüsyona aktarıldı ve kısa bir inkübasyon sonrası santrifüj edilerek üst sıvıda kalan test antikorunun miktarı "anti-idiopatik antikor tabanlı ELISA" ile ölçüldü. ELISA kuyucuklarına eklenen örnek içerisinde eğer özgül olduğu idiotipik antikor (test antikoru) var ise, zemindeki anti-idiotipik antikor bunu spesifik olarak bağlayacaktır. Bu bağlama ortamdaki test antikor miktarı ile doğru orantılı olacak ve bağlanmış olanlar yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaşmayacaktır. Zemindeki anti-idiopatik antikor aracılığı ile bağlanmış olan test antikoru, ortama eklenen enzim ile işaretli anti-idiopatik antikor'a da bağlanacaktır; çünkü test antikorumuz insan IgG1 olup, spesifik bağlanmadan sorumlu özdeş iki adet Fab ucu bulunmaktadır. Dolayısıyla, ortamda test antikoru var ise miktarıyla orantılı olarak köprü bağlanması yapacak, o ölçüde renklenmeye neden olacak ve nicel (kantitatif) bir ölçüm sistemi oluşturacaktır. Bu çalışma sonunda, mikroorganizmalarda antikor bağlayan proteinlerin varlığını göstermek için orijinal, hızlı ve pratik bir yöntem geliştirildi.

Bilim Kodu : 1039
Anahtar Kelimeler : Antikor bağlayan proteinler, ELISA, terapötik antikor
Sayfa Adedi : 97
Danışman : Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR

# ESTABLİSHMENT OF A METHOD TO DETECT HUMAN İMMUNOGLOBULİN G1 BİNDİNG MİCROORGANİSMS

(Ph. D. Thesis)

Olkar ABDULMAJED

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES
December 2018

## ABSTRACT

Immunoglobulin binding proteins are the molecules that may be found on the surface of some bacteria that have ability to bind antibodies and some proteins in human and other mammalian organisms. These kind of proteins have been identified in a small number of bacteria up to the present. Protein A molecule in staphylococci, protein G molecule in streptococci and protein L in peptostreptococci are examples of these molecules. Binding specifities of these proteins to antibody classes and subclasses in human and different organisms, their afinity, strenght, and parts in the antibody molecule that they bind may show differences. Immunoglobulin binding molecules have been extensively used to obtain and purify monoclonal antibodies in the area of biotechnology. In this study, it is aimed to develop an original and practical screening method for the detection of immunoglobulin binding proteins on the surface of bacteria. Due to common usage of therapeutic antibodies in humans in recent years, drug-anti drug ELISA methods (idiotypic-anti idiotypic antibody ELISA) have also been widely used worldwide to determine the metabolism of these drugs. In this study, we developed an original and rapid idiotypic-anti idiotypic ELISA method, different from the techniques defined in the literature for this purpose so far, to detect immunoglobulin binding proteins on the surface of bacteria. The test antibody used in our study to detect immunoglobulin binding proteins was the idiotypic antibody in our idiotypic-anti idiotypic ELISA measurement system. This idiopathic antibody is a recombinant human immunoglobulin G1 Kappa (IgG1κ) molecule, and has been used as a drug, Tocilizumab (Actemra®), in humans for theurapotic purposes. ELISA microplates were covered with anti-idiotypic antibodies (anti-Tocilizumab). Bacterial and fungal isolates which were isolated and identified from different clinical specimens submitted to our clinical microbiology laboratory were used in the experiments. Microorganisms were maintained at -30ºC until the study day. Frozen isolates were transferred to the appropriate growth media on the study day. After an overnight incubation they were subcultered again and used in the screeening experiments. Isolates were transferred to the tubes containing a fixed concentration of the test antibody. After a short incubation period (30 min), tubes were centrifuged and supernatants were measured for the presence of test antibody with our idiotypic-anti idiotypic ELISA system. If the samples added to the ELISA wells contain the test antibody, this idiotypic antibody will then bind specifically to the anti-idiotypic antibody in the solid phase. This binding will directly be proportional to the amount of the test antibody in the supernatant and bound antibodies will not be washed away from the wells during the washing of the ELISA plates. The bound test antibody will also bind to the anti-idiotypic antibody conjugate labelled with an enzyme since our test antibody has two identical Fabs responsible for specific antigen binding. Therefore, if the test antibody is present in the supernatant, it will cause a bridging directly proportional to its quantity and a color development will be seen forming a quantitative measurement system. At the end of this study, a fast, original and practical method was developed in the detection of the immunoglobulin binding proteins on the surface of bacteria.

Science Code : 1039
Key Words : Antibody-binding protein, ELISA, therapeutic antibody
Page Number : 97
Advisor : Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR

# TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca öğrenimime katkıda bulunan ve tez çalışmamı yöneten, her aşamasında yol gösteren yakın desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR'a, doktora eğitimime başlamamda büyük emeği olan, bigi ve teşvikleriyle her zaman yanımda olan değerli hocam Prof. Dr. Nedim SULTAN'a, üzerimde büyük emeği olanTıbbi Mikrobiyoloji A.D. öğretim üyeleri Prof. Dr. Semra KUŞTİMUR'a, Prof. Dr. Seyyal ROTA'ya, Prof. Dr. Meltem YALINAY'a, Prof. Dr. Ayşe KALKANCI'ya, Prof. Dr.Gülendam BOZDAYI'ya, Prof. Dr. Işıl FİDAN'a, Prof. Dr. Funda DOĞRUMAN AL'a, çok teşekkür ederim.

Ayrıca eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili arkadaşlarım Dr. Ayça Ünal, Biyolog Özge Karabulut, Dr. Gamze Gizem Duman, Dr. Zeynep Koç Kuralay,Dr.Tuğba Cuhadar, Dr. Hande Durak, Dr. Sidre Erganiş, Dr. Hatice Kuralay Erdem, doktora öğrencisi Shakhnoza Sarzhanova ve özellikle tez çalışmamda çok yardımcı olan doktora öğrencisi Fakhriddin Sarzhanov'a çok teşekkür ederim

Ayrıca Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında tanıma şansı bulduğum ve beraber çalıştığım başta Biyolog Kenan Yüce Ve Biyolog Emine Esmer olmak üzere herkese teşekkürlerimi sunarım.

Beni büyütüp yetiştiren her zaman bana destek olan,bu günlere gelmemde çok emek vermis olan başta annem ve babam olmak üzere dost ve arkadaş bildiğim sevgili abimlere sonsuz teşekkür ediyorum.

# İÇİNDEKİLER

**Sayfa**

ETİK BEYAN ..... iii

ÖZET ..... i

TEŞEKKÜR ..... iii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ ..... vii

ŞEKİLLERİN LİSTESİ ..... viii

RESİMLERİN LİSTESİ ..... x

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... xi

1. GİRİŞ ..... 1

2. GENEL BİLGİLER ..... 7

2.1. Tarihçe ..... 7

2.2. Antikorlar ..... 8

2.2.1. Tanım ..... 8

2.2.2. Antikorların yapısı ..... 10

2.2.3. Domainler ..... 11

2.2.4. Monoklonal antikorlar ..... 11

2.2.5. İmmünotoksinler ..... 11

2.2.6. Antikorların Özellikleri ..... 12

2.3. Antijenler ..... 18

2.4. Bakteriyel İmmünoglobulin Bağlayan Proteinler ..... 18

2.4.1. Gram pozitif bakterilerin IBP'leri ..... 19

2.4.2. Gram negatif bakterilerin IgBP'leri ..... 29

2.5. Paraziter İmmünglobulin Bağlayan Proteinler ..... 32

3. GEREÇ VE YÖNTEM ..... 35

3.1. Malzemeler ..... 35

3.1.1. Kimyasal malzemeler ..... 35

**Sayfa**

3.1.2. Besiyerleri ve standart bakteri suşu ..... 35

3.1.3. Hazirlanan tamponlar ve solusyonlar..... 35

3.1.4. ELISA plaklari..... 37

3.1.5. Cihazlar..... 37

3.1.6. Antikorlar..... 37

3.2. Bakterilerin Eldesi ve Tiplendirmesi..... 39

3.2.1. Bakterilerin saklanmasi..... 39

3.2.2. Bakterilerin çalişma şartlarina hazirlanmasi..... 39

3.3. Anti-İdiotipik Antikor (AIA) Tabanli Elisa Sistemi ..... 39

3.3.1. AİA kapli ELISA plak hazirlanmasi..... 40

3.3.2. AİA tabanli ELISA çalışma basamaklari ve değişkenlerin belirlenmesi ..... 41

3.4. ELISA Sisteminde Test Antikorun Çalışma Konsantrasyonunun Belirlenmesi..... 42

3.5. Bakteri Miktarinin ve İnkübasyon Süresinin Tarama Sistemine Etkisi ..... 44

3.6. Farkli Bir Besiyeri Olarak Mueller-Hinton Agarda Üretilen Bakteri Miktarinin Tarama Sistemine Etkisi..... 46

3.7. Kanli Agar ve Mueller-Hinton Besiyerlerinin IgBP Ekspresyonu Üzerine Potansiyel Etkisi..... 47

3.8. Toplanan Mikroorganizmalarin IgBP Taşiyip Taşimadiğinin Saptanmasina Yönelik AIA Tabanli ELISA ile Taranmasi ..... 49

4. BULGULAR..... 57

4.1. AİA Tabanli ELISA Sisteminde İdiotipik Antikorun Sabit Çalişma Konsantrasyonunun Belirlenmesi ..... 57

4.2. Kullanilacak Bakteri Miktari ve İnkübasyon Süresi ..... 58

4.3. Farkli Bir Besiyeri Olarak Mueller-Hinton Agarda Üretilen Bakteri Miktarinin Tarama Sistemine Etkisi..... 61

4.4. Kanli Agar ve Mueller-Hinton Besiyerlerinin IgBP Ekspresyonu Üzerine Potansiyel Etkisi..... 63

4.5. AIA Tabanli ELISA ile Mikroorganizmalarin Tarama Sonucu..... 66

**Sayfa**

5. TARTIŞMA .....73

6. SONUÇ VE ÖNERILER .....85

KAYNAKLAR .....87

ÖZGEÇMİŞ……..93

# ÇİZELGELERİN LİSTESİ

**Çizelge** **Sayfa**

Çizelge 2.1. İnsan İmmunglobulinlerin Yapısal Özellikleri .....13

Çizelge 2.2. İnsan İmmunoglobulinlerin Fonksiyonel Özellikleri.....14

Çizelge 2.3. İnsan ve hayvan IgG bağlama özelliklerine dayalı olarak IGBP'lerin sınıflandırması.....19

Çizelge 2.4. Protein A-immoglobulin etkileşimi .....21

Çizelge 2.5. İyi çalışılmış bazı gram pozitif bakteriyel IGBP'lerin özellikleri .....22

Çizelge 2.6. Fonksiyonel tip II yaısında farklı IGBP'lerin IgG bağlama profilleri.....24

Çizelge 2.7. Antikor saflaştırmak için kullanılan IGBP'lerin bazı genel özellikleri. .....32

Çizelge 3.1. AİA tabanlı ELISA sistemi ile taranan mikroorganizmalar. .....51

# ŞEKİLLERİN LİSTESİ

**Şekil** **Sayfa**

Şekil 2.1. Antikorun Epitop/Antijen ile özgül etkileşimi (bağlanması) .....9

Şekil 2.2. İmmünoglobulinlerin (Ig) temel dört peptid yapısı, IgG paterni ile gösterilmiştir Üç ağır zincir sabit bölge domainleri (CH1, CH2, CH3) ve bir hafif zincir sabit bölgesi koyu mavi ile gösterilimiştir. Hafif ve ağır zincirlerin her ikisinin değişken bölgeleri (VL ve Vh, sırası ile turuncu) özgül epitop bağlanma bölgesini oluşturur önemli birkaç disülfit bağı(-ss-) gösterilmiştir. CHO karbonhidrat bağlı olduğu yeri göstermektedir .....10

Şekil 2.3. Pepsin ve papain ile immünoglobülin G'nin enzimatik parçalanması. (A) papainin ayrılması, disülfid bağları (-ss-)ile iki tane bağlı olmayan antijen baglama parçaları(Fab) ve kristalize edilebilen parçalar (Fc) oluşması ile sonuçlanır , parçalar univalan olduğu için antijenleri presipite ve aglütine edemez.(B) Pepsin ayrılması F(ab') 2olarak bağlanmış iki Fab parçaları ile disülfit bağlarının tutulmasıyle sonuçlanır. Fc kısmı sırası ile p CH1, CH2, CH3 ve bir hafif zincir sabit domaini CL (mavi), ağır zincir sabit bölge domainleri: VL, VH (turuncu), ağır ve hafif zincirlerin değişken bölgesine indirgenir .....13

Şekil 2.4. İmmünoglobulin M pentameri .....15

Şekil 2.5. (A). İmmünoglobulin A dimeri (B)immünglobulin E dimeri .....16

Şekil 2.6. Staphylococcal protein A aracılı bakterinin immün sistemin salgısal (sol panel alt) ve hücresel (sol panel üstü; sağ panel ise normal yanıtı temsil etmekte) savunma mekanizmalarından kaçış mekanizmaları .....20

Şekil 2.7. Protein A taşıyan Staphylococcus aureus bakteri örneklemi üzerinden, bakteriyel IgBP'lerin antikor bağlamasıyla patojenisiteye katkısı arasındaki ilişki örneği .....20

Şekil 2.8. (A) Protein A Ig bağlayıcı 5 alt birimi. (B) C alt birimi. (C) Asimetrik B-B alt birimi .....22

Şekil 2.9. Bazı streptokokkal ve stafilokokal IGBP'lerin IgG ve IgA'nın Fc bölgelerinde bağlandığı yerler. IgG (A-C) ve IgA (D-F) ağır zincirlerin CH2 ve CH3 domainleri sırasıyla açık mavi ve koyu mavi olarak belirtilmiştir. Bağlanma bölgeleri açısından, A: S. equi fibrinojen bağlayan protein, B: streptokokkal protein G, C: stafilokokkal protein A, D: S. pyogenes kaynaklı Sir22, E: Grup B streptokokal kaynaklı β protein, F: S. aureus kaynaklı SSL7 protein .....27

Şekil 2.10. İmmunoglobulin molekülünde hem Fc hem Fab bölgelerine bağlanabilen bazı bakteriyel IGBP'ler .....28

**Şekil** **Sayfa**

Şekil 2.11. Anti-idiotipik antikor tabanlı ELISA sisteminin çalışma prensipleri. A: Antikorda idiotipik alanlar, B: Anti-idiotipik antikor oluşumu, C: Anti-idiotipik antikorlar ile idiotipik antikor bağlama/saptama yöntemi. .....33

Şekil 3.1. Anti-idiotipik antikor (AİA) tabanlı ELISA sisteminin çalışma prensibi. .....40

Şekil 3.2. İdiotipik test antikor çalışma konsantrasyonunun belirlenmesi.....43

Şekil 3.3. Bakteri miktarının ve inkübasyon süresinin belirlenmesine yönelik çalışma akış şeması.....45

Şekil 3.4. Bakteri miktarının belirlenmesine yönelik çalışma akış şeması.....47

Şekil 3.5. Besiyerinin IgBP ekspresyonu üzerine etkisinin araştırılmasına yönelik çalışma akış şeması .....48

Şekil 3.6. Birinci plakta bulunan mikroorganizmaların konfigürasyonu.....53

Şekil 3.7. İkinci plakta bulunan mikroorganizmaların konfigürasyonu .....53

Şekil 3.8. Üçüncü plakta bulunan mikroorganizmaların konfigürasyonu. .....54

Şekil 3.9. Dördüncü plakta bulunan mikroorganizmaların konfigürasyonu.....54

Şekil 3.10. Beşinci plakta bulunan mikroorganizmaların konfigürasyonu.....55

Şekil 4.1. Tarama sisteminin geliştirilmesi ve ölçümlerde kullanılmak üzere dinamik aralığın orta noktasına karşılık gelen idiotipik antikor miktarı.....58

Şekil 4.2. Bakteri (kanlı agarda üretilen) miktarı ve inkübasyon süresi sonuçları. .....60

Şekil 4.3. Mueller-Hinton agarda üretilen bakteri miktarı ile antikor bağlama düzeyi arasındaki ilişki. .....62

Şekil 4.4. Farklı besiyerlerinin (Mueller-Hinton agar ve Kanlı agar) S. aureus'un antikor bağlama özelliğine etkisi. A: Besiyerlerinden alınan bakterilerle doğrudan hazırlanan bakteri solusyonlarına ait veriler. B: Besiyerlerinden alınan bakterilerin yıkanmış halleri kullanılarak hazırlanan bakteri solüsyonlarına ait veriler.....65

Şekil 4.5. Bir no'lu AİA tabanlı ELISA plağı sonuç görüntüsü. .....67

Şekil 4.6. İki no'lu AİA tabanlı ELISA plağı sonuç görüntüsü.....68

Şekil 4.7. Üç no'lu AİA tabanlı ELISA plağı sonuç görüntüsü.....69

Şekil 4.8. Dört no'lu AİA tabanlı ELISA plağı sonuç görüntüsü .....70

Şekil 4.9. Beş no'lu AİA tabanlı ELISA plağı sonuç görüntüsü. .....71

# RESİMLERİN LİSTESİ

**Resim** **Sayfa**

Resim 3.1. Çalışmada kullanılan ana cihazların fotoğrafları. .....38

# SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

| **Simgeler** | **Açıklamalar** |
|---|---|
| **Da** | Molekül ağırlığı |
| **Kb** | Aafinite sabiti |
| **L** | Litre |
| **µL** | Mikrolitre |
| **mL** | Mililitre |
| **ng** | Nanogram |
| **µg** | Mikrogram |

| **Kısaltmalar** | **Açıklamalar** |
|---|---|
| **IgBP** | İmmünoglobulin binding proteinler |
| **BiP** | Binding immunoglobulin protein |
| **GRP** | Glukoz ile düzenlenen protein |
| **ELISA** | Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay |
| **IgG** | İmmünoglobulin G |
| **IgM** | İmmünoglobulin M |
| **IgA** | İmmünoglobulin A |
| **IgE** | İmmünoglobulin E |
| **IgD** | İmmünoglobulin D |
| **SpA** | *S.aureus* protein A |
| **SpG** | Streptokok protein G |
| **SpL** | Peptostreptokok protein L |
| **SSL** | Stafilokok süperantijen benzeri |
| **GAS** | Grup A streptokok |
| **BSA** | Bovine serum albumin |
| **TMB** | Tetramethylbenzidine |

| | |
|---|---|
| **PBS** | Phosphate buffered saline |
| **ET** | ELISA Tamponu |
| **DS** | Dilüsyon Solusyonu |
| **IA** | İdiotipik Antikor |
| **AIA** | Anti-idiotipik Antikor |
| **POD-AIA** | Peroksidaz enzim işaretli anti-idiotipik antikor |
| **OD** | Optik dansite |
| **MH** | Mueller-Hinton |
| **SDA** | Sabouraud dextrose agar |

# 1. GİRİŞ

İmmünoglobulinler, immünojenlere (antijenlere) cevap olarak özgül uyarım sonrasında B lenfositlerin farklılaşması ile oluşan plazma hücrelerinden salgılanan ve antikor olarak görev yapan glikoprotein yapısındaki moleküllerdir. İmmünoglobulinler spesifik olarak tek bir veya az sayıda yakın ilişkili antijenlere bağlanır. Aslında her bir monomerik immünoglobulin molekülü içerdiği özdeş iki adet Fab bölgelerinin uç kısımları ile spesifik bir antijenik bölgeye (epitope/antijenik determinant) bağlanır. Antikorlar tarafından antijen bağlama, antikorların primer fonksiyonudur ve konak savunmasına yarar. Bir antikorun valansı (birleşme değeri) her bir antikor molekülünün bağlayabileceğini antijenik determinantların sayısı ile belirlenir. Tüm antikorların valansı en az iki ve bazı durumlarda daha fazladır. Genellikle bir immünoglobulinin antijenle bağlanması direkt bir biyolojik etkiye neden olmaz. Aksine, biyolojik etkiler immünoglobulinin ikincil efektör, etkin fonksiyonlarının bir sonucudur. İmmünoglobulinler çeşitli efektör fonksiyonlara aracılık ederler. Genellikle belirli bir efektör fonksiyonu gerçekleştirmesi için antikorun antijenine önceden bağlanması gerekir. Ancak her immünoglobulin izotipi tüm efektör fonksiyonları yerine getiremez. İmmunoglobulinlerin iyi tanımlanmış olan efektör fonksiyonlarından bazıları kompleman fiksasyonu ve çeşitli hücrelere Fc reseptörü aracılığı ile bağlanmadır. Bunun sonucunda aşağıda belirtilen olaylar gerçekleşir [1-3].

- Kompleman fiksasyonu: Hücrelerin lizisiyle ve biyolojik aktif moleküllerin salınımıyla sonuçlanır.

- Çeşitli hücre membranlarında bulunan Fc reseptörlerine immunoglobulinlerin bağlanması: Fagositler, lenfositler, trombositler, mast hücreleri ve bazofiller immünglobulinlere bağlanabilecek reseptörlere sahiptir. Bu bağlanma hücrelerin bazı fonksiyonları yerine getirmesini indükler. Bazı immünoglobulinler ayrıca plasental trofoblastlardaki reseptörlere de bağlanarak immünglobulinlerin plasentadan fetusa transferine neden olur.

İmmunoglobulinlerin yukarıdaki efektör fonksiyonlarını molekül üzerinde bulunan değişik bağlanma bölgeleri aracılığı ile gerçekleşmektedir. İmmunoglobulinlerin primer etkilerinden sorumlu Fab aracılıkları ile antijenlerine özgül bağlanmaları ve efektör-biyolojik etkilerden sorumlu molekülün diğer bölgelerinden bağlanma özellikleri yanında bazı mikroorganizmalara ait yüzey proteinleri de immünoglobülinleri bağlayabilmektedir.

İmmunoglobulin bağlayan bakteriyel proteinler yaklaşık 50 yılı aşkın bir süredir incelenmekte olan bir konu olup, konunun önemi ile çeşitli araştırmalar ve kitap yayınlanmıştır [4-7].

İmmünoglobulin bağlayan proteinler (IgBP) genel bir tanımlamadır. Bu moleküller protein karakterinde olup, immunoglobulinlere bağlanabilen yapılardır. Bu nedenle, aşağıdaki yapıların tamamını genel anlamda tanımlamaktadır.

- Binding immunoglobulin protein: BiP, 78 kDa glukoz ile düzenlenen protein (GRP-78) veya ısı şok 70 kDa protein 5 olarak da bilinen bu protein insanda HSPA5 geni tarafından kodlanmaktadır. Bir tür şaperon molekül olan HSP70 endoplasmik retikulum lümeninde yerleşiktir ve yeni sentezlenen proteinlerin sitoplazmadan endoplazmik retikulum lümenine aktarılması sırasında bunlara bağlanarak bir sonraki aşamadaki katlanma ve oligomerizasyomlarında stabil tutar [8, 9].

- İmmunoglobulin-binding protein 1 (IgBP1): kandaki B hücrelerini bağlayan bir tür proteindir [10-12].

- Bakteriyel immunoglobulin bağlayan proteinler (Bakteriyel IgBP, BIgBP): Aşağıda prototipleri bulunan geniş bir protein grubunu içermektedir.

    Protein A: İlk olarak *Staphylococcus aureus* bakteri hücre duvarında tanımlanmış 42 kDa ağırlığında proteindir.

    Protein G: C ve G grubu streptokokların hücre yüzeyinde bulunmaktadır.

    Protein L: *Peptostreptococcus magnus* bakteri hücre yüzeyinden izole edilmiştir.

    Protein M: Grup A streptokok bakteri hücre yüzeyinde bulunmuştur.

Yukarıda bahsedilen nedenle, hem tezin ana araştırma konusunu göstermesi açısından hem mikroorganizmalarda bulunan ve immunoglobulinleri bağlanan yapıları ifade etmek için tezin bundan sonraki kısmında bakteriyel immunoglobulin bağlayan proteinler “bakteriyel IgBP” ya da kısaca “IgBP” olarak belirtilecektir.

Değişik memeli türlerine ait immunoglobulin G (IgG) moleküllerini non-immün bir şekilde bağlayan (immunoglobulinlerin antijene bağlanma bölgesinin dahil olmadığı bir bağlanma şekli) proteinler bakterilerde yaygın olarak bulunmaktadır. Bakteriyel IgBP’ler büyük bir

protein grubunu oluştururlar ve mikroorganizmalarda bulunduğu yer açısından, moleküler yapı ve ağırlık (ortalama 20-350 kDa) açısından, monomer veya oligomer olmaları açısından ve farklı türlere ait immunoglobulinlere bağlanma özellikleri açısından farklılıklar gösterirler. Bakteriyel IgBP'ler bakteri hücre yüzeyinde, kapsülde ve kültür vasat ortamında bulunabilmektedir [13-15]. Ayrıca immunoglobulinlerin izotiplerine karşı bağlanma özellikleri farklılık gösterebildiği gibi, immunoglobulin molekülü üzerinde bağlandıkları yer/bölge açısından da farklılık gösterebilmektedirler [16-19].

Bakteriyel IgBP'ler ortamdaki immunoglobulinleri non-immun şekilde bağlamak suretiyle bakterilerin patojenisitesinde önemli rol oynamaktadırlar. Bakteriyel IgBP'lerin bu şekildeki bağlanmaları bakterilerin kompleman etkisine karşı direnç artışına yol açmakta; opsonizasyon ve fagositozu azaltmak suretiyle konak savunmasına/koruyucu faktörlere karşı bir direnç oluşturmak suretiyle bakteri lehine avantaj sağlamaktadır. Böylece bakterinin konak immün sisteminden kaçışı için önemli bir faktör oluşturmaktadırlar [20, 21].

Bakteriyel IgBP'ler görece geniş bir bakteri grubunda saptanabilmektedir. Gram pozitif bakteriyel IgBP'ler insan ve hayvan IgG bağlama özelliklerine göre fonksiyonel olarak tiplendirilmişlerdir [22]. Gram pozitif bakteriler bu açıdan incelendiğinde 1950'li yıllardan itibaren başlayan araştırmalar stafilokok ve grup A, C ve G streptokokal gram pozitif bakteriyel IgBP konusunda oldukça fazla bilgi birikimine neden olmuş, moleküler yapıların öğrenilmesi ve ayrıca bazı bağlanma mekanizmalarına da açıklık getirmiştir. Örneğin IgG bağlama özelliği olan M proteinleri fonksiyonel tip II IgBP'lerdir. Bu tip içerisindeki proteinler IgG bağlama etkinlikleri açısından oldukça farklıdırlar. Bu gruptaki proteinler de insan ve hayvan IgG bağlama özelliklerine dayanarak beş subtipe (IIa, IIb, IIc, IIo ve II'o) ayrılırlar [17]. Bakteriyel IgBP'ler farklı cinsteki gram negatif bakterilerin bazı türlerinde de bulunmaktadır. Gram negatif IgBP'lerin çoğunun hücre zarfında bulunduğu saptanmıştır [18, 23-25]. Ancak, gram pozitif bakteriyel IgBP'lerde olduğu gibi bunların da ayrıca kapsüler materyalde ve kültür/besiyeri ortamında bulunabildiği bildirilmiştir [14, 26]. Bazı *E. coli* suşlarındaki IgG bağlama aktivitesinin durağan fazda ve 37$^{o}$C'de üreyen bakterilerde, bu yüzey proteinlerin maksimum ifadelenmesine bağlı olduğu bildirilmiştir [23]. *Haemophilus somnus* örneğinde ise sığır IgG'sini bağlayan bu tür proteinler kültür vasatından izole edilmiştir [25, 26]. *Yersinia* cinsi patojenik bakteriler arasında *Y. pestis* ve *Y. pseudotuberculosis*'in IgBP aktivitesi gösterdikleri saptanmıştır. *Y. pestis* IgBP'i pH-6 antijeni veya PsaA olarak tanımlanmakta [27], *Y. pseudotuberculosis*'de ise IBP-14 ve IBP-16 olmak üzere iki adet IgBP tanımlanmakta [28, 29]. *E. coli*'de Eib proteinleri olarak

tanımlanan IgBP'ler EibA, C, D, E, F ve G olmak üzere 6 adettir [30]. Bu ailedeki proteinlerden rekombinant olarak elde edilen dört tanesinin IgG'nin Fc kısmı ile bağlandığı, Fab kısmı ile ise bağlanmadığı gösterilmiştir [31, 32]. *Prevotella intermedia*'da saptanan IgBP'nin insan, maymun, domuz ve sığır IgG ile etkileşime girdiği, ancak tavşan, fare, sıçan ve koyun IgG'si ile bağlanmadığı bildirilmiştir [18]. *Pseudomonas maltophilia*'dan elde edilen 30kDa ağırlığındaki proteinin insan IgG'nin dört alt tipine, tavşan IgG ve fare IgG ile IgA moleküllerine yüksek afinite ile bağlandığı saptanmıştır [33]. *Helicobacter pylori* yüzeyinde saptanan 60kDa ağırlığındaki IgBP, bir ısı şok proteini (Hsp60) olarak tanımlanmıştır [24, 34]. Bu proteinin insan IgG1, IgG3 ve IgM ile bağlandığı, ancak insan IgA, tavşan IgG ve fare IgG ile bağlanmadığı saptanmıştır. Bununla birlikte bağlanmaların antikora Fab bölgesinden gerçekleştirildiği ve ortama insan IgG kappa hafif zinciri eklendiğinde engellendiği gösterilmiştir. Bu açıdan *Peptostreptococcus magnus* kaynaklı protein L ile benzer bir özellik gösterdiği anlaşılmaktadır.

Bakteriyel IgBP'lerden protein A ve protein G yanında *Sreptococcus equi* subsp *equi* kaynaklı M proteini (fibrinojen bağlayan protein) esas olarak IgG'nin Fc bölgesindeki ağır zincire ait CH2 ve CH3 domainler arası bölgeye bağlanmaktadır. Bu nitelikte bağlanma yapan IgBP'lerde bağlanmanın tam olması için Fc bölgesindeki her iki domainin varlığına gerek duyulmaktadır [35]. IgG üzerinde bağlanma yerleri detaylı olarak incelendiğinde bağlanma bölgelerinin birbirleri ile örtüştükleri saptanmaktadır [35]. Bu bölge aynı zamanda ökaryot hücre membranında bulunan Fc reseptörlerinin (ör. İnsan CD16, CD32, CD64) de bağlanma yeri olduğundan, bakteriyel IgBP'ler antikor-Fc reseptör bağlanmasını da engellerler. Ayrıca *Streptococcus pyogenes* kaynaklı Sir22 protein, B grubu streptokokal β protein ve *Staphylococcus aureus* kaynaklı SSL7 proteinlerinin de insan IgA molekülüne bağlanma yerlerinin Fc bölgesindeki CH2 ve CH3 domainleri arasında olduğu ve örtüştüğü belirtilmiştir [36-38]. Ayrıca, *Peptostreptococcus magnus* izolatlarının yüzeyinde saptanan protein L antijen-antikor bağlanmasını etkilemeksizin kappa hafif zincirindeki V domainine doğrudan bağlanmaktadır, esas olarak Fc reaktif olan protein A ve protein G aynı zamanda ağır zincirin Fab bölgesine de bağlanabilmektedirler [39, 40].

Son yıllarda insanlarda monoklonal antikorlar ilaç olarak sık bir şekilde kullanılmaktadır. Bu ilaçların vücuttaki metabolizmasını belirlemek için de ilaç-anti ilaç ELISA sistemleri (idiyotipik-anti idiyotipik ELISA sistemleri) tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Böylelikle monoklonal antikorların vücutta kan, idrar ve serumda tesbit edilmelerine olanak sağlamaktadır. Dolayısıyla biz de bu ELISA sistemlerini göz önüne alarak, çalışmamızda

mikroorganizmalardaki IgBP varlığını araştırmak/taramak için yeni bir metod olarak "idiyotipik-anti idiyotipik ELISA" sistemi geliştirdik. Anti-idotipik antikor tabanlı bu ELISA ölçüm sistemimiz mikroorganizmalardaki IgBP'lerin varlığının saptanması/taranması için hızlı, pratik ve avantajlı bir sistemdir. Kendi geliştirdiğimiz böyle bir ELISA ölçüm yöntemi ile aynı zamanda laboratuvarımızda izole ettiğimiz çeşitli mikroorganizmalarda IgBP varlığını araştırmayı amaçladık.

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1. Tarihçe

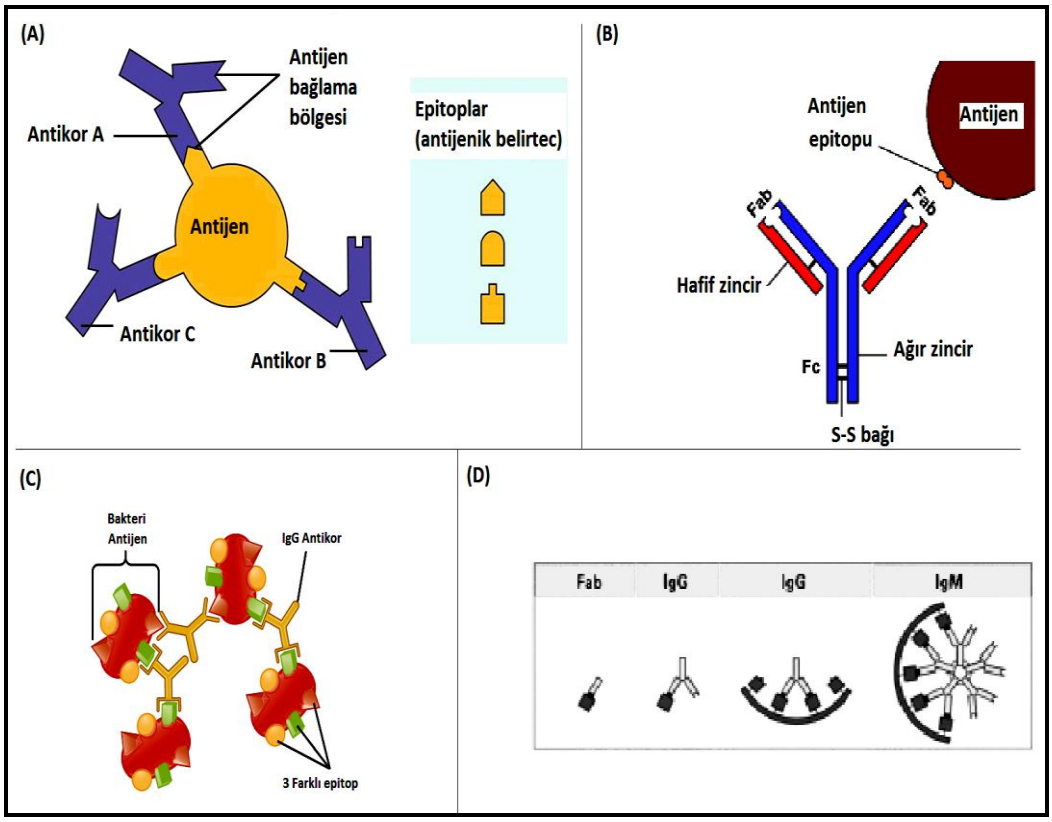
Bakteriyel immünoglobulin bağlayan proteinler (IgBP) büyük bir grup olup, çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilmektedirler. Immünoglobulin bağlayan proteinler yapıları, moleküler ağırlıkları ve immünoglobulinlere bağlanma özellikleri açısından birbirlerinden farklılık gösteren moleküllerdir. İlk kez Jensen 1958 yılında bazı *S. aureus* suşlarının insan ve hayvan serumundaki immünoglobulinleri presipite ettiğini bildirmiştir [15]. Daha sonra bu IgG presipitasyon olayının *S. aureus* hücre yüzeyinden bulunan protein A molekülünün IgG'nin Fc fragmanını bağlamasından kaynaklandığı anlaşılmıştır [41]. Böylece SpA insan IgG molekülünü non-immün bir şekilde bağlayan ilk protein olarak tanımlanmıştır. 1973 yılında beta-hemolitik streptokokların da IgG için reseptör taşıdığı keşfedilmiştir. Sonraları streptokoklarda Fc reseptörleri üzerine yapılan çalışmalar sonucunda, bakteri türleri ile ilişkili tip I, tip 2, tip 3, tip 4 ve tip 5 olarak beş farklı Fc bağlanma varlığı tanımlanmıştır [7]. *Staphylococcus aureus* tarafından üretilen protein A molekülü tip I Fc reseptör olarak adlandırılmıştır. İnsan C ve G grubu beta-hemolitik streptokoklarda bulunan tip III reseptör $IgG_3$'ü bağlama yeteneğine sahiptir. Grup A streptokoklarda IgG3 için ayrı bir reseptör keşfedildikten sonra, tip II'nin isimlendirmesi, daha önceki ve yeni reseptör tipini tanımlamak için Fc reseptör tip IIa ve IIb olarak değiştirilmiştir [42, 43]. 1986 yılında tip VI olarak adlandırılan bir başka tip reseptör, *Streptococcus zooepidemicus*'un bir suşunda tanımlanmış olup bu reseptör fare immünoglobulinleri için yüksek afiniteye sahiptir [44]. 1987'de Grup U streptokoklarda bulunan ve fare immünoglobulinleri için yüksek afiniteye gösterdiği saptanan IgBP'nin daha önce tanımlanmış olan beş orijinal tipten farklı bir Fc reseptörü olduğu bildirilmiştir [45]. Daha sonraları, grup L streptokokların da tip III özgüllüğü olan bir Fc reseptörü taşıdığı gösterilmiştir. Grup G streptokoklarda bulunan Fc tip III reseptörü protein G olarak adlandırılmıştır. İlk bulunan IgBP'lerin Ig'lerin Fc kısmına bağlandığı görülmüş, zaten bu yüzden bu IgBP'ler aynı zamanda Fc reseptörü olarak da adlandırılmıştır. *S. aureus* protein A molekülü ile yapılan çalışmalarda protein A'nın Ig'lerin sadece Fc kısmına değil de Fab kısmıma da bağlanabildiği ayrıca streptokoklardaki tip III reseptörünün de IgG Fab kısmına bağlanabildiği gözlenmiştir.

Stafilokok ve streptokoklarda IgBP taşıdığının görülmesi üzerine diğer bakterilerde de IgBP varlığının araştırılması hızlanmıştır. IgBP'ler büyük oranda bakteriler tarafından üretilse de, bazı parazit de IgBP üretmektedirler. Bakteriyel IgBP'lerin büyük kısmı gram pozitif bakteriler tarafından üretilir, ancak birçok gram negatif bakteri de IgBP üretmektedir. Yapılan araştırmalarda Grup B beta-hemolitik streptokokların CAMP faktörünün, Fc reseptör aktivitesi aracılığıyla çeşitli memeli türlerinin IgG ve IgM'sini bağlayabildiği; *Staphylococcus intermedius*'un Fc reseptörü eksprese ettiği gösterilmiştir. Anaerob bakterilerle yapılan çalışmalarda bir anaerob gram pozitif kok olan *Peptococcus magnus* izolatının IgG, IgA ve IgM hafif zincirleri için IgBP taşıdığı. *Clostridium perfringens'*in IgM ve IgG Fab yapılarını bağlayan reseptör bulundurduğu; bir anerobik kok olan *Coprococcus comes*'in IgG'ye bağlanma özelliği gösterdiği saptanmıştır. Bazı gram negatif bakteriler de IgBP eksprese etmektedir. Yapilan çalışmalarda *Brucella abortus*'un IgM molekülünün Fc kısmını bağladığı, *Taylorella equigenitalis*'in IgG ve IgM'yi bağladığı saptanmıştır. Bunlardan başka, bakteriler dışındaki mikroorganizmalarda da Fc reseptörü bulunmuştur. Örneğin *Schistosoma mansoni* IgG Fc'ye bağlanabildiği gösterilmiştir [46-51].

## 2.2. Antikorlar

### 2.2.1. Tanım

Antikorlar serum elektroforezinde gamaglobülin fonksiyonunda bulunan proteinlerdir. Antikorlar IgG, IgA, IgM, IgE, IgD olmak üzere beş sınıfta gruplandırılır [2]. Antikorların tıbbi araştırma, teşhis ve tedavi alanlarının pek çok alanında yaygın bir kullanımı vardır. Antijenine yönelik seçici ve spesifik bağlanma kabiliyeti, sadece bir proteinin aşılanması için değil, aynı zamanda üzerinde belirli bir bölge "epitop" olarak adlandırılır (Şekil 2.1).



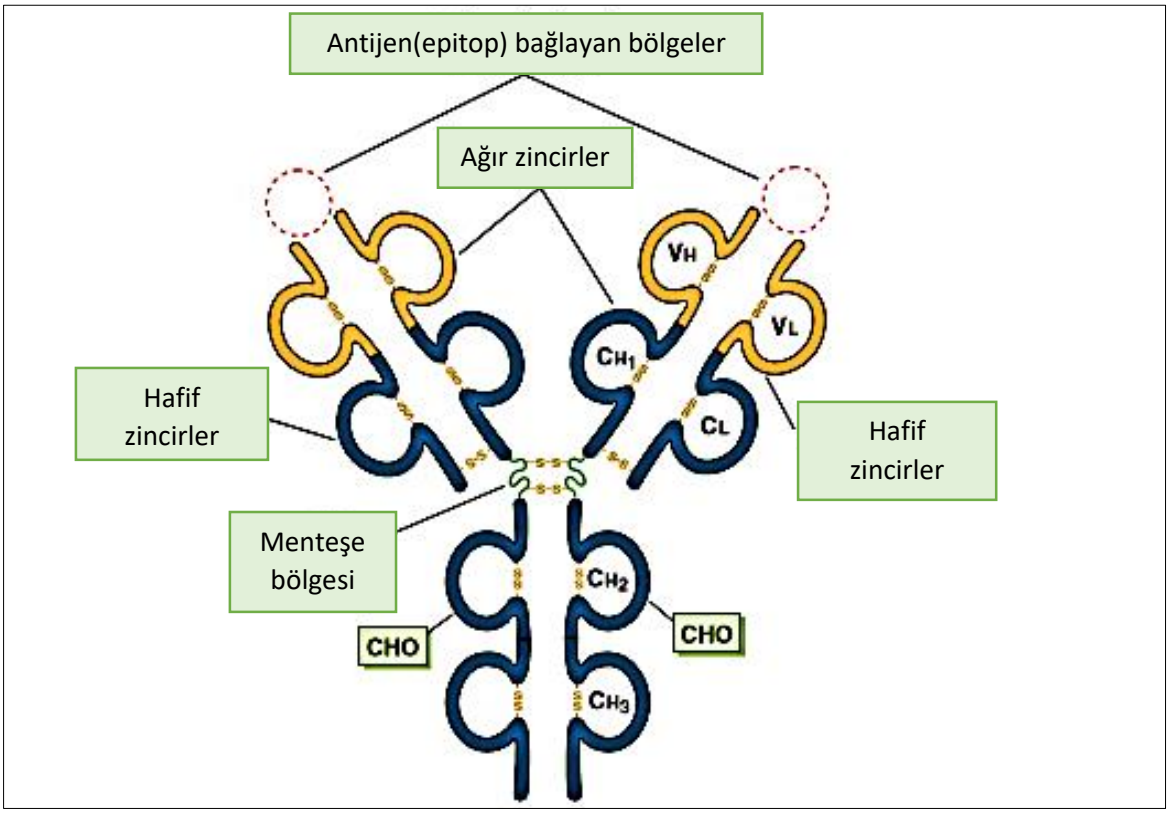

Şekil 2-1. Antikorun Epitop/Antijen ile özgül etkileşimi (bağlanması) [52].

Değişken alanların protein dizilimindeki değişiklikler yüksek çeşitlilik çeşitliliğini verir ve değişken bölgenin özellikleri antikorun idiyotipini belirler. Bir antikor molekülü de kendisi antijeniktir ve antikor kombinasyon sahasında veya antikor kombinasyon bölgesine yakın antijenik belirleyicilere yönelik anti-idiyotipik antikorların geliştirilmesi için kullanılabilir. Anti-idiyotipik antikorları antijenik belirleyicileri tanır antijen taklit edebilir. Belirli bir antijene karşı bir bağışıklık tepkisi, bağışıklık tepkisini arttıran ya da baskılayabilen bir dizi idiyotip-anti-idiotip reaksiyonu tarafından kontrol edilir. Orjinal antijene yanıt olarak üretilen antikor molekülü de bir antijen olabilir ve "anti-idiyotipik antikor" olarak adlandırılan ikinci bir antikorun sentezlenmesine yol açabilir [53].

### 2.2.2. Antikorların yapısı

Her sınıfın temel yapısal birimi, disülfit bağları ile bağlanmış, iki ağır (H) ve iki hafif (L) zincir polipeptidleri olan dört zincirli bir proteindir. (Şekil 2.2).

- H zincirinin her biri için özgül kısa aminoasit sekansı beş sınıf halinde farklılaşmsını sağlar. Bu H zincir farklılıkları izotoplar olarak adlandırılır ve Yunan harfleriyle; gama (ɣ), alfa (α), mu (μ), epsilon (ε), ve delta (δ) olarak gösterilir. İzotipler tüm insanların sahip olduğu genetik çeşitliliklerdir.
- Beş sınıfın hepsi de L zincirlerinde ortak aminoasit sekansına sahiptir. Böylece, bunlar immünoglobulinler olarak birlikte sınıflandırılabilirler. Ek olarak; iki izotip; kappa (k) ve lambda (ƛ) beş sınıfın hepsinin içinde bulunur [2].




Şekil 2-2. İmmünoglobulinlerin (Ig) temel dört peptid yapısı, IgG paterni ile gösterilmiştir Üç ağır zincir sabit bölge domainleri (CH1, CH2, CH3) ve bir hafif zincir sabit bölgesi koyu mavi ile gösterilimiştir. Hafif ve ağır zincirlerin her ikisinin değişken bölgeleri (VL ve Vh, sırası ile turuncu) özgül epitop bağlanma bölgesini oluşturur önemli birkaç disülfit bağı(-ss-)gösterilmiştir. CHO karbonhidrat bağlı olduğu yeri göstermektedir [54].

### 2.2.3. Domainler

Hem H hem de L zinciri CH ve CL ile belirlenmiş sabit bölge alanlarına ve VH ve VL ile gösterilmiş değişken bölge alanlarına ayrılmıştır.

a. H ve L zincirlerinin her ikisinin sabit bölgelerinin aminoasit sekansı, her bir sınıf içindeki tüm antikor molekülleri için benzerdir.
b. H ve L zincirlerinin her ikisinin değişken bölgelerinin aminoasit sekansı yöneldiği antikora göre epitopta değişir.
    - Farklı özgüllükteki antikorlar arasındaki belirgin farklılıkları gösteren aminoasitler, her bir değişken bölge içindeki aşırı-değişken bölgeyi oluşturur.
    - Hem H hem de L zincirinin aşırı- değişken bölgeleri, idiotip antikor olarak bilinen iki epitop bağlayıcı bölge oluşturmak üzere birleşir.
    - CH1 ve CH2 domainleri arasında bulunan menteşe bölgesi, iki antijen bağlama bölgesine hareket esnekliği sağlar.

### 2.2.4. Monoklonal antikorlar

Çoğu antijenik uygulamalar bir antikor karışımı ortaya çıkarır. Ancak, özgül tanı testleri ve immünoterapi gibi birçok amaç için tek bir özgüllüğe sahip antikorlar gereklidir.

- Monoklonal antikorlar, aşılanmış bir hayvandan alınan dalak B hücrelerinin malign, ölümsüz plazma hücreleri ile birleştirilmesi ile bir hibridoma oluşturarak, rütin olarak yapılabilir.
- İstenen antikoru salgılayan B lenfosit hibridoma, ilgili antijenle reaktive edilerek diğerlerinden ayrılır sonra klonlanır ve doku kültüründe çoğalır. Sonuçta tek bir özgüllüğe sahip çok miktarda antikor elde edilir.

### 2.2.5. İmmünotoksinler

- Monoklonal antikorlar, bir kanser antijeni için özgül Fab domain ile mürin antikoru kullanılarak yapılabilir. Fc domaini çıkarılır ve istenilen toksin ile yer değiştirir.

- Bu tür antikorlar, fare Fab aşırı değişken bölgeleri üzerinden kanser hücresi antijenine spesifik olarak bağlanır. Böylece sadece belirlenen hedef hücre üzerinde ölümcül toksin olur [2].

### 2.2.6. Antikorların özellikleri

**İmmünoglobulin G:**

***Yapısal özellikleri*** (Çizelge 2.1)

a. IgG iki L zinciri (her biri 22.000 Da molekül ağırlığında) ve iki H zincirden (her biri 53.000 Da molekül ağırlığında) oluşmaktadır Toplam molekül ağırlığı 150.000 Da'dır.
b. Yapısal görünüm L.zincir izotipi gösteren k-belirteci ya da ƛ-belirteci ve IgG H zinciri izotipini gösteren ɣ-marker'dan oluşan (ɣ2k2) veya (ɣ2ƛ2) şeklindedir.
c. Dört alt sınıfı vardır: ɣ1, ɣ2, ɣ3 ve ɣ4. Bu alt sınıflar H zincirindeki aminoasit dizilerindeki küçük değişiklikler ile ayrılır.
d. Enzimatik bölünme (şekil 2.3).

Papin IgG'yi üç parçaya böler

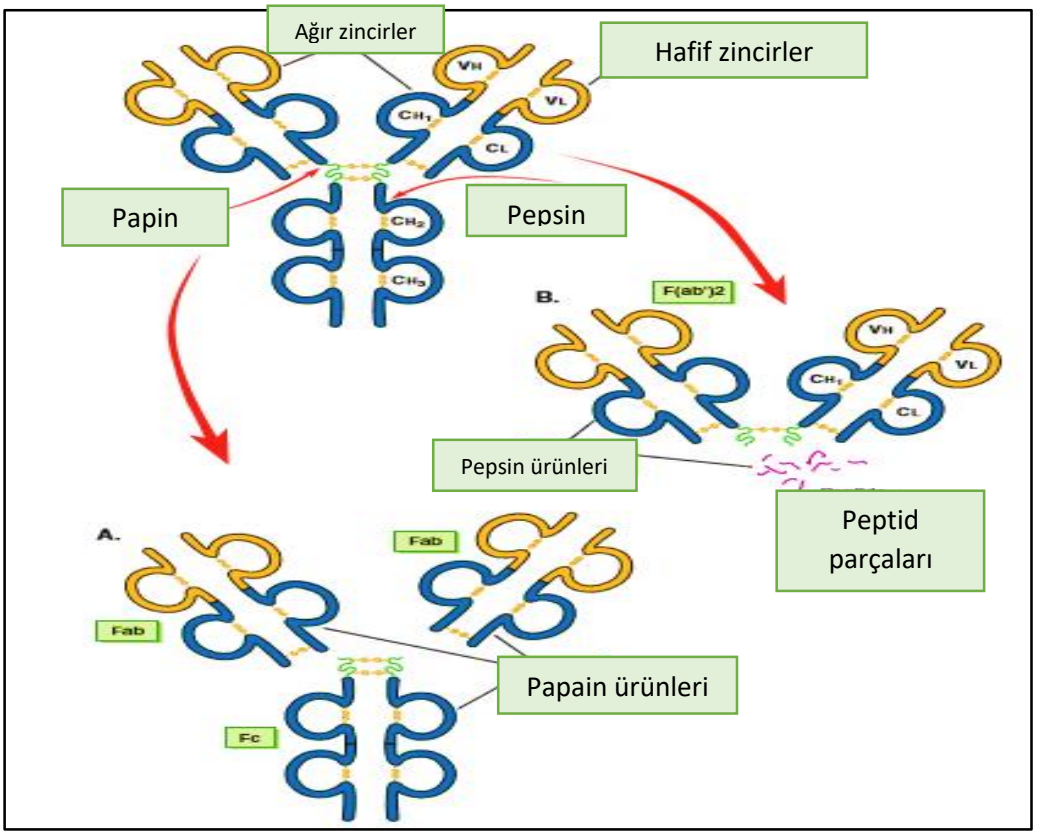
a) Bu parçalardan ikisi, Fab (fragment, antijen bağlayan) epitopa yanıt veren bölgelerin sadece birini içerecek şekilde benzerdir. Çünkü Fab monovalandır, kafes oluşumuna bağlanabilir (ancak içine giremez) antijeni agglütine veya presipite edebilir.
b) Üçüncü parça, Fc (kristalize olabilir) komplemanı aktive eder, IgG, katabolizmasını kontrol eder, Fc reseptörü araçlığıyla hücrelere ve dokulara IgG bağlar ve antikorunu plasentadan geçişine aracılık eder.

Pepsin iki H zincirine bağlanarak disülfit bağının arasında her iki Fab parçası bağlı kalacak şekilde böler. Sonuçta bu parça F(ab')2 olarak adlandırılır.

a) F(ab')2 bivalandır, kafes oluşturma yeteneğindedir ve böylece antijenlerin uzaklaştırılmasını kolaylaştırır.
b) F(ab')2, dolaşımdan bozulmamış IgG'den daha hızlı uzaklaştırılır
c) Fc parçaları yoğun olarak yıkılır.

Çizelge 2.1. İnsan İmmunoglobulinlerin Yapısal Özellikleri **[55].**

| Özellik | IgG | IgM | IgA | IgE | IgD |
|---|---|---|---|---|---|
| H-zincir izotip | ɣ | μ | A | ε | Δ |
| H-zincir altsınıfı | ɣ1, ɣ2, ɣ3, ɣ4 | - | α1 α2 | - | - |
| H-zincir izotip | κ veya ƛ | κ veya ƛ | κ veya ƛ | κ veya ƛ | κ veya ƛ |
| Bağlantı zincirleri | - | J zinciri | J zinciri,SP | - | - |
| Yapısal görünüm | ɣ2 κ2 veya ɣ2 ƛ2 | (μ2 ƛ2)5 veya (μ2 ƛ2)5 | Serum:ακ2 veya αɣ2 Mukoza:$(\alpha_2\ \kappa_2)_2$ J, SP veya $(\alpha_2\gamma_2)_2$ J,SP | $\varepsilon_2$ $K_2$ veya $\varepsilon_2\lambda_2$ | $\delta_2$ $K_2$ veya $\delta_2$ ƛ $_2$ |
| Karbonhidrat oranı % | 4 | 15 | 10 | 18 | 18 |
| Moleküler (ağırlık Da) | 150.000 | Monomer:180.000 Pentamer:950.000 | Monomer:160.000 Dimer:318.000 Dimer+SP:380.0000 | 188.000 | 184.000 |




Şekil 2-3. Pepsin ve papain ile immünoglobülin G'nin enzimatik parçalanması. (A) papainin ayrılması, disülfid bağları (-ss-)ile iki tane bağlı olmayan antijen baglama parçaları(Fab) ve kristalize edilebilen parçalar (Fc) oluşması ile sonuçlanır , parçalar univalan olduğu için antijenleri presipite ve aglütine edemez.(B) Pepsin ayrılması F(ab')2olarak bağlanmış iki Fab parçaları ile disülfit bağlarının tutulmasıyle sonuçlanır. Fc kısmı sırası ile p CH1, CH2, CH3 ve bir hafif zincir sabit domaini CL (mavi), ağır zincir sabit bölge domainleri: VL, VH (turuncu), ağır ve hafif zincirlerin değişken bölgesine indirgenir [56].

***Fonksiyonel özellikler*** (Çizelge 2.2)

a. İmmunoglobulinler arasında IgG en yüksek serum konsantrasyonuna sahiptir ve serum yarılanma ömrü 18-25 gündür.
b. IgG, IgG'nın Fc Parçası için reseptöre (Fcɣ)sahip hücrelere yapışır.
c. IgG komplemenı ve bir dizi enzimi bağlar ve bu hücre lizisi ile sonuçlanır.
d. IgG maternal antikorun fötusa plasental geçişini aracılık eder.

Çizelge 2.2. İnsan İmmunoglobulinlerin Fonksiyonel Özellikleri[55].

| **Özellik** | **IgG** | | | | **IgA** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ɣ1 | ɣ2 | ɣ3 | ɣ4 | IgM | α 1 | α 2 | IgE | IgD |
| **Ortalama serum konsantrasyonu (%mg)** | 900 | 300 | 100 | 50 | 150 | 300 | 50 | 0.03 | 3 |
| **Serum yarı-ömrü (günler)** | 23 | 23 | 8 | 23 | 5 | 5 | 5 | 3 | 2,5 |
| **Kompleman aktive etme** | + | ± | ++ | - | +++ | - | - | - | - |
| **FC reseptörüne bağlanma** | + | ± | ++ | + | + | - | - | + | - |
| **Plasentaya geçme** | + | ± | + | + | - | - | - | - | - |

**<u>İmmünoglobulin M</u>**

***Yapısal özellikleri*** (Çizelge 2.1).

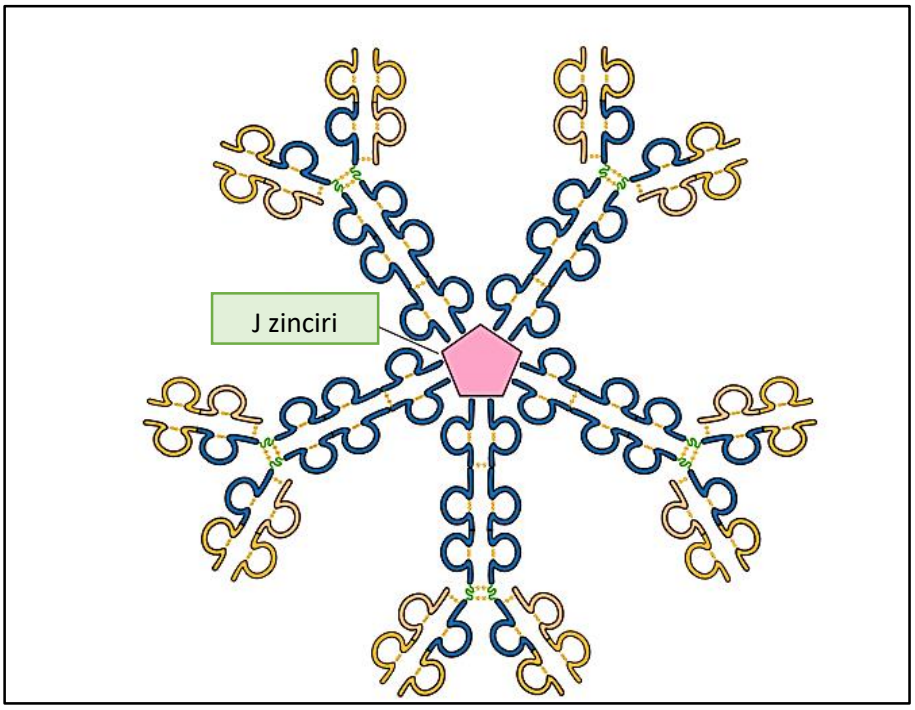
a. IgM'nin iki yapısal forumu vardır
   (1) Monomer, B lenfositleri tarafından sentezlenir membran üzerinde kalır ve $\mu 2\kappa 2$ veya $\mu 2\lambda 2$ görünümündedir.
      a. Tek bir antijenik epitop için özgül B lenfosit reseptörü olarak görev görür.
      b. Monomerin aşırı-değişken bölgesi her bir B lenfosit klonu için farklıdır.
   (2) Salgılanan IgM pentamer olarak bulunur (beş monomerik IgM molekülleri J zinciri ile birbirine birleşmiştir (Şekil 4). IgM Pentameri $(\mu 2\kappa 2)5$ görümündedir.

a. Pentamer b lenfositlerin antijen ve sitokin aktivasyonunu ardından salgılanır. Pentamer üzerindeki aşırı değişken bölge membrana bağlı monomer reseptör üzerindeki ile aynı yapıdadır.
b. Pentamerin 10 olası epitop bağlayıcı bölgesinin 5'i yüksek afiniteye ve 5'i düşük afiniteye sahiptir.

b. Moleküler ağırlık: IgM, H ve L zincirleri üzerinde dört sabit domaine sahiptir (IgG, IgA, IgD'de üç adet bulunur) Bu nedenle pentamer formu immünglobulinlerin en yüksek moleküler ağırlığına (yaklaşık 1 milyon) sahiptir

***Fonksiyonel özellikler*** (Çizelge 2.2):

IgM, antijenik uyarıdan sonra en erken ortaya çıkan antikordur, komplemanı hızlıca bağlar.




Şekil 2-4. İmmünoglobulin M pentameri [56].

**<u>İmmünoglobulin A</u>**

***Yapısal özellikler*** (Çizelge 2.1)

a. IgA'nın üç formu vardır; monomer, dime (J zinciri iki monomeri bağlar) ve salgısal parça olan dimer plus (şekil 2.5 A)

(1) Dimer, mukoza epiteli üzerinde IgA için reseptör (FcαR) olan salgı parçası tarafından solunum ve bağırsak mukoza bariyerlerinden lümene taşınır.

(2) Ayrıca salgısal parçalar IgA'yı proteolizden korur

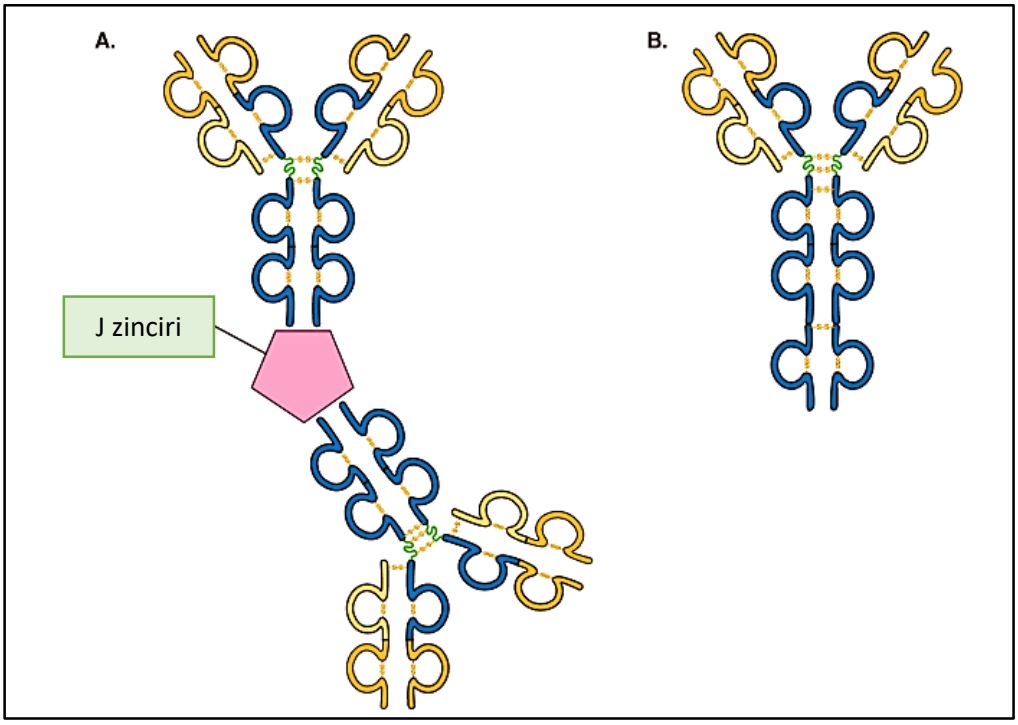
b. Yapısal görünüm monomer olarak (α2κ2) veya (α2λ2) ve dimer olarak (α2κ2)2 veya (α2λ2)şeklindedir.

c. İki alt sınıfa ayrılır: α1 ve α2.

***Fonksiyonel özellikler*** (Çizelge 2.2).

a. IgA, salgılarda yüksek konsantrasyonlarda bulunur; serumda IgA esas olarak 5 günlük yarılanma ömrü olan bir dimer olarak bulunur.

b. IgA, mukozal dokular, tükürük, gözyaşı ve kolostrumda bulunur ve bakteri, virüs ve toksinlerin konak hücreye bağlanmasını engeller.




Şekil 2-5. (A). İmmünoglobulin A dimeri (B)immünglobulin E dimeri [56].

**İmmunoglobulin E**

***Yapısal özellikleri*** (Çizelge 2.1)

a. IgE, dört sabit domaine (Şekil 2.5 B) ve %18'lik karbohidrat içeriğe ve sonuçta 188.000 Da molekül ağırlığına sahiptir.
b. IgE'nın yapısı ε2κ2 ya da ε2λ2 görünümündedir.
c. IgE molekülü 56°C'de sabit yapısını koruyamaz ve reagin olarak adlandırılır.
d. B lenfositin IgE üretimi için değişimine IL-4 aracılık eder.

***Fonksiyonel özellikler*** (Çizelge 2.2)

a. IgE'nin Fc bölgeleri mast hücreleri ve bazofillerer hızlıca bağlandığı için son derece düşük serum konsantrasyonuna ve ayrı-ömre sahiptir.
b. IgE, dokulardaki mast hücrelerine ve dolşımdaki bazofillere bu hücreler üzerindeki Fcε reseptörleri aracılığıyla yapışır. Bu IgE duyarlı hücrelere antijenin bağlanması, vazoaktif aminlerin salınımını (özellikle histamin) tetikler, ürtiker (bölgesel reaksiyon) ve anafilaksi (sistemik reaksiyon) ile karakterize atopik hastalık ile sonuçlanır.
c. IgE plasentayı geçmez ve klasik yolla komplemanı aktive etmez
d. IL-5 ile aktifleşen eozinofillere IgE'nin bağlanması parazitik helmintlerin yok edilmesi ile sonuçlanır.
e. Hem toplam IgE hem de alerjene özgül IgE ölçülebilir.

**Immünoglobulin D**

***Yapısal özellikleri*** (Çizelge 2.1):

IgD için yapısal formül δ2κ2 veya δ2λ2'dir.

***Fonksiyonel özellikleri*** (Çizelge 2.2)

a. IgD, yenidoğanların %15'nin B lenfosit membranlarında ve yetişkinlerde periferik kan lenfositlerinde IgM ile birlikte bulunur serum düzeyleri çok düşüktür. Serum yarılama ömrü 2-3 gündür.
b. IgD, antijen için B lenfosit membranı üzerinde bir reseptördür [2].

## 2.3. Antijenler

Antijenler (immünojenler), antikorlarla reaksiyona giren moleküllerdir, kendisine karşı bağışık yanıt gelişen moleküller olarak tanımlanabilir. Antijen ile antikor arasındaki etkileşim yüksek düzeyde özgüldür ve bu özellik tanı labouratuvarında mikroorganizmaları tanımlamak için sıklıkla kullanılır. Antijen ve antikor, kovalent bağlarla değil, hidrojen bağları ve van der Waals kuvettleri gibi zayıf bağları ile birbirine bağlanır.

## 2.4. Bakteriyel İmmünoglobulin Bağlayan Proteinler

Bakteriler arasında değişik memeli türlerine ait IgG moleküllerini, antijen bağlama bölgesi dışındaki bir bölgeden non-immün bir şekilde bağlayan proteinlere immünoglobulin bağlyan proteinler (IgBP) adı verilmektedir. IgBP'ler bazı bakteri türleri arasında yaygın olarak bulunurlar. Bu bakteriler genellikle bakterilerin hücre yüzeyinde eksprese edilmiş olup, genel olarak bakterinin konak immün cevabından, opsonizasyondan, fagositozdan, kompleman atağından kaçmasına yardımcı olurlar. IgBP'lere en sık olarak gram pozitif bakterilerde rastlanmaktadır (stafilokok, streptokok, peptostreptokok).

Immünoglobulin bağlayan proteinler bakteri hücre yüzeyinden bulunduğu gibi bakterinin ürediği kültür sıvısına da salgılanabilmektedir. Immünoglobulin bağlayan proteinler'lerin insan ve hayvan türleine ait immünoglobulin moleküllerine, farklı antikor izotiplerine ve alt sınıflarına olan afiniteleri farklılık göstermektedir [15]. Bilinen IgBP'lerin çoğu multifonksiyonel özelliğe sahiptir; insan veya hayvan serumundaki birçok diğer protein molekületi ile de etkileşime girebilmekte, onları bağlayabilmektedir. Bakteri yüzeyinde IgBP'lerin ekspresyonu bakterinin ürediği kültür ortamına ve kültür ortamının içeriğine bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir.

### 2.4.1. Gram pozitif bakterilerin IBP'leri

Bakteriyel IgBP'ler görece geniş bir bakteri grubunda saptanabilmektedir. 1950'li yıllardan itibaren gram pozitif bakterilerdeki IgBP'lerin varlığı, yapısı ve fonksiyonel özellikleri ile ilgili olarak çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu konularda en fazla araştırma stafiloklar, grup A, grup C, grup G streptokoklar ve peptostreptokolarla yapılmıştır. Gram pozitif bakteriyel IgBP'lerin insan ve hayvan IgG antikorlarına bağlanma özelliklerine göre bu proteinler fonksiyonel olarak tiplendirilmişlerdir (Çizelge 2.3). Şu ana kadar en iyi bilinen IgBP'ler *S. aureus* protein A molekülü (SpA), streptokokların M proteini ve streptokok protein G molekülü (SpG) olup, bu moleküller tipI-III olarak adlandırılmıştır [15]. Peptostreptokoklar tarafından üretilen immunoglobulin bağlayan bir protein olan L (SpL) proteini hariç, tüm gram pozitif IgBP'ler immünoglobulinin Fc kısmına bağlanırlar.

Bazı IgBP'ler (SpA, SpG, SpL) immmünoglobulinlere yüksek afinite göstermeleri sebebiyle, tıpta, immünolojik tanıda, çeşitli ticari uygulamalarda, immünokimyasal aplikasyonlarda, monoklonal ve poliklonal IgG saflaştırılmasında uzun bir süredir kullanılmaktadır.

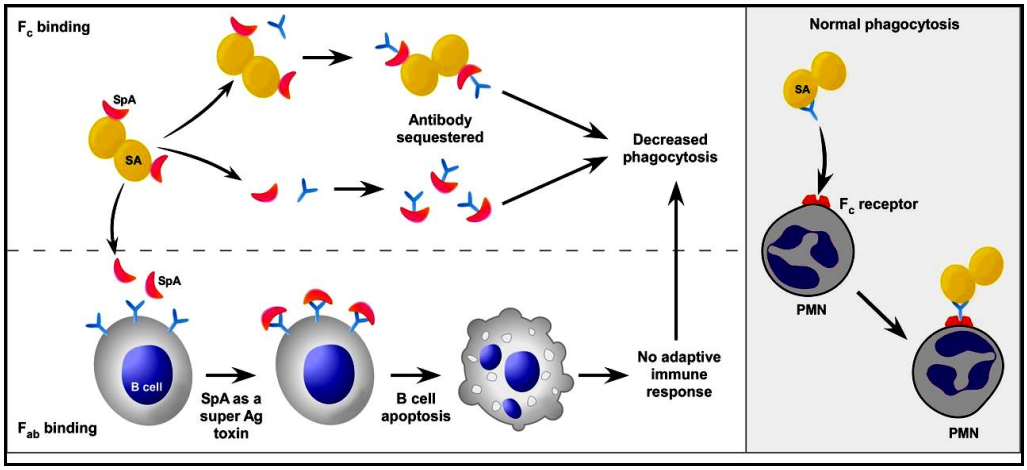
Çizelge 2.3. İnsan ve hayvan IgG bağlama özelliklerine dayalı olarak IgBP'lerin sınıflandırması [15].

| IgG Kaynağı | IgBP'lerin fonksiyonel tiplendirmesi | | |
|---|---|---|---|
| | I | II | III |
| **İnsan** | + | + | + |
| **Tavşan** | + | + | + |
| **Kobay** | + | - | + |
| **Köpek** | + | - | - |
| **Kedi** | + | - | - |
| **At** | - | - | + |
| **Domuz** | + | + | + |
| **Koyun** | - | - | + |
| **İnek** | - | - | + |
| **Tavuk** | - | - | - |

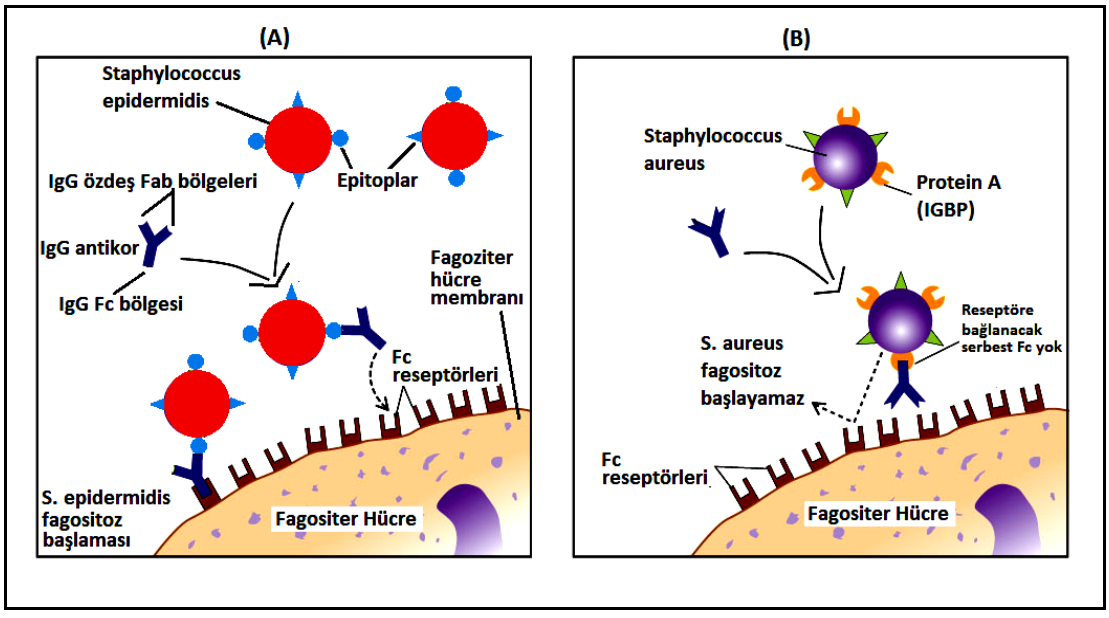
**Tip I IgBP: stafilokok IgBP (protein A, SpA)**

En fazla çalışılmış olan bakteriyel IgBP *S.aureus* protein A molekülüdür, tip I Fc reseptörü olarak da adlandırılır. Protein A bakteriyel IgBP'lerin prototipidir. Bakteriyel IgBP'lerin sınıflandırılması, IgBPlerin farklı türlere ait antikor sınıfları ile ve antikor alt sınıfları ile

raktivitesine dayanarak yapılmıştır. Bu sınıflamaya göre protein A tip I bakteriyel Fc reseptörü olarak adlandırılmıştır. Protein A ilk defa 1958 yılında Jensen tarafından izole edilmiş, *S. aureus*'un hücre duvarında yer alan başlıca proteindir [57]. Protein A molekülü insan serumunda IgG'nin Fc parçasında, komplemanın bağlandığı yere bağlanarak kompleman aktivasyonuna engel olur; C3b oluşumunu engeller, böylece bakterinin opsonizasyonu ve fagositozu büyük ölçüde azalır (şekil 2.6). Bu sebeplerden dolayı protein A *S. aureus*'un önemli bir virülans faktörüdür (şekil 2.7) [20, 58].




Şekil 2-6. Staphylococcal protein A aracılı bakterinin immün sistemin salgısal (sol panel alt) ve hücresel (sol panel üstü; sağ panel ise normal yanıtı temsil etmekte) savunma mekanizmalarından kaçış mekanizmaları [20].




Şekil 2-7. Protein A taşıyan *Staphylococcus aureus* bakteri örneklemi üzerinden, bakteriyel IgBP'lerin antikor bağlamasıyla patojenisiteye katkısı arasındaki ilişki örneği [58].

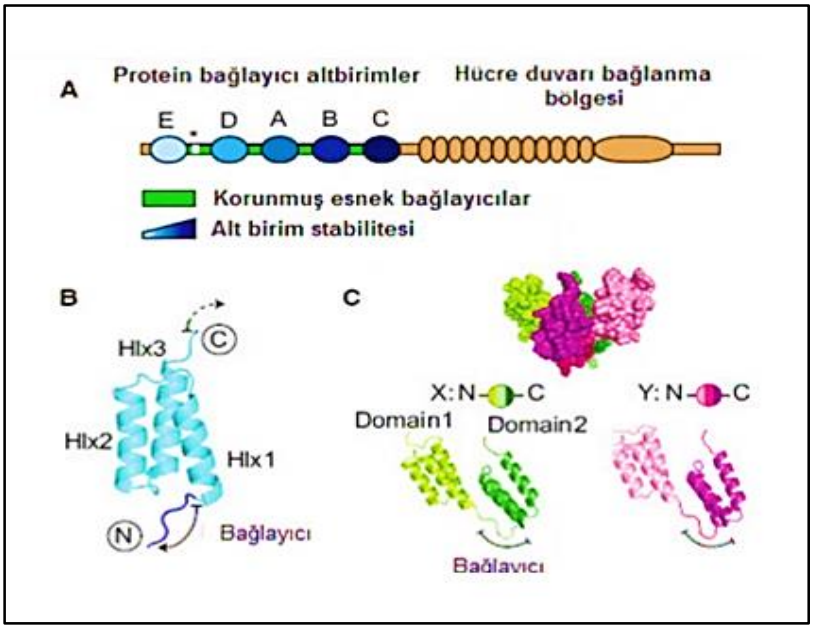
Protein A, IgG'ye bağlanarak antijen-antikor kompleks yapısında koaglütinat oluşturur ve bu özelliği nedeniyle klinik laboratuvarlarda uygulanan bazı testlerde kullanılmaktadır [59]. Protein A yaklaşık 42 kDa molekül ağırlığına sahip olup, IgG3 hariç insan IgG'lerinin tamamına kuvvetli bir şekilde bağlanır; ayrıca tavşan, sığır, fare gibi diğer bazı canlı türlerinin Ig'lerine de bağlanabilme özelliğine sahiptir (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Protein A-immoglobulin etkileşimi [57].

| Tür | Altsınıflar | Protein A |
|---|---|---|
| **İnsan** | $IgG_1$ | ++ |
| | $IgG_2$ | ++ |
| | $IgG_3$ | - |
| | $IgG_4$ | ++ |
| | IgA | Değişken |
| | IgD | - |
| | IgM | Değişken |
| **Tavşan** | Tamamı | ++ |
| **Kobay** | $IgG_1$ | ++ |
| | $IgG_2$ | ++ |
| **Sığır** | | + |
| **Fare** | $IgG_1$ | + |
| | $IgG_{2a}$ | ++ |
| | $IgG_{2b}$ | + |
| | $IgG_3$ | + |
| | IgM | Değişken |
| **Tavuk** | IgY | - |

*Güçlü bağlanma ++, orta etkileşim +, zayıf veya etkileşim yok -*

Tam boyda bir SpA, N-ucundan sırası ile E, D, A, B ve C olmak üzere 5 homolog alt birimden ve bir hücre duvarı bağlanma bölgesinden oluşmaktadır (şekil 2.8) [57]. SpA'nın beş alt biriminden her biri yaklaşık 58 amino asit içeren üç-sarmal demeti halinde düzenlenmiş olup, bu alt birimlerin hepsi IgG ile bağlanabilmektedir. Bu etkileşimler *S. aureus* enfeksiyonu oluştuğunda gelişen inflamasyonun artmasına yol açarlar.




Şekil 2-8. (A) Protein A Ig bağlayıcı 5 alt birimi. (B) C alt birimi. (C) Asimetrik B-B alt birimi [57].

SpA insan ve hayvan immünoglobulinleri ile etkileşime girer, ancak aynı türün farklı antikor alt sınıfları için afinite farklı olabilir. Alt birimler IgG1, IgG2 ve IgG4'ün Fc kısmına yaklaşık 108 ($M^{-1}$) afinite sabiti (Kb) ile güçlü, IgG3 ile zayıf etkileşim gösterir (Çizelge 2.5) [15].

Çizelge 2.5. İyi bilinen bazı gram pozitif bakteriyel IgBP'lerin özellikleri [15].

| IGBP | MW (KDa) | Tip | $K_{b(M^{-1})}$ İnsan ɛIgG | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | Fare | Sıçan | Keci | Tavşan | IgG Bağlama bölge sayısı |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **SpA** | 41-57 | I | $4.4\times10^{10}$ | $1.3\times10^{9}$ | $2.1\times10^{9}$ | Yok | $3.4\times10^{9}$ | $2.6\times10^{10}$ | $1.8\times10^{7}$ | Yok | $5.2\times10^{10}$ | 4-5 |
| **Protein H** | 42.5 | IIa | $1.6\times10^{9}$ | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 |
| **SPG** | 63 | III | $6.7\times10^{10}$ | $2.0\times10^{9}$ | $1.3\times10^{9}$ | $6.1\times10^{9}$ | $4.7\times10^{9}$ | $4.2\times10^{10}$ | $1.4\times10^{9}$ | $1.4\times10^{10}$ | $7.0\times10^{10}$ | 2-3 |
| **PpL** | 76-106 | Kappa hafif zincire bağlanır | $1.5\times10^{9}$ | - | - | - | - | - | - | - | - | 4-5 |

**$K_b$: IgG bağlanma sabit katsayısı, SpA: Stafilokokkal protein A, Protein H: Streptokokkal M protein ailesinden SpG: Streptokokkal protein G, PpL: Peptostreptokokkal protein L**

Ayrıca her bir alt birim belirli antikorların Fab kısmına yönelik yüksek afinite gösterir. Bu alt birimlerden B'nin IgG ile etkileşimi en ilgi çekici olanıdır. Üçlü sarmal yapıdaki B alt birimi, Fc'deki 9 amino asit ve B alt birimindeki 11 amino asit ile IgG'ye bağlanır [57]. SpA'nın immünoglobulin bağlayıcı alanları oldukça hidrofilik, proteolitik enzimlere dirençli

ve denatüre edici faktörlere karşı oldukça dirençlidir. Termostabildir, geniş bir pH aralığına (pH 1-12) dirençlidir ve tripsin tarafından yok edilmezler [60].

*Staphylococcus aureus* suşlarının çoğu insan IgG molekülüne non-immün olarak bağlanır; *S. aureus*'lardaki protein A ekspresyon düzeyi diğer birçok bakteri türünün aksine, özelikle grup A streptokokların aksine, zaman izçerisinde sabit bir karakter gösterir. Eskpresyon düzeyi loboratuvarda seri pasajlar sonucu değşkinlik göstermez. Ancak, *S. aureus* izolatları arasında immünoglobulin bağlama aktivitesinin ekspresyon düzeyi farklılık gösterir. *S. aureus* Cowan 1 suşu en yüksek derecede ekspresyon göstermekte olup, protein A araştırmalarında genellikle bu izolat kulanılır. Bazı *S. aureus* suşlarının IgG bağlama aktivitesi *S. aureus* Cowan I suşu düzeyine yaklaşırken, suşların çoğunda genellikle düşük reaktivitede bağlanma özelliği görülür. Reis ve ark. radyoaktif iyot ile işaretli IgG kullanarak yaptıkları çalışmada, tüm *S. aureus* suşlarının tespit edilebilir düzeyde IgBP ürettiğini saptamışlardır [61]. Protein A kültür sıvısına bakteri yüzeyinde de eksprese edildiği düzeyle korele olarak salgılanmaktadır. Kültür şartlarının değiştirilmesi ile bakteri yüzeyindeki IgBP ekspresyon düzeyinin de değişkenlik gösterdiği farkedilmiştir.

Yapılan çeşitli çalışmalar *S. aureus*'un SpA dışında da Ig bağlayıcı proteinlere sahip olduğunu ortaya koymuştur [38, 62-66]. Bunlar arasında protein Sbi, protein IsaB ve stafilokok süperantijen benzeri toksinler olan SSL7 toksini ve SSL10 toksini sayılabilir. Protein Sbi SpA'nınkine benzer immünoglobulin bağlanma özgünlüğünü gösterir. Birçok başka IgBP'ne benzer şekilde Sbi çok fonksiyonludur ve sadece IgG'yi değil aynı zamanda diğer serum proteinlerini de bağlayabilir. Sbi immunoglobulin molekülleri gibi domainlere sahiptir. Komplemanın C3 bileşenini Sbi domain III ve Sbi domain IV alanlarından bağlar ve böylece alternatif yolak yoluyla kompleman aktivasyonunu uyarır [67]. Bir diğer stafilokok immunoglobulin bağlayan protein olan IsaB molekülünün insan IgM ve IgG moleküllerine non-immün bir şekilde bağlandığı bildirilmiştir [63]. SSL10 ve SSL7, yapısal olarak stafilokok toksin TSST1 ve enterotoksinlere benzeyen stafilokok süper antijen benzeri (SSL) protein ailesinin bir üyesidir. SSL10 spesifik olarak IgG'yi bağlar ve klasik yolak yoluyla kompleman aktivasyonunu inhibe eden komplemanın IgG ve C1q bileşeni arasındaki etkileşimi engeller. SSL7 yüksek afinite ile IgA'ya bağlanmaktadır. IgG molekülündeki SSL10 bağlanma yeri belirsiz iken, SSL7'nin IgA molekülünün Fc kısmına, buradaki CH2 ile CH3 arasındaki bölgeye bağlandığı bildirilmiştir [38].

**Tip II IgBP: A grubu streptokokal IgBP**

Grup A beta hemolitik streptokoklar içerisindeki tek patojen tür olan *Streptococcus pyogenes'in* insanda çeşitli hastalıkların etkeni olup, birçok virulans faktörü de üretmektedir. Bunlar arasında M proteini, H proteini ve M-benzeri proteinler sayılabilir. En önemli virulans faktörü M proteini olup, M proteini üretmeyen suşlar avirulandır. M-benzeri proteinler immünoglobulinleri Fc kısmından bağlama özelliğine sahiptir. Grup A streptokokların çoğu immünoglobulinleri non-immün bir şekilde bağlayabilmektedir, yani IgBP üretmektedir. Bu suşların çoğu hem IgG'yi hem de IgA'yı bağlayabilmektedir. Suşlar arasında IgA'yı bağlama veya IgG alt sınıflarını bağlama açısından farklılıklar bulunmaktadır [68-70].

M proteini farklı yapı ve fonksiyonel özelliklerine sahip bir "süper aile protein grubunu" oluşturur. Bu süper aile içinde Emm, Mrp ve Err olmak üzere üç farklı protein yer alır. Bu üç protein grubu içerisinde de IgBP'ler bulunmaktadır. M protein süper ailesi günümüzde M proteinleri ve M benzeri proteinler olarak da adlandırılmaktadır. [15]. IgG'yi bağlayan M proteinleri fonksiyonel tip II olarak da adlandırılır (Çizelge 2.3). Ancak bu tip içerisinde yer alan proteinlerin IgG molekülerinin bağlama özellikleri farklılık göstermektedir. Bu yüzden farklı insan IgG alt sınıflarını ve hayvan IgG'lerini bağlama özelliklerine göre bu tip II proteinleri (IIa, IIb, IIc, IIo ve II'o) olmak üzere beş ayrı sub tipe ayrılır (Çizelge 2.6). Diğer birçok IgBP'lerde olduğu gibi M proteinleri de multifonksiyonel özelliktedir; insan plazmasında bulunan albümin, fibrinojen ve kininojen gibi çeşitli proteinleri bağlarlar [15].

Çizelge 2.6. Fonksiyonel tip II yaısında farklı IgBP'lerin IgG bağlama profilleri [15].

| **IgG** | **IGBP Alt tipleri** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | IIa | IIb | IIc | IIo | II'o |
| **İnsan IgG1** | + | – | + | + | + |
| **İnsan IgG2** | + | – | – | + | + |
| **İnsan IgG3** | – | + | – | + | + |
| **İnsan IgG4** | + | – | + | + | + |
| **Tavşan IgG** | + | – | + | + | + |
| **Domuz IgG** | + | – | + | + | – |
| **At IgG** | + | – | + | + | – |

H proteini de IgG'yi Fc bölgesinden bağlamaktadır. M ve H proteinlerinin IgG Fc kısımlarına bağlandıkları bölgeler birbirleriyle aynı/örtüşük olabilmektedir. Protein H ve protein M immünoglobulinleri bağladıkları gibi aynı zamanda albümin ve fibrinojen gibi konak proteinlerini de bağlamaktadırlar. Yapılan genetik çalışmalarda, streptokok IgBP genlerinin streptokok M protein süpergen ailesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu grup genler kromozomda birbirine komşu bölgede yer alırlar ve birbirleri ile koordineli bir şekilde regüle edilen *vir* lokusunu oluşturular. Grup A streptokoklarla ilişkili olan tip II IgBP'ler en geniş IgBP grubunu oluştururlar. Bu tip (GAS IgBP'leri) içerisindeki IgBP'ler IgG bağlama etkinlikleri açısından oldukça farklıdırlar [71].

Grup A beta-hemolitik streptokok IgBP'lerinin analiz edilmesi zorluk göstermektedir, çünkü bakterilerin laboratuavar subkültürleri esnasında bu grup proteinleri eksprese etme özelliği ortadan kaybolmaya eğilimlidir [72]. *S. aureus*'larda ise bu ekspresyon sabit bir karakter gösterir.

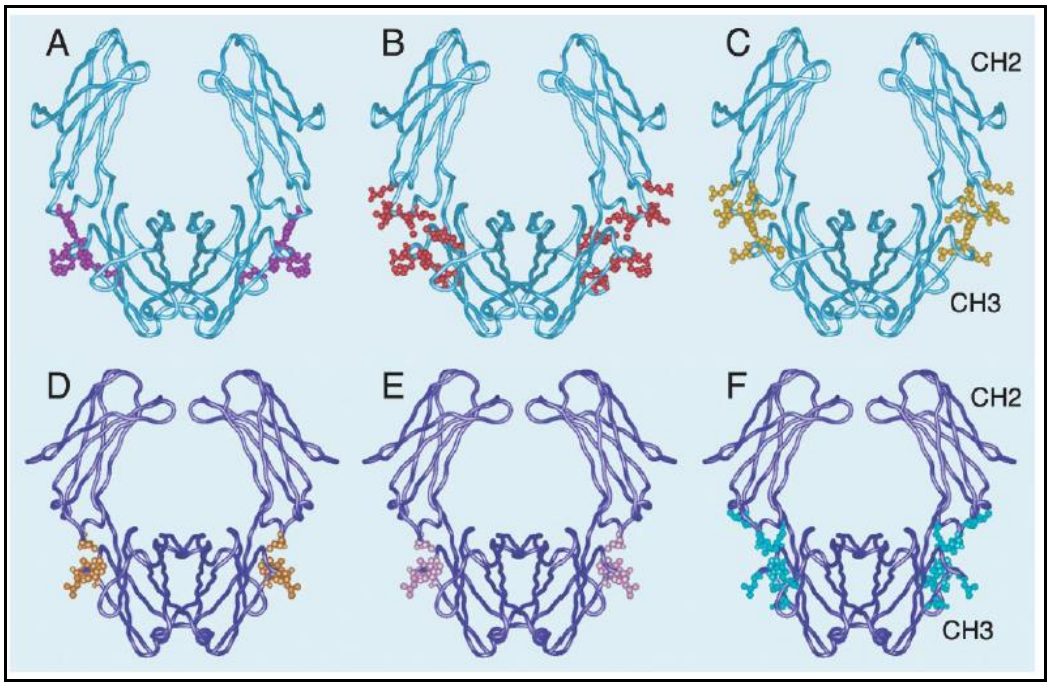
Grup A beta-hemolitik streptokoklarda M süper ailesi dışında farklı türde de IgBP'ler de saptanmştır [72]. Bu molekül SibA (grup A streptokoklardan salgılanan IgBP) olarak adlandırılmıştır. Bu IgBP molekülü insan IgG'sini, tüm IgG alt sınıflarını, Fc ile Fab fragmanlarını, ayrıca IgA ve IgM'yi bağlayabildiği gösterilmiştir. SibA proteininin M proteini, H proteini ve M benzeri proteinler ile benzerliği olmadığı, *vir* lokusu ile de ilişkili olmadığı bildirilmiştir. Bergmann ve ark. 2017 yılında bir hayvan patojeni olan *Streptococcus canis*'in yüksek afinite ile insan IgG molekülünü bağlayan bir IgBP ürettiğini bildirmişlerdir. Bu protein insan IgG'sini bağladığı gibi diğer birçok hayvan türüne ait IgG molekülünü de bağlamaktadır. Diğer streptokokal IgG-bağlayan IgBP'lere benzer şekilde, *S.canis* IgBP'si de IgG'yi Fc bölgesinden bağlamaktadır [73].

**Tip III IgBP: C ve G grubu streptokok IgBP'leri**

Grup C ve grup G beta hemolitik streptokokların hücre duvarında bulunan protein G molekülü bir IgBP olup, IgG molekülünü bağlamakta, aynı zamanda serumda bulunan diğer bazı proteinleri de ($\alpha_2$-makroglobulin, albumin, kininojen gibi) bağlayabilmektedir [74, 75]. Grup C ve G streptokokların çoğu tip III Fc reseptörü eksprese ederler. Protein G molekülü IgG'nin Fc kısmına bağlanmaktadır [75-77]. Protein G SpA'ya göre daha geniş bir IgG

bağlama kapasitesine sahip olup, insan IgG'sinin dört alt sınıfının hepsine ve birçok hayvan IgG'sine bağlanabilmektedir (Çizelge 2.5). Protein G IgG molekülüne SpA'ya göre daha yüksek afinite ile bağlanmaktadır [77]. Protein G molekülü de SpA'daki gibi IgG'nin Fab kısmına da bağlanmaktadır, ancak bu bağlanma özellği Fc kısmına bağlanmasına göre çok daha zayıftır. 1990'lı yılların ortalarında grup C streptokoklar içinde yer alan *S. dysgalactiae'*da SpG benzeri Ig bağlayan bir protein bulunmuş olup, bu proteinin diğer tip III Fc reseptörlerinin aksine insan serum albumini bağlamadığı görülmüştür ve bu protein MIG olarak adlandırılmıştır [78]. Yine *S. dysgalactia*'da bir başka IgBP daha saptanmış olup, bu protein insan serumundaki α2-makroglobulin ve albüminini de bağladığı için MAG olarak adlandırılmıştır [79, 80]. Bu IgBP'ler de IgG'yi bağlama özellikleri açısından tip III Fc reseptörü karakteri taşımaktadırlar.

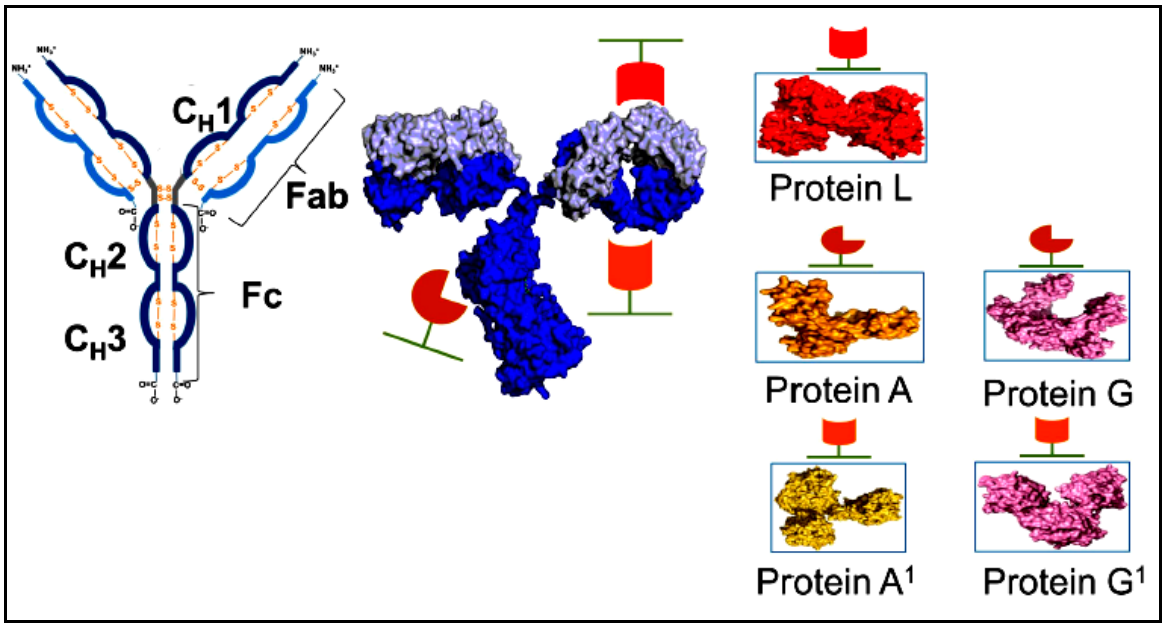
Grup G streptokoklarda bulunan bir başka IgBP ise, insan IgG'sini Fc kısmından bağlayan ve bazı hayvan türlerinin IgG'lerini de bağlayan bir hücre yüzey molekülü olup, FOG proteini olarak adlandırılmıştır. Protein G tüm IgG alt sınıflarına bağlayan bir IgBP olmasına rağmen, FOG proteini IgG1, IgG2 ve IgG4'ü bağlamakta, IgG3'ü bağlayamamaktadır [81]. Grup C streptokok olan *S.equi* subsp. *equie*'de fibrinojeni de bağlayan bir IgBP saptanmıştır. FgBP olarak da adlandırılan IgBP molekülü hem insan IgG'sini hem de farklı hayvan türlerine ait IgG'lerinin Fc bölgelerini bağlamakta ve ayrıca atlara ait IgG'nin Fab bölgesi ile de de zayıf bir şekilde reaksiyon vermektedir [82]. Bakteriyel IgBP'lerden protein A ve protein G yanında *S. equi* subsp. *equi* kaynaklı IgBP esas olarak IgG'nin Fc bölgesindeki ağır zincire ait CH2 ve CH3 domainleri arasındaki bölgeye bağlanmaktadır (şekil 2.9). Bu nitelikte bağlanma yapan IgBP'lerde bağlanmanın tam olması için Fc bölgesindeki her iki domainin varlığına gerek duyulmaktadır. IgG üzerinde bağlanma yerleri detaylı olarak incelendiğinde bağlanma bölgelerinin birbirleri ile örtüştükleri saptanmaktadır [35]. Bu bölge aynı zamanda ökaryot hücre membranında bulunan Fc reseptörlerinin (ör. İnsan CD16, CD32, CD64) de bağlanma yeri olduğundan, bakteriyel IgBP'ler immunoglobulin molekülü-Fc reseptör bağlanmasını engelleyebilirler. Ayrıca *S. pyogenes* kaynaklı Sir22 protein, B grubu streptokok β proteini ve *S. aureus* kaynaklı SSL7 proteinlerinin de insan IgA molekülüne bağlanma yerlerinin Fc bölgesindeki CH2 ve CH3 domainleri arasına olduğu bildirilmiştir [36-38].




Şekil 2-9. Bazı streptokokkal ve stafilokokal IGBP'lerin IgG ve IgA'nın Fc bölgelerinde bağlandığı yerler. IgG (A-C) ve IgA (D-F) ağır zincirlerin CH2 ve CH3 domainleri sırasıyla açık mavi ve koyu mavi olarak belirtilmiştir. Bağlanma bölgeleri açısından, A: *S. equi* fibrinojen bağlayan protein, B: streptokokkal protein G, C: stafilokokkal protein A, D: S. pyogenes kaynaklı Sir22, E: Grup B streptokokal kaynaklı β protein, F: *S. aureus* kaynaklı SSL7 protein [35].

**L grubu *peptostreptococcus magnus*'un IgBP'leri**

Bir anaerob gram pozitif kok olan *Peptostreptococcus magnus*'un klinik izolatlarının yaklaşık %10'unun yüzeyinde saptanan protein L molekülü antijen-antikor bağlanmasını etkilemeksizin immunoglobulin molekülündeki kappa hafif zincirinde bulunan V domainine doğrudan bağlanmaktadır [83-85]. Protein A ve protein G molekülleri de immunoglobulin Fab bölgesine bağlanabilmektedir, ancak bu bağlanma hem zayıf bir şekilde gerçekleşmektedir, hem de bağlanma ağır zincir aracılığı ile olmaktadır (Şekil 2.10).




Şekil 2-10. İmmunoglobulin molekülünde hem Fc hem Fab bölgelerine bağlanabilen bazı bakteriyel IGBP'ler [39, 40].

*Peptostreptocoocus magnus* kaynaklı IgBP'nin protein L olarak adlandırılmasının sebebi, immünoglobulin molekülünün hafif (light) zincirine bağlanma özelliğinin olmasıdır. PpL immünoglobulin bağlama özelliğine açısından geniş bir çeşitliliğe sahiptir; immünoglobulin molekülünün kappa hafif zincirine bağlandığı için tüm antikor sınıflarına afinite göstermektedir. PpL birçok farklı hayvan türünün immünoglobulinine bağlanabilmektedir [86]. Protein L'nin antikora bağlanması, IgG molekülünün antijen bağlama alanının yakınında gerçekleşmesine rağmen, antijenin bağışık tanımada yer alan hiperdeğişkenli antikor bölgelerini içermez. Bu alışılmadık bağlanma spesifitesi protein L'nin herhangi bir immunoglobulin alt sınıfını bağlamasına izin verir [16, 83-86]. Bu özelliği sebebiyle protein L molekülü antikor molekülünün çeşitli amaçlarla izole edilmesi ve çalışılmasına olanak sağlayan oldukça faydalı bir immünokimyasal bir araçtır. Protein L'nin immünoglobuin hafif zincirine bağlanması fizyolojik açıdan önemlidir. Protein L bazofilleri stimüle ederek (muhtemelen bazofil hücre membranlarında bulunan IgE'ye bağlanarak) histamin salınımına yol açmaktadır [15]. Protein L ekspresyonu *P. magnus* suşlarının ancak bir kısmında (%10) görülmektedir [87]. Protein L ekspresyonunun bakteri virulansı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [88].

### 2.4.2. Gram negatif bakterilerin IgBP'leri

#### *Yersinia* IGBP'leri

*Yersinia* cinsi içinde yer alan *Yersinia pestis*'te eskiden beri bilinin bir virulans faktörü olan pH6 antijeninin aynı zamanda immünoglobulin bağlama özelliğine de sahip olduğu saptanmıştır. Bu Fc reseptörünün insan IgG1, IgG2 ve IgG3 molekülleri ile reaktif olduğu; tavşan, fare ve koyun gibi çeşitli hayvan türleine ait IgG'leri bağlamadığı bildirilmiştir. pH6 antijeninin IgG molekülün CH2 domaini ile etkileşerek bağlandığı ileri sürülmüştür [89]. pH6 proteininin ekspresyonu hafif asifik pH'da gerçekleşmektedir. *Yersinia pseudotuberculosis*'te insan ve tavşan IgG'sinin Fc kısmı ile bağlanabilen bir IgBP olduğu bildirilmiştir [28, 29]. Bu IgBP'nin ekspresyonunun kültür şartlarına, ortamın sıcaklığına ve pH'sına bağlı olarak değişkenlik gösterdiği bildirilmiştir. Buna göre en yüksek aktivitenin glukoz içeren sıvı besiyerinde ve üremenin durağan fazında gerçekleştiği, pH6.0'da daha yüksek bağlanma özelliği olduğu, IgBP sentezinin +4ºC'de aktive olduğu olduğu, 37ºC'de belirgin bir şekilde azaldığı saptanmıştır [90].

#### *Escherichia coli* IgBP'leri

*Escherichia coli* kaynaklı IgBP'lerin altı üyeden oluşan Eib-proteinleri olarak adlandırılan bir aileyi oluşturdukları bidirimiştir; bunlar Eib A, C, D, E, F ve G proteinleridir. Eib proteinleri IgG'nin Fc kısmına bağlanmaktadır. Bir *E. coli* suşu ile yapılan çalışmada, *E. coli* IgBP'lerinin maksimum ekspresyonunun sabit büyüme fazı boyunca, 37°C'de gözlendiği bildirilmiştir. Bunlar arasında Eib-G proteininin ayrıca IgA molekülüne de bağlanabildiği saptanmıştır [30, 31, 91].

#### *Haemophilus somnus* IgBP'leri

Sığırların büyük bir kısmında hastalılığa yol açan bir bakteri olan *Haemophilus somnus*'un antikor bağlayan protein ürettiği, bu IgBP'nin aynı zamanda kültür sıvısına da salgılandığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda *Haemophilus somnus* immünoglobulin moleküllerini Fc bölgesinden bağlayan farklı molekül ağırlıklı antikor bağlayıcı proteinlere sahip olduğu; yüksek molekül ağırlıklı IgBP'lerinin sığır IgG2'sini yüksek bir afiniteyle bağladığı, düşük

molekül ağırlıklı IgBP'nin ise IgG1 ve IgG2'ye zayıf bir şekilde bağlandığı bildirilmiştir [25, 92].

### *Prevotella intermedia* IBP'leri

Anaerobik *Prevotella intermedia* temel olarak diş eti ve periodontal enfeksiyonlarda rol oynayan gram negatif bir bakteridir. *P. intermedia* hücre yüzeyinde eksprese edilen IgBP'si insan IgG'sinin Fc kısmına bağlanma özelliği göstermektedir. Bu IgBP aynı zamanda insan IgG'sinin $F(ab')_2$ parçasına da zayıf bir şekilde bağlanmaktadır. Ayrıca, maymun, domuz ve sığır IgG'si ile kısmen etkileşime girdiği, ancak tavşan, fare, sıçan ve koyun IgG'si ile bağlanmadığı bildirilmiştir [18].

### *Pseudomonas maltophilia* IgBP'ler

*Pseudomonas maltophilia'*dan izole edilen 30-kDa molekül ağırlıklı IgBP'nin immünoglobulinleri Fc kısmından bağladığı saptanmıştır. Bu IgBP'nin insan IgG'sinin tüm alt sınıflarını ve çeşitli hayvan türlerine (tavşan, fare) ait IgG molekülünü yüksek afinite ile bağladığı, ayrıca fare IgA molekülüne de bağlandığı bildirilmiştir. Bu antikor bağlayan proteininin karışık bir süspansiyondan fare IgA molekülünün elde edilmesinde yararlı olacağı belirtilmektedir [33].

### *Fusobacterium nucleatum* IgBP'leri

*Fusobacterium nucleatum* ağız boşluğunda bulunan, periyodontal hastalıklara ve çeşitli anaerob enfeksiyonlara yol açan bir oral bakteridir. *F. nucleatum* yüzeyindeki porin benzeri bir proteinin insan IgG'sinin Fc bölgesini bağlayabildiği gösterilmiştir. Bunun bir virulans faktörü olarak da rol oynayabileceği ve konak immün sisteminden kaçınmada rol oynadığı ileri sürülmüştür [93].

### *Helicobacter pylori* IgBP'leri

*Helicobacter pylori'*nin bazı suşlarında immünoglobulinleri non-immün bir şekilde bağlayabilen 60 kDa'luk bir IgBP tespit edilmiştir [24]. Bu proteinin insan IgGl, IgG3 ve IgM moleküllerini bağladığı, ancak insan IgA'sı, tavşan ve fare IgG'si ile reaksiyona girmediği saptanmıştır. İmmünoglobulin molekülüne bağlanmanın insan IgG kappa zincirleri ile inhibe olması, bu IgBP'nin aynı *Peptostreptococcus magnus* IgBP'si gibi Fab aracılığı ile antikorlara bağlandığını göstermektedir [34].

### *Haemophilus influenzae* IgBP'leri

*Haemophilus influenzae* tip b'de eksprese edilen protein D molekülünün insan IgD'sini non-immün bir şekilde bağlama özelliğine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu IgBP'nin insan IgD molekülünü bağladığı ve incelenen tüm *H. influenzae* tip b suşlarında rastlandığı bildirilmiştir [94].

### *Moraxella catarrhalis* IgBP'leri

*Moraxella catarrhalis'*in bazı suşlarında dış membranlarında insan IgD'sine bağlanan bir IgBP bulunmaktadır. İnsan IgD'sine güçlü bir afinite göstermekte olan bu IgBP MID olarak adlandırılmıştır. MID eksprese eden *Moraxella*'ların insan lenfositleri üzerinde mitojenik etki gösterdiği, T lenfosit sitokinleri varlığında B lenfositlerini stimüle ettiği ve anti-IgD monoklonal antikorlarının ortama eklenmesiyle bu stimülasyonun ortadan kalktığı bildirilmiştir [95, 96].

### *Taylorella equigenitalis* IgBP'leri

Bir gram negatif kokobasil olan *Taylorella equigenitalis* atlarda genital enfeksiyona neden olur. *T. equigenitalis* non-immün bir şekilde immünoglobulinleri bağlama özelliğine sahiptir. Bu bakterinin IgG'yi güçlü bir şekilde bağladığı, IgM ile bağlanmasının zayıf olduğu ve IgA'yı bağlayamadığı görülmüştür. Bakterinin atların IgG'sinin hem Fab hem de Fc fragmanlarını bağladığı, insan IgG'sini de zayıf bir şekilde bağladığı bildirilmiştir [97].

## 2.5. Paraziter İmmünglobulin Bağlayan Proteinler

### *Schistosoma* IgBP'leri:

*Schistosoma mansoni* parazitlerinde, hem erişkin hem de larval şekillerinde, insan IgG molekülünün Fc bölgesini seçici olarak bağlayan, ancak Fab fragmanını bağlamayan Fc reseptörü bulunduğu. Parazitte bulunan bu Fc reseptörü aynı zamanda kompleman C3 proteinini de bağlayabilmektedir. IgG'nin ve C3'ün bağlanmasının, parazitin immün sistemden kaçmasına yardımcı olduğu belirtilmektedir [50, 51].

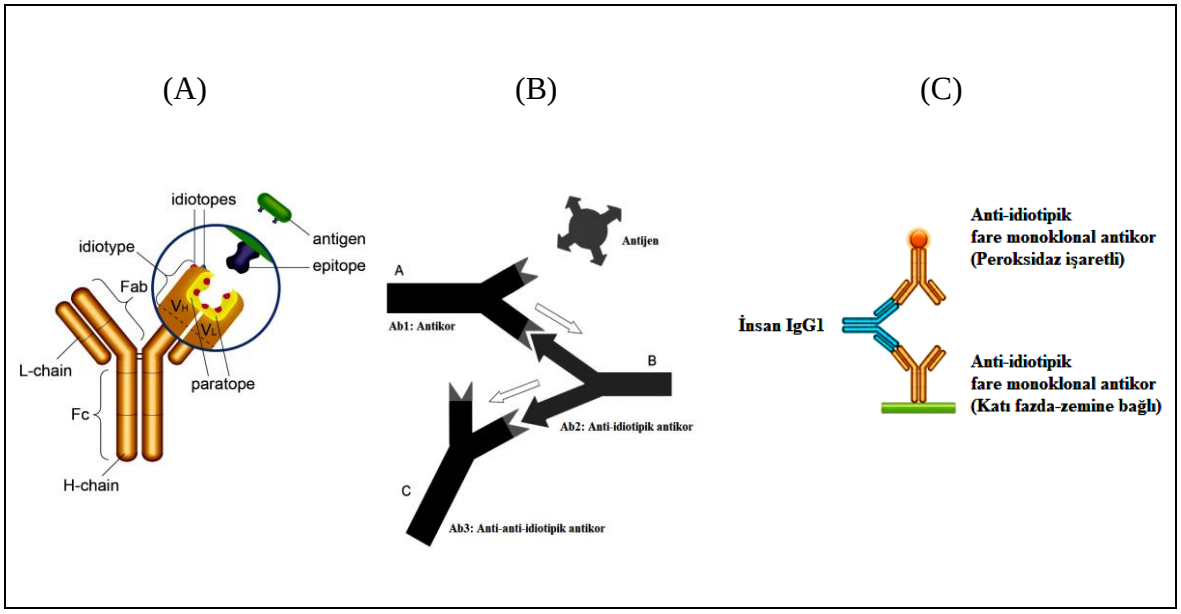
Bakteriyel IgBP'ler immünolojide, biyokimyada, tıp ve biyomühendislikte yaygın olarak kullanımları yanısıra değişik laboratuvar test sistemlerinde de çok yönlü kullanılan önemli araçlar haline gelmiştir. Hatta konunun önemini göstermesi açısından, antikor saflaştırılması veya varlığını göstermek için daha güçlü bağlanan ajanlar olarak günümüzde protein A, protein G ve protein L moleküllerinin immünoglobulin bağlayan domainleri üzerinden A/G, G/L ve L/A gibi hibrid proteinler oluşturulmuştur (Çizelge 2.7). Tıbbi amaca yönelik IGBP'lerin kullanıldığı uygulama alanlarının zamanla daha da gelişeceği açıktır.

Çizelge 2.7. Antikor saflaştırmak için kullanılan IgBP'lerin bazı genel özellikleri.

| | **Doğal Protein A** | **Rekombinant Protein A** | **Rekombinant Protein G** | **Rekombinant Protein A/G** | **Rekombinant Protein L** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Doğal kaynak** | S. aureus | S. aureus | Streptococcus | | P. magnus |
| **Üretim kaynağı** | S. aureus | E. coli | E. coli | E. coli | E. coli |
| **MW (Da)** | 46,700 | 44,600 | 21,600 | 50,460 | 35,800 |
| **SDS-PAGE MW** | 42kDa | 45kDa | 32kDa | 40-45kDa | 36kDa |
| **Ig bağlama bölge sayısı** | 5 | 5 | 2 | 4+2 | 4 |
| **Albumin bağlama bölgesi** | Yok | Yok | Yok | Yok | Yok |
| **Ig bağlama optimum pH değeri** | 8.2 | 8.2 | 5 | 5-8.2 | 7.5 |
| **Ig bağlanma hedefi** | Fc | Fc | Fc | Fc | VL-kappa |

Bu çalışmada bakteri yüzeyinde bulunan IgBP'lerin saptanmasına yönelik orijinal, üstün ve pratik bir tarama testinin geliştirilmesi, doğrulanması ve uygulamadaki etkinliğinin denenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, şimdiye kadar literatürde tanımlananlardan farklı ve

“anti-idiotipik antikor tabanlı” olarak adlandırdığımız etkin bir tarama sisteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışma esası Şekil 11’de belirtilmiştir.




Şekil 2-11. Anti-idiotipik antikor tabanlı ELISA sisteminin çalışma prensipleri. A: Antikorda idiotipik alanlar, B: Anti-idiotipik antikor oluşumu, C: Anti-idiotipik antikorlar ile idiotipik antikor bağlama/saptama yöntemi.

# 3. GEREÇ VE YÖNTEM

## 3.1. Malzemeler

Aşağıda belirtilen malzemeler ilgili firmalardan temin edildi.

### 3.1.1. Kimyasal malzemeler

NaCl, KCl, $Na_2HPO_4.2H_2O$, $KH_2PO_4$, $Na_2CO_3$, $NaHCO_3$, Sodium azide ($NaN_3$) ve %37'lik HCl Merck Firma'sından temin edildi. Sığır serum albumin (BSA, Fraction V, 126593), Tetrametilbenzidin (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)) ve Tween-20 malzemeleri Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir.

### 3.1.2. Besiyerleri ve standart bakteri suşu

1. Columbia koyun kanlı agar (bioMerieux, SA-France).
2. Mueller-Hinton agar (bioMerieux, SA-France).
3. Çikolata agar besiyeri (bioMerieux, SA-France).
4. Sabouraud-Dextrose agar (bioMerieux, SA-France).
5. *Staphylococcus aureus* Cowan 1 suşu (Türk Halk Sağlığı Kurumu, NCTC 8530, ATCC 12598).

### 3.1.3. Hazırlanan tamponlar ve solusyonlar

**10x Fosfat tamponlu tuz (phosphate buffered saline, PBS)**

80 gram NaCl
2 gram KCl
14,4 gram $Na_2HPO_4.2H_2O$
2,4 gram $KH_2PO_4$
0,8 Litre distile su ($dH_2O$)

Çözünme tamamlandıktan sonra toplam volum distile su ile 1 Litre'ye tamamlanır. Hazırlanan

pH'ı 6,8 olan bu 10X PBS, distile su ile 1xPBS haline getirildiğinde pH 7,4 olmaktadır.

### 3.1.3.2. 1x Fosfat tamponlu pH tuz (phosphate buffered saline, PBS) pH 7,4

Bir hacim 10X PBS ile 9 hacim distile su karıştırılarak hazırlanır. 1X PBS her defasında kullanılacağı miktarda taze olarak hazırlanmaktadır.

### 3.1.3.3. Yıkama tamponu

Bir Litre 1X PBS pH 7.4 içerisine 5 mL %10'luk distile su içerisinde tween 20 eklenerek (Tween 20'nin final konsantrasyonu % 0.5 olmaktadır) ve iyici karıştırılarak hazırlanır.

### 3.1.3.4. Kaplama tamponu (0.05M Karbonat-Bikarbonat, pH9,6) [98]

3,70 gram Sodyum Bikarbonat ($NaHCO_3$)
0,64 gram Sodyum Karbonat ($Na_2CO_3$)
1 Litre distile su ($dH_2O$)

Tamamen çözünen tampon pH 9,6 olmaktadır.

**3.1.3.5. Bloklama solusyonu** BSA içeren (%3 (weight/Volum; W/V) Kaplama Tamponu) [99, 100].

3 gram BSA
100 mL Kaplama Tamponu

**3.1.3.6. Durdurma solusyonu** (1N HCl)

50 mL %37'lik HCl
450 mL distile su

### 3.1.3.7. ELISA tamponu (ET)

1 gram BSA
100 mL 1X PBS

#### 3.1.3.8. Azidli dilüsyon solusyonu (DS)

0.1 gram Sodyum Azid
1 gram BSA
100 mL 1X PBS

### 3.1.4. ELISA plaklari

ELISA plağı olarak yüksek bağlama kapasiteli 96-kuyucuklu, düz tabanlı polistiren plak (Nunc plate, Cat no: 446612, Thermo Fisher) kullanıldı.

### 3.1.5. Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan ve aşağıda özellikleri belirtilen cihazlara ait fotoğraflar ayrıca Resim 1 olarak da sunulmuştur.

1. **MALDI-TOF kütle spektrofotometri:** VITEK MS model (Biomerieux, SA-France).
2. **Bakteriyolojik etüv:** Shell Lab marka bakteriyolojik etüv (1535 II E model).
3. **ELISA yıkayıcı:** ELISA otomatik yıkayıcı, ELx50 model (BioTek marka (BioTek Instruments, USA).
4. **ELISA okuyucu:** Sunrise-TS/TW model (Tecan, Grödig, Austria).
5. **Mikrosantrifüj cihazı:** 1-15 model, Sartorius-Sigma marka (Sartorius AG, Germany).
6. **Elektronik hassas terazi:** AY 120 model, Shimadzu marka (Shimadzu Corporation, Japan).
7. **Elektronik ısı kontrollü etüv:** MCO-18AIC model, Sanyo marka (Sanyo, Japan).

### 3.1.6. Antikorlar

Aşağıda belirtilen antikorlar Tanı Medikal Firma'sından (Tanı Medikal, Ankara, Türkiye) temin edildi.

1. **Test antikoru (İdiotipik antikor, IA):** Test antikoru olarak kullanılan bu idiotipik antikor, rekombinant insan immunoglobulin G1 kappa (ıgG1κ) yapısında ve Tocilizumab (Actemra®) isimli tedavi amaçlı kullanılmakta olan bir ilaçtır. Tocilizumab, insan interlökin 6 (IL-6) sitokin reseptörüne spesifik humanize edilmiş (insansılaştırılmış) %100 saflıkta bir idiotipik insan monoklonal antikordur.
2. **Anti-idiotipik antikor (AIA):** Yukarıda özelliği belirtilen Tocilizumab'ın Fab ucundaki idiotipik epitopa (idiotop, antijenik determinant) spesifik bağlanan fare monoklonal antikor (bu da fare IgG1κ yapısında). Plak kaplaması için temin edilen AIA 100 kat konsantredir.
3. **Peroksidaz enzim işaretli anti-idiotipik antikor (POD-AIA):** Yukarıda belirtilen anti-idiotipik antikorun (AIA) "Horseraddish Peroxidase" enzimiyle bağlanarak hazırlanmış ve konjugat olarak kullanılan şeklidir. Stabilize ve 100 kat konsantredir.

Resim 3.1. Çalışmada kullanılan ana cihazların fotoğrafları.



## 3.2. Bakterilerin Eldesi ve Tiplendirmesi

Gazi Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi, Gazi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilmiş olan çeşitli klinik örneklerden üreyen bakterilerin "tam otomatik mikroorganizma tanımlama/antibiyotik duyarlılık sistemi" ile (MALDI-TOF MS, VITEK; Biomerieux, SA France) tiplendirilmesi sonrası seçilen izolatlar çalışmaya alındı. Klinik örnekler mikrobiyoloji laboratuvarında rutin kültür işlemine tabi tutulduktan sonra, izolatların tanımlanması için MALDI-TOF MS sistemi kullanıldı. Çalışmaya farklı hastalardan izole edilen örnekler dahil edildi, aynı hastadan izole edilen aynı mikroorganizmalar çalışmaya alınmadı. Çalışmadaki klinik örneklerden üremiş olan maya mantarlarının tür düzeyinde tanımlanması ise germ tüp ve karbohidrat asimilasyon testleri (API-ID 32C, Biomerieux, SA France) ile yapıldı.

### 3.2.1. Bakterilerin saklanmasi

İzolatlar çalışma gününe kadar microbank boncuklu bakteri saklama viyalleri içerisinde derin dondurucuda (-30°C) saklandı. Zor üreyen, saklanması zor olan bakterilerin ve çalışmaya alınan az sayıdaki anaerob bakterinin -30$^{o}$C'de saklama sonrası canlanmama ihtimali gözönüne alınarak, bu suşlar izole edildikleri gün işleme alındı.

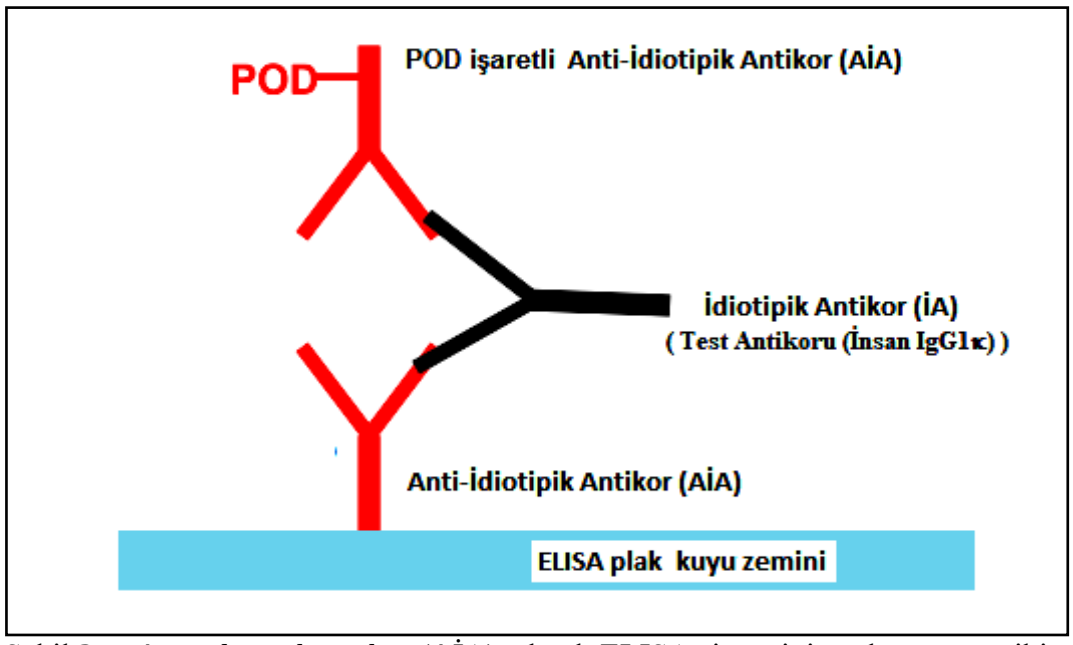
### 3.2.2. Bakterilerin çalişma şartlarina hazirlanmasi

Microbank bakteri saklama viyalleri içerisinde dondurularak saklanmış olan bakteriler çalışmadan iki gün önce çıkartılıp oda ısısında 5-10 dak. bekletildikten sonra bakterileri canlandırmak için kanlı agar ve Mueller-Hinton agara pasaj yapıldı (mayaları canlandırmak için kanlı agar ve Sabouraud-Dextrose agar kullanıldı; *Haemophilus* cinsi bakteriler için çikolata agar kullanıldı), 24 saat etüvde 36°C'de bekletildi, daha sonra üremiş olan bakteriler DS içerisinde 5 McFarland derişimi hazırlandı, hazırlanan derişim ELISA çalışmasında kullanıldı.

## 3.3. Anti-İdiotipik Antikor (AIA) Tabanli ELISA Sistemi

Şekil 3.1'de çalışma esası çizilen ve IgBP taşıyan bakterilerin saptamasına yönelik kullanılan tarama sistemi anti-idiotipik tabanlı bir ELISA ölçüm sistemidir. ELISA plağı anti-idiotipik antikor ile kaplıdır. Kuyucuklara eklenen örnek içerisinde eğer özgül olduğu

idiotipik antikor var ise bunu spesifik olarak bağlayacaktır, bu bağlama ortamdaki idiotipik antikor miktarı ile doğru orantılı olacak ve bağlanmış olanlar yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaşmayacaktır. Zemindeki anti-idiotipik antikor aracılığı ile bağlanmış olan idiotipik antikor, ortama eklenen enzim ile işaretli anti-idiotipik antikor'a da bağlanacaktır. Çünkü test antikoru olarak kullanılan idiotipik antikor insan IgG1 olup spesifik bağlanmadan sorumlu özdeş iki adet Fab ucu bulunmaktadır. Dolayısıyla ortamda test antikoru olan idiotipik antikor var ise miktarıyla orantılı olarak köprü bağlanması yapacak, o ölçüde renklenmeye neden olacak ve nicel (kantitatif) bir ölçüm sistemi oluşturacaktır. Bu amaçla kullanılacak olan sistemin parçaları aşağıdaki şekil (3.1)'de hazırlanmıştır.




Şekil 3-1. Anti-idiotipik antikor (AİA) tabanlı ELISA sisteminin çalışma prensibi.

### 3.3.1. Anti-idiotipik antikor kaplı ELISA plak hazirlanmasi

Bu amaçla 100X olan 500µg/mL anti-idiotipik antikor [101, 102], kaplama tampon içerisinde 1X haline getirilerek yüksek bağlama kapasiteli ELISA plağına kuyucuk başına 100 µL olarak (100 µL/kuyucuk) dağıtım yapıldı. Oda ısısında (20-25$^{o}$C) 4 saat bekletilerek kaplanan plaklar yıkama cihazında yıkama solusyonu kullanılarak 3 kez yıkandı ve plakların her bir kuyucukuna 200 µL bloklama solusyonu dağıtılarak oda ısısında 1 saat bekletilti. İnkübasyon sonunda tekrar kaplanan plaklar yıkama cihazında yıkama solusyonu kullanılarak 3 kez yıkandıktan sonra ELISA çalışmalarında kullanıldı.

### 3.3.2. Anti-idiotipik antikor tabanli ELISA çalışma basamaklari ve değişkenlerin belirlenmesi

ELISA çalışma basamakları, her basamakta kullanılan örnek ve reaktiflerin miktarı, bekletilme süreleri, ara işlemler ve değerlendirme ana hatları ile şu şekildedir:

1. Anti-idiotipik antikor kaplı plakta kullanılacak olan miktardaki kuyucuklara önce 100 µL ELISA tamponu eklenerek kullanıma hazır hale getirildi. İlgili kuyucukların her birinin içerisine kendisine karşılık gelen ve çalışmadaki değişkeni yansıtan örneğe ait 75µL dilüsyon solusyonu eklendi. Eklenen dilüsyon solusyonu içerisinde test antikoru içermiyor olabilir, belirli miktarda test antikoru içeriyor olabilir veya mikroorganizma ile muamele edildikten sonra geriye kalan miktarda test antikorunu içeren bir örnek de olabilmektedir. Bu durum aşağıda açıklandığı üzere değişik deney modellemelerine göre doğal olarak değişebilmektedir.
2. İçerisinde 100 µL ELISA tampon bulunan kuyucuklara 75 µL dilusyon solusyonu eklendikten sonra yapışkan bant ile kapatılan plak 60 dakika oda ısısında bekletildi.
3. İnkübasyon sonrası plak kuyucukları otomatik yıkayıcıda yıkama solusyonu kullanılarak 3 kez yıkandı. Plak ters çevrilerek kuyucuk içeriği boşaltıldıktan sonra yine plak ters pozisyonda tutularak havlu kağıda birkaç kez yumuşak şekilde vurmak suretiyle içeriğin tamamen boşalması sağlandı.
4. Kullanım sırasında ELISA tamponu içerisinde 1X hale getirilen konjugattan (POD-AİA) kuyucuk başına 100 µL dağıtım yapıldıktan sonra yapışkan bant ile tekrar kapatılan plak oda ısısında 60 dakika bekletildi [103].
5. İnkübasyon sonrası plak kuyucukları otomatik yıkayıcıda yıkama solusyonu kullanılarak 3 kez yıkandı. Plak ters çevrilerek kuyucuk içeriği boşaltıldıktan sonra yine plak ters pozisyonda tutularak havlu kağıda birkaç kez yumuşak şekilde vurmak suretiyle içeriğin tamamen boşalması sağlandı.
6. Kullanıma hazır halde olan enzim substratı TMB'den kuyucuk başına 100 µL dağıtım yapıldıktan sonra oda ısısında ve karanlık bir ortamda 10 dakika bekletilerek renklenme reaksiyonu gerçekleşti.
7. Süre sonunda kuyucuk başına 100 µL 1N HCl durdurma solusyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve ELISA okuyucu kullanılarak optik dansite (OD) değerleri belirlendi. Okuma 450nm referans 620nm olacak şekilde ayarlanarak net optik

dansite değerleri elde edildi.

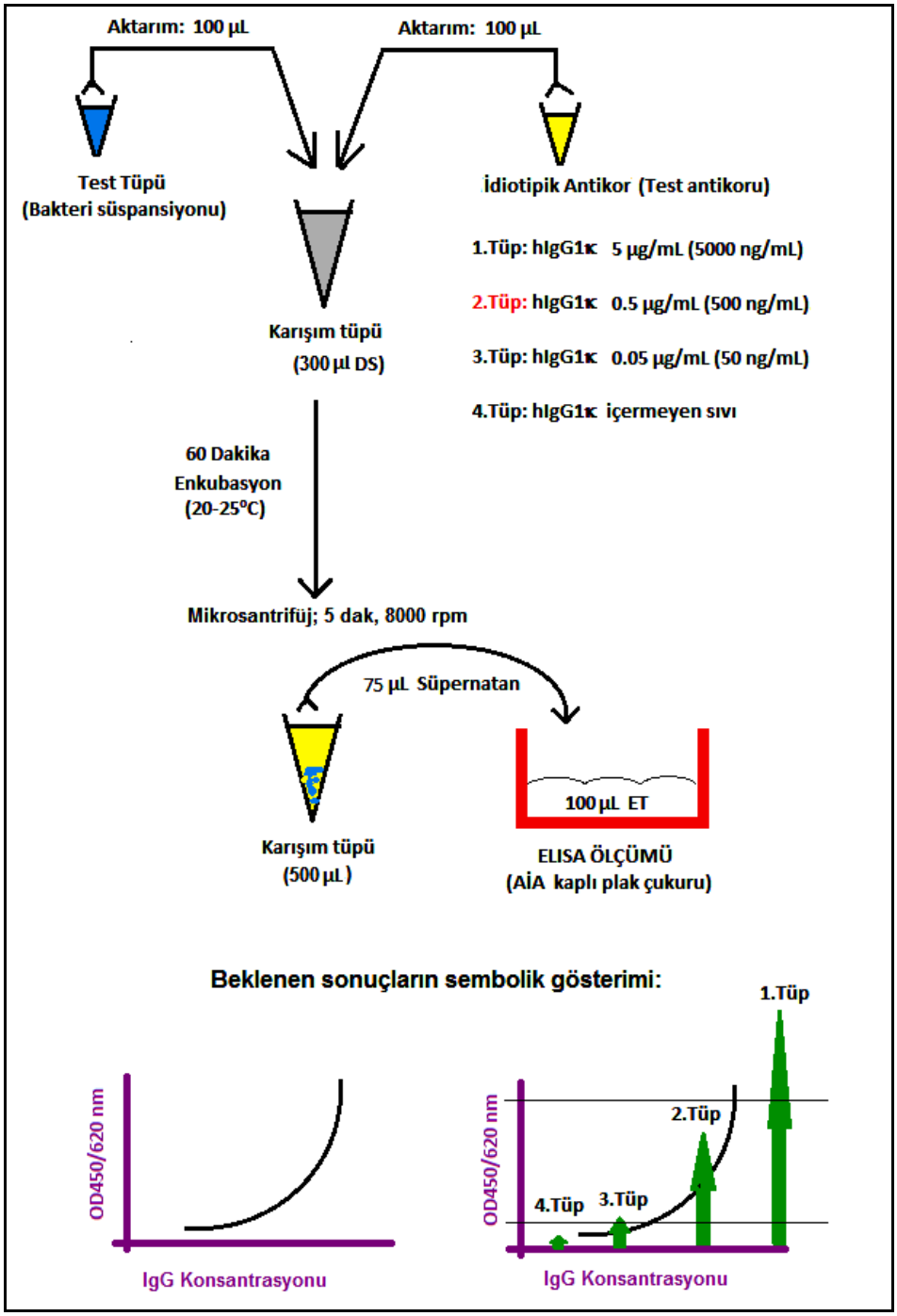
8. Standard eğrinin oluşturulması, optik dansite değerlerinin lineer Y eksenine, idiotipik antikor miktarının ise semi-log X eksenine yerleştirilmesiyle oluşturuldu. Sonuçların nicel değeri ise standard eğri kullanılarak hesaplandı.

### 3.4. ELISA Sisteminde Test Antikorun Çalışma Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Şekil 3.2'de ana hatları belirtilen bu çalışmada, IgBP taşıyan bakteri saptanmasına yönelik olarak bakterilerin üzerine eklenecek test antikorunun (idiotipik antikor) sabit kullanım konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Anti-idiotipik antikor tabanlı ELISA sisteminde oluşan reaksiyon ortamdaki idiotipik antikor miktarı ile orantılı olup, konsantrasyon ile doğru orantılı sonuç vermektedir. Her defasında değişen konsantrasyonlarda idiotipik antikor kullanılması sonuçların değişkenliğine neden olacaktır. Bu açıdan, herşeyden önce çalışmanın standart olması için de standart bir değer belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla, değişik konsantrasyonlarda idiotipik antikor kullanılarak elde edilen standard eğride değişikliklere en hassas olan "dinamik aralığa" karşılık gelen bölgenin orta noktasını yansıtacak idiotipik antikor konsantrasyonu belirlenmeye çalışıldı.

Ayrıca daha sonraki deneysel çalışmalarda içerisinde sabit miktarda bakteri bulunan 100 µL örnek ile belli konsantrasyondaki 100 µL test antikoru içerisinde 300 µL dilüsyon solüsyonu bulunan ependorf tüpe aktarılarak burada karıştırılacaktır. Belirli bir inkübasyon süresi sonrası santrifüj edilerek tüp dibine çöken bakterilerin üstündeki sıvıdan örnek alınacak ve ortamda kalan test antikorunun miktarı belirlenebilecek ve başlangıç miktarına göre karşılaştırma yapılabilecektir. Bu şekilde kurgulanan bir sistem ile elde edilecek sonuçlardan ana hatları ile şu çıkarımlar yapılabilecektir; a) Test edilen bakteri IgBP taşımıyor ise üzerine eklenen test antikorunu bağlamayacaktır. İnkübasyon sonunda santrifüj edilen ependorf tüpte bakteriler dibe çökecek fakat test antikorunu yüzeyine bağlamadığı için kendisiyle birlikte dibe götüremeyecek, dolayısıyla süpernatandaki test antikorunun konsantrasyonu değişmeyecek, başlangıçtaki ekleme anındaki konsantrasyonu koruyacaktır ve süpernatandan alınan örneğin ölçümü ile bu doğrulanacaktır. b) Test edilen bakteri IgBP taşıyor ise üzerine eklenen test antikorunu yüzeyine bağlayacaktır. İnkübasyon sonunda santrifüj edilen ependorf tüpte bakteriler dibe çökerken kendileriyle birlikte hücre yüzeylerine bağladıkları test antikorunuda tüp dibine taşıyacaklar. Dolayısıyla

süpernatandaki test antikorunun konsantrasyonu azalacaktır. Başlangıçtaki ekleme anındaki konsantrasyona göre olan bu azalma miktarı ilgili bakterinin taşıdığı IgBP'nin miktarı ve/veya bağlama gücüyle (afinite) doğrudan ilişkili olacaktır.




Şekil 3-2. İdiotipik test antikor çalışma konsantrasyonunun belirlenmesi

Yukarıda belirtilen amaca yönelik açıklamalar eşliğinde test antikor konsantrasyonunun belirlenmesi için yapılan çalışma basamakları maddeler halinde şu şekilde gerçekleştirildi.

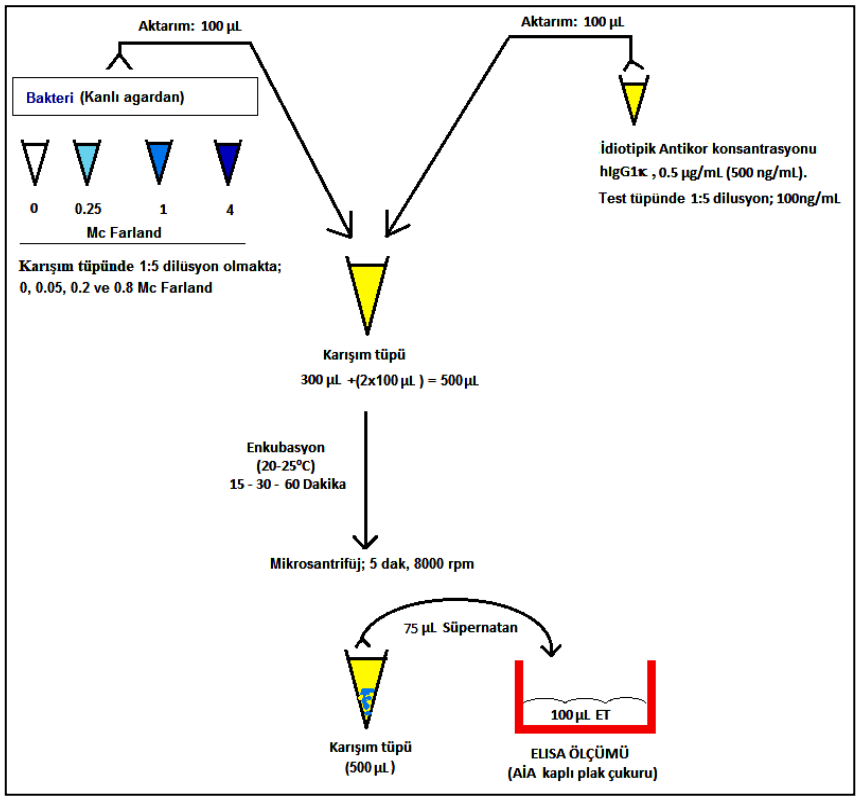
1. Test edilecek bakteri örneğini temsil etmek üzere içerisinde sadece dilüsyon solüsyonu bulunan ependorftan 100 µL örnek alınarak, içerisinde 300 µL dilüsyon solüsyonu bulunan karışım tüpüne eklendi. Santrifüj sonrası pipet ucuna bakteri bulaşı olmadan kolay süpernatan örneği alabilmek ve gerektiğinde tekrar ölçüm yapabilmek için süpernatan örneğini yedeklemek amacıyla da karışım tüpüne 300 µL ekstra ekleme ile volum artışı sağlandı.
2. Dilusyon solusyonu içerisinde 5000-500-50 ng/mL konsantrasyonlarda test antikoru içeren ve içermeyen 4 ayrı örnekten 100 µL alınarak kendilerine karşılık gelen karışım tüplerine eklendi. Bu aşamada ortamdaki test antikorunun konsantrasyonu 1:5 dilue olmaktadır.
3. Test edilen bakterinin hücre yüzeyinde IgBP var ise, ortama eklenen test antikorunu yüzeyine bağlaması için oda ısısında 60 dakika enkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda mikrosantrifüj cihazında 8000 rpm'de (route per minute) 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatandan 75 µL alınarak içerisinde 100 µL ELISA tamponu bulunan kuyucuklara aktarılarak ölçüm yapıldı. Çalışmanın bundan sonraki aşamaları daha önce tanımlanan anti-idiotipik antikor tabanlı ELISA ölçümündeki gibi aynı şekilde gerçekleştirildi.

### 3.5. Bakteri Miktarinin ve İnkübasyon Süresinin Tarama Sistemine Etkisi

Giriş bölümünde de belirtildiği üzere, bazı bakterilerde bulunan IgBP'ler diğer bakterilerde olana göre antikora çok daha yüksek veya düşük afinite ile bağlanabilmektedir. Ayrıca bakterilerde bulunan IgBP'nin hücre yüzeyinde ekspresyon düzeyi kullanılan besiyerine ve çoğalma şartlarına göre değişebilmektedir. Bu nedenle referans olabilecek bir bakteri ve besiyeri kullanılarak tarama testinin etkin şekilde kullanılabilmesine olanak verebilecek en az ne kadar bakterinin ortama eklenmesi gerektiğine yönelik bir ölçüte ihtiyaç olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca test edilecek bakteri üzerine eklenen referans antikor ile yeteri düzeyde bir bekletilme süresinin saptanmasına ihtiyaç olduğu anlaşılmaktadır. Bu sebeple, (Şekil 3.3)'de ana hatları belirtilen bu çalışmada, IgBP taşıyor mu diye test edilecek bakteriden ne kadar kullanılacağı belirlenmeye çalışıldı. Bu amaca yönelik olarak da laboratuvarların vazgeçilmez besiyeri öğelerinden biri olan koyun kanlı agar besiyerinde üretilmiş bakteriler çalışıldı. Bu deneyde antikorun bağladığı bir *S. aureus* Cowan suşu ve antikoru bağlamayan bir *S. epidermidis* ve *E. coli* kullanıldı. *Staphylococcus epidermidis* ve *E. coli* suşları laboratuvarımızdaki klinik örneklerden izole edildi.

Yukarıda amacı belirtilen ve aşağıda akış şeması sunulan bu çalışmanın basamakları, aşağıda maddeler halinde sırasıyla açıklanmıştır.

1. Test edilecek bakteriler dilüsyon solüsyonu içerisinde 0.25, 1 ve 4 McFarland olmak üzere 3 farklı derişimi hazırlandı. Ayrıca, bakteri içermeyen tüp negative kontrol amacıyla kullanıldı. Bunlardan ayrı ayrı 100 µL örnek alınarak, kendilerine karşılık gelen ve içerisinde 300 µL dilüsyon solüsyonu bulunan karışım tüplerine aktarıldı.
2. Bir önceki deneysel modelde tanımlanan çalışmalardan elde edilen verilere dayanarak hazırlanan 500ng/mL konsantrasyondaki test antikorundan da karışım tüplerinin her birine 100 µL ekleme yapıldı.
3. Her birinde 4 karışım tüpü bulunan 3 özdeş setin her biri sırasıyla 15, 30 ve 60 dakika enkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda santrifüj edilen (8000 rpm'de 5 dakika) karışım tüplerinden 75µL süpernatan alınarak içerisinde 100 µL ELISA tamponu bulunan kuyucuklara aktarım yapıldı. Çalışmanın bundan sonraki aşamaları daha önce tanımlanan anti-idiotipik antikor tabanlı ELISA ölçümündeki gibi aynı aşamalar uygulanarak gerçekleştirildi.



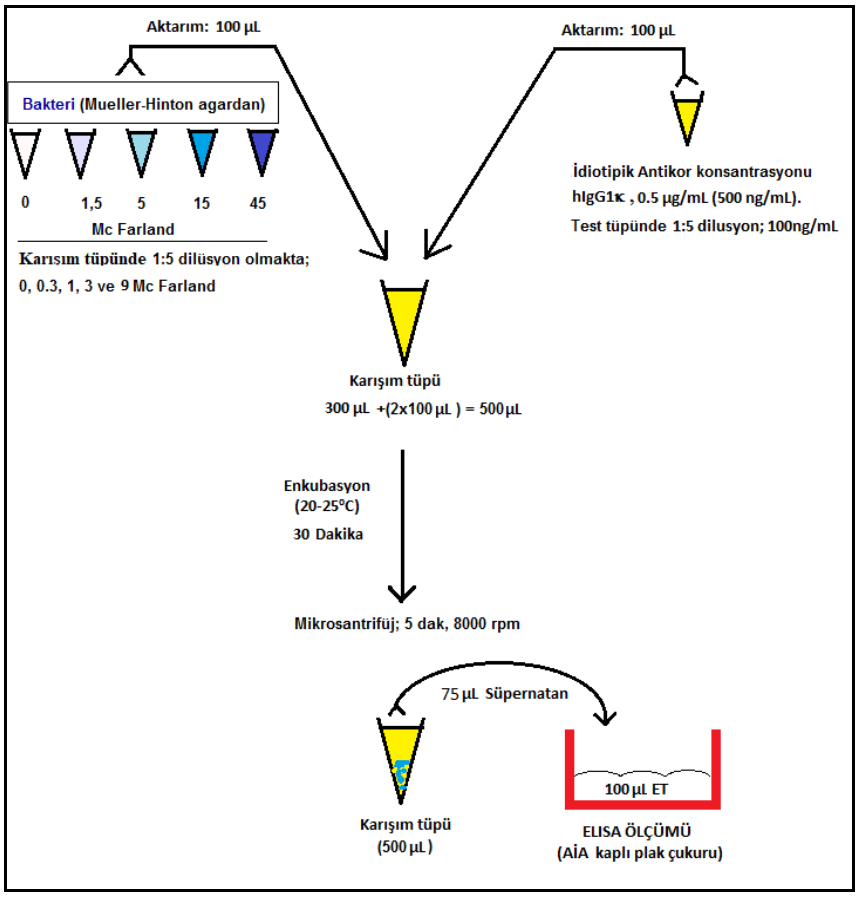

Şekil 3-3. Bakteri miktarının ve inkübasyon süresinin belirlenmesine yönelik çalışma akış şeması.

## 3.6. Farkli Bir Besiyeri Olarak Mueller-Hinton Agarda Üretilen Bakteri Miktarinin Tarama Sistemine Etkisi

Bakterilerde bulunan IgBP'nin ekspresyon düzeyi kullanılan besiyerine ve çoğalma şartlarına göre değişebildiği için, biz de böyle bir değişimi saptayabilmek için kanlı agar dışında bir başka besiyeri daha kullanarak yeni bir deney yaptık. Bu sebeple, (şekil 3.4)'de ana hatları belirtilen bu çalışmada, IgBP taşıyor mu diye test edilecek bakteriden ne kadar kullanılacağı belirlenmeye çalışıldı. Bu testte kanlı agar dışında laboratuvarda sık kullanılan bir diğer besiyeri olan Mueller-Hinton agar besiyeri olarak seçildi.

Aşağıda akış şeması sunulan bu çalışmanın basamakları, aşağıda maddeler halinde sırasıyla açıklanmıştır.

1. Test edilecek bakteri örnekleri dilüsyon solüsyonu içerisinde 1, 5, 15 ve 45 McFarland olmak üzere 4 farklı derişimi hazırlandı. Ayrıca, bakteri içermeyen tüp negative kontrol amacıyla kullanıldı. Bunlardan ayrı ayrı 100 µL örnek alınarak, kendilerine karşılık gelen ve içerisinde 300 µL dilüsyon solüsyonu bulunan karışım tüplerine aktarıldı.
2. Bir önceki deneysel modelde tanımlanan çalışmalardan elde edilen verilere dayanarak hazırlanan 500 ng/mL konsantrasyondaki test antikorundan da karışım tüplerinin her birine 100 µL ekleme yapıldı.
3. Bir önceki çalışmadan inkübasyon süresinin 30 dakika olarak belirlenmesinin yeterli olduğu saptandığı için hazırlanan 5 adet karışım tüpü oda ısısında 30 dakika enkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda santrifüj edilen (8000 rpm'de 5 dakika) karışım tüplerinden 50 µL süpernatan alınarak içerisinde 100 µL dilüsyon solüsyonu bulunan ELISA kuyucuklarına aktarım yapıldı. Çalışmanın bundan sonraki aşamaları daha önce tanımlanan anti-idiotipik antikor tabanlı ELISA ölçümündeki gibi aynı aşamalar uygulanarak gerçekleştirildi.




Şekil 3-4. Bakteri miktarının belirlenmesine yönelik çalışma akış şeması.

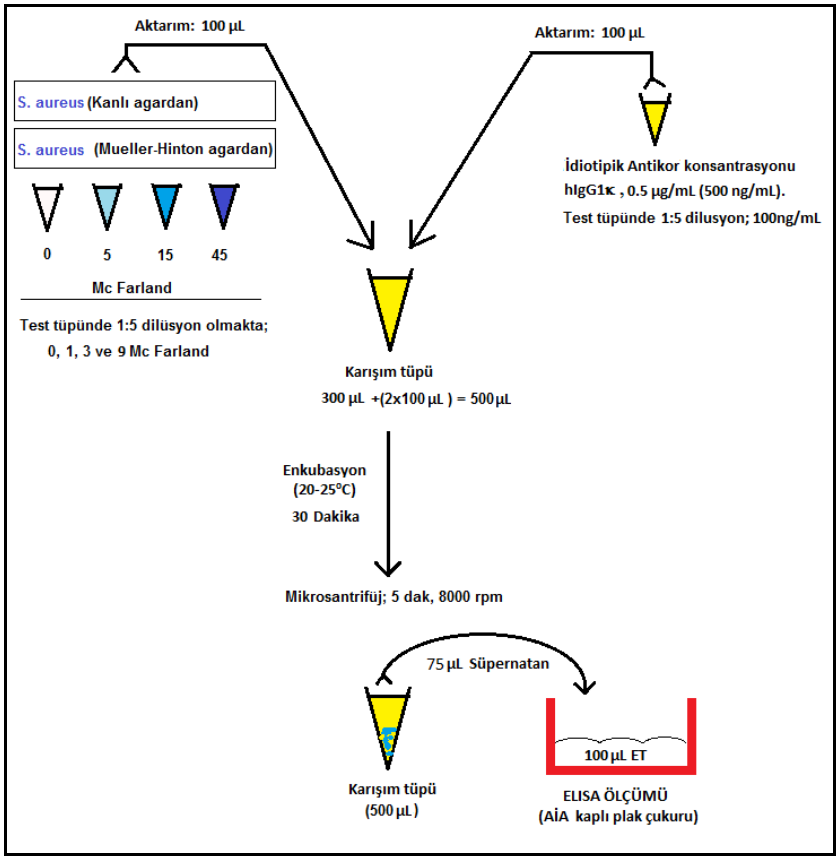
## 3.7. Kanlı Agar ve Mueller-Hinton Besiyerlerinin IgBP Ekspresyonu Üzerine Potansiyel Etkisi

Hem giriş bölümünde bahseldiği üzere hem şekil 3 ve 4 olarak belirtilen akış şemalı çalışmadan elde edilen veriler kullanılan besiyerinin önemli etki yarattığını göstermiştir. Bu nedenle, bu etkinin net ortaya konulmasına yönelik, standart suşumuzda besiyerinin IgBP ekspresyonu üzerine besiyerinin etkisi araştırıldı. Kanlı agar ve Mueller-Hinton agarda üretilen *S. aureus*'un diğer değişkenleri aynı tutulmak suretiyle tarama test sistemindeki davranış farklılıkları araştırıldı. Bu amaçla, (Şekil 3.5)'de çalışma akış şeması belirtilen bu çalışmanın basamakları maddeler halinde aşağıda sırasıyla açıklanmıştır.

1. Pozitif kontrol olarak kullanılan *S. aureus* suşu hem kanlı agara hem Mueller-Hinton agara ekimi yapılarak bakteriyolojik etüv içerisinde üretildi. Her bir besiyerinden ayrı ayrı alınan *S.aureus*'un dilüsyon solüsyonu içerisinde 5, 15 ve 45 McFarland olmak üzere 3 farklı derişimi hazırlandı. Ayrıca, bakteri içermeyen tüp negative

kontrol amacıyla kullanıldı. Kanlı agar kaynaklı olandan 4 tüp, Mueller-Hinton agar kaynaklı olandan da 4 tüp olmak üzere her biri 4 tüp içeren 2 farklı set halinde toplam 8 tüp hazırlanmış oldu. Her iki set (hem kanlı agar hem Mueller-Hinton agardan hazırlanan derişimler) ikiye ayrıldı, bunlardan birinci grup yıkanmadı, diğer grup 3 kez dilüsyon solüsyonu ile yıkandı ve dilüsyon solüsyonu içerisinde süspanse edildi. Bunlardan ayrı ayrı 100 µL örnek alınarak, kendilerine karşılık gelen ve içerisinde 300 µL dilüsyon solüsyonu bulunan karışım tüplerine aktarıldı.

2. Test antikorundan (500 ng/mL) da karışım tüplerinin her birine 100 µL ekleme yapıldı.
3. Her birinde 4 karışım tüpü bulunan 2 set halinde hazırlanmış olan karışım tüpleri (8 adet karışım tüpü, yıkanmış ve yıkanmamış olarak) oda ısısında 30 dakika enkübe edildi.
4. İnkübasyon sonunda santrifüj edilen (8000 rpm'de 5 dakika) karışım tüplerinden 75µL süpernatan alınarak, içerisinde 100 µL tampon bulunan ELISA kuyucuklarına aktarım yapıldı. Çalışmanın bundan sonraki aşamaları daha önce tanımlanan anti-idiotipik antikor tabanlı ELISA ölçümündeki gibi aynı aşamalar uygulanarak gerçekleştirildi.




Şekil 3-5. Besiyerinin IgBP ekspresyonu üzerine etkisinin araştırılmasına yönelik çalışma akış şeması

### 3.8. Toplanan Mikroorganizmaların IgBP Taşıyıp Taşımadığının Saptanmasına Yönelik Anti-İdiotipik Antikor Tabanlı ELISA ile Taranması

Şekil 3.5'deki çalışmadan elde edilen verilere dayanarak besiyerinin önemli olduğu saptandı. Bu nedenle, toplanan 189 mikroorganizma (Çizelge 3.1) taranırken, hem kanlı agarda hem Mueller-Hinton agarda çoğalmış şekilleri eşzamanlı olarak tarandı. Zor üreyen bakterilerden *H. influenzae'*nın sadece çikolata besiyerine ekimi yapıldı. A-grubu beta hemolitik sreptokok sadece kanlı besiyerine ve *Fusobacterium nucleatum, Peptostreptococcus sp., Propionibacterium acnes, Clostridium perfringes* gibi anaerob bakteriler ise anaerop jar içerisinde ve sadece kanlı agara ekimi yapıldı. Mantarlar SDA ve kanlı agara ekim yapılarak çalışıldı.

Bu amaçla yapılan çalışmanın basamakları aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir;

1. Microbank içerisinde -30°C'de saklanmış olan mikroorganizmaların çözülmesi için oda ısısında 5-10 dakika bekletildi.
2. Bakterileri canlandırmak için kanlı agara pasaj yapıldı, 36°C etüvde 24 saat bekletildi, üremiş olan bakteriler tekrar kanlı agar ve Mueller-Hinton agara ikinci pasajı yapıldı, 36°C etüvde 24 saat bekletildi
3. İkinci pasajdan sonra test edilecek bakteri örnekleri dilüsyon solüsyonu içerisinde 5 McFarland olmak üzere derişimi hazırlandı.
4. Bakteri örneklerinden 100 µL alınarak, kendilerine karşılık gelen ve içerisinde 300 µL dilüsyon solüsyonu bulunan karışım tüplerine aktarıldı.
5. Karışıma 500ng/mL konsantrasyondaki test antikorundan da karışım tüplerinin her birine 100 µL ekleme yapıldı. Böylelikle her bir ependorf tüpündeki final antikor konsantrasyonu 100 ng/ml olmaktadır (1:5 dilusyona uğradığı için). Stok antikor (Tociluzumab) 100µg/ml'den içerisinde 9950 µL dilüsyon sıvısı bulunan tüpe 50 µL eklendi, böylece 1:10 oranında dilüye edildi ve 500 ng/mL(istenen antikor çalışma konsantrasyonu) elde edildi.
6. Hazırlanan karışım tüpü oda ısısında 30 dakika enkübe edildi.
7. İnkübasyon sonunda santrifüj edilen (8000 rpm'de 5 dakika) karışım tüplerinden 250 µL süpernatan alınarak ELISA çalışma gününe kadar ependorf tüpte -80'de saklandı.
8. ELISA çalışması için çalışılacak mikroorganizmaların mikroplaklardaki çalışma konfigürasyonları yapıldı (1. Ve 2. Streplere standartlar eklendi 200 ng/mL'den

başlayarak 1/3 azalan konsantrasyonlar kullanıldı). A:200 ng/mL, B:60 ng/mL,C:20 ng/mL,D:6 ng/mL, E:0 ng/mL (Şekil 3.6-3.10).

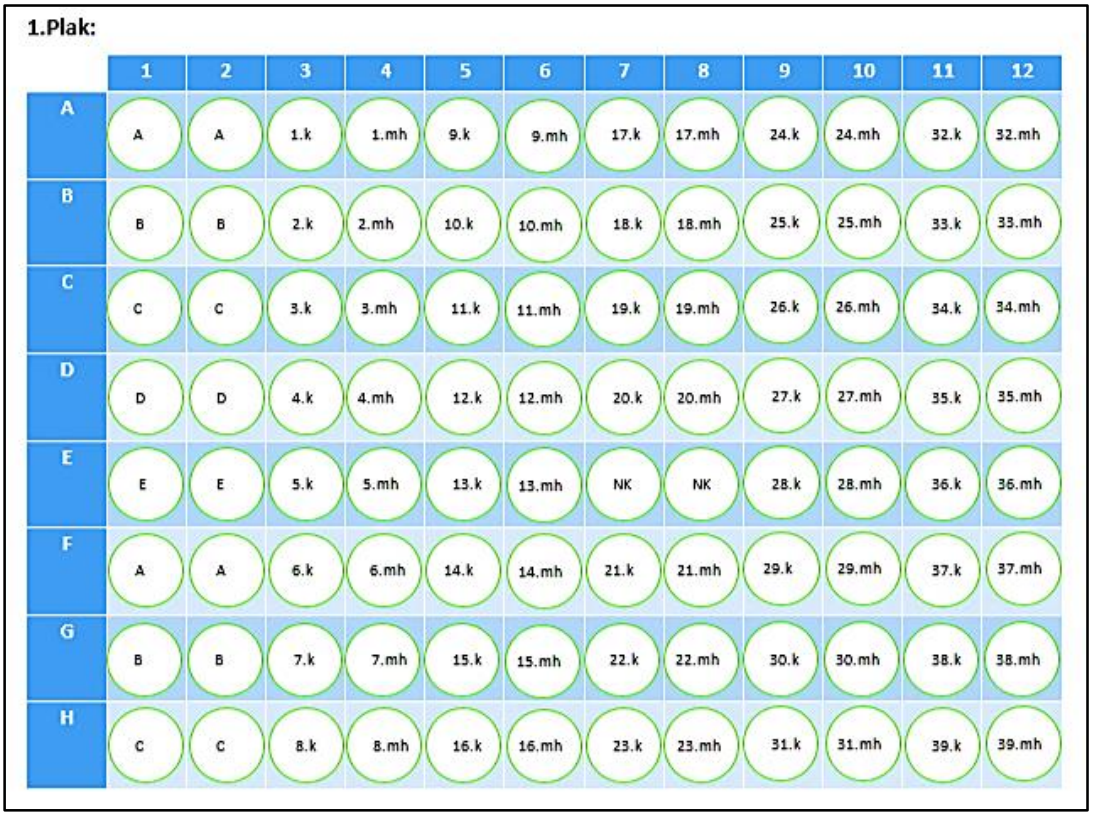
9. ELISA çalışma günü ependorf tüpte saklanan örnekler oda ısısında çözdürüldü ve çalışma kolaylılığı sağlamak amacı ile örneklerin tamamı (250 µL) 96-kuyucuklu polypropylene plak içerisine, konfigürasyona uygun şekilde aktarıldı.
10. İçerisinde 100 µL ELISA tamponu bulunan kuyucuklara 75 µL örnek aktarımı yapıldı.
11. Daha sonra yapışkan bant ile kapatılan plak 60 dakika oda ısısında bekletildi.
12. İnkübasyon sonrası plak kuyucukları otomatik yıkayıcıda yıkama solusyonu kullanılarak 3 kez yıkandı. Plak ters çevrilerek kuyucuk içeriği boşaltıldıktan sonra yine plak ters pozisyonda tutularak havlu kağıda birkaç kez yumuşak şekilde vurmak suretiyle içeriğin tamamen boşalması sağlandı.
13. Kullanım sırasında ELISA tamponu içerisinde 1X hale getirilen konjugattan (POD-anti-idiotipik antikor) kuyucuk başına 100 µL dağıtım yapıldıktan sonra yapışkan bant ile tekrar kapatılan plak oda ısısında 60 dakika bekletildi.
14. İnkübasyon sonrası plak kuyucukları otomatik yıkayıcıda yıkama solusyonu kullanılarak 3 kez yıkandı. Plak ters çevrilerek kuyucuk içeriği boşaltıldıktan sonra yine plak ters pozisyonda tutularak havlu kağıda birkaç kez yumuşak şekilde vurmak suretiyle içeriğin tamamen boşalması sağlandı.
15. Kullanıma hazır halde olan enzim substratı TMB'den kuyucuk başına 100 µL dağıtım yapıldıktan sonra oda ısısında ve karanlık bir ortamda 10 dakika bekletilerek renklenme reaksiyonu gerçekleşti.
16. Süre sonunda kuyucuk başına 100 µL 1N HCl durdurma solusyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve ELISA okuyucu kullanılarak optic dansite değerleri belirlendi. Okuma 450 nm referans 620 nm olacak şekilde ayarlanarak net optic dansite değerleri elde edildi.

Çizelge 3.1. Anti-idiotipik antikor tabanlı ELISA sistemi ile taranan mikroorganizmalar.

| No. | Mikroorganizmalar | No. | Mikroorganizmalar | No. | Mikroorganizmalar |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | *Achromobacter xylosoxidans* | 2 | *Chryseobacterium indologenes* | 3 | *Alcaligenes faecalis* |
| 4 | *Nocardia cyriacigeorgica* | 5 | *Ochrobactrum anthropi* | 6 | *Delftia acidovorans* |
| 7 | *Sphingomonas paucimobilis* | 8 | *Rothia mucilaginosa* | 9 | *Pandoraea apista* |
| 10 | *Sphingobacterium spiritivorum* | 11 | *Acinetobacter ursingii* | 12 | *Hafnia alvei* |
| 13 | *Raoultella ornithinolytica* | 14 | *Aerococcus urinae* | 15 | *Aeromonas hydrophila* |
| 16 | *Staphylococcus pettenkoferi* | 17 | *Pseudomonas putida* | 18 | *Burkholderia contaminans* |
| 19 | *Streptococcus salivarius* | 20 | *Aeromonas sobria* | 21 | *Rhizobium radiobacter* |
| 22 | *Shewanella algae* | 23 | *Pseudomonas stutzeri* | 24 | *Paenibacillus pabuli* |
| 25 | *Granulicetella adiacens* | 26 | *Citrobacter braakii* | 27 | *Lactococcus service* |
| 28 | *Raoultella planticola* | 29 | *Pasteurella multocida* | 30 | *Microbacterium paraaxydans* |
| 31 | *Ochrobactrum intermedium* | 32 | *Corynebacterium tuberculostearium* | 33 | *Corynebacterium aurimucosum* |
| 34 | *Pediococcus acidilactici* | 35 | *Providencia stuarti* | 36 | *Citrobacter sedlakii* |
| 37 | *Streptococcus gordonii* | 38 | *Enterobacter hormaechei* | 39 | *Microbacterium foliorum* |
| 40 | *Microbacterium paraoxydans* | 41 | *Elizabethkingia meningoseptica* | 42 | *Providencia rettgeri* |
| 43 | *Streptococcus constellatus* | 44 | *Citrobacter youngae* | 45 | *Helcococcus kunzii* |
| 46 | *Alcaligenes faecalis ssp.fecalis* | 47 | *Citrobacter werkmanii* | 48 | *Neisseria gonorrehea* |
| 49 | *Arsenicicoccus spp.* | 50 | *Dermabacter hominis* | 51 | *Escherichia coli* |
| 52 | *Salmonella typhi* | 53 | *Shigella dizanteri* | 54 | *Acinetobacter lwoffii* |
| 55 | *Listeria monositogenes* | 56 | *Citrobacter koseri* | 57 | *Pseudomonas luteola* |
| 58 | *Staphylococcus simulans* | 59 | *Enterobacter cloacae* | 60 | *Neisseria sicca* |
| 61 | *Oligella urethralis* | 62 | *Kocuria kistinae* | 63 | *Staphylococcus pettenkoferi* |
| 64 | *Aggregatibacter aphrophilus* | 65 | *Ralstonia picketti* | 66 | *Achromobacter identificus* |
| 67 | *Providencia alcalifaciens* | 68 | *Serratia liguefaciens* | 69 | *Enterobacter cancerogenus* |
| 70 | *Pseudomonas luteola* | 71 | *Pantoea agglomerans* | 72 | *Enterococcus raffinosus* |
| 73 | *Corynebacterium urealyticum* | 74 | *Streptococcus anginosus* | 75 | *Chryseobacterium gleum* |
| 76 | *Streptococcus parasanguinis* | 77 | *Staphylococcus caprae* | 78 | *Enterobacter kobei* |
| 79 | *Enterobacter ludwingi* | 80 | *Burkholderia lata* | 81 | *Chryseobacterium vialaceum* |
| 82 | *Enterobacter hormaechei* | 83 | *Pseudomonas fluorescens* | 84 | *Stenotrophomonas maltophilia* |
| 85 | *Acinetobacter baumannii* | 86 | *Proteus mirabilis* | 87 | *Klebsiella pnumoniae* |
| 88 | *Citrobacter freundii* | 89 | *Enterobacter aerogenes* | 90 | *Klebsiella oxytoca* |
| 91 | *Enterococcus faecalis* | 92 | *Serratia marcescens* | 93 | *Citrobacter amalonaticus* |
| 94 | *Morganella morgani* | 95 | *Klebsilla rhinoscleromatis* | 96 | *Brevundimonas vesicularis* |
| 97 | *Staphylococcus capitis* | 98 | *Staphylococcus auricularis* | 99 | *Pseudomonas mendocina* |
| 100 | *Serratia odorifena* | 101 | *Salmonella entrika (Grup C)* | 102 | *Neisseria elongata* |
| 103 | *Staphylococcus schleifer* | 104 | *Achromobacter xylosoxidans* | 105 | *Enterococcus gallinarum* |
| 106 | *Enterococcus avium* | 107 | *Enterococcus durans/hirae* | 108 | *Staphylococcus wernerii* |

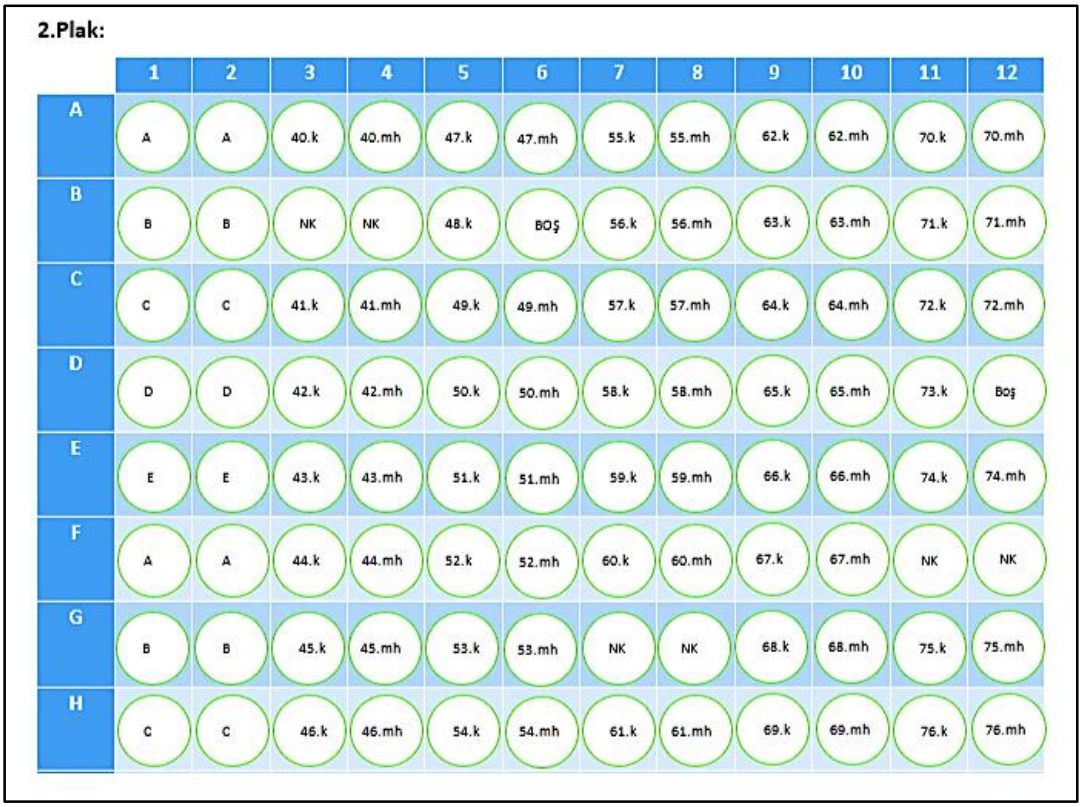
Çizelge 3.1. (*Devam*) Anti-idiotipik antikor tabanlı ELISA sistemi ile taranan mikroorganizmalar.

| No. | Mikroorganizmalar | No. | Mikroorganizmalar | No. | Mikroorganizmalar |
|---|---|---|---|---|---|
| 109 | *Kytococcus sedantorius* | 110 | *Empedobacter brevis* | 111 | *Kluyvera ascarbata* |
| 112 | *Weeksella virosa* | 113 | *Citrobacter koseri* | 114 | *Burkholderia cepacia* |
| 115 | *Gemella ssp.* | 116 | *Enterobacter asburiae* | 117 | *Klebsiella pneumoniae* |
| 118 | *Enterobacter intermedius* | 119 | *Brevundimonas diminuta* | 120 | *Luteimonas aestuarii* |
| 121 | *Proteus vulgaris* | 122 | *Staphylococcus haemolyticus* | 123 | *Streptococcus pneumonia* |
| 124 | *Pseudomonas pantoea* | 125 | *Enterococcus durans* | 126 | *Enterococcus raffinosus* |
| 127 | *Ralstonia pichetti* | 128 | *Empedobacter brevis* | 129 | *Pasteurella actinobacillus* |
| 130 | *Chromobacterium violaceum* | 131 | *Vibrio fluvialis* | 132 | *Bacillus ssp.* |
| 133 | *Enterococcus soacium* | 134 | *Delftia acidovorans* | 135 | *Shewanella putrefacines* |
| 136 | *Corynebacterium jeikeium* | 137 | *Mannheimia haemolytica* | 138 | *Citrobacter farmeri* |
| 139 | *Micrococcus luteus* | 140 | *Bordetella bronchiseptica* | 141 | *Serratia odorifera* |
| 142 | *Edwarsiella ictaluri* | 143 | *Leminorella species* | 144 | *Ewingella americana* |
| 145 | *Chryseobacterium meningosepticum* | 146 | *Cedecea neteri* | 147 | *Enterococcus casseliflavus* |
| 148 | *Burkholderia gladioli* | 149 | *Streptococcus sanguinis* | 150 | *Micrccous ssp.* |
| 151 | *Kingella spp.* | 152 | *Shigella flexneri* | 153 | *Kluyvera spp.* |
| 154 | *Pediococcus pentosaceus* | 155 | *Enterococcus faecium* | 156 | *Aeromonas caviae* |
| 157 | *Salmonella spp. (C grubu)* | 158 | *Dermococcus nishinomiyaensis* | 159 | *Cardiobacterium hominis* |
| 160 | *Streptococcus oralis* | 161 | *Staphylococcus aureus* | 162 | *Acinetobacter haemolyticus* |
| 163 | *Achromobacter piechaudii* | 164 | *Brevundimonas diminuta* | 165 | *Trichosporon ssp.* |
| 166 | *Candida glabrata* | 167 | *Candida tropicalis* | 168 | *Candida krusei* |
| 169 | *Saccharomyces ssp.* | 170 | *Saccharomyces cerevisiae* | 171 | *Candida lusitania* |
| 172 | *Candida kefyr* | 173 | *Candida albicans* | 174 | *Candida parapsilosis* |
| 175 | *Candida sake* | 176 | *Staphylococcus hominis* | 177 | *Pseudomonas aeruginosa* |
| 178 | *Staphylococcus aureus* | 179 | *Staphylococcus aureus* | 180 | *Streptococcus thoraltensis* |
| 181 | *Fusobacterium nucleatum* | 182 | *Peptostreptococcus spp.* | 183 | *Propionibacterium acnes* |
| 184 | *Actinomyces spp.(aerop)* | 185 | *Clostridium perfringens* | 186 | *Streptococcus pyogenes* |
| 187 | *Pseudomonas alcaligenes* | 188 | *Haemophilus influenzae* | 189 | *Gemella haemolysans* |

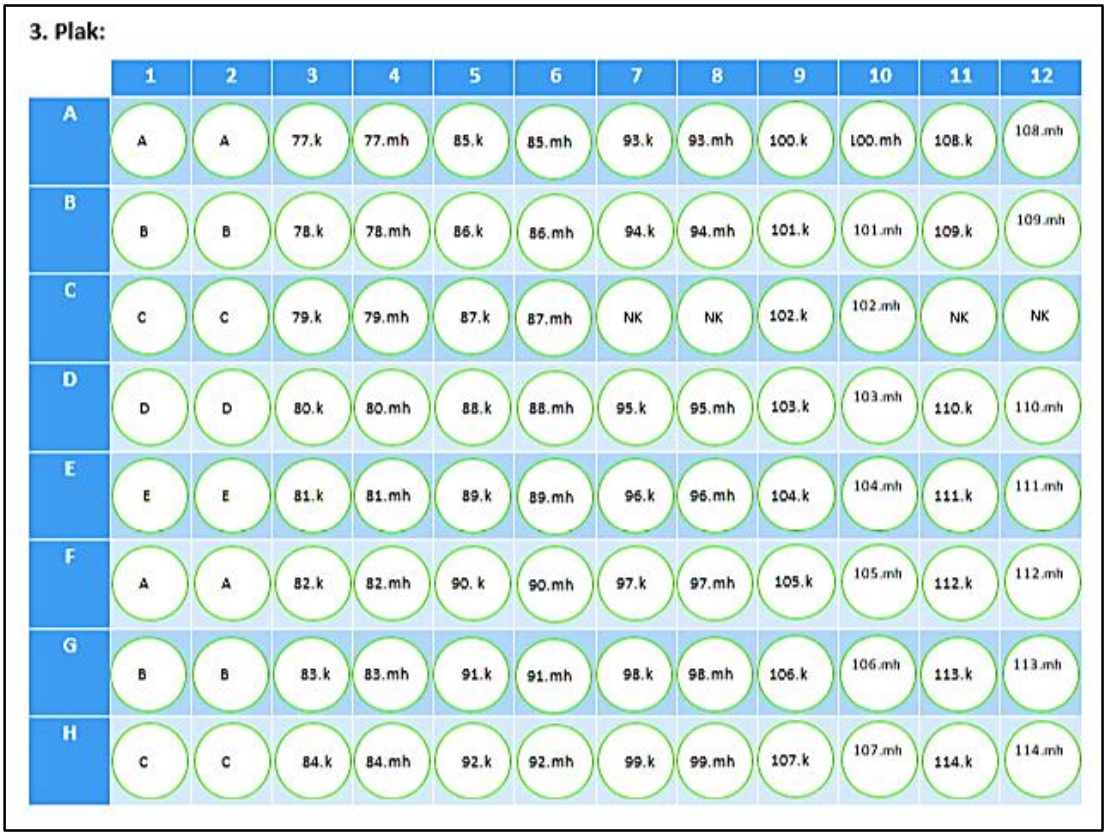



Şekil 3-6. Birinci plakta bulunan mikroorganizmaların konfigürasyonu.

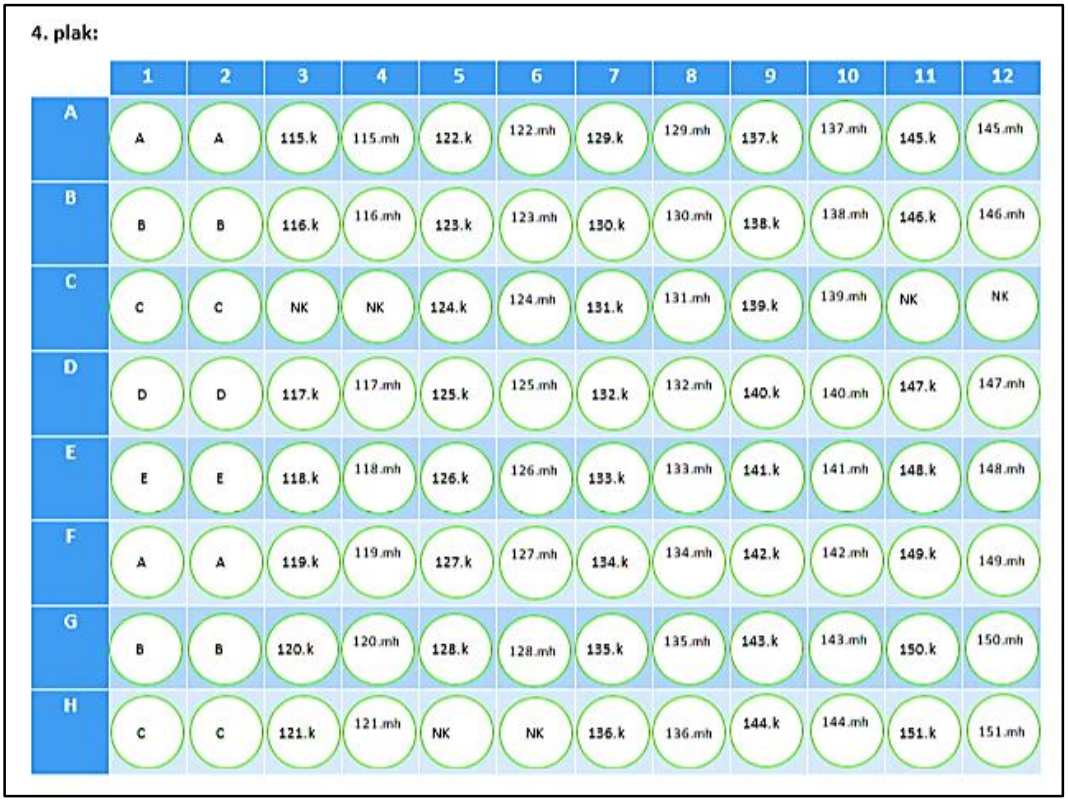
**K:** kanlı agar, **Mh:** mueller-Hinton agar, **NK:** negativ kontrol




Şekil 3-7. İkinci plakta bulunan mikroorganizmaların konfigürasyonu




Şekil 3-8. Üçüncü plakta bulunan mikroorganizmaların konfigürasyonu.




Şekil 3-9. Dördüncü plakta bulunan mikroorganizmaların konfigürasyonu.




Şekil 3-10. Beşinci plakta bulunan mikroorganizmaların konfigürasyonu.

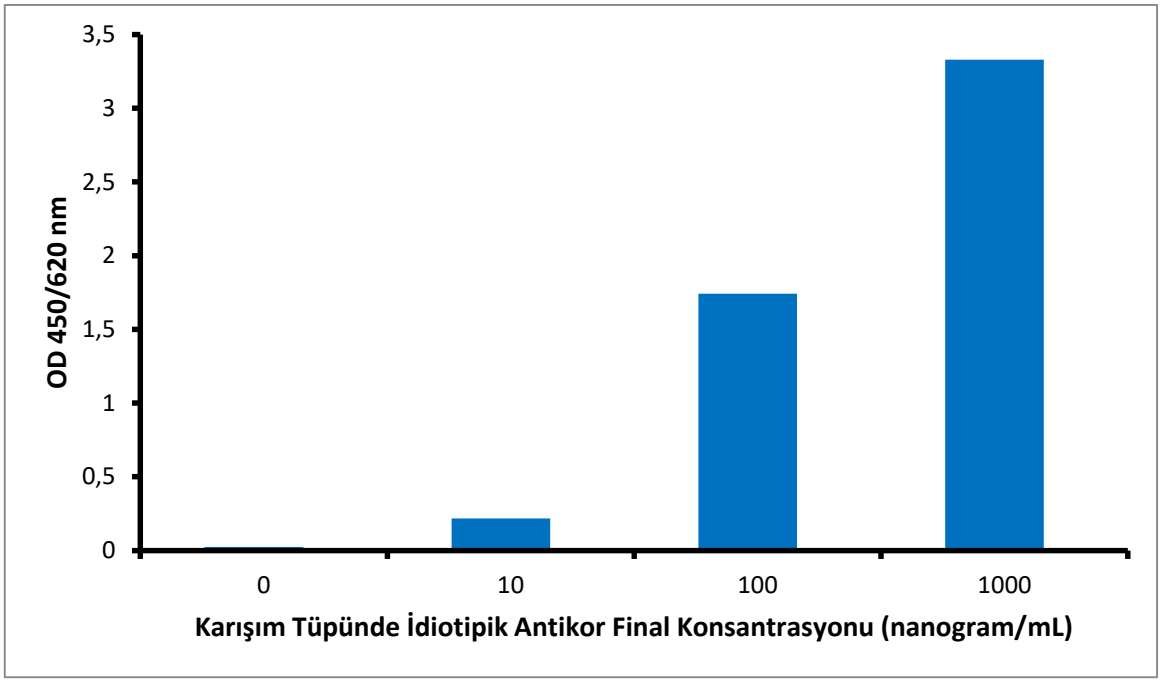
SDA: Sabouraud-Dextrose agar, Ç: Çikolata agar.

# 4. BULGULAR

## 4.1. Anti-İdiotipik Antikor Tabanlı ELISA Sisteminde İdiotipik Antikorun Sabit Çalışma Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Gereç ve yöntem bölümündeki şekil 2'de ana hatları belirtilen bu çalışmada, ilk olarak IgBP taşıyan bakteri saptanmasına yönelik olarak bakterilerin üzerine eklenecek test antikorunun sabit kullanım konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Her defasında değişen konsantrasyonlarda iditipik antikor kullanılması sonuçların değişkenliğine neden olacaktır. Herşeyden önce çalışmanın standart olması için de standart bir iditipik antikor konsantrasyon değerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla değişik konsantrasyonlarda iditipik antikor kullanılarak elde edilen standard eğride değişikliklere en hassas olan dinamik aralığa karşılık gelen bölgenin orta noktasını yansıtacak iditipik antikor konsantrasyonu belirlenmeye çalışıldı.

Bu bağlamda yapılan test sonucuna göre test tüpündeki idiotipik antikor miktarı ile oluşan OD değerlerine bağlı değişim (Şekil 4.1)'de sunulmuştur. Bu verilere göre, test tüpünde idiotipik antikor miktarının 1000 ng/mL ve daha üzeri değerlerinde yüksek OD oluşturduğu, doygunluğ düzeyini sağladığı veya aştığını gösterdiği, dolayısıyla hem bir nedenle oluşabilecek olası OD artışını gösteremeyeceği hem de bağlanmaya bağlı OD azalmasının hassas şekilde saptanmasına uygun olmayacağını göstermektedir. Test tüpündeki idiotipik antikor konsantrasyonu 10 ng/mL ve daha aşağısı olduğunda oluşan OD 0,200 civarlarındadır. Deney sırasında OD değerlerindeki olabilecek 0,100'lik bir sapma %100'lük bir değişime neden olacağından güvenilirlik açısından tercih edilmeye uygun bir konsantrasyon olmadığını göstermektedir. Oysa, test tüpündeki 100ng/mL'lik bir final konsantrasyonda oluşan 1.8 civarındaki OD 450/620 nm değeri hem standard eğrinin dinamik aralığına uygun orta noktayı oluşturmakta hem de %100'lük artışların ve azalışların kolay-net görülebilmesini ve ölçüm hassasiyeti sağlayacaktır. Saptanan bu veriler eşliğinde, bütün bir çalışma boyunca test tüpüne eklenen idiotipik antikor final konsantrasyonun 100 ng/mL olması gerektiği belirlenmiştir.




Şekil 4.1. Tarama sisteminin geliştirilmesi ve ölçümlerde kullanılmak üzere dinamik aralığın orta noktasına karşılık gelen idiotipik antikor miktarı.

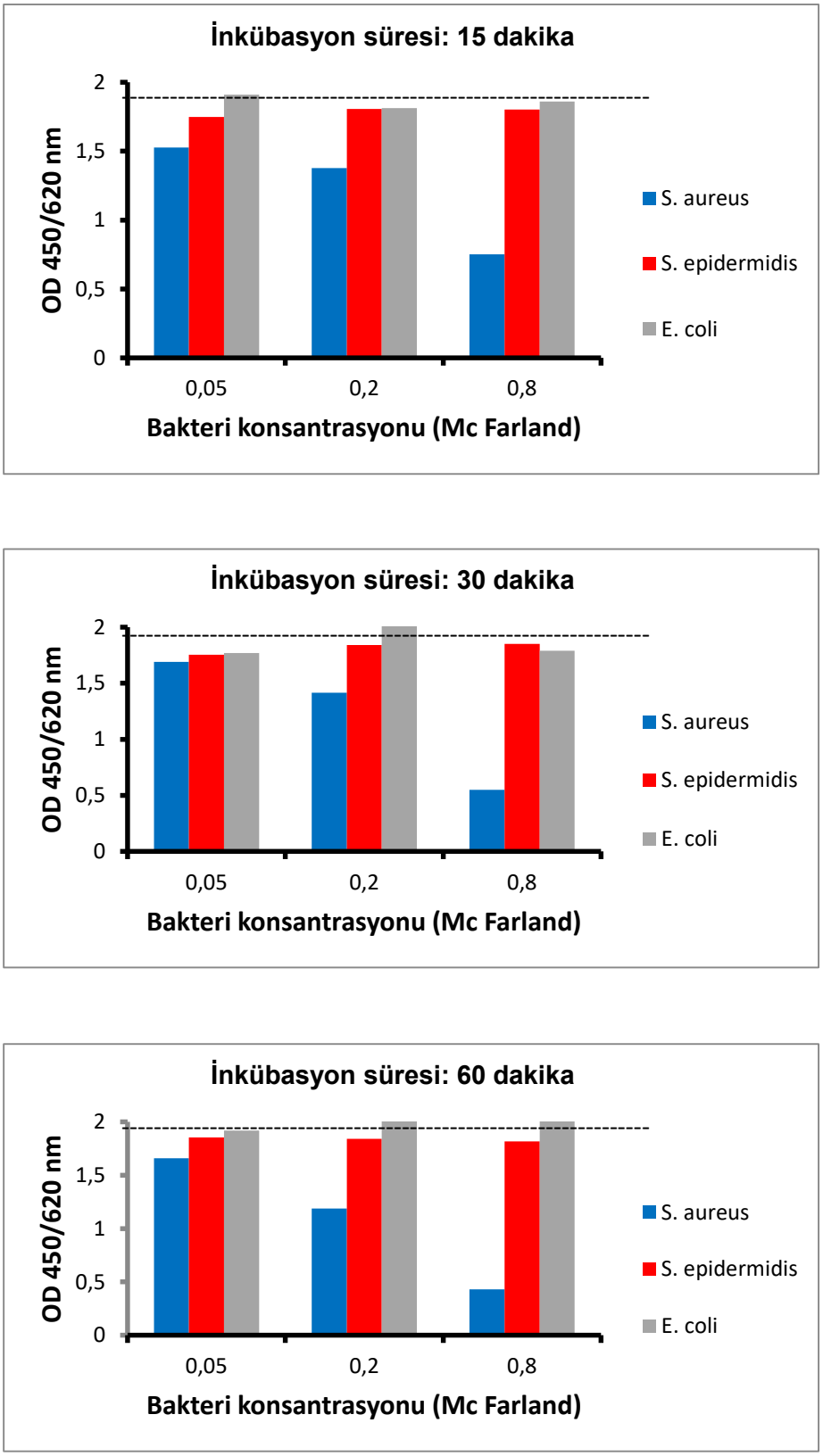
**4.2. Kullanılacak Bakteri Miktarı ve İnkübasyon Süresi**:

Bu amaçla pozitif kontrol *S. aureus* yanında negatif kontrol olan *S. epidermidis* ve *E. coli* kolonilerinden değişen miktarlarda test tüplerine eklendi. Tüpler 15, 30 ve 60 dakika süreler ile bekletildikten sonra santrifüj edilerek süpernatandaki idiotipik antikor miktarı belirlendi. (Şekil 4.2)'de görüldüğü üzere, kanlı agarda üremiş *S. aureus*'un test tüpüne eklenen miktarı arttıkça ortamdaki idiotipik antikoru da o oranda bağlamakta ve santrifüj ile tüpün dip kısmına götürmekte, süpernatanda kalan miktarı azalmakta ve idiotipik antikorun ölçülen miktarı da bu yüzden azalmaktadır. Bakteri içermeyen test tüpüne eklenen idiotipik antikorun 100 ng/mL konsantrasyondaki OD 450/620nm değeri 1.7-1.9 aralığında iken (şekil içerisindeki yıldız işareti ile belirtilen yatay kesikli çizgiler) 15 dakikalık inkübasyonda bile McFarland 0.2 değerinden itibaren idiotipik antikor miktarında belirgin azalmaya neden olmaktadır. Aynı miktardaki *S. aureus* ile inkübasyon süresinin arttırlması idiotipik antikor azalmasına önemli bir etki yapmamaktadır. 15, 30 ve 60 dakikalık karşılaştırma çalışmasından elde edilen üç ayrı veri şu şekilde özetlenebilir;

a. Yüksek afiniteye sahip IgBP taşıyan bir bakteri ile (buradaki örnek *S. aureus*) test antikorunun 15 dakikalık birlikteliği bağlanma için yeterli süreyi oluşturmaktadır.

b. Belirli bir minumum süre (30 dak) sonrasında inkübasyon süresinin artırımının çok önemli olmadığı.

c. Antikor bağlanmasına bağlı santrifüj sonrası süpernatandaki idiotipik antikor azalmasında ortama eklenen bakteri miktarının önemli belirleyicilerden biri olduğu anlaşılmaktadır. Hangi inkübasyon süresi olursa olsun *S. aureus* miktarı McFarland 0.05'den McFarland 0.8'e doğru arttıkça bağlamaya bağlı olarak süpernatandaki idiotipik antikor miktarı da azalmaktadır. Bakteri miktarının McFarland 1 civarında kullanılması 15 dakikalık bir inkübasyon ile bile OD değerinde (0.751) en az %50 azalmaya neden olmaktadır.




Şekil 4.2. Bakteri (kanlı agarda üretilen) miktarı ve inkübasyon süresi sonuçları.

Ancak, IgBP taşımayan ve negatif örnek olarak kullanılmış olan hem *S. epidermidis* hem de *E. coli* bakterileri inkübasyon süresi ve bakteri miktarları ne kadar arttırılırsa arttırılsın

belirgin bir OD azalmasına neden olmamaktadır. Bu bakteriler ile elde edilen OD değerleri sadece idiotipik antikor içeren test tüpünün oluşturduğu OD değerlerine (şekil içerisindeki yıldız işaretli kesikli yatay çizgiler) yakın sonuçlar vermektedir.

Bu verilere dayanarak, ortama eklenecek test bakterisi final konsantrasyonun McFarland 1 olarak ayarlanmasının uygun olduğu anlaşılmıştır. *Staphylococcus aureus* örneğinde saptandığı üzere, 15 dakikalık bir inkübasyon süresinin yeterli olduğu anlaşılmaktadır. Antikoru görece zayıf bağlayan IgBP taşıyan bakteriyle karşılaşma açısından düşünüldüğünde bu sürenin 30 dakika gibi iki katına çıkartılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. Ancak daha da uzun süreli inkübasyonun bağlanma üzerine belirgin etki yapmayacağı öngörülmüştür. Ayrıca tarama testinin zaman açısından da pratik olması için 60 dakika yerine 30 dakika olması uygun olacaktır.

### 4.3. Farkli Bir Besiyeri Olarak Mueller-Hinton Agarda Üretilen Bakteri Miktarinin Tarama Sistemine Etkisi

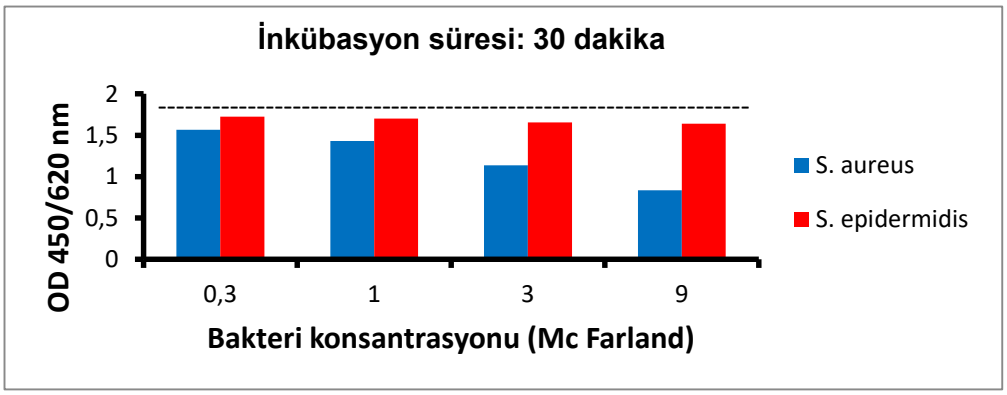
En önemli faktör bakterinin IgBP açısından pozitif olup olmadığı yanında ortama eklenen miktarı olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.2). Bir önceki çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan *S. aureus*'un McFarland 0.05 ve 0.2 değerlerindeki etkisi çok çarpıcı olmamasına karşın, 0,8 değerlerine ulaştığında 15 dakikalık inkübasyonda bile ortamdaki test antikorunun en az %50'sini bağladığı ve inkübasyon süresi 60 dakikaya ulaştığında ise bağlanma yaklaşık %75'e ulaşmaktadır.

Bu veriler göz önüne alındığında test antikorunun %100'ünü bağlayabilecek *S. aureus* miktarını belirlemeye yönelik çalışma yapıldı. Bu defa 30 dakikalık inkübasyon süresi kullanılarak 0.3 ve 1 McFarland değerlerine ek olarak McFarland düzeyi 3 ve 9 olacak şekilde arttırılmış örnekler ile test tekrarlandı. Ancak bu açıdan yapılan testte Mueller-Hinton agarda üreyen bakteriler kullanıldı. Kanlı agar gibi, Mueller-Hinton agar da laboratuarlarda sık kullanılan zengin bir besiyeri düşüncesi ile ekim yapılmış, yani bu seçim bilinçli olarak planlanmamıştı. Kanlı agar ile Mueller-Hinton agar arasında bu açıdan bir fark olmayacağı düşünülmüştü.

IgBP açısından negatif olan *S. epidermidis* ile elde edilen veriler kendi içerisinde uyumlu bulunmuştur. Yani miktarı ne kadar artarsa artsın anlamlı bir antikor bağlama gerçekleşmemektedir. Ancak besiyerinin pozitif bakteride IgBP ekspresyonu üzerine çok çarpıcı etkisi olduğuna yönelik sonuçla karşılaşıldı. Bir önceki çalışmada kanlı agarda üreyen *S. aureus*'un antikoru bağlama miktarı ortamdaki miktarı ile doğru orantılıdır ve McFarland 0.8 miktarda bile antikorun en az %50'sini bağlayabilmektedir. Ancak, Mueller-Hinton agarda üreyen *S. aureus* ile %50 antikor bağlanması ancak en az 10 kat fazla (McFarland 9) bakteri eklenmesi ile elde edilebilmektedir (Şekil 4.3). Daha net ifade ile kanlı agarda üreyen S. aureus ile Mueller-Hinton agarda üreyen aynı *S. aureus* suşlarının antikor bağlama özellikleri arasında farklılık olmaktadır. Hangi miktardaki bakteri antikor bağlanmasını %100'ler düzeyine ulaştıracağına yönelik veri beklentisi karşısında Mueller-Hinton agarda üreyen *S. aureus*'un McFarland 9 düzeyleri bile antikor bağlanmasını %75 düzeylerine ulaştıramamıştır. Bu sonuçlar olayın literatürdeki bazı veriler ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Çünkü literatürde mikroorganizmanın ürediği ortamın ve besiyerinin IgBP ekspresyonunu etkilediği belirtilmektedir (90).

Yaptığımız çalışmadan elde edilen veriler açıkça göstermektedir ki IgBP açısından taranacak bakterilerin hem kanlı agarda üreyen hem de Mueller-Hinton agarda üreyen şeklinin eşzamanlı olarak taranması daha uygun olacaktır. Bu yaklaşım aynı zamanda iki kez çalışılmış olmasına ve daha güvenilir veri elde edilmesine olanak sağlayacaktır.

Bu sonuçlardan sonra farklı besiyerinin aynı *S. aureus* suşu üzerine olan etkisi ve bu farklılığın olası nedenini saptamaya yönelik biraz daha detaylı çalışma planlandı.




Şekil 4.3. Mueller-Hinton agarda üretilen bakteri miktarı ile antikor bağlama düzeyi arasındaki ilişki.

## 4.4. Kanlı Agar ve Mueller-Hinton Besiyerlerinin IgBP Ekspresyonu Üzerine Potansiyel Etkisi

Kanlı agar ve Mueller-Hinton agarda üreyen *S.aureus* arasında antikor bağlama kapasitesi açısından fark gözlendi. Bunun olası nedenlerinden biri olarak besiyerlerinden bakteriler öze ile alınıp süspansiyonları hazırlanırken bir şekilde süspansiyona bulaşan besiyerinin bunda etkisi olabileceği düşünüldü. Aşağıda belirtilen olası nedenler akla gelmektedir:

a. Koyun kanlı agarda bulunan koyun antikorlarının bir şekilde deney sonucuna etkisi olabileceği ve bakteri süspansiyon hazırlanırken öze ile bakteri aktarımı sırasında besiyeri de bulaşmış olabilir. Aslında ilk etapta böyle bir etki varsa bile bunun bakterinin antikoru daha çok bağlamasını sağlaması yerine azaltıcı bir etkisi olacağı öngörülmektedir. Çünkü kanlı agardan alınan *S. aureus* bakterilerinin bir kısmının veya yüzeyindeki IgBP'lerin bir kısmının koyun antikorları tarafından önceden bağlanmış olması nedeniyle teorik olarak ortama eklenen test antikorunu daha az bağlaması beklenmektedir. Oysa (Şekil 4.2) ve (Şekil 4.3) karşılaştırıldığında, kanlı agarda üreyen *S. aureus*, Mueller-Hinton agarda üreyene göre daha iyi antikor bağlıyor gibi gözükmektedir.

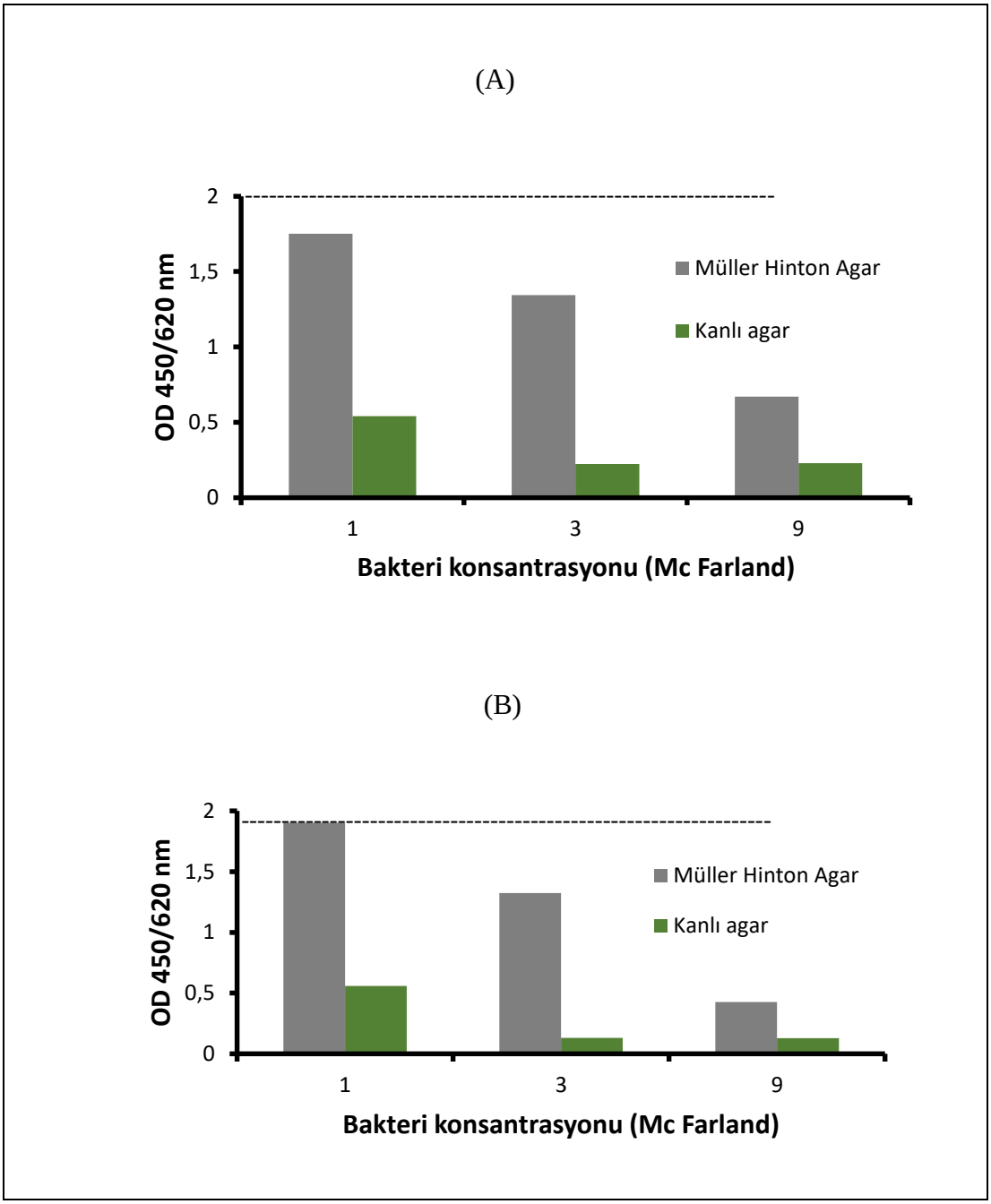
b. Olayın kaynaklandığı nokta, Mueller-Hinton agar ile ilişkili olabilir. Şöyle ki; bakteri süspansiyonuna bulaşan Mueller-Hinton agar kaynaklı maddeler *S. aureus* bakteri yüzeyini sıvayarak (bir şekilde bakteri yüzeyini kaplayarak var olan IgBP'leri bloke etmesi) bakterinin ortama eklenen antikoru yeterince fazla bağlayamamasına yol açmış olabilir.

c. Başka bir yaklaşım ise, aslında olayın doğrudan kanlı agar besiyerinin *S. aureus* bakterisinde protein A (IgBP) ekspresyonu üzerine arttırıcı bir etkisinin olabilmesidir.

d. Benzer şekilde aksi yöndeki bir etkinin Mueller-Hinton agar aracılığıyla oluşturulmasıdır. Mueller-Hinton agar besiyerinin *S. aureus* bakterisinde IgBP ekspresyonu üzerine azaltıcı bir etkisinin olabilmesidir. Bu durum kanlı agara göre Mueller-Hinton agarda üreyen *S. aureus*'un antikoru daha az bağlama nedenini açıklayabilecektir.

Bu durumun belirlenmesine yönelik olarak hem kanlı agar hem Mueller-Hinton agarda eşzamanlı ve aynı şartlar altında aynı *S. aureus* suşu kullanılarak yapılan çalışmada alınan bakteriler yıkanmadan ve yıkandıktan sonra test edilmiştir. (Şekil 4.4)'de görüldüğü üzere, kanlı agarda üreyen *S.aureus* ortama eklenen test antikorunu Mueller-Hinton agarda üreyene göre daha etkin bağlamaktadır. Doğrudan besiyerinden alınan bakterilerle hazırlanan süspansiyon kullanılarak yapılan testte, kanlı agarda üreyen *S.aureus*'un McFarland 1 değerindeki antikor bağlama kapasitesine benzer düzeyde bir etki Mueller-Hinton agarda üreyen *S.aureus*'un ancak 9 katı ile açığa çıkabilmektedir (Şekil 4.4 A). Besiyeri farklılığından kaynaklanan değişken bağlama kapasitesinin besiyeri bulaşından oluşmadığı anlaşılmaktadır. Çünkü farklı besiyerlerinden alınan bakteriler test edilmeden önce yıkanmalarına rağmen, yıkanmadan kullanılan bakteri süspansiyonları gibi hatta neredeyse tamamen benzer sonuçlar elde edilmektedir (Şekil 4.4 B ).

Genel anlamda kullanılabilen zengin bir besiyeri olması nedeniyle çalışmanın başlangıcında sadece Mueller-Hinton agar kullanılması planlanmıştı. Ancak gözlenen belirgin farklılık, tarama testinin hem Mueller-Hinton agarda hem de kanlı agarda üremiş aynı bakterilerin eşzamanlı olarak taranması gerekliliğini ortaya koymuştur.




Şekil 4.4. Farklı besiyerlerinin (Mueller-Hinton agar ve Kanlı agar) *S. aureus*'un antikor bağlama özelliğine etkisi. A: Besiyerlerinden alınan bakterilerle doğrudan hazırlanan bakteri solusyonlarına ait veriler. B: Besiyerlerinden alınan bakterilerin yıkanmış halleri kullanılarak hazırlanan bakteri solüsyonlarına ait veriler.

Elde edilen veriler tarama test uygulamasında aşağıda belirtilen ana üç esasın göz önüne alınması gerektiğini ortaya koymuştur:

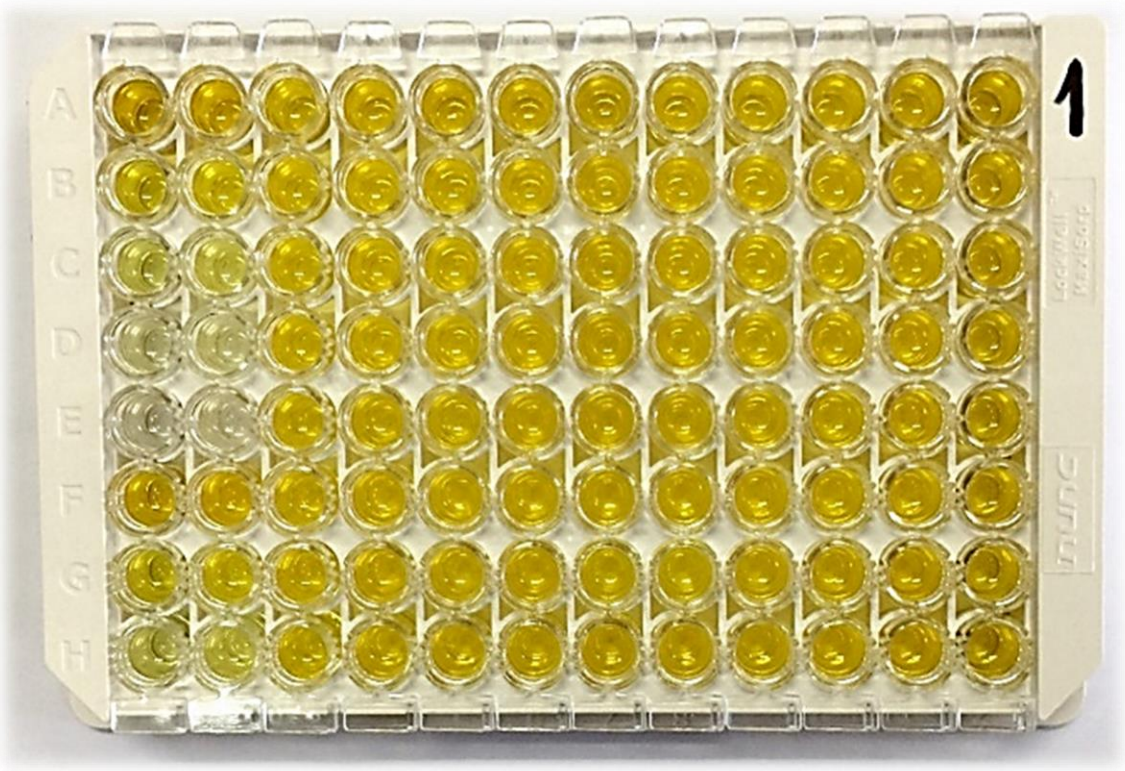
1. Tarama sırasında test tüpünde en az McFarland 1 düzeyinde bakteri bulunmalıdır.

2. Tarama sırasında test tüpü santrifüj edilmeden önce eklenen bakteri ile test antikorun 30 dakikalık inkübasyonu yeterli olmaktadır.

3. *S. aureus* benzeri IGBP pozitif bakterinin saptanması için test tüpüne eklenen test antikorunu bağlama düzeyinin %50 ve daha fazlası olması yeterli kriter olabilecektir. Bu düzeyde net bağlanma gösterenler yeniden test edilmeye değer bakteri olarak belirlenecek ve ikinci kez bu açıdan doğrulandığında daha ileri analizler uygulanacaktır.

### 4.5. Anti-İdiotipik Antikor Tabanlı ELISA ile Mikroorganizmaların Tarama Sonucu:

İmmünoglobulin bağlayan protein üreten bakterilerde bakterinin test antikorunu bağlanması nedeniyle santrifüj sonrası üst sıvıdaki test antikoru başlangıç anına göre azalmaktadır. ELISA test sonuçlarımıza göre üç adet *S. aureus* izolatında IgBP varlığı saptanmıştır. Taramaya dahil edilen diğer gram pozitif ve gram negatif bakterilerde tarama sonucuna göre IgBP varlığı görülmemiştir (Şekil 4.5a,b-4.9a,b).




Şekil 4.5a: Bir no'lu AİA tabanlı ELISA plağı sonuç görüntüsü.

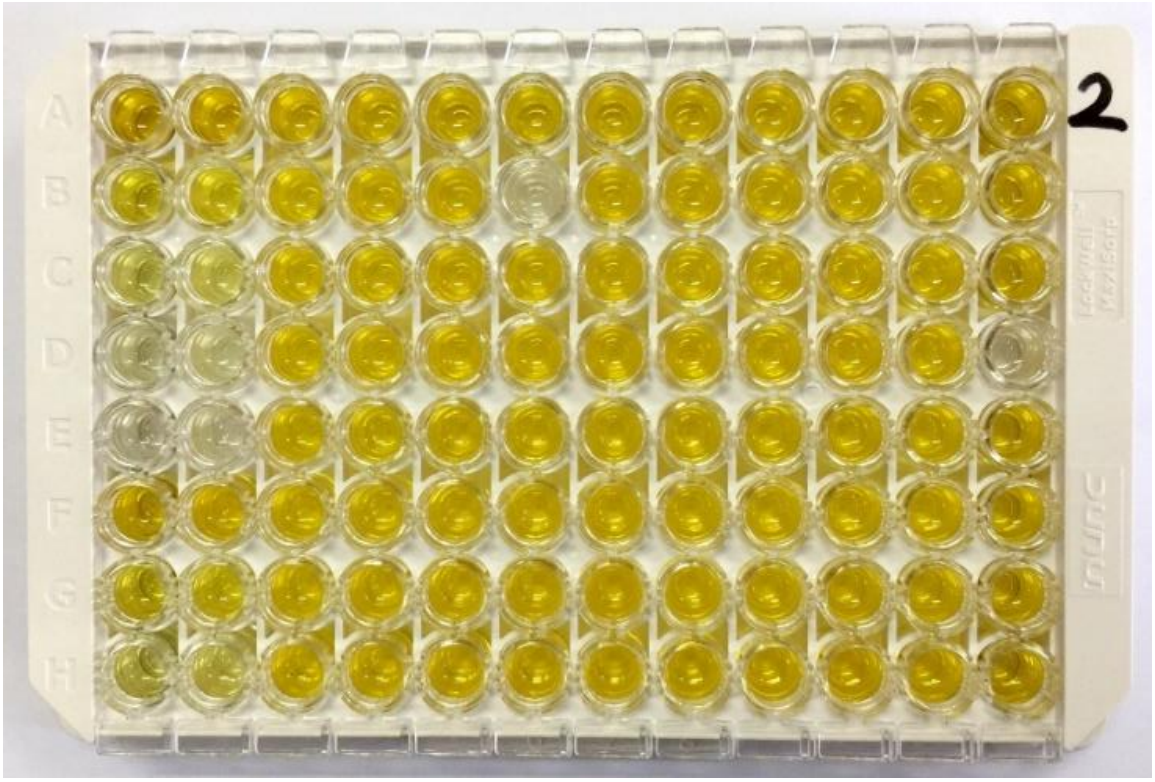
**Measurement parameters**

SUNRISE
Instrument serial number: 504000001
Measurement mode: Absorbance
Measurement wavelength: 450 nm
Reference wavelength: 620 nm
Dual wavelength mode: Difference
Read mode: Normal
Unit: OD
Date: 4/24/2018, Time: 2:49:32 PM

**Difference data**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 2.966 | 3.071 | 1.929 | 2.437 | 2.385 | 2.47 | 1.982 | 2.246 | 2.059 | 2.175 | 2.421 | 2.399 |
| B | 1.238 | 1.345 | 1.919 | 2.224 | 2.086 | 2.151 | 2.21 | 2.408 | 2.138 | 2.196 | 2.388 | 2.351 |
| C | 0.454 | 0.468 | 1.741 | 2.345 | 2.027 | 2.186 | 2.163 | 2.138 | 2.059 | 2.172 | 2.238 | 2.299 |
| D | 0.162 | 0.169 | 2.079 | 2.171 | 1.902 | 2.279 | 2.338 | 2.122 | 2.007 | 2.235 | 2.372 | 2.267 |
| E | 0.038 | 0.043 | 1.883 | 2.07 | 1.868 | 2.173 | 2.189 | 2.19 | 2.025 | 2.022 | 2.412 | 2.29 |
| F | 3.043 | 3.032 | 2.032 | 2.324 | 2.155 | 2.084 | 2.02 | 2.093 | 2.086 | 2.147 | 2.283 | 2.367 |
| G | 1.147 | 1.282 | 2.009 | 2.323 | 1.961 | 2.212 | 1.572 | 1.533 | 2.101 | 2.2 | 2.483 | 2.198 |
| H | 0.414 | 0.514 | 1.735 | 2.146 | 2.148 | 2.108 | 2.221 | 2.324 | 2.167 | 2.248 | 2.545 | 2.433 |

Şekil 4.5b: Bir no'lu AİA tabanlı ELISA plağı OD değerleri.




Şekil 4.6a: İki no'lu AİA tabanlı ELISA plağı sonuç görüntüsü.

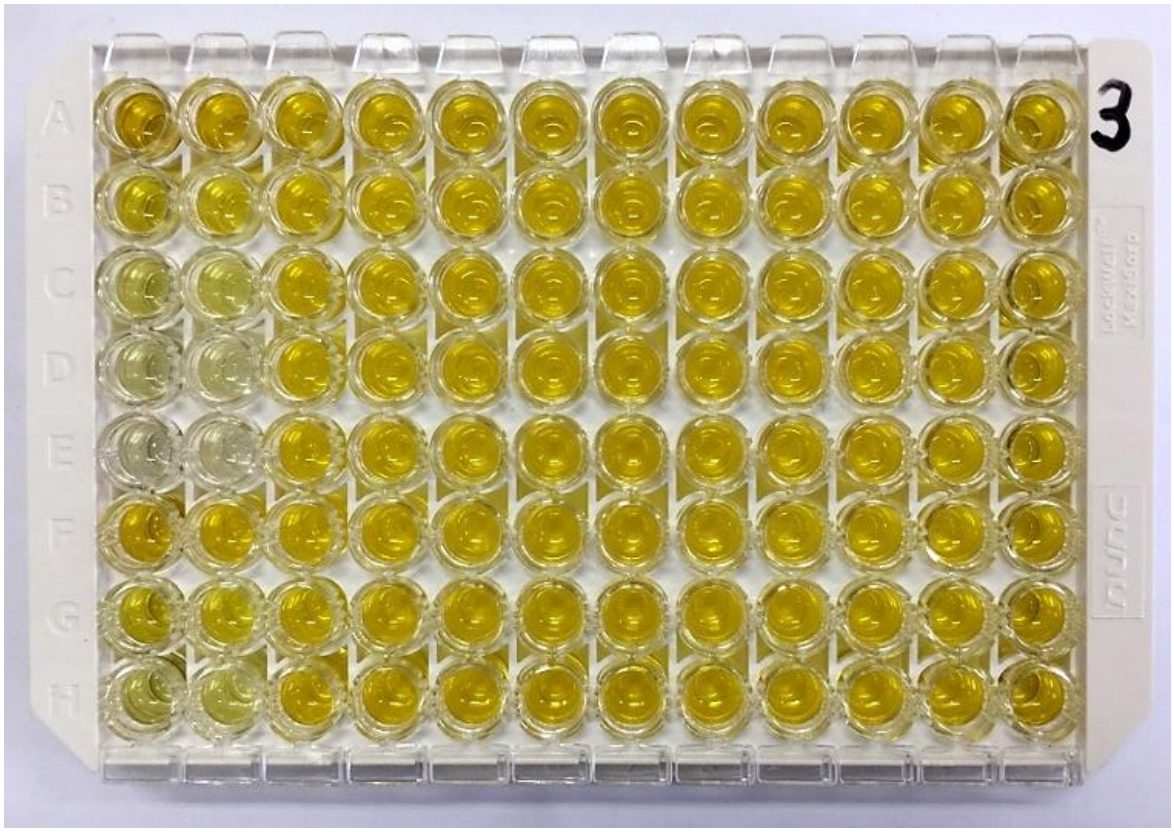
**Measurement parameters**

SUNRISE
Instrument serial number: 504000001
Measurement mode: Absorbance
Measurement wavelength: 450 nm
Reference wavelength: 620 nm
Dual wavelength mode: Difference
Read mode: Normal
Unit: OD
Date: 4/24/2018, Time: 2:52:08 PM

**Difference data**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 2.998 | 2.828 | 2.287 | 2.137 | 2.291 | 2.037 | 2.14 | 2.319 | 2.02 | 2.255 | 2.233 | 2.276 |
| B | 1.133 | 1.044 | 1.872 | 2.14 | 2.209 | 0.038 | 2.119 | 2.224 | 2.125 | 2.018 | 1.985 | 2.15 |
| C | 0.428 | 0.412 | 2.005 | 1.828 | 2.185 | 2.058 | 2.034 | 1.826 | 2.035 | 2.134 | 1.928 | 2.057 |
| D | 0.159 | 0.139 | 1.999 | 2.027 | 2.171 | 2.058 | 2.126 | 2.213 | 1.966 | 2.207 | 1.955 | 0.04 |
| E | 0.044 | 0.049 | 2.018 | 1.689 | 2.148 | 1.927 | 1.938 | 2.033 | 1.982 | 2.092 | 1.87 | 2.156 |
| F | 2.879 | 2.844 | 2.022 | 2.025 | 2.173 | 1.947 | 2.072 | 2.092 | 1.988 | 2.052 | 1.975 | 2.109 |
| G | 1.173 | 1.104 | 1.978 | 2.156 | 2.195 | 1.971 | 2.464 | 2.081 | 2.039 | 2.126 | 2.024 | 2.195 |
| H | 0.424 | 0.422 | 2.038 | 2.117 | 2.137 | 2.137 | 2.125 | 2.262 | 2.125 | 2.4 | 2.252 | 2.398 |

Şekil 4.6b: İki  no'lu AİA tabanlı ELISA plağı OD değerleri.




Şekil 4.7a: Üç no'lu AİA tabanlı ELISA plağı sonuç görüntüsü.

**Measurement parameters**

SUNRISE
Instrument serial number: 504000001
Measurement mode: Absorbance
Measurement wavelength: 450 nm
Reference wavelength: 620 nm
Dual wavelength mode: Difference
Read mode: Normal
Unit: OD
Date: 4/24/2018, Time: 2:54:12 PM

**Difference data**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 2.924 | 2.918 | 1.976 | 2.095 | 2.055 | 2.131 | 2.123 | 2.118 | 1.961 | 2.16 | 1.985 | 2.119 |
| B | 1.135 | 1.081 | 2.01 | 2.007 | 2.075 | 1.952 | 2.138 | 2.031 | 2.097 | 2 | 1.961 | 2.027 |
| C | 0.442 | 0.418 | 2.11 | 1.946 | 2.16 | 2.056 | 2.116 | 2.189 | 2.099 | 2.105 | 1.907 | 1.93 |
| D | 0.237 | 0.141 | 1.893 | 1.927 | 1.962 | 1.975 | 2.085 | 2.14 | 2.064 | 2.068 | 1.84 | 1.78 |
| E | 0.071 | 0.03 | 2.034 | 1.964 | 1.899 | 1.917 | 2.166 | 2.057 | 2.021 | 2.084 | 1.871 | 1.848 |
| F | 2.892 | 2.75 | 2.074 | 2.014 | 2.004 | 1.94 | 2.149 | 2.033 | 1.996 | 1.918 | 1.931 | 1.893 |
| G | 1.106 | 1.068 | 1.869 | 2.087 | 1.994 | 1.989 | 2.034 | 2.134 | 1.912 | 1.949 | 1.864 | 1.965 |
| H | 0.429 | 0.415 | 1.995 | 2.017 | 2.01 | 2.079 | 2.271 | 2.011 | 1.985 | 1.987 | 1.945 | 2.186 |

Şekil 4.7b: Üç no'lu AİA tabanlı ELISA plağı OD değerleri.




Şekil 4.8a: Dört no'lu AİA tabanlı ELISA plağı sonuç görüntüsü .

**Measurement parameters**

SUNRISE
Instrument serial number: 504000001
Measurement mode: Absorbance
Measurement wavelength: 450 nm
Reference wavelength: 620 nm
Dual wavelength mode: Difference
Read mode: Normal
Unit: OD
Date: 4/24/2018, Time: 2:56:32 PM

**Difference data**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 3.033 | 3.005 | 2.053 | 2.225 | 1.872 | 2.06 | 2.003 | 2.005 | 1.797 | 1.963 | 1.91 | 2.026 |
| B | 1.06 | 1.067 | 1.897 | 2.146 | 1.948 | 1.976 | 2.025 | 2.036 | 1.912 | 2.045 | 1.916 | 1.92 |
| C | 0.384 | 0.394 | 2.165 | 2.181 | 1.976 | 2.018 | 2.1 | 2.058 | 1.776 | 2.067 | 1.873 | 2.014 |
| D | 0.138 | 0.14 | 1.937 | 1.742 | 1.84 | 2.094 | 2.012 | 1.818 | 1.892 | 2.009 | 1.948 | 1.951 |
| E | 0.059 | 0.038 | 2.102 | 1.982 | 1.94 | 2.053 | 1.876 | 1.943 | 1.782 | 1.841 | 1.932 | 1.997 |
| F | 2.74 | 2.822 | 1.917 | 2.034 | 1.957 | 1.964 | 1.915 | 1.85 | 1.829 | 1.81 | 1.878 | 2.043 |
| G | 1 | 1.109 | 1.874 | 1.929 | 1.855 | 1.884 | 2.014 | 2.022 | 1.818 | 1.853 | 1.99 | 2.001 |
| H | 0.383 | 0.388 | 2.044 | 1.938 | 1.918 | 1.956 | 1.939 | 1.83 | 1.786 | 1.916 | 2.075 | 2.084 |

Şekil 4.8b: Dört no'lu AİA tabanlı ELISA plağı OD değerleri.




Şekil 4.9a: Beş no'lu AİA tabanlı ELISA plağı sonuç görüntüsü.

.

**Measurement parameters**

SUNRISE
Instrument serial number: 504000001
Measurement mode: Absorbance
Measurement wavelength: 450 nm
Reference wavelength: 620 nm
Dual wavelength mode: Difference
Read mode: Normal
Unit: OD
Date: 4/27/2018, Time: 12:24:13 PM

**Difference data**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 2.683 | 2.808 | 1.884 | 2.195 | 2.044 | 2.942 | 1.982 | 2.055 | 1.982 | 0.254 | 2.094 | 2.083 |
| B | 1.736 | 1.738 | 2.17 | 2.185 | 0.871 | 0.564 | 2.024 | 2.148 | 2.004 | 1.939 | 2.245 | 2.196 |
| C | 0.696 | 0.715 | 2.114 | 2.134 | 2.189 | 1.42 | 2.171 | 2.025 | 1.977 | 2.091 | 2.197 | 2.13 |
| D | 0.381 | 0.264 | 1.859 | 2.133 | 2.143 | 2.038 | 2.028 | 2.071 | 0.844 | 2.009 | 2.245 | 2.163 |
| E | 0.241 | 0.092 | 1.86 | 2.177 | 2.231 | 2.339 | 2.001 | 2.097 | 0.144 | 0.916 | 2.105 | 2.096 |
| F | 0.231 | 1.044 | 1.843 | 2.154 | 1.968 | 2.006 | 2.034 | 2.121 | 2.18 | 2.393 | 2.196 | 2.35 |
| G | 0.274 | 2.166 | 1.807 | 2.088 | 1.982 | 2.003 | 1.978 | 2.086 | 2.054 | 2.07 | 2.126 | 2.018 |
| H | 0.136 | 1.948 | 1.823 | 2.07 | 1.969 | 1.996 | 1.973 | 2.2 | 2.064 | 1.97 | 0.237 | 2.277 |

Şekil 4.9b: Beş no'lu AİA tabanlı ELISA plağı OD değerleri.

# 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, bakteri yüzeyinde bulunan antikor bağlayan proteinlerin (IgBP) saptanmasına yönelik "anti-idiopatik antikor tabanlı" olarak adlandırdığımız orijinal, üstün ve pratik bir tarama testinin geliştirilmesi, doğrulanması ve uygulamadaki etkinliğinin denenmesi amaçlanmıştır.

Antikor bağlayan proteinlerin varlığı ile ilgili olarak yapılmış araştırmalarda ortaya çıkan reaksiyonu görünür kılmak için değişik işaretleyiciler kullanılmaktadır. Literatürde daha önce bu konuda yapılmış olan çalışmalar incelendiğinde, IgBP'lerin saptanması veya tanımlanması için sıklıkla floresans veren madde, radyoaktif madde, enzim veya altın gibi çeşitli maddelerin immunoglobuline veya immünoglobulin molekülünün kesilmesiyle elde edilmiş Fc bölgesi gibi bazı kısımlarına kimyasal olarak bağlanmak süretiyle hazırlanmış probların/konjugatların kullanıldığı görülmektedir [30, 33, 104-107]. Konjugat olarak tanımlanan işaretli bir antikor hazırlamak için, antikor molekülü yukarıda belirtilen işaretleyiciler ile bağlanmakta, işaretlenmektedir. Bir antikor molekülü üzerinde antikordaki polipeptit zincirlerin kıvrılması sonucu oluşmuş olan globüler bölgeler yer alır, bu bölgelere domain adı verilmektedir. Antikorun hafif zincir molekülü üzerinde bir adet domain, ağır zincir molekülü üzerinde ise üç adet domain vardır; ağır zincir üzerindeki bu domain bölgeleri CH1, CH2 ve CH3 bölgeleridir. Bu bölgeler işaretleyiciler tarafından kimyasal bağlanmaya elverişli ve sıklıkla kullanılan hedef bölgeleridir. Genel anlamda, konjugat olarak tanımlanan işaretli antikor hazırlanırken, enzim veya diğer işaretleyici problar antikor molekülü üzerinde kimyasal bağlanmaya elverişli ve sıklıkla kullanılan hedef bölgelerine bağlanmaktadır [106].

Bakteriyel IgBP'ler de genellikle antikorların Fc bölgelerine bağlanırlar. Örneğin *S. aureus* protein A molekülü IgG'nin Fc molekülüne bağlanmaktadır. Grup C ve G beta hemolitik streptokokların ürettiği protein G molekülü insan IgG molekülünün Fc kısmına bağlanmaktadır ve bu bağlanma bölgesi *S. aureus*'taki protein A'nın insan IgG'sinde bağlandığı Fc bölgesi ile aynıdır [19, 108]. Bununla birlikte, IGBP'ler antikorun Fc bölgesi dışındaki diğer bölgelerine de bağlanabilmektedirler. *Staphylococcus aureus* protein A molekülü normalde IgG molekülünün Fc kısmına bağlandığı halde diğer antikorlara da bağlanabildiği ve bu antikorların değişken ağır zincirlerine de bağlandığı görülmüştür [109]

*Streptococcus pyogenes*'in ürettiği IgBP'lerin de (M-benzeri protein, protein H) immünoglobuline bağlanırken protein A ve protein G moleküllerini ile yarıştığı, yani antikor üzerindeki aynı bölgeye (IgG Fc bölgesi) bağlandığı bildirilmiştir [110]

Konjugatların hazırlanması sırasında işaretleyiciler ile (floresan madde, radyoaktif madde, enzim, altın gibi) bağlanan antikor üzerindeki bağlanma bölgeleri (başta CH2 ve CH3 domainleri olmak üzere), aynı zamanda bakteriyel IgBP'lerin de bağlandığı bölgeler ile aynı ve/veya örtüşük olan yerlerdir [36, 37, 106, 111]. Bu durum, bakterilerdeki IgBP'lerin varlığı bu tür konjugatlarla araştırılırken/taranırken çeşitli sorunlara, yalancı pozitifiliklere veya yalancı negatifliklere yol açabilmektedir. Antikor bağlayan protein saptanması ile ilgili yapılan çalışmalarda, bakteri eğer IgBP üretiyor ise, bakteriyel IgBP immünoglobulin molekülü ile bağlanmakta ve bir kompleks oluşmaktadır. Oluşan kompleksin (bakteri-IGBP-çalışmada kullanılan test antikor molekülü, örneğin IgG) saptanmasında reaksiyonu görünür kılmak için, genellikle konjugat olarak işaretli antikor (işaretli anti-IgG) kullanılmaktadır. Bu işaretleme işlemi genellikle biyotin, peroksidaz, alkalen fosfataz, radyoaktif iyot veya floresan madde ile yapılmaktadır. Böyle bir durumda, yalancı negatiflik ortaya çıkma olasılığı gözardı edilemez. Zira konjugat molekülü (anti-IgG) oluşmuş olan kompleksteki (bakteri-IgBP-IgG) antikorun Fc kısmına bağlanma özelliğine sahip olabilir (konjugat olarak kullanılan işaretli antikorun test antikoru olan IgG molekülünün Fc bölgesindeki domainlere spesifik olma ve bu domainlere bağlanma ihtimali vardır). Böyle bir durumda, kompleksteki IgG'ye de zaten bakteriyel IgBP bağlanmış olduğu için, konjugatın kompleksteki IgG'ye bağlanması sterik nedenlerden dolayı engellenebilecek, zayıf olabilecek veya belki de hiç bağlanamayacaktır. İşaretli antikor ile (örneğin peroksidaz enzimi ile işaretli antikor) tarama yapıldığında da yalancı negatiflik ortaya çıkma ihtimali vardır. Çünkü işaretlemede kullanılan peroksidaz enziminin de immünoglobulin molekülünün Fc kısmındaki domainlere bağlanma ihtimali yüksektir; peroksidaz enzimi genelde bu bölgelere bağlanmaktadır. Dolayısıyla bu işaretli antikor bakteri üzerine eklendiği zaman, bakteri antikorun Fc kısmındaki domainlere bağlanmaya çalışacak, ancak bu bölgeye de işaretleme amacıyla kullanılan peroksidaz bağlı olduğu için, antikorun bakteriye bağlanması zayıf olabilecek veya sterik nedenlerden dolayı bağlanamayacaktır. Böylece yalancı negatif reaksiyona ortaya çıkabilecek veya IgBP düşük düzeyde eksprese etmiş gibi görünebilecektir.

İşaretleme amacıyla kullanılan enzimler ile IgBP'nin antikor molekülünün aynı bölgesine bağlanması durumu şu ihtimali ortaya koymaktadır: Böyle bir durumda önceden bir madde ile bağlanmış/işaretlenmiş immunoglobulin molekülüne bakteriyel IgBP'nin bağlanması zayıflayacak veya belki de tamamen kaybolabilecektir. Bir diğer deyişle, doğal ve işaretlenmemiş bir immunoglobulin molekülüne bakteriyel IgBP bağlanabiliyor iken, işaretlenmiş formuna bağlanamayabilecektir. Hatta antikor moleküllerinin işaretlenmesi sırasındaki farklılıklar, işaretleme için kullanılan madde ile fazla işaretlenmesi özgül olduğu antijene bile bağlanma karakterini değiştirebilmektedir. Vira ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada hemaglutinine karşı bir FITC işaretli fare monoklonal antikor (Fc125) kullanılmış, antikor yüksek miktarda FITC ile işaretlendiğinde, monoklonal antikorun (Fc125) özgül olduğu hemaglutin antijenine bağlanmasının azaldığı bildirilmiştir [111].

Bakterilerdeki IgBP'lerin varlığı araştırılırken, işaretli konjugat kullanılmasına bağlı olarak çeşitli sebeplerden dolayı yalancı negatiflikler veya yalancı pozitiflikler görülebilmektedir. İşaretli konjugat ile taramaya/görüntülemeye bir diğer örnek streptavidin/biyotin sistemidir. Streptavidin/biyotin sisteminin moleküler biyolojide, immünolojide, mikrobiyolojide, yaygın uygulama ve kulanım alanları vardır. Bu sistem ile bakteriyel IgBP varlığı da rahatlıkla araştırılabilmektedir. Streptavidin proteini günümüzde rekombinant yöntemlerle elde edilmekte ve çeşitli amaçlarla kullanılabilmektedir [112]. Biyotin küçük bir molekül olup streptavidine çok yüksek bir afiniteyle bağlanmaktadır. Streptavidin-biyotin bağlanması neredeyse kovalan bağlanmalara yakın bir güçle gerçekleşmekte olup, bilinen en güçlü non-kovalan bağlanmalardan birisidir. Bu bağlanma çeşitli çevresel etkenlere de (organik çözücüler, deterjanlar, proteolitik enzimler, ekstrem pH'lar gibi) oldukça dirençlidir. Biyotin molekülü DNA, RNA ve protein gibi çeşitli substratlara bağlanabilmekte, onları işaretleyebilmektedir. Bu substratların görünür hale getirilmesi de streptavidin kullanılarak saptanmaktadır. Bu amaçla streptavidin enzimlerle (alkalen fosfataz, peroksidaz gibi) veya floresan problarla (FITC) rahatlıkla bağlanabilmekte, işaretlenebilmektedir. Sonrasında renklendirici substratın eklenmesi ile reaksiyon görünür kılınmakta, örnekler renklenmektedir. Böylelikle streptavidin-biyotin tabanlı biyolojik ölçümlere olanak vermektedir. Streptavidin-biyotin sistemi, antikor saflaştırma çalışmalarında, biyoteknoloji uygulamalarında, ELISA çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

Biyotin ile antikorun işaretlenmesi, konjugat oluşturulması esnasında, biyotin antikorun CH2 ve CH-3 gibi bölgelerine bağlanabilmektedir. Bakteriyel IgBP de antikorun Fc kısmındaki bu bölgeler bağlanma özelliğine sahipse, biyotin de bu bölgelere bağlanmış olabileceği için, sonuçta bakteri IgBP üretiyor olsa bile, IgBP varlığı ELISA sisteminde bu sterik engellemelerden dolayı tespit edilemeyecek, veya zayıf bir şekilde bağlanma olacak ve reaksiyon zayıf görünebilecektir. Böylece yalancı negatiflik ortaya çıkmış olacaktır.

Streptavidin-biyotin sistemi kullanılarak yapılan IgBP taramalarında yalancı pozitif reaksiyon görülme ihtimali de mevcuttur. Streptavidin molekülü normalde *Streptomyces avidinii* bakterisinin salgısal formdaki bir proteinidir. Diğer streptomiçes türleri de streptavidine benzer moleküller üretip salgılayabildiği gibi, başka cinse ait bakteriler de streptavidin üretebilmektedir [112, 113]. Eğer tarama testinde biotin ile işaretli bir antikor kullanılıyor ve test edilen mikroorganizma IgBP taşıyor olsa bile, bu mikroorganizmanın aynı zamanda streptavidin benzeri bir madde salgılaması durumunda, ortama eklenen biyotin ile işaretli antikorların tamamı streptavidinle bağlayacak ve sonuç güvenilmez olabilecektir. Bakteri IgBP taşımadığı halde, biyotin-streptavidin bağlanmasına sonucu renklenme olacak ve bakteri IgBP taşıyormuş sanılacaktır (yalancı pozitiflik). Bir diğer olasılık bakterinin IgBP üretmesidir. Böyle bir durumda ise, bakteri IgBP taşıyor olsa bile biyotin molekülleri streptavidine çok yüksek bağlanma afinitesi gösterdikleri için çoğunlukla streptavidine bağlanabilirler ve eğer bakteri IgBP'yi düşük düzeyde eksprese ediyorsa IgBP'ye hiç bağlanma olmayabilir, yalancı negatiflik görülür veya bakteri düşük düzeyde IgBP eksprese etmiş gibi görünebilir.

Streptavidin-biyotin yönteminin kullanıldığı çalışmalarda, yani deteksiyonda streptavidin kullanıldığında, hücrelerde endojen biyotin bağlayan proteinlerin bulunabilmesi sebebiyle de yalancı pozitiflikler görülebilmektedir. Tytgat'in yapığı bir çalışmada, bir *Lactobacillus rhamnosus* suşundaki lektin bağlayan glikoproteinlerin varlığı araştırılmış, bu amaçla Con-A lektini kullanılmış ve Con-A biyotinlenerek işaretlenmiştir [114]. Bağlanma reaksiyonunu görünür kılmak için de streptavidine dayalı yöntem (enzim ile işaretli streptavidin konjugatı; renklenme için de enziminin substratı olan nitroblue tetrazolium) kullanılmıştır. Çalışmada ortaya çıkan bağlanma reaksiyonunun (pozitif renklenme reaksiyonunun) Con-A bağlanmasını göstermesi gerekirken, endojen kökenli bir molekülün biyotini bağlaması sonucu pozitif yalancı reaksiyon görülmüştür. Afinite kromatografisi ile saflaştırma

çalışması sonucunda, bu bağlanmanın Con-A bağlanmasına bağlı değil de, biyotinin bağlanmasına bağlı olduğu anlaşılmıştır. Daha sonra bunun bir piruvat karboksilaz molekül olduğu ve biyotini bir kofaktör olarak bağladığı anlaşılmıştır. Bu durum streptavidin-biyotin bazlı ölçüm sistemindeki yalancı pozitiflik görülebilmesine bir başka örnektir. Yazar bu tür yalancı pozitifliklerden kaçınılması için streptavidin konujugatı yerine başka bir konjugat kullanılması ile, örneğin digoksigenin tabanlı ölçüm, bu tür yalancı pozitifliklerden kaçınılacağını bildirmiştir.

Antikor bağlayan proteinler farklı özellikte olup, bazıları tek bir canlı türüne ait immünoglobulinlere bazıları da birkaç farklı canlı türüne (sığır, fare, tavşan, at vs.) ait immünoglobulinlere bağlanma özelliğine sahiptir. Antikor bağlayan proteinlerin immunoglobulin izotiplerine veya daha da detaylı olarak izotipin alt tiplerine olan bağlanma özellikleri de farklılık göstermektedir. Hatta bazı türlerin immunoglobulinlerine çok iyi bağlanırken başka bir türe hiç bağlanmayabilmektedir. Örneğin Forsgren ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; *Moraxella catarrhalis* IgBP'si insan IgD'sine bağlanmaktadır [115]. *Moraxella catarrhalis*'in bu özelliğini saptamaya yönelik tarama testinde insan IgD yerine başka türe ait IgD kullanılmış olsaydı o zaman bu özellik saptanmayacaktı. Benzer bir mikroorganizma saptamak için (insan IgD'sini bağlama özelliği olan bir IgBP varlığını araştırmak için) tarama testinde işaretsiz insan IgD molekülü ve bunu bağlayıp bağlamadığını görüntülemek için de konjugat olarak buna bağlanan FITC ile işaretli fare kaynaklı anti-insan IgD kullanıldığında, test edilen mikroorganizma sadece fare antikorunu bağlıyor ise, bu durumda ortama eklenen insan IgD'yi bağlamadığı halde, "fare kaynaklı FITC-anti-insan IgD" konjugatını bağlayarak yalancı pozitif sonuç verebilecektir. Daha doğrusu floresan mikroskopunda pozitif floresans görülmesi, hem gerçek pozitiflik (bakterinin isan IgD'sini bağlaması) hem de yalancı pozitiflik (bakterinin fare IgG'sini-anti-IgD'sini bağlaması) anlamına gelebilecektir. Bir diğer deyişle, mikroorganizma insan IgD'sini bağlamadığı halde fare IgG'sini (anti-insan IgD) bağladığı için, insan IgD'sini bağladığı zannedilecektir; çünkü bu testte pozitif sinyal insan IgD'sinin bağlanması anlamına gelmektedir. Konjugat bir fare antikoru olduğu için mikroorganizma da fare antikoru bağlama özelliği olduğu için bunu bağlayacaktır. Bu durum böyle bir test sisteminin dezavantajı olmaktadır.

Bakteriyel IgBP'ler immünoglobulin molekülünün farklı bölgelerine bağlanabilmektedir. Bazıları Fab kısmına bazıları Fc kısmına, Fc kısmındaki CH2 ve CH3 domainlerine bağlanmaktadır. Antikor bağlayan proteinin antikorda bağlandığı bölge, bir deteksiyon antikoru olarak kullanılacak olan FITC-anti insan antikor konjugatında FITC'in antikor molekülünde bağlandığı Fc kısmındaki domainlerle aynı olabilir. İşte bu tür durumlarda, yani bu FITC ile işaretli antikor tarama antikoru (deteksiyon antikoru) olarak kullanıldığında, "işaretleme esnasında immünoglobuline bağlanmış olan FITC molekülü" bakteriyel IgBP'nin antikor molekülüne bağlanmasını sterik nedenlerden dolayı engelleyebilecektir. Dolayısıyla bakteri aslında IgBP eksprese ettiği halde (böyle bir sistem FITC-antikor ile ölçüm esasında dayalı olduğu için) IgBP yokmuş gibi görünebilecek, yalancı negatifliğe yol açabilecektir. Bir başka durumda, IGBP belki de yüksek düzeyde eksprese edilmesine rağmen, düşük düzeyde eksprese ediyormuş gibi görünecektir (çünkü sterik engelleme nedeniyle düşük floresans gözlenecektir). Bu hadise, FITC-antikor sistemi ile tarama yapmanın bir dezavantajıdır.

Bakteriyel IgBP ekspresyonu ve/veya düzeyi üreme şartlarına ve kullanılan besiyerinin içeriğine bağlı olarak değişebilmektedir [44]. Bir bakteri türünde aynı suşu bile IGBP ekspresyonu açısından değişen laboratuvar pasaj faktörlerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Grup A beta hemolitik streptokok suşunda deneysel olarak kullanılan değişik dipeptitlerin insan radyoaktif-işaretli IgG'nin bakteriye bağlanmasını etkilediği, inhibe ettikleri gösterilmiştir [44, 107]. *Yersinia* kaynaklı IGBP'in maksimum düzeyde açığa çıkması için pH değerinin 6.5'den düşük ve ısının 37$^{o}$C olması gerekmektedir; bağlanma hem ortam şartlarına (ısı, pH, besiyeri bileşenleri) hem bakteri çoğalma fazına bağlıdır [27, 90, 116, 117]. *E. coli* IgBP'lerinde maksimum ekspresyonun 37$^{o}$C'de ve durağan çoğalma fazında olduğu bildirilmiştir [23]. Dolayısıyla tüm bunlar dikkate alındığında, IgBP varlığının araştırılmasında, taramasında kullanılan yöntem hassas olmalıdır, zira düşük düzeyde ekspresyon veya sterik engellemeler sebebiyle pozitifliğin gözden kaçma ihtimali mevcuttur. Bir başka şekilde ifade edilirse, yapısal veya üreme şartlarına bağlı olarak düşük düzeylerde IgBP eksprese eden mikroorganizmaların saptanmasına yönelik kullanılan yöntemler çok hassas olmalıdır. Bizim geliştirdiğimiz yöntem de çok hassas olduğu için avantaj oluşturmaktadır.

Bazı çalışmalarda bütünlüğü bozulmamış antikor molekülünün veya enzimatik olarak kesilerek hazırlanmış antikor Fc parçasının $^{125}$I gibi radioaktif maddeler ile işaretlenmesi ile hazırlanan problar kullanılmıştı. Ancak, radyoaktif madde ile işaretlemenin zorluğu ve kullanım sakıncası dezavantaj yaratmaktadır. Ayrıca, işaretleme işlemi antikorun üzerindeki IgBP'e bağlanma bölgesini etkilemiş, maskelemiş de olabilir. Grover ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *Pseudomonas maltophilia*'nın immünoglobülinlerin Fc bölgesine bağlanan bir IgBP varlığı gösterilmiştir. Çalışmada radyoaktif $^{125}$I işaretli antikorlar ve işaretlenmemiş antikorlar kullanılmıştır ve radyoaktif iyot ile işaretlenmiş antikor ile işaretsiz antikor yer değiştirmiştir, yani işaretsiz antikor daha büyük bir afiniteyle bağlanmıştır [33]. Bu durum muhtemelen radyoaktif iyotun antikorda IgBP ile aynı bölgeye bağlanmış olmasından kaynaklanmaktadır.

*Haemophilus influenzae*'nın bazı suşları tarafından üretilen bir IgBP olan protein D molekülü IgD immünoglobulinine bağlanmaktadır. Yapılan bir çalışmada *Haemophilus* türlerinde IgD ve "IgD-bağlayan protein D'ye" karşı geliştirilmiş monoklonal antikorların bağlanma özellikleri araştırılmıştır. Çalışmadaki antikorlar radyoaktif iyot ile işaretlenmiştir. Araştırıcılar *Haemophilus aphrophilus*'un anti-protein D monoklonal antikoru ile reaktif olduğunu, ancak insan IgD'si ile reaktif olmadığını gözlemişlerdir. Bu durumun muhtemel bir sebebi, çalışmada kullanılan insan IgD molekülünün radyoaktif iyot ile işaretlenmesi ve bu sebepten dolayı *Haemophilus aphrophilus* tarafından üretilen IGBP'nin sterik engelleme nedeniyle IgD'ye bağlanamaması olabilir. Bir diğer deyişle IgD molekülü iyot ile işaretlenmiş olduğu için yalancı negatifliğe yol açılmış olabilir. Aynı çalışmada, *Haemophilus influenze*'da anti-protein D monoklonal antikorlarının sadece bakteri ekstraktları ile reaktif olduğu görülmüş, parçalanmamış/tüm bakteri ile direkt bağlanma deneylerinde reaktif olmadıkları görülmüştür; IgD antikorunun ise hem ekstraktlara hem de tüm bakteriye bağlandığı görülmüştür. Bu durum muhtemel bir izahı, monoklonal antikorların protein D'ye bağlandıkları domain ile IgD'nin protein D'ye bağlandığı domainin farklı olduğudur. Dolayısıyla bir proteinin, antikorun işlem görmesi, işaretlenmesi, kesilmesi, saflaştırılması işlemleri başka bir molekülün kendisine bağlanmasını etkileyebilmektedir. Aynı olayın veya buna benzer bir olayın IgBP varlığının araştırılması esnasında görülmesi de olası bir durumdur [118].

Test edilen mikroorganizmanın ürediği ortamda-besiyerinde immunoglobulin bulunuyor ise (örneğin kanlı agar besiyerine eklenen koyun kanından kaynaklanan koyun immünoglobulinleri varlığı) veya immunoglobuline bağlanabilme özelliği gösteren bir madde var ise ölçüm sistemine bağlı olarak yalancı pozitif veya yalancı negatif sonuç verebilecektir. Bizim çalışmamızda, koyun kanlı agar ile Mueller-Hinton agar karşılaştırıldığında, kanlı agarda üreyen bakteriler, Mueller-Hinton agarda üreyene göre daha iyi antikor bağlıyor gibi gözükmektedir, bir diğer deyişle bakteriler koyun kanlı agarda Mueller-Hinton agara göre daha iyi IgBP eksprese etmiş gibi görünmektedirler.

Tarama amaçlı kullanılan immünoglobulin örneği saf değil ise, işaretsiz veya işaretli şekilleri ile yapılacak çalışmaya ait verilerin güvenilirliği de sorgulanır hale gelebilecektir. Örneğin serum kaynaklı elde edilen antikor saf olmayabilir veya yapıya bağlanarak eşlik etmiş olan kompleman molekülleri olabilir. Bu nedenle, bakteriye olan bağlanma IgBP aracılığı ile değil de, kompleman veya fibrinojen yoluyla gerçekleşiyor olabilir ve yalancı pozitiflik olabilir. Yani bakteri sadece immunoglobulinleri değil aynı zamanda serum kaynaklı başka proteinleri de bağlayabilmektedir. Serum veya plazma, çok kompleks bir ortam olup bu ortamlardan bu düzeyde saf madde elde edebilmek neredeyse imkansızdır. Hatta serum/plasma kaynaklı immunoglobulinler dâhil olmak üzere terapotik proteinlerin tamamı %100 saflıkta değildir. Serumdan saflaştırılan antikorla yapılacak IgBP saptanmasına yönelik test sistemlerinde gözlenen etkinin bulaş maddelerden kaynaklı yalancı bir reaksiyon olup olmadığının doğrulanması gerekmektedir. Çeşitli bakteriler serumda bulunan fibrinojen, kompleman gibi çeşitli yapılara bağlanabilmektedir, bu yapılar taramada kullanılan antikor ile birlikte bulunabilir, dolayısıyla tarama testinde ortaya çıkan pozitif reaksiyon bakterinin IgBP'ye bağlanmasına bağlı da olabilir (gerçek pozitiflik) ya da fibrinojen-kompleman gibi yapılara bağlanması ile ilgili olabilir, yani yalancı pozitiflik görülebilir. Örneğin *S. aureus*, insan IgG molekülünü bağladığı gibi, bazı IgM, IgA ve IgE moleküllerini, immünoglobulinlerin Fab kısmını bağlar ve ayrıca fibrinojen ve fibronektine afinitesi olan yüzey yapılarına da sahiptir [119]. *Streptococcus pyogenes*'in M proteini serumdaki insan fibrinojenini, kompleman regülatör C4b bağlayıcı proteinini bağlayabilmektedir [120, 121]. *Streptococcus equi* kaynaklı fibrinojen bağlayan proteininin aynı zamanda IgG-Fc kısmını da bağlandığı bildirilmiştir [82]. Grup G beta hemolitik streptokokları insan IgG'sini bağlayabildiği gibi plazma kaynaklı çeşitli proteinler için de (örneğin fibronektin, plazminojen, alfa-2 makroglobulin) reseptör bulundurmakta ve onları bağlamaktadır [122]. Dolayısıyla başka bir bakteri taranırken, bakteri antikor bağlamadığı

halde fibrinojen bağlayan bir protein bulunabilir; işte böyle bir durumda eğer serum kökenli saf olmayan bir antikorla tarama yapılıyorsa, bakteri fibrinojene bağlanarak yalancı pozitiflik ortaya çıkmasına yol açabilir.

Yukarıda yazılı olan bütün bu sebepler göz önüne alındığında, IgBP varlığının araştırılmasında doğal bir immunoglobulin molekülü kullanılarak yapılacak bir tarama testinin çok daha üstün olacağı açıktır. Bu amaçla, şimdiye kadar literatürde tanımlananlardan farklı ve "anti-idiotipik antikor tabanlı" olarak adlandırdığımız etkin bir tarama sisteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bizim çalışmamızda kullanılan fare kaynaklı ve monoklonal antikor olan anti-idiotipik antikor, IgBP varlığını araştırmak için kullanılan insan IgG1'nin Fab bölgesindeki en uç kısmına bağlanmaktadır. Bu bağlanma antikor ile antijenik epitop arasında gerçekleşen bağlanma gibi olmaktadır. Anti-idiotipik antikor tabanlı ölçüm sisteminde kullanılan ve ortama eklenen test antikoru %100 saflıkta, yapısında kappa hafif zinciri olan insan IgG1'dir (IgG1κ). Testimizde besiyerinden alınan mikroorganizma, içinde sabit miktarda test antikoru bulunan solüsyona aktarılmakta ve kısa bir inkübasyon sonrası santrifüj edilerek üst sıvıda kalan test antikorunun miktarı ölçülmektedir. Üst sıvıdaki IgG1 test antikorunun ölçüm aşaması çok hassas olarak anti-idiotipik antikor tabanlı test sistemi ile gerçekleştirilmektedir. Üst sıvıdaki antikor miktarının azalması, yüzeyinde IgBP bulunduran bakterinin IgG1'i bağlayarak santrifüj sonrası bakterilerin dibe çökmesine ve bağlanmış olduğu IgG1'i de birlikte çökeltiye-tüp dibine taşımasından kaynaklanmaktadır. ELISA sistemimiz de zaten bu üst sıvıdaki antikoru ölçmeye dayalı bir sistem olduğu için, üst sıvıda antikor azalmasını herhangi bir engellemeye bağlı olmadan ölçebilecektir.

Sistemimizin bir diğer üstünlüğü de, bu bağlanmayı yani test antikorundaki azalmayı kantitatif olarak ölçebilmesidir. Anti-idiotipik antikor tabanlı ölçüm sistemimiz ortamdaki insan IgG1 antikor miktarı ile doğru orantılı reaksiyon/sonuç vermektedir. Ortama eklenen saf insan IgG1 antikorunun mikroorganizmaya bağlanması durumunda santrifüj sonrası sıvı ortamda azalacağından, ölçüm sisteminde de orantılı olarak azalmaya neden olacaktır. Böylelikle analitik açıdan niceliksel bir sonuç vermektedir. Dolayısıyla tarama esnasında hem IgBP varlığı, hem de bunun ne düzeyde eksprese edildiği test sistemimizin kantitafif olması sayesinde, kolaylıkla belirlenebilmiş olacaktır.

Çalışmamızda bakteri yüzeyindeki IgBP'lerin saptanmasına yönelik orijinal, pratik ve avantajları olan bir tarama testini geliştirdikten sonra, aynı zamanda bunun uygulamadaki etkinliğini de denedik. Bu amaçla, daha önce bu konuda pek araştırılmamış, IgBP yönünden taranmamış farklı bakterilerde bu yöntemle IgBP varlığını araştırdık. Genel olarak bakıldığında, gram negatif bakterilerde antikor bağlayan proteinler gram pozitif bakterilere göre daha az görülmektedir. Bununla birlikte, çeşitli çalışmalarda *Brucella*'larda, *Haemophilus* türlerinde, *Yersinia*'larda ve *Moraxella catarrhalis* gibi farklı gram negatif bakterilerde de IgG, IgM, IgD gibi değişik immünoglobulinleri bağlayan IGBP'lerin varlığı bildirilmiştir. Biz de taramamıza bu sebepten dolayı çoğunlukla gram negatif bakterileri dahil ettik. Çalışmamızda kullandığımız gram negatif bakterilerin bir kısmı, eskiden klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında fazla tanınmayan, saprofit/kommensal olduğu düşünülen, etken olarak tanımlaması pek yapılmayan, ancak son yıllarda otomatize sistemlerin mikrobiyoloji laboratuvarlarında daha yaygın kullanılmasına bağlı olarak günümüzde daha sık olarak izole edilen ve tanımlanan bakterilerdir.

Deneylerimiz sonrasında, bu test yöntemi ile çalışmada yer alan tüm *S. aureus* suşlarında (toplam üç adet) IgBP varlığını saptadık. *Staphylococcus aureus* suşlarında protein A varlığına bağlı olarak IgG bağlanması bilinen bir durum olduğu için bu bulgu şaşırtıcı değildir. Biz de bu amaçla fazla sayıda *S. aureus* suşunu taramamıza dahil etmedik. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarımızdan izole etmiş olduğumuz birkaç *S. aureus* suşunu deneylerimiz esnasında değişik plaklarda çalışarak, bir anlamda iç kalite kontrolü gibi kullanarak deneyimizin bir kez daha konfirme edilmesini sağlamış olduk. Çalışmamızda taramaya dahil etmiş olduğumuz gram negatif ve gram pozitif bakterilerin hiçbirinde IgBP varlığı görülmemiştir.

Tanımladığımız anti-idiotipik antikor tabanlı yöntem sadece mikroorganizmanın hücre yüzeyinde IgBP eksprese ediliyor ise bunu göstermeye yönelik pratik bir sistemdir. Bu sistemde test edilen bakteri katı besiyerindeki koloniden doğrudan aktarılmaktadır. Salgılanan nitelikteki herhangi bir maddeden etkilenmemektedir. Hatta test edilen mikroorganizma IgBP karakterinde bir maddeyi sadece salgılıyor olsa bile, bu anti-idiotipik antikor tabanlı tarama sistemi, bakteri yüzeyinde IgBP varlığını göstermeyecek, yani yalancı pozitif sonuç vermeyecektir. Zira ortamdaki test antikoru santrifüj ile dibe çökmeyecek (test antikoru ancak bakteriye bağlanırsa dibe çökmektedir) ve azalmayacaktır; böylelikle yalancı

pozitiflik görülmeyecektir. Dolayısıyla, salgısal nitelikteki IgBP ortama eklenen insan IgG1 molekülüne bağlı kalmaya devam ettiği halde test sistemini etkilemeyecek, ortama eklenen insan IgG1 molekülünde azalmaya neden olmayacaktır. Salgılanmış olan IgBP fare antikorunu bağlama özelliğine sahipse bile, test sistemimiz anti-idiotipik antikor tabanlı olması sebebiyle test antikorunun bağlanmasında bir engellemeye yol açmayacaktır.

Çalışmamızda kullanılan ve test antikoru %100 saflıkta, yapısında kappa hafif zinciri olan insan IgG1 (IgG1κ) molekülüdür. Besiyerinden alınan mikroorganizma belirli miktarda test antikoru bulunan tampona aktarılmakta ve kısa bir inkübasyon sonrası santrifüj edilerek üst sıvıda kalan bu test antikor miktarı ölçülmektedir. Yani ölçümümüzde kullanacağımız antikor tamamen saf ve işaretsiz olup, herhangi bir manipülasyona uğramamıştır. Bir başka deyişle bakteri (eğer IgBP eksprese ediyorsa) IgBP'si antikora bağlanırken herhangi bir engelleme, maskeleme, sterik engelleme vs durumu ile karşılaşmamaktadır. Dolayısıyla IgBP bakteri tarafından çok düşük düzeyde eksprese edilmiş olsa dahi immünoglobulin molekülüne bağlanacaktır. Sonrasında santrifüj işlemi ile bakteriler dibe çökerek sediment oluşturacağı için üst sıvıda bakteri bulunmayacak, üst sıvıda sadece test antikoru düşük miktarda, yüksek miktarda veya hiç değişmemiş miktarda (bakterinin IgBP eksprese edip etmemesine bağlı olarak) bulunacaktır. Anti-idiotipik antikor tabanlı ELISA sistemimiz de bu saf, işaretsiz test antikorunu ölçmektedir. Bu ölçümün kantitatif olması sistemimizin ekstra bir avantajıdır, zira aynı anda, yani tarama yapılırken hem IgBP varlığı hem de bunun ne ölçüde eksprese edildiği veya bağlanma afinitesinin yüksekliği hakkında da fikir edinilmektedir. Dolayısıyla ölçümümüz herhangi bir engellemeden bağımsızdır, bir diğer deyişle ortamda (üst sıvıda) ne kadar antikor var ise onu ölçecektir, bu ölçüm sonucu da ortamda ne kadar antikorun bakteri tarafından IgBP ile bağlandığını, dolayısıyla da bakterideki IgBP varlığını göstermektedir.

Geliştirdiğimiz ELISA yönteminde kullanılan immunoglobulin doğal halde olduğundan, yani herhangi bir madde ile işaretlenmediğinden, kimyasal bir işleme tabi tutulmadığından, enzimler veya kimyasal maddeler ile kesilip parçalanarak elde edilen fragman içermediğinden bu işlemlerden veya işaretlemeden kaynaklanabilecek olumsuz etkilerden uzaktır ve olası avantajlar içermektedir. Çalışmamızda kullandığımız anti-idiotipik antikor tabanlı bu tarama sistemi %100 özgüllükte olduğu için taranacak mikroorganizmanın alındığı besiyerinden kaynaklı bir maddenin yalancı pozitif ve negatif etkisi

beklenmemektedir. Zira anti-idiotipik antikor tabanlı tarama sisteminde antijen-antikor bağlanması (antikor-antijenik epitop arasında gerçekleşen bağlanma gibi) Fab bölgesinin en uç kısmından gerçekleştiği için, antikorun Fc kısmı ile etkileşime girebilecek maddeler test sistemini etkilemeyecektir. Bizim yöntemimizde kullanılan test antikoru insan IgG1 monoklonal antikoru olup içeriğinde % 0.1 oranında bile başka bir bulaş protein bulunmamaktadır, %100 saflıktadır. Bu nedenle test sonucunda saptanan pozitiflik yalancı bir reaksiyon olmayıp doğrudan immunoglobulin bağlanması ile ilgili olacaktır. Test sistemimizde bir antikor idiotopu ile anti-idiotipik antikor arasındaki bağlanmayı engelleyebilecek veya inhibe edecek ana faktör ortama eklenecek özgül antijendir. Dolayısıyla, antikor ile anti-idiotipik antikorun birlikte kullanılarak oluşturulan anti-idiotipik tabanlı tarama sistemi %100 özgüllük sağlamaktadır. Bu özellikler yöntemimizin bakterilerde IgBP varlığının araştırılmasına yönelik tarama esnasında kullanılmasında üstün-avantajlı yönlerini oluşturmaktadır.

Şimdiye kadar tanımlanmış bakteriyel IgBP'lerin hemen tamamı genel olarak insan IgG1 izotipindeki antikoru yüksek afiniteyle bağlamaktadır. Geliştirdiğimiz bu tarama sisteminde kullandığımız test antikorunun insan IgG1 olması bu açıdan antikor izotipine bağlı potansiyel bir kaçağı minimuma indirmesi yanında, yapısında kappa hafif zincir bulundurması protein L benzeri bir IgBP'yi yakalama olasılığını artıracaktır. Bir açıdan türlerdeki antikor izotiplerinin genel anlamda iyi bir temsilcisi gibidir. Bir diğer ifadeyle, test edilen ilgili mikroorganizmada IgBP var ise bunu göstermek için kullanılabilecek en uygun tekil antikor izotipidir.

# 6. SONUÇ VE ÖNERILER

BU çalışma sonucunda IgBP varlığının araştırılması sonucunda, daha önce bu yönden araştırılmamış taranmamış bir bakteride IgBP varlığı saptanabilir. Bu saptanmış olan yeni IgBP'nin oldukça değişik immünglobulin bağlama özelliği, bağlanma bölgeleri bulunabilir. Böyle bir durumda bu yeni molekül yani IgBP mikrobiyolojide, immünolojide, immünokimyasal uygulamalarda, biyolojide yeni araştırma olanaklarının gelişmesine yol açabilir; enfeksiyon patogenezinin anlaşılmasına katkı sağlayabilir. Bu sebepten dolayı (üstün ve avantajlı özellikleri olan) yeni, hızlı, pratik bir test geliştirilmesinin ve bu test yöntemi kullanılarak IgBP araştırılmasının önemli olacağını düşünmekteyiz.

# KAYNAKLAR


1. Delves, P.J., et al. 2017. *Roitt's essential immunology*. 13th edition. ed. Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. p.232.

2. Hawley, L., et al. 2014. *Microbiology and Immunology*. 6th ed. Board review series. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Heath. x, p 347

3. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai. 2016. *Basic immunology : functions and disorders of the immune system*. Fifth edition. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier. x, 335 p.

4. Thomas, K.A., N.M. Valenzuela, and E.F. Reed. 2015. *The perfect storm: HLA antibodies, complement, FcgammaRs, and endothelium in transplant rejection.* Trends Mol Med, 21(5): p. 319-29.

5. Kizhedath, A., S. Wilkinson, and J. Glassey, 2017. *Applicability of predictive toxicology methods for monoclonal antibody therapeutics: status Quo and scope.* Arch Toxicol, 91(4): p. 1595-1612.

6. Rosales, C., Uribe-Querol, E, 2017. *Fc receptors: Cell activators of antibody functions.* Advances in Bioscience and Biotechnology, 4: p. 13.

7. Boyle, M.D.P., *Bacterial immunoglobulin binding proteins*. 1990, San Diego: Academic Press.p.22-35.

8. Ting, J. and A.S. Lee,1988. *Human gene encoding the 78,000-dalton glucose-regulated protein and its pseudogene: structure, conservation, and regulation.* DNA, 7(4): p. 275-86.

9. Hendershot, L.M., et al.,1994. *Localization of the gene encoding human BiP/GRP78, the endoplasmic reticulum cognate of the HSP70 family, to chromosome 9q34.* Genomics, 20(2): p. 281-4.

10. Inui, S., et al.,1995. *Molecular cloning of a cDNA clone encoding a phosphoprotein component related to the Ig receptor-mediated signal transduction.* J Immunol, 154(6): p. 2714-23.

11. Di Como, C.J. and K.T. Arndt,1996. *Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases.* Genes Dev, 10(15): p. 1904-16.

12. Onda, M., et al.,1997. *Expression and chromosomal localization of the human alpha 4/IGBP1 gene, the structure of which is closely related to the yeast TAP42 protein of the rapamycin-sensitive signal transduction pathway.* Genomics, 46(3): p. 373-8.

13. Kihlberg, B.M., et al.,1999. *Protein H, an antiphagocytic surface protein in Streptococcus pyogenes.* Infect Immun, 67(4): p. 1708-14.

14. Tolo, K. and K. Helgeland,1991. *Fc-binding components: a virulence factor in Actinobacillus actinomycetemcomitans?* Oral Microbiol Immunol, 6(6): p. 373-7.

15. Sidorin, E.V. and T.F. Solov'eva, 2011. *IgG-binding proteins of bacteria.* Biochemistry (Mosc), 76(3): p. 295-308.

16. Bjorck, L., 1988. *Protein L. A novel bacterial cell wall protein with affinity for Ig L chains.* J Immunol, 140(4): p. 1194-7.

17. Raeder, R., E.L. Faulmann, and M.D. Boyle, 1991. *Evidence for functional heterogeneity in IgG Fc-binding proteins associated with group A streptococci.* J Immunol, 146(4): p. 1247-53.

18. Labbe, S. and D. Grenier, 1995. *Characterization of the human immunoglobulin G Fc-binding activity in Prevotella intermedia.* Infect Immun, 63(7): p. 2785-9.

19. Bjorck, L. and G. Kronvall, 1984. *Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent.* J Immunol, 133(2): p. 969-74.

20. Kobayashi, S.D. and F.R. DeLeo, 2013. *Staphylococcus aureus protein A promotes immune suppression.* MBio, 4(5): p. e00764-13.

21. Widders, P.R., et al., 1989. *Immunoglobulin-binding activity among pathogenic and carrier isolates of Haemophilus somnus.* Infection and Immunity, 57(2): p. 639-642.

22. Myhre, E.B. and G. Kronvall, 1977. *Heterogeneity of nonimmune immunoglobulin Fc reactivity among gram-positive cocci: description of three major types of receptors for human immunoglobulin G.* Infection and Immunity, 17(3): p. 475-482.

23. Sandt, C.H., et al., 1997. *Escherichia coli strains with nonimmune immunoglobulin-binding activity.* Infect Immun, 65(11): p. 4572-9.

24. Reza, A.H., et al., 1995. *Particle agglutination assay for detection of albumin and IgG binding cell surface components of Helicobacter pylori.* Zentralbl Bakteriol, 282(3): p. 255-64.

25. Corbeil, L.B., F.D. Bastida-Corcuera, and T.J. Beveridge, 1997. *Haemophilus somnus immunoglobulin binding proteins and surface fibrils.* Infect Immun, 65(10): p. 4250-7.

26. Yarnall, M., P.R. Widders, and L.B. Corbeil, 1988. *Isolation and characterization of Fc receptors from Haemophilus somnus.* Scand J Immunol, 28(2): p. 129-37.

27. Lindler, L.E., M.S. Klempner, and S.C. Straley, 1990. *Yersinia pestis pH 6 antigen: genetic, biochemical, and virulence characterization of a protein involved in the pathogenesis of bubonic plague.* Infect Immun, 58(8): p. 2569-77.

28. Sidorin, E.V., et al., 2006. *Isolation and characterization of a low-molecular-weight immunoglobulin-binding protein from Yersinia pseudotuberculosis.* Biochemistry (Mosc), 71(11): p. 1278-83.

29. Sidorin, E.V., et al., 2009. *Chaperone Skp from Yersinia pseudotuberculosis exhibits immunoglobulin G binding ability.* Biochemistry (Mosc), 74(4): p. 406-15.

30. Sandt, C.H. and C.W. Hill, 2000. *Four Different Genes Responsible for Nonimmune Immunoglobulin-Binding Activities within a Single Strain ofEscherichia coli*. Infection and Immunity, 68(4): p. 2205-2214.

31. Lu, Y., et al., 2006. *A New Immunoglobulin-Binding Protein, EibG, Is Responsible for the Chain-Like Adhesion Phenotype of Locus of Enterocyte Effacement-Negative, Shiga Toxin-Producing Escherichia coli*. Infection and Immunity, 74(10): p. 5747-5755.

32. Leo, J.C. and A. Goldman, 2009. *The immunoglobulin-binding Eib proteins from Escherichia coli are receptors for IgG Fc.* Mol Immunol, 46(8-9): p. 1860-6.

33. Grover, S., Z.A. McGee, and W.D. Odell, 1991. *Isolation of a 30 kDa immunoglobulin binding protein from Pseudomonas maltophilia.* J Immunol Methods, 141(2): p. 187-97.

34. Amini, H.R., et al., 1996 *Immunochemical properties of a 60 kDa cell surface-associated heat shock-protein (Hsp60) from Helicobacter pylori.* FEMS Immunol Med Microbiol,. 16(3-4): p. 163-72.

35. Lewis, M.J., et al., 2008. *A common theme in interaction of bacterial immunoglobulin-binding proteins with immunoglobulins illustrated in the equine system.* J Biol Chem, 283(25): p. 17615-23.

36. Pleass, R.J., et al., 2001. *Streptococcal IgA-binding proteins bind in the Calpha 2-Calpha 3 interdomain region and inhibit binding of IgA to human CD89.* J Biol Chem, 276(11): p. 8197-204.

37. Wines, B.D., et al., 2006. *A competitive mechanism for staphylococcal toxin SSL7 inhibiting the leukocyte IgA receptor, Fc alphaRI, is revealed by SSL7 binding at the C alpha2/C alpha3 interface of IgA.* J Biol Chem, 281(3): p. 1389-93.

38. Ramsland, P.A., et al., 2007. *Structural basis for evasion of IgA immunity by Staphylococcus aureus revealed in the complex of SSL7 with Fc of human IgA1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 104(38): p. 15051-6.

39. Choe, W., T.A. Durgannavar, and S.J. Chung, 2016. *Fc-Binding Ligands of Immunoglobulin G: An Overview of High Affinity Proteins and Peptides.* Materials (Basel), 9(12).

40. Graille, M., et al., 2000. *Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 97(10): p. 5399-404.

41. Forsgren, A. and J. Sjoquist, 1966. *"Protein A" from S. aureus. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin.* J Immunol, 97(6): p. 822-7.

42. Yarnall, M. and M.D. Boyle, 1986. *Identification of a unique receptor on a group A streptococcus for the Fc region of human IgG3.* J Immunol, 136(7): p. 2670-3.

43. Yarnall, M. and M.D. Boyle, 1986. *Isolation and characterization of type IIa and type IIb Fc receptors from a group A streptococcus.* Scand J Immunol, 24(5): p. 549-57.

44. Reis, K.J., E.J. Siden, and M.D. Boyle, 1988. *Selective colony blotting to expand bacterial surface receptors: applications to receptors for rat immunoglobulins.* Biotechniques, 6(2): p. 130-6.

45. Chhatwal, G.S. and H. Blobel, 1987. *Isolation and properties of a novel IgG-binding protein from streptococci of serological group U.* Med Microbiol Immunol, 176(1): p. 1-12.

46. Lammler, C., et al., 1985. *Interactions of immunoglobulin G, fibrinogen and fibronectin with Staphylococcus hyicus and Staphylococcus intermedius.* Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A, 260(2): p. 232-7.

47. Erling B. Myhre, M.E., 1985 *A non-immune interaction between the light chain of human immunoglobulin and a surface component of a Peptococcus magnus strain.* Molecular Immunology, 22(8): p. 879-885.

48. Lindahl, G. and G. Kronvall, 1988. *Nonimmune binding of Ig to Clostridium perfringens. Preferential binding of IgM and aggregated IgG.* The Journal of Immunology, 140(4): p. 1223-1227.

49. Van de Merwe, J.P. and J.H. Stegeman, 1985. *Binding of Coprococcus comes to the Fc portion of IgG. A possible role in the pathogenesis of Crohn's disease?* Eur J Immunol, 15(8): p. 860-3.

50. Torpier, G., A. Capron, and M.A. Ouaissi, 1979. *Receptor for IgG(Fc) and human beta2-microglobulin on S. mansoni schistosomula.* Nature, 278(5703): p. 447-9.

51. Tarleton, R.L. and W.M. Kemp, 1981. *Demonstration of IgG-Fc and C3 receptors on adult Schistosoma mansoni.* J Immunol, 126(1): p. 379-84.

52. G.E., M. *Structural Biochemistry/Protein function/Epitope*. 2008; Available from: 3 Eylul 2018 tarihinde URL: https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Protein_function/Epitope adresinden erişildi.

53. Yildirim, T., et al., 2004. *Generation of Anti-Idiotypic Antibodies that Mimic HBsAg and Vaccination against Hepatitis B Virus.* Hybridoma and Hybridomics, 23(3): p. 192-197.

54. Eisen, H.N. and H.N. Eisen, 1990. *General immunology*., Philadelphia: Lippincott. xi, p 259

55. Johnson, A.G. and B.L. Clarke, 2005. *High-yield immunology*. 2nd ed. The high-yield series., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. xi, p 99

56. Abbas, A.K., et al., 2018 *Cellular and molecular immunology*. Ninth edition. ed. Philadelphia, PA: Elsevier. x, p 565.

57. Aslıyüce, S., Türkmen, D., Denizli, A., 2016. *Bakteri duvarındaki mucize: protein A.* Bioreg Bilim. Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü: p. 1-4.

58. Stauruspharma, *Immunoglobulins and variants directed against pathogenic microbes*. 2014: USA.

59. Murray, P.R., et al., 2016. *Tıbbi Mikrobiyoloji*. 7. Baskı ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders. x, 874 p.

60. Björk, I., B.-Å. Petersson, and J. Sjöquist, 1972. *Some Physicochemical Properties of Protein A from Staphylococcus aureus.* European Journal of Biochemistry, 29(3): p. 579-584.

61. Reis, K.J., E.M. Ayoub, and M.D. Boyle, 1983. *Detection of receptors for the Fc region of IgG on streptococci.* J Immunol Methods, 59(1): p. 83-94.

62. Zhang, L., et al., 1998. *A second IgG-binding protein in Staphylococcus aureus.* Microbiology,144 ( Pt 4): p. 985-91.

63. Clark, E., et al., 2009. *IsaB, a new immunoglobulin-binding protein from Staphylococcus aureus.* Molecular Immunology, 46(14): p. 2834-2835.

64. Itoh, S., et al., 2010. *Staphylococcal superantigen-like protein 10 (SSL10) binds to human immunoglobulin G (IgG) and inhibits complement activation via the classical pathway.* Mol Immunol,47(4): p. 932-8.

65. Atkins, K.L., et al., 2008. *S. aureus IgG-binding proteins SpA and Sbi: host specificity and mechanisms of immune complex formation.* Mol Immunol, 45(6): p. 1600-11.

66. Deisenhofer, J., et al., 1978. *Crystallization, crystal structure analysis and atomic model of the complex formed by a human Fc fragment and fragment B of protein A from Staphylococcus aureus.* Hoppe Seylers Z Physiol Chem, 359(8): p. 975-85.

67. Burman, J.D., et al., 2008. *Interaction of human complement with Sbi, a staphylococcal immunoglobulin-binding protein: indications of a novel mechanism of complement evasion by Staphylococcus aureus.* J Biol Chem, 283(25): p. 17579-93.

68. Haanes, E.J., D.G. Heath, and P.P. Cleary, 1992. *Architecture of the vir regulons of group A streptococci parallels opacity factor phenotype and M protein class.* J Bacteriol, 174(15): p. 4967-76.

69. Podbielski, A., 1993. *Three different types of organization of the vir regulon in group A streptococci.* Mol Gen Genet, 237(1-2): p. 287-300.

70. Stenberg, L., P. O'Toole, and G. Lindahl, 1992. *Many group A streptococcal strains express two different immunoglobulin-binding proteins, encoded by closely linked genes: characterization of the proteins expressed by four strains of different M-type.* Mol Microbiol, (9): p. 1185-94.

71. Akesson, P., et al., 1994. *M1 protein and protein H: IgGFc- and albumin-binding streptococcal surface proteins encoded by adjacent genes.* Biochem J, 300 ( Pt 3): p. 877-86.

72. Boyle, M.D., et al., 1994. *Analysis of genes encoding two unique type IIa immunoglobulin G-binding proteins expressed by a single group A streptococcal isolate.* Infect Immun, 62(4): p. 1336-47.

73. Bergmann, S., et al., 2017. *SCM, the M Protein of Streptococcus canis Binds Immunoglobulin G.* Front Cell Infect Microbiol, 7: p. 80.

74. Sjöbring, U., et al., 1989. *Ig-binding bacterial proteins also bind proteinase inhibitors.* The Journal of Immunology, 143(9): p. 2948-2954.

75. Sjobring, U., et al., 1988. *Isolation and characterization of a 14-kDa albumin-binding fragment of streptococcal protein G.* J Immunol, 140(5): p. 1595-9.

76. Reis, K.J., E.M. Ayoub, and M.D. Boyle, 1984. *Streptococcal Fc receptors. I. Isolation and partial characterization of the receptor from a group C streptococcus.* J Immunol, 132(6): p. 3091-7.

77. Sauer-Eriksson, A.E., et al., 1995. *Crystal structure of the C2 fragment of streptococcal protein G in complex with the Fc domain of human IgG.* Structure, 3(3): p. 265-78.

78. JONSSON, H. and H.-P. MÜLLER, 1994. *The type-III Fe receptor from Streptococcus dysgalactiae is also an α2-macroglobulin receptor.* European Journal of Biochemistry, 220(3): p. 819-826.

79. Jonsson, H., C. Burtsoff-Asp, and B. Guss, 1995. *Streptococcal protein MAG--a protein with broad albumin binding specificity.* Biochim Biophys Acta, 1249(1): p. 65-71.

80. Jonsson, H., et al., 1994. *MAG, a novel plasma protein receptor from Streptococcus dysgalactiae.* Gene,143(1): p. 85-9.

81. Nitsche-Schmitz, D.P., et al., 2007. *Group G streptococcal IgG binding molecules FOG and protein G have different impacts on opsonization by C1q.* J Biol Chem, 282(24): p. 17530-6.

82. Meehan, M., et al., 2001. *The fibrinogen-binding protein (FgBP) of Streptococcus equi subsp. equi additionally binds IgG and contributes to virulence in a mouse model.* Microbiology, 147(Pt 12): p. 3311-22.

83. Akerstrom, B. and L. Bjorck,1989. *Protein L: an immunoglobulin light chain-binding bacterial protein. Characterization of binding and physicochemical properties.* J Biol Chem, 264(33): p. 19740-6.

84. Enokizono, J., et al.,1997. *NMR analysis of the interaction between protein L and Ig light chains.* J Mol Biol, 270(1): p. 8-13.

85. Nilson, B.H., et al.,1992. *Protein L from Peptostreptococcus magnus binds to the kappa light chain variable domain.* J Biol Chem, 267(4): p. 2234-9.

86. Wikstrom, M., et al.,1995. *Mapping of the immunoglobulin light chain-binding site of protein L.* J Mol Biol, 250(2): p. 128-33.

87. Kastern, W., U. Sjobring, and L. Bjorck,1992. *Structure of peptostreptococcal protein L and identification of a repeated immunoglobulin light chain-binding domain.* J Biol Chem, 267(18): p. 12820-5.

88. Kastern, W., et al.,1990. *Protein L, a bacterial immunoglobulin-binding protein and possible virulence determinant.* Infection and Immunity, 58(5): p. 1217-1222.

89. Zav'yalov, V.P., et al., 1996. *pH6 antigen (PsaA protein) of Yersinia pestis, a novel bacterial Fc-receptor.* FEMS Immunol Med Microbiol, 14(1): p. 53-7.

90. Naberezhnykh, G.A., et al., 2006. *Influence of culture conditions and virulence plasmids on expression of immunoglobulin-binding proteins of Yersinia pseudotuberculosis.* Biochemistry (Mosc), 71(11): p. 1284-8.

91. Leo, J.C. and A. Goldman, 2010. *Jacks of all trades?--Probably not. The E. coli Eib proteins bind IgG Fc.* Mol Immunol, 47(9): p. 1870-2.

92. Bastida-Corcuera, F.D., K.H. Nielsen, and L.B. Corbeil, 2010. *Binding of bovine IgG2a and IgG2b allotypes to protein A, protein G, and Haemophilus somnus IgBPs.* Vet Immunol Immunopathol, 71(2): p. 143-9.

93. Guo, M., et al., 2000. *Identification and characterization of human immunoglobulin G Fc receptors of Fusobacterium nucleatum.* Oral Microbiol Immunol, 15(2): p. 119-23.

94. Sasaki, K. and R.S. Munson, Jr., 1993. *Protein D of Haemophilus influenzae is not a universal immunoglobulin D-binding protein.* Infect Immun, 61(7): p. 3026-31.

95. Forsgren, A. and A.O. Grubb, 1979. *Many bacterial species bind human IgD.* J Immunol, 122(4): p. 1468-72.

96. Forsgren, A., et al., 1988. *Branhamella catarrhalis activates human B lymphocytes following interactions with surface IgD and class I major histocompatibility complex antigens.* Cell Immunol, 112(1): p. 78-88.

97. Widders, P.R., et al., 1985. *Nonimmune binding of equine immunoglobulin by the causative organism of contagious equine metritis, Taylorella equigenitalis.* Infect Immun, 48(2): p. 417-21.

98. Dmitriev, A.D., et al., 2013. *Monoclonal antibodies requiring coating buffer with low pH for efficient antigen capture in sandwich ELISA: the rarities or practically important phenomena?* J Immunoassay Immunochem, 34(4): p. 414-37.

99. Kuttappan, V.A., et al., 2015. *Comparison of different ELISA protocols for the detection of IgA against influenza nucleoproteins in trachea of vaccinated chickens.* Poult Sci, 94(2): p. 181-4.

100. *The Protein Man's Blog* A Discussion of Protein Research, 2017.

101. Zhang, M., Hu, Y., Liu, S., Cong, S., Liu, B., and Wang, L, 2013. *A highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of dipropyl phthalate in plastic food contact materials.* Food and Agricultural Immunology, 24(2): p. 165-177.

102. Farney, J.K., et al., 2011. *Technical note: validation of an ELISA for measurement of tumor necrosis factor alpha in bovine plasma.* J Dairy Sci, 94(7): p. 3504-9.

103. Bio-Rad, 2015. *Anti-Drug Antibody (ADA) Bridging ELISA Protocol*, in *For use with anti-adalimumab monoclonal antibody products HCA203, HCA204, HCA205*, A.-. Adalimumab, Editor.

104. TALAY, S.R., M.P. GRAMMEL, and G.S. CHHATWAL, 1996. *Structure of a group C streptococcal protein that binds to fibrinogen, albumin and immunoglobulin G via overlapping modules.* Biochemical Journal, 315(2): p. 577-582.

105. Serhir, B., et al., 1993. *Detection of immunoglobulin-G-binding proteins in Streptococcus suis.* J Gen Microbiol, 139(12): p. 2953-8.

106. Dennler, P., E. Fischer, and R. Schibli, 2015. *Antibody Conjugates: From Heterogeneous Populations to Defined Reagents.* 4(3): p. 197.

107. Yarnall, M. and M.D. Boyle, 1986. *Influence of dipeptides on the interaction of immunoglobulins with bacterial Fc receptors.* Biochem Biophys Res Commun, 135(3): p. 1105-11.

108. ERNTELL, M., E.B. MYHRE, and G. KRONVALL, 1985. *Non-Immune IgG F(ab')2 Binding to Group C and G Streptococci Is Mediated by Structures on γ Chains.* Scandinavian Journal of Immunology, 21(2): p. 151-157.

109. Sasso, E.H., G.J. Silverman, and M. Mannik, 1991. *Human IgA and IgG F(ab')2 that bind to staphylococcal protein A belong to the VHIII subgroup.* The Journal of Immunology, 147(6): p. 1877-1883.

110. Frick, I.M., et al., 1992. *Convergent evolution among immunoglobulin G-binding bacterial proteins.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 89(18): p. 8532-8536.

111. Vira, S., et al., 2010. *Fluorescent-labeled antibodies: Balancing functionality and degree of labeling.* Anal Biochem, 402(2): p. 146-50.

112. Noda, S., et al., 2015. *Secretory production of tetrameric native full-length streptavidin with thermostability using Streptomyces lividans as a host.* Microbial Cell Factories, 14(1): p. 5.

113. Nagarajan, V., et al., 1993. *Secretion of streptavidin from Bacillus subtilis.* Appl Environ Microbiol, 59(11): p. 3894-8.

114. Tytgat, H.L., et al., 2015. *Endogenous biotin-binding proteins: an overlooked factor causing false positives in streptavidin-based protein detection.* Microb Biotechnol, 8(1): p. 164-8.

115. Forsgren, A., et al., 2001. *Isolation and characterization of a novel IgD-binding protein from Moraxella catarrhalis.* J Immunol, 167(4): p. 2112-20.

116. Yang, Y. and R.R. Isberg, 1997. *Transcriptional regulation of the Yersinia pseudotuberculosis pH6 antigen adhesin by two envelope-associated components.* Mol Microbiol, 24(3): p. 499-510.

117. Nagel, G., A. Lahrz, and P. Dersch, 2001. *Environmental control of invasin expression in Yersinia pseudotuberculosis is mediated by regulation of RovA, a transcriptional activator of the SlyA/Hor family.* Molecular Microbiology, 41(6): p. 1249-1269.

118. Janson, H., et al., 1991. *Protein D, an immunoglobulin D-binding protein of Haemophilus influenzae: cloning, nucleotide sequence, and expression in Escherichia coli.* Infect Immun, 59(1): p. 119-25.

119. Espersen, F., 1987. *Interactions between human plasma proteins and cell wall components of Staphylococcus aureus.* Dan Med Bull, 34(2): p. 59-69.

120. Carlsson, F., C. Sandin, and G. Lindahl, 2005. *Human fibrinogen bound to Streptococcus pyogenes M protein inhibits complement deposition via the classical pathway.* Mol Microbiol, 56(1): p. 28-39.

121. Berggard, K., et al., 2001. *Binding of human C4BP to the hypervariable region of M protein: a molecular mechanism of phagocytosis resistance in Streptococcus pyogenes.* Mol Microbiol, 42(2): p. 539-51.

122. Muller, H.P. and L.K. Rantamaki, 1995. *Binding of native alpha 2-macroglobulin to human group G streptococci.* Infect Immun, 63(8): p. 2833-9.

# ÖZGEÇMİŞ



**Kişisel Bilgiler**


Soyadı, adı : Olkar ABDULMAJED

Uyruğu : Irak Cumhuriyeti

Doğum tarihi ve yeri : 18/06/1986 Kerkük

Medeni hali : Bekâr

Telefon : 05349665268

e-posta : ulkerabdulmecit@gmail.com


| Eğitim Derecesi yılı | Okul/Program | Mezuniyet |
|---|---|---|
| Doktora | Gazi Üniversitesi /Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü | Devam Ediyor |
| Yüksek Lisans | Erciyes Üniversitesi/ Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü | 2011 |
| Lisans | Kerkük Üniversitesi/Fen Fakültesi/Biyoloji Bölümü | 2008 |

**Yabancı Dili**

İngilizce, Arapça

**Yayınlar**


1. Güzel Tunçcan Ö, Kalkancı A, Unal EA, Abdulmajed O, Erdoğan M, Dizbay M, Çağlar K.2018, The in vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy on Candida and Staphylococcus biofilms. doi: 10.3906/sag-1803-44.
2. Yeşil Ş, Kan A, Abdulmajed O, Bakirtaş A, Sultan N, M Demirsoy S. 2017 Role of hygienic factors in the etiology of allergic disorders in children. doi: 10.3906/sag-1603-22.


**Hobiler**

Spor yapma, Müzik dinleme



*GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...*

