

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİ-HBV ANTİKORLAR KULLANILARAK
ANTİ-İDİYOTİP ANTİKOR ÜRETİMİ VE
AŞI GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI

Tuba YILDIRIM
DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE
2004

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİ-HBV ANTİKORLAR KULLANILARAK
ANTİ-İDİYOTİP ANTİKOR ÜRETİMİ VE
AŞI GELİŞTİRME ÇALIŞMALARI

Tuba YILDIRIM
DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
I. Prof.Dr. İ. Yavuz SEZEN
II. Doç.Dr. Aynur BAŞALP

GEBZE
2004

ÖZET

Bu çalışmada, hibridoma teknolojisi kullanılarak HBsAg'i taklit eden anti-idiotip monoklonal antikorlarının elde edilmesi amaçlandı. Fareler, (6A5) anti-HBV fare monoklonal ve anti-HBV keçi poliklonal antikorları ile bağışıklandı. Füzyondan sonra, IgM izotipinde anti-id-HBsAg 6C9 ve 6H9 monoklonal antikorları elde edildi ve antikorlar S-300 jel filtrasyon kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Anti-id 6C9 ve 6H9 antikorları ile bağışıklanan fare gruplarında, hem antijene hem de BSA'ne spesifik immün yanıtın olduğu gözlemlendi. Farelerin serumlarında sadece HBsAg spesifik immün yanıt oluşturabilmek için anti-id 6C9 antikoru distile suya karşı diyaliz edilerek basit bir yöntemle saflaştırıldı. Anti-idiotip antikoru saflığı SDS-PAGE ile kontrol edildi ve jel üzerinde BSA bandı görülmedi. Bu basit protokolün izlenmesiyle yüksek düzeyde saf bir antikor elde edildi.

Anti-id 6C9 saf antikoru farklı dozlarda (10 µg, 25 µg, 50 µg, 100 µg) ve Hepatit B aşısı (Gen Hevac B Pasteur ve Engerix) 1 µg dozda farelere uygulandı. Fareler üzerinde anti-HBsAg antikor yanıtı karşılaştırmalı olarak incelendi. Antikor miktarının artırılmasıyla, anti-id 6C9 antikoru ile immünizeli grupta HBsAg ve BSA'ne karşı spesifik antikor yanıtın arttığı tespit edildi. Anti-id 6C9 antikoru hem HBsAg ve hem de BSA üzerinde genel bir epitopu tanıdığı düşünüldü. Sadece HBsAg'ne özgü immün yanıt elde edebilmek için anti-id 6C9 antikoru Fab fragmanları elde edilerek değişik konsantrasyonlarda farelere enjekte edildi. Ancak bu deney grubundaki farelerden antikor yanıtı alınamadı. Anti-id 6C9 antikoru saflaştırılmasından sonra farklı saflaştırma koşullarının antikor spesifikliğine olan etkisi incelendi. Distile suya karşı diyaliz işleminin antikorların bağlanma özelliklerini *in vitro* olarak değiştirdiği, bununla beraber farelerin anti-id 6C9 antikorları ile bağışıklanmasının, antikoru antijeni taklit etme aktivitesini *in vivo* olarak değiştirmediği gözlemlendi.

SUMMARY

In this study, production of anti-idiotypic monoclonal antibodies mimicking HBsAg was aimed by means of hybridoma technology. Mice were immunized with (6A5) anti-HBV mouse monoclonal and anti-HBV goat polyclonal antibodies. After the fusion, IgM isotype anti-id-HBsAg 6C9 and 6H9 monoclonal antibodies were produced and purified by S-300 gel filtration column chromatography. In mice groups immunized with anti-id 6C9 and 6H9 antibodies, both antigen and BSA specific immune response were obtained. In order to develop only HBsAg specific immunity in mice sera, anti-id 6C9 antibody was purified by simply dialysing of antibody against distilled water. The purity of anti-idiotypic antibody was controlled by SDS-PAGE and no BSA band was detected on the gel. By following this simple procedure, highly pure antibody was obtained.

Anti-id 6C9 antibody in high purity at different doses (10 µg, 25 µg, 50 µg, 100 µg) and hepatitis B vaccines (Gen Hevac Pasteur and Engerix-1 µg) were injected into mice and anti-HBsAg antibody response was followed in mice. In anti-id 6C9 antibody immunized group, HBsAg and BSA specific antibody responses increased with the increasing dose of antibody. It was thought that anti-id 6C9 antibody recognizes a general epitope on both HBsAg and BSA. For only HBsAg specific immune response, Fab fragments of anti-id 6C9 antibody was injected into mice at different concentrations. However, in this group, antibody response was not obtained. After purification of anti-id 6C9 antibody, the efficacy of different purification conditions on antibody specificity was investigated. It was determined that dialysing against distilled water changed binding properties of antibodies *in vitro*. However, when mice were immunized with anti-id 6C9 antibodies, the antigen mimicking activity was not effected *in vivo*.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince değerli bilgi ve görüşleriyle beni yönlendiren ve imkan sağlayan danışman hocam, GYTE Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof.Dr. İ.Yavuz SEZEN'e,

Tez konumun seçilmesinde ve çalışmalarımın yönlendirilmesinde, değerli bilgi ve önerilerinden yararlandığım ikinci danışman hocam, TÜBİTAK GMB AE Hibridoma Laboratuvarı Uzman Araştırmacı Doç.Dr. Aynur BAŞALP'e,

Doktora eğitimim süresince ilgi ve desteklerini esirgemeyen Tez İzleme Komitesi Öğretim Üyesi hocalarım Prof.Dr. Abdülkadir AKÇİN ve Yrd.Doç.Dr. Aziz TANRISEVEN'e, gerekli olan idari izin ve imkanları sağladıkları için GYTE Rektör Yardımcısı ve Biyoloji Bölüm Başkanı Prof.Dr. Füsun GÜMÜŞEL'e, GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitü Müdürü ve Kimya Bölüm Başkanı Prof.Dr. Adem KILIÇ'a ve Fen Fakültesi Dekanı Prof.Dr. Vefa AHSEN'e,

GMB AE alt yapı olanaklarından yararlanmama izin vererek eğitimimi destekleyen GMB AE Enstitüsüne, proje kapsamında paylaştığı değerli bilgi birikimi ve yardımlarından dolayı TÜBİTAK GMB AE Hibridoma Laboratuvarı Uzman Araştırmacı Dr. Fatma YÜCEL'e, çalışmalarına gösterdiği ilgi ve destek için TÜBİTAK GMB AE Hibridoma Laboratuvarı Uzman Araştırmacı Dr. Selma ÖZTÜRK'e, her türlü teknik konuda bilgi ve yardımlarını gördüğüm, engin deneyimlerinden yararlandığım TÜBİTAK GMB AE Hibridoma Laboratuvarı Teknisyeni Ali İhsan MANAV'a, deney aşamalarında tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen TÜBİTAK GMB AE Hibridoma Laboratuvarı Teknisyeni Harun KOCAAĞA'ya, araştırma ve deneylerdeki yardımları için çalıştığım proje ekibinde görev alan arkadaşım Tıbbi Biyolog Meray AKKOR'a, çalışmalarına gösterdikleri katkılarından dolayı Transgen Laboratuvar Uzman Araştırmacıları Doç.Dr. Haydar BAĞIŞ ve Doç.Dr. Sezen ARAT'a, deney hayvanlarının her türlü bakım ve ihtiyaçlarını büyük bir özveriyle karşılayan Transgen Laboratuvar Teknisyenleri Seyfettin ÇETİN ve Şakir SEKMEN'e,

Çalışmalarım süresince gösterdikleri dayanışma ve dostlukları için tüm arkadaşlarıma, öğrenimim süresince verdikleri her türlü destek ve sabır için aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER VE KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Viral Hepatitler	3
2.2. Hepatit B Virüsü	3
2.2.1. Hepatit B Epidemiyolojisi	3
2.2.2. HBV'nün Morfolojik ve Fizikokimyasal Özellikleri	5
2.2.3. Hepatit B Virüsü Genomu	6
2.2.4. HBV Replikasyonu ve Sentezi	7
2.2.5. HBV Genomu Tarafından Kodlanan Proteinler	8
2.2.5.1. HBV Yüzey Proteinleri	8
2.2.5.2. Nükleokapsid Proteinleri	9
2.2.5.3. X Proteini	9
2.2.5.4. P Proteini	10
2.2.6. Hepatit B Virüsü Mutantları	11
2.2.6.1. Yüzey (Kılıf) Mutantları	11
2.2.6.2. Prekor/kor Mutantları	12
2.2.7. Hepatit Enfeksiyonları	12
2.2.8. HBV Aşı Uygulamaları	13
2.3. Antikor	15
2.3.1. Molekül Yapısı	16
2.3.2. Antikor İzotipleri ve Fonksiyonları	18

2.4. Antijen	21
2.5. Aşılar ve Adjuvanlar	22
2.6. Hepatit B Aşıları	23
2.6.1. Plazma Kökenli Aşılar	23
2.6.2. Rekombinant DNA Teknolojisi ile Üretilen Aşılar	24
2.6.2.1. Maya Rekombinant Aşıları	24
2.6.2.2. Memeli Hücre Rekombinant Aşıları	25
2.6.3. DNA Aşılar	25
2.6.4. Sentetik Peptid Aşılar	26
2.6.5. Virüs Taşıyıcı Aşılar	26
2.6.6. PreS Aşılar	27
2.6.7. Tek Dozluk HBV Aşıları	27
2.7. Anti-idiotip Antikorlar	28
2.7.1. Network Teorisi	29
2.7.2. Anti-idiotip Antikor Tipleri	30
2.8. Anti-idiotip Aşılar	31
2.8.1. Bakteriyel Anti-idiotip Antikor Aşılar	32
2.8.2. Viral Anti-idiotip Antikor Aşılar	33
2.8.3. Paraziter Anti-idiotip Antikor Aşılar	33
2.9. Anti-idiotip Antikor Aşıların Avantaj ve Dezavantajları	34
2.10. Anti-idiotip Antikor Üretimi	36
2.11. Hibridoma Teknolojisi ve Monoklonal Antikorlar	37
2.12. Monoklonal Antikor Eldesinde Etkili Faktörler	41
2.12.1. İmmünizasyon	41
2.12.2. Hücre Soyları	41
2.12.3. Hücre Seçimi	41
2.13. Monoklonal Antikor Uygulama Alanları	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1. Gereç	45
3.1.1. Aletler	45
3.1.2. Kimyasal Maddeler	46

3.1.3. Tamponlar	47
3.1.4. Besiyerleri	48
3.1.5. Hücreler	49
3.2. Yöntem	49
3.2.1. Dondurulmuş Hibrit Hücrelerinin Açılması	49
3.2.2. Hücre Pasajı	49
3.2.3. 6A5 Monoklonal Antikorumun Serumsuz Besiyerinde Geniş Ölçekte Üretimi	50
3.2.4. 6A5 Monoklonal Antikor Miktar Tayini	50
3.2.5. 6A5 Monoklonal Antikorumun S-300 Jel Filtrasyon Kolon Kromatografisi ile Saflaştırılması	50
3.2.6. 6A5 Monoklonal Antikoru ve Keçi anti-HBsAg Poliklonal Antikoru ile Farelerin Bağışıklanması	51
3.2.7. ELISA Testi	51
3.2.8. Füzyon ve Hazırlıkları	52
3.2.8.1. Besleyici Hücrelerin Hazırlanması	52
3.2.8.2. Myeloma Hücrelerinin Hazırlanması	52
3.2.8.3. Bağışıklanmış Fareden Dalak Hücrelerinin Elde Edilmesi	52
3.2.8.4. Bağışıklanmış Fareden Lenf Düğümü Hücrelerinin Elde Edilmesi	53
3.2.8.5. Hücrelerin Sayımı	53
3.2.8.6. Füzyon	54
3.2.8.7. Füzyon Sonrası Kültürün Takibi	54
3.2.8.8. Hibritlerin Alt Klonlanması	55
3.2.8.9. Anti-idiotip HBsAg Antikorlarının Aktivite ve Karakterizasyonu	55
3.2.8.10. Hibrit Hücrelerin Dondurulması	55
3.2.9. Monoklonal Antikorların Saflaştırılması	56
3.2.9.1. Hibrit Hücrelerin Geniş Ölçekte Üretimi	56
3.2.9.2. Amonyum Sülfat Çöktürme	56
3.2.9.3. S-300 Jel Filtrasyon Kolon Kromatografisi	56

3.2.9.4. DE52 İyon Değişimi Kromatografisi	56
3.2.10. Anti-id 6C9 ve 6H9 Antikorları ile Farelerin Bağışıklanması	57
3.2.11. Bağışık Yanıtın Kontrolü	57
3.2.12. Serumsuz Ortamda Üretilen Anti-id 6C9 Antikorumun S-300 Jel Filtrasyon Kolon Kromotografisi ile Saflaştırılması	58
3.2.13. Anti-id 6C9 Antikorumun Distile Suyu Karşı Diyaliz ile Saflaştırılması	58
3.2.14. Distile Suyu Karşı Diyaliz Sonrası Elde Edilen Saf Anti-id 6C9 Antikor ile Farelerin Bağışıklanması	59
3.2.15. Anti-id 6C9 Antikorumun Pepsin ile Kesimi	59
3.2.16. Anti-id 6C9 Antikor Fab Fragmanları ile Farelerin Bağışıklanması	60
3.2.17. Saf Antikor Tespiti	60
3.2.17.1. Denatüre Edici Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	60
3.2.17.2. Protein Jelin Coomassie Blue ile Boyanması	61
3.2.17.3. Protein Jelin Gümüş ile Boyanması	61
4. BULGULAR	62
4.1. (6A5) anti-HBsAg Miktar Tayini	62
4.2. 6A5 Monoklonal Antikorumun S-300 Jel Filtrasyon Kolon Kromotografisi ile Saflaştırılması	62
4.3. 6A5 Monoklonal Antikoru ile Bağışıklanan Farelerin Antikor Yanıtları	63
4.4. Hücre Füzyonu	66
4.5. Anti-idiotip HBsAg Antikorlarının Aktiviteleri ve Karakterizasyonu	68
4.6. Anti-idiotip HBsAg Antikorların Saflaştırılması	69
4.6.1. Anti-id 6C9 ve 6H9 Antikorlarının S-300 Jel Filtrasyon Kolon Kromotografisi ile Saflaştırılması	69
4.6.2. Anti-id 6C9 Antikorumun S-300 Jel Filtrasyon Sonrası Kesimlerin SDS-PAGE Çalışması	71
4.6.3. Anti-id 6C9 Antikorumun DE52 İyon Değişimi Kromatografisi ile Saflaştırılması	72

4.7. Serumlu Besiyerinde Üretilerek S-300 Jel Filtrasyon Kolon Kromotografisi ile Saflaştırılan Anti-id 6C9 ve 6H9 Antikorları ile Farelerin Bağışıklanma Çalışmaları	73
4.8. Serumsuz Ortamda Üretilen Anti-id 6C9 Antikorumun S-300 Jel Filtrasyon Kolon Kromotografisi ile Saflaştırılması	82
4.9. Distile Suyu Karşı Diyaliz ile Saflaştırma	83
4.9.1. Serumsuz Ortamda Üretilen Anti-id 6C9 Antikorumun Distile Suyu Karşı Diyalizi	83
4.9.2. Serumsuz Ortamda Üretilen Anti-id 6C9 Antikorumun Distile Suyu Karşı Diyaliz Sonrası SDS-PAGE	85
4.9.3. % 10 Serumlu Ortamda Üretilen Anti-id 6C9 Antikorumun Distile Suyu Karşı Diyalizi	86
4.10. Farklı Yöntemlerle Saflaştırılan Anti-id 6C9 Antikorların Farklı Proteinlerle Değişik Seyreltmelerdeki Çapraz Reaksiyonları	87
4.11. Farklı Saflaştırma Teknikleri Uygulanarak Elde Edilen Saf Anti-idiotip Antikorların, Ticari Hepatit B Aşıları ile Farelerde HBsAg'ne Karşı Oluşturduğu Antikor Yanıtının Belirlenmesi	92
4.12. % 10 Serumlu Ortamda Üretilen Anti-id 6C9 Antikorumun Distile Suyu Karşı Diyaliz ve Pepsin Kesim Sonrası Gradyent SDS-PAGE	98
4.13. Pepsin Kesim Sonrası Anti-id 6C9 Antikor Fab Fragmanları ile Bağışıklanan Farelerin Antikor Yanıtları	99
4.14. Anti-idiotip 6C9 Antikorumun HBsAg'ni Taklit Etme Özelliğinin İncelenmesi	101
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	102
KAYNAKLAR	113
ÖZGEÇMİŞ	132

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ab1	: İdiyotip
Ab2	: Anti-idiyotip antikor
Ab3	: Anti-anti-idiyotip antikor
AIDS	: Kazanılmış immün yetmezlik sendromu
anti-id	: Anti-idiyotip
AP	: Alkalen fosfataz
APC	: Antijen sunan hücre
APS	: Amonyum persülfat
AuAg	: Avustralya antijeni
BSA	: Sığır serum albumin
cDNA	: Sirküler DNA
CDR	: Komplementerliği belirleyen bölgeler
CEA	: Karsinoembriyonik antijen
CFA	: Freund'un tam adjuvanı
C _L	: Hafif zincir sabit bölge
CRC	: Kolon kanseri
CRI	: Çapraz reaksiyon gösteren idiyotip
CTL	: Sitotoksik T lenfositler
DE52	: DEAE (diethylaminoetil adsorbanı)
DMSO	: Dimetil sülfoksit
ELISA	: Enzime bağlı immunolojik tanı sistemi
Enh1,2	: Yükseltici DNA bölgesi
F(ab') ₂	: İki Fab bölgesi
F(ab') _{2μ}	: Bivalent fragman
F(ab') _μ	: Monovalent fragman
Fab	: Antijen bağlayan bölge
FBS	: Fötal sığır serumu
Fc	: Antikorum sabit bölgesi
FCS	: Fötal dana serumu
GD2	: Disialogangliosid

H	: Ağır zincir
HAT	: Hipoksantin / aminopterin / timidin
HBcAg	: Hepatit B kor antijeni
HBeAg	: Hepatit B e antijeni
HBIG	: Hepatit B immünglobülini
HBsAg	: Hepatit B yüzey antijeni
HBV	: Hepatit B virüsü
HCC	: Karaciğer kanseri
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipid
HEPES	: N-2-hidroksietilpiperazin N ^l -2-aminoetan sülfonik asit
HGPRT	: Hipoksantin guanin fosforibozil transferaz
HIV	: İmmün yoksunluk virüsü
HMFG	: İnsan sütü yağ globülin membran antijeni
HT	: Hipoksantin/timidin
Id	: İdiyotip
IFA	: Freund'un tam olmayan adjuvanı
IFN α	: İnterferon α
Ig	: İmmünglobulin
ISCOM	: Bağışıklığı uyarıcı kompleks
Kd	: Difüzyon sabiti
kDa	: Kilodalton
L	: Hafif zincir
LD	: Sınırlı seyreltme
LHBsAg	: Hepatit B büyük yüzey antijeni
LPS	: Lipopolisakkarit
MAb	: Monoklonal antikor
MDP	: Muramil dipeptid
MHBsAg	: Hepatit B orta yüzey antijeni
MHC I-II	: Doku uygunluk antijenleri I-II
MLA	: Monofosforil lipid A
NK	: Doğal öldürücü T lenfositler
ORF	: Açık okuma çerçevesi

PAP	: Prostatik asit fosfataz
PBS	: Fosfat tuzu tamponu
PEG	: Polietilen glikol
PLAP	: Plasental alkalın fosfataz
PLG	: Polimer polilaktid poliglikosid
PNPP	: 4-paranitrofenilfosfat
PolyHSA	: Polimerik insan serum albumini
RT	: Revers transkriptaz
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
SHBsAg	: Hepatit B küçük yüzey antijeni
TAA	: Tümör ile ilişkili antijen
TEMED	: N,N,N',N'- Tetrametil etilen diamin
Th	: Yardımcı T lenfosit
TK	: Timidin kinaz
TMV	: Tütün mozaik virüsü
TNF	: Tümör nekroz faktör
TP	: Terminal protein
V _H	: Ağır zincirdeki değişken bölge
V _L	: Hafif zincirdeki değişken bölge
WHO	: Dünya sağlık örgütü
κ	: Kappa
λ	: Lamda

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Hepatit B partikül tipleri	6
2.2. Hepatit B virüsü genomu (adw alt tipi)	7
2.3. Antikoru moleküler yapısı	16
2.4. Antikoru çeşitli enzimlerle etkileştiğinde oluşan alt birimleri	17
2.5. IgM antikoru	20
2.6. Anti-idiotip antikorlar	30
2.7. Monoklonal antikor üretimi	40
2.8. HAT kültür ortamında de-novo yolunun inhibe edilerek salvage yolunun devreye girişi	42
4.1. 6A5 monoklonal antikor miktarının belirlenmesi	62
4.2. 6A5 monoklonal antikoru S-300 jel filtrasyon kolon kromatografisiyle saflaştırılması	63
4.3. 10 µg 6A5 monoklonal antikoru ile bağışıklanan farelerin Polyvalen-AP ile elde edilen serumdaki toplam antikor yanıtı	64
4.4. 40 µg 6A5 monoklonal antikoru ile bağışıklanan farelerin Polyvalen-AP ile elde edilen serumdaki toplam antikor yanıtı	64
4.5. (A)10 µg ve (B) 40 µg 6A5 monoklonal antikoru ile bağışıklanan farelerin IgM-AP ve IgG-AP ile elde edilen serumdaki IgM ve IgG sonuçları	65
4.6. (A)10 µg ve (B) 40 µg 6A5 monoklonal antikoru ile bağışıklanan farelerin IgM-AP ve IgG-AP ile elde edilen serumdaki IgM ve IgG sonuçları	65
4.7. (A)10 µg ve (B) 40 µg 6A5 monoklonal antikoru ile bağışıklanan farelerin IgM-AP ve IgG-AP ile elde edilen serumdaki IgM ve IgG sonuçları	66
4.8. Anti-id 6H9 antikoru S-300 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırma sonuçları	70
4.9. Anti-id 6C9 antikoru S-300 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırma sonuçları	70
4.10. Anti-id 6C9 antikoru S-300 jel filtrasyon sonrası kesimlerin SDS-PAGE’te görünümü	71

4.11. Anti-id 6C9 antikorunun DE52 iyon değişimi kromotografisi ile saflaştırma sonuçları	72
4.12. Anti-id 6C9, 6H9 antikorları ve ticari aşı ile bağışıklanma sonrası 14. güne ait poliklonal yanıtları	74
4.13. Anti-id 6C9, 6H9 antikorları ve ticari aşı ile bağışıklanma sonrası 49. güne ait poliklonal yanıtları	75
4.14. Anti-id 6C9, 6H9 antikorları ve ticari aşı ile bağışıklanma sonrası 63. güne ait poliklonal yanıtları	76
4.15. Anti-id 6C9, 6H9 antikorları ve ticari aşı ile bağışıklanma sonrası 91. güne ait poliklonal yanıtları	77
4.16. Farelerin anti-id 6C9 antikoru ile bağışıklanma sonrası 35. güne ait serumdaki farklı antikor yanıtları	78
4.17. Farelerin ticari aşı ile bağışıklanma sonrası 35. güne ait serumdaki farklı antikor yanıtları	79
4.18. Farelerin anti-id 6C9 antikoru ile bağışıklanma sonrası 63. güne ait serumdaki farklı antikor yanıtları	80
4.19. Farelerin ticari aşı ile bağışıklanma sonrası 63. güne ait serumdaki farklı antikor yanıtları	81
4.20. Serumsuz ortamda üretilen anti-id 6C9 antikorunun S-300 jel filtrasyon kolon kromotografisiyle saflaştırılması	82
4.21. Distile suya karşı diyaliz sonrası elde edilen örneklerin ELISA sonuçları (a. hücre kültür üst sıvısı, b. diyalizde üst sıvıda kalan antikor rneği, c. diyalizde çöken antikor rneği)	83
4.22. Distile suya karşı diyaliz saflaştırması ile elde edilen örneklerin farklı seyreltmelerdeki anti-HBsAg keçi antikoruna karşı yanıtları (a.diyalizde çöken antikor rneği, b.diyalizde üst sıvıda kalan antikor rneği, c.hücre kültür üst sıvısı)	84
4.23. Serumsuz ortamda üretilen anti-id 6C9 antikorunun distile suya karşı diyaliz sonrası örneklerin SDS-PAGE’te görünümü	85
4.24. Distile suya karşı diyaliz sonrası elde edilen örneklerin ELISA sonuçları (a. hücre kültür üst sıvısı, b. diyalizde üst sıvıda kalan antikor rneği, c. diyalizde çöken antikor rneği)	86

4.25. Anti-id 6C9 antikorunun % 10 serumlu üst sıvısının S-300 jel filtrasyon kromatografisi sonrası farklı seyreltmelerdeki ELISA sonuçları A(1/10), B(1/25), C(1/50), D(1/100)	87
4.26. DE52 iyon değiştirme kromatografisi sonrası elde edilen anti-id 6C9 antikorun farklı seyreltmelerdeki ELISA sonuçları A(1/10), B(1/25), C(1/50), D(1/100)	88
4.27. % 10 serumlu ortamda üretilerek distile suya karşı diyaliz edilen anti-id 6C9 antikorun farklı seyreltmelerdeki ELISA sonuçları A(1/10), B(1/25), C(1/50), D(1/100)	89
4.28. % 10 serumlu besi yerinde üretilen anti-id 6C9 antikor üst sıvının farklı seyreltmelerdeki ELISA sonuçları A(1/10), B(1/25), C(1/50), D(1/100)	90
4.29. Farelerin anti-id 6C9 antikoru ve ticari aşılar ile bağışıklanma sonrası 7. güne ait poliklonal yanıtları	93
4.30. Farelerin anti-id 6C9 antikoru ve ticari aşılar ile bağışıklanma sonrası 42. güne ait poliklonal yanıtları	94
4.31. Farelerin anti-id 6C9 antikoru ve ticari aşılar ile bağışıklanma sonrası 49. güne ait poliklonal yanıtları	95
4.32. Farelerin anti-id 6C9 antikoru ve ticari aşılar ile bağışıklanma sonrası 56. güne ait poliklonal yanıtları	96
4.33. Farelerin anti-id 6C9 antikoru ve ticari aşılar ile bağışıklanma sonrası 77. güne ait poliklonal yanıtları	97
4.34. Anti-id 6C9 antikorunun distile suya karşı diyaliz sonrası pepsin kesimlerin gösterilmesi	98
4.35. Gradyent % 6 ve % 15'lik indirgenmemiş SDS-PAGE ile Fab fragmanlarının gösterilmesi.	99
4.36. Anti-id 6C9 antikoru Fab fragmanlarının A(25 µg) ve B(50 µg) ve ticari aşılar ile bağışıklanma sonrası farklı günlere ait poliklonal yanıtları	100
4.37. Farklı seyreltmelerdeki anti-id 6C9 antikoru ve HBsAg'nin ELISA test sonuçları	101

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Dünyada HBV'nün yayılımı	4
2.2. HBV genleri ve bu genler tarafından sentezlenen proteinlerin özellikleri	10
3.1. Hibrit hücre üretimi için kullanılan hücreler	49
3.2. İmmünglobulinler ve alt birimleri	60
4.1. 6A5 monoklonal antikoruna ait 1. 2. ve 3. füzyon sonuçları	67
4.2. Keçi anti-HBsAg poliklonal antikoruna ait füzyon sonuçları	67
4.3. Anti-id HBsAg antikorlarının (5A4, 6B2, 6F12, 6C9, 6H9) “keçi anti-HBsAg poliklonal antikoru” ve “farklı proteinler” ile yapılan sandviç ELISA çapraz reaksiyon sonuçları	68
4.4. Farklı saflaştırma teknikleri ile elde edilen anti-id 6C9 antikorun 1/50 seyreltme oranındaki “keçi anti-HBsAg poliklonal antikoru” ve “farklı proteinler” ile yapılan sandviç ELISA sonuçları	91
4.5. Serumsuz ortamda üretilerek distile suya karşı diyaliz edilen anti-id 6C9 antikorun geniş seyreltme aralıklarındaki “keçi anti-HBsAg poliklonal antikoru” ve “farklı proteinler” ile yapılan sandviç ELISA testi sonuçları	91

1. GİRİŞ

Hepatit B virüsü (HBV) akut hepatit, kronik hepatit, karaciğer sirozu ve karaciğer kanseri etkeni olarak kabul edilmektedir. Bu klinik tabloların hiçbirinin etkin ve güvenilir bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Bu yönleriyle ele alındığında viral hepatit, tıbbi ve ekonomik açıdan birçok ülkede önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre Hepatit B virüs enfeksiyonuna dünyada 2 milyardan fazla insanda yaygın olarak rastlanmakta ve yaklaşık 300-350 milyon kişi bu virüsü taşımaktadır.

Toplum sağlığının HBV enfeksiyonuna karşı korunmasında en etkin yöntem aşılamadır. Geleneksel aşılarda enfeksiyon ajanlarının öldürülmüş, zayıflatılmış veya saflaştırılmış formları kullanılmaktadır. Hepatit B aşıları; kronik HBV taşıyıcılarının serumlarından veya rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak maya ve memeli hücre kültür sistemlerinden elde edilmektedir.

Günümüzde rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilen HBV aşısı kullanılmaktadır. Bu aşı kanserden korunmada geliştirilen ilk aşıdır. Etkili ve güvenli bir koruma sağlamasına rağmen, aşılananların yaklaşık %5-11'inde kanda yeterli düzeyde antikor oluşmamaktadır.

Anti-idiotip (anti-id) antikorların antijeni taklit edebilme özellikleri, deneysel anti-id aşılarda üretiminde alternatif bir yöntem oluşturmaktadır. Anti-idiotip antikorlar çeşitli patojenlere karşı (bakteri, virüs, parazit vb) aşı geliştirme çalışmalarında kullanılmaktadır. Anti-id aşılarda virulans ya da enfeksiyon riski bulunmamaktadır. Belirli hayvan model sistemlerinde etkili olan bu aşılarından çeşitli kanser hastalıklarının tedavisinde yararlanılmaktadır. Anti-idiotipler teknik ve ticari avantajları yönünden geleneksel antijenlerin yerine kullanılabilir. Antijenlerin DNA teknolojisi ya da sentetik yollarla elde edilmesinin, geniş ölçekte üretilmesinin ve saflaştırılmasının zor olduğu durumlarda özgün monoklonal anti-idiotipleri çoğaltmak, bakteriyel ve viral antijenleri üretmekten daha kolay, güvenli ve ekonomiktir.

Bu tez çalışmasında hibridoma teknolojisini kullanarak anti-idiotip HBsAg monoklonal antikorların üretilmesi, bu antikorların *in vivo* sistemde (farelerde) HBsAg'ne karşı antikor yanıtı oluşturma ve ticari aşılar ile karşılaştırmalı olarak HBsAg'ni taklit etme özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda spesifik anti-idiotip monoklonal antikorları sentezleyen hibridomaların çeşitli hücre kültür sistemlerinde geniş ölçekte üretilmesiyle daha kolay, güvenli ve ekonomik bir şekilde antijen eldesi hedeflenmiştir. Ayrıca hibridoma teknolojisinde antikor saflaştırma koşullarının antikorun bağlanma özgünlüğü üzerine olan etkileri de incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER VE KONU İLE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

2. 1. Viral Hepatitler

Viral hepatitler karaciğeri etkileyen sistemik enfeksiyonlardır. Günümüzde antijenik yapıları farklı 6 virüs saptanmıştır. Bunlardan ikisi karakteristik olarak enterik, oral-fekal yolla bulaşan, kronik hepatite yol açmayan hepatit A virüsü (HAV) ve hepatit E virüsü (HEV), diğer dördü ise parenteral (kan) yolla bulaşan, kronik hepatite yol açabilen hepatit B virüsü (HBV), hepatit C virüsü (HCV), hepatit Delta virüsü (HDV) ve hepatit G virüsü (HGV)'dür [Badur, 1998; Bayraktar ve Türkoğlu, 1998]. Son yıllarda enterik yolla bulaşarak hepatite yol açtığı düşünülen bir F virüsünden de söz edilmektedir. Kan yoluyla bulaşan HBV, HCV ve HDV ile kronik karaciğer hastalığı, siroz ve karaciğer kanseri gelişebilmektedir. Bu yönleriyle ele alındığında viral hepatit tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır [Lemon and Thomas, 1997; Badur and Akgün, 2001].

2.2. Hepatit B Virüsü

1963 yılında Blumberg tarafından “Avustralya antijeni” (AuAg) olarak tanımlanan antijenik yapı daha sonra hepatit B virüsü (HBV) olarak adlandırılmıştır [Blumberg et al., 1965; Blumberg, 1977]. Daha çok parenteral yolla geçtiği tespit edildiği için önceleri “serum hepatit” adı verilen bu hastalığın etkeni olan virüs 1970 yılında immün elektron mikroskobu ile gösterilmiştir [Dane et al., 1970; Howard and Zuckerman, 1990]. Hepatit B moleküler ve klinik özellikleri en iyi bilinen hepatit virüsüdür. HBV enfeksiyonu belli bir yaş grubuna spesifik değildir. Değişik hayvan türlerinde de HBV benzeri virüs enfeksiyonları tespit edilmiştir [Maupas et al., 1976; Lee,1997].

2.2.1. Hepatit B Epidemiyolojisi

Hepatit B virüs enfeksiyonu dünyadaki en yaygın enfeksiyonlardan biridir. Dünya nüfusunun 2/5'sinin (2 milyar kişi) HBV ile enfekte olduğu tahmin

edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre tüm dünyada yaklaşık 300-350 milyon kişi bu virüsü taşımakta, her yıl yaklaşık 50 milyon yeni hepatit B vakası ortaya çıkmakta ve her yıl 1-2 milyon kişi doğrudan HBV enfeksiyonu ve komplikasyonlarına bağlı nedenlerle yaşamını yitirmektedir [Uzun, 1998; Lok, 2000]. HBV taşıyıcılarında primer hepatosellüler karsinoma (karaciğer kanseri) rastlanma olasılığı sağlıklı kişilere oranla 200-400 kat daha fazladır. HBV'nün fulminant hepatit, siroz ve karaciğer kanseri gibi ölümcül hastalıkların etkeni olması nedeniyle, dünyada en fazla ölüme yol açan viral hastalıklardan birisi olarak kabul edilmektedir [Lee, 1997; Hilleman, 2003]. Aynı zamanda HBV, sigaradan sonra ikinci sırada gelen, kanserojen etki gösteren bir ajandır. HBV dünyadaki primer hepatosellüler karsinoma olgularının % 80'inden sorumlu tutulmaktadır. Bazı araştırmacılar kamuoyunun dikkatini çekmek için hepatit B'yi AIDS'le karşılaştırmışlardır. Bu verilere bakıldığında hepatit B'nin AIDS'ten çok daha fazla önemsenmesi gereken bir hastalık olduğu anlaşılmaktadır. Dünyada HBV taşıyıcılığı 350-500 milyon iken, HIV taşıyıcılığı 20 milyon kadardır. HBV'ne bağlı bir günde ölenlerin sayısı, AIDS'e bağlı 1 yılda ölenlerden daha fazladır. HBV, HIV'den 100 kat daha enfeksiyözdür [Balık, 2000]. Hepatit B enfeksiyonunun dünyadaki dağılımı; genel enfeksiyon oranı, enfeksiyonun alınma yaşı ve bulaşma yolu açısından 3 kategoriye ayrılabilir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Dünyada HBV'nün yayılımı [Uzun, 1998].

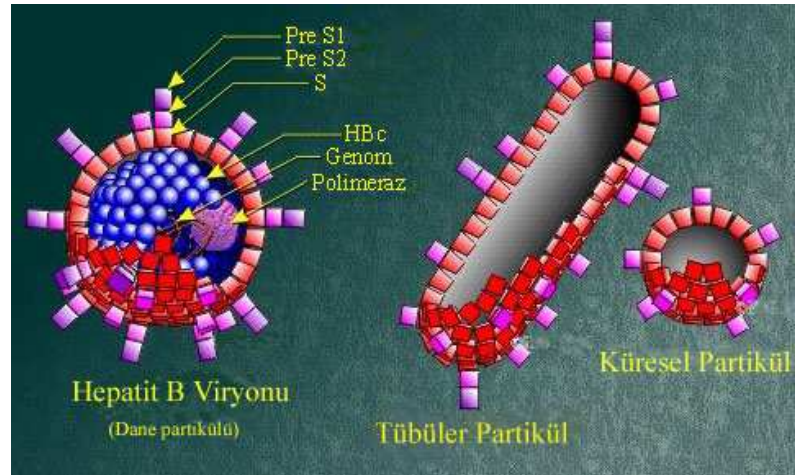
Dünyada HBV dağılımı	DÜŞÜK	ORTA	YÜKSEK
HBsAg pozitifliği	<% 2	% 2-10	>% 10
Anti-HBs pozitifliği	% 5-10	% 20-60	% 70-90
Enfeksiyonun alındığı yaş	Erişkin	Yenidoğan, çocuk, erişkin	Yenidoğan, erken çocukluk
Başlıca bulaşma yolu	Cinsel, perkütan, diğer	Horizontal	Perinatal, horizontal
Coğrafi bölgeler, ülkeler	ABD Kanada Batı Avrupa Avustralya Yeni Zelanda	Hindistan Orta Doğu Batı Asya Güney ve Doğu Avrupa Güney ve Orta Amerika	Asya Afrika Pasifik Amazon

Ülkemizde Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) taşıyıcılığı (% 4-10) orta-yüksek endemite sınırlarındadır. Doğu-Güneydoğu Anadolu'da oran $>8\%$ ve seropozitiflik $>50\%$, diğer bölgelerde ise $<5\%$ ve seropozitiflik $<50\%$ şeklindedir. Yılda en az 100 bin kişi hepatit B virüsü ile karşılaşmaktadır. Enfeksiyonun alındığı yaş sıklıkla çocukluk ve yetişkin dönemdir [Balık, 2000].

HBV esas olarak enfekte kan ve vücut sıvıları ile parenteral temas, cinsel yol, enfekte anneden yenidoğana bulaşma ile geçer. Enfekte kişilerden horizontal bulaşma da söz konusudur. Bulaşma riski kan ve vücut sıvılarında bulunan enfekte edici partikül sayısı ile orantılıdır [Uzun, 1998; Koff, 2002].

2.2.2. HBV'nün Morfolojik ve Fizikokimyasal Özellikleri

Akut ve kronik hepatit B'li hastaların serumlarında, 22 nm (16-25 nm) çapında sadece virüsün kılıf proteinlerinden oluşan küresel ve tübüler yapılar gözlenmiştir. Küresel partikül küçük ve orta HBsAg'den oluşurken tübüler partikül büyük HBsAg bulundurur ve uzunluğu 50-500 nm'dir. HBV'nün büyük yapısal bileşenleri kılıf ve nükleokapsit proteinleridir. Ayrıca hasta serumlarında "Dane partikülü" adı da verilen 42 nm boyutunda küresel virüs partikülleri de tespit edilmiştir. Hepatit B'nin bulaşmasında bu "Dane partikülleri"nin öncelikli neden olduğu, bunun yanında 22 nm'lik partiküllerin ise immünolojik etki göstermelerine karşılık, enfeksiyöz olmadığı tespit edilmiştir [Howard and Zuckerman, 1990; Lee, 1997]. Dane partikülünün dış kabuk bölgesine ise "nükleokapsid" adı verilir, bu yapı "kor protein"inden meydana gelmiştir. Farklı antijenik özelliğe sahip bir yapısı olduğundan kendi spesifik antikorları ile reaksiyon vermektedir. Bu proteinin özellikle virüs replikasyonu ve yapılanması sırasında virüs genomunun korunmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir. Virüsün daha iç bölgesinde ise E antijeni (HBeAg) yer alır. Bu antijenik yapılardan başka virüsün iç kısmında virüs DNA'sı, DNA polimeraz enzimi ve 3' ucunda DNA'ya kovalent olarak bağlı polipeptid bulunmaktadır. Bunun yanı sıra HB yüzey antijenlerinin yapısında yüksek yoğunluklu lipidler (HDL) bulunmaktadır [Özdener, 1997; Kao and Chen, 2002] (Şekil 2.1).

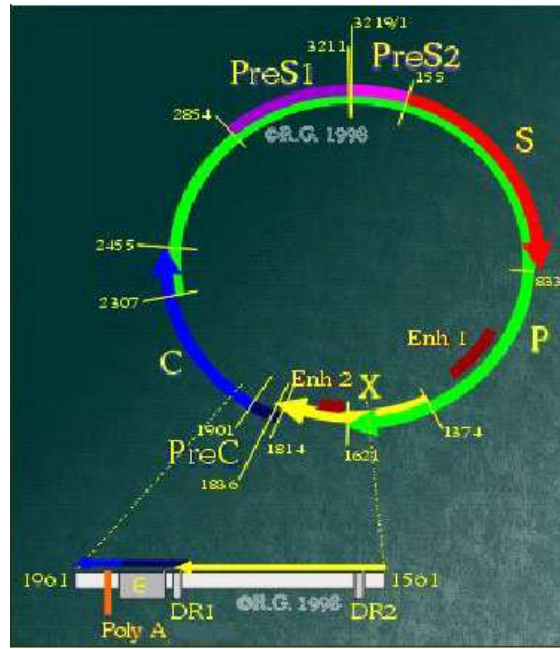


Şekil 2.1. Hepatit B partikül tipleri

[<http://www.globalserve.net/~harlequin/HBV/hbvparts.htm>].

2.2.3. Hepatit B Virüsü Genomu

Hepatit B virüsü *Hepadnaviridae* adı verilen virüs ailesi içinde sınıflandırılmaktadır. HBV DNA'sı 3200 nükleotidlik uzun (L veya negatif) ve 1800-2700 nükleotidlik kısa (S veya pozitif) zincir içeren, kısmen çift sarmallı sirküler yapıya sahiptir [Seeger and Mason, 2000; Jung and Pape, 2002]. HBV'de genetik bilginin tamamı uzun sarmal üzerinde kodlanır. Farklı izolatların nükleotid dizilimi karşılaştırıldığında tüm genom üzerinde 4 farklı protein kodlayabilecek "open reading frame" (ORF) (preS ve S, preC ve C, X ve P) olduğu gösterilmiştir. Bu genler kılıf proteini, kapsid proteini, X proteini ve DNA polimerazı kodlar [Burda et al., 2001]. ORF'lerinin transkripsiyonunu düzenleyen en az 4 promotor (preS1 prom, S prom, X prom ve pre-C prom) ve 2 enhancer (Enh 1 ve Enh 2) bulunur. S geni üzerinde üç, C geni üzerinde ise iki başlangıç kodonu bulunmaktadır [Lok, 2000]. Farklı başlangıç kodonlarından sentezlenen proteinler farklı olduklarından HBV genomu 4 adet ORF'e sahip olmasına rağmen yedi değişik polipeptid üretmektedir. Bu bölgeler birbirleri ile iç içe geçmiş durumdadırlar. Farklı proteinlerin oluşması gen okunmasının farklı başlangıç kodonundan başlanması ile gerçekleşir. Bu yüzden HBV genomu diğer aynı özelliğe sahip lineer genomlara göre 1.5 kat daha fazla kodlama kapasitesine sahiptir. Bu özelliği ile oldukça kısa olan genomun zengin bir antijen repertuarı bulunmaktadır [Howard and Zuckerman, 1990; Özden, 1997] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Hepatit B virüsü genomu (adw alt tipi)

[<http://www.globalserve.net/~harlequin/HBV/genome.htm>].

2.2.4. HBV Replikasyonu ve Sentezi

HBV'nün konak hücreye bağlanmasında küçük (S) proteinine özgü bazı reseptörler ile orta (M) ve büyük (L) proteinlerinin önemli olduğu saptanmıştır. HBV, reseptöre bağımlı endositoz yoluyla hücre içine girdikten sonra viral DNA ve nükleokapsidin viryondan ayrılarak konak hücre çekirdeğine taşındığı ileri sürülmektedir. DNA'nın (+) zincirin eksik olan bölümü viral DNA polimeraz tarafından tamamlanırken, (-) zincirin 5' ve 3' uçları arasındaki açıklık onarılır. Viral DNA polimeraz aktivitesi, kovalent bağlarla kapalı asimetrik DNA'yı, sirküler DNA (cDNA)'ya dönüştürüp bu yapının hücre çekirdeğine girmesini sağlar. cDNA kalıp olarak alınarak viral RNA'lar sentezlenir [Özdener, 1997; Seeger and Mason, 2000]. Viral RNA'lar ORF'den gelen sinyale göre mRNA olarak viral proteinlerin sentezinde ya da pregenom olarak viral genomun oluşturulmasında görev alır. Pregenom kor partikülü içine yerleşerek revers transkriptaz aktivitesine sahip viral DNA polimeraz etkisiyle viral DNA sarmalı sentezlenir [Karayiannis, 2003]. HBV yüzey proteinleri endoplazmik retikulumda öncelikle transmembran proteinleri olarak sentezlenir, molekül içi ve moleküller arası disülfid köprülerinin oluşmasıyla olgunlaşırlar. Tomurcuklanma sırasında virüs tanecikleri oluşmaya başlar, membran

lipidleri ile birlikte kor partiküllerini çevreleyip plazma membranından ayrılarak hücre dışına çıkarlar [Howard and Zuckerman, 1990; Lok, 2000].

2.2.5. HBV Genomu Tarafından Kodlanan Proteinler

2.2.5.1. HBV Yüzey Proteinleri

Virüs dış yüzeyini oluşturan HBsAg polipeptidini kodlamakla preS/S gen bölgesi görevlidir. Bu bölge başlangıç kodonları preS1, preS2 ve S olan gen bölgesidir ve sırasıyla 108, 55 ve 226 amino asitten oluşan polipeptidleri sentezler. Sentez hangi kodondan başlarsa başlasın aynı 3' ucunda sonlanmakta ve üç değişik protein molekülü sentezlenmektedir [Shearer et al., 1998].

a. Hepatit B Büyük Yüzey Antijeni (LHBsAg): Okuma işlemine S geni ilk kodondan başladığında preS1+preS2+S bölgelerinin tümü eksprese olacağından L protein (LHBsAg) sentezlenir [Howard and Zuckerman, 1990]. Bu proteinin glikolize edilmiş formu gp42, edilmemiş formu p39 şeklindedir. L proteini küresel ve tübüler partiküllerin salınımını ve kor partiküllerinin kılıflanmasını sağladığından virüsün yüzeyinde çok miktarda bulunur. Enfeksiyöz özellikteki LHBsAg'nin hepatositleri enfekte etme özelliği olmakla birlikte, hepatosit içine girdikten sonra da eksprese olması sitotoksik etki göstermesine neden olmaktadır [Cooper et al., 2003].

b. Hepatit B Orta Yüzey Antijeni (MHBsAg): Okuma işlemine S geni ikinci kodondan başlarsa preS2+S bölgelerinin ürünü olan M protein (MHBsAg) sentezlenir. MHBsAg, bir ya da iki bölgesinden glikolizlenmiştir. Glikoliz formu gp36 ve glikolize edilmemiş formu gp33 şeklindedir [Cooper et al., 2003]. M proteini 281 amino asitten oluşmuştur ve replikasyonun olmadığı durumlarda HBsAg içinde yer almaz. Bu nedenle preS2 antijeninin varlığı viral replikasyonun bir göstergesidir. Ayrıca MHBsAg'nin HBV'nün hepatositlere tutunmasında önemli rolü olduğu düşünülmektedir [Leroux-Roels et al., 1997].

c. Hepatit B Küçük Yüzey Antijeni (SHBsAg): S proteini 226 amino asitten meydana gelmiştir ve glikoliziz olma özelliğine sahip hidrofobik bir proteindir [Pride

et al., 1992]. Okuma işlemine S geni üçüncü kodondan başlarsa S bölgesinin ürünü olan S protein (SHBsAg) sentezlenir. Glikolize edilmemiş formu p24 ve glikolize edilmiş formu gp27 şeklindedir. HBsAg'nin büyük bir kısmını oluşturan SHB yüzey proteini B lenfositleri için immünojenik epitoplara taşımaktadır [Howard and Zuckerman, 1990; Shokrgozar and Shokri, 2002].

2.2.5.2. Nükleokapsid Proteinleri

Nükleokapsid proteinleri, preC ve C bölgelerinin kodlaması ile oluşmaktadır. Translasyon preC kısmında bulunan başlangıç kodonundan başlamış ise HBeAg'ni sentezler. Sentezlenen polipeptid endoplazmik retikuluma yönelir. Burada peptidaz tarafından C terminal ucundaki 34 amino asitlik bölüm kesintiye uğrayarak golgi cisimciği üzerinden HBeAg olarak salınır ya da nükleusa yönlendirilir. Eğer translasyon C bölgesinden başlamış ise kor antijeni (HBcAg) sentezlenir. Oluşan polipeptid konak hücre sitoplazmasında kalır ve burada modifikasyona uğrayarak HBcAg halini alır [Howard and Zuckerman, 1990]. Bu bölgenin viral nükleik asidin hücre nükleusuna translokasyonunda ve virüs yapılanması sırasında etkin rolü olduğu kabul edilmektedir. Kor promotörü transkripsiyon için gereklidir. Virüs enhancer elementleri ise; hem kor promotörü aktivasyonunun düzenlenmesi hem de karaciğer hücresi ve diğer hücresel faktörlerin aktivasyonu için gereklidir. Kor partikülleri güçlü immünojenik özelliğe sahiptir, bağımsız antijen özelliği göstererek yüksek titrasyonda anti-HBc IgM antikor salınmasına neden olur ve bu antikor HBV enfeksiyonu sırasında miktarı ilk yükselen markırdır [Iwarson et al., 1985; Lee, 1997]. HBeAg'nin fonksiyonu tam bilinmemekle birlikte, immün tolerans oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir. Bu yüzden HBeAg negatif olgularda, karaciğer hasarlarının takibi özel bir önem taşımaktadır. HBeAg pozitifliği ise viral DNA ve aktif replikasyonun varlığını göstermektedir. HBeAg ve HBcAg yüksek oranda homoloji gösterirler ve her iki antijen ortak immünolojik epitoplara sahiptirler [Özdener, 1997; Burda et al., 2001].

2.2.5.3. X Proteini

HBV transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol alan 154 amino asit uzunluğunda bir proteindir [Howard and Zuckerman, 1990]. X proteini HBV konakçı

ilişkisinde konakçı genlerinin [major histocompatibility complex II (MHC-II), hücre içi adezyon molekülleri-I, beta-interferon ve tümör nekrozis faktör (TNF)] ekspresyonunu uyarma yeteneğindedir. Human immüne deficiency virüs (HIV) başta olmak üzere immün yetersizliğe neden olan virüslerin transkripsiyonunun uyarımında görev alır. Ayrıca bu proteinin insan hepatosellüler karsinoma gelişiminde önemli fonksiyona sahip olduğu gösterilmiştir. Bu özelliği biyokimyasal olarak protein kinaz fonksiyonuna sahip olması ile açıklanabilir. Değişik çalışmalar X proteininin, hücre içi gen ekspresyonunda ve büyümenin düzenlenmesinin kontrolünde önemli fonksiyona sahip protein-protein ilişkisinde etkili olduğunu göstermiştir [Özdener, 1997; Burda et al., 2001].

2.2.5.4. P Proteinini

En büyük genomik bölgedir. Genomun 2/3'sini kapsar. C geninin karboksi uç kısmını, tüm S genini ve X geninin amino uç bölgesini kapsar [Howard and Zuckerman, 1990]. P geni virüs ile ilgili DNA polimeraz enzimini kodlar. Viral DNA replikasyonu için kritik öneme sahiptir ve terminal protein (TP) (negatif DNA sarmalının sentezlenmesinde RNA pregenomunun ters transkripsiyonu için primer görevi yapar), RNaz H (RNA pregenomunun sindirilmesinde endonükleaz görevi yapar) ve revers transkriptaz (RT) polipeptidlerini kodlayan üç bölgesi bulunmaktadır. Bu fonksiyonundan dolayı HBV korunmasında yeni tedavi stratejilerinde kullanılmaktadır [Nassal, 1997; Özdener, 1997] (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. HBV genleri ve bu genler tarafından sentezlenen proteinlerin özellikleri [Kıyan, 2001].

Gen bölgesi	Nükleotid yerleşimi	Protein	Aminoasit sayısı	Glikolize olmamış kDa	Glikolize kDa
PreS1	2850-3174	LHBs	389	39	42
PreS2	3174-157	MHBs	281	33	36
S	157-833	SHBs	226	24	27
PreC/C	1816-2452	HBeAg	212	15	-
C	1903-2452	HBcAg	183	19	-
P	2309-1623	DNA pol	832	92	-
X	1376-1838	HBxAg	154	16	-

2.2.6. Hepatit B Virüsü Mutantları

Karaciğer hasarının oluşması virüsün direkt etkisi ile değil hücrel immün yanıt ile gelişmektedir. Sitotoksik T lenfositler karaciğer hasarından sorumludur. Akut ve kronik HBV enfeksiyonlarında patolojik incelemede karaciğer hücrelerinin çevresinde sitotoksik T lenfositler (CTL) ve doğal öldürücü T lenfositlerin (NK) birikimi gösterilmiştir [Lee, 1997; Michel et al., 2001]. HBV tümör ilişkilerini inceleyen çalışmalarda HBV integrasyon bölgelerinin ve nükleotid diziliminin çok değişken olduğu gösterilmiştir. HBV DNA'sı konakçı hücre kromozomuna insersiyon mutajen ile dahil olma özelliğine sahiptir. Hepatit B vakalarında fulminant hepatit gelişiminin prekor ve preS/S bölgesi mutasyonları sonucunda geliştiği gösterilmiştir [Özdener, 1997].

2.2.6.1. Yüzey (Kılıf) Mutantları

İlk tanınan HBV mutantları d, y, w, r ve a olarak bilinen HBsAg alt tipleridir. Bunlar HBV enfeksiyonlarının moleküler epidemiyolojisini incelemede kullanılmışlardır. HBV soyları SHB yüzey antijenini (SHBsAg) oluşturan amino asitlerin belli bölgelerdeki diziliş farklılıklarına göre kategorize edilmiştir. Antijenik determinantların (a, d/y ve w/r) kombinasyonları 4 serolojik alt tip (adw, ard, ayw ve ayr) halinde bulunur [Swenson et al., 1983]. HBsAg'nin koruyucu antikor oluşturan komponenti, major proteinin 24 amino asitten oluşan "a" grup determinantında bulunur. HBsAg'nin "a" determinantı 124-147. amino asitleri arasındaki hidrofilik bölgededir [Jolivet-Reynaud et al., 2001; Shokrgozar and Shokri, 2002]. Bu determinant bütün alt tiplerde ortaktır. Bu bölgeye karşı oluşan antikorlar virüsün hepatosite bağlanmasını inhibe eder ve bütün alt tiplere karşı bağışıklık sağlar. HBsAg'nin diğer iki determinantı d/y ve w/r'dir. SHBsAg'nin 122. amino asiti lizin ise "d", arginin ise "y"; 160. amino asiti arginin ise "r", lizin ise "w" determinantı olarak tanımlanır [Howard and Zuckerman, 1990].

HBV yüzey antijeninin "a" determinantını kodlayan gen bölgesi mutasyona oldukça elverişlidir. Bu bölgede en sık görülen mutasyon, 587. nükleotidde guanin yerine adenin bazının yer almasıdır. Bu durumda peptid zincirinde 145. amino asit olan glisin (GGA) yerine arginin (AGA) gelir ve bu şekilde HBsAg'nin antijenik

yapısı değişir. Bunun sonucunda bu mutantlarla oluşan enfeksiyonlar sırasında, klasik testlerle serumda HBsAg tespitinde sorunlar ortaya çıkar. ELISA testleri negatiftir ve rutin kullanımdaki rekombinant aşı, bu mutantla oluşan enfeksiyona karşı yeterli düzeyde koruyucu etkinlik göstermez [Burda et al., 2001]. Bu mutantların ayrıca, hastalıktan korunma amacı ile anti-HBs monoklonal antikorları verilen karaciğer transplantlı hastalarda da ortaya çıktığı görülmüştür. Bu virüslara “aşı ile indüklenen mutantlar” da denmektedir. Mutant virüslerin şimdiye kadar subünit aşılarla immünize olmuş hastalarda görüldükleri ve bu aşıların humoral immün yanıt oluşturmalarına karşılık, sitotoksik T hücre yanıtını indklemedikleri, bu durumun ise mutantların daha kolay ortaya çıkmalarına yol açtığı düşünülmektedir [Kılıçturgay, 1995].

2.2.6.2. Prekor/kor Mutantları

HBV’nn prekor bölgesindeki en önemli genomik varyasyon, HBsAg yapısının ortadan kalkmasına yol açan mutasyonlardır. Orjinal virsta prekor ve kor proteinleri, kor geni tarafından kodlanırlar. Prekor bölgesi 1814-1900 nükleotidleri arasında yer alır ve 29 amino asitten oluşan bir bölgeyi kodlar. HBeAg virüs yapısında yer almaz, golgi cisimciği üzerinden salınarak serumda serbest halde bulunur. Fakat aynı gen tarafından kodlanan HBcAg ise hepatositte bulunur, nükleokapsid proteini olarak viryonda yer alır ancak serumda serbest halde bulunmaz [Lok, 2000; Chin and Locarnini, 2003]. Bununla beraber HBeAg kodlayan prekor bölgesi yapısal gen bölgesi olmadığı için, delesyon sonucu HBV prekor mutasyonu ile HBeAg serumdan kaybolur ancak virüs replikasyonu devam eder. Bu mutasyonların ortaya çıkışına yol açan konak ve virüsa ait faktörler iyi bilinmemekle beraber, prekor bölgesindeki bu mutasyonun virüsün, konağın anti-HBe aracılığı ile oluşan sitotoksik yanıtından kaçarak yaşamasına yardımcı olduğu düşünülmektedir [Kılıçturgay, 1995; Badur and Akgün, 2001].

2.2.7. Hepatit Enfeksiyonları

Kronik hepatitlerin % 80’inden fazlasını kronik viral hepatitler oluşturur. Bunlar arasında hepatit B, C, D virüslerine bağlı enfeksiyonlar en sık görülenlerdir. Nadiren Sitomegalovirüs ve Epstein-Barr virüsü gibi diğer hepatotropik virüsler de

yenidoğanlarda ve immün sistemi zayıflamış hastalarda kronik hepatite neden olabilir. Diğer kronik hepatit nedenleri arasında otoimmün hepatitler, ilaçlar, alkol, metabolik nedenler, alfa-1 antitripsin eksikliği sayılabilir [Savaş ve Şimşek, 1998; Torbenson and Thomas, 2002].

Klasik hepatit B enfeksiyonunun doğal seyrinde üç faz vardır; immün tolerans, immün klerens ve virüs entegrasyonu [Locarnini and Newbold, 1997]. Yenidoğanda immün tolerans durumu vardır. HBV-DNA ve HBeAg pozitifdir, transaminazlar normal ve karaciğer biyopsisi hafif aktiftir [Pol, 1995]. İmmün klerens fazında; 10-20 yaşlarında virüse karşı immün yanıt oluşturulur, virüsün replike olduğu hepatositlerin ölümüyle transaminazlarda yükselme ve şiddetli hepatit tablosu oluşur [Karayiannis, 2003]. İlerleyen yıllarda viral nükleik asit konakçı DNA'sına entegre olur ve infektivite azalır. HBeAg negatifleşir, HBV-DNA titresi düşüktür ve anti-HBe oluşur. Erişkinde ise kronik hepatit B enfeksiyonlarının replikatif ve nonreplikatif fazları bulunmaktadır [Savaş ve Şimşek, 1998; Wai and Lok, 2002].

Hepatitlerin tedavisi için en sık rekombinant DNA teknolojisiyle üretilen interferon- α (IFN- α) kullanılmaktadır. Bunların iki ticari preparatı (IFN- α 2a ve IFN- α 2b) değişik dozlarda bulunmaktadır. İnterferonlar, vücudumuzda normal immün yanıt sırasında sentezlenen biyolojik sitokinlerdir [Wai and Lok, 2002]. İmmünomodülatör veya doğrudan doğruya antiviral olarak; immün sistemde major histocompatibility complex I (MHCI) antijen ekspresyonunda, naturel killer (NK) hücre aktivitesinde, antijen sunan hücre (APC) aktivitesinde ve doğal interferon sentezinde artış sağlayarak etki gösterirler [Akbar et al., 1999]. Ayrıca gansiklovir, lamivudin ve famsiklovir gibi pekçok antiviral ilaç günümüzde, HBV replikasyonunu inhibe etmek amacıyla da kullanılmaktadır [Esteban, 2002; Karayiannis, 2003].

2.2.8. HBV Aşı Uygulamaları

Günümüzde genetik mühendisliği yoluyla elde edilen HBV aşıları güvenli olarak kullanılmaktadır. Bugüne kadar kullanılan milyonlarca doz aşıdan sonra ciddi herhangi bir yan etki bildirilmemiştir. Ayrıca aşıya bağlı hepatoma gelişme riski de

yoktur. HBV taşıyıcılarında gelişme olasılığı yüksek hepatoma riski gözönüne alınarak, WHO tarafından HBV aşısı kanserden korunmada geliştirilmiş ilk aşı olarak değerlendirilmektedir [Lemon and Thomas, 1997; Akova, 1998].

Aşı 0, 1, 6. aylarda 3 doz olarak deltoid adale içine uygulanır. Uygulama 0, 1, 2, 12. aylarda dört doz şeklinde de yapılabilir. Her iki uygulamada da antikor geliştirme bakımından farklılık olmadığından 3 dozluk aşılamaya tercih edilmektedir [Akova, 1998; Banatvala et al., 2001].

Aşılananların yaklaşık % 5-11'inde kanda yeterli düzeyde antikor oluşmaz [Shearer et al., 1998]. Bu durumda ek doz aşı uygulanabilir. Genellikle yüksek risk altındaki sağlık personelinin ilk immünizasyondan 5 yıl sonra anti-HBs titresine bakılıp, bu titrenin 10 mIU/ml'nin altında olması durumunda bir doz rapel yaptırılabilir önerilmektedir [Lemon and Thomas, 1997; Banatvala et al., 2001].

Hastalığın yaşa bağlı risk ve komplikasyonları, aşılanan kişinin oluşturacağı immün yanıt gibi birçok faktöre bağlı olarak değişiklik gösterir. Genellikle aşılardan hastalık için risk taşıyan ve yeterli antikor yanıtı oluşturabilecek en genç gruba yapılır. İmmün sistemin gelişimi fetal hayatta başlar ve 5-6 yaşa kadar devam eder. Yenidoğanlarda en iyi immün yanıt gelişimi protein antijenlere karşı gelişmiştir. Yenidoğanların immün sistemi bu antijenleri tanır ve immünolojik hafıza geliştirir. Aşı, ihtiyacı olan kişiye, yeterli immün yanıtı oluşturabileceği zamanda ve ihtiyaç duyduğu dönemde yapılmalıdır [Balık, 2000]. Hepatit B aşısı risk taşıyan hamilelere uygulanabilir. HBs antijeni pozitif anneden doğan prematürelerde hepatit B aşısı ve hepatit B immünglobulini (HBIG) yapılmalıdır. HBsAg negatif anneden doğan bebeklerin primer hepatit B immünizasyon programında hepatit B aşısının 3. dozu, 2. dozundan en az iki ay sonra yapılmalı ya da bebeğe aşı 6. aydan önce yapılmamalıdır [Akova, 1998; Karayiannis, 2003].

Tüm yenidoğanlar, on yaş civarındaki çocuklar, hasta ve hasta vücut salgıları ile temas riski olan sağlık çalışanları ve diğer çalışanlar, hemodiyaliz hastaları, hemofili vb hastalıkları nedeniyle sürekli kan transfüzyon gereksinimi olan hastalar,

hepatit B taşıyıcılarının eşleri ve aynı evde yaşayan kişiler, huzurevi, akıl hastanesi ve mental özürlü çocuk bakımevlerinde kalan ve buralarda çalışan sağlık personeli, damar içi uyuşturucu madde kullananlar, homoseksüel ve biseksüel kişiler, mahkumlar, HBV endemik bölgelere seyahatle burada 6 aydan daha fazla kalması planlanan kişiler risk altındadır ve bu gruplara aşı uygulanmalıdır [Howard and Zuckerman, 1990; François et al., 2002].

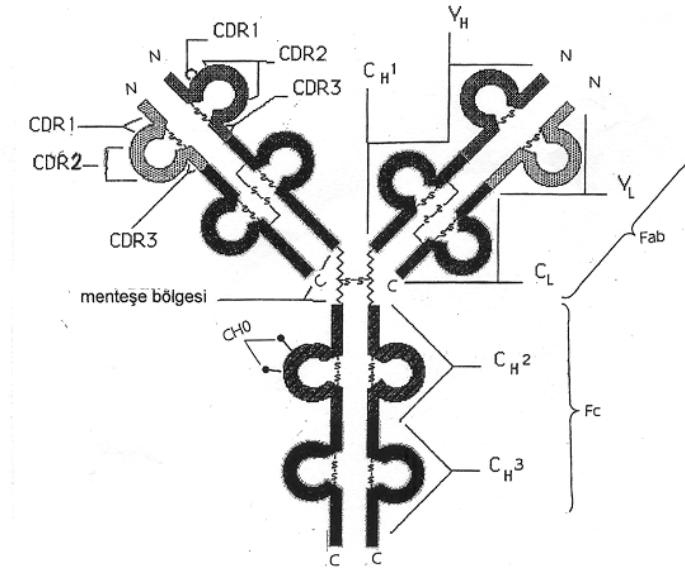
Hepatit B'den korunma; genel koruyucu önlemler, pasif ve aktif immünizasyon yoluyla olmaktadır:

Pasif bağışıklık; hepatit B antijeni ile karşılaşmadan antijene karşı sağlanan bağışıklıktır. HBsAg'ne karşı çok yüksek yoğunlukta spesifik human immünglobulin molekülleri veya duyarlı lenfositlerin aktarımı ile dolaylı yoldan bağışıklık oluşturulur. Böylece enfeksiyon etkenine spesifik bir koruma sağlanır [Roitt and Delves, 2001].

Aktif bağışıklık; Hepatit B antijeninin doğal yolla vücuda girerek enfeksiyon oluşturması (doğal aktif bağışıklık) veya aşılama ile (yapay aktif bağışıklık) kazandırılabilir. Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen hepatit antijeni organizmaya verildiğinde, doğal enfeksiyon sonrası oluşan immün yanıtı benzer koruyucu hücresel ve humoral bağışıklık oluşturulur [Roitt and Delves, 2001].

2.3. Antikor

Humoral bağışıklık; antijenleri özgül olarak tanıyarak yok edilmesini sağlayan immünglobulin (Ig) molekülleri tarafından gerçekleştirilir. B lenfositleri antijenin epitop adı verilen özel bölgelerine özgü antikor (immünglobulinler) salgırlar. Salgılanan antikorlar, özgül olarak tanıdığı antijene bağlanarak onun diğer hücreler tarafından yok edilmesini sağlarlar [Roitt and Delves, 2001].



Şekil 2.3. Antikoru moleküler yapısı

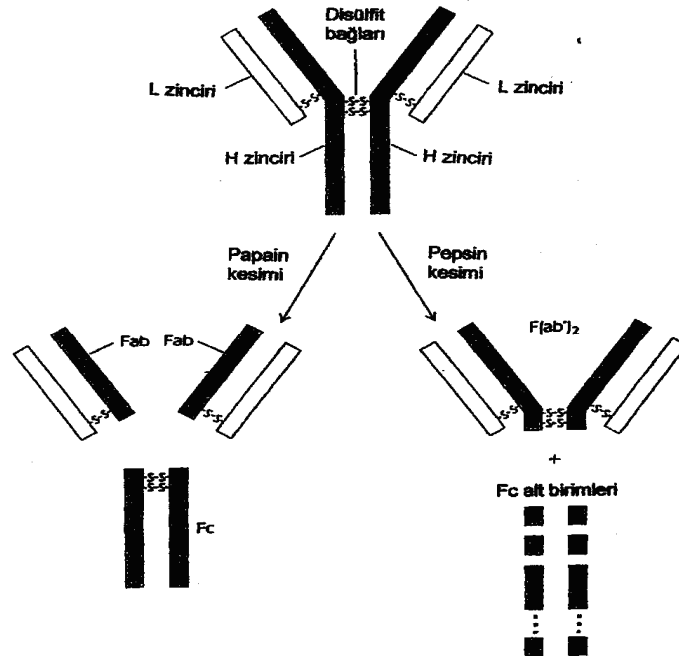
[http://www.courses.brown.edu/George_Yap-BI0053_F02/9].

2.3.1. Molekül Yapısı

Ig molekülü birbirlerine disülfid bağları ile bağlanmış benzer yapıda iki hafif (L) ve iki ağır (H) zincirden oluşur. Ağır zincir 55-70 kDa, hafif zincir ise 24 kDa ağırlığındadır. Hafif ve ağır polipeptid zincirlerinin her ikisi de bir aminoterminal değişken (V) bölge (Fab) ile bir karboksi terminal sabit (C) bölge (Fc) içerir [French et al., 1989]. Her ağır zincir üç sabit (CH_1 , CH_2 ve CH_3) ve bir değişken bölgeye (V_H) sahiptir. Ağır zincirde toplam 446 amino asit bulunur, bunlardan ilk 109'u amino ucundaki değişken bölgeye aittir. Hafif zincirde ise bir değişken (V_L) ve bir sabit bölge (C_L) bulunur ve 214 amino asitten oluşur. Hafif zincirde de ilk 109 amino asit değişken bölgeyi oluşturur [Loewy et al., 1991; DeWildt et al., 1999]. Ağır ve hafif zincirlerin değişken bölgeleri antijen bağlama bölgesini oluşturur. Her zincirin değişken bölgesindeki üç aşırı değişken bölge, komplementerliği belirleyen bölgeler (CDR) olarak adlandırılır. CDR_1 , CDR_2 , CDR_3 olarak simgelenen bu bölgeler bir araya gelerek antijen bağlama yüzeyini oluştururlar. Ağır zincirde sabit bölge 1 (CH_1) ve sabit bölge 2 (CH_2) arasındaki menteşe bölgesi moleküle esneklik sağlar. Ağır zincirler birbirlerine ve hafif zincir ağır zincire disülfid bağları ile bağlanır. Ayrıca değişken ve sabit bölgelerin içinde de disülfid köprüleri bulunur (Şekil 2.3). Hafif zincirler iki tipten birini kappa(κ) veya lamda(λ) taşır [DePinho, 1986; Cedar and Bergman, 1999]. Yapılan çalışmalar immünglobulin molekülünün amino asit

dizilerinin her antikorun değişken bölgelerinde birbirinden farklı olduğunu göstermiştir. İmmünglobulin G dışında, ağır zincirlerin sabit bölgesi yönünden birbirinden farklı olan başka immünglobulin tipleri vardır. IgG'de γ , IgA'da α , IgM'de μ , IgD'de δ ve IgE'de ϵ ağır zincir izotipler bulunmaktadır [Roitt and Delves, 2001].

Antikorlar papain ve pepsin enzimleri ile muamele edildiğinde farklı gruplara ayrılırlar. IgG molekülü pepsin ile muamele edildiğinde $F(ab')_2$ (iki Fab bölgesinin antikorun menteşe bölgesiyle birbirine bağlanmış şekli) adı verilen bölgelere ayrılırken, Fc kısmı pepsin tarafından sindirilerek parçalara ayrılır. Papain ise iki ağır zinciri bağlayan disülfid bağının karboksiterminal tarafına etkilidir. Papain etkisi ile IgG molekülü üç parçaya bölünür. Aminoterminal tarafta kalan iki parça birbirine eşit olup özgül antijenle birleşme özelliğine sahip olan Fab kısmı, üçüncü parça kristalize olabilen Fc kısmıdır [Smith, 1993; Zouali, 2001]. IgM molekülü pepsinle kesildiğinde ise bivalent fragment $F(ab')_2\mu$ oluşur. Oluşan bu parça monovalent $Fab'\mu$ 'yi üretmek için indirgenebilir [Matthew and Reichardt, 1982; Liddell and Cryer, 1991] (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Antikorun çeşitli enzimlerle etkileştiğinde oluşan alt birimleri
[Benjamini, 2000].

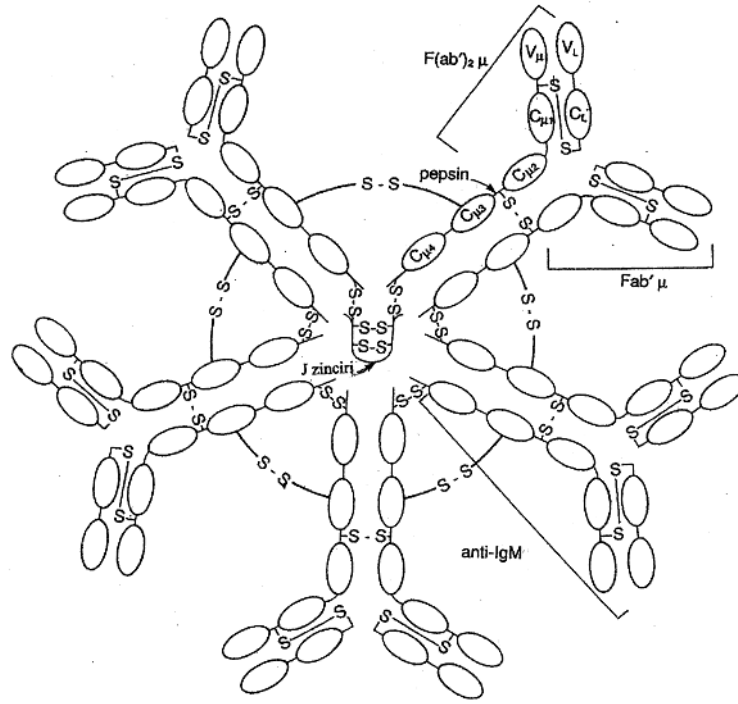
2.3.2. Antikor İzotipleri ve Fonksiyonları

a) IgG: İki ağır ve iki hafif polipeptid zincirden oluşan IgG antikor molekülleri 150 kDa molekül ağırlığında ve çökme katsayısı 7S olan bir monomerdur. Normal serumda ortalama 600-1800 mg/dl bulunmaktadır. IgG sınıfı antikorlar, % 3-4 oranında karbonhidrat içermektedir. Normal yetişkinde plazmadaki total immünglobulinlerin % 80 kadarını IgG oluşturur [Loewy et al., 1991]. Disülfid bağlarının pozisyon ve sayısındaki farklılığından kaynaklanan IgG'nin (γ) ağır zincirin IgG₁, IgG₂, IgG₃ ve IgG₄ olmak üzere insanlarda 4 alt sınıfı bulunmaktadır [Kuby, 1994]. Birçok hücre yüzeyinde IgG için Fc reseptörleri bulunduğu belirlenmiştir. Fc γ RI (CD64); antijenin sitotoksik olarak parçalamasını sağlayarak antikora bağlı hücreler sitotoksikite oluşturur. Fc γ RII (CD32); antikor sentezini belirli bir aşamadan sonra engelleyerek immünglobulin yapımının düzenlenmesini sağlar, Fc γ RIII (CD16); antikora bağlı sitotoksikite için gerekli olan düşük afiniteli reseptördür. Bu reseptörler aracılığıyla IgG molekülleri, immün kompleksler ve partiküler antijenleri fagositoza duyarlı hale getirir [Zouali, 2001]. IgG plesantadan geçebilen tek immünglobulindir, yenidoğanı enfeksiyonlara karşı korumaktadır. Presipitasyon, toksin ve virüs nötralizasyonu, kompleman birleşmesi, trombosit agregasyonu ve opsonin reaksiyonlarında etkilidir [Roitt and Delves, 2001].

b) IgA: Kan serumunda ve seromukoz salgılarda bulunan çökme sabitesi 7-11 S olan bir immünglobulindir. İnsan kan serumunda bulunan immünglobulinlerin % 15'i IgA'dır ve yapısında % 7 oranında karbonhidrat bulunur. IgA plazmada monomer, vücut salgılarında dimer veya trimer şeklinde bulunur. Monomer IgA 160 kDa, trimer IgA 400 kDa molekül ağırlığındadır. Salgısal IgA molekülü (dimer) bir çift bazik birim, bir J zincir ve sekreter parçadan oluşur. J zincir 15 kDa molekül ağırlığında asidik bir polipeptid olup yüksek oranda sistein içermektedir. IgA'nın ağır zincirin (α) IgA₁ ve IgA₂ olmak üzere farklı iki alt sınıfı vardır [Zouali, 2001]. Komplemanı alternatif yoldan aktive ederler. Yarı ömrü 6 gündür ve serum düzeyi 200-500 mg/dl'dir. IgA esas olarak mukoza salgılarının major immünglobulinidir ve bu nedenle organizmanın lokal enfeksiyonlara karşı ilk olarak savunmasından sorumludur. Gözyaşı, tükürük, trake, bronş, burun, vajen, barsak salgıları, safra ve sütte yüksek düzeyde IgA bulunur. Salgısal IgA proteolitik enzimlere dirençlidir. Üst solunum yolları ve barsak sistemi mukozası enfeksiyonlarında ve yüzeysel

immünitede etkilidir. Mikroorganizmaların mukoza hücrelerine bağlanmalarını ve dolayısıyla dış yüzeylerde kolonize olmalarını veya epitel hücrelerini enfekte etmelerini önler [Kuby, 1994]. IgA çeşitli mikroorganizmalar tarafından oluşturulan toksik veya litik enzimleri de nötralize edebilir. T lenfosit, monosit, nötrofillerin yüzeyinde bulunan IgA reseptörleri fagositoz olayına yardım etmekte ve IgA yapımını düzenlemektedir [Benjamini et al., 2000].

c) IgM: Beş IgG alt biriminden oluşan molekül ağırlığı 970 kDa ve çökme katsayısı 19 S olan bir pentamerdir. Bir IgM molekülünde disülfid bağları ile bağlı olarak 5 bazik birim yer alır. Her pentamer moleküldeki bazik birimlerden ikisine kovalent bağlanmış bir J zincir bulunur. Bazı IgM molekülünde J zincir bulunmayabilir veya birden fazla olabilir. Menteşe bölgesi yoktur, bunun yerine 130 aminoasit'lik ilave bir CH₄ birimi içerirler. Normal yetişkinlerde, plazmadaki total immünglobulinlerin % 8-10 kadarını IgM oluşturur. IgM % 12 oranında karbonhidrat içeren, merkaptetanole duyarlı bir antikordur. Yarı ömrü 5 gün olan IgM sınıfı antikorların serumdaki normal düzeyleri 60-200 mg/dl'dir. Ağır zincirin (μ) IgM₁ ve IgM₂ olmak üzere iki alt sınıfı bulunmaktadır. IgM sınıfı antikorlar klasik yoldan kompleman aktivasyonunda, aglütinasyonunda ve fagositoz duyarlılığında IgG'den çok daha fazla etkindir. Fagositozu kolaylaştırırlar, makrofaj ve nötrofillere bağlanmazlar [Zouali, 2001]. IgM ilkel omurgalılarda görevsel olarak ilk oluşan, bireysel gelişmede fötüste ilk yapılan ve birincil immün yanıtta oluşturan bir antikordur. Bunlar aylar içinde kaybolarak yerlerini, uzun süre koruyucu etkinlik gösteren IgG sınıfı antikora bırakırlar. Bu nedenle serumda IgG'ye göre daha yüksek düzeyde spesifik IgM antikorlarının saptanması, akut bir enfeksiyonu işaret eder [Kuby, 1994]. Serumda IgM eksikliği septisemiye duyarlılık yaratmaktadır. Normalde sentezlenen IgM polimerleri pentamer olmakla beraber, B hücrelerinin bazı hallerde hekzamer IgM molekülü de sentezleyebileceği gösterilmiştir [Reddy and Corley, 1999] (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. IgM antikorü [Coligan et al., 1991].

d) IgD: IgG sınıfı antikorların molekül yapısına benzer yapıda moleküle sahip, çökme katsayısı 7S, mol ağırlığı 180 kDa olan kısa ömürlü bir antikordur. Yenidoğanın B tipi lenfositlerinin hücre membranında (δ) globulin adı verilen IgD ağır zincirleri gösterilmiştir [Blattner and Tucker, 1984]. Plazmada total Ig'lerin %0.2-1 kadarını IgD oluşturur. Alternatif yoldan komplemanı aktive edebilen IgD antikorları % 13 oranında karbonhidrat içerirler. Yarı ömrü 3 gün ve serumdaki düzeyi 0.1-4 mg/dl'dir. Isı ve proteolitik enzimlere duyarlı kolayca parçalanabilen bir immünglobulindir. Soğuk ortamda Fab ve Fc parçaları ayrılır [Preud'homme et al., 2000]. IgD'nin B lenfositlerinde antijeni ilk olarak bağlayan bir reseptör görevi yaptığı bildirilmektedir. IgM ile birlikte B lenfosit yüzeyinde yer alır, B hücrelerinin farklılaşmasında görev yapar. IgD antijenik uyarımdan sonra lenfosit yüzeyinden kaybolmaktadır [Kuby, 1994].

e) IgE: Mol ağırlığı 190 kDa ve çökme katsayısı 8S olan bir monomerdır. Normalde, plazmadaki total immünglobulinlerin ancak % 0.0004-0.001 kadarını oluşturur. IgE sınıfı antikorlar perifer kan serumunda çok az miktarda (0.01-0.9 mg/dl) bulunmaktadır. Yarı ömrü ancak 2 gün olan IgE molekülleri % 11 oranında karbonhidrat içermektedir. Ağır zincir (ε) ile gösterilir. IgE sınıfı antikorlar mast hücrelerine ve bazofillere bağlanarak onları duyarlı hale getirirler [Benjamini et al., 2000]. IgE 56 °C'lik ısıya duyarlı ve bu ısıda bir saatte etkinliği kaybolan, komplemanı alternatif yoldan aktive eden, plasentadan geçemeyen, özgül antijenleriyle presipitasyon yapamayan ve merkaptetanol etkisine dirençli olan bir antikordur. Helmin enfeksiyonlarında ve aniden gelişen alerji olgularında miktarı artan immünglobulinlerdir [Kuby, 1994]. FcεR1 reseptörleri aracılığı ile mast hücreleri alerjene bağlandıkları zaman hızlı aşırı duyarlılık reaksiyonlarının (anafilaksi) ortaya çıkmasına neden olurlar. Bu alerjik reaksiyonlar, paraziter hastalıklara karşı savunmada yer alabilir. T ve B lenfosit, makrofaj ve eozonofillerde bulunan düşük afiniteli FcεRII reseptörleri de IgE yapımının düzenlenmesini sağlamaktadır [Roitt and Delves, 2001].

2.4. Antijen

Yabancı bir organizmaya girdiğinde immün yanıt oluşturabilen, kendisine karşı gelişmiş antikorlara bağlanma yeteneğine sahip olan yabancı maddelere immünojen denir. Her immünojen bir antijendir ancak her antijen bir immünojen değildir. İmmünojen antijenler genellikle protein, karbonhidrat ve fosfolipid yapısındadır. İmmünojen olmayan antijenler (hapten) küçük oldukları için bağışıklık sisteminde kalamazlar ancak taşıyıcı bir proteinle bağlandığında bağışık yanıt oluşturabilirler [Kaufman, 1995].

Antikorlar sadece tüm immünojen yapısına karşı değil, immünojen antijenin epitop (antijenik determinant) olarak isimlendirilen küçük polipeptid dizilerine karşı da gelişirler. Antijenler epitopa özgü antikorlar ya da bağışıklıktan sorumlu hücrelerin reseptörleri tarafından tanınır [Asai and Wilder, 1993; Kaufman, 1995].

2.5. Aşılar ve Adjuvanlar

1778 yılında Edward Jener tarafından enfeksiyöz hastalıklara karşı aşılama fikri ilk olarak ortaya atılmış ve araştırmacı bu düşüncesiyle çiçek hastalığından korunmayı sağlamıştır. 1980 yıllarında Dünya Sağlık Örgütü çiçek hastalığının dünya üzerinden tamamıyla silindiğini bildirmiştir [Thanavala, 1996]. Aşılama sayesinde çiçek, kuduz, tetanoz, difteri, boğmaca ve verem hastalıklarının önüne geçilmesine rağmen hala aşısı bulunamayan hastalıklar nedeniyle milyonlarca kişi etkilenmektedir [Andre, 2003]. Aşı geliştirme çalışmaları gen klonlama, peptid sentezleme, monoklonal antikor üretimi sayesinde yeni boyutlar kazanmaktadır [Dagleish and Kennedy, 1988; Renner et al., 2000].

Birçok antijen immün yanıtı istenilen düzeyde uyaramaz. Özellikle inaktive mikroorganizmalar veya bunların ürünlerini taşıyan aşıların immün yanıtlarını artırmak ve oluşan immün yanıtın uzun süreli olmasını sağlamak amacı ile adjuvanlar kullanılır [Delves, 1997]. Günümüzde makrofajları aktive eden ve bazen de lenfositler üzerine direk olarak etki eden adjuvanlar bulunmaktadır. İnsanlarda genellikle alüminyum hidroksit ve alüminyum fosfat taşıyan aşılar kullanılmaktadır [Audibert and Lise, 1993]. Bunun dışında antijenin küçük lipit membran vesiküllerine (lipozomlar) ya da özel bir glikozit matriksine bağlanan immün uyarıcı kompleks (ISCOM), monofosforil lipit A (MLA) ve muramil dipeptit (MDP) gibi adjuvanlarla çeşitli toksinler için uygulanan yeni taşıyıcı yöntemler bulunmaktadır [Gregoriadis, 1990; Rabinovich et al., 1994].

Organizmaya çeşitli yollarla verilen aşılar ilgili antijenlere karşı bağışıklık sistemini harekete geçirerek vücutta koruyucu proteinlerin (antikorların) gelişmesini sağlamaktadır. Çeşitli enfeksiyon etmenleri (ölü bakteri, virüs, mantar, parazit) fiziksel (ısı, ultraviyole ışınları) ve kimyasal (formaldehit vb.) maddelerle inaktive edilerek ya da doğal veya yapay olarak virülensi zayıflatılmış formlar halindeki organizmalar aşı antijeni olarak kullanılmaktadır [Ellis, 1999; Roitt and Delves, 2001].

2.6. Hepatit B Aşıları

Hepatit B'ye karşı aktif immünizasyon çalışmalarını ilk olarak 1971'de Krugman başlatmıştır. Bu araştırmacı; HBV'lü serumları seyreltip 1 dakika kaynatarak gönüllülere verdikten sonra bu kişilerde sarılık oluşmadığını ve HBV'ne karşı korunduklarını göstermiştir [Krugman et al., 1967]. 1981'de ilk ticari "plazma aşısı" [Brown et al., 1986], 1985'te de ilk ticari "rekombinant DNA" aşısı üretilmiştir [Lemon and Thomas, 1997]. HBV aşıları, immünijeniteleri ve koruyuculuğu yüksek, çok güvenli inaktif aşılar olup diğer aşılarla uyumsuzluk göstermez. HBV aşıları özellikle çocuklara uygulanan aşılarla kombine edilerek kullanılabilir. Bu şekilde tek bir enjeksiyonla koruyucu yanıt almak mümkündür. Alüminyum tuzları üzerine adsorblanmış difteri, tetanoz toksoitleri, inaktive boğmaca bakterisi ve hepatit B virüsünün rekombinant SHBs antijenini içeren kombine aşı diğer bir yöntem olarak kullanılmaktadır [Jilg, 1998; Papaevangelou, 1998]. HBV aşısı geliştirme çalışmalarında farklı yaklaşımlar bulunmaktadır.

2.6.1. Plazma Kökenli Aşılar

HBV'ne karşı ilk etkili aşı ABD'de 1970'lerde kronik olarak enfekte olmuş vericilerin kanlarından viral ürünlerin saflaştırılması ile elde edilmiştir. 1980'lerde HIV hastalığının yaygınlaşmasıyla kan kökenli patojenlerin yayılmasının görülmesi ve insan kaynaklı biyolojik ürünlerin aşı olarak kullanımının riskli olması nedeniyle plazma aşıları artık kullanılmamaktadır. Yapılan çalışmalar sonucu ml'de 1µg HBsAg bulunduran inaktive edilmiş 1/10 seyreltmedeki insan serumunun, uygulanan kişilerde belirli miktarda antikor yanıtı oluşturduğu gösterilmiştir. Seronegatif kişilere aşı yapıldığında HBsAg'ne karşı antikor (anti-HBs) oluşurken kor ve e antijenlerine karşı antikor oluşmaz. Aşılama ile çeşitli HBV alt tiplerine karşı çapraz koruma gösteren "a" antijenine karşı antikor oluşur. Hepatit B aşıları HBsAg taşıyıcılarının plazmasından hazırlanır [Ellis, 1999]. Taşıyıcıların plazmasından HBsAg saflaştırılması, plazmada bulunabilecek HBV'lerinin ve diğer ajanların inaktivasyonunun sağlanması amacıyla büyük ölçekte üretim yapılmaktadır. Bunun için pepsin kesimi, üre ile denatürasyon, formalin veya ısı inaktivasyonu uygulanmaktadır. Plazma aşıları alüminyum hidroksite adsorbe edilerek hazırlanırlar. Plazmadan elde edilen aşıların üretimi sırasında uygulanan işlemlerde, insanda

hastalık yapan non-A, non-B hepatit virüsleri ve HIV virüsü hariç, bilinen tüm virüslerin inaktive olduğu gösterilmiştir [Benjamini et al., 2000].

2.6.2. Rekombinant DNA Teknolojisi ile Üretilen Aşılar

Rekombinant DNA teknolojisi ile mikroorganizmaların protein antijenleri üretilir [Ellis, 1999]. Aşı üretimi için Rekombinant DNA teknolojinin ilk uygulama örneği Hepatit B aşısıdır. Plazma kökenli aşılar yerine mayada rekombinant DNA teknolojisi kullanarak Hepatit B antijeninin eksprese edildiği alternatif bir aşı geliştirilmiştir [Plotkin, 2002]. Rekombinant aşı kan kökenli patojenlerle aşı antijeninin kontaminasyon riskini ortadan kaldırmaktadır [Traavik, 1999; Benjamini et al., 2000].

Rekombinant DNA aşıları; maya hücresinde veya memeli hücrelerinde çoğaltılır. HBsAg'i saflaştırıldıktan sonra alüminyum hidroksite adsorbe edilir ve koruyucu olarak tiyomersal kullanılır [Kuby 1994; Lemon and Thomas, 1997].

2.6.2.1. Maya Rekombinant Aşıları

HBV'nün adw alt tipinin yüzey antijenini kodlayan gen izole edilerek *Saccharomyces cerevisiae* maya kültüründen elde edilmiştir. Ekspresyon plazmitleri maya genomunu ya da genomun bir kısmını ve GAL1 gibi promotorla kontrol edilen HBV yüzey antijen genini içerir. Aşı adw alt tipinde hazırlanmış olmasına karşın diğer alt tiplere de bağışıklık sağlar. Maya hücreleri preS1 ve preS2 bölgelerini içeren aşıların üretiminde kullanılmaktadır [Kao and Chen, 2002]. Bu bölgelerin saflaştırılması sırasında proteaz inhibitörleri eklenir. Translasyon sonucunda kimyasal bir işlem olmaksızın HBsAg ortalama 20 nm çapında küresel parçacıklara dönüşmektedir. Glikolize olmamış HBsAg polipeptidleri ve fosfolipidlerden oluşan bir lipid matriksi taşıyan bu parçacıklar doğal HBsAg özelliğine sahiptir. Maya kökenli HBV aşılarının üretiminde HBsAg'nin saflaştırılması kolon kromatografisi, ultrasantrifüjleme gibi çeşitli tekniklerle gerçekleştirilir. Aşı filtrasyon ile sterilize edildikten sonra alüminyum hidroksite bağlanır [Howard and Zuckerman, 1990; Benjamini et al., 2000]. Bu aşı uygulamaları sonucunda enfeksiyöz virüs DNA'sı veya Dane partikülü oluşmaz. Aşı içerisinde % 4 konsantrasyona kadar çıkabilen

maya kökenli proteinlere karşı olumsuz reaksiyon gözlenmemiştir [Roitt and Delves, 2001].

2.6.2.2. Memeli Hücre Rekombinant Aşıları

Rekombinant aşılar ayrıca memeli hücrelerinde de üretilmektedir. Plazma kökenli partiküllere glikolizasyon ve lipit içeriği bakımından benzemektedirler. Memeli hücrelerinden salgılanan 22 nm çapındaki partiküllerin antikor üretimini, mayada üretilen HBsAg'den daha yüksek miktarda indüklediği bildirilmektedir. Bu aşının etkinliği ve güvenirliliğini klinik denemeler göstermiştir. Bu yöntemle üretilen ticari aşı, rekombinant Chinese hamster ovary (CHO) hücrelerinden elde edilen S ve preS2 proteinlerini içeren saflaştırılmış ve alüminyum hidroksite bağlı inaktive HBs antijeninden oluşmaktadır [Howard and Zuckerman, 1990; Jilg, 1998].

Rekombinant DNA teknolojisi ve biyomühendisliğin diğer alanlarındaki ilerlemeler mevcut aşıların ve yeni aşıların üretimine çeşitli yaklaşımlar getirmektedir.

2.6.3. DNA Aşılar

Son yıllarda koruyucu bir antijen için DNA dizisi kodlayan plazmidler aşı geliştirmede kullanılır. Proteinlere karşı immün yanıtı güçlü bir memeli promotörü taşıyan plazmid tarafından bu gerçekleştirilir. DNA aşıları hücre içinde istenen antijeni oluşturarak MHC proteinleri tarafından sunumunun kolaylaştırıldığı bir avantaj sağlar [Jilg, 1998; Traavik, 1999]. DNA aşıları enfeksiyon riskinin yokluğu, protein aşılarına göre daha fazla kararlı olması ve patojen ile enfekte olmayan antijenin hücrelere verilmesi bakımından avantajlıdır [Ellis, 1999]. DNA aşıları anneden geçen antikorlara sahip çocukların immünizasyonu için de faydalı yöntemlerdir. DNA aşılar birçok viral, bakteriyel ve protozoal enfeksiyonlara karşı laboratuvar hayvanlarında denenmektedir. Ancak DNA aşılarının mutajenik olabilme şüpheleri bulunmaktadır. Bu noktada DNA aşıları daha yoğun deneysel çalışmayı gerektirir [Renner et al., 2000]. Mancini ve ark., transgenik farelerde, HBV-spesifik DNA aşısının tek bir uygulama ile karaciğerde yan etki oluşturmadan HBsAg'nin uzaklaştırıldığını bildirmişlerdir [Mancini et al., 1996]. DNA aşıları ile immünize

edilen farelerde HBV inaktivasyonundan T hücreleri sorumludur. HBV-DNA aşısı, kronik taşıyıcılığın ortadan kaldırılmasında yeni bir yaklaşım oluşturmaktadır [Michel, 2002; Thermet et al., 2003].

2.6.4. Sentetik Peptid Aşılar

Koruyucu immün yanıtı oluşturan protein antijeninin aminoasit dizi bilgisi kullanılarak sentetik peptid aşıları geliştirilir [Plotkin, 2002]. Teorik olarak sentetik peptid aşıları saflaştırılmış peptidleri ve daha basit antijenik komponentleri içermeleri bakımından avantajlıdır. Bu aşılar daha az yan etki ile koruma sağlayabilirler. Ancak peptid aşıları proteinlerin küçük olmaları ve taşıyıcı proteinlerle konjugasyona ihtiyaç duymaları bakımından bazı istenmeyen özelliklere sahiptir. Bu tür aşıya örnek olarak influenza virüsünün H3 hemagglutinin aşısı, 1. tip poliovirüs VP1 yapı proteini, Hepatit B virüsü yüzey antijenini taşıyan aşılar verilebilir [Howard and Zuckerman, 1990; Benjamini et al., 2000].

2.6.5. Virüs Taşıyıcı Aşılar

İstenen antijeni kodlayan bir genin bir organizmadan diğerine (poliovirüs, adenovirüs gibi) vektörler aracılığıyla aktarılması mümkündür. Oluşturulan virüs konakta replike olur, yabancı geni eksprese eder ve bu özel antijen bir aşı gibi davranır [Traavik, 1999]. Bu yaklaşım aşı virüsünün konağa zarar vermediği durumlarda yararlıdır. Virüs taşıyıcı aşı hem hücre hem de antikor bağımlı immüniteyi uyarması bakımından da avantaj sağlar [Benjamini et al., 2000; Timmerman et al., 2001].

Hibrid partikülleri kullanılarak üretilen yeni hepatit aşılarında, S geni poliomyelit virüsüne klonlanır. Yüzey antijenini taşıyan kılıf proteinleri memeli hücre kültürlerinde hücre lipidleri ile birleştirilir. Bu şekilde HBsAg'nin kılıf proteinleri partikül formda memeli hücrelerinde eksprese edilebilir. HBV'nün çekirdek partikülleri insan aşılarında taşıyıcı olarak kullanılabilirler. Partikül olarak kor yapısının kullanımı ile yüzey antijen partiküllerine oranla 100 kat daha fazla antikor yanıtı oluşturulabilir ve Th hücre fonksiyonu güçlendirilir [Howard and Zuckerman, 1990; Traavik, 1999].

2.6.6. PreS Aşılar

İmmünojenik aşı elde etmek için diğer bir yöntem HBsAg'ni diğer HBV spesifik proteinlerle birleştirmektir. Bu amaçla kullanılan protein dizileri preS, kor protein dizileri veya S varyantlarıdır. Şempanzelerde yapılan denemelerde preS1, preS2 ve S dizilerin antikorü nötrale etmek için hedef bölgeler olarak rol oynadığı gösterilmiştir. preS2 dizisinin farelerde oldukça immünojenik olduğu, geleneksel HBsAg aşısına yanıt oluşturmamayan suşlarda anti-HBsAg yanıtını indüklediği bulunmuştur [Prange and Werr, 1999]. Bu durum preS2 dizisinde güçlü bir T hücre epitopunun varlığı ile açıklanabilir. Bu incelemeler preS2 içeren yeni aşıların geliştirilmesine ya da preS2 ve preS1 epitoplarının insanlarda kullanımına temel teşkil etmektedir [Jilg, 1998; Thermet et al., 2003].

2.6.7. Tek Dozluk HBV Aşıları

Bu aşılar kontrollü salınım mikropartikül tekniği kullanılarak geliştirilmektedir. Bu yöntemde tek bir enjeksiyon ile güçlü ve uzun süreli bağışıklık oluşturan inaktif aşı kullanılır. Aşı nonreaktif ve biyolojik olarak parçalanabilir bir polimer olan polylactid polyglycosid (PLG) içerisinde immobilize edilir [Zhou et al., 2003]. Bu mikrokapsüllerde aşının farklı zaman ve miktarlarda salınımı gerçekleşir. Hayvanlar üzerindeki denemelerde, HBsAg içeren tek bir mikropartikül doz, farklı zamanlarda üç doz halinde uygulanan geleneksel Hepatit B aşılması sonucu gözlenen immün yanıtı benzer bir yanıt oluşturmıştır [Jilg, 1998; Moynihan et al., 2001].

Modern aşılar koruyucu immünite oluşturarak çeşitli enfeksiyöz ajanların oldukça etkili bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlarlar. Geleneksel aşıların getirdiği dezavantajlar gözönünde bulundurulduğunda ise çeşitli modern aşı alternatiflerinden birisi olarak anti-idiotip antikorların aşı olarak kullanılması düşünülmüştür [Eichmann et al., 1987].

2.7. Anti-idiotip Antikorlar

Antikor molekülünde antijene spesifik olarak bağlanan, antikoru değişken bölgesinde bulunan özel amino asit dizilerine idiyotip (Id) denir ve bu idiyotipler orjinal antijene benzeyen antikor üretimini uyarır. İdiyotip bölgeye karşı gelişen bu antikora anti-idiyotip (anti-id) antikor denir [Williams et al.,1990; Cruse and Lewis, 2003]. Anti-idiyotip antikor, orjinal antijenin antikora bağlanma dizisini taklit eder ve antikor oluşumunu indükler [Mitra-Kaushik et al., 2001; Lesinski and Westerink, 2001].

İdiyotipler, antikor molekülünün değişken bölgesinde bulunan idiyotop topluluğundan oluşurlar. Bazı durumlarda anti-idiyotip serumlar, antikoru kendi antijeni ile bağlanmasını engeller. Bu durumda idiyotipik determinantın kendi bağlanma bölgesinde ya da yakınında olduğu düşünülür. Antikoru antijene bağlanmasını engellemeyen anti-idiyotip serumlar, muhtemelen bağlanma bölgesinin dışındaki çerçeve bölgesinin çeşitli determinantlarına karşı üretilmiştir [Georgatos, 1993]. İdiyotipin bağlanma bölgesine komplementer olan bir bağlanma bölgesi içeren anti-idiyotip antikor epitopa benzerdir. Bu nedenle anti-idiyotip herhangi bir epitopun kopyasını temsil edebilir. Birbiriyle çok yakın amino asit yapı benzerliğine sahip antikor molekülleri aynı idiyotiplere sahiptirler ve bu yüzden çapraz reaksiyon gösterebilirler. İdiyotipler antikor ve T-lenfosit reseptörleri tarafından eksprese edilirler [Benjamini et al., 2000].

İmmünizasyon sonrası aynı antijen üzerinde bulunan farklı epitoplara karşı yönelen farklı spesifiklikteki antikorların, çoğunlukla ortak ya da çapraz reaksiyon gösteren bir idiyotip oluşturduğu tespit edilmiştir. İdiyotipe spesifik T hücrelerinden biri doğal reseptör idiyotipini ve diğeri de işlenmiş idiyotipleri tanır. B hücreleri antijene ve idiyotipe spesifik Th hücrelerinin sayısını artırır [Finberg and Ertl, 1987]. Belirli bir antikor için spesifik hafıza B hücreleri üzerindeki Id'ye karşı oluşan Th hücrelerinin varlığı ikinci bir yanıtı artırırken, idiyotiplerde immün yanıtın artmasına izin verir ve hafıza hücrelerinin devamlılığını sağlar [Mitra-Kaushik et al., 2001].

Antikoru primer yapısı, serolojisi ve fonksiyonu üzerine yapılan çalışmalar sonucunda idiyotiplerin antikor moleküllerinin CDR bölgeleri ile ilişkili oldukları gösterilmiştir [Billetta et al., 1991; Goldbaum et al., 1997]. CDR bölgelerinin çok çeşitlilik göstermesi nedeniyle, idiyotiplerde aynı derecede çeşitlilik gösterirler ve otoantijen oluştururlar. İdiyotip ekspresyonu antikoru ağır ya da hafif zincirlerinin değişken bölgeleri (V_H ve V_L) ile ilişkilidir. Haptenler, anti-idiyotip antikorların idiyotip bölgelerine bağlanmalarını inhibe edebilirler. Bu yüzden V_H ve V_L 'lerin bir ya da daha fazla CDR bölgeleri ile ilişkili oldukları sonucuna varılmıştır [Bentley et al., 1990; Poljak, 1994]. İdiyotiplere özgü T lenfositlerinin varlığı, spesifik idiyotipleri ile reaksiyona giren T hücrelerinin antikor regülasyonunda rol oynayabileceği olasılığını göstermektedir [McCullough and Langley, 1985].

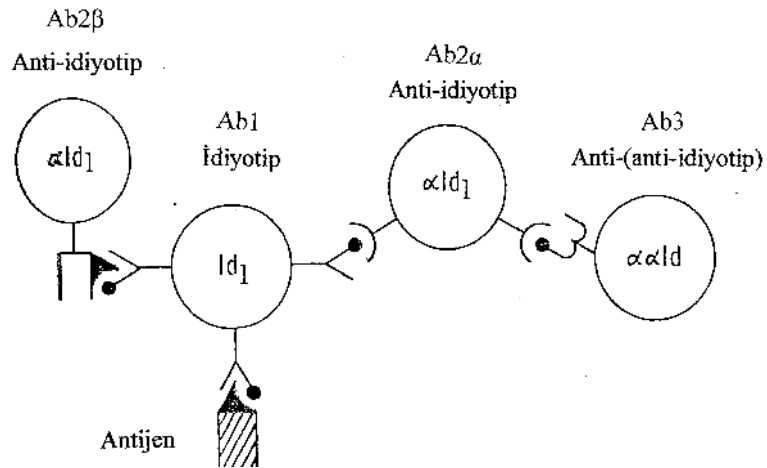
2.7.1. Network Teorisi

İmmün düzenleme için alternatif bir görüştür. Lindenmann (1973) ve Jerne (1974) tarafından bağışıklık sisteminin antikor ve lenfosit hücreleri arasında bir "etkileşim ağı" olduğu öne sürülmüştür [Lindenmann, 1973; Jerne, 1974]. İmmün yanıtı baskılayan ya da artıran idiyotip anti-idiyotip reaksiyon seri etkileşimleri ile bir antijene karşı düzenli olarak immün yanıt oluşturulmakta ve kontrol edilmektedir [Skaletsky, 1997]. İmmün sistemin bir network tarafından kontrol edildiğinin savunulduğu bu teori Jerne'e Nobel ödülü kazandırmıştır. Teori daha sonraları kanıtlanmış ve çeşitli araştırmacılar tarafından da doğrulanmıştır [Benjamini et al., 2000].

T ve B hücreleri arasında idiyotip anti-idiyotip tanımlamasına bağlı olarak büyük bir bağlantı ya da ağ serisi meydana getirilir ve bu ağa dışarıdan etki eden antijene karşı oluşan yanıt idiyotipik etkileşimler ile sağlanır. Oluşturulan idiyotip bağlantıların ilk olarak otoantijenler ile ilişkili olduğuna dair kanıtlar vardır [Eichmann et al., 1987]. Irun Cohen vücuttaki önemli organlarda bulunan, belirli dominant otoantijenleri tanıyan B ve T hücrelerinde oluşan regülatör bağlantı ile immün sistemde vücudun fonksiyonel yapısının kodlandığı fikrini ortaya atmıştır [Cohen, 1991].

2.7.2. Anti-idiotip Antikor Tipleri

Belirli bir antijen ile immünizasyon sonucu bu antijene karşı Ab1 olarak isimlendirilen antikorların üretimi gerçekleşir. Ab1'e karşı Ab2 olarak tanımlanan bir seri anti-idiotip antikor üretilebilir [Pillet et al., 2002]. Ab2 moleküllerinin bazıları antijenin üç boyutlu yapısını taklit edebilir. Ab1'in paratopuna uygunluk gösteren Ab2 β olarak adlandırılan anti-idiotipler antijen tarafından oluşturulan immün yanıtı benzer spesifik immün yanıtı indükleyebilirler. Ab2 β antijen gibi davrandığı için farelere ya da diğer türlere enjekte edildiğinde anti-anti-idiotip antikorları denilen poliklonal anti-idiotip antikor (Ab3)'ler oluşur [McCullough and Langley, 1985; Poskitt et al., 1991]. Ab3'ün bir alttipi Ab1'e benzer bir bağlanma bölgesine (paratopa) sahiptir. Ab1'in diğer idiyotoplarından farklılığını belirtmek amacıyla Ab1ⁱ olarak isimlendirilir ve tek başına hedef antijene bağlanabilir [Pan et al., 1995; Tripathi et al., 1998] (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Anti-idiotip antikorlar [Roitt and Delves, 2001].

Anti-idiotip antikor geliştiği idiyotopun antikordaki bulunduğu yere göre isimlendirilir. Anti-idiotip yapının ab2 α , ab2 β , ab2 γ ve ab2 ϵ olmak üzere 4 alt tipi bulunur [Huang et al., 1988; Poskitt et al., 1991].

- **Ab2 α anti-idiotip antikor;** idiyotip bölgesine antijen ya da haptten bağlanmasını engellemiyorsa idiyotipin çerçeve bölgesindeki idiyotopa karşı gelişir. Ab2 α antijen bağlama bölgesinin dışında yer alan idiyotopları tanır ve muhtemelen regülatör idiyotiptir [Tripathi et al., 1998]. Ab2 α anti-idiotipler fonksiyonel olarak orjinal antijeni taklit etmez ve genel olarak geniş çeşitlilik gösteren lenfositleri uyarma kapasitesindedirler. Bu anti-idiotipler genç bireylerde oldukça zayıf immünojenite oluşturan karbohidrat içerikli potansiyel aşılardan yerine kullanılır [Huang et al., 1988].
- **Ab2 β anti-idiotip antikor;** idiyotip bölgesine antijen ya da haptten bağlanmasını engellediğinde idiyotipin antijenle direkt ilişkili idiyotopuna karşı gelişir [Ban et al., 1994]. Ab2 β bakteriyel, viral ve parazitik enfeksiyonlara karşı hayvan modellerinde spesifik ve koruyucu bağışıklık sağlamada kullanılmaktadır [Pan et al., 1995]. Tümör ilişkili antijenlerin yerine kullanılabilen Ab2 β anti-idiotip antikorlar aşı uygulamaları için de uygun yaklaşımlardır [Poskitt et al., 1991].
- **Ab2 γ anti-idiotip antikor;** Ab1'e antijen bağlanmasını inhibe eder [Ban et al., 1994]. 1984 yılında Bona ve Kohler'in tanımladığı bu anti-idiotip antikorun antijen ya da haptten bağlanmasını engellemesinin nedeninin antijenle doğrudan ilişkili olan idiyotip bölgesinin üç boyutlu yapısını değiştirmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir [Huang et al., 1988; Pan et al., 1995].
- **Ab2 ϵ anti-idiotip antikor;** Bu tip antikorlar antijen üzerindeki epitop ve Ab1 üzerindeki idiyotipleri tanırlar [Finberg and Ertl, 1987]. Bu anti-idiotipler öncelikle rometoid faktörleri içeren otoimmün hastalıklarla ilişkilidir [Dalglish and Kennedy, 1988].

2.8. Anti-idiotip Aşılar

Anti-idiotip antikorların immünojen olarak deney hayvanları üzerinde çeşitli uygulama örnekleri bulunmaktadır. Bu tür immünojenler, antijene bağlanma yeteneğindeki antikorları aktive ederler. Anti-idiotipler epitop spesifik aşılardan olarak kullanılabılırler [Delves et al., 1997]. Bir antijenin spesifik bir epitopu ile indüklenen antikor, yapısal olarak epitopa uygun bir bölgeye sahiptir. Eğer antikor diğer bir antikoru üretmek için immünojen olarak kullanılırsa bu anti-idiotip antikor, idiyotipin antijenle birleşen kısmıyla reaksiyona girer ve yapısal olarak epitopu taklit eder [Thanavala, 1996; Benjamini et al., 2000].

Anti-idiotip antikor (Ab2) teknolojisi kullanılacaksa, aşılamanın Ab2'nin taklit edilebileceği ve özellikle koruyucu nitelikte olan epitopa yönelik olmasına dikkat edilmelidir. Ab2 immünojenik özellikteki proteinlerle birleştirildiğinde ya da bir adjuvanla birlikte verildiğinde immün baskılama oluşturmaz [Maruyama et al., 2002]. Etkili bir anti-idiotip aşı geliştirebilmek için koruyucu bağışıklığı artıran bir enfeksiyöz ajanın epitopları tanımlanmalı ve antikorların bu ajana karşı pasif bağışıklık gösterdiği tespit edilmelidir. Bu koruyucu antikorların immünojen olarak kullanılması amacıyla hazırlanan anti-idiotip antikorlar aşı olarak kullanılabilirler [Lesinski and Westerink, 2001].

Anti-idiotip aşılar; Rabies, Coronavirus, Cytomegalovirus (Herpes virüs), hepatit B gibi virüslere, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* ve *Streptococcus pneumoniae* gibi bakterilere ve *Schistosoma mansoni* enfeksiyonlarına neden olan parazitlere karşı koruyucu bağışıklığı artırmada etkili olmuşlardır [Magliani et al., 2003].

2.8.1. Bakteriyel Anti-idiotip Antikor Aşılar

Anti-idiotip antikor aşıları, patojenik bakteri hücre duvarlarının polisakkarit yapılarına karşı immün yanıt oluşturmamayan yenidoğanlarda başarı ile kullanılabilir. *H. influenza*, *N. meningitidis*, *D. pneumoniae*, *E. coli* vs. bakterilere karşı hazırlanan klasik aşılar yenidoğanlarda etkisiz durumdadır. Anti-idiotip antikorlar belirli bakteri proteinlerinin karbonhidrat epitoplarını taklit ederek antikor yanıtı oluşturur [Arda, 1994; Delves et al., 1997]. Anti-idiotip aşılarda *P. aeruginosa* veya *N. gonorrhoeae* karşı anti-lipopolisakkarit antikor yanıtını koruduğu ve epitopu taklit ettiği bildirilmiştir. *Neisseria meningitidis* C serotipinin kapsüler polisakkaritine karşı oluşan monoklonal anti-idiotip antikorlar, sinejenik (benzer genotipe sahip) ve xenogenik (farklı genotiplere sahip)'lerdeki meningococcal C polisakkaritine spesifik antikorları uyarmıştır [Moe et al., 1999]. Normal aşılarında böyle bir etki gözlenmemektedir. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalar bu anti-idiotip aşının etkin olabileceğini göstermiştir [Thanavala, 1989; Lesinski and Westerink, 2001].

2.8.2. Viral Anti-idiotip Antikor Aşılar

Enfekte insan plazmasından elde edilen Hepatit B virüsüne karşı oluşturulan idiyotip antikorların tavşanlara verilmesiyle elde edilen anti-idiyotip antikorlar (Ab2) şempanzelere enjekte edildiğinde hayvanlarda koruyucu etki yarattığı gözlenmiştir [Thanavala, 1989; Shoenfeld et al., 1994]. Hepatit B'den başka, TMV (tütün mozaik virüsü), VEE (Venezuelan equine encephalitis), Polio (tip II), Cytomegalo, Rabies, Influenza, Cocksackie, Herpes simplex, Reo (tip 3) ve Sendai virüslerine karşı çeşitli deney hayvanlarında anti-idiyotip antikorlar elde edilmiş ve bunların etkinlikleri incelenmiştir [Finberg and Ertl, 1987; Arda, 1994].

Greene ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada reovirüs anti-idiyotip antikorlar aşı olarak kullanılmıştır. Anti-idiyotipin, reovirüsü nötralize eden immün yanıt oluşumunu, virüsa özgü sitolitik T hücrelerini ve gecikmiş tip hipersensitiviteyi indüklediği bildirilmiştir [Sharpe et al., 1984]. Anti-idiyotip antikorlar reovirüs reseptörünün karakterizasyonunda ve izolasyonunda başarıyla kullanılmışlardır [Eichmann et al., 1987].

Sendai virüse spesifik yardımcı T hücre klonlarına karşı oluşan monoklonal antikor hem B hem de T hücre immünitesinin oluşumunda etkili olmuştur. Bu nedenle farelerin anti-idiyotip antikor ile immünizasyonu sonucunda Sendai virüs ile enfeksiyona karşı koruma sağlanmış ve sitolitik T hücreleri de indüklenmiştir [Thanavala, 1989].

2.8.3. Paraziter Anti-idiyotip Antikor Aşılar

Enfeksiyon ajanına karşı aşı üretiminde anti-idiyotip antikorlar ilk olarak *Trypanosoma rhodensiense*'ye karşı başarılı bir şekilde kullanılmıştır [Koprowski et al., 1984; Thanavala, 1989]. Ayrıca *Schistosoma mansoni*, *Trypanosoma cruzi* ve *Eimeriina*'lara karşı farelerde anti-idiyotip antikorlar elde edilmiş ve etkinlikleri incelenmiştir [Finberg and Ertl, 1987; Shoenfeld et al., 1994].

Schistosoma mansoni ile immünize olmuş farelerde ve aktif Schistosomiasis hastalığının görüldüğü hastalarda parazit yumurtalarına karşı antikor yanıtı oluşturan anti-idiotip T hücreleri görülmüştür. Benzer bir şekilde *Trypanosoma cruzi*'nin sebep olduğu Chagas hastalığının görüldüğü hastalarda anti-idiotip T hücre yanıtı görülmüştür [Eichmann et al., 1987; Thanavala, 1989].

2.9. Anti-idiotip Antikor Aşıların Avantaj ve Dezavantajları

a. Avantajlar

- Günümüzde kullanılan geleneksel aşılar enfeksiyon ajanlarının öldürülmüş, zayıflatılmış veya saflaştırılmış formları kullanılmaktadır. Bir diğer teknik olan rekombinant DNA teknolojisi ile aşı üretiminde kullanılan antijenin saflaştırılması ise oldukça güçtür [Bhattacharya-Chatterjee et al., 2000].
- Malarya, trypanosomiasis, lepra ve leishmaniasis gibi hastalıklara karşı aşı geliştirmede kullanılan antijenlerin üretimi ve Hepatit B gibi diğer hastalıklarda etken mikroorganizmayı *in vitro* koşullarda kültüre etmek de mümkün değildir [Eichmann et al., 1987; Thanavala, 1989].
- Hibridoma teknolojisi ile anti-idiotip antikorlar hücre kültürü ve asit sıvılarında geniş ölçekte üretilip kolaylıkla saflaştırılabilir [Bendandi, 2000]. Anti-idiotip aşıların üretimi için yüksek miktarda saf antijene ihtiyaç duyulmaz. Anti-idiotip aşılar geleneksel aşılarla oranla daha güvenlidir ve ekonomik açıdan avantajlara sahiptir [Bhattacharya-Chatterjee et al., 2000].
- Saf olarak geniş ölçekte üretimi zor ve pahalı olan bir antijen rekombinant yöntemlerle ya da sentetik olarak üretilmesi aşamasında protein katlanması ve glikolizasyon geçirebilir. Bu tür antijenlerin yerine anti-idiotip antikor kullanılması alternatif bir yaklaşım oluşturur. Birçok bakteri ve protozoanın antijenik komponentleri karbonhidrat bakımından zengindir ve bunlar rekombinant DNA tekniği ile veya sentetik olarak sentezlenemezler. Anti-idiotip antikorlar ise rekombinant DNA teknolojisi ile oluşturulamayan polisakkarit, glikolipid ve karbonhidrat grubu taşıyan antijen epitoplarının konformasyonunu ve yapısını taklit edebilirler [Shoenfeld et al., 1994; Bhattacharya-Chatterjee et al., 2000].

- Anti-idiotip aşıları protein yapıda olduklarından T hücre bağımlı antijenleri oluşturmak için etkili immünojenik taşıyıcılarla birleştirilebilirler. Elde edilen antijenin dizi bilgisi kullanılarak tamamen sentetik anti-idiotip aşılar üretilebilir. T hücre bağımsız immünitinin T hücre bağımlı immüniteye dönüşümü ile bebeklerde ve immün yetmezliğin görüldüğü hastalarda polisakkaritlere karşı immün yanıtın artırılması sağlanır [Shoenfeld et al., 1994; Bhattacharya-Chatterjee et al., 2000].
- Anti-idiotip aşılar antijeni ya da onun komponentlerini taşımadıklarından geleneksel antijen aşılarına oranla avantajlara sahiptir. Zayıflatılmış patojenlerin aşısı olarak kullanılması sırasında etkenin tekrar virulans forma dönüşme riski bulunmaktadır. Virulans riskinin yüksek olduğu durumlarda zayıflatılmış aşıların kullanılmasıyla da kalıtsal sorunlar oluşabilir. Anti-idiotip aşıların virulans ya da enfeksiyon riski bulunmamaktadır. Anti-idiotip aşılar antijen içermediğinden bu konuda istenmeyen yan etkiler oluşturmaz ve hastalık etkeni taşımadıklarından koruma sağlarlar [Shoenfeld et al., 1994; Bhattacharya-Chatterjee et al., 2000].
- Anti-idiotip antikorların immünoterapide kullanımı ilk olarak B hücre lösemi ve lenfomalarına yönelik olmuştur. Bu kanser tipleri transforme olmuş tek bir klonndan orjinlenir. Herbir tümör hücresi belirli bir idiyotipi eksprese eden bir immünglobulin molekülü meydana getirir [Kwak et al., 1992; Dillman, 2001].
- Anti-idiotip antikorların aşısı olarak kanser tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılabileceğine ilişkin çalışmalar son yıllarda giderek artmaktadır [Bhattacharya-Chatterjee et al., 2002]. Anti-idiotip aşılar insan kolorektal karsinoma, göğüs kanseri, melanoma gibi çeşitli insan kanser tedavilerinde önemli rol oynayarak hastaların yaşam kalitelerini geliştirebilir [Foon et al., 2000; Lutzky et al., 2002].
- Anti-idiotip antikorlar aynı zamanda toksinlere karşı bağışık yanıt sağlamada önemli rol oynar. Belirli biyolojik toksinlerin antijen olarak kullanılmasında bu antikorlar toksik etkiyi elimine etmek için kullanılırlar [Thanavala, 1989; Benjamini et al., 2000]. Anti-idiotip antikorlar tümör spesifik antijenlere bağlandığında, konakçının immün sistemi bağlanan bu hücreleri yok eder. Ayrıca malignant hücreleri kimyasal anlamda etkisiz hale getirmek amacıyla toksik maddeleri anti-idiotiplere bağlamak mümkündür [Eichmann et al., 1987; Shoenfeld et al., 1994].

b. Dezavantajlar

- Antijen ya da organizmanın vücut komponentleri otoantikor yanıtın oluşmasını indükleyebilir [Thanavala, 1989]. Anti-idiotip aşıları hedeflendirilmiş antijen immünitesi oluşturmak için etkili yöntemlerdir. Anti-idiotip aşılarla immünizasyon, otoimmün hastalıklarda otoantikor ekspresyonunu değiştirebilir. İlgili antijen epitopu normal dokular üzerinde oluşmadığında anti-idiotipler otoimmüniteyi indükler. Belirli deney modellerinde anti-idiotip ve idiyotip kullanımı aynı zamanda otoimmün benzeri hastalıkların indüklenmesini artırıcı olabilir [Eichmann et al., 1987; Shoenfeld et al., 1994].
- Bir anti-idiotip antikor antijene karşı spesifik olarak antikor yanıtı oluşturur. Birçok anti-idiotip antikor bir antijenin meydana getirdiği yanıtı eşit bir immün yanıt oluşturabilir fakat immün sistem üzerine uyarıcı veya baskılayıcı bir etkiye de bulunabilir [Shoenfeld et al., 1994].
- Çeşitli faktörler insan aşısı olarak anti-idiotip antikorların kullanımını kısıtlamaktadır. Anti-idiotiplerin çeşitli deney hayvanlarından hazırlanması bazı insanlarda ateş ve alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir [Shoenfeld et al., 1994; Dillman, 2001].
- Anti-idiotip aşılar epitopları zamanla değişime uğrayan influenza virüsü gibi organizmalara karşı etkili değildir [Thanavala, 1989].
- Anti-idiotip antikor tümör hücrelerinin, virüs, bakteri ve parazitlerin karbonhidrat epitoplarına yönelik aşı geliştirilmesinde yararlı olabilir [Bhattacharya-Chatterjee et al., 2001]. Ancak anti-idiotip antikor üretimi ve moleküler modellemesi uzun süren bir işlemdir ve bu nedenle kullanımında bazı kısıtlamalar bulunmaktadır [Maruyama et al., 2000; Lesinski and Westerink, 2001].

2.10. Anti-idiotip Antikor Üretimi

Anti-idiotip antikorlar biyoteknolojik yöntemlerden biri olan hibridoma teknolojisiyle elde edilmektedir. Herhangi bir antijenle bağışıklanan deney hayvanında geliştirilen monoklonal antikor, bir başka deney hayvanına enjekte edildiğinde oluşan serumda anti-idiotip antikorlar bulunur. Hibridoma teknolojisiyle anti-idiotip antikor üreten B lenfositleri ölümsüzleştirilir [Skaletsky, 1997; Bhattacharya-Chatterjee et al., 2000].

2.11. Hibridoma Teknolojisi ve Monoklonal Antikorlar

Monoklonal antikorlar (MAb) tek bir B hücre klonal soyu tarafından üretilirler. Her bir memeli B hücresi, antijenin bir epitopuna özgü antikor üretme yeteneğine sahiptir. Tek bir B hücresi yüzlerce antikor üretebildiği halde, bunların tümü epitop bağlama bölgeleri bakımından birbirine benzer yapıda olacaktır [Steward, 2001].

Günümüzde virüs, bakteri, parazit, MHC antijenleri, hücre yüzey, tümör ve farklılaşma antijenleri, reseptörler ve hormonlar, enzimler ve izoenzimler, kompleks karbonhidratlar, nükleik asitler ve glikolipidler gibi antijenlere özgü monoklonal antikorlar üretilmiştir [Yelton and Scharff, 1981; Teillaud et al., 1983]. Ayrıca immünglobulinlerin sentezi, yapı ve fonksiyonunu incelemek, fonksiyonel hücre dizileri oluşturmak için somatik hücre hibridizasyon tekniği kullanılmıştır [Vora, 1985; Williams, 1988].

1960'ların başlarına kadar myeloma proteinlerinin yapıları bilim adamları tarafından açıklanamamıştır. Daha sonra Michael Potter tarafından monoklonal antikor üretimi gerçekleştirilmiş fakat birçok denemeye rağmen enjekte edilmiş bir antijene karşı antikor sentezleyebilen tümörleri indüklemek mümkün olamamıştır. Leo Sachs, Kenko Haribata, Edwin S. Lennox ve Melvin Cohn doku kültüründe bir fare myeloma hücre dizisi üretmeyi başarmışlar fakat daha sonra bu hücre dizisi korunamamıştır [Milstein, 1980].

1973'te Richard G. Cotton, Davis S. Secher ve Cesar Milstein ilk kez hücre dizisi tarafından salgılanan bir fare myeloma proteininin yapısal mutantlarını kültürde üretmişlerdir [Milstein, 1980].

1973'de Cotton ve Milstein bir fare ve rat hücresinden alınan iki myeloma hücresini birleştirmişlerdir. Yapılan hibrid hücre analizi ile parental hücreler tarafından sentezlenen değişik zincir kombinasyonlarını içeren hibrid moleküllerin salgılandığı gösterilmiştir. Bir hayvan Ig V bölgesi ile diğlerinin C bölgesinin oluşturduğu kombinasyonda ise hibrid moleküller salgılanamamıştır. Bu durum V ve C bölgelerini kodlayan genlerin aynı kromozom üzerinde yer alması anlamına gelir.

V ve C bölgelerini kodlayan DNA dizilerinin intronlarla ayrıldığı bilinmektedir. Tüm DNA kalıbı komplementer bir nükleer RNA ipliğine dönüştürülür. RNA'nın intron bölgesi çeşitli enzimlerle muamele edilerek kesip çıkartılır. V ve C bölgelerini kodlayan diziler biraraya getirilir. Bu işlemler immünglobulin zincir proteinini sentezleyecek mRNA'yı meydana getirmek için yapılır. Hibrid myeloma deneyi, V ve C dizilerinin tek bir RNA molekülünde bir araya gelerek birleştiklerini ve hibridlerin allelik olmadığını göstermiştir [Milstein, 1980; Kohler, 1985]. Bu bulgu, plazma hücresinin sürekli spesifik antikor salgılamasını sağlamak için bir myeloma hücresi ile normal bir lenfositin ya da plazma hücresinin birleştirilebileceği fikrini doğurmuştur [Kohler and Milstein, 1975].

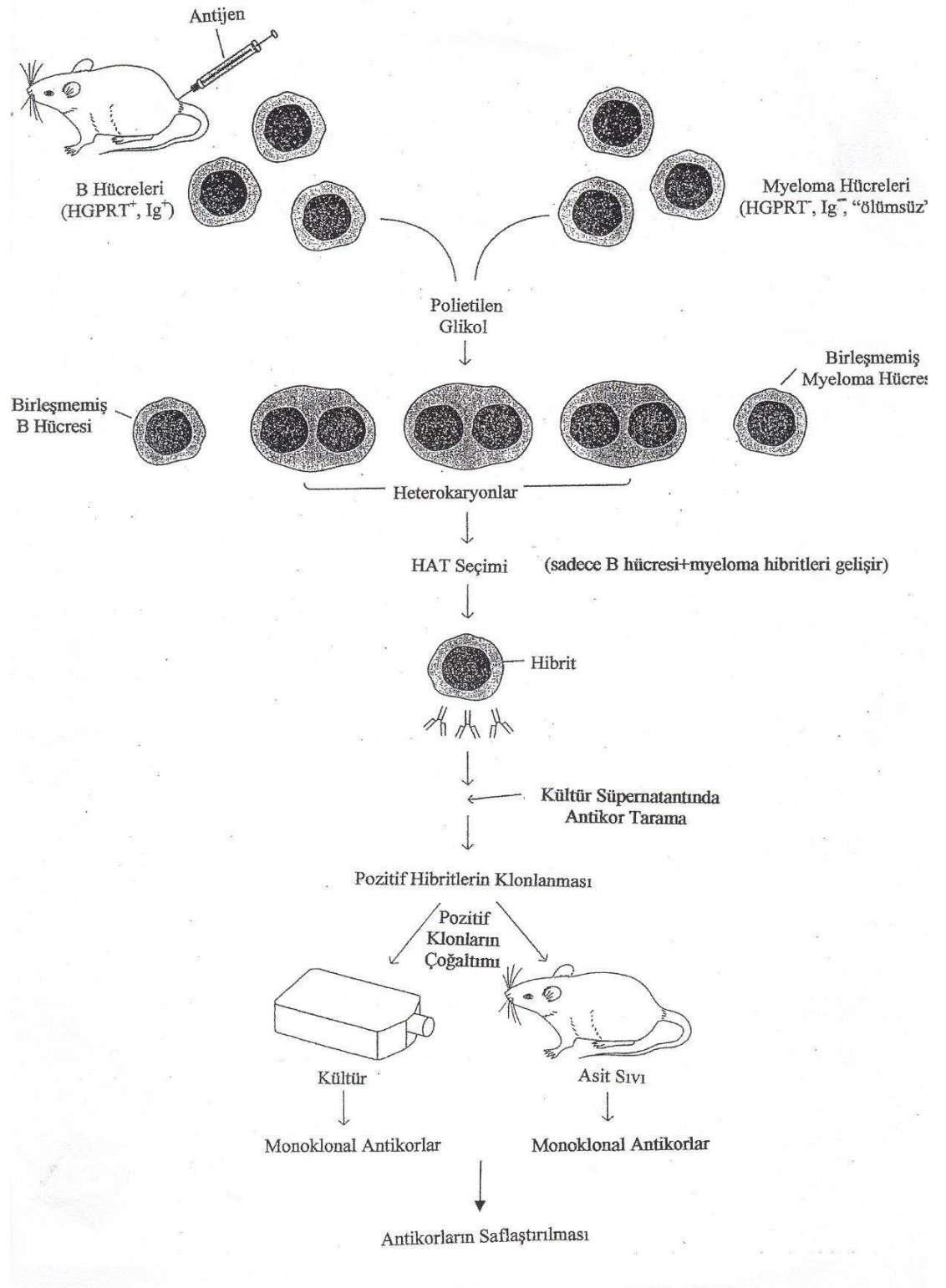
1975'te Cesar Milstein ve arkadaşları; ilk denemeler için immünojen olarak koyun kırmızı kan hücrelerini tercih etmişlerdir. Hücre füzyonunu sağlayan bir ajanın varlığında immünize farelerin dalak hücreleri ile fare myeloma hücreleri birleştirilmiştir. Füzyon hücreleri seçici bir besiyerinde üretilerek immünglobulin salgılamışlardır. Bunların bazıları kırmızı kan hücrelerine karşı antikor üretmişlerdir. Tek tip antikor üreten klonlar izole edilerek kültürde üretilmiştir. Oluşan hibrid-myeloma ya da hibridoma hücreleri spesifik antikor üretimini sağlamışlar ve myeloma hücrelerinin ölümsüz özelliğini göstermişlerdir [Kohler and Milstein, 1976]. Böylece ilk kez özgünlüğü önceden tespit edilen bir monoklonal antikor salgılayan füzyon hücresi sürekli olarak kültürlerde geliştirilebilmiştir. Daha sonra Jonathan C. Howard ve Geoffrey W. Butcher tarafından; fare doku uygunluk antijenlerine karşı bir dizi monoklonal antikorun üretildiği bir füzyon gerçekleştirilmiştir [Milstein, 1980].

Hibrid hücreler tek tek klonlanabilir ve her bir klon tek bir antijenik determinanta karşı çok miktarda benzer antikor üretirler. Her bir klon uzun süre saklanabilir, kültürde üretilabilir ya da çok miktarda monoklonal antikor üretimi için hayvanlara enjekte edilebilirler. Bu yöntemle üretilen yüksek özgünlükte monoklonal antikorlar birçok biyolojik araştırma ve klinik alanda çok yönlü olarak kullanılmaktadır [Milstein, 1980; Reichert, 2001].

İmmün yanıtın derecesi enjekte edilen antijenin immünijenitesi ile belirlenir. Farklı birçok B hücresi tarafından üretilen bu antikor toplulukları, türevlendikleri çeşitli B hücre klonları nedeniyle “poliklonal” olarak isimlendirilirler. Buna bağlı olarak poliklonal serum çok sayıda monoklonal antikor topluluğundan oluşur [Golub and Green, 1991; Kaufman, 1995]. B hücreleri bir hayvandan alınıp *in vitro*’da kültüre edildiklerinde, herhangi bir yolla transforme edilmemiş ya da ölümsüz hale getirilmemişlerse hızla ölürler. Poliklonal karışımdan izole edilmiş ve ölümsüzleştirilmiş tek bir B hücresi “monoklonal” olarak adlandırılır [Asai and Wilder, 1993; Steward, 2001] (Şekil 2.7).

Hibrid hücre klonunun salgıladığı tüm antikorlar genetik olarak tek bir hücreden türevlenir. Ancak bunlar immünolojik açıdan bir monoklonal antikor değildir, çünkü hibrid klonunun her bir hücresi myeloma hücresi ile dalak hücresinden gelen kromozomlara sahiptir ve her iki kromozom grubunu da eksprese eder. Bir hibrid hücresi monoklonal antikorun iki komponentini (ağır ve hafif zincir) üretmek yerine iki ağır zincir ile iki hafif zincir üretir. Dalak hücresinin ağır ve hafif zincir ile myeloma hücresinin gamma ve kappa zincirlerini salgıladığı için böyle bir hücre HLGK şeklinde ifade edilir. Bunlar kromozomların hızlı bir şekilde kaybedilmesi açısından özellikle çoğalmanın erken safhalarında yapı bakımından hibrid hücrelere benzer. Genellikle ilk olarak ağır zincirler (H ya da G) ve sonra hafif zincirlerden biri (L ya da K) kaybolur. Bu nedenle HLGK hibridi, sekresyon örneği olarak HLK ya da GLK şeklinde varyantlar oluşturur. Bunlarda sırasıyla HL, HK, LK, L ve K şeklinde varyantlar oluştururlar. Bu sorunu ortadan kaldırmak için daha sonraki yıllarda antikor üretmeyen myeloma hücreleri kullanılmıştır. Spesifik olarak immün dalak hücresinin sadece ağır zincir ile hafif zincirini eksprese eden HL istenen hücre klonudur [Milstein, 1980].

Belli bir hibridoma tarafından üretilen tüm monoklonal antikorlar benzerdir. Bu antikorlar aynı Ig sınıfı ve allotipinde, aynı değişken bölge yapısı ve idiyotipe sahip, belli bir epitopa karşı ise aynı özgünlüktedir [Golub and Green, 1991; Roitt and Delves, 2001].



Şekil 2.7. Monoklonal antikor üretimi

[[http://www.mcb.berkeley.edu/courses/mcb150/lect4/lect4 slides.pdf](http://www.mcb.berkeley.edu/courses/mcb150/lect4/lect4%20slides.pdf)].

2.12. Monoklonal Antikor Eldesinde Etkili Faktörler

2.12.1. İmmünizasyon

Antijenin deri altına ya da barsağı çevreleyen karın zarı (periton) boşluğuna enjekte edilmesiyle hayvanlar immünize edilirler. Hayvanın immün sistemi Freund'un komplete adjuvanının (FCA) enjekte edilmesiyle uyarılabilir. Ölü tüberküloz organizmalarını içeren bu karışım, immün sistemin enjekte edilmiş herhangi bir antijeni tanımasında etkilidir [Liddell and Cryer, 1991; Ward et al., 1999]. İlk immünizasyon subkutan olarak (deri altına) ya da intraperitoneal (karın içine) olarak gerçekleştirilir ve abdomendeki 2-4 farklı bölgeye eşit olarak dağıtılır. İkinci immünizasyon, FIA ile intraperitoneal olarak uygulanır. Son immünizasyon füzyondan 3-4 gün önce ilgili B hücrelerin maksimum uyarılmasını sağlamak amacıyla kuyruk damarından intravenöz olarak verilir. Bu yolla büyük bir hücre grubu aynı anda uyarılabilir [Delves, 1997; Steward, 2001].

2.12.2. Hücre Soyları

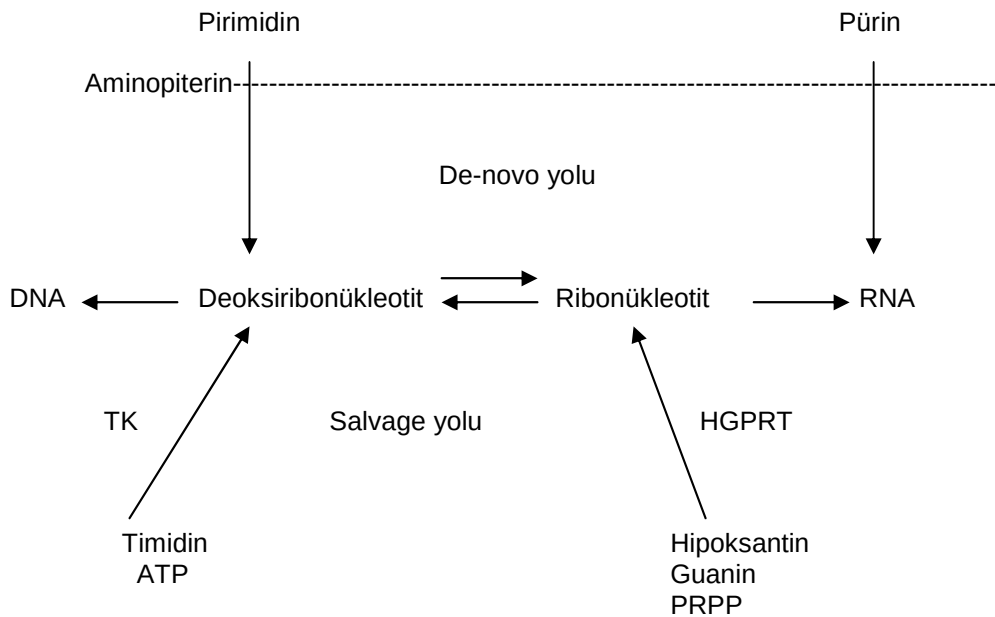
Hayvan seçimi füzyon için kullanılan mutant hücre soyları ile uygunluk gösteren hayvanlarla sınırlıdır. Birçok mutant hücre soyu BALB/c farenden türevlendiği için donör hayvanlar olarak daha çok fareler ve sıçanlar kullanılır [Liddell and Cryer, 1991].

Kullanılan tipik mutant hücre soyları SP2/0-Ag 14, P3-X63-Ag8.653, S194/5.XXO ve FO'dır. Bu myeloma hücre soylarının tümü BALB/c orijinlidir, immünglobulin salgılamaz ve yaygın olarak füzyon için kullanılırlar [Delves, 1997; Steward, 2001].

2.12.3. Hücre Seçimi

Hibridoma hücrelerinin kültür ortamında seçilmesi için myeloma hücrelerinin timidin kinaz ya da hipoksantin guanin fosforibozil transferaz (HGPRT) enzimi negatif olmalıdır. Fare myeloma hücre dizilerinden HGPRT negatif hücrelerin seçimi için HGPRT aracılığıyla DNA'ya bağlanma özelliğine sahip toksik baz analogları

olan 8-azoguanin ya da 6-tioguanin kullanılır. Füzyon işleminden sonra kültürde birçok hücre tipi bulunur, ancak hibridomalar ve myeloma hücreleri dışında bunların tümü ölür. Myeloma hücreleri hibridlerden daha fazla sayıda çoğalacağından hibridomaları spesifik olarak seçmek gereklidir [Asai and Wilder, 1993]. Bunun için en yaygın kullanılan yöntem HGPRT enzimi içermeyen mutant hücreleri kullanmak ve hipoksantin aminopterin timidin (HAT) ile desteklenmiş besiyerinde hücreleri çoğaltmaktır [Kaufman, 1995]. Aminopterin, nükleik asitlerin biyosentetik yolunu (de novo) yani pürin ve pirimidin sentezini bloke eder. HGPRT'ye sahip normal hücreler diğer bir yolu (salvage) kullanarak pürinleri yapmak için hipoksantini, pirimidinleri yapmak için de timidini kullanırlar [Abbott and Povey, 1995]. HGPRT negatif myeloma hücreleri HAT besiyerinde üretildiklerinde DNA sentezi yapamadıklarından yaşayamaz. Füzyon sonucu oluşan HGPRT pozitif hibridoma hücreleri ise yaşamını sürdürebilir [Morgan and Darling, 1993] (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. HAT kültür ortamında de-novo yolunun inhibe edilerek salvage yolunun devreye girişi [<http://www.stopford.man.ac.uk/ESRG/powerpoint/29>].

2.13. Monoklonal Antikor Uygulama Alanları

1. Monoklonal antikorlar; diyagnostik testlerde, doku tiplendirmede, spesifik yüzey markırları ile tek tip hücreyi diğerlerinden ayırmada [DePinho et al., 1986; Ward et al., 1999; Glennie and Johnson, 2000],
2. Enfeksiyon etkenlerinin (bakteri, virüs, mantar, protozoon, parazit, vs.) alt gruplarının belirlenmesinde, enfeksiyon etkenlerinde sonradan meydana gelen genetik değişimlerin (mutasyon) saptanmasında ve mutantların teşhisinde [Green, 1999; Glennie and Johnson, 2000],
3. Çeşitli antijenik determinantların belirlenmesinde, haritalarının ve analizlerinin yapılmasında, aşı üretiminde kullanılabilecek uygunlukta immünojenlerin seçilmesinde [Breedveld, 2000; Cao and Lam, 2003],
4. Kan hücrelerinin yüzey moleküllerinin ve kan gruplarının belirlenmesinde, vücut doku sıvılarında çeşitli kimyasal maddelerin belirlenmesinde [Breedveld, 2000; Siegel, 2002],
5. Benzer histolojik görünümde olan tümörlerin yüzey antijenik moleküllerinin belirlenmesinde, tümör tiplerinin ve alt tiplerinin tayininde, primer tümörlerle bunlara ait metastazların saptanmasında, antitümör spesifik antikorlara bağlantılı sitotoksik ajanlarla terapi ve kanser immünoterapisinde kullanılır [Breedveld, 2000; Glennie and Johnson, 2000; Dillman, 2001].

Monoklonal antikorların en önemli uygulama alanlarından birisi de membran biyolojisidir. Membran proteinleri hücrelerde az miktarda bulunurlar ve bu nedenle saflaştırmak oldukça güçtür. Genellikle kolayca belirlenebilen biyolojik aktiviteleri yoktur ya da analiz için membranlar çözündüğünde aktiviteleri bozulur. Bu problemleri ortadan kaldırmanın tek yolu immünolojik yöntemlerle hücre-yüzey moleküllerini tanımlamaktır. Bu yöntem aynı zamanda, doku farklılaşmasının farklı aşamalarında belirli hücre tiplerini tanımlayan yüzey antijenlerinin tanınmasında yarar sağlayan bir yaklaşımdır [Milstein, 1980; Golub and Green, 1991].

Monoklonal antikorların önemli uygulama alanlarından bir diğeri de immünoafinite kromatografisi ile enzimlerin saflaştırılmasıdır. Bu teknik diğer enzim saflaştırma yöntemlerinden daha etkin olabilir. Monoklonal antikorlar ile enzimlerin

amino asit kompozisyonu, dizilimi, hareketi, düzenleyici özelliklerinin ortaya çıkarılması, enzim etki mekanizması, enzim biyosentezi, çevrim parametreleri, enzim protein miktar tayini, hücresel düzeydeki lokalizasyonu ile ilgili çalışmalar yapılabilmektedir [Lennon and Lambert, 1980; Richman et al., 1980; Vora, 1985]. Somatik hücre genetiği ve enzimlerin moleküler genetiği alanlarında, monoklonal antikorlar spesifik problemlerin enzimleri tanımlarını sağlarlar. Monoklonal antikorların enzim genlerinin moleküler klonlanmasında oldukça etkili araçlar olduğu söylenebilir. Ayrıca monoklonal antikor karışımları, bir ekspresyon vektör kütüphanesinden alınan enzim spesifik cDNA klonlarının izolasyonu için de kullanılarak enzimlerin ve izoenzimlerin evlasyonel biyolojilerinin aydınlatılmasına yardımcı olabilirler [Vora, 1985; Green, 1999]. Klinik alanda monoklonal antikor uygulamaların en önemlisi, plasental alkaline phosphatase (PLAP), prostatic acid phosphatase (PAP) ve terminal deoksinükleotid transferaz gibi tümör ya da kanser markırları olarak kullanılabilen enzimlerin belirlenmesi ve miktar tayinlerinin yapılmasıdır [Vora, 1985].

Belirli bir organın dokularına ya da spesifik tümör antijenlerine karşı oluşan monoklonal antikorlar, ilacın etkisini yoğunlaştırmak için ilaç moleküllerine bağlanabilir. Alternatif olarak tümör hücrelerini yok edebilen antitümör antikorları da üretilebilmiştir [Milstein, 1980; Cao and Lam, 2003].

Monoklonal antikorlar, radioimmünoassay gibi yöntemler için kullanılan standart kitlerde poliklonal antikorların yerini alarak büyük ölçeklerde üretilebildiklerinden tanı kitlerinin yaygın olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Bu antikorlar organ nakillerinde, hormon reseptörleri ve nörotransmitterler ile ilgili çalışmalarda, embriyoloji ve farmakoloji gibi temel araştırmalarda kullanılmaktadır [Milstein, 1980; Cao and Lam, 2003].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Aletler

1. % 5 CO₂ , % 96 nem ve 37°C ortam koşulları sağlayan inkübatör (Cytoperm)
2. Laminar akımlı kabin (Heraeus)
3. Invert mikroskop ve ışık mikroskobu (Olympus)
4. Masaüstü santrifüj (Eppendorf)
5. Yüksek hızlı santrifüj (Sorvall RC5C Plus)
6. Sıcak su banyosu (37 °C) (Scientific Industries)
7. Buzdolabı (-20°C ve -70°C derin dondurucu)
8. Sıvı azot tankı (Union Carbide)
9. ELISA okuyucu (Bio-Tech)
10. Spektrofotometre (Bio-Rad)
11. Manyetik karıştırıcı (Cole Parmer)
12. Vorteks (Scientific Industries)
13. Güç kaynağı (Sigma-Techware)
14. Poliakrilamit jel elektroforezi (PAGE) aparatları (Bio-Rad)
15. Pipet tabancası (Flow Laboratories)
16. Sekiz kanallı pipet (Trefflab)
17. Mikropipet (0.5-1000 µl) (Trefflab)
18. Pleyt yıkayıcı (Nunc)
19. Steril tek kullanımlık polistren kapları (Nunc ve Tpp)
 - ELISA plakları (96 kuyulu)
 - Kültür kapları (25 cm² , 75 cm² , 150 cm²)
 - Santrifüj tüpleri (10 ml ve 50 ml)
 - Füzyon plakları (96 kuyulu)
 - Kostar (4-6-24 kuyulu)
20. Dondurma tüpleri (Tpp)
21. Petri kapları (Nunc)
22. Makas, pens, süzgeç (Sigma)
23. Otoklavlanabilir cam şişe (50-1000 cc) (Schott)

24. Thoma lamı (Sigma)
25. Enjektör (1-5 cc) (Ayset)
26. Hücre skrapeli (Tpp)
27. Cam baget (Sigma)
28. Cam pipet (1-25 cc) (Iso-Lab)
29. Diyaliz membranı (Sigma)
30. 0.2-0.45 µm filtre (Sartorius)
31. Cam kolon (Sigma)
32. Eppendorf tüp (0.5, 1.5, 2 ml)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

1. Anti-fare polivalen antikoru alkalen fosfataz (AP) konjugatı (Sigma)
2. Anti-fare IgG-AP konjugatı (Sigma)
3. Anti-fare IgM-AP konjugatı (Sigma)
4. Anti-keçi IgG-AP konjugatı (Sigma)
5. Freund's complete ve incomplete adjuvanları (Sigma)
6. Hepatit B aşısı (Gen Hevac B Pasteur ve Engerix)
7. HBsAg ad alt tipi (Fitzgerald)
8. Keçi anti-HBsAg poliklonal antikoru (Fitzgerald)
9. Anti-HBsAg tavşan antikoru
10. Normal keçi ve tavşan serumu
11. 8-Azoguanin (Sigma)
12. Bovine serum albumin (BSA) (Sigma)
13. Fetal calf serum (FCS) (Biochrom)
14. Fetal bovine serum (FBS) (Biochrom)
15. Gentamisin (Gibco)
16. Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Fluka)
17. Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (Gibco)
18. RPMI-1640 medium (Gibco)
19. Hypoxanthine aminopterin thymidine (HAT) (Gibco)
20. Hypoxanthine thymidine (HT) (Gibco)
21. Polyethylene glycol (PEG-4000) (Merck)
22. Para-nitro-phenyl-phosphate (PNPP) (Merck)

23. Süt tozu (Pınar)
24. Tween 20 (Merck)
25. Bradford reagent (Sigma)
26. (DE52) (Whatman)
27. Pepsin (Sigma)
28. Amonyum sülfat (Merck)
26. Sephacryl S-300-HR jel filtrasyon kolon materyali (Sigma)
29. Acrylamid (Sigma)
30. Amonium persulfat (APS) (Sigma)
31. N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine (TEMED) (Sigma)
32. Markır proteinler (Pharmacia)

3.1.3. Tamponlar

PBS (Fosfat) Tamponu: 10 mM KH_2PO_4 , 10mM K_2HPO_4 ile pH= 7.2 olacak şekilde hazırlandı. 0.15 M NaCl ilave edildi.

PBS-Tween 20 Tamponu: Fosfat tamponuna % 0.05 tween 20 eklendi.

Substrat Tamponu: 1 mM ZnCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0.1 M glisin, pH=10.4 (KOH ile) olacak şekilde hazırlandı. Kullanım anında 1 ml substrat tamponuna 1 mg PNPP ilave edilerek tampon karanlıkta saklandı.

PEG Çözeltisi: 2 gr PEG, 1 ml distile su, 1 ml PBS eklenerek otoklav ile steril edildi. Kullanım anına kadar 37 °C'de saklandı.

Borat Tamponu: 15 mM borik asit, 150 mM NaCl, NaOH ile pH 8.5'a ayarlandı.

Asetat Tamponu: 0.2 M sodyum asetat tamponu glasiyel asetik asit ile hazırlandı ve pH 4.5'a ayarlandı.

Örnek Uygulama Tamponu: 62.5 mM tris-HCl (pH 6.8), % 2 sodyum dodesil sülfat (SDS), % 20 gliserol, % 5 β -merkapto etanol, % 0.01 brom fenol mavisi

5X Yürütme Tamponu: 7.5 gr tris-baz, 15 gr glisin, 0.6 gr SDS + 1 L dH_2O

Yükleme Tamponu: % 20 gliserol, % 0.5 bromfenol mavisi, 60 mM tris-HCl (pH 6.8)

Boyama Tamponu: % 25 etil alkol, % 10 asetik asit, % 0.2 coomassie blue R-250

Boya Açıcı Tamponu: % 25 etil alkol, % 10 asetik asit

Gümüş Boyama: Fiksatif çözeltisi (% 50 metanol, % 12 asetik asit, % 37 formaldehit), % 50 etil alkol, 0.2 gr/L sodyum tiyosülfat, 0.2 gr/L gümüş nitrat, % 37 formaldehit, geliştirme tamponu (60 gr/L sodyum karbonat, % 37 formaldehit, 4 mg/L sodyum tiyosülfat), durdurma tamponu (% 50 metanol, % 12 asetik asit)

3.1.4. Besiyerleri

DMEM Besiyeri: 13.4 gr DMEM, 2 gr NaHCO₃, 5.96 gr Hepes, % 1 sodyum piruvat pH: 7.2 olacak şekilde hazırlandı. 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek sterilizasyon sağlandı. [% 80 DMEM (4.5 gr/lt glukoz, 25 mM Hepes içeren), % 20 FCS, gentamisin (50 µg/ml)]

RPMI-1640 Besiyeri: 10.3 gr RPMI 1640, 5.96 gr Hepes, 2 gr NaHCO₃ pH: 7.2 olacak şekilde hazırlandı. 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek sterilizasyon sağlandı. [%80 RPMI-1640 (22 mM Hepes içeren), % 20 FCS, gentamisin (50 µg/ml)]

HAT Besiyeri: Besiyerine % 2 HAT (50X) çözeltisi eklendi.

HT Besiyeri: Besiyerine % 2 HT (50X) çözeltisi eklendi

Dondurma Besiyeri: % 50 FCS, % 40 DMEM ya da RPMI-1640, % 10 DMSO olacak şekilde tam kullanım sırasında hazırlandı.

3.1.5. Hücreler

Hibridoma çalışmalarında farklı hücre soylarından yararlanılmıştır. Kullanılan bu hücre soyları çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Hibrit hücre üretimi için kullanılan hücreler

Hücre		Kaynak
Myeloma	FO	ATCC CRL 1646
Myeloma	P3-X63-Ag 8.653	ATCC CRL 158
Besleyici hücre	Periton sıvısındaki hücreler	BALB/c fare
Dalaktan elde edilen hücreler	Tüm lenfositler	BALB/c fare dalağı
Lenften elde edilen hücreler	Tüm lenfositler	BALB/c fare lenf düğümü

3.2. Yöntem

Yapılan çalışmada (TÜBİTAK-GMBAE Hibridoma Laboratuvarı'nda geliştirilen) (6A5) anti-HBsAg ile 6C9 ve 6H9 anti-idiotip HBsAg monoklonal antikoları benzer yöntemler kullanılarak hazırlandı. [Başalp, 2002]

3.2.1. Dondurulmuş Hibrit Hücrelerinin Açılması

Sıvı azot tankında (-196°C) dondurularak saklanan hibridoma hücreleri 37°C sıcaklıkta çözülüp PBS tamponu içine alınarak 1100 rpm devirde 10 dakika santrifüj edildi. Hücre pelleti serumlu RPMI-1640 ya da DMEM besiyeri ile çözülerek kültür kaplarına aktarıldı.

3.2.2. Hücre Pasajı

Hücrelerin bulunduğu kültür kabındaki normal besiyeri atılarak yerine 5-10 ml PBS koyuldu, cam pipet ya da zemindeki hücreleri kaldırmada kullanılan hücre skrapeli ile kabın zeminine yapışık hücreler kaldırıldı. PBS içinde süspanse edilen hücreler santrifüj tüpüne alınarak 1100 rpm'de santrifüjlendi. Üst faz atılarak dibe çöken hücreler serumlu besiyeri ile süspanse edildi. Hücre sayımından sonra

içerisinde 6-8 ml ve 15-20 ml besiyeri bulunan 25 cm²'lik ve 75 cm²'lik kültür kaplarına sırasıyla 2×10^6 - 3×10^6 ve 8×10^5 - 10^6 hücre aktarıldı.

3.2.3. 6A5 Monoklonal Antikörünün Serumsuz Besiyerinde Geniş Ölçekte Üretimi

Yüksek saflıkta monoklonal antikor elde etmek için hibrit hücre sırasıyla % 10, % 5 ve % 0 FCS içeren DMEM'li besiyerinde 2'şer gün döngüsel şekilde üretilip 1100 rpm'de santrifüjlendikten sonra üst sıvıları 4°C'de saklandı [Başalp et al., 2000].

3.2.4. 6A5 Monoklonal Antikor Miktar Tayini

Antikor miktar tayini için Bradford yöntemi kullanıldı. Standartlar 50 mg/ml konsantrasyonundaki BSA kullanılarak yapıldı. 100 µg/ml, 200 µg/ml, 400 µg/ml, 800 µg/ml, 1000 µg/ml konsantrasyonlarda BSA standartları hazırlandı. (Her ölçüm için protein aralığı 1-10 µg). 595 nm'de absorbans değerleri ölçüldükten sonra bu değerler grafikte gösterildi.

3.2.5. 6A5 Monoklonal Antikörünün S-300 Jel Filtrasyon Kolon Kromatografisi ile Saflaştırılması

Serumsuz ortamda geniş ölçekte üretilen 6A5 monoklonal antikoruna amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemi uygulandıktan sonra S-300 jel filtrasyon kromatografisiyle saflaştırıldı. 80 cm uzunluğunda 1.2 cm çapında cam kolon içine 100 ml sephacryl S-300-HR jel filtrasyon kolon materyali dolduruldu. Hazırlanan kolon 15 mM borat tamponu ile bir kolon hacmi kadar yıkandı. Kolon hacminin % 10'u kadar miktarda 6A5 monoklonal antikor üst sıvısı kolona yüklendi. Kolon sonrası kesimler, tüp başına 1 ml olacak şekilde toplandı. Elde edilen örneklerin protein miktarlarını belirlemek için spektrofotometrede OD₂₈₀'de ölçümler yapıldı. Antikor içeren kesimler ELISA ile test edilerek seçildi.

3.2.6. 6A5 Monoklonal Antikoru ve Keçi anti-HBsAg Poliklonal Antikoru ile Farelerin Başışıklanması

- Başışıklama için 8 adet 8 haftalık BALB/c türü fare kullanıldı. Farelerin birinci grubu için 10 µg, 2. grubu için 40 µg antijen (6A5 monoklonal antikoru) PBS içerisinde 1:1 oranında Freund's complete adjuvanı (FCA), 2. ve 3. başışıklamada ise Freund's incomplete adjuvanı (FIA) ile hazırlandı.
- Farklı bir çalışma için ise 4 adet 8 haftalık BALB/c türü fare kullanıldı. 25 µg antikor (keçi anti-HBsAg poliklonal antikoru) PBS içerisinde 1:1 oranında FCA, 2. ve 3. başışıklamada ise FIA ile hazırlandı.
- Üç hafta aralıklarla her bir fareye 200 µl/fare olacak şekilde intraperitoneal olarak antijen enjekte edildi.
- Serumdaki antikor yanıt takibi için haftalık aralıklarla farelerin kuyruk ucundan kan alındı ve ELISA testleri yapıldı.

3.2.7. ELISA Testi

- ELISA plakları PBS içinde 100 ng/ml keçide geliştirilen anti-HBsAg poliklonal antikoru, anti-HBsAg tavşan antikoru, BSA olacak şekilde kuyu başına 100 µl kaplandı. 4°C'de gece boyu inkübe edildi.
- Başışılmayan antikorlar PBS + % 0.5'lik tween-20 tamponu ile 3 kez yıkanarak uzaklaştırıldı.
- Kuyucuklar 150 µl % 1'lik süt tozu ile 1 saat 37°C'de bloke edildi.
- Plaklar 3 kez yıkandıktan sonra fare serumu PBS ile 1/200 seyreltilerek her bir kuyuya 100 µl eklendi ve 37°C'de 2 saat bekletildi.
- Üç kez yıkamadan sonra, alkalen fosfatazla konjuge olmuş 1/1000 dilüsyonda anti-fare polivalen antikoru eklendi.
- 37°C'de 1 saat inkübasyondan sonra plaklar 5 kez yıkandı ve 1 mg/ml PNPP substrat tampon içinde hazırlanan PNPP eklendi. 1 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta bırakıldı.
- Oluşan renk değişimi ELISA okuyucusu ile 60. dakikada 405 nm'de absorbans okunarak antikor düzeyi belirlendi [Coligan et al., 1991].

3.2.8. Füzyon ve Hazırlıkları

3.2.8.1. Besleyici Hücrelerin Hazırlanması

Besleyici hücreler (periton içi hücreleri) füzyondan bir gün önce hazırlandı. Başışıkılanmamış bir fare dislokasyon yöntemi ile öldürüldükten sonra % 70’lik alkol içerisinde dezenfekte edildi. Sırt üstü yatırılan farenin, laminar akımlı kabin içerisinde steril makas ve pens yardımıyla karın bölgesi yanlara doğru açıldı. Bir elle kuyruk tutulurken üst deri pens yardımıyla boyuna doğru çekilerek periton açığa çıkarıldı. Yağsız bir bölgeden organlara değmeden periton içerisine 5 ml (serumsuz) DMEM ya da RPMI-1640 enjekte edildi, verilen sıvı enjektöre geri çekildi. Böylece periton iç yüzeyindeki besleyici hücreler alınmış oldu. Enjektör içerisindeki hücreler, içinde % 20 FBS’li RPMI-1640 ya da DMEM besiyeri bulunan steril bir şişeye alındı ve hücre sayımı yapıldı. Çalışılacak hücre kültür plağı sayısına göre her kuyuya ~6000 hücre düşecek şekilde ve kuyu başına 100 µl hacimde besiyeri eklenerek dağıtıldı.

3.2.8.2. Myeloma Hücrelerinin Hazırlanması

Füzyondan 10 gün önce, FO ya da P₃ myeloma hücreleri % 5 FBS içeren RPMI-1640 ya da DMEM besiyeri içinde hücre kültür kaplarında çoğaltmaya alındı. Myeloma hücrelerinin çoğaltılması işlemlerinin başlangıcında besiyerine Azoguanin (20 µg/ml) eklenerek HGPRT⁽⁺⁾ hücrelerin seçimi sağlandı. Füzyon günü kültür kaplarının içindeki kullanılmış besiyeri steril bir beher içine döküldü ve hücreler pasajlanarak 50 ml’lik santrifüj tüpü içerisine alındı. Hücreler, PBS tamponunda 1100 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek 2 kez yıkandı. Çöken hücreler 45 ml PBS içerisine alınarak hücre sayımı yapıldı ve son yıkamadan sonra 10 ml PBS içine alındı.

3.2.8.3. Başışıkılanmış Fareden Dalak Hücrelerinin Elde Edilmesi

6A5 monoklonal antikoru ve keçi anti-HBsAg poliklonal antikoru ile başışıkılanan fareler arasında en yüksek antikor yanıtı veren fare ELISA ile belirlendi. Füzyondan 4 gün önce son hatırlatma amacı ile antijen adjuvan kullanılmadan, başışıkılamada kullanılan dozun yarısı oranında fareye (intraperitoneal,

intravenöz ve el-ayak avuç içlerine) sistemik olarak enjekte edildi. Hatırlatma yapılan fare dislokasyon yöntemi ile öldürüldü ve % 70'lik alkol içerisinde dezenfekte edildi. Laminar akımlı kabin içerisinde bağışıklanmış fare yan yatırılarak sol kaburga hizasından açıldı. Periton kesilerek kaburganın altındaki dalak yağ dokusundan arındırılmış bir şekilde içinde 5 ml PBS tamponu bulunan petri kabına alındı. Burada yabancı dokulardan temizlendikten sonra içinde 10 ml PBS tamponu içeren diğer bir petri kabında bir süzgeç içerisinde cam baget ile ezilerek hücreler açığa çıkarıldı ve pipet yardımı ile süspanse edildi. Hücreler, PBS tamponunda 1100 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek 2 kez yıkandı. Çöken hücreler 45 ml PBS içerisine alınarak hücre sayımı yapıldı.

3.2.8.4. Bağışıklanmış Fareden Lenf Düğümü Hücrelerinin Elde Edilmesi

Tüm vücuda dağılmış bir şekilde bulunan lenf düğümleri (çene ve koltuk altında 2 çift, deri üzerinde ve kasıkta 1'er çift, barsakta 4, sırtta 3 adet) petride bulunan 5 ml PBS içerisinde yağ dokusundan arındırılarak toplandı. Elde edilen tüm bu dokular 10 ml PBS tamponu içeren farklı petri kabına alındı, lenf düğümleri bir süzgeçte cam baget ile ezilerek hücreler açığa çıkarıldı ve pipet yardımı ile süspanse edildi. Hücreler, PBS tamponunda 1100 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek 2 kez yıkandı. Çöken lenf hücreleri 10 ml PBS içerisine alınarak hücre sayımı yapıldı.

3.2.8.5. Hücrelerin Sayımı

Myeloma, dalak ve lenf hücreleri süspanse edilip PBS ile 45 ml'ye tamamlandıktan sonra Thoma lamı üzerine karışımdan bir damla alınarak 25 kareye düşen hücreler sayıldı. Aşağıdaki formüle göre hücre sayısı belirlendi.

$$10^4 \times A \times B = C$$

10^4 : sabit katsayı

A: hücrelerin içinde bulunduğu hacim

B: sayılan hücre miktarı

C: toplam hücre sayısı

3.2.8.6. Füzyon

Birinci füzyon çalışmasında hücre sayımı yapılan FO myeloma hücreleri ile dalak hücreleri 1/5 oranında birleştirildi. 2. füzyonda FO myeloma/dalak hücreleri ve myeloma/lenf hücreleri oranı 1/2 olacak şekilde birleştirildi. 3. füzyonda ise FO myeloma hücreleri ve dalak hücreleri 1/2 oranında birleştirildi.

Yapılan bu üç füzyon çalışmasında da birleştirilen hücreler 1100 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst kesim atılarak, çöken hücre karışımına 37°C'de ısıtılmış % 50 konsantrasyonda 1 ml polietilen glikol 4000 (PEG) 1 dakika içerisinde oldukça yavaş bir şekilde eklendi. 1 dakika beklendi, daha sonra sırasıyla 4 ml serumsuz DMEM 1 dakika içinde, 20 ml serumsuz DMEM ve 20 ml % 15 FBS içeren DMEM besiyeri 2'şer dakika içinde yavaşça hücrelerin üzerine ilave edildi. Karışım 1 saat 37°C ısıdaki CO₂ inkübatörde bekletildikten sonra santrifüj edildi. Çöken hücreler %2 HAT'lı % 20 FBS içeren DMEM besiyeri içinde süspanse edildi. Birgün önce hazırlanmış besleyici hücre içeren hücre kültür plaklarına 150 µl/kuyu olacak şekilde dağıtıldı [Coligan et al., 1991].

Dördüncü füzyon çalışmasında ise diğer füzyonlardan farklı olarak P3 myeloma hücreleri kullanıldı. P3 myeloma hücreleri ve dalak hücrelerinin oranı 1/10 olacak şekilde birleştirildi. Bu füzyon işlemi sırasında ise farklı içerikli RPMI-1640 besiyerleri hazırlandı. Füzyon protokolü benzer şekilde uygulandı.

3.2.8.7. Füzyon Sonrası Kültürün Takibi

Füzyondan 10 gün sonra hücre üst sıvılarından 100 µl alınarak hücrelerin üzerine 100 µl % 10 FBS içeren % 2 HAT'lı RPMI-1640 ya da DMEM seçici besiyeri ilave edildi. 15. gün aynı şekilde seçici % 2 HT besiyeri eklendi. Hücrelerin gelişme periyoduna bağlı olarak normal besiyerine geçildi. Füzyondan yaklaşık 10 gün sonra hibrit hücrelerin HAT seçici besiyerinde canlı, belirgin, büyük hücreler olarak geliştiği ve bölünerek klon oluşturmaya başladığı gözlemlendi. Füzyon plakları invert mikroskopta tek tek taranarak hibrit hücreler belirlendi. Füzyon sonrası elde edilen monoklonal antikorları üreten hibrit hücrelerin belirlenmesi için sandviç ELISA yöntemi kullanıldı.

3.2.8.8. Hibritlerin Alt Klonlanması

ELISA yöntemi ile pozitif reaksiyon veren ve monoklonal antikor ürettiği belirlenen hibrit hücrelerin tek klondan oluşan hibrit hücre soyunu elde etmek için sınırlı seyreltme (limiting dilution) işlemi uygulandı. Bunun için hücreler, pipet yardımı ile tüplere alındı ve hücre sayımı yapılarak özellikle son kuyulara tek bir hücre düşecek şekilde % 10 FBS'li RPMI ya da DMEM besiyeri içeren kültür plaklarına dağıtıldı [Coligan et al., 1991].

3.2.8.9. Anti-idiotip HBsAg Antikorlarının Aktivite ve Karakterizasyonu

Antikor aktivitesi pozitif olan hibrit hücrelerin farklı proteinlerle olan çapraz reaksiyonu görmek için ELISA plağına farklı proteinler kaplandı ve sandviç ELISA testi yapıldı.

ELISA plakları kuyu başına 100 µl olacak şekilde (100 ng/ml) keçi geliştirilen anti-HBsAg poliklonal antikor, anti-HBsAg tavşan antikor, normal keçi serumu, normal tavşan serumu, BSA, süt tozu ve FCS ile kaplandı. 4°C'de gece boyu inkübe edildi. Yıkama işleminden sonra kuyucuklar 150 µl % 1'lik süt tozu ile 1 saat 37°C'de bloke edildi. Plaklar yıkandıktan sonra hibrit üst sıvıları her bir kuyuya 100 µl eklendi ve 37°C'de 2 saat bekletildi. Yıkamadan sonra, alkalen fosfatazla konjuge olmuş 1/1000 dilüsyonda anti-fare polivalen antikor eklendi. 37°C'de 1 saat inkübasyondan sonra plaklar yıkandı ve 1 mg/ml PNPP substrat tampon içinde hazırlanan PNPP eklendi. 1 saat oda sıcaklığında ve karanlıkta bırakıldı. Oluşan renk değişimi ELISA okuyucusu ile 405 nm'de absorbans belirlendi [Coligan et al., 1991].

3.2.8.10. Hibrit Hücrelerin Dondurulması

Hücre pasajı ile kültür kabından alınıp PBS yıkama ile çöktürülen 6C9 ve 6H9 hücre pelleti 3×10^6 hücre/ml olacak şekilde dondurma medyumunu ile birlikte dondurma tüplerine alındı. -70°C'de bir gece bekletilen tüpler -196°C'de sıvı azot tankında saklandı.

3.2.9. Monoklonal Antikorların Saflaştırılması

3.2.9.1. Hibrit Hücrelerin Geniş Ölçekte Üretimi

6C9 ve 6H9 hibrit hücrelerden geniş ölçekte antikor elde etmek için değişik büyüklüklerde (25 cm², 75 cm² ve 150 cm²) hücre kültür kapları kullanıldı. Hibrit hücreler % 10, % 5 FCS içeren RPMI-1640 besiyerinde üretilip 1100 rpm'de santrifüjlendikten sonra üst sıvıları 4°C'de saklandı.

3.2.9.2. Amonyum Sülfat Çöktürme

Bir karıştırıcı üzerinde, 30 dakika içerisinde, serumlu ortamda üretilen anti-id 6C9 ve 6H9 antikorlu hücre kültür üst sıvısı üzerine % 45 oranında amonyum sülfat soğuk ortamda yavaş yavaş eklendi. Gece boyu +4°C'de bırakıldı. 13000 rpm'de, 1 saat +4°C'de santrifüj edildi. Hücre çökeleği PBS ile çözülerek PBS'e karşı gece boyu +4°C'de diyaliz edildi.

3.2.9.3. S-300 Jel Filtrasyon Kolon Kromatografisi

Cam kolon içine 100 ml sephacryl S-300-HR jel filtrasyon kolon materyali konuldu. Hazırlanan kolon 15 mM borat tamponu ile yıkandı. Anti-id 6C9 ve 6H9 antikor üst sıvıları kolon hacminin % 10'u kadar miktarda kolona yüklendi. Kolon sonrası kesimler, tüp başına 1 ml olacak şekilde alındı. Spektrofotometrede OD₂₈₀'de örneklerin protein miktarları belirlendi. ELISA yöntemi ile antikor içeren kesimler test edilerek seçildi. Her fraksiyondaki örneğin saflık kontrolü için % 10'luk indirgenmiş SDS jel uygulandı.

3.2.9.4. DE52 İyon Değişimi Kromatografisi

- Anti-id 6C9 antikorlu diyaliz membrana yüklendi ve tris-borat tamponuna karşı gece boyu +4°C'de diyaliz edildi.
- Yıkama tamponu olarak; 5mM Tris (pH 8.6), 55 mM Tris (pH 6), 500 mM Tris (pH 5.1) tamponları kullanıldı.
- Adsorban olarak kullanılan anyon değiştirici DE52 ve antikor örneği kolona yüklendi. Zıt yüke sahip proteinler kolon dolgu maddesine adsorbe olurken, matriksle aynı yükte olanlar kolondan ayrıldı. Gradyan elüsyonu ile kolondan

- geçirilen tamponun içeriği sürekli değiştirildi. Tuz iyonları proteinle yer değiştirerek onun tekrar matrikse bağlanmasını engelledi. Kullanılan tampon çözeltisinin pH'sını ve tuz konsantrasyonunu değiştirmek suretiyle proteinler kolondan ayrıldı. Tuz konsantrasyonunun kademeli olarak artırılması ile daha fazla yüke sahip proteinlerin de kolondan ayrılması sağlandı. Kolon içinde tutulmuş proteinlerin ayrılması için kolon NaCl çözeltisi ile yıkandı.
- Elde edilen örneklerin protein miktarlarını belirlemek için kolon sonrası kesimler, tüp başına 1 ml olacak şekilde toplandı. Spektrofotometrede OD₂₈₀'de ölçümler yapılarak antikor içeren kesimlerin seçilmesi için ELISA testi uygulandı [Coligan et al., 1991].

3.2.10. Anti-id 6C9 ve 6H9 Antikorları ile Farelerin Bağışıklanması

Bağışıklama için 8 haftalık BALB/c fareler kullanıldı. 1. ve 2. bağışıklamada 25 µg antijen (S-300 saflaştırma sonrası elde edilen anti-id 6C9 ve 6H9 antikor) 1/1 oranında FIA, 1 µg ticari aşı (Pastör) 1/1 oranında PBS ile hazırlandı. 4'er fareden oluşan 3 farklı gruba 100 µl/fare olacak şekilde antijen enjekte edildi. 1. ay sonunda aynı koşullarda 2. bağışıklama yapıldı.

3.2.11. Bağışık Yanıtın Kontrolü

Anti-id 6C9, 6H9 antikorlar ve ticari aşı ile bağışıklanmış farelerin antikor aktivite kontrolü için haftalık aralıklarla farelerin kuyruk ucundan kan alınarak dolaylı ELISA yöntemi uygulandı.

Dolaylı ELISA Testi;

- 96 kuyuluk ELISA plakları PBS içinde 20 ng/ml HBsAg ve BSA olacak şekilde kuyu başına 100 µl kaplandı. Gece boyu 4°C'de inkübe edildi.
- Bağlanmayan antikorlar PBS+% 0.5'lik tween-20 ile yıkanarak uzaklaştırıldı.
- Kuyucuklar 150 µl % 1'lik süt tozu ile 1 saat 37°C'de bloke edildi.
- Plaklar yıkandıktan sonra 1/100 ve 1/200 oranında seyreltilmiş fare serumları her bir kuyuya 100 µl eklendi ve 37°C'de 2 saat bekletildi.

- Yıkamadan sonra, 1/1000 dilüsyonda polyvalen-AP, anti-fare (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃)-AP ve anti-fare IgM-AP konjugatları eklendi.
- 37°C’de 1 saat inkübasyondan sonra plaklar yıkandı.
- 1 mg/ml PNPP substrat tampon içinde hazırlanan PNPP eklendi ve 405 nm’de absorbands okundu.

Farklı saflaştırma teknikleri kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen antikorda serumlu ortamda geliştirilmesinden kaynaklandığı düşünülen safsızlıklar tespit edildi. Bu nedenle saf antikor eldesi için serumsuz ortamda hücre üretimi çalışmaları yapıldı.

3.2.12. Serumsuz Ortamda Üretilen Anti-id 6C9 Antikorumun S-300 Jel Filtrasyon Kolon Kromatografisi ile Saflaştırılması

Serumsuz besiyerinde geniş ölçekte üretilen anti-id 6C9 antikor S-300 jel filtrasyon kolon kromatografisi tekniği ile saflaştırıldı.

3.2.13. Anti-id 6C9 Antikorumun Distile Suyu Karşı Diyaliz ile Saflaştırılması

S-300 saflaştırma sonrası elde edilen anti-id 6C9 antikorumun farelere bağışıklanmasından sonra, farelerin serumlarında BSA spesifik antikor yanıtı oluştu. Bu durumu ortadan kaldırmak için serumsuz besiyerinde geniş ölçekte üretilen anti-id 6C9 antikorumun üst sıvısı distile suya karşı diyaliz edildi.

Serumsuz ve % 10 serumlu besiyerinde geniş ölçekte üretilen anti-id 6C9 antikor üst sıvısına 14.000 rpm’de 15 dakika santrifüjleme işlemi uygulandı. Santrifüj sonrası üst kesimler diyaliz membrana alınarak 2 gün belirli aralıklarla tamponu değiştirilerek distile suya karşı diyaliz edildi [Friboulet and Izadyar-Demichele, 1995]. Diyaliz sonrası örnek 14.000 rpm’de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çöken örnek 350 mM (NaCl) PBS ile çözüldü. Elde edilen örneğin protein miktarını belirlemek için spektrofotometrede OD₂₈₀’de ölçüm yapıldı.

Antikor içeren kesimler ELISA ile test edildi. Örneğin saflık kontrolü için % 10'luk indirgenmiş (SDS) jel uygulandı.

3.2.14. Distile Suyu Karşı Diyaliz Sonrası Elde Edilen Saf Anti-id 6C9 Antikor ile Farelerin Bağışıklanması

Bağışıklamalar için farklı dozlarda (10 µg, 25 µg, 50 µg, 100 µg) anti-id 6C9 antikorlar kullanıldı. Ayrıca S-300 jel filtrasyon saflaştırma sonrası elde edilen anti-id 6C9 antikor kontrol olarak (50 µg) uygulandı. Bu antikorlar 1/1 oranında FIA, 1 µg dozdaki ticari aşılar (Pastör ve Engerix) ise 1/1 oranında PBS ile hazırlandı. 2. bağışıklama 30.günde aynı koşullarda gerçekleştirildi.

Distile suya karşı diyaliz ile elde edilen anti-id 6C9 antikor ve ticari aşılar ile bağışıklanmış farelerin antikor aktivite kontrolü için haftalık aralıklarla farelerin kuyruk ucundan kan alınarak dolaylı ELISA yöntemi kullanıldı.

3.2.15. Anti-id 6C9 Antikorum Pepsin ile Kesimi

Distile suya karşı diyaliz edilen anti-id 6C9 antikorida yalnızca Hepatit B virüsüne karşı immün yanıt oluşturmak için pepsin kesim ile Fab fragmanlar elde edilmek istendi. Bunun için % 10 serumlu ortamda üretilerek distile suya karşı diyaliz sonrası elde edilen 3 mg/ml saf anti-id 6C9 antikoru asetat tamponuna (pH 4.5) karşı 4°C'de 6 saat diyaliz edildi. Asetat tamponunda çözülen pepsin 1:20 enzim:antikor oranında (mg/ml) diyaliz sonrası anti-id 6C9 antikoru eklendi. Gece boyu 37°C su banyosunda inkübe edildi. 2 M tris base ile pH 8'de reaksiyon sonlandırıldı. Borat tamponu ile yıkanan S-300 jel filtrasyon kolonuna yüklendi. Elde edilen antikor kesimlerinin protein konsantrasyonu OD₂₈₀'de belirlendi. Her fraksiyondaki örneğin saflık kontrolü için % 8'lik indirgenmemiş SDS jel ile % 6 ve % 15'lik gradiyent SDS jel uygulandı. Elde edilen antikor kesimleri 4°C'de 15 mM borat tamponu içinde saklandı [Coligan et al., 1991] (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. İmmünglobulinler ve alt birimleri [Coligan et al., 1991].

Molekül	OD ₂₈₀ (1 mg/ml)	Molekül ağırlığı (kDa)	
		İndirgenmemiş	İndirgenmiş
IgG	1.43	160	55.25
IgM	1.18	900	78.25
IgM alt birimleri	1.18	180	78.25
Fab	1.53	50	25
F(ab') ₂	1.48	110-120	25
F(ab') ₂ μ	1.38	135	44.25
F(ab')μ	1.38	65	44.25

3.2.16. Anti-id 6C9 Antikor Fab Fragmanları ile Farelerin Bağışıklanması

Bağışıklama için 25 µg ve 50 µg farklı dozlarda anti-id 6C9 antikor Fab fragmanları kullanıldı. 4 adet fareden oluşan 2 farklı gruba, 100 µl/fare olacak şekilde 1/1 oranında FIA ile hazırlanan Fab fragmanları 2 kez intraperitoneal olarak enjekte edildi.

Pepsin kesim sonrası elde edilen Fab fragmanları ile bağışıklanan farelerde oluşan antikor aktivitesini tespit etmek için haftalık aralıklarla farelerin kuyruk ucundan alınan kandan elde edilen serumlar dolaylı ELISA'da kullanıldı.

3.2.17. Saf Antikor Tespiti

3.2.17.1. Denatüre Edici Poliakrilamit Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

4 ml dH₂O, 3.3 ml % 30 akrilamit, 2.5 ml 1.5 M tris-HCl (pH 8.8), 0.1 ml % 10 sodyum dodesil sülfat (SDS), 0.1 ml % 10 amonyum persülfat (APS), 0.004 ml tetrametil etilen diamin (TEMED)'den oluşan toplam 10 ml % 10'luk alt jel hazırlandı. Daha sonra bu jel elektroferez aparatına pipetle boşaltıldıktan sonra üzerine damla damla bütanol eklendi. Jel donduktan sonra kurutma kağıdıyla bütanol uzaklaştırıldı.

3.4 ml dH₂O, 0.83 ml % 30 akrilamit, 0.63 ml 1.0 M Tris (pH 6.8), 0.05 ml %10 SDS, 0.05 ml % 10 APS, 0.005 ml TEMED'den oluşan toplam 5 ml % 5'lik üst jel, alt jel üzerine pipet yardımıyla eklendi. Jel tarakları jel üzerine takılarak donması bekledi. Jel donduktan sonra PAGE aparatına yerleştirilerek yürütme tamponu dolduruldu.

Marker proteinler ve anti-id 6C9 antikorlar örnek tamponu ile karıştırılıp, 3 dakika kaynatıldıktan sonra kuyulara yüklendi, üst jel boyunca 30 miliamper (80 Volt), alt jel boyunca 120 V'da elektroforez gerçekleştirildi.

3.2.17.2. Protein Jelin Coomassie Blue ile Boyanması

SDS-PAGE sonrasında jel, gece boyu boyama tamponu (staining) içinde bekletildikten sonra, boya açıcı tampon (destaining) ile boya uzaklaştırılarak protein bantları görünür hale getirildi.

3.2.17.3. Protein Jelin Gümüş ile Boyanması

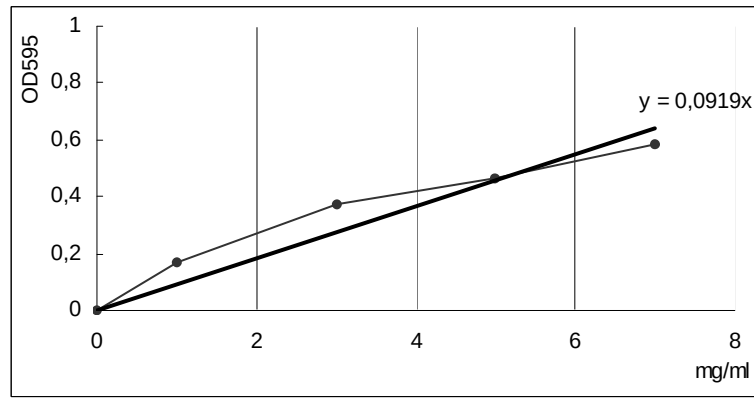
SDS-PAGE işleminden sonra jele gümüş boyama protokolüne göre boyama işlemi uygulandı. Fiksatif çözeltisi içinde 1 saat çalkalandı. % 50 etil alkol ile 3x20 dakika yıkandı. 0.2 gr/L sodyum tiyosülfat ile 1 dakika ön muamele edildi. dH₂O ile 3x20 sn çalkalandı. 0.2 gr/L gümüş nitrat, % 37 formaldehit ile 20 dakika fikse edildi. dH₂O ile 2x20 sn çalkalandı. Geliştirme tamponunda 10 dakika bekletildi. dH₂O ile 2x2 dakika yıkandı. Durdurma tamponunda 10 dakika bekletildi. % 50 metanol ile 3 kez yıkandı.

4. BULGULAR

4.1. (6A5) anti-HBsAg Miktar Tayini

6A5 monoklonal antikor miktar tayini için Bradford metodu kullanıldı. Örnekler 595 nm’de ELISA’da okundu. Absorbans değerleri ölçüldükten sonra değerler grafiğe yerleştirildiğinde antikor miktarı 5.3 mg/ml olarak tespit edildi.

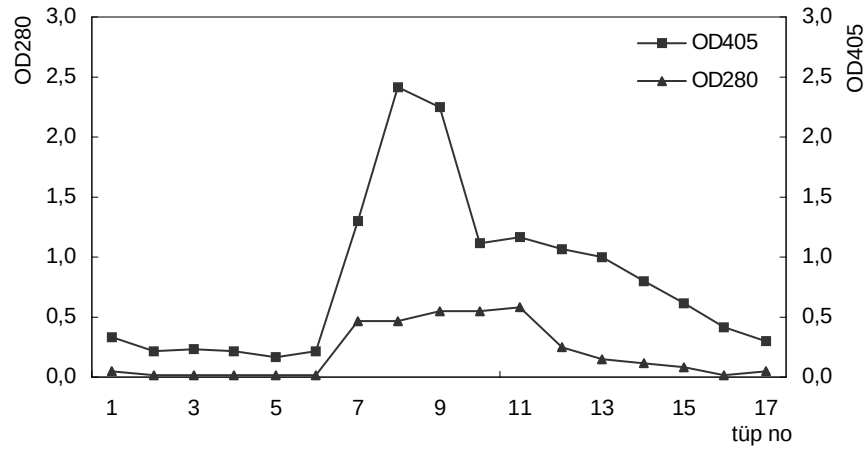
6A5 monoklonal antikorunun Bradford yöntemi kullanılarak elde edilen grafiği şekil 4.1’de gösterilmektedir.



Şekil 4.1. 6A5 monoklonal antikor miktarının belirlenmesi

4.2. 6A5 Monoklonal Antikorunun S-300 Jel Filtrasyon Kolon Kromatografisi ile Saflaştırılması

Serumsuz ortamda geniş ölçekte üretilen 6A5 monoklonal antikoruna amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemi uygulandı. Bu yöntemle hazırlanan antikorun farelere verilmesinden sonraki ilk üç haftada gözlenen aktivite sonuçları, farelerin serumunda BSA’ya karşı da yüksek oranda yanıt oluştuğunu gösterdi. Bu nedenle IgM tipi bir antikor olan 6A5 monoklonal antikoru daha saf bir şekilde hazırlanmak üzere S-300 jel filtrasyon kolon kromatografisiyle saflaştırıldı. Kolon sonrası toplanan kesimlere dolaylı ELISA testi uygulandı. Pozitif reaksiyon alınan ve 280 nm’de en fazla absorbans gösteren kesim farelerin bağışıklanmasında kullanıldı. Saflaştırma sonrası elde edilen antikorun miktarı 0.4 mg/ml olarak belirlendi. Antikorun saflaştırma profili şekil 4.2’de gösterilmektedir.

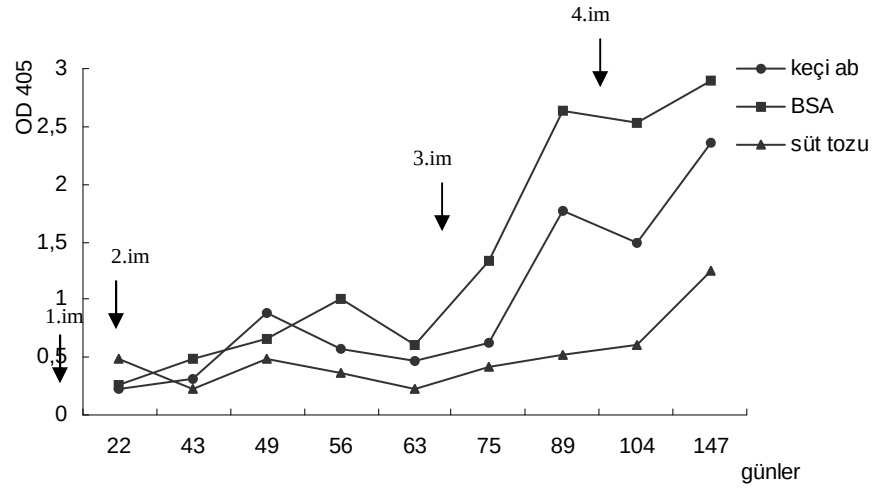


Şekil 4.2. 6A5 monoklonal antikorunun S-300 jel filtrasyon kolon kromotografisiyle saflaştırılması

4.3. 6A5 Monoklonal Antikoru ile Bağışıklanan Farelerin Antikor Yanıtları

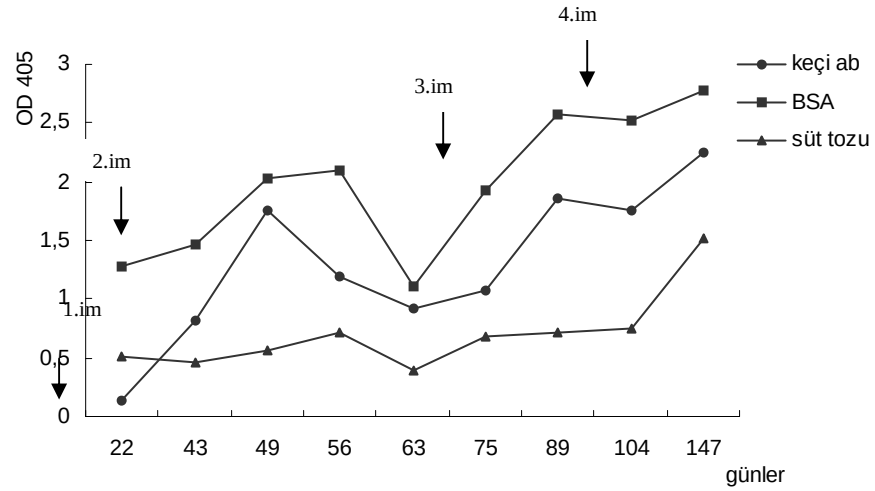
Fareler iki ayrı dozda 6A5 monoklonal antikoru ile immünize edildi ve her bir grupta 4 adet fare kullanıldı.

10 µg 6A5 monoklonal antikoru ile bağışıklanma sonrası 1/200 seyreltilmiş fare serumlarındaki farklı günlere ait poliklonal yanıtları şekil 4.3’de gösterilmektedir.



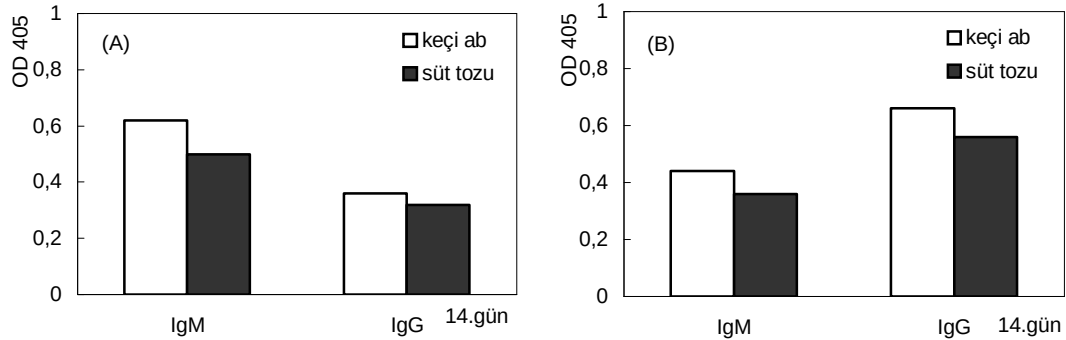
Şekil 4.3. 10 μ g 6A5 monoklonal antikoru ile bağışıklanan farelerin Polyvalen-AP ile elde edilen serumdaki toplam antikor yanıtı

40 μ g 6A5 monoklonal antikoru ile bağışıklanan farelerin serumlarındaki farklı günlere ait poliklonal yanıtları şekil 4.4’de gösterilmektedir.



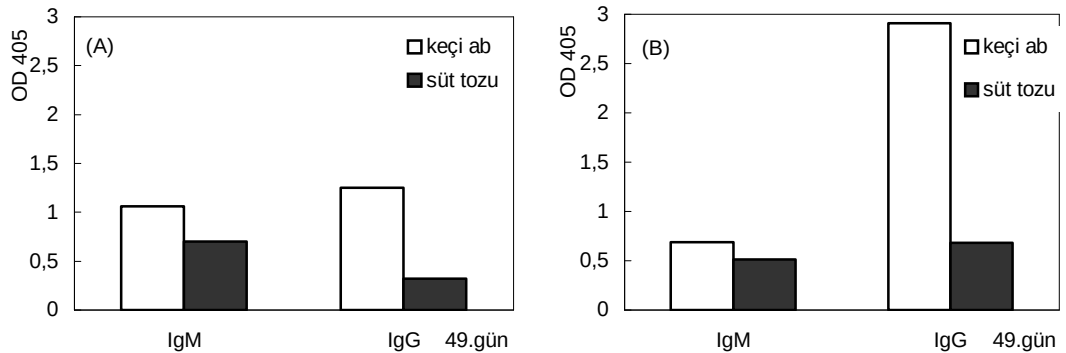
Şekil 4.4. 40 μ g 6A5 monoklonal antikoru ile bağışıklanan farelerin Polyvalen-AP ile elde edilen serumdaki toplam antikor yanıtı

Birinci bağışıklama sonrası 14. günde 1/200 seyreltilmiş fare serumlarındaki IgG ve IgM antikor seviyeleri ELISA ile tespit edildi. 10 μ g ve 40 μ g 6A5 monoklonal antikoruna ile bağışıklanan farelerin IgM ve IgG antikor yanıtları şekil 4.5’de gösterilmektedir.



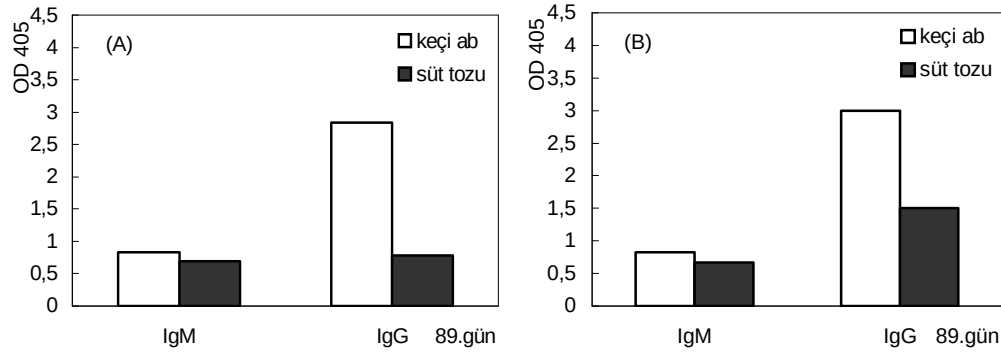
Şekil 4.5. (A)10 μ g ve (B) 40 μ g 6A5 monoklonal antikoruna ile bağışıklanan farelerin IgM-AP ve IgG-AP ile elde edilen serumdaki IgM ve IgG sonuçları

İkinci bağışıklama sonrası 49. günde 1/200 seyreltilmiş fare serumlarındaki IgG ve IgM antikor seviyeleri ELISA ile tespit edildi. 10 μ g ve 40 μ g 6A5 monoklonal antikoruna ile bağışıklanan farelerin IgM ve IgG antikor yanıtları şekil 4.6’da gösterilmektedir.



Şekil 4.6. (A)10 μ g ve (B) 40 μ g 6A5 monoklonal antikoruna ile bağışıklanan farelerin IgM-AP ve IgG-AP ile elde edilen serumdaki IgM ve IgG sonuçları

Üçüncü bağışıklama sonrası 89. günde 1/200 seyreltilmiş fare serumlarındaki IgG ve IgM antikor seviyeleri ELISA ile tespit edildi. 10 µg ve 40 µg 6A5 monoklonal antikoru ile bağışıklanan farelerin IgM ve IgG antikor yanıtları şekil 4.7’de gösterilmektedir.



Şekil 4.7. (A) 10 µg ve (B) 40 µg 6A5 monoklonal antikoru ile bağışıklanan farelerin IgM-AP ve IgG-AP ile elde edilen serumdaki IgM ve IgG sonuçları

ELISA sonuçlarına göre fare serumlarının anti-HBsAg keçi antikoruna immün yanıt oluşturduğu, süt tozu ile çapraz reaksiyonun düşük olduğu ancak BSA ile çapraz reaksiyon verdiği, farelere verilen antikor miktarı arttığında ise süt tozuna ve özellikle BSA'ya karşı yanıtın arttığı görüldü.

Antikor yanıtının gelişmesinden 14. gün sonra IgM yanıtın yüksek olduğu ve IgG yanıtın oluşmaya başladığı, 49. gün ve 89. gün sonra IgM yanıtın azaldığı ve IgG yanıtının arttığı görüldü.

4.4. Hücre Füzyonu

a) 6A5 monoklonal antikoru (40 µg) ile bağışıklanan fareler arasında en yüksek antikor yanıtı verenler ELISA ile belirlenerek sırasıyla füzyona alındı. Bu antikora ait füzyon sonuçları çizelge 4.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1. 6A5 monoklonal antikoruna ait 1. 2. ve 3. füzyon sonuçları

	1. füzyon	2. füzyon		3. füzyon
		dalak	lenf	
Dalak hücre sayısı	270*	250*	-	380*
Lenf hücre sayısı	-	-	90*	-
Myeloma hücre sayısı (FO)	60*	125*	45*	170*
Füzyonda kullanılan toplam kuyu sayısı	576	576	384	672
Toplam hibrit hücre sayısı	79	283	92	0
Antikor aktivitesi olan hibrit hücre sayısı	0	5	1	0
Spesifik antikor üreten hibrit hücre sayısı	0	0	0	0

(*) milyon

(6A5) fare monoklonal antikoruna ait füzyon çalışması sonucunda elde edilen hibritlerden monospesifik yanıt alınamadığı için ikinci bir yaklaşım olarak keçi anti-HBsAg poliklonal antikoru ile çalışmalara devam edildi.

b) Keçi anti-HBsAg poliklonal antikoru ile bağışıklanan fareler arasında en yüksek antikor yanıtı veren fare ELISA ile belirlendikten sonra füzyona alındı. Bu antikora ait füzyon sonucu çizelge 4.2’de gösterilmektedir. Füzyon çalışması sonucunda anti-id 6C9 ve 6H9 antikorları elde edildi.

Çizelge 4.2. Keçi anti-HBsAg poliklonal antikoruna ait füzyon sonuçları

Dalak hücre sayısı	42 milyon
Myeloma hücre sayısı (P3)	412 milyon
Füzyonda kullanılan toplam kuyu sayısı	576
Toplam hibrit hücre sayısı	461
Antikor aktivitesi olan hibrit hücre sayısı	36
Spesifik antikor üreten hibrit hücre sayısı	5

4.5. Anti-idiotip HBsAg Antikorlarının Aktiviteleri ve Karakterizasyonu

Füzyon sonrasında antikor aktivitesi olan hibrit hücrelerden bir kısmı aktivitelerini kaybetmiş, bazıları ise farklı proteinlerle (keçide geliştirilmiş olan anti-HBsAg poliklonal antikor dışında) çapraz etkileşim göstermiştir.

Antikor aktivitesi olan hibrit hücrelerdeki çapraz reaksiyonları tespit edebilmek için farklı proteinler ELISA plağına kaplandı. Yapılan ELISA testi sonuçları çizelge 4.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Anti-id HBsAg antikorlarının (5A4, 6B2, 6F12, 6C9, 6H9) “keçi anti-HBsAg poliklonal antikor” ve “farklı proteinler” ile yapılan sandviç ELISA çapraz reaksiyon sonuçları

Antijenler	Anti-idiotip antikorlar				
	5A4	6B2	6F12	6C9	6H9
anti-HBsAg keçi poliklonal antikor	1.50	0.80	0.60	1.07	0.80
anti-HBsAg tavşan antikor	0.10	0.10	0.10	0.25	0.36
Normal keçi serumu	0.90	0.60	0.50	0.29	0.33
Normal tavşan serumu	0.10	0.10	0.10	0.20	0.31
FCS	0.10	0.10	0.10	0.27	0.37
BSA	0.10	0.10	0.10	0.25	0.40
Süt tozu	0.30	0.20	0.20	0.25	0.34

ELISA testinde kullanılan farklı proteinler:

anti-HBsAg keçi poliklonal antikor: keçide geliştirilen anti-HBsAg poliklonal antikor

anti-HBsAg tavşan antikor: bağışıklanmış tavşan antikor

normal keçi serumu: bağışıklanmamış keçi serumu

normal tavşan serumu: bağışıklanmamış tavşan serumu

FCS: fetal dana serumu

BSA: sığır serum albumin

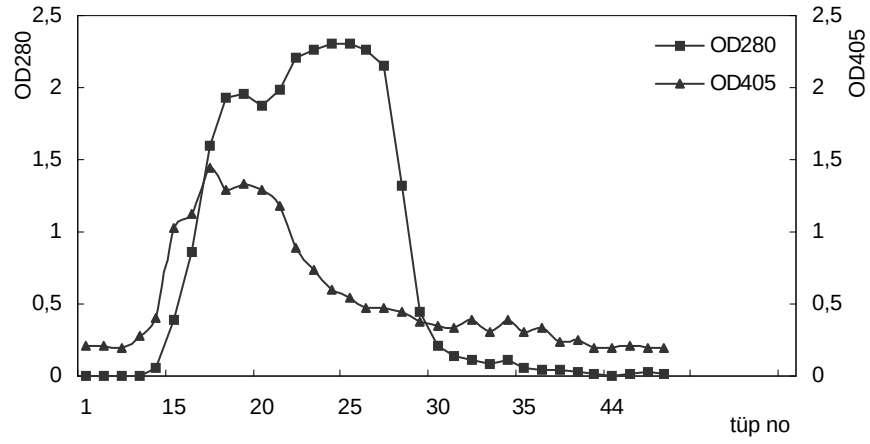
Sandviç ELISA testi sonucunda anti-id-HBsAg monoklonal antikorlarından 5A4, 6B2, 6F12, 6C9, 6H9’un diğer proteinlere göre “anti-HBsAg poliklonal keçi antikorunu” daha yüksek oranda tanıdığı görüldü. 5A4, 6B2, 6F12 anti-idiotip antikorları “anti-HBsAg keçi poliklonal antikorunu” ile daha yüksek oranda ve bunun yanında “normal keçi serumu” ile de reaksiyon verdi. 6C9 ve 6H9 diğer farklı proteinlerle yüksek oranda reaksiyon vermedi.

Anti-id-HBsAg monoklonal antikoru ürettiği belirlenen hibritlerin tek klondan oluşan soyunu elde etmek için sınırlı seyreltme yöntemi uygulandı. Birinci füzyon sonrası anti-HBsAg keçi poliklonal antikoru ile bağışıklanan farelerden elde edilen anti-id 6C9 ve 6H9 HBsAg antikorlarının immünglobulin tipinin IgM olduğu belirlendi. Bu antikorların HBsAg’yi taklit eden anti-idiotip antikor gibi davranıp davranmadığını belirlemek için farelere enjekte edilmeden önce antikorların saflaştırılması gerçekleştirildi.

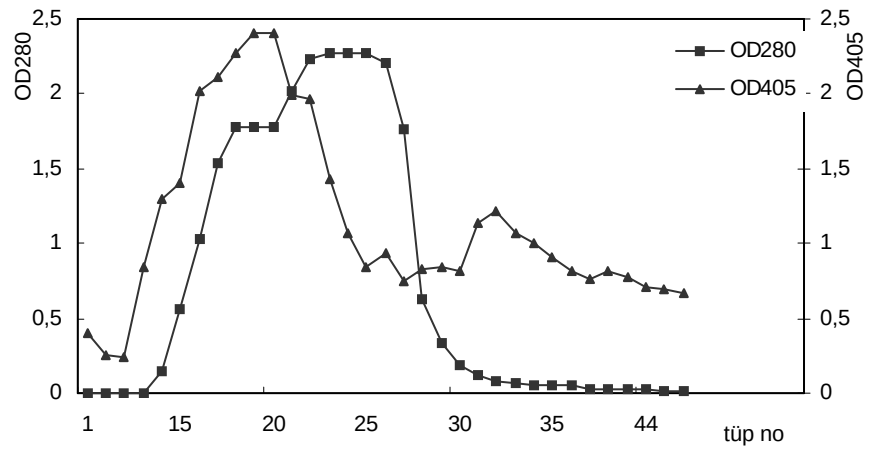
4.6. Anti-idiotip HBsAg Antikorların Saflaştırılması

4.6.1. Anti-id 6C9 ve 6H9 Antikorlarının S-300 Jel Filtrasyon Kolon Kromatografisi ile Saflaştırılması

Anti-id 6C9 ve 6H9 antikorları geniş ölçekte % 10 serumlu ortamda üretildi. Üst sıvılara amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemi uygulandı. Bu antikorların Ig tipleri IgM olduğundan S-300 jel filtrasyon kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Kolon sonrası kesimlere sandviç ELISA uygulandı. Her iki antikorida ELISA testinde pozitif reaksiyon veren kolon sonrası kesim örnekleri farelerin bağışıklanması için seçildi. Bu iki antikoru saflaştırma sonuçları şekil 4.8 ve 4.9’da gösterilmektedir.



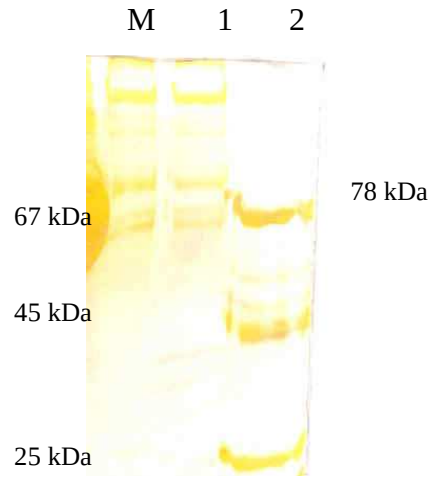
Şekil 4.8. Anti-id 6H9 antikorunun S-300 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırma sonuçları



Şekil 4.9. Anti-id 6C9 antikorunun S-300 jel filtrasyon kromatografisi ile saflaştırma sonuçları

4.6.2. Anti-id 6C9 Antikorumun S-300 Jel Filtrasyon Sonrası Kesimlerin SDS-PAGE Çalışması

S-300 jel filtrasyon ile elde edilen anti-id 6C9 antikorumun % 10'luk indirgenmiş SDS-PAGE uygulandıktan sonra gümüş boya ile oluşan jel görünümü şekil 4.10'da gösterilmiştir.

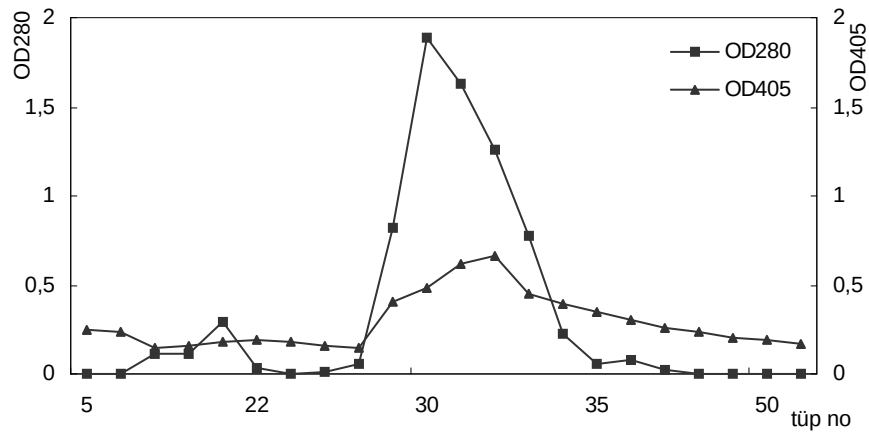


Şekil 4.10. Anti-id 6C9 antikorum S-300 jel filtrasyon sonrası kesimlerin SDS-PAGE’te görünümü.

M (markır): BSA (67 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Kimotripsinojen A (25 kDa);
1-2) S-300 jel filtrasyon kolon sonrası 18 no’lu kesim

4.6.3. Anti-id 6C9 Antikorumun DE52 İyon Değişimi Kromatografisi ile Saflaştırılması

Tris-borat tamponuna karşı gece boyu +4°C’de diyaliz edilen anti-id 6C9 antikoru DE52 iyon değişimi kromatografisi ile saflaştırıldı. Tüplerin 280 nm’de absorbans değerleri ölçülerek kolon sonrası kesimlere sandviç ELISA testi uygulandı. Bu antikorun saflaştırma sonuçları şekil 4.11’de gösterilmektedir.



Şekil 4.11. Anti-id 6C9 antikorumun DE52 iyon değişimi kromatografisi ile saflaştırma sonuçları

4.7. Serumlu Besiyerinde Üretilerek S-300 Jel Filtrasyon Kolon Kromatografisi ile Saflaştırılan Anti-id 6C9 ve 6H9 Antikorları ile Farelerin Bağışıklanma Çalışmaları

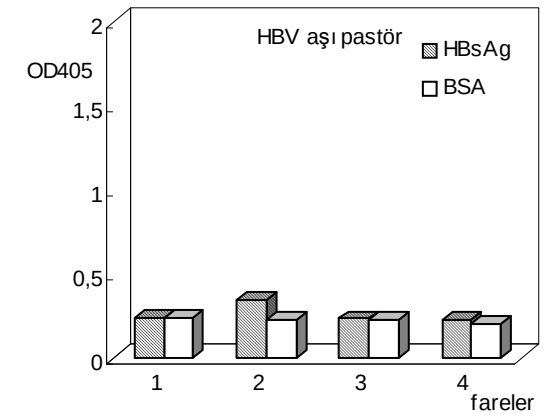
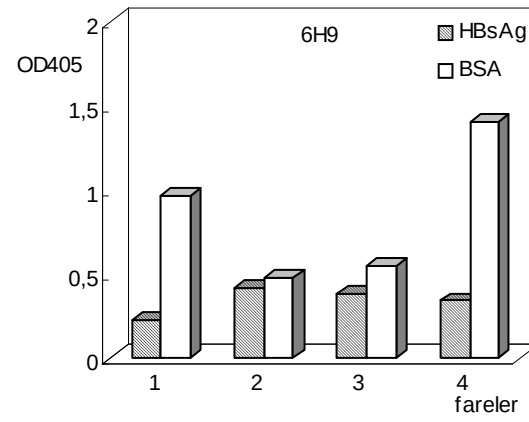
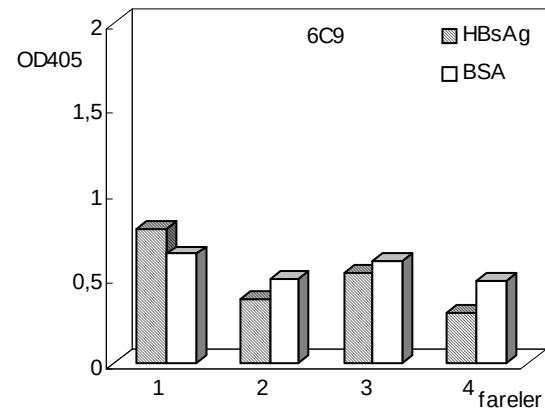
Anti-id 6C9 ve 6H9 antikorlarının, ticari hepatit B aşısı (Pastör) ile karşılaştırmalı olarak fareler üzerinde HBsAg antikor yanıtı oluşturma yeteneği araştırıldı. Bunun için fareler ticari aşı, anti-id 6C9 ve 6H9 antikorları ile bağışıklandı.

Ticari aşıyla fare başına 1µg, her bir anti-idiotip antikorla ise fare başına 25 µg'lık dozda bağışıklama yapıldı. Her bir grupta 4 fare kullanıldı. Enjeksiyonlar 0. ve 35. günler olmak üzere iki kez, her bir enjeksiyonda adjuvan olarak FIA kullanılarak gerçekleştirildi.

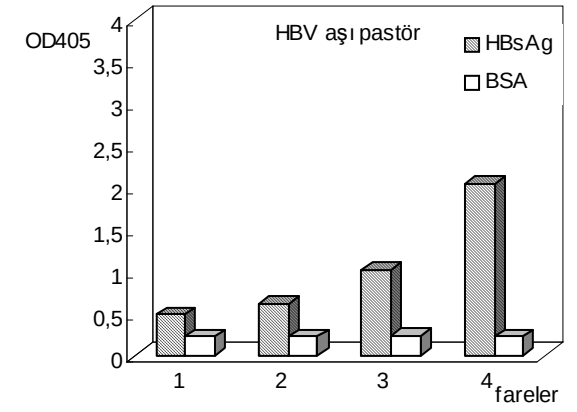
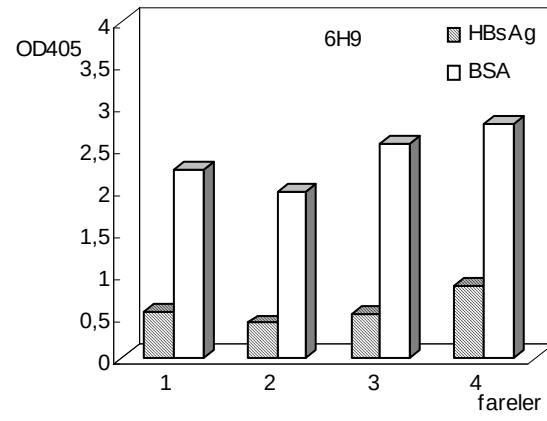
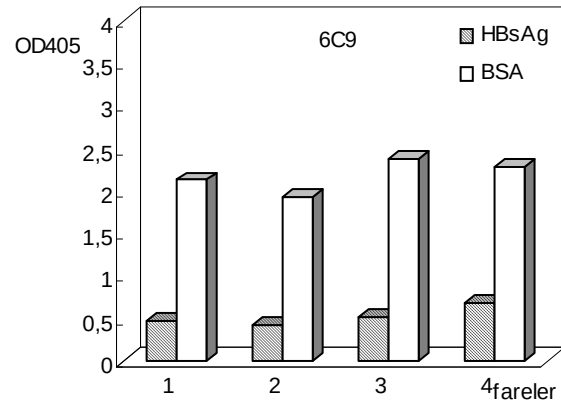
Bağışıklanan farelerin PBS ile 1/100 ve 1/200 seyreltilen serumlarındaki HBsAg antikor yanıtları dolaylı ELISA testi ile belirlendi. Yapılan çalışmada birinci bağışıklamadan sonra 6C9 ve 6H9 grupları antikor yanıtı açısından daha yüksek değerler gösterdi. Ticari aşı grubundan ise daha düşük yanıt alındı. İkinci bağışıklamadan sonra 6C9 ve 6H9 grupları antikor yanıtı açısından benzer değerler gösterdi. Ticari aşı grubundan ise daha yüksek yanıt alındı.

Şekil 4.12, 4.13, 4.14 ve 4.15'de farelerin anti-id 6C9, 6H9 antikorları ve ticari aşı ile 1. ve 2. bağışıklanma sonrası farklı günlere ait poliklonal yanıtları gösterilmiştir.

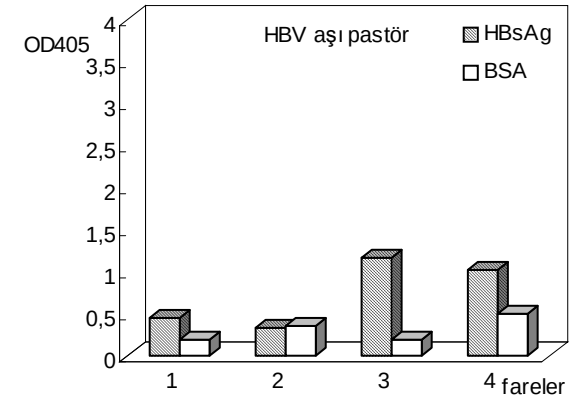
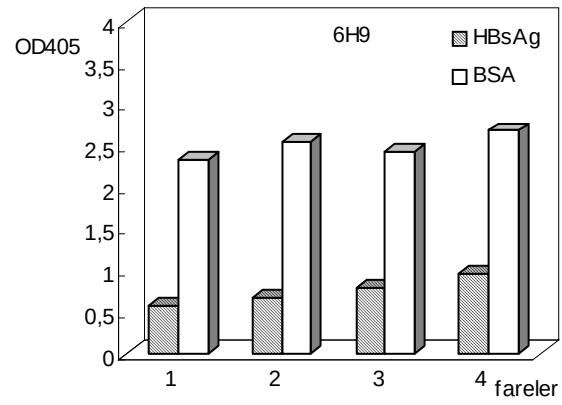
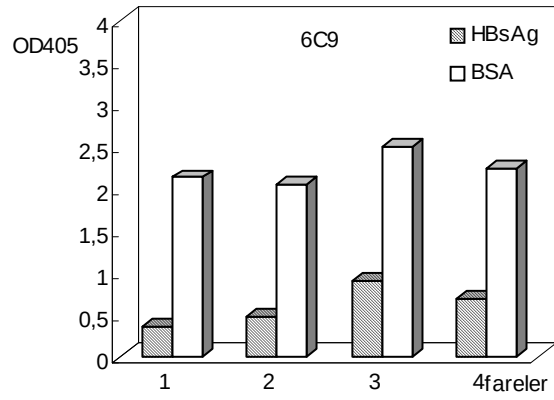
Şekil 4.16, 4.17, 4.18 ve 4.19'da farelerin anti-id 6C9, 6H9 antikorları ve ticari aşı ile 1. ve 2. bağışıklanma sonrası farklı günlere ait IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 alt tipleri ve IgM antikor yanıtları gösterilmiştir.



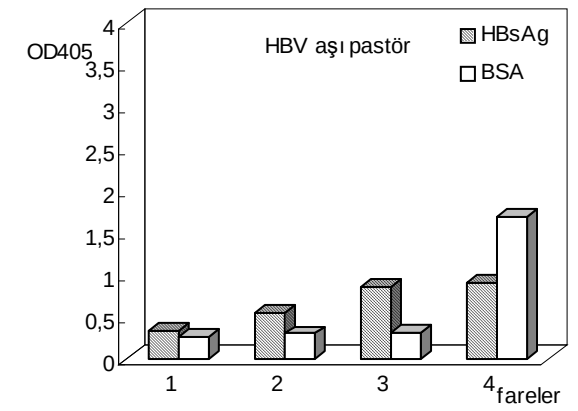
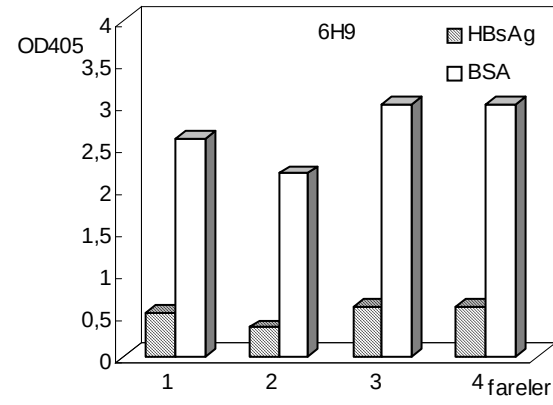
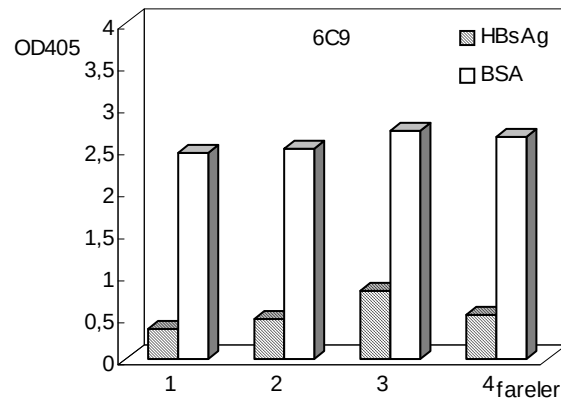
Şekil 4.12. Anti-id 6C9, 6H9 antikorları ve ticari aşı ile bağışıklanma sonrası 14. güne ait poliklonal yanıtları



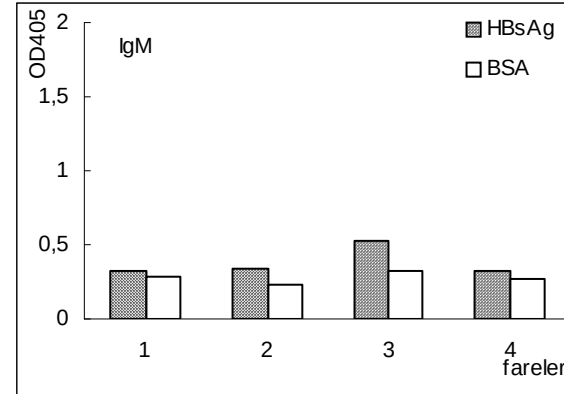
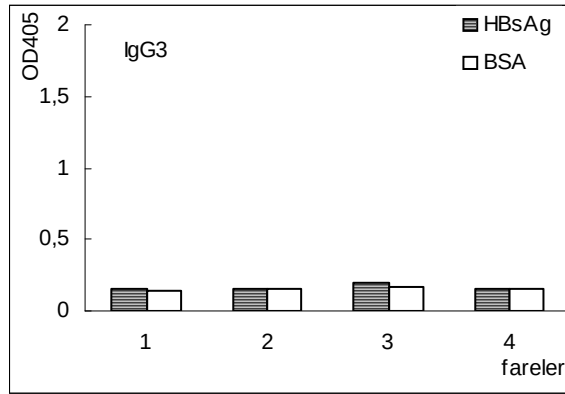
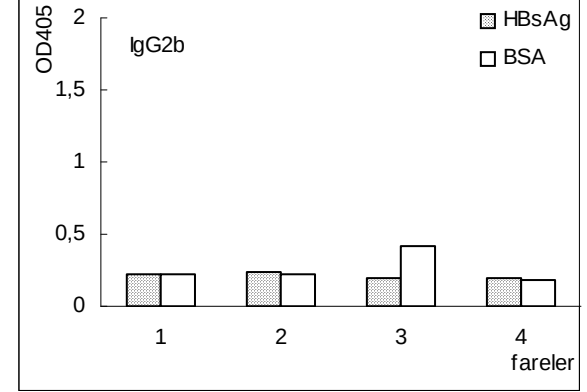
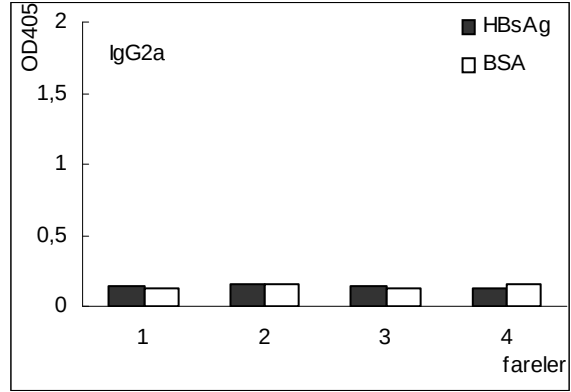
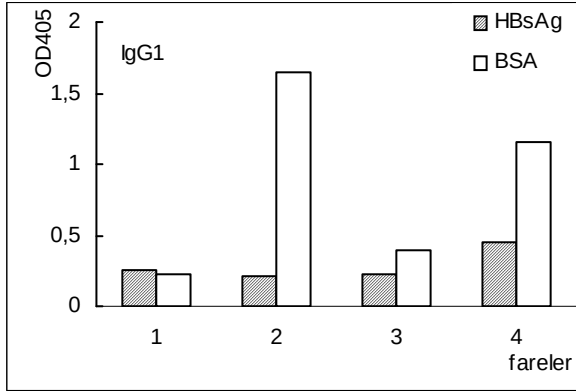
Şekil 4.13. Anti-id 6C9, 6H9 antikorları ve ticari aşı ile bağışıklanma sonrası 49. güne ait poliklonal yanıtları



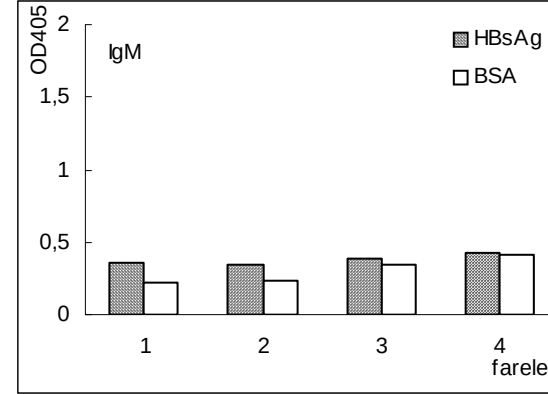
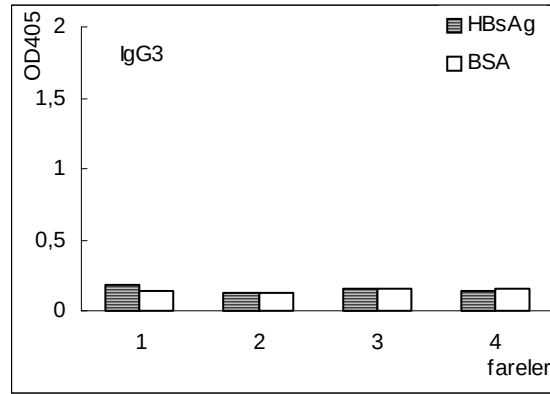
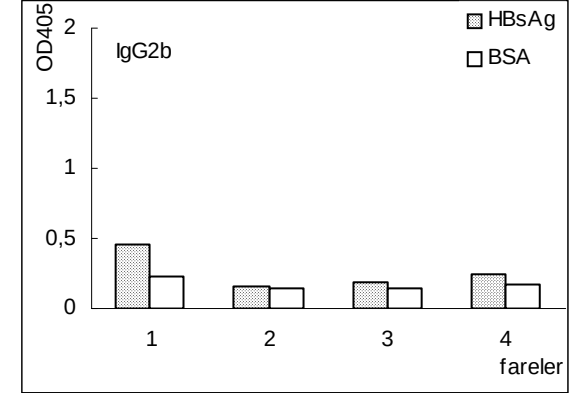
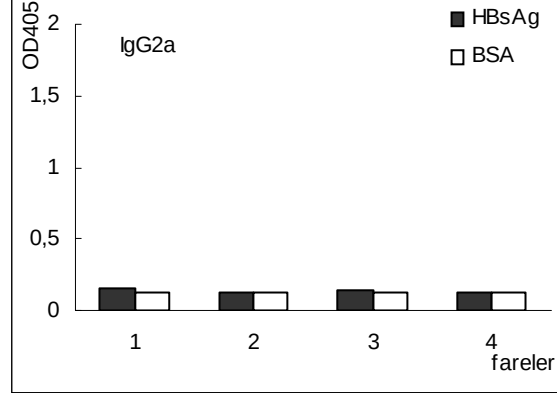
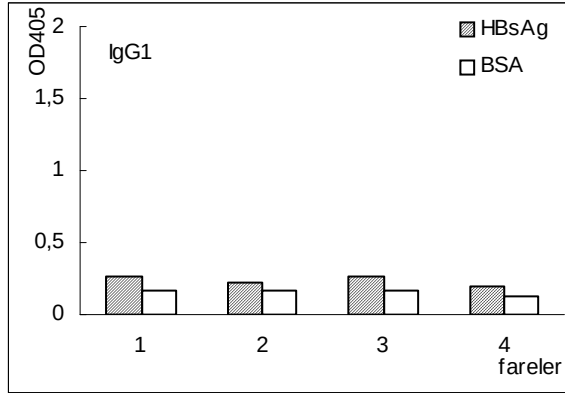
Şekil 4.14. Anti-id 6C9, 6H9 antikorları ve ticari aşı ile bağışıklanma sonrası 63. güne ait poliklonal yanıtları



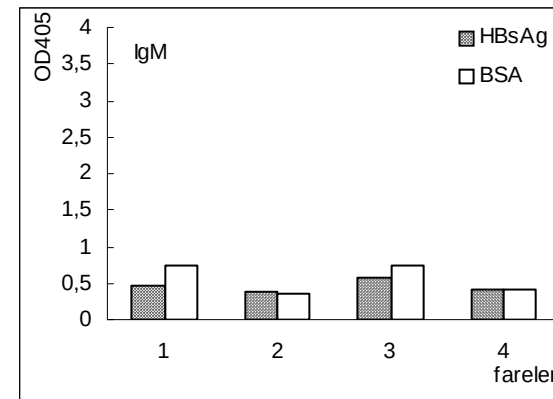
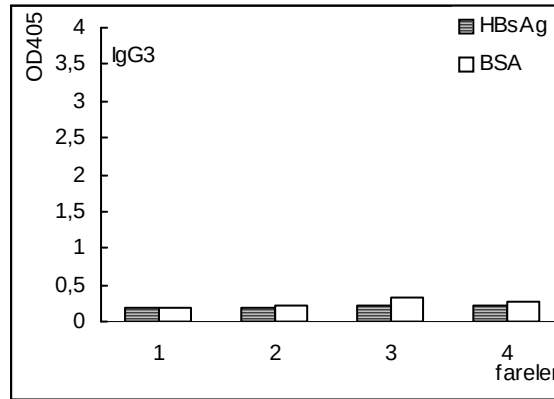
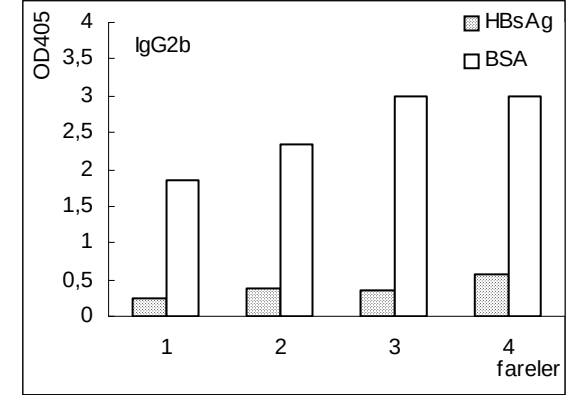
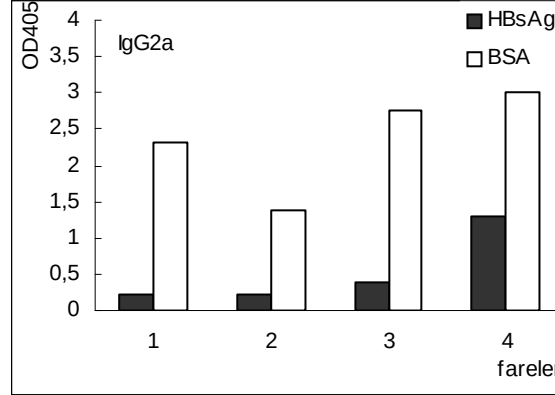
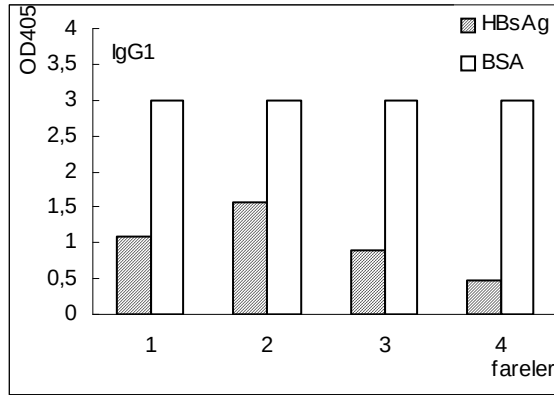
Şekil 4.15. Anti-id 6C9, 6H9 antikorları ve ticari aşı ile bağışıklanma sonrası 91. güne ait poliklonal yanıtları



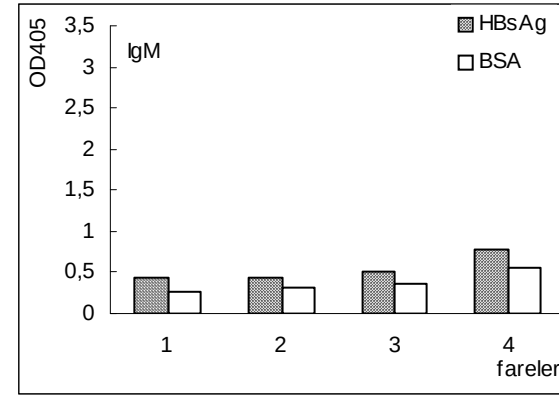
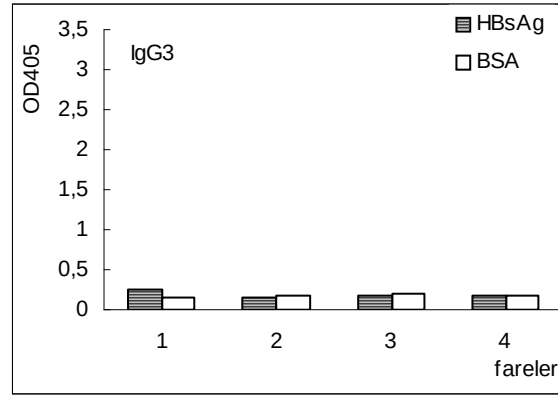
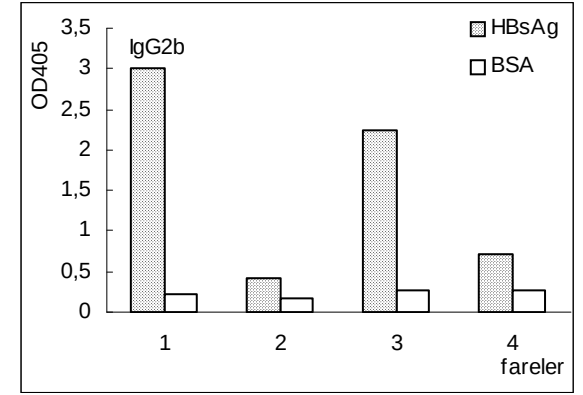
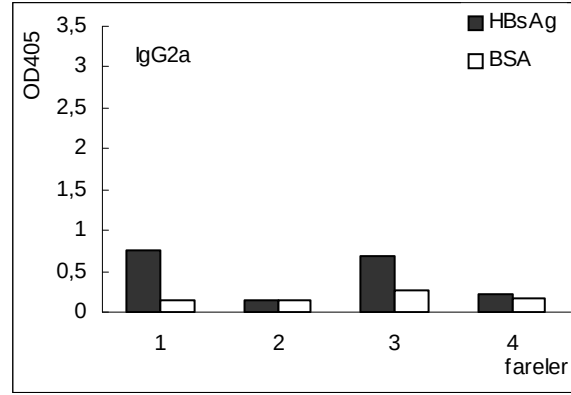
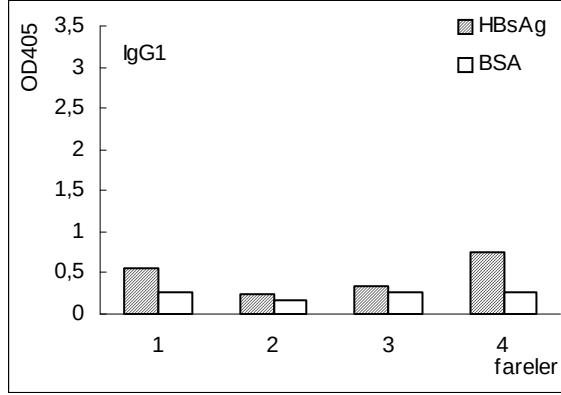
Şekil 4.16. Farelerin anti-id 6C9 antikoruna ile bağışıklanma sonrası 35. güne ait serumdaki farklı antikor yanıtları



Şekil 4.17. Farelerin ticari aşı ile bağışıklanma sonrası 35. güne ait serumdaki farklı antikor yanıtları



Şekil 4.18. Farelerin anti-id 6C9 antikoruna ile bağışıklanma sonrası 63. güne ait serumdaki farklı antikor yanıtları

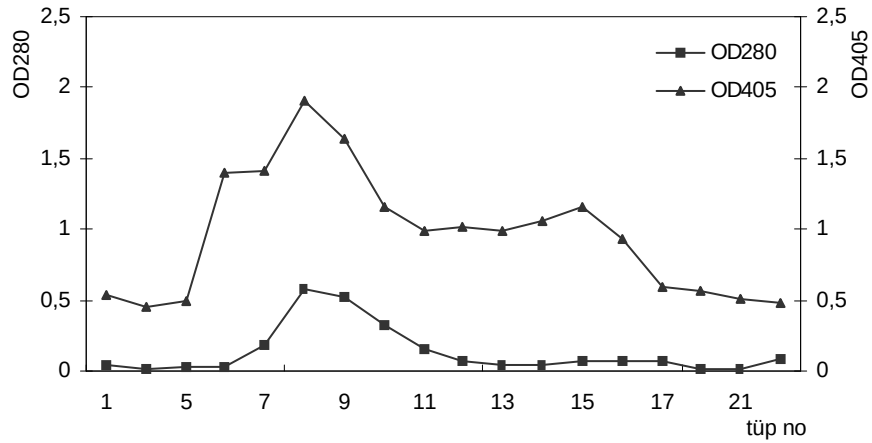


Şekil 4.19. Farelerin ticari aşı ile bağışıklanma sonrası 63. güne ait serumdaki farklı antikör yanıtları

4.8. Serumsuz Ortamda Üretilen Anti-id 6C9 Antikorumun S-300 Jel Filtrasyon Kolon Kromatografisi ile Saflaştırılması

Farklı saflaştırma teknikleri kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen antikorun farklı proteinlere de yanıt oluşturduğu gözlemlendi. Antikorumun serumlu ortamda geliştirilmesinin bu duruma yol açtığı düşünüldü. Bu nedenle daha saf antikor eldesi için serumsuz ortamda hücre üretimi çalışmaları yapıldı.

Serumsuz besiyerinde geniş ölçekte üretilen anti-id 6C9 antikorunun üst sıvısına amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemi uygulandı. Antikor S-300 jel filtrasyon kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Kolon sonrası kesimlere sandviç ELISA uygulandı. Bu antikorun saflaştırma sonucu şekil 4.20’de gösterilmiştir.

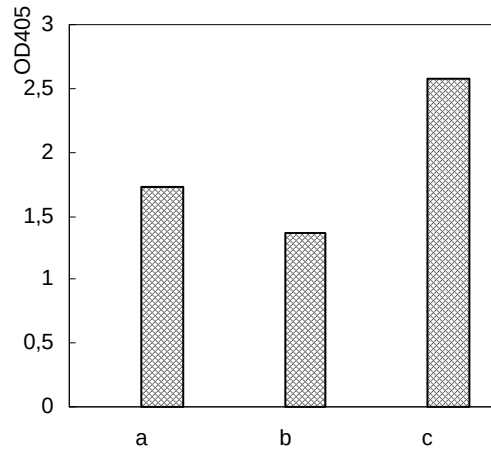


Şekil 4.20. Serumsuz ortamda üretilen anti-id 6C9 antikorunun S-300 jel filtrasyon kolon kromatografisiyle saflaştırılması

4.9. Distile Suyu Karşı Diyaliz ile Saflaştırma

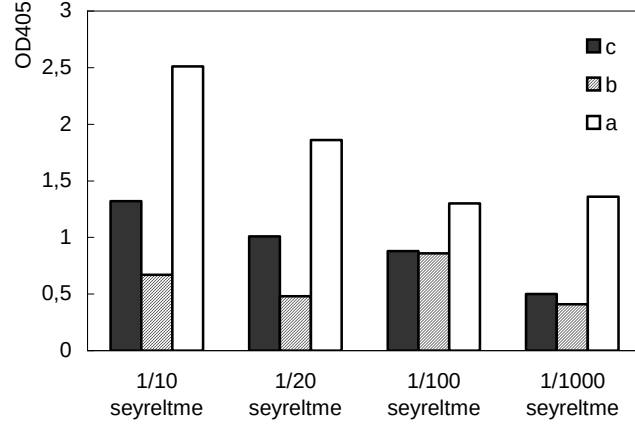
4.9.1. Serumsuz Ortamda Üretilen Anti-id 6C9 Antikorumun Distile Suyu Karşı Diyalizi

S-300 saflaştırma sonrası elde edilen anti-id 6C9 antikorumun farelere bağışıklanmasından sonra farelerin serumlarında BSA'ya özgü antikor yanıtı oluşmuştur. Bu durumu ortadan kaldırmak için serumsuz besiyerinde geniş ölçekte üretilen anti-id 6C9 antikorumun üst sıvısı distile suya karşı diyaliz edildi. Diyaliz sonrası santrifüj işlemiyle elde edilen çöken örnekteki protein miktarı OD₂₈₀'de 1.12 mg/ml olarak belirlendi. Hücre kültür üst sıvısı, diyalizde üst sıvıda kalan antikor ve çöken antikor örneklerinin 1/2 seyreltmedeki ELISA sonuçları şekil 4.21'de gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Distile suya karşı diyaliz sonrası elde edilen örneklerin ELISA sonuçları
(a. hücre kültür üst sıvısı, b. diyalizde üst sıvıda kalan antikor örneği,
c. diyalizde çöken antikor örneği)

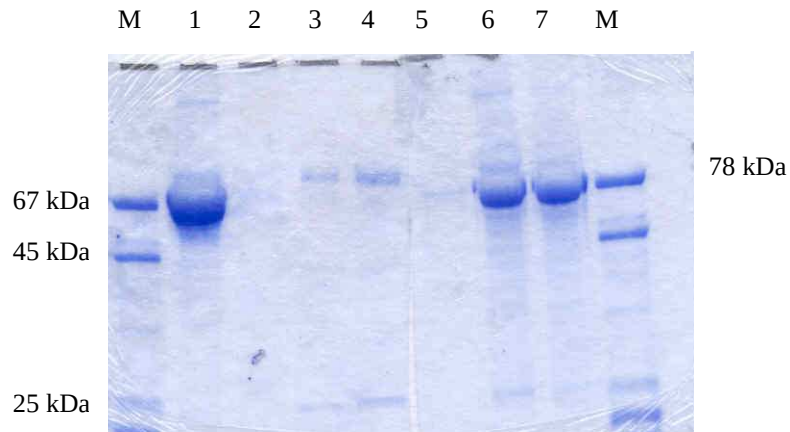
Hücre kültür üst sıvısı, diyalizde üst sıvıda kalan antikor ve çöken antikor örneklerinin farklı seyreltmedeki ELISA sonuçları şekil 4.22’de gösterilmiştir.



Şekil 4.22. Distile suya karşı diyaliz saflaştırması ile elde edilen örneklerin farklı seyreltmelerdeki anti-HBsAg keçi antikoruna karşı yanıtları (a. diyalizde çöken antikor örneği, b. diyalizde üst sıvıda kalan antikor örneği, c.hücre kültür üst sıvısı)

4.9.2. Serumsuz Ortamda Üretilen Anti-id 6C9 Antikorumun Distile Suyu Karşı Diyaliz Sonrası SDS-PAGE

Serumsuz ortamda üretilen anti-id 6C9 antikorumun distile suya karşı diyalizi ile elde edilen örneklere % 10'luk indirgenmiş SDS-PAGE uygulandıktan sonraki jel profili şekil 4.23'de gösterilmiştir. Bu yöntemle anti-id 6C9 antikorumun tamamen saf bir şekilde elde edildiği tespit edilmiştir.



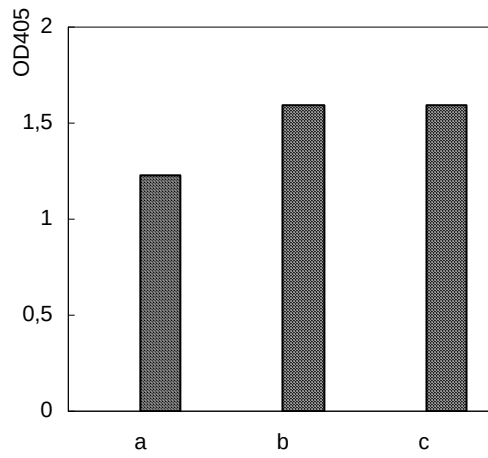
Şekil 4.23. Serumsuz ortamda üretilen anti-id 6C9 antikorumun distile suya karşı diyaliz sonrası örneklerin SDS-PAGE’te görünümü.

M: BSA (67 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Kimotripsinojen A (25 kDa);

- 1) % 10 serumlu üst sıvı; 2) serumsuz üst sıvı; 3-4) distile suya diyaliz sonrası çöken örnek; 5) üst kesim; 6) S-300 jel filtrasyon kolon sonrası 8 no’lu kesim; 7) 9 no’lu kesim

4.9.3. % 10 Serumlu Ortamda Üretilen Anti-id 6C9 Antikorumun Distile Suyu Karşı Diyalizi

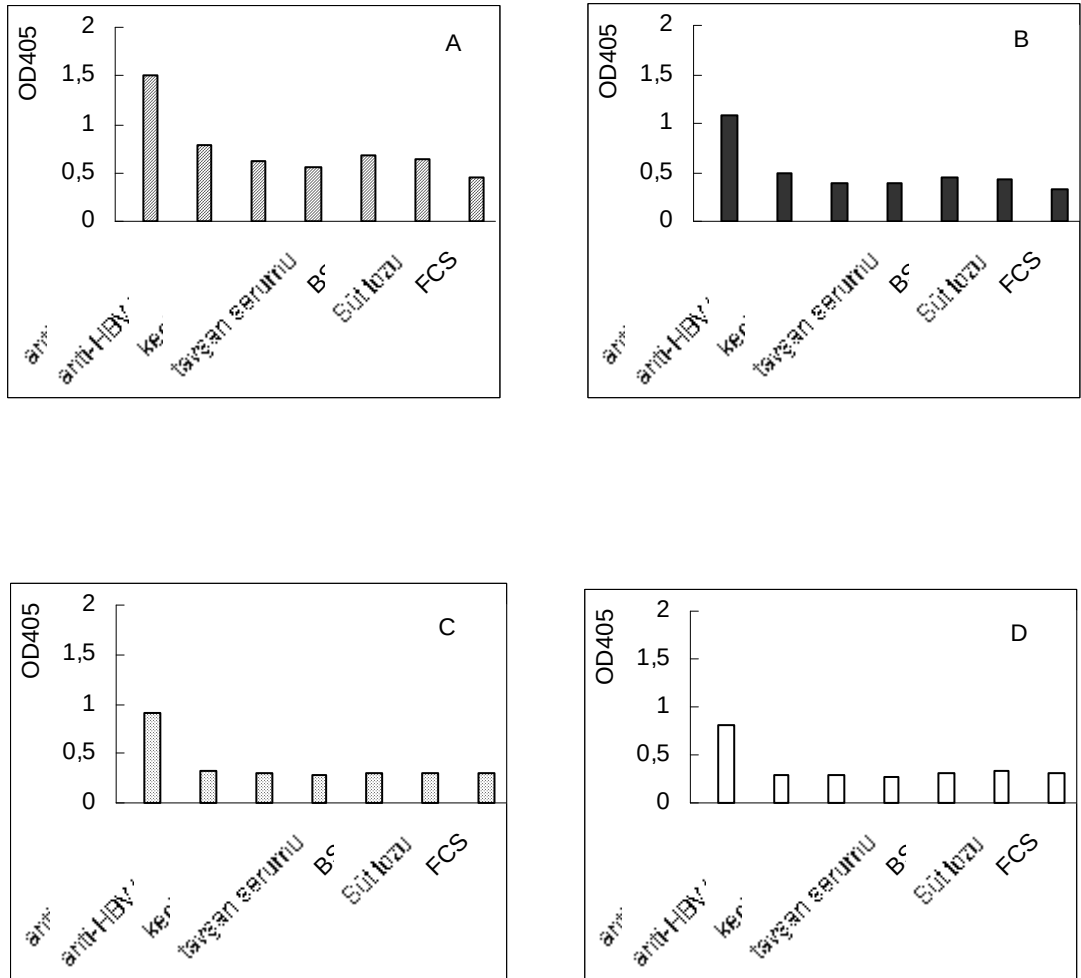
% 10 serumlu besiyerinde geniş ölçekte üretilen anti-id 6C9 antikorumun üst sıvısı distile suya karşı diyaliz edildi. Diyaliz sonrası santrifüj işlemiyle elde edilen çöken örnekteki protein miktarı OD₂₈₀'de 4.24 mg/ml olarak belirlendi. 1/2 seyreltmede hücre kültür üst sıvısı, diyalizde üst sıvıda kalan antikor ve çöken antikor örneklerine ELISA uygulandı. Bu örneklerin ELISA sonuçları şekil 4.24'de gösterilmiştir.



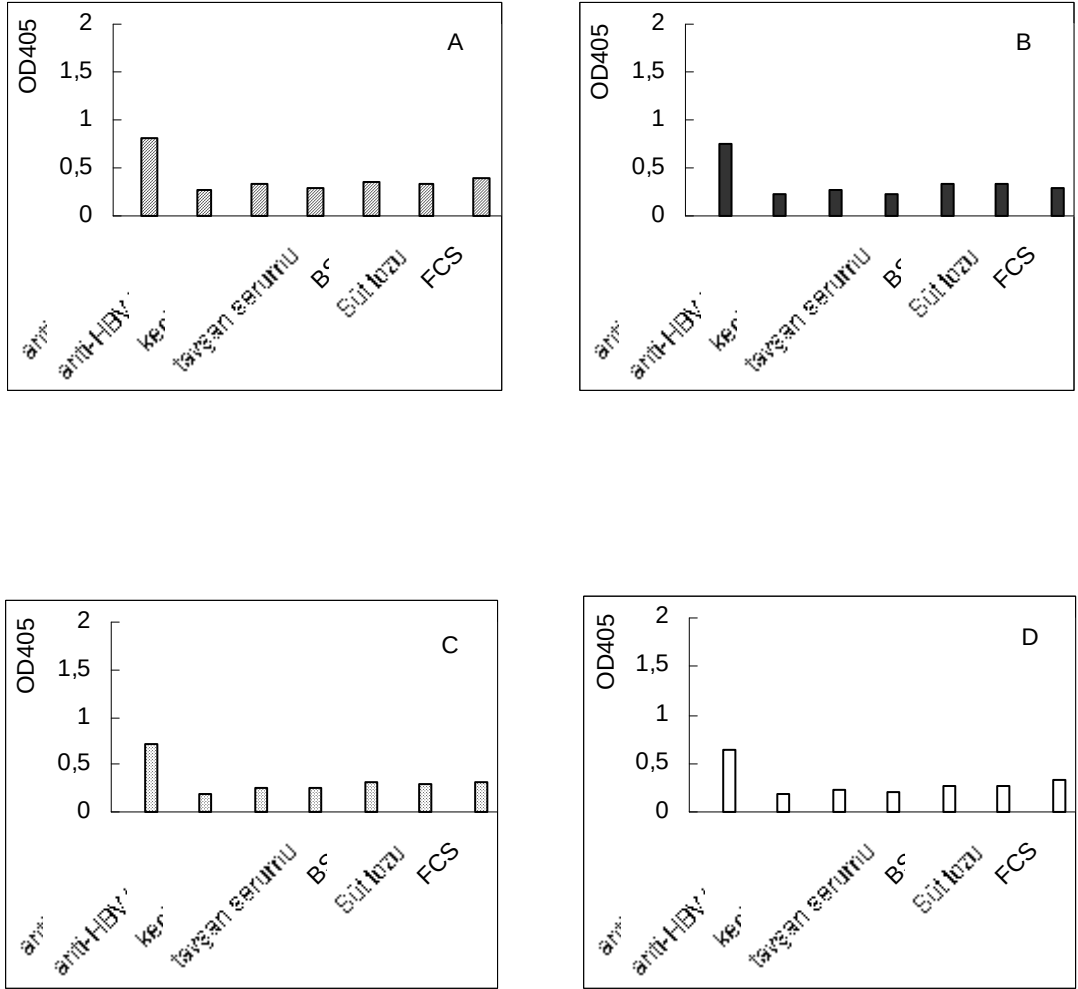
Şekil 4.24. Distile suya karşı diyaliz sonrası elde edilen örneklerin ELISA sonuçları
(a. hücre kültür üst sıvısı, b. diyalizde üst sıvıda kalan antikor örneği,
c. diyalizde çöken antikor örneği)

4.10. Farklı Yöntemlerle Saflaştırılan Anti-id 6C9 Antikorların Farklı Proteinlerle Değişik Seyreltmelerdeki Çapraz Reaksiyonları

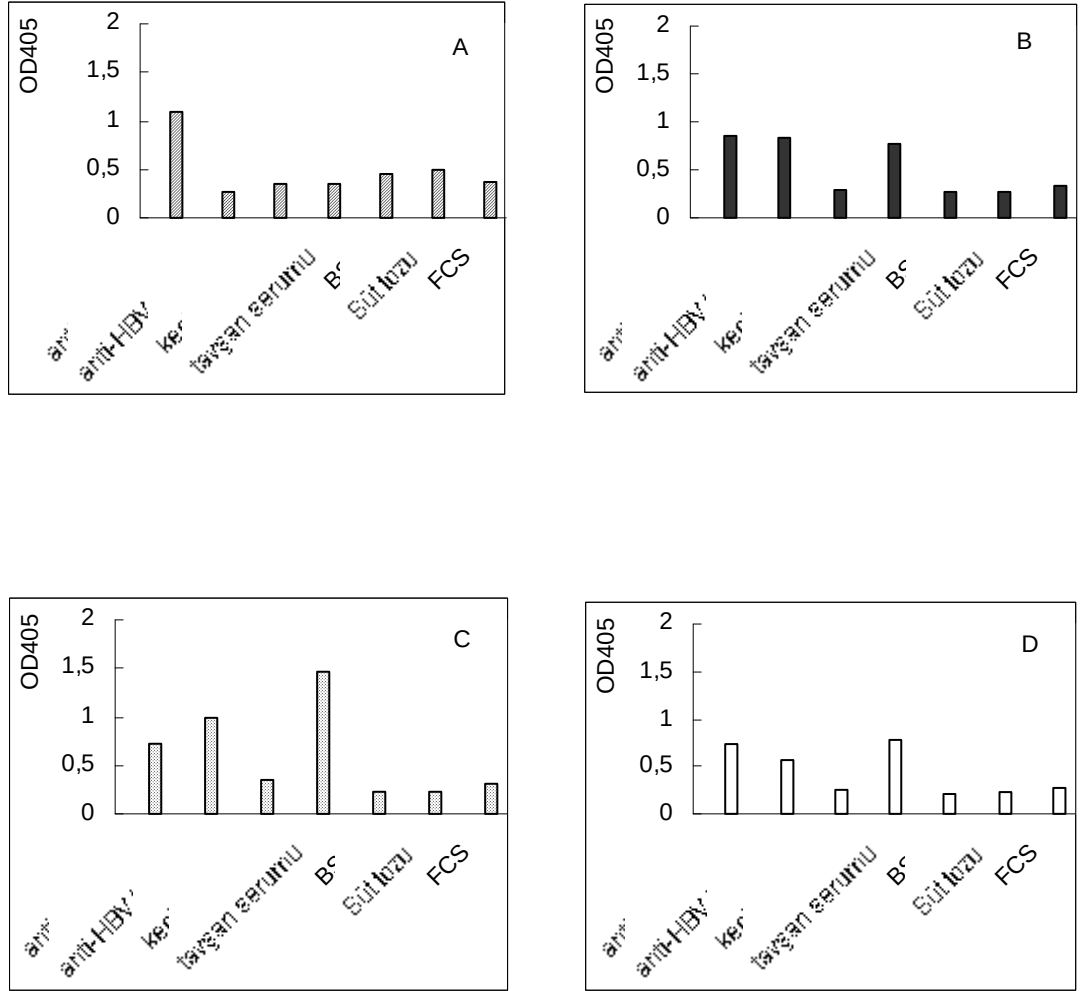
% 10 serumlu ve serumsuz besiyerinde üretilen anti-id 6C9 antikor üst sıvısının S-300 jel filtrasyon kromatografisi, DE52 iyon değişimi kromatografisi ve distile suya karşı diyalizi sonrası elde edilen saf antikorların farklı proteinlerle değişik seyreltmelerdeki çapraz reaksiyonlarını tespit edebilmek için yapılan ELISA sonuçları şekil 4.25, 4.26, 4.27 ve 4.28’de gösterilmiştir.



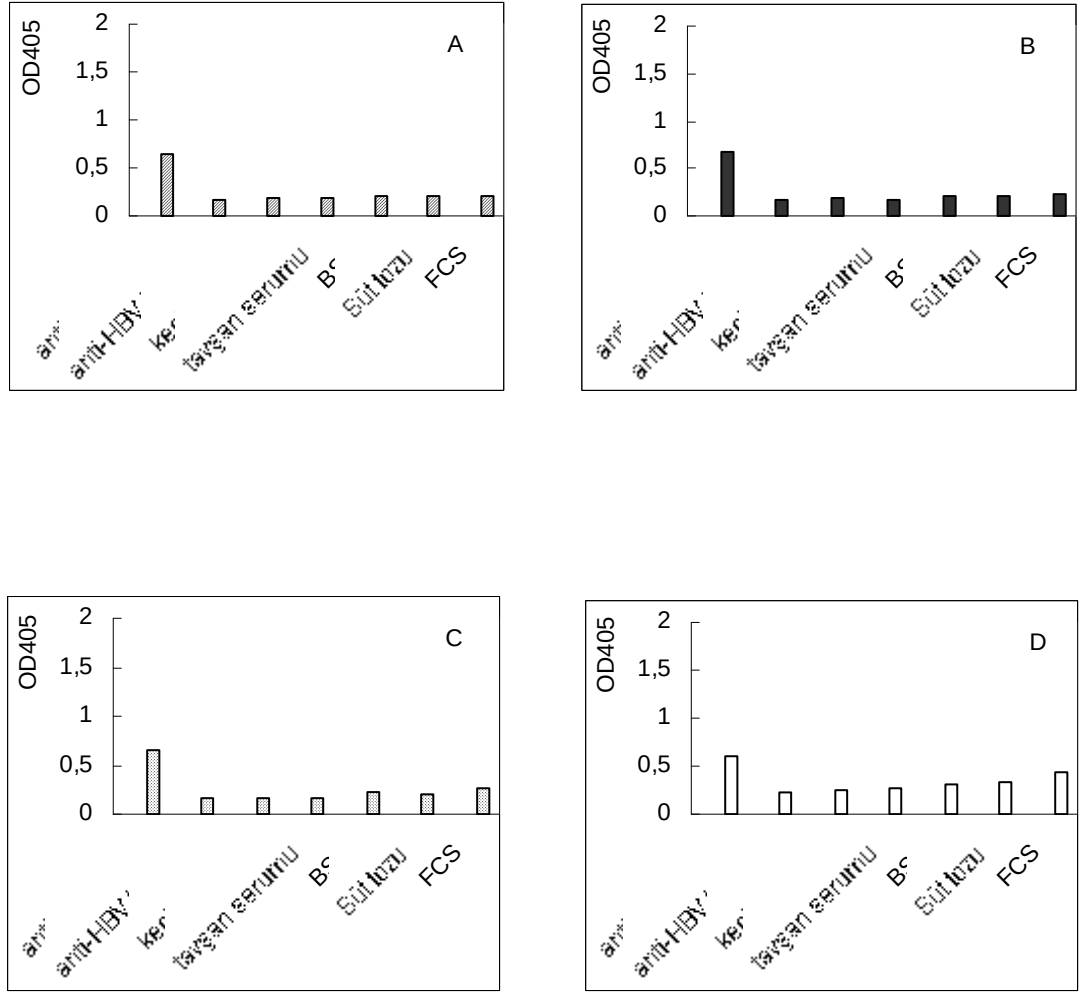
Şekil 4.25. Anti-id 6C9 antikorunun % 10 serumlu üst sıvısının S-300 jel filtrasyon kromatografisi sonrası farklı seyreltmelerdeki ELISA sonuçları
A(1/10), B(1/25), C(1/50), D(1/100)



Şekil 4.26. DE52 iyon değıştirme kromatografisi sonrası elde edilen anti-id 6C9 antikorun farklı seyreltmelerdeki ELISA sonuçları
A(1/10), B(1/25), C(1/50), D(1/100)



Şekil 4.27. % 10 serumlu ortamda üretilerek distile suya karşı diyaliz edilen anti-id 6C9 antikorun farklı seyreltmelerdeki ELISA sonuçları
A(1/10), B(1/25), C(1/50), D(1/100)



Şekil 4.28. % 10 serumlu besi yerinde üretilen anti-id 6C9 antikor üst sıvının farklı seyreltmelerdeki ELISA sonuçları
A(1/10), B(1/25), C(1/50), D(1/100)

Bu çalışmaların paralelinde anti-id 6C9 antikorunun % 10 serumlu üst sıvısının, S-300 jel filtrasyon kromatografisi, DE52 iyon değişimi kromatografisi ve distile suya karşı diyalizi sonrası 1/50 seyreltme oranındaki “keçi anti-HBsAg poliklonal antikor” ve “farklı proteinler” ile elde edilen sandviç ELISA sonuçları çizelge 4.4’de ve geniş seyreltme aralıklarındaki sonuçları çizelge 4.5’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı saflaştırma teknikleri ile elde edilen anti-id 6C9 antikorun 1/50 seyreltme oranındaki “keçi anti-HBsAg poliklonal antikor” ve “farklı proteinler” ile yapılan sandviç ELISA sonuçları

Antijenler	S-300	DE52	distile suya diyaliz	hücre kültür üst sıvı
Anti-HBsAg keçi	0,90	0,72	0,72	0,65
Anti-HBsAg tavşan	0,33	0,20	0,98	0,16
Keçi serumu	0,30	0,25	0,35	0,17
Tavşan serumu	0,28	0,25	1,47	0,17
BSA	0,30	0,31	0,22	0,22
Süt tozu	0,31	0,30	0,23	0,21
FCS	0,30	0,31	0,31	0,27

Çizelge 4.5. Serumsuz ortamda üretilerek distile suya karşı diyaliz edilen anti-id 6C9 antikorun geniş seyreltme aralıklarındaki “keçi anti-HBsAg poliklonal antikor” ve “farklı proteinler” ile yapılan sandviç ELISA testi sonuçları

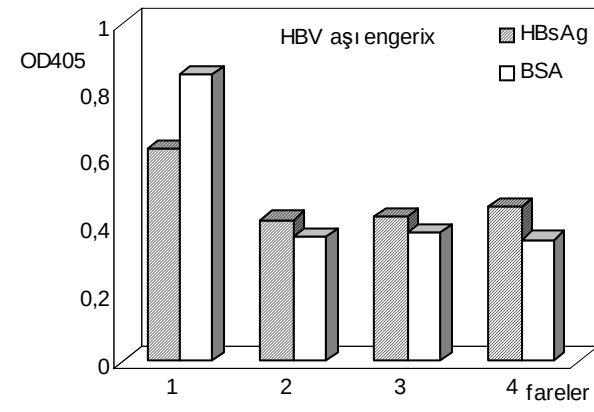
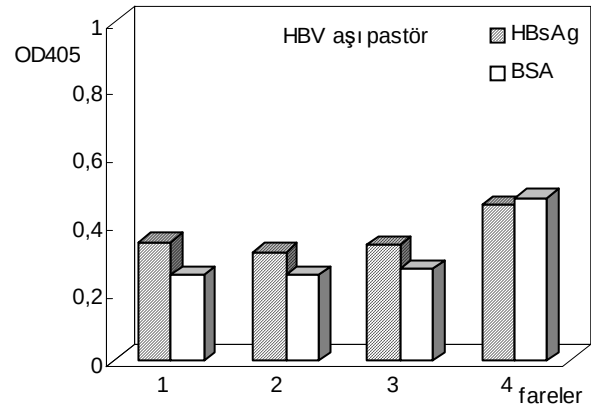
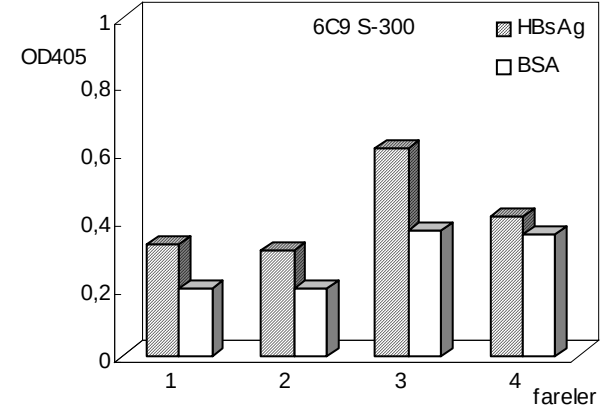
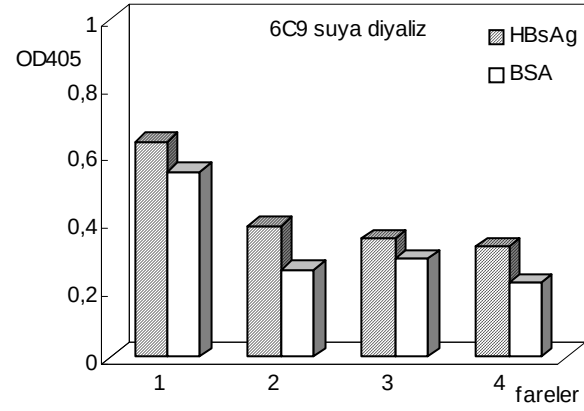
Antijenler	Antikor seyreltme oranları											
	1/100	1/500	1/1000	1/2500	1/5000	1/10000	1/20000	1/30000	1/50000	1/100000	1/150000	1/200000
Anti-HBsAg keçi	0,81	0,58	0,49	0,44	0,42	0,36	0,33	0,30	0,27	0,21	0,19	0,28
Anti-HBsAg tavşan	2,99	1,88	0,92	0,43	0,40	0,24	0,17	0,15	0,16	0,13	0,15	0,20
Keçi serumu	1,94	0,77	0,47	0,28	0,26	0,21	0,18	0,17	0,17	0,15	0,16	0,20
Tavşan serumu	3,00	2,18	1,04	0,61	0,57	0,35	0,20	0,17	0,16	0,14	0,14	0,22
BSA	0,22	0,18	0,14	0,14	0,14	0,14	0,12	0,12	0,12	0,12	0,13	0,18
Süt tozu	0,36	0,24	0,17	0,16	0,15	0,16	0,14	0,15	0,14	0,14	0,16	0,19
FCS	0,35	0,27	0,22	0,19	0,18	0,17	0,15	0,16	0,17	0,16	0,17	0,16

4.11. Farklı Saflaştırma Teknikleri Uygulanarak Elde Edilen Saf Anti-idiotip Antikorların, Ticari Hepatit B Aşıları ile Farelerde HBsAg'ne Karşı Oluşturduğu Antikor Yanıtının Belirlenmesi

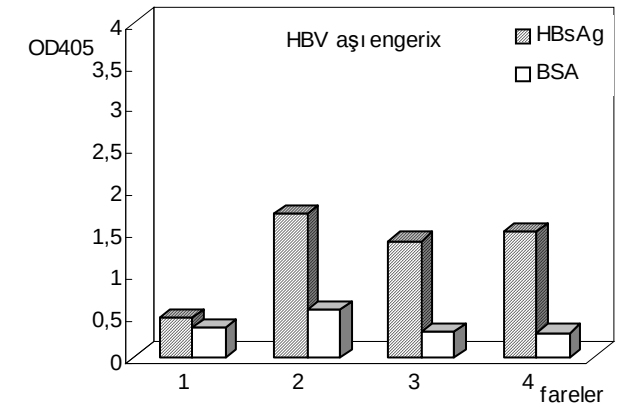
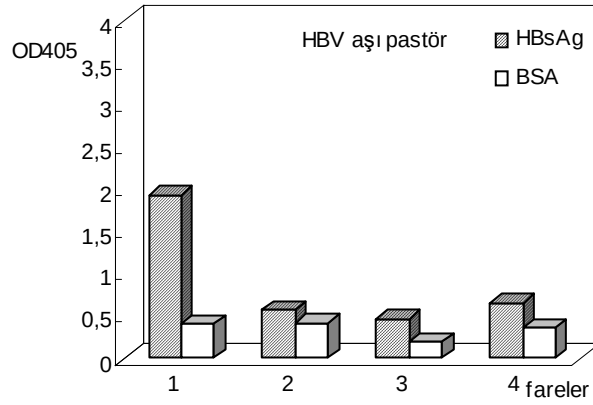
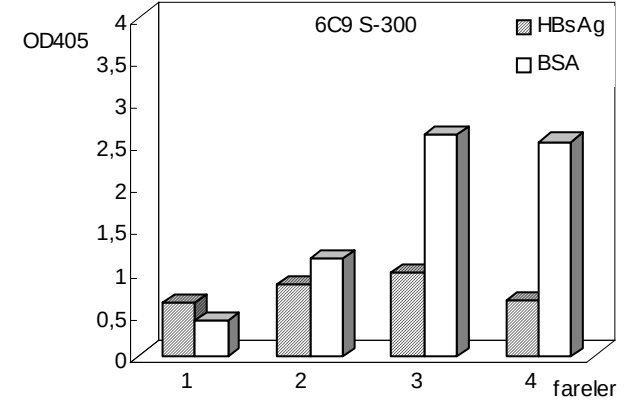
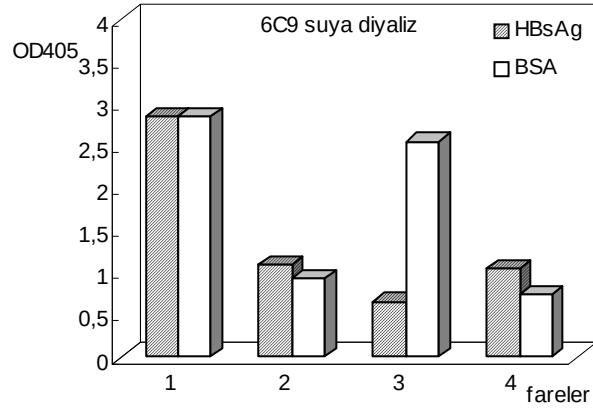
% 10 serumlu ortamda üretilerek distile suya karşı diyaliz ile saflaştırılan anti-id 6C9 antikorunun, S-300 jel filtrasyon saflaştırma sonrası elde edilen anti-id 6C9 antikorunun (kontrol antikor olarak), ticari Hepatit B aşıları (Gen Hevac B Pasteur, Engerix) ile karşılaştırmalı olarak fareler üzerinde (*in vivo* sistemde) anti-HBsAg antikor yanıtı incelendi.

Fare başına (10 µg, 25 µg, 50 µg, 100 µg) farklı dozlarda saf anti-idiotip antikorlar ve 1 µg dozda ticari aşılar (Pastör ve Engerix) ile bağışıklama yapıldı. 2. bağışıklama 35.günde aynı koşullarda tekrarlandı.

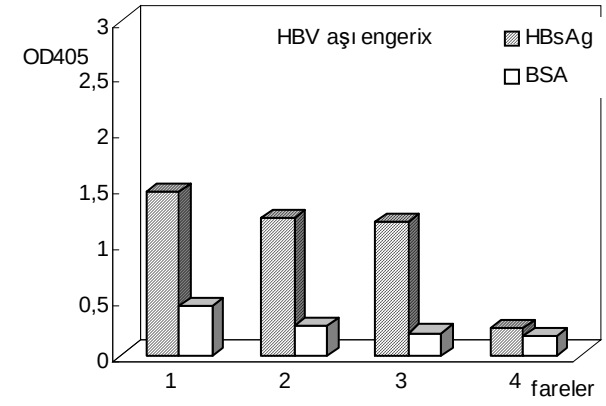
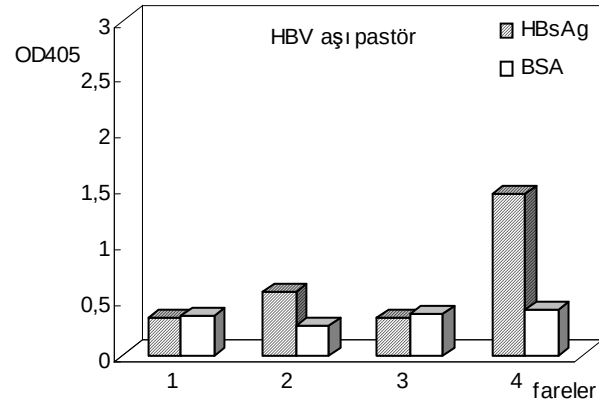
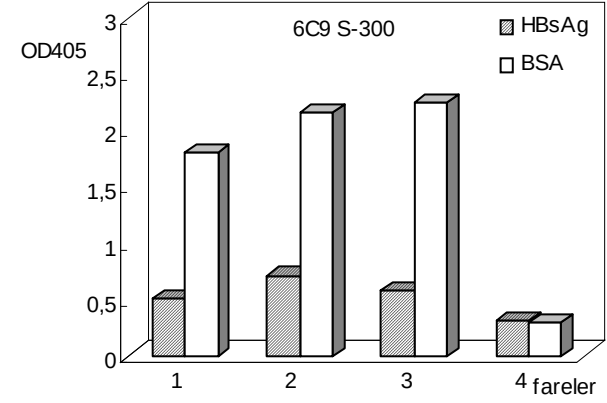
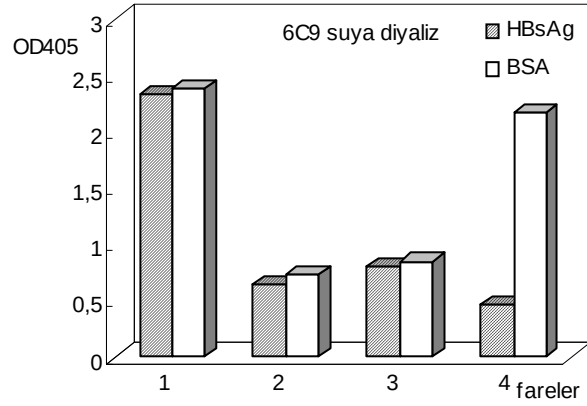
Bağışıklanan farelerin PBS ile 1/100 seyreltilen serumlarındaki HBsAg antikor yanıtları dolaylı ELISA testi ile belirlendi. Şekil 4.29, 4.30, 4.31, 4.32 ve 4.33'de 100 µg anti-idiotip antikor ve ticari aşılar ile bağışıklanmış fare grubundaki 1. ve 2. bağışıklanma sonrası farklı günlere ait poliklonal yanıtları gösterilmiştir.



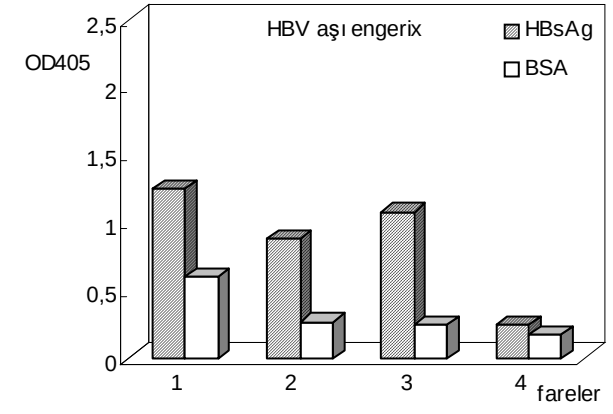
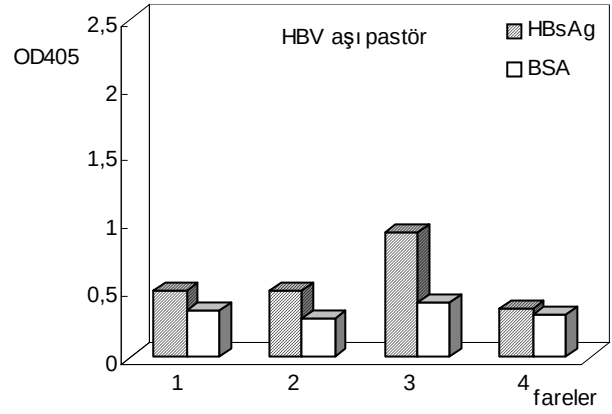
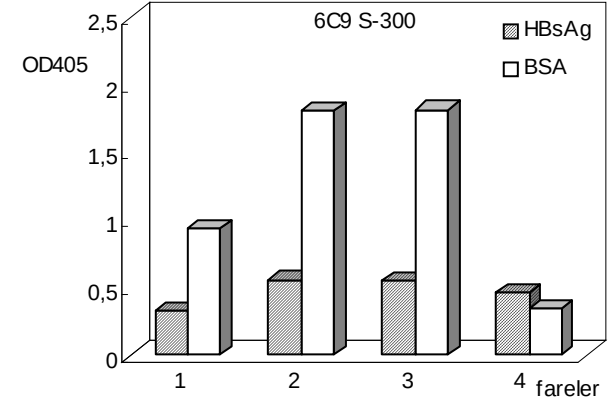
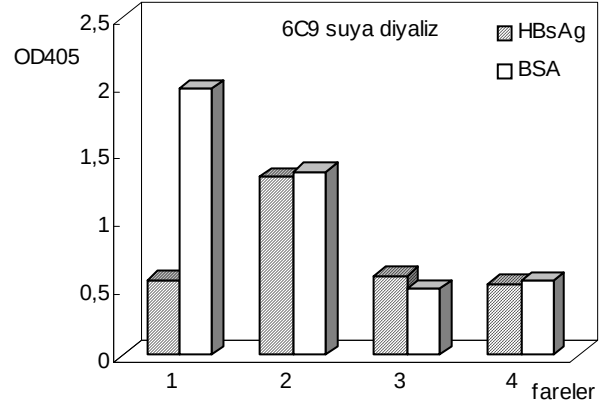
Şekil 4.29. Farelerin anti-id 6C9 antikorü ve ticari aşılar ile bağışıklanma sonrası 7. güne ait poliklonal yanıtları



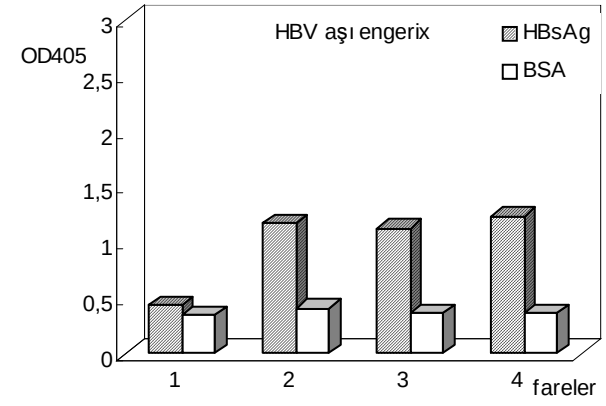
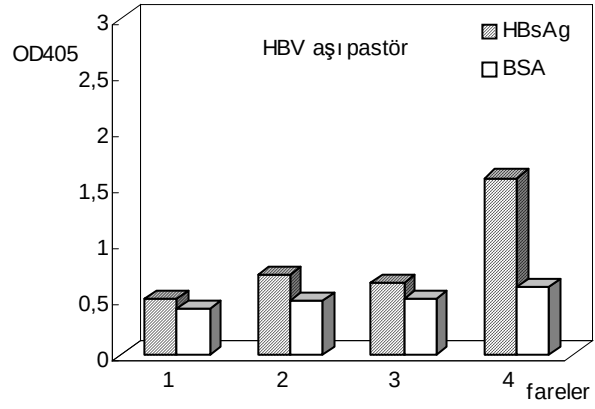
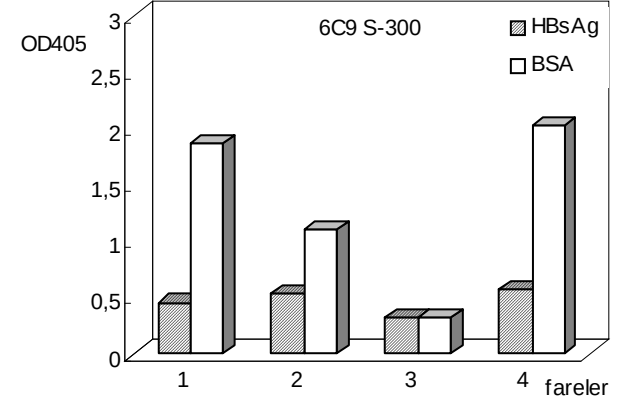
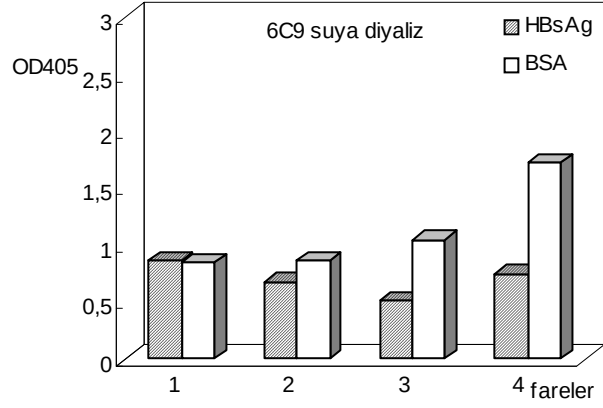
Şekil 4.30. Farelerin anti-id 6C9 antikor ve ticari aşilar ile bağışıklanma sonrası 42. güne ait poliklonal yanıtları



Şekil 4.31. Farelerin anti-id 6C9 antikoru ve ticari aşılar ile bağışıklanma sonrası 49. güne ait poliklonal yanıtları



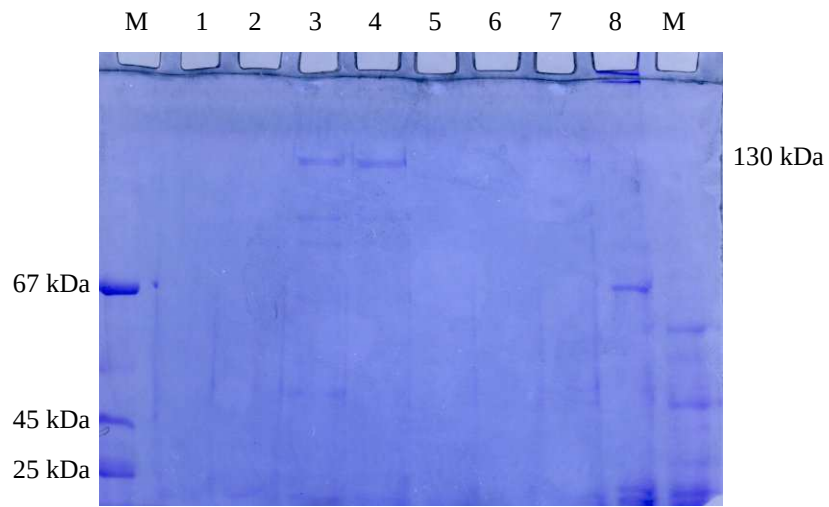
Şekil 4.32. Farelerin anti-id 6C9 antikoruna ve ticari aşılardan bağışıklanma sonrası 56. güne ait poliklonal yanıtları



Şekil 4.33. Farelerin anti-id 6C9 antikoru ve ticari aşılar ile bağışıklanma sonrası 77. güne ait poliklonal yanıtları

4.12. %10 Serumlu Ortamda Üretilen Anti-id 6C9 Antikorumun Distile Suyu Karşı Diyaliz ve Pepsin Kesim Sonrası Gradyent SDS-PAGE

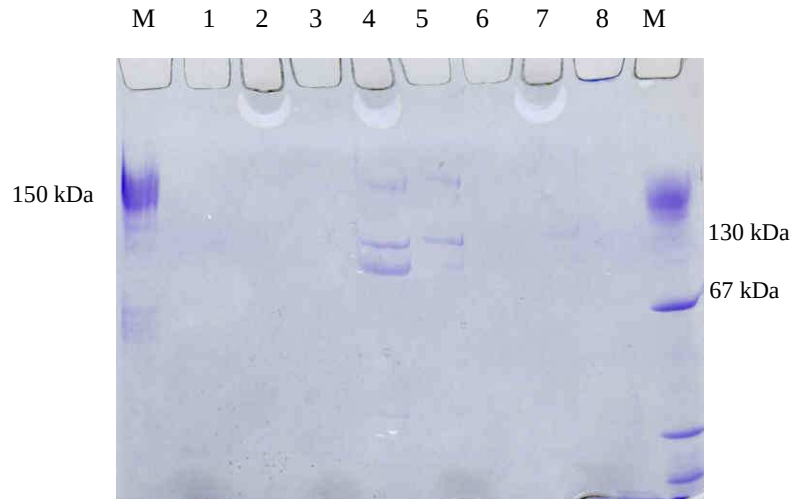
Distile suya karşı diyaliz edilen anti-id 6C9 antikorunda yalnızca HBsAg yanıtı oluşturmak için pepsin kesim ile Fab fragmanlar elde edildi. Bu örneklerin gradiyent %6 ve %15'lik indirgenmemiş SDS-PAGE uygulandıktan sonraki jel profili şekil 4.34'de gösterilmiştir.



Şekil 4.34. Anti-id 6C9 antikorunun distile suya karşı diyaliz sonrası pepsin kesimlerin gösterilmesi.

M: BSA (67 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Kimotripsinojen A (25 kDa);
 1) S-300 jel filtrasyon kolon sonrası 9 no'lu kesim; 2) 8 no'lu kesim;
 3) 7 no'lu kesim; 4) 6 no'lu kesim; 5) 5 no'lu kesim; 6) 4 no'lu kesim;
 7) pepsin kesim sonrası örnek; 8) %10 serumlu distile suya diyaliz sonrası çöken örnek

Farklı markır proteinler kullanılarak deneyin tekrarlanması sonucu elde edilen Fab fragmanlarının profili şekil 4.35’de gösterilmiştir.



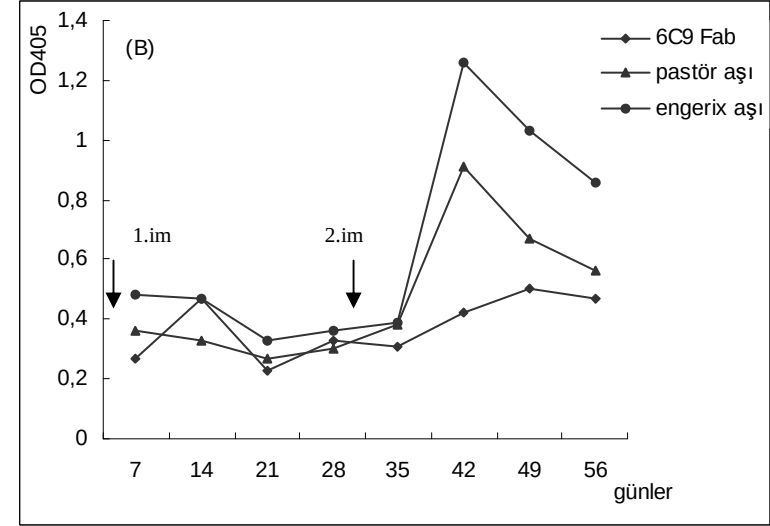
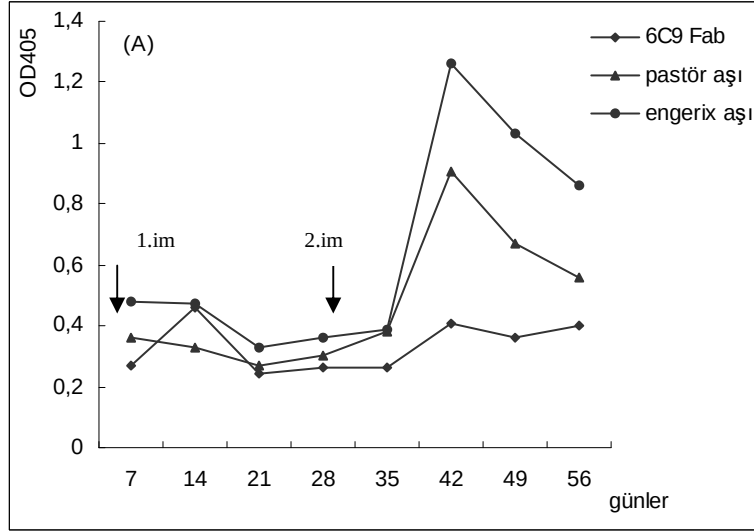
Şekil 4.35. Gradyent % 6 ve % 15’lik indirgenmemiş SDS-PAGE ile Fab fragmanlarının gösterilmesi.

M: IgG (152 kDa) 1) S-300 jel filtrasyon kolon sonrası 11 no’lu kesim; 2) 10 no’lu kesim; 3) 9 no’lu kesim; 4) 8 no’lu kesim; 5) 7 no’lu kesim; 6) 6 no’lu kesim; 7) pepsin kesim sonrası örnek; 8) serumsuz distile suya diyaliz sonrası çöken örnek; M: IgG (152 kDa), BSA (67 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Kimotripsinojen A (25 kDa)

4.13. Pepsin Kesim Sonrası Anti-id 6C9 Antikor Fab Fragmanları ile Bağışıklanan Farelerin Antikor Yanıtları

Pepsin kesim ile elde edilen anti-id 6C9 antikor Fab fragmanları (25 µg ve 50 µg /fare) olacak şekilde 0. ve 30. günlerde yapılan bağışıklamalarda kullanıldı. Her bir enjeksiyonda adjuvan olarak FIA uygulandı.

PBS ile 1/100 seyreltilen fare serumlarındaki HBsAg antikor yanıtları dolaylı ELISA ile belirlendi. Şekil 4.36’da farelerin anti-id 6C9 antikor Fab fragmanlarının 25 µg ve 50 µg farklı dozları ve ticari aşılardan 1 µg ile bağışıklanma sonrası farklı günlere ait poliklonal yanıtları gösterilmiştir.

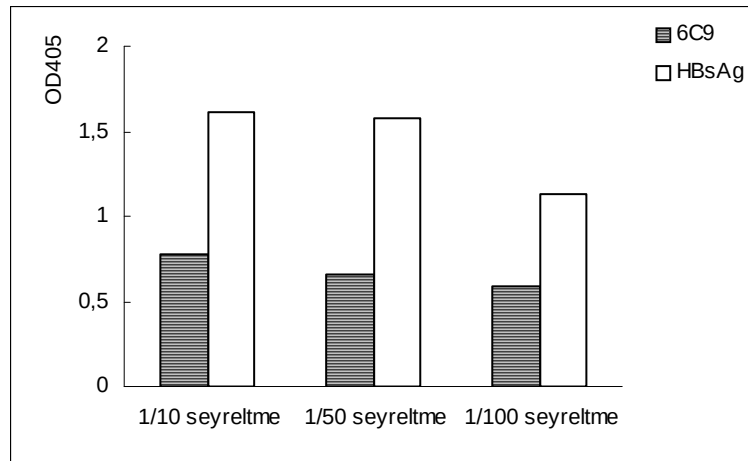


Şekil 4.36. Anti-id 6C9 antikoruna Fab fragmanlarının A(25 µg) ve B(50 µg) ve ticari aşılar ile bağışıklanma sonrası farklı günlere ait poliklonal yanıtları

4.14. Anti-idiotip 6C9 Antikoru'nun HBsAg'ni Taklit Etme Özelliğinin İncelenmesi

HBsAg (20 ng/ml) ve anti-id 6C9 (1/10, 1/50 ve 1/100 seyreltme) antikoru ile kaplanan ELISA plağına sırasıyla %1'lik süt tozu, keçiye geliştirilen anti-HBsAg poliklonal antikoru (100 ng/ml), tavşanda geliştirilen anti-keçi IgG-AP konjugatı (1/5000 seyreltme) ve PNPP substrat tampon içinde hazırlanan PNPP (1 mg/ml) eklendi. Absorbans 405 nm'de okundu.

Serumsuz ortamda üretilerek distile suya karşı diyaliz edilen farklı seyreltmelerdeki anti-id 6C9 antikoru'nun ve HBsAg'nin ELISA sonuçları şekil 4.37'de gösterilmiştir.



Şekil 4.37. Farklı seyreltmelerdeki anti-id 6C9 antikoru ve HBsAg'nin ELISA test sonuçları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hepatit B dünyadaki en yaygın enfeksiyonlardan biridir. Dünya nüfusunun 2/5'si HBV ile enfekte durumdadır [Banatvala et al., 2001]. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre tüm dünyada yaklaşık 300-350 milyon kişi bu virüsü taşımakta, her yıl yaklaşık 50 milyon yeni hepatit B vakası ortaya çıkmakta ve 1-2 milyon kişi doğrudan HBV enfeksiyonu ve komplikasyonlarına bağlı nedenlerle yaşamını yitirmektedir [Lee, 1997; Lok, 2000; Jung and Pape, 2002]. Ülkemizde HBsAg taşıyıcılığı (% 4-10) orta-yüksek endemisite sınırlarındadır [Balık, 2000].

Viral hepatitler karaciğeri etkileyen sistemik enfeksiyonlardır. Kan yoluyla bulaşan HBV, HCV ve HDV ile kronik karaciğer hastalığı, siroz ve karaciğer kanseri gelişebilmektedir. Bu yönleriyle ele alındığında viral hepatit tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır [Lemon, 1997; Bayraktar ve Türkoğlu, 1998].

HBV esas olarak enfekte kan ve vücut sıvıları ile parenteral temas, cinsel yol, enfekte anneden yenidoğana bulaşma ile geçer. Bulaşma riski kan ve vücut sıvılarında bulunan enfekte edici virüs partikül sayısı ile orantılıdır [Uzun, 1998; Koff, 2002].

Hepatit B'den korunma; genel koruyucu önlemlerin yanısıra aktif ve pasif immünizasyon yoluyla da sağlanır. Toplumda HBV'nün kontrolünde etkili tek yol rutin olarak hepatit B aşılmasıdır [Howard and Zuckerman, 1990; Balık, 2000].

Hepatit B aşılı; kronik HBV taşıyıcılarının serumlarından veya rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak maya ve memeli hücrelerinden olmak üzere iki yoldan elde edilir. Her iki aşı da alüminyum tuzları ve koruyucu madde olarak tiyomersal içerir. Kimyasal ve immünolojik açıdan birbirine benzer özelliklere sahiptirler [Lemon and Thomas, 1997; Ellis, 1999].

Günümüzde rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilen HBV aşısı kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından HBV aşısı kanserden korunmada

geliştirilmiş ilk aşı olarak kabul edilmektedir [Akova, 1998]. HBV aşıları birçok insanda immünojenik etkiye sahiptir ve güvenli bir şekilde kullanılmaktadır [Lemon and Thomas, 1997]. Bununla beraber bireylerin % 5-11'inde ve HBV taşıyıcılarında aşıya iyi yanıt alınamaz [Shearer et al., 1998].

HBV aşısı geliştirme çalışmalarına farklı bir yaklaşım da anti-idiotip antikorların kullanılmasıdır. Antikor molekülünün değişken bölgesinde bulunan ve antijene spesifik olarak bağlanan idiyotip (Id) bölgeye karşı gelişen antikora anti-idiotip antikor denir [Bhattacharya-Chatterjee et al., 2000; Mitra-Kaushik et al., 2001]. Anti-idiotip antikor, orjinal antijenin antikora bağlanma dizisini taklit ederek antikor oluşumunu uyarır [Skaletsky, 1997; Lesinski and Westerink, 2001].

Anti-idiotip antikorların antijeni taklit edebilme özellikleri, deneysel anti-idiotip aşılarda üretiminde alternatif bir yöntemdir ve bunlar geleneksel aşılarla oranla birçok avantaj sağlarlar. Anti-idiotip antikorlar hibridoma teknolojisi ile hücre kültürü ve asit sıvılarında geniş ölçekte, kısa sürede ve düşük maliyetle üretilebilirler [Bhattacharya-Chatterjee et al., 2000]. Anti-idiotip aşılarda üretimi için yüksek miktarda saf antijene ihtiyaç duyulmaz. Özellikle virulansın yüksek olduğu yerlerde, antijenlerin büyük ölçekli üretim ve saflaştırılmalarının uygun olmadığı durumlarda anti-idiotip antikor, güvenli olarak üretilerek saflaştırılabilir [Eichmann et al., 1987; Bendandi, 2000]. Zayıflatılmış patojenlerin aşı olarak kullanılması sırasında etkenin tekrar virulans forma dönüşme riski hastalığa neden olabilir. Anti-idiotip aşılarda ise antijen içermediğinden istenmeyen yan etkiler oluşurmaz ve hastalık etkeni taşımadıklarından etkili bir koruma sağlarlar [Thanavala, 1989].

Sentetik peptidler, karbonhidrat antijenleri ve subünit aşılarda, genel olarak T hücre yanıtını indüklemeye yeterli değildir. Anti-idiotip antikorlar T hücre immünitesinin önemli olduğu enfeksiyonlarda alternatif olarak kullanılırlar [Eichmann et al., 1987; Monzavi-Karbassi et al., 2002]. Birçok anti-idiotip antikor bir antijenin meydana getirdiği yanıtla eşit bir immün yanıt oluşturabilir bunun yanı sıra immün sistem üzerinde uyarıcı veya baskılayıcı bir etkide de bulunabilir [Shoenfeld et al., 1994].

Anti-idiotiplerin aşı olarak kanser tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılabileceğine ilişkin çalışmalar son yıllarda giderek artmaktadır. Anti-idiotip aşının kolon kanseri, göğüs kanseri, melanoma gibi çeşitli kanser tedavilerinde önemli rol oynadığı bilinmektedir [Luitzky, 2002]. Örneğin; malign hücreler tarafından eksprese edilen tumor-associated antigens (TAA)'leri ya da bu antijenler üzerindeki belirli determinantları taklit eden anti-idiotip antikorlar, kanser hastalarında spesifik immün tedavi için kullanılmışlardır [Somasundaram et al., 1995; Foon et al., 2000]. Anti-idiotip antikorlar kolon, ovaryum ve göğüs kanserli hastalarda çeşitli tümör antijenlerine özgün humoral ve hücrel immün yanıt oluşumuna neden olmuşlardır [Herlyn et al., 1986; Herlyn et al., 1987].

Kansere özgü antijen spesifikliği ile malign hücrelere karşı etkili bir tedavi sağlanmaktadır. İnsan kanser terapisinin önemli sorunlarından biri ise bağışık toleranstır [Maruyama et al., 2000]. Antijen bakımından zengin supernatant içeren multivalen aşı dışında, bir anti-idiotip aşı kullanılarak bağışık tolerans durumu daha kolay giderilebilir [Moingeon, 2001; Lutzky et al., 2002]. Kanser tedavisinde “bağışık tolerans” sorununun anti-idiotip antikorlarla üstesinden gelinebileceği görüşü desteklenmiştir [Herlyn et al., 1996; Birebent et al., 2001]. Örnek olarak; carcinoembryonic antigen (CEA) pozitif tümör içeren hastalar immünolojik olarak CEA'ya tolerans gösterebilirler. Birçok laboratuarda colorectal carcinoma (CRC) gibi kanser hastaları için tümör hücresi tarafından eksprese olan antijenleri taklit eden anti-idiotip antikorların kullanılması önerilmiştir [Fagerberg et al., 1995].

Yine CEA ile yapılan çalışmalarda; CEA'nın spesifik epitopunu taklit eden 3H1 fare monoklonal anti-id antikor geliştirilmiş ve bunun tümör aşısı olarak fare tümör modeli üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu modelde, fare kolorektal kanser hücre dizisine insan CEA geni transfer edilerek CEA taşıyan fare kolorektal kanser hücreleri elde edilmiştir. Fareler 3H1 ile bağışıklandıklarında humoral ve hücrel anti-3H1 yanıt geliştirmişlerdir. Ayrıca 32 hastada % 1 oranında yüksek spesifiklikte yardımcı T (Th) hücre yanıt oluşmuştur. 3H1'in tümör aşısı olarak tedavi edici özelliği olabileceği, tümör hücreleri tarafından eksprese olan antijenleri taklit eden anti-idiotip antikorların kombine edilerek kullanılabileceği önerilmiştir [Bhattacharya-Chatterjee et al., 2000].

T hücre lösemi/lenfoma ile ilişkili antijen, CEA, insan sütü yağ globulin membran antijeni (HMFG) ve disialogangliosid (GD2) olmak üzere 4 farklı antijene karşı TAA taklidi yapan monoklonal anti-id'ler üretilmiştir [Bendandi, 2000; Monzavi-Karbassi et al., 2002]. Bu monoklonal anti-id'lerin fare, tavşan ve maymunlarda Ab3 (Ab1¹) yanıt oluşturma yeteneğinde olduğu bulunmuştur [Kaminski et al., 1986].

Farklı bir çalışmada insüline karşı anti-idiotip antikor (Ab2) geliştirilerek Ab2'nin insülinin biyolojik etkilerini taklit edebileceği gösterilmiştir. Aynı zamanda Ab2'nin sıçan barsak epitel hücrelerine bağlanabileceği ve bu hücrelerde insülin salınımını etkileyebileceği tespit edilmiştir. Bu tür bulgular; Ab2 moleküllerinin çeşitli reseptör ligand etkileşimlerinin üç boyutlu yapısını taklit etmede etkili olduklarını, aşı yapımında ve ilaç üretiminde etkin bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir [Bruck et al., 1986; Lesinski and Westerink, 2001].

Hepatit B tedavisinde anti-idiotip aşılar alternatif bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Antikorum çerçeve bölgesinde bulunan idiyotopa karşı gelişen Ab2 α anti-idiotip antikorları kullanılarak farelerde anti-HBsAg yanıt alınmıştır [Schick et al., 1987]. Farede geliştirilen anti-HBsAg monoklonal antikorunu tavşana verildiğinde oluşan Ab2 α anti-idiotip antikoru, BALB/c türü farelere verilmiş ve HBsAg'ne karşı oluşan normal anti-HBsAg antikor yanıtından farklı bir anti-HBsAg yanıt alınmıştır. Bunun sonucunda Ab2 α sayesinde normalde aktif olmayan B lenfosit klonlarının aktif hale geldiği ve BALB/c farelerde anti-HBsAg antikor yanıtının birden fazla bağışık ağ tarafından kontrol edildiği savunulmuştur [Korec, 1987].

HBsAg ile immünize edilmiş fare, tavşan, keçi, domuz ve insanlardan elde edilen serumlar ile anti-idiotip antikorlar reaksiyona girerek anti-HBs yanıt oluşturmıştır [Kennedy et al., 1983]. Ab2 β anti-idiotipler, monoklonal ve poliklonal anti-hepatit B yüzey antijeni serumlarının, HBsAg a determinantı ile ilişkili lineer ve siklik sentetik peptidlere bağlanmasını inhibe ederler [Thanavala et al., 1986]. Bu anti-id kullanılarak (BALB/c, SWR/J, B10.M ve yabani *Mus spretus*)

fare soylarında ve HBsAg'e yanıt oluşturmamayan farelerde anti-HBs'ler üretilebilmiştir [Pride et al., 1993; Thanavala, 1996].

Yapılan bir çalışmada; keçi, tavşan, domuz ve insanda HBsAg'ne karşı üretilen poliklonal antiserumuyla 6 tane anti-idiotip test edilmiş bunlardan ikisinin HBs antijenini taklit ettiği görülmüştür. Böylece HBsAg'nin a determinantına karşı geliştirilmiş olan monoklonal fare antikoru (Id) kullanılarak, HBsAg'yi taklit eden (2F10 ve 4D4) isimli anti-idiotip fare antikorumu geliştirilmiştir [Thanavala et al., 1985]. İmmünofloresans tekniğiyle belirlenen bu anti-idiotip antikorumun, orjinal antijene ihtiyaç duymadan bağışıklama çalışmalarına yeni bir yaklaşım kazandırabileceği ileri sürülmüştür [Thanavala et al., 1985; Pride et al., 1993]. Anti-id 2F10 ile yapılan çalışmalarda *in vivo* olarak birçok farede anti-HBsAg antikorumunun ve primer T hücrelerin oluşumunun uyarıldığı, bu uyarımın *in vitro* olarak sadece HBsAg tarafından gerçekleştirildiği bildirilmiştir. Farklı çalışmalarda farelerin B ve T hücre yanıtları incelenmiş ve HBsAg'nin a determinantına spesifik B hücre yanıtının oluştuğu gözlenmiştir [Kennedy et al., 1984; Pride et al., 1992].

Kennedy ve Dreesman'ın yaptığı çalışmalarda; anti-id antikoru elde etmek için saflaştırılmış insan anti-HBsAg antikorumu tavşanlara enjekte edilmiştir. Oluşan tavşan anti-idiotip antikoru BALB/c farelere enjekte edildikten sonra anti-HBsAg reaktif Ab3'lerin meydana geldiği görülmüştür [Kennedy and Dreesman, 1983]. Kennedy ve Dreesman'ın diğer bir çalışmasında ise poliklonal tavşan anti-idiotip antikorumu kullanılarak şempanzelerde koruyucu bir immün yanıt oluşturulmuştur. Bir hafta boyunca iki şempanzeye 4 anti-idiotip enjekte edilmiştir. 12 hafta sonra her iki hayvanda anti-HBsAg tespit edilmiştir. 24 hafta sonra enfeksiyöz HBs virüs inokulasyonuna karşı iyi bir koruma sağlanmıştır. Buna karşılık 2 kontrol şempanzeden birine hiçbir enjeksiyon yapılmamış, diğerine ise normal tavşan IgG'si verilmiştir. Yapılan kontrollerde klinik ve serolojik olarak hepatit B enfeksiyon belirtileri görülmüştür. Bu şempanzelerde aşılardan sonra 3 yıl süresince anti-id titresinin yüksek olduğu belirlenmiştir [Kennedy et al., 1986; Shoenfeld et al., 1994].

Bugüne kadar yapılan çalışmalar gözönünde bulundurularak anti-idiotip antikor üretimine yeni bir yaklaşım sağlamak amacıyla; hibridoma teknolojisi

kullanılarak, hepatit B yüzey antijenini taklit eden anti-idiotip monoklonal antikorlar geliştirildi ve *in vivo* sistemde bu antikorların ticari aşılar ile karşılaştırmalı olarak HBsAg'ni taklit etme yetenekleri incelendi.

Yapılan çalışmada ilk olarak; TÜBİTAK GEMBAE Hibridoma Laboratuvarında HBsAg'ne karşı geliştirilmiş (6A5) fare monoklonal antikor ve ticari olarak satın alınmış keçi de geliştirilen anti-HBsAg poliklonal antikor ile BALB/c fareleri bağışıklandı. En yüksek antikor yanıtı veren fareler sandviç ELISA ile belirlendi. Bu farelerin lenfositleri myeloma hücreleri ile füzyona uğratıldı. Seçici HAT kültür ortamında üreyen hibridoma hücrelerinden antijene karşı yüksek oranda antikor üreten hibritler sandviç ELISA testiyle belirlendi. (6A5) fare monoklonal antikoru ait füzyon çalışması sonucunda elde edilen hibrit hücrelerinden monospesifik antikor yanıtı alınamadı. Ancak anti-HBsAg keçi poliklonal antikoru ait füzyondan 6C9 ve 6H9 adı verilen 2 adet anti-idiotip monoklonal antikor elde edildi. Sandviç ELISA testi sonucunda anti-id-HBsAg antikorlarından 6C9 ve 6H9'un diğer proteinlere (anti-tavşan, normal keçi ve tavşan serumu, FCS, BSA ve süt tozu) göre "anti-HBsAg poliklonal keçi antikoru"nu daha yüksek oranda tanıdığı, bu proteinlerle ise yüksek oranda reaksiyon vermediği görüldü. Bu hibritlerin tek klondan oluşan soyunu elde etmek için sınırlı seyreltme yöntemi uygulandıktan sonra % 10 serumlu besiyerinde geniş ölçekte üretildi. Anti-HBsAg keçi poliklonal antikoru ile bağışıklanan farelerden elde edilen anti-id 6C9 ve 6H9 antikorlarının immünglobulin tipinin IgM olduğu belirlendi.

Anti-id 6C9 ve 6H9 antikorları amonyum sülfat çöktürme ve diyaliz işlemleri uygulandıktan sonra S-300 jel filtrasyon kolon kromatografisi ve DE52 iyon değişimi kromatografisi ile saflaştırıldı. Bu anti-idiotip antikorların ticari hepatit B aşısı ile karşılaştırmalı olarak fareler üzerinde HBsAg antikor yanıtı oluşturma ve antijeni taklit etme yeteneği araştırıldı. Bunun için yapılan çalışmada fareler ticari (Pasteur) aşı (1 µg), anti-id 6C9 ve 6H9 antikorları (25 µg) ile bağışıklandı. Anti-id antikorlarla bağışıklanan farelerin serumlarındaki anti-HBsAg antikor yanıtları dolaylı ELISA testiyle belirlendi. Birinci bağışıklamadan sonra 6C9 ve 6H9 grupları antikor yanıtı açısından ticari aşı grubuna oranla daha yüksek değerler gösterdi. İkinci bağışıklamadan sonra 6C9 ve 6H9 gruplarından benzer antikor yanıtı, ticari aşı

grubundan ise daha yüksek antijene özgü antikor yanıtı alındı. Anti-id 6C9 ve 6H9 ile bağışıklanan grupta HBsAg spesifik antikor yanıtı oluştu, ancak özellikle ikinci bağışıklamadan sonra BSA spesifik yanıtın arttığı görüldü. HBV aşısı ile bağışıklanan hayvanlarda bu tür bir etki gözlenmedi (Şekil: 4.12, 4.13, 4.14, 4.15).

Tishchenko ve arkadaşlarının yaptıkları benzer bir çalışmada; insan IgG antikoru, horseradish peroksidaz ve insan IgM antikoruna karşı özgün fare monoklonal antikorları geliştirilmiştir. Elde edilen bu monoklonal antikorlara amonyum sülfat çöktürme, diyaliz yöntemleri ile DEAE-selüloz DE-52 anyon değişimi kromatografisi uygulanmıştır. Kromatografi çalışmalarında indirgenmemiş SDS-PAGE kullanılarak antikorum saflığı belirlenmiştir. Bu saflaştırılmış monoklonal antikorların ELISA yöntemi ile immün aktivitesi belirlenmiştir [Tishchenko et al., 1998].

Knutson ve arkadaşları tarafından; IgM tipi sıçan monoklonal antikorlarının saflaştırılması için basit bir yöntem izlenmiştir. Asit sıvıya amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz, ultrogel AcA22 jel filtrasyon kromatografisi ve DEAE sefaroze iyon değişimi kromatografisi yöntemleri uygulanmıştır. Antikorum saflığı indirgenmiş SDS-jel elektroforezi ile tespit edilmiştir. Jel filtrasyon ile % 85, iyon değişimi kromatografisi ile % 95'in üzerinde saf antikor elde edilmiş ve immün blot yöntemi ile antikorum immün aktivitesi belirlenmiştir. Jel filtrasyon sonrası saflaştırma yöntemiyle yaklaşık % 50 antikor aktivitesi elde edilirken, iyon değişimi kromatografisi ile başlangıç aktivitesinin sadece % 10'u sağlanabilmiştir. Bundan dolayı immün aktiviteye sahip antikor elde etmek amacıyla IgM antikorlarının saflaştırılması aşamasında iyon değişimi ve afinite kromatografi yöntemlerinin kullanılması önerilmemektedir [Knutson et al., 1991].

Farklı saflaştırma teknikleri kullanılarak yapılan tez çalışması sonucunda elde edilen antikorda, serumlu ortamda geliştirilmesinden kaynaklandığı düşünülen safsızlıklar tespit edildi. Saflaştırılan antikor örneği içinde kalan az miktardaki BSA'nın antikor yanıtına neden olabileceği düşünüldü. Bu nedenle saf antikor eldesi için serumsuz ortamda hücre üretimi çalışmaları yapıldı.

Serumsuz ortamda hücre üretimi monoklonal antikorların saflaştırılması ve karakterizasyonunun kolaylığı açısından bir avantaj sağlamaktadır. Bu yöntem serum ya da diğer bileşenlerin kullanımını gerektirmemektedir. Antikor diğer kontamine edici proteinlerden özellikle immünglobulinleri içermemesi nedeniyle tek bir amonyum sülfat çöktürmesi ile kolaylıkla saflaştırılabilir. Bu teknik hızlı bir şekilde ekonomik olarak monoklonal antikorun üretimi ve saflaştırma kolaylığı sağlamaktadır [Başalp et al., 2000].

6C9 ve 6H9 grupları antikor yanıtı açısından benzer değerler gösterdiğinden bundan sonraki uygulamalara anti-id 6C9 antikoru ile devam edildi. Serumsuz besiyerinde geniş ölçekte üretilen anti-id 6C9 antikorunun üst sıvısına amonyum sülfat çöktürmesi ve diyaliz işlemi yapıldı. Antikor S-300 jel filtrasyon kolon kromatografisi ile saflaştırıldı.

Farelerin serumlarındaki BSA spesifik antikor yanıtın oluşumunu engellemek için anti-id 6C9 antikoru ayrıca distile suya karşı diyaliz edilerek daha basit bir yöntemle [Friboulet and Izadyar-Demichale, 1995] saflaştırıldı. Bunun için anti-id 6C9 antikor üst sıvısına 14.000 rpm’de 15 dakika santrifüjleme işlemi uygulandı. Santrifüj sonrası üst kesimler diyaliz membrana alınarak 2 gün belirli aralıklarla tamponu değiştirilerek distile suya karşı diyaliz edildi. Diyaliz sonrası örnek 14.000 rpm’de 30 dakika santrifüj edilerek elde edildi. Bu antikorun saflığı % 10’luk indirgenmiş SDS-PAGE ile kontrol edildi ve jel üzerinde hiçbir BSA bandı görülmedi (Şekil 4.23). Modifiye edilen bu basit protokolün izlenmesiyle yüksek düzeyde saf antikor örnekleri elde edilebileceği görüldü. IgM antikorunun izoelektrik noktası (pI:6) ve molekül ağırlığının 970 kDa olduğu için bu yöntem kolaylıkla uygulanabildi.

Anti-id 6H9 antikoru da yine benzer yöntemle [Page and Thorpe, 1998], 2 mM PO₄ tamponuna (pH: 6) ve distile suya karşı diyaliz edildi. Elde edilen saf antikorun farklı proteinlerle değişik seyreltmelerdeki çapraz reaksiyonlarını tespit edebilmek için ELISA testi uygulandı. IgM tipi bir antikor olan anti-id 6H9 antikorunun anti-id 6C9 antikoruna oldukça benzer reaksiyon gösterdiği tespit edildi. Yapılan deneylerde anti-id 6H9 ve 6C9 antikorlarının farklı antikor seyreltme oranlarının aktiviteye nasıl

yansıdığı belirlenmeye çalışıldı. Antikor seyreltmesi arttıkça monoklonal antikorların farklı proteinlerle olan çapraz etkileşimlerinin azaldığı gözlemlendi.

Vollmers ve arkadaşları tarafından; insan IgM antikorunu saflaştırmak için hızlı ve ekonomik olarak benzer bir yöntem geliştirilmiştir. Doku kültürü şartlarında 250 ml'lik flasklarda % 10 FCS içeren RPMI besi yerinde hibridoma üst sıvısı üretilmiştir. Bu örnekler ultrafiltrasyon yöntemi ile konsantre edildikten sonra pH 6.4'de distile suya karşı diyaliz edilmiştir. 6 saatlik bir sürede 5L hibridoma üst sıvısından 14 mg'dan fazla IgM antikoruna saflaştırılmıştır. Elde edilen antikorun fizyolojik ve immünohistokimyasal çalışmalar için uygun olduğu belirtilmiştir [Vollmers et al., 1996].

Garcia-Gonzalez ve arkadaşları; sıçan IgG3 ve IgM monoklonal antikorlarını saflaştırmak için basit ve etkili bir yöntem geliştirmiştir. Asit sıvı filtrasyon işleminden sonra distile suya karşı diyaliz edilerek 22 000 g'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan çökelti 0.1 M Tris-HCl (pH 8) tamponuyla çözülmüştür. İkinci bir diyaliz ve santrifüj işleminden sonra oldukça saf bir ürün elde edilmiştir. Bu işlemle 9 adet IgG3 monoklonal antikorunun 7'si % 90, 8 adet IgM antikoruna ise % 40-90 arasında değişen verimde üretilerek saflaştırılmış ve antikorların saflığı SDS-PAGE ile belirlenmiştir. Albumin, transferin ve diğer fare asidik proteinlerinden tamamen uzaklaştırılan saf antikorun fonksiyonunda ise herhangi bir kayıp gözlenmemiştir [Garcia-Gonzalez et al., 1988].

Yapılan tez çalışmasında elde edilen anti-id 6C9 saf antikorları farklı dozlarda (10 µg, 25 µg, 50 µg, 100 µg) ve Hepatit B aşısı (Gen Hevac B Pasteur ve Engerix) 1 µg dozda BALB/c farelerine immünize edildi. Fareler üzerinde (*in vivo*) anti-HBsAg antikor yanıtı karşılaştırmalı olarak incelendi. Bu çalışmada farelere uygulanan antikor dozu arttığında HBsAg ve BSA'ya karşı elde edilen spesifik antikor yanıtın özellikle ikinci bağışıklamadan sonra arttığı görüldü. Fakat HBV aşısı ile bağışıklanan hayvanlarda bu tür bir etki gözlenmedi. Anti-id 6C9 antikorunun hem HBsAg ve hem de BSA üzerinde genel bir epitopu tanıdığı düşünüldü (Şekil: 4.29, 4.30, 4.31, 4.32, 4.33).

Colucci ve arkadaşlarının yaptığı benzer bir çalışmada; polimerik insan serum albuminini (polyHSA) taklit eden ve hepatit B yüzey antijeni üzerindeki reseptörüne bağlanan monoklonal anti-idiotip 63.14'ler, antijeni *in vivo* olarak taklit eden monoklonal anti-anti-idiotip antikor (Ab3) üretmek amacıyla kullanılmıştır. Üretilen G11 (Ab3) monoklonal antikorların HBsAg'nin a determinantına spesifik olduğu bulunmuştur. G11'lerin aktif anti-HBsAg immün yanıtını uyarmada HBsAg kadar etkin olduğu görülmüştür ve HBV enfeksiyonu için alternatif bir aşı olarak kullanılabileceği ifade edilmiştir. Bu çalışmada HBsAg'yi taklit eden monoklonal anti-anti-idiotip antikorların *in vivo* olarak spesifik immün yanıtını viral antijenler kadar etkin bir şekilde uyardığı tespit edilmiştir [Colucci et al., 1987].

Tez çalışmasının devamında saf 6C9 anti-idiotip antikor ile sadece HBV yüzey antijenine karşı immün yanıt oluşturmak için pepsin kesim ile antikorun Fab fragmanları elde edildi ve böylece antikorun Fc (sabit) bölgeleri uzaklaştırıldı. Bunun için anti-id 6C9 antikoru asetat tamponuna (pH 4.5) karşı 4°C'de 6 saat diyaliz edildi. Asetat tamponunda çözölen pepsin, 1:20 enzim:antikor oranında (mg/ml) diyaliz sonrası anti-id 6C9 antikoruna eklendi. Gece boyu 37°C su banyosunda inkübe edildikten sonra 2 M tris base ile pH 8'de reaksiyon sonlandırıldı [Coligan et al., 1991]. Elde edilen Fab fragmanları borat tamponu ile yıkanan S-300 jel filtrasyon kolonunda saflaştırıldı. Bu örnekler % 6 ve % 15'lik indirgenmemiş gradiyent SDS-PAGE jel üzerinde görüntülendi. 25 µg ve 50 µg farklı dozlarda pepsin kesim sonrası sadece anti-id 6C9 antikoru Fab fragmanları farelere enjekte edildi ancak bu gruplarda antikor yanıtı alınamadı.

Pascual ve Clem'in yaptığı benzer bir çalışmada; sıçan IgM monoklonal antikorları kullanılarak, pepsin kesim işlemi ile düşük sıcaklıkta % 90'dan fazla verimde örnekler elde edilmiştir. IgM antikorları 4°C'de asidik koşullarda pepsinle kesilerek SDS-PAGE'de 134 kDa kovalent F(ab')₂ fragmentleri ve 67 kDa kovalent olmayan F(ab')₂ fragmentleri belirlenmiştir. F(ab')₂ fragmentlerinin bağlanma özelliği ve aktivitesi pepsin kesiminden etkilenmemiştir. F(ab')₂ fragmentlerinin diyalizi sonucunda ise indirgenmiş alt birimlerin her birinin aynı sayıda bağlanma bölgelerine sahip olduğu ve bağlanma afinitelerinin benzer olduğu görülmüştür. Bu

işlem 37 °C’de tekrarlandığında 4 °C’de yapılan kesimlere oranla daha düşük verimde F(ab¹)₂ fragmentleri elde edilmiştir [Pascual and Clem, 1992].

Holmberg ve arkadaşları tarafından; IgM antikorunun anti-Ia.7 monoklonal antikoruna spesifik olarak bağlandığı tespit edilmiştir. IgM antikoru DNP (dinitrofenil) sefaroza afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. pH 4.8’de 0.5 M sodyum asetat tamponuna karşı diyaliz edildikten sonra, 37 °C’de 1 saat enzim:protein oranı (1:50) olacak şekilde pepsin ile muamele edilmiştir. pH 7.0’de 2M NaOH eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. (pH 8) 0.05 M Tris-HCl karşı diyaliz edildikten sonra sodyum asetat tamponunun kullanıldığı Ultrogel AcA34 jel filtrasyonla saflaştırılarak F(ab¹)₂ elde edilmiştir. Ayrıca IgM moleküllerini spesifik olarak belirlemek için ELISA yöntemi kullanılmıştır [Holmberg et al., 1984].

Yapılan tez çalışmasında sonuç olarak; farklı saflaştırma protokollerinin uygulanması ile anti-id 6C9 antikorları saflaştırıldı ve farklı saflaştırma koşullarının antikor spesifikliğine etkisi karşılaştırılmalı olarak incelendi. Distile suya karşı diyaliz işleminin *in vitro* olarak antikorların bağlanma özelliğini değiştirdiği gözlemlendi. Bununla birlikte farelerle yapılan çalışmalarda anti-id 6C9 antikorun antijeni taklit etme aktivitesinin *in vivo* olarak değişmediği belirlendi. Anti-id 6C9 antikorunun % 50 oranında HBsAg’ni taklit etme özelliğinde olduğu tespit edildi.

KAYNAKLAR

1. Abbott C and Povey S: Making somatic cell hybrids In: *Somatic Cell Hybrids: The Basics*. Oxford University Press, Oxford. 1995, pp.13-16.
2. Akbar F, Abe M, Masumoto T, Horiike N, and Onji M (1999) Mechanism of action of vaccine therapy in murine hepatitis B virus carriers: vaccine-induced activation of antigen presenting dendritic cells. *Journal of Hepatology* 30:755-764.
3. Akova M (1998) Hepatit B ve hepatit A aşıları. *İnfeksiyon Hastalıkları Serisi* 1(3):126-134.
4. Andre FE (2003) Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises. *Vaccine* 21:593-595.
5. Arda M: Anti-idiotip antikor aşıları. *Biyoteknoloji (Bazı Temel İlkeler)* 2. Baskı, Kükem Derneği Bilimsel Yayınları, Ankara. No 2, 1994, 138-141.
6. Asai DJ and Wilder JK: Making monoclonal antibodies In: *Methods in Cell Biology. Antibodies in Cell Biology*. Asai DJ (Ed.). Academic Press, Inc.USA. 1993, Vol.37, pp.57-69.
7. Audibert FM and Lise LD (1993) Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunology Today* 14(6):281-284.
8. Badur S (1998) Hepatitler: tanı ve takibinde kullanılan yöntemler. *İnfeksiyon Hastalıkları Serisi* 1(3):112-119.
9. Badur S and Akgün A (2001) Diagnosis of hepatitis B infections and monitoring of treatment. *Journal of Clinical Virology* 21:229-237.
10. Balık İ (2000) www.aventispasteur.com.tr/rapel/rapel.html Hepatit B. 36-39.

11. Ban N, Escobar C, Garcia R, Hasel K, Day J, Greenwood A, and MoPherson A (1994) Crystal structure of an idiotype-anti-idiotype Fab complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1604-1608.
12. Banatvala J, Damme PV, and Oehen S (2001) Lifelong protection against hepatitis B: the role of vaccine immunogenicity in immune memory. *Vaccine* 19:877-885.
13. Başalp A, Çırakoğlu B and Bermek E (2000) Simple production and purification of monoclonal antibodies in serum-free medium. *Türk J Biol* 24: 189-196.
14. Başalp A (2002) Monoclonal antibodies against hepatitis B virus surface antigen. *Hybridoma Hybridomics* 21:81-82.
15. Bayraktar B ve Türkoğlu S (1998) Yeni hepatit virüsleri ve infeksiyonları. *İnfeksiyon Hastalıkları Serisi* 1(3):105-110.
16. Bendandi M (2000) Anti-idiotype vaccines for human follicular lymphoma. *Leukemia* 14(8):1333-1339.
17. Benjamini E, Coico R, Sunshine G: Resistance and immunization to infectious diseases In: *Immunology a Short Course*. 4th ed. A John Wiley&Sons, Inc. USA. 2000, pp.421-453.
18. Bentley GA, Boulot G, Riottot MM, and Poljak RJ (1990) Three-dimensional structure of an idiotope-anti-idiotope complex. *Letters to Nature* 348(15):254-257.
19. Bhattacharya-Chatterjee M, Baral RN, Chatterjee SK, Das R, Zeytin H, Chakraborty M, and Foon KA (2000) Counterpoint. Cancer vaccines: single-epitope anti-idiotype vaccine versus multiple-epitope antigen vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 49(3):133-141.
20. Bhattacharya-Chatterjee M, Chatterjee SK, and Foon KA (2000) Anti-idiotype vaccine against cancer. *Immunology Letters* 74:51-58.

21. Bhattacharya-Chatterjee M, Chatterjee SK, and Foon KA (2001) The anti-idiotypic vaccines for immunotherapy. *Current Opinion of Molecular Therapy* 3:63-69.
22. Bhattacharya-Chatterjee M, Chatterjee SK and Foon KA (2002) Anti-idiotypic antibody vaccine therapy for cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2(8):869-81.
23. Billetta R, Holingdale MR, and Zanetti M (1991) Immunogenicity of an engineered internal image antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4713-4717.
24. Birebent B, Somasundaram R, Purev E, and Li W (2001) Anti-idiotypic antibody and recombinant antigen vaccines in colorectal cancer patients. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 39:107-113.
25. Blattner FR and Tucker PW (1984) The molecular biology of immunoglobulin D. *Nature* 307(2):417-422.
26. Blumberg BS (1977) Australia antigen and the biology of hepatitis B. *Science* 197(4298):17-25.
27. Blumberg BS, Alter HJ, and Visnich S (1965) A “New” antigen in leukemia sera. *JAMA* 191:541-6.
28. Breedveld FC (2000) Therapeutic monoclonal antibodies. *The Lancet* 355(26):735-740.
29. Brown SE, Stanley C, Howard CR, Zuckerman AJ, and Steward MW (1986) Antibody responses to recombinant and plasma derived hepatitis B vaccines. *Br Med J* 292(6514):159-161.
30. Bruck C, Co MS, Slaovi M, Gaulton GN, Smith T, Fields BN, Mullins JI, and Greene MI (1986) Nucleic acid sequence of an internal image bearing monoclonal anti-idiotypic and its comparison to the sequence of the external antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:6578-6582.

31. Burda MR, Günther S, Dandri M, Will H, and Petersen J (2001) Structural and functional heterogeneity of naturally occurring hepatitis B virus variants. *Antiviral Research* 52:125-138.
32. Cao Y and Lam L (2003) Bispecific antibody conjugates in therapeutics. *Advanced Drug Delivery* 55:171-197.
33. Cedar H and Bergman Y (1999) Developmental regulation of immune system gene rearrangement. *Current Opinion in Immunology* 11:64-69.
34. Chin R and Locarnini S (2003) Treatment of chronic hepatitis B: current challenges and future directions. *Rev Med Virol* 13:255-272.
35. Cohen IR: The self the world and autoimmunity In: *Immunology Recognition and Response*. Paul WE (Ed.). WH Freeman and Company, New York. 1991, pp.98-108.
36. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, and Strober W: Antibody detection and preparation. In: *Current Protocols in Immunology*. Vol 2, Suppl 1, John Wiley, New York, 1991, pp.1-15.
37. Colucci G, Beazer Y, and Waksal SD (1987) Interactions between hepatitis B virus and polymeric human serum albumin. II. Development of syngeneic monoclonal anti-anti-idiotypes which mimic hepatitis B surface antigen in the induction of immune responsiveness. *Eur J Immunol* 17(3):371-374.
38. Cooper A, Paran N, and Shaul Y (2003) The earliest steps in hepatitis B virus infection. *Biochimica et Biophysica Acta* 1614:89-96.
39. Cruse JM and Lewis RE: *Illustrated Dictionary of Immunology* 2nd ed. CRC Press, LLC. USA, 2003.
40. Dalglish AG and Kennedy RC (1988) Anti-idiotypic antibodies as immunogens: idiotypic-based vaccines. *Vaccine* 6(3):215-220.

41. Dane DS, Cameron CH, and Briggs M (1970) Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1(7649):695-8.
42. Delves PJ, Lund T, and Roitt IM (1997) Can epitope-focused vaccines select advantageous immune responses. *Molecular Medicine Today* 55-60.
43. Delves PJ: Preparing immunogens In: *Antibody Production Essential Techniques*. Rickwood D (Ed.). John Wiley and Sons, Ltd. UK. 1997, pp.18-26.
44. DePinho RA, Feldman LB, and Scharff MD (1986) Tailor made monoclonal antibodies. *Annals of Internal Medicine* 104(2):225-233.
45. DeWildt RMT, Van Venrooij WJ, Winter G, Hoet RMA, and Tomlinson IM (1999) Somatic insertions and deletions shape the human antibody repertoire. *J Mol Biol* 294:701-710.
46. Dillman RO (2001) Monoclonal antibody therapy for lymphoma. *Cancer Practice* 9(2):71-80.
47. Eichmann K, Emmrich F, and Kaufmann SHE (1987) Idiotypic vaccinations: consideration towards a practical application. *CRC Critical Reviews in Immunology* 7(3):193-227.
48. Ellis RW (1999) New technologies for making vaccines. *Vaccine* 17:1596-1604.
49. Esteban R (2002) Management of chronic hepatitis B: an overview. *Semin Liver Dis* 22 (1):1-6.
50. Fagerberg J, Steinitz M, Wigzell H, Askelof P, and Mellstedt H (1995) Human anti-idiotypic antibodies induced a humoral and cellular immune response against a colorectal carcinoma-associated antigen in patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4773-4777.
51. Finberg RW and Ertl H (1987) The use of antiidiotypic antibodies as vaccines against infectious agents. *CRC Crit Rev in Immunol* 7(4):269-84.

52. Foon KA, Lutzky J, Baral RN, Yannelli JR, Hutchins L, Teitelbaum A, Kashala OL, Das R, Garrison J, Reisfeld RA, and Bhattacharya-Chatterjee M (2000) Clinical and immune responses in advanced melanoma patients immunized with an anti-idiotypic antibody mimicking disialoganglioside GD2. *J Clin Oncol* 18(2):376-84.
53. François G, Hallauer J, and Damme PV (2002) Hepatitis B vaccination: how to reach risk groups. *Vaccine* 21:1-4.
54. French DL, Laskov R, and Scharff MD (1989) The role of somatic hypermutation in the generation of antibody diversity. *Science* 244(9):1152-1157.
55. Friboulet A and Izadyar-Demichele L: Preparation and assay of acetylcholinesterase antibody In: *Methods in Molecular Biology: Antibody Engineering Protocols*. Vol.51. Paul S (Ed.), Humana Press, Totowa, New Jersey. 1995, pp.211-222.
56. Garcia-Gonzalez M, Bettinger S, Ott S, Olivier P, Kadouche J, and Pouletty P (1988) Purification of murine IgG3 and IgM monoclonal antibodies by euglobulin precipitation. *J Immunol Methods* 111(1): 17-23.
57. Georgatos SD: Antiidiotypic antibodies: methods, applications and critique In: *Methods in Cell Biology*. Asai DJ (Ed). Vol.37, Academic Press, Inc. 1993, pp.407-416.
58. Glennie MJ, and Johnson PWM (2000) Clinical trials of antibody therapy. *Immunology Today* 21(8):403-410.
59. Goldbaum FA, Velikovsky CA, Dall' Acqua W, Fossati CA, Fields BA, Braden BC, Poljak RJ, and Mariuzza RA (1997) Characterization of anti-anti-idiotypic antibodies that bind antigen and an anti-idiotypic. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(16):8697-8701.
60. Golub ES and Green DR: Antibodies as tools In: *Immunology a Synthesis*. 2nd ed., Sinauer Associates Inc.USA. 1991, pp.134-139.

61. Green LL (1999) Antibody engineering via genetic engineering of the mouse. XenoMouse strains are a vehicle for the facile generation of therapeutic human monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods* 231:11-23.
62. Gregoriadis G (1990) Immunological adjuvants: a role for liposomes. *Immunology Today* 11(3):89-97.
63. Herlyn D, Ross AH, and Koprowski H (1986) Anti-idiotypic antibodies bear the internal image of a human tumor antigen. *Science* 232(4746):100-102.
64. Herlyn D, Somasundaram R, Li W, and Maruyama H (1996) Anti-idiotypic cancer vaccines: past and future. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 43(2):65-76.
65. Herlyn D, Wettendorff M, Schmoll E, Iliopoulos D, Schedel I, Dreikhauser U, Raab R, Roos AH, Jaksche H, Scriba M, and Koprowski H (1987) Anti-idiotypic immunization of cancer patients: Modulation of the immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:8055-8059.
66. Hilleman MR (2003) Critical overview and outlook: pathogenesis, prevention, and treatment of hepatitis and hepatocarcinoma caused by hepatitis B virus. *Vaccine* 21(32):4626-4649.
67. Holmberg D, Forsgren S, Forni L, Ivars F, and Coutinho A (1984) Idiotypic determinants of natural IgM antibodies that resemble self Ia antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3175-3179.
68. Howard CR and Zuckerman AJ: Viral Hepatitis In: *Topley & Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*. 8th ed. Parker MT and Collier LH (Eds.). Vol.4, 1990, pp.388-412.
69. http://www.courses.brown.edu/George_Yap-BI0053_F02/9.
70. <http://www.globalserve.net/~harlequin/HBV/genome.htm>.
71. <http://www.globalserve.net/~harlequin/HBV/hbvparts.htm>.

72. <http://www.stopford.man.ac.uk/ESRG/powerpoint/29>.
73. [http://www.mcb.berkeley.edu/courses/mcb150/lect4/lect4 slides.pdf](http://www.mcb.berkeley.edu/courses/mcb150/lect4/lect4%20slides.pdf).
74. Huang JY, Ward RE, and Kohler H (1988) Biological mimicry of antigenic stimulation: analysis of the in vivo antibody responses induced by monoclonal anti-idiotypic antibodies. *Immunology* 63:1-8.
75. Iwarson S, Tabor E, Thomas HC, Snoy P, and Gerety RJ (1985) Protection against hepatitis B virus infection by immunization with hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 88:763-7.
76. Jerne NK (1974) Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol Paris* 125C(1-2):373-389.
77. Jilg W (1998) Novel hepatitis B vaccines. *Vaccine* 16:S65-S68.
78. Jolivet-Reynaud C, Lesenechal M, O'Donnell B, Becquart L, Foussadier A, Forge F, Battail-Poirot N, Lacoux X, Carman W, and Jolivet M (2001) Localization of HBsAg epitopes present on variants and specifically recognised by anti-HBsAg monoclonal antibodies. *Journal of Medical Virology* 65: 241-249 .
79. Jung M-C and Pape GR (2002) Immunology of hepatitis B infection. *The Lancet Infectious Diseases* 2(1):43-50.
80. Kaminski MS, Kitamura K, Maloney DG, Campbell MJ, and Levy R (1986) Importance of antibody isotype in monoclonal anti-idiotypic therapy of a murine B cell lymphoma. A study of hybridoma class switch variants. *The Journal of Immunology* 136(3):1123-1130.
81. Kao J-H and Chen D-S (2002) Global control of hepatitis B virus infection. *The Lancet Infectious Diseases* 2:395-403.
82. Karayiannis P (2003) Hepatitis B virus: old, new and future approaches to antiviral treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51:761-785.

83. Kaufman PB: Preparation of monoclonal and polyclonal antibodies against specific proteins In: *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*. 1st ed. Cseke LJ, Kaufman PB, Podila GK, Tsai CJ, Wu WF, Kim D (Eds.). CRC Press, Boca Raton. 1995, pp.455-465.
84. Kennedy RC and Dreesman GR (1983) Common idiotypic determinant associated with human antibodies to hepatitis B surface antigen. *Journal of Immunology* 130(1):385-389.
85. Kennedy RC, Adler-Storthz K, Henkel RD, Sanchez Y, Melnick JL, and Dreesman GR (1983) Immune response to hepatitis B surface antigen: Enhancement by prior injection of antibodies to the idiootype. *Science* 221:853-855.
86. Kennedy RC, Eichberg JW, Lanford RE, and Dreesman GR (1986) Anti-idiotypic antibody vaccine for type B viral hepatitis in chimpanzees. *Science* 232:220-23.
87. Kennedy RC, Ionescu-Matiu I, Sanchez Y, and Dreesman GR (1983) Detection of interspecies idiotypic cross-reactions associated with antibodies to hepatitis B surface antigen. *Eur J Immunol* 13(3):232-5.
88. Kennedy RC, Melnick JL, and Dreesman GR (1984) Antibody to hepatitis B virus induced by injecting antibodies to the idiootype. *Science* 223:930-931.
89. Kılıçturgay K (1995) Hepatit B virusunda (HBV) mutasyon ve getirdiği sorunlar. *Viral Hepatit Dergisi* 1: 1-7.
90. Kıyan M: Hepatit B virüsü. *Viral Hepatit*. Kılıçturgay K ve Badur S (Eds). 1.Baskı, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, Deniz Ofset, 2001, 86-120.
91. Knutson VP, Buck RA, and Moreno RM (1991) Purification of a murine monoclonal antibody of the IgM class. *J Immunol Methods* 136(2):151-7.

92. Koff RS (2002) Immunogenicity of hepatitis B vaccines: implications of immune memory. *Vaccine* 20:3695-3701.
93. Kohler G (1985) Derivation and diversification of monoclonal antibodies. *The EMBO Journal* 4(6):1359-1365.
94. Kohler G and Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256(5517):495-497.
95. Kohler G and Milstein C (1976) Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *European Journal of Immunology* 6(7):511-519.
96. Koprowski H, Herlyn D, Lubeck M, DeFreitas E, and Sears HF (1984) Human anti-idiotypic antibodies in cancer patients: Is the modulation of the immune response beneficial for the patient? *Proc Natl Acad Sci USA* 81:216-219.
97. Korec E, Hlozaneck I, Stara J, and Nemecek V (1987) Anti-idiotypic antibody as a prospective vaccine against hepatitis B. *Folia Biol (Praha)* 33(2): 98-103.
98. Krugman S, Giles JP, and Hammond J (1967) Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA* 200(5):365-73.
99. Kuby J: Immunoglobulins: structure and function. In: *Immunology* 2nd ed. W.H. Freeman and Company, New York. 1994, pp.124-130.
100. Kwak LW, Campbell MJ, Czerwinski DK, Hart S, Miller RA, and Levy R (1992) Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors. *The New England Journal of Medicine* 327(17):1209-1215.
101. Lee WM (1997) Hepatitis B virus infection. *The New England Journal of Medicine* 337 (24):1733-1743.

102. Lemon SM and Thomas DL (1997) Vaccines to prevent viral hepatitis. *The New England Journal of Medicine* 336(3):196-204.
103. Lennon VA and Lambert EH (1980) Myasthenia gravis induced by monoclonal antibodies to acetylcholine receptors. *Nature* 285(5762):238-40.
104. Leroux-Roels G, Desombere I, DeTollenaere G, Petit M-A, Desmons P, Hauser P, Delem A, De Grave D, and Safary A (1997) Hepatitis B vaccine containing surface antigen and selected preS1 and preS2 sequences. 1. Safety and immunogenicity in young, healthy adults. *Vaccine* 15(16):1724-1731.
105. Lesinski GB and Westerink MAJ (2001) Novel vaccine strategies to T-independent antigens. *Journal of Microbiological Methods* 47:135-149.
106. Liddell JE and Cryer A: Myeloma cells, lymphocytes, fusion In: *A Practical Guide to Monoclonal Antibodies*. John Wiley&Sons, Ltd.England.1991, pp. 68-88.
107. Lindenmann J (1973) Speculations on idiotypes and homobodies. *Ann Immunol* 124(2):171-184.
108. Locarnini SA and Newbold JE (1997) Chronic hepatitis B: the therapeutic challenge. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 39:559-565.
109. Loewy AG, Siekevitz P, Menninger JR, Gallant JAN: Beyond the cell In: *Cell Structure Function an Integrated Approach*. 3rd ed. Saunders College Publishing, USA. 1991, pp.897-912.
110. Lok AS-F (2000) Hepatitis B infection: pathogenesis and management. *Journal of Hepatology* 32(1):89-97.
111. Lutzky J, Gonzalez-Angulo AM, and Orzano JA (2002) Antibody-based vaccines for the treatment of melanoma. *Seminars in Oncology* 29(5):462-470.

112. Magliani W, Conti S, Salati A, Arseni S, Ravanetti L, Frazzi R, and Polonelli L (2003) Biotechnological approaches to the production of idiotypic vaccines and antiidiotypic antibiotics. *Curr Pharm Biotechnol* 4(2) 91-7.
113. Mancini M, Hadchouel M, Davis HL, Whalen RG, Tiollais P, and Michel ML (1996) DNA-mediated immunization in a transgenic mouse model of the hepatitis B surface antigen chronic carrier state. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(22):12496-12501.
114. Maruyama H, Sperlagh M, Zaloudik J, Liang S, Mizuki K, Molthoff C, and Herlyn D (2002) Immunization procedures for anti-idiotypic antibody induction in mice and rats. *Journal of Immunological Methods* 264:121-133.
115. Maruyama H, Zaloudik J, Li W, Sperlagh M, Koido T, Somasundaram R, Scheck S, Prewett M, and Herlyn D (2000) Cancer vaccines: single-epitope anti-idiotype vaccine versus multiple-epitope antigen vaccine. *Cancer Immunology Immunotherapy* 49(3):123-132.
116. Matthew WD and Reichardt LF (1982) Development and application of an efficient procedure for converting mouse IgM into small, active fragments. *J Immunol Methods* 50(3):239-53.
117. Maupas P, Goudeau A, Coursaget P, and Drucker J (1976) Immunisation against hepatitis B in man. *The Lancet* 26:1367-1370.
118. Mc Cullough KC and Langley D (1985) Anti-idiotope vaccines: can they exist? *Vaccine* 3(1):59-64.
119. Michel ML (2002) Towards immunotherapy for chronic hepatitis B virus infections. *Vaccine* 20:A83-A88.
120. Michel ML, Pol S, Brechot C, and Tiollais P (2001) Immunotherapy of chronic hepatitis B by anti-HBV vaccine: from present to future. *Vaccine* 19:2395-2399.
121. Milstein C (1980) Monoclonal Antibodies. *Sci Ame* 243 (4):66-74.

122. Mitra-Kaushik S, Shaila MS, Karande AK, and Nayak R (2001) Idiotypic and antigen-specific T cell responses in mice on immunization with antigen, antibody, and anti-idiotypic antibody. *Cellular Immunology* 209:109-119.
123. Moe GR, Tan S, and Granoff DM (1999) Molecular mimetics of polysaccharide epitopes as vaccine candidates for prevention of *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 26:209-226.
124. Moingeon P (2001) Cancer vaccines. *Vaccine* 19:1305-1326.
125. Monzavi-Karbassi B, Cunto-Amesty G, Luo P, and Kieber-Emmons T (2002) Use of surrogate antigens as vaccines against cancer. *Hybridoma and Hybridomics* 21(2):103-109.
126. Morgan SJ and Darling DC: Cloning techniques In: *Animal Cell Culture*. Graham JM, Billington D (Eds.). BIOS Scientific Publishers Limited. UK. 1993, pp.79-92.
127. Moynihan JS, Jones DH, Farrar GH, and Howard CR (2001) A novel microencapsulated peptide vaccine against hepatitis B. *Vaccine* 19(23-24):3292-300.
128. Nassal M (1997) Novel molecular approaches toward therapy of chronic hepatitis B. *Arch Virol* 142:611-628.
129. Özdener H (1997) Hepatit viruslarının moleküler biyolojisi. *Viral Hepatit Dergisi* (1): 1-18.
130. Page M and Thorpe R: Purification of monoclonal antibodies In: *Methods in Molecular Biology, Immunochemical Protocols*. Pound JD (Ed.). 2nd ed. Humana Press, Totowa. New Jersey. 1998, pp.113-119.
131. Pan Y, Yuhasz SC, and Amzel LM (1995) Anti-idiotypic antibodies: biological function and structural studies. *FASEB J* 9(1):43-49.

132. Papaevangelou G (1998) Current combined vaccines with hepatitis B. *Vaccine* 16:S69-S72.
133. Pascual DW and Clem LW (1992) Low temperature pepsin proteolysis. An effective procedure for mouse IgM F(ab')₂ fragment production. *J Immunol Methods* 146(2):249-55.
134. Pillet D, Paon M, Vorobiev II, Gabibov AG, Thomas D, and Friboulet A (2002) Idiotypic network mimicry and antibody catalysis: lessons for the elicitation of efficient anti-idiotypic protease antibodies. *Journal of Immunological Methods* 269:5-12.
135. Plotkin SA (2002) Vaccines in the 21st century. *Hybridoma and Hybridomics* 21(2):135-145.
136. Pol S (1995) Immunotherapy of chronic hepatitis B by anti-HBV vaccine. *Biomed&Pharmacother* 49:105-109.
137. Poljak RJ (1994) An idiotope-anti-idiotope complex and the structural basis of molecular mimicking. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1599-1600.
138. Poskitt DC, Jean-Francois MJB, Turnbull S, Macdonald L, and Yasmeen D (1991) Internal image (Ab2β) anti-idiotypic vaccines. Theoretical and practical aspects. *Vaccine* 9(11):792-796.
139. Prange R and Werr M (1999) DNA-mediated immunization to hepatitis B virus envelope proteins: preS antigen secretion enhances the humoral response. *Vaccine* 17(7-8):617-23.
140. Preud'homme JL, Petit I, Barra A, Morel F, Lecron J-C, and Lelievre E (2000) Structural and functional properties of membrane and secreted IgD. *Molecular Immunology* 37:871-887.

141. Pride MW, Shi H, Anchin JM, Linthicum DS, LoVerde PT, Thakur A, and Thanavala Y (1992) Molecular mimicry of hepatitis B surface antigen by an anti-idiotypic-derived synthetic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11900-11904.
142. Pride MW, Thakur A, and Thanavala Y (1993) Mimicry of the a determinant of hepatitis B surface antigen by an antiidiotypic antibody. I. Evaluation in hepatitis B surface antigen responder and nonresponder strains. *J Exp Med* 177(1):127-134.
143. Rabinovich NR, McInnes P, Klein DL, and Hall BF (1994) Vaccine technologies:view to the future. *Science* 265(2):1401-1404.
144. Reddy PS and Corley RB (1999) The contribution of ER quality control to the biologic functions of secretory IgM. *Immunology Today* 20(12):582-588.
145. Reichert JM (2001) Monoclonal antibodies in the clinic. *Nature Biotechnology* 19(9):819-822.
146. Renner C, Trumper L, and Pfreundschuh M (2000) Tumour vaccines: a new immunotherapeutic approach in oncology. *Ann Hematol* 79:651-659.
147. Richman DP, Gomez CM, Berman PW, Burres SA, Fitch FW, and Arnason BG (1980) Monoclonal anti-acetylcholine receptor antibodies can cause experimental myasthenia. *Nature* 286(5774):738-9.
148. Roitt IM and Delves PJ: Control mechanisms In: *Roitt's Essential Immunology*. 10th ed. Roitt IM and Delves PJ (Eds.). Blackwell Science Ltd. Italy, 2001, pp.207-219.
149. Savaş C ve Şimşek H (1998) Kronik hepatitler. *İnfeksiyon Hastalıkları Serisi* 1(3):121-125.
150. Schick MR, Dreesman GR, and Kennedy RC (1987) Induction of an anti-hepatitis B surface antigen response in mice by noninternal image (Ab2 alpha) anti-idiotypic antibodies. *J Immunol* 138 (10): 3419-3425.

151. Seeger C and Mason WS (2000) Hepatitis B virus biology. *Microbiology and Molecular Biology* 64(1):51-68.
152. Sharpe AH, Gaulton GN, McDade KK, Fields BN, and Greene MI (1984) Syngeneic monoclonal antiidiotypic can induce cellular immunity to reovirus. *J Exp Med* 160(4):1195-1205.
153. Shearer MH, Sureau C, Dunbar B, and Kennedy RC (1998) Structural characterization of viral neutralizing monoclonal antibodies to hepatitis B surface antigen. *Molecular Immunology* 35:1149-1160.
154. Shoenfeld Y, Amital H, Ferrone S, and Kennedy RC (1994) Anti-idotypes and their application under autoimmune, neoplastic, and infectious conditions. *Int Arch Allergy Immunol* 105:211-223.
155. Shokrgozar MA and Shokri F (2002) Subtype specificity of anti-HBs antibodies produced by human B-cell lines isolated from normal individuals vaccinated with recombinant hepatitis B vaccine. *Vaccine* 20:2215-2220.
156. Siegel DL (2002) Recombinant monoclonal antibody technology. *Transfus Clin Biol* 9(1):15-22.
157. Skaletsky E (1997) Antiidiotypic antibodies as diagnostic antigens. *IVD Technology* 24-35.
158. Smith TJ: Purification of mouse antibodies and Fab fragment In: *Methods in Cell Biology*. Asai DJ (Ed.). Academic Press, Inc. 1993, Vol.37, pp.75-93.
159. Somasundaram R, Zaloudik J, Jacob L, Benden A, Sperlagh M, Hart E, Maks G, Kane M, Mastrangelo M, and Herlyn D (1995) Induction of antigen-specific T and B cell immunity in colon carcinoma patients by anti-idiotypic antibody. *The Journal of Immunology* 155: 3253-3261.

160. Stewart SJ: Monoclonal Antibody Production In: *Basic Methods in Antibody Production and Characterization*. Howard GC and Bethell DR (Eds.). CRC Press, LLC. USA. 2001, pp. 51-69.
161. Swenson PD, Escobar MR, Carithers RL, and Sobieski TJ (1983) Failure of preexisting antibody against hepatitis B surface antigen to prevent subsequent hepatitis B infection. *Journal of Clinical Microbiology* 18(2):305-309.
162. Teillaud JL, Desaymard C, Giusti AM, Haseltine B, Pollock RR, Yelton DE, Zack DJ, and Scharff MD (1983) Monoclonal antibodies reveal the structural basis of antibody diversity. *Science* 222(4625):721-6.
163. Thanavala Y (1989) Anti-idiotypic vaccines. *Tibtech* 7:62-66.
164. Thanavala Y (1996) Novel approaches to vaccine development against HBV. *Journal of Biotechnology* 44:67-73.
165. Thanavala YM, Bond A, Hay FC, and Roitt IM (1985) Immunofluorescent technique for the detection of monoclonal internal image anti-idiotypic antibodies of hepatitis B surface antigen. *Journal of Immunological Methods* 83:227-232.
166. Thanavala YM, Bond A, Tedder R, Hay FC, and Roitt IM (1985) Monoclonal 'internal image' anti-idiotypic antibodies of hepatitis B surface antigen. *Immunology* 55(2):197-204.
167. Thanavala YM, Brown SE, Howard CR, Roitt IM, and Steward MW (1986) A surrogate hepatitis B virus antigenic epitope represented by a synthetic peptide and an internal image antiidiotypic antibody. *J Exp Med* 164(1):227-36.
168. Thermet A, Rollier C, Zoulim F, Trepo C, and Cova L (2003) Progress in DNA vaccine for prophylaxis and therapy of hepatitis B. *Vaccine* 21:659-662.
169. Timmerman JM, Caspar CB, Lambert SL, Syrengelas AD, and Levy R (2001) Idiotypic-encoding recombinant adenoviruses provide protective immunity against murine B-cell lymphomas. *Blood* 97(5):1370-1377.

170. Tishchenko GA, Bleha M, Skvor J, and Bostik T (1998) Effect of salt concentration gradient on separation of different types of specific immunoglobulins by ion-exchange chromatography on DEAE cellulose. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 706(1):157-66.
171. Torberson M and Thomas DL (2002) Occult hepatitis B. *The Lancet Infectious Diseases* 2:479-486.
172. Traavik T: Genetically engineered vaccines: strategies and alternatives In: *An Orphan in Science: Environmental Risks of Genetically Engineered Vaccines*. Research report for DN 1999-6, Trondheim, Norway. 1999, pp.30-40.
173. Tripathi PK, Qin H, Deng S, Xu C, Bhattacharya-Chatterjee M, Foon KA, and Chatterjee SK (1998) Antigen mimicry by an anti-idiotypic antibody single chain variable fragment. *Molecular Immunology* 35:853-863.
174. Uzun Ö (1998) Viral hepatitler: epidemiyoloji. *İnfeksiyon Hastalıkları Serisi* 1(3):97-100.
175. Vollmers HP, Wozniak E, Stepien-Botsch E, Zimmermann U, and Muller-Hermelink HK (1996) A rapid method for purification of monoclonal human IgM from mass culture. *Hum Antibodies Hybridomas* 7(1):37-41.
176. Vora S (1985) Monoclonal antibodies in enzyme research: present and potential applications. *Analytical Biochemistry* 144:307-318.
177. Wai CT and Lok ASF (2002) Treatment of hepatitis B. *J. Gastroenterol* 37:771-778.
178. Ward PA, Adams J, Faustman D, Gebhart GF, Geistfeld JG, Imbaratto JW, Peterson NC, Quimby F, Marshak-Rothstein A, Rowan AN, and Scharff MD: Monoclonal antibody production: a report of the committee on methods of producing monoclonal antibodies institute for laboratory animal research national

research council. Grossblatt (Ed.). National Academy Press. Washington, DC. 1999, pp.6-8.

179. Williams G (1988) Novel antibody reagents: production and potential. *Tibtech* 6:36-42.

180. Williams WV, Weiner DB, Kieber-Emmons T, and Greene MI (1990) Antibody geometry and form: three-dimensional relationships between anti-idiotypic antibodies and external antigens. *Trends Biotechnol* 8(9):256-263.

181. Yelton DE and Scharff MD (1981) Monoclonal antibodies: a powerful new tool in biology and medicine. *Annu Rev Biochem* 50:657-80.

182. Zhou S, Liao X, Li X, Deng X, and Li H (2003) Poly-D,L-lactide-co-poly(ethylene glycol) microspheres as potential vaccine delivery systems. *J Control Release* 86(2-3):195-205.

183. Zouali M (2001) Antibodies. *Encyclopedia of life sciences* Nature Publishing Group/www.els.net 1-8.

ÖZGEÇMİŞ

1969 yılında Karabük'te doğdu. 1991 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Lisans programından mezun oldu. 1996 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde "Bursa ve Sakarya Yöreleri Kırmızı Biberlerinde Aflatoksin Çalışması" konulu tezi ile Yüksek Lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl GYTE Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde Doktora programına başladı. 1995 yılından itibaren GYTE Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji A.B.D. Araştırma Görevlisi olarak çalışmalarını sürdürmektedir.