

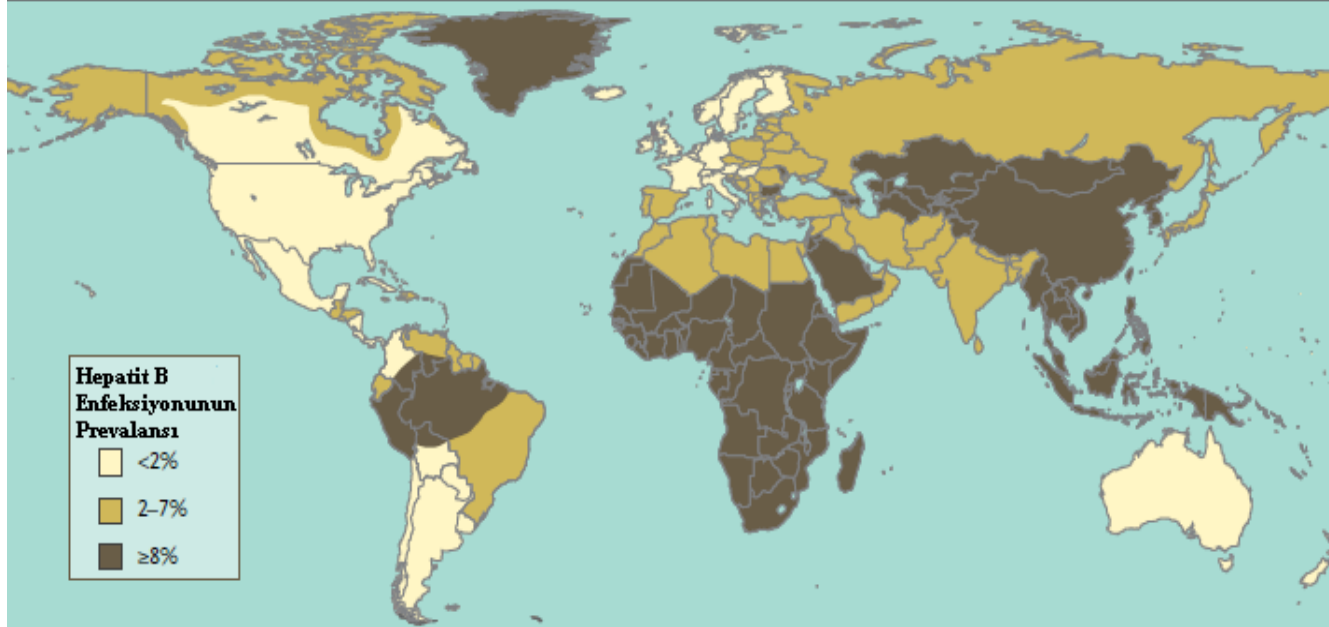


Hepatit e Antijenine (HBeAg) Özgü Monoklonal Antikor Geliştirilmesinde Alternatif Yöntemler

XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi

Yrd.Doç.Dr. İbrahim SÖĞÜT
İstanbul Bilim Üniversitesi
28/10/2013

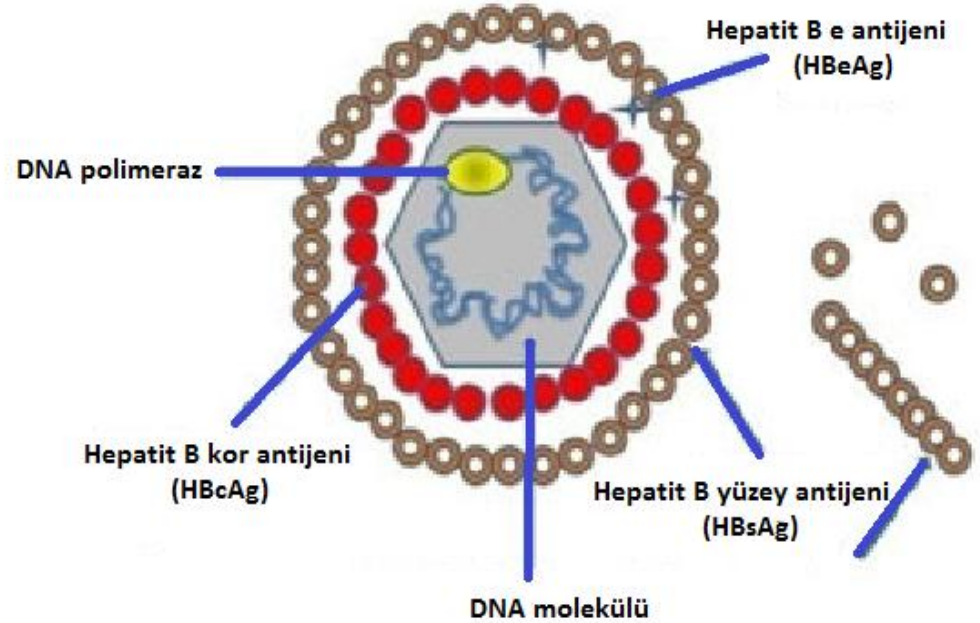
Dünyada ve Türkiye'de HBV Yayılımı



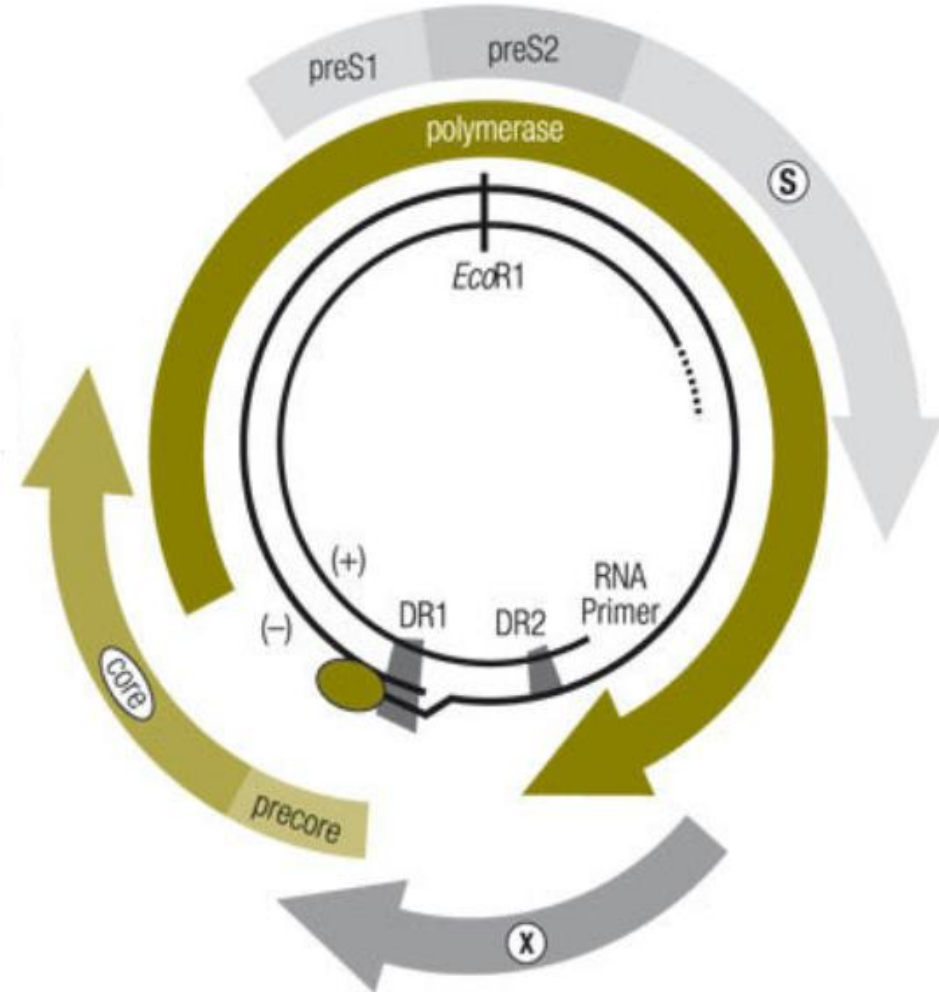
- DSÖ verilerine göre **2 milyar kişi** HBV ile enfekte, **350 milyon kişi** kronik HBV'dir
- Dünyada her yıl **500-700 bin kişi** ölmektedir
- Sağlık Bakanlığı verilerine göre ülkemizde **4-4.5 milyon** HBV taşıyıcısı bulunmaktadır

Hepatit B Virüsü

- Hepadnaviridae ailesinin bir üyesi olan Hepatit B virüsü (HBV)
 - küçük,
 - zarflı,
 - kısmi çift zincirli,
 - insanlarda ve hayvanlarda enfeksiyon oluşturan,
 - hepatotropik bir DNA virüsüdür.



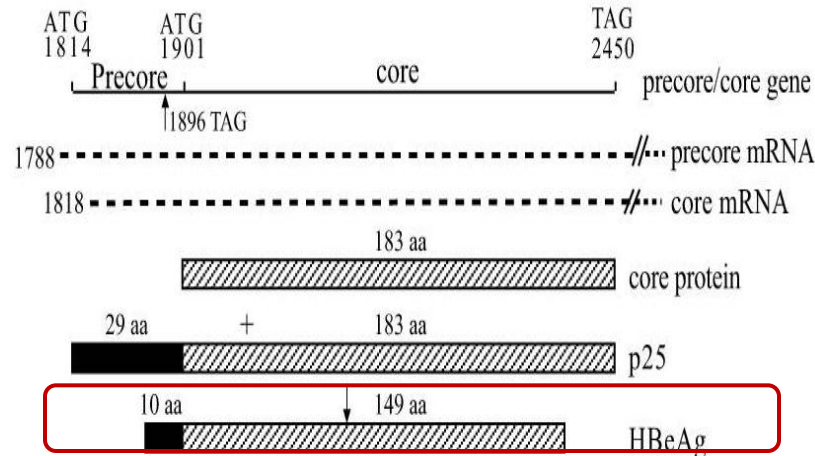
HBV'nin Genom Yapısı



- S, C, X, P genlerine sahiptir
- HBsAg'den oluşan dış zarf
 - kor proteini (HBcAg),
 - HBeAg'yi,
 - DNA'ya bağlı polimerazı çevreler

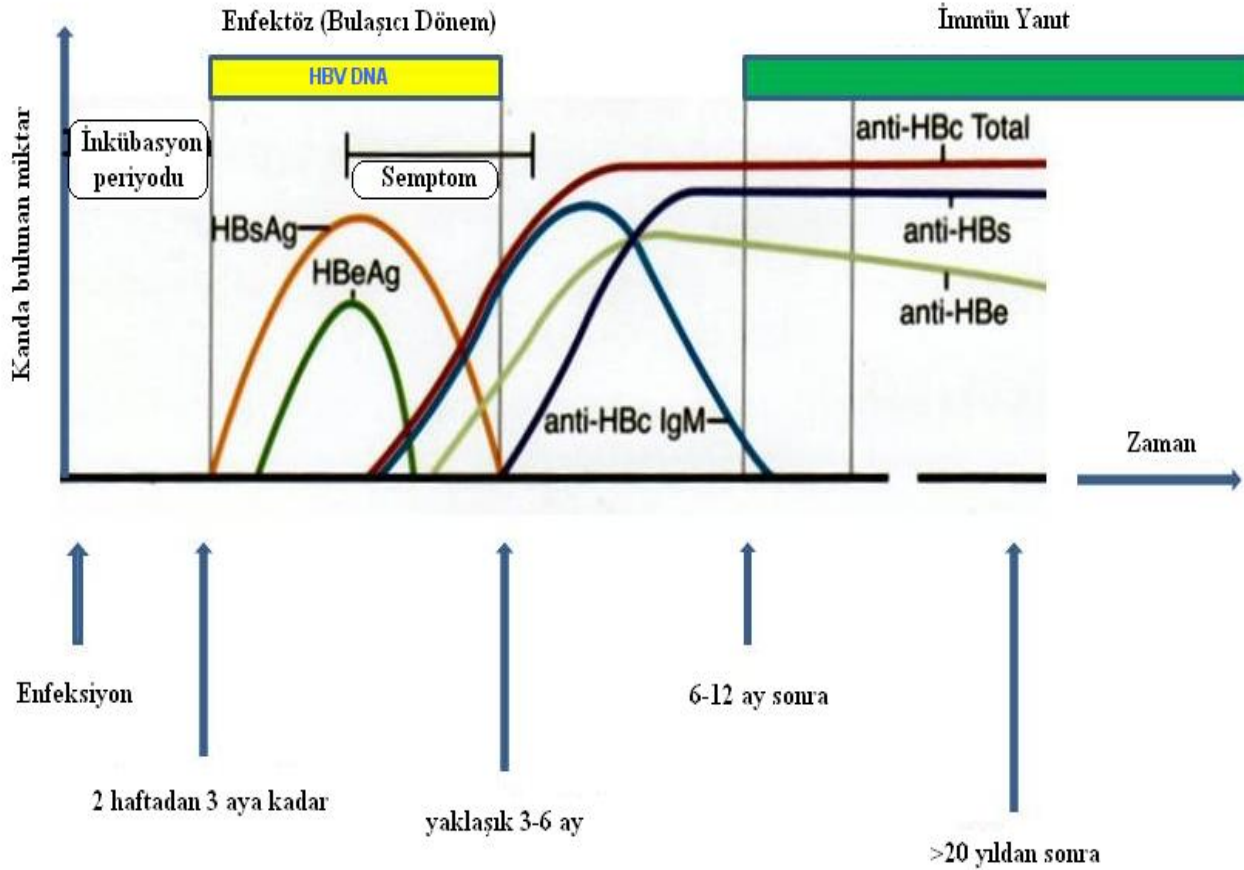
HBeAg Oluşum Aşaması

- HBcAg'yi HBV'nin C geni, C geninin içerdiği precore dizisi ise HBeAg'yi kodlamaktadır
- Ribozomlarda gerçekleşen translasyonun sonunda kor proteinine göre 29 aminoasit daha uzun olan HBeAg öncül bölgesi oluşmaktadır
- Bu öncül bölgenin **19 aminoasiti sinyal bölgesi** görevi gördükten sonra C-terminal kısımdaki arjininden kesilmekte ve kalan kısım **HBeAg**'yi oluşturur



HBeAg , Anti-HBeAg ve Hepatit B

Kanda bulunan HBV antijen ve antikorları

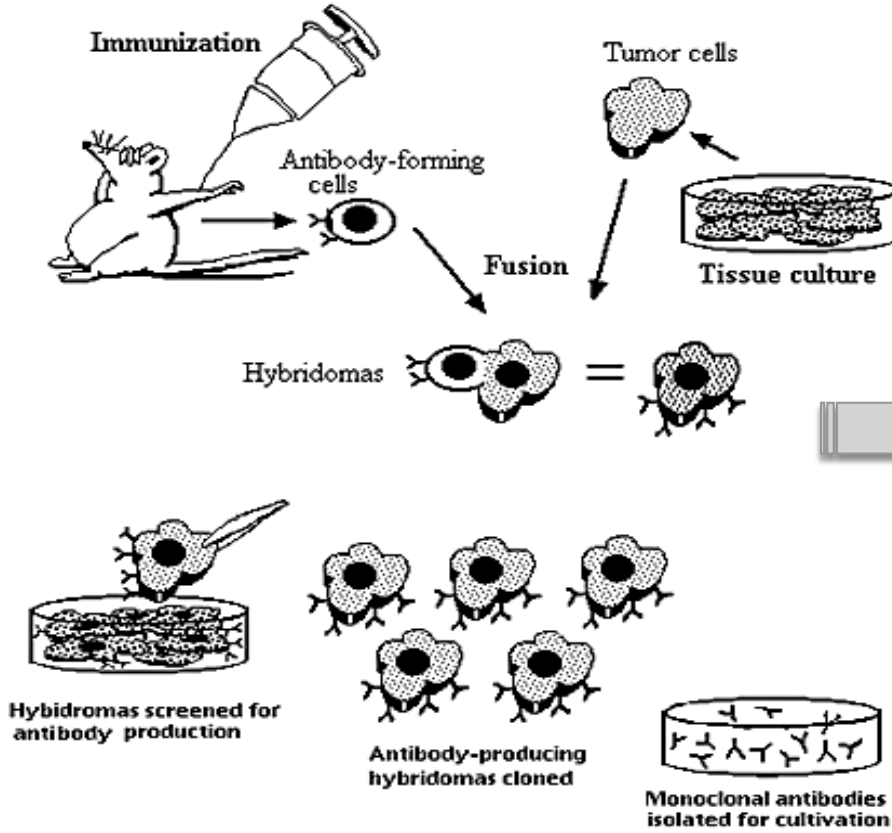


- HBsAg ve HBeAg, Hepatit B tanısında ilk tespit edilen proteinler arasındadır
- Hastalığın orta safhalarında
 - HBeAg azalırken,
 - Anti-HBeAg miktarı artmaya başlar

Hepatit e Antijeninin Önemi (Kronik)

- HBV ile enfekte hastaların serumlarında 6 aydan fazla HBsAg, HBeAg ve yüksek seviyede HBV DNA'sı bulunması enfeksiyonun kronikleşme göstergesidir.
- HBeAg klinik açıdan
 - enfeksiyonun tanısında,
 - viral replikasyon seviyesinin belirlenmesinde,
 - şiddetinin tayininde kullanılır.

Çalışmanın Amacı

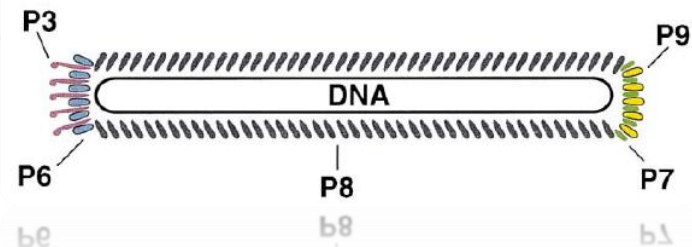


Monoclonal Antibody Production

Klasik Yöntem



1. Alternatif Yöntem

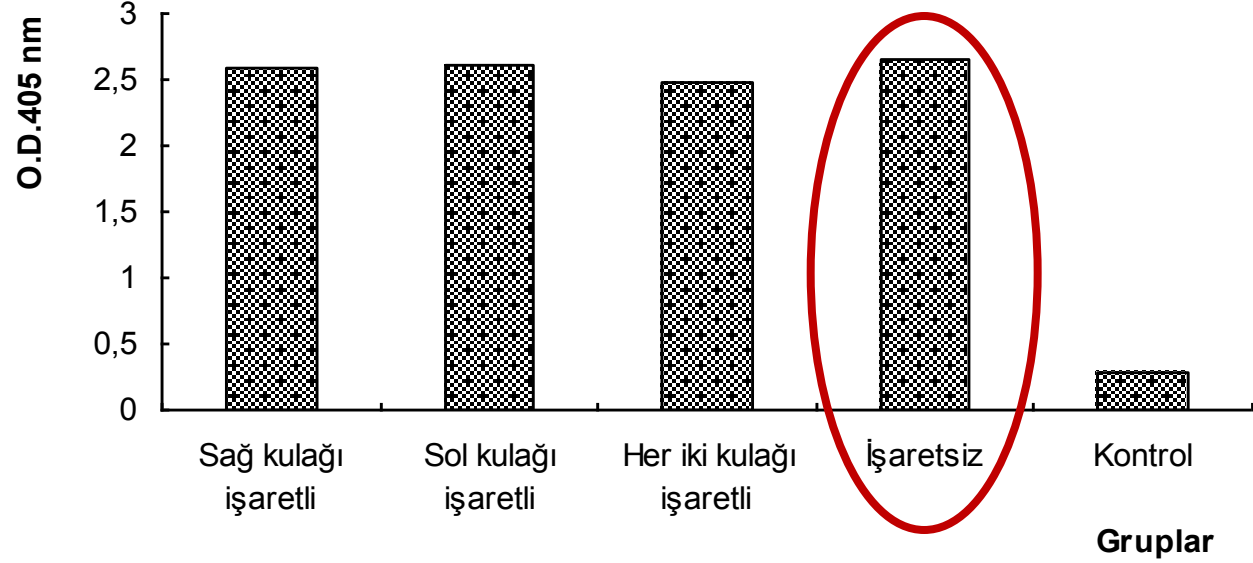


2. Alternatif Yöntem

İmmünizasyonlar

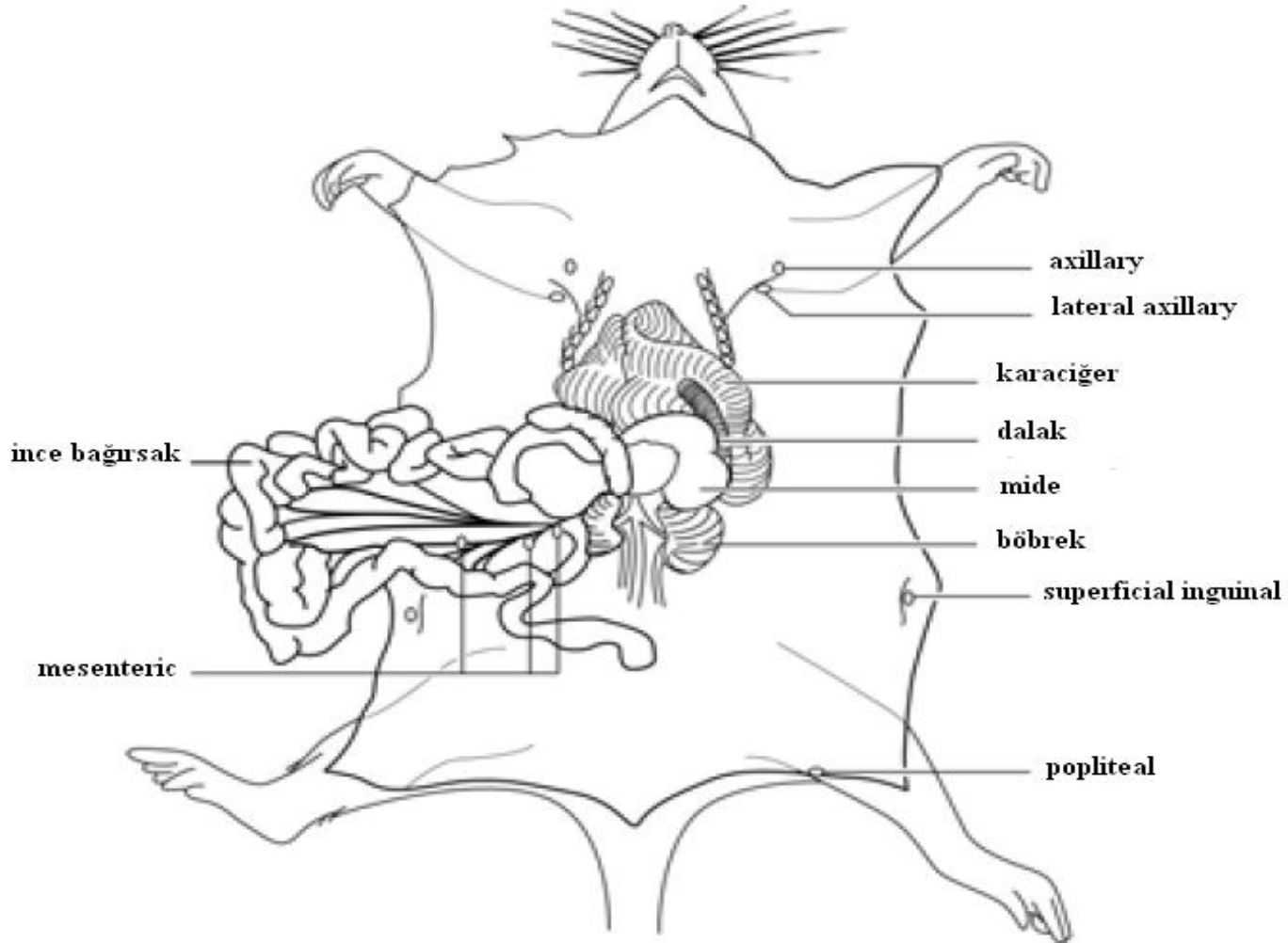
- Hepatit B e antijenine özgü monoklonal antikor üretim çalışmalarında 6-8 haftalık **BALB/c fareleri**, HB e antijeni (10µg HBeAg) ile ikişer hafta aralıklarla immünize edildi.
- İmmünizasyon sırasında 4 fare kullanıldı.
- İlk immünizasyon *“Freund’s complete”* adjuvanı, ikinci ve diğer immünizasyonlar ise *“Freund’s incomplete”* adjuvanı ile gerçekleştirildi.

HBeAg'ye Karşı Oluşan Antikor Yanıtı

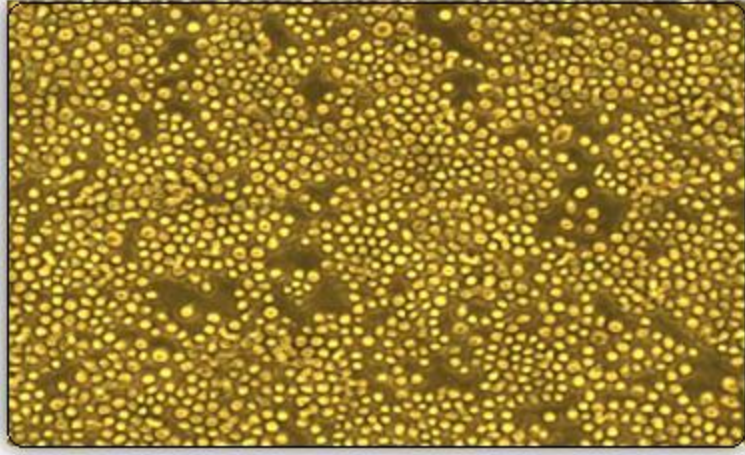


TİTRESİ EN YÜKSEK FARE(LER) FÜZYONA ALINDI

Dalak ve Lenf düğümlerinin Toplanması



Füzyon



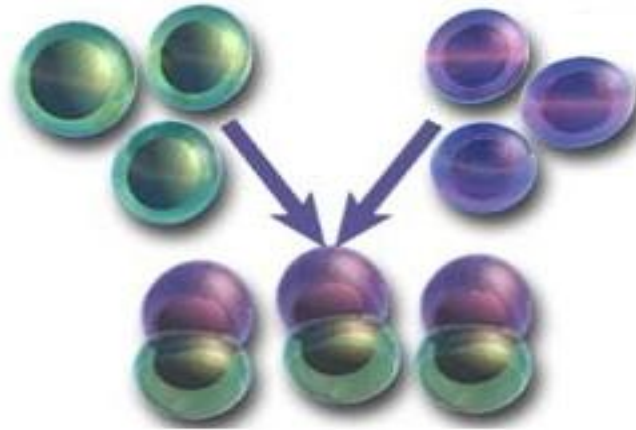
Myeloma Hücresi



Dalak

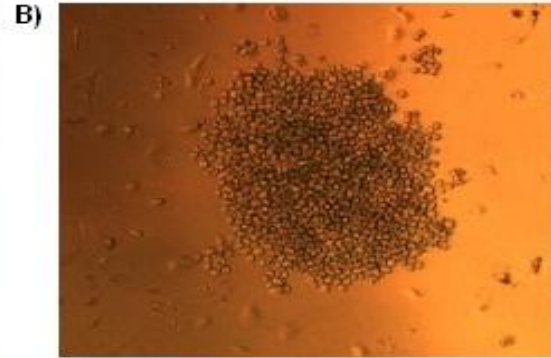
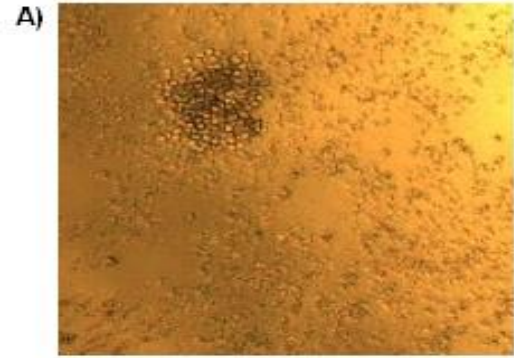


Lenf Nodu



FÜZYON

Füzyon Sonrası



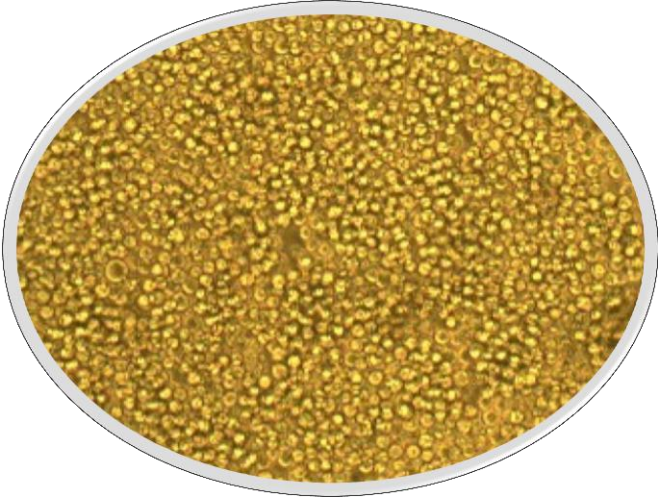
A)Füzyon pleytindeki kuyuda bulunan hibrid hücrenin **10. gündeki** durumu, 4x.

B)Füzyon pleytindeki kuyuda bulunan hibrid hücrenin **10. gündeki** durumu, 10x.

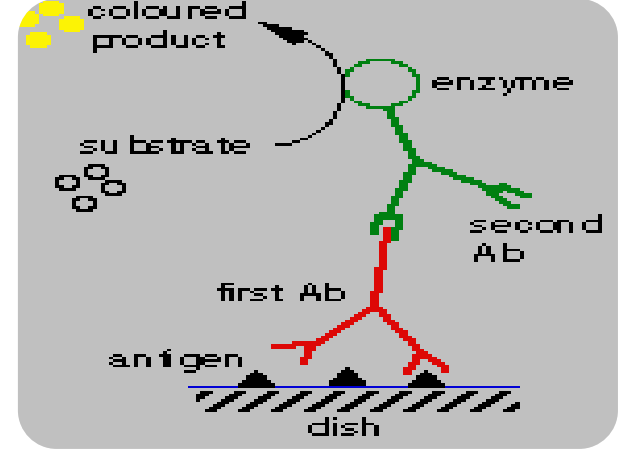
C)Hibrid hücrenin besiyerinin değiştirilmesi sonucu **15. gündeki** durumu, 10x.

D)Hibrid hücrenin **22. gündeki** durumu, 10x.

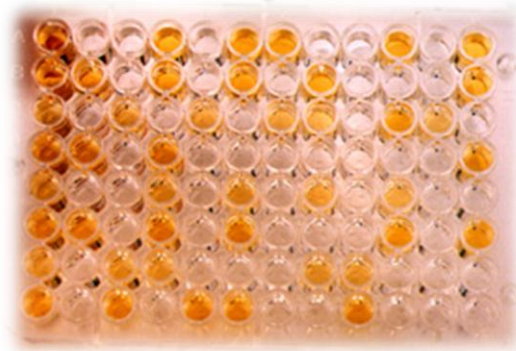
Füzyon Taraması



Çoğalmış hibridoma hücresi



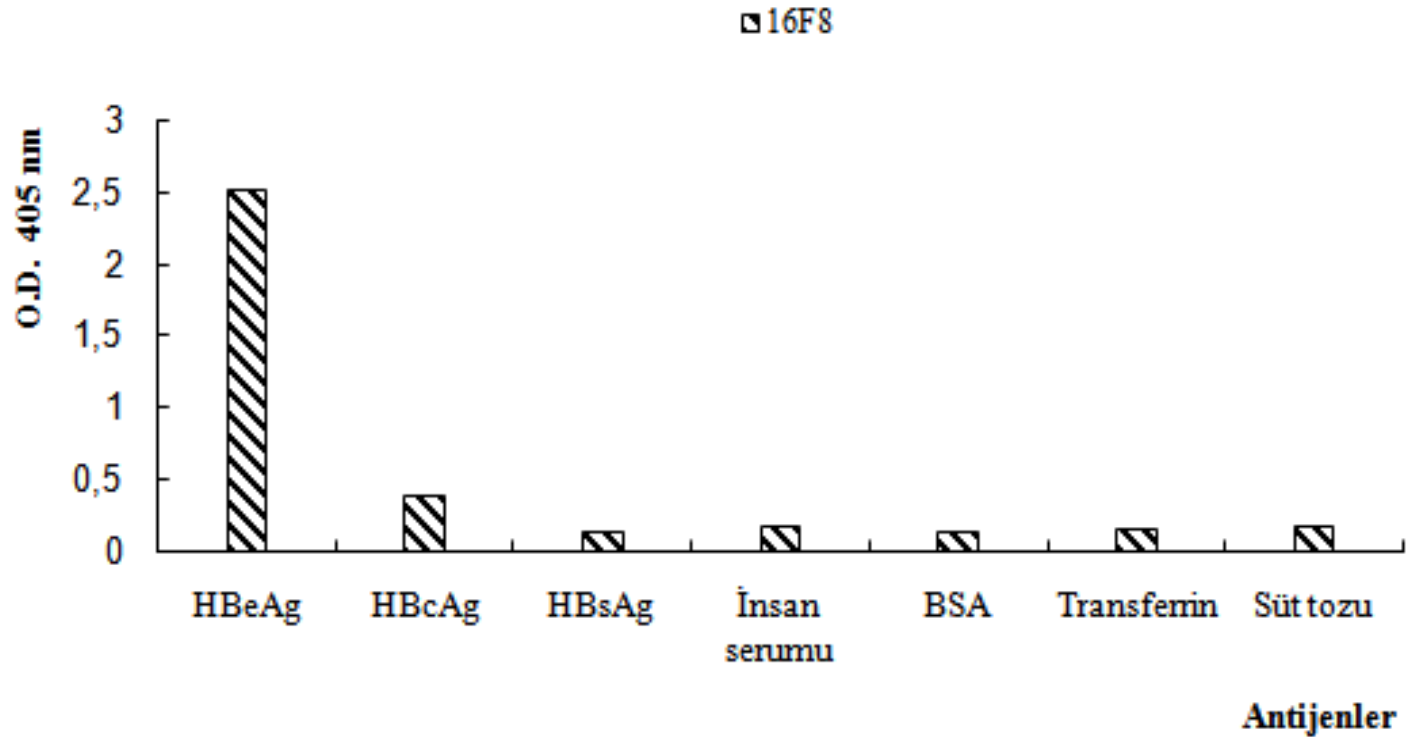
İndirekt ELISA



Füzyon sonuçları

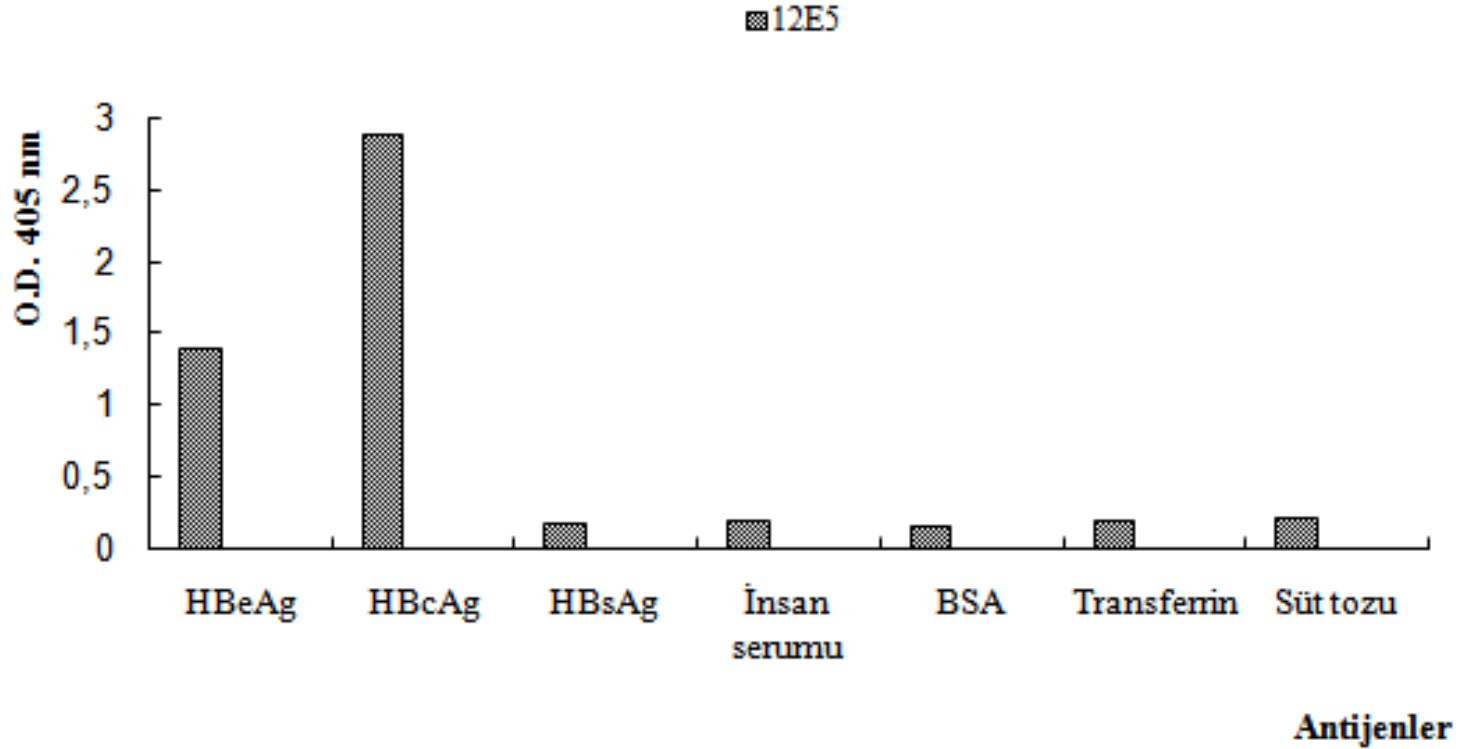
- Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen on füzyon sonucunda üç füzyondan HBeAg ve HBcAg için özgün olan üç hibrit hücre (16F8, 12E5, 18E10) elde edilmiştir.

Monoklonal Antikorların Çapraz Reaksiyon Testi (16F8)



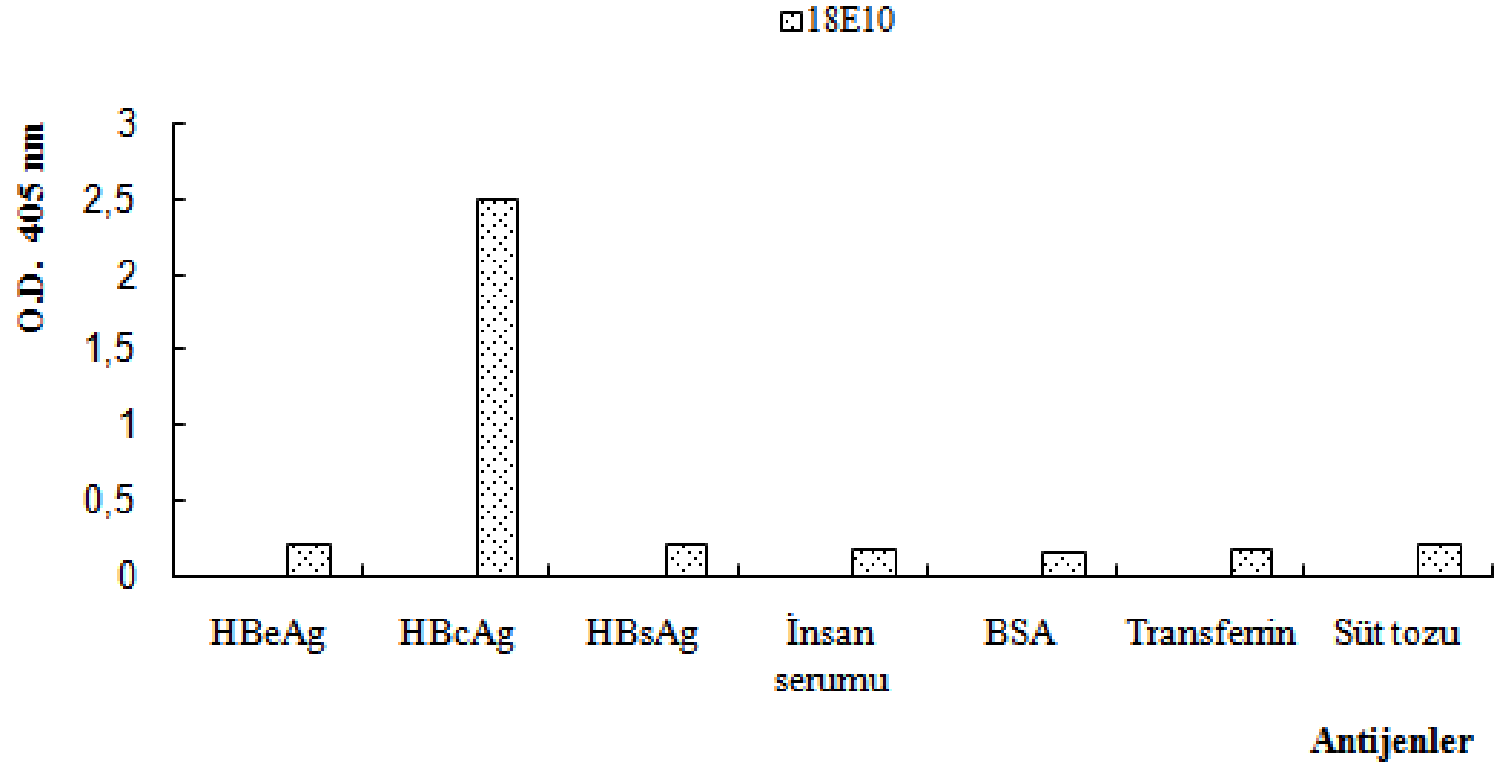
HBeAg'ye karşı antikor aktivitesi pozitif olan 16F8 hibrit hücreesindeki çapraz etkileşimleri görebilmek için farklı proteinleri ELISA plağına kaplayarak yapılan indirekt ELISA testinin sonuçları

Monoklonal Antikorların Çapraz Reaksiyon Testi (12E5)



HBeAg'ye karşı antikor aktivitesi pozitif olan 12E5 hibrit hücredeki çapraz etkileşimleri görebilmek için farklı proteinleri ELISA plağına kaplayarak yapılan indirekt ELISA testinin sonuçları

Monoklonal Antikorların Çapraz Reaksiyon Testi (18E10)



HBeAg'ye karşı antikor aktivitesi pozitif olan 18E10 hibrit hücredeki çapraz etkileşimleri görebilmek için farklı proteinleri ELISA plağına kaplayarak yapılan indirekt ELISA testinin sonuçları

Monoklonal Antikorların Alt İzotipleri

- Elde edilen monoklonal antikorların sınıf ve alt sınıfları indirekt ELISA ile belirlendi

Alt izotipe özgü anti-mouse immüoglobulinler									
Hibrid hücreler	IgG	IgM	IgA	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	λ	K
16F8	2,53	0,18	0,18	2,15	0,19	0,23	0,16	0,16	1,6
12E5	2,93	0,17	0,18	0,15	0,16	2,45	0,19	0,18	1,8
18E10	0,19	2,43	0,17	0,17	0,18	0,17	0,17	0,23	0,8

Monoklonal Antikor Üreten Hücrenin Geniş Çaplı Çoğaltılması



Saflaştırma (16F8)

- 16F8 HBeAg'ye özgü monoklonal antikor geniş ölçekte üretildikten sonra üst sıvıları amonyum sülfat ile çöktürüldü.
- 16F8 monoklonal antikorunun izotipi IgG1 olduğundan Protein-G afinite kolon kromotografisi ile saflaştırıldı.
- Kolon sonrası biriktirilen bütün kesimlere indirekt ELISA testi uygulandı.

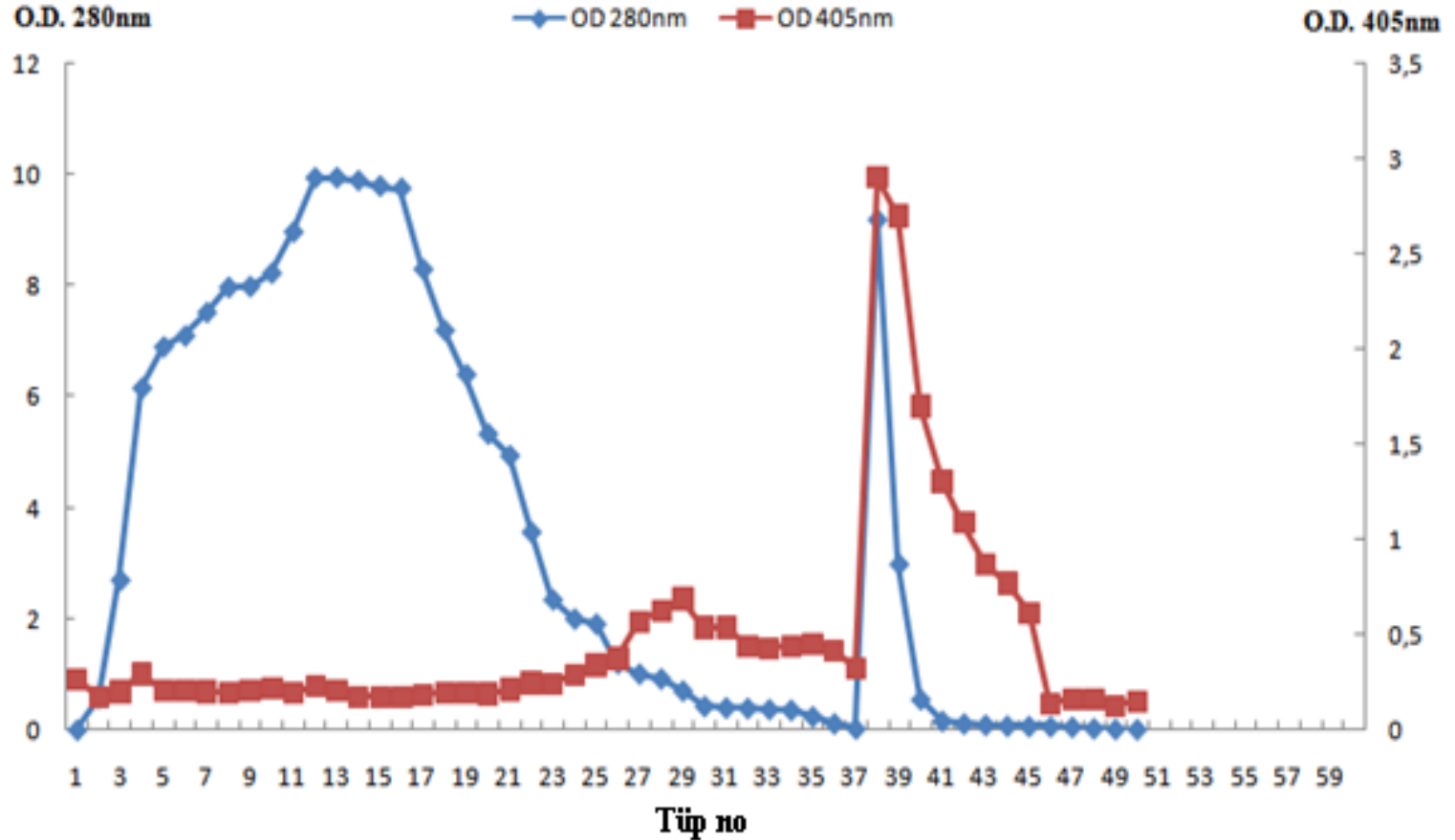


Fraction Collector



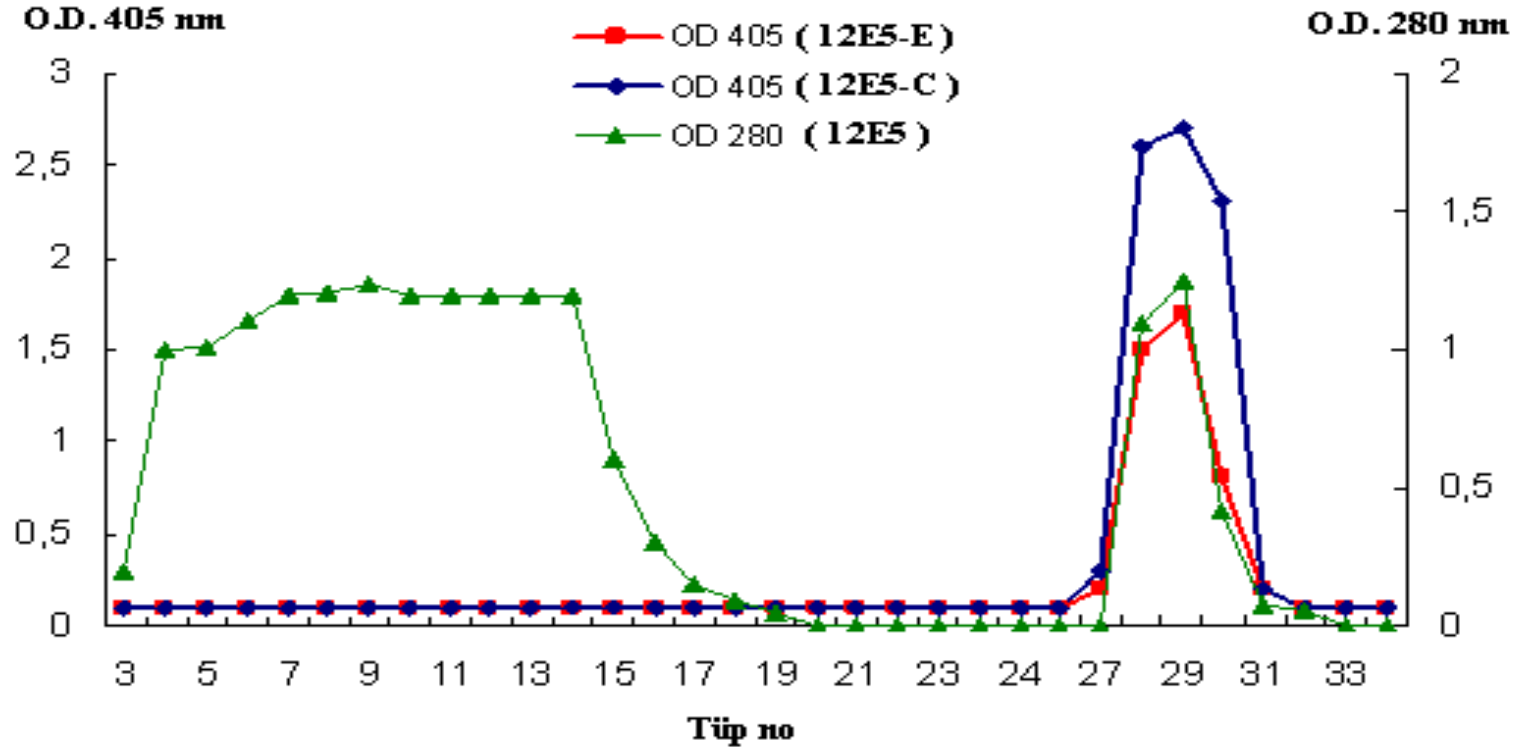
Protein A & Protein G Kolonu

Saflaştırma-16F8 (devam)



38. ve 39. tüplerden **toplam 9 mg/ml protein** elde edildi ve 1 mg/ml olacak şekilde bölündükten sonra -20°C 'de saklandı.

Saflaştırma (12E5)



28, 29 ve 30. tüplerden **5 mg/ml protein** elde edildi ve 1 mg/ml olacak şekilde bölündükten sonra -20°C'de saklandı.

Epitop Analizi

- 16F8 monoklonal antikorun lineer B hücre epitop analizi sonucunda, amino asit dizilimi **FGVWIRTPPAYRPPNAPILS** olarak bulundu (ProImmune Ltd, Oxford/UK).
- 16F8 monoklonal antikoru, diğer rekombinant HBeAg immünizasyonlarında genelde ortaya çıkan ve **HBeAg- β** epitopu ile eşleşen antikorların amino asit dizilimine sahipti.

Epitop Analizi

- 12E5(c) için gerçekleştirilen lineer B hücresi epitop haritalama analizi sonucunda **SFGVWIRTPQAYRPP** dizisinde zayıf bir bağlanma görülmüştür
 - Bu zayıf bağlanmanın 16F8 monoklonal antikorundaki lineer epitopun aksine **kesintili konformasyonel epitopun** varlığına işaret ettiği belirlenmiştir
- Veritabanlarında HBcAg için tanımlanan altı epitoptan beşinin konformasyonel epitop olduğu bilinmektedir

Alternatif Yaklaşımlar

- HBe antijenine özgü monoklonal antikor geliştirilmesinde bilinen klasik yöntemlerin yanı sıra kullanılacak alternatif yaklaşımlar:
 - **Organ olarak dondurulmuş dalak ve lenf düğümlerinin füzyon çalışmasında kullanılması**
 - **Yüzeyinde HB e antijeni eksprese eden M13 fajlarla yapılan immunizasyonlar sonrası monoklonal antikor geliştirilmesi**

Organ Olarak Dondurulmuş Dalak ve Lenf Dügümlerinin Füzyon Çalışmasında Kullanılması

- HBeAg ticari olarak rekombinant şekilde üretilmektedir.
 - Düşük moleküler ağırlığı (17kDa) ve HBcAg ile ortak protein yapısı nedeniyle bu antijene karşı monoklonal antikor geliştirilmesi zordur.
 - Bu nedenle HBeAg oldukça kıymetlidir.
- Genel olarak antijenlere karşı monoklonal antikor elde edilmesi için bir füzyon çalışmasında en az 4 fareyle immünizasyonlar başlatılır.
 - Bunun nedeni, antijene karşı etkin hümmoral yanıt elde etme olasılığını artırmaktır.

Organ Olarak Dondurulmuş Dalak ve Lenf Dügümlerinin Füzyon Çalışmasında Kullanılması

- Dondurma konusunda ulaşılan noktada homojen hücre popülasyonlarının ya da tek katmanlı dokuların dondurulması için optimum koşulların belirlenmesi ve dondurulan hücrelerin çözünmesiyle yeniden aktif hücre eldesi mümkündür.
- Ancak kompozit dokuların ve organların bütün olarak dondurulması konusunda henüz tam anlamıyla başarı elde edilememiştir.

Dondurulmuş Dalak ve Lenf Düğümlerinin Füzyon alışmasında Kullanılması

- Anti-HBeAg monoklonal antikoruunu üretmek için 5 adet 7-8 haftalık BALB/c fareler 10 g HBeAg ile ikişer hafta aralıklarla immünize edildi.
- İlk immünizasyon *Freund's complete* adjuvanı, ikinci ve diğer immünizasyonlar ise *Freund's incomplete* adjuvanı ile gerçekleştirildi.
- Farelerden kan alınıp ilgili antijene karşı gelişmiş bir antikor yanıtının oluşup oluşmadığına ELISA'da bakıldı.

Farelerin HBeAg'ye Karşı Geliřtirdiđi Antikor Yanıtı

Bu alışmada HBeAg ile immünize edilen iyi antikor yanıtı veren  farenin lenf nodları ve dalağı



%80 Fetal Calf Serum (FCS), % 10 DMEM medium ve % 10 Dimethylsulfoxide (DMSO)'den oluşan dondurma ortamı içine alınarak



bir gün -80 C' de bekletilip



daha sonra -150 C derin dondurucuya alındı

Sonuç

- Dondurulmuş dalak ve lenf dğümlerinin 1., 2., ve 3. ay füzyonları sonucunda anti-HBe monoklonal antikor elde edilemedi fakat bütün füzyonlarda antikor aktivitesine sahip hibrid hücrelerin oluşabildiği görüldü.
- Buna ek olarak ikinci ay sonunda, dondurulan organlardan yapılan ikinci füzyon çalışmasında HBc antijenine özgü monoklonal antikor elde edildi (3G3).

Farelerin dalak ve lenf nodlarının dondurulması ile
immünizasyon için gereken zaman ve antijenden
tasarruf sağlandı



Yüzeyinde HB e Antijeni Eksprese Eden Fajlarla Yapılan İmmunizasyonlar Sonrası Monoklonal Antikor Geliştirilmesi

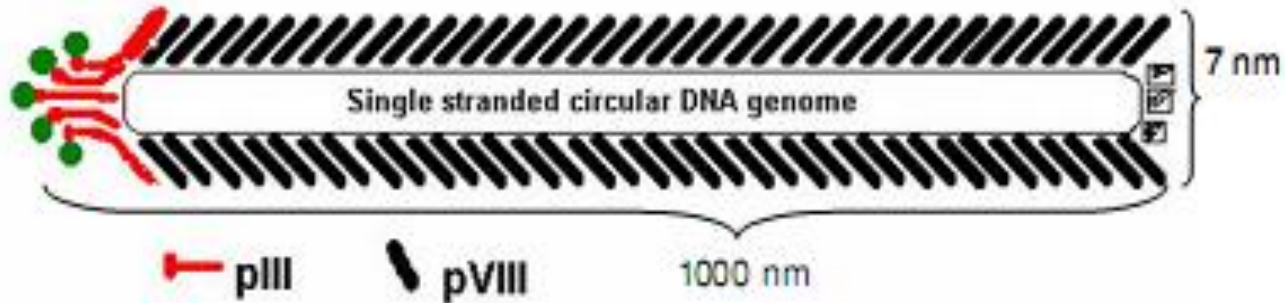
- Bir antijene karşı etkin hümmoral yanıt elde etmek için antijenin niteliği kadar aşu veya immunizasyonlarda kullanılan adjuvanlar da çok önemlidir.
- Adjuvanlar, bir antijene karşı özgül olmayan immün cevabı uyarayan/artıran maddelerdir.
- İnsanlarda -- alüminyum bileşikleri
- Deney hayvanlarında -- Freund'un mineral adjuvanı

Faj Display Yöntemi

- Alternatif adjuvan geliştirme çalışmalarında rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesiyle birlikte *faj display* yöntemi de kullanılmaktadır.
- Fajın büyük bir molekül olması ve faj yüzeyinde eksprese olan proteinlerin hümmoral ve sitotoksik T hücre yanıtına sebep olması, alternatif adjuvan olarak kullanılabilme olasılığını arttırmaktadır.
 - Bu yöntemle sadece bakteri enfekte etme özelliğinde olan fajın yüzeyinde yabancı proteinler eksprese edilmektedir.

Faj Display

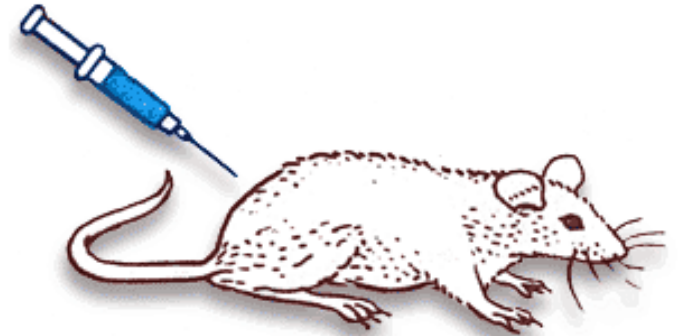
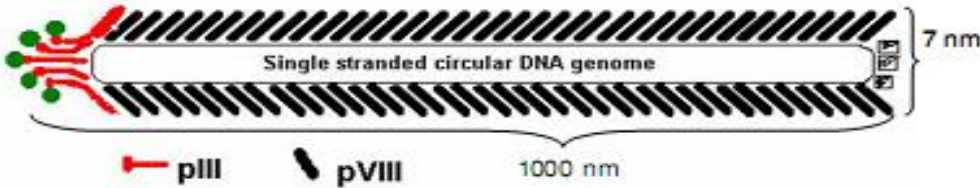
- Çalışmada M13 yaban fajı kullanıldı.



- M13, tek iplikli DNA'ya sahip ve yüzeyinde 5 adet PIII proteini ile 2700 adet PVIII proteini bulunan bakteriofajdır.

HBeAg ve Faj Display

- Bu kapsamda; iki farklı fare grubu rEfaj kullanılarak 21 gün arayla üç kez immünize edildi. Her grup için 6–8 haftalık 4 adet BALB/c fare kullanıldı. İlk gruba 10^{11} rekombinant e faj, ikinci gruba ise 10^{11} rekombinant e faj+IFA (Freund's incomplete adjuvanı) intraperitoneal olarak uygulandı.



HBeAg ve Faj Display

- Rekombinant e faj immünizasyonlarında yüksek Hepatit B e antikor yanıtı veren farelerin dalak ve lenf düğümlerinin 1. 2. ve 3. füzyonları sonucunda anti-HBe monoklonal antikor elde edilemedi fakat antikor aktivitesine sahip hibrid hücrelerin bütün füzyonlarda oluşabildiği görüldü.

CRYOPRESERVATION OF SPLEEN AND LYMPH NODES AS A SOURCE OF MONONUCLEAR CELLS TO BE USED FOR THE DEVELOPMENT OF MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCING HYBRIDOMA CELLS

Ibrahim Sogut¹, Ibrahim Hatipoglu¹, Muge Serhatli¹, Safak Isil Cevik², Deniz Durali¹ and Aynur Basalp^{1*}

¹TUBITAK Marmara Research Center, Genetic Engineering and Biotechnology Institute, 41470 Gebze, Kocaeli, Turkey

²Biological Sciences and Bioengineering Program, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Sabanci University, Orhanli, Tuzla, 34956 Istanbul, Turkey.

*Corresponding author e-mail: aynur.basalp@mam.gov.tr

Phage Displayed HBV Core Antigen with Immunogenic Activity

Aylin Ozdemir Bahadir • Bertan Koray Balcioglu • Kamil Serkan Uzyol • Ibrahim Hatipoglu • Ibrahim Sogut • Aynur Basalp • Berrin Erdag

HYBRIDOMA
Volume 30, Number 5, 2011
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/hyb.2011.0052

Monoclonal Antibodies Specific for Hepatitis B e Antigen and Hepatitis B Core Antigen

Ibrahim Sogut^{1,2} Ibrahim Hatipoglu¹ Gungor Kanbak² and Aynur Basalp¹

DİNLEDİĞİNİZ İÇİN TEŞEKKÜRLER

- Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Prof. Dr. GÜNGÖR KANBAK
- TÜBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü (GMBE)
Doç. Dr. AYNUR BAŞALP

Doç. Dr. BERRİN ERDAĞ
Dr. İBRAHİM HATİPOĞLU
Dr. KORAY BALCIOĞLU
Dr. AYLIN BAHADIR



Bu çalışma TÜBİTAK KAMAG-1007 programı 105G056 no'lu proje tarafından desteklenmiştir