

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR ALFA'YA (TNF-ALFA) KARŞI POLİKLONAL
ANTİKOR ÜRETİLMESİ

Ezgi Koç

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Erkan Yılmaz

Mayıs

2021

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Ezgi KOÇ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Tümör Nekrozis Faktör Alfa'ya (TNF-alfa) Karşı Poliklonal Antikor Üretilmesi

Ezgi KOÇ

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Erkan YILMAZ

Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF-alfa), doğal bağışıklığın başlıca mekanizmalarından olan inflamasyonda etkin rol oynayan, multifonksiyonel bir sitokindir. Özellikle Romatoid artrit (RA) ya da Crohn hastalığı (CD) gibi otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarda TNF-alfa konsantrasyonunun vücutta artması bu sitokini terapötik olarak önemli bir hedef haline getirmektedir. Bu hastalıklarda TNF-alfa'yı tanıyan ve nötralize edebilen anti-TNF-alfa antikorları tabanlı ilaçlar kullanılabilmektedir. Infliximab (Remicade); FDA-onaylı kimerik bir anti-TNF-alfa antikorudur ve dünyanın en çok satan antikor tabanlı ilaçlarından biri olmuştur. Infliximab patent süresi 2018 yılı itibarıyla dolmuştur. Biyobenzer antikorlar, orijinal antikorlar ile aynı sekansa sahip olmasının yanında farklı klonlama ya da üretim prosesi ile üretilirler. Bu nedenle, glikolizasyon profillerinde, üretilen ürünün kalitesinde ve işlevselliğinde değişimler olabilmektedir. Bu yüzden anti-TNF-alfa antikorları ve biyobenzerleri oluşturulmaya devam etmektedir.

Bu tez çalışmasında TNF-alfaya karşı poliklonal antikor üretilmiştir. Bu amaca ulaşmak için; TNF-alfa rekombinant protein ekspresyonu yapılmış ve Balb/C dişi fareye immünizasyonu sonrasında ascite sıvısı toplanarak antikorun TNF-alfa'ya karşı spesifitesi ölçülmüştür. Üretilmiş olan poliklonal antikor geliştirilip saflaştırılarak ELISA ve Western Blot gibi teknikler için kullanılmaya açık olacaktır. Aynı zamanda ülkemizde TNF-alfa'ya karşı biyoteknolojik bir ilaç geliştirilmesi için önemli bir basamak olabilecektir.

2021, 101 sayfa

Anahtar kelimeler: TNF-alfa, rekombinant protein, poliklonal antikor, biyobenzerler.

ABSTRACT

M.Sc Thesis

Generation of Polyclonal Antibody Against Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-alpha)

Ezgi KOÇ

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Erkan YILMAZ

Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-alpha), is a multifunctional cytokine which is one of the most important mechanisms of the immune system. Increasing concentration of TNF-alpha, especially in the autoimmune and inflammatory disorders makes this cytokine an important therapeutic target. In diseases with high TNF-alpha concentration, anti-TNF antibody-based drugs can recognize and neutralize TNF-alpha. Nowadays, there are many FDA-approved anti-TNF-alpha antibodies in the market. Infliximab (Remicade), an FDA-approved chimeric TNF-alpha antibody has been one of the top 10 selling antibody-based drugs in the world. Infliximab patent expired as of 2018. Biosimilar antibodies could be produced by different cloning or production processes. For this reason, there may be changes in the glycosylation profiles, the quality of the produced product or its functionality. Therefore, anti-TNF-alpha antibodies and biosimilars continue to be produced.

In this study, anti-TNF-alpha polyclonal antibody is generated. To achieve this; recombinant protein is produced with the TNF-alpha protein expression vector and the Balb/C female mice are immunized. Ascites fluid is collected and the specificity of the antibody is measured. Generated polyclonal antibody will be developed in later stages for techniques such as ELISA and Western Blotting. This antibody could be a step for the biotechnological drug production against TNF-alpha.

2021, 101 pages

Keywords: TNF-alpha, recombinant protein, polyclonal antibody, biosimilars.

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans eğitimim boyunca bana her türlü desteği sağlayan, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren ve tez çalışmamın her aşaması ile ilgilenerek önerileriyle beni yönlendiren sayın danışman hocam Prof. Dr. Erkan YILMAZ'a,

Eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen sayın hocam Dr. Öğretim Üyesi Doruk ENGİN'e,

Yardımları ve güler yüzleri için tüm Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı hocaları, öğrenci ve çalışanlarına,

Her daim yanımda olan ve bana sonsuz destek olan canım ailem; annem Nurgül KOÇ'a, babam Fatih KOÇ'a, kardeşim Damla KOÇ'a ve teyzem Ayşegül FOTA'ya,

Son olarak; bugüne kadar ve yüksek lisansım boyunca her daim yanımda olan bütün dostlarıma,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ezgi KOÇ

Ankara, Mayıs 2021

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
SEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR ALFA	3
2.1.1. TNF-ALFA SİNYAL YOLAĞI.....	4
2.1.1.1. TNFR1 Sinyal Yolağı	5
2.1.1.2. TNFR2 Sinyal Yolağı	7
2.1.2. TNF-ALFA DİSREGÜLASYONU	7
2.1.3. TNF-ALFA İNHİBİTÖRLERİ	10
2.2. ANTİKORLAR.....	12
2.2.1. ANTİKOR YAPISI	13
2.2.1.1. Antikor İzotipleri	15
2.2.1.2. Antikorum Antijene Bağlanması	17

2.2.2. POLİKLONAL ANTİKORLAR	19
2.2.2.1. Poliklonal Antikorların Üretim Yöntemleri.....	20
2.2.3. MONOKLONAL ANTİKORLAR	23
2.2.3.1. Monoklonal Antikorların Üretim Yöntemleri.....	24
2.2.3.2. Rekombinant Antikorlar	25
2.2.3.3. Alternatif Antikor Formatları.....	27
2.3. REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ.....	31
2.3.1. REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİNDE KONAK SİSTEMLERİ.....	31
2.3.2. REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİNDE VEKTÖR SEÇİMİ	32
2.3.3. REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİNDE ANTİBİYOTİK SEÇİMİ.....	35
2.3.4. REKOMBİNANT PROTEİNLERİN SAFLAŞTIRILMASI	35
2.3.4.1. İmmobilize Metal İyon Kromatografisi	35
2.3.4.2. SUMO Füzyon Teknolojisi.....	36
2.4. BİYOBENZERLER	38
<u>3. GEREKÇE VE AMAÇ.....</u>	<u>40</u>
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	<u>41</u>
4.1. MATERYAL	41
4.1.1. IPTG İLE PROTEİN İNDÜKSİYONU	41
4.1.2. TOTAL PROTEİN İZOLASYONU	42
4.1.3. REKOMBİNANT PROTEİNİN SAFLAŞTIRILMASI	43
4.1.4. BCA İLE PROTEİN TAYİNİ	43
4.1.5. SDS-PAGE	44
4.1.6. İMMÜNİZASYON	47

4.1.7. İNDİREKT ELISA İLE ANTİKOR TİTRASYONU	47
4.1.8. WESTERN BLOTLAMA.....	48
4.2. YÖNTEM	51
4.2.1. REKOMBİNANT TNF-ALFA PROTEİNİ ÜRETİLMESİ	51
4.2.1.1. IPTG ile Protein İndüklenmesi	51
4.2.1.2. Total Protein İzolasyonu	51
4.2.1.3. Rekombinant Proteinin Saflaştırılması	52
4.2.1.4. BCA ile Protein Tayini	52
4.2.1.5. SDS-PAGE	53
4.2.2. İMMÜNİZASYON	53
4.2.3. ASCİTE SIVISINDAN ANTİKOR TİTRASYONU	54
4.2.4. KUYRUK KANINDAN ANTİKOR TİTRASYONU	56
4.2.5. WESTERN BLOTLAMA	56
4.2.5.1. SDS-PAGE	57
4.2.5.2. Semi-dry Transfer	57
4.2.5.3. Bloklama	57
4.2.5.4. Primer Antikor Uygulaması.....	58
4.2.5.5. Sekonder Antikor Uygulaması.....	58
4.2.5.6. Western Blot Görüntüleme	58
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	<u>59</u>
5.1. REKOMBİNANT TNF-ALFA PROTEİNİ ÜRETİLMESİ	59
5.1.1. BCA PROTEİN TAYİNİ SONUÇLARI	59

5.1.2. PROTEİN SAFLAŞTIRMA BASAMAKLARININ SDS-PAGE İLE GÖSTERİLMESİ.....	62
5.2. POLİKLONAL TNF-ALFA ANTİKORUNUN KARAKTERİZASYONU	63
5.2.1. İNDİREKT ELISA İLE ANTİKOR TİTRASYONU SONUÇLARI.....	63
5.2.2. WESTERN BLOT SONUÇLARI.....	69
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>70</u>
6.1. TARTIŞMA	70
6.2. SONUÇ.....	71
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>72</u>
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>80</u>
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>81</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. TNFR1 ve TNFR2 sinyal yolaklarına genel bakış (13)	5
Şekil 2.2. TNFR1 sinyal yolağı (13)	6
Şekil 2.3. TNF-alfanın insülin direncine etkisi (24).....	9
Şekil 2.4. Terapötik olarak kullanılan TNF-alfa inhibitörlerinin yapıları (30)	11
Şekil 2.5. TNF-alfa inhibitörlerinin aksiyon mekanizmaları (32)	12
Şekil 2.6. IgG1 yapısı (38).....	14
Şekil 2.7. Değişken ve sabit bölgelerin immünoglobulin fold yapısı (36)	14
Şekil 2.8. Proteazlar ile immünoglobulin fragmanlarının ayrılması (39).....	15
Şekil 2.9. İmmünoglobulin izotipleri (35)	16
Şekil 2.10. Somatik rekombinasyon ile değişken bölgelerin bir araya gelmesi (35)	19
Şekil 2.11. Poliklonal antikor üretimi (44).....	22
Şekil 2.12. Monoklonal antikor terapisinin yıllara göre artan grafiğı (47)	23
Şekil 2.13. Monoklonal antikorların üretim yöntemleri (45)	25
Şekil 2.14. Antikorların FcRn yolağı ile geri dönüştürülmesi (49)	26
Şekil 2.15. Rekombinant insanlaştırılmış antikorlar (53).....	27
Şekil 2.16. Fc bölgesi içermeyen antikor formatları (56).....	29
Şekil 2.17. Fc bölgesi içeren alternatif antikor formatları (56)	30
Şekil 2.18. BiTE formatı (62).....	31
Şekil 2.19. pET sistemi (9)	34
Şekil 2.20. SUMO proteininin siklusu (72).....	37

Şekil 2.21. pSUMO klonlama vektörünün gösterimi (71).....	37
Şekil 2.22. Biyobenzerlerde farklılık gösteren üretim aşamaları (11).....	38
Şekil 4.1. pET-SUMO vektör gösterimi (77)	41
Şekil 5.1. BCA protein tayini sonucu plate görünümü.....	59
Şekil 5.2. BCA standart konsantrasyonlarının ve OD değerlerinin standart eğri grafiği ...	61
Şekil 5.3. Rekombinant TNF-alfa proteininin saflaştırma basamaklarının SDS-PAGE ile gösterilmesi.....	62
Şekil 5.4. Ascite sıvısı ile yapılan indirekt ELISA ile antikor titrasyonunda 2M H ₂ SO ₄ ile reaksiyonun durdurulması sonucu plate görünümü.....	63
Şekil 5.5. Serumla yapılan ELISA titrasyonu sırasında HRP-substratı TMB'nin eklenmesi sonucu plate görünümü.....	65
Şekil 5.6. Serumla yapılan ELISA titrasyonunda 2M H ₂ SO ₄ ile reaksiyonun durdurulması sonucu plate görünümü.....	66
Şekil 5.7. Ascite sıvısı primer antikor olarak kullanılarak yapılan Western Blot görüntüsü	69
Şekil 5.8. TNF-alfa monoklonal ticari antikoru ile yapılan Western Blot görüntüsü	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. İndüksiyon besiyeri için kullanılan materyaller, konsantrasyonları ve miktarları	42
Çizelge 4.2 Total protein izolasyonu için kullanılan materyaller, konsantrasyonları ve miktarları	42
Çizelge 4.3. Nikel kolon için kullanılan tamponların içerikleri ve konsantrasyonları	43
Çizelge 4.4. Standart BSA çözeltilerinin konsantrasyonları ve hazırlanan içeriklerin miktarları	44
Çizelge 4.5. %12'lik poliakrilamid jel hazırlanmasında kullanılan malzemeler ve miktarları	45
Çizelge 4.6. 4X Laemmli Tamponu hazırlanmasında kullanılan materyaller ve miktarları	46
Çizelge 4.7. Primer antikorun hazırlanan dilüsyonları	48
Çizelge 4.8. %15'lik poliakrilamid jel hazırlanmasında kullanılan malzemeler ve miktarları	49
Çizelge 5.1. BCA protein tayini sonucu OD değerleri	60
Çizelge 5.2. BCA tayini ile oluşturulan standartların konsantrasyonları ve OD değerleri .	60
Çizelge 5.3. Protein konsantrasyonunun standart eğrinin grafik denklemi ile hesaplanması	61
Çizelge 5.4. Ascite sıvısı ile yapılan indirekt ELISA poliklonal antikor titrasyonu sonucu OD değerleri	64
Çizelge 5.5. ELISA ile ascite sıvısı antikor titrasyonu OD değerleri ortalaması ve dilüsyonların gösterilmesi	64
Çizelge 5.6. Kuyruk kanından alınan serum ile yapılan ELISA titrasyonunda ölçülen OD değerleri.....	66

Çizelge 5.7. ELISA ile serum antikor titrasyonu OD değerleri ortalaması ve dilüsyonların gösterilmesi.....	67
Çizelge 5.8. Proteinlerin standart konsantrasyonları ile indirekt ELISA sonucunda ölçülen OD değerleri	68
Çizelge 5.9. ELISA ile protein standartlarının OD değerleri ortalaması ve dilüsyonların gösterilmesi.....	68



SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ADCC	Antikora Bağlı Hücresel Sitotoksosite
bp	Baz Çifti
CDC	Komplemente Bağlı Sitotoksosite
CDR	Komplementarite Belirleyici Bölge
CH	Sabit Ağır Zincir
ChIP	Kromatin İmmünopresipitasyon
CHO	Çin Hamster Over Hücresi
ddH ₂ O	Çift distile su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Fab	Antijene Bağlanma Bölgesi
Fc	Kristalleşebilen Fragman
FcRn	Neonotal Fc Reseptörü
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
Fv	Değişken Fragman
IgG	İmmüoglobulin G
IHC	İmmünohistokimya
IL	İnterlökin
IPTG	İzopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit
kDa	Kilodalton

M	Molarite
MHC	Majör Histokompatibilite Kompleksi
ml	Mililitre
mTNF	Transmembran Tümör Nekrozis Faktör
NF- κ B	Nuclear Faktör Kappa-B
PEG	Polietilen Glikol
PVDF	Polivinilidin Florür
sTNF	Çözünür Tümör Nekrozis Faktör
SUMO	Küçük Ubikitin Benzeri Düzenleyici
TCR	T Hücre Reseptörü
Th	Yardımcı T Hücre
Treg	Regülatör T Hücre
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TNFR	Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF-alfa), doğal bağışıklığın başlıca mekanizmalarından olan inflamasyonda etkin rol oynayan, multifonksiyonel bir sitokindir (1). Özellikle Romatoid artrit ya da Crohn hastalığı gibi otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarda TNF-alfa konsantrasyonunun vücutta arttığı gözlemlenmiştir (2). TNF-alfa konsantrasyonunun yüksek olduğu hastalıklarda TNF-alfa'yı tanıyan ve nötralize edebilen anti-TNF-alfa terapileri kullanılabilmektedir (3).

Anti-TNF terapileri, anti-TNF antikorlarını içermektedir. Onaylanmış anti-TNF alfa antikorları; infliximab, adalimumab, golimumab ve certolizumab pegol'dür. Çözünür TNFR2 formunda bulunan füzyon proteini etanercept de anti-TNF terapisi olarak kullanılmaktadır. Bu terapiler romatoid artrit, Crohn hastalığı, psöriatik artrit, plak psoriasis, üveitis ve ülseratif kolit hastalıklarında kullanılmaktadır (4).

Poliklonal antikorlar, antijen üzerindeki farklı epitoplara bağlanabilen antikorlardır. Doğal antikorlar birçok B hücre klonundan salgılandıkları için poliklonal olarak adlandırılırlar. Poliklonal serum farklı antijenlerdeki farklı epitoplara bağlanan antikorları içermektedir (5).

Monoklonal antikorlar spesifik olmayan bağlanmaları azaltsa da farklı araştırma prosedürlerinde antikorun kullanışlılığını azaltabilmektedirler (6). Poliklonal antikorlar ise, hedef protein üzerindeki birden fazla epitopu tanıyabildiklerinden, hedef proteinin teşhisinde kullanılan kromatin immünopresipitasyon (ChIP), immünohistokimya (IHC), Western Blot ve ELISA gibi tekniklerde daha etkilidirler (7). Poliklonal antikorlar immünojenin hayvana enjeksiyonu ile üretilirler. İmmünizasyon sonrasında poliklonal antikorlar direkt olarak kullanılabilmekte ya da saflaştırılarak da kullanılabilmektedir. Hayvandan alınan poliklonal antikorları içeren serum birden çok epitopa karşı afinite gösterdiğinden araştırma ya da terapötik olarak kullanım için etkilidir (8).

Poliklonal antikor üretiminde ilk olarak, belirlenen immünojenin üretimi sağlanmalıdır. Rekombinant proteinlerin üretilmesi ve saflaştırılması hem ilaç üretimi hem de yeni yapısal ilaç hedeflerinin keşfedilmesinde önemli bir basamaktır. Bu proteinler konak hücre içerisinde sentezlenmektedirler ve DNA'ları yeniden düzenlendiğinden rekombinant

protein adını almaktadırlar. Bu proteinler üretilirken öncelikle konak seçimi, vektör seçimi ve antibiyotik seçimi yapılması önem taşımaktadır. Proteinler üretildikten sonra ise afinite kromatografisi ile ya da SUMO füzyon proteinleri kullanılarak saflaştırılarak terapötik amaçlar için kullanılmaya hazır hale getirilmektedirler (9).

Biyobenzerler; daha önceden onaylanmış, fakat patent süresi dolmuş ilaçların benzer ürünleridir. 2005 yılında biyobenzerlerin onaylanmaya başlamasıyla, özellikle monoklonal antikor tabanlı birçok ilacın biyobenzeri üretilmeye başlamıştır (10). Biyoteknolojik ilaçların üretim aşamalarındaki farklılıklar; proteinlerin üretildiği kaynak ve saflaştırma süreçleri gibi süreçleri kapsamaktadır. Bu tür değişiklikler proteinlerin üç boyutlu yapısında ve glikozilasyonlarında değişiklikler oluşturabilmektedir (11).



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. TÜMÖR NEKROZİS FAKTÖR ALFA

Tümör Nekrozis Faktör Alfa, doğal bağışıklığın başlıca mekanizmalarından olan inflamasyonda etkin rol oynayan, multifonksiyonel bir sitokindir (1). İlk kez 1975 yılında keşfedilmiş olan bu sitokin, tümör hücrelerinde hücre ölümünü destekleyen bir serum faktörü olarak ortaya çıkmıştır (12). Daha sonraki yıllarda ise inflamatuvar hastalıklara karşı potansiyel bir hedef olduğu belirlenmiştir (13).

Tümör Nekrozis Faktör-Alfa geni 6. kromozomda (6p21.33), MHC3 gen bölgesinin içerisinde yer almaktadır (14). Birçok farklı hücre tipinde farklı roller üstlenen TNF-alfa, öncelikli olarak monositler ve makrofajlar tarafından üretilmesinin yanı sıra, B hücreleri, nötrofiller ve doğal katil hücreler gibi bağışıklık sisteminde rol oynayan birçok hücre tarafından da üretilmektedir (4). TNF-alfanın bu hücreler tarafından retilmesi, UV ışınları, ozmotik basınç, kimyasal ajanlar, bakteriler ve virüsler gibi birçok faktöre bağlıdır (14). Bu sitokin, hücreler tarafından ilk olarak 26 kDa boyutunda bir homotrimer transmembran proteini olarak eksprese edilmekte, daha sonra ADAM17 geni tarafından kodlanan TNF dönüştürücü enzim TACE tarafından kesilerek 17 kDa boyutunda çözünür forma geçmekte, ya da transmembran formunda kalmaktadır (4, 14). TNF transmembran formu (mTNF) ve çözünür formu (sTNF) hücre içindeki fonksiyonlarını TNFR1 ve TNFR2 adı verilen iki reseptör üzerinden gerçekleştirmektedirler (4).

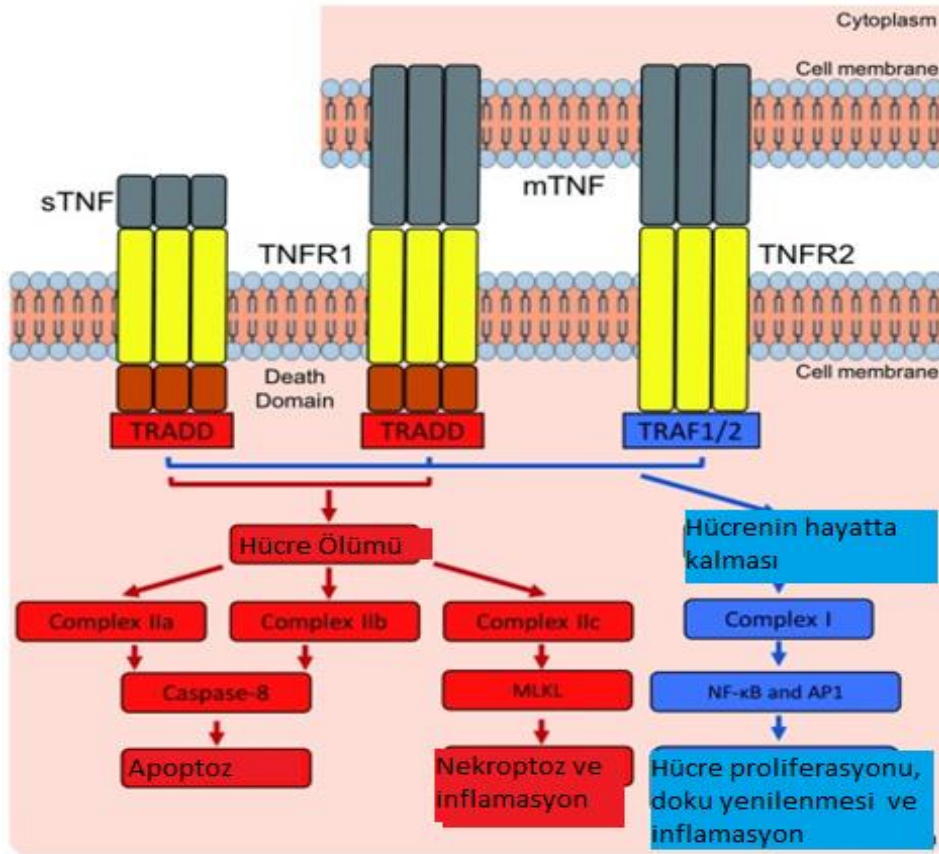
TNF-alfa inflamasyonda, lokal inflamatuvar yanıtı sağlayan bir sitokin olarak görev yapmaktadır. Karaciğerde akut faz yanıtını ve endotel hücrelerdeki gerekli adezyon moleküllerinin ve kan pıhtılaşmasını sağlayıcı proteinlerin ekspresyonlarını indüklemektedir. Enfeksiyon sırasında makrofaj hücrelerinden sistemik olarak TNF-alfa salınımı gerçekleştirilmesi septik şoka neden olabilmektedir (15). Romatoid artrit ve Crohn hastalığı gibi otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarda TNF-alfa konsantrasyonunun vücutta arttığı gözlemlenmiştir (2). TNF-alfa konsantrasyonunun yüksek olduğu hastalıklarda TNF-alfa'yı tanıyan ve nötralize edebilen anti-TNF-alfa antikoru tabanlı ilaçlar kullanılabilmektedir (3).

2.1.1. TNF-ALFA SİNYAL YOLAĞI

TNF-alfa'nın TNFR1 ve TNFR2 olmak üzere iki farklı reseptörü bulunmaktadır. TNF-alfa transmembran (mTNF) ve çözünür formları (sTNF) reseptörlerine bağlandığında; aralarında IL-1, IL6 ve IL-8'in de bulunduğu sitokin kaskadına öncülük etmekte, makrofaj farklılaşmasını sağlamakta ve lökositlerin endotel tabakadan geçişini hızlandırmaktadır (2). TNF reseptör 1 (TNFR1) endotel hücreler ve makrofajlar başta olmak üzere neredeyse tüm hücrelerde eksprese edilirken, TNF reseptör 2 (TNFR2) çoğunlukla lenfositler, endotel hücreler ve nöronlar tarafından eksprese edilmektedirler (13, 15). TNFR2, ayrıca regülatör T hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilmektedir (14). TNFR1 pro-inflamatuvar cevapların sağlanmasında görev alırken, TNFR2 doku homeostazı, korunması ve rejenerasyonunda etkindir (4).

Transmembran formu (mTNF), TNFR2'ye bağlandığında hücreler arası etkileşim sırasında bir ligand görevi üstlenmektedir (13). Ayrıca, mTNF'nin bir reseptör olarak da görev alarak hücre içi sinyal kaskadını başlattığı gösterilmiştir (16).

TNFR1 ve TNFR2'de mTNF ve sTNF bağlanma bölgeleri benzer olmasına rağmen, hücre içindeki domainleri farklılık göstermektedir. TNFR1'in sitoplazmik kuyruğu TNFR1'le ilişkili DD (TRADD)'a bağlanmasını sağlayan bir domain bulundurmaktadır (Şekil 2.1.). Diğer bir yandan, TNFR2'nin böyle bir bölgesi bulunmamakta, bunun yerine TNFR-ilişkili faktör (TRAF) 1 ve 2 proteinlerine bağlanmaktadır (Şekil 2.1). TNFR1 ve TNFR2 sinyal yolları Nüklear Faktör-kappa B (NF- κ B)'yi aktifleştirerek hücrenin hayatta kalmasını sağlamaktadırlar (13). Bunun yanında, TNFR1 aktivasyonunun iki önemli fonksiyonu olan pro-inflamasyon genlerinin aktivasyonunu ile hücrenin hayatta kalmasını sağlamasının ve apoptozu uyarıcı etkisinin dengede tutulabilmesi büyük önem taşımaktadır (17).



Şekil 2.1. TNFR1 ve TNFR2 sinyal yollarına genel bakış (13)

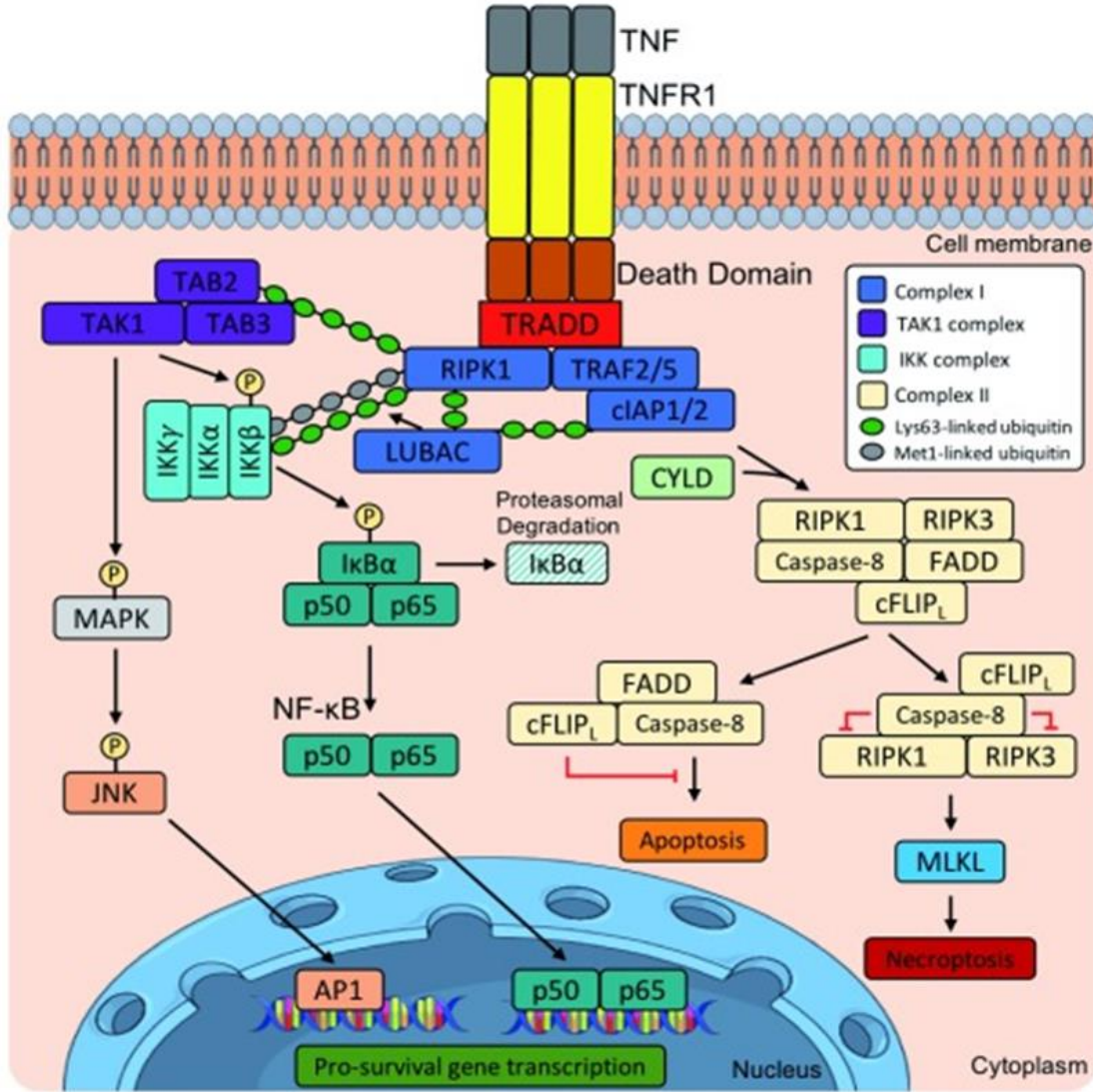
2.1.1.1. TNFR1 Sinyal Yolağı

TNF-alfa TNFR1'e bağlandığında; TNFR1, TRADD ile bağlanmakta ve TRADD ise reseptör-etkileşimli protein kinaz 1 (RIPK1) ve TRAF2'yi getirmektedir. Bu iki protein de pro-inflamatuvar ve anti-apoptotik yolları düzenlemekte görevlidir ve NF-κB yolağı üzerinden hücrenin hayata kalmasını sağlamaktadır (13, 18).

RIPK1'in ubiquitin E3 ligaz ile ubiquitinasyonu; bu sinyal yolağının kompleks 1 ile hayatta kalmasını, kompleks 2b ile apoptozun, ya da kompleks 2c ile kontrolsüz hücre ölümünü (nekrozis) belirlemektedir. Ubikitin zincirleri TNF reseptörlerinin aktivasyonu ile bağlanmakta ve protein fonksiyonlarına etki etmektedirler (13).

Sitoplazmada bulunan çoğu NF-κB dimeri; IκB'ler tarafından DNA bağlama bölgeleri bloklanarak inaktif halde tutulmaktadır. NF-κB aktivasyonu IκB inhibitörü kinazı (IKK) kompleksi ile sağlanmaktadır. IKK'nin aktifleşmesi ise TRAF2 ve RIPK1 ile sağlanmaktadır (18). Ubikitinlenen RIPK1, içerisinde IKK'nin de bulunduğu dönüştürücü

büyüme faktörü beta (TGF- β) ile aktifleşen kinaz (TAK) 1 kompleksini getirerek MAPK fosforilasyonunu sağlamaktadırlar (Şekil 2.2.) (13).



Şekil 2.2. TNFR1 sinyal yolağı (13)

Mitojenle aktifleşen protein kinazı (MAPK) da TNF-alfa sinyal yolağında pro-inflammatuvar aracı moleküllerin aktifleştirilmesinde görev almaktadır. Üç MAPK ailesi; ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinazlar (ERK), c-Jun N-terminal kinazlar (JNK) ve p38, downstream enzimlerinin ve transkripsiyon faktörlerinin aktivitelerini sağlayarak gen ekspresyonunu düzenleyici rol üstlenirler. MAPK kaskadının aktivasyonu; inflamasyon, proliferasyon, farklılaşma ya da apoptoz ile sonuçlanabilmektedir (18, 19). AP1 transkripsiyon faktörünün MAPK ile aktivasyonu ve NF- κ B'nin IKK ile aktivasyonu,

hücrenin hayatta kalma sinyalini ve bağışıklık hücrelerinin proliferasyonu ile inflamasyonun indüklenmesini sağlamaktadır (Şekil 2.2.) (13).

RIPK1'in ubiquitine olmaması ise kompleks 2b'nin oluşmasına neden olmaktadır. CYLD enzimi RIPK1 deubitikinasyonunu ve kompleks 1'den ayrılmasını sağlar. Böylece apoptoz ile sonuçlanan kaspaz sinyali oluşmaktadır. Apoptoz için; RIPK1 ve RIPK3'ün kaspaz 8 kompleksindeki cFLIPL ile kesilmesi gerekmektedir. Kesilemediği durumda ise, kompleks 2c ile nekrotik hücre ölümü gerçekleşmektedir (Şekil 2.2.) (13, 19).

2.1.1.2. TNFR2 Sinyal Yolağı

mTNF, TNFR2'ye bağlandığında, TRAF1 ve TRAF2 proteinleri sitoplazmik TNFR2 domaini ile etkileşime geçerler. Bu durumda kompleks 1 formasyonu ile NF- κ B, MAPK ve Akt indüksiyonu sağlanarak hücre proliferasyonu ve doku rejenerasyonu sağlanmaktadır (13).

TNF-alfa bağlanmadığı durumda; TRAF2 kompleks apoptoz protein inhibitörü 1 ve 2 (cIAP1 ve cIAP2) ile bağlanmış durumdadır. cIAP, ubiquitin ligaz aktivitesi ile kaspaz proteinlerini engellemektedir. cIAP1 ve cIAP2, NIK'i (NF- κ B-indükleyici kinaz) ubiquitine edip proteozomal degradasyonu sağlamaktadırlar. TNF-alfa'nın TNFR2'ye bağlanması, TRAF2-cIAP1-cIAP2 kompleksinin reseptöre geçmesine ve NIK'in degrede olamamasına neden olur (18). Böylece NF- κ B'nin aktivasyonu sağlanabilmektedir.

TNFR1'in aksine, TNFR2 NF- κ B'yi daha yavaş aktifleştirmekte, fakat daha uzun süre aktif kalmasını sağlamaktadır (18).

2.1.2. TNF-ALFA DİSREGÜLASYONU

TNF-alfa birçok patolojik ve fizyolojik yolda etkin rol oynamaktadır. Birçok farklı hücrenin ve molekülün immünolojik reaksiyonlarını düzenlemektedir (14). Fizyolojik olarak, enfeksiyonlara normal bir yanıtın sağlanması için çok büyük önem taşımaktadır. Diğer bir yandan, vücutta uygun olmayan ya da aşırı TNF alfa üretimi ise birçok hastalığa neden olmaktadır (20).

Mast hücrelerinde üretilen TNF-alfa, enfeksiyon bölgesine nötrofillerin getirilmesinde büyük önem taşımaktadır. Bir çalışmada, TNFR1 eksikliği durumunda farelerin septik şoka

karşı dirençli olduğu, fakat *Listeria monocytogenes* enfeksiyonunda aşırı duyarlılık gösterdikleri gösterilmiştir (21).

TNF-alfanın CD4 ve CD8 T hücrelerindeki TCR'ye bağlı aktivasyonu artırdığı, bununla birlikte de T hücre proliferasyonuna katkı sağladığı bilinmektedir. TNF-alfa TNFR2'ye bağlandığında, T hücrelerinde antijen tanınması sırasında ko-sitimülatör molekül olarak görev yaparak NF-κB aktivasyonunu sağlamaktadır. TNFR2 bulundurmayan T hücrelerinin TCR ile aktifleşmelerinde yanıtsız kaldıkları gösterilmiştir. TNFR2 eksikliğinde, CD4 ve CD8 hücrelerindeki proliferasyon ve sitokin üretimi azalmaktadır (17, 22). Farklı çalışmalarda ise TNFR2 aracılı TNF yolağının Bcl2 gibi anti-apoptotik moleküllerin ekspresyonunu artırdığı ve T hücre aktivasyonunda hayatta kalmayı sağladığı gösterilmiştir (23). TNFR2 eksikliği hafıza T hücrelerinin sayısını azaltmakta ve efektör T hücrelerinin ilk bağışıklık yanıtı sırasında daha az olmasını sağlamaktadır (17).

TNF-alfa konsantrasyonunun fazlalığı hematolojik hastalıklarda da etki göstermektedir. Th1 hücreleri aplastik anemide önemli role sahiptir. TNF-alfa, fazla olması durumunda bu hücreleri baskılamakta ve hematopoietik progenitörlerin ölümüne neden olmaktadır (14).

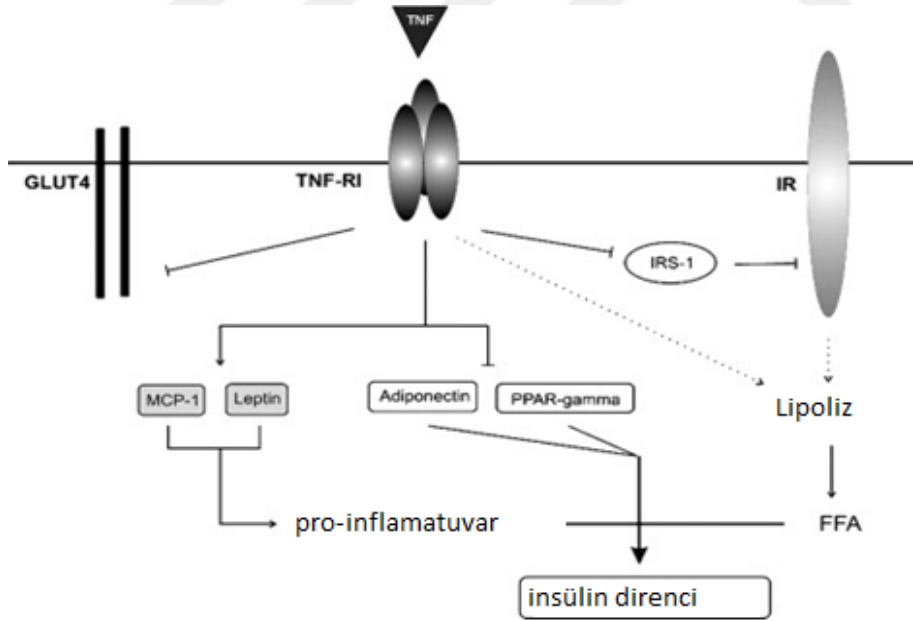
Otoimmün ve romatolojik hastalıklarda TNF-alfa konsantrasyonunun arttığı bilinmektedir. Ankilozan spondilit, omurga ve eklemleri etkileyen inflamatuvar bir artrittir. Crohn hastalığı olan kişilerde yaygın olarak görülmektedir (20). Romatoid artrit de kronik otoimmün inflamatuvar bir hastalık olarak bilinmektedir. Oluşan inflamasyon, inflamatuvar hücrelerin, T hücrelerinin ve makrofajların birikmesi ile ilişkilidir. İltihaplanmış eklemlerde başta TNF-alfa olmak üzere pro-inflamatuvar sitokinler üretilmektedir. Romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar durumundaki hastalarda kardiyovasküler hastalıkların oluşum ihtimalinin arttığı da görülmüştür. TNF-alfa konsantrasyonunun bu hastalıklarda artması kardiyovasküler hastalık riskini de artırmaktadır (20).

TNF-alfa ayrıca solunum yolu hastalıklarının patofizyolojisinde de rol oynamaktadır. Astım hastalarının bronşlarında biriken lökositlerde de yükselen TNF-alfa ekspresyonu gösterilmiştir (20).

TNF-alfa lipid metabolizmasında da etkilidir. Yükselen TNF-alfa konsantrasyonunun açığa çıktığı inflamatuvar hastalıklarda ve sepsiste, trigliserit konsantrasyonu da yükselmekte ve

hipertrigliseridemi ortaya çıkabilmektedir. TNF-alfa plasma trigliseritlerini, trigliserit sentezinde bir substrat olan serbest yağ asitlerini artırarak adipoz dokuda ve karaciğerde artırmaktadır (24).

TNF-alfa konsantrasyonunun fazlalığının insülin direncinde de etkinliği bilinmektedir (14). İnflamatuvar markırlardan insülin direci patogenezinde ilk gösterilen TNF-alfa olmuştur (24). 1993 yılında yapılan bir çalışmada; obez farelerin adipositlerinde yükselen miktarda TNF-alfa ekspresyonu görülmüştür (25). TNF-alfa insülin direncine, insülin reseptörü substratı 1'in (IRS1) serin fosforilasyonunu sağlayarak ve insülin reseptörünün tirozin kinaz aktivitesini engelleyerek etki etmektedir. Bunun yanında, adiposit dokudaki lipolizi de artırarak plazmadaki FFA (serbest yağ asitleri) seviyesini artırıp insülin direnci oluşumunu sağlamaktadır (Şekil 2.3.). Böylece, glikoz üretimini hızlandırıp kaslardaki metabolizmayı azaltmaktadır. Adipositlerde insülin reseptörü yolağındaki birçok proteinin ekspresyonunu downregüle etmektedir (24). Homeostazi düzenlemesiyle bilinen leptin üretimini ise upregüle etmekte ve pankreastaki insülin salınımını azaltmaktadır (26). Ayrıca, makrofajları adiposit hücrelere yönlendirerek inflamatuvar durumunu artırmasıyla da insülin direncini tetiklemektedir (24).

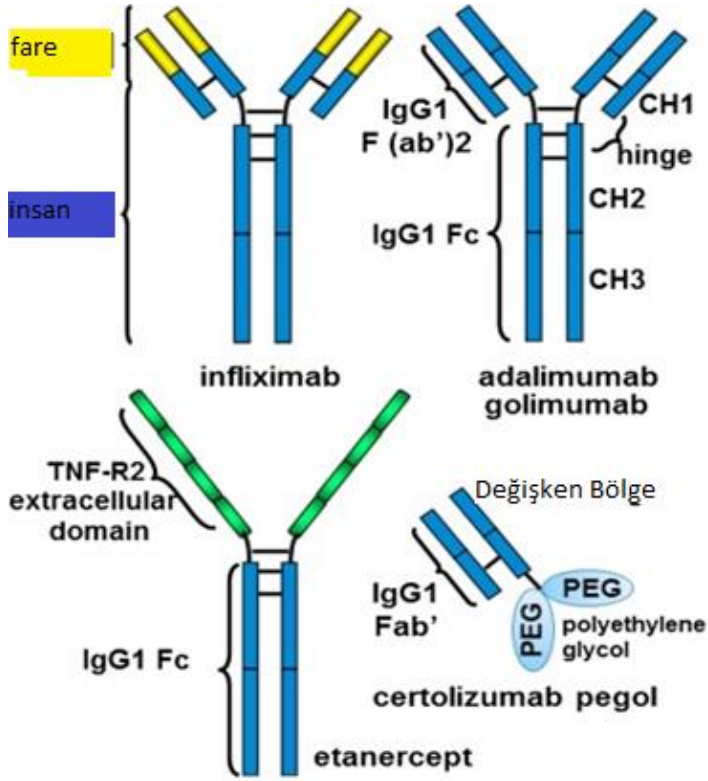


Şekil 2.3. TNF-alfanın insülin direncine etkisi (24)

2.1.3. TNF-ALFA İNHİBİTÖRLERİ

Anti-TNF terapileri anti-TNF-alfa antikorlarını içermektedir. Onaylanmış anti-TNF alfa antikorları; infliximab, adalimumab, golimumab ve certolizumab pegol'dür. Çözünür TNFR2 formunda bulunan füzyon proteini etanercept de anti-TNF terapisi olarak kullanılmaktadır. Bu terapiler romatoid artrit, Crohn hastalığı, psöriatik artrit, plak psoriasis, üveitis ve ülseratif kolit hastalıklarında kullanılmaktadır (4). Crohn hastalığı (CD), gastrointestinal sistemdeki bir bölümünü etkileyen kronik inflamatuvar bir hastalık olarak bilinmektedir. Interferon-gamma, interleukin 12 ve TNF-alfa gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımının artmasıyla T hücre aracılı yanıt ve inflamasyon bu hastalıkta artmaktadır. TNF-alfa baskılanmasının sağlanması uygun tedavi yöntemi olabilmektedir (27). Bu inhibitörler TNF'ye bağlanarak TNF reseptörleri ile etkileşimini engellemektedirler (28).

1998'de Crohn hastalığı için onaylanan ilk anti-TNF-alfa antikoru olan infliximab (Remicade®, Janssen Biotech and biosimilars) IgG1 yapısında, kimerik insan/fare formunda, fare değişken bölgelerini ve insan sabit bölgelerini bulundurmaktadır (29). Adalimumab (Humira®, AbbVie) ve golimumab (Simponi®, Merck Sharp & Dohme) insansılaştırılmış anti-TNF-alfa monoklonal antikorlarıdır. Etanercept (Enbrel®, Amgen and biosimilars) ise TNFR2'nin iki ekstrasellüler bölgesini ve insan Fc (kristalleşebilen) bölgesini bulundurmaktadır. Certolizumab (Cimzia®, UCB Pharmaise), anti-TNF-alfa antikorunun Fab (antijene bağlanma fragmanı) bölgesinden oluşmaktadır (2). Certolizumab'ın hinge bölgesi PEG ile bağlanmakta, bu yüzden de certolizumab pegol olarak adlandırılmaktadır (30).



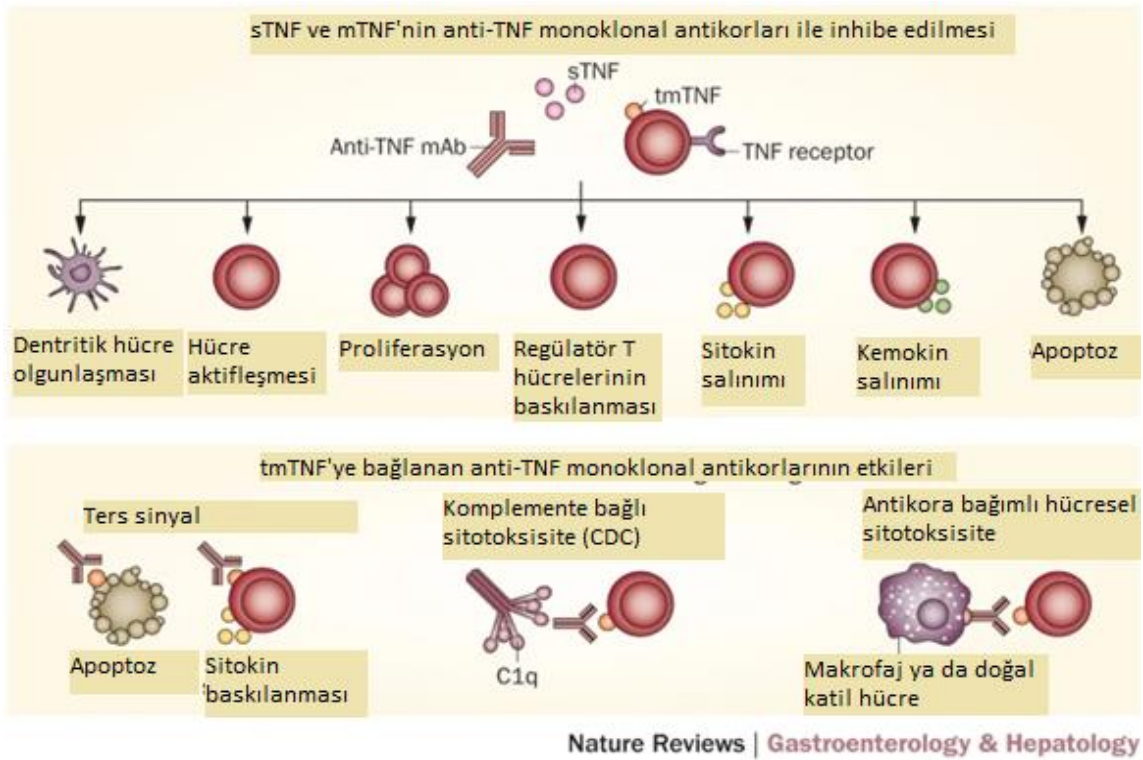
Şekil 2.4. Terapötik olarak kullanılan TNF-alfa inhibitörlerinin yapıları (30)

Tüm bu inhibitörler TNF aktivitesini nötralize etse de, hepsinin farklı karakteristikleri ve uygulanma yolları bulunmaktadır (29). Infliximab sTNF'nin hem monomerik hem de trimerik formlarına bağlanabilmektedir. Etanercept ise yalnızca trimerik forma bağlanabilmektedir, fakat diğerlerine kıyasla lemfotoksin-alfa'yı da nötralize edebilmektedir (29). Infliximab, adalimumab, etanercept ve certulizumab pegol hemen hemen aynı bağlanma özelliklerine sahiptir ve hemen hemen aynı TNFR sinyal yolağı nötralizasyon etkisini göstermektedirler (30). Golimumab konformasyonel olarak daha stabil bir yapıdadır ve inhibitör aktivitesinin infliximab ve adalimumab'dan daha iyi olduğu gösterilmiştir (31). Tüm bu inhibitörlerin mTNF'ye olan afiniteleri sTNF'ye olan afinitelerine göre daha düşüktür. Etanercept ise diğer inhibitörlere göre mTNF'ye daha düşük afiniteyle bağlanmaktadır (30).

Infliximab, adalimumab ve golimumab; etanercept'e oranla daha fazla komplemente bağlı hücrel sitotoksisite (CDC) ve antikora bağımlı hücrel sitotoksisteyi (ADCC) sağlayabilmektedirler (Şekil 2.5.). Bunu sebebi ise etanercept'in CH1 (sabit bölge 1) içermemesinden kaynaklanmaktadır. Certolizumab pegol ise Fc bölgesi (kristalleşebilen

fragman) bulundurmadığından CDC ve ADCC aktivitesi yoktur (30). Ayrıca, etanercept'in diğer inhibitörlere göre daha düşük serum yarılanma ömrü bulunmaktadır. Bunun nedeni ise, Fc bölgesi içermediğinden neonatal Fc reseptörlerine (FcRn) daha düşük afinite ile bağlanmasıdır (30).

TNF inhibitörlerinin bir diğer aksiyon mekanizması da dıştan-içe ya da ters sinyal mekanizmasıdır (Şekil 2.5.). Infliximab, mTNF'ye bağlandığında mTNF'yi eksprese eden bağışıklık hücrelerinde apoptoz indüklenmektedir. Bu mekanizma ile pro-inflamatuvar sitokinlerin üretiminin durdurulması sağlanmaktadır (29).



Şekil 2.5. TNF-alfa inhibitörlerinin aksiyon mekanizmaları (32)

2.2. ANTİKORLAR

İmmünoglobulinler iki ağır ve iki hafif zincirden oluşan, antijene bağlanan değişken bölgeler ve efektör fonksiyonlarını sağlayan sabit bölgelerden meydana gelen heterodimerik proteinlerdir (33). İmmünoglobulin G insanda serumda en fazla bulunan proteinlerden biridir ve plazma proteinlerinin yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır (34).

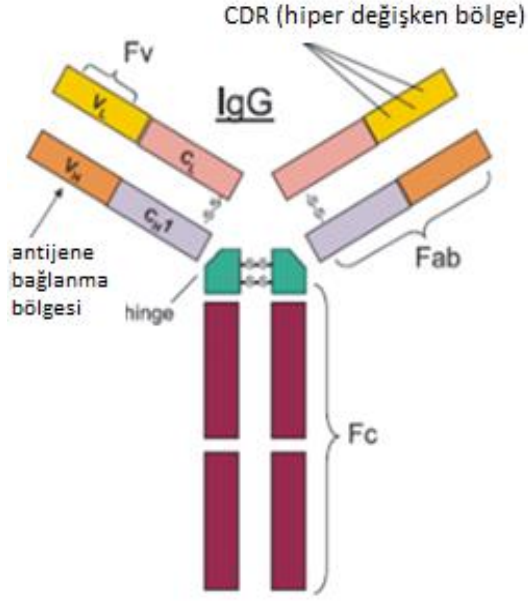
İmmünoglobulin molekülünde bulunan iki ağır ve iki hafif zincir de birbirinin aynısı olduğundan ikisi de aynı antijene spesifik iki bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Bu durum antikora aynı anda iki antijene bağlanma kabiliyetini vererek, avidite adı verilen total interaksiyon gücünü de artırmaktadır. Antijene afinite ise tek bir antijene bağlanma bölgesinin antijene bağlanma gücünü ifade etmektedir (35).

Antikorlar birçok terapötik indikasyon için kullanılıp geliştirilebilmektedirler. Antikorlar terapötik olarak monoklonal ya da poliklonal olarak üretilmektedir. Ayrıca, üretilen bu antikor rekombinant olarak geliştirilerek farklı yapılar da oluşturulabilmektedir (36).

2.2.1. ANTİKOR YAPISI

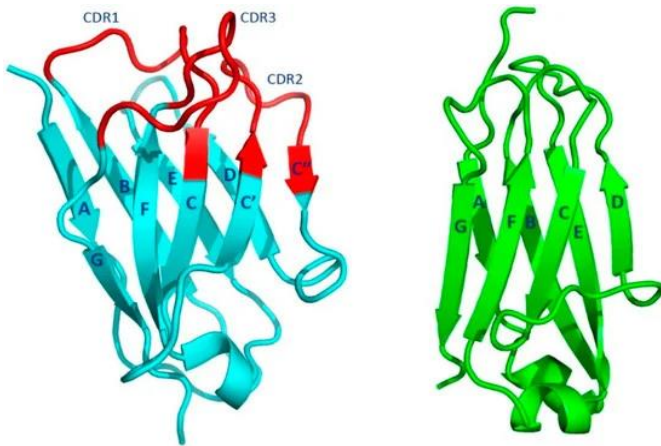
IgG yapısı memelilerde 24 kDa boyutunda hafif zincir ve 55 kDa boyutunda ağır zincirden oluşmaktadır. Bu zincirler üç boyutlu yapısal domainler meydana getirerek, birbirlerine hinge adı verilen bir bölge ile bağlanan iki Fab (antijene bağlanma bölgesi) ve bir Fc (kristalleşebilen fragman) bölgesi oluşturmaktadırlar. Bu bölgeler proteazlar ile kesilebilen yapıdadırlar. Fc bölgesi bir ağır zincir dimerinden meydana gelmektedir. Fab bölgesi ise ağır ve hafif zincirlerin bir araya gelmesinden oluşur (37). Ağır ve hafif zincir heterodimerleri birbirlerine disülfid bağlarıyla bağlanmaktadır. Ağır zincir dimeri de birbirine disülfid bağı ile bağlıdır (36).

Fab bölgesi içerisinde, Fv (değişken fragman) olarak bilinen antijeni asıl tanıma bölgesi bulunmaktadır. Her değişken bölge komplementarite belirleyici bölge (CDR) adı verilen, üç adet hiper değişken bölgeyi içermektedir. Fv (değişken fragman) içerisinde her biri üç adet CDR bölgesi bulunduran bir ağır ve bir hafif zincir bulunmaktadır (33). Antijene asıl spesifikite gösteren bölgeler değişken ağır ve hafif zincirlerde bulunan bu CDR bölgeleridir (Şekil 2.6.).



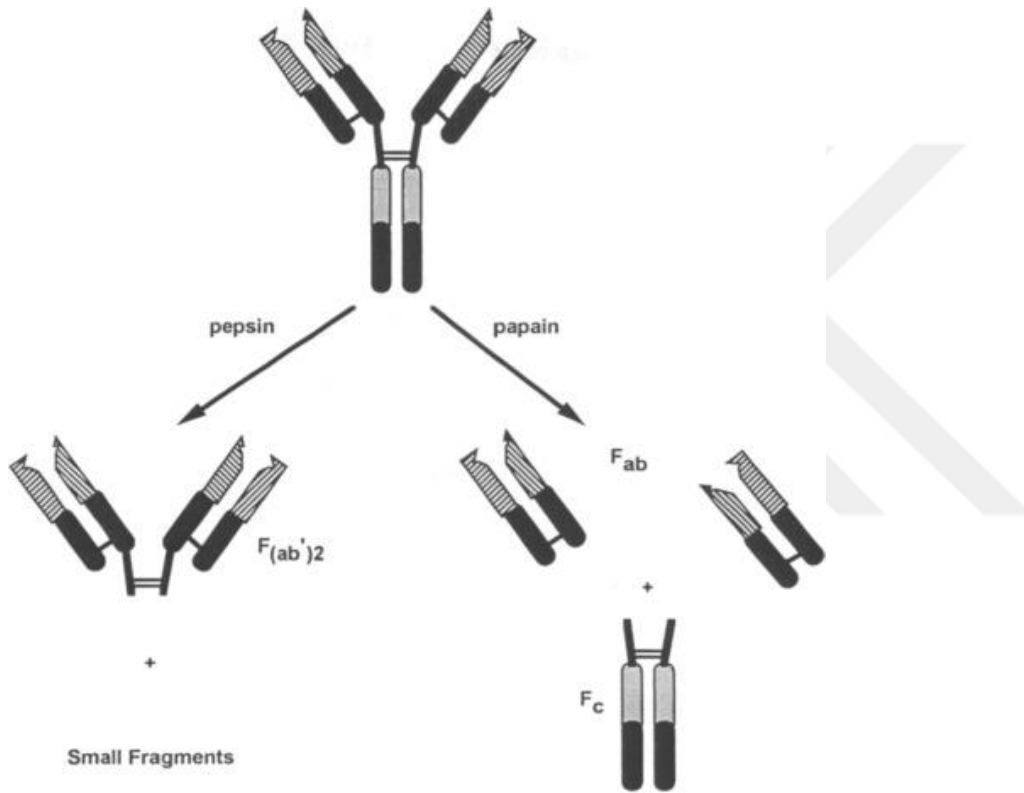
Şekil 2.6. IgG1 yapısı (38)

Ağır ve hafif zincir domainleri yaklaşık 110 amino asit uzunluğundadır ve konformasyonlarına “immünoglobulin foldu” adı verilmektedir. Immünoglobulin foldu iki tane anti-paralel β -sheetlerden oluşmaktadır. Immünoglobulin yapısındaki değişken domainler sabit ağır ve hafif zincirlerin N-ucunda bulunmaktadırlar. Bu bölgelerin yapıları sabit domainlere benzese de bazı farklılıklar da içermektedirler (36). Değişken ve sabit bölgelerdeki asıl farklılık değişken bölgenin daha uzun olması ve ekstra bir β strand bulundurmasıdır. Değişken bölgedeki esnek halka yapıları antijen bağlanma bölgesine katkıda bulunur (35).



Şekil 2.7. Değişken ve sabit bölgelerin immünoglobulin fold yapısı (36)

Antikor molekülünün iki kolu arasında hinge bölgesi adı verilen esnek bir polipeptit zinciri bulunur. Antikoru Y şekli ise ağır zincirlerin karboksı uçlarının bir araya gelmesiyle oluşur. Üçüncü sabit domain (CH3) dimer oluşturmakta, karbonhidrat bağları da ikinci sabit ağır zincire (CH2) bağlı olarak bulunmaktadır. Proteazlar antikor yapısının belirlenmesinde önemli rol oynarlar. Papain enzimi antikoru iki ağır zincir arasındaki disülfid bağından keserek Fab ve Fc bölgelerinin birbirlerinden ayrılmasını sağlamaktadır (Şekil 2.8.). Bir başka proteaz olan pepsin ise karboksı ucundaki disülfid bağlarını keserek Fc bölgesini iki Fab bölgesinden ayırır (35).

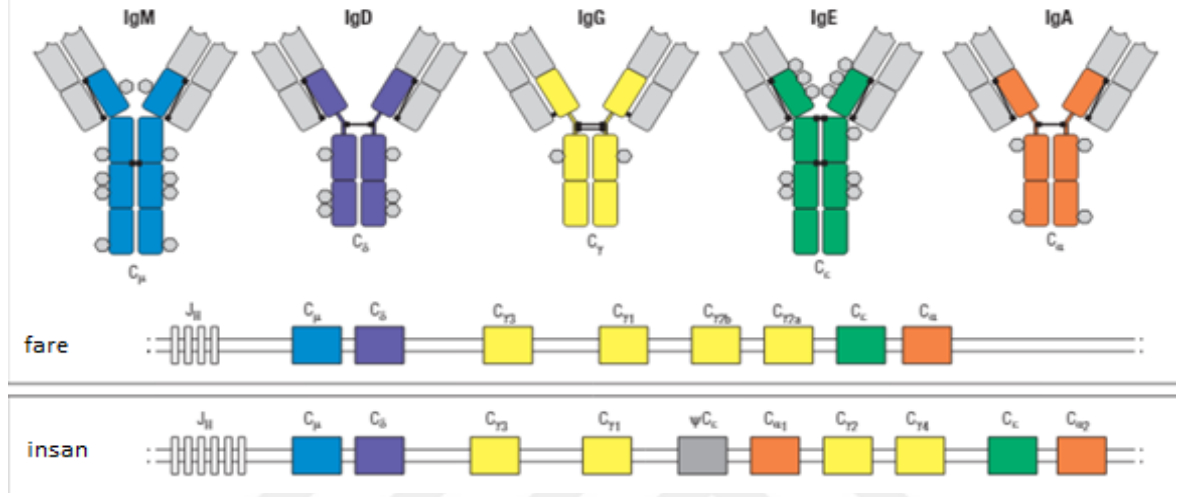


Şekil 2.8. Proteazlar ile immünoglobulin fragmanlarının ayrılması (39)

2.2.1.1. Antikor İzotipleri

İnsanda κ (kappa) ve λ (lambda) olmak üzere iki fonksiyonel hafif zincir sınıfı bulunmaktadır. Bu sınıflar arasında herhangi bir fonksiyonel farklılık bulunmamakta, sadece bulunma sıklığı değişmektedir. İki sınıfın bulunma sıklığı türler arasında farklılık gösterir. İnsanda kappa ve lambda oranı 2:1 iken, farede bu oran 20:1'dir (35). İki hafif zincir sınıfının da sabit (CL) ve değişken (VL) olmak üzere iki bölgesi bulunmaktadır.

İnsanda bulunan ağır zincir izotipleri ise IgA, IgD, IgE, IgG ve IgM'dir (Şekil 2.9.). Bu beş farklı izotipin de bağışıklık sisteminde farklı görevleri bulunmaktadır. Serumda en fazla görülen izotip IgG'dir. IgA, IgD ve IgG üç sabit (C) ve bir değişken (V) bölgeden oluşurken, IgE ve IgM dört sabit ve bir değişken bölge bulundurmaktadır. IgA ve IgM, diğer izotiplere kıyasla J zinciri bulundurarak dimer ve pentamer yapıları oluşturabilmektedirler. Diğer izotiplerse monomer yapıda bulunmaktadır (36).



Şekil 2.9. İmmünoglobulin izotipleri (35)

Sabit bölgelerdeki sekans farklılıkları her antikor izotipinde farklı karakteristikler oluşmasına yol açmaktadır. Bu karakteristikler disülfid bağlarının sayısını ve yerini, bağlanan karbonhidrat gruplarının sayısını, sabit domainlerin sayısını ve hinge bölgesinin uzunluğunu belirler. IgM ve IgE, diğer izotiplere kıyasla ekstra bir sabit domain daha bulundurarak γ (gamma), δ (sigma) ve α (alfa) zincirlerindeki hinge bölgesinin yerini alırlar. IgM ve IgE'de hinge bölgesi bulunmaz. Farklı izotipler ayrıca farklı efektör fonksiyonlarının da gösterilmesini sağlamaktadır (35).

IgM, B hücrelerinin aktivasyonu sonrasında ilk üretilen immünglobulindir. Pentamer olarak salgılandığından moleküler ağırlığı oldukça yüksektir ve aviditesi de oldukça fazladır. IgG ise serumda en fazla bulunan immünoglobulindir ve bağışıklık yanıtı sırasında kanda ve dokuların ekstrasellüler boşluklarında bulunmaktadır (35). IgG ve IgM izotipleri komplement komponenti C1 ile etkileşime geçerek klasik komplement yolağını aktifleştirebilmektedirler. IgA ve IgE ise komplement sistemi aktifleştiremezler. IgA, kanda bulunmakta, fakat asıl görevi olan mukozal yüzeylere savunma sağlamaktadır. IgE ise multisellüler parazitlere ve alerjik hastalıklara karşı savunma sağlamakla görevlidir.

IgG ve IgE her zaman monomer olarak bulunurken, IgA monomer ya da dimer olarak bulunabilir (35).

IgG dört sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar, kanda bulunma sıklıklarına göre IgG1, IgG2, IgG3 ve IgG4 olarak isimlendirilir. Bu sınıflar %90 oranında aynı amino asitlere sahipken, antijen bağlanması, immün kompleksi oluşturmaları, komplement sistemin aktivasyonu, efektör hücrelerini tetiklemeleri ve serum yarılanma ömrü gibi özellikleri farklı olabilmektedir (34).

Çözünür ve membran proteinlerine karşı antikor yanıtı çoğunlukla IgG1 ile sağlanmaktadır. IgG1 normalde en fazla bulunan sınıf olduğundan, IgG1 yokluğu birçok primer ve sekonder antikor bozukluğuna ve total IgG seviyesi düşüklüğü olarak da bilinen hipogammaglobulinemiya neden olmaktadır (34).

IgG2; bakteriyel kapsüler polisakkarit antijenlere karşı yanıtın oluşmasında etkili IgG sınıfıdır. IgG2 eksikliği bakteriyel enfeksiyonlara yatkınlığın artmasına ve IgG4 ve IgA subtiplerinin de eksikliğine yol açabilmektedir. IgG3 antikorları ise efektör fonksiyonların sağlanmasında etkilidirler. Yarılanma ömrü düşük olduğundan aşırı inflamatuvar yanıtın önlenmesini de sağlamaktadır (34).

Alerjenler genellikle IgG1 ve IgG4 isotiplerini indüklemektedirler. İmmünoterapide semptomların azaltılması genellikle IgG4 indüksiyonu ile ilişkilidir. IgG4 antikorları Fab kısımlarını değiştirebilmektedirler. IgG4 yarı molekülü random olarak farklı bir IgG4 yarı molekülü ile yer değiştirip rekombine olabilmekte, böylelikle etkili monovalan bispesifik antikorlar oluşturabilmektedir (34).

İsotipik çeşitliliğin yanında, IgG sınıfları arasında allotip adı verilen allellik çeşitlilik de bulunmaktadır. İmmüoglobulinlerdeki polimorfik epitoplar kişiler ve etnik gruplar arasında farklılık göstermektedir (34).

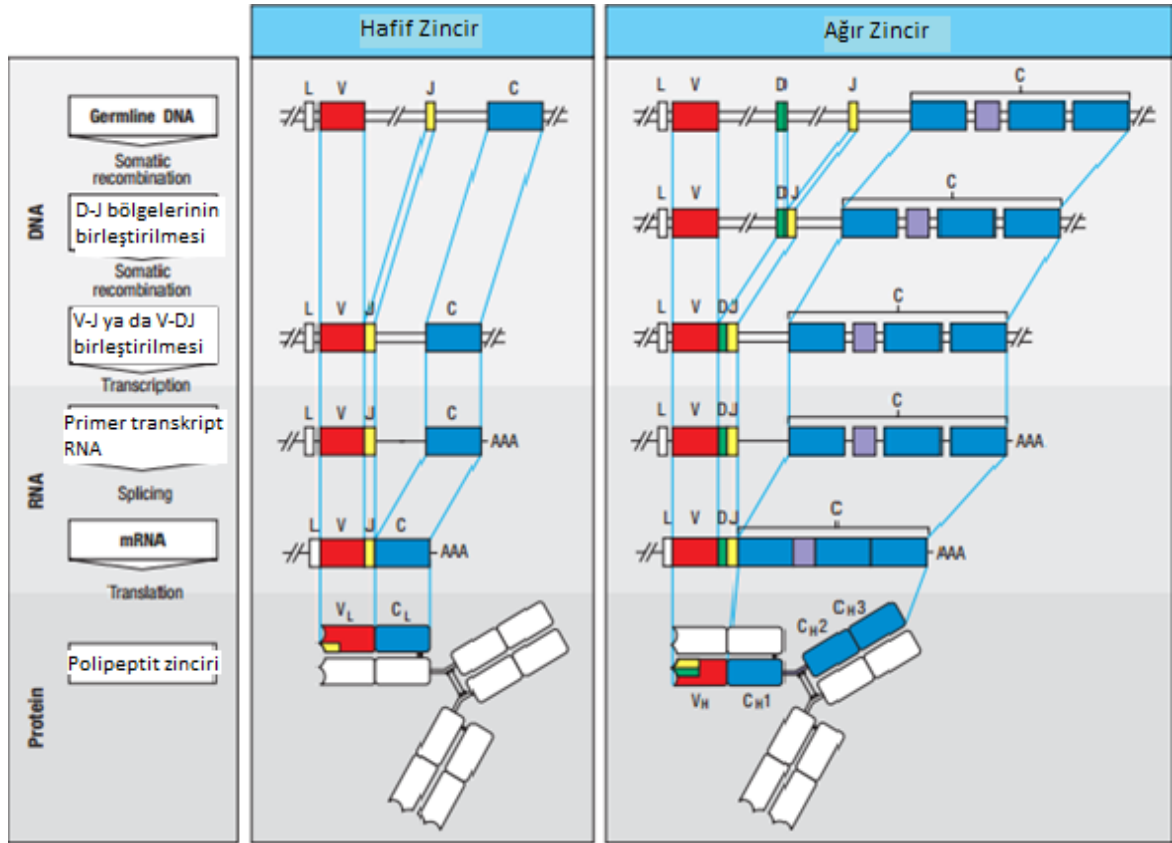
2.2.1.2. Antikorum Antijene Bağlanması

Antikorum değişken bölgelerindeki ağır ve hafif zincirler üzer hiper değişken bölge (CDR) bulundurmaktadır. Bunlar arasında en değişken bölge ağır zincirin üçüncü CDR bölgesidir (HV3). CDR bölgeleri arasında kalan bölgeler ise framework bölgeleri olarak bilinmekte

ve bu bölgeler CDR bölgelerine oranla daha az değişkenlik göstermektedirler. Değişken bölgelerde toplamda 4 framework bölgesi bulunmaktadır. Sırasıyla bir framework ve bir CDR bölgesi art arda bulunur. CDR bölgeleri bu değişkenliklerinden dolayı antijene spesifiteyi belirlediklerinden, antijene bağlanma bölgesi olarak da bilinirler. Kısacası, antijen spesifitesini belirleyen ağır ve hafif zincirlerdeki hiper değişken bölgelerin kombinasyonlarıdır (35).

Hafif zincirde birleşme (J) bölgesi ve değişken bölge (V) tüm değişken hafif zinciri kodlayan ekzonu oluşturmaktadır. DNA'da değişken hafif zincir gen segmenti sabit hafif zincir gen segmentinden daha uzakta bulunmaktadır. Birleşme (J) bölgesi sabit bölgeye (C) daha yakındır ve sabit bölge ile değişken bölgeyi (V) bir araya getirmektedir. mRNA'da tam bir hafif zincir oluşturulması, transkripsiyon sonrası RNA splicing ile V bölgesi ekzonunun sabit bölge sekansları ile birleştirilmesine bağlıdır (Şekil 2.10.) (35).

Ağır zincirlerde ise bu durum daha farklıdır. Ağır zincir değişken bölge lokusunda iki yerine üç gen segmenti bulunmaktadır. V ve J gen segmentlerinin dışında bir de çeşitlilik (diversity) bölgesi bulunur. D (çeşitlilik) bölgesi, V ve J segmentlerinin arasında bulunmaktadır. Rekombinasyon sürecinde ağır zincir değişken bölgesinin oluşturulması iki aşamalıdır. İlk aşamada D bölgesi J bölgesine bağlanırken, ikinci aşamada V bölgesi DJ bölgesine bağlanır. Böylece tamamlanmış bir ağır zincir değişken bölge ekzonu oluşturulur. Hafif zincir genlerinde olduğu gibi burada da RNA splicing mekanizması ile değişken bölge segmenti sabit bölge geniyle bir araya getirilir (Şekil 2.10.) (35).



Şekil 2.10. Somatik rekombinasyon ile değişken bölgelerin bir araya gelmesi (35)

Ağır zincir gen bölgesi tek bir sabit bölge bulundurmamasıyla hafif zincirden ayrılmaktadır. Her sabit bölge farklı bir immünoglobulin izotipi oluşturmaktadır. B hücreleri ilk olarak μ and δ (IgM ve IgD) izotiplerini eksprese ederler. Diğer izotiplerin ekspresyonu sınıf değiştirme olarak adlandırılan DNA yeniden düzenlenmesi ile olur. Bu durum B hücrelerinin bağışıklık yanıtında antijen ile aktifleşmesi sonucu meydana gelmektedir (35).

2.2.2. POLİKLONAL ANTİKORLAR

Poliklonal antikorlar, antijen üzerindeki farklı epitoplara bağlanabilen antikorlardır. Spesifik antijene farklı koşullarda başarılı bir şekilde bağlanabilirler. Doğal antikorlar birçok B hücre klonundan salgılandıkları için poliklonaldirler. Poliklonal serum birden çok antijendeki birden çok epitopa bağlanan antikorları içermektedir (5). Poliklonal anti-serum immünoterapide ilk olarak 1891 yılında kullanılmıştır. Halen daha içerisinde virüs ve toksinlerin de neden olduğu hastalıklarda birden çok epitopu hedefleyerek, monoterapiye kıyasla daha geniş bir koruma sağlaması nedeniyle kullanılmaktadır (40).

Monoklonal antikorlar spesifik olmayan bağlanmaları azaltsa da, farklı araştırma prosedürlerinde antikorun kullanışlılığını azaltabilmektedirler (6). Poliklonal antikorlar ise, hedef protein üzerindeki birden fazla epitopu tanıyabildiklerinden, hedef proteinin teşhisinde kullanılan kromatin immünopresipitasyon (ChIP), immünohistokimya (IHC), Western Blot ve ELISA gibi tekniklerde daha etkilidirler. Poliklonal antikorların üretimi monoklonal antikora göre daha kolay ve ucuzdur. Sıcaklık ve pH değişimlerinde monoklonal antikora göre daha dayanıklıdır (7).

Poliklonal antikorlar terapötik uygulamalarda da kullanılabilir. Yapılan bir çalışmada patojen üzerindeki farklı yapıları da tanıyabildiklerinden, patojenleri monoklonal antikora göre daha kolay elimine edebildikleri gösterilmiştir (41).

2.2.2.1. Poliklonal Antikorların Üretim Yöntemleri

Poliklonal antikorlar farklı B hücre soylarından salgılanan immüoglobulin molekülleridir ve spesifik antijenin birden fazla epitopuna karşı etkilidirler. Poliklonal antikorlar, immünojenin hayvana enjeksiyonu ile üretilirler. İmmünizasyon sonrasında poliklonal antikorlar direkt olarak kullanılabilir ya da saflaştırılarak da kullanılabilir. Hayvandan alınan poliklonal antikorları içeren serum birden çok epitopa karşı afinite gösterdiğinden araştırma ya da terapötik olarak kullanım için etkilidir (8).

Son yıllarda, poliklonal antikorların antikor mühendisliğindeki faydaları daha çok ortaya çıkmıştır. Antikor kokteyli olarak da bilinen bu terapide önceden onaylanmış monoklonal antikorların farklı kombinasyonları da kullanılabilir (40).

İmmünizasyon sonrasında karın içinde biriken ascite sıvısının poliklonal antikor içerdiği bilinmektedir. Bu nedenle çeşitli adjuvanlar ile karın içi enjeksiyonlar yapılarak ascite sıvısının hayvan karnında toplanması ile poliklonal antikor üretimi kısa sürede yapılabilir (42).

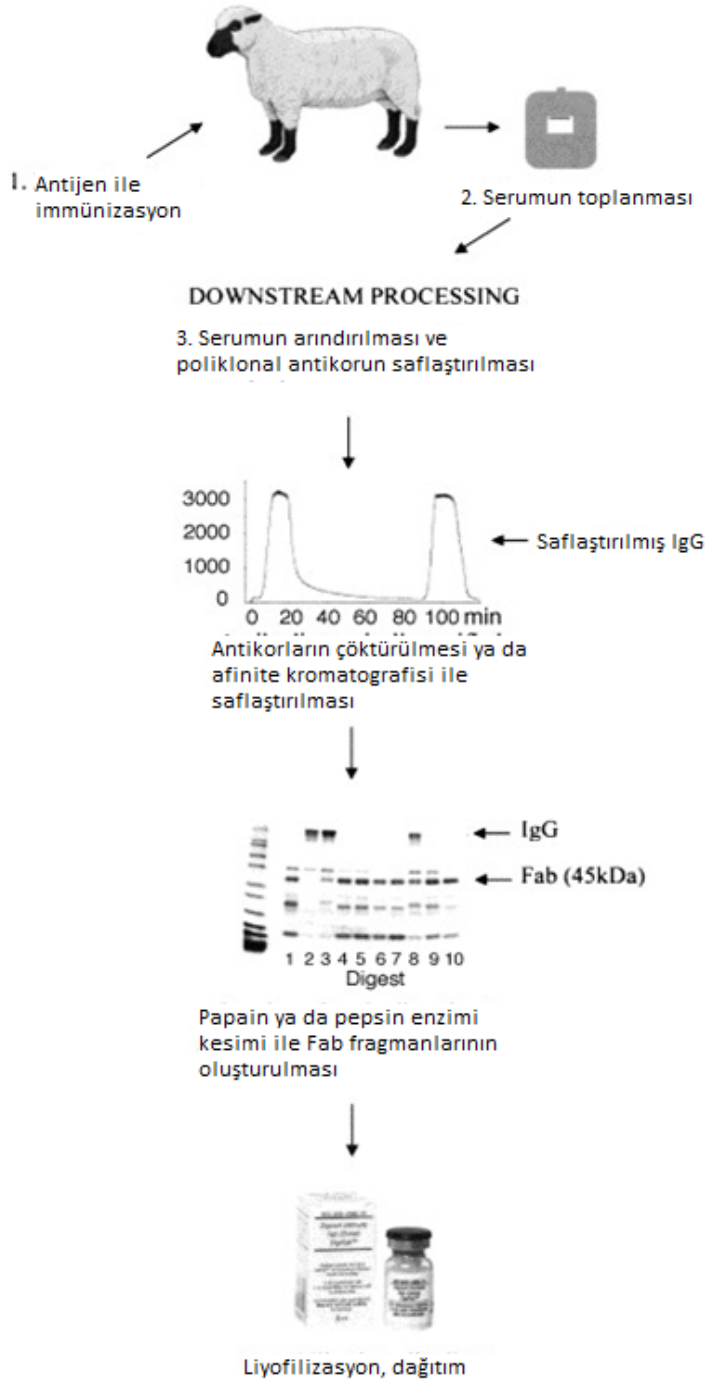
Hayvan seçimi poliklonal antikor üretiminde önemli bir yere sahiptir. Tavşanlar poliklonal antikor üretiminde en fazla kullanılan laboratuvar hayvanlarıdır. Diğer türlere göre birçok avantaj sağlamaktadırlar. Boyutlarının büyük olmasıyla daha fazla poliklonal antikor içeren serum toplanabilir (43).

Antijen dozu da antikor yanıtını ve antikorun afinitesini belirleyici faktörlerdendir. İmmünojen dozunun az olması antikor üretimi için yetersiz gelebilir ya da aşırı dozlar tolerans gelişimi sağlayarak düşük afiniteli antikorların üretilmesine sebep olabilir. Optimal immünojen dozunun belirlenmesi kullanılan adjuvana, immünizasyonların sıklığına ve immünizasyon bölgesine bağlıdır (43).

İdeal immünizasyon bölgesinin seçilmesi de poliklonal antikor üretimi için önem taşımaktadır. İntramusküler (kas içi) ve subkutan (deri altı) enjeksiyonlar tavşanlar için teknik olarak uygulaması daha kolay enjeksiyonlardır. İntravenöz (damar içi) ve intraperitoneal (karın içi) enjeksiyonlar da kullanılan diğer yöntemlerdendir (43).

Adjuvanlar, antijene karşı geliştirilen bağışıklık yanıtını artıran maddelerdir. Safılaştırılmış proteinler zayıf immünojenlerdir ve adjuvanla enjeksiyon gerektirirler. Bu nedenle poliklonal antikor üretiminde adjuvan seçimi büyük önem taşımaktadır. Bağışıklık yanıtı oluşturulurken oluşabilecek yan etkiler en aza indirilmelidir. “Depot” etkisine sahip adjuvanlar antijenin hayvan tarafından degradasyonunu immünojeni yavaşça salarak azaltırlar. Bu şekilde hayvanın bağışıklık sistemi daha uzun süre ve daha az immünojene maruz kalır. Emülsiyon adjuvanlar genellikle depot adjuvanlardır. En sık kullanılan emülsiyonlar yağ-içinde-su ve su-içinde-yag tipi adjuvanlardır. Alüminyum, mikropartiküller, lipozomlar ve nitrosellüloz da kullanılan diğer depot adjuvanlardır. Freund’s complete adjuvant (FCA), poliklonal antikor üretiminde en çok kullanılan ve en etkili adjuvandır. FCA; mineral yağ, mannide monooleate ve ısı ile öldürülmüş mikobakteriyel hücreler içermektedir. Freund’s incomplete adjuvant (FIA) ise mikobakteriyel hücreler içermez. İki adjuvan da yüksek afinite ve aviditeye sahip antikorlar üretilmesi için etkilidir (43).

Hayvanın istenilen antijenle immünizasyonu sonrasında spesifik antikor bulunduran yükselen serum titresi oluşmaktadır. Bu serum birden çok epitopa karşı üretilmiş antikor karışımını içermektedir. İmmünijenitenin azaltılabilmesi içinse bu antikorlar geliştirilerek türe spesifik Fc bölgeleri proteazlar ile kesilebilmekte ve antijene bağlanma bölgeleri kromatografik yöntemlerle saflaştırılarak ayrılabilir (Şekil 2.11.). Bu şekilde üretilmiş olan antikor fragmanları hipersensitivite reaksiyonlarını azaltarak ürünün daha güvenilir olabilmesini sağlamaktadır (44).



Şekil 2.11. Poliklonal antikor üretimi (44)

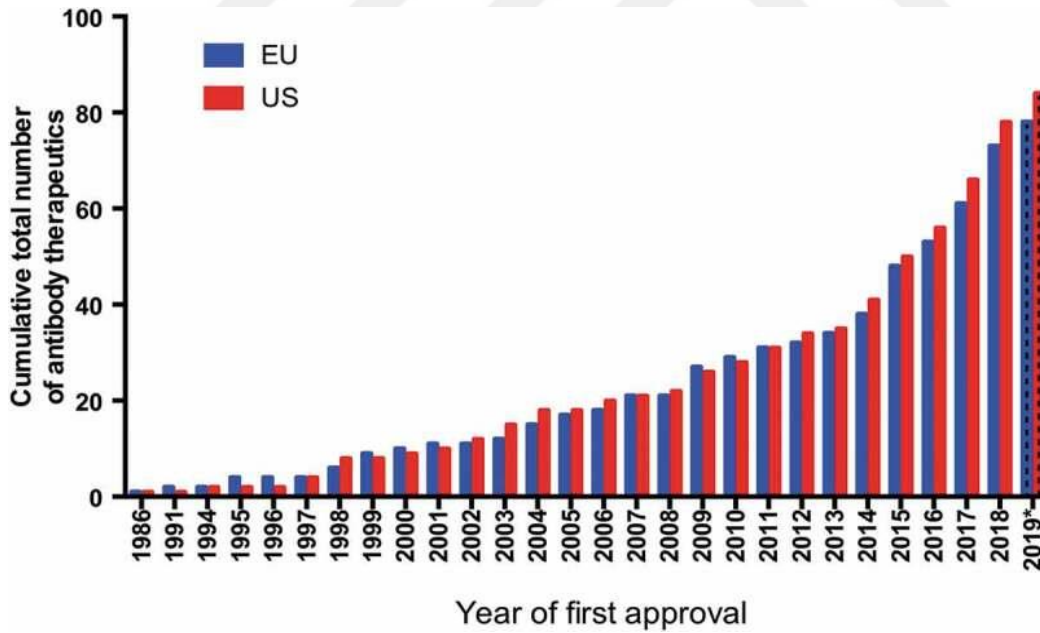
İnsan poliklonal antikorları transgenik teknolojiler kullanılarak da geliştirilebilmektedir. Bunun için insan yapay kromozomları (HAC) kullanılmaktadır. Bu kromozomlar insan immüoglobulin ağır ve hafif zincir bölgelerinin sekanslarını içermektedir. Antijenle immünizasyon sonrası insan poliklonal antikorları toplanıp saflaştırılabilmektedir (44).

2.2.3. MONOKLONAL ANTİKORLAR

Monoklonal antikorlar, B hücreleri tarafından yalnızca tek bir epitopa spesifik olarak üretilen antikorlardır (45). 1986 yılında ilk terapötik monoklonal antikor olan Orthoclone OKT3'ün böbrek transplantasyonu rejeksiyonunda kullanımı için onay almasıyla birlikte, terapötik antikorlar daha fazla onay almaya başlamıştır. Daha sonraki yıllarda insanlaştırılmış ve tamamen insan monoklonal antikorlarının da ortaya çıkmasıyla, 2013 yılında monoklonal antikor ürünlerinin satışı 75 milyon doları bulmuştur (46).

Günümüzde, 570'ten fazla monoklonal antikorun klinik denemeleri sürmektedir ve 30'u kanser tedavisi için kullanılan 79 terapötik monoklonal antikor FDA tarafından onaylanmıştır (45). Şekil 2.12.'te 1986 yılında onaylanmış ilk monoklonal antikordan bu yana onaylanmış terapötik antikorların yıllara göre artan grafiği gösterilmektedir (47).

Terapötik antikorların öneminin artmasıyla son 25 yılda çoğu hastalıkta baskın tedavi yöntemi olmuştur. Bu süre boyunca monoklonal antikor terapilerinde gelişmeler ve daha etkili ve hızlı üretim yöntemleri ortaya çıkmıştır (45).



Şekil 2.12. Monoklonal antikor terapisinin yıllara göre artan grafiği (47)

2018 yılında monoklonal antikorların yıllık satışı 3 milyon doların üzerindedir. Aralarında adalimumab, pembrolizumab, trastuzumab, bevacizumab ve rituximab'ın bulunduğu antikorların market değeri 6 milyon doları aşmıştır. Bunlar arasından adalimumab

(Humira) en fazla satış gelirin e sahip ilaç olarak bilinmektedir. Adalimumab 2018 yılında dünyanın en çok satan ilacıdır ve TNF-alfa'ya karşı geliştirilmiş bir insan monoklonal antikorudur. 2002 yılında romatoid artrit hastalığı için onay almasından sonraki yıllarda psoriatrik artrit, Crohn hastalığı gibi inflamatuvar hastalıklarda da kullanımı onaylanmıştır (45).

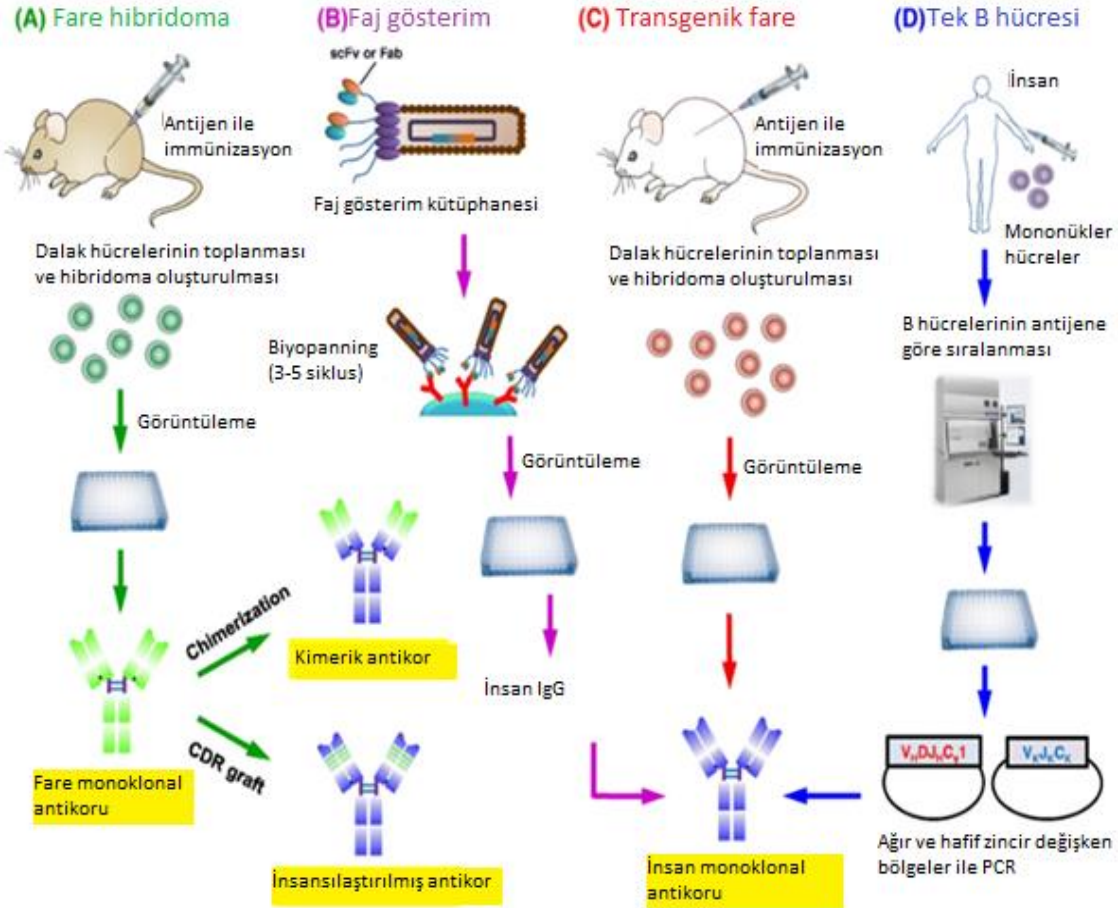
2.2.3.1. Monoklonal Antikorların retim Yöntemleri

Monoklonal antikorların üretilmesi ilk olarak 1975 yılında kullanılan hibridoma teknolojisi ile mümkün olmuştur (48). Hibridoma teknolojisinde fare ilk olarak spesifik antijenle immünize edilmekte ve spesifik plazma hücrelerini bulunduran dalak hücreleri kanser hücreleri ile birleştirilmektedir. Oluşan hibrit hücrelere hibridoma adı verilmekte ve bu hücreler çoğaltılarak istenilen antijene karşı monoklonal antikorları üreten hücreler oluşturulmaktadır (şekil 2.13.) (49).

Faj gösterim, 1985 yılında keşfedilmiş monoklonal antikor üretiminde etkili bir diğer yöntemdir (50). Bu yöntemde M13 fajlar genetik olarak modifiye edilip, proteinlerin, fajların yüzeylerinde kılıf proteinleri ile birlikte eksprese edilmeleri, gösterimleri sağlanmaktadır (51).

Faj gösterim yönteminde antikor fragmanları, fajmid adı verilen bir faj gösterim plasmidine aktarılarak bir faj kütüphanesi oluşturulmaktadır. Oluşturulan bu kütüphanedeki antijene bağlanan fajlar, biyopanning adı verilen bir yöntemle seçilmektedir (52). Biyopanning yönteminde, hedef protein faj-gösterim kütüphanesine tanıtılarak fajların bu proteine bağlanması sağlanmaktadır. Daha sonra bağlanmayan fajlar yıkanıp, bağlanan fajlarınsa elüsyonu sağlanır. Elüsyonu sağlanan fajlar *Escherichia coli* ile yeniden enfekte edilerek önceki stepler tekrarlanır. Son olarak ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ile bağlanma spesifiteleri tespit edilir (51).

Monoklonal antikorların üretiminde kullanılan bir diğer yöntem de transgenik fare yöntemidir. Burada, insan immünoglobulin genleri fare genomuna eklenir. Farenin antijenle immünizasyonu sonrası bu hayvanların insan antikoru salgılaması sağlanarak insan monoklonal antikoru üretilabilmektedir (şekil 2.13.) (45).



Şekil 2.13. Monoklonal antikorların üretim yöntemleri (45)

Tek B hücresi yöntemi de insan monoklonal antikorları üretilmesi için kullanılan bir yöntemdir (Şekil 2.13.). Bu yöntemde, insan periferik kan mononükleer hücreleri alınarak istenilen antijene spesifik B hücreleri seçilmektedir. İmmüoglobulin ağır ve hafif zincirlerinin çoğaltılmasıyla, bir memeli hücre hattında ekspresyonu sağlanır. Bu şekilde istenilen antijene karşı insan monoklonal antikor elde edilebilmektedir (45).

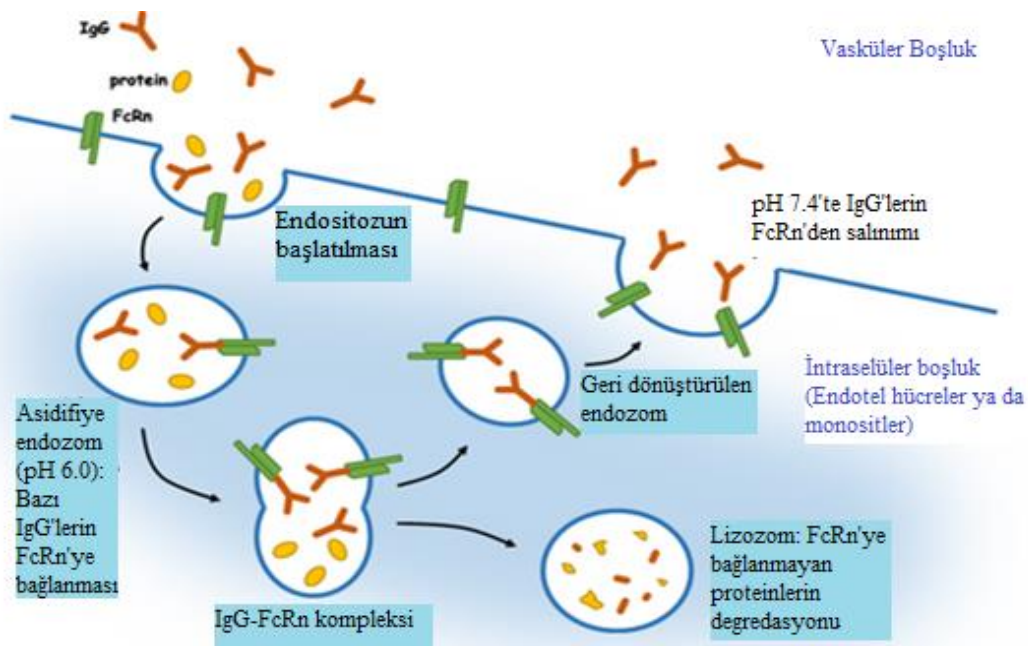
2.2.3.2. Rekombinant Antikorlar

Fareden üretilen antikorlar terapötik hedefe karşı etkili bir spesifikite gösterse de insan komplement ve Fc reseptörünün efektör sistemlerini yeterli derecede aktifleştirememektedirler. Ayrıca, fare antikorları insanda insan anti-fare antikor cevabı (HAMA) oluşturulmasını tetiklemektedir (53). Bu nedenle, bu antikorlar farklı yöntemlerle geliştirilerek insanlaştırılabilir. Fareden üretilen antikorun değişken bölgeleri insan antikorunun sabit bölgeleriyle birleştirilerek kimerik bir antikor formatı elde

edilebilmektedir. Fare antikorunun antijene bağlanmayı sağlayan sekansları olan CDR bölgeleri insan sekanslarıyla birleştirilerek de insanlaştırılmış bir form oluşturulabilmektedir (45).

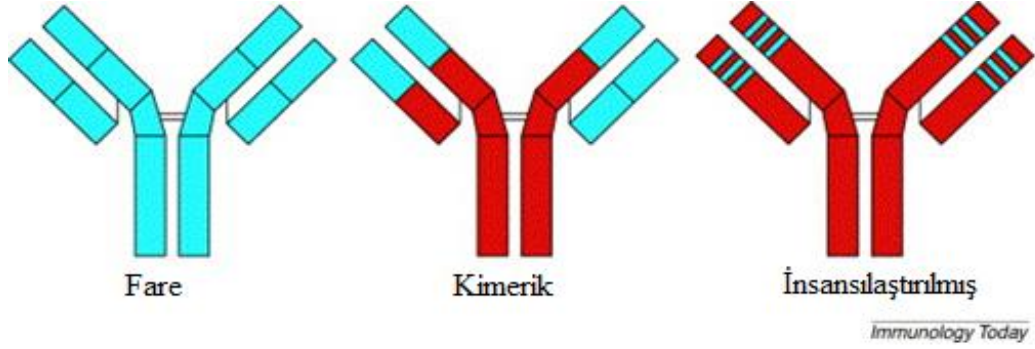
FDA tarafından onaylanan ilk kimerik antikor olan abciximab 1994 yılında kardiyovasküler hastalıklarda platelet agregasyonunun inhibisyonu için kullanılmaya başlanmıştır. Onkojenik indikasyona sahip ilk monoklonal antikor olan rituximab da non-Hodgkin's lenfomaya karşı 1997 yılında onaylanmış bir kimerik antikordur (45).

IgG antikorları stabil moleküllerdir ve yarılanma ömürleri uzundur. Bunun sebebi FcRn (neonetal Fc reseptörü) reseptörlerine sahip olmalarıdır. Bu reseptör IgG moleküllerinin korunmasını ve plazmada geri dönüşümlerini sağlamaktadır (53). Antikorların FcRn reseptörleri ile geri dönüştürülmeleri için antikordaki Fc bölgesinin endozomlardaki FcRn reseptörlerine bağlanması gerekir. Bu şekilde degradasyonlarını sağlayan lizozomal yoldan kaçınmış olurlar. Geri dönüştürülen IgG molekülleri hücre yüzeyine salınırlar (Şekil 2.14.). Antikorların FcRn reseptörleri ile interaksiyonu bu şekilde antikor yarılanma ömürlerinin uzun olmasını sağlamaktadır (54). Antikor Fc bölgesi fareden geldiğinde, Fc reseptörleri insan endozomlarındaki FcRn reseptörlerine bağlanamaz ve yarılanma ömürleri kısalır. Bu nedenle bu antikorların Fc bölgeleri insan olacak şekilde yeniden kombine edilerek terapötik olarak uygulanabilir hale getirilmeleri gerekir (53).



Şekil 2.14. Antikorların FcRn yolağı ile geri dönüştürülmesi (49)

Antikorlar rekombinant olarak üretilip fare değişken bölgeleri ve insan sabit bölgelerinden oluşan kimerik antikorlar oluşturulabilmektedir (Şekil 2.15.). Bu durumda, antijeni asıl tanıyan kısım değişken bölgeler olduğundan antikor, antijene bağlanma afinitesini kaybetmez. Aynı zamanda insan Fc bölgeleri bulundurduğundan Fc efektör fonksiyonlarına ve FcRn reseptörüne bağlanma gücüne de sahiptir (53).



Şekil 2.15. Rekombinant insanlaştırılmış antikorlar (53)

CDR-graft adı verilen bir yöntemle, yalnızca değişken bölgedeki CDR bölgeleri fareden alınan insan antikorları da oluşturulabilmektedir (Şekil 2.15.). Bu formatta ise antikorun değişken bölgelerinde antijeni asıl tanıyan hiper değişken bölgeler olan CDR sekansları fareden oluşmakta, kalan kısımlar insan antikorundan oluşmaktadır. Bu antikorda fareden alınan bölgeler yalnızca CDR bölgeleri olduğundan insanlaştırılmış antikorlardır. Bu formatta antikorun immüjenitesi azaltılmıştır ve Fc efektör fonksiyonlarına da sahiptirler (55).

2.2.3.3. Alternatif Antikor Formatları

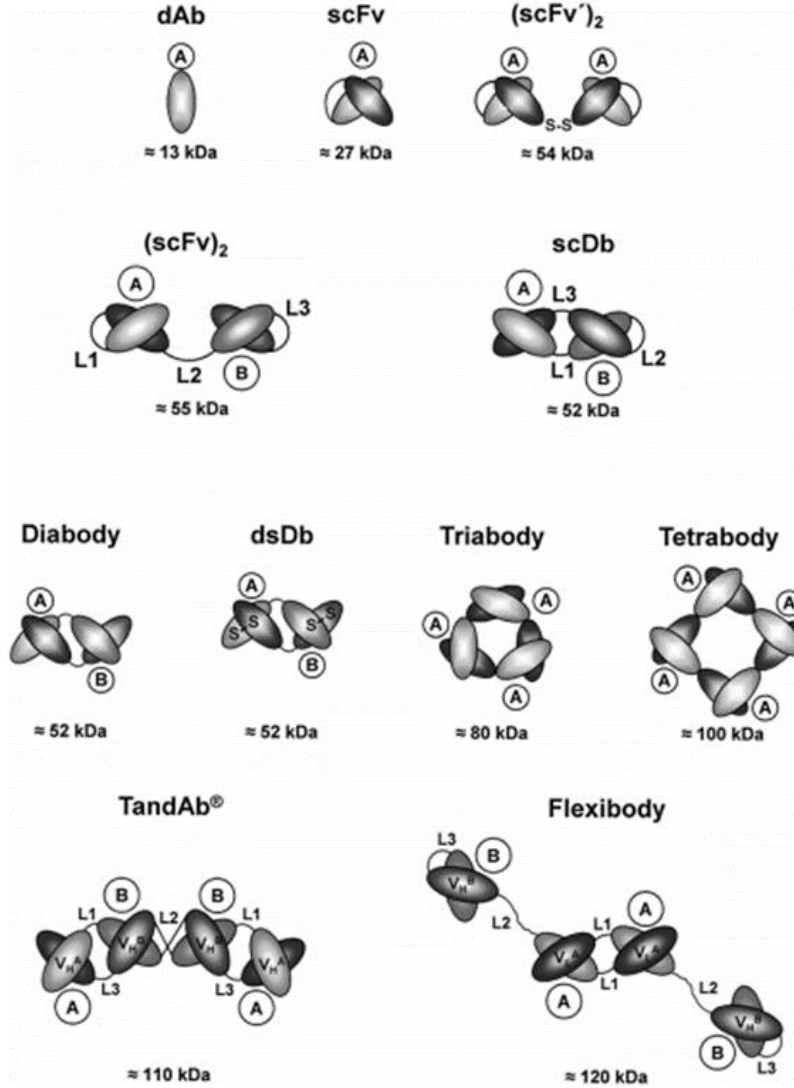
Son yıllarda birçok farklı antikor formatı geliştirilmeye başlanmıştır. Alternatif antikor formatları; antikor yapısındaki bazı fragmanların değiştirilmesi, çıkarılması ya da yeni fragmanlar eklenmesi ile oluşturulmaktadır (56). Farklı antijeni tanıyan fragmanların birleştirilmesiyle iki ya da daha fazla antijeni aynı anda tanıyabilen bispesifik ya da multispesifik formatlar oluşturulabilmektedir. Bu formatların terapötik olarak kullanılabilmeleri için klinik denemeleri sürmektedir (57).

Alternatif antikorlar, Fc bölgeleri olanlar ve Fc bölgeleri olmayanlar olarak iki şekilde incelenebilmektedirler. Fc-bölgeleri olmayan formatlar, yapıları daha küçük olduğundan tümöre daha hızlı nüfuz ederler. Bu avantajlarından dolayı diyagnozda ya da

görüntülemeye kullanılabilirler. Fc bölgesi bulunduran formatlarda, Fc efektör fonksiyonlarına sahip olmalarıyla ve FcRn'ye bağlanabildiklerinden yarılanma ömürlerinin daha uzun olmasıyla avantaj sağlamaktadırlar (56, 57).

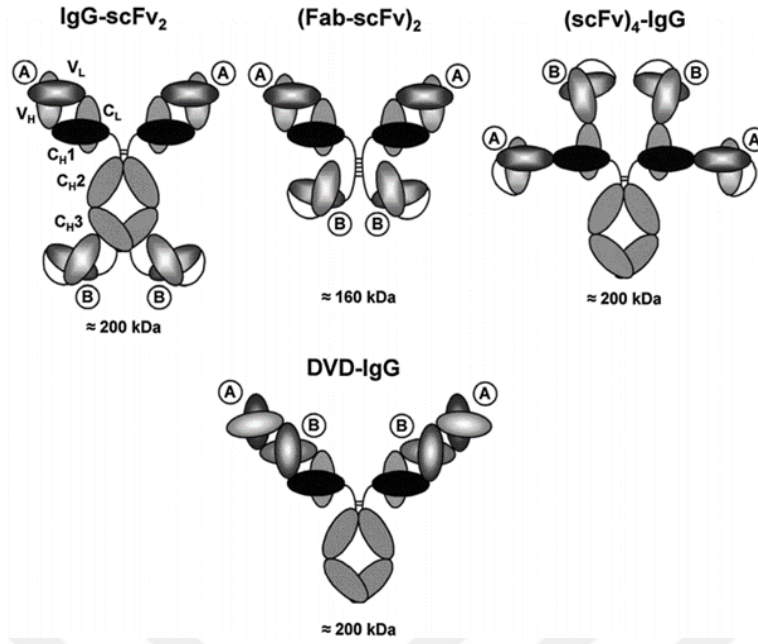
Tek zincirli değişken parça (scFv), antikorun bir ağır ve bir hafif zincirinin esnek bir polipeptit bağıyla bağlanmasıyla oluşur (Şekil 2.16.). Bu scFv'ler birbirlerine bağlanarak iki bağlanma bölgesine sahip, bivalent bir format oluşturabilirler. Her iki scFv de farklı antijeni tanıdığından bispesifik bir antikor formatı meydana gelmektedir. Bu durumda her iki scFv yapısı da farklı antijenlere aynı anda bağlanabilmektedir. Tribody ya da tetrabody yapıları da üç ya da dört scFv yapısının bir araya gelmesiyle oluşurlar. Bu formatların daha fazla bağlantı bölgeleri olduğundan antijene bağlanma konusunda daha avantajlıdırlar. Bu formatların farklı antijenleri tanıyan scFv'ler ile birleştirilmeleri ile multispesifik yani ikiden fazla antijeni tanıyan antikorlar oluşturulabilmektedir (56).

Fc bölgelerinin olmaması bu formatların yarılanma ömürlerini kısaltmaktadır. Bu formlara polietilen glikol (PEG) ya da albumin gibi moleküller bağlanarak yarılanma ömürleri uzatılabilmektedir (9, 58).



Şekil 2.16. Fc bölgesi içermeyen antikor formatları (56)

Bispesifik ya da multispesifik antikor formatları Fv ya da Fab bölgelerinin IgG formuna bağlanmasıyla da oluşturulabilmektedir. Bu formatlar Fc fragmanlarını da içermektedirler (Şekil 2.17.) (59). Bu formatlarda standart IgG yapısından farklı olarak, scFv'ler direkt olarak Fc domainine bağlanabilir ya da farklı antijeni tanıyan scFv'ler, Fv (değişken) bölgeye bağlanarak alternatif bir format oluşturulabilir (56).



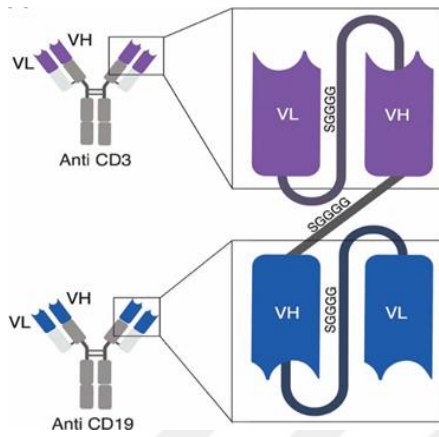
Şekil 2.17. Fc bölgesi içeren alternatif antikor formatları (56)

Bispesifik antikor formları iki farklı epitopu tanıyarak antikorun spesifitesini ve fonksiyonunu artırabilirler (60). Faj gösterim yöntemi antikor fragmanlarını üretmek için etkili bir yöntemdir. Fc bölgesi içermeyen formatlar çoğunlukla bakteri, maya ve memeli hücrelerinde üretilirler (57). Fc bölgesine sahip olan bispesifik antikorlar iki farklı antijeni tanıyan iki farklı antikorun birleştirilmesiyle oluşturulabilir. Bu antikorların farklı ağır ve hafif zincirlerinin bağlanabilmeleri kritiktir. Farklı Fc bölgelerinin birbirleriyle bağlanabilmeleri için farklı yöntemler mevcuttur (61).

Quadroma yönteminde iki farklı hibridomanın füzyonu sağlanmaktadır. İki farklı monoklonal antikor üreten hücrelerin füzyonu ile hibrit bir IgG yapısı olan quadromalar oluşmaktadır. Füzyon sonrası sadece fare antikor protein A kromatografisinden geçebilirken sıçan antikorları ayrılmış olurlar. Farklı pH'larda olan fare monoklonal antikorları ve bispesifik antikorlar da kromatografik teknikler ile ayrılırlar (57).

Knobs into holes teknolojisi de bispesifik formatların üretimi için kullanılmaktadır. Bir Fc fragmanının dimerizasyonu sağlayan üçüncü sabit ağır zincirinde küçük bir aminoasit daha büyük bir aminoasitle değiştirilerek bir "knob" oluştururken, diğer Fc fragmanında aynı bölge daha küçük bir aminoasit ile değiştirilerek "hole" oluşturulur. Böylece Fc zincirleri heterodimerleşmeye yatkın olurlar (57).

BiTE (bispecific T cell engager) adı verilen format, iki scFv'nin bağlanmasıyla oluşmakta ve iki farklı antijeni tanıyabilmektedir (Şekil 2.18.). Bu yapılar hem tümör hücrelerindeki moleküllere hem sitotoksik T hücrelerindeki molekülleri tanıyabilmesiyle kanser tedavisinde kullanılabilmektedirler. T hücrelerine bağlandıklarında T hücrelerini aktifleştiren tümörü tanımasını sağlayabilirler (62). Blinatumomab (Blinicyto®), FDA tarafından onaylanmış ilk BiTE molekülüdür ve günümüzde onaylanmış olarak bulunan iki bispesifik antikordandır. Blinatumomab akut lenfoblastik lösemi tedavisinde kullanılmaktadır. Bu bispesifik antikör, lösemi hücrelerinde CD19 moleküllerine ve T hücrelerindeki CD3 molekülüne bağlanabilmekte ve T hücrelerini tümör hücrelerine yönlendirebilmektedir (57).



Şekil 2.18. BiTE formatı (62)

FDA tarafından onaylanmış ikinci bispesifik antikorsa emicizumab'dır. Hemofili A hastalığında kullanılmaktadır ve Fc bölgesi bulunduran bir bispesifik antikordur (63).

2.3. REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ

Rekombinant proteinlerin üretilmesi hem ilaç üretimi hem de yeni yapısal ilaç hedeflerinin keşfedilmesinde önemli bir basamaktır. Bu proteinler konak hücre içerisinde sentezlenmektedir ve DNA'ları yeniden düzenlendiğinden rekombinant protein adını almaktadırlar. Rekombinant ilaç üretiminde en çok kullanılan hücreler bakteri hücreleridir (9).

2.3.1. REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİNDE KONAK SİSTEMLERİ

Rekombinant protein üretiminde ilk olarak konak sistemine karar vermek gerekmektedir. Eğer protein glikosile oluyorsa (spesifik şeker moleküllerinin bağlanması) ökaryotik

sistemler seçilmesi gerekir. Çünkü bu modifikasyonlar protein fonksiyonu için gereklidir ve bakteri hücreleri bu modifikasyonları gerçekleştirememektedir. Bunun nedeni bakteride endoplasmik retikulum ve Golgi cisimciğinin bulunmamasıdır. Glikosile olan ya da post-transkripsiyonel modifikasyonlar gerektiren proteinler CHO gibi memeli hücrelerinde üretilmektedirler. Bunun yanında, disülfid bağ oluşumu da bakteri hücrelerinde mümkün olmaktadır. Memeli ya da bakteri hücreleri dışında maya sistemleri de kullanılabilir. Maya hücreleri rekombinant proteinlerin üretiminde hızlı ve basit sistemlerdir. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Pichia pastoris* hücreleri post-transkripsiyonel modifikasyonlar geliştirebilmektedir. İlaç marketinde mayada üretilmiş aşı ve insülin tabanlı ilaçlar bulunmaktadır (9).

Post-transkripsiyonel modifikasyonlara ya da glikosilasyona ihtiyaç duymayan proteinlerde bakteriler uygun konak hücrelerdir. Ökaryotik hücrelerden daha ucuz olmaları ve basit yapılar olmaları avantaj sağlamaktadır. Rekombinant protein üretiminde en fazla kullanılan bakteri *Escherichia coli*, fizyolojik ve metabolik özelliklerinin iyi bilinmesi ve tüm genomu sekanslanan ilk organizmalardan olmasıyla DNA sekansının yeniden düzenlenmesi konusunda avantaj sağlar. *E.coli*'de üretilmiş olan ilk rekombinant protein 1977 yılında üretilen somatostatindir. Onaylanan ilk ticari rekombinant ilaç olan insan insülini de 1982 yılında *E. Coli*'de üretilmiştir (9).

Rekombinant protein üretiminde host hücre seçimi sonrası, ilgili proteini kodlayan gen ekspresyon vektöründeki çoklu klonlama bölgesine aktarılır. *E.coli*'ye aktarılan plasmid vektörü bu hücrelerde protein üretimini sağlar. Proteinin üretimi, kimyasal olarak vektör içerisindeki promotorun indüklenmesiyle sağlanır. Son olarak üretilen protein toplanır ve saflaştırılabilir (9).

2.3.2. REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİNDE VEKTÖR SEÇİMİ

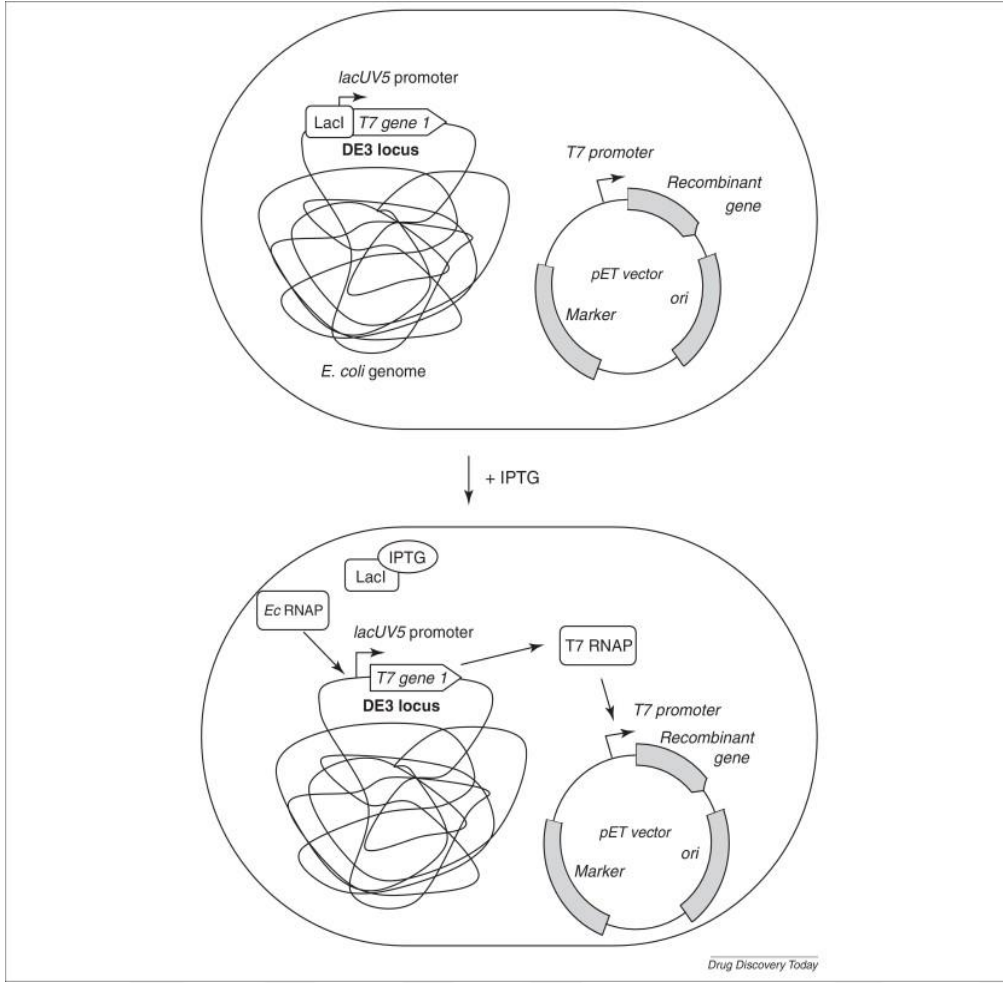
Ekspresyon vektörünün seçimi de rekombinant protein üretiminde yapılması gereken ilk seçeneklerdendir. Ekspresyon vektörü seçiminde rekombinant genin eksprese edileceği promotor, seçim markırı ve plasmidin kopya sayısını düzenleyen replikasyon orijini seçimi önem taşımaktadır (9). Plasmid kopya sayısının kontrolü replikon içerisinde bulunur. Plasmid kopya sayısının artması, daha fazla protein üretimi ile ilişkilidir. Fakat plasmid kopya sayısının yüksekliği bakterinin büyüme oranını ve plasmidin stabilitesini azaltabilir.

Bu nedenle plasmid kopya sayısının fazla olması daha fazla protein ekspresyonu anlamına gelmez (64).

Promotorlar genellikle kültüre eklendiğinde transkripsiyonu artıran ve protein üretiminin kontrolünü sağlayan bir kimyasal indükleyici ile düzenlenirler. Bu promotorlar sıkı bir kontrol altında tutulacak şekilde düzenlenmekte, indükleyici olmadığında tamamen kapatılıp, indükleyici madde kültür içerisinde belirli bir konsantrasyonda bulunduğu anda ekspresyon sağlanmaktadır (9).

pET sistemi, rekombinant protein üretiminde en sık kullanılan vektör sistemidir (Şekil 2.19.). Bu sistemde, düzenlenmiş bir *E.coli* konağı, bakteriyofaj T7 RNA polimerazını kodlayan genin kromozomal bir kopyasını taşır. Bu RNA polimeraz geni ise izopropil β -d-1-thiogalaktopyranoside (IPTG) tarafından indüklenebilir promotor olan lacUV5'i bulundurur (65). Bu sistem bakteriyel kromozomun DE3 lokusunda oluşturulabilmektedir. IPTG ortamda bulunmadığında lac promotoru Lac baskılayıcısı (represör) LacI'ya bağlanmaktadır. Bu baskılayıcı gen transkripsiyonu önleyerek T7 RNA polimerazının sentezlenememesine neden olur. IPTG ortama eklendiğindeyse, LacI represörü lac promotorundan ayrılarak T7 RNA polimerazının transkripsiyon ve translasyonunu sağlar. T7 RNA polimerazı böylece T7 promotoru üzerinden plasmiddeki ilgili genin transkripsiyonunu sağlamaktadır (9, 65).

pET sistemi en çok kullanılan vektör sistemi olmasının yanında bazı dezavantajlara da sahiptir. T7 RNA polimeraz seviyesi hücrede yüksek olabilir ve ilgili genin aşırı transkribe olmasına neden olabilir. Ayrıca, IPTG eklenmediği durumda da az miktarda rekombinant genin ekspresyonu sağlanabilir. Bu durum IPTG olmadığında az miktarda da olsa T7 RNA polimeraz üretiminden ya da *E.Coli*'den gelen RNA polimerazdan dolayı T7 promotorundan ekspresyon sağlamasından kaynaklanabilmektedir. Bütün bunlar, rekombinant proteinin hücrede toksik etki yaratmasına ve hücre büyümesinde azalmaya neden olabilmektedir. Bunların önlenmesi için, lac operon sekansı T7 promotoru ile çakışabilmekte ve Lac represörünün T7 RNA polimeraz ve ilgili genlerin promotorlarına bağlanarak ekspresyonlarının engellenmesi sağlanabilmektedir. Alternatif olarak, T7 lizozimi eksprese eden ekstra plasmidler eklenerek T7 RNA polimeraz aktivitesi engellenebilmektedir (9, 65).



Şekil 2.19. pET sistemi (9)

Kodon biası; plasmid DNA'da aynı amino asidi oluşturan synonymous kodonların frekansının host DNA'dakinden farklı olmasıyla oluşur. Rekombinant proteinin sentezi sırasında daha az bulunan tRNA'lar azalır ve bu da amino asitlerin yanlış yerleşimine ve protein ekspresyonunun azalmasına neden olur. Nadir kodonların belirlenmesi rekombinant protein ekspresyonunda büyük önem taşımaktadır (64).

E.Coli'de nadir kodonların frekansı %1 olarak belirlenmiştir. Örneğin; arjinin amino asit kodonu AGG *E.Coli*'de %0.2 frekansında bulunurken, bitkilerde bu frekans %1.5'ten fazladır ve nadir olarak adlandırılmaz. Kodon biası sorununu çözmek için, vektördeki kodlama sekansında kodon optimizasyonu yapılabilir ya da konak hücrede modifikasyonlar gerçekleştirilerek bu tRNA'ların ulaşılabilirliği artırılabilir. Kodon optimizasyonu, hedef gendeki nadir kodonların konak tarafından kullanılmasını sağlayacak modifikasyonları ile gerçekleştirilir. Bu da sessiz mutagenез ile ya da tüm genin yeniden

sentezi ile sağlanabilmektedir. Bunun en basit yöntemi de hedef gendeki tüm amino asitlerin konakta en fazla bulunan kodonlarla değiştirildiği “bir amino asit bir kodon” yöntemidir (64).

2.3.3. REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİNDE ANTİBİYOTİK SEÇİMİ

Plasmidlerin sürekliliğinin sağlanması antibiyotik genlerinin seçilmesiyle sağlanmaktadır. İlgili plasmidi içermeyen hücreler antibiyotik içeren besiyeri içerisinde büyüyemezler. Penisilin türevleri, ampisilin en sık kullanılan antibiyotiklerdendir. Fakat, penisilin direnç geni ürünü β -lactamaz besiyeri içerisindeki antibiyotiği degrades edebilmektedir. Bunun için alternatif olarak degradesyona daha toleranslı bir antibiyotik olan carbenisilin ya da farklı antibiyotikler; tetrasiklin ya da kanamisin kullanılabilmektedir (9).

2.3.4. REKOMBİNANT PROTEİNLERİN SAFLAŞTIRILMASI

Rekombinant proteinler üretildiklerinde doğru katlanmaları büyük önem taşımaktadır. Ekspresyon vektörleri protein üretimini ve doğru katlanmayı artırıcı tagler ile modifiye edilebilirler. Bu taglerin, rekombinant genin N ya da C terminaline füzyonu sağlanabilmekte ve transkripsiyon sonrası tek bir polipeptit zinciri olarak üretilmektedir. Bu tagler ayrıca rekombinant proteinlerin daha kolay saflaştırılabilmelerini sağlamaktadır (9).

2.3.4.1. İmmobilize Metal İyon Kromatografisi

Bakteriden üretilen proteinlerde afinite tagleri en sık kullanılan taglerdir. Bunlar arasında en sık kullanılan afinite tagi olan histidin tagi, genellikle 6 histidin residueden oluşmakta ve rekombinant proteinin N ya da C ucuna tutturulması sağlanmaktadır. Translasyon sonrasında bu histidinlerin nikel ya da bakır gibi metal iyonları bulunduran kromatografi rezinlerine bağlanması sağlanarak hücre içindeki diğer istenmeyen moleküllerden ayrılması sağlanabilmektedir. Bu yöntemle immobilize metal iyon kromatografisi (IMAC) adı verilmektedir (9).

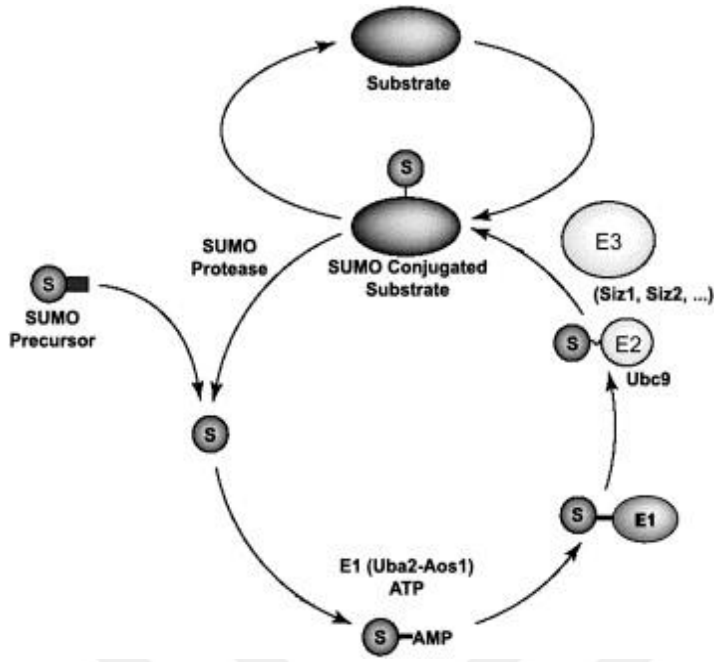
Ni-NTA (nikel-nitrilotriasetik asit) sistemi, rekombinant proteinlerin, 6 histidin bölgesinin nikel iyonlarına bağlanarak saflaştırılmasına dayalıdır (66). Nikel iyonları, nitrilotriasetik asit (NTA) sepharoz resin içerisinde immobilize, yani sabit halde bulunurlar. Histidinler

resin içerisindeki bu nikel iyonlarına bağlanmaktadır (67). His-tag ve rezinin sıkı bir şekilde bağlanmaları diğer moleküllerin kolay bir şekilde yıkanıp elimine edilerek kolona bağlanan His-tag'li proteinlerin ayrılmasını sağlamaktadır. His-tag bağlı olan bu proteinlerse daha sonra, imidazol ile ya da pH'ın düşürülmesi ile his-tag'den ayrılabilir. pH'ın düşürülmesi histidinlerin protonlaşarak Ni-NTA'dan ayrılmasını sağlamaktadır. İmidazol tamponu ise Ni-NTA'ya bağlanıp proteinden ayrılmasını sağlamaktadır (66, 67). Bu işlem sonrasında diyaliz yöntemi kullanılarak imidazolün proteinden uzaklaştırılması sağlanabilmektedir (68).

2.3.4.2. SUMO Füzyon Teknolojisi

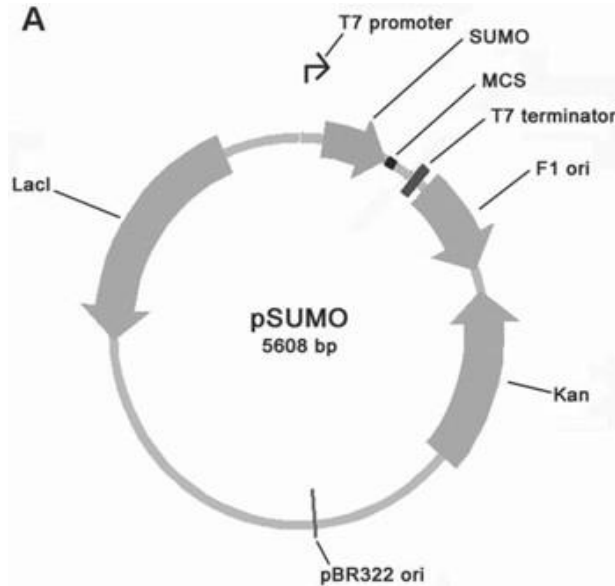
Çözünürlük tagleri de rekombinant proteine bağlandıklarında protein çözünürlüğünü artıran taglerdir. En sık kullanılanları NusA, maltoza bağlanan protein (MBP) ve küçük ubitikin benzeri düzenleyici (SUMO) ailesi proteinleridir (9, 65, 69). SUMO proteini *E.Coli*'de çözünürlüğü artıran bir proteindir. Kanamisin ve ampisilin direnç kasedine sahip pSUMO vektörü bulunmaktadır. pSUMO vektörü *E.Coli*/maya ve *E.Coli*/memeli hücresi olmak üzere iki farklı ikili ekspresyona sahiptir. pSUMO'nun kullanımındaki en büyük avantaj; SUMO proteaz ile kesim sonrası rekombinant proteinde ekstra amimo asit kalmadan saflaştırılabilmesidir (70).

SUMO proteinleri, ökaryotik hücrelerdeki proteinlere kovalent bağlarla bağlanıp ayrılabilirler. Sumoylasyon, transport, apoptoz, protein inaktivasyonu, stabilite ve hücre siklusu progresyonu gibi birçok hücre içi süreçte bulunan post translasyonel bir modifikasyondur. SUMO proteini *Saccharomyces cerevisiae*'de Smt3 olarak adlandırılır. Bu protein prokaryotik hücrelerde stabil ve çabuk katlanabilen bir protein olduğundan etkili bir biyoteknolojik araç olabilmektedir (71). SUMO ve SUMO yolağı tüm ökaryotlarda korunmuş bir proteinken, prokaryotlarda bulunmaz. *Saccharomyces cerevisiae* ise Smt3 adı verilen sadece tek bir SUMO geni bulundurur. SUMO protein ailesi diğer proteinlerin kovalent modifikasyonlarını sağlarlar. SUMO proteini ATP'ye bağlı bir steple SUMO aktifleştirici enzim E1 ile aktifleşir (Şekil 2.20.). Aktivasyon sonrası E2'ye ve oradan da E3 enzimi ile hedef proteinine transferi sağlanır. Hedef proteininden ayrılmasıysa SUMO proteaz enzimi ile gerçekleşir (72).



Şekil 2.20. SUMO proteininin siklusu (72)

N-terminal SUMO tagi, genellikle partner proteine doğru katlanma ve yapısal stabilite sağlayabildiğinden protein fonksiyonunu da artırmaktadır. Partner proteininin saflaştırılmasını hızlandırmak adına 6xHis ve SUMO-tag birlikte oluşturulmaktadır (Şekil 2.21.). Bu tag *S. cerevisiae*'de Ulp1 adı verilen SUMO proteaz enzimi ile kolayca kesilebilmekte ve istenilen protein saf halde elde edilebilmektedir (71).

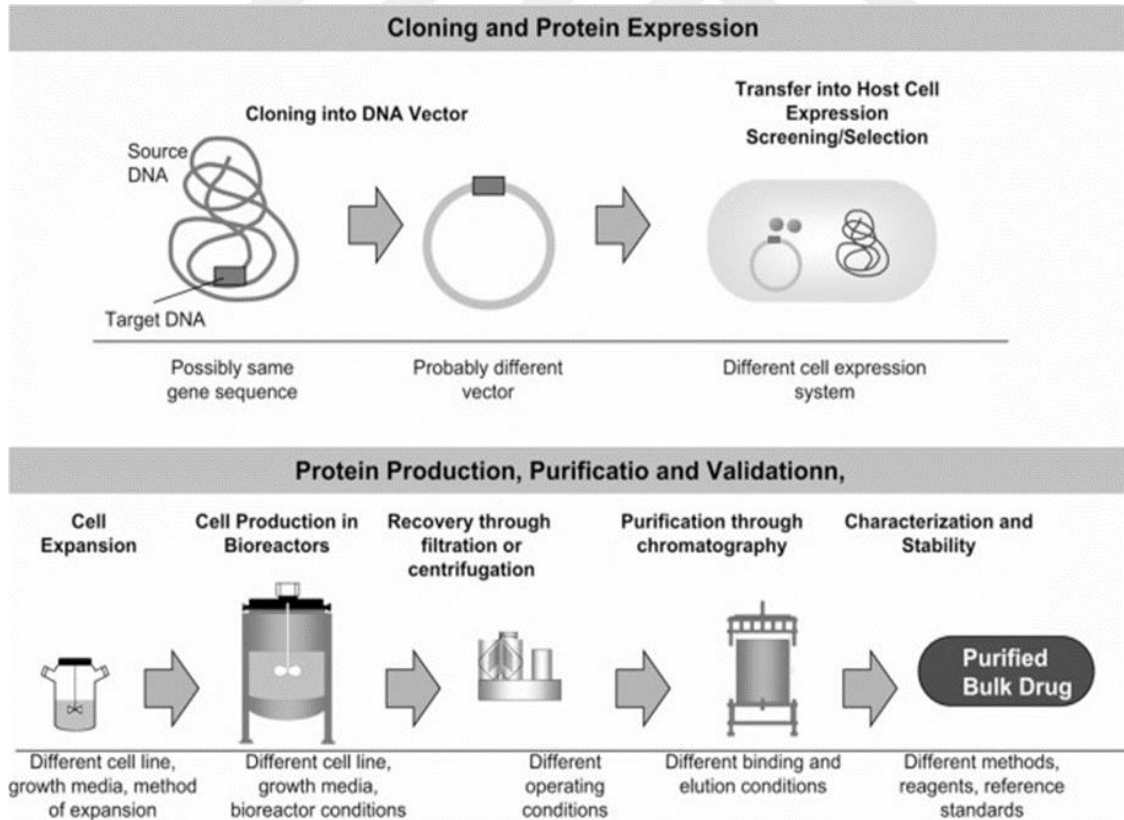


Şekil 2.21. pSUMO klonlama vektörünün gösterimi (71)

2.4. BİYOBENZERLER

Biyobenzerler; daha önceden onaylanmış, fakat patent süresi dolmuş ilaçların benzer ürünleridir. 2005 yılında biyobenzerlerin onaylanmaya başlamasıyla, özellikle monoklonal antikor tabanlı birçok ilacın biyobenzeri üretilmeye başlamıştır (10).

Biyobenzerler; kimyasal içerikleri aynı olan biyolojik ilaçlardır. Bununla birlikte, bu ürünler biyolojik olduklarından çok fazla çeşitliliğe sahip ve tam olarak karakterize edilmesi mümkün olmayan hücre ve organizmalardan üretilmektedirler. Biyolojik sistemlerin çeşitliliği ve üretilme süreci bu ilaçlarda da farklılığa sebep olabilmektedir. Bu nedenle biyobenzerler orijinallerinin tam olarak kopyası değil, ancak benzeri olabilmektedirler (10, 11). Biyolojik ilaçların üretimleri farklı üretim aşamaları ile mümkün olmaktadır. Üretim aşamalarındaki bu farklılıklar; proteinlerin üretildiği kaynak, saflaştırma süreçleri gibi süreçleri kapsamaktadır (Şekil 2.22.). Bu tür değişiklikler proteinlerin üç boyutlu yapısında ve glikozilasyonlarında değişiklikler oluşturabilmektedir (11).



Şekil 2.22. Biyobenzerlerde farklılık gösteren üretim aşamaları (11)

Son yıllarda, anti-TNF antikorları olan etanercept, infliximab ve 2018 yılı itibariyle adalimumab'ın patent sürelerinin bitmesiyle daha düşük fiyatlı biyobenzer versiyonları da markette yer edinmeye başlamıştır. Bu antikorların biyobenzerlerinin üretilmesi, anti-TNF ajanlarının markette bulunmaya devam etmesi açısından büyük önem taşımaktadır (73-75).



3. GEREKÇE VE AMAÇ

Bu tez çalışmasının temel amacı; inflamasyonda etkin rol oynayan ve otoimmün hastalıklarda konsantrasyonunun arttığı gösterilmiş bir sitokin olan Tümör Nekrozis Faktör Alfa'ya (TNF-alfa) karşı poliklonal antikor üretilmesidir.

Biyobenzer antikorlar, orjinal antikorlar ile aynı sekansa sahip olmasının yanında farklı klonlama ya da üretim prosesi ile üretilirler. Bu nedenle, glikolizasyon profillerinde, üretilen ürünün kalitesinde işlevselliğinde değişimler olabilmektedir (3). Son yıllarda, anti-TNF antikorları olan etanercept, infliximab ve 2018 yılı itibarıyla adalimumab'ın patent süreleri dolmuştur (75). Anti-TNF-alfa antikorlarının ve biyobenzerlerinin oluşturulmaya devam etmesi önem taşımaktadır. Bu nedenle, bu tez çalışması ile insan TNF-alfa proteinine karşı fare poliklonal antikoru üretilmiştir.

Bu amaca ulaşmak için; TNF-alfa protein ekspresyon vektörü olan pET-SUMO-TNF ile rekombinant protein ekspresyonu yapılmış (76) ve iki adet BALB/C dişi fareye immünizasyonu sağlanmıştır (42). Bu farelerden yaklaşık 40 gün sonunda ascite sıvısı, 45 gün sonunda ise kuyruk kanı toplanmış ve üretilen antikoru TNF-alfa'ya karşı spesifitesi indirekt ELISA ve Western Blot ile ölçülmüştür.

Bu tez ile üretilmiş olan poliklonal anti-TNF-alfa antikoru, ELISA ve Western Blot gibi tekniklerde kullanılabilir. Bu şekilde üretilmiş olan poliklonal antikor ileriki çalışmalarda saflaştırılıp geliştirilerek teşhis ve görüntüleme gibi birçok alanlarda kullanılabilir, ayrıca, ülkemizde birçok antikor tabanlı teknikte dışa bağımlılığı azaltma adına bir adım olabilecektir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

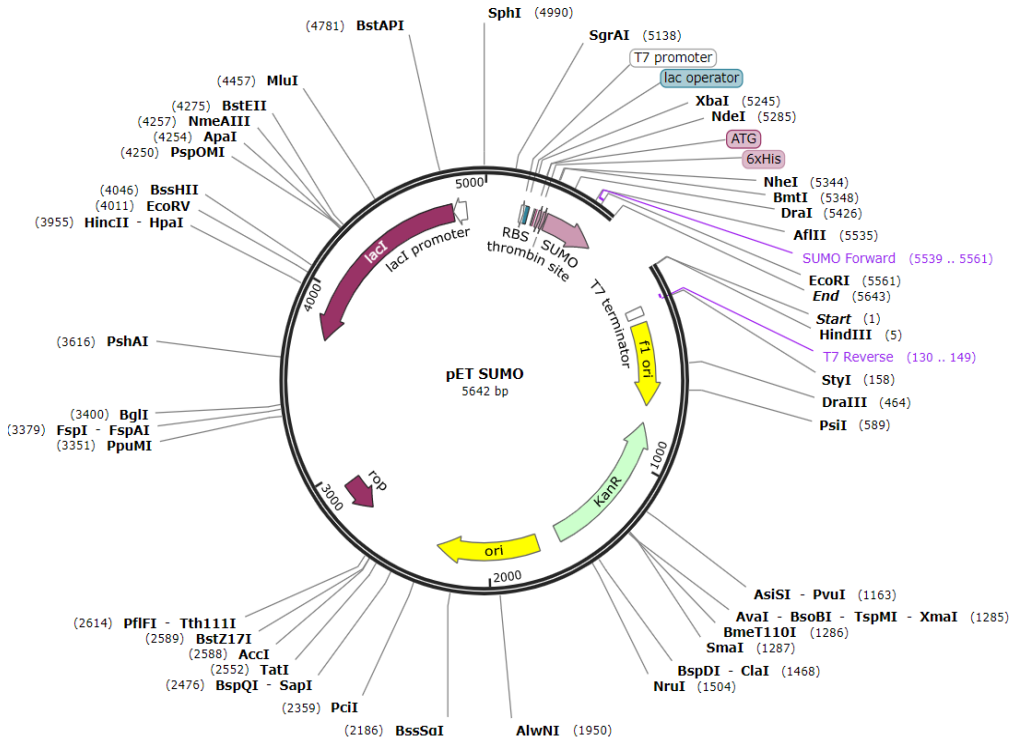
4.1. MATERYAL

Bu tez çalışması için 2021-3-13 karar no'lu etik kurulu onayı (Ek1) alınmıştır.

Genel laboratuvar kimyasalları olarak Fischer Scientific, Applichem, Merck, Sigma Aldrich, Applichem, Invitrogen ve Neogen firmalarının ürünleri kullanılmıştır.

4.1.1. IPTG İLE PROTEİN İNDÜKSİYONU

Rekombinant TNF-alfa proteininin izolasyonu için pET-SUMO-TNF vektörü kullanılmıştır (76). Bu vektörde matür TNF-alfa proteini, N-terminalinde SUMO-füzyon proteini olan Smt3 ve füzyon proteininin N-terminalinde ise His6-tag ile birlikte bulunmaktadır. Şekil 4.1.'de pET-SUMO vektörü gösterilmiştir.



Şekil 4.1. pET-SUMO vektör gösterimi (77)

BL21 hücresinin aktiveleştirilmesi için LB Broth (Sigma, L3022-250G) kullanılmıştır. IPTG ile protein indüksiyonu için indüksiyon besiyeri hazırlanmıştır. Kanamisin, LB Broth (Sigma, L3022-250G), Tripton (Neogen, MC005) ve IPTG (İzopropil-β-D-

tiyogalaktopiranozit) (Sigma-Aldrich, 16758-10G) kullanılmıştır. Santrifüj aşamasında Sigma 3430 santrifüj cihazı kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. İndüksiyon besiyeri için kullanılan materyaller, konsantrasyonları ve miktarları

Materyaller	Çalışan Konsantrasyon	Miktar (50 ml için)
Tripton	%2	20 ml
IPTG (420 mM)	1 mM	118 µl
Kanamisin (250 ug/ml)	50 µg/ml	10 µl
LB sıvı besiyeri		29,78 ml

Tripton, 40 ml ddH₂O içerisinde 2 g çözülürerek hazırlanmıştır. 0,1 g IPTG, 1 ml ddH₂O içerisinde çözülürerek filtreden geçirilerek kullanılmıştır.

4.1.2. TOTAL PROTEİN İZOLASYONU

Total protein izolasyonu için Trisma base (Sigma, T6066-1KG), Triton X-100 (Appllichem, A49750100) ve PMSF (Phenylmethylsulfonyl flüoride) (Sigma, P7626-250MG) kullanılmıştır. Sonikasyon için Sonics Vibra Cell Ultrasonic Processor (SN:406732) kullanılmıştır.

Çizelge 4.2 Total protein izolasyonu için kullanılan materyaller, konsantrasyonları ve miktarları

Materyaller	Çalışan Konsantrasyon	Miktar (900 ul için)
ddH ₂ O		800 µl
1 M Tris-HCl pH.8.0	50 mM	45 µl
%10 Triton-X-100	%0.5	45 µl
PMSF (100 mM)	0.1 mM	0.9 µl
Lizozim (2 mg/ml)	800 µg/ml	0.8 µl

4.1.3. REKOMBİNANT PROTEİNİN SAFLAŞTIRILMASI

Proteinin nikel kolondan geçirilerek saflaştırılması için HisPur Ni-NTA Spin Columns (Thermo Fisher Scientific, 88226) kullanılmıştır. Bu aşamada kullanılan tamponların içerikleri ve konsantrasyonları Çizelge 4.3.'te belirtilmiştir.

2 M imidazol, 250 ml ddH₂O içerisinde 34 g imidazol (Applichem, A1378,0010) çözündürülerek hazırlanmış ve pH. 7.4'e ayarlanmıştır. 10X PBS (Phosphate-Buffered Saline) hazırlanması için; 80 g NaCl (Sodium chloride, Merck, K49432804.743), 2 g KCl (potassium chloride, Sigma, P9541), 14.4 g Na₂HPO₄ (sodium phosphate dibasic anhydrous, Fisher Scientific, BP332-500) ve 2.4 g KH₂PO₄ (potassium phosphate monobasic anhydrous, Bioshop, PPM666.500) 1 L ddH₂O içerisinde hazırlanmış ve HCl ile pH 7,4 olarak ayarlanmıştır. 1X PBS için; 100 ml 10X PBS çözeltisi, 900 ml ddH₂O içerisinde hazırlanarak kullanılmıştır.

Çizelge 4.3. Nikel kolon için kullanılan tamponların içerikleri ve konsantrasyonları

Tamponlar	İmidazol Konsantrasyonu	İmidazol Miktarı (2 M Stok çözelti)	1X PBS Miktarı
Equilibration Buffer (pH. 7.4)	10 mM	250 µl	49.75 ml
Wash Buffer (pH. 7.4)	25 mM	625 µl	49.375 ml
Elution Buffer (pH. 7.4)	250 mM	6250 µl	43.75 ml

1X PBS'e karşı diyaliz aşaması için Dialysis sacks (Sigma, D6066-5EA) kullanılmıştır. Diyaliz membran uygun boyutta kesilip iki ucundan mandal ile kapatılarak kullanılmıştır.

4.1.4. BCA İLE PROTEİN TAYİNİ

BCA ile protein tayini için Takara BCA Protein Assay Kiti kullanılmıştır. 20 mg BSA (bovine serum albumine, Sigma, A153-100G) 10 ml 1X PBS içerisinde çözündürülerek 2 mg/ml BSA çözeltisi hazırlanmıştır. Kit protokolüne göre farklı konsantrasyonlarda seri dilüyon yapılarak standart BSA çözeltileri hazırlanmıştır.

Çizelge 4.4. Standart BSA çözeltilerinin konsantrasyonları ve hazırlanan içeriklerin miktarları

Standart	BSA Miktarı (µl)	PBS Miktarı (µl)	BSA Konsantrasyonu (µg/ml)
A	300 µl BSA'dan	0	2000
B	375 µl A'dan	125	1500
C	325 µl A'dan	325	1000
D	175 µl B'den	175	750
E	325 µl C'den	325	500
F	325 µl E'den	325	250
G	325 µl F'den	325	125
H	100 µl G'den	400	25
I	0	400	0

Tecan i-control (Infinite 200 Pro) cihazında ölçüm yapılmıştır. Standart eğri ve denklemi Excel ile çizdirilerek protein konsantrasyonu hesaplanmıştır.

4.1.5. SDS-PAGE

TNF-alfa proteininin saflaştırma basamakları SDS-PAGE ile gösterilmiştir. %12 ayırma jeli ve %5 yığılma jeli ile poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Bunun için Çizelge 4.5.'te belirtilen miktarlarda akrilamid (Serva, 10675.02), bisakrilamid (Applichem), SDS (sodium dodecyl sulfate, Fisher Scientific, BP166-500), APS (ammonium persulphate ultrapure, Gerbu, 1708), TEMED (Scharlau, TE0050) ve Tris (TrizmaBase, Sigma, T6066-1KG) kullanılmıştır. Ayırma jeli camlar arasına döküldükten sonra isopropanol (2-propanol, Sigma-Aldrich, 24137) ile jel yüzeyi kapatılarak jelin polimerizasyonu beklenmiştir.

Çizelge 4.5. %12'lik poliakrilamid jel hazırlanmasında kullanılan malzemeler ve miktarları

Jel Yüzdesi (Tek jel için)	%12'lik Ayırma Jeli	%5'lik Yığılma Jeli
%30 Akrilamid/Bisakrilamid	4 ml	657 µl
ddH ₂ O	3,3 ml	2,76 ml
%10 SDS	100 µl	39 µl
%10 APS	100 µl	39 µl
TEMED	10 µl	4 µl
1.5 M Tris pH. 8,8	2,53 ml	
1.5 M Tris pH. 6,8		500 µl

%30 Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi için 50 ml ddH₂O'ya 14,4 g akrilamid ve 0,4 g bisakrilamid eklenmiştir. %10 APS taze hazırlanmıştır. 60 mg amonyum persülfat tartılarak 600 µl ddH₂O içerisinde çözündürülmüştür. %10 SDS için, 5 g SDS 50 ml ddH₂O içerisinde çözündürülmüştür. 1.5 M Tris pH.8,8 için 7,26 g Tris baz 30 ml ddH₂O içerisinde çözündürölüp pH. 8,8'e HCl ile ayarlanarak 40 ml'ye ddH₂O ile tamamlanmıştır. 1.5 M Tris pH.6,8 için 7,26 g Tris baz 30 ml ddH₂O içerisinde çözündürölüp pH. 6,8'e HCl ile ayarlanarak 40 ml'ye ddH₂O ile tamamlanmıştır. Jellerin hazırlanışında Bio-rad marka camlar ve tarak kullanılmıştır.

Örnekler 4X Laemmli Tamponu ile karıştırılarak ve heat-block (MS Major Science Dry Bath Incubator) içerisinde kaynatılarak kuyulara yüklenmiştir. Laemmli Tamponu; Tris (Trizma base, Sigma, T6066-1KG), Gliserol (amresco, 0854-1L), SDS (sodium dodecyl sulfate, Fisher Scientific, BP166-500) ve Bromofenol mavisi (Fisher Scientific, BP115-25) ile hazırlanmıştır. Beta-merkaptan etanol (2-mercaptoethanol, Merck, S64744440 306) 1 ml Laemmli Buffer içerisine 10 µl eklenerek kullanılmıştır.

Çizelge 4.6. 4X Laemmli Tamponu hazırlanmasında kullanılan materyaller ve miktarları

Materyaller	Miktar (Toplam 10 ml için)
1 M Tris-HCl pH. 6,8	3,15 ml
Gliserol	3 ml
%20 SDS	2,5 ml
%1 Bromofenol Mavisi	25 µl
ddH ₂ O	1,3 ml
2-Merkaptoetanol	50 µl

%20 SDS için, 20 g SDS 100 ml suda 68°C'de çözündürülmüştür. %1 Bromofenol mavisi hazırlanması için 22 mg bromofenol mavisi 1 ml su içerisinde çözündürülmüştür. Beta-merkaptoetanol kullanım sırasında eklenmiştir.

Örnekler kuyulara yüklendikten sonra 1X Yükleme Tamponu içerisinde Bio-rad Mini-Protean Tetra System tankı içerisinde, Bio-rad Power pac 3000 elektroforez cihazı ile yürütülmüştür. Protein markerı olarak Bio-rad Precision Plus Protein Standards (161-0373) kullanılmıştır.

5X Yürütme Tamponu hazırlamasında 15 g Tris-baz, 72 g Glisin (Glisin Extra Pure, Tekkim, TK.9301.35.01002) ve 5 g SDS kullanılmış, HCl ile pH.8,3'e ayarlanmış ve 1 litreye ddH₂O ile tamamlanmıştır. 1X Yürütme Tamponu için 100 ml 5X Yürütme Tamponu 400 ml ddH₂O ile hazırlanmıştır.

Yürütme sonrası Fix Tamponu %20 izopropanol (Sigma-Aldrich, 4137) ve %10 asetik asit (Sigma-Aldrich, 75-.5L-R) ile hazırlanmıştır. Coomassie mavisi; 3 g/L coomassie brilliant blue R-250 (Bio-rad, 161-0400), %45 metanol (Merck, 1.06009.2511), %10 glasiyel asetik asit ve %45 dH₂O olacak şekilde hazırlanmıştır. Destain için %10 Asetik asit, 100 ml asetik asit (Sigma-Aldrich, 75-.5L-R) 900 ml ddH₂O ile hazırlanmıştır.

Jelin görüntülenmesinde Bio-rad Versa-doc görüntüleme cihazı kullanılmıştır. Coomassie mavisi sekmesi seçilerek 0.4 s exposure time ile görüntüleme yapılmıştır.

4.1.6. İMMÜNİZASYON

Farelerin karnında ascite sıvısı oluşturmak ve bu sıvıdan poliklonal antikor toplamak için 2 adet fareye immünizasyon yapılmıştır (42).

İmmünizasyon için iki adet 10 haftalık dişi Balb/C fare kullanılmıştır. İmmünizasyon aşamasında CFA (Freund's Adjuvant, Complete, Sigma, F5881-10ML) ve IFA (Freund's Adjuvant, Incomplete, Sigma, F5506) adjuvanları kullanılmıştır.

4.1.7. İNDİREKT ELISA İLE ANTİKOR TİTRASYONU

İndirekt ELISA yöntemi için 96-kuyulu ELISA plate kullanılmıştır.

10X PBS (Phosphate-Buffered Saline) hazırlanması için; 80 g NaCl (Sodium chloride, Merck, K49432804.743), 2 g KCl (potassium chloride, Sigma, P9541), 14.4 g Na₂HPO₄ (sodium phosphate dibasic anhydrous, Fisher Scientific, BP332-500) ve 2.4 g KH₂PO₄ (potassium phosphate monobasic anhydrous, Bioshop, PPM666.500) 1 L ddH₂O içerisinde hazırlanmış ve HCl ile pH 7,4 olarak ayarlanmıştır. 1X PBS için; 100 ml 10X PBS çözeltisi, 900 ml ddH₂O içerisinde hazırlanarak kullanılmıştır.

PBS-T, 500 µl Tween-20 (amresco, 0777-1L) 500 ml 1X PBS içerisinde hazırlanmıştır.

%5 BSA içeren PBS hazırlanması için; 0,5 gram Bovin Serum Albumin (Sigma, A2153-1006) 10 ml 1X PBS içerisinde çözdürülmüştür.

Ascite sıvısı ve kuyruk kanından alınan poliklonal antikorum dilüsyonları 1X PBS içerisinde, Çizelge 4.7.'de belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

Çizelge 4.7. Primer antikorun hazırlanan dilüsyonları

Standart	Dilüsyon Katsayısı	Antikor	1X PBS Miktarı
A	1:1000	2 µl antikor	2000 µl
B	1:3125	192 µl A'dan	408 µl
C	1:6250	300 µl B'den	300 µl
D	1:12500	300 µl C'den	300 µl
E	1:25000	300 µl D'den	300 µl
F	1:50000	300 µl E'den	300 µl
G	1:100000	300 µl F'den	300 µl
H	1:250000	240 µl G'den	360 µl

Sekonder antikor olarak Anti-mouse HRP-linked IgG antikor (Cell Signaling Technology, 7076S) kullanılmıştır. HRP substratı olarak TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) (TMB/E Solution, Merck, E5001-500ML) kullanılmıştır. Reaksiyonu durdurmak için; H₂SO₄ çözeltisi, 5,5 ml Sülfürik Asit (%98, Tekkim) 44,5 ml ddH₂O üzerine yavaşça eklenerek hazırlanmıştır. OD değerlerinin ölçümü için Tecan i-control (Infinite 200 Pro) cihazında ölçüm gerçekleştirilmiştir.

4.1.8. WESTERN BLOTLAMA

Proteinler SDS-PAGE ile yürütülmüştür. Bunun için öncelikle %15 ayırma jeli ve %5 yığılma jeli hazırlanmıştır. Çizelgede belirtilen miktarlarda akrilamid (Serva, 10675.02), bisakrilamid (Applichem), SDS (sodium dodecyl sulfate, Fisher Scientific, BP166-500), APS (ammonium persulphate ultrapure, Gerbu, 1708), TEMED (Scharlau, TE0050) ve Tris (Trizma base, Sigma, T6066-1KG) kullanılmıştır. Ayırma jeli camlar arasına döküldükten sonra isopropanol (2-propanol, Sigma-Aldrich, 24137) ile jel yüzeyi kapatılarak jelin polimerizasyonu beklenmiştir.

Çizelge 4.8. %15'lik poliakrilamid jel hazırlanmasında kullanılan malzemeler ve miktarları

Jel Yüzdesi (Tek jel için)	%15'lik Ayırma Jeli	%5'lik Yığılma Jeli
%30 Akrilamid/Bisakrilamid	4,5 ml	657 µl
ddH ₂ O	2,1 ml	2,76 ml
%10 SDS	90 µl	39 µl
%10 APS	20 µl	39 µl
TEMED	9 µl	4 µl
1.5 M Tris pH. 8,8	2,25 ml	
1.5 M Tris pH. 6,8		500 µl

%30 Akrilamid/Bisakrilamid çözeltisi için 50 ml ddH₂O'ya 14,4 g akrilamid ve 0,4 g bisakrilamid eklenmiştir. %10 APS taze hazırlanmıştır. 60 mg amonyum persülfat tartılarak 600 µl ddH₂O içerisinde çözündürülmüştür. %10 SDS için, 5 g SDS 50 ml ddH₂O içerisinde çözündürülmüştür. 1.5 M Tris pH.8,8 için 7,26 g Tris baz 30 ml ddH₂O içerisinde çözündürülüp pH. 8,8'e HCl ile ayarlanarak 40 ml'ye ddH₂O ile tamamlanmıştır. 1.5 M Tris pH.6,8 için 7,26 g Tris baz 30 ml ddH₂O içerisinde çözündürülüp pH. 6,8'e HCl ile ayarlanarak 40 ml'ye ddH₂O ile tamamlanmıştır. Jellerin hazırlanışında Bio-rad marka camlar ve tarak kullanılmıştır.

4X Laemmli Tamponu çizelgedeki gibi hazırlanmıştır. Bunun için; Tris (Trizma base, Sigma, T6066-1KG), Gliserol (amresco, 0854-1L), SDS (sodium dodecyl sulfate, Fisher Scientific, BP166-500) ve Bromofenol mavisi (Fisher Scientific, BP115-25) kullanılmıştır. Beta-merkapt etanol (2-mercaptoethanol, Merck, S64744440 306) 1 ml Laemmli Buffer içerisine 10 µl eklenerek kullanılmıştır. Örnekler 4X Laemmli Tamponu ile karıştırılarak ve heat-block (MS Major Science Dry Bath Incubator) içerisinde kaynatılarak kuyulara yüklenmiştir. Örnekler kuyulara yüklendikten sonra 1X Yükleme Tamponu içerisinde Bio-rad Mini-Protean Tetra System tankı içerisinde, Bio-rad Power pac 3000 elektroforez cihazı ile yürütülmüştür. Protein markerı olarak Bio-rad Precision Plus Protein Standards (161-0373) kullanılmıştır.

5X Yürütme Tamponu hazırlamasında 15 g Tris-baz, 72 g Glisin (Glisin Extra Pure, Tekkim, TK.9301.35.01002) ve 5 g SDS kullanılmış, HCl ile pH.8,3'e ayarlanmış ve 1 litreye ddH₂O ile tamamlanmıştır. 1X Yürütme Tamponu için 100 ml 5X Yürütme Tamponu 400 ml ddH₂O ile hazırlanmıştır.

Semi-dry transfer için PVDF membran (Bio-rad, 1620177) kullanılmıştır. 10X Transfer Buffer; 500 ml için 29 g Tris-baz (TrizmaBase, Sigma, T6066-1KG) ve 14,65 g Glisin (Glisin Extra Pure, Tekkim, TK.9301.35.01002) ile hazırlanmıştır. 1X Transfer Buffer, 50 ml 10X Transfer Buffer ve 450 ml ddH₂O ile hazırlanmıştır. Semi-dry transfer için 120 ml 1X Transfer Buffer, 30 ml metanol (Merck, 1.06009.2511) ile hazırlanarak kullanılmıştır. Semi-dry transfer, Amersham Biosciences (SN:1189383) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

10X TBS (Tris Buffered Saline) hazırlanması için; 24,23 g Tris-baz ve 87,06 g NaCl (Sodium chloride, Merck, 1.06404.1000) pH. 7,6'ya ayarlanarak 1 litre ddH₂O'ya tamamlanmıştır. 1X TBS-T 100 ml 10X TBS, 900 ml ddH₂O ve 1 ml Tween-20 (amresco, 0777-1L) ile hazırlanmıştır.

%5 BSA içeren membran bloklama tamponu için; 2 gram Bovin Serum Albumin (Sigma, A2153-1006) 40 ml 1X TBST içerisinde çözündürülmüştür.

Sekonder antikor olarak Anti-mouse HRP-linked IgG antikor (Cell Signaling Technology, 7076S) kullanılmıştır.

Membranın görüntülenmesinde SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, 34087) kiti kullanılmıştır. Li-Cor cihazında 2 dk görüntüleme yapılmıştır.

4.2. YÖNTEM

Bu çalışmanın amacı poliklonal TNF-alfa antikorı üretilmesidir. Bunun için öncelikle rekombinant TNF-alfa proteini üretilmiş (76) ve BALB/C fareye immünizasyonu sonrası ascite sıvısından toplanan antikorun karakterizasyonu yapılmıştır (42).

4.2.1. REKOMBİNANT TNF-ALFA PROTEİNİ ÜRETİLMESİ

Rekombinant TNF-alfa proteininin üretilmesi için içerisinde matür TNF-alfa proteinini bulunduran pET-sumo-TNF vektörü kullanıldı (76). BL21 hücreleri içerisindeki bu vektör çoğaltılarak protein indüksiyonu sağlandı. Daha sonra ise nikel kolondan geçirilerek saflaştırılması sağlandı.

4.2.1.1. IPTG ile Protein İndüklenmesi

İçerisinde pET-sumo-TNF vektörünü bulunduran BL21 hücreleri, IPTG ile protein indüksiyonu aşaması için aktiveleştirildi (76). Gliserol stok içerisindeki hücrelerden 100 µl, 2 µl 250 µg/ml (içerisinde 50 µg/ml olacak şekilde) kanamisin bulunduran 10 ml'lik LB Broth içerisine aktarılıp gece boyu 180 rpm'de 37°C inkübatörde bırakıldı. LB sıvı besiyeri, 2 gram LB Broth, 100 ml ddH₂O içerisinde çözündürülüp otoklavlanarak hazırlandı.

IPTG ile protein indüksiyonu için aktiveleştirilen kültürün hacmi 1 L'lik balon jöjeye aktarıldı. 50 ml LB sıvı besiyeri içerisine 10 µl 250 µg/ml kanamisinden (kültür içerisinde 50 µg/ml olacak şekilde) ve 1 ml aktiveleştirilmiş olan kültürden eklenerek 37°C inkübatörde 150 rpm'de hücrelerin büyümesi beklendi. 4,5-5 saat sonunda çizelgede belirtilen şekilde hazırlanmış olan indüksiyon besiyeri 1:1 olacak şekilde balon jöje içerisindeki kültüre eklendi. Kültür, 150 rpm'de 37 °C inkübatörde çalkalanmaya bırakıldı. 6 saat sonunda, kültür 50 ml'lik falkon tüpe alınarak 5 dakika 9000 g'de santrifüj edildi. Santifüj sonunda oluşan pellet hacmi ölçülerek protein izolasyonu aşaması için kullanılmak üzere -20°C'lik dolapta saklandı (76).

4.2.1.2. Total Protein İzolasyonu

Pellet hacmi 700 mg olarak ölçülmüştür. Bunun için toplam hacim 900 µl olacak şekilde, TNF-alfa protein izolasyonu için Tris-HCL, Triton-X-100 ve ddH₂O çizelgede belirtilen miktarlarda çözündürülen pellet üzerine eklendi ve pipetaj yapılarak homojenize edildi. En

son belirtilen miktarlarda PMSF ve lizozim eklenerek 35 dakika buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 40 amplitude'da 15 dakika boyunca buz üzerinde sonikasyon yapıldı. 2 ml'lik eppendorf tüplere alınıp 13300 g'de 20 dakika 4°C'de santrifüj edilerek süpernatant yeni tüplere alındı.

1 M Tris-HCl, 100 ml ddH₂O içerisinde 12,11 gram Tris-baz ile hazırlanarak pH. 8.0'a HCl ile ayarlandı. %10 Triton-X-100, 45 ml ddH₂O içerisinde 5 ml çözündürülerek hazırlandı. 100 mM PMSF, 0.174 g 10 ml isopropanol içerisinde çözündürülerek hazırlandı.

4.2.1.3. Rekombinant Proteinin Saflaştırılması

TNF-sumo proteininin His-tag'den ayrılarak saflaştırılması için nikel kolodan geçirildi. Öncelikle kolonun hazırlanması için 700 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Rezin yatağının iki katı kadar yaklaşık 6 ml Equilibration Buffer eklendi. 700 g'de 2 dakika santrifüj sonrası 1 ml total protein 3 ml Equilibration Buffer ile karıştırılarak kolona eklendi. 45 dakika oda sıcaklığında döndürüldükten sonra santrifüj edilerek flow-through yeni tüpe ayrıldı. 6 ml Wash Buffer resin üzerine eklenip santrifüj edildi. Alt tüpe toplanan sıvı yeni tüpe ayrıldı. Yıkama basamağı tekrarlandı. 3 ml Elution Buffer resin üzerine eklenip santrifüj edildi. Altta toplanan sıvı yeni tüpe ayrıldı. Elüsyon basamağı iki kez daha tekrarlandı.

Elüsyon 2 ve 3. basamaklarında toplanan sıvı diyaliz membranında 1X PBS içerisinde gece boyu döndürüldü.

4.2.1.4. BCA ile Protein Tayini

Protein konsantrasyonu BCA (Bikinkoninik asit tahlili) ile hesaplandı. Protein standart eğrisi için çizelgede belirtilen şekilde farklı konsantrasyonlarda BSA çözeltileri ayrı tüplere hazırlandı. BCA Protein Assay Kit içerisindeki Reagent A'dan 3920 µl, Reagent B'den 80 µl ile 50:1 oranında karıştırıldı. 96-well plate'te 20 kuyuya kuyu başına 200 µl bu karışımdan eklendi. Kuyular üzerine 20 µl hazırlanan standartlardan ikişer tekrarlı olacak şekilde eklendi. İkişer kuyuya saflaştırılmış proteinden 20 µl eklendi. Plate yarım saat 37°C'de inkübe edildikten sonra 562 nm absorbansta ölçüm yapıldı.

Ölçüm sonrası standartların OD değerleri ve konsantrasyonları ile Excel'de standart eğri grafiği çizdirilmiş ve grafik denklemi oluşturuldu. Denklemden gösterilen x ve y değerleri

(protein-kesme noktası)/eğim formülü ile protein konsantrasyonunun hesaplanması için kullanıldı.

4.2.1.5. SDS-PAGE

Proteinin saflaştırma basamakları poliakrilamid jelde görüntülenmek üzere SDS-PAGE yapıldı. Kullanılan %12'lik ayırma jeli ve %5'lik yığılma jeli çizelgede belirtilen materyal ve miktarları ile hazırlandı. 1 mm ince cam ve 1.5 mm kalın camlar arasına %12'lik ayırma jeli (alt jel) döküldü ve üzeri 1 ml isopropanol ile kapatıldı. Jel polimerize olduğunda isopropanol uzaklaştırıldı ve üst jel (yığılma jeli) polimerize olmuş alt jel üzerine eklendi. 1.5 mm 15 kuyulu tarak ile üst jel kapatılıp polimerizasyonu sağlandı.

Örnekler çizelgede belirtilen şekilde hazırlanmış olan 4X Laemmli Tamponu içerisinde 4:1 olacak şekilde hazırlanıp 95°C'de 5 dakika dry-block içerisinde kaynatıldı. Saflaştırma basamakları sırasıyla kuyulara yüklendi. Marker ve total protein örnekleri 3 µl, diğer örnekler 15 µl olacak şekilde kuyulara yüklendi. Önce 80 V'da 1 saat, daha sonra 100 V'da 1X Yürütme Tamponu içerisinde yürütüldü.

Yürütme sonrası jel camlar arasından çıkarılarak Fix Tamponu içerisinde 45 dakika çalkalanmaya bırakıldı. Fiksasyon sonrasında Coomassie mavisi içeren tampon içerisinde gece boyu çalkalanmaya bırakıldı. Boyama sonrası destain edilmesi için, %10 Asetik asit içerisinde her biri 30 dakika olacak şekilde 3'er kez çalkalanmaya bırakıldı. Destain sonrası Versa-doc cihazında 0,4 saniye süre ile görüntüleme yapıldı.

4.2.2. İMMÜNİZASYON

Her iki fare karnında ascite sıvısı oluşturulması için immünizasyon protokolü oluşturuldu (42).

Birinci immünizasyon için; her fare için 16,5 µg protein olacak şekilde; toplamda 66 µl protein 85°C'de 15 dakika bekletilerek ısı inaktivasyonu yapıldı. 1:1 oranı olacak şekilde toplamda 66 µl CFA (Freund's Adjuvant Complete) ile karıştırıldı. Vorteksenerek enjektör yardımı ile iki adet Balb/C dişi fareye intraperitoneal enjeksiyon yapıldı.

İkinci immünizasyon 15 gün sonra yapıldı. Her fareye 25 µg protein olacak şekilde, her fareye 50 µl TNF-alfa proteini 85°C'de 10 dakika bekletilerek ısı aktivasyonu yapıldıktan

sonra 1:5 oranı olacak şekilde 250 µl CFA ile karıştırılıp vortekslendi. Her hayvana toplam 300 µl intraperitoneal enjeksiyon yapıldı.

İlk immünizasyondan 30 gün sonra üçüncü immünizasyon gerçekleştirildi. Her bir fareye 30 µg protein olacak şekilde her hayvan için 60 µl protein, 85°C’de 10 dakika bekletilerek ısı aktivasyonu yapıldıktan sonra, 300 µl CFA ile karıştırılarak (1:6 oranında) intraperitoneal enjeksiyon yapıldı.

40 gün sonunda tek farenin karın bölgesinde şişme gözlemlendi. Sağ kulağı kesilen farenin ascite sıvısı yaklaşık 300 µl kadar enjektör yardımı ile toplandı. 10000 g’de 5 dakika santrifüj edilerek antikor bulunduran sıvı ayrı tüpe alınarak yağ tabakasından ayrılması sağlandı. İndirekt ELISA ile antikor titrasyonu yapılmak üzere -20°C’lik dolapta saklandı.

İlk immünizasyondan 45 gün sonra dördüncü immünizasyon gerçekleştirildi. Her bir fareye 20 µg protein olacak şekilde, her fare için 40 µl protein 85°C’de ısı bloğu içerisinde 10 dakika bekletilerek ısı aktivasyonu yapıldıktan sonra, 300 µl IFA (Freund’s Adjuvant Incomplete) ile karıştırılarak yaklaşık 1:9 oranı olacak şekilde intraperitoneal enjeksiyon yapıldı.

47 günün sonunda sağ kulağı ve sol kulağı kesilmiş her iki farenin kuyruğundan yaklaşık 250 µl kan alındı. 10000 g’de 5 dakika santrifüj yapılarak serum ayrı tüplere aktarıldı. İndirekt ELISA ile antikor titrasyonu yapılmak üzere -20°C’lik dolapta saklandı.

4.2.3. ASCİTE SIVISINDAN ANTİKOR TİTRASYONU

Tek hayvandan toplanmış olan ascite sıvısından antikor titrasyonu indirekt ELISA yöntemi ile yapıldı.

96-well ELISA plate’in 2 tekrarlı 9 antikor dilüsyonu için toplamda 18 kuyu rekombinant TNF-alfa proteini ile kaplandı. Bunun için, konsantrasyonu 503 µg/ml olan proteinden 60 µl, 2940 µl 1X PBS ile karıştırılarak 10 µg/ml protein hazırlandı. 10 µg/ml TNF-alfa proteininden 18 kuyuya 100 µl dağıtıldı. 1 gece boyu +4’te bekletildi. Ertesi gün, PBS-T ile 3 kez peçete üzerine vurularak yıkama yapıldı. %5 BSA’lı PBS içerisinde, her kuyuda 200 µl olacak şekilde 1 saat 37 °C’de, yarım saat oda sıcaklığında bloklama yapıldı.

Primer antikorun uygun dilüsyonları PBS içerisinde, çizelgedeki gibi hazırlanarak 2'şer tekrarlı 100'er µl kuyulara dağıtıldı. Blank için 1X PBS iki kuyuya 100 µl olacak şekilde eklendi. Oda sıcaklığında 3 saat çalkalanmaya bırakıldı. PBS-T ile üç kez peçeteye vurularak yıkama yapıldı.

Sekonder antikor için; anti-mouse HRP-işaretli IgG antikor 1/2000 oranında seyreltilerek kullanıldı. 1 µl antikor 2 ml PBS içerisinde hazırlandı. Her kuyuya 100 µl olacak şekilde dağıtıldı. Oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1,5 saat bekletildi. PBS-T ile 5 kez peçeteye vurularak yıkama yapıldıktan sonra HRP-substratı TMB'den 100 ul kuyulara eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için 50 µl 2 M H₂SO₄ çözeltisinden kuyulara dağıtıldı. 450 nm absorbansta ölçüm gerçekleştirildi.

Ascite sıvısı poliklonal antikor olarak kullanıldığında etkin olduğu protein konsantrasyonunu aralığını belirlemek amacıyla TNF alfa protein dilüsyonları standartları oluşturuldu. Konsantrasyonlar PBS içerisinde ve seri dilüsyonlar ile hazırlandı.

Kuyucuk başına 200 ng/ml ve 3 pg/ml aralığında konsantrasyonlar iki tekrarlı olarak protein kaplanırken kullanıldı. Blank olarak aynı miktarda PBS iki kuyucuğa eklendi. 1 gece boyunca +4'te bekletildi. Ertesi gün, PBS-T ile 3 kez peçete üzerine vurularak yıkama yapıldı. %5 BSA'lı PBS içerisinde, her kuyuda 200 µl olacak şekilde 1 saat 37 °C'de, yarım saat oda sıcaklığında bloklama yapıldı. Ascite sıvısı primer antikor olarak 1:5000 oranında PBS içerisinde seyreltilerek kullanıldı. Sekonder antikor için; anti-mouse HRP-işaretli IgG antikor 1/2000 oranında seyreltilerek kullanıldı. 1 µl antikor 2 ml PBS içerisinde hazırlandı. Her kuyuya 100 µl olacak şekilde dağıtıldı. Oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1,5 saat bekletildi. PBS-T ile 3 kez peçeteye vurularak yıkama yapıldıktan sonra HRP-substratı TMB'den 100 ul kuyulara eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için 50 µl 2 M H₂SO₄ çözeltisinden kuyulara dağıtıldı. 450 nm absorbansta ölçüm gerçekleştirildi.

4.2.4. KUYRUK KANINDAN ANTİKOR TİTRASYONU

İki fareden de alınmış olan serumdan antikor titrasyonu indirekt ELISA yöntemi ile gerçekleştirildi.

96-well ELISA plate'in 2 tekrarlı 2 serum antikor dilüsyonu için toplamda 36 kuyu rekombinant TNF-alfa proteini ile kaplandı. Bunun için, konsantrasyonu 503 µg/ml olan proteinden 80 µl, 3920 µl 1X PBS ile karıştırılarak 10 µg/ml protein hazırlandı. 10 µg/ml TNF-alfa proteininden 36 kuyuya 100 µl dağıtıldı. 1 gece boyunca +4°C'de bekletildi. PBS-T ile 3 kez peçete üzerine vurularak yıkama yapıldı. %5 BSA'lı PBS içerisinde, her kuyuda 200 µl olacak şekilde 1 saat 37 °C'de, yarım saat oda sıcaklığında bloklama yapıldı. Sağ kulağı ve sol kulağı kesilmiş iki hayvandan alınan serumlar primer antikor olarak kullanıldı. Dilüsyonlar PBS içerisinde çizelgedeki gibi hazırlanarak 2'şer tekrarlı 100'er µl kuyulara dağıtıldı. İlk iki sıraya sağ kulağı kesilmiş fareden alınan antikor, üçüncü ve dördüncü sıraya ise sol kulağı kesilmiş fareden alınan antikor konuldu. Blank için 1X PBS dört kuyuya 100 µl olacak şekilde eklendi. Oda sıcaklığında 3 saat çalkalanmaya bırakıldı.

PBS-T ile üç kez peçete üzerine vurularak yıkama yapıldı. Sekonder antikor için; anti-mouse HRP-işaretli IgG antikor 1/2000 oranında seyreltilerek kullanıldı. 2 µl antikor 4 ml PBS içerisinde hazırlandı. Her kuyuya 100 µl olacak şekilde dağıtıldı. Oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1,5 saat bekletildi. PBS-T ile 5 kez peçeteye vurularak yıkama yapıldıktan sonra HRP substratı TMB'den 100 µl kuyulara eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildi.

Reaksiyonu durdurmak için 50 µl 2 M H₂SO₄ çözeltisinden kuyulara dağıtıldı. 450 nm absorbansta ölçüm yapıldı.

4.2.5. WESTERN BLOTLAMA

Hayvandan alınan assit sıvısında bulunan poliklonal antikorun rekombinant proteini tanıyıp tanımadığı Western Blot tekniğiyle gösterildi. Öncelikle proteinler jele yüklenerek SDS-PAGE yapılarak jelin membrana transferi sağlandı. Antikor uygulanması aşamasında primer antikor olarak üretilen poliklonal antikor kullanıldı.

4.2.5.1. SDS-PAGE

Rekombinant protein 10 µl ve 4 µl (5 µg ve 2 µg) olacak şekilde poliakrilamid jele yüklenerek primer antikorun aktivitesi tespit edildi. Poliakrilamid jelin hazırlanması için kullanılan %15'lik ayırma jeli ve %5'lik yığılma jeli reaktifleri çizelgede belirtilen miktarlar ile hazırlandı. 1 mm ince cam ve 1.5 mm kalın camlar arasına %15'lik ayırma jeli (alt jel) döküldü ve üzeri 1 ml isopropanol ile kapatıldı. Jel polimerize olduğunda isopropanol uzaklaştırıldı ve üst jel (yığılma jeli) polimerize olmuş alt jel üzerine eklendi. 1.5 mm 15 kuyulu tarak ile üst jel kapatılıp polimerizasyonu sağlandı.

Örnekler çizelgede belirtilen şekilde hazırlanmış olan 4X Laemmli Tamponu içerisinde 4:1 olacak şekilde hazırlanıp 95°C'de 5 dakika kuru-blok içerisinde kaynatıldı. Marker 3 µl, rekombinant TNF-alfa proteini 10 µl ve 4 µl olacak şekilde kuyulara yüklendi. Önce 70 V'da 1 saat, daha sonra 90 V'da 1X Yürütme Tamponu içerisinde yürütüldü.

4.2.5.2. Semi-dry Transfer

Proteinler poliakrilamid jelde yürütüldükten sonra PVDF membrana transferi semi-dry transfer yöntemi ile sağlandı.

PVDF membran 9 cm x 6 cm boyutlarında kesilerek 1 dakika metanol içerisinde bekletildi. Watman kağıtları, jel ve membran 1X Transfer Tamponu içerisinde ıslatılarak eksiden artıya (yukarıdan aşağıya) sırası ile kağıt, jel, membran, kağıt olacak şekilde sistem üzerine yerleştirildi. Transfer cihazı üzerine 2 kg'lık ağırlık konularak 1,5 saat transfer gerçekleştirildi.

4.2.5.3. Bloklama

PVDF membran transfer sonrası sistemden dikkatlice çıkarıldı ve protein yüzü belli olması için sağ üst köşesi kesildi.

Membrana, spesifik olmayan bağlanmaları önlemek için primer antikor öncesi, %5 BSA'lı TBS-T içerisinde 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bekletildi.

4.2.5.4. Primer Antikor Uygulaması

Bloklama aşamasından sonra, ascite sıvısı TNF alfa poliklonal antikorunu primer antikor olarak kullanıldı. 1:3000 oranında antikor PBS içerisinde hazırlandı. Kontrol olarak, TNF-alfa monoklonal ticari antikorunu kullanıldı ve aynı şekilde hazırlandı. Membran, primer antikor içerisinde +4'te gece boyu döndürüldü.

4.2.5.5. Sekonder Antikor Uygulaması

TBS-T ile 3 kez 10 dakika oda sıcaklığında membran çalkalandı. Anti-mouse-HRP-işaretli IgG sekonder antikor olarak kullanıldı. Sekonder antikor 1:2000 oranında bloklama tamponu (%5 BSA'lı TBS-T) içerisinde hazırlandı. Membran 1,5 saat oda sıcaklığında döndürüldü. TBS-T ile 10 dakika 3'er kez yıkama yapıldı.

4.2.5.6. Western Blot Görüntüleme

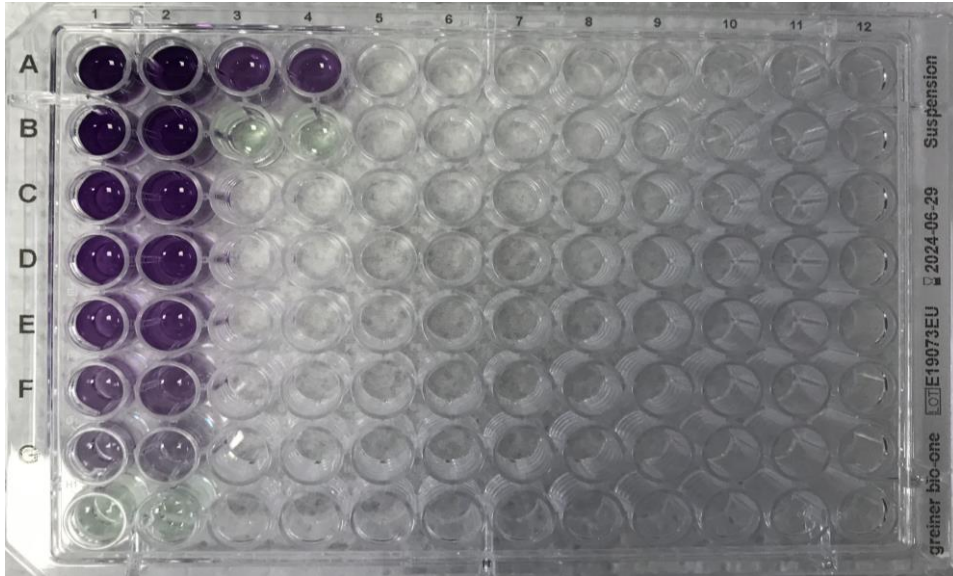
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kiti içerisindeki luminol ve peroksit içeren çözeltiler 100'er µl (1:1 oranında) karıştırıldı. Görüntü tepsisine damlacıklar halinde dağıtıldı ve membranın her iki tarafı ıslatılarak görüntü alındı.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. REKOMBİNANT TNF-ALFA PROTEİNİ ÜRETİLMESİ

Rekombinant protein ekspresyonu pet-sumo-TNF vektörü ile sağlanmıştır. Bu vektörü içerisinde bulunduran *E.Coli* BL21 suşunun IPTG ile protein indüksiyonu sağlanarak protein ekspresyonu lizozim ve sonikasyon ile gerçekleştirilmiştir. Total protein Ni-NTA kolon ile saflaştırılmıştır. Son olarak 1X PBS'e karşı diyalizi yapılan rekombinant TNF proteininin BCA protein tayini ile konsantrasyonu hesaplanmıştır.

5.1.1. BCA PROTEİN TAYİNİ SONUÇLARI



Şekil 5.1. BCA protein tayini sonucu plate görünümü

A1-2: Standart A, B1-2 Standart B, C1-2: Standart C, D1-2: Standart D, E1-2: Standart E, F1-2: Standart F, A3-4: Saflaştırılmış Protein, B3-4: Blank olacak şekilde kuyulara yükleme yapılmıştır.

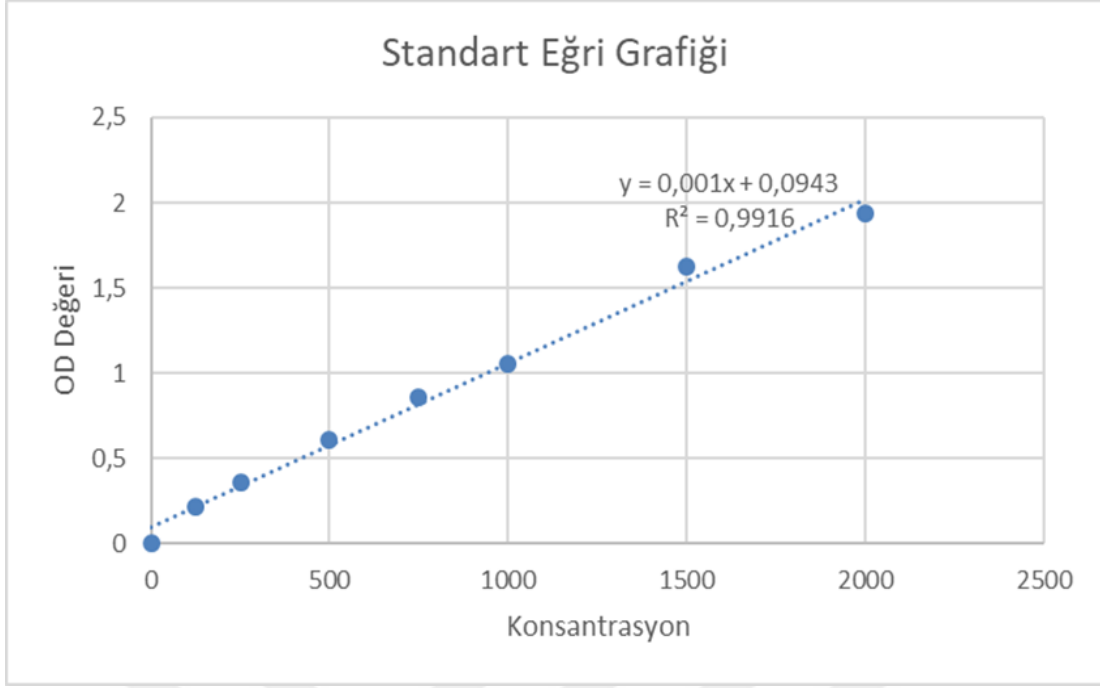
Çizelge 5.1. BCA protein tayini sonucu OD değerleri

<>	1	2	3	4
A	2,0927	1,9575	0,732	0,6438
B	1,8104	1,6199	0,0998	0,0754
C	1,2044	1,0776		
D	0,9695	0,927		
E	0,7069	0,6931		
F	0,4547	0,448		
G	0,3219	0,2943		
H	0,092	0,0881		

Çizelge 5.2. BCA tayini ile oluşturulan standartların konsantrasyonları ve OD değerleri

Standart	Konsantrasyon	Standart	OD	değerleri	Standard	OD	Değerleri
2000		2,0250			1,9350		
1500		1,7151			1,6251		
1000		1,1409			1,0509		
750		0,9482			0,8582		
500		0,6999			0,6099		
250		0,4513			0,3613		
125		0,3081			0,2180		
0		0,090			0		

Standartların konsantrasyonları ve ölçülen OD değerleri ile Excel’de standart eğri grafiği çizdirilmiştir. Bu eğriye göre oluşturulan eğri denklemi ile rekombinant proteinin hangi konsantrasyonda olduğu hesaplanmıştır.



Şekil 5.2. BCA standart konsantrasyonlarının ve OD değerlerinin standart eğri grafiği

Protein konsantrasyonunun standart eğri grafiğinde oluşturulan denklem ile hesaplanması çizelgede gösterildiği gibidir. Protein OD değeri kesme noktası değerinden çıkarılıp eğim değerine bölünmüştür. Bu formül ile protein konsantrasyonu 503,55 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 5.3. Protein konsantrasyonunun standart eğrinin grafik denklemi ile hesaplanması

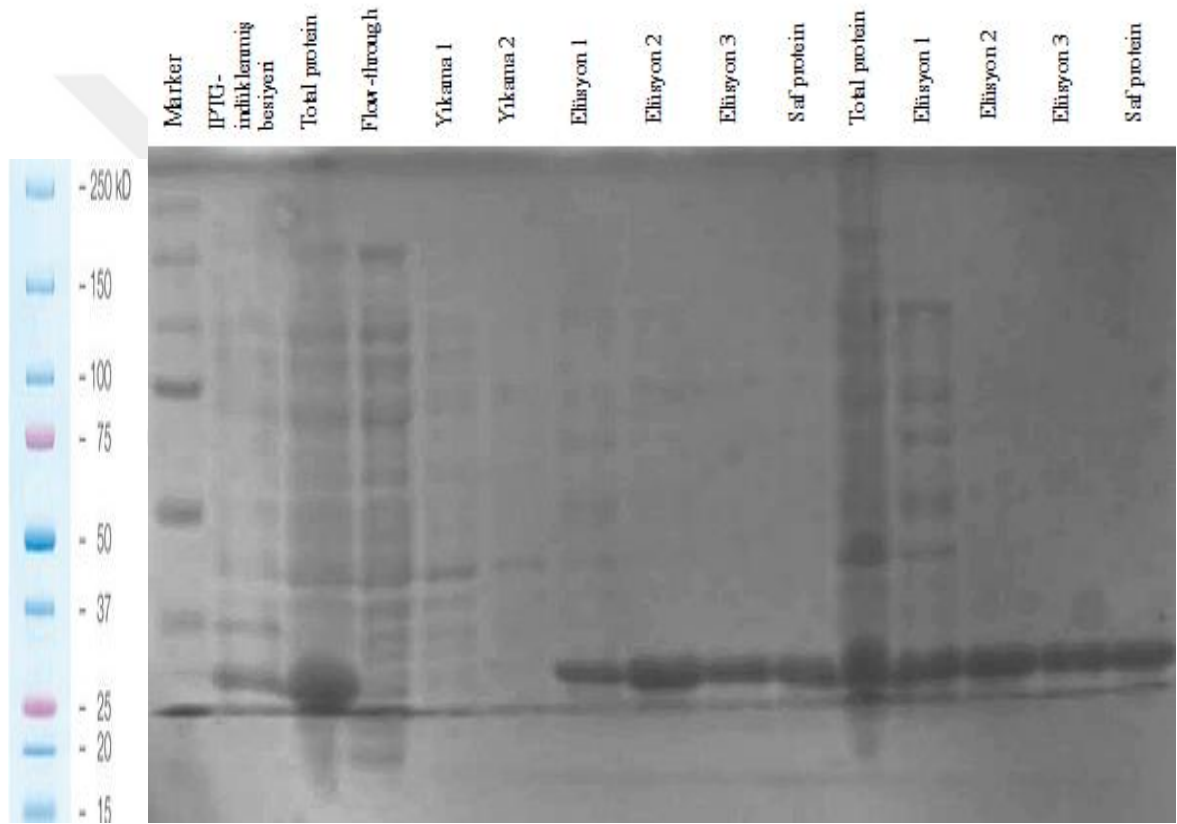
protein OD değerleri	0,732	0,6438
OD değerleri ortalaması	0,6879	
OD değerleri normalizasyonu	0,5979	
Eğim (x değeri)	0,001	
Kesme noktası	0,0943	
(protein OD-kesme noktası)/eğim	503,55	

5.1.2. PROTEİN SAFLAŞTIRMA BASAMAKLARININ SDS-PAGE İLE GÖSTERİLMESİ

Nikel kolon ile saflaştırılan rekombinant TNF-alfa proteinin saflaştırılma basamakları SDS-PAGE ile gösterilmiştir. Burada, saf protein olarak 30 kDa'lık protein görülmesi beklenmektedir.

Proteinlerin boyutunun belirlenmesi için Bio-Rad Precision plus protein standards (161-0307) marker kullanılmıştır.

Protein saflaştırma basamakları her bir kuyuda Şekil 5.3'te belirtilen sıradadır.



Şekil 5.3. Rekombinant TNF-alfa proteininin saflaştırma basamaklarının SDS-PAGE ile gösterilmesi

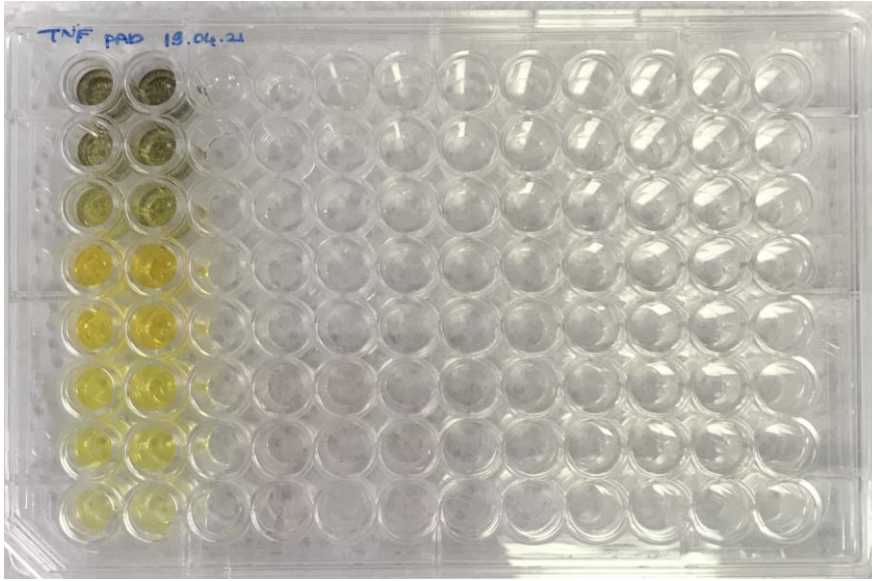
SDS-PAGE görüntüsü ile diyaliz yapılarak saflaştırılmış protein tek bant olarak 30 kDa boyutunda görülmüştür. Saflaştırılmış bu protein ile immünizasyon aşamasına geçilmiştir.

5.2. POLİKLONAL TNF-ALFA ANTİKORUNUN KARAKTERİZASYONU

İmmünize olan her iki fareden assit sıvısı ve kuyruk kanı toplanarak üretilmiş olan poliklonal antikorun karakterizasyonu ELISA ve Western Blot ile gösterilmiştir.

5.2.1. İNDİREKT ELISA İLE ANTİKOR TİTRASYONU SONUÇLARI

İmmünizasyon sonrası fare assit sıvısından alınmış olan poliklonal antikorun titrasyonu indirekt ELISA ile yapılmış ve antikorun antijeni tanıyabildiği dilüsyonlar gösterilmiştir. Buna göre, antikorun etkin olduğu en düşük dilüsyon belirlenmiştir.



Şekil 5.4. Ascite sıvısı ile yapılan indirekt ELISA ile antikor titrasyonunda 2M H₂SO₄ ile reaksiyonun durdurulması sonucu plate görünümü

A(1-2) 1:1000, B(1-2) 1:3125, C(1-2) 1:6250, D(1-2) 1:12500, E(1-2) 1: 25000, F(1-2) 1:50000, G(1-2) 1:100000, H(1-2) 1:250000, A(3-4) PBS Blank

Ortama TMB eklendiğinde reaksiyon devam etmektedir. Bu nedenle bir süre sonra reaksiyonun durdurulması gerekir. 2 M sülfürik asit ile reaksiyon durdurulduğunda pH değişimi ile mavi renk sarı renge dönüşmektedir.

Çizelge 5.4. Ascite sıvısı ile yapılan indirekt ELISA poliklonal antikor titrasyonu sonucu OD değerleri

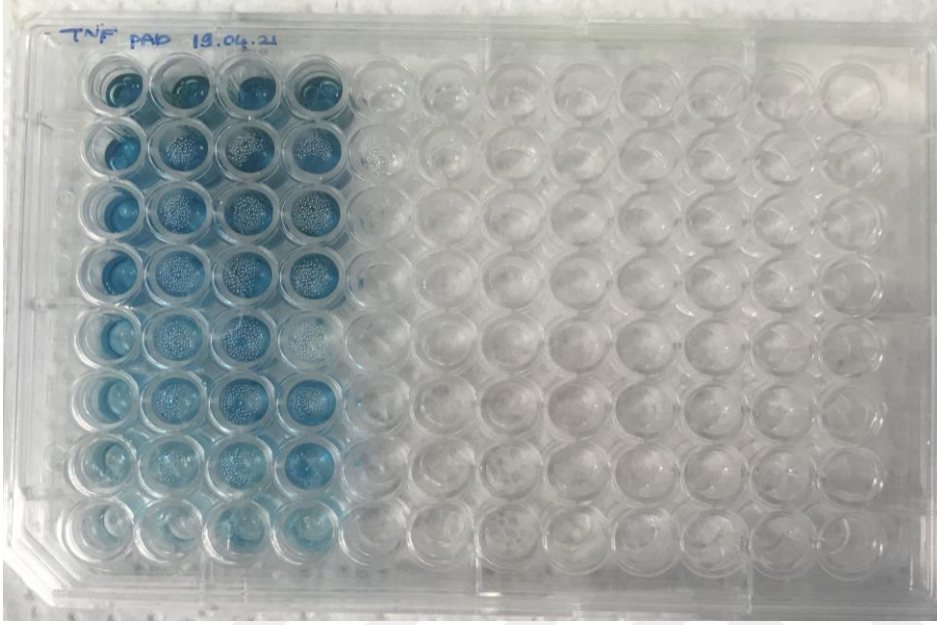
<>	1	2	3	4
A	OVER	OVER	0,0601	0,0549
B	OVER	OVER		
C	OVER	OVER		
D	OVER	OVER		
E	2,4572	2,5226		
F	1,4038	1,2094		
G	0,7312	0,7597		
H	0,3188	0,3359		

Çizelge 5.5. ELISA ile ascite sıvısı antikor titrasyonu OD değerleri ortalaması ve dilüsyonların gösterilmesi

Dilüsyonlar	OD Değerleri Ortalaması
1: 1000	OVER
1: 3125	OVER
1: 6250	OVER
1: 12500	OVER
1: 25000	2,4899
1: 50000	1,3066
1: 100000	0,7455
1: 250000	0,3227
Blank	0,0575

Çizelge 5.5.'te de gösterildiği gibi alınan ascite sıvısının etkinliği 1:250000 dilüsyonda gösterilmiştir. 1:1000 ve 1:25000 arasındaki dilüsyonlarda OD değerleri çok yüksek çıkmıştır.

İmmünizasyon sonrası; sağ kulağı ve sol kulağı kesilmiş olan her iki farenin kuyruğundan kan alınmış ve poliklonal antikorun titrasyonu indirekt ELISA ile tayin edilmiştir. Antikorun antijeni tanıyabildiği dilüsyonlar gösterilmiştir. Buna göre, antikorun etkin olduğu en düşük dilüsyon belirlenmiştir.

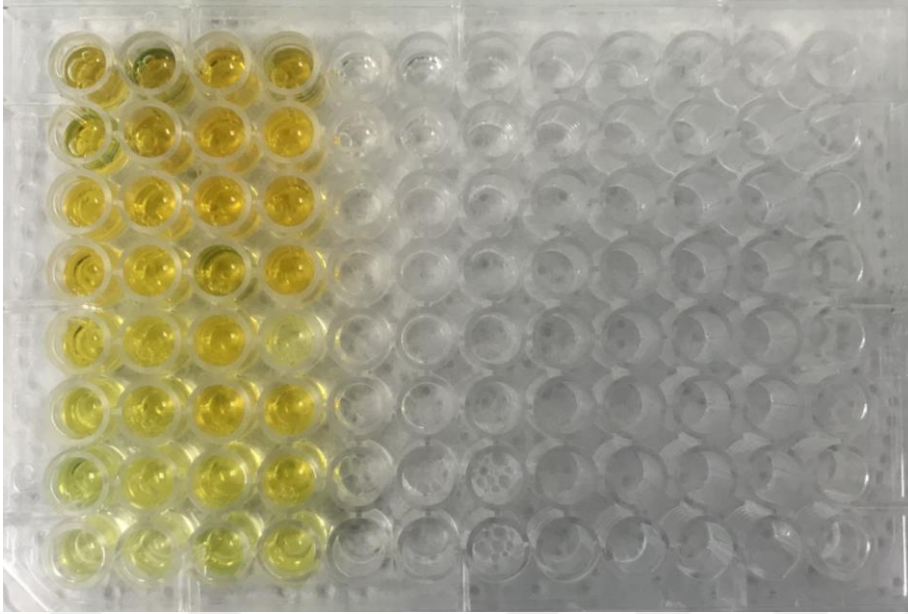


Şekil 5.5. Serumla yapılan ELISA titrasyonu sırasında HRP-substratı TMB'nin eklenmesi sonucu plate görünümü

İlk farenin serumu ile; A(1-2) 1:1000, B(1-2) 1:3125, C(1-2) 1:6250, D(1-2) 1:12500, E(1-2) 1: 25000, F(1-2) 1:50000, G(1-2) 1:100000, H(1-2) 1:250000

İkinci farenin serumu ile; A(3-4) 1:1000, B(3-4) 1:3125, C(3-4) 1:6250, D(3-4) 1:12500, E(3-4) 1: 25000, F(3-4) 1:50000, G(3-4) 1:100000, H(3-4) 1:250000, A(5-6) PBS Blank, B(5-6) PBS Blank

ELISA titrasyonunda TMB, HRP-işaretli sekonder antikorun substratı olarak kullanılmaktadır. TMB kuyucuklara eklendiğinde sekonder antikor ile ışığa vererek oksitleşip mavi rengini almıştır. Bu da sekonder antikorun, antijene bağlanan primer antikorlara bağlanabildiğini göstermektedir. Koyu mavi renk daha fazla bağlanmayı, açık mavi renk ise daha az bağlanmayı gösterir.



Şekil 5.6. Serumla yapılan ELISA titrasyonunda 2M H₂SO₄ ile reaksiyonun durdurulması sonucu plate görünümü

Kuyucuklara TMB eklendiğinde reaksiyon başlamaktadır. Bu nedenle bir süre sonra reaksiyonun durdurulması gerekir. 2 M sülfürik asit ile reaksiyon durdurulduğunda pH değişimi ile mavi renk sarı renge dönüşmektedir.

Çizelge 5.6. Kuyruk kanından alınan serum ile yapılan ELISA titrasyonunda ölçülen OD değerleri

<>	1	2	3	4	5	6
A	2,1396	2,3922	2,7005	3,3586	0,0532	0,0572
B	3,192	2,9966	3,0923	3,6346	0,064	0,0605
C	3,3003	3,2999	3,7079	2,7952		
D	3,886	2,2776	3,8592	3,5727		
E	1,8388	2,1492	3,106	0,3746		
F	1,2539	1,688	2,418	2,3132		
G	0,9628	1,0045	1,3153	1,808		
H	0,4558	0,3877	0,779	0,7857		

Çizelge 5.7. ELISA ile serum antikor titrasyonu OD değerleri ortalaması ve dilüsyonların gösterilmesi

Dilüsyonlar	Birinci Fare Serum OD	İkinci Fare Serum OD
1: 1000	2,2659	3,0295
1: 3125	3,0943	3,3634
1: 6250	3,3001	3,2515
1: 12500	3,0818	3,7159
1: 25000	1,994	1,7403
1: 50000	1,4709	2,3656
1: 100000	0,9836	1,5616
1: 250000	0,4217	0,7823
Blank	0,0552	0,0622

Antikor titrasyonu sonuçları ile hayvandan alınan serumun en az 1:250000 dilüsyona kadar etkili olabildiği gösterilmiştir. Serumdan alınan poliklonal antikor, rekombinant proteine etkili bir şekilde bağlanmıştır.

Ascite sıvısı poliklonal antikor olarak kullanıldığında etkin olduğu protein konsantrasyonunu aralığını belirlemek amacıyla TNF alfa protein dilüsyonları standartları oluşturulmuştur.

Kuyucuk başına 200 ng/ml ve 3 pg/ml aralığında konsantrasyonlar iki tekrarlı olacak şekilde indirekt ELISA ile tayin edilmiştir.

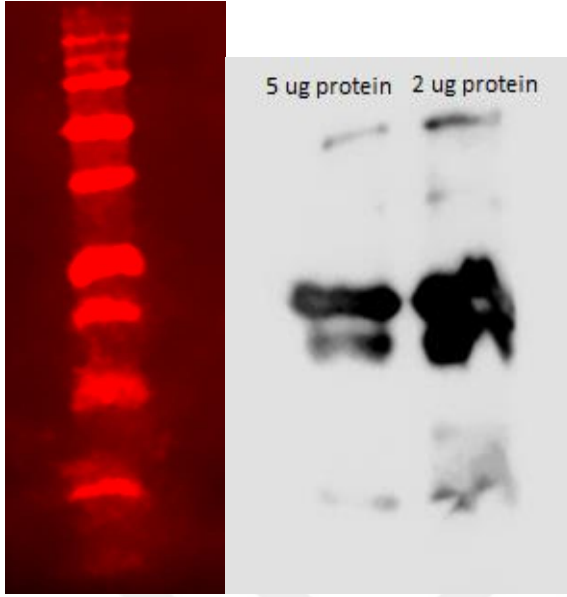
Çizelge 5.8. Proteinlerin standart konsantrasyonları ile indirekt ELISA sonucunda ölçülen OD değerleri

<>	1	2	3	4	5	6
A	2,9554	2,3754	0,8033	0,8094	0,2501	0,3326
B	2,6559	3,6935	0,6749	0,6933		
C	3,3408	OVER	0,5624	0,5781	0,0469	0,0491
D	3,0999	OVER	0,5599	0,529		
E	3,5977	3,3301	0,4715	0,7687		
F	2,6436	2,6729	0,4202	0,6606		
G	1,8213	1,9638	0,4646	0,5428		
H	1,1219	1,188	0,4116	0,4545		

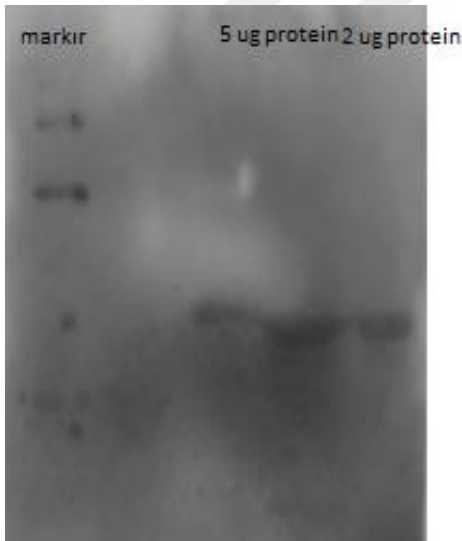
Çizelge 5.9. ELISA ile protein standartlarının OD değerleri ortalaması ve dilüsyonların gösterilmesi

Protein Konsantrasyonu	OD Değerleri Ortalaması	Protein Konsantrasyonu	OD Değerleri Ortalaması
200 ng/ml	2,81	390 pg/ml	0,68
100 ng/ml	3,17	195 pg/ml	0,57
50 ng/ml	3,34	97,5 pg/ml	0,53
25 ng/ml	3,10	48,75 pg/ml	0,62
12,5 ng/ml	3,46	24 pg/ml	0,54
6,25 ng/ml	2,66	12 pg/ml	0,50
3,125 ng/ml	1,89	6 pg/ml	0,43
1,56 ng/ml	1,15	3 pg/ml	0,29
780 pg/ml	0,80	0	0,048

5.2.2. WESTERN BLOT SONUÇLARI



Şekil 5.7. Ascite sıvısı primer antikor olarak kullanılarak yapılan Western Blot görüntüsü
Western Blot görüntüsü ile primer antikor olarak kullanılan ascite sıvısı TNF-alfa poliklonal antikorunun 2-5 μ g arası rekombinant proteine bağlanabildiği gösterilmiştir.



Şekil 5.8. TNF-alfa monoklonal ticari antikor ile yapılan Western Blot görüntüsü
Kontrol olarak kullanılan ticari monoklonal antikor da 2-5 μ g arasındaki rekombinant proteine bağlanma göstermiştir.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında inflamatuvar hastalıklarda önemli rol oynayan Tümör Nekrozis Faktör Alfa'ya karşı fareden poliklonal antikor üretilmiştir. Rekombinant TNF-alfa proteini pET-sumo-TNF vektörü ile başarılı bir şekilde üretilmiş ve saflaştırılma sonrası 30 kDa boyutundaki bant SDS-PAGE ile gösterilmiştir (76).

İmmünizasyon için ascite sıvısı üretilmesi protokolü ile immünizasyonlar belirtilen adjuvanlar ve miktarlar ile uygulanmıştır (42). TNF-alfa proteini bağışıklık sisteminde çok etkili bir sitokindir ve inflamasyona neden olmaktadır (78). Bu nedenle, rekombinant TNF-alfa proteini hayvanlara enjekte edilmeden önce ısı inaktivasyonu yapılarak hayvanda septik şok oluşması önlenmiştir (79).

İmmünizasyonlar sonrasında hayvanların karnında belirgin şişlikler gözlenmiş ve ascite sıvısı bu şekilde toplanmıştır (42). Toplanan ascite sıvısı içerisinde rekombinant olarak üretilmiş TNF-alfa proteinine karşı hayvanlar tarafından poliklonal antikorlar oluşturulmuştur. Bu antikorlar poliklonal olduklarından TNF-alfa üzerinde farklı epitoplara afinite göstermektedirler. Toplanan ascite sıvısı ve hayvanların kuyruklarından alınan kan ile karakterizasyon yapılarak rekombinant proteine etkili bir şekilde bağlandığı gözlenmiştir. Hayvanların serumu ve ascite sıvısı yeterli miktarda TNF alfa poliklonal antikoru üretmiştir. Antikor titrasyonu sonuçları ile hayvandan alınan serum ve ascite sıvısının en az 1:250000 dilüsyona kadar etkili olabildiği gösterilmiştir.

1:5000 dilüsyondaki ascite sıvısının etkinliği 3 pg/ml proteine kadar gösterilmiştir. Ticari ELISA kitlerinde en düşük standart 15 pg/ml olarak belirlenmiştir.

Şekil 5.7.'deki Western Blot görüntüsü ile primer antikor olarak kullanılan ascite sıvısının en az 2 µg rekombinant proteine bağlanabildiği gösterilmiştir. Hayvanlar rekombinant TNF-alfa'ya karşı antikor geliştirebilmişlerdir. Kontrol olarak kullanılan ticari monoklonal antikoru da en az 2 µg rekombinant proteine bağlanma göstermiştir. Rekombinant TNF-alfa proteini başarılı bir şekilde üretilmiştir.

Son yıllarda, anti-TNF antikoru olan etanercept, infliximab ve 2018 yılı itibariyle adalimumab'ın patent süreleri dolmuştur (75). Anti-TNF-alfa antikoru ve biyobenzerlerinin oluşturulmaya devam etmesi önem taşımaktadır. Bu nedenle, bu tez çalışması ülkemizde TNF-alfa'ya karşı biyoteknolojik bir ilaç geliştirmek adına bir basamak oluşturabilecektir.

6.2. SONUÇ

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında fareden anti-insan-TNF-alfa poliklonal antikoru üretilmiştir. Üretilen antikor başarılı bir şekilde rekombinant TNF-alfa proteinine bağlanmıştır. Serum ve ascite sıvısı da en az 1:250000 dilüsyona kadar etkili olabilmektedir. Ascite sıvısı primer antikor olarak kullanıldığında 3 pg/ml proteine kadar bağlanma göstermektedir.

Bu çalışmada üretilmiş olan poliklonal anti-TNF-alfa antikoru, ELISA ve Western Blot gibi tekniklerde kullanılabilir. Anti-TNF-alfa antikoru ve biyobenzerlerinin oluşturulmaya devam etmesi önem taşımaktadır. Bu nedenle, bu antikor sonraki çalışmalarda saflaştırılıp geliştirilerek teşhis ve görüntüleme gibi birçok alanda kullanılabilir, ayrıca, ülkemizde birçok antikor tabanlı teknikle dışa bağımlılığı azaltmak ve TNF-alfa proteinine karşı biyoteknolojik bir ilaç geliştirilebilmesi adına önemli bir adım olabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in cell biology*. 2001;11(9):372-7.
2. Fernández-Ruiz M, Aguado JM. Risk of infection associated with anti-TNF- α therapy. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2018;16(12):939-56.
3. Mantzaris GJ. Anti-TNFs: originators and biosimilars. *Digestive Diseases*. 2016;34(1-2):132-9.
4. Richter F, Zettlitz KA, Seifert O, Herrmann A, Scheurich P, Pfizenmaier K, et al., editors. *Monovalent TNF receptor 1-selective antibody with improved affinity and neutralizing activity*. MAbs; 2019: Taylor & Francis.
5. Wootla B, Denic A, Rodriguez M. Polyclonal and monoclonal antibodies in clinic. *Human Monoclonal Antibodies*. 2014:79-110.
6. Suckow MA, Stevens KA, Wilson RP. *The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents*: Academic Press; 2012.
7. Ascoli CA, Aggeler B. Overlooked benefits of using polyclonal antibodies. *BioTechniques*. 2018;65(3):127-36.
8. Parray HA, Shukla S, Samal S, Shrivastava T, Ahmed S, Sharma C, et al. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *International Immunopharmacology*. 2020;85:106639.
9. Overton TW. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug discovery today*. 2014;19(5):590-601.
10. Weise M, Bielsky M-C, De Smet K, Ehmann F, Ekman N, Giezen TJ, et al. Biosimilars: what clinicians should know. *Blood*. 2012;120(26):5111-7.

11. Mellstedt H, Niederwieser D, Ludwig H. The challenge of biosimilars. *Annals of oncology*. 2008;19(3):411-9.
12. Carswell EA, Old LJ, Kassel R, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1975;72(9):3666-70.
13. Holbrook J, Lara-Reyna S, Jarosz-Griffiths H, McDermott MF. Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Research*. 2019;8.
14. Sharif PM, Jabbari P, Razi S, Keshavarz-Fathi M, Rezaei N. Importance of TNF-alpha and its alterations in the development of cancers. *Cytokine*. 2020;130:155066.
15. Murphy K, Weaver C. *Janeway's Immunobiology*. 9th ed. New York: Garland Science; 2017. 109-20 p.
16. Eissner G, Kolch W, Scheurich P. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine & growth factor reviews*. 2004;15(5):353-66.
17. Mehta AK, Gracias DT, Croft M. TNF activity and T cells. *Cytokine*. 2018;101:14-8.
18. Zelová H, Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflammation Research*. 2013;62(7):641-51.
19. Waters JP, Pober JS, Bradley JR. Tumour necrosis factor in infectious disease. *The Journal of pathology*. 2013;230(2):132-47.
20. Bradley J. TNF - mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2008;214(2):149-60.
21. Rothe J, Lesslauer W, Lötscher H, Lang Y, Koebel P, Köntgen F, et al. Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to IMF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature*. 1993;364(6440):798-802.

22. Kim EY, Teh H-S. TNF type 2 receptor (p75) lowers the threshold of T cell activation. *The Journal of Immunology*. 2001;167(12):6812-20.
23. Lin R-H, Hwang Y-W, Yang B-C, Lin C-S. TNF receptor-2-triggered apoptosis is associated with the down-regulation of Bcl-xL on activated T cells and can be prevented by CD28 costimulation. *The Journal of Immunology*. 1997;158(2):598-603.
24. Popa C, Netea MG, Van Riel PL, Van Der Meer JW, Stalenhoef AF. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *Journal of lipid research*. 2007;48(4):751-62.
25. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259(5091):87-91.
26. Ahima RS, Saper CB, Flier JS, Elmquist JK. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2000;21(3):263-307.
27. Adegbola SO, Sahnun K, Warusavitarne J, Hart A, Tozer P. Anti-TNF therapy in Crohn's disease. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(8):2244.
28. Gerriets V, Bansal P, Khaddour K. Tumor necrosis factor (TNF) inhibitors. *StatPearls [Internet]*. 2019.
29. Steeland S, Libert C, Vandenbroucke RE. A new venue of TNF targeting. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(5):1442.
30. Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H, Ueda N. Molecular mechanisms of action of anti-TNF- α agents—Comparison among therapeutic TNF- α antagonists. *Cytokine*. 2018;101:56-63.
31. Shealy DJ, Cai A, Staquet K, Baker A, Lacy ER, Johns L, et al., editors. Characterization of golimumab, a human monoclonal antibody specific for human tumor necrosis factor α . *MAbs*; 2010: Taylor & Francis.

32. Castele NV, Sandborn WJ. Indication extrapolation for anti-TNF biosimilars. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2015;12(7):373-4.
33. Schroeder Jr HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(2):S41-S52.
34. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology*. 2014;5:520.
35. Murphy K, Weaver C. *Janeway's Immunobiology*. New York: Garland Science; 2017. 140-205 p.
36. Chiu ML, Goulet DR, Teplyakov A, Gilliland GL. Antibody structure and function: the basis for engineering therapeutics. *Antibodies*. 2019;8(4):55.
37. Stanfield RL, Wilson IA. Antibody structure. *Antibodies for Infectious Diseases*. 2015:49-62.
38. Hagemeyer CE, von Zur Muhlen C, von Elverfeldt D, Peter K. Single-chain antibodies as diagnostic tools and therapeutic agents. *Thrombosis and haemostasis*. 2009;101(06):1012-9.
39. Feldkamp CS, Carey JL. Immune function and antibody structure. *Immunoassay* EP Diamandis and TK Christopoulos, editors Academic Press, New York. 1996:5-24.
40. Wang X-z, Coljee VW, Maynard JA. Back to the future: recombinant polyclonal antibody therapeutics. *Current opinion in chemical engineering*. 2013;2(4):405-15.
41. Bregenholt S, Jensen A, Lantto J, Hyldig S, Haurum JS. Recombinant human polyclonal antibodies: a new class of therapeutic antibodies against viral infections. *Current pharmaceutical design*. 2006;12(16):2007-15.
42. Mahana W, Paraf A. Mice ascites as a source of polyclonal and monoclonal antibodies. *Journal of immunological methods*. 1993;161(2):187-92.
43. Stills HF. Polyclonal antibody production. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*: Elsevier; 2012. p. 259-74.

44. Newcombe C, Newcombe AR. Antibody production: polyclonal-derived biotherapeutics. *Journal of Chromatography B*. 2007;848(1):2-7.
45. Lu R-M, Hwang Y-C, Liu I-J, Lee C-C, Tsai H-Z, Li H-J, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of biomedical science*. 2020;27(1):1-30.
46. Ecker DM, Jones SD, Levine HL, editors. The therapeutic monoclonal antibody market. MAb; 2015: Taylor & Francis.
47. Kaplon H, Muralidharan M, Schneider Z, Reichert JM, editors. Antibodies to watch in 2020. MAb; 2020: Taylor & Francis.
48. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *nature*. 1975;256(5517):495-7.
49. Ryman JT, Meibohm B. Pharmacokinetics of monoclonal antibodies. *CPT: pharmacometrics & systems pharmacology*. 2017;6(9):576-88.
50. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985;228(4705):1315-7.
51. Mimmi S, Maisano D, Quinto I, Iaccino E. Phage display: An overview in context to drug discovery. *Trends in pharmacological sciences*. 2019;40(2):87-91.
52. Bazan J, Całkosiński I, Gamian A. Phage display—A powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2012;8(12):1817-28.
53. Clark M. Antibody humanization: a case of the ‘Emperor’s new clothes’? *Immunology today*. 2000;21(8):397-402.
54. Buss NA, Henderson SJ, McFarlane M, Shenton JM, De Haan L. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Current opinion in pharmacology*. 2012;12(5):615-22.

55. Safdari Y, Farajnia S, Asgharzadeh M, Khalili M. Antibody humanization methods—a review and update. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 2013;29(2):175-86.
56. Kontermann RE. Alternative antibody formats. *Current opinion in molecular therapeutics*. 2010;12(2):176-83.
57. Wang Q, Chen Y, Park J, Liu X, Hu Y, Wang T, et al. Design and production of bispecific antibodies. *Antibodies*. 2019;8(3):43.
58. Kontermann RE. Strategies to extend plasma half-lives of recombinant antibodies. *BioDrugs*. 2009;23(2):93-109.
59. Weidle UH, Tiefenthaler G, Weiss EH, Georges G, Brinkmann U. The intriguing options of multispecific antibody formats for treatment of cancer. *Cancer Genomics-Proteomics*. 2013;10(1):1-18.
60. Spiess C, Zhai Q, Carter PJ. Alternative molecular formats and therapeutic applications for bispecific antibodies. *Molecular immunology*. 2015;67(2):95-106.
61. Shim H. Bispecific Antibodies and Antibody–Drug Conjugates for Cancer Therapy: Technological Considerations. *Biomolecules*. 2020;10(3):360.
62. Trabolsi A, Arumov A, Schatz JH. T cell–activating bispecific antibodies in cancer therapy. *The Journal of Immunology*. 2019;203(3):585-92.
63. Kitazawa T, Shima M. Emicizumab, a humanized bispecific antibody to coagulation factors IXa and X with a factor VIIIa-cofactor activity. *International Journal of Hematology*. 2020;111(1):20-30.
64. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:172.
65. Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology*. 1999;10(5):411-21.

66. Crowe J, Dobeli H, Gentz R, Hochuli E, Stüber D, Henco K. Immobilised metal affinity chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Protocols for gene analysis*. 1994;371-87.
67. Bolanos-Garcia VM, Davies OR. Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2006;1760(9):1304-13.
68. Hamilton S, Odili J, Pacifico MD, Wilson GD, Kupsch J-M. Effect of imidazole on the solubility of a his-tagged antibody fragment. *Hybridoma and hybridomics*. 2003;22(6):347-55.
69. Rosano GL, Morales ES, Ceccarelli EA. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5 - year update. *Protein Science*. 2019;28(8):1412-22.
70. Gopal GJ, Kumar A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *The protein journal*. 2013;32(6):419-25.
71. Panavas T, Sanders C, Butt TR. SUMO fusion technology for enhanced protein production in prokaryotic and eukaryotic expression systems. *SUMO protocols*. 2009:303-17.
72. Butt TR, Edavettal SC, Hall JP, Mattern MR. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein expression and purification*. 2005;43(1):1-9.
73. Papamichael K, Van Stappen T, Jairath V, Gecse K, Khanna R, D'Haens G, et al. Pharmacological aspects of anti - TNF biosimilars in inflammatory bowel diseases. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2015;42(10):1158-69.
74. Barker J, Girolomoni G, Egeberg A, Goncalves J, Pieper B, Kang T. Anti-TNF biosimilars in psoriasis: from scientific evidence to real-world experience. *Journal of Dermatological Treatment*. 2019.

75. Parigi TL, D'Amico F, Peyrin-Biroulet L, Danese S. Evolution of infliximab biosimilar in inflammatory bowel disease: from intravenous to subcutaneous CT-P13. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2021;21(1):37-46.
76. Hoffmann A, Müller MQ, Gloser M, Sinz A, Rudolph R, Pfeifer S. Recombinant production of bioactive human TNF- α by SUMO-fusion system–High yields from shake-flask culture. *Protein expression and purification*. 2010;72(2):238-43.
77. SnapGene software [Internet]. Insightful Science. Available from: snapgene.com.
78. Spooner CE, Markowitz NP, Saravolatz LD. The role of tumor necrosis factor in sepsis. *Clinical immunology and immunopathology*. 1992;62(1):S11-S7.
79. Cryz S, Fürer E, Germanier R. Effect of chemical and heat inactivation on the antigenicity and immunogenicity of *Vibrio cholerae*. *Infection and immunity*. 1982;38(1):21-6.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ezgi Koç

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce, Almanca (başlangıç seviyesinde), İtalyanca (başlangıç seviyesinde)

Eğitim Durumu

Lise: Öğretmen Necla Kızılbaş Anadolu Lisesi (2010-2014)

Lisans: Bilkent Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik (2014-2019)

İş Tecrübesi

University Medicine Göttingen Neurobiological Research Laboratory, Stajyer Öğrenci, Temmuz-Ağustos 2018

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Stajyer Öğrenci, Temmuz-Ağustos 2017

Posterler ve Bildiriler

Koc E, Yılmaz E. Generation of Polyclonal Antibody Against Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-Alpha). 10th International Scientific Research Congress, April 2021.



Poster Presentation / Poster Sunum

Tümör Nekrozis Faktör Alfa'ya (Tnf-Alfa) Karşı Poliklonal Antikor Üretilmesi

Ezgi Koç¹ , Prof. Dr. Erkan Yılmaz²

¹Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

²Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Özet

Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF-alfa), doğal bağışıklığın başlıca mekanizmalarından olan inflamasyonda etkin rol oynayan, multifonksiyonel bir sitokindir. Makrofajlar ve T hücreleri başta olmak üzere, B hücreleri, nötrofiller ve doğal katil hücreler gibi bağışıklık sisteminde rol oynayan birçok hücre tarafından üretilmektedir. Özellikle Romatoid artrit (RA) ya da Crohn hastalığı (CD) gibi otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarda TNF-alfa konsantrasyonunun vücutta artması bu sitokini terapötik olarak önemli bir hedef haline getirmektedir (Fernández-Ruiz & Aguado, 2018). TNF-alfa konsantrasyonunun yüksek olduğu hastalıklarda TNF-alfa'yı tanıyan ve nötralize edebilen anti-TNF-alfa antikor tabanlı ilaçlar kullanılabilmektedir. Günümüzde FDA tarafından onaylanmış anti-TNF-alfa antikorları bulunmaktadır. Infliximab (Remicade); Crohn hastalığı, romatoid artrit, ülseratif kolit, ankilozan spondilit, psöriyatik artrit ve psoriasis hastalıklarında kullanılan FDA-onaylı kimerik bir anti-TNF-alfa antikorudur ve dünyanın en çok satan 10 antikor tabanlı ilaçlarından biri olmuştur (Lu et al., 2020). Infliximab patent süresi 2018 yılı itibariyle dolmuştur. Biyobenzer antikorlar, orjinal antikorlar ile aynı sekansa sahip olmasının yanında farklı klonlama ya da üretim prosesi ile üretilirler. Bu nedenle, glikolizasyon profillerinde, üretilen ürünün kalitesinde işlevselliğinde değişimler olabilmektedir. Bu yüzden anti-TNF-alfa antikorları ve biyobenzerleri oluşturulmaya devam etmektedir (Beck, 2011). Poliklonal antikorlar, antijen üzerindeki farklı epitoplara bağlanabilen antikorlardır. Bu çalışma ile TNF-alfaya karşı poliklonal antikor üretilcek ve üretilcek olan poliklonal antikor, ileriki aşamalarda geliştirilerek ELISA ve Western Blot gibi teknikler için kullanılmaya açık olacaktır. Bu amaca ulaşmak için; TNF-alfa protein ekspresyon vektörü ile rekombinant protein ekspresyonu yapılacak ve BALB/C dişi fareye immünizasyonu sağlanacaktır. Ascites sıvısı toplanacak ve antikor saflaştırma işlemleri ile üretilen antikorum TNF-alfa'ya karşı spesifitesi ölçülecektir.

Anahtar Kelimeler: Tnf-Alfa, Rekombinant Protein, Poliklonal Antikor

Generation of Polyclonal Antibody Against Tumor Necrosis Factor Alpha (Tnf-Alpha)

Abstract

Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF-alpha), is a multifunctional cytokine which has one of the most important mechanisms of the immune system. TNF-alpha could be produced by many immune cells including macrophages, T cells, B cells, NK cells and neutrophils. Increasing concentration of TNF-alpha, especially in the autoimmune and inflammatory diseases makes this cytokine an important therapeutic target. In diseases with high TNF-alpha concentration, anti-TNF-alpha antibody-based drugs can recognize and neutralize TNF-alpha (Fernández-Ruiz & Aguado, 2018). Nowadays, there are many FDA-approved anti-TNF-alpha antibodies in the market. Infliximab (Remicade) is an FDA-approved chimeric TNF-alpha antibody which is used in Crohn's disease, rheumatoid arthritis, ulcerative colitis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis and psoriasis and it has been one of the top 10 selling antibody-based drugs in the world (Lu et al., 2020). Infliximab patent expired as of 2018. Biosimilar antibodies could be produced by different cloning or production processes. For this reason, there may be changes in the glycosylation profiles, the quality of the produced product or its functionality. Therefore, anti-TNF-alpha antibodies and biosimilars continue to be produced (Beck, 2011). Polyclonal antibodies could bind different epitopes on the antigen. In this study, anti-TNF-alpha polyclonal antibody will be produced and will be developed in later stages for techniques such as ELISA and Western Blotting. To achieve this; recombinant protein expression will be made with the TNF-alpha protein expression vector and the BALB /C female mouse will be immunized. Ascites fluid will be collected and the specificity of the antibody will be measured.

Keywords: Tnf-Alpha, Recombinant Protein, Polyclonal Antibody