

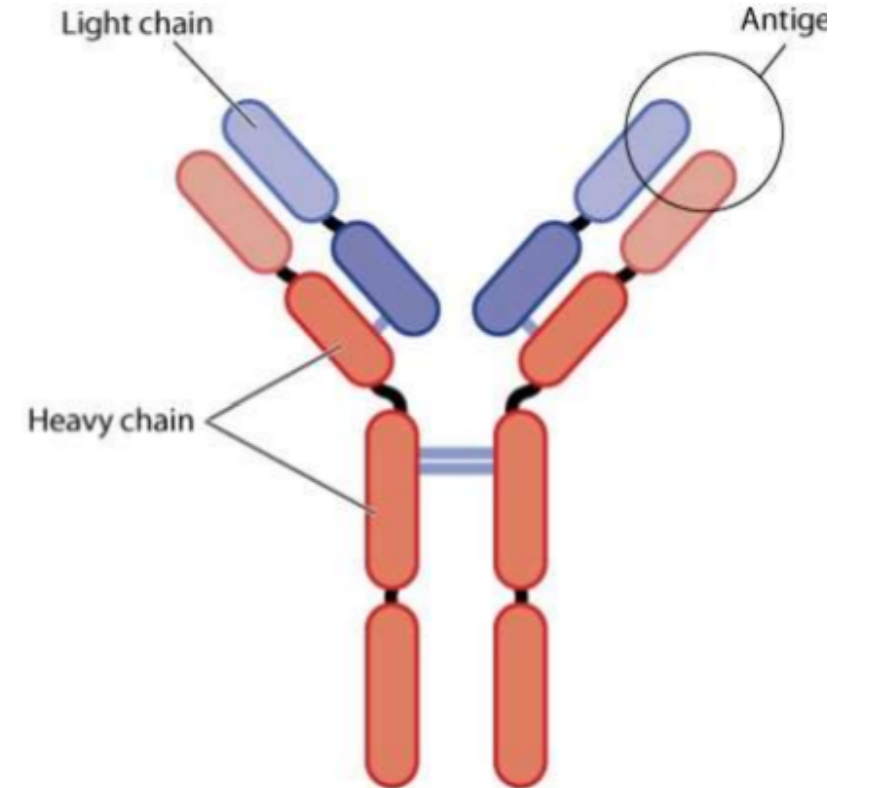
HÜCRE KÜLTÜR TEKNİKLERİ

Ders 8

Monoklonal Antikorlar ve Hibridoma Teknolojileri

Antikor nedir?

- İmmünoglobulinler olarak da bilinen antikorlar, B hücreleri (plazma hücreleri) tarafından **bakteri ve virüsler gibi antijenleri nötralize etmek** için salgılanır.
- Bir antikor; **iki ağır ve iki hafif zincir** olmak üzere dört polipeptit zincirinden oluşan Y şeklinde bir molekül olarak tanımlanabilir.



Antijenlerin ve Antikorların Bağlanması

- "Y" nin her ucu, bir antijen üzerindeki belirli bir epitopa (bir anahtara benzer şekilde) özgü olan ve bu iki yapının hassasiyetle bağlanmasına izin veren bir paratop (bir kilide benzer bir yapı) içerir.
- Bir antijene bağlanma yeteneği, çeşitli yaşam bilimleri ve tıp biliminde yaygın olarak kullanılmalarına yol açmıştır.

Enfeksiyonlara (konağa yabancı yapılara) karşı direnci sağlayan hücrelerin, dokuların ve moleküllerin oluşturduğu bütüne **immün sistem;**

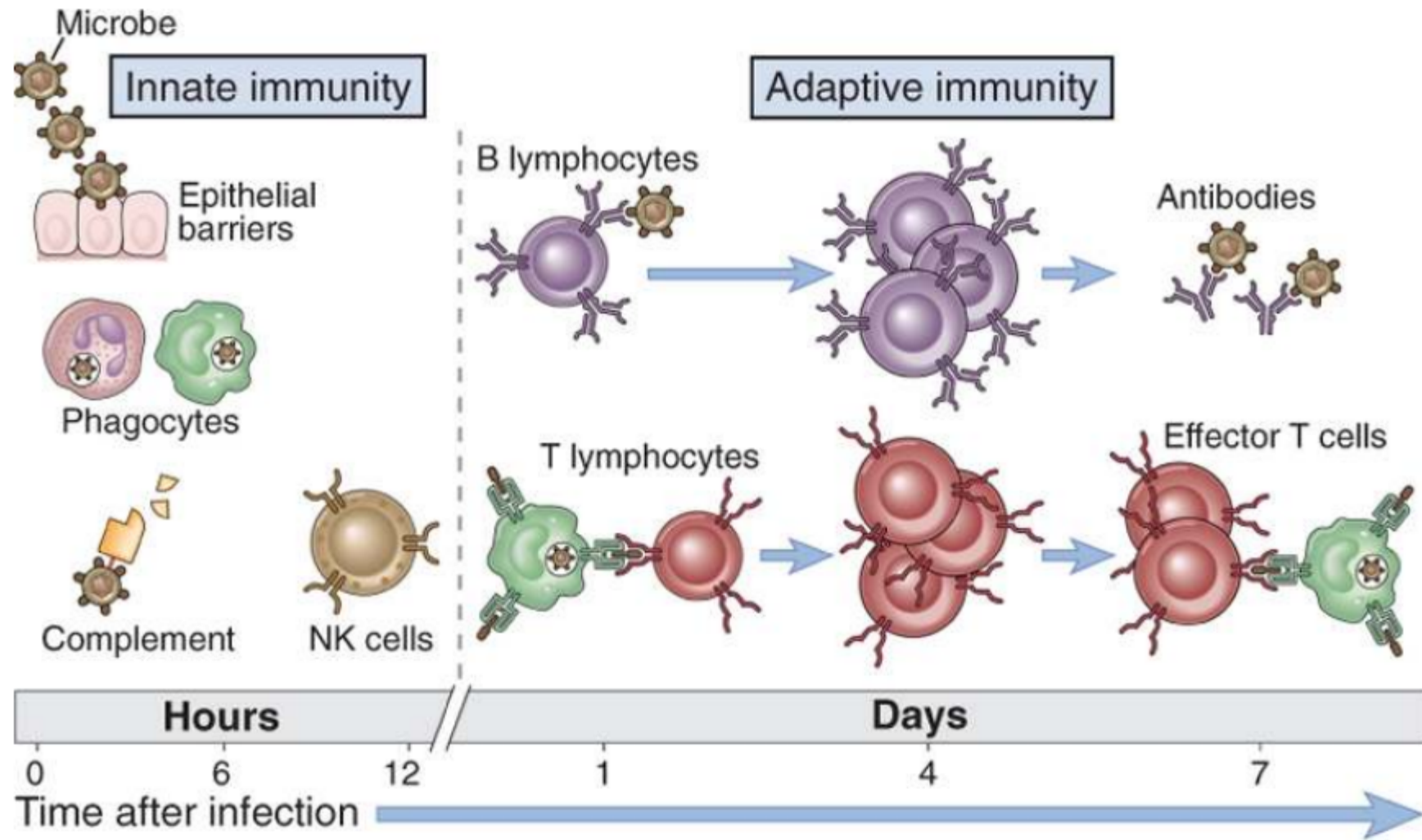
Bu hücrelerin ve moleküllerin oluşturdukları koordineli reaksiyonlara **immün yanıt denir.**

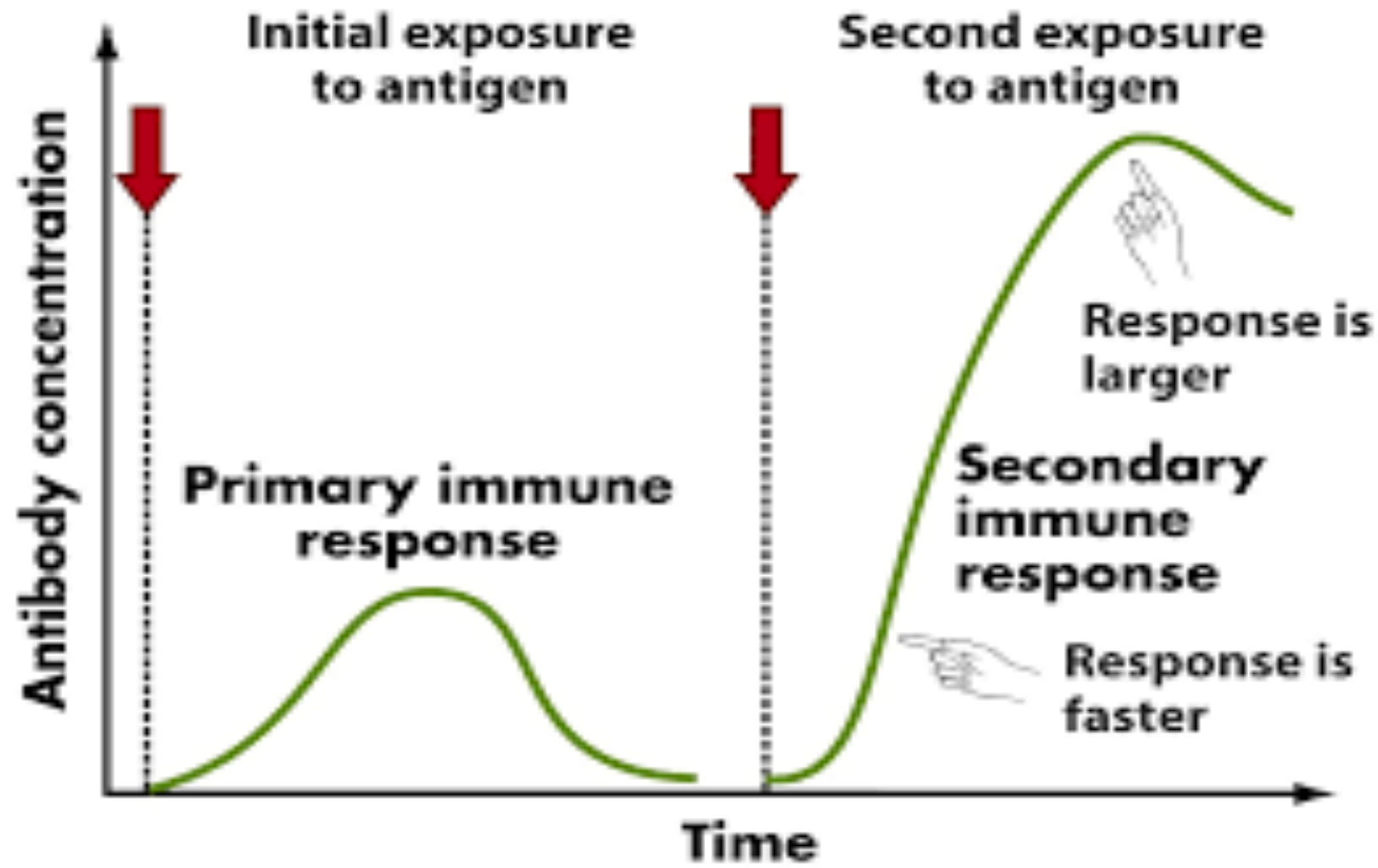
Doğal bağışıklık

- Hızlı yanıt (saatler)
- **Sabit R yapıları**
- Sınırlı çeşidi tanıma
- Yanıt sırasında değişmez

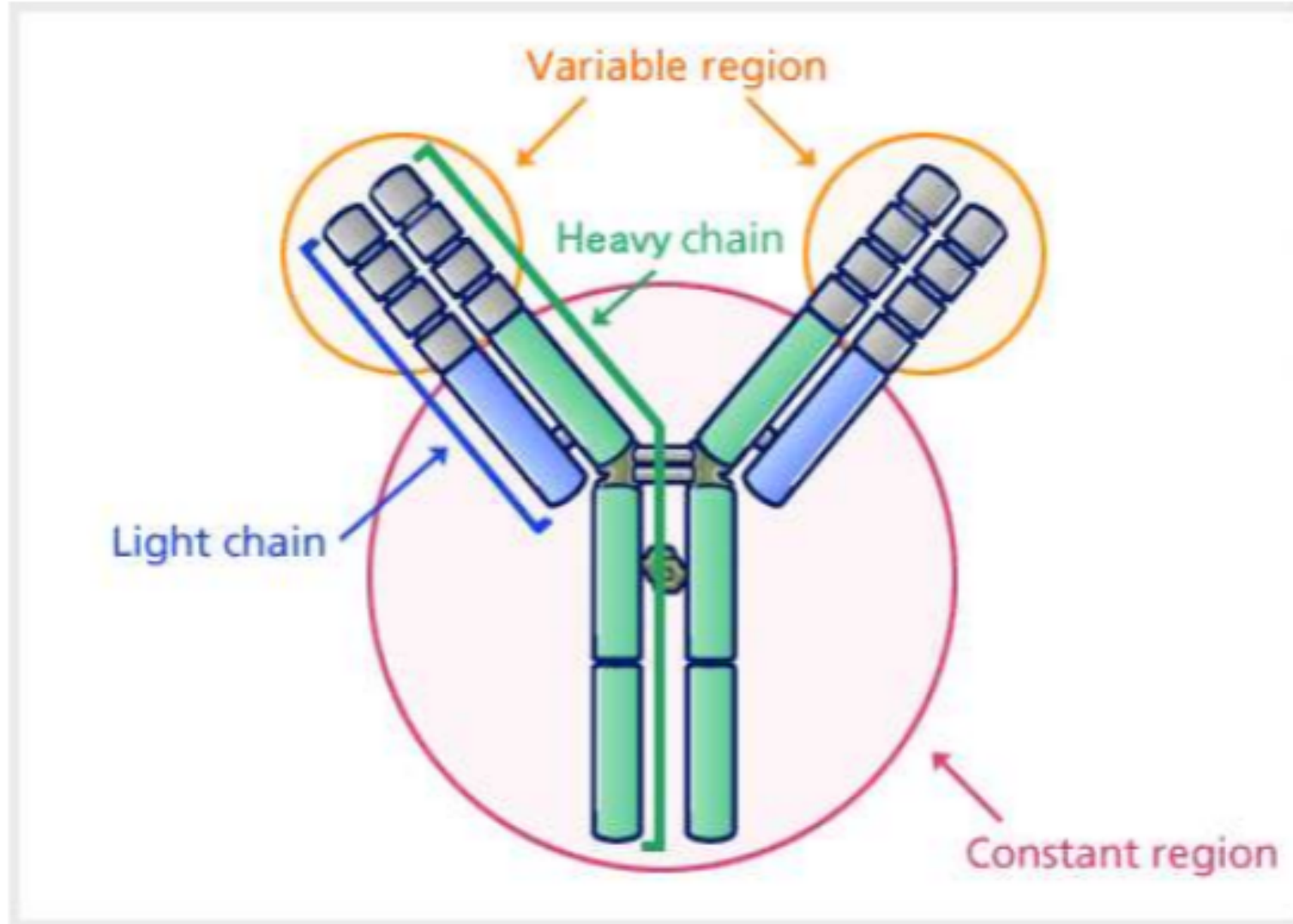
Edinsel bağışıklık

- Yavaş yanıt (Gün-hafta)
- Çok sayıda çeşidi seçici tanıma
- Yanıt sırasında gelişme (farklılaşma)
- Bellek özelliği
- Klonal çoğalma
- Özelleşme (Farklılaşma)
- Küçülme ve dengelenme (homeostasis)
- Kendine yanıt vermeme
- **Değişken R** (Özgüllük)





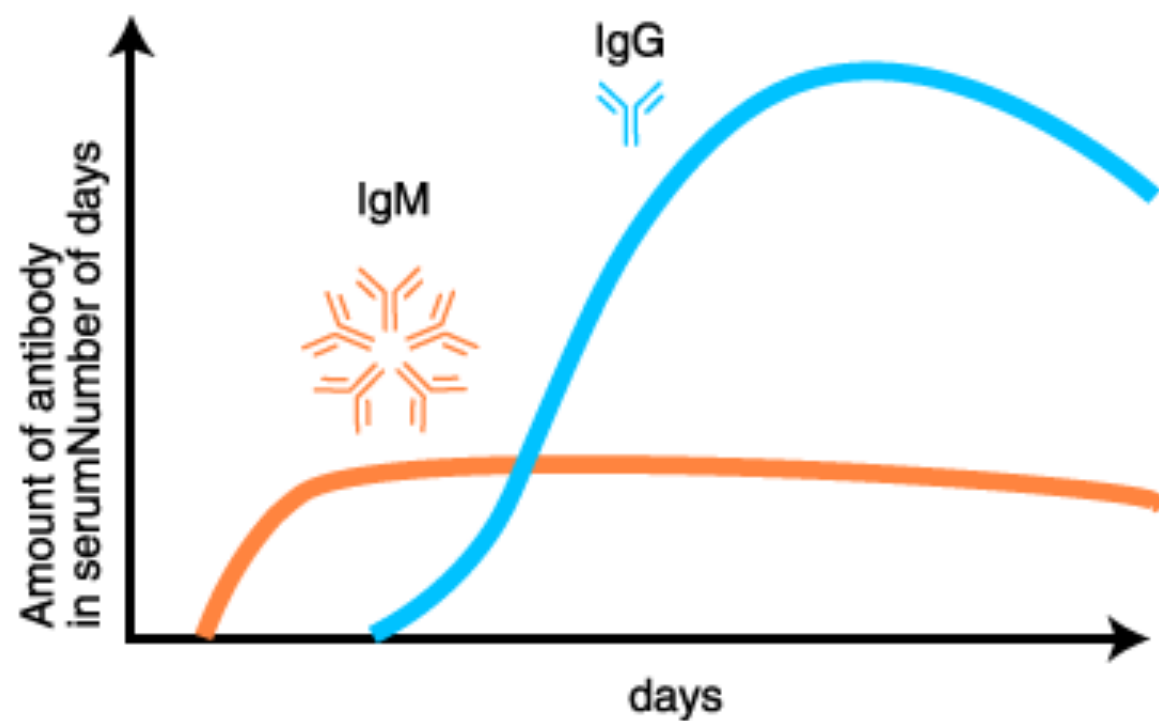
Antikoru Yapısı



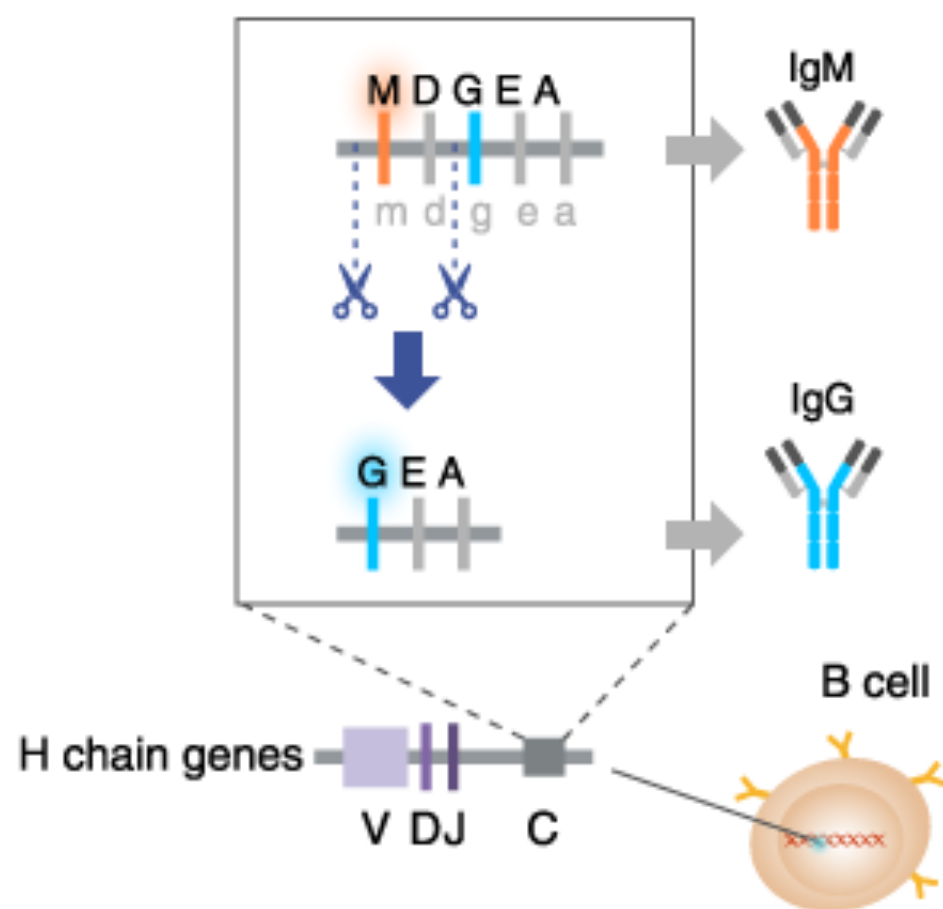
The Five Immunoglobulin (Ig) Classes

	IgM pentamer	IgG monomer	Secretory IgA dimer	IgE monomer	IgD monomer
					
Heavy chains	μ	γ	α	ϵ	δ
Number of antigen binding sites	10	2	4	2	2
Molecular weight (Daltons)	900,000	150,000	385,000	200,000	180,000
Percentage of total antibody in serum	6%	80%	13%	0.002%	1%
Crosses placenta	no	yes	no	no	no
Fixes complement	yes	yes	no	no	no
Fc binds to		phagocytes		mast cells and basophils	
Function	Main antibody of primary responses, best at fixing complement; the monomer form of IgM serves as the B cell receptor	Main blood antibody of secondary responses, neutralizes toxins, opsonization	Secreted into mucus, tears, saliva, colostrum	Antibody of allergy and antiparasitic activity	B cell receptor

Levels of circulating antibodies to a specific antigen



Class switching



ANTİKORLAR

Polyclonal

Antibodies that are collected from sera of exposed animal

recognize multiple antigenic sites of injected biochemical.



Monoclonal

Individual B lymphocyte hybridoma is cloned and cultured. Secreted antibodies are collected from culture media

recognize ONE antigenic site of injected biochemical



Poliklonal Antikorlar

- Poliklonal antikorlar (pAbs), genellikle vücuttaki farklı B hücresi klonları tarafından üretilen heterojen antikor karışımıdır.
- Tek bir antijenin birçok farklı epitopunu tanıyabilir ve bunlara bağlanabilirler.

Poliklonal Antikorların Üretimi

- Poliklonal antikorlar, bir hayvana bir immünojen enjekte edilerek üretilir. Birincil bağışıklık tepkisini ortaya çıkarmak için spesifik bir antijen enjekte edildikten sonra, belirli antijene karşı daha yüksek antikor titreleri üretmek için ikincil, hatta üçüncül bir immünizasyon gerçekleştirilir
- İmmünizasyondan sonra, poliklonal antikorlar doğrudan pıhtılaşma proteinleri içeren serumdan (kırmızı kan hücreleri uzaklaştırılmış kan) elde edilebilir veya diğer serum proteinlerinden arınmış bir çözelti elde etmek için saflaştırılabilir.

Poliklonal Antikorların Üretimi

- Poliklonal antikorlar genellikle tavşan veya keçi gibi bir laboratuvar hayvanına spesifik bir antijen enjekte edilerek elde edilir. **Birkaç hafta içinde, hayvanların bağışıklık sistemi antijene özgü yüksek seviyelerde antikorlar üretecektir.** Bu antikorlar, bir antijene maruz kaldıktan sonra bir hayvandan alınan bütün serum olan bir antiserumda toplanabilir.

Poliklonal Antikorların Üretimi

- Çoğu antijen, pek çok epitop içeren karmaşık yapılar olduğundan, laboratuvar hayvanında farklı epitoplara özgü antikorların üretilmesine neden olurlar.
- Bu poliklonal antikor tepkisi, insan bağışıklık sistemi tarafından enfeksiyona verilen tepkinin tipik bir örneğidir.
- Bir hayvandan alınan antiserum böylece B hücrelerinin çoklu klonlarından antikorlar içerecektir, her B hücresi antijen üzerindeki belirli bir epitopa yanıt verir

1 Inject antigen into rabbit.

2 Antigen activates B cells.

3 Plasma B cells produce polyclonal antibodies.

4 Obtain antiserum from rabbit containing polyclonal antibodies.

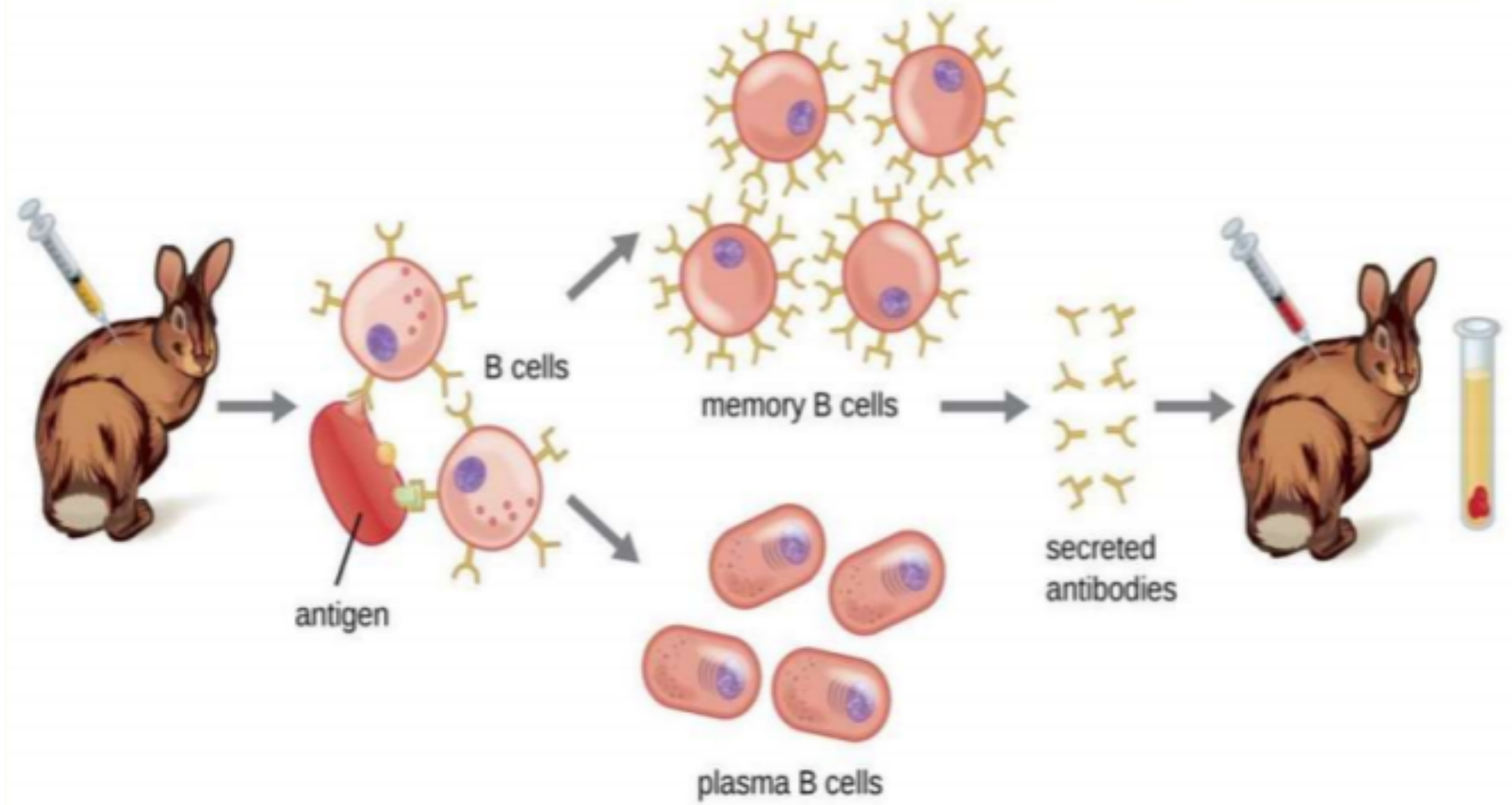


Figure: The process for harvesting polyclonal antibodies produced in response to an antigen.



Monoklonal Antikorlar

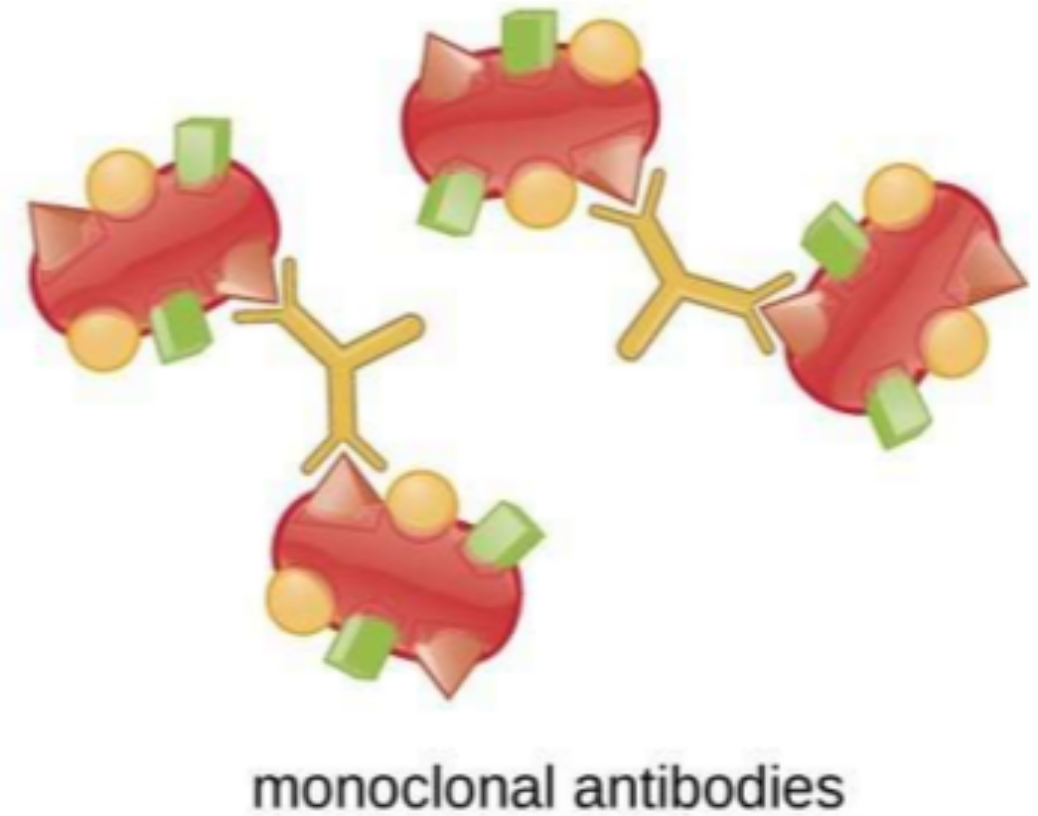
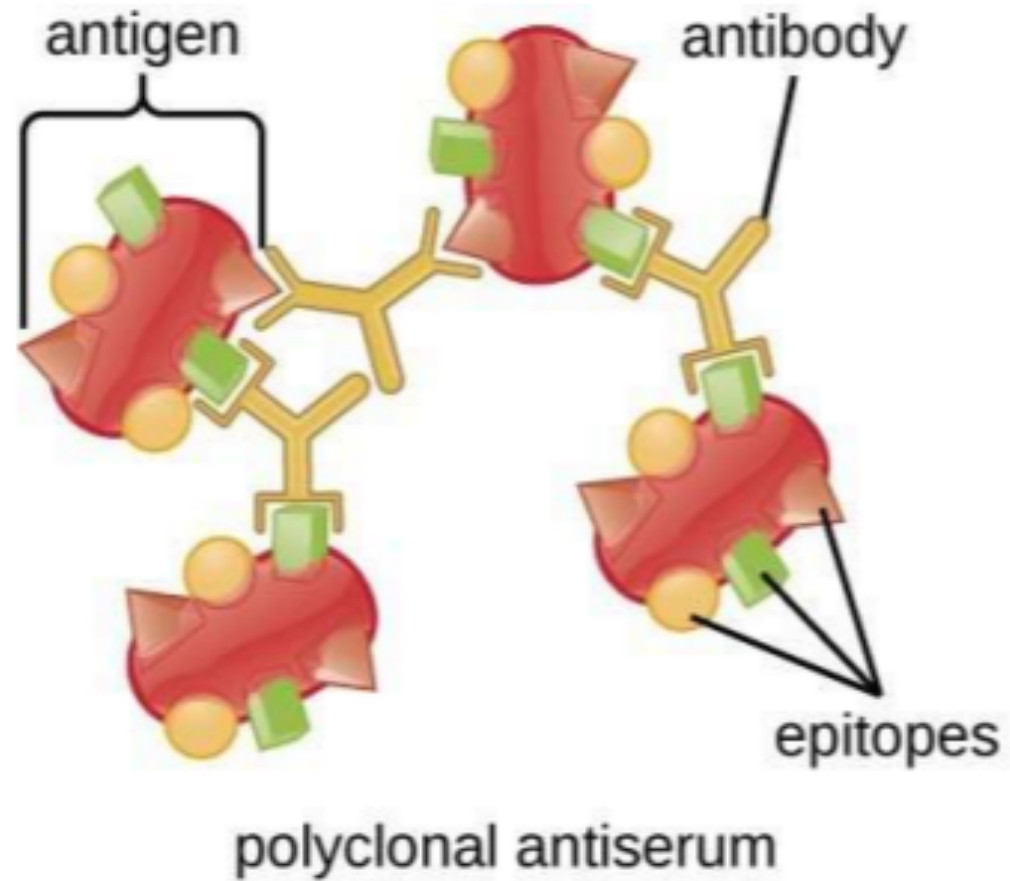
- Monoklonal antikorlar (mAb), tek bir ana hücreden klonlaşmış özdeş B hücreleri tarafından üretilir.
- Bu, monoklonal antikorların tek değerlikli afiniteye sahip olduğu ve sadece bir antijenin aynı epitopunu tanıdığı anlamına gelir.

Monoklonal Antikotların Karakteri

- Monoklonal antikorlar, özdeş olan ve spesifik bir epitopa yönelik olan ve tek bir ebeveynin veya tek bir hibridoma hücre hattının B hücre klonları tarafından üretilen tek bir antikor türüdür.
- Bir hibridoma hücre hattı, B hücre lenfositinin bir myeloma hücresi ile füzyonuyla oluşur.
- Bazı myeloma hücreleri doğal olarak tek monoklonal antikorları sentezler

- Canlı hayvanlarda üretilen poliklonal antikorların aksine, monoklonal antikorlar doku kültürü teknikleri kullanılarak ex vivo üretilir.
- İşlem, istenen antijenin bir hayvana, genellikle bir fareye, birçok kez enjekte edilmesiyle başlar. Hayvan bir bağışıklık tepkisi geliştirdiğinde, B-lenfositleri hayvanın dalağında izole edilir ve ölümsüzleştirilmiş B hücreleri bir myeloma hücre hattı ile kaynaştırılarak hibridoma hücre dizisi oluşturulur
- Antikor üretilirken kültürde sürekli olarak büyüeyebilen hibridomalar daha sonra istenen monoklonal antikor için taranır.

Poliklonal vs. Monoklonal



Monoklonal Antikorlar

- Avantajları:
 - Bir antijenin sadece bir epitopunun yüksek düzeyde tanınması
 - Ölümsüz hibridoma hücre dizileri sınırsız miktarda antikor üretme yeteneğine sahiptir
 - Deneyler arasında yüksek tutarlılık
 - Minimum çapraz reaktivite
 - Afinite saflaştırması için yüksek verimlilikle kullanılabilir

- Dezavantajları:

- Bir monoklonal geliştirmek zaman alır ve yüksek teknik beceriler gerektirir.

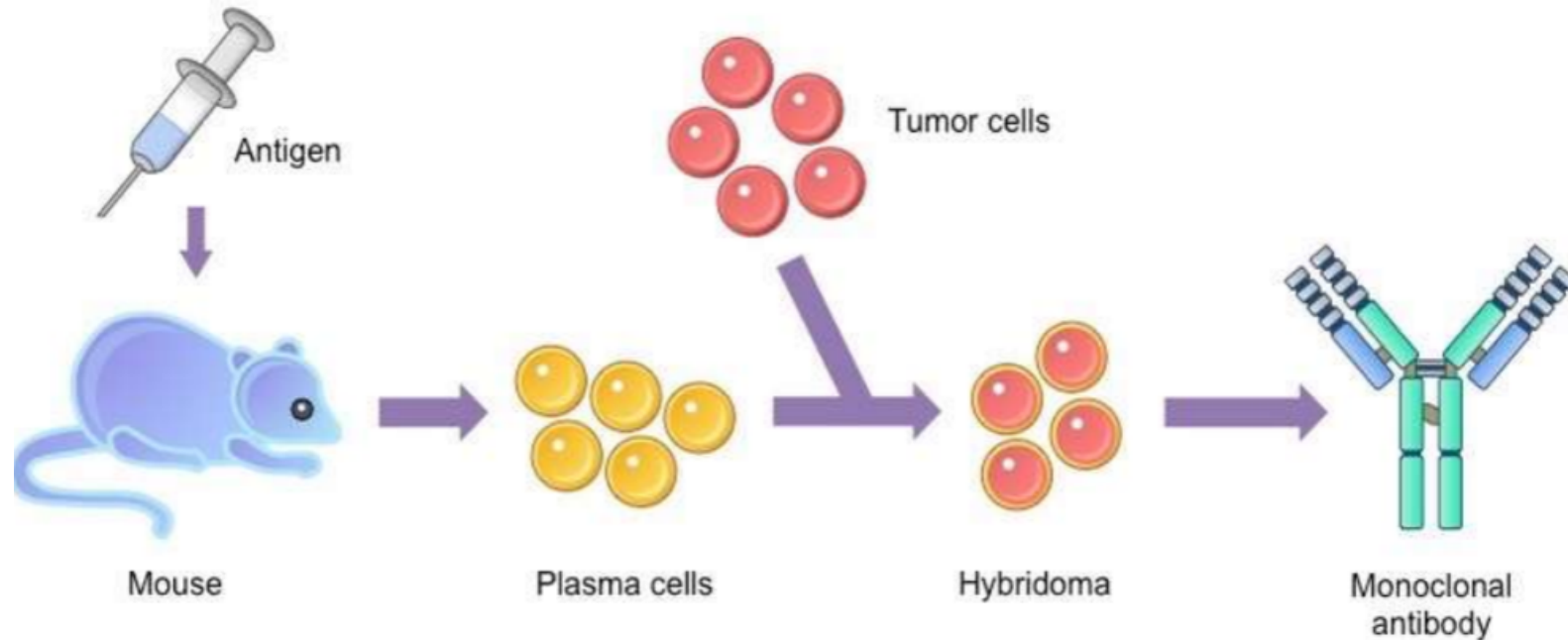
- Çok miktarda spesifik antikor üretilebilir, ancak farklı alt türlerdeki antijenleri tespit edemeyecek kadar spesifik olabilirler.

- Epitop değişikliğine karşı savunmasızdır. Antijen konformasyonundaki ufak bir değişiklik bile bağlama kapasitesinin önemli ölçüde azalmasına neden olabilir.

	<u>Polyclonal antibodies</u>	<u>Monoclonal Antibodies</u>
<i>Produced by:</i>	Many B cell clones	A single B cell clone
<i>Bind to:</i>	Multiple epitopes of all antigens used in the immunization	A single epitope of a single antigen
<i>Antibody class:</i>	A mixture of different Ab classes (isotypes)	All of a single Ab class
<i>Ag-binding sites:</i>	A mixture of Abs with different antigen-binding sites	All Abs have the same antigen binding site
<i>Potential for cross-reactivity:</i>	High	Low

Hibridoma

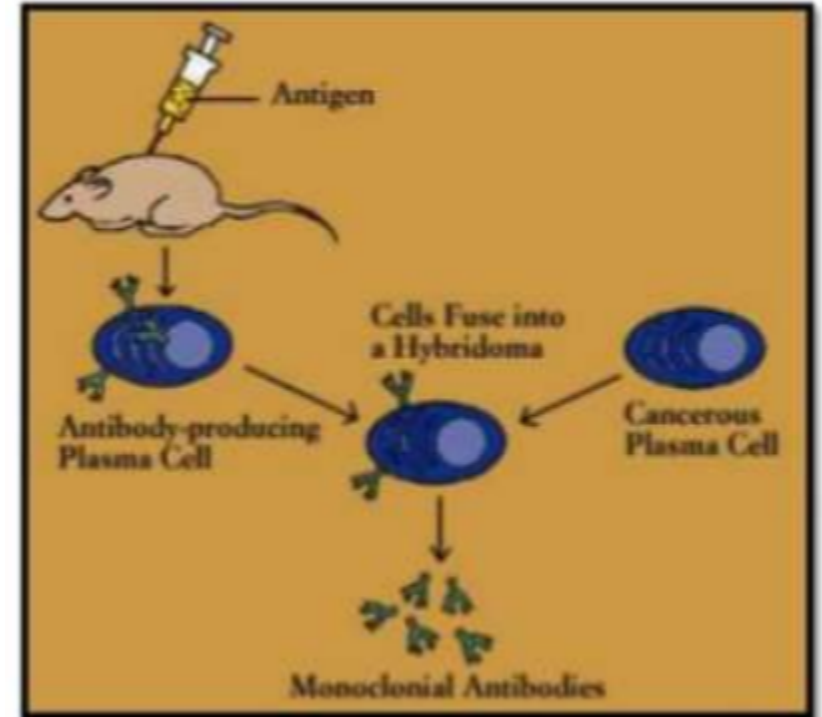
- Bir hibridoma, antikor oluşturan B lenfositlerinin genellikle bir tümör hücresi (myeloma) ile füzyonuyla elde edilen hibrid bir hücredir



PRENSİP

- Hibrit hücre, B hücrelerinden elde edilen antikor üretim kapasitesine sahiptir
- Aynı zamanda Myelom hücrelerinden elde edilen bir özellik olarak sürekli olarak bölünebilir
- Her iki hücrenin istenen özelliklerini birleştirerek, hibridoma teknolojisi tek spesifiteye sahip büyük ölçekli antikor üretimi sağlar

- Spesifik hibridomalar in vitro olarak kültüve edilir veya monoklonal antikorlar elde etmek için fare periton boşluğundan enjekte edilebilir.
- Her iki yöntem de buna hibridoma teknolojisi olarak isimlendirilir



HİBRİDOMA PROSEDÜRÜ

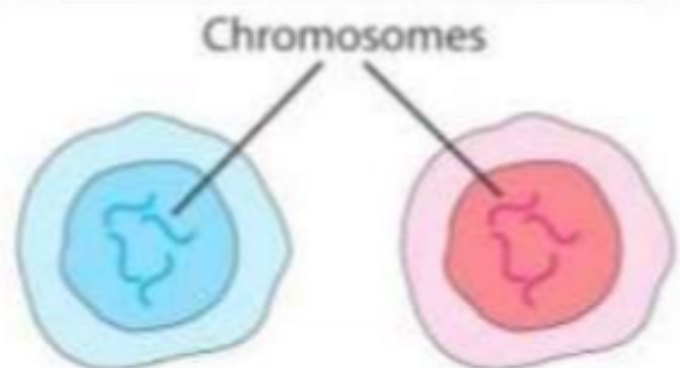
- B hücrelerinin izolasyonu

- 2-4 haftalık farelere antikor seviyesinin yükseltilmesi için deri altı enjeksiyonla uygun antijen verilir
- Daha sonra B hücreleri aşılanmış bir farenin dalağından izole edilir.

- Myelom hücrelerinin izolasyonu
 - Myeloma hücreleri kemik iliğinden izole edilir
 - Kullanılan myeloma hücreleri HGPRT (Hipoksantinguanin fosforibosil transferaz) mutant hücrelerdir (8-azaguanin indüklenmiştir)

- Somatik Hücre Füzyonu

- Elektrofüzyon: Hücrelerinin elektrik alanıyla kaynaşmasına izin verilir
- PEG ortamı kullanılarak yapılır
- PEG polietilen glikol anlamına gelir



Normal T or B cell
(dies after 7-10
days in culture)

Cancerous T or B cell
(grows continuously
in culture)

Polyethylene glycol

Nucleus
of normal
lymphocyte

Nucleus of
cancer cell

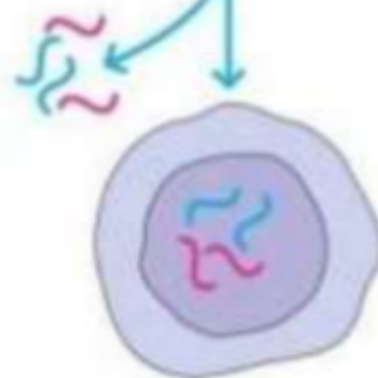
Heterokaryon

Nucleus
of normal
lymphocyte

Nucleus of
cancer cell

Heterokaryon

Random chromosomal loss



Hybridoma

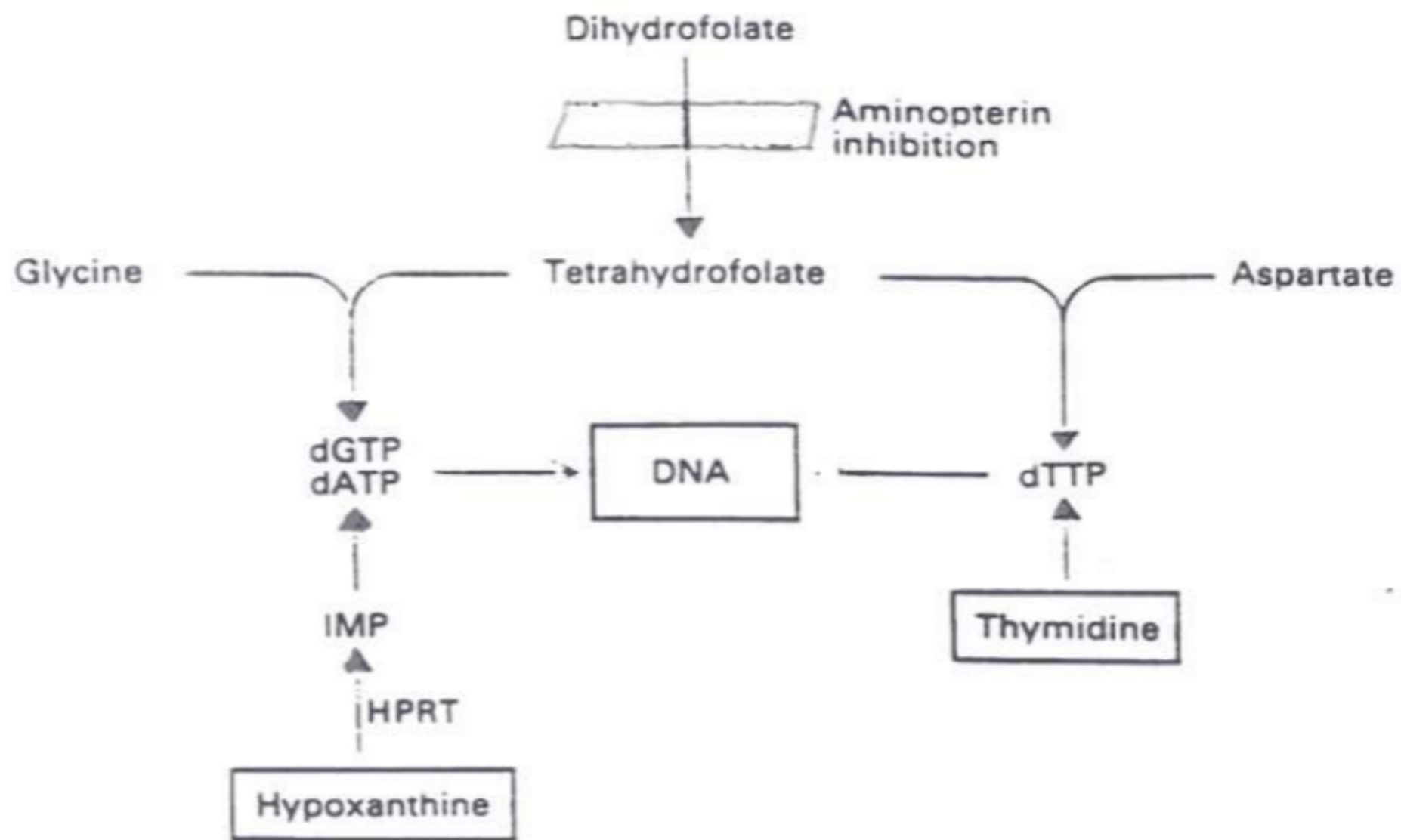
(expresses some normal B-cell or T-cell genes but
grows indefinitely like a cancer cell)

- Hibrit Hücrelerin Seçimi

- HAT ortamı hibrid hücrelerin seçimi için kullanılır

- HAT, Hipoksantin Aminopterin Timidin anlamına gelir

- Nükleotid sentezi hücrenin hayatta kalması için gereklidir
- HAT ortamında **aminopterin**, hücresel pürin ve pirimidinlerin basit şekerlerden sentezini engeller
- Ancak hücreler, *HGPRT* enzimi aracılığıyla salvage yolu ile ortamda bulunan hipoksantin ve timidini kullanarak gelişebilir



- HAT ortamı hibrid hücrelerin seçiminde nasıl çalışır?

- B hücreleri HGPRT + dir ve HAT ortamında hayatta kalabilirler, ancak bazı bölünmelerden sonra normal hücre ölümüne uğrarlar

- Hibridoma teknolojisinde kullanılan myeloma hücreleri HGPRT negatiftir

- Bu hücreler, Aminopterin Denovo yolunu bloke ettiği için HAT ortamında hayatta kalamaz

- Hibrid hücreler, B hücrelerinden gelen **HGPRT** enzimine sahiptir ve ayrıca myeloma hücreleri olarak tekrar tekrar çoğalma yeteneğine sahiptirler
- Böylece **HAT ortamında sadece hibrit hücreler hayatta kalabilir**

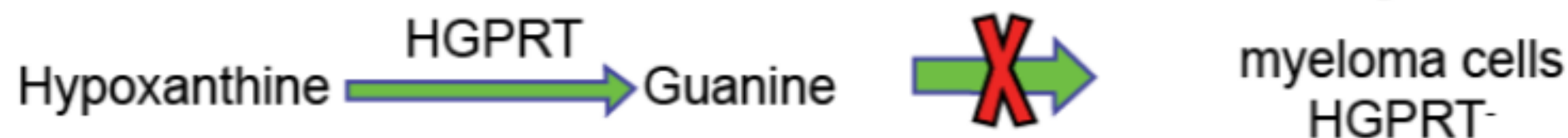
De novo pathway

Aminopterin



De novo pathway is blocked in all cells

Salvage pathway



Myeloma Cell

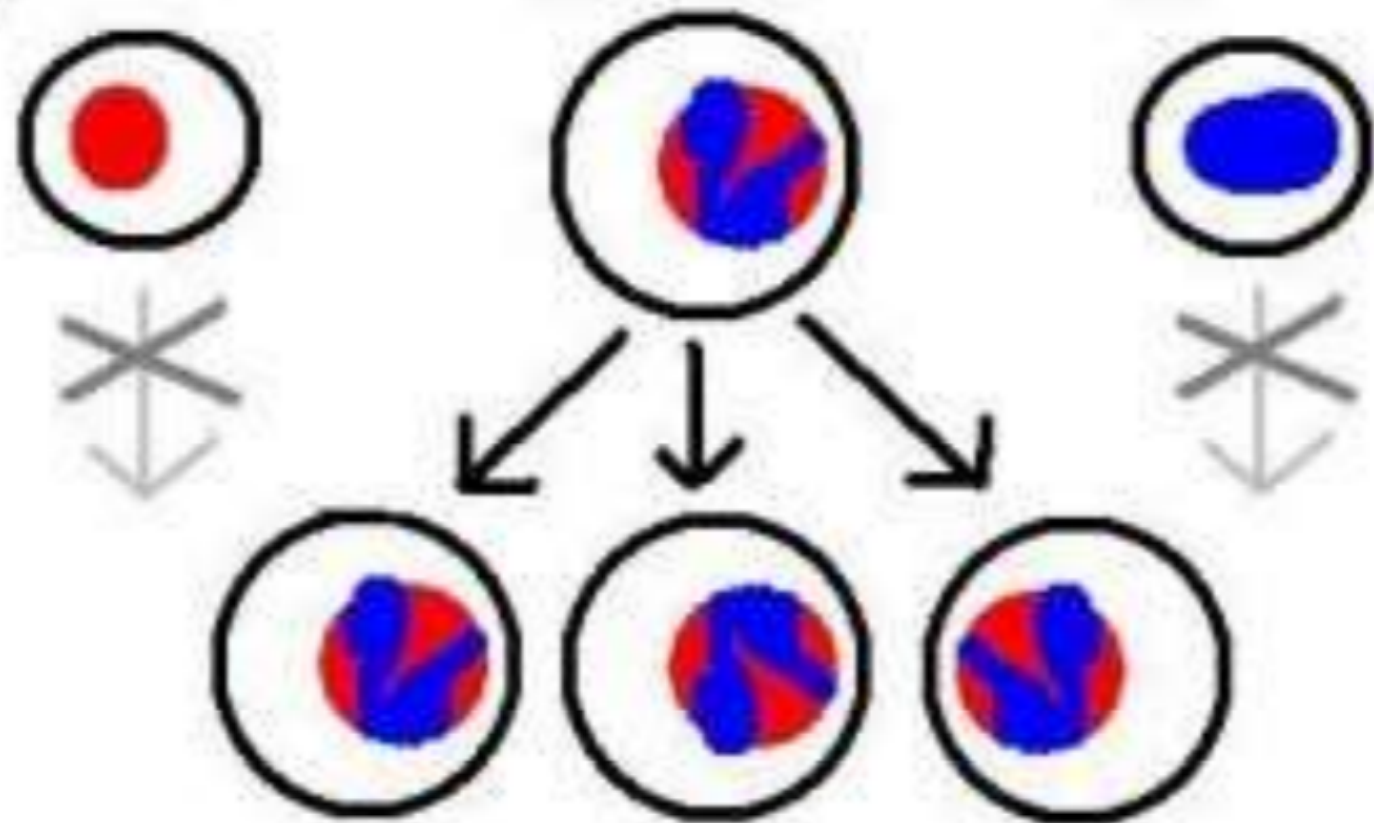
- Can grow in normal cell culture
- Lack salvage pathway enzymes
- DIE

Hybridoma

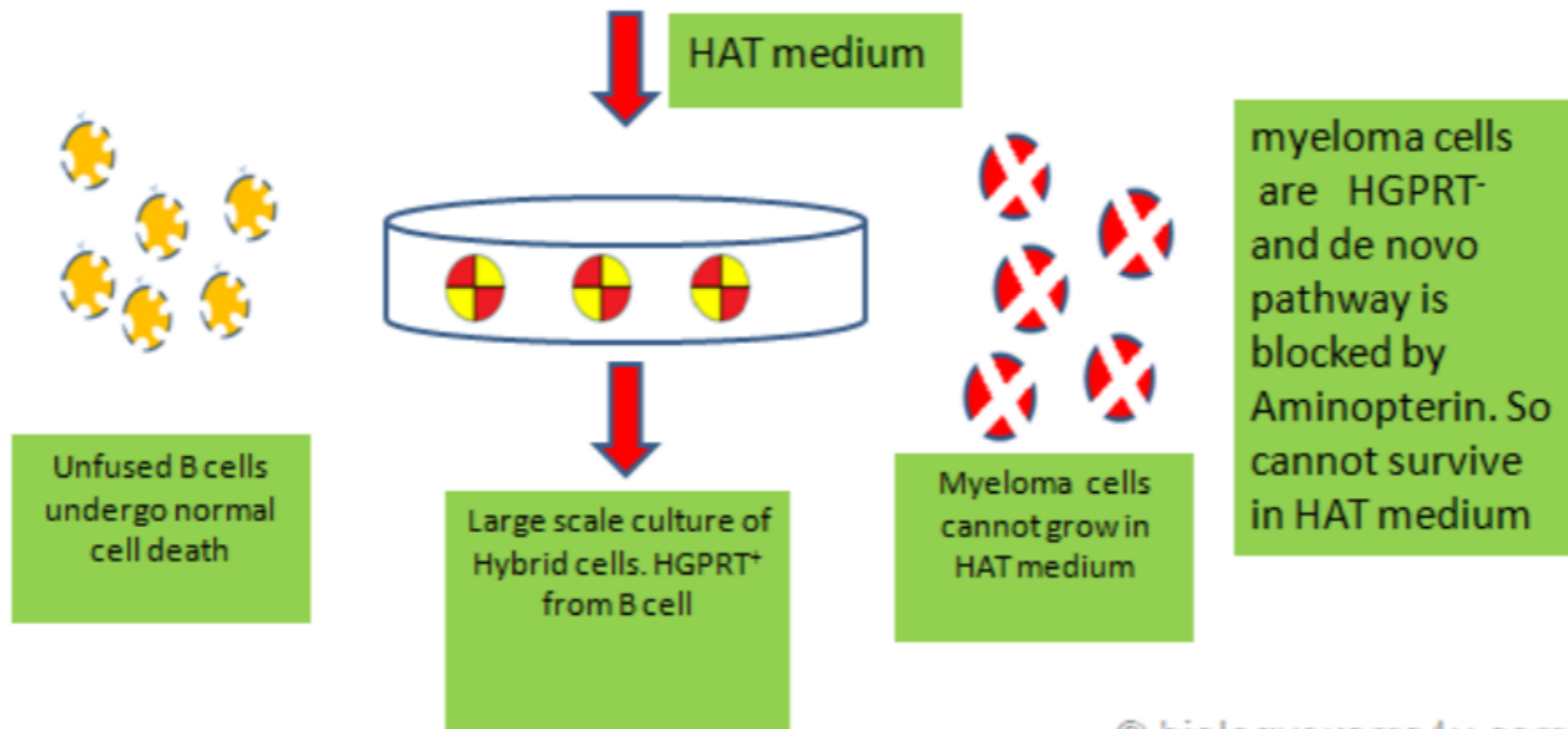
- Can grow in normal cell culture
- Possess salvage pathway enzymes
- PROLIFERATE

B-Lymphocyte

- Cannot grow in cell culture
- Possess salvage pathway enzymes
- DIE



How hybrid cells are selected in HAT medium?



-HAT ortamı (Hipoksantin Aminopetrin Timidin) monoklonal antikörlerin hazırlanması için kullanılır.

-Laboratuvar hayvanları (örn. Fareler) önce bir antikoru izole etmekle ilgilendiğimiz bir antijene maruz bırakılır.

- Splenositler memeliden izole edildiğinde, B hücreleri, polietilen glikol kullanılarak HGPRT (hipoksantin-guanin fosforibosil transferaz) geninden yoksun olan ölümsüzleştirilmiş miyelom hücreleri ile kaynaştırılır.

Hibridoma

Füzyon hücreleri HAT (HipoksantinAminopetrin Timidin) ortamında inkübe edilir.

Myeloma hücrelerinde aminopterin nükleotit sentezine izin veren yolu bloke eder.

Bu hücreler de novo veya salvage yolları tarafından nükleotit üretemedikleri için ölür,

- Kullanılmayan B hücreleri kısa ömürlü oldukları için ölürler.

- B hücrelerinden gelen HGPRT geni işlevsel olduğundan, sadece B hücre-myelom hibritleri hayatta kalır. Bu hücreler antikorlar (B hücrelerinin bir özelliği) üretir ve ölümsüzdür (miyelom hücrelerinin bir özelliği).

Alt klonlama

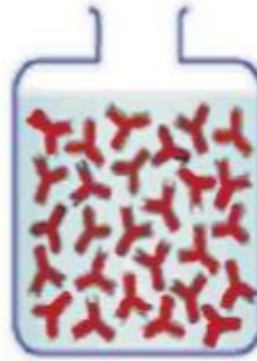
- İnkübe edilmiş ortam daha sonra her kuyuya sadece 1 hücre düşecek şekilde mikropalakalarda seyreltilir.
- Daha sonra her kuyudaki süpernatant, istenen antikor için kontrol edilebilir.
- Kuyudaki antikorlar aynı B hücresi tarafından üretildiğinden, aynı epitopa yönlendirilecekler ve monoklonal antikorlar olarak bilineceklerdir

Alt klonlama

- Çok kuyucuklu plakalar başlangıçta hibridomaları büyütmek için kullanılır ve bu hücreler daha sonra seçimden sonra daha büyük doku kültürü flasklarına aktarılır.
- Bu işlem hibridomaların sağlığını korur ve sonraki araştırmalar için, kriyoprezervasyon ve süpernatant eldesi (yüksek seviyede antikor) için yeterli hücre sağlar.



**only one
B-lymphocyte clone**



monoclonal antibody

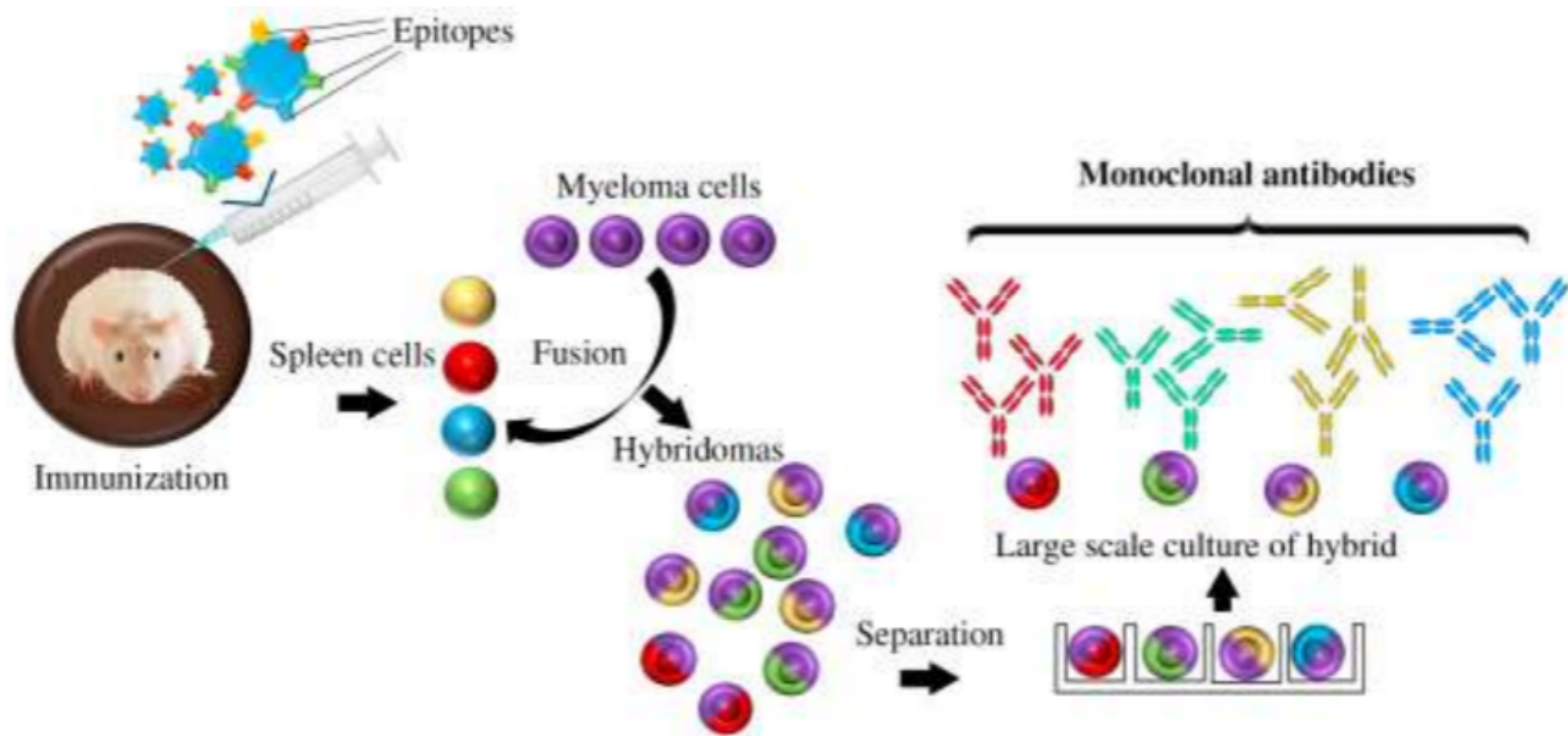


**more
B-lymphocyte clone**



Polyclonal antibody



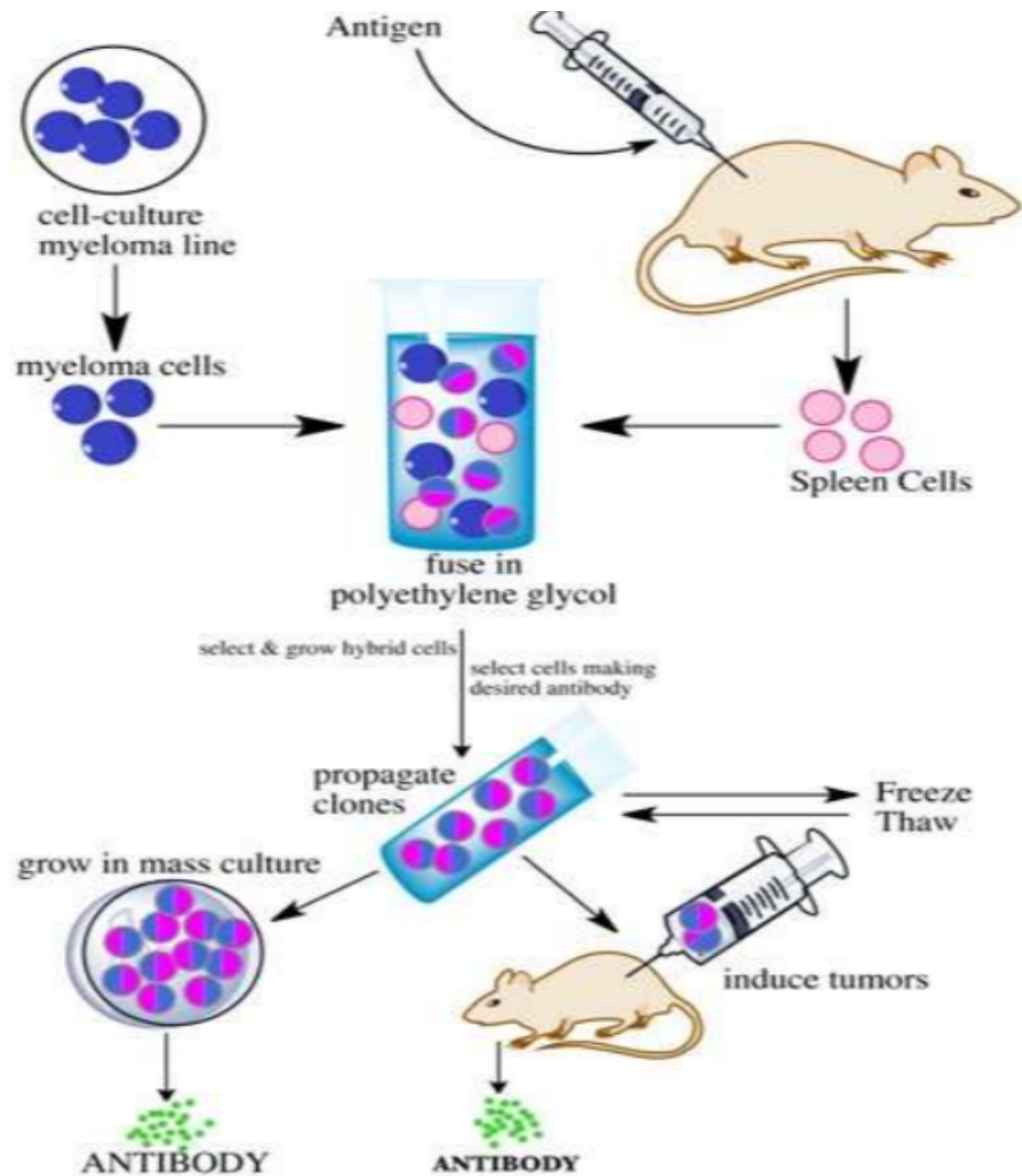


- Hibridom hücrelerini çoğaltmak için iki yöntem kullanılmıştır

1. In-vivo

2. in vitro

- In-vivo prosedür, hibridoma hücrelerinin hayvanın periton boşluğuna enjeksiyonunu içerir, daha sonra asetik sıvı izole edilir ve daha sonra antikorlar buradan izole edilir
- In-vitro yöntem hibridoma hücrelerinin uygun kültür ortamında kültürlenmesini içerir ve daha sonra antikorlar izole edilir ve saflaştırılır





Antigen



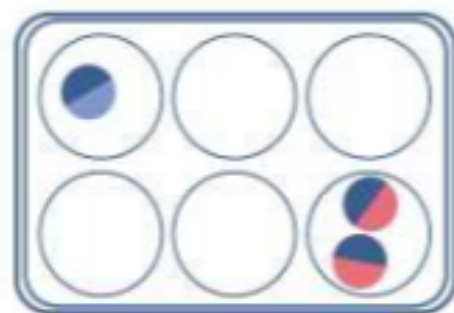
Immunization



Myeloma & Spleen



Cell Fusion



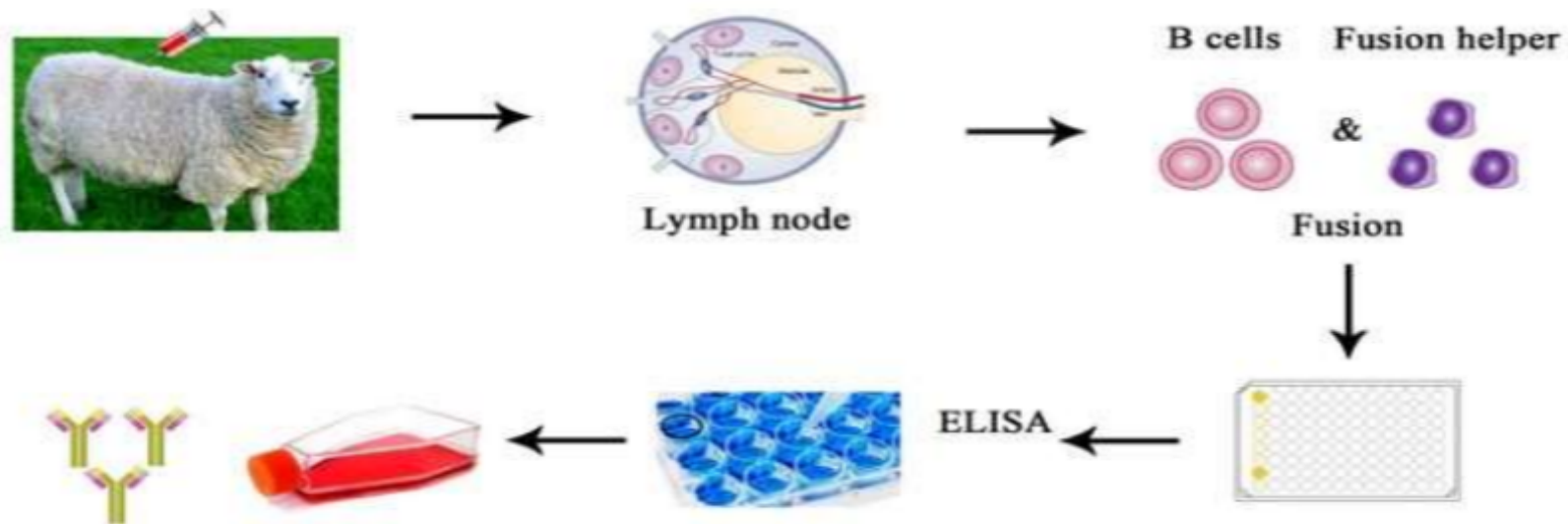
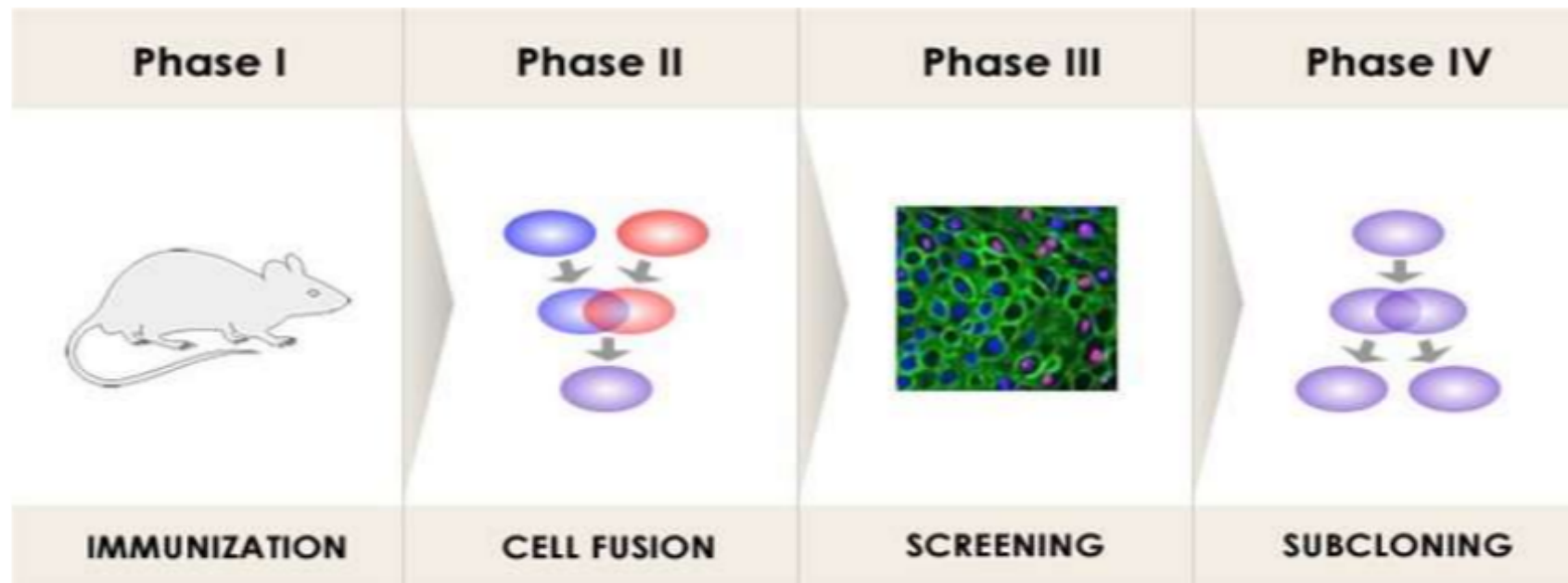
Subcloning



Production & Purification



Detection



ELISA NEDİR?

- Enzim bağlı immünosorbent deneyi
- **4 bileşen içerir**
 - Antikor
 - Katı faz (sorbent).
 - Enzim bağlı antikor
 - Substrat

ELISA NEDİR?

- Numunelerde spesifik molekülleri (örn. Proteinler ve karbonhidratlar) tespit etmek (tahlil etmek) için kullanılan teknik.
- İmmünolojik teknik: antikorlar kullanır
- Nicel analiz yapar
- Çok hassastır
- Tıbbi ve bilimsel araştırmalarda yaygın olarak kullanılır.

- Tanım :

- Enzime bağlı immünosorban testi (ELISA), bir maddeyi tanımlamak için antikorlar ve renk değişimi kullanan biyokimyasal bir tekniktir.
- ELISA mevcut en hassas ve tekrarlanabilir teknolojilerden biridir. Bu testler hızlı, uygulanması basit ve kolayca otomatikleştirilmiştir.

- Prensip :

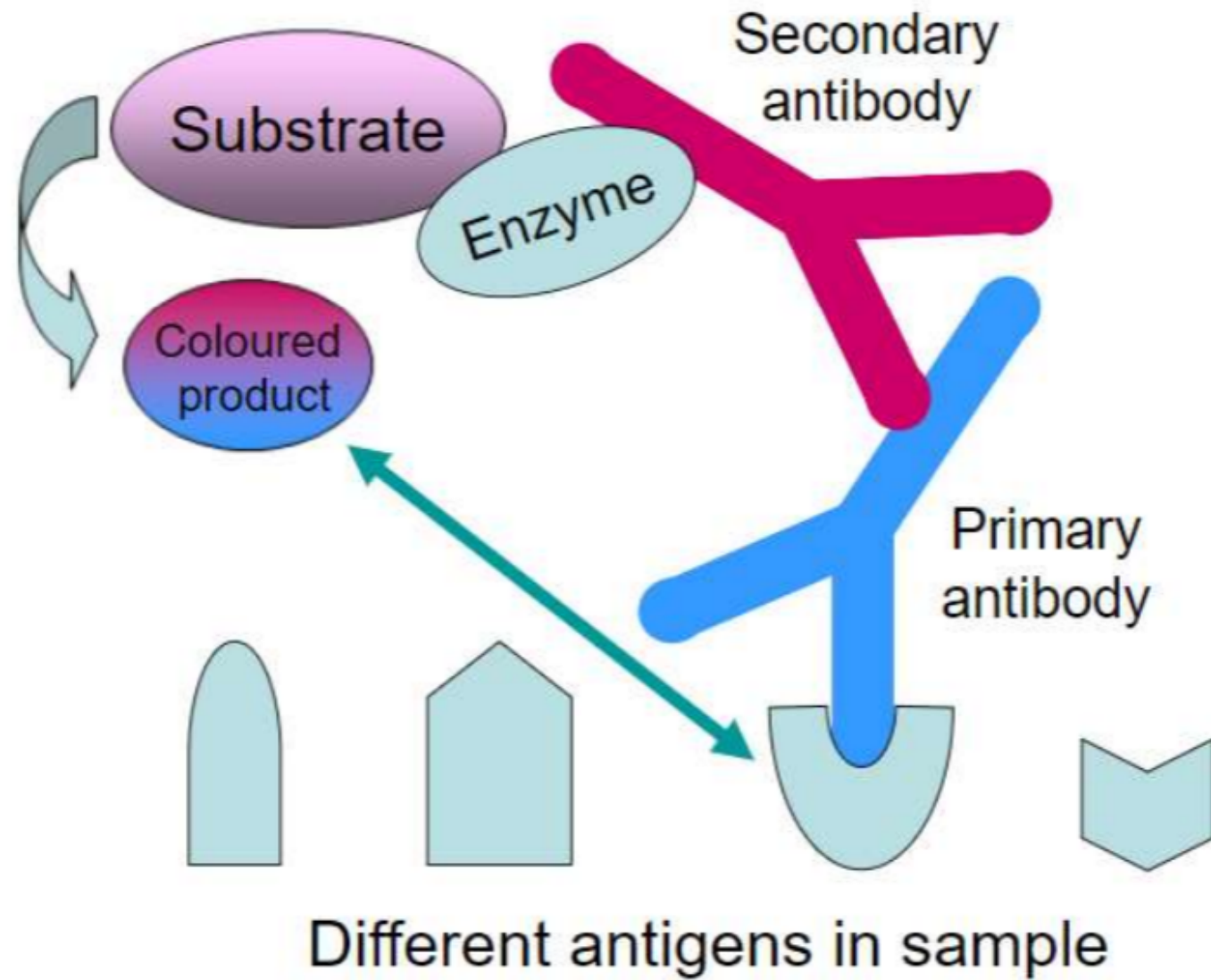
- ELISA, antikorların özgüllüğünü basit enzim tahlillerinin duyarlılığı ile birleştirir. (kolayca tahlil edilen bir enzime bağlı antikorlar veya antijenler kullanılarak).

ELISA, antijen veya antikor konsantrasyonunun ölçümü için yararlı bir yöntemdir

ELISA

Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testinin Temel Adımları

- 1. İlgili antijen, plastik yüzeye (sorbent) sabitlenir.
- 2. Antijen, spesifik antikor (immüno) tarafından tanınır.
- 3. Bu antikor, enzime bağlı (enzime bağlı) ikinci antikor (immüno) tarafından tanınır.
- 4. Substrat genellikle renkli olan ürün üretmek için enzimle reaksiyona girer.



The steps of "indirect" ELISA follows the mechanism below:-

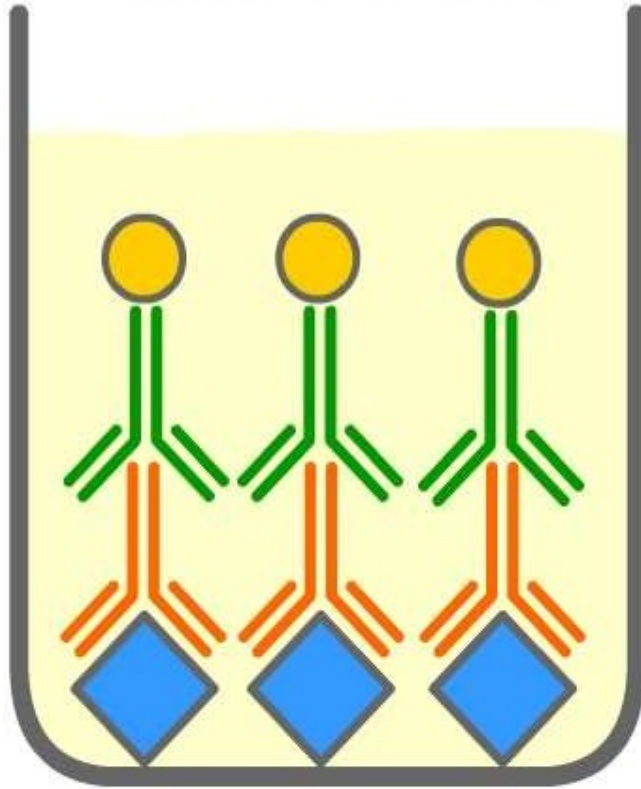
- Antigens are coated in the wells
- The primary antibody is added, which binds specifically to the test antigen coating the well.
- A secondary antibody is added, which will bind the primary antibody. This secondary antibody often has an enzyme attached to it, which has a negligible effect on the binding properties of the antibody.
- A substrate for this enzyme is then added
- The color change shows the secondary antibody has bound to primary antibody.
- The higher the concentration of the primary antibody present in the serum, the stronger the color change. Often, a spectrometer is used to give quantitative values for color strength.

Sandwich ELISA (Direct) :

Antigen-Capture (Direct) Format

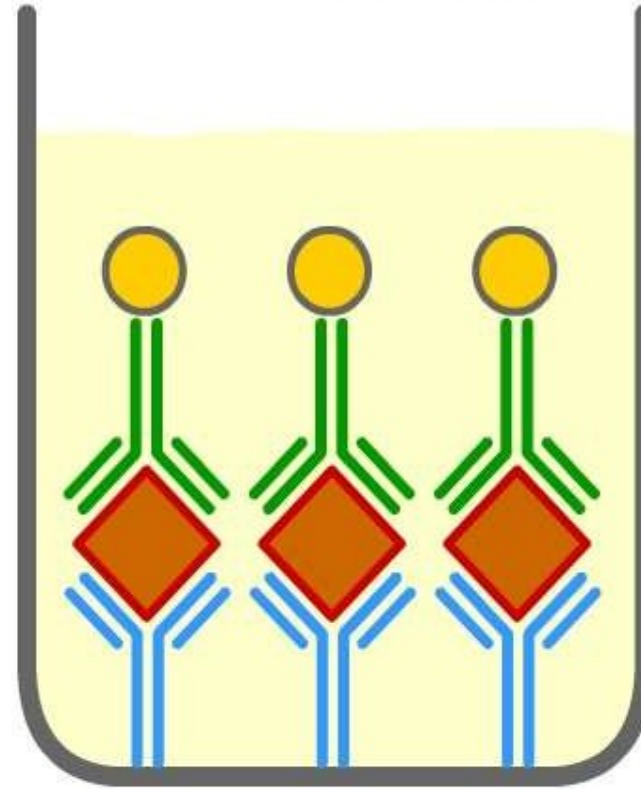
- In the antigen-capture format, the antigen in the sample is sandwiched between antibodies coated on the plate and an enzyme-labeled conjugate.
- The antibody conjugate can be either monoclonal or polyclonal.
- The addition of an enzyme substrate-chromogen reagent causes color to develop. This color is directly proportional to the amount of the target antigen present in the sample
- Plate is coated with a capture antibody. Sample is added, and any antigen present binds to capture antibody.
- Detecting antibody is added, and binds to antigen.
- Enzyme-linked secondary antibody is added, and binds to detecting antibody.
- Substrate is added, and is converted by enzyme to detectable form.

Indirect ELISA



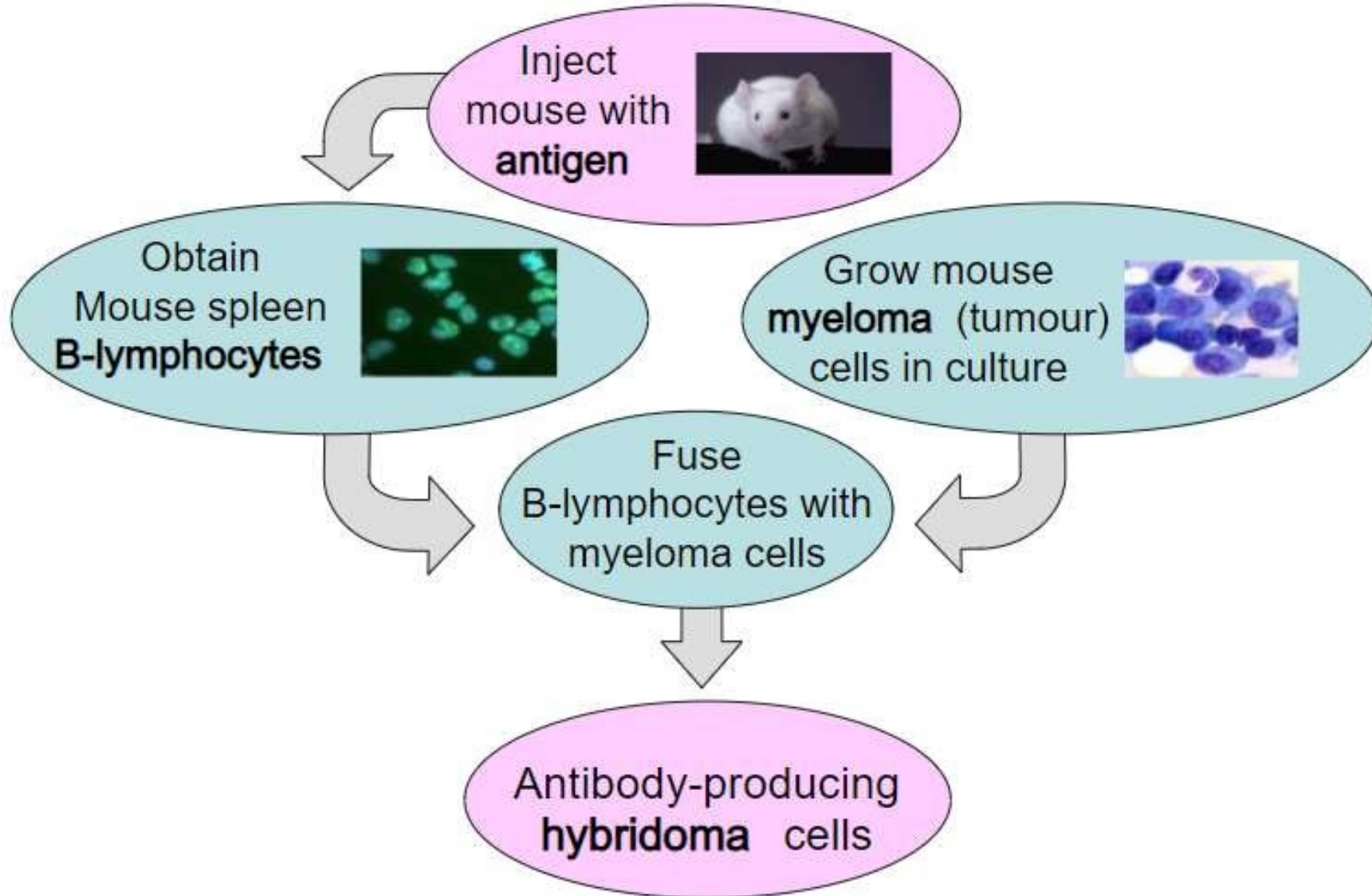
These reporter antibodies bind to the bound autoantibodies from the sample, forming a complex consisting of immobilised antigen, autoantibody and labelled reporter antibody. The wells are again rinsed to remove any unbound antibodies.

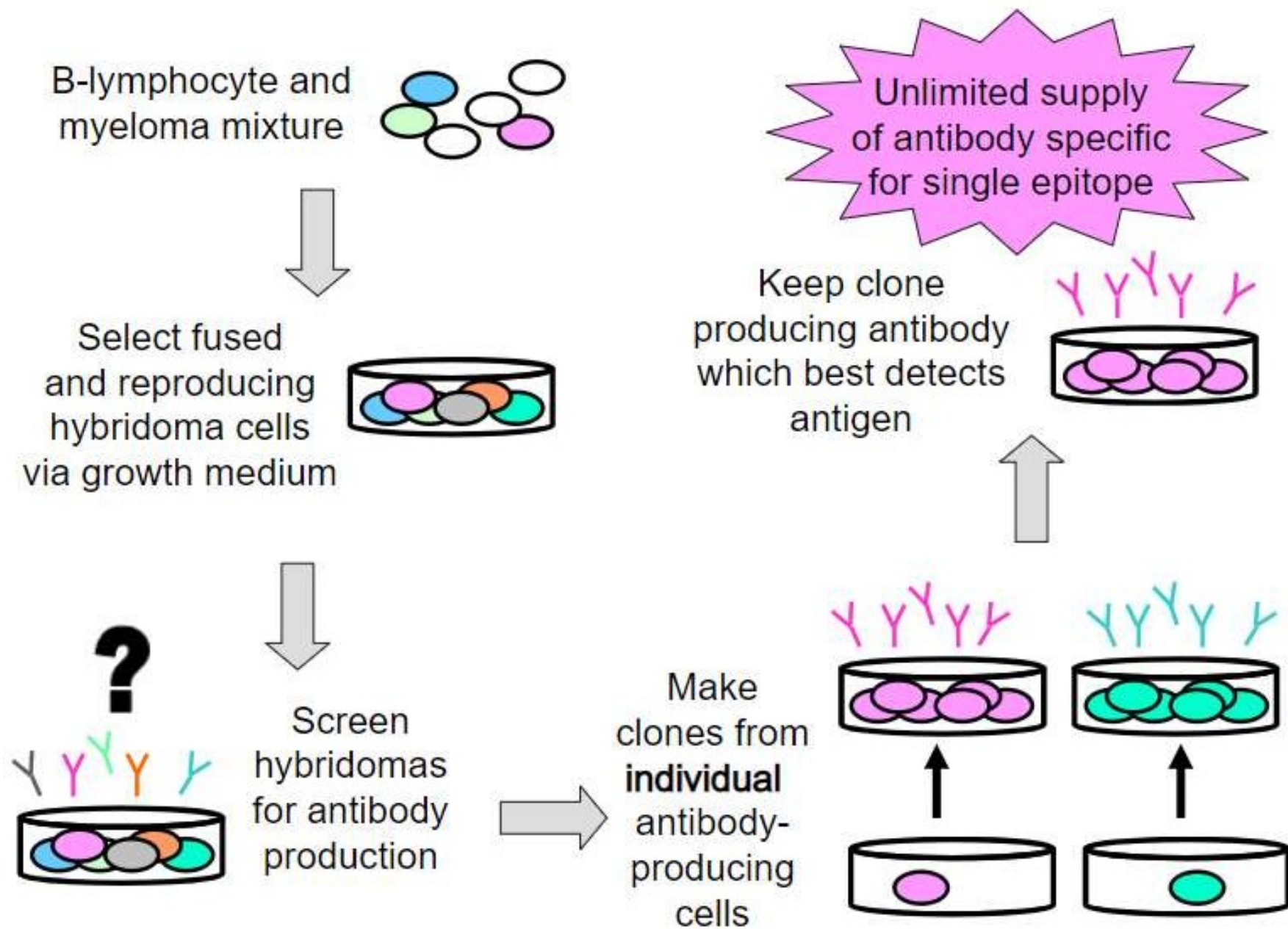
Direct ELISA



The secondary antibody attaches to the bound protein from the sample, forming a complex consisting of immobilised antibody, protein and labelled secondary antibody.

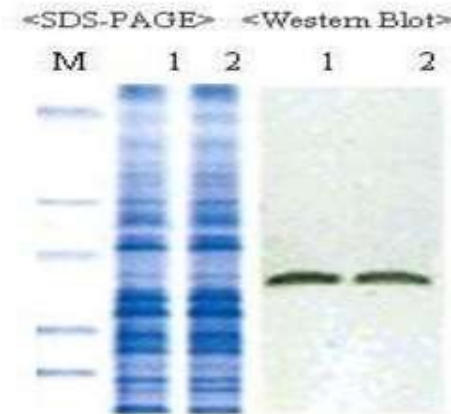
Monoclonal antibody production (hybridoma technology)





Monoclonal – Diagnostic use

- ▶ A monoclonal antibody can be used to **detect pregnancy** only 14 days after conception. Other monoclonal antibodies allow rapid **diagnosis of hepatitis, influenza, herpes, streptococcal, and Chlamydia infections.**
- ▶ They can be used to detect for the **presence and quantity of this substance**, for instance in a Western blot test (to detect a substance in a solution) or an immunofluorescence test.
- ▶ Monoclonal antibodies can also be used to **purify a substance** with techniques called **immunoprecipitation and affinity chromatography.**



Monoclonal antibodies for cancer treatment

- Possible treatment for **cancer** involves monoclonal antibodies that bind only to cancer cells specific **antigen** and induce immunological response on the target cancer cell (naked antibodies). mAb can be modified for delivery of [toxin], radioisotope, cytokine.

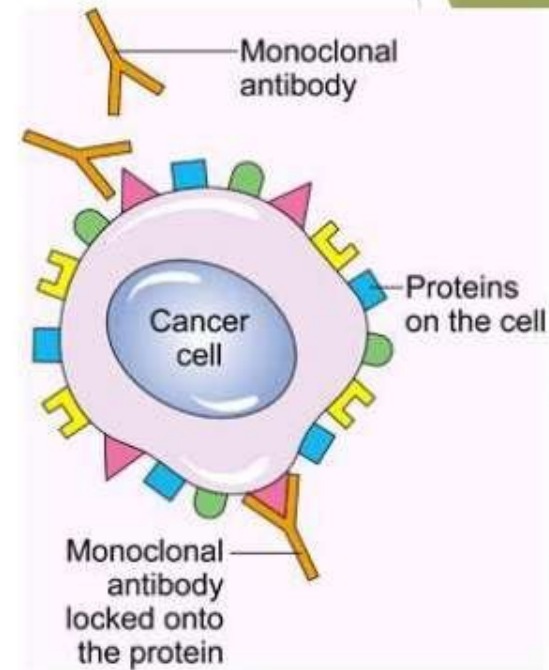


Diagram showing a monoclonal antibody attached to a cancer cell
© CancerHelp UK