

SIĞIR VEBASI VİRÜSÜNÜN HEMAGLUTİNİN PROTEİNİNE KARŞI MONOKLONAL ANTİKORUN ÜRETİMİ VE KARAKTERİZASYONU*

İrem GÜLAÇTI Hakan BULUT Yusuf BOLAT

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Elazığ – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 30.01.2004 Kabul Tarihi: 23.08.2004

ÖZET

Bu çalışmada, sığır vebası virüsünün (RPV) hemaglutinin proteinine (H) karşı monoklonal antikor (MA)'ların üretimi ve bu antikorların karakterize edilmesi amaçlandı. Mevcut çalışmada, ilk olarak, RPV'nin aşısı suşuyla (RBOK) immunize edilen farelerin dalak hücreleriyle myeloma hücreleri (FO) polietilen glikol-dimetil sülfoksit (PEG/DMSO) yardımıyla füzyon işlemi yapıldı. Hibrid hücrelerin seçimi hipoksantin-aminopterin-timidin (HAT) içeren hücre kültür vasatında gerçekleştirildi. Sığır vebası virüsüne karşı antikor salgılayan hibrid hücre kuyucuklarının seçimi enzime bağlı immunosorbent deneyi (ELISA) ile yapıldı. Limiting dilüsyon işlemini takiben gerçekleştirilen sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) ve immunblotting ile H proteinine karşı antikor salgılayan klonlar belirlendi. Klonlara ait antikorların alt tipleri ve nötralizasyon etkileri gibi bazı özellikleri karakterize edildi. Bu çalışma ile, RPV virüsünün hemaglutinin proteinine karşı MA'ların üretilmesi ve bu antikorların karakterize edilmesi gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sığır vebası virüsü, Monoklonal antikor, Hemaglutinin proteini

ABSTRACT

Production and Characterization of Monoclonal Antibody to Heamagglutinin Protein of Rinderpest Virus

In this study, production and characterization of monoclonal antibody (Mabs) to heamagglutinin protein of rinderpest virus (RPV) were aimed. In present study, initially, splenocytes from the mice immunized with RPV-RBOK and myeloma cell line (FO) were fused by polyethylene glycol-dimethyl sulfoxide (PEG/DMSO). For the selection of hybrid cell lines, the cell culture media containing hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) was used. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was utilized to select hybrid cell line producing antibodies against RPV. After limiting dilution procedure, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunblotting were used to determine the specificity of anti-H Mab. These antibodies were characterized for certain properties such as sub-type and neutralization affect. With this study, production and characterization of monoclonal antibody (Mabs) to heamagglutinin protein of rinderpest virus (RPV) was carried out.

Key Words: Rinderpest virus, Monoclonal antibody, Hheamagglutinin protein

GİRİŞ

Sığır vebası hastalığı evcil ve yabani ruminantların %95 mortalite ve morbiditeyle seyreden akut, ateşli bir hastalıktır. Uzun yıllar devam ettirilen savaşım neticesinde ülkemizde, bugün, bu hastalık görülmemektedir (1). Ancak, bazı Asya ve Afrika ülkelerinin hastalığı eradike edememiş olmaları, ülkemizi hastalığın yayılması bakımından riskli duruma düşürmektedir (2, 3). Bu bakımdan, ülkemizin bu hastalığa karşı yeterli bilgi birikimi ve teknolojik ekipmanlara sahip olmasında yarar vardır.

Sığır vebası virüsünün (rinderpest virüs, RPV) en önemli zarf proteinlerinden biri olan, hemaglutinin proteini (H) virüsün biyolojisi açısından gereklidir (4). Bu protein hedef hücre resöptörüne virüsün bağlanmasını sağlayarak, enfeksiyonu başlatır (5, 6). Ayrıca, virüsle enfekte konakçıda H proteinine karşı

oluşan sıvısal yanıt enfeksiyona karşı korunmada önemli rol oynar (7, 8) Yukarıdaki nedenlerden dolayı, H proteini gerek enfeksiyonu engellemek amacıyla gerekse teşhis için virüsün öncelikli hedef proteini olarak sıklıkla çalışılmıştır (9-11).

Virolojide kullanılan teşhis yöntemlerinin pek çoğunun temel kurgusu antijen-antikor ilişkisine dayalıdır. Bu amaçla antikor olarak poliklonal yada monoklonal antikor (MA)'lar kullanılmaktadır. Özgüllükleri nedeniyle, MA'nın poliklonal antikorlara kıyasla viral teşhis yöntemlerinde kullanılmaları hızla artmıştır ve bu nedenle bir çok virüsün önemli proteinlerine karşı MA'lar üretilmiştir (10-12).

Bu çalışmada, sığır vebası virüsünün en önemli yapısal proteinlerinden biri olan H proteinine karşı MA'ların üretimi ve bu antikorların karakterizasyonu amaçlanmıştır.

* Bu çalışma İrem GÜLAÇTI'nın doktora tezinin özeti olup Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (fubap 528) desteklenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Virüs : Bu çalışmada, sığır vebası virüsünün aşısı (RBOK) kullanıldı. Bu virüs Afrika Yeşil Maymun Böbrek (Vero) epitel hücresinde üretildi. Sitopatik etki %80'ne ulaştığı zaman enfekte hücre üst sıvısı toplandı. Virüsün hücre kültüründeki enfeksiyözite gücü DKID₅₀: 10^{4.5}/0,1 ml olarak belirlendi. Enfekte hücre üst sıvıdan polietilen glikol (PEG) presipitasyon metoduyla kısmi pürifiye virüs elde edildi (13).

Farelerin İmmünizasyonu : İmmünizasyonlarda 6-8 haftalık 5 tane dişi Balb/c fareleri (Gebze Marmara Araştırma Enstitüsü, Kocaeli) kullanıldı. Polietilen Glikol presipitasyon yöntemi ile elde edilen RPV antijeninin 200 µl ile Freund Complete Adjuvant'ın (Sigma Chemical Co., St. Louis MO., USA) 200 µl'si çift geçişli enjektör kullanılarak emülsifiye edildi (14). Bu karışım farelere intraperitoneal (İP) yolla verildi. İlk immunizasyondan 15 gün sonra, aynı miktarda virüs bu kez Freund Incomplete Adjuvant (Sigma Chemical Co., St. Louis MO., USA) ile emülsifiye edilerek, İP yolla uygulandı. İmmünizasyondan bir hafta sonra farelerden intraorbital yolla kan alınarak serumları çıkarıldı. Elde edilen bu serumlar ELISA ile test edilerek en iyi immun yanıtı veren fare belirlendi. Bu fareye İP yolla 500 µl kısmi pürifiye RPV antijeni tekrar verildi. Bu farenin dalak hücreleri immunizasyondan üç gün sonra füzyonda kullanıldı.

Füzyon : En son immunizasyondan üç gün sonra füzyonda kullanılacak fare dislokasyon yöntemiyle öldürüldü. Bu farenin dalağı çıkartıldı ve dalak hücreleri hücre vasatı ile 3 kez yıkandı. Füzyondan bir hafta önce hücre üretme vasatında (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12; Sigma Chemical Co., St. Louis MO., USA) üretilmeye başlayan myeloma hücreleri (FO; American Type Culture Collection, MD, USA) de eş zamanlı olarak hücre vasatında yıkandı. Füzyon amacıyla yaklaşık 20 milyon myeloma hücresi ve 80 milyon dalak hücresi PEG/DMSO ile füzyon işlemine tabi tutuldu. Hücreler %20 fetal calf serum (FCS) ve HAT (hipoksantin-aminopterin-timidin) içeren seçici vasatla süspanse edildi. Hücre süspanسیونları 24 kuyucuklu hücre kaplarının her kuyucuğuna 1 ml olarak dağıtıldı. Kaplar % 5 CO₂ içeren etüve kaldırıldı (14).

Füzyonun beşinci gününde kontrol kuyucukları hariç tüm kuyucuklardan vasat alınarak alınan miktar kadar HAT'lı vasat bırakıldı. Takip eden günlerde üç gün arayla aynı işlem tekrar edildi. Füzyonun 14. gününden sonra, kuyucuklardan alınan HAT'lı vasat yerine aynı miktarda HT (hipoksantin-timidin) içeren

vasat bırakıldı. Üremenin olduğu kuyucuklar belirlenerek bu kuyucuklardan üst sıvı alındı ve ELISA'da test edildi (14).

Enzime Bağlı İmmunosorbent Deneyi : Farelerin immunize edilmesinde PEG pürifiye RPV antijeni kullanılmasına rağmen, ELISA'da üst sıvıları test etmek için ELISA kaplarına tam pürifiye RPV antijeni (Hayvan Sağlığı Enstitüsü, Pirbright, UK) kaplandı. Hibridoma üst sıvıları ile immun fare, non-immun fare ve FO üst sıvıları tam pürifiye RPV antijeni bağlı kaplarda Doymaz ve ark. tarafından bildirilen yöntemle test edildi (14).

Limiting Dilüsyon : ELISA sonucu, RPV'a özgül antikor salgıladıkları belirlenen kuyucuklardaki hücreler 25 cm²'lik hücre üretme kabına alınarak çoğaltıldı. Çoğaltılan bu hücrelerin 3/4 dondurulurken, geri kalan hücrelerle limiting dilüsyon işlemi yapıldı (15). Bu işlemde 1 ml vasata 10 tane hücre düşecek şekilde dilüsyonun yapılması ve böylelikle 96 kuyucuklu kapların her kuyucuğuna bir hücre düşürülmesi amaçlandı. Bir ml vasat içinde sulandırılan hücreler 10 adet kuyucuğuna aktarıldı ve tek hücre düşen kuyucuklar işaretlendi. Bu kuyucuklar yeterli hücre sayısına ulaştıklarında, üst sıvılarından ELISA işlemi tekrarlandı. ELISA'da pozitif olduğu belirlenen kuyucuklardaki hücreler 25 cm²'lik hücre üretme kaplarında çoğaltıldı. Bu kaplardaki üst sıvılar 10 gün sonra toplandı ve üst sıvılar SDS-PAGE ve immunblotting ile test edildi. Ayrıca, üst sıvılar SDS-PAGE ve immunblotting sonuçları alındıktan sonra alt tip tayininde kullanılmak için -20 °C'ye kaldırıldı.

Kaplarda kalan hücreler sırasıyla 75, 125 ve 250 cm²'lik hücre kültür kaplarında çoğaltıldı. Üst sıvılar saklanırken hücreler dondurularak azot tankında saklandı. Bu hücreler 2 ay sonra çözülürerek antikor üretme yeteneği ELISA ile tekrar test edildi.

Antikorların alt tip tayinleri, ticari (Sigma Chemical Co., St. Louis MO., USA) bir fare IgG tiplendirme kiti (Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagent) kullanılarak belirlendi.

SDS-PAGE ve immunblotting : Bu amaçla, ilk olarak, PEG pürifiye RPV ve enfekte olmayan Vero proteinleri %5 yığılmayı ve % 10 çözücü jelde yürütüldü. Daha sonra yürütülen proteinler nitroselüloz membrana transfer edildi. Transfer işlemini takiben nitroselüloz membran uzun şeritler halinde kesildi. Bu şeritler kullanılarak ELISA pozitifliği belirlenen ve 25 cm²'lik hücre üretme kaplarında çoğaltılan füzyon üst sıvıları Doymaz ve ark. tarafından bildirilen yöntemle test edildi (14).

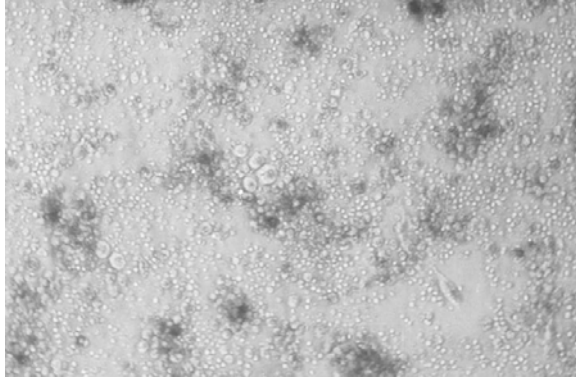
İmmunoblotting de belirlenen bantların yaklaşık büyüklüğü üretici firmanın belirtmiş olduğu metot kullanılarak (Sigma Chemical Co., St. Louis MO., USA) Relative mobility (Rf) hesaplamasına göre belirtildi.

Nötralizasyon : SDS-PAGE and immunblotting ile H proteinine karşı antikorların belirlendiği üst sıvıların nötralizan etkileri Vero hücreleri üzerinde test edildi (16).

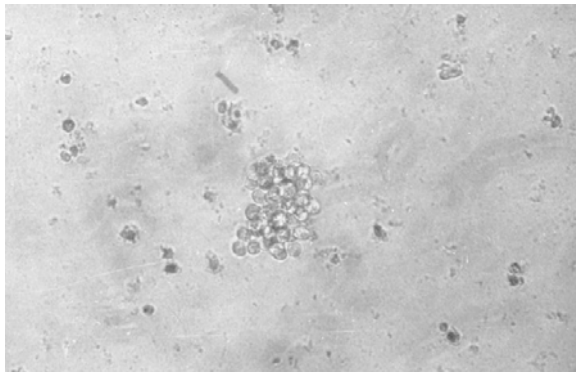
BULGULAR

Çalışma boyunca RPV ile immunize edilmiş 5 tane fare kullanıldı. İlk iki füzyon denemesinde hiçbir hibridoma oluşumu gözlenmedi. Diğer üç füzyon denemesinde toplam 150 farklı hibridoma klonu oluştu.

Genel olarak füzyonların 4. gününden sonra 4-5 hücreden oluşan hibridoma kolonileri tespit edilmeye başlandı (Şekil 1). Bu kolonilerdeki hücrelerin sayılarının 10. günde artmaya başladığı gözlemlendi (Şekil 2).



Şekil 1. Füzyonun 4. gününde hibridoma kolonilerinin mikroskopik görüntüsü (100X).

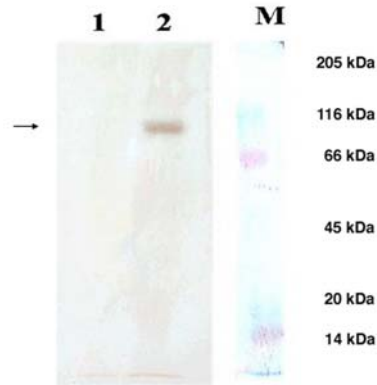


Şekil 2. Füzyonun 10. gününde hibridoma kolonisinin mikroskopik görüntüsü (100X).

Füzyonun onyedinci gününde hücre üremelerinin devam ettiği kuyucuklar belirlendi ve kuyucuklardan alınan üst sıvılar ELISA ile test edildi. ELISA sonucunda, üç füzyonda 150 farklı hibridomannın 12'sinin RPV'ye spesifik antikor oluşturduğu tespit edildi.

ELISA verilerinden sonra gerçekleştirilen limiting dilüsyon işleminde tek hücrelerin düştüğü 20 tane kuyucuk elde edildi. Limiting dilüsyon işlemini takiben yaklaşık 15. günde bu kuyucuklarda alınan üst sıvılar da ELISA ile test edildi ve bu hücrelerin RPV antikorunu üretmeye devam ettiği saptandı.

Limiting dilüsyon aşamasından sonra H özgül klonları seçmek için SDS-PAGE ve immunblotting deneyi gerçekleştirildi. Bu testler sonucunda ELISA ile RPV'ye spesifik antikor oluşturan 20 tane tek klondan elde edilen üst sıvıların yalnızca 4 tanesinin yaklaşık 75 kilo Dalton (kDa)'luk H proteiniyle pozitif immun reaksiyon verdiği belirlendi (Şekil 3).



Şekil 3. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez ve immunblotting deneyleri ile H proteinine pozitif reaksiyon veren antikorun üretildiği klonun belirlenmesi. M; Marker, 1; Enfekte olmayan Vero hücresi 2; PEG pürifiye RPV.

Bu antikorların ELISA ile izotiplendirilmeleri neticesinde, iki tanesinin IgG1, diğer ikisinin ise IgG2b ve IgG2a izotipleri oldukları tespit edildi. Gerçekleştirilen nötralizasyon denemeleri sonucunda antikorların hiç birisinin nötralizan özellikte olmadıkları görüldü.

TARTIŞMA

Monoklonal antikor üretiminin başarılabilmesi için öncelikli olarak füzyonun başarıyla gerçekleştirilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (17). İki farklı hücrenin membranlarının bileştirilerek tek hücre elde edilmesinin teorikte olduğu kadar kolay olmadığı bu teknolojiyi kullanan bilim adamları tarafından kabul edilmektedir. Füzyon işleminin olabilmesi veya daha etkin oranda gerçekleşmesi için

gerekli olan ilk kriter füzyonda kullanılan uygun ajandır. Uzun yıllardır bu amaçla PEG tek başına kullanılmıştır. Ancak, PEG ile birlikte DMSO'nun kullanımının füzyon etkinliğini artırdığı belirtilmiştir (15). Bu nedenle, ilk iki füzyon denemesi hariç, bu çalışmada son 3 füzyonda PEG-DMSO kullanılmıştır. İlk iki füzyondaki başarısızlıkların nedeni yalnızca füzyon ajanına bağlanmadığından diğer füzyonlarda, füzyonu ve hibrid hücre oluşumunu etkilediği bilinen diğer bazı parametreler de değiştirilmiştir. Bunlar; füzyondan sonra kullanılan vasatların ve serumun klon oluşumu için test edilmiş olması, çok sağlıklı myeloma hücreleriyle füzyona girilmesi ve füzyon gününden sonraki pH'nın günlük olarak takibidir. Yapılan bu değişiklikler neticesinde son 3 füzyonda da başarılı şekilde hibridoma elde edilmiştir.

Bu çalışmada ELISA'da katı faz antijeni olarak tam pürifiye virüs partikülü kullanılmıştır. Bu nedenle, ELISA sonucu belirlenen pozitifliklerin virüsün yalnızca zarf proteinlerine karşı olması beklenmektedir. Sonuç olarak, bu çalışmada, RPV'ye özgül antikorlar salgıladığı ELISA ile belirlenen 12 farklı hibrid hücre klonundan elde edilen üst sıvıların ya H ya da RPV'nin füzyon (F) proteinine karşı antikorları üretmeleri beklenen bir durumdur. Ancak, bu üst sıvıların yalnızca 4 tanesinin H proteinine özgül immun tepkime verdiği SDS-PAGE ve immunblotting ile belirlenmiştir. Diğer 8 üst sıvıda ise her hangi bir proteine karşı reaksiyon saptanmamıştır. Bu durumun muhtemel nedeni olarak, SDS-PAGE ve immunblotting de işlenen viral proteinlerdeki kaynatma esnasındaki epitopik

denatürasyonları olabilir. Böylelikle, denatüre epitoplarla mevcut MA'ların bileşmesi olmamaktadır (14, 15). Füzyon proteininin dimerik yapısı dikkate alındığında, H proteininden fazla denatürasyondan etkilenmesi olası bir durumdur (18). Denatürasyon etkinliğini ortadan kaldırmak amacıyla immunblottingden önce natif jel elektroforezi yapılması önerilebilecek bir çözüm olarak görülmektedir. Ayrıca, radioaktif işaretlendirme gerçekleştirilebildiği takdirde, immunopresipitasyon bu amaçla daha akılcı uygulama olarak kabul edilmektedir. Bu doğrultuda çalışmalara devam edilmektedir (19).

Bu çalışmada elde edilen MA'ların hiçbirinin nötralizan özellikte olmadığı belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda da H proteine karşı elde edilen monoklonal antikorların tek başlarına nötralizan özellikte olmadıkları, F protein antikorları veya komplemanın varlığı ile birlikte bu etkiyi gösterdikleri ifade edilmiştir (16).

Bu çalışma sonucunda RPV virüsünün en önemli zarf proteinlerinden birine karşı MA'ların üretilmesi ve bu antikorların karakterizasyonları yapılmıştır. Bu çalışma, MA teknolojisinin laboratuvarımıza yerleştirilmesine yönelik olarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, elde edilen antikorların H proteinine karşı olması da, bu antikorların daha sonraki çalışmalarda geniş amaçlı kullanımlarına imkan sağlayacak olması açısından önemli görülmektedir. Bu nedenle de mevcut MA'ların, ELISA başta olmak üzere, teşhis amaçlı deneylerde kullanımına yönelik çalışmalarımız devam etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Food and Agriculture Organization. Rinderpest in Turkey. The EMPRES Transboundary Animal Disease Bulletin 1999; 9: 4.
2. Anderson J, McKay JA. The Detection of antibodies against peste des petits ruminants virus in cattle, sheep and goats and possible implications to rinderpest control programmes. Epidemiol Infect 1994; 112: 224-231.
3. Taylor WP, Bhat PN, Nanda Y P. The principles and practise of rinderpest eradication. Vet. Microbiol 1995; 44: 359-367.
4. Dash SC, Baron MD, Barret T. Recovery and characterization of a chimeric rinderpest virus with the glycoproteins of peste des petits ruminant virus: Homologous F and H proteins are required for virus viability. J. Virol 2000; 74: 9039-9047.
5. Lund BT, Tiwari A, Galbraith S et al. Vaccination of cattle with attenuated rinderpest virus stimulates Cd4⁺ T cell responses with broad viral antigen spesifity. J Gen Virol 2000; 81: 2137-2146.
6. Sinnathamby G, Naik S, Renukaradhya GJ et al. Recombinant hemagglutinin protein of rinderpest virus expressed in insect cells induces humoral and cell mediated immune responses in cattle. Vaccine 2000; 19: 3870-3876.
7. Giavedoni L, Jones L, Mebus C et al. Vaccinia virus double recombinant expressing the F and H genes of rinderpest virus protects cattle against rinderpest and causes no pock lesions. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 8011-8015.
8. Sangeeta N, Renukaradhya GJ, Rajasekhart M et al. Immunogenic and protective properties of haemagglutinin protein (H) of rinderpest virus expressed by a recombinant baculovirus. Vaccinia 1997; 15: 603-607.
9. Verardi PH, Aziz FH, Ahmad S et al. Long-term sterilizing immunity to rinderpest in cattle vaccinated

- with a recombinant vaccinia virus expressing high levels of the fusion and hemagglutinin glycoproteins. *J Virol* 2002; 76: 484-491.
10. Diallo A, Libeau G, Couacy-Hymann E et al. Recent developments in the diagnosis of rinderpest and peste des ruminants. *Vet Microbiol* 1995; 44: 307-317.
 11. Wambura PN, Mollel JO, Moshy DW et al. Rinderpest antibody detected in sheep and goats before an outbreak of rinderpest reported in cattle in northern Tanzania. *Trop Anim Health Prod* 1999; 31: 9-14.
 12. Fener M, Binz H. Monoclonal antibodies specific for sendai virus: I. production and characterization of monoclonal antibodies. *Scand J Immunol* 1986; 24: 335-340.
 13. Killington RA, Stokes A, Hierholzer JC. PEG Precipitation. Mahy BWJ, Kangro HO. (Editors). *Virology Methods Manual*. New York., Academic Press, 1996; 73-74.
 14. Doymaz MZ, Bulut H, Özdarendeli A ve ark. Production and characterization of monoclonal anti-ovalbumin antibodies. *Tr J Med Sci* 2000; 30: 411-416.
 15. Harlow E, Lane D. *Antibodies A Laboratory Manual*. New York., Cold Spring Harbor Laboratory . 1988.
 16. Bassiri M, Ahmad S, Giavedoni L et al. Immunological responses of mice and cattle to baculovirus-expressed F and H proteins of rinderpest virus: Lack of protection in the presence of neutralizing antibody. *J Virol*. 1993; 67: 1255-1261.
 17. De St. Groth SF, Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: Strategy and tactics. *J Immunol Method*. 1980; 35: 1-21.
 18. Fenner FJ, Gibbs EPJ, Murphy FA et al. *Paramyxoviridae*. *Veterinary Virology*. 2nd Edition. San Diego, Academic Press. 1993; 471-487.
 19. Grubman MJ, Mebus C, Dale B et al. Analysis of the polypeptides synthesized in rinderpest virus-infected cells. *Virology* 1988;163: 261-267.

Yazışma Adresi: İrem GÜLAÇTI, Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı 23119 Elazığ – TÜRKİYE
Tel: 0 424 237 00 00 / 6737 e-posta: iremgulacti@hotmail.com igulacti@firat.edu.tr
