

## ANTİFOSFOLİPİD SENDROMU OLAN BİR HASTADAN MONOKLONAL ANTI- $\beta$ 2 GLİKOPROTEİN ANTİKORLARININ ÜRETİLMESİ

Murat İNANÇ\*

### ÖZET

Tekrarlayan arter veya ven trombozları ve /veya fetus kayıpları ile birlikte antifosfolipid antikorların (AFLA) saptanması antifosfolipid sendromu (AFS) olarak tanımlanmıştır. AFS'li hastalarda saptanan AFLA'ların önemli bir bölümünün sadece fosfolipidlere değil  $\beta$ 2-glikoprotein ( $\beta$ 2GPI) ve protrombin başta olmak üzere plazma proteini içeren ve protein kofaktör-fosfolipid'den oluşan antijen komplekslerine bağlandığı ortaya konmuştur. Yapılan araştırmalar anti- $\beta$ 2GPI antikorların AFS patogeneziindeki önemini belirlemekle birlikte, bu otoantikorların ortaya çıkışlarının ve patojenik etkilerinin mekanizmaları tam olarak açıklanamamıştır. Bu çalışmada AFS'li bir hastanın dalağından elde edilen B-hücreleri kullanılarak yapılan füzyon deneyi ile hibridoma oluşturularak monoklonal anti- $\beta$ 2GPI elde edilmesi amaçlanmıştır. Kardiyolipin ve  $\beta$ 2GPI'e bağlanılan monoklonal otoantikor üreten iki hibridoma üretilmiştir.

### SUMMARY

*The production of monoclonal anti- $\beta$ 2 glycoprotein I antibodies from patient with antiphospholipid syndrome.* The production of monoclonal anti- $\beta$ 2 glycoprotein I antibodies from patient with antiphospholipid (aPL) autoantibodies has been classified as the antiphospholipid syndrome (APS). It has been found that most aPL antibodies in patients with APS do not bind exclusively to phospholipid antigens but react with protein cofactor-phospholipid antigen complexes. These protein cofactors were found to be plasma proteins like  $\beta$ 2-glycoprotein ( $\beta$ 2GPI) and prothrombin. Although investigations revealed the importance of anti- $\beta$ 2GPI antibodies in the pathogenesis of APS, the origin of these autoantibodies and mechanisms of their pathogenicity could not be explained completely. In this study, B-cells from a spleen of a patient with APS were used in a fusion experiment in order to produce monoclonal anti- $\beta$ 2GPI antibody secreting hybridomas. Two different autoantibody secreting hybridomas were produced. The monoclonal autoantibodies bind to both cardiolipin and  $\beta$ 2GPI.

### GİRİŞ

Tekrarlayan arter veya ven trombozları ve /veya fetus kayıpları ile birlikte antifosfolipid antikorların (AFLA) saptanması antifosfolipid sendromu olarak tanımlanmıştır (9). Klinik tabloya trombositopeni eşlik edebilir ve sendromun ilk bulgusu trombositopeni olabilir (13). AFS ilk olarak sistemik lupus eritematozuslu (SLE) hastalarda tanımlanmış olmakla birlikte başka bir otoimmün hastalığı olmayan kişilerde görülebilir ve bu durum primer AFS olarak adlandırılır (2). AFL SLE ve diğer otoimmün hastalıkların, infeksiyonların, malign hastalıkların seyrin-

de ve klorpromazin gibi bazı ilaçları kullanan hastalarda saptanabilen heterojen bir otoantikor grubudur (10). Serumda AFLA anyonik (kardiyolipin vb.) veya nötral fosfolipidlerin (fosfatidiletanolamin) antijen olarak kullanılarak ELISA yöntemi ile saptanabilir. Bir diğer yöntem ise antikorların fosfolipide bağımlı pıhtılaşma testlerinin (aPTT vb.) süresini uzattığının belirlenmesidir. Bu durumda lupus antikoagülanının varlığından söz edilir (10).

AFS'li hastalarda saptanan AFLA'ların önemli bir bölümünün sadece fosfolipidlere değil  $\beta$ 2-glikoprotein ( $\beta$ 2GPI) ve protrombin

başta olmak üzere plazma proteini içeren ve protein kofaktör-fosfolipidden oluşan antijen komplekslerine bağlandığı ortaya konmuştur (1,7).  $\beta$ 2GPI (apolipoprotein H) *in vitro* antikoagülan özellikleri olmakla birlikte fizyolojik rolü tam aydınlatılamamış bir plazma proteindir (11). Ayrıca heparin, trombosit membranı ve DNA gibi negatif yüklü makromoleküllere bağlanabilir. AFS'li hastalarda direkt  $\beta$ 2GPI'e bağlanan antikorlar saptanmış ve bu anti- $\beta$ 2GPI antikorların tromboz açısından tanı değerinin antikardiyolipin antikorlardan yüksek olduğu ortaya konmuştur (11). Anti- $\beta$ 2GPI antikorların SLE'li hastalarda tromboz gelişmeden önce de pozitif bulunduğu saptanmıştır (12). Bu bulgulara ek olarak  $\beta$ 2GPI ile aşılardan farelerde anti- $\beta$ 2GPI antikorlarının gelişmesi ve bu hayvan modellerinde AFS ile uyumlu klinik bulguların ortaya çıkması,  $\beta$ 2GPI'in AFS'de immünojenik özelliğini ve gelişen otoantikorların patojenik karakterini yansıtmaktadır (16).

Yapılan araştırmalar anti- $\beta$ 2GPI'in AFS patogeneziindeki önemini belirlemekle birlikte, bu otoantikorların ortaya çıkışlarının ve patojenik etkilerinin mekanizmaları tam olarak açıklanamamıştır. Bu çalışmada AFS'li hastaların B-hücreleri kullanılarak yapılan füzyon deneyleri ile hibridoma oluşturarak monoklonal anti- $\beta$ 2GPI elde edilmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL ve METOD

Anti- $\beta$ 2GPI pozitif hastaların saptanması amacıyla University College London Bloomsbury Romatoloji Ünitesi tarafından izlenmekte olan 11 primer AFS'li hasta IgG antikardiyolipin ve anti- $\beta$ 2GPI ELISA testi ile tarandı. Her iki antikorla ilgili ELISA metodları 12 numaralı kaynaktan tarif edilmiştir. Tarama sonucunda pozitif bulunan hastalardan tedaviye dirençli trombositopeni nedeniyle splenektomi yapılacak olan P.G.'den elde edilecek dalak hücreleri ile füzyon yapılması planlandı.

## Füzyon Protokolü

Splenektomi sonrası dalak steril şartlarda laboratuvara getirildi ve laminer akım cihazında heparin ve RPMI içeren solüsyon içinde çok küçük parçalara bölündü. Bu parçalardan elde edilen hücre suspansiyonundan mononükleer hücreler Lymphoprep (Nycomed) ile ayrıldı. Üç kez RPMI-1640 (Gibco) ile yıkanan hücrelerin direkt olarak CB-F7 fare insan heteromiyelom (normal insan B-lenfositleri ile fare miyelom hücre dizini P3X63Ag8/653'ün füzyonu sonucu elde edilmiştir) hücre dizini (S. Jahn, Berlin) ile füzyonu yapıldı (8). CB-F7 hücreleri HAT (hipoksantin-aminopterin-timidin)'a duyarlı, ouabain'e dirençli sekretuar olmayan bir hücre dizinidir. Kısaca, mononükleer hücre:CB-F7 oranı 1:1 olarak hücreler RPMI içinde karıştırıldı ve santrifüj edildi. Elli milyon lenfositte önce 1ml %50 polietilen glikol eklendi ve daha sonra 1 milyon lenfositte 1ml RPMI ile seyreltilti. Yeniden santrifüj yapıldı ve füzyon sonrası solüsyon ile sulandırıldı. Hücreler daha sonra 96 kuyucuklu plakalara (Nunc) ekildi. Yirmidört saat sonra kuyucuklara HAT solüsyonu eklenmeye başlandı. Hücrelerin çoğaldığı kuyucuklardan alınan "supernatant" yaklaşık 3-4 hafta sonra antikor sekresyonunun saptanması için ELISA ile kontrol edildi. Plakalar Dynatech MR 4000 ELISA okuyucu ile pozitif kontrol optik dansitesi 1.0'ı geçtiği zaman okundu ve okunan değerden antijenle kaplanmamış kuyucuklarda okunan değerler çıkarılarak elde edilen sonuçlar dikkate alındı. Monoklonal antikor eldesi için antikor sekresyonu yapan klonlar üç kez yeniden dilüsyon yapılarak klonlandı-ekildi ("subcloning by limiting dilution") (6). Yirmi dört kuyucuklu plakalar kullanılan bu dönemde klonların ekspansiyonuna destek olarak kuyucuklara BALB/c farelerin peritonundan elde edilen makrofajlar eklendi. Ekspansiyon gözlenen ve yapılan ELISA kontrollerinde uygun özgüllükte antikor sekresyonu yapan klonların tedricen serumdan yoksun solüsyonda ve 500ml'lik

şişelerde kültürleri yapıldı (6). Antikor sekresyonu yapan hibridomalar -80 C'de dondurularak pürifikasyon ve ileri çalışmalar için saklandı.

## BULGULAR

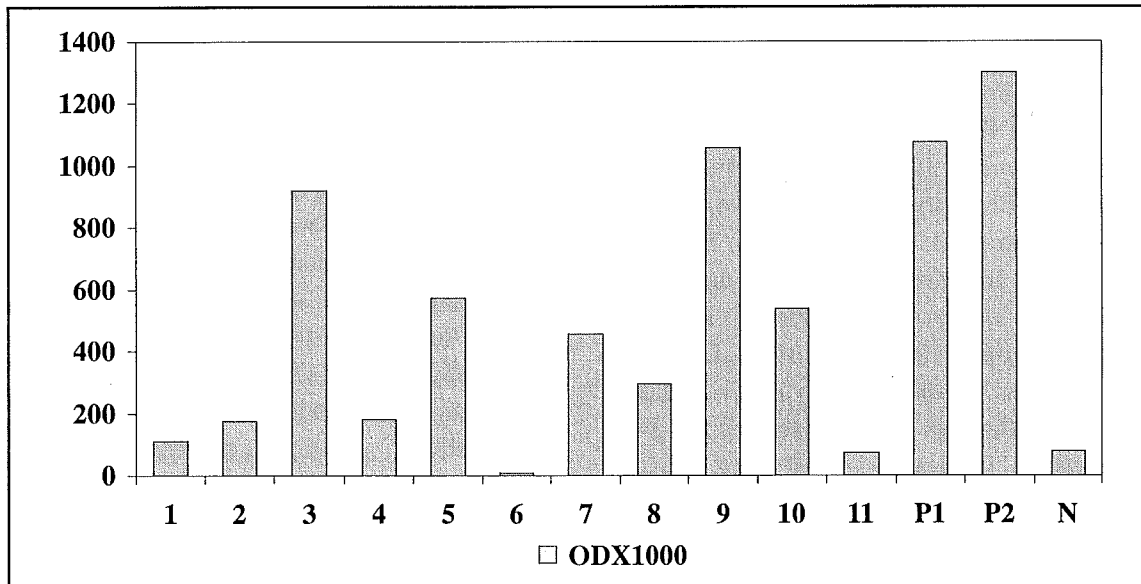
Onbir primer AFS'li hastanın tarama sonuçları Şekil 1'de verilmiştir. Bu çalışmada 1,6 ve 11 numarlı hastalar dışında bütün hastalarda anti- $\beta$ 2GPI antikorlar pozitif bulunmuştur. Füzyon deneyi splenektomi olan 7 numaralı hastadan (P.G.) elde edilen dalak hücreleri kullanılarak yapıldı. Füzyon sonrasında hücreler 19 adet 96 kuyucuklu plakaya ekilmiştir. Üç hafta sonra tespit edilen 400'den fazla klondan elde edilen "supernatant" ELISA ile antikardiyolipin ve anti- $\beta$ 2GPI sekresyonu açısından polivalan konjuge kullanılarak kontrol edildi. Klonların tespit edildiği kuyucuklara destekleyici olarak farelerden elde edilen makrofajlar eklenmiş ve kültür sürdürüldü. Antikardiyolipin ELISA ile yüksek bağlanma saptanan 12 klonun kültürüne devam edildi. Altkültür ("subcloning") yapılan 2 klonda yüksek IgM anti- $\beta$ 2GPI sekresyonu saptandı ve klonlar

(IG11R1 ve IG11R2) ileri analizler yapılmak üzere -80 C'de saklandı. Elde edilen klonların kardiyolipin ve  $\beta$ 2GPI'e bağlanma aktiviteleri Şekil 2'de verilmiştir. ELISA yöntemi kullanılarak belirlenen klonların çift sarmal DNA (dsDNA)'ya bağlanmadığı saptanmıştır.

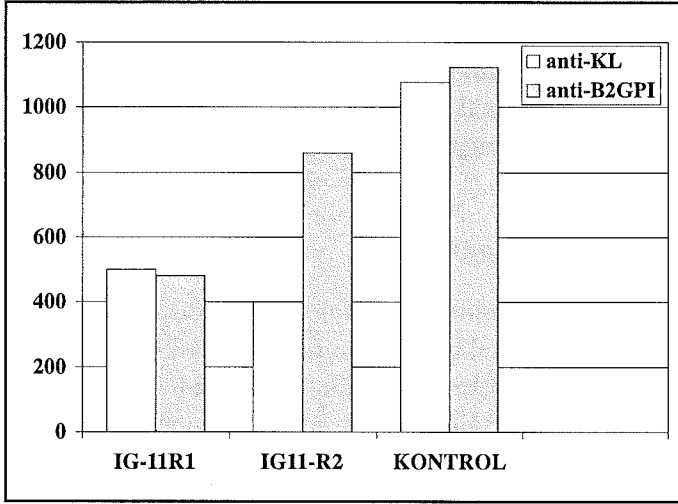
## TARTIŞMA

Hibridoma teknolojisinin gelişmesi araştırmacıların otoimmün hastalıklarda otoantikörlerin ayrıntılı özelliklerini incelemelerini sağlamaktadır. İnsandan monoklonal antikor üretilmesi ve analizi ile ilgili deneyler örnek elde etmede zorluklar ve teknik güçlükler nedeniyle belli merkezlerce yapılabilmektedir. Bu çalışmada tedaviye dirençli trombositopenisi olan ve anti- $\beta$ 2GPI antikorları pozitif bulunan bir primer AFS'li hastadan fare-insan heterohibridomaları elde edilmesi ve heterohibridomalar tarafından üretilen otoantikörlerin tanımlanması amaçlanmıştır. Çalışma sonunda kardiyolipin ve  $\beta$ 2GPI'e bağlanan IgM izotipinde iki otoantikör üretilmiş ve ileri analizler için saklanmıştır.

Şekil 1. Anti- $\beta$ 2 glikoprotein I antikor taraması yapılan primer antifosfolipid sendromlu hastaların sonuçları. P= pozitif kontrol, N= sağlıklı kontrol, OD= optik dansite



Şekil 2. Monoklonal antikorların (IG-11R1 ve IG-11R2) ve pozitif kontrol serumunun kardiyolipin (anti-KL) ve  $\beta$ 2-glikoprotein I'e (anti-B2GPI) bağlanma aktiviteleri (ODX 1000).



Daha önce SLE'li hastalardan üretilen monoklonal anti-dsDNA antikorların çoğu IgM izotipinde ve polireaktiftir. Aktif SLE'li hastalarda yüksek düzeyde saptanan anti-dsDNA antikorlar ise IgG izotipindedir (5). SLE ve AFS arasında otoantikor üretimi açısından benzerlikler vardır ve AFS'de de tromboz ve fetus kayıpları gibi klinik bulgularla yüksek düzeyde IgG AFLA arasında korelasyon saptanmıştır (11). IgM izotipindeki otoantikorların doğal otoantikor niteliklerine karşın IgG izotipindeki otoantikorların bir bölümünün patojenik özelliği olduğu ve gelişimlerinde somatik mutasyonun rolü olduğu kabul edilmektedir (5). İnsanda IgG izotipinde monoklonal antikor üretimi periferik kanda IgM üreten hücreler lehine bir artış olduğundan güç olduğu ileri sürülmüştür (3). Bir diğer monoklonal antikor üretim metodu olan periferik lenfositlerin Epstein-Barr virus transformasyonunun daha çok IgM üreten klonları seçtiği düşünülmektedir (5). IgM izotipindeki AFLA'nın özgül olmayan biçimde birçok negatif yüklü moleküle bağlanma olasılığı vardır (polispesifik otoantikorlar). Ravirajan ve ark. çok sayıda IgM insan monoklonal AFLA ile yaptıkları çalışmada bu otoantikorların fosfolipid antijenlere özgül olarak bağlandıklarını kanıtla-

mışlardır (17). Başka antijenlerle ilgili çalışmalarda inhibisyon incelemeleri IgG ve IgM izotipindeki monoklonal otoantikorların aynı epitopyu tanıyabildiklerini ortaya koymuştur (4). AFS'li hastalardan elde edilen IgM izotipinde monoklonal antikardiyolipin antikorların incelenmesi, bu antikorların IgG izotipindeki antikardiyolipin antikorların aktivitesini büyük oranda inhibe ettiklerini yani aynı epitoplara ya da çok yakın ilişkili epitoplara bağlandıklarının ve patojenik IgG izotipi özelliği taşıdıklarını ortaya koymuştur (18). IgM otoantikorların bu özellikleri nedeniyle patojenik özellikleri açısından incelenmeleri önemlidir (17).

Çalışmamızda ve dalak dokusu kullanılan bu füzyon deneyinden önce yapılan 10 periferik lenfosit füzyonunda IgG üretimi açısından daha avantajlı bir yöntem olduğu kabul edilen partner heteromiyelom hücreleri ile direkt füzyon yapıldığı halde IgG otoantikor üreten hibridoma elde edilememiştir. Benzer metodla daha önce IgG anti-dsDNA ve IgG antifosfolipid antikorların üretilmiş olması nedeniyle metod açısından bir sorun olmadığı kabul edilebilir (5,15). Aynı dönemde IgG monoklonal antikor üretimi yapılamaması CB-F7 füzyon partneri ile ilgili sonradan gelişmiş bir seçicilik özelliği ile açıklanabilir. Buna ek olarak otoantikor taraması ve füzyon deneyi farklı zamanlarda yapıldığından deney sırasında IgG anti- $\beta$ 2GPI üretiminin olmadığı varsayılabilir. Monoklonal insan otoantikoru üretimindeki sorunlar son yıllarda belirli antijene spesifik hücrelerin akım sitometresi ile tek tek seçimi ve daha sonra immünooglobulin değişken bölge (V) geninin klonlanması ve monoklonal antikorun transfer vektörleri yardımıyla rekombinan olarak üretilmesi ile giderilebilmektedir. Bu yolla elde edilen AFLA antikorların heterojen yapı ve fonksiyon taşıdıkları bildirilmiştir (14).

Bu deneyde üretilen hibridomaların serumdan yoksun solüsyonda kültürünün yapılabildiği elde edilen "supernatant"dan afinite pürifikasyonu ile çok miktarda antikör elde edilerek antikorların yapısı, antijene bağlanma özelliklerinin incelenmesi ve hibridomalarından cDNA elde edilerek sekans analizi planlanmaktadır (15).

**Not:** Bu çalışmadaki deneyler Prof. D.A. Isenberg (University College London, İngiltere) yönetiminde ve Dr C.T. Ravirajan'ın yardım ve desteği ile yapılmıştır. Yazar her iki bilimadamına teşekkürlerini sunar. Çalışmalar kısmen Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından verilen Avrupa Bilimsel Değişim Programı (Royal Society) ve NATO B-2 Doktora Sonrası Araştırma Programı bursları ile desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Alarcon-Segovia D, Cabral AR: The antiphospholipid/cofactor syndromes. *J Rheumatol* 23:1319 (1996).
- Asherson RA, Cervera R: Primary, secondary and other variants of the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 3:293 (1994).
- Casali P, Notkins AL: Probing the B cell repertoire with EBV.: polyreactive antibodies and CD5+ B lymphocytes. *Ann Rev Immunol* 7:513 (1989).
- Ehrenstein MR, Leaker B, Isenberg D, Cambridge G: Production of human monoclonal antibodies to myeloperoxidase. *Immunology* 76:617 (1992).
- Ehrenstein M, Longhurst C, Isenberg DA: Production and analysis of IgG monoclonal anti-DNA antibodies from systemic lupus erythematosus (SLE) patients. *Clin Exp Immunol* 92:39 (1993).
- Ehrenstein MR: Production and analysis of human monoclonal IgG anti-DNA antibodies. PhD Thesis University College London, Londra, İngiltere (1994).
- Galli M, Bevers EM: Inhibition of phospholipid dependent coagulation reactions by antiphospholipid antibodies : possible mode of action. *Lupus* 3:223 (1994).
- Grunow R, Jahn S, Portsmann T, Kiessig SS ve ark: The higher efficiency, human B cell immortalising heteromyeloma CB-F7. *J Immunol Methods* 106:257 (1988).
- Hughes GRV: The antiphospholipid syndrome : ten years on. *Lancet* 342:341 (1993).
- İnanç M: Sistemik lupus eritematozusta antikardiyolipin antikorların ve antifosfolipid sendromunun klinik önemini araştırılması. Romatoloji Yandal Uzmanlık Tezi, İstanbul Tıp Fakültesi (1996).
- İnanç M, Radway-Bright EL, Isenberg DA.  $\beta$ 2-glycoprotein I/anti- $\beta$ 2-glycoprotein I: Where are we now? (Scientific Review). *Br J Rheumatol* 36:1247 (1997).
- İnanç M, Donohoe S, Ravirajan C, Radway-Bright EL, Mackie I, Machin S, Isenberg DA: Anti- $\beta$ 2-glycoprotein I, anti-prothrombin and anticardiolipin antibodies in a longitudinal study of patients with SLE and antiphospholipid syndrome. *Br J Rheumatol* 37:1089 (1998).
- Küçükaya-Diz R, Hacıhanefioğlu A, Yenerel M, Turgut M, Keskin H, Nalçacı M, İnanç M: Antiphospholipid antibodies and antiphospholipid syndrome in patients presenting with immune thrombocytopenic purpura: a prospective cohort study. *Blood* 98:1760 (2001).
- Lieby P, Soley A, Levallois H, ve ark. The clonal analysis of anticardiolipin antibodies in a single patient with primary antiphospholipid syndrome reveals an extreme antibody heterogeneity. *Blood* 97:3820 (2001).
- Menon S, Rahman MAA, Ravirajan CT ve ark. The production, binding characteristics and sequence analysis of four human IgG monoclonal antiphospholipid antibodies. *J Autoimmun* 10:43 (1997).
- Radway-Bright EL, İnanç M, Isenberg DA. Animal models of the antiphospholipid syndrome. *Rheumatology* 38:591(1999).
- Ravirajan CT, Harmer I, McNally T, Hohmann A, Mackworth-Young CG, Isenberg DA. Phospholipid binding specificities and idiotype expression of hybridoma derived monoclonal autoantibodies from splenic cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 54:471 (1995).
- Wang M, Kandiah DA, Ichikawa K ve ark. Epitope specificity of monoclonal anti- $\beta$ 2-glycoprotein I antibodies derived from patients with the antiphospholipid syndrome. *J Immunol* 155:1629 (1995).