

**GLİOMA BEYİN TÜMÖRÜNÜN HASTA SERUMLARINDAN TESPİTİNE
YÖNELİK ANTİ-SLC3A2 OTOANTİKORLARININ VE SLC3A2'NİN
KULLANILDIĞI YÖNTEMLER**

10 Buluş, hasta serumları kullanılarak Glioblastoma beyin tümörlü (GB) ve/veya ileri evre glioma beyin tümörü hastalarının erken tanısı ve tedavisine imkân sağlayan tanı/tespit yöntemleri ile ilgilidir. Buluş ile, GB hasta serumlarında bulunan anti-SLC (özellikle anti-SLC3a2) otoantikoru ve bu antikorun etkileştiği mutant, izomer ya da modifiye SLC otoantijenin etkileşimi sayesinde yüksek duyarlılık ve özgüllükte GB teşhisi sağlanmaktadır.

1. Glioblastoma (GB) hastalığına ve/veya ileri evre glioma beyin tümörü hastalığına yakalanmış olma olasılığını değerlendirmek için bir yöntem olup özelliği;
- 10 a) Doku ve/veya serum örneklerinde doğal ve farklı formlardaki SLC3a2 proteinin ekspresyon seviyesinin veya varlığının belirlenmesi,
- b) a basamağında seviyesi belirlenen proteine karşı gelişen otoantikorun kandaki düzeyinin, normal ve gliom olguları arasındaki farklılıkların karşılaştırılması
- 15 c) SLC3a2 proteininin ekspresyon düzeyinde artış olup olmadığının belirlenmesi işlem adımlarını içermesidir.
2. İstem 1'e göre yöntem olup özelliği, doğal ve farklı formlardaki SLC3a2 proteininin Solute Carrier 3a2 (SLC3a2) proteini, mutant SLC3a2 proteini, SLC3a2 protein izomeri, modifiye olmuş SLC3a2 veya başka protein veya proteinler ile kompleks oluşturmuş SLC3a2 proteini olmasıdır.
- 20 3. İstem 1'e göre yöntem olup özelliği, bahsi geçen doğal ve farklı formlardaki Solute Carrier 3a2 (SLC3a2) proteininin, anti-SLC3a2 otoantikorunun etkileştiği SLC3a2 otoantijeni olmasıdır.
4. İstem 3'e göre yöntem olup özelliği; doğal ve farklı formlardaki Solute Carrier 3a2 (SLC3a2) proteininin Solute Carrier 3a2 (SLC3a2) proteini, mutant SLC3a2 proteini,
- 25 SLC3a2 protein izomeri, modifiye olmuş SLC3a2 veya başka protein veya proteinler ile kompleks oluşturmuş SLC3a2 proteini olmasıdır.
5. İstem 1'e göre yöntem olup özelliği, bahsi geçen Solute Carrier 3a2 (SLC3a2) proteinlerine antikorların bağlanmasıdır.

**GLİOMA BEYİN TÜMÖRÜNÜN HASTA SERUMLARINDAN TESPİTİNE
YÖNELİK ANTİ-SLC3A2 OTOANTİKORLARININ VE SLC3A2'NİN
KULLANILDIĞI YÖNTEMLER**

10 Buluşun İlgili Olduğu Teknik Alan

Buluş, hasta serumları kullanılarak glioblastoma (GB) ve/veya ileri evreli glioma beyin tümörlü hastalarının erken tanısı ve tedavisine imkân sağlayan otoantikorlar ve bu otoantikorların tanıdığı antijenlerin kullanıldığı bir yöntem ile ilgilidir.

Buluşla İlgili Tekniğin Bilinen Durumu (Önceki Teknik)

- 15 Mevcut yöntemlerle, ileri evreli gliomalardan glioblastomanın (GB) tanısını koyabilmek için hastalardan cerrahi operasyonla tümör dokusu alınıp GB'ye yönelik patolojik belirteçlerin analizi yapılmaktadır. Dolayısıyla hastalığın tanısı ancak cerrahi tedavi sonrası yani tümörün agresifleştiği ve malignitenin arttığı geç dönemde yapılabilmektedir ve bu durum doğrudan hastanın yaşam süresini daraltmaktadır.
- 20 Hastalığın tanısı ilk olarak MR bulgularının incelenmesi ile cerrahi operasyondan sonra radyoterapi ve adjuvan kemoterapi ile (hastalara temozolomide tedavisi başlanmakta) devam etmektedir. Cerrahi operasyon, kranyal manyetik rezonans görüntüleme (MRI) sonrası tümörün tespitinden sonra planlanmaktadır. Ancak bazen tümör görüntüsü radyonekrozdan ya da başka beyin patolojilerinden de kaynaklanabilmektedir ve MRI tek başına glial tümör
- 25 tanısı için maalesef yeterli bir yöntem değildir. Dolayısıyla tümörün MRI sonrası ve operasyon öncesi glial tümör olup olmaması ve/veya evresi hakkında bilgi edinilmesi, cerrahi tedaviye yön verebilecek (iğne biyopsi veya güvenli maksimum rezeksiyon gereksinimini belirleyerek) ve hastanın yaşam süresini ve kalitesini artırabilecektir. Ayrıca tümörün lokasyonu nedeniyle cerrahi tedavinin bu bilgiler olmadan uygulanmasından sonra motor
- 30 beceri kaybı ve konuşma bozuklukları gibi hasarlara neden olabilmektedir. Sonuç olarak glioma özgü ve /veya gliom evresini belirleyici tanı sistemleri bu malign (ölümcül) hastalığın tedavisini yönetmek ve hastaların sağkalım süreleri ile yaşam kalitelerini artırmak adına büyük öneme sahiptir.

- Diğer taraftan mevcut tedavi yöntemleri olan radyoterapi ve kemoterapi tedavisi, tümör
- 35 spesifik olmadığı için sağlıklı doku ve organlara da zarar verirken hastalığın iyileştirilmesini

5 sağlayamamaktadır. Normal koşullarda hastalara GB tanısı koyulduktan sonra hastalar istatistiki olarak ortalama 15 ay yaşayabilmektedir. Mevcut teşhis ve tedavi yöntemleri ise bu süreyi uzatmak için yeterli olamamaktadır. Dolayısıyla ileri evreli glioma beyin tümörünün, cerrahi uygulamadan önce teşhis edilmesi hastalığın tedavi sürecini önemli derecede iyileştirebileceği gibi, bu sistemin bileşenlerinin gliomaya özgü biyobelirteç sunması halinde
10 tümöre özgü hedefe yönelik tedavi sistemleri geliştirilerek hastalıkla mücadelede ikinci bir iyileşme de olabilecektir.

WO2015200823A1 numaralı patent dokümanında GB hastalarını % 98'den fazla doğrulukla sağlıklı kontrollerden ayıran, glioblastom (GB) dokusunda tanımlanan 33 hücre yüzeyi proteininden bahsedilmektedir. Fakat bu proteinlerin bir otoantijen olduğu bildirilmemiştir.
15 Bu proteinler GB hastalarının diyagnozunda kullanılabilirler fakat bir otoantikör olmadıklarından hasta serumlarında uzun süre sirküle olması beklenmemektedir.

Otoantikörler, organizmanın kendi antijenlerine karşı reaksiyonun göstergesidir. Bu antijenler tüm hücre tiplerine veya vücudun bir organının spesifik hücrelerine karşı da gelişebilir. Bu antikörler otoimmün hastalığı olan hastalarda inflamasyon ve tolerans kaybının temel
20 mekanizmaları hakkında bilgi verir. Birçok otoimmün hastalıkta aylar veya yıllar öncesinden herhangi bir klinik bulgu gelişmeksizin otoantikörlerin varlığı gözlenmiştir. Otoantikörler spesifik klinik bulgular, hastalık şiddeti ve ilerlemenin derecesini de gösteren belirteçlerdir.

Otoantikörler birçok hastalığın teşhisinde kullanılmaktadır ancak özellikle GB hastalığına özgü otoantikörlerin kullanıldığı teşhis yöntemleri ve sistemleri bulunmamaktadır.
25 CN102590511B numaralı patent dokümanında çeşitli kanserlerle birlikte glioblastoma tanısında da kullanılabilecek IGFBP-2 otoantikörlerinin tespiti ve diyagnostik kit olarak kullanılabilesinden bahsedilmektedir.

SLC (solute carriers) taşıyıcı proteinler 65 üyeli süperaile (superfamily) oluşturan genlerden ibarettir. Temel olarak molekül/ilaç taşımada görevlidirler ve ilaç direnci çalışmalarında
30 sıklıkla başvuru bir araştırma kaynağıdır. Ne tür molekül taşımada sorumlu olduklarına göre SLC aileleri olarak bir alt sınıflandırılma yapılır ve bu aileler:

SLC1 ailesi, SLC2 ailesi....SLC65 ailesine kadar uzanmaktadır. Ayrıca her ailenin de alt üyeleri bulunmaktadır. Örneğin SLC3 ailesinin 2 üyesi vardır: SLC3a1 ve SLC3a2 gibi. Genel olarak çalışma mekanizmasında SLC7 ailesi üyeleri ile birlikte hareket ederler, bu
35 nedenle de çoğu çalışmada genelde her ikisi birlikte analiz edilir. SLC3a2 (diğer isimleri CD98; 4F2) ise fonksiyonelliği için SLC7a5 ile dimer oluşturur ve birlikte aminoasitlerin

5 taşınmasında görev alırlar. CD98 bir transmembran proteindir ve hücre yüzeyinde bulunur. Dolayısıyla kolaylıkla ilaçlar ile hedeflenebilir.

Oldukça ölümcül ve seyri kötü olan GB hastalığı için yeni terapötik yöntemlere ihtiyaç vardır. Ancak tedavi için öncelikli olan hastalığın erken teşhis edilmesidir. Bu sebeple hastalığın erken teşhisini sağlayacak, böylece hastaların sağkalım süresini uzatabilecek yöntemlere
10 ihtiyaç duyulmaktadır.

Buluşun Kısa Açıklaması ve Amaçları

Buluş ile ileri evreli gliomların, erken dönemde cerrahi operasyona gerek kalmadan hızlı bir şekilde sadece hasta kanı örneği kullanılarak tespit edilmesini sağlanmaktadır. Önceki teknikte GB ve/veya ileri evreli gliom hastalarının teşhis ve tedavisine imkân sağlayabilecek
15 otoantikor temelli diagnostik ve prognostik bir yöntem veya kit bulunmamaktadır.

Buluş ile GB'ye özgü anti-SLC (buluşun bir örneğinde özellikle anti-SLC3A2 (solute carrier 3a2)) otoantikorların varlığı immünpresipitasyonu takip eden western blot analizleri ile gösterilmekte ve sağlıklı kişilere kıyasla GB hastalarının ve diğer gliom hastalarının bu otoantikoru bulundurma düzeyleri belirlenerek, artan otoantikor düzeyleri GB hastalığı ile
20 ilişkilendirilmektedir. Hastalığın ileri evreli olarak ortaya çıkmasını tespit ederek sunacağı avantaj dışında, ayrıca düşük seviyeli gliomlarda bu otoantikoru SLC3a2 ile etkileşiminin olmadığı, özellikle grad II seviyesinden GB'ye progresyon gösteren tümörleri ayırıcı tanı ile glioma evresinin ilerlemesini takip imkanı sunmaktadır. Böylece buluş, hasta kanında SLC3a2'ye özgü otoantikor bulundurması ve SLC3a2 ekspresyon düzeylerinin ve
25 modifikasyonlarının belirlenmesi ile GB tümörünün tanısını ve hastalığın takibini sağlayabilecek yöntemlerini kapsamaktadır.

Buluş ile, hasta serumlarında bulunan anti-SLC3a2 otoantikoru immünoassay (antikor temelli) yöntemler ile düzeyinin belirlenmesi ve böylece glioblastoma beyin tümörünün ve ileri evreli gliom geçişinin tanısının konulmasını amaçlanmaktadır.

30 Buluşun bir örneğinde, GB olgularında kontrol ve GB olmayan glioma olgularına kıyas ile SLC3a2'nin artan ekspresyonu ve bu proteine yönelik insan vücudunda üretilen otoantikor varlığı buluş sürecinde keşfedilmiş ve buluş ile bu otoantikoru glioma prognozu ile ilişkili bir artış göstermesinin, özellikle GB olgularına yönelik erken teşhis avantajı sunabileceği gösterilmiştir.

35 Bununla birlikte SLC3a2' nin bir otoantijen olduğunun belirlenmesi sayesinde primer oluşum gösteren GB ve sekonder GB hastalarında, serumda artan otoantikorlar vasıtası ile erken

5 tedavi imkânı sunulabilecektir. Bu amaçla buluş yöntemi vasıtası ile GB hastalarına cerrahi operasyona maruz kalmadan basit ve hızlı bir şekilde sadece hasta kanı kullanılarak GB ve/veya ileri evreli gliom teşhisinin, dolayısıyla erken tedavinin önü açılmaktadır. Bunun dışında, buluşta kullanılan otoantikörler ile yüksek oranda özgül hedefleme, GB tedavisinde çeşitli imkanların da önünü açabilecektir.

10 Önceki teknikte mevcut olan WO2015200823A1 numaralı patent dokümanında glioblastom (GB) dokusunda tanımlanan 33 hücre yüzeyi proteininden bahsedilmesine rağmen, buluşa konu olan SLC3a2 proteininden ve otoantijen-otoantikör etkileşiminden bahsedilmemektedir. Bu sebeple buluş ile ilk defa SLC3a2 proteinin GB'ye özgü bir otoantijen olduğu ve anti-SLC (özellikle anti-SLC3a2) otoantikörlerinin GB ve/veya ileri evre gliom hastalarının teşhis ve
15 tedavi yöntemlerinde kullanılabileceğinden bahsedilmektedir.

CN102590511B numaralı patent dokümanında ise çeşitli kanserlerle birlikte glioblastoma tanısında da kullanılabilecek IGFBP-2 otoantikörlerinin tespiti ve diyagnostik kit olarak kullanılabilmemesinden bahsedilmekte ancak SLC3a2 otoantijeni ve gliomlarla ilişkisinden bahsedilmemektedir. Buluşta ise anti-SLC3a2 otoantikör seviyeleri ve otoantijen olan
20 SLC3a2'nin gliomlardaki farklı tipleri ya da modifiye formlarının tespiti ile erken ve ileri evreli gliomaları ayırıcı olmasının yanında, ileri evreli gliomlardan glioblastoma (GB) özgü profili ile GB tanısında ayırıcı özellik sunmaktadır. Glioblastom ise tanı koyulması ile tedaviye rağmen hastaların ortalama 15 ay gibi çoğu zaman daha kısa sürede kaybedildiği bilinen en ölümcül kanser olduğundan, GB ayırıcı özelliği anti-SLC3a2 otoantikörlerini tanı
25 ve tedaviye yönelik önemli derecede etkin kılmaktadır. Bu bağlamda, GB hastalığının tedavisi ve erken dönem tanı imkanının geliştirilmesi için yenilikçi yaklaşımların geliştirilmesi, GB tedavisinin önünü açmak ve hastaların yaşam sürelerinin artırabilmek açısından büyük önem arz etmektedir.

Buluşta SLC3a2 proteinlerinin beyin tümörlerinde artan düzeylerinin, hastalığın kötü seyrine
30 sebep olduğu ve ayrıca glioblastom beyin tümörlerinde özel modifikasyonlara uğradığı gösterilmiştir. Bu da SLC3a'yı ve/veya izotiplerini ya da bunların modifiye olduğu özel formları beyin tümörü için bir potansiyel biyobelirteç yapmaktadır. Otoantikör ise bu SLC3a2'ye bağlanan ve hasta serumlarında ayırıcı şekilde varlığını gösterdiğimiz tanıya yönelik bir belirteç olmaktadır. Dolayısıyla SLC3a2'nin kendisi hem tanı hem de tedavide
35 kullanılabilecek ayrı bir biyobelirteç adaydır.

Bu yönleriyle buluş, sunduğu otoantikörler ve bu otoantikörlerin tanıdığı antijenlerin kullanıldığı yöntemler ile hasta serumları kullanılarak ileri evreli glioma beyin tümörlü

5 hastaların erken tanısı ve tedavisine imkân sağlamaktadır.

Buluşu Açıklayan Şekillerin Tanımları

Şekil 1: Hasta ve kontrol olgu doku/serumları kullanılarak yapılan Westen Blot sonuçları

Şekil 2: Hasta doku kesitlerinde SLC3a2 boyaması

10 **Şekil 3:** GB serumlarında anti-SLC3a2 otoantikorlarının gliom grad özgünlüğünün IP yöntemi ile araştırılması

Şekil 4: SLC3a2'nin GB'lerde ekspresyon seviyesi n=9 (GB), n=6 (non-GB), n=3 (kontrol); $p^* < 0.05$, ve $p^{****} < 0.001$).

Buluşun Ayrıntılı Açıklaması

15 Buluş, glioblastoma (GB) hastalığına ve/veya ileri evre glioma beyin tümörü hastalığına yakalanmış olma olasılığını değerlendirmek için bir yöntem olup

- a) Doku ve/veya serum örneklerinde doğal ve farklı formlardaki SLC3a2 proteinin ekspresyon seviyesinin veya varlığının belirlenmesi,
- b) a basamağında seviyesi belirlenen proteine karşı insan serum örneğinde gelişen otoantikorun kandaki düzeyinin, normal ve gliom olguları arasındaki farklılıkların
- 20 karşılaştırılması,
- c) SLC3a2 proteininin ekspresyon düzeyinde artış olup olmadığının belirlenmesi işlem adımlarını içermektedir.

Burada doğal ve farklı formlardaki SLC3a2 proteinleri; Solute Carrier 3a2 (SLC3a2) proteini, mutant SLC3a2 proteini, SLC3a2 protein izomeri, modifiye olmuş SLC3a2 veya başka

25 protein veya proteinler ile kompleks oluşturmuş SLC3a2 proteini olabilmektedir.

Öncelikle Glioblastoma (GB) ve GB olmayan glioma hasta olguları ile tümör dokusu barındırmayan kontrol olgularına (epilepsi hastaları) ait doku ve serum örnekleri toplanmıştır. Hasta ve kontrol dokuları homojenize edilerek protein izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen homojenatlar ile primer antikor olarak insan serumları ve sekonder antikor olarak da ticari

30 HRP konjuge anti-human IgG' ler kullanılarak western blot (WB) analizleri yapılmıştır. WB analizleri sonucu serum antikorlar ile doku homojenatlarının 30-70 kDa aralığında anlamlı olarak etkileştiği görülmüştür. Bu sebeple, aday antijenleri belirlemek üzere 5 kontrol 5 GB olmayan glioma ve 5 GB doku homojenatı kütle spektrometrisi yöntemi ile analiz edilmiştir. Non-GB (GB olmayan) olarak adlandırılan örnekler, GB patolojisi olmayan grad I-II-III ve

35 IV gliomları ifade etmektedir.

Analizler sonucunda SLC3 proteinlerinin, özellikle SLC3a2 proteininin büyük oranda GB'lerde fazla düzeyde ifade edildiği görülmüştür. Ayrıca WB analizlerinde anlamlı görülen

5 otoantikor ile etkileşimine ait bant aralığı ile de moleküler ağırlığının uyumlu olduğu
görülmüştür. Şekil 1’de hasta ve kontrol olgu doku/serumları kullanılarak yapılan WB
çalışmaları gösterilmektedir. Bu çalışmada grad tespiti yapılan gliom dokularından protein
izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışma gereği olarak sağlıklı kontrol beyin dokusu temin
edilemeyeceği için tümör tanısı olmayan epilepsi hastalarından elde edilen dokular ve serum
10 örnekleri kontrol olguları olarak kullanılmıştır. WB yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen
analizlerde primer antikor yerine olgu serumları kullanılmış olup, WB öncesi örnek
hazırlanmasında deney dizaynı gereği olarak β -merkaptoetanol kullanılmamıştır. β -
merkaptoetanol kullanılmamasının amacı, serumda mevcut olabilecek otoantikorlar eğer
kompleks yapılara özgü ise β -merkaptoetanol tarafından yıkılması engellenerek bu
15 otoantikorların belirlenebilmesidir. Yapılan analizler sonucu GB olgularıyla GB serumlarının
ayrıt edici etkileşim modeli gösterdiği gözlemlenmiştir. GB dokuları ile ayrıt edici etkileşim
gösteren bantlar şekilde siyah oklar ile gösterilmiştir. Yapılan analizler sonucu 25-150 kDa
aralığında GB’ye özgü/GB’de yüksek ifade düzeyi olan protein bantları tespit edilmektedir.

Proteomiks verileri ile kütle spektrometrisi analizleri sonucu, toplam 3014 protein
20 tanımlanmakta ve bunlardan 10 tanesinin GB’de artan ekspresyonları istatistiksel anlamlılık
göstermektedir. Etkileşim tespit edilen kDa aralığındaki proteinlerden SLC3a2 (solute carrier
3a2)’nin GB hastalarında kontrol olgularına göre 11 kat daha fazla ifade edildiği
saptanmaktadır. ($p < 0.001$).

Kütle spektrometrisi analizleri sonucu SLC3a2 ekspresyonunda kontrol dokularına kıyas ile
25 39 kat artış gözlemlenmiştir. Dolayısıyla bu artışın hasta serumları ile yapılan WB
analizlerindeki band yoğunlukları ile ilişkili olup olmadığı araştırılmıştır. SLC3a2
ekspresyonunun başka metodlarla da kütle spektrometri sonuçları ile uyumlu olup
olmayacağını test etmek için kontrol, non-GB ve GB deney grupları ile WB ve İHK
çalışmaları gerçekleştirilmiştir. WB analizleri sonucu SLC3a2 ekspresyonunun kontrole kıyas
30 ile GB dokularında 18.6 kat artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Şekil 4’te görüldüğü üzere
SLC3a2 GB’lerde yüksek seviyede ekspresyon göstermektedir. Kütle spektrometrisi sonuçları
WB ile değerlendirilip sonuçlar analiz edilmiştir; $n=9$ (GB), $n=6$ (non-GB), $n=3$ (kontrol);
 $p^* < 0.05$, ve $p^{****} < 0.001$).

Ticari SLC3a2 antikorları ile 3 kontrol, 3 GB olmayan glioma ve 3 GB doku homojenatında
35 SLC3a2 proteini immünopresipitasyon (IP) yöntemi ile çöktürülmüş ve kontrol olgusu, GB
olmayan glioma ve GB hasta serumları primer antikor olarak kullanılarak WB yöntemi ile
analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda GB hasta serumlarında GB doku

5 homojenatlarında eksprese edilen SLC3a2 proteinini tanıyan otoantikorların varlığı belirlenmiştir. Dolayısı ile buluş sürecinde GB hasta serumlarında hastalığın prognozu ile ilgili olabilecek ve hastalığın hem tanı hem de tedavisine yön verebilecek anti-SLC3a2 otoantikorlarının varlığı tespit edilmiş ve bu otoantikorların GB tespitinde kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu sebeple buluş, GB tespiti için SLC proteinini tanıyan otoantikorların kullanılımasını ve bu otoantikorların tanıdığı antijenleri (SLC proteinlerini) hedefleyen tanı yöntemlerini kapsamaktadır.

SLC otoantikoru 2 ağır zincir ve 2 hafif zincirden oluşmaktadır ve yaklaşık 150 KDa ağırlığındadır. Antikor çeşitlerinden immunoglobulin G ailesine (IgG) aittir. Bu otoantikor GB doku serumlarında bulunmaktadır ve GB hastalarının doku homojenatlarında bulunan SLC3a2 proteinini, GB olmayan glioma doku ve kontrol doku homojenatlarına göre çok güçlü bir şekilde özgün olarak tanımaktadır.

Şekil 2’de görüldüğü üzere yapılan immunohistokimya (IHK) boyamaları, proteomiks verilerini doğrulamaktadır. SLC3a2, GB’lerde daha fazla eksprese olduğu görülmektedir. Hasta doku kesitlerindeki SLC3a2 boyamasında, hücre içi ve hücre membranında GB hasta doku kesitlerinde (A) non-GB Glioma (B) ve kontrol olgusu olarak kullanılan epilepsi (C) doku kesitlerine kıyas ile yoğun bir şekilde SLC3a2 ekspresyonu gözlemlenmektedir.

3 farklı metodla (WB, ekspresyon analizi ve IHK) SLC3a2 ekspresyonunun kontrol dokularına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek çıkması SLC3a2’ye karşı hastalarda gelişen otoantikorların varlığını desteklemektedir.

25 Şekil 3’te ise SLC3a2 otoantikorumun GB serumlarına özgü olduğu görülmektedir. GB serumlarında anti-SLC3a2 otoantikorlarının özgünlüğünün IP yöntemi ile araştırılması sonucunda ticari SLC3a2 ile hasta ve kontrol olgularından SLC3a2 çöktürüldükten sonra hasta ve kontrol serumları kullanılarak WB ile analiz edilmektedir. GB dokularında fazla ekspresyon gösteren SLC3a2’ye karşı GB serumlarında otoantikorların varlığını tespit etmek için immünopresiptasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla, 40 µg kontrol, non-GB ve GB doku lizatları ticari SLC3a2 antikoru ile çöktürülüp WB analizlerinde primer antikor olarak GB serumları kullanılarak analiz edilmiştir. Çeşitli GB serumları ile yapılan analizler sonucu GB serumlarının GB doku lizatları ile güçlü bir biçimde, non-GB ve kontrol doku lizatları ile ise band varlığı gözlemlenemeyecek kadar zayıf olarak etkileştiği görülmüştür. Yükleme kontrolü olarak ticari anti-SLC3a2 kullanılmıştır. Sadece GB serum IgG’lerinin GB’ye özgü olarak SLC3a2’ye çok kuvvetli bir şekilde bağlandığı gözlemlenmektedir. Aynı membran üzerinde non-GB ve GB proteinleri bir arada bulunduğu halde, GB serumlarındaki SLC3a2

5 otoantikorları sadece GB dokuları ile etkileşmiştir. Bu veri, GB hasta serumlarındaki SLC3a2 otoantikorlarının sadece GB dokularında bulunan SLC3a2'yi daha güçlü tanıdığını göstermektedir. Bu sebeple, veriler GB dokularında başka bir SLC3a2 izoformunun bulunduğunu veya SLC3a2'nin GB'lerde bir modifikasyona uğradığını ya da mutant olduğunu akla getirmektedir.

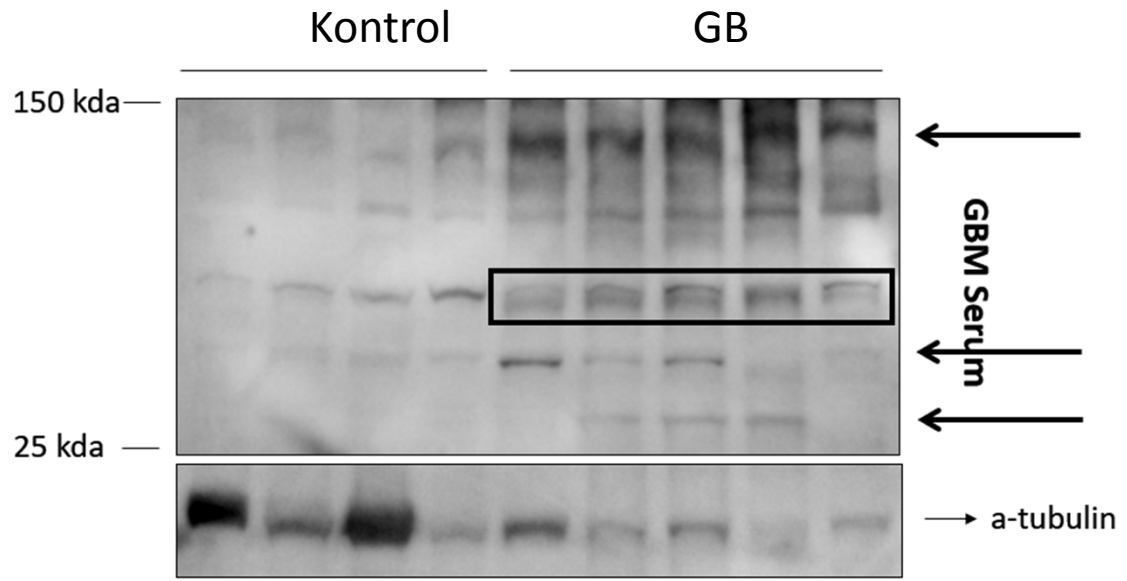
10

15

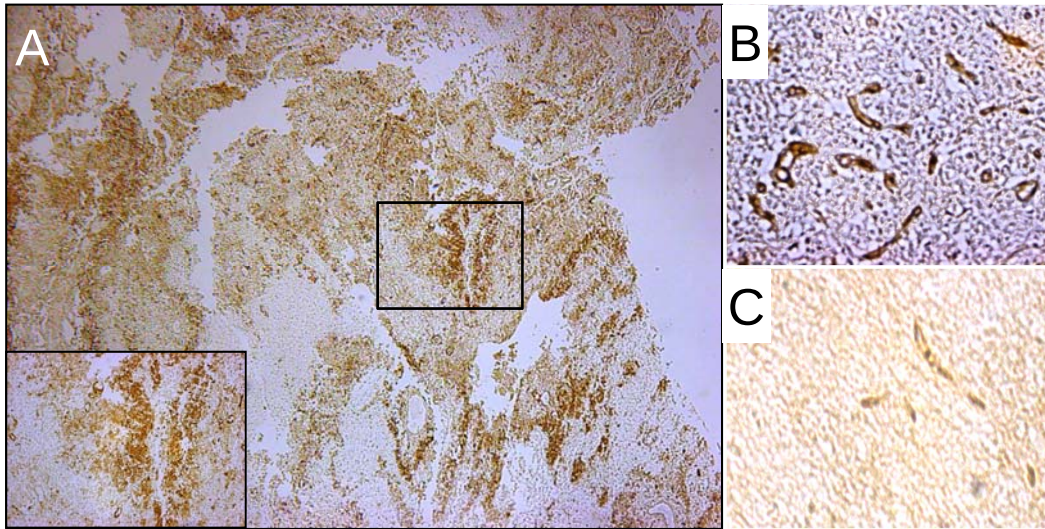
20

25

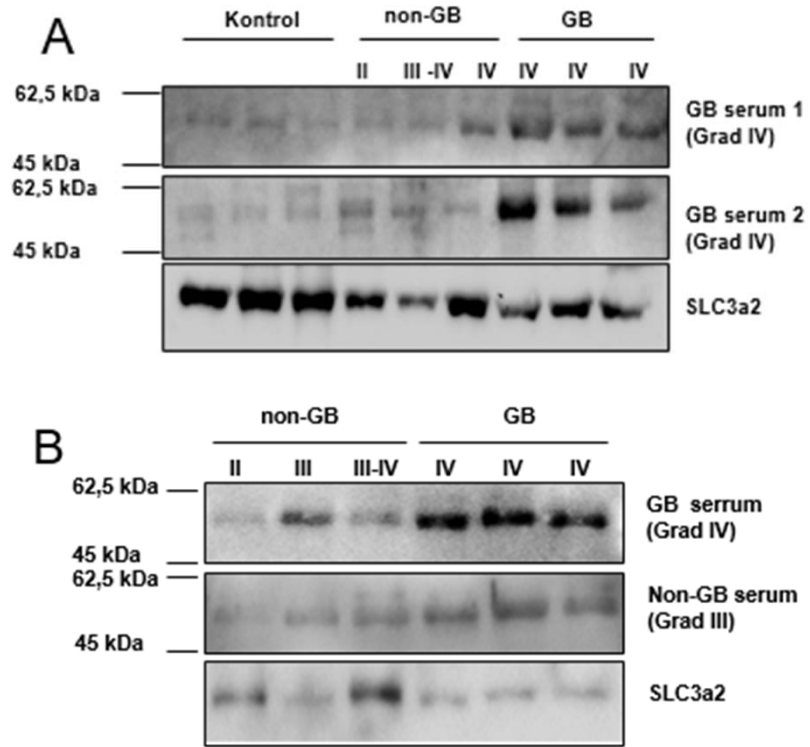
30



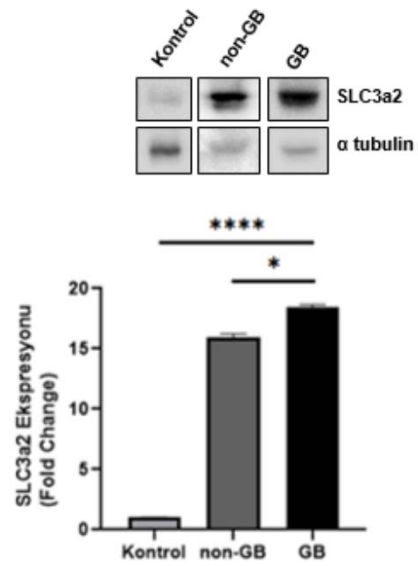
ŞEKİL 1



ŞEKİL 2



ŞEKİL 3



ŞEKİL 4