

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

SARS-CoV-2 SPIKE PROTEİNİNE KARŞI MONOKLONAL ANTİKOR
GELİŞTİRİLMESİ

Zehra Fırat Karagöz

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Erkan Yılmaz

Ocak

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.

Zehra Fırat Karagöz

İmzası

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SARS-CoV-2 Spike Proteinine Karşı Monoklonal Antikor Geliştirilmesi

Zehra Fırat Karagöz

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Erkan Yılmaz

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2019 Aralık ayında SARS-CoV-2 virüsünü resmen tanımlaması ve global pandemi etiyolojik ajanı olarak ilan etmesinden sonra, dünya genelinde yaklaşık 2 milyon kişinin ölümüne sebep olan ve 100 milyon kişiyi enfekte eden COVID19, tüm dünyada hız kesmeden etkisini sürdürmeye devam etmektedir. Ülkeler arasında tedavi yönergeleri değişiklik gösterse de henüz virüse özel geliştirip onaylanmış kesin bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır. Bu etiyolojik ajana karşı özel bir tedavi yönteminin bulunmaması dolayısıyla, dünya genelinde enfekte olmuş kişiler, pandeminin kontrol altına alınabilmesi için, sosyal izolasyonla karantina altında tutulmaya çalışılmış ve mevcut ilaçlarla virüs üzerinde etkinliği net olarak bilinmeden tedavi edilmiştir. Tedavide yüksek doz ilaç kullanımı sistemik yük oluşturmuş ve akut böbrek, karaciğer hasarı, sekonder enfeksiyonların gelişmesi gibi sistemik hasarlara yol açmıştır. Özellikle de multipl kronik hastalığı olan bireylerde tedavinin yetersiz kalması ciddi dezavantajları da beraberinde getirmiştir. Mevcut durum COVID19 a karşı kullanılabilecek spesifik bir ajan/antikor geliştirilmesi yönündeki ihtiyacın aciliyetini vurgulamıştır. Bu konuda yürütülen bilimsel araştırmalardan elde edilecek veriler, hem virüsün daha iyi tanınmasını sağlama hem de global kullanım potansiyeline sahip biyoteknolojik ürün geliştirme ihtimali taşıdığından kritik seviyede önemlidir. Bu tez çalışmasında, SARS-CoV-2 virüsünün bağlanma füzyon ve hücrel girişinde önemli rol oynayan Spike (S) proteinine karşı hibridoma teknolojisi ile 146 klon toplandı. Pozitifliği kanıtlanan 8 klon içinden, IgG1 kappa isotipinde yüksek doz monoklonal antikor üreten 3 adet klon seçildi.. İndirekt ELISA testinde en yüksek pozitifliği veren klonun ürettiği antikor saflaştırıldıktan sonra immünblotlama ile inaktif virüs üzerinde etkinliği doğrulandı. Üretilen monoklonal antikorun nötralizan etkisi 1×10^{-8} titrasyonda SARS-CoV-2 virüsü ile inoküle edilen Vero E6 hücreleri kullanılarak araltırıldı. İnoküle Vero E6 hücrelerinde sitopatik etki gözlemlendiğinden mevcut antikorların nötralizan etkiye sahip olmadığına karar verildi. Çalışma ürünü olarak elde edilen bu antikor, humanizasyonu sonrasında pasif immünizasyon geliştirmede kullanılacak önemli biyoteknolojik ajan olacaktır.

2021, 88 sayfa

Anahtar kelimeler: SARS-CoV-2, COVID-19, Spike, Rekombinant DNA Teknolojisi, Hibridoma Teknolojisi, Monoklonal Antikor

ABSTRACT

Master Thesis

Generation of Monoclonal Antibody Against SARS-CoV-2 Spike Protein

Zehra Fırat Karagöz

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. Erkan Yılmaz

The World Health Organization officially identified the SARS-CoV-2 virus in December 2019 and declared it as a global pandemic etiological agent. COVID19, which caused the death of approximately 2 million people and infected 100 million people worldwide, still continues to be effective all over the world without a sign of a slight decrease. Although the treatment guidelines vary between countries, there is no virus-specific treatment method developed yet. Due to the lack of a special treatment procedure against this etiological agent, infected people all around the world were tried to be kept under social isolation in quarantine in order to control the pandemic and were treated with existing drugs without knowing their effectiveness on this virus. The use of high doses of these drugs has created systemic burden and caused damages such as acute kidney and liver damage, and the development of secondary infections. In particular, inadequate treatment in individuals with multiple chronic diseases brought serious disadvantages. The current situation has emphasized the urgency of the need to develop a specific agent / antibody that can be used against COVID19. The data to be obtained from scientific studies conducted on this subject are critically important, as they have the possibility of both ensuring better recognition of the virus and developing biotechnological products with global use potential. In this thesis study, among generated 146 clones, 8 clones in IgG1 kappa isotype showed positivity against Spike protein. 3 clones were chosen as monoclonal antibodies producing the best positivity against Spike (S) protein, which plays an important role in binding fusion and cellular entry of SARS-CoV-2 virus. After the antibody producing clone with the highest positivity detected by indirect ELISA test, the antibody was purified using protein G agarose binding column and its effectiveness on detection of the inactive virus was confirmed by immunoblotting. Whether the produced monoclonal antibody had a neutralizing effect was checked by using Vero E6 cells inoculated with SARS-CoV-2 virus at 1×10^{-8} titration. Since cytopathic effect was observed in inoculated Vero E6 cells, it was decided that the existing antibodies did not have neutralizing effect. By product of the thesis study after its humanization will be at great importance to be used as biotechnologic agent generating passive immunity.

2021, 88 pages

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, Spike, Recombinant DNA Technology, Hybridoma Technology, Monoclonal Antibody Generation

.

TEŞEKKÜR



İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER DİZİNİ	xv
1 GİRİŞ	1
2 KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1 KORONAVİRÜSLER	3
2.1.1 SARS-CoV	4
2.1.2 MERS-Cov	5
2.1.3 SARS-COV-2	5
2.2 COVID-19 KLİNİK BULGULAR VE DİAGNOZ YÖNTEMLERİ	6
2.3 COVID-19 TEDAVİ YÖNTEMLERİ.....	8
2.3.1 AŞILAR	8
2.3.1.1 İnaktif Aşılar ve Zayıflatılmış Canlı Aşılar	8
2.3.1.2 Vektörel Aşılar.....	8
2.3.1.3 Nükleik Asit Temelli Aşılar.....	9
2.3.1.4 Rekombinant Subunit Aşılar.....	9
2.3.2 İLAÇLAR	9

2.4 SARS-Cov-2 İMMUN YANIT.....	10
2.5 REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ VE ANTİKOR ÜRETİMİ.....	13
<u>3 GEREKÇE VE AMAÇ.....</u>	<u>17</u>
<u>4 MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	<u>18</u>
4.1 MATERYAL	18
4.1.1 GEN KAYNAĞI	18
4.1.2 DENEY HAYVANLARI.....	18
4.1.3 HÜCRE HATTI	18
4.1.4 EKSPRESYON VEKTÖRÜ VE BAKTERİ SUŞ SEÇİMİ.....	18
4.1.5 REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİM REAKTİFLERİ	20
4.1.5.1 PZT Reaktifleri	20
4.1.5.2 Restriksiyon Enzim Reaksiyonu.....	21
4.1.5.3 Ligasyon Reaktifleri	21
4.1.5.4 Amplikon Saflaştırma Reaktifleri.....	22
4.1.5.5 Bakteriyel Besiyeri Kimyasalları.....	22
4.1.5.6 Bakteriyel Transformasyon Kimyasalları.....	23
4.1.5.7 Bakteriden Plazmid DNA İzolasyonu.....	24
4.1.5.8 Bakteriden Protein İzolasyon Çözeltisi ve Konsantrasyon Tayini	24
4.1.5.9 Protein Purifikasyonu	25
4.1.6 PROTEİN VALİDASYONU	25
4.1.6.1 SDS-PAGE Hazırlamada Kullanılan Kimyasallar	25
4.1.6.2 Coomassie Blue Boyama	26

4.1.6.3	Western Blotlama Kimyasalları	26
4.1.7	FARE İMMUNİZASYONU.....	27
4.1.7.1	Antijen Enjeksiyonu	27
4.1.7.2	Fare Serum Antikor Seviyesi Takibi	27
4.1.8	HİBRİDOMA GELİŞTİRİLMESİ.....	27
4.1.9	TAMPONLAR	28
4.1.9.1	Genel Kullanılan Tamponlar.....	28
4.1.9.2	Agarose Jel Elektroforezinde Kullanılan Tamponlar	29
4.2	YÖNTEM.....	30
4.2.1	SARS-COV-2 SPIKE REKOMBİNANT ANTİJEN ÜRETİMİ	30
4.2.1.1	Gen Kaynağı	30
4.2.1.2	Primer Dizaynı	30
4.2.1.3	Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması	31
4.2.1.4	Gen Kaynağının PZT ile Çoğaltılması, Doğrulanması ve Stoklanması	31
4.2.1.5	Restriksiyon Enzimi ile Vektör ve PZT ürünlerinin Kesilmesi	32
4.2.1.6	Ligasyon.....	32
4.2.1.7	Bakteriyel Transformasyon.....	33
4.2.1.8	Bakteriden Plazmid İzolasyonu	33
4.2.1.9	İnsert Alan Kolonilerin Tespiti ve BL21 Transformasyonu	34
4.2.1.10	IPTG ile Protein İfadesinin İndüklenmesi	34
4.2.1.11	Bakteriden Total Protein İzolasyonu	34

4.2.1.12	Afinite Kromatografi ve Diyaliz ile Protein Saflaştırılması	34
4.2.1.13	Protein Konsantrasyon Tayini	35
4.2.1.14	SDS PAGE ve Coomassie Blue Boyama	36
4.2.2	İMMÜNİZASYON	36
4.2.2.1	Antijenin Hazırlanması	36
4.2.2.2	Serum Antikor Titrasyonu	36
4.2.3	HİBRİDOMA KLONU OLUŞTURMA	37
4.2.3.1	F0 Hücrelerinin Hazırlanması.....	37
4.2.3.2	Makrofaj Hücre Kültürü	37
4.2.3.3	Splenosit izolasyonu	38
4.2.3.4	Füzyon	38
4.2.3.5	Hibridoma Hücrelerinin Validasyonu, İdamesi ve Tek Klon Çoğaltılması.....	38
4.2.4	POZİTİF KLON SAPTANMASI VE KARAKTERİZASYONU	39
4.2.4.1	İndirekt ELISA Testi	39
4.2.4.2	Antikor İsotiplendirme Testi.....	40
4.2.5	PROTEİN G AGAROSE İLE ANTİKOR SAFLAŞTIRILMASI	40
4.2.6	İMMUNBLOTLAMA	41
4.2.6.1	SDS-PAGE	41
4.2.6.2	PVDF Membrana Transfer	41
4.2.6.3	PVDF Membranın Bloklanması	41
4.2.6.4	Primer Antikor İnkübasyonu	41

4.2.6.5	Sekonder Antikor İnkübasyonu	42
4.2.6.6	Membranın Görüntülenmesi	42
5	<u>ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	43
5.1	REKOMBİNANT SARS-COV-2 SPIKE ÜRETİMİ	43
5.1.1	GEN KAYNAĞI VE PROTEİN SEKANSLARI.....	43
5.1.2	GEN KAYNAĞININ PZT İLE ÇOĞALTILMASI.....	44
5.1.3	RESTRİKSİYON ENZİM KESİMİ	44
5.1.4	LİGASYON	45
5.1.5	BAKTERİYEL TRANSFORMASYONUN DOĞRULANMASI	45
5.1.5.1	Plazmit izolasyonu	45
5.1.5.2	Koloni PZT	46
5.1.6	PROTEİN SAFLAŞTIRILMASI.....	47
5.1.7	PROTEİN KONSANTRASYONU	48
5.1.8	ANTİKOR SERUM TİTRASYONU	49
5.2	HİBRİDOMA GELİŞTİRİLMESİ.....	50
5.2.1	HİBRİDOMA KLONLARININ İNDİREKT ELISA İLE POZİTİVİTE ANALİZİ	50
5.2.2	FÜZYON GELİŞİMİ VE HİBRİDOMA HÜCRE TAKİBİ	51
5.2.3	İMMÜNOGLOBİLİN İSOTİPLENDİRME.....	53
5.2.4	WESTERNBLOTLAMA.....	54
5.2.5	NÖTRALİZASYON TESTİ	55
6	<u>TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	56
6.1	TARTIŞMA	56
6.2	SONUÇ	57

<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>59</u>
<u>EKLER.....</u>	<u>64</u>
<u>EK1: TEZ ÇALIŞMASI ETİK KURUL KARARI.....</u>	<u>64</u>
<u>ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>66</u>
<u>YAYINLAR.....</u>	<u>69</u>



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Betakoronavirüs genom organizasyonu(1)	1
Şekil 2.1. Betacoronavirüs partikül ve genomu (22).....	6
Şekil 2.2. Popülasyonlarda Hastalık Yayılma Şeması	10
Şekil 2.3. Toplumsal Bağışıklık Geliştirmiş Popülasyonlarda Hastalık Yayılma Şeması ..	11
Şekil 2.4. FDA tarafından onaylanmış ilk rekombinant insan insülini (48)	14
Şekil 4.1. pET28a Ekspresyon Vektör Haritası.....	19
Şekil 4.2. SARS-CoV-2 Spike Protein Dizisi	30
Şekil 5.1. Spike Gen Dizisi	43
Şekil 5.2. Spike Protein Dizisi	43
Şekil 5.3. %1.5 Agarose jel Spike PZT ampliconu.....	44
Şekil 5.4. pET28a Enzim Kesimi	44
Şekil 5.5. Spike PZT amplicon kesimi.....	45
Şekil 5.6. Transformasyon Sonrası Bakteriden Plazmit İzolasyonu	46
Şekil 5.7. Spike pozitif transforme bakteriler.....	46
Şekil 5.8. Spike Protein Purifikasyonu Poliakrilamid Jel Coomassie Blue Boyama	47
Şekil 5.9. BCA Protein Standart Grafiği	48
Şekil 5.10. anti-Spike Serum Antikor Titrasyon Grafiği	49
Şekil 5.11 anti-Spike Antikor Üreten Klon Tespiti	50
Şekil 5.12 Antikor İsolelendirme	53
Şekil 5.13. İmmünblotlama: Rekombinant Spike proteinine karşı anti-Spike mAb	54

Şekil 5.14. İmmünBlotlama: İnaktif virüse karşı anti-Spike mAb	55
--	----



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Hücre hattı bilgileri	18
Çizelge 4.2. pET28-a vektör özellikleri	20
Çizelge 4.3. Genel PZT Protokolü	20
Çizelge 4.4. Restriksiyon Enzim Tamponları ve Kesim Koşulları	21
Çizelge 4.5. Ligasyon Reaktifleri ve Koşulları	21
Çizelge 4.6. Guanidin ile DNA Saflaştırma	22
Çizelge 4.7. LB Buyon İçeriği	22
Çizelge 4.8. LB Katı Buyon İçeriği.....	23
Çizelge 4.9. TSS Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasallar	23
Çizelge 4.10. SOC Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasallar	23
Çizelge 4.11. Alkalen Lizis I Çözelti Protokolü	24
Çizelge 4.12. Alkalen Lizis II Çözelti İçeriği	24
Çizelge 4.13. Alkalen Lizis III Çözelti İçeriği	24
Çizelge 4.14. Bakteriden Protein İzolasyonu	24
Çizelge 4.15. SDS PAGE Hazırlama	25
Çizelge 4.16. 10X SDS-PAGE Yürütme Tamponu	25
Çizelge 4.17. Fiksasyon, Stain ve Destain Tamponları.....	26
Çizelge 4.18. İmmunblotmala Transfer Tamponu (10X).....	26
Çizelge 4.19. Hücre kültürü kimyasalları.....	28
Çizelge 4.20. Sodyum Fosfat Tamponu	28

Çizelge 4.21. Sodyum Fosfat Tween Tamponu	28
Çizelge 4.22. 6X Laemmlı Protein Kaynatma Tamponu	29
Çizelge 4.23. Tris Sodyum Tamponu.....	29
Çizelge 4.24. 50X TAE Tamponu: 1L Stok Tamponu İçin Gerekli Kimyasallar.....	29
Çizelge 4.25. 5X TBE Tamponu: 1L Stok Tampon İçin Gerekli Kimyasallar	29
Çizelge 4.26. Spike Primer Sekansı	31
Çizelge 4.27. PZT Reaktifleri ve Thermal Cycle Koşulları	31
Çizelge 4.28. Restriksiyon Enzim Kesimi	32
Çizelge 4.29. Ligasyon Protokol Bileşenleri.....	32
Çizelge 4.30. Afinite Kromatografi Tamponları	35
Çizelge 5.1. Saflaştırılmış Spike protein absorbance ve konsantrasyonu	48
Çizelge 5.2. Serum Dilüsyonları ve Absorbance Değerleri	49

SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
mM	Milimolar
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EtBr	Etidium bromide
°C	Santigrat
µm	Mikrometre
BCA	Bikinkoninik asit
BSA	Sığır serum albümini
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	Enzyme-Linked immunosorbent assay
FBS	Fetal sığır serumu
gr	Gram
H ₂ O	Su
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel elektroforez sn Saniye
SOB	Super optimal broth
SOC	Katabolit baskılayıcı
Taq	Thermus aquaticus

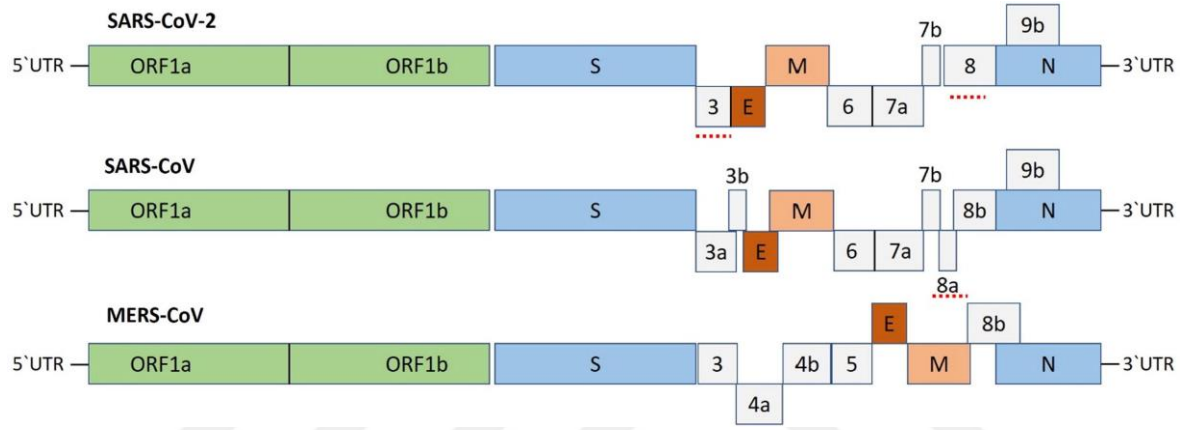
TEMED	Tetrametiletilendiamin
TBE	Tris-Borik asit- EDTA
TBS	Tris tamponlu tuz çözeltisi
TBS-T	Tween-20 içeren tris tamponlu tuz çözeltisi
TMB	3,3',5,5'-tetramethybenzidine
UV	Ultraviyole
V	Volt
HAT	Hipoksantin aminopterin timidin
HCl	Hidroklorik asit
HGPRT	Hipoksantin-guanin fosforibosiltransferaz
HRP	Horseradish peroxidase
HT	Hipoksantin timidin
IFN- α	İnterferon alfa
IgG	İmmunoglobulin G
IL	İnterlökin
IPTG	İzopropil- β -D-tiyogalaktopiranozit
LB	Luria bertani M Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MgCl ₂	Magnezyum klorür
NK	Doğal öldürücü
nm	Nanometre
OD	Optik yoğunluk
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PBS-T	Tween-20 içeren fosfat tamponlu tuz çözeltisi

PEG	Polietilen glikol
PCR / PZT	Polimeraz zincirleme (chain) tepkimesi (reaction)
RNase	RNA parçalayıcı enzim



1 GİRİŞ

2019 yılı Aralık ayında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), Çin'in Wuhan kentinde ortaya çıkan, şiddetli akut solunum yolu enfeksiyonunda rol oynayan bir etiyolojik ajanın ortaya çıktığını duyurmuştur. 2002 ve 2012 yıllarında tespit edilen insan korona virüslerinden SARS-CoV ve MERS-CoV ile olan filogenetik ve taksonomik benzerliğinden dolayı (Şekil1.1) (1), bu yeni tip insan korona virüsünü SARS-CoV-2 olarak adlandıran DSÖ, bu virüsün sebep olduğu hastalığa da COVID-19 ismini verdi (2). Kısa sürede 144 ülkeye yayılım göstermesi üzerine, 11 Mart 2020'de DSÖ tarafından global pandemi ilan edilmiştir.



Şekil 1.1. Betakoronavirüs genom organizasyonu(1)

Yüzlerce çeşidi bulunan *Coronaviridae* ailesi mensubu koronavirüsler son yirmi yılda iki büyük ölçekli salgına sebep olurken (3), majör olarak yarasalarda görülen koronavirüs SARSr-CoV'un gelecekte bir salgına sebep olabileceği bilim insanları tarafından öngörülmüştür (4). Domuz, yarasa, deve gibi hayvanlar arasında yayılım gösteren virüs, dönem dönem sadece enfekte hayvanlardan insanlara bulaşırken, mutasyon geçirerek kazandığı genetik varyasyonlar sonrası orijin konaktan ara konaklara, ara konaklardan insanlara ve son basamak olarak da insandan insana bulaşma yeteneği kazanmıştır (5). Bilinen yedi insan koronavirüsünden dördü, hafif ile orta şiddetli üst solunum yolu hastalıklarına sebep olmakla beraber, SARS,MERS, COVID-19 a yol açan diğer üç insan korona virüsü, ateş, öksürük, dispne, miyalji ve baş ağrısı gibi semptomlarla kendini gösterip çoklu organ fonksiyon bozukluklarının/yetmezliğinin gelişmesine ve dolayısıyla vaka ölüm oranlarının artmasına sebep olmaktadır. Semptom gösterenlerin yanısıra, bilim insanları

SARS-CoV-2 ile enfekte olan kişilerden yaklaşık %40 ının semptomları göstermeden önce hatta asemptomatik olarak virüsü diğer insanlara bulaştırabileceğini tahmin etmektedir (6). 2004 yılında mutasyon geçirerek virülan bulaşma etkisini kaybeden SARS-CoV %9.6, hala etkisini göstermeye devam eden MERS-CoV %35, epidemiyolojik olarak bakıldığında en yüksek bulaşma oranına sahip ve henüz yol açtığı global pandeminin birinci yılında olduğumuz SARS-CoV ise güncel verilere göre %2.3 vaka ölüm oranına sahiptir (7).

Diğer betakoronavirüslerinden daha düşük mortalite oranına sahip olmasına rağmen, hızlı yayılım ve şiddetli enfeksiyon oranına sahip SARS-CoV, görüldüğü günden bu yana çok hızlı mutasyonlar geçirmektedir. Bilim insanları tarafından virülan etkisini azaltacağı yönünde umut edilen ve beklenen mutasyonlar, aksine virüsün bulaşma hızını %50 oranında artırmış ve enfeksiyon geliştirdiği konakçı kapsamını genişletmiştir, bunlara ek olarak; Güney Afrika'da tespit edilen 501Y.V2 varyantının, aşı aracılığıyla ya da ilk COVID-19 dalgasında geçirilmiş enfeksiyonla uyarılmış/tetiklenmiş immün yanıtı kaçırdığına dair kanıtlar gittikçe artmaktadır (8–12). Mevcut bulgularla, tedaviye yönelik etkisi kanıtlanmış ilaç geliştirilmesi ve etkin aşı çalışmalarının virüsün mutasyon hızına yetişemeyeceği gözler önüne serilmişken, mevcut geliştirilen aşılarla global bağışıklığın mümkün olan en kısa zamanda kazanılabilmesi için toplumsal aşılamanın önemi ve aciliyeti bir kez daha vurgulanmıştır.

2 KURAMSAL TEMELLER

Rekombinant DNA ve Hibridoma Teknolojileri'ni birleştiren aşı geliştirme çalışmalarının temelinde, ilgili antijenin rekombinant olarak üretilmesi, üretilen rekombinant antijen ile deney hayvanı immünizasyonu ve immünize deney hayvanının B hücreleri kaynak alınarak geliştirilecek monoklonal antikörlerin insansılaştırılması basamakları yer almaktadır. Bağışıklık sisteminin, antijen adı verilen ve vücudu invaze eden yabancı maddelere savaş açmasının bir yolu, bu antijenleri tanıyıp bağlanan ve protein yapısında olan antikörler üretmektir. Bu çalışmada da olduğu gibi, bilim insanları mevcut teknolojiler aracılığıyla bağışıklık sisteminin virüs gibi zararlı antijenlerle savaşma yeteneğini taklit edebilen spesifik bir antikör dizayn edebilirler. Bu aşamada istilacı ajana karşı doğru antijenin tanımlanıp dizayn edilmesi ve ona göre antikör geliştirilmesi kritik basamaklardan biridir.

2.1 KORONAVİRÜSLER

1930 yılında, kümes hayvanlarında akut solunum yolu enfeksiyonları başgösterdiğinde virion morfolojisi diğer RNA virüslerinden farklı olması ile keşfedilen koronavirüsler, insanlarda ilk olarak 1960'larda tespit edilmiştir. 2002 yılı öncesinde, aynı karakteristik morfolojiye sahip olan sadece iki insan patojeni (HcoV229E ve HcoV-OC43) tespit edilip tanımlanmış ve insanlarda hafif solunum yolu enfeksiyonuna ve soğuk algınlığına yol açtığı için yüksek öncelikli olarak görülmemiş ve yoğun olarak araştırılmamıştır. Temel olarak hayvancılık sektörünün problemi gibi görülen korona virüsler, 2002 yılında ortaya çıkan şiddetli akut solunum yolu enfeksiyonundan sorumlu etiyolojik ajanı olarak keşfedildiğinden bu yana bilim dünyasının ilgisini üzerine çekmiş ve büyük araştırmaların ana konusu haline gelmiştir (13–16).

Koronavirüsler (CoV), *Nidovirales* takımı içerisinde sınıflandırılan üç RNA virüsü ailesinden biri olan *Coronaviridae* üye ailesine mensup, omurgalı ve omurgasız çok çeşitli konakçıları enfekte etme yeteneğine sahip, bilinen en geniş RNA genomlu (~30 kb), intraselüler membrandan köken alan zarflı, pozitif polariteli, tek sarmal RNA virüsleridir (17,18). Elektron mikroskop görüntülerine göre yüzeyinde 15-20 nm taç yaprak şeklinde karakteristik saçaklar bulunduran 120-160 nm çapında; tipik biyolojik membranlara kıyasla iki kat daha kalın zarf ve sıkıca katlanmış helikal nükleokapsid bulunduran koronavirüsler

hızlı yayılım ve şiddetli enfeksiyon oranına sahip virüslerdir (19). CoV, ekolojisi ve evriminde çok önemli rol oynadığı bilinen yarasaların dışında, çiftlik hayvanları, evcil hayvanlar ve insanlar da dahil olmak üzere kuşlar ve memeliler için tehlikeli enfeksiyon ajanıdır.

Aşağıda kısaca içerikleri belirtilen *Coronaviridae* alt ailesi üyeleri dört cinse ayrılır: α , β , γ , δ (13).

- *Alphacoronavirus*: Hayvan virüslerinin çoğu ve iki tip insan korona virüsü bu cinse mensuptur: HCoV-229E, HCoV-NL63.
- *Betacoronavirus*: Prototip fare hepatit virüsü (MHV), HCoV-OC43, SARS-HCoV ve HCoV-HKU1 in yanı sıra bir dizi hayvan koronavirüsü ile birlikte SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2 virüsleri de *Betacoronavirus* cinsi altında sınıflandırılmıştır.
- *Gammacoronavirus*: Balinalar gibi memeli deniz hayvanları ve kuşları enfekte etme yeteneğine sahip korona virüsler bu cins altında sınıflandırılırlar.
- *Deltacoronavirus*: Bu cins korona virüsler ise domuzlarda ve kuşlarda tespit edilmiştir.

2.1.1 SARS-COV

2002 yılında Çin'in Guangdong kentinde ortaya çıkan SARS koronavirüsünün yarasalardan orijin aldığı, yarasalardan ara konakçı olarak misk kedilerine bulaştığı ve zoonotik shift ile insan popülasyonunu enfekte edebilme yeteneği kazandığı düşünülmektedir. Solunum yolu epitel hücrelerini hedef alarak alveolar hasara ve dolayısıyla şiddetli akut respiratuar sendromuna yol açmıştır. Ateş, öksürük, titreme gibi ortak soğuk algınlığı semptomları ile kendini gösteren virüs, çoğu vakada nefes darlığı ve pnömoni gelişimine de sebep olmuştur. Kontrol altına alınmadan önce çoğu Çin'de olmak üzere 26 ülkede SARS vakaları raporlanmıştır. 2004 yılında geçirdiği mutasyonlarla enfeksiyöz özelliğini kaybedene kadar enfeksiyona yakalandığı raporlanan 8000 kişiden 774'ünün ölümüne sebep olmuştur (20).

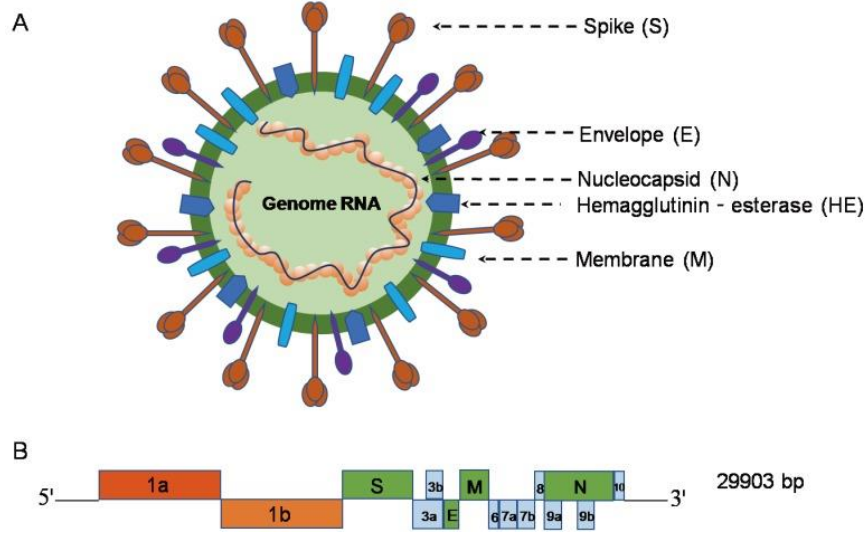
2.1.2 MERS-COV

Dünya Sağlık Örgütü raporlarına göre insan popülasyonunu etkileyen ikinci patojenik koronavirüs, ilk defa 2012 yılı Eylül ayında Suudi Arabistan'da tespit edilmiş ve o günden bu yana 27 ülkeye yayılmıştır. Virüs tespit edildiği bölge ve sebep olduğu hastalık itibariyle ortadğu respiratuar sendromuna yol açtığı için MERS-CoV olarak adlandırılmıştır. MERS-CoV develerden orijin aldığı bilinen SARS-CoV gibi zoonotik shift ile insanları enfekte etme özelliği kazanmış ikinci patojenik insan koronavirüsüdür. Ocak 2020 tarihine kadar MERS koronavirüsü ile enfekte olmuş, %80 i Arabistan sınırları içerisindeki 2519 vakada, şiddetli akut solunum yolu hastalığı geliştirenler olmuştur ve 1:3 vaka ölüm oranıyla 866 ölüm raporlanmıştır (20).

2.1.3 SARS-COV-2

Tanımlanıp raporlanmasından 2 ay sonra 214 ülke ve bölgeye hızlıca yayılım gösteren COVID-19, SARS ve MERS e benzer semptomlarla kendini göstermiştir. Enfekte kişinin mevcut kronik hastalıklarının olması ve bağışıklık sisteminin zayıflaması, virüsün yol açtığı respiratuar hastalığın daha şiddetli seyretmesine sebep olmaktadır. Bulaş sonrası virüsün konak canlıda inkübasyon süresinin Dünya Sağlık Örgütü tanımlamalarına göre 5 ile 14 gün arasında olduğu belirtilmiştir. En temel ve kişinin kritik seviyede hasta olduğunun göstergesi olan semptomlar düşük oksijen seviyesi ve düşürülemeyen yüksek ateştir. Ancak herhangi bir semptom göstermediği halde virüsü taşıyan ve yüksek oranda yayılımına sebep olan vakalar da tespit edilmiştir.

Diğer koronavirüsler gibi, SARS-CoV-2 de tek sarmal pozitif polarizasyonlu RNA virüsüdür ve insan akciğer epitel hücrelerine bağlanabilmek için yüzeyinde bulundurduğu Spike proteinlerini kullanır. 2002 yılı salgınında baş gösteren SARS-CoV ile benzerlik göstererek, hücresel bağlanmayı anjiotensin dönüştürücü enzim 2 reseptörü üzerinden gerçekleştirmektedir. Araştırmalar göstermektedir ki, SARS-CoV-2, *Betacoronavirüs* ailesi diğer virüslerden olan yarasa koronavirüs ile %96 (3) SARS-CoV ile %79.5 (21) benzerlik göstermektedir.



Şekil 2.1. Betacoronavirüs partikül ve genomu (22)

2.2 COVID-19 KLİNİK BULGULAR VE DİAGNOZ YÖNTEMLERİ

2019 yılı Aralık ayında Wuhan kentinde tespit edilmesi ile beraber önlenemez bir yayılım ve enfeksiyon hızı gösteren SARS-CoV-2, dört ay gibi bir sürede yaklaşık 2 milyon kişiye bulaşmış, ilk yılı dolmadan dünya genelinde 100 milyon kişiyi enfekte etmiştir. Pandemi yönetiminde anahtar rolü oynayan en önemli basamak, hızlı ve doğru tanı konulmasıdır. Etiyolojik ajanın epidemiyolojisinin tanımlanması ile tanının doğruluğu, enfekte kişilerin mümkün olan en kısa sürede tespit edilip izolasyonunun sağlanması ve tedavisinin başlanması açısından yüksek öneme sahiptir. Ocak 2020 de virüsün tüm genomunun çıkarılarak yayımlanmış olması, moleküler tanı kitlerinin geliştirilebilmesinin yolunu açmış, bunun üzerine DSÖ tarafından ticari kitlerin geliştirilebilmesi ve vakaların tespitini sağlayabilmesi açısından Gerçek Zamanlı Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Tepkimesi (qRT-PZT) protokolü yayımlanmıştır (23). Protokol doğrultusunda geliştirilen kitler eşliğinde boğaz ve derin genizden alınan sürüntü örnekleri ile tanı konulmaya başlanmış ancak vaka sayılarındaki hızlı artış sebebiyle spesimen birikimleri ve sonuç vermede gecikmeler meydana gelmiştir (24). İlk andan itibaren test sonuçlarının klinik bulgularla örtüşmesi sayesinde hastalık semptomları daha net tanımlanmıştır. Veriler biriktikçe enfeksiyon hakkında daha çok bilgi sahibi olunmuş ancak bireysel varyasyonlar dolayısıyla, hastalığın seyrinde farklı tablolarla karşı karşıya kalınmıştır (25). Kritik seviyede solunum

durması, septik şok ve/veya çoklu organ yetmezliği yaşayan ve hayatını kaybeden vakaların yanı sıra, enfekte olmasına rağmen hiç bir semptom göstermeyen vakaların sayısı, toplam vakaların yaklaşık %40'ını oluşturmuştur (26). Bu doğrultuda DSÖ, hastaların test edilip edilmeyeceğine dair surveyans için bir vaka tanımlaması yayımlamış ancak her ülkenin kendi bölgesel epidemiyolojilerine uygun olarak adapte edilmesini tavsiye etmiştir. DSÖ tanımlamalarına göre vakalar, şüpheli vaka, doğrulanmış vaka ve temaslı olarak üç maddede sınıflandırılmıştır (27).

DSÖ doğru diağnozun yapılması ve hasta takibi amacıyla virus RNA'sını hedef alan moleküler testleri tavsiye etse de örnek sayılarının fazlalığı/çalışılan laboratuvar/laborant sayısının yetersizliği, hızlı diagnostic kitlerin geliştirilmesini teşvik etmiştir. Bu kitler genellikle direk antijen ya da indirekt antikor testleri olarak piyasaya sürülmüştür ancak kullanımları yanımları da beraberinde getirmiştir. Antijen testleri enfeksiyonun erken safhalarında virüsü tespit edebilirler ancak nükleik asit amplifikasyon testlerine kıyasla antijen testlerinin hassasiyetleri çok daha düşüktür. Indirekt antikor testleri ise diğer koronavirus tipleri ile çapraz reaktivite verebilirken, enfeksiyonun erken dönemde teşhisi mümkün değildir. Indirekt antikor testleri sonucunda elde edilecek veriler, tanıdan ziyade bireylerin immünite seviyelerinin belirlenmesinde ve epidemiyolojik soruların cevaplanmasında önem arzedecektir (28).

Bağışıklık sisteminin, doğal enfeksiyonlar ya da doğalı taklit ederek bağışıklık sistemini uyaran aşı uygulamaları sonrasında nasıl çalıştığıının anlaşılması pandemilerin gelecek yörüngesini tahmin etmek açısından çok önemlidir. IgG antikor cevapları hastalığın başlangıcından sonraki 6 ile 15. günler arasında tespit edilebilirken, IgM yanıtı enfeksiyon başlandıcında akut cevap olarak oluşturulur. Enfeksiyonun akut döneminde ilk haftaya kadar artan IgM ve IgA antikor titrasyonları 30. güne kadar hızla düşerken, serum IgG değeri 14. günden sonra artış gösterip enfeksiyonu takip eden 90 gün boyunca serumdaki titrasyonunu korumaktadır (29). Serolojik testler IgG seviyesi ölçtüğünden, akut vakaların ilk haftasında tanı koyulması açısından kullanılamazlar (30,31). Akut enfeksiyon sırasında hızla artan IgM antikor titrasyona eş zamanlı olarak ELISA tekniği ile bakılması, virüs replikasyon zaman penceresinin kaçırılması ve/veya nasal spesimenlerin doğru toplanamaması dolayısıyla qRT-PZT'de ortaya çıkabilecek yanlış negatif sonuçların teyit edilip doğrulanmasında etkin rol oynayabileceği düşünülmektedir (26,32).

2.3 COVID-19 TEDAVİ YÖNTEMLERİ

2.3.1 AŞILAR

Global pandemilerde aşı geliştirme çalışmaları yüksek öncelikli araştırma statüsünde sınıflandırılmaktadır. Morbidite ve mortaliteyi düşürmek, yayılım hızının önünü kesmek ve şiddetli enfeksiyon seyrini önlemek amacıyla bilim insanlarının açık kaynak bilgi paylaşım platformlarına katkıda bulunmaları, çok sayıda SARS-CoV-2 aşı adayı geliştirilmesine olanak sağlamıştır (11).

İnaktive aşılar, zayıflatılmış canlı aşılar, vektör aşıları, nükleik asit temelli ve rekombinant subunit aşıları mevcut aşı çeşitleri arasında sayılabilir.

2.3.1.1 İnaktif Aşılar ve Zayıflatılmış Canlı Aşılar

Ölü virüslere ait tamamen inaktive edilmiş virüs parçacıkları, patojenitelerini yok etmek için kimyasal olarak modifiye edilmiş toksoitler ve virüsten elde edilen spesifik componentler antijenite özelliğine sahiptir. İnaktif virüs aşılarında bu antijenlere karşı antikor geliştirilir ve bağışıklık sistemini taklit ederek geliştirmesi söz konusudur. Çin Sinovac firması tarafından geliştirip kitle halinde uygulamaları başlamış olan aşı, ölü virüsten kaynak alan inaktif aşıdır.

Laboratuvar koşulları altında fiziksel, kimyasal ya da biyolojik anlamda zayıflatılmış mikrobiyal ajanlar da virüs partikülleri gibi bağışıklık sistemi tarafından antijen olarak karşılanır. Zayıflatılmış mikrobiyal ajanların antijenitesine bağlı olarak geliştirilen aşılar zayıflatılmış canlı aşı olarak tanımlanır. zayıflatılmış canlı virüs aşı geliştirilmesinde kullanılır. tekniklerle bağlı olarak inaktif aşılar, zayıflatılmış virüslerin antijenitesine bağlı olarak da zayıflatılmış canlı aşılar üretilmektedir (33–35).

2.3.1.2 Vektörel Aşılar

Vektörel aşılar, araştırmalarına devam edilen bir takım virüslerin başka virüs proteinleri için vektör olarak kullanıldığı aşı çeşididir. SARS-CoV-2 proteinleri için halihazırda adenovirüsler kullanılarak aşı geliştirme çalışmaları devam etmektedir (35).

2.3.1.3 Nükleik Asit Temelli Aşılar

Viral ya da bakteriyel genlerin, nükleik asit konstraktı olarak enjeksiyonu hem hümmoral hem de hüccresel immün cevabın aktive olmasını sağlamaktadır. SARS-CoV-2 nin hüccreye girişinden sorumlu Spike proteinine karşı geliştirilecek DNA aşısı ile enfeksiyondan korunma ve viral klerensin sağlanması mümkün olabilecektir. Çin ve Amerika işbirliğinde geliştirilen ve INO-4800 olarak adlandırılan aşının preklinik testleri devam etmektedir. Amerikalı şirketlerden Moderna da NIH kolaborasyonu ile SARS-CoV-2 S proteinine karşı mRNA aşısı geliştirmektedir (33–35).

2.3.1.4 Rekombinant Subunit Aşılar

Heterolog ekspresyon sistemlerince üretilen mikrobiyal komponentlerden oluşan aşılar dır rekombinant subunit aşıları. Bu tez çalışması ile ürettiğimiz ve aşı aday ı olarak humanize edilip geliştirilebilecek olan monoklonal antikor da rekombinant subunit aşılar başlığı altında sınıflandırılmaktadır. Diğer aşı tiplerine kıyasla, enfeksiyon özelliği bulunmayan rekombinant ya da sentetik peptidler içerd iğinden dolayı yüksek güvenilirlik profiline sahip aşı tipidir. Koronavirüs yapısal proteinleri içinde en önemli antijenik komponent reseptör bağlanmasında ve membran füzyonunda anahtar rol oynayan S proteini, hem konak immün cevabını tetikleyen hem de olası nötralizan antikor geliştirme kapasitesine sahiptir (33,35,36).

2.3.2 İLAÇLAR

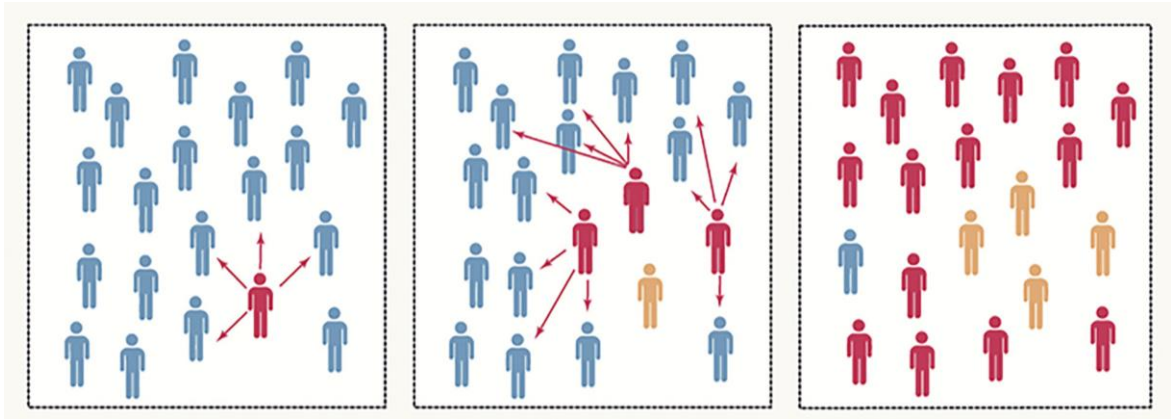
COVID-19 un tespit edilmesinin ardından, aşı çalışmaları yüksek öncelikli çalışmalar olarak desteklenip yürütölse dahi, pandeminin başlangıcından itibaren aşıların üretilip güvenlik ve etkinliklerinin kanıtlanması için gereken, virüsün dünya genelinde 100 milyon kişinin enfekte olmasını engelleyememiştir. Bu aşamada aşı geliştirme çalışmaları ile birlikte konakçı yolaklarını ve virüs replikasyon mekanizmalarını hedef alacak ilaçlar amacına uygun olarak tekrar gözden geçirilmiş ve klinik denemelere başlanılmıştır. Bu amaçla hedef alınan mekanizmalar ve örnek ilaçlar aşağıdaki gibidir (22,27,34,37):

- RNA bağımlı RNA polimeraz inhibisyonu: Remdesivir, Favipiravir etc.
- Viral proteaz inhibisyonu: Ritonavir, Ivermectin

- Virüs Membran Hücre Füzyonunun Blokajı: Hydroxychloroquine
- Doğal bağışıklık sisteminin Desteklenmesi: Doğal Katil Hücreler, Rekombinant İnterferon
- Enflamatuvar Cevabın azaltılması: Mezenkimal Kök Hücre, İntravenöz İmmünoglobulin, SARS-CoV-2 Spesifik Nötralizan Antikorlar, Anti-C5a Monoklonal Antikor, IL-6 Yolağının Blokajı etc.
- Semptomatik Kontrol: Bevacizumab

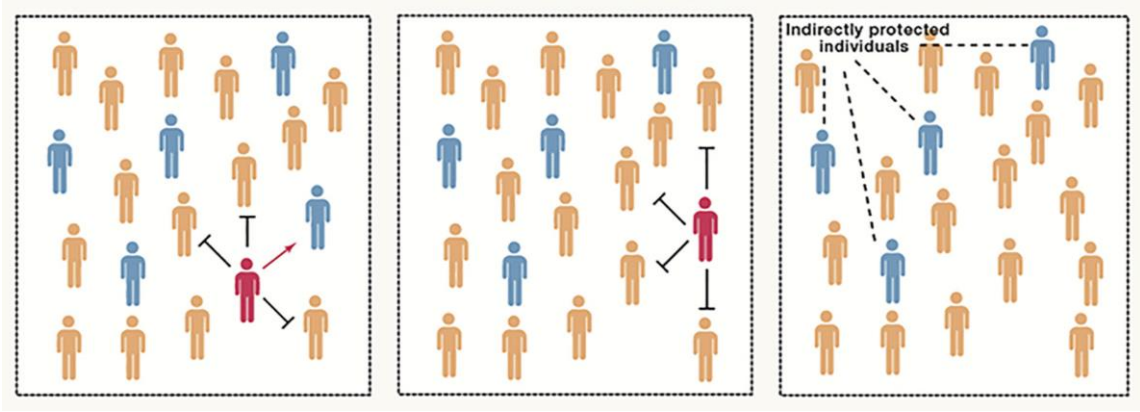
2.4 SARS-COV-2 İMMUN YANIT

Epidemi ve pandemilerde enfeksiyonu kontrol altında tutmak ve yayılmasını önlemek amacıyla ulaşılması gereken bir eşik değeri vardır. Bu eşik değerine, bir toplumda etiyolojik ajana karşı koruyucu bağışıklığı olan kişilerin sayısının ülke genelinde %60 seviyesine çıkıp, bağışıklığı olmayan insanlara rağmen, hastalık etkeninin hareket alanının kısıtlanması ile ulaşılır. Sürü bağışıklığı / herd immünite olarak adlandırılan bu konseptte, bireysel bağışıklığın toplumsal bağışıklığa ölçeklendirilmiş etkisi söz konusudur (38). Koruyucu bağışıklığa sahip bireyler sayesinde virüs hareket alanı kısıtlandığından toplumdaki aşısız ya da daha önce aynı kaynakla enfekte olmamış ve dolayısıyla bağışıklık geliştirmemiş kişiler için de toplumsal korunma sağlanmış olmaktadır (39).



Şekil 2.2. Popülasyonlarda Hastalık Yayılma Şeması

Enfekte birey (kırmızı) Bağışıklığı olmayan duyarlı bir popülasyona dahil edildiğinde (mavi), enfeksiyon peak seviyesine ulaşana kadar yayılmaya devam eder. Sonrasında enfeksiyona dirençli (turuncu) bireyler gelişir (38).



Şekil 2.3. Toplumsal Bağışıklık Geliştirmiş Popülasyonlarda Hastalık Yayılma Şeması
Enfeksiyöz ajan dirençli bireylerle karşılaştıkça yayılma yeteneğini kaybeder ve o toplumda varlığını sürdüremez (38).

Pandemilerde sürü bağışıklığının oluşmasını beklemek popülasyonda enfeksiyon bulaşma hızının artmasıyla birlikte vaka ölüm oranlarının da ciddi oranda artması anlamına gelmektedir. Bu durumu önlemek amacıyla, toplumsal aşılama yoluna gidilmektedir. Ancak SARS-CoV-2 gibi yeni bir enfeksiyöz ajanla karşılaşıldığında aşı tasarım geliştirme ve üretimi, etkinlik ve validasyon süreci uzun zaman alacağından, DSÖ yönergelerince sosyal yaşam sınırlandırmalarına hatta toplu sokağa çıkma yasaklarıyla, virüslerin yayılma hızı kontrol altına alınmaya çalışılmaktadır. bir diğer bağışıklık geliştirme yöntemi hastalık etkenine karşı spesifik olarak geliştirilmiş aşının popülasyonlara uygulanmasıdır.

Viral enfeksiyon sonrasında birbirini takip eden iki negatif test sonrasında karantina koşullarına rağmen tekrar pozitif viral RNA test sonucunun elde edilmesi gibi rekürens vakaların raporlanması (40) mevcut testlerin manipülasyonlara açık olması dolayısıyla güvenilirliğini sorgulatmaktadır. Bu durumu uzamış ancak asemptomatik hale evrilmiş bir Covid-19 enfeksiyonu olarak değil, teknik uygulama ve/veya specimen toplanması sırasında yapılabilecek hataların yanlış negatif sonuçlara sebep olabileceği yönünde yorumlamak daha uygun görünmektedir.

Benzer şekilde Nisan ayında ilk SARS-CoV-2 enfeksiyonuna yakalanıp takiben tam iyileşme gösteren ancak farklı ülkelere seyahat ettikten sonra Ağustos ayında tekrar Covid-19 tanısı konulan bir vakadan alınan örnek sekanslandığında, hastaya bulaşan ikinci virüs ile ilk virüs arasında 11 nükleotid değişikliği, bir delesyon ve bir insersiyon meydana geldiği tespit edilmiştir (41).

Bilim insanlarıncı, tespit edildiği günden bugüne SARS-CoV-2 ile enfekte vaka ve klinik tedaviye ihtiyaç duyan ağır seyirli vaka sayıları kıyaslandığında, virüsün yayılmasında etkili asemptomatik birey sayısının genel vaka sayısının %40'ı kadar olduğu görölmüşür (26). Bu durum asemptomatik bireylerde gelişen anti-viral immün cevaba karşı merak uyandırmıştır. Quan-Xin Long ve arkadaşları 2000 yakın temaslı birey ile yaptıkları araştırmada bireylerden %21'inin viral RNA yönünden pozitif tespit edilmesine rağmen asemptomatik kaldığını göstermiştir. Söz konusu asemptomatik bireylerde, enfeksiyon parametresi olan C-reaktif protein seviyesinin vakaların üçte birinde arttığı gözlemlenirken, %67 sinin akciğerinde abnormal radyolojik bulgulara rastlanmıştır. Semptomatik ve asemptomatik hastalar arasında benzer virüs yükü tespit edilirken, semptomatik hastalara kıyasla asemptomatik hastaların nazofarinkslerinde daha uzun süre virüs positivitesi saptanmıştır. Akut ve iyileşme dönemi farketmeksizin, asemptomatik hastalarda semptomatik hastalara göre daha düşük anti-viral IgG antikorı tespit edilmiştir. Her iki grupta da nötralizan antikor ve IgG seviyesi iyileşme döneminde düşüş gösterirken; bu düşüş semptomatiklerde %13, asemptomatiklerde %40 olarak saptanmıştır. Yine benzer şekilde 18 pro- ve anti-enflamatuar sitokinler yönünden test edildiklerinde asemptomatik bireylerde azalmış enflamatuar yanıt tespit edilmiştir (21,42,43).

Lucas ve arkadaşları tarafından 113 COVID-19 hastası üzerinde yapılan çalışmada, SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı çok çeşitli immün yanıt geliştirilmesinin nedenleri araştırılmıştır. 'COVID-19 bazı bireylerde çok hafif seyrederken, bazı vakalarda herhangi bir semptom göstermezken, neden bazı vakalarda çok ağır seyretmektedir?' sorusuna cevap ararken araştırma bulgularında, immün yanıtın CD4 ve CD8 T hücre immün yanıtının hafif ve şiddetli seyirli COVID-19 hastaları arasında değişmediğı gözlemlenmiştir. Nazal viral yük, enfeksiyon başlangıcında değişkenlik göstermezken, orta seyirli vakalarda zamanla azalırken, şiddetli seyirli vakalarda azalma raporlanmamıştır. Bu veriler, araştırmacıların başlangıçta tüm hastalarda tespit ettiğı artmış IL1 α , IL-1 β , IFN- α , IL-17A sitokin seviyeleri ile gelişen immünolojik yanıt ile uyum göstermiştir. Araştırmacılar bu durumu COVID-19 sebepli immün sistemin yanlış ateşlenmesi olarak tanımlamıştır. Klasik viral enfeksiyonlarda tip 1 immünite indüklenir ki bu durum interferon- γ (IFN γ) ekspresyonu ile karakterize edilmektedir. Doğal katil hücreler, sitotoksik T hücreleri ve yardımcı T 1 hücreleri ise intraselüler patojenlerin yok edilmesinde görev alan bağışıklık sistemi elemanlarıdır. Bu bilgiler ışığında SARS-CoV-2 nin sadece tip 1 immüniteyi tetiklemesi

beklenirken, helminth parazit kurdu enfeksiyonuna karşı tetiklenen ve IL-4, IL-5, IL-13 ve IgE cevabı ve parazitin özonofil ve bazofiller tarafından temizlenmesi ile karakterize edilen tip 2 immüniteyi de tetiklediği gözlemlenmiştir. Hatta mantar enfeksiyonu sırasında aktifleşen tip 3 immünite cevabı olarak salgılanan IL-17 sitokin seviyesinin COVID-19 hastalarında arttığı tespit edilmiştir (44,45).

Doğal ve adaptif immün sisteminlerinin önemli sitokinleri arasında interferonlar (IFNs) da yer alır. IFNs, interferon I (α ya da β) interferon II (γ) ve interferon III (π) olmak üzere üç ana tipde sınıflandırılırlar. Viral enfeksiyonlar sırasında viral nükleik asit patern tanımlama reseptörleri ile tespit edilir ve IFNs üretimini indükleyerek antiviral yanıt oluşmasını sağlar. Hafif seyirli COVID-19 vakalarında da, erken interferon cevabının SARS-CoV-2 replikasyonunu sınırladığı görülmektedir. Eğer erken interferon yanıt mekanizması çalışmazsa, vücut savunma amacıyla enflamasyon geliştirir ancak bu durumun, özellikle de akciğerlerde, enfeksiyonu yenmeye yardım etmekten çok vücuda zarar verdiği bilinmektedir (46,47).

2.5 REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ VE ANTİKOR ÜRETİMİ

1979 yılında Stanley Cohen ve Herbert Boyer gen ve DNA fragmanları izolasyonu ve bu isolatları çoğaltabilmek için araştırma yapıyorlardı. Boyer laboratuvarında DNA'yı net olarak kesebilen bir enzim üretmiş; Cohen ise DNA parçacıklarını bakteri hücresine yerleştirebildiği bir teknik geliştirmişti. Cohen ve Boyer'in geliştirdikleri bu teknik sayesinde bilim insanları yüksek organizmalardan isole ettikleri DNA'yı bakteri veya diğer hücrelerin içine yerleştirerek adeta ilgilendikleri proteinleri yüksek hacimlerde üreten fabrikalar geliştirdiler. Cohen ve Boyer'in geliştirdikleri metodoloji sayesinde biyoteknoloji endüstrisi kurulmuş oldu. Herb Boyer ortaklığında kurulan Genentech firması, 1979 yılında insan somatostatin proteinini *Eschericia coli* bakterisine ürettirmeyi başardı. İnsan proteinlerinin bu yöntemle üretilebileceğinin kanıtı olan bu çalışma, karlı bir pazar oluşturacak insan insülini üretebilmek için çalışmalarına başladı ve 1982 yılında FDA onayını da alarak Humalin adını verdikleri ve genetik mühendisliğiyle üretilmiş insan insülinini üretmeye başladı (48).



Şekil 2.4. FDA tarafından onaylanmış ilk rekombinant insan insülini (48)

Cohen ve Boyer'in geliştirdikleri teknik sayesinde bugün sadece insan hayatını etkileyen yiyecek endüstrisinden, çevresel konulardan ve sağlık problemleri değil, kişiselleştirilmiş tıptan bahsetmek bile mümkün olmuştur. Öyle ki bu durum, bireylerin spesifik hastalıklarının altında yatan moleküler mekanizmaların çözülüp, spesifik olarak hastalık etmenine saldıracak güdümlü terapötikler gerçekleştirmek bir yana, doğru ilacı doğru kişiye doğru zamanda doğru dozda verebilme imkanını bilim dünyasının ayakları altına sermiştir.

Bir yıldır içerisinde bulunduğumuz SARS-CoV-2 pandemisine yönelik geliştirilen aşılar da rekombinant dna teknolojilerinden temel almaktadır. Rekombinant DNA Teknoloji ile herhangi bir virülan etkisi olmadan ancak antijenik etkisini koruyarak özellikli antikorlar üretilmektedir. Antikorlar, virüs/bakteri enfeksiyonuna cevaben ya da bir kanser hastalığının gelişmesine karşı vücudu koruyan immün sistemin ürettiği doğal proteinlerdir. İmmunoglobulinler ailesi mensubu olan antikorlar, hedeflerine yüksek afinite ve spesifite ile bağlanma yeteneğine sahiptir. Antikorların tanıdığı ve bağlandığı bu hedef moleküllere antijen adı verilir (48–50).

Antikor kullanım amaçları, 20. yüzyıl boyunca farklı laboratuvar tekniklerine adapte edilmesiyle ve antikor üretme teknolojilerinin keşfedilmesiyle çeşitlenmiştir. 1949 da ilk olarak miyosin ve aktinin kas içerisindeki interaksyonu coimmunoprecipitasyon (Co-IP) ile gösterilmiştir. 1960 da ilk olarak kan plazmasında bulunan insülin seviyesinin kuantifikasyonu için radioimmünoassay geliştirilmiştir. Antikorların immünohistokimyaya ve ELISA tekniklerine adapte edilmesiyle 1970lerde ilk IHC ve ELISA deneyleri gerçekleştirilmiştir. Köhler ve Milstein 1975 de myeloma hücrelerini B hücreleri ile birleştirip ilk ölümsüz hibridomaları geliştirmiştir. 1981 de Southern Blotlama tekniğinin

proteinlere uyarlanmasıyla ilk western blotlama gerçekleştirilmiştir. Bu ve bunun gibi örnekler antikorların farklı kullanım alanlarına adapte edilmesiyle geliştirilmiş teknikleri bilimin hizmetine sunulmasında ön ayak olmuştur (48–50).

Araştırma ve klinik amaçlı olmak üzere kullanılan üç çeşit antikor bulunmaktadır: monoklonal, poliklonal ve rekombinant antikorlar.

Poliklonal antikorlar

Araştırma dünyasında ilk kullanılan antikorlar farklı sekanslar taşıyan dolayısıyla da farklı epitoplara bağlanan B hücrelerinden oluşan poliklonal antikorlardır. Poliklonal antikor oluşturmak için deney hayvanlarına araştırma konusu olan antijen enjekte edilerek antijene karşı primer immünolojik yanıt oluşturulur. Serum içerisindeki antikor titrasyonunu artırmak için seri antijen enjeksiyonlarına devam edilir. Bu aşama immünizasyon olarak adlandırılır immünizasyon sonrası serum direk kullanılabilir ya da diğer serum proteinlerinden ayırmak için poliklonal antikor purifiye edilebilir. İmmünizasyon yapılacak deney hayvanı ihtiyaç duyular poliklonal antikor miktarına göre seçilirken, antijen donorüne filogenetik olarak en uzak deney hayvanının seçilmesi beklenen immün yanıtın dolayısıyla da üretilecek olan poliklonal antikoru daha güçlü olmasını sağlayacaktır.

Monoklonal antikorlar

Monoklonal antikorlar spesifik olarak tek bir B hücre klonundan elde edilirler dolayısıyla sadece immunoglobulinlerin değişken bölgelerinden sadece bir sekans taşır ve sadece bir epitopa bağlanabilirler. Spesifik antijenle immünize edilen farelerin dalaklarından izole edilen B hücre klonları miyeloma hücreleri ile birleştirilir ve ölümsüzleşir. Spesifiteleri açısından sürekli takip edilen hibridomalardan, etkili olan klonlar tespit edildikten sonra antikor üretimini artırmak için tespit edilen klon üretilmeye devam edilir. Monoklonal antikor üretiminde çoğunlukla fareler kullanılsa da tavşan ve diğer memeli hayvanlardan da monoklonal antikor elde edilebilmektedir.

Rekombinant Antikorlar

Monoklonal ve poliklonal antikorlar farklı deneysel uygulamalarda kullanılmalarına göre biyoteknolojik olarak geliştirilebilirler. Ancak her üretim partisindeki verimlilik farkından

dolay, bilim insanları farklı antikor kaynakları aramış ve rekombinant antikor üretimi bu amaca uygun bir alternatif oluşturmuştur. Herhangi bir deney hayvanı immünizasyonu ya da hibridoma kültürü gerektirmeyen ve in vitro ortamda sentetik genlerden üretilen monoklonal antikor çeşidi rekombinant antikor olarak adlandırılmaktadır. Rekombinant antikor teknolojisi, 1984 yılında Neuberger'in hibridoma kullanmadan plazmosit hücre hatlarında antikor üretmeyi başarması ve Morrison'un klonlanmış hibridoma IgG genlerini, in vitro ortamda modifiye edip ilk kimerik antikorları üretmesi ile bilim dünyasının ilgisini üzerine çekmiştir. İlgili dizi bir defa klonlandıktan sonra, o diziye istenildiği gibi modifiye edilebilmesi rekombinant antikor teknolojisinin başlıca avantajlarından biridir (48,50).



3 GEREKÇE VE AMAÇ

Bu tez çalışması ile, dünya genelinde 100 milyon kişiyi enfekte ederek yaklaşık 2 milyon kişinin ölümüne sebep olan ve global pandemi etkeni olarak tüm dünyada hız kesmeden etkisini sürdürmeye devam eden COVID-19 a karşı terapötik ve diagnostik kullanım potansiyellerine sahip monoklonal Spike antikoru geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Şiddetli akut solunum sendromuna sebep olan SARS-CoV-2 virüsü, büyük bir hızla global pandemiye sebep olmuş ve sadece sağlık yönünden değil ekonomik olarak da global tehtite dönüşmüştür. Ülkeler arasında tedavi yönergeleri değişiklik gösterse de tedavide onaylanmış kesin bir yöntem bulunmamaktadır. Bu etkene karşı özel bir tedavi yönteminin bulunmaması dolayısıyla, dünya genelinde enfekte olmuş kişiler, pandeminin kontrol altına alınabilmesi için, mevcut ilaçların yüksek dozlarda kullanımı ile, virüs üzerinde etkinliği bilinmeden tedavi edilmiştir. Tedavide yüksek doz ilaç kullanımı sistemik yük oluşturmuş ve akut böbrek, karaciğer hasarı, sekonder enfeksiyonların gelişmesi gibi sistemik hasarlara yol aç ve sekonder hastalıkların gelişmesine sebep olmuştur. Özellikle de multipl kronik hastalığı olan bireylerde enfeksiyonun ağır seyretmesiyle birlikte tedavinin yetersiz kalması ciddi kayıpları da beraberinde getirmiştir. Mevcut durum COVID19 a karşı kullanılabilecek spesifik bir ajan/antikor geliştirilmesi yönündeki ihtiyacın aciliyetini vurgulamıştır. Bu aşamada, virüsün öncelikle doğru tespit ve tayin edilmesini sağlayacak kit geliştirilmesi büyük öneme ve aciliyete sahiptir. Beraberinde, yayılmasını önceleyecek ve bulaş sonrası semptomatik ya da asemptomatik hastaları tedavi edebilecek ajanların geliştirilmesi ve mevcut ilaçların denenmesini teşvik edecek stratejilerin acil olarak uygulamaya geçirilmesi hayati öneme sahiptir. Bu konuda yürütülen ve yürütülecek olan her bilimsel çalışma verisi, global kullanım potansiyeline de sahip olması nedeniyle büyük önem taşımaktadır.

4 MATERYAL VE YÖNTEM

4.1 MATERYAL

4.1.1 GEN KAYNAĞI

Çalışmada kullanılan SARS-CoV-2 gen kaynağı, *E.coli* kodon optimize olacak şekilde dizayn edilip IDT'den sipariş edilmiştir.

4.1.2 DENEY HAYVANLARI

Tez çalışması kapsamında 3 adet 6-8 haftalık BALB/c fare kullanılmıştır. Kullanım izni, 11/11/2020 tarihli ve 2020-18-149 sayılı etik kurul onayı ile Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından verilmiştir. EKLER bölümünde etik kurul karar örneği sunulmuştur.

4.1.3 HÜCRE HATTI

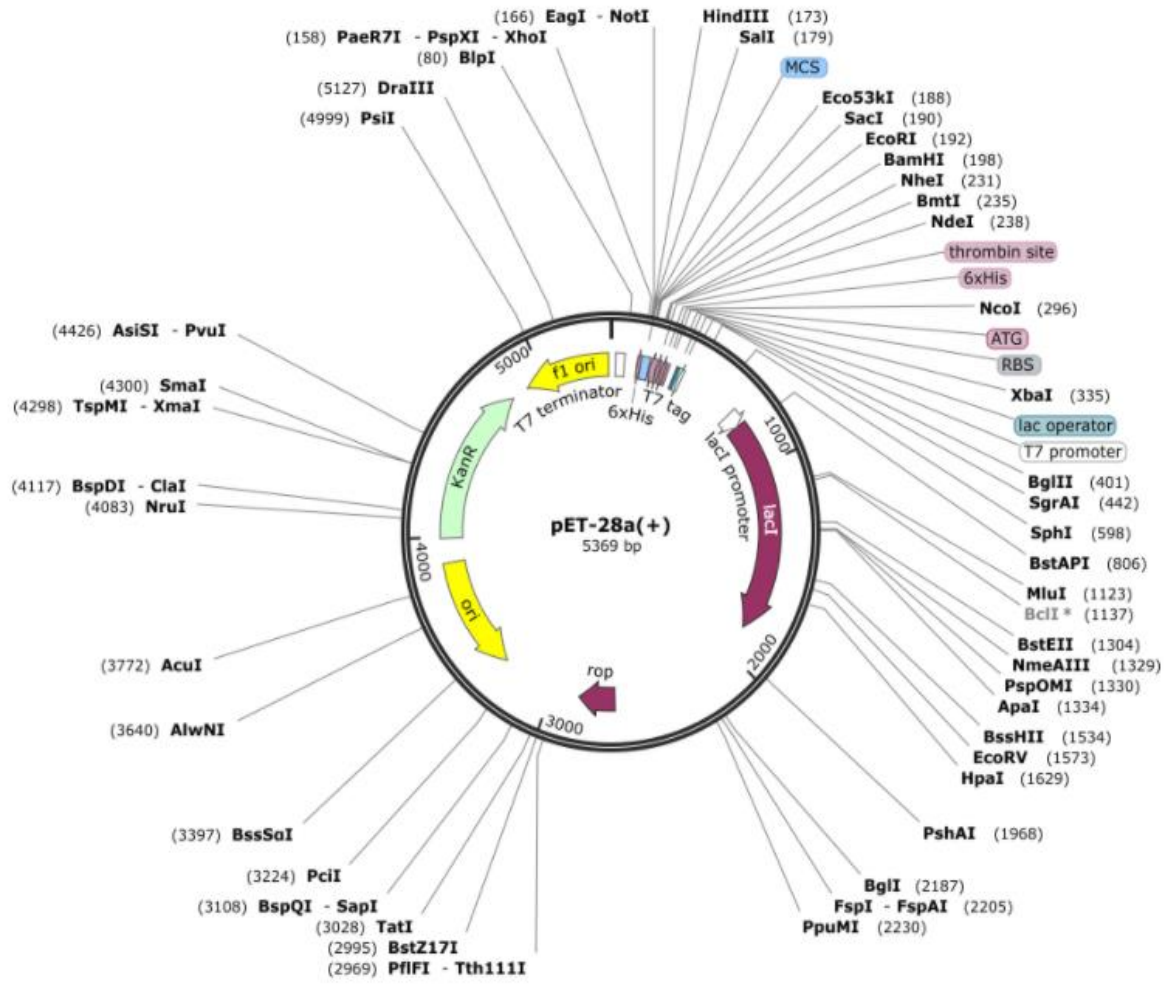
Çalışmada B hücre hibridomaları oluşturmak amacıyla kullanılan hücre hattı ATCC' den alınmıştır. Detaylı bilgi Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Hücre hattı bilgileri

Hücre hattı	ATCC Katalog Numarası	Organizma	Hücre Tipi	Strain	Hastalık	Biyogüvenlik Seviyesi
F0	CRL-1646	Mus musculus, fare	B Lenfoblast	BALB/c	Plazmasitom, Miyelom	1

4.1.4 EKSPRESYON VEKTÖRÜ VE BAKTERİ SUŞ SEÇİMİ

Ekspresyon vektörü olarak, N-terminal ve C-terminal ucunda polihistidin tag (6xHisTag) protein füzyonu bulunan ve kanamisin direnç kaseti içeren pET ekspresyon sistemine mensup pET-28a seçilmiştir. Bakteriyel transformasyon amacıyla *E.coli DH5α* ve *E.coli BL21(DE3)* suşları seçilmiştir. Vektör özellikleri Çizelge 4.1.' de, vektör haritası Şekil 4.1.'de yer almaktadır.



Şekil 4.1. pET28a Ekspresyon Vektör Haritası

Çizelge 4.2. pET28-a vektör özellikleri

Kimyasal İçerik	İsim	Tanımlama	Sekans Pozisyonu
Trxn terminasyon sekansı	T7 Term	T7 Terminasyon Sekansı	26-72
Multiple Klonlama Bölgesi	MCS	MCS (XhoI, NotI, EagI, HindIII, SalI, SacI, EcoRI, BamHI, NheI, NdeI, NcoI)	158-203
Tag	T7 tag	T7 tag cds	207-239
Tag	His tag	His tag cds (6xHis)	270-287
Promotor	T7	T7 Promotor	370-386
Represor Protein Geni	lacI cds	lacI coding sekans (lacI cds)	773-1852
Bakteriyel orijin	Ori	Bakteriyel replikasyon orijini	3286-0
Seçici markör	kanR	Kanamisin direnç geni	3995-4807
ssDNA orijin	f1 ori	F1 orijin	4903-5358

4.1.5 REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİM REAKTİFLERİ

4.1.5.1 PZT Reaktifleri

Spike protein sekansı kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Kalıp DNA çoğaltılması, pozitif bakteriyel transformasyon kontrolü amacıyla Taq DNA Polymerase with ThermoPol® Buffer (NEB, M0267) kiti kullanılmıştır. Kit içerik ve örnek reaktif protokolü Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Genel PZT Protokolü

Kimyasal İçerik	Çalışma Konsantrasyonu
10x ThermoPol Reaksiyon Tamponu	1X
10mM dNTPs	200 µM
10 µM İleri Primer	0,2 µM
10 µM Geri Primer	0,2 µM
Kalıp DNA	<1000 ng
Taq DNA Polimeraz	1.25 units/50 µl PZT
Nükleazsız Su	Reaksiyon Hacmine Tamamlanır

4.1.5.2 Restriksiyon Enzim Reaksiyonu

NdeI (NEB, R0111S) ve HindIII (NEB, R3104S) restriksiyon endonükleazları ve uygun tampon çözeltileri ile üretici firma protokolüne uygun olarak kullanılmıştır. Enzimlerin tampon uyumluluğu Çizelge 4.4 'de belirtilmiştir. Uygun tampon seçilerek, kalıp DNA ve ekspresyon vektörü eş zamanlı çifte enzim kesim protokolüne uyularak kesilmiştir.

Çizelge 4.4. Restriksiyon Enzim Tamponları ve Kesim Koşulları

İsim	Katalog No	Derece °	Tampon	NEBuffer Aktivite Yüzdesi			
				1.1	2.1	3.1	CutSmart®
NdeI	R0111	37	CutSmart	75	100	100	100
HindIII-HF®	R3104	37	CutSmart	10	100	10	100

4.1.5.3 Ligasyon Reaktifleri

Enzim kesim reaksiyonları sonrasında kalıp DNA ve pET28a vektörü yapışkan uçları aracılığıyla kovalent olarak T4 ligaz enzimi (NEB, M0202) varlığında birbirine bağlanmıştır. Ligasyon reaksiyonu için kullanılan kit içeriği Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Ligasyon Reaktifleri ve Koşulları

Kimyasal İçerik	Çalışma Konsantrasyonu
T4 DNA Ligase Tamponu, 10X	1X
Vektör DNA (4 kb)	0,020 pmol
İnsert DNA (1kb)	0,060 pmol
Nükleazsız Su	20 µl'ye tamamlanır
T4 DNA Ligaz	1 µl

4.1.5.4 Amplikon Saflaştırma Reaktifleri

Amplikon saflığının üst düzey öneme sahip olduğu enzim kesim, ligasyon ve transformasyon reaksiyonları öncesinde guanidin bazlı saflaştırma yöntemi ile artık primer, dNTP, enzim, tuz vb kontaminantlar ortamdan uzaklaştırılmıştır. Saflaştırma sırasında kullanılan kimyasallar Çizelge 4.6’da belirtilmiştir.

Çizelge 4.6. Guanidin ile DNA Saflaştırma

Kimyasal İçerik	Marka / Katalog No	Çalışma Konsantrasyonu
GuHCl	Sigma / G3272	4.5 M
Na2SO3	Merck /S0505	50 mM
Bromtimol Mavisi	Sigma / 18470	1X
NaAsetat pH 5.2	Sigma / S2889	21.50 mM
Amplikon + Nükleazsız Su		Değişken

4.1.5.5 Bakteriyel Besiyeri Kimyasalları

E.coli DH5α ve *BL21(DE3)* suşlarının sürekliliği için kullanılan katı ve sıvı besiyeri içerikleri Çizelge 4.7 ve 4.8’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.7. LB Buyon İçeriği

Kimyasal İçerik	Marka / Katalog No	Çalışma Konsantrasyonu
Trypton	Sigma / T7293	10 g/l
Maya Ektraktı	Merck / 70161	5 g/l
NaCl	Sigma / S3014	0.5 g/l
NaOH	Fisher / S318	0.001 N
Kanamisin	Applichem / A1806	0.50 /ml

Çizelge 4.8. LB Katı Buyon İçeriği

Kimyasal İçerik	Marka / Katalog No	Çalışma Konsantrasyonu
Trypton	Sigma / T7293	10 g/l
Maya Ektraktı	Merck / 70161	5 g/l
Agar	Merck / 05040	15 g/l
NaCl	Sigma / S3014	0.5 g/l
NaOH	Fisher / S318	0.001 N
Kanamisin	Applichem / A1806	0.050 mg/ml

4.1.5.6 Bakteriyel Transformasyon Kimyasalları

DH5α ve *BL21* bakteriyel transformasyonları TSS (Çizelge 4.9) ve SOC (Çizelge 4.10) kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 4.9. TSS Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal İçerik	Marka / Katalog No	Çalışma Konsantrasyonu
PEG-6k	Calbiochem, 528877	%10
DMSO	Sigma, D8418	%5
MgCl ₂	Sigma, M8366	10 mM
MgSO ₄	Sigma, M7506	10 mM
LB	Sigma, L3522	Değişken

Çizelge 4.10. SOC Hazırlanmasında Kullanılan Kimyasallar

Kimyasal İçerik	Marka / Katalog No	Çalışma Konsantrasyonu
Trypton	Sigma / T7293	20 g/l
Maya Ektraktı	Merck / 70161	5 g/l
NaCl	Sigma / S3014	0.5 g/l
NaOH	Fisher / S318	0.001 N
KCl	Sigma /P9541	0.003 M
Glukoz	Merck /108337	0.020 M
MgSO ₄	Sigma, M7506	0.010 M
MgCl ₂	Sigma, M8366	0.010 M

4.1.5.7 Bakteriden Plazmid DNA İzolasyonu

Çalışmada kullanılan E.coli suşlarından plazmid DNA izolasyonu amacıyla Alkalen Lizis protokolü uygulanmıştır. Kullanılan çözeltilerin içeriği Çizelge 4.11-13’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Alkalen Lizis I Çözelti Protokolü

Kimyasal İçerik	Marka / Katalog No	Çalışma Konsantrasyonu
Tris-Cl pH 8.0	Amresco, 0826	25 mM
Glukoz	Merck /108337	50 mM
EDTA pH 8.0	Sigma, E5134	10 M

Çizelge 4.12. Alkalen Lizis II Çözelti İçeriği

Kimyasal İçerik	Marka / Katalog No	Çalışma Konsantrasyonu
NaOH	Fisher / S318	0.2 N
SDS	Sigma / L4390	%1

Çizelge 4.13. Alkalen Lizis III Çözelti İçeriği

Kimyasal İçerik	Marka / Katalog No	Çalışma Konsantrasyonu
Glasiyel Asetik Asit	Riedel-de Haën / 27225	11.5 ml
Potasyum Asetat, 5M	Merck / P1190	60 ml
ddH ₂ O		28.5

4.1.5.8 Bakteriden Protein İzolasyon Çözeltisi ve Konsantrasyon Tayini

Bakteriden total protein izolasyonu enzim kullanılarak yapılmıştır. Çizelge 4.14’de içerik belirtilmiştir. Protein izolasyon sonrasında konsantrasyon tayini amacıyla Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 23227) kullanılmıştır.

Çizelge 4.14. Bakteriden Protein İzolasyonu

Kimyasal İçerik	Marka / Katalog No	Çalışma Konsantrasyonu
Triton X-100	Sigma, T8787	0.5%
Lizozim	Applichem, A4972	0.2µg/ µl
TrisCl pH 8.0	Amresco, 0826	50 mM
ddH ₂ O + pellet		

4.1.5.9 Protein Purifikasyonu

Total bakteriyel proteinden Spike protein purifikasyonu için HisPur™ Ni-NTA Spin Purification Kit (Thermo Scientific, 88226) ve imidazolden uzaklaştırıp PBS tamponuna değişiklik yapılması amacıyla Dialysis Tubin Cellulose Membrane (Sigma, D9777) kullanılmıştır.

4.1.6 PROTEİN VALİDASYONU

Saflaştırılan proteinin, ilgili spike proteini olup olmadığını valide etme maksadıyla SDS-PAGE ve Western Blotlama yapılmıştır. Proteinler hesaplanan eşit konsantrasyonlarda 4X Laemmli Sample Buffer (BioRad, 161-0747) ile kaynatılarak poliakrilamid jele yüklenerek yürütülmüştür.

4.1.6.1 SDS-PAGE Hazırlamada Kullanılan Kimyasallar

39.5 kDa boyutunda beklenen Spike proteini %12 lik poliakrilamid jelde yürütme tamponu içerisinde yürütülmüştür.

Çizelge 4.15. SDS PAGE Hazırlama

Kimyasal İçerik	Marka / Katalog No	Yürütme Jeli Çalışma Konsantrasyonu	Hizalama Jeli Çalışma Konsantrasyonu
Tris pH 8.8	Merck / 77-86-1	0.375 M	0.125 M
Bis-Akrilamid (%30)		%12	%3.75
SDS	Sigma / L4390	%0.1	%0.1
APS	Gerbü / 1708	%0.050	%0.050
TEMED	Merck / T9281	%0.050	%0.050

Çizelge 4.16. 10X SDS-PAGE Yürütme Tamponu

Kimyasal İçerik	Marka / Katalog No	Kullanılan Miktar
Trizma Base	Merck / 77-86-1	30.2 gr
Glisin	Sigma / G7126	144 gr
SDS	Sigma / L4390	10 gr

4.1.6.2 Coomassie Blue Boyama

HisTag protein purifikasyon protokolü sırasında elde edilen fraksiyonlar ve eluatlar protein takibi yapılmak amacıyla SDS-PAGE de yürütüldükten sonra, polyakrilamid jel coomassie blue boyası ile boyanır. Boyama aşamasında kullanılan fiksasyon, stain ve de-stain solüsyon içerikleri Çizelge 4.17 de verilmiştir.

Çizelge 4.17. Fiksasyon, Stain ve Destain Tamponları

Kimyasal İçerik	Marka / Katalog No	Fiksasyon Tamponu	Stain Tamponu	Destain Tamponu
Methanol	Merck / 1.06009	%50 (v/v)	%50 (v/v)	%5
Glacial Acetic Asit	Riedel-de Haën / 27225	%10 (v/v)	%10 (v/v)	%7.5
ddH ₂ O	--	%40 (v/v)	%40 (v/v)	%87.5
Coomassie Brilliant Blue	BioRad / 1610400	--	%0.25	--

4.1.6.3 Western Blotlama Kimyasalları

Poliakrilamid jel yürütme sonrası boyutlarına göre ayrıştırılmış proteinler PVDF membrana (BioRad, 1620177) transfer tamponu (Çizelge 4.18) içerisinde aktarılmıştır. Transfer sonrası membran BSA (Fisher, 9048-46-8) ile bloklanmış ve sonrasında anti-His-Tag primer antikoru (CST, 2365S) ve anti-mouse HRP sekonder antikoru (SantaCruz, SC-2005) ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonlar sonrası membran SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, 34094) ile muamele edilerek görüntülenmiştir.

Çizelge 4.18. İmmunblotlama Transfer Tamponu (10X)

Kimyasal İçerik	Marka / Katalog No	Çalışma Konsantrasyonu
Tris	Amresco, 0826	30,2 gr
Glisin	Amresco, 0167	144 gr
SDS	Sigma, L4390	10 gr
Methanol	Merck, 1.06009	%20 (v/v)

4.1.7 FARE İMMUNİZASYONU

4.1.7.1 Antijen Enjeksiyonu

Kullanılan antijenin doğasına bağlı olarak immünizasyon planı değişmekle birlikte periton içi enjeksiyonlarda, antijen ilk enjeksiyonda Complete Freund's Adjuvant (Sigma, F5881), takip eden enjeksiyonlarda Incomplete Freund's Adjuvant (Sigma, F5506) kullanılmıştır.

4.1.7.2 Fare Serum Antikor Seviyesi Takibi

5. Haftadan itibaren düzenli olarak fare kuyruk veninden toplanan kanlardan serum elde edilmiştir. Elde edilen serumlardan, seri dilüsyonla indirekt ELISA yöntemi ile antikor seviye takibi yapılmıştır. ELISA sırasında BSA (Fisher, 9048-46-8), PBS ve PBS-T (Bknz Tamponlar), goat anti-mouse IgG-HRP (SantaCruz, SC-2005), TMB/E Solüsyonu (Merck, ES001) ve Sülfirik asit (Merck, 1.60315) kullanılmıştır.

4.1.8 HİBRİDOMA GELİŞTİRİLMESİ

Fare serumunda uygun antikor titrasyonu tespit edildikten sonra hibridoma geliştirme deneyine başlanmıştır. Hibridoma geliştirilmesi sırasında kullanılan kimyasallar Çizelge 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.19. Hücre kültürü kimyasalları

İçerik	Marka / Katalog No	Kullanım Amacı
DMEM-HG	Sigma /D6429	Hücrelerin Beslenmesi
FBS	Biological Industries / 04-121-1A	Hücrelerin Beslenmesi
PenStep Solution	Biological Industries / 03-031-1B	Bakteriyel Kontaminasyonun Engellenmesi
Plasmocin	Invivogen, ant-mpp	Mikoplazma Kontaminasyonunun Engellenmesi
Polyethylene Glycol Solution	Sigma/P7306	Hücresel hibridasyonun indüklenmesi
HT Media Supplement	Sigma/H0137	Hypoxanthine ve thymidine kokteyli / Hibridoma Seçimi ve F0 hücre kültürü
HAT Media Supplement	Sigma/H0262	Pozitif klonların seçilmesi ve validasyonu
DMEM-HG-Glutamax	Gibco/10567014	Hibrodoma verimli enerji metabolizması ve yüksek büyüme verimi

4.1.9 TAMPONLAR

4.1.9.1 Genel Kullanılan Tamponlar

Çizelge 4.20. Sodyum Fosfat Tamponu

Kimyasal İçerik	Çalışan Konsantrasyon
KCl	2.7 mM
KH ₂ PO ₄	1.8 mM
NaCl	137 mM
Na ₂ HPO ₄	10 M

Çizelge 4.21. Sodyum Fosfat Tween Tamponu

Kimyasal İçerik	Çalışan Konsantrasyon
KCl	2.7 mM
KH ₂ PO ₄	1.8 mM
NaCl	137 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
Tween-20	%0.1 (v/v)

Çizelge 4.22. 6X Laemmli Protein Kaynatma Tamponu

Kimyasal İçerik	Çalışma Konsantrasyonu
Tris_HCl, pH:6.8	375 mM
SDS	%9 (w/v)
Gliserol	%50 (v/v)
Bromophenol Blue	%0.03 (w/v)
B-Mercapthoethanol	%9 (v/v)

Çizelge 4.23. Tris Sodyum Tamponu

Kimyasal İçerik	Çalışma Konsantrasyonu
Tris	24 gr
NaCl	88 gr

4.1.9.2 Agarose Jel Elektroforezinde Kullanılan Tamponlar

Çizelge 4.24. 50X TAE Tamponu: 1L Stok Tamponu İçin Gerekli Kimyasallar

Trizma Base	242 gr
Glasiyel Asetik Asit	54.1 ml
EDTA (0.5 M) pH 8.0	100

Çizelge 4.25. 5X TBE Tamponu: 1L Stok Tampon İçin Gerekli Kimyasallar

Trizma Base	54 gr
Borik Asit	27.5 gr
EDTA (0.5 M) pH 8.0	20 ml

4.2 YÖNTEM

SARS-CoV-2 Spike proteinine karşı monoklonal antikor geliştirilmesi sırasında kullanılan tekniklerden bahsedilmiştir.

4.2.1 SARS-COV-2 SPIKE REKOMBİNANT ANTİJEN ÜRETİMİ

4.2.1.1 Gen Kaynağı

Gen kaynağı IDT'den *E.coli* kodon optimize olarak sipariş edilmiştir. İlgili protein dizi aşağıda NCBI BLASTp sonucunda belirtildiği gibidir:

surface glycoprotein [Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2]						
Sequence ID: QOS50451.1 Length: 1273 Number of Matches: 1						
Range 1: 260 to 579 GenPept Graphics			▼ Next Match ▲ Previous Match			
Score	Expect	Method	Identities		Positives	Gaps
667 bits(1720)	0.0	Compositional matrix adjust.	320/320(100%)		320/320(100%)	0/320(0%)
Query 1		AGAAAYVGYLQPRTEFLKYNENGTITDAVDCALDPLSEKCTLSFTVEKGIYQTSNFR				60
Sbjct 260		AGAAAYVGYLQPRTEFLKYNENGTITDAVDCALDPLSEKCTLSFTVEKGIYQTSNFR				319
Query 61		VQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSLVNSASFSTFKC				120
Sbjct 320		VQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNCVADYSLVNSASFSTFKC				379
Query 121		YGVSPTEKNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRIAPGQTKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSN				180
Sbjct 380		YGVSPTEKNDLCFTNVYADSFVIRGDEVRIAPGQTKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSN				439
Query 181		NLDSKVGNNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCFYPLQSYGFQF				240
Sbjct 440		NLDSKVGNNYLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCFYPLQSYGFQF				499
Query 241		TNGVGYPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFGLTGTGVLTESNKKF				300
Sbjct 500		TNGVGYPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNFGLTGTGVLTESNKKF				559
Query 301		LPFQQFGRDIADTTDAVRDP	320			
Sbjct 560		LPFQQFGRDIADTTDAVRDP	579			

Şekil 4.2. SARS-CoV-2 Spike Protein Dizisi

4.2.1.2 Primer Dizaynı

Klonlama aşamasında kullanılmak üzere NdeI ve HindIII enzim kesim bölgelerini içerecek şekilde NCBI Primer ve CLC Sequence Viewer arayüzleri kullanılarak dizayn edilen aşağıdaki primer dizi sentezletirilmiştir:

Çizelge 4.26. Spike Primer Sekansı

Primer Adı	Enzimi	Primer Sekans
İleri Primer	NdeI	5'-TTG CATATG GCAGGCGCTGCCGCATATTAC-3'
Geri Primer	HindIII	5'-TTG AAGCTT CGGGTCCCGCACAGCATCG-3'

4.2.1.3 Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması

Tez çalışması sırasında kullanılacak olan E.coli DH5 α ve BL21 (DE3) suşları -86°C dondurucudan çıkarılarak 10'ar ml LB besiyeri içerisinde çoğaltıldı. İlk canlandırma sonrası elde edilen bakteri kültüründen taze LB besiyerlerine 1:100 oranında inoküle edilerek çalışmaya hazır bakteri kültürleri elde edildi.

4.2.1.4 Gen Kaynağının PZT ile Çoğaltılması, Doğrulanması ve Stoklanması

IDT'den E.coli kodon optimize şekilde sipariş edilen gen kullanım öncesi E.coli DH5 α suşuna aktararak bakteri stoğu hazırlandı.

Kağıt membrana emdirilmiş halde teslim alınan insert, 100 μ l nükleazsız su içerisinde çözündürüldükten sonra NanoDrop™ ile konsantrasyon ölçümü yapıldı (4643 ng/ μ l) 20 μ l şeklinde alikotlanarak, çalışma alikotu dışındaki porsiyonlar -86°C dondurucuya saklanmak üzere kaldırıldı. DNA kalıbı olarak kullanılarak PZT reaksiyonu kuruldu. PZT reaktif ve thermal cyler protokolü Çizelge 4.27'de verilmiştir.

Çizelge 4.27. PZT Reaktifleri ve Thermal Cycle Koşulları

PZT Reaktifleri		Thermal Cycle Koşulları		
İçerik	Miktar (25 μ l)	Sıcaklık	Süre	Döngü
Dream Taq PCR Master Mix (2X)	12,5 μ l	95°C	5 dk	1
F Primer	0,5 μ l	95°C	45 sn	40
R Primer	0,5 μ l	54 °C	45 sn	40
Kalıp DNA	1 μ l	72°C	2 dk	40
Nükleazsız Su	10,5 μ l	72°C	10 dk	1
		4°C	∞	4

PZT amplikonları %1'lik Agarose jelde 1xTAE tamponu içerisinde 100 V 45 dk yürütüldü. Yürütme sonrası agaroz jel TAE içerisinde hazırlanan Etidyum Bromür karışımı içerisinde 15 dakika bekletildi. Jel görüntüsü BioRad VersaDoc 1000 cihazında alındı.

4.2.1.5 Restriksiyon Enzimi ile Vektör ve PZT ürünlerinin Kesilmesi

SARS-CoV-2 Spike sekansının pET28a vektörünün içine ligasyonunu sağlamak amacıyla PZT amplikonları ve pET28a vektörü NdeI ve HindIII restriksiyon enzimleriyle eş zamanlı olarak kesildi. Reaksiyon koşulları Çizelge 4.28.'de belirtilmiştir. Tampon uyumluluğu gösterdiklerinden dolayı iki enzimle eş zamanlı olarak CutSmart™ tamponu içinde restriksiyon enzim kesimleri yapıldı. PZT amplikonu ve pET28a 37°C de 2 saat süreyle thermal cycle kapağı ısıtılmadan kesime bırakıldı.

Çizelge 4.28. Restriksiyon Enzim Kesimi

İçerik	Miktar (100 µL)		İçerik	Miktar (100 µL)
10xCutSmart	10 µL		10xCutSmart	10 µL
NdeI	10 µL		NdeI	10 µL
HindIII	10 µL		HindIII	10 µL
pET28a	5 µL		PZT Amplikon	5 µL
Nf H2O	65 µL		Nf H2O	65 µL

4.2.1.6 Ligasyon

Enzim kesim işlemleri sonrasında vektör ve insert ligasyonu T4 Ligaz Enzimi kullanılarak yapıldı. İnsert:vektör oranı 3:1 olarak belirlendi. Ligasyon reaksiyonu içerikleri Çizelge4.29'da belirtilmiştir. Thermal Cycle koşulları 16°C de gece boyunca, 65°C de 10 dakika ve 4°C sonsuz olarak belirlendi.

Çizelge 4.29. Ligasyon Protokol Bileşenleri

İçerik	Miktar (20 µL)
10x T4 Ligase Buffer	2 µL
Vektör	0,02 pmol
İnsert DNA	0,06 pmol
Ligase	1 µL
dH2O	20 µl'ye tamamlanır

4.2.1.7 Bakteriyel Transformasyon

Viral Spike genini kodlayan pET28a-Spike vektörü yüksek verimlilikle önce DH5 α suşuna, daha sonra ekspresyon suşu olan BL21 (DE3) e transforme edildi.

DH5 α suşu bir gece önceden sıvı LB besiyeri içinde canlandırıldı. Starter kültürden 500 μ l alınarak 20 ml LB içine inokülasyon yapıldı. OD600 dalga boyunca turbidite takibi yapıldı. Turbidite değeri 0.8 e ulaştığında +4°C, 1000 g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak elde edilen bakteriyel pelet 400 μ l taze hazırlanmış soğuk TSS içerisinde çözdürüldü. 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Süre dolduktan sonra 200 ng ligasyon ürünü, 2.0 ml'lik mikrofüj tüpüne pipetlendi ve TSS'li bakteriler ligasyon ürünlerinin üzerine eklendi. 1 saat buz üstünde bekledikten sonra 42°C ye önceden hazırlanmış su banyosunda 90 sn inkübe edildi ve tüpler hemen buz üstüne transfer edildi. 900 μ l SOC besiyeri eklenip 37°C çalkalayıcı inkübatörde 4 saat süreyle inkübe edildi. Daha önceden hazırlanmış kanamisin içeren LB-agar katı besiyerleri oda sıcaklığına çıkarıldı. Tüpler ekim yapılmak üzere 13.000 g de 2 dk santrifüj edildi. Pelet 100 μ l SOC içinde çözdürülerek katı LB-Kan agara ekildi. 24 saat 37°C inkübatörde koloni gelişiminin gözle görünür boyuta gelmesi beklendi. Gelişen koloniler 10 ml antibiyotikli sıvı LB içerisine inoküle edildi ve plazmit izolasyonu gerçekleştirilmek üzere gece boyunca çalkalayıcı inkübatörde 37°C de çoğalmaya bırakıldı.

4.2.1.8 Bakteriden Plazmid İzolasyonu

Gece boyunca çoğalan bakteriler, çalkalayıcı inkübatörden alınarak 10.000 g de 90 sn santrifüj edildi. Tüm işlemler buz üstünde yapıldı. Alkalen lizis yöntemi ile plazmid izolasyonu için lizis tamponu 1 ve lizis tamponu 3 daha önceden hazırlanıp buz üstünde soğutuldu. Alkalen lizis tamponu 2 taze olarak hazırlandı. 2.0 ml tüp içerisindeki peletlerin üzerine 200 μ l soğuk lizis 1 tamponu eklenerek çözdürüldü. 400 μ l Lizis 2 tamponu üzerine eklendi ve tüp bir kaç defa ters yüz edildi. 300 μ l lizis 3 tamponu eklenerek tüpler 5 dk buz üstünde bekletildi. 5 dk maksimum hızda santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası 600 μ l süpernatant temiz tüplere aktarıldı. Üzerine 600 μ l fenol:kloroform karışımı eklendi ve vortekslendi. Maksimum hızda 15 dk santrifüj edildi ve üst berrak faz temiz tüpe aktarıldı. 600 μ l izopropanol eklenerek 2 saat -20°C de bekletildi. 15 dakika maksimum hızda santrifüj

edildikten sonra alkol yıkamaları yapıldı. Elde edilen plazmit DNA'nın ağzı açık şekilde alkolü uçuruldu. 50 µl RNase içeren su ile çözdürüldü.

4.2.1.9 İnsert Alan Kolonilerin Tespiti ve BL21 Transformasyonu

Pozitif DH5α kolonilerinin belirlenmesi için izole edilen plazmitlerden spike ve T7 primerlerine karşı PZT yapıldı. Pozitif kolonilerden elde edilen plazmitlerin bir bölümü stoklandı. Pozitif plazmitlerden biri ile BL21 ekspresyon suşuna transformasyon yapıldı. BL21 transformasyonu, DH5α transformasyon protokolüne sadık kalınarak yapıldı.

4.2.1.10 IPTG ile Protein İfadesinin İndüklenmesi

Kanamisinli katı LB-agardan alınan BL21 kolonisi canlandırma amacıyla antibiyotikli TB besiyeri içerisine inoküle edilerek gece boyunca çalkalayıcı inkübatörde bırakıldı. Ertesi gün 1/100 oranında 100 ml antibiyotikli TB besiyerine tekrar inoküle edildi. 3 saat 37°C çalkalayıcı inkübatörde çoğalmaya bırakıldı. 2X IPTG indüksiyon besiyeri eklenerek oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası elde edilen bakteri kültürü dört adet 50 ml'lik tüpe aktarıldı. 5000 g de 10 dk santrifüj edilerek bakteriyel pellet elde edildi. Tüplerden ikisi -86°C de stoklanırken diğeri ikisi total protein izolasyonu amacıyla kullanıldı.

4.2.1.11 Bakteriden Total Protein İzolasyonu

Bakteri peletleri su ile süspanse edilerek 700 µl'lik hacimlere ayrıldı. Bakteri süspansiyonunun üzerine Çizelge 4.30'da belirtilen oranlarda lizozim içeren lizis tamponu eklendi. Buz üzerinde ultrasonikatörde tutularak 10 sn aralarda toplamda 4 dk bakteri parçalanması sağlandı. 15 dk orbital rotatör üzerinde enzimatik lizis reaksiyonu devam ettirildi. Sonrasında maksimum hızda 15 dk santrifüj yapılarak total protein içeren süpernatantlar 1,5 ml lik tüplere alikotlandı.

4.2.1.12 Afinite Kromatografi ve Diyaliz ile Protein Saflaştırılması

Total proteinden hem N-terminal ucunda hem de C-terminal ucunda 6xHis-tag etiketi bulunan spike proteinini saflaştırmak için afinite kromatografi tekniği kullanıldı. Protein üretimini görmek amacıyla iki teknikle protein saflaştırılması yapıldı. İlk indüklenen BL21 kolonisinden izole edilen proteinler HisPur Ni-NTA purifikasyon kiti ile, üretici firma

protokolüne sadık kalınarak saflaştırıldı. Yüksek konsantrasyonda protein eldesi amacıyla BioRad Biologic DuoFlow kromatografi cihazında yüksek hacimli saflaştırma yapıldı. Saflaştırma aşamasında dengeleme, yıkama ve elüsyon tamponları kullanıldı. Tampon içerikleri Çizelge 4.30 ‘da belirtildi.

Çizelge 4.30. Afinite Kromatografi Tamponları

Tampon Adı	İçerik	Konsantrasyon	pH
Dengeleme Tamponu	Sodyum Fosfat	20 mM	7.4
	Sodyum Klorür	300 mM	
	İmmidazol	10 mM	
Yıkama Tamponu	Sodyum Fosfat	20 mM	7.4
	Sodyum Klorür	300 mM	
	İmmidazol	15 mM	
Elüsyon Tamponu	Sodyum Fosfat	20 mM	7.4
	Sodyum Klorür	300 mM	
	İmmidazol	300 mM	

Kromatografi sonrasında elde edilen saf His-tag li proteinlerin immidazolden uzaklaştırması ve pH dengelenmesi amacıyla diyaliz membran kullanılarak elüsyon tamponu PBS e çevrildi. Uygun boyutta diyaliz membranı kesilerek içine tampon değiştirilecek protein elüsyonları konulur ve membran iki ucundan klipslenir. 1 L PBS içerisinde manyetik karıştırıcı üzerinde gece boyunca bırakıldı. Ertesi gün diyaliz membranı içindeki proteinler 1,5 ml’lik tüpler içerisine alikotlanarak -86°C donduruyuca kaldırıldı.

4.2.1.13 Protein Konsantrasyon Tayini

Saflaştırılan Spike protein konsantrasyonu BCA Protein Assay Kiti ile kit protokolüne sadık kalınarak ölçüldü. Kit içerisinde bulan 2 mg/ml albumin ampülü kullanılarak 2 mg/ml , 1.5 mg/ml, 1 mg/ml, 0.75 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml ve 0 mg/ml olmak üzere standart protein çözeltileri hazırlandı. Örnekler ve standartlar 96 kuyucuklu pleytlere 25 µl olarak duplike dağıtıldı. Kit içerisinde bulunan A ve B reaktifleri 50/1 oranında karıştırılarak her kuyucuğa 200 µl dağıtıldı. Karanlık ortamda 37°C de 30 dk inkübe edildikten sonra spektrofotometrik olarak 562 nm dalga boyunda okutma yapıldı. Elde edilen absorbans değerleri ile bilinen standart kondisyonları kıyaslanarak konsantrasyon hesabı yapıldı.

4.2.1.14 SDS PAGE ve Coomassie Blue Boyama

Spike rekombinant proteini üretilirken diyalizle saflaştırılma basamağına kadar tüm basamakların moniterize edilebilmesi amacıyla tüm fraksiyonlardan numune ayrıldı. Bu örnekler 4X Laemmli Sample Buffer ile karıştırılarak 95°C de 7 dk ısı bloğunda bekletildi. Buza transfer edildi. %12 lik Poliakrilamid jelde protein markır eşliğinde hizalayıcı jeli geçene kadar 80 V, sonrasında 100 V'ta 90 dk Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell sisteminde yürütüldü. Coomassie Blue boyaması için jel 45 dk fiksasyon tamponunda, gece boyunca Coomassie Blue boyasında ve ertesi gün bantlar görünür olana kadar 15 dk da bir değiştirilerek destain tamponunda çalkalayıcı üzerinde tutuldu. Bantlar belirginleştikten sonra jel 700 nm dalga boyunda Li-COR cihazında görüntülendi.

4.2.2 İMMÜNİZASYON

4.2.2.1 Antijenin Hazırlanması

İmmünizasyonda kullanılacak 3 Balb/C fare için fare başına 300 µl de 100 µg rekombinant Spike proteini olacak şekilde 1:1 hacim oranında Freund's Complete Adjuvant çözeltisi hazırlanarak intraperitoneal zerk yapıldı. 2. dozdan itibaren antijen çözeltileri yine 1:1 hacim oranında Freund's Incomplete Adjuvant ile karıştırılarak 15 gün arayla periton içine zerk edildi.

4.2.2.2 Serum Antikor Titrasyonu

Serum antikor titrasyonunun belirlenebilmesi amacıyla indirekt ELISA tekniği kullanıldı. Test yapılmadan bir gün önce 96 kuyucuklu ELISA pleytleri her kuyucuğa 1µg olacak şekilde Spike antijeni ile kaplandı. Gece boyunca +4°C'de tutulan pleyt 3 defa PBS-T tamponu ile yıkandı. Kuyucuklara 200 µl %5 BSA içeren PBS dağıtılarak 1 saat 37°C'de 30 dk oda sıcaklığında bloklama yapıldı. İmmünizasyon enjeksiyonları sırasında 3. doz güçlendirici zerk edildikten 5 gün sonra farelerin (L, N, R) kuyruğundan kan alındı. 6000 rpm de 10 dk santrifüjlendikten sonra serum ayrıştırıldı. Serumlardan 1/1000, 1/5000, 1/10.000, 1/25.000, 1/50.000, 1/100.000, 1/250.000, 1/500.000 ve 1/1.000.000 oranlarında dilüsyon hazırlandı. Serum dilüsyonları duplike olacak şekilde 100 µl kuyucuklara

dağıtılarak 3 saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda 3 defa PBS-T tamponu ile yıkandı. Kuyucuk başına 100 µl olacak şekilde, 1/5000 oranında anti-mouse IgG-HRP sekonder antikoru PBS içinde hazırlandı ve kuyucuklara dağıtıldı. 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Sürenin tamamlanmasının ardından 3 defa PBS-T tamponu ile yıkandı. Kuyucuklara bir HRP substratı olan TMB-E solüsyonu 100 er µl olacak şekilde dağıtılıp 15 dk karanlıkta inkübe edildi. 15 dk sonunda 50 µl 2M sülfirik asit eklenerek reaksiyon durduruldu ve 450 nm dalga boyunda TECAN Infinite 200 Pro ile spektrofotometrik okuma yapıldı.

4.2.3 HİBRİDOMA KLONU OLUŞTURMA

1/200.000 serum dilüsyonunda antijen pozitif sonuç veren farelere 100 µg adjuvansız boost dozu peritoneal olarak zerk edildikten 5 gün sonra, uygun immünize fareler lethal doz anestezik ile sakrifiye edildi. Cerrahi öncesinde kanüller yardımıyla göz arkası damarlardan kan toplanarak serum ayrıştırıldı. Steril koşullarda cerrahiye alınan farelere splenektomi yapıldı.

4.2.3.1 F0 Hücrelerinin Hazırlanması

Son doz antijen enjeksiyonu ile paralel olarak hali hazırda hücre kültürü devam eden myeloma (F0) hücreleri, hypoxanthine ve thymidine kokteyli içeren ve HT adı verilen supplement ile hazırlanan hücre kültürü besiyeri içinde beslendi. Füzyon hazırlık besiyeri %10 FBS, %1 Penisilin Streptomisin, %1 L-glutamin, 4.5 g/L Glukoz ve 1xHT içerecek şekilde hazırlandı. F0 hücreleri 5 gün süre ile füzyon hazırlık besiyerinde çoğaltıldı. Bir dalak için iki adet T75 cm flaskta çoğaltılmış F0 kullanıldı.

4.2.3.2 Makrofaj Hücre Kültürü

Makrofajlar füzyon sonrası hücrelerin ekilmesi için önemli bir feeder layer oluştururlar ve besiyerine salgıladıkları sitokinlerle füzyon hücrelerinin idamesi için destek olurlar. Bu amaçla immünize farelerin sakrifikasyonundan 4 gün önce farelerin periton boşluğuna 10 ml eklentisiz DMEM enjekte edildi. İki üç dakika sonra enjekte edilen DMEM periton boşluğundan geri çekildi ve 15 ml'lik tüplere konuldu. 400 g'de 5 dk santrifüj edildikten sonra full besiyeri ile resüspanse edilerek 24 kuyucuklu hücre kültürü pleytlerine ekildi.

4.2.3.3 Splenosit izolasyonu

Splenektomi sonrasında, fare dalakları boş DMEM ile 100 mikron elek büyüklüğü bulunan metal mesh üzerinde 10 cc enjektör arkası yardımıyla ezildi ve homojenize edildi. 10 ml boş DMEM içerisinde toplanarak 400 g'de 5 dakika santrifüj edilip yıkandı. 10 ml serumsuz besiyeri içinde resüspanse edildi.

4.2.3.4 Füzyon

T75 flaskta ekili olan F0 hücreleri, splenosit izolasyonu ile eş zamanlı olarak flasklardan toplanarak 15 ml'lik tüplere transfer edildi. 400 g'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üste kalan besiyeri aspire edildi. Hücre peleti 10 ml boş besiyerinde resüspanse edildi ve aynı şekilde 10 ml boş besiyerinde bekleyen splenositlerle birlikte 400 g'de 5 dk santrifüj edildi. Yıkama işlemi sonrasında F0 hücreleri ve splenositler 10 ml boş besiyerinde süspanse edildi ve iki hücre birbirine karıştırıldı. 800 g'de 5 dk santrifüj edildi. Pelet tüp dibine yavaşça vurularak gevşetildikten sonra 37°C sıcak su banyosunda bekleyen 1 ml PEG solüsyonu laminar akışlı steril hücre kabini içine alındı. 1 dk içerisinde yavaş yavaş sızdırılarak hücre karışımının üzerine eklendi. Ekleme sırasında tüpün altına hafifçe vurulmaya devam edildi. 2 dakika boyunca düzensiz hareketlerle karıştırıldı. 10 ml serumsuz besiyeri serolojik pipetle çekilerek PEG'li hücre karışımı üzerine ilk 1 dakika 1 ml eklenirken kalan 9 ml serumsuz besiyeri 2 dakika içinde düzensiz karıştırma devam edilerek eklendi. Hücreler 10 dk sıcak su banyosunda ara ara düzensiz şekilde sallanarak inkübasyona bırakıldı. PEG artığını ortamdaki uzaklaştırmak için karışım 400 g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant çok dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra hücre karışımı selektif besiyeri içinde iki adet 24 kuyucuklu pleytlere ekildi. Selektif besiyeri, yüksek glukozlu DMEM içerisine %20 FBS, %1 Pen-Strep %1 L-Glutamin, ve son hacimde 1x olacak şekilde 50xHAT supplementinden eklenerek hazırlandı. Bu aşamada artı kalan 100 mikrolitre hücre karışımı lam üzerine konularak mikroskop altında füzyona giren hücreler izlendi.

4.2.3.5 Hibridoma Hücrelerinin Validasyonu, İdamesi ve Tek Klon Çoğaltılması

24 kuyucuklu pleytlere ekilmesinden sonra 48 saat boyunca hücrelere herhangi bir manipülasyon yapılmadı. Füzyonu takip eden 3. Gün, kuyucuklara eklendiğinde son hacimde 1x HAT içerecek şekilde 300 µl besiyeri eklendi. F0 klonları hypoxanthine-guanine

phosphoribosyltransferase (HGPRT) yönünden mutant bir hücre hattıdır. Füzyon deneyi sonrasında ortamda 3 tip hücre bulunmaktadır: füzyona uğramamış F0 hücreleri ve splenositler ve füzyona uğramış hibridoma hücreleri. HAT eklenmesi sonucunda, aminopterin varlığında de novo DNA nükleotid sentezi bloklanacaktır. Bu aşamada hücre nükleotid sentezini devam ettirebilmek için alternatif oluşturan salvage pathwayini aktive edecektir. Salvage pathway ile de ancak ortamda hypoxanthine ve thymidin varsa yaşam döngüsünü devam ettirebilecektir. HGPRT mutant F0 hücreleri salvage pathway'ı aktive edemeyerek ölecek ve ortamdan elimine olacaktır. Ortamda HAT varlığında ancak F0 ve splenosit füzyonuna uğramış hibridoma hücreleri yaşamını devam ettirebilecektir. Bu bilgiler ışığında pozitif hibridoma klonlarının validasyonu ve seçilmesi amacıyla füzyon sonrası hücreler HAT içeren besiyerine ekildi. Çoğalma gösterip koloni oluşturan kuyucuklardaki klonlar, mikroskop altında tek tek toplanarak yeni 24 kuyucuklu hücre kültürü pleytlerine ekildi. Kuyucuklarda hücreler %80 konfluensiye ulaştıklarında 6 well pleytlere oradan da sırasıyla T25 ve T75 flasklara aktarıldı. Her aşamada ana klonlar %10 DMSO içeren FBS içerisinde sıvı azota kaldırıldı. Daha sonra yapılan testlerle pozitif olduğu belirlenen klonlar, varyasyonun azaltılması ve standardizasyonun sağlanarak monoklonal hale getirilmesi amacıyla 96 kuyucuklu pleytlere ekilerek tek koloni düşürülene kadar seyreltildi. Tek koloniden kaynak alan klonlar çoğaltılarak antikor testlerine tabi tutuldu.

4.2.4 POZİTİF KLON SAPTANMASI VE KARAKTERİZASYONU

Füzyon deneyi sonrasında hibridoma elde edilmesine rağmen, her hibridoma hücresinin aynı kalite ve yoğunlukta ilgi duyulan antikoru üretmediği bilinmektedir. En yüksek yoğunlukta antikor üreten klonun tespit edilmesi amacıyla indirekt ELISA testi yapıp, yüksek pozitivite gösteren klon çoğaltılmaya ve sonraki testlerle karakterize edilmeye devam edilir.

4.2.4.1 Indirekt ELISA Testi

Hibridoma klonlarının çoğalmasından ve yeterince stok oluşturulmasından sonra hücreler kademeli olarak azalan (%20'den %15'e, %15'den %10'a, %10'dan %5'e) serumlu besiyeri ile beslenmeye adapte edildi. %5 serum içerisinde beslenen hücrelerden toplanan süpernatantlarla indirekt ELISA testi yapıldı. Önceden hazırlanan Spike ile kaplı 96 kuyucuklu ELISA pleytlerine primer antikor olarak hücre süpernatantları eklendi. HRP

konjuge anti mouse sekonder antikor inkübasyonu sonrasında HRP substratı TMB-E ile inkübe edildi. Reaksiyonu durdurmak amacıyla 2M sülfürik asit eklendi ve 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik okuma yapıldı. Negatif oldukları belirlenen klonların üretilmesi durduruldu. Pozitif sonuç veren klonlar çoğaltılarak hem stokları artırıldı hem de süpernatant toplandı.

4.2.4.2 Antikor İsoiplendirme Testi

İndirekt ELISA testinde pozitiflik gösteren klonların süpernatantları, üretilen antikor isotipinin belirlenmesi amacıyla Rapid ELISA Mouse mAB Isotyping Kit ile çalışıldı. Kit sonucuna göre üretilen monoklonal antikorun hangi ağır ve hafif zincir tipinde olduğu belirlendi.

4.2.5 PROTEİN G AGAROSE İLE ANTİKOR SAFLAŞTIRILMASI

Üretilen anti-spike monoklonal antikoru saflaştırılmak ve tampon değişimi yapılarak stabilizasyonunu artırabilmek amacıyla IgG kromatografisi (immünoafinity purifikasyonu) ile saflaştırıldı. Saflaştırma Protein G Agarose, Fast Flow (Millipore, 16-266) kiti kullanılarak yapıldı. Protein G saflaştırması için gerekli tamponlar hazırlandı ve steril edildi: Glisin (0.1 M, pH 2), PBS (1M ve 0.1 M) Tris-HCl (2M, pH 8)

HisTag kromatografisi kolonlarından biri boşaltılarak yerine 4 ml Protein G resin konuldu. Resin 40 ml 0.1 M PBS ile yıkandı. Antikor içeren hücre süpernatantı 1:1 oranında 0.1 M PBS ile dilüe edildi. Dilüe edilmiş süpernatant olası hücresel artıkları uzaklaştırmak amacıyla 10.000 g'de 15 dk santrifüj edildi. Dilüe edilmiş süpernatant yerçekimi akışına bırakılarak 3 defa kolondan geçirildi. Kolon, eluattan protein tespit edilmeyene kadar yıkandı. Flow through ürün kalitesi ve veriminden emin olunana kadar saklandı. İmmunoaffinity ile kolona bağlanan antikor, kolondan 0.1M glisin (pH2) tamponu geçirilerek elue edildi. Fraksiyonlar 2M Tris HCl (pH 8) içeren tüplere toplandı. Kolon 80 ml 0.1 M PBS ile rejenere edilerek %0.02 sodyum azid eklenerek +4°C'de saklandı. Antikor saflaştırma sonrasında PBS tampona geçirilmek amacıyla diyalize edildi.

4.2.6 İMMUNBLOTLAMA

Üretilen antikor etkinliğinin belirlenebildiği tekniklerden biri de western blotlamadır. Hibridoma klonlarının ürettiği anti-Spike mouse antikor, SDS-PAGE e yüklenerek rekombinant spike proteini ve inaktif virüse karşı etkin olup olmadığı araştırıldı.

4.2.6.1 SDS-PAGE

Rekombinant olarak üretilen Spike proteini ve Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Prof.Dr. Aykut Özkul laboratuvarından temin edilen inaktif SARS-CoV-2, %5 β ME içeren 4x LSB içerisinde 95°C de 7 dk kaynatıldıktan sonra hazırlanan %12'lik poliakrilamid jel içerisinde broad range protein ladder (NEB, P7712) eşliğinde 40 dk 80 V'da, 90 dk 100 V'da 1x yürütme tamponu içerisinde yürütüldü.

4.2.6.2 PVDF Membrana Transfer

Jelin boyutuna uygun PVDF membran kesildi. Membran aktifleştirilmek amacıyla 5 dk metanole yatırıldı. Transfer deneyi sırasında kullanılacak kalın blotlama kağıtları, PVDF membran ve jeller equilibrasyona getirilmesi amacıyla transfer tamponuna yatırılarak, 5 dk inkübe edildi. BioRad Trans-Blot Turbo Transfer sistemine ait kasetler açılarak sırasıyla blotlama kağıdı, PVDF membran, SDS-PA jel ve yine blotlama kağıdı olacak şekilde sandviç yapıldı. Membran ile jel arasında kabarcık kalmasını önlemek amacıyla roller ile üzerinden geçildi ve fazla sıvı peçete ile kurulandı. 25 V, 1.5 A de 33 dakika transfer gerçekleştirildi.

4.2.6.3 PVDF Membranın Bloklanması

Blotlama sonrası PVDF membran üzerinde hala boş spotların kaldığı ve bu spotlara nonspesifik protein bağlanmasını engellemek amacıyla %5 BSA bloklama tamponu ile membran 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi.

4.2.6.4 Primer Antikor İnkübasyonu

Membran, hibridoma klonları tarafından üretilen anti-spike monoklonal antikor ile 1/750 dilüsyonunda oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 3 x 10 dk PBS-T ile çalkalayıcı üzerinde yıkandı.

4.2.6.5 Sekonder Antikor İnkübasyonu

Fare orijinli üretilen anti-Spike primer antikorunun tespiti için HRP etiketli anti mouse IgG sekonder antikor 1/5000 dilüsyonunda kullanıldı. Membran sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 2X10 dk PBS-T ile 1x10 dk PBS ile çalkalayıcı üzerinde bekletilerek yıkandı.

4.2.6.6 Membranın Görüntülenmesi

Li-COR görüntüleme cihazı sekonder antikor inkübasyonu bitip yıkamalara geçildiğinde ısınması amacıyla açıldı ve hazırda bekletildi. Membran cihaz tablasına yerleştirildi. SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate kiti içerisindeki solüsyonlar 200 er µl karıştırıp saf su ile 2 ml'ye tamamlandı. Karışım membran üzerine dökülerek kemiluminesans okuma 2 dk süreyle yapıldı. Görüntüler kaydedildi.

5 ARAŞTIRMA BULGULARI

SARS-CoV-2 Spike antijenine karşı monoklonal antikor geliştirilmesi sırasında elde edilen bulgular eklenmiştir.

5.1 REKOMBİNANT SARS-COV-2 SPIKE ÜRETİMİ

5.1.1 GEN KAYNAĞI VE PROTEİN SEKANS LARI

>Spike protein kodlayan dizi

GCAGGCGCTGCCGCATATTACGTTGGGTATCTTCAGCCTCGGACTTTTTTGCTGAAGTACAACGAGAATGGTACGATTACAGACGCGGTTGATTGTGCTCTCGATCCTTTGAGCGAGACAAAATGTACACTTAAATCCTTTACCGTGGAGAAGGGCATCTATCAAACATCCAATTC CGTGTCCAGCCGACCGAGTCGATCGTGCCTTTCCCTAATATTACAAATCTGTGTCCATT TGGTGAGGTCTTCAACGCAACCCGGTTTGCTTCTGTGTATGCGTGGAATCGCAAACGGA TTAGCAATTGCGTCGCGGACTACTCCGTGCTGTACAACCTCGGCGTCGTTCTCCACTTTC AAGTGTTATGGCGTGTACCTACAAAAGTGAATGATCTCTGCTTTACCAATGTTTATGC GGACTCATTTGTCAATTCGCGGGGACGAGGTACGGCAAATCGCACCGGGTCAAACCGGCA AGATCGCTGACTACAACCTATAAGTTACCTGACGACTTTACTGGTTGTGTCATTGCTTGG AACTCGAACAACCTGGATTCAAAAGTGGGCGGCAACTATAATTATTTATACCGCCTTTT TCGCAAATCGAATTTGAAGCCATTCGAACGGGATATTTCCACGGAAATTTACCAGGCAG GCTCCACTCCTTGCAACGGCGTAGAAGGCTTCAACTGCTATTTCCCATTGCAGTCATAC GGCTTCCAACCGACCAACGGGGTAGGGTACCAGCCATACCGGGTCGTTGTCTCTCATTT TGAAGTGTACACGCCCTGCTACAGTGTGTGGCCAAAAAAGTACGAACCTGGTCA AAAATAAATGCGTTAATTTTAATTTCAACGGCCTGACTGGCACTGGTGTGTTGACCGAA AGTAACAAGAAGTTCCTCCCTTTCCAGCAGTTTGGTCGCGATATCGCAGATACAACCGA TGCTGTGCGGGACCCG

Şekil 5.1. Spike Gen Dizisi

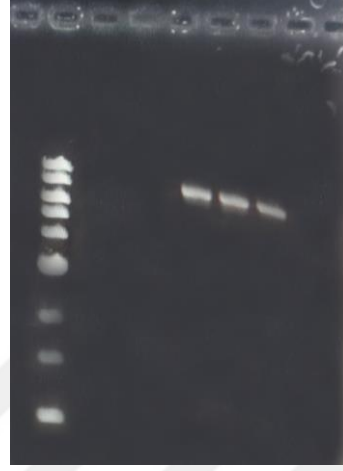
Kullanılan primer çifti renk blokları içerisinde gösterilmiştir.

surface glycoprotein [Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2]						
Sequence ID: QOS50451.1 Length: 1273 Number of Matches: 1						
Range 1: 260 to 579 GenPept Graphics Next Match Previous Match						
Score	Expect	Method	Identities		Positives	
667 bits(1720)	0.0	Compositional matrix adjust.	320/320(100%)		320/320(100%)	Gaps
						0/320(0%)
Query 1	AGAAAYVGYLQPRFTLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFR					60
Sbjct 260	AGAAAYVGYLQPRFTLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETKCTLSFTVEKGIYQTSNFR					319
Query 61	VQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKISNCVADYSVLNSASFSTFKC					120
Sbjct 320	VQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKISNCVADYSVLNSASFSTFKC					379
Query 121	YGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSN					180
Sbjct 380	YGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSN					439
Query 181	NLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQP					240
Sbjct 440	NLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQP					499
Query 241	TNGVGYPYRVVVLSEFLLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNGLTGTGVLTESNKKF					300
Sbjct 500	TNGVGYPYRVVVLSEFLLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFNGLTGTGVLTESNKKF					559
Query 301	LPFQQFGRDIADTTDAVRDP	320				
Sbjct 560	LPFQQFGRDIADTTDAVRDP	579				

Şekil 5.2. Spike Protein Dizisi

5.1.2 GEN KAYNAĞININ PZT İLE ÇOĞALTILMASI

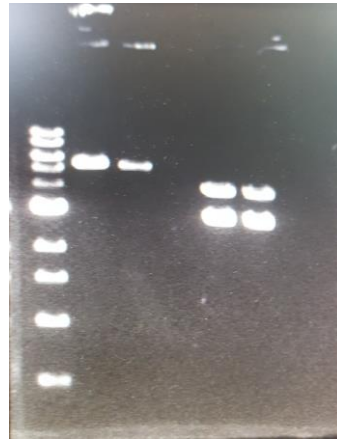
IDT'den sipariş edilen Spike gen dizisi PZT kalıbı olarak kullanıldı. Üretilen ampikon %1 agarose jelde 100 bp DNA markır eşliğinde yürütüldü. Jel görüntüsünde yaklaşık 1000 bp boyutunda bantların elde edildiği gözlemlendi. NCBI blast sonucuna göre beklenen bantın 960 bp uzunluğunda olduğu bilinmektedir.



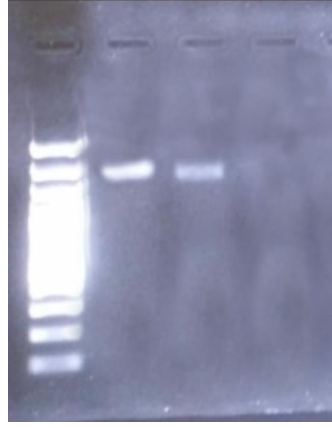
Şekil 5.3. %1.5 Agarose jel Spike PZT ampikonu

5.1.3 RESTRİKSİYON ENZİM KESİMİ

Kullanılan ekspresyon vektörü pET28a ve Spike PZR ampikonları NdeI ve HindIII enzimleri ile eş zamanlı olarak kesildi. %1.5'luk agaroz jelde 1 kb DNA Ladder (NEB, N3232S) eşliğinde yürütüldü. Enzim kesimleri pET28a vektörü için net olarak gözlemlenebilirken, 100 bp DNA Ladder eşliğinde yürütülen PZT ampikonunda ~10 bazlık yapışkan uçlar oluşturduğundan jelde bu farkı ayırebilmek mümkün değildir.



Şekil 5.4. pET28a Enzim Kesimi



Şekil 5.5. Spike PZT amplikon kesimi

5.1.4 LİGASYON

Ligasyon reaksiyonları çok küçük konsantrasyonlarda ve hacimlerde yapıldığı için teknik olarak yüksek hacimlerde agarose jele yüklemekten tespit edilemez. Deney reaktifleri ve ligasyon ürünleri yüksek kıymette olduklarından agaroz jelde yürütülmeden transformasyon aşamasına geçildi.

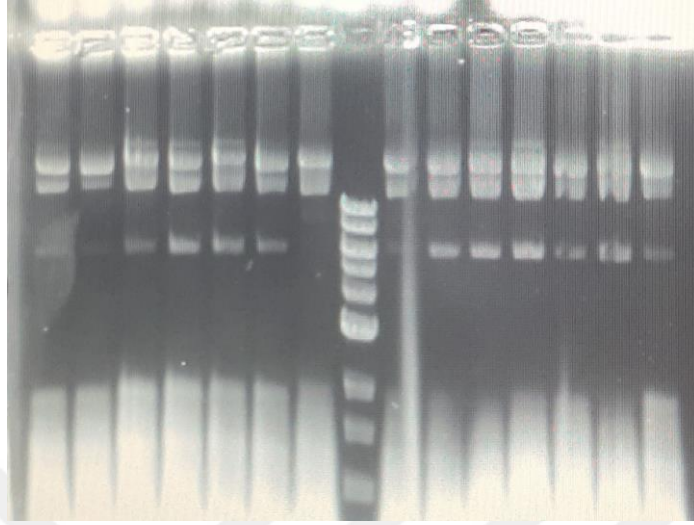
5.1.5 BAKTERİYEL TRANSFORMASYONUN DOĞRULANMASI

Rekombinant spike protein üretimi sırasında her basamağın titizlikle kontrol edilip, elde edilen ürünlerin doğruluğundan emin olunduktan sonra bir sonraki basamağa geçildi. Bu durum hem olası sorunların tespitini ve çözümünü kolaylaştırmış hem de sonraki basamaklarda malzeme ve iş gücü kazanımına olanak sağlamıştır.

5.1.5.1 Plazmit izolasyonu

Bakteriyel transformasyonlardan sonra, çoğalan bakterilerin pozitif olup olmadığının kontrolü koloni PZT tekniği ile yapılabilmektedir. Ancak bu tekniğin yanlış negatiflikler verdiği göz önünde bulundurularak, mevcut bakteriler parti halinde mini prep plazmit izolasyonu yapıldıktan sonra spike primerleri kullanılarak polimeraz zincir tepkimesi ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi ile kontrol edildi. İşleme pozitif koloni bulunana kadar tekrar edildi. İzolasyonu sonrasında plazmit DNA çözdürülürken Rnase kullanılmadığından dolayı, jelin alt tarafında RNA artıkları sürüntü halinde görülmektedir. Bu izolasyon sadece

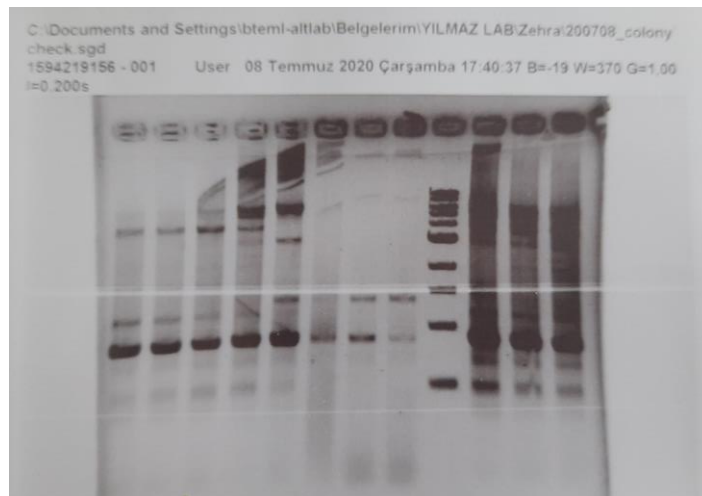
pozitif koloni confirmasyonu amacıyla yapıp downstream aplikasyonlarda kullanılmayacağından mevcut RNA kontaminasyonu herhangi bir sorun oluşturmamıştır.



Şekil 5.6. Transformasyon Sonrası Bakteriden Plazmit İzolasyonu

5.1.5.2 Koloni PZT

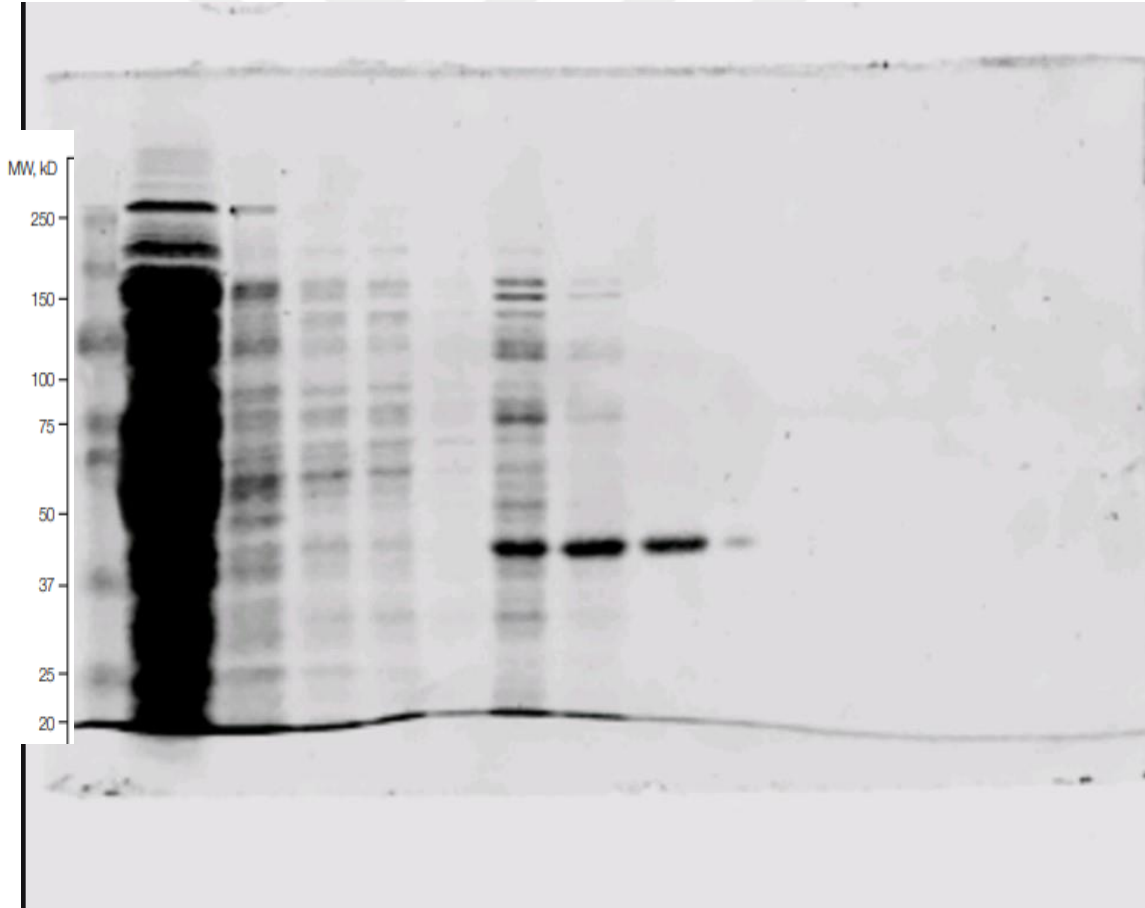
İlk 14 bakteriden izole edilen plazmitler kalıp DNA olarak kullanıldı. Spike ileri ve geri primer seti kullanılarak elde edilen PZT amplikonları %1,5 agaroz jel elektroforezinde 1 kp DNA Ladder eşliğinde yürütüldü. İlk denenen 10 koloni plazmitinden 6 tanesi spike pozitif olarak bulundu. Bu nedenle kalan 4 plazmit ve diğer koloniler pozitivite yönünden taranmaya devam edilmedi.



Şekil 5.7. Spike pozitif transforme bakteriler

5.1.6 PROTEİN SAFLAŞTIRILMASI

IPTG ile indüklenme sonrası elde edilen total proteinden afinite kromatografisi ile, yapısında 6xHisTag bulunduran rekombinant spike protein saflaştırılması HisPur Ni_NTA purifikasyon kolonları kullanılarak yapıldı. Kromotagrafi elüsyon tamponunda tuz ve imidazole kalıntıları bulunduğundan, immünizasyon çalışmaları öncesinde proteinin kimyasal püritesini artırmak ve imidazolden uzaklaştırmak amacıyla diyaliz membranı kullanılarak elüsyon tamponu PBS' e dönüştürüldü. Saflaştırılan proteinlerin her aşamada moniterize edilebilmesi amacıyla fraksiyonlar toplandı ve %12 SDS-PA jelde yürütüldükten sonra coomasie blue boyası ile boyandı. Sırasıyla total protein, yıkama fraksiyonları, Ni-NTA kolon elüsyonu ve diyaliz membran elüsyonları yüklenerek Precision Plus Protein™ WesternC™ Standards (BioRad, 161-0385) protein ladder eşliğinde yürütüldü.



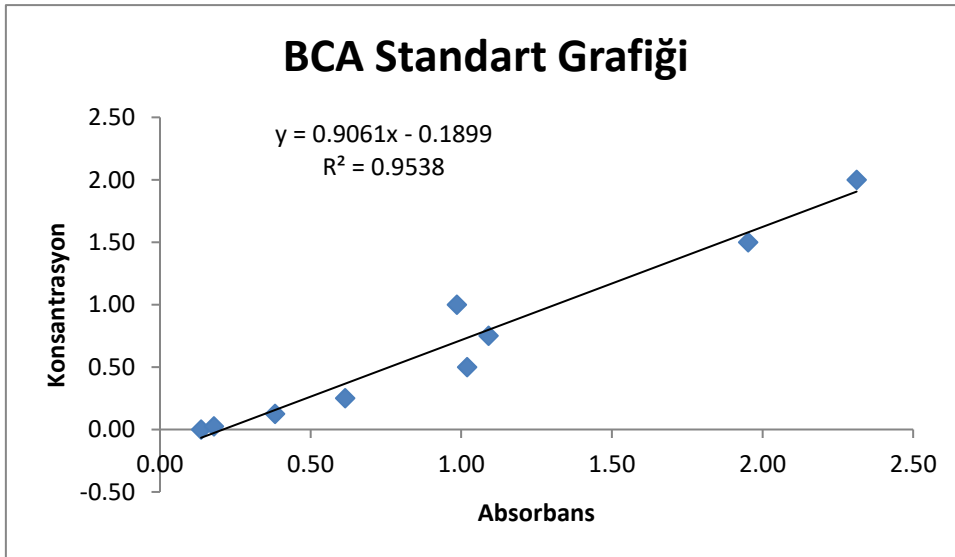
Şekil 5.8. Spike Protein Purifikasyonu Poliakrilamid Jel Coomassie Blue Boyama

5.1.7 PROTEİN KONSANTRASYONU

Elde edilen proteinlerin konsantrasyonu BCA kiti ile ölçüldü. Konsantrasyonu bilinen standart örneklerine kıyasla, konsantrasyon tespiti yapıldı. Absorbance değerleri ve Standart eğri grafiği sırasıyla Çizelge 5.1 ve Şekil 5.9 da verildi.

	Örnek Adı	OD	(mg/ml)
1	Spike Protein G Flow 1	0.52	1.93
2	Spike Protein G Flow 2	0.54	2.00
3	Spike Protein G Flow 3	0.52	1.92
4	Spike Protein G Elute 1	0.33	1.17
5	Spike Protein G Elute 2	0.27	0.97
6	Spike Protein G Elute 3	0.16	0.53
7	Spike Protein G Dialize 1	0.3	1.07
8	Spike Protein G Dialize 2	0.26	0.94
9	Spike Protein G Dialize 3	0.13	0.41
10	Spike HisTaq Dialize E1	0.39	1.44
11	Spike Histaq Elute 1	0.35	1.26
12	Spike Hybridoma Supernatant %2 FBS	1.76	6.74

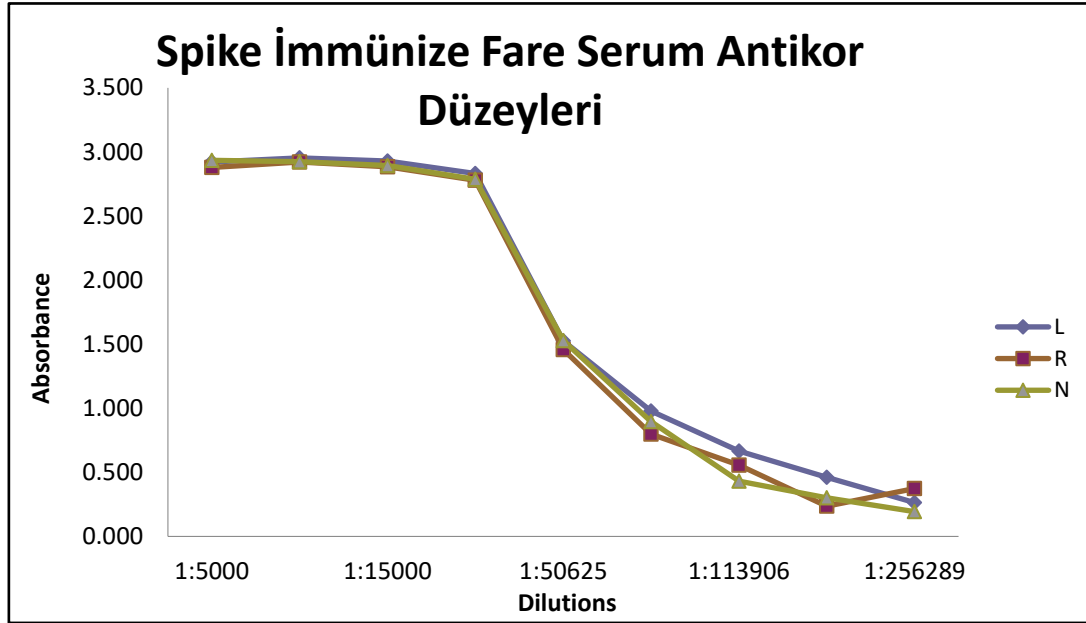
Çizelge 5.1. Saflaştırılmış Spike protein absorbance ve konsantrasyonu



Şekil 5.9. BCA Protein Standart Grafiği

5.1.8 ANTİKOR SERUM TİTRASYONU

Spike protein ile immünizasyonu sırasında, 3. dozdan itibaren farelerden alınan kandan ayırıştırılan serumlarla antikor titrasyonu takip edildi. Serumlar seri dilüsyonlar yapılarak indirekt ELISA yönteminde primer antikor olarak kullanıldı. Titrasyon grafiği Şekil 5.10 da gösterildi. Fareler kulak işaretlerine göre L,R ve N olarak adlandırıldı.



Şekil 5.10. anti-Spike Serum Antikor Titrasyon Grafiği

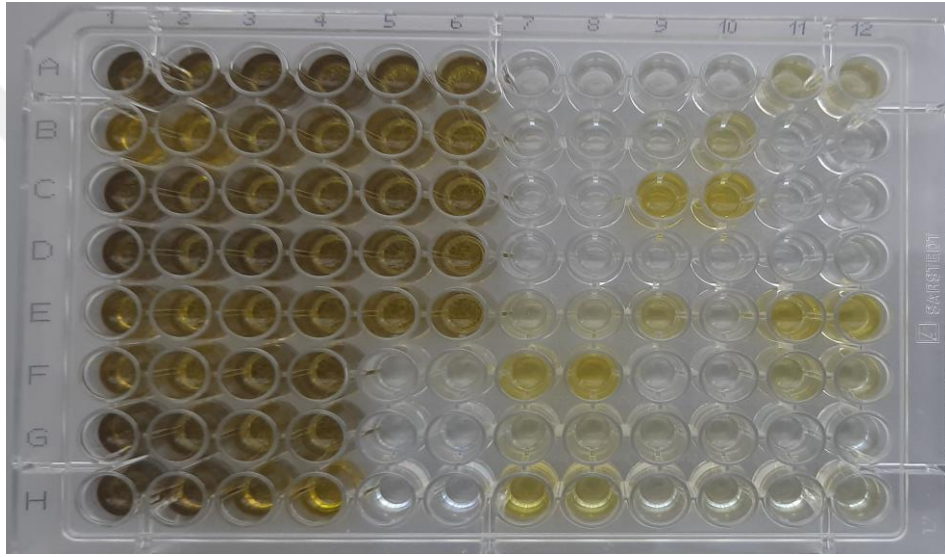
Çizelge 5.2. Serum Dilüsyonları ve Absorbance Değerleri

	Dilüsyon	L	R	N
A1	1:5000	2.920	2.879	2.934
A2	1:10000	2.953	2.921	2.925
B	1:15000	2.929	2.883	2.895
C	1:22500	2.832	2.778	2.786
D	1:50625	1.526	1.457	1.527
E	1:75937	0.977	0.799	0.895
F	1:113906	0.665	0.555	0.432
G	1:170859	0.462	0.236	0.301
H	1:256289	0.263	0.372	0.193

5.2 HİBRİDOMA GELİŞTİRİLMESİ

5.2.1 HİBRİDOMA KLONLARININ İNDİREKT ELISA İLE POZİTİVİTE ANALİZİ

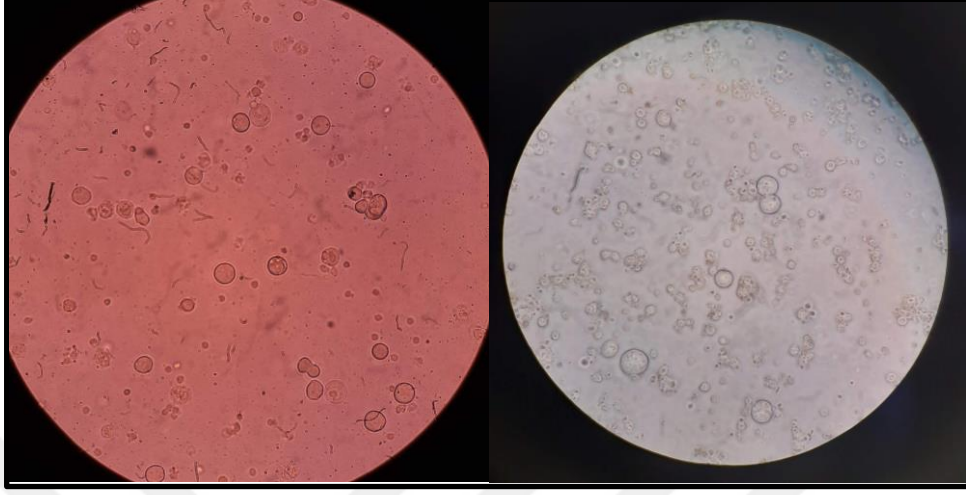
Hibridoma klon geliştirilmesi sırasında toplamda 146 koloni toplandı. İndirekt ELISA tekniğiyle rekombinant spike proteinine karşı pozitiflikleri incelendi. Bu kolonilerden 3 tanesi yüksek pozitif olmak üzere toplam 8 pozitif koloni tespit edildi. ELISA pleytinde 7.sütündan itibaren hibridoma klonları test edilmiştir. Önceki sütunlar spike proteini ile çalışılan başka bir araştırmaya aittir.



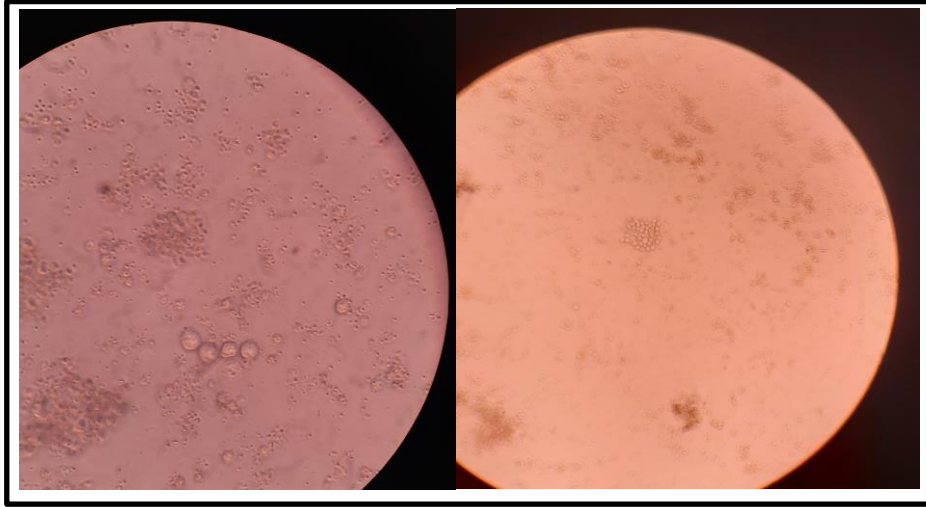
Şekil 5.11 anti-Spike Antikor Üreten Klon Tespiti

5.2.2 FÜZYON GELİŞİMİ VE HİBRİDOMA HÜCRE TAKİBİ

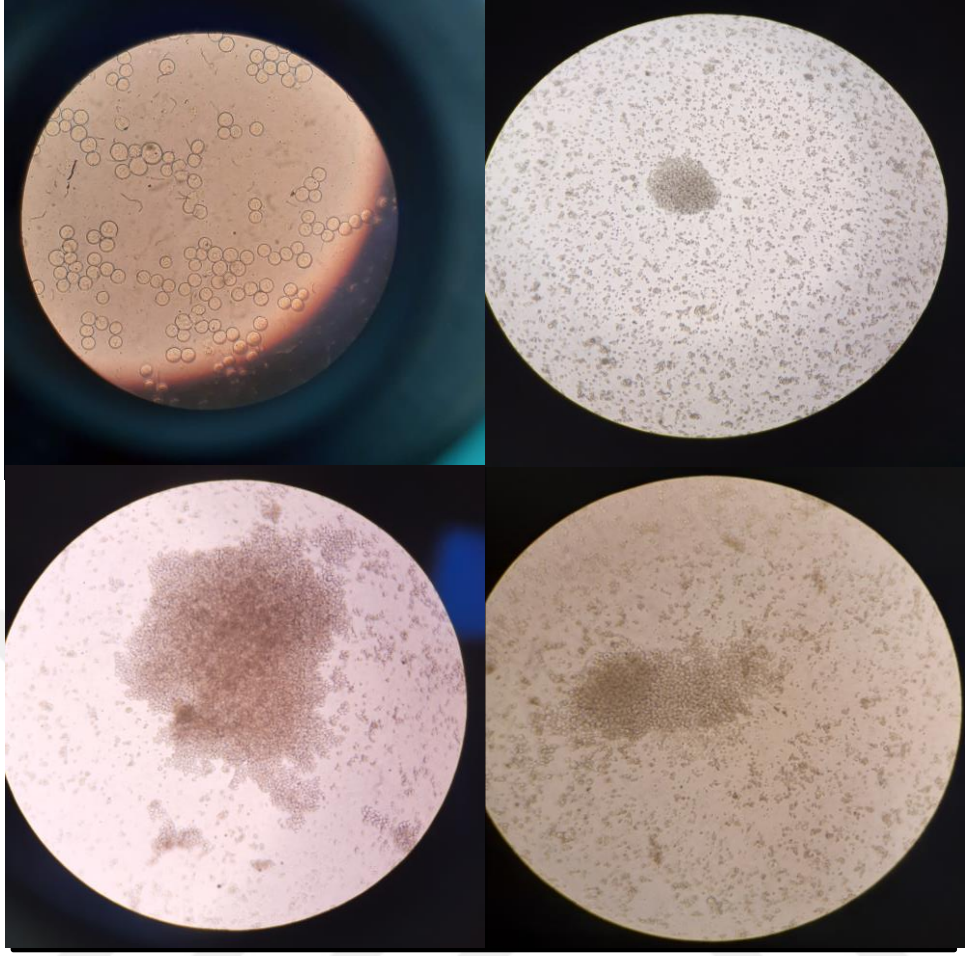
Hibridoma klon oluşumu sırasında çekilen hücre kültürü fotoğrafları eklendi.



Şekil 5.12. Füzyona aşamasındaki hücreler



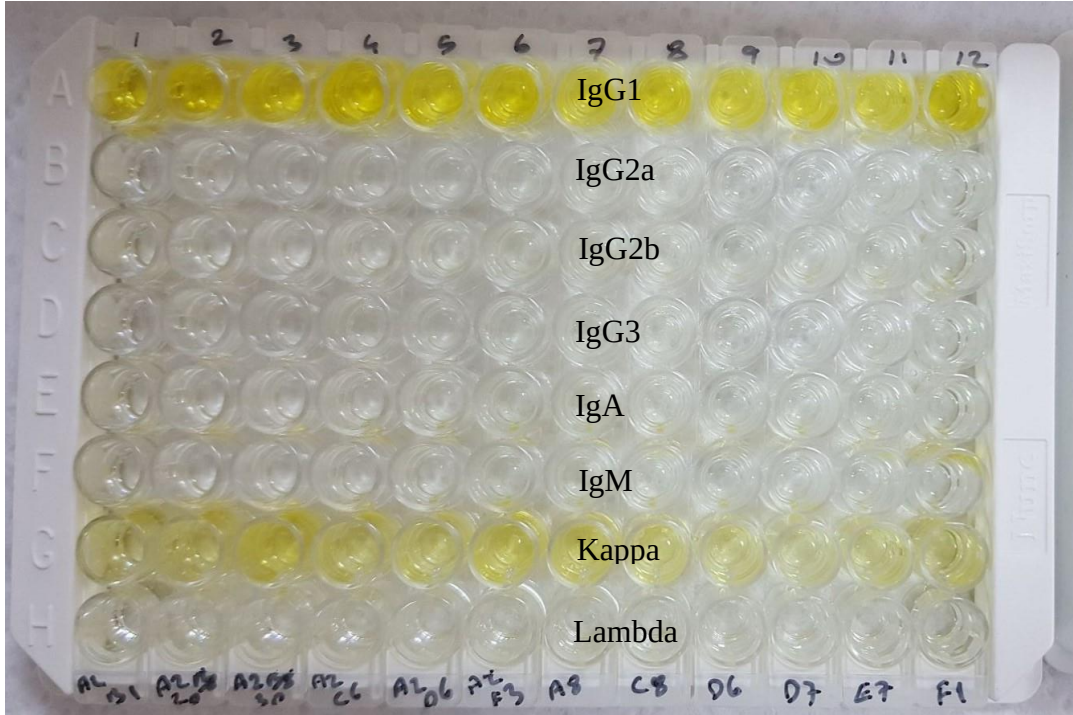
Şekil 5.13. Hibridoma hücrelerinin koloni oluşturması 1



Şekil 5.14.Hibridoma hücrelerinin koloni oluşturması 2

5.2.3 IMMÜNOGLOBİLİN İSOTİPLENDİRME

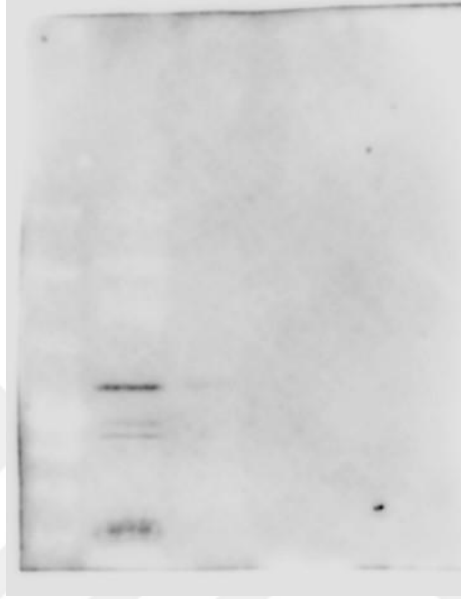
Thermo Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping kit kullanılarak Heavy ve Light chain isotiplendirmesi yapıldı. ELISA plety sonucu eklendi. Sonuca göre üretilen antikorun IgG1 Kappa isotipinde olduğu tespit edildi.



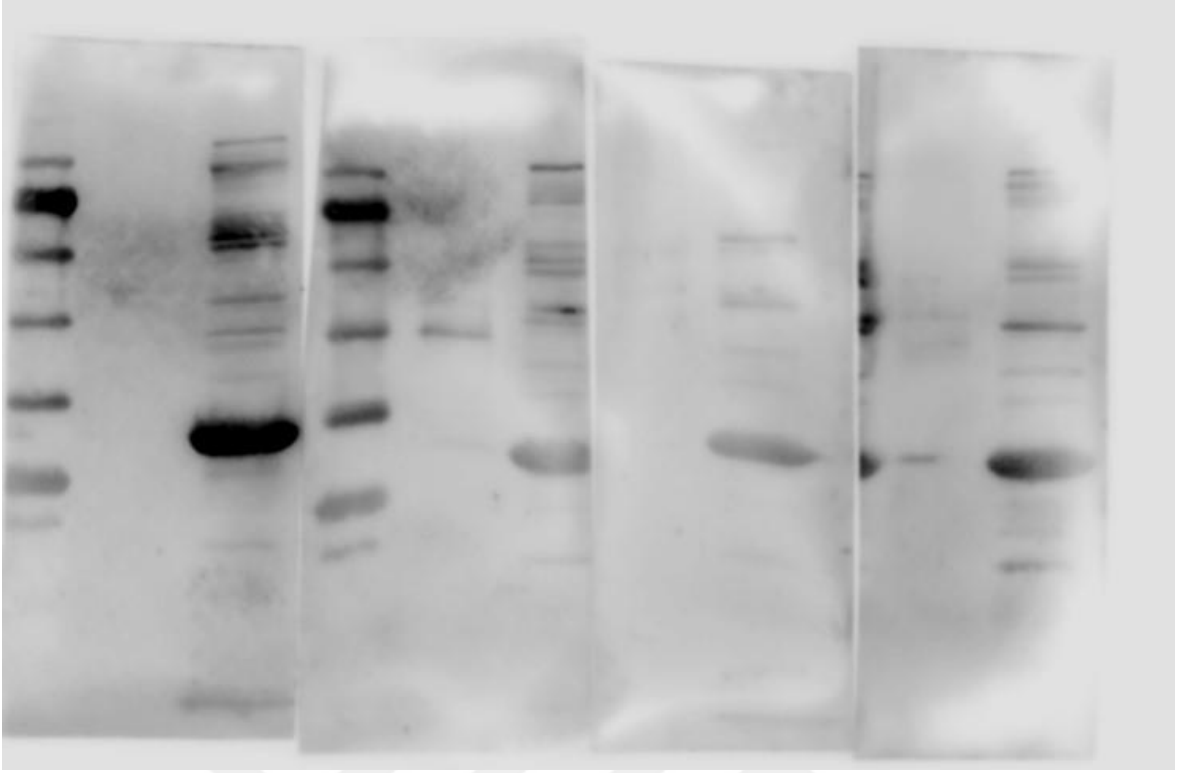
Şekil 5.15 Antikor Isotiplendirme

5.2.4 WESTERNBLOTLAMA

Seçilen klonlar tarafından üretilen anti-Spike monoklonal antikorunun etkinliğinin tespit edilmesi için immunblotlama yapıldı. İmmunblotlama aşamasında Prof.Dr. Aykut Özkul laboratuvarı tarafından farklı partilerde izole ve inaktive edilen SARS-CoV-2 virüsü kullanıldı.



Şekil 5.16. İmmünblotlama: Rekombinant Spike proteinine karşı anti-Spike mAb



Şekil 5.17. İmmünBlotlama: İnaktif virüse karşı anti-Spike mAb

5.2.5 NÖTRALİZASYON TESTİ

Çalışmada üretilen ve spesifikliğı tespit edilen Anti-Spike monoklonal antikorunun aktif SARS-CoV-2 üzerindeki etkisinin gösterilmesi amacıyla Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Prof. Dr. Aykut Özkul Laboratuvarında çalışıldı. Kültüre edilen Vero-E6 hücre hattı, 24 kuyucuklu hücre kültürü pleytine ekildi. 1×10^{-8} titrasyonunda aktif virüs 1:1 oranında farklı klonlardan elde edilip pozitif ELISA sonucu veren hibridoma süpernatantları ile karıştırıldı. 1 saat 37°C hücre kültürü inkübatöründe inkübasyona bırakıldı. 1 saat sonra 24 well kuyucuklara duplike olarak dağıtıldı ve kültür inkübatörüne kaldırıldı. 5 gün boyunca takip edilen hücrelerde viral aktivite sonucu CPE gözlemlendi. Deney üç defa tekrarlandı. İkinci tekrarda antikorun koruyucu etkisi görülse dahi, birbirini destekleyen birinci ve üçüncü tekrarlar da viral aktivite gözlemlendiğinden, sonuç mevcut antikorun virüs üzerinde nötralizan etkisinin olmadığı yönünde yorumlandı. Hücre fotoğrafları, aktif virüs ile BSL-3 laboratuvarında yüksek güvenliklı ortamda çalışıldığından çekilemedi.

6 TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1 TARTIŞMA

Rekombinant DNA teknolojileri Cohen ve Boyer ile başlayıp günümüze kadar birbirinden farklı ancak protein-protein interaksyonu aracılığıyla çalışan teknolojilerin gelişmesine ön ayak olmuştur. Kişiselleştirilmiş tıptan bahsetmek, bir prokaryotik canlıya kompleks ökaryotik bir canlıya ait proteini üretirmek ve bu işin standardize olduğundan bahsetmek işten bile değildir. Rekombinant DNA teknolojisi ile artan nüfus karşısında verimliliği yetersiz kalan tarımsal teknolojilere müdahalesinden, yokluğunda ciddi organ hasarları görüp yaşamın devam ettirilebilirliğinin sorgulandığı insülin hormonunun üretilip replasman tedavisinde kullanılmasına kadar ilerleyen süreç büyüleyiciyken, herhangi bir viral etki göstermeden bağışıklık sistemini uyaracak viral antijen taklitçileri ile günümüzde global pandemiler kontrol altına alınmaya çalışılmaktadır.

Rekombinant teknolojilerle üretilecek biyoteknolojik ürünlerin karanlıkta kalmış noktalarından biri, kompleks ökaryotlarda proteinler sentezlendikten sonra post-translasyonel modifikasyonlar geçirmelerinden kaynaklanmaktadır. Bu anlamda rekombinant ürünler gerçeği taklit edebilse de downstream yollarda aynı etkiyi oluşturabilecek midir?

COVID-19 global pandemisi başladığından bu yana, araştırmacılar amansız bir çalışma sürecini başlatarak kısa sürede SARS-CoV-2 genetik ve yapısal haritasının çıkarılmasını başarmıştır. Bilim insanlarının süreci aydınlatması esnasında, sağlık personelleri bireysel tehlikelerine ve zorluklarına rağmen, mevcut koşullarda gelişen ani ve beklenmedik semptomları geriletmek için uğraşmışlardır. Pandemi sürecinin başlaması henüz bir yılını doldurmadan acil kullanım izinleriyle aktif olarak kullanılmaya başlanmış iki aşı geliştirilmiştir: Sinovac, BioNtech. Klasik aşı grubunda yer alan Sinovac firmasının ürettiği aşı inaktif virüsten kaynak alırken, BioNtech firması tarafından geliştirilen aşı yeni nesil mRNA aşılardan biridir. Klasik tip geliştirilen aşı uygulamaları, mRNA aşılara kıyasla toplum ve bazı bilim camiaları tarafından daha güvenilir adlandırılırken, mRNA aşısının genomla entegre olma riskini taşıdığına dair henüz kanıtlanamaması dolayısıyla spekülasyonlar tereddütlerle karşılanmıştır. Pandemielerde en önemli olarak vurgulanan

maddelerden biri herd immüniteyi oluşturabilmesi açısından aşılarda global ölçekli olarak yapılmasıdır. Aksi takdirde hızla yayılım gösteren ve bir yılını doldurmadan yüzden fazla mutasyon geçirdiği belgelenen SARS-CoV-2 virüsü aşılarından kaçma yeteneğini geliştirecek ve mevcut aşılarda etkinliğini kaybetme riskiyle karşı karşıya kalacaktır. Öyle ki Güney Afrikada tespit edilen yeni form SARS-CoV-2 virüs varyantı 501Y.V2, daha önceden aşı vurularak ya da enfeksiyonu geçirerek geliştirilen bağışıklık cevabından kaçmayı başarmış ve %50 oranında bulaş hızını artırdığı gösterilmiştir (10).

Aşı ve ilaç geliştirme çalışmaları devam ederken, toplumsal olarak enfeksiyon kaynağının izole edilmesi, bulaş yollarının ortadan kaldırılması, şüpheli vakaların tanı ve tedasını hızlandırma yollarının bulunması açısından kapsamlı süzveyans kritikliğini korumaya devam etmektedir. Sosyal izolasyonun beraberinde getirdiği ekonomik darboğaz ve en basitinden eğitimin aksaması dahi uzun dönemli çıkmazlara sokacak gibi görülmektedir. İş gücü kaybının ekonomik olarak etkisini azaltabilmesi için planlı işe dönüşler başlatılmıştır. Bu aşamada Dünya Sağlık Örgütü yeni normal yaşam adı altında ülkelere yönergeler tavsiye etse de uygulamanın ülkelere kendi toplumlarına adapte edilmesi beklenmektedir.

Mevcut aşılarda uzun dönemli etkilerinin bilinmemesi, tanı yöntemlerinde tespit edilen yanlış pozitif ve yanlış negatifliklerin varlığı, semptomların geriletebilmesi için uygulanan yüksek doz ilaçların çoklu organ yetmezliklerine kadar giden sekonder etkileri yaşam kalım savaşında birçok dezavantajı beraberinde getirmektedir. Virüsün bulaştığı ancak asemptomatik kaldığı için yayılım hızında artışa sebep olan vakaların varlığı da yine daha detaylı araştırmalara olan ihtiyacı gözler önüne sermektedir. Bu nedenlerle, SARS-CoV-2 epidemiyolojisini detaylandırarak, patofizyolojisini aydınlatacak her araştırma yüksek öncelikli veri ve ürün geliştirme potansiyeline sahiptir.

6.2 SONUÇ

Bu tez çalışmada rekombinant Spike proteini üretilerek, hibridoma tekniği ile monoklonal Spike antikoru salgılayan stabil klonlar geliştirildi. Klonlardan elde edilen süpernatantlar kullanılarak anti-Spike mAb saflaştırıldı ve hem spike proteinine karşı hem de inaktif virüse karşı etkinliği gösterildi. Geliştirilen monoklonal Spike antikoru, humanize edildikten sonra tedavi amaçlı alternatif oluşturma potansiyeline sahiptir. Mevcut formuyla diagnostik

amaçla geliştirilebilecek kitlerde kullanılabilir. Konvansiyonel plazma tedavilerine güvenilir bir alternatif oluşturabilir. Mevcut koşullarda IgG1 Kappa isotipinde geliştirilmiş olan bu antikor, ileri modifikasyonlarla nötralizan etkiye sahip olabilir. Yapılan araştırmalar göstermektedir ki, Spike proteinin C-terminal bölgesi, N-Terminal bölgesine kıyasla daha yüksek immün yanıt oluşturmaktadır. Bu neden Spike antikoruna karşı üretilen antikorların proteinin hangi bölgesini hedeflediği antikorun viral aktiviteyi bloke etmesi açısından büyük önem taşımaktadır (2,10,12). Bu tarz bilgiler arttıkça geliştirilecek aşı ve ilaçlar daha etkin olacaktır.



KAYNAKLAR

1. Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R. COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. J Adv Res [Internet]. 2020;24:91–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.03.005>
2. Tai W, He L, Zhang X, Pu J, Voronin D, Jiang S, et al. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. Cell Mol Immunol [Internet]. 2020;17(6):613–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-020-0400-4>
3. Fan Y, Zhao K, Shi ZL, Zhou P. Bat coronaviruses in China. Viruses. 2019;11(3):27–32.
4. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nat Rev Microbiol [Internet]. 2019;17(3):181–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
5. Guan Y, Zheng BJ, He YQ, Liu XL, Zhuang ZX, Cheung CL, et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in Southern China. Science (80-). 2003;302(5643):276–8.
6. Berlin DA, Gulick RM, Martinez FJ. Severe Covid-19. N Engl J Med. 2020;383(25):2451–60.
7. Suryawanshi RK, Koganti R, Agelidis A, Patil CD, Shukla D. Dysregulation of cell signaling by SARS-CoV-2. Trends Microbiol [Internet]. 2020;1–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.12.007>
8. Da C, Meng B, Iatm F, Datir R, Citiid-nihr T, Collaboration BC-, et al. Impact of SARS-CoV-2 B.1.1.7 Spike variant on neutralisation potency of sera from individuals vaccinated with Pfizer vaccine BNT162b2. 2021;
9. Greaney AJ, Loes AN, Crawford KHD, Starr TN, Malone KD, Chu HY, et al. PREPRINT: Comprehensive mapping of mutations to the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human serum antibodies. bioRxiv [Internet]. 2021;2020.12.31.425021. Available from: <http://biorxiv.org/content/early/2021/01/04/2020.12.31.425021.abstract>

10. Cele S, Gazy I, Jackson L, Hwa S, Tegally H, Lustig G, et al. Escape of SARS-CoV-2 501Y . V2 variants from neutralization by convalescent plasma.
11. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* [Internet]. 2020;395(10224):565–74. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
12. Wallisch A, Swanson KA, Chen W, Cai H, Sarkar R, Dormitzer PR, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 lineage BNT162b2 vaccine-elicited human sera pseudovirus by. 2021;16–21.
13. Eastern M. Coronaviruses. 2003;437–46.
14. Holmes K V. Corona Structure.Pdf.
15. Gaurav A, Al-Nema M. Polymerases of coronaviruses: Structure, function, and inhibitors [Internet]. *Viral Polymerases: Structures, Functions and Roles as Antiviral Drug Targets*. Elsevier Inc.; 2018. 271–300 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-815422-9.00010-3>
16. Cavanagh D, Britton P. Coronaviruses: General Features. *Encycl Virol*. 2008;549–54.
17. Gorbalenya AE, Enjuanes L, Ziebuhr J, Snijder EJ. Nidovirales: Evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res*. 2006;117(1):17–37.
18. Gulyaeva AA, Gorbalenya AE. A nidovirus perspective on SARS-CoV-2. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2020;(xxxx). Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.11.015>
19. Nidovirales. *Virus Taxon*. 2012;784–94.
20. Atzrodt CL, Maknojia I, McCarthy RDP, Oldfield TM, Po J, Ta KTL, et al. A Guide to COVID-19: a global pandemic caused by the novel coronavirus SARS-CoV-2. *FEBS J*. 2020;287(17):3633–50.
21. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med*. 2020;26(6):845–8.
22. Duan G. Intuition on virology, epidemiology, pathogenesis, and control of COVID-

19. Nov Res Microbiol J. 2020;4(5):955–67.
23. Venter M, Venter M, Richter K, Richter K. Towards effective diagnostic assays for COVID-19: A review. J Clin Pathol. 2020;73(7):370–7.
24. Singh A, Shaikh A, Singh R, Kumar A. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . 2020;(January).
25. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. Nature [Internet]. 2020;579(7798):270–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
26. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. Lancet [Internet]. 2020;395(10229):1054–62. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
27. Pascarella G, Strumia A, Piliengo C, Bruno F, Del Buono R, Costa F, et al. COVID-19 diagnosis and management: a comprehensive review. J Intern Med. 2020;288(2):192–206.
28. Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Yang F, et al. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). Clin Infect Dis. 2020;71(15):778–85.
29. Asaduzzaman M, Hossain N, Abul M. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . 2020;(January).
30. ECDC. Guidance for discharge and ending isolation in the context of widespread community transmission of COVID-19-first update Scope of this document. Eur Cent Dis Prev [Internet]. 2020;(April):1–8. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/disposition-hospitalized-patients.html>

31. Bulut O, Kilic G, Netea MG, Netea MG. *Accepted for publication*. *Ann Med* [Internet]. 2020;1868;0(0):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/07853890.2020.1840620>
32. Asselah T, Durantel D, Pasmant E, Lau G, Schinazi RF. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . 2020;(January).
33. Shi Y, Wang G, Cai X, Deng J, Zheng L, Zhu H, et al. An overview of COVID-19. 2020;21(5):343–60.
34. Tu YF, Chien CS, Yarmishyn AA, Lin YY, Luo YH, Lin YT, et al. A review of sars-cov-2 and the ongoing clinical trials. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7).
35. Tregoning JS, Brown ES, Cheeseman HM, Flight KE, Higham SL, Lemm NM, et al. Vaccines for COVID-19. *Clin Exp Immunol*. 2020;202(2):162–92.
36. Plotkin SA. Vaccines: Past, present and future. *Nat Med*. 2005;11(4S):S5.
37. Stasi C, Fallani S, Voller F, Silvestri C. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . 2020;(January).
38. Randolph HE, Barreiro LB. Herd Immunity: Understanding COVID-19. *Immunity* [Internet]. 2020;52(5):737–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.012>
39. Ni L, Ye F, Cheng ML, Feng Y, Deng YQ, Zhao H, et al. Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals. *Immunity* [Internet]. 2020;52(6):971-977.e3. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.023>
40. Lan L, Xu D, Ye G, Xia C, Wang S, Li Y, et al. Positive RT-PCR Test Results in Patients Recovered from COVID-19. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2020;323(15):1502–3.
41. To AKK, Hung IF, Ip JD, Wing- A, Chu H, Chan W, et al. 1,2* ,. :1–25.

42. Long QX, Tang XJ, Shi QL, Li Q, Deng HJ, Yuan J, et al. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat Med*. 2020;26(8):1200–4.
43. Kadkhoda K. COVID-19: an Immunopathological View. *mSphere*. 2020;5(2):19–22.
44. Lucas C, Wong P, Klein J, Castro TBR, Silva J, Sundaram M, et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. *Nature*. 2020;584(7821):463–9.
45. Perlman S. COVID-19 poses a riddle for the immune system. *Nature*. 2020;584(7821):345–6.
46. Wppdn ED, Qdshqhujld UD, Jd PH, Fpo G, Qrvtwiviqdn KD V, Gdvijl JD, et al. 3 . modul : A napenergia felhasználása D PH] JD] GDViJEDQ napsütés esetén , a téli félévben (október-március) 250-600 W / m ² , a nyári félévben (április- 2020;724(August):74–88.
47. Brüssow H. Immunology of COVID-19. *Environ Microbiol*. 2020;22(12):4895–908.
48. Burrill GS. The Biotechnology Industry: An Engine of Innovation [Internet]. *Biotechnology Entrepreneurship: Starting, Managing, and Leading Biotech Companies*. Elsevier; 2014. 21–44 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-404730-3.00003-8>
49. Khan S, Ullah MW, Siddique R, Nabi G, Manan S, Yousaf M, et al. Role of recombinant DNA technology to improve life. *Int J Genomics*. 2016;2016.
50. Hacker DL, Wurm FM. Recombinant Technology [Internet]. Second Edition. Vol. 2, *Comprehensive Biotechnology*, Second Edition. Elsevier B.V.; 2011. 401–406 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00120-3>

EKLER

EK1: TEZ ÇALIŞMASI ETİK KURUL KARARI



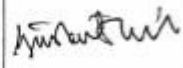
T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 11/11/2020
TOPLANTI NO : 2020-18
DOSYA NO : 2020-119
KARAR NO : 2020-18-149

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Biyoteknoloji Enstitüsü öğretim üyelerinden Prof.Dr. Erkan Yılmaz'ın yaptığı, araştırmacı olarak Prof.Dr. Aykut Özkul, Dr.Öğr.Üyesi E. Doruk Engin, Ali Reza Hanifehnezhad ve Zehra Fırat Karagöz'ün katıldığı "Rekombinant Spike Protein Üretilmesi ve Yeni Tip Korona Virüs (COVID-19)'e karşı Monoklonal Antikor Geliştirilmesi" başlıklı çalışma Kurulumuzca değerlendirilmiş ve söz konusu çalışmanın Üniversite senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi" ne göre aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Fare
Hayvan Sayısı : 3
Geçerlilik Süresi : 15/11/2020-15/5/2021

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof. Dr. Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof. Dr. Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	

Doç. Dr. Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Doç. Dr. Halit KANCA (Üye)	Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Dr. Vet. Hek. Nigar YERLİKAYA (Üye)	Veteriner Hekimliği Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	K	
Dr. Vet. Hek. Gürbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E	
Uzm. Vet. Hek. Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Uzm. Vet. Hek. Attila İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Zehra Fırat Karagöz

Doğum Yeri: Malatya

Doğum Tarihi: 25.11.1986

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce (İleri Seviye), Almanca (başlangıç seviyesinde)

Educational Information

09/2012 – 01/2021 Ankara University, Ankara Master of Science, Biotechnology Institute
11/2009 – 07/2015 Genetics Diagnostic Center Dışkapı Yıldırım Beyazıt Training and Research Hospital Research Project Assistant
09/2003 – 02/2012 Bilkent University, Ankara Bachelor of Science, Molecular Biology and Genetics

Academic Projects:

- Monoclonal Antibody Generation Against SARS-Cov-2 Spike Protein (03/2020-01/2021)
- Monoclonal Antibody Generation Against Fatty Acid Transport Protein 1 (02/2016 - Present)
- Monoclonal Antibody Generation Against Fatty Acid Binding Protein 5 (09/2018-Present)
- Analysis of ADAMTS Proteins on Human and Rat Pancreas (08/2013 - 08/2015)
- Analysis of ADAMTS Proteins on Mouse Kidney (02 /2014 – 01/2015)
- Analysis of ADAMTS Proteins on Organs of Ob/Ob and Db/Db Mouse (09/2014 – 03/2015)
- Generation of Monogenetic Diabetes of Youth Registry in Türkiye (01/2012-11/2013)
- Isolation of Human Pancreas Islet Cells and Analyzing Their Functions in Therapeutic Aspects (11/2009 – 11/2013)
- Role of Estrogen and Estrogen Receptors on Mesenchymal Stem Cell Maintenance, Differentiation and Proliferation (09/2007-09/2009)

Posters:

- FMF Case Report (19-23 December 2012 – Bursa)
- ADAMTS Profiling of Hyperglycemic and Normoglycemic Rat Pancreas (27-30 October 2013 – Kuşadası)
- Role of Organic Coagulum Matrix with Autologous Mesenchymal Stem Cells on Repair of Osteochondral Defect in Sheep Model (5-6 December 2013 – Italy)
- ADAMTS1 Protein Analysis in Hyperglycemic Rat Liver (27-30 April 2014 – Antalya) ADAMTS5 Protein Analysis in Hyperglycemic Rat Pancreas (22-24 June 2014 – IFCC World Lab İstanbul)
- Effect of Low and High Glucose on Level of ADAMTS gene in Human Pancreatic Islet Cells (6-7 July 2014 – FIMS İstanbul)

Accepted Oral Presentations:

- Global ADAMTS and TIMP Profiling in Diabetic Nephropathy Formation Reveals Deregulated Matrix Proteinases in Diabetic Mice (4-5 July 2014 Gordon GRS, USA)
- Diyabetik Nefropati Oluşumunda Global ADAMTS ve TIMP Profili: Diyabetik Farelerde Matriks Proteinazların Düzensizleştiğini Ortaya Çıkarır (22-26 Nisan 2015 - 51. Ulusal Diyabet Kongresi, Antalya)

Internship Experience

- 06/2004 - 08/2004 Bilkent University, Ankara/Turkey Chemistry Department Topic: Protein Structure focused on enzyme Serine Protease
(Supervisor: Professor Andrej Cieplak,)
- 06/2005 – 08/2005 Munich Technical University, Munich/Germany Institute for Hygiene and Medical Microbiology Topic: Apoptotic and necrotic cell death in mouse macrophages during contact with infectious pathogens
(Supervisor: Univ-Prof.Dr.Med. Georg Häcker)
- 06/2007 - 09/2007 Hacettepe University, Ankara/Turkey Biochemistry Division Topic: Preparation and characterization of Poly(Hema-Mah) Cryogels for Antibody Purification
(Supervisor: Prof. Dr. Adil Denizli)

- 07/2009 - 10/2009 German Cancer Research Center (DKFZ), Heidelberg/Germany
Division of Vascular Oncology and Metastasis Topic: Effect of Angiopoietins on
Hematopoietic Stem Cell Mobilization, Differentiation and Maintenance
(Supervisor: Prof. Dr. Helmut Augustin)



YAYINLAR

- Akyol S, **Karagoz Z**, Dingil Inan N, Butun I, Benli I, Demircan K, et al. The gene expression and protein profiles of ADAMTS and TIMP in human chondrosarcoma cell lines induced by insulin: The potential mechanisms for skeletal and articular abnormalities in diabetes. Electron J Gen Med. 2020;17(1):em186. <https://doi.org/10.29333/ejgm/112767>
- Baybek N, Akdeniz D, Yilmaz H, Yildirim U, Bender O, **Firat Z**, Acar M, Hatipoglu OF, Bilgic AM, Gunduz E, Akcay A: Overexpression of microRNAs May Be Key to Decreased Autophagy and PRR in the Pathogenesis of Focal Segmental Glomerulosclerosis. The American Society of Nephrology Kidney Week 2014, Philadelphia, USA; 11/2014 Published in: Journal of the American Society of Nephrology
- Meltem Ateş, Ferda Alpaslan Pınarlı, Gülnur Take Kaplanoğlu, Meral Tiryaki, Sercan Mercan, Davut Erdoğan, Gülbahar Büyük, **Zehra Firat**, Nilnur Eyerici, Oya Topaloğlu, Ahmet Yeşilyurt. A Modified Method for Isolation of Rat Hepatocyte: Saving Time Increases Viability. Niche, 2012; 1: 8-11 • doi : 10.5152/niche.2012.02