



T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

BİYOMÜHENDİSLİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**FARKLI PLATFORMLARIN VERO HÜCRE HATTI
PROLİFERASYONU VE ACE2 GEN EKSPRESYONU ÜZERİNE
ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşra Orçan

Prof. Dr. Bilge Hilal Çadircı

TOKAT- 2024

Her hakkı saklıdır.

Bu tez çalışması; Dollvet Biyoteknoloji A.Ş. tarafından AR-GE çalışması olarak desteklenmiştir

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, **Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI** danışmanlığında hazırlamış olduğum “**Farklı Platformların Vero Hücre Hattı Proliferasyonu ve ace2 Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi**” adlı Yüksek Lisans tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

BÜŞRA ORÇAN

24/05/2024

JÜRİ KABUL VE ONAY

Büşra ORÇAN tarafından hazırlanan “**Farklı Platformların Vero Hücre Hattı Proliferasyonu ve *ace2* Gen Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 15.04.2024 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Üye (Başkan) :Prof.Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI

.....

Üye : Prof.Dr. Elif APOHAN.....

.....

Üye : Doç.Dr. Ercan ÇAÇAN

ONAY

...../...../.....

Doç. Dr. Yusuf TEMÜR

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesinde, lisans ve yüksek lisans öğrenimim boyunca her türlü bilgi ve önerilerini benden esirgemeyen, ideallerim için daima bana yol gösteren, tanıdığım süreç boyunca bana idol olan değerli hocam ve tez danışmanım Sayın **Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI** 'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın planlanmasında, çalışma sürecinde ve tez yazım aşamasında en az benim kadar emek gösteren, bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım, daima beni güzel enerjisiyle motive eden Sayın Dr. Şükran YILMAZ'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma sürecinde tecrübelerinden yararlandığım Sayın Dr. Tajelser ADAM, Sayın Dr. Mohamed Elmogtaba MARKHİ, Sayın Dr. Yaser VAZER, Sayın Dr. Haluk ULUCA ve tüm AR-GE ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca sevgilerini ve desteklerini benden esirgemeyen aileme, her anımda beni motive eden ve ailem kadar yakın olan sevgili arkadaşım Kübra ERDAL ve meslektaşlarım Meltem SELVİTOPU, Hilal TUNÇKOL'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezi aileme ithaf ediyorum...

BÜŞRA ORÇAN

Mayıs 2024

ÖZET

FARKLI PLATFORMLARIN VERO HÜCRE HATTI PROLİFERASYONU VE ACE2 GEN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Büşra Orçan
Yüksek Lisans, Biyomühendislik Ana Bilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI
Mayıs 2024, xi+37 sayfa

ACE-2 proteini 805 aminoasitlik, dipeptidil karboksidipeptidazların anjiyotensin dönüştürücü enzim ailesine ait bir tip I integral membran proteinidir ve X kromozomu üzerinde Xp22.2 pozisyonunda bulunan *ace2* geni tarafından kodlanır. Proteinin bir hücre dışı domaini, tek bir transmembran domaini ve bir sitoplazmik kuyruğu bulunur. ACE-2 insan vücudundaki birçok dokuda eksprese edildiği gibi fareler, gelincikler ve altın hamsterlarda da bulunmaktadır. ACE-2, SARS-CoV-2'nin hücreye giriş reseptörüdür. Virüs, spike proteininin reseptör bağlanma domaini (RBD) aracılığıyla ACE-2'ye bağlanarak membran fizyosunu başlatır.

Vero hücresi, Afrika yeşil maymununun böbrek epitel hücrelerinden hazırlanan ve sürekli çoğalma yeteneği sahip olan devamlı hücre hattıdır. Esas olarak tip I interferon genlerinde bir delesyon içerirler, dolayısıyla interferon alfa veya beta üretemezler, bu da onları viral enfeksiyona karşı daha duyarlı hale getirir. Bu nedenle bir dizi virüsü incelemek ve insan aşılarının hazırlanmasında da kullanılmışlardır.

Bu tez kapsamında COVID-19 aşısı üretimi için kullanılmakta olan konak hücresi (Vero), stasyonier kültür ve mikrotasıyıcı süspanse kültürde üretilmiştir. Üretim sonunda virüs bağlanma reseptörü olan *ace2* ifadesi üretim modelleri karşılaştırılmıştır. Bulgular incelendiğinde her iki kültürde üretilen Vero hücrelerinde ACE-2 reseptörü varlığı, yapılan konvensiyonel PCR analizleri ile doğrulanmıştır. RT-PCR sonuçları $\Delta\Delta CT$ ile hesaplandığında benzer sonuçlar elde edilmiştir. Sonuç olarak mikrotasıyıcı süspanse kültürlerinin ACE-2 ekspresyonu üzerinde negatif bir etkiye sahip olmadığını ve aşısı üretimde kullanılmasını doğrulamıştır.

ANAHTAR KELİMELEER: *ace2* Ekspresyon, Vero Hücre, Mikrotasıyıcı, Stasyonier Kültür

ABSTRACT

DETERMINING THE EFFECT OF DIFFERENT PLATFORMS ON VERO CELL LINE PROLIFERATION AND ACE2 GENE EXPRESSION

Orçan, Büşra

Master's Thesis, Department of Bioengineering

Advisor: Prof. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI

May 2024, xi+37 page

ACE2- protein is an 805 amino acid, type I integral membrane protein belonging to the angiotensin-converting enzyme family of dipeptidyl carboxydipeptidases and is encoded by the *ace2* gene located at position Xp22.2 on the X chromosome. The protein has an extracellular domain, a single transmembrane domain and a cytoplasmic tail. ACE-2 is expressed in many tissues in the human body and is also found in mice, ferrets and golden hamsters. ACE-2 is the cell entry receptor of SARS-CoV-2. The virus initiates membrane fission by binding to ACE-2 through the receptor binding domain (RBD) of the spike protein. The Vero cell is a continuous cell line prepared from renal epithelial cells of the African green monkey and is capable of continuous proliferation. They mainly contain a deletion in their type I interferon gene, so they cannot produce interferon alpha or beta, making them more susceptible to viral infection. For this reason, they have also been used to study a number of viruses and in the preparation of human vaccines. In this thesis, the host cell (Vero) used for COVID-19 vaccine production was grown in stationary culture and microcarrier suspension culture. At the end of production, the production models of *ace2* expression, which is the virus binding receptor, were compared. When the findings were examined, the presence of ACE-2 receptor in Vero cells produced in both cultures was confirmed by conventional PCR analyses. Similar results were obtained when RT-PCR results were calculated with $\Delta\Delta CT$.

KEYWORDS: *ace2* Expression, Vero Cell, Microcarrier, Stationary Cultur

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1.Hücre Kültürü	5
2.2.Hücre Kültürü Yöntemleri	5
2.2.1.Primer Kültür Yöntemleri	6
2.2.2. İki Boyutlu (2B) Hücre Kültür Yöntemleri	6
2.2.3. Üç Boyutlu (3B) Hücre Kültürü Yöntemleri	7
2.2.4.Süspansiyon Kültür Yöntemleri	8
2.3. Üç boyutlu Kültür Sisteminin Avantajları ve Dezavantajları	8
2.4.Vero Hücresi	9
2.5. ACE-2	11
2.6. Housekeeping Genler	13
3. MATERYAL ve YÖNTEM	14
3.1.1 Materyal	14
3.1.2.Kullanılan cihazlar	14
3.1.3.Kullanılan kimyasallar	15
3.2.Yöntem	16
3.2.1.Hücre hattının kültürlenmesi	16
3.2.2.Hücre Çözdürme	16
3.2.3. Stasyoner Kültürde iki boyutlu kültür kapları (2B) ile Hücre Ekimi	16
3.2.4.Mikrotaşıyıcı Süspanse Kültürde (3B) Hücre Ekimi	18
3.2.5. Stasyoner ve mikrotaşıyıcı kültür sistemlerinde çoğaltılan Vero hücrelerinin ACE-2 protein ifadelerinin ölçümü	21
4. BULGULAR	24
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	30
6. KAYNAKLAR	34
ÖZGEÇMİŞ	Error! Bookmark not defined.

SİMGELER DİZİNİ

°C: Santigrat Derece

µl: Mikrolitre

gr: gram

ml: mililitre

G: Oluşan santrifüj kuvveti

CT: Döngü eşiği

kDa: moleküler kütle



KISALTMALAR DİZİNİ

ACE-2: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim²

APS: Amonyumpersülfat

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

FBS: Fötal sığır serum

PBS: Fosfat tamponu

TAMED: Tetrametilendiamin

TMPRSS2: Transmembran proteaz, serin 2

RBD: Reseptör bağlama alanını

VERO: Afrika yeşil maymunları

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1. Spike Proteininin Ace-2 Reseptörüne Bağlanarak Hücreye Girişi	4
Şekil 2. 2. Vero Hücresinin Ters Faz Kontrast Mikroskop Görüntüsü	10
Şekil 2. 3. Sars-Cov-2 Hücreye Giriş.	12
Şekil 3.1. Hücre Sayımı.....	17
Şekil 3.2. Stasyoner Kültür.....	18
Şekil 3.3. Mikrotaşıyıcılı Süspanse Kültür	20
Şekil 4.1. Vero Hücresinin Stasyoner Kültürde Ters Faz Kontrast Mikroskop Görüntüleri	24
Şekil 4.2. Vero Hücresinin Mikrotaşıyıcılı Süspansiyon Kültürde Ters Faz Kontrast Mikroskop Görüntüleri.....	25
Şekil 4.3. Vero Hücresi Stasyoner Kültür Büyüme Grafiği	26
Şekil 4.4. Vero Hücresinin Mikrotaşıyıcılı Süspansiyon Kültürde Büyüme Grafiği.	26
Şekil 4.5. Vero Hücresinin Stasyoner Kültür Ve Mikrotaşıyıcılı Süspansiyon Kültürde Karşılaştırmalı Büyüme Grafiği.....	27
Şekil 4.6. Stasyoner Ve Mikrotaşıyıcılı Süspansiyon Kültürde Üretilen Vero Hücrelerinin Sentezlediği <i>ace2</i> Promotor Bölgesi	28
Şekil 4.7 Stasyoner Kültür Ve Mikrotaşıyıcılı Süspansiyon Kültürde <i>ace2</i> Gen İfadesinin RT-PCR CT Değerleri Grafiği.....	29
Şekil 4.8. Stasyoner Kültür Ve Mikrotaşıyıcılı Süspansiyon Kültür Sistemlerinde <i>ace2</i> Gen İfadesi.....	29

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 3. 1. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar Ve Kullanım Amaçları	14
Çizelge 3. 2. Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar Ve Kullanım Amaçları.....	15
Çizelge 3.3. Tripsinazyon İşlem Tablosu.....	17
Çizelge 3.4. Konvensiyonel PCR Bileşenleri	22
Çizelge 3.5. Konvensiyonel PCR Koşulları	22
Çizelge 3.6. Rt-PCR Bileşenleri	23
Çizelge 3.7. Rt-PCR Koşulları.....	23



1. GİRİŞ

Bir transmembran glikoprotein ve renin-anjiyotensin sisteminin (RAS) önemli bir parçası olan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE-2) korona virüs ailesinden SARS-CoV (Ciddi Akut Solunum Yolu Sendromu-Koronavirüs) için fonksiyonel hücresele reseptör olarak tanımlanmıştır. *ace2* geni anjiyotensin dönüştürücü enzim ailesinden olup, anjiyotensin II'nin vazodilatör anjiyotensin 1-7'ye bölünmesini katalize eder. Bu gen X kromozomunun p22 pozisyonunda yer alır, yaklaşık 40 kB büyüklüğündedir ve 17 intron ile 18 ekzon içerir (Li ve ark.2020; Lima ve ark., 2021; Wang ve ark., 2021). ACE-2 normalde, interstisyumda bulunan farklı aktif peptitleri substrat olarak kullanarak hücre dışı boşluk üzerinde çıkıntı yapan katalitik bölgeyi içeren N-terminali ile plazma zarı (mACE2) üzerinde lokalizedir (Daniele ve ark., 2020). ACE-2'nin SARS-CoV-2'ye bağlanma afinitesi, SARS-CoV ile bağlanmasından 10 ~ 20 kat daha yüksektir (Wang ve ark., 2021). ACE-2 insan vücudundaki birçok dokudan eksprese edilmektedir (Beacon ve ark., 2020). SARS-CoV-2, insan ACE-2'sinin (hACE2) yanı sıra domuz, gelincik, al yanaklı maymun, misk kedisi, kedi, karıncayiyen, tavşan ve köpektaki ACE-2'yi de tanır. Diğer koronavirüslere benzer şekilde SARS-CoV-2'nin enfeksiyon patogenezi incelemek için kullanılan hayvan modelleri arasında insan olmayan primatlar (al yanaklı makaklar, sinomolgus maymunları, marmosetler ve Afrika yeşil maymunları), fareler, gelincikler ve altın hamsterlar bulunmaktadır. İnsan dışı primat hayvan modellerinde çoğu tür, virüs saçılımı, virüs replikasyonu ve SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı konakçı tepkileri dahil olmak üzere, COVID-19 hastalarına benzer klinik özellikler sergilemektedir (Hu ve ark., 2021).

SARS-CoV Spike (S) glikoproteini, hACE-2'ye bağlanarak viral girişe aracılık eder ardından viral ve hücresele membranların füzyonunu tetikleyen transmembran proteaz, serin 2 (TMPRSS2), furin ve diğer akciğer proteazları tarafından proteolitik işleme tabi tutulur (Hou ve ark., 2020). İnsan vücudu bir patojen ile karşılaştığında doğal ve edinsel bağışıklık sistemleri devreye girer. Doğal bağışıklık sistemi, antijene özgü olmayan ve patojeni yok etmeye yönelik faaliyette bulunan nötrofil, makrofaj, doğal öldürücü (NK) hücreler, dentritik hücreler ve kompleman sisteminden oluşur. Vücuttaki antijen seviyesi belli bir eşiği geçtiğinde humoral ve hücresele bağışıklıktan oluşan çok daha kompleks ve

antijene spesifik edinsel bağışıklık sistemi devreye girer. Aşılarla edinsel bağışıklık uyarılarak hastalıklar önlenmeye çalışılmaktadır (Dayan, 2021). SARS-CoV-2, ACE-2'yi bağlamak ve membran füzyonunu başlatmak için spike protein reseptör bağlama alanını (RBD) kullanır. Bu bağlamda RBD, aşı gelişimi için ideal bir hedeftir. SARS-CoV-2 spike proteininin anahtar RBD'si ile biyolojik işlevine ilişkin net yapısal bilgiler temelinde, bu protein bölgesi aşı gelişimi için ideal bir hedef olmaktadır (Kang., ve ark. 2021).

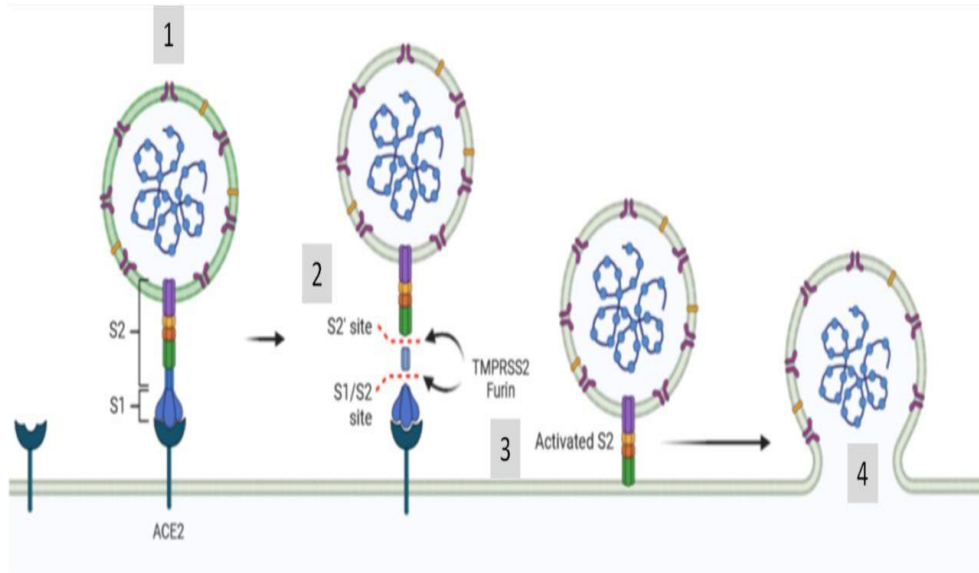
Viral hastalıklara karşı aşı geliştirme tarihindeki en önemli gelişmelerden biri, stasyoner hücre kültüründe virüs çoğaltılmasının gösterilmesidir. Birçok viral hastalıkta olduğu gibi SARS CoV-2 virüsüne karşı da inaktif viral aşının hızla geliştirilmesinde stasyoner kültür olan Vero hücre kültürü platformunun önemi büyüktür ve COVID 19 pandemisinde de bu bir kez daha görülmüştür (Barret ve ark., 2009). Vero hücresi, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından insan kullanımına yönelik immünobiyolojiklerin üretiminde bir substrat olarak önerilmiş ve insan aşılarının hazırlanmasında da kullanılmış olan ilk devamlı hücre hattıdır (World Health Organization, 1987; Barret et al., 2009; Kiesslich ve Kamen, 2020). Vero hücreleri yüzeye bağımlı (adherent) olarak büyüdüklerinden, bu hücrelerin çoğaltılmasında adherent kültür sistemleri için uyarlanmış biyoproseslerin uygulanması gerekir. Adherent hücrelerin büyük hacimlerdeki üretimlerinde kullanılan çoklu kültür flakslarından oluşan “cell factory” hücre fabrikaları ve süspansiyon halindeki mikro kürelere bağlı olarak çoğalabildiği mikrotasıyıcılı sistemler, büyük ölçekli hücre kültürü için uygun sistemleri temsil etmektedirler (Kiesslich ve ark., 2020). Mikrotasıyıcıların farklı özellikleri nedeniyle hücrelerin onların yüzeylerine tutunma, yayılma ve çoğalmalarına olan etkileri de farklı olabilmektedir. Ayrıca hücre kültürleri, ölçeklenebilir, daha az alana ihtiyaç duyan ve üretimi izlemek ve süreci tanımlanmış parametreler dahilinde kontrol etmek ve sürdürmek için biyoreaktörleri içeren üretim teknolojilerine uyarlanabilmektedir. Bu, özellikle aşılar için acilen ihtiyaç duyulan pandemi zamanlarında daha hızlı üretime izin vermektedir. Kültür flaksları stasyoner sistemler olup, hücrelerin tutunması için yüzeyleri ve yükleri muamele görmüş iki boyutlu substratlardır. Mikrotasıyıcılar ise hücrelerin tutunması için yüzeyleri ve yükleri muamele görmüş substratlar olup, karıştırmalı ortamlar için uygundur. Büyük ölçekte üretim yapılan karıştırmalı biyoreaktör sistemlerinde karıştırma sisteminin şekli, boyutu, hacmi

ve ortam dinamiklerinin hücrenin mikrotasıyıcıya tutunma, çoğalma ve hücre membran metabolizmasına olduğu gibi membran proteinlerinin ifadesine de etkileri olabilmektedir. 2 boyutlu ve tek tabaka kültürlerde hücre çoğaltılması için kullanılan geleneksel cam veya plastik hücre kültürü flaskları ile yapılan hücre kültürü ve aşı üretimi belirli bir ölçek büyütme ile sınırlanabilmektedir. Oysaki, karıştırmalı biyoreaktörlerde mikrotasıyıcılar kullanılarak yapılan hücre büyütme ve ölçek büyütme, 3 ton, 5 ton, 10 ton gibi çok büyük ölçeklere rahatlıkla çıkabilmek için olanak sağlamaktadır. Ancak, karıştırmalı ortamlarda hücre büyümesini ve gelişimi etkileyebilecek çok fazla parametre (karışım hızı, karışım şekli, süresi, kayma gerilimleri vb.) mevcut olup, bunların da hücre büyümesinde ve dolayısıyla viral hücresel reseptörlerin bulunduğu hücre membranının antijenik bölgesindeki proteinlerin ifadesinde etkilerinin olabilmesi ihtimal dahilindedir.

Bu bağlamda, yüksek lisans tez çalışması kapsamında, farklı üretim platformlarının, Vero hücrelerinin, morfoloji, canlılık ve SARS-CoV-2 hücresel reseptörü olan ACE-2 proteinin ifadesine olan etkisi, 2B flasklardaki stasyoner kültür ve karıştırmalı biyoreaktörlerin simülasyonu (küçük ölçeği) olan spinner flasklardaki mikrotasıyıcılı süspansiyon kültürlerde karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Bulaşıcı hastalıklar, yüzyıllardır insan sağlığı ve hayatta kalması için büyük bir sorun olmuştur. Bulaşıcı hastalıkların önlenmesi ve kontrolünde yıllar içinde önemli ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, patojen mikroorganizmalar insan sağlığı için muazzam bir tehdit oluşturmaya devam etmektedir. Şiddetli akut solunum sendromu (SARS) 2002 sonlarında/2003 başlarında Çin'in Guangdong Eyaletinde ortaya çıkmış ve hızla Asya, Kuzey Amerika ve Avrupa'daki birçok ülkeye yayılarak yaklaşık 8000 kişide hastalığa neden olmuş ve bunların yaklaşık %10'u ölümlle sonuçlanmıştır. SARS'ın ilk ortaya çıkışından sadece birkaç ay sonra, etiyolojik ajan olarak yeni keşfedilen bir koronavirüs (CoV) tanımlanmıştır. SARS-CoV, diğer grup 2 koronavirüse yapısal olarak benzeyen, yaklaşık 30 kb uzunluğunda bir genoma sahip pozitif sarmallı bir RNA virüsüdür. Spike (S) protein S1 alanının, SARS-CoV reseptörü ACE-2'ye bağlanmasıyla konakçı hücreye girer. Daha sonra, S2 alanı, hücresel membran ile birleşir. ACE-2, birçok farklı dokularda bulunmakla birlikte, renin-anjiyotensin sisteminin bir bileşenidir ve esas olarak kalp fonksiyonunun ve kan basıncının düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Lang ve ark., 2006).



Şekil 2. 1. Spike Proteininin ACE-2 Reseptörüne Bağlanarak Hücreye Girişi (Bruno ve ark., 2021:4).

Viral hastalıkların mekanizmaları, antiviral ajanlar ve aşıların araştırılması viral hastalıklara verilen yanıt için çok önemlidir. Çeşitli insan virüslerine ilişkin mevcut anlayış viral aşılar ve antiviral ilaçlar, büyük ölçüde hücrelerin cam veya düz plastik substratlar üzerinde büyütüldüğü geleneksel 2B hücre kültürüne dayanmaktadır (Bing ve ark., 2016). Bilindiği şekliyle hücre kültürü, 1800'lerin sonlarında hayvan dokusundan hücrelerin toplanması ve dokunun kültürlenmesi veya lenf sıvısı veya plazma gibi doğal ortamlarda muhafaza edilmesiyle başlamıştır.

Hücre sağlığı ve canlılığı için neyin gerekli olduğuna dair araştırmalar, farklı hücre hatlarına olan ilgiyle birlikte artmıştır. Bu durum 1900'lerden günümüze, kısmen sentetik ve daha sonra tamamen sentetik hücre kültürü ortamlarının geliştirilmesini teşvik etmiştir. Araştırmacılar, vücuttaki dokuların oluşumu ve işlevine yönelik araştırmalarını genişletmek için yaygın olarak bulunan bu hücre türlerini kullanmışlardır. Bu da tıp ve sağlık alanında büyük ilerlemelere yol açmıştır (Castiaux ve ark., 2019).

2.1.Hücre Kültürü

Hücrelerin *in vitro* ortamda muhafaza edilmesi ve büyütülmesine yönelik tekniklerin oluşturulması, yaşam bilimlerinde önemli bir dönüm noktasıdır. İlk kez 1912 yılında kullanılmaya başlanmasından bu yana, hücreleri kültürlemek, genişletmek, farklılaştırmak ve farklılığını gidermek için yöntemler geliştirilmiştir. Hücre kültürü için temel araçlar ve gereksinimler o zamandan beri önemli ölçüde değişmemiştir. Bakteriyel, fungal ve maya kontaminasyonunun kontrolündeki büyük ilerlemelerin yanı sıra, hücre kültüründeki gelişmelerin çoğu kültür ortamında ve hücre kültürü kabı yapımında kullanılan malzemelerde olmuştur. Hücre kültürü kabının şekli bile neredeyse bir yüzyıl boyunca büyük ölçüde değişmeden kalmıştır. Zaman alan manuel pipetleme adımlarını ortadan kaldırmak için son zamanlarda robotik kullanımı, verimi ve doğruluğu artırmıştır ve teknikte nadir fakat olağanüstü bir gelişmeyi temsil etmektedir (Freshney, 2010).

2.2.Hücre Kültürü Yöntemleri

Bir kültürü başlatmanın üç ana yöntemi vardır. Birincisi organ kültürü, dokunun *in vivo* karakteristik yapısının kültürde kısmen korunmasını ifade eder. Doku, küresel veya üç boyutlu bir şeklin korunmasını destekleyen sıvı-gaz ara yüzüne (bir sal, ızgara veya jel

üzerinde) yerleştirilir. İkincisi primer eksplant kültüründe, bir doku parçası cam-sıvı ara yüzeyine yerleştirilir. Tutunmadan sonra katı alt tabaka düzleminde göç meydana gelir. Üçüncüsü hücre kültüründe, primer eksplanttan alınan doku aşırı büyüme sonunda katı bir substrat üzerinde yapışkan bir tek tabaka olarak hücre süspansiyonunda kültürlenir.

Bulunan histolojik etkileşimlerin korunması nedeniyle kültürün türetildiği organ kültürleri, o dokunun farklılaştırılmış özelliklerini koruma eğilimindedir. Hücre proliferasyonu, eksplantın çevresi ile sınırlıdır. Bu nedenle hızlı çoğaltılamazlar. Her deney, hücre kültüründen daha zahmetli ve daha az tekrarlanabilir olan taze eksplantasyon gerektirir (Freshney, 2010).

2.2.1. Primer Kültür Yöntemleri

Bir doku parçasından göç eden hücrelerin aşırı büyümesi veya dokudan enzimatik veya mekanik yöntemler ile primer kültür elde edilir. Kullanılan yöntem ne olursa olsun, primer kültür, nihai olarak nispeten tek biçimli bir hücre hattına neden olabilecek bir dizi seçici işlemdir. Birincil eksplantasyonda seçim, hücrelerin eksplanttan dışarı göç etme kabiliyetine dayanırken, primer kültür birkaç saatten fazla tutulursa, başka bir seçim adımı gerçekleşir. Çoğalma yeteneğine sahip hücreler çoğalacak, ancak diğerleri kültürün belirli koşulları altında hayatta kalamayacaklardır. Böylece, her bir hücre tipinin nispi oranları değişecek ve tek tabakalı kültürler söz konusu olduğunda, mevcut kültür substratının tamamı dolana kadar değişmeye devam edecektir. Primer kültürlerin, sitogenetik analiz gibi bazı çalışmalar için uygun olmasına rağmen, kararsızlıkları ve heterojenlikleri nedeniyle diğer çalışmalar için uygun olmayabileceği kabul edilmelidir. Hem hücre popülasyonundaki değişiklikler hem de hücreler içindeki adaptif değişiklikler, kültür periyodu boyunca sürekli olarak meydana gelir ve bu, kültürün homojen veya kararlı olarak kabul edilebileceği bir zaman seçimini zorlaştırır (Freshney., 2010).

2.2.2. İki Boyutlu (2B) Hücre Kültür Yöntemleri

Son yüzyılda yüzeye bağımlı hücre hatlarını korumanın ve analiz etmenin en popüler yöntemi, 2B veya tek katmanlı kültür olmuştur. 2B kültürde, hücreler düz bir yüzey üzerinde tutulur, en yaygın olarak bir plastik kültür şişesi veya petri kabı kullanılmaktadır. Bu yüzeyler, hücre yapışmasını teşvik etmek ve hücre sağlığını iyileştirmek için

proteinler veya diğer yüzey işlevleriyle kolayca değiştirilebilir. Hücreleri bu şişelerde tutmanın maliyeti düşüktür ve kontaminasyon olasılığını azaltan sağlam ve basit protokoller geliştirilmiştir. Bu substratlar aracılığıyla doğrudan görüntü alınabilir, bu da hücre canlılığını ve morfolojisini izlemeyi kolaylaştırır. Farklı koşulların ve uyaranların etkisini analiz etmek için reaktifler ve aliquot örnekleri eklemek de kolaydır. Bununla birlikte, son yıllarda, 2B kültürün yararlı olmasına rağmen, hücrelerin *in vivo*'yu deneyimlediği 3B ortamı her zaman doğru bir şekilde yansıtmadığı fazlasıyla açık hale gelmiştir. 2B hücre kültüründe hücreler, çoğunlukla plastik (genellikle polistiren) olan tek bir malzemenin yüzeyiyle sınırlıdır. Bu plastik, pürüzlülük, sertlik ve sınırlı bağlanma yerleri gibi tanımlanmış yüzey özelliklerine sahiptir. Hücrenin yüzey düzlemi içinde yapışmaya zorlanması nedeniyle, hücrenin toplu çözeltiye maruz kalan alanı sınırlıdır. Birincisi, hücrenin yalnızca bir kısmı çözeltiye maruz kaldığından, hücrenin kimyasal gradyanlara maruz kalmasını sınırlar. İkincisi, hücre yeni sınırlı geometriye uyum sağlamak zorunda kaldığından, hücre işlevini etkileyerek hücre içinde bir polarite kaymasına neden olabilir. Üçüncüsü, hücrelerin ayrı eklere sahip olduğu *in vivo* ortamdan farklı olarak hücre, sürekli bir yüzey matrisi kaynağına maruz kalır. Son olarak, yüzey pürüzlülüğü çok düşüktür ve hücreler çoğalabilir ve serbestçe göç edebilir, bu da birçok hücre hattı için *in vivo* koşulları tam olarak taklit etmez (Andre ve ark., 2020)

2.2.3. Üç Boyutlu (3B) Hücre Kültürü Yöntemleri

Biyomalzemeler, doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta merkezi bir rol oynar ve doğal hücre dışı matrisin temel özelliklerini taklit eden bir platform olarak kabul edilir. Doku mühendisliği uygulamalarında, özellikle 3B hücre kültüründe, yapı iskelelerinin mekanik ve biyokimyasal özellikleri hücresel morfogenez ve işlevi etkiler. Doğal ve sentetik polimerler, 3B hücre kültüründe kapsamlı bir şekilde incelenmiştir; bu yapı iskelesi malzemeleri, hücrelerin bağlanmasını, bakımını, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklemek üzere tasarlanır. Doku mühendisliği, iskelelerin ve matrislerin fiziksel ve biyokimyasal özelliklerini esnek bir şekilde değiştirme fırsatı sunabilir (Bing ve ark., 2016). Şu anda 3B hücre kültürü için birçok farklı yöntem vardır ve her yöntemin yararları ve dezavantajları vardır. Genel olarak, teknikler dört kategoriye ayrılabilir: Süspansiyon, hidrojel, kâğıt tabanlı kültür ve fiber iskeleler. Süspansiyon teknikleri çoğunlukla

serbest yüzen hücre kümelerini içerirken, diğer teknikler hücrelerin yapışabileceği ve çoğalabileceği bir ağ gerektirir (Bing ve ark., 2016).

2.2.4.Süspansiyon Kültür Yöntemleri

Süspansiyon hücre kültürünün genel sınıfı, 3B hücre kültürünün en eski biçimidir ve hücre kültürünün geliştirilmesinden bu yana kullanılmaktadır. Bununla birlikte, süspansiyon hücre kültürü, süspansiyon koşulları altında büyümek üzere değiştirilebilen (yapışkan olmayan hücreler) çoğunlukla böcek hücre dizileri veya memeli hücre dizileriyle sınırlandırılmıştır. Bunun nedeni, Memeli hücre dizilerinin çoğunluğunun yüzeye bağımlı hücreler olmasındandır. Süspansiyon hücre kültürünün en basit yöntemi, hücreleri çoğalırken askıda tutabilmek amacıyla çalkalanabilen veya karıştırma mekanizması olan kültür kapları gerektirir. Büyük ölçekli süspansiyon hücre kültürleri biyoreaktörlerde öncelikle ve ağırlıklı olarak terapötik proteinlerin ekspresyonu için kullanılmıştır (Andre ve ark., 2016).

2.3. Üç boyutlu Kültür Sisteminin Avantajları ve Dezavantajları

2B tek tabakalar ve hayvan modelleriyle ilişkili bu sınırlamaların üstesinden gelmek için çeşitli 3B hücre kültürü modelleri geliştirilmiştir. 3B hücre modelleri, *in vivo* mikro ortamı daha yakından taklit eden bir *in vitro* hücre modeli sistemi sağlayarak 2B hücre kültürleri ve hayvan modelleri arasındaki boşluğu doldurur ve böylece hem virüs-konak etkileşimlerinin hem de insan virüslerinin temel mekanizmalarının anlaşılmasına katkıda bulunur. Antiviral ilaçların geliştirilmesini kolaylaştırmanın yanı sıra 3B kültür sistemlerinde büyütülen hücreler, morfoloji, canlılık, sinyal kontrolü, gen ekspresyonu, farklılaşma, çoğalma ve ilaç duyarlılığı bakımından düz 2B doku substratları üzerinde büyütülen hücrelerden önemli ölçüde farklılık gösterebilir. Örneğin, Matrigel'de kültürlen Huh7 hücreleri, 3B sferoidler halinde toplanırken, standart 2B kültürlü hücreler epitelyal tek tabakalar oluşturur. 3B matriste kültürlen hücreler, 3B dokuların işlevini gerçekleştirebilir ve *in vivo* olarak hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerini taklit edebilir. İnsan virüsleri, bakterileri ve parazitleri gibi enfeksiyöz ajanların incelenmesi için 3B kültür sistemleri geliştirilmiştir. Bu modeller virolojide paha biçilmez bir rol oynamaktadır. 3B hücre kültürleri, hücre çoğalması ve farklılaşması için

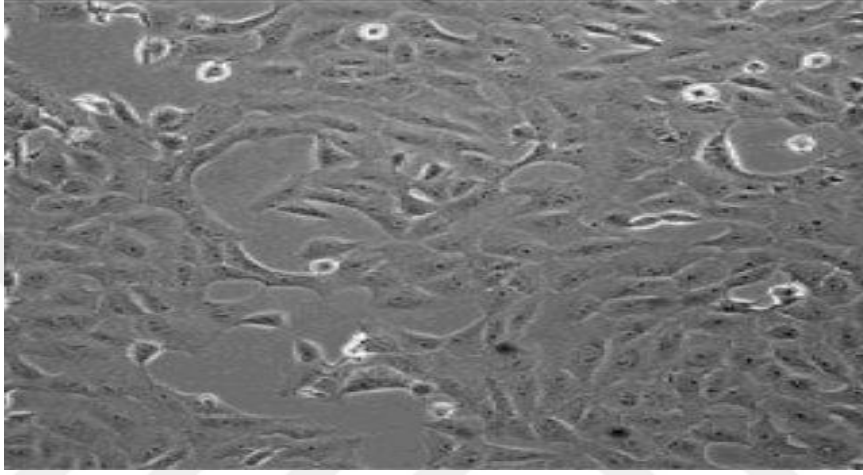
bir platform sağlar. Ek olarak, ortaya çıkan bazı 3B kültür modelleri, besinleri ve metabolitleri 3B hücrelerin içine ve dışına taşıyabilir. Mevcut 3B sistemler, hücre-mikroçevre etkileşimlerine ilişkin benzersiz mekanik içgörüler sağlasa da çoğu 3B model, gerçek dokunun tüm karmaşık fizyolojik özelliklerini in vivo olarak kopyalamaz (Bing ve ark., 2016). Karıştırmalı süspansiyon sistemlerde adherent hücre biyoproseslerinin büyük çoğunluğu mikrotasıyıcı sistemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Burada hücreler, karıştırmalı kültürde süspansiyon halindeki mikrotasıyıcılara tutunarak çoğalma esasına dayanır. Temelde yüzeyleri gözeneksiz ve makro gözenekli olanlara ayrılan ve yüzey özellikleri bakımından farklılık gösteren birçok tip mikro taşıyıcı vardır. Kültürün aşılması sırasında mikrotasıyıcılara hücre tutunması, hücre/taşıyıcı oranı, ortam bileşenleri, karıştırma hızı veya azaltılmış hacim gibi etkenlere bağlı olabilmektedir. Mikrotasıyıcı teknolojisi, karıştırmalı biyoreaktörlerde de gerçekleştirilebilir. Biyoreaktörlerin avantajı ise ölçek büyütebilme ve endüstriyel miktarlarda aşı üretimine imkân sağlayabilmesidir. Ayrıca, hayvan hücre kültürü için biyoreaktörlerin kullanımı, mevcut birçok farklı konfigürasyonla kurulmuştur ve büyük ölçekli operasyonlar için uygundur. Mikrotasıyıcılarda büyüyen hücreleri içeren ilk büyük ölçekli süreç, vero hücreleri ile neredeyse 40 yıl önce inaktive edilmiş çocuk felci aşısının üretimi için geliştirilmiştir (Kiesslich ve ark., 2020).

2.4.Vero Hücresi

1962 yılında Yasumura ve Kawikata tarafından Chiba Üniversitesi'nde (Japonya) sağlıklı, yetişkin Afrika yeşil maymununun böbreğinden hazırlanan ve sürekli çoğalma yeteneği sahip olan Vero hücresi devamlı hücre hattıdır. Bu nedenle kapsamlı hücre karakterizasyonuna ve büyük hücre bankalarının oluşturulmasına izin vererek süresiz olarak pasajlanabilir olması sınırlı geçiş kapasiteleri olan primer hücrelere ve sonlu hücre hatlarına göre değerli bir avantaj sağlar. Vero hücreleri yüzeye bağımlı bir şekilde büyür, interferon ekspresyonu olmadığı için ve serumsuz koşullarda büyümeye uyarlanabilir. Vero hücreleri, viral replikasyonu engelleyebilen interferon- α 'yı ifade edememe, düşük iki katına çıkma süresi ve göreceli kullanım kolaylığı dahil olmak üzere viral bir üretim hücre hattı olarak hizmet etmek için çok sayıda doğal faydaya sahiptir. DSÖ tarafından insan kullanımına yönelik immünobiyolojiklerin üretiminde bir substrat olarak önerilmiş

ve insan aşılarının hazırlanmasında da kullanılmış olan ilk devamlı hücre hattıdır (World Health Organization,1987 Barret et al., 2009; Kiesslich ve Kamen, 2020).

Vero hücresinin Vero 81, Vero 76 veya Vero E6 gibi birkaç alt hücre dizisi türetilmiştir. Daha sonraki genom analizi, hücrelerin *Chlorocebus sabaues* türünün bir dışısından kaynaklandığını göstermiştir.



Şekil 2. 2. Vero Hücresinin ters faz kontrast mikroskop görüntüsü (Nicole ve ark., 2008:9)

Vero hücreleri, Dulbecco'nun %10 fetal bovin serumu içeren modifiye Eagle's medium (DMEM) veya Eagle's minimum esansiyel ortamda (EMEM) kolayca büyür ve ticari olarak aşı üretimi için çok sayıda virüs ürettiği belgelenmiştir (Alfano ve ark., 2020). Aşı üretimine yönelik olarak kullanılan çoğu hücre kültürü temel olarak yüzeye bağımlı hücrelere dayanmaktadır (Shen ve ark., 2019). Vero hücreleri, çok çeşitli virüslere duyarlı olmaları ve 60'tan fazla ülkede biyo-üretim için onaylanmış olmaları nedeniyle aşı üretimi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Logan ve ark., 2022). Vero hücrelerinin mikro taşıyıcılar üzerinde çoğaltılmaları gerçekleştirildikten sonra kuduz, çocuk felci, enterovirüs 71, influenza ve diğer aşıların üretimi için kullanımları yaygınlaşmıştır. Temel karakteristiğinde yüzeye bağımlı olarak çoğalan Vero hücrelerinin büyütülmesi formatları arasında T flasklar, döner şişeler ve farklı hacimlerdeki çok katlı hücre fabrikaları sistemleri gibi birçok "2B" düzlemsel kültür kapları ve mikro taşıyıcı teknolojisi bulunmaktadır. Son yıllarda, karıştırmalı biyoreaktörlerde bir süspansiyon içinde dağıtılan çeşitli yoğunluklara, gözenelere ve yüzey alanlarına sahip küçük cam, plastik veya diğer bileşim boncuklarını kullanan mikro taşıyıcı teknolojisi, hücre

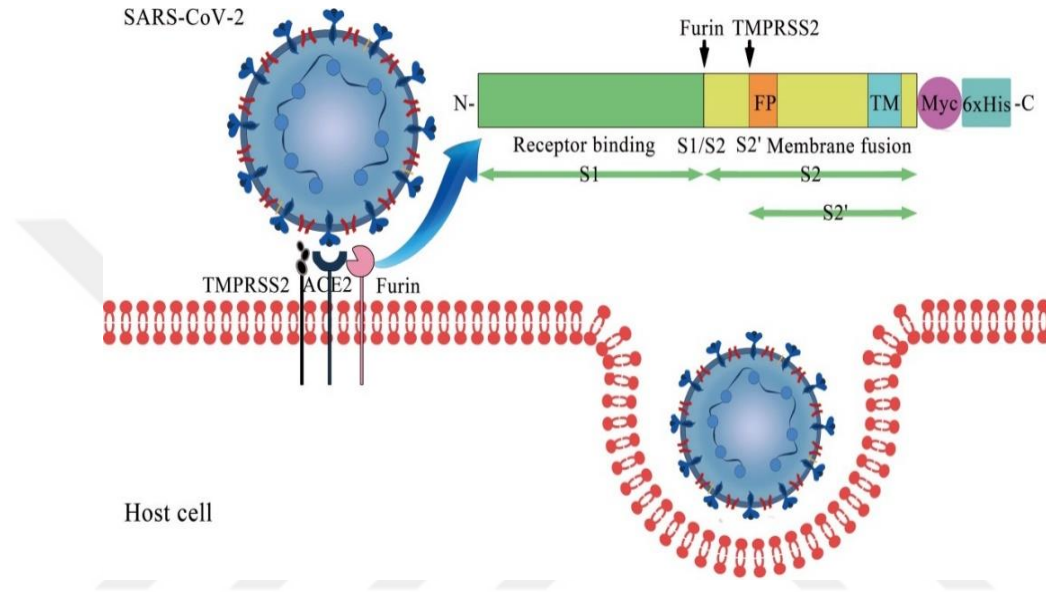
büyümesi için geniş bir yüzey alanı sağlayarak hücre üretimi için en popüler platformlardır (Shen ve ark., 2019).

2.5. ACE-2

ACE-2, renin-anjiyotensin aldosteron sistemi yolunun önemli bir üyesi olarak ACE ve Anjiyotensin II'nin (ANG-II) kardiyovasküler sistem üzerindeki etkilerini dengelemedeki homeostatik rolüyle en iyi bilinen bir transmembran proteindir. ACE-2, aktif olarak ANG-II'yi parçalayabilen zara bağlı veya çözünür formlar olarak bulunabilir (Yalcin ve ark., 2021). *ace2*'nin aşırı ifade edilmiş ACE-2 reseptörlerine konjugasyonu reseptörün konformasyonel değişimiyle sonuçlanır ve çeşitli biyolojik aktivitelerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Ekta ve ark., 2021). ACE-2, memelilerde kan basıncının düzenlenmesi, tuz ve su dengesi, ince bağırsakta amino asit alımı ve glukoz homeostazı ve pankreatik β -hücre fonksiyonu dahil olmak üzere birçok bilinen fizyolojik fonksiyona sahip bir karboksipeptidazdır (Blume ve ark., 2021). X kromozomu üzerinde Xp22 konumunda bulunan *ace2* geni, 805 amino asitlik bir tip I integral membran proteini kodlar. Proteinin özellikleri arasında bir hücre dışı alan, bir transmembran alan ve bir sitoplazmik kuyruk bulunur (Beacon ve ark., 2020). ACE-2, ACE'nin işlevini dengelemede rol oynar. ACE, vazodilatör anjiyotensin I'i anjiyotensin II'ye ayırır. ACE-2 ayrıca çeşitli peptit hormonlarının parçalanmasından da sorumludur. Bunlardan en önemlisi vazokonstriktör anjiyotensin II'den karboksil-terminal amino asit fenilalaninin çıkarılması ve tekrar anjiyotensine hidroliz edilmesidir. ACE-2 ayrıca bradikinin, apelin, nörotensin, dynorphin A ve ghrelinin bölünmesinde de rol oynayabilir. En önemlisi, çalışmalar ACE-2 reseptörlerinin HoV-NL63, SARS-CoV, SARS-CoV-2 gibi koronavirüslerin insan hücrelerine girmesi için bir reseptör görevi gördüğünü bildirmiştir. Bir virüsün bir organizmayı enfekte etme yolu, hücre üzerindeki spesifik yüzey reseptörlerine bağlanmasıdır. Bu nedenle, bu tür reseptörlerin ekspresyonu ve dokuya özgü dağılımı, hastalığın patogenezi belirler.

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsüne (SARS-CoV) benzer şekilde SARS-CoV-2, hücre girişi için peptidaz anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'yi (ACE-2) kullanır. Virüs, hücreye giriş için hedef hücrenin zarındaki spesifik yüzey reseptörlerine bağlanarak replikasyona ve enfeksiyona yol açar. Koronavirüs S-proteininin S1 ve S2

olmak üzere iki fonksiyonel birimi vardır. S1, ACE-2'ye bağlanmak için reseptör bağlama alanını (RBD) içerirken, SARS-CoV-2'nin konak reseptörü olan S2'nin işlevi, konak hücre zarına füzyon yapmaktır. Virüsün S1 tarafından ACE-2'ye bağlanmasının ardından, S2'nin bölünme bölgesi, virüs enfeksiyonu için kritik bir adım olduğu gösterilen konakçı proteaz tarafından açığa çıkar ve bölünür (Yalcin ve ark., 2021).



Şekil 2. 3. SARS-CoV-2 hücreye giriş (Chen ve ark., 2021:2).

SARS-CoV'a benzer şekilde, SARS-CoV-2'nin konakçı hücreye girişine yüzeye bağlı spike (S) glikoproteini aracılık eder. Protein, sırasıyla reseptör bağlanması ve membran füzyonundan sorumlu olan 'S1' ve 'S2' olarak bilinen iki fonksiyonel birime sahiptir. S1'deki reseptör bağlayıcı alan (RBD), anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'nin (ACE-2) hücre dışı peptidaz alanına (PD) bağlanarak S1/S2 interdomain proteaz bölgesinin açığa çıkmasına neden olur. S-proteini daha sonra proprotein konvertaz furin tarafından S1/S2 bölgesinde ve transmembran serin proteaz 2 (TMPRSS2) tarafından S2 bölgesinde parçalanır. Bu süreçler, S2 füzyon peptidinin konakçı membranına yerleştirilmesiyle füzyon reaksiyonunu tetikleyen büyük ölçekli konformasyonel değişikliklere izin verir. SARS-CoV-2 virüsü hücreye girdikten sonra, viral RNA replikasyon ve transkripsiyon için serbest bırakılır. Hücre içinde olgunlaşan virüsler yeni bir enfeksiyon döngüsüne başlamak üzere hücreden salınır (Chen F. ve ark., 2021). Tek-hücreli RNA dizilimi ve RT-qPCR gibi hassas yöntemler ile birçok dokuda ACE ifadesi gösterilmiştir. Ancak o

dokularda *ace-2* ifadesi böbrek, incebağırsak ve kalpte görülenden biraz daha düşük olabilir (Beacon ve ark., 2020).

2.6. Housekeeping Genler

Housekeeping genleri tipik olarak temel hücresel fonksiyonun sürdürülmesi için gerekli olan kurucu genlerdir ve genellikle tüm hücre tiplerinde yapısal olarak ifade edilir. RNA yükü, bütünlüğü ve ters transkripsiyon adımının verimliliğindeki varyasyonları kontrol etmek için kullanılır. İdeal olarak, housekeeping gen ekspresyon seviyesi deney koşullarından etkilenmemelidir (Johnson ve ark.,2004). HKG'ler kantitatif analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılan HKG'lerin; *glisealdehit-3- fosfat dehidrojenaz (GAPDH)*, *Beta aktin (β -Aktin)*, *TATA bağlanma proteinleri (TBP)*, *hipoksantinguanidin fosforibozil transferaz (HPRT)*, *tubulinler*, *siklofilin (CyP)*, *albümin*, *18S rRNA* ve *28S rRNA* olduğu bildirilmektedir(Ağaoğlu ve ark.,2020).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.1 Materyal

Çalışmada kullanılan Vero hücresi ATCC orijinli Vero CCL81 olup, Dollvet Biyoteknoloji hücre bankasından temin edilmiştir. Mikrotaşıyıcı olarak kullanılan agaroz içerikli dextran kaplı mikrobidler ticari olarak (Sunresin New Materials Co. Ltd. Shaanxi, China) temin edilmiştir.

İnsan X kromozomu üzerindeki 169 nükleotid uzunluğundaki *ace-2* promotor bölgesi (LOC117134593) ACE-2 varlığını test etmek üzere tasarlanmıştır. Bu bağlamda kullanılan primerlerden ileri yönlü primer: F-5'-GCC CAA CCC AAG TTC AAA G-3' ters yönlü primer ise R-5'-CCT CAA TGG TGG ACT GAG CA-3 dizisinde Microsynth firmasına sentez ettirilmiştir.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, markaları ve kullanım amaçları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları

Cihaz Adı	Markası	Kullanım Amacı
Biyogüvenlik kabini	Esco	Hücre kültürü çalışmalarının steril ve güvenli bir ortamda yapılması için kullanılmıştır.
-80 °C Derin Dondurucu	Binder	Hücrelerin güvenli saklanması için kullanılmıştır.
CO ₂ 'li İnkübatör	Esco	Hücrelerin uygun sıcaklık, nem ve gaz alışverişi gibi optimal koşullarda çoğalmaları için kullanılmıştır.
Ters faz kontrast hücre kültürü Mikroskobu	Olympus CKX41	Hücre kültürlerinin büyümelerini gözlemlemede kullanılmıştır.
Işık mikroskobu	Olympus	Hücrelerin canlılık ve sayımlarında kullanılmıştır
Soğutmalı Santrifüj Cihazı	Thermo	Hücre süspansiyonlarının çöktürülmesinde ve hücre pelletinin eldesinde kullanılmıştır.
Manyetik Karıştırıcı	Magnetic Stirrers	Spinner flask çalışmasında kullanılmıştır.

RT-PCR cihazı	Roche LightCycler® 480	Real time PCR ile ACE2 ekspresyonu gerçekleştirilmiştir.
ChemiDoc™ MP Imaging System	Biorad	Konvensiyonel PCR için kullanılmıştır

3.1.3.Kullanılan kimyasallar

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasallar, markaları ve kullanım amaçları Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3. 2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar ve kullanım amaçları

Kimyasal Adı	Markası	Kullanım Amacı
Dulbecco's Medified Eagle Medium (DMEM)	Gibco	VERO hücrelerinin büyümesini sağlayacak besi ortamı olarak kullanılmıştır.
Fetal Sığır Serum (FBS)	Cegrogen	Hücrelerin çoğalması için besi ortamı hazırlanmasında kullanılmıştır.
PBS	Gibco	Hücrelerin pasajlanmasında hücre yüzeyini yıkamak için kullanılmıştır.
PBS-EDTA	Gibco	Hücrelerin pasajlanmasında hücre yüzeyini yıkamak ve hücreler arası bağları koparmak için kullanılmıştır.
Tripan Mavisi Solüsyonu	Gibco	Hücre canlılığını belirlemek için hücre sayımında kullanılmıştır.
Nükleaz boya solüsyonu	Gibco	Mikrotaşıyıcı sistemlerde hücre sayımında kullanılmıştır.
RNA Ekstraksiyon kiti	Invitrogen	ace2 RNA ekstraksiyonu için kullanılmıştır.
cDNA kiti	Grips	ace2 cDNA oluşturmak için kullanılmıştır.
Primerler	Microsynth	RT-PCR için kullanılmıştır.
Mikrotaşıyıcı	Cytodex	Mikrotaşıyıcı süspansiyon kültür üretiminde kullanılmıştır.
Tripan Mavisi Solüsyonu	Gibco	Hücre canlılığını belirlemek için hücre sayımında kullanılmıştır.
Trypsin-EDTA	Gibco	Hücrelerin yüzeyden kaldırılması için kullanılmıştır.

3.2.Yöntem

3.2.1.Hücre hattının kültürlenmesi

Vero hücresi, %10 FBS’li DMEM besi ortamı içerisinde kültüre edilmiştir.

3.2.2.Hücre Çözdürme

Kriyotüp içerisinde -80 °C derin dondurucuda muhafaza edilen hücreler, çıkarılarak hızlı bir şekilde 37 °C’deki su banyosu içerisinde çözdürülmüştür. Kriyotüp ethanol ile silinerek steril laminar akışlı biyogüvenlik kabinine alınıp üzerine hazırlanan besi ortamı yavaşça eklenmiş ve tüp içeriği dikkatlice toplanarak 50 ml’lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Hücreler 800 rpm’de 4 °C’de 5 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant atılarak, dipteki pellet alınmıştır. Pellet üzerine %10 FBS’li DMEM besi ortamı eklenerek homojenize edilmiştir. Homojenize edilen hücreler T75 cm² flasklara aktarılmıştır. T75 flask üzerine etiketleme yapılarak hücreler inkübasyon için 37 °C’de, %5 CO₂ içeren ortamda 96 saat inkübe edilmiştir.

3.2.3. Stasyonere Kültürde iki boyutlu kültür kapları (2B) ile Hücre Ekim’i

Hücre Görünümü;

Çözdürülüp ön kültürü yapılan hücreler, ters faz kontrast mikroskopta farklı büyütmelerdeki objektiflerde morfolojik incelemeleri yapılmıştır. Hücrelerde membran dinamiği ve bütünlüğüne, olağan dışı granülüzasyon ve vakuolleşme olmamasına dikkat edilmiştir.

Tripsinizasyon işlemi aşamaları;

Ön kültürü yapılan hücrelerin flasklardan alınması için tripsinizasyon işlemi yapılmıştır. Bunun için tripsin çözeltisi 37 °C’de su banyosunda ısıtılıp biyogüvenlik kabininde tripsine %3 oranında EDTA eklenerek, Tripsin+EDTA karışımı hazırlanmıştır. T75 flask içindeki hücre besi ortamı atık kabına boşaltılmıştır. Hücrelerin üzerine Tablo 1’de belirtilen miktarda Tripsin+EDTA karışımı eklenmiştir. Karışım hücrelerin yüzeyinde

gezdirilerek tüm yüzeye teması sağlanarak karışım atık kabına dökülmüştür. Bu işlem iki defa tekrarlanmıştır. İkinci tripsinizasyonda Tripsin+EDTA'nın yarısı kap içinde bırakılmış ve Tripsin+EDTA karışımı ile muamele edilmiş hücreler Tablo 1'de belirtilen süre kadar inkübasyona bırakılmıştır.

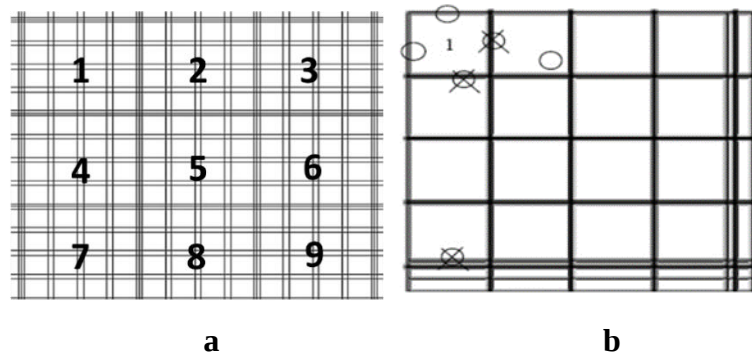
Çizelge 3.3. Tripsinazyon İşlem Tablosu

Üretim Modeli	Tripsin+EDTA miktarı	İnkübasyon süresi
T75	0.75-1 ml	3-5 dk

İnkübasyon süresi sonunda flask içerisine 25 ml besi ortamı eklenerek homojen olması için pipetleme yapılmıştır. Homojen karışımdan hücre sayımı için 900 µl numune alınmıştır.

Hücre sayımı;

Thoma lamı üzeri boş iken lamel ile kapatılır. Hücre kabındaki karışım pipet ile iyice homojen haline getirilir. Karışımdan 900 µl numune alınarak endorff tüpe konulur. Üzerine 100 µl boyama solüsyonu eklenir ve pipetleyerek boyanın karışması sağlanır. Sonra 100 µl kadar numune alınır, lamın uygulama noktasından bırakılır. Canlı hücrelerin (boya almamış hücreler) ışık mikroskop altında 10x büyütmede sayımı gerçekleştirilmiştir.



Hücre Pasajı;

Hücre sayımı sonunda her bir T75 flask için 3×10^5 h/ml/25ml olacak şekilde hücre hesaplanmış ve yeni bir T75 flask içerisine %10 FBS'li DMEM ile transfer edilmiştir. T75 flask üzerine etiketleme yapılarak hücreler inkübasyon için 37 °C'de, %5 CO₂ içeren ortama bırakılmıştır. Hücreler her gün ters faz kontrast mikroskopta kontrol edilmiş %90-100 yoğunluğa ulaşan hücreler pasajlanmıştır. Bu işlem 10 pasaj için aynı şekilde tekrarlanmıştır.



Şekil 3.2. Stasyoner Kültür

3.2.4.Mikrotaşıyıcılı Süspanse Kültürde (3B) Hücre Ekim'i

Mikrotaşıyıcılı üretici talimatına göre hazırlanıp 100 ml PBS içerisine eklenerek 121 °C' de 30 dk. otoklavda steril edilmiş ve biyogüvenlik kabininde mikrotaşıyıcıların çökmesi için 2 saat beklemeye bırakılmıştır. Dibe çöken mikrotaşıyıcı üzerindeki PBS kontrollü bir şekilde pipet yardımıyla uzaklaştırılıp, mikrotaşıyıcılar spinner flask içerisine transfer edilmiştir. Spinner flask üzerine toplam hacim 50 ml olması için yeterli miktarda DMEM besi ortamı eklenmiştir ve 1 gece 37 °C'de, %5 CO₂ içeren etüve manyetik karıştırıcı üzerinde 40 rpm hızda bırakılarak mikrotaşıyıcıların besi ortamı ile adaptasyonu sağlanmıştır. Adaptasyonu takiben, mikrotaşıyıcılar yine çöktürülerek üzerindeki DMEM besi ortamı uzaklaştırılmış ve T75 flaskta üretilen hücreler tripsinize edilerek %10 FBS içeren DMEM besi ortamı ile 3×10^5 h/ml/50ml hücre süspansiyonu hazırlanmış ve mikrotaşıyıcılı spinner flaska transfer edilmiştir. Hücrelerin mikrotaşıyıcı üzerine tutunması için 4 saat boyunca 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatöre alınarak karıştırıcı

üzerinde 40 rpm’de tutunma protokolü (2 dk karıştırma 20 dk bekleme) uygulanmıştır. Dört saatin sonunda spinner flask içerisinden 2 ml numune alınarak hücre ışık mikroskopunda incelenmiş ve sayım yapılmıştır. Spinner flaskta toplam hacm DMEM besi ortamı ile 100 ml’ye tamamlanarak 37 °C’de, %5 CO₂ içeren inkübatöre alınmış ve manyetik karıştırıcı üzerinde 40 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. Hücrelerden 4. saat, 24.saat, 48.saat 72.saat ve 96. saatte numune alınarak hücre morfolojisi incelemesi, pH ölçümü ve hücre sayımı gerçekleştirilmiştir.

Hücre Görünümü;

Hücreler ters faz kontrast mikroskopta farklı büyütmelelerdeki objektiflerde morfolojik incelemeleri yapılmıştır, Hücrelerde membran dinamiği ve bütünlüğüne, olağan dışı granülüzasyon ve vakuolleşme olmamasına dikkat edilmiştir.

Mikrotaşıyıcı süspansiyon kültürde tripsinizasyon işlemi aşamaları;

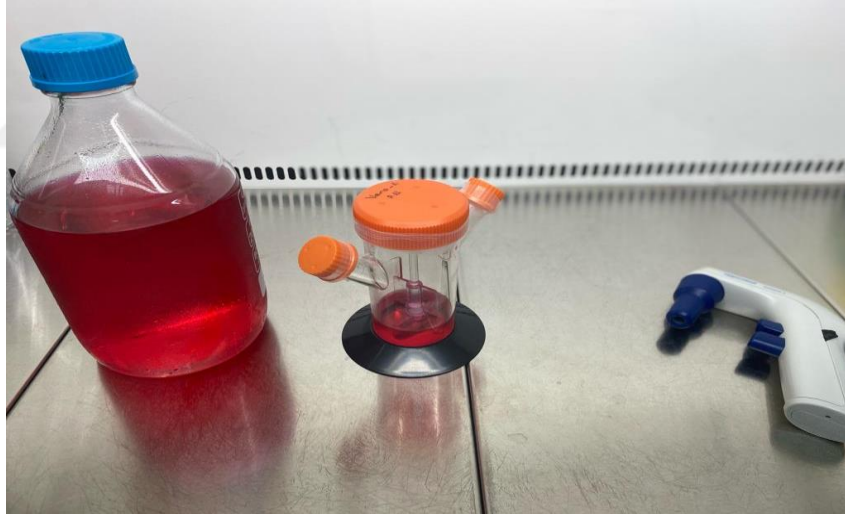
Spinner flask Biyogüvenlik kabini içerisine alınmış ve mikrotaşıyıcıların dibe çökmesi için 3-4 dakika bekletilmiştir. Mikrotaşıyıcılar dibe çöktüğünde besi ortamı pipet ile alınarak atık kabına bırakılmıştır. Spinner flask içerisine 50 ml PBS eklenerek çalkalamalı inkübatörde 10 dk karıştırılmaya bırakılmıştır. Spinner flask içerisinden PBS uzaklaştırmak için pipet ile süpernatat alınarak atık kabına boşaltılmış, içerisine 50 ml PBS+EDTA karışımı eklenerek 20 dk karıştırılmak üzere inkübatöre alınmıştır. Spinner flask içerisinden PBS+EDTA karışımını uzaklaştırmak için pipet ile süpernatant alınarak atık kabına boşaltılmıştır. Spinner flask içerisini hücre başlangıç sayısının %4’ü kadar tripsin eklenerek 30 dk karışıma bırakmak üzere inkübatöre alınmıştır.

Mikrotaşıyıcı süspansiyon kültürde hücre pasajı

Mikrotaşıyıcı süspanse kültür için hücre kültürü kullanımına uygun steril olmayan dekstran kaplı cytodex 1 marka mikrotaşıyıcılar kullanılmıştır. Her bir mikrotaşıyıcının kuru haldeki boyutu ortalama 170 µm’dir. Bir gramdaki mikrotaşıyıcı sayısı ise 4 milyon olup, ıslak halde iken bir gramdaki toplam mikrotaşıyıcının yüzey alanı ise 3000 cm²/g civarındadır (<https://cytiva-delivery.sitecorecontenthub.cloud/api/public/content/digi-11574-pdf>). Her bir spinner flask için 0.33g mikrotaşıyıcı 100 ml PBS içerisine

aktarılarak 120 °C'de otoklav edilerek sterilizasyonu sağlanmıştır. Dolayısıyla her spinner flaska konulan toplam mikrotasıyıcının yüzey alanı 900cm² olarak hesaplanmıştır.

Steril mikrotasıyıcıların içinde bulunduğu ve bir gece önce dengeleme için inkübatöre bırakılan spinner flask biyogüvenlik kabin içerisine alınarak besi ortamı tazelenmiştir. Sayımı yapılan hücreler 3x10⁵ h/ml olarak hazırlanmış ve spinner flask içerisine aktarılmıştır. Hücrelerin mikrotasıyıcı üzerine tutunması için 4 saat boyunca 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatöre alınarak karıştırıcı üzerinde 40 rpm'de 2 dk karıştırma 20 dk sabit bırakarak tutunma protokolü uygulanmıştır. 4 saat sonunda spinner flask içerisine 50 ml besi ortamı eklenmiş ve 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatöre alınarak karıştırıcı üzerinde 40 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlem 10 pasaj için aynı şekilde tekrar edilmiştir.



Şekil 3.3. Mikrotasıyıcılı Süspanse Kültür

Üç boyutlu ortam sağlayan mikrotasıyıcılı süspanسیون kültürde 3B olarak üreyen hücrelerden 24 saatte bir örnek alınarak thoma lamda hücre sayımı yapılmıştır. 2B kültür ve 3B kültürde 96. saatte sayım için örnek alınmıştır. Daha sonra alınan örneklerdeki hücre sayıları serum içeren besi ortamı ile seyreltilerek 3x10⁵ h/ml ayarlanmış ve 10 pasaja kadar ileri pasajlamalar yapılmıştır.

3.2.5. Stasyonel ve mikroteşyicili kültür sistemlerinde çoğaltılan Vero hücrelerinin ACE-2 protein ifadelerinin ölçümü

İki boyutlu stasyonel kültür ve üç boyutlu mikroteşyicili süspansiyon kültürlerin her pasajında; tripan mavisi ile hücre sayıları ve RT-PCR ile SARS-CoV-2 virüsünün hücresel reseptörü olan *ace2* geninin ifadesi karşılaştırılmıştır.

PCR: Vero CCL81 hücre pasajları esnasında alınan hücrelerdeki *ace2* genlerinin ekspresyonu incelenmiştir. Bu amaçla toplam mRNA izolasyonu, RNase mini kiti (invitrogen) ile protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonrası elde edilen RNA'nın ters transkripsiyonu, Xpert cDNA Synthesis kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. cDNA' daki *ace2* gen varlığı gene özgü 169 nükleotid uzunluğundaki LOC117134593 promotor bölgesi PCR ile çoğaltılarak kontrol edilmiştir. Hedef genin göreceli ekspresyon oranı, $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Hedef *ace2* geninin ekspresyonu, stabil şekilde eksprese edilen referans gen olan hipoksantin-guanin fosforibosiltransferaz (HPRT1) ile normalleştirilerek değerlendirilmiştir.

Toplam mRNA ekstraksiyonu: Ependorf tüp içerisine 500ul Lizis Buffer +500ul %70 Etanol+500ul numune eklenerek vortekslenmiştir. Homojen hale getirilen karışımdan 750ul alınarak spin kolon içerisine yerleştirilmiştir. 12000 G'de 15 sn santrifüj edilmiştir. Spin kolonda altta kalan kısım atılmıştır. Geriye kalan 750ul karışım spin kolona aktararak 12000 G' de 15 sn santrifüj edilmiştir. Spin kolonda altta kalan kısım atılmıştır. 700ul washing 1 solüsyonu spin kolon üzerine aktarılmıştır. 12000 G'de 15 sn santrifüj edilmiştir. Spin kolonda altta kalan kısım atılmıştır. 500ul washing 2 solüsyonu spin kolon üzerine aktarılmıştır. 12000 G'de 15 sn santrifüj edilmiştir. Spin kolonda altta kalan kısım atılmıştır. 500ul washing solüsyonu spin kolon üzerine aktarılmıştır. 12000 G'de 2dk santrifüj edilmiştir. Spin kolonda altta kalan kısım atılmıştır. Spin kolon yeni bir ependorf tüpüne takılmıştır. Spin kolon üzerine 50ul elüsyon buffer eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1-2 dakika bekletilmiştir. 14000 G' de 2 dk santrifüj edilmiştir. Spin kolon üzerine 50ul elüsyon buffer eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1-2 dakika bekletilmiştir. 14000 G' de 2 dk santrifüj edilmiştir. Spin kolon içerisinde 100ul RNA elde edilmiştir.

cDNA Sentezi: Her bir numune için Xpert cDNA Synthesis kiti kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Kit içinde bulunan reaktifler iyice karıştırılarak buz üzerine alınan RNaz içermeyen tüp içerisine alınarak karıştırılmıştır. Her bir tüp içerisine 18 ul reaktiften eklendi üzerine 2 ul RNA eklenerek 25°C de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 55 °C de 50 dakika karıştırıcıda inkübasyona bırakılmıştır. 85 °C 5 dakika ısıtılarak RTase etkisiz hale getirilmiştir. Sonrasında 2 dk buz üzerinde bekletilerek soğutulmuştur. Her bir numune için 100 ul cDNA elde edilmiştir.

Konvensiyonel PCR: cDNA üretiminin kontrolü, *ace2* geninin varlığı, konvensiyonel PCR yöntemi ile Ace2F ve Ace2R primerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR karışımı aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 3.4. Konvensiyonel PCR Bileşenleri

Bileşen	Miktar
RED	12,5 ul
Forward Primer	1, ul
Reverse Primer	1, ul
miliQ su	4,5 ul

PCR tüpleri içerisinde iyice karıştırılan mastermixten 20 ul ve cDNA'lerden 5 ul eklenerek Çizelge 3.4. koşullar altında polimerizasyon gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.5. Konvensiyonel PCR Koşulları

94 °C	2 dk	1 döngü
94 °C	30 sn	
59 °C	30 sn	35 döngü
72 °C	1 dk	
72 °C	5 dk	1 döngü

Konvensiyonel PCR için elektroforez tankında %2 oranında agaroz jel hazırlanmıştır. Hazırlanan jel donması gerçekleştiğinde numuneler 3ul sybr safe boyası ile karıştırılarak jele yüklenmiştir. 140V'ta 30 dk yürümeye bırakılmıştır. Yürütme sonrası görüntüleme yapılmıştır.

RT-PCR : Aşağıda belirtilen bileşenler çözündürülerek iyice karıştırılmıştır.

Çizelge 3.6. RT-PCR Bileşenleri

Bileşen	Birim
DNA Green	12,5 ul
Forward Primer	1 ul
Reverse Primer	1 ul
miliQ Su	4,5 ul

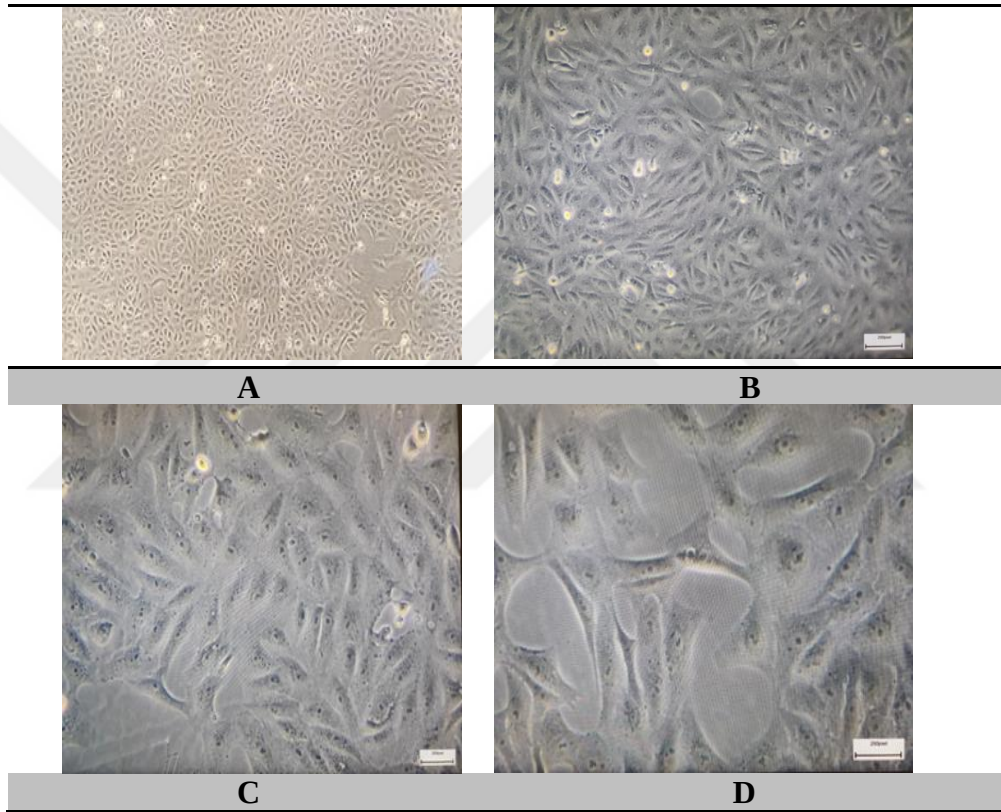
ace2 ve *hprt1* genleri için spesifik primerler kullanılmıştır. İyice karıştırılmış olan karışımdan her bir tüpe 18 ul eklenmiş ve üzerine oluşturulan cDNA numunelerinden 2 ul eklenerek aşağıdaki koşullar altında roche lightcycler 480 model cihazda real-time PCR gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.7. RT-PCR Koşulları

Aktivasyon Aşaması	95 °C	5 dk	1 döngü
PCR Aşaması	95 °C	20 sn	
	55 °C	30 sn	40 döngü
Melting	95 °C	10 sn	
	50 °C	1 dk	1 döngü
	95 °C		

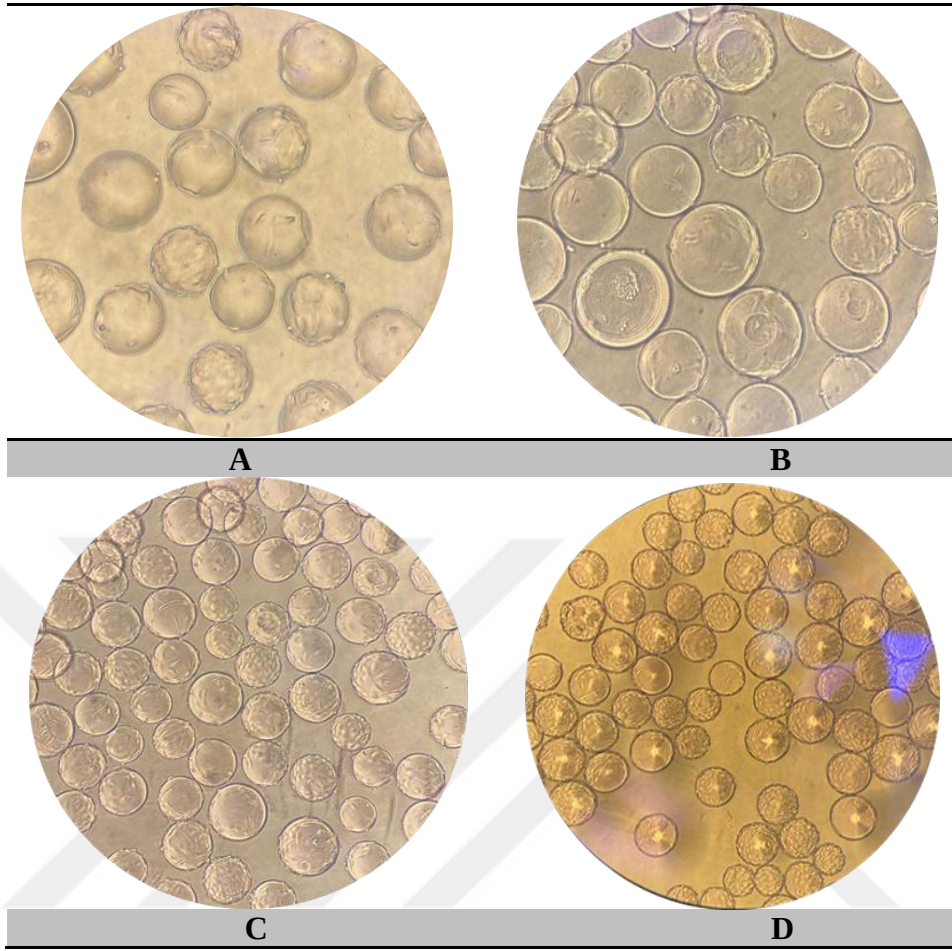
4. BULGULAR

Stasyoner kültürde çoğaltılan Vero CCL81 hücresinin morfolojik değerlendirmesi ters faz kontrast mikroskopta incelenmiş ve  ekil 4.1’de bu değerlendirmeye ait görüntülemeler gösterilmiştir. Mikroskobik incelemelerde hücrelerin 72 saatte kültür kabı yüzeyini %90 oranında kapladığı, morfolojik olarak epitelyal görünümde membran yapısı dinamik, hücre içi granülüzasyon ve vakuol   menin olmadığı gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.1. Vero hücresinin stasyoner kültürde ters faz kontrast mikroskop görüntüleri (A. 4x büyütme, B. 10x büyütme, C. 20x büyütme, D. 40x büyütme)

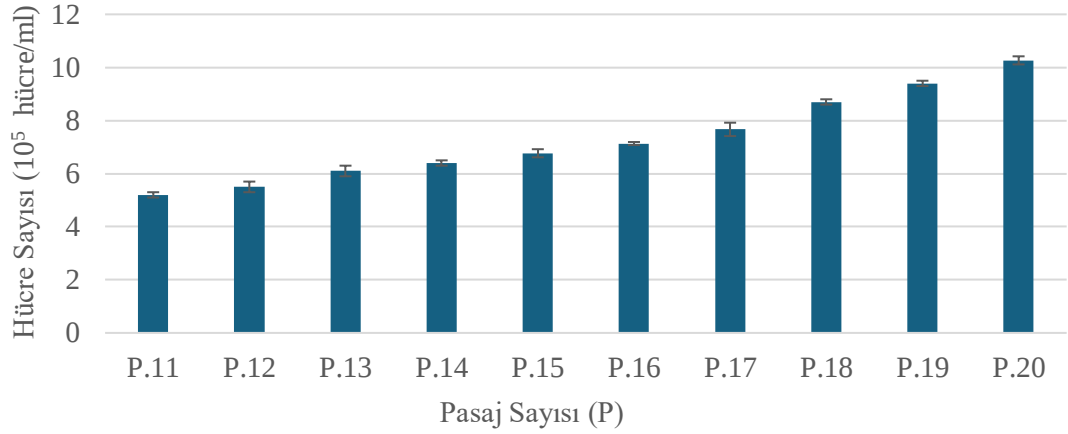
Mikrota ıyıcılı süspansiyon kültürde üretilen Vero hücresinin 4.saat, 24.saat, 48.saat ve 96.saatte inverted mikroskopta morfolojik yapıları incelenmiş ve  ekil 4.2’ de gösterilmiştir. Hücrelerin morfolojik olarak epitelyal görünümde, membran yapısı dinamik, hücre içi granülüzasyon ve vakuol   me olmadığı gözlemlenmemiştir. 4. saatte hücreler mikrota ıyıcılar üzerine tutunmaya ba lamı tır. 96. saatte mikrota ıyıcı yüzeyini kaplama oranı %90-100 ‘e ulaşmıştır.



Şekil 4.2. Vero hücresinin mikrotasıyıcı süspansiyon kültürde ters faz kontrast mikroskop görüntüleri (A. 4.saat 20x büyütme, B. 24.saat 40x büyütme, C. 72.saat 4x büyütme, D. 96.saat 4x büyütme)

Şekil 4.2’de görülen dairesel yapılar, mikrotasıyıcı sistemlerin mikroskopik görüntüleridir. Özellikle Şekil 4.2.’de mikrotasıyıcıların çoğunluğunun yüzeyi Vero hücreleri tarafından kaplandığı görülmektedir.

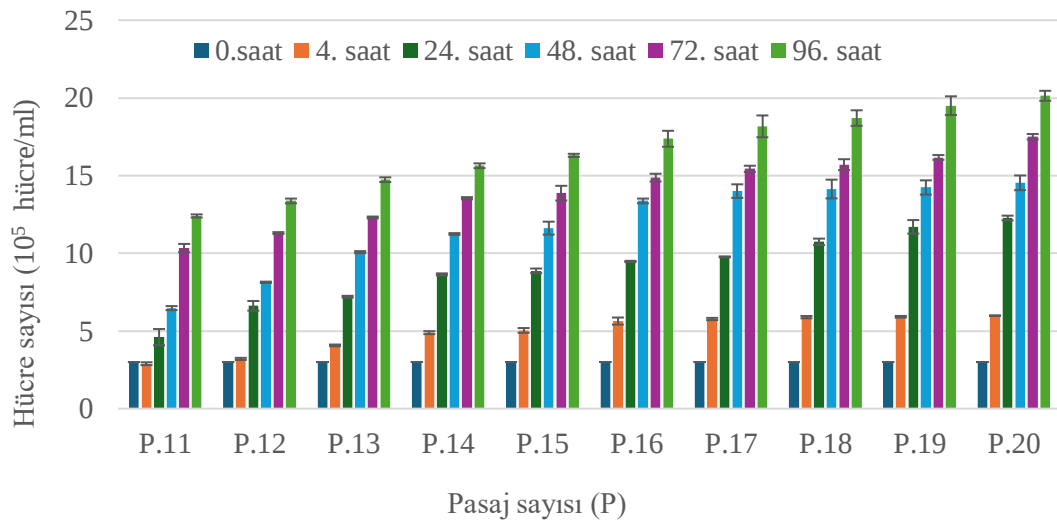
Stasyonier kültür ile çoğaltılan Vero hücresinin, her on pasajda, 96. saatteki hücre sayımına bağlı olarak gerçekleştirilen büyüme grafiği Şekil 4.3’te gösterilmiştir. Her pasajda hücre başlangıç sayıları 300.000 hücre ile başlanarak çalışmanın standardize olması hedeflenmiş ve çalışma üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.3. Vero hücresi stasyoner kültür büyüme grafiği. Hata çubukları standart sapmaları temsil etmektedir (n=3)

Şekil 4.3'te yer alan grafikte stasyoner kültürde ilk beş pasajda hücrenin koşullara tamamen adapte olduğu ve ondan sonraki pasajlarda hücre sayısının 7×10^5 hücre/ml – 1×10^6 hücre/ml arasında kararlı şekilde de çoğalmaya devam ettiği görülmektedir.

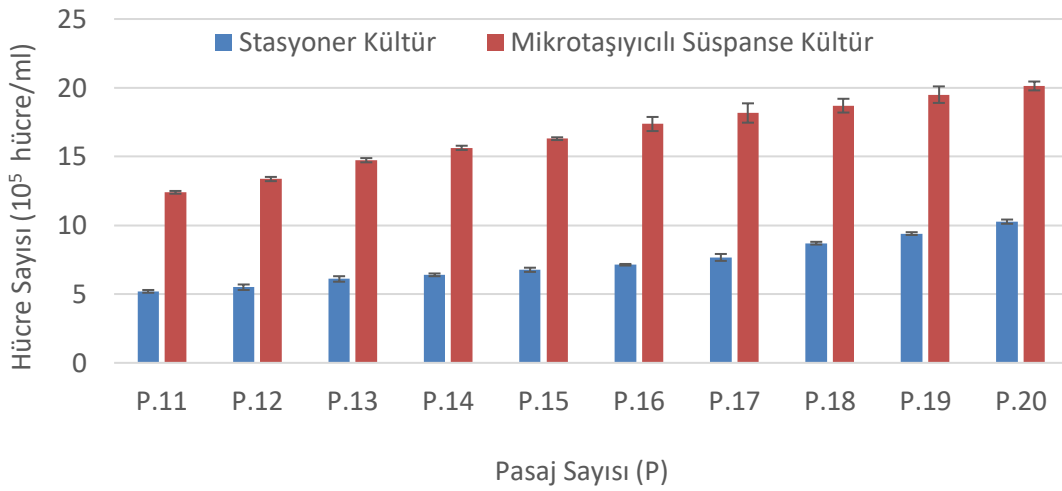
Mikrotaşıyıcılı süspansiyon kültürde çoğaltılan Vero hücreleri ile de 10 seri pasaj yapılmış ve her pasajın 0., 4., 24., 48. ve 96 saatlerinde hücre sayımına bağlı olarak gerçekleştirilen büyüme grafiği Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4. Vero hücresinin mikrotaşıyıcılı süspansiyon kültürde büyüme grafiği. Hata çubukları standart sapmaları temsil etmektedir (n=3)

Şekil 4.4’de stasyoner kültürde olduğu gibi, mikrotaşırıyıcı süspanşyon kültürde ilk beş pasajda hücrenin koşullara tamamen adapte olduğu ve ondan sonraki pasajlarda hücre sayının 1.5×10^6 hücre/ml – 2×10^6 hücre/ml arasında kararlı şekilde de çoğalmaya devam ettiği görölmektedir (Şekil 4.4)

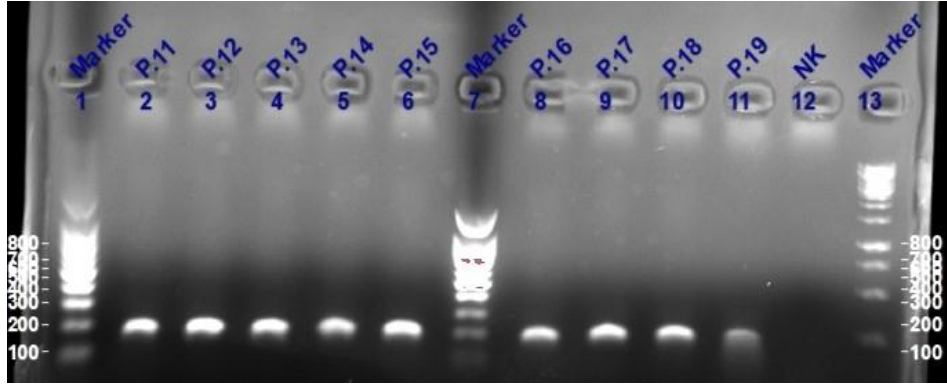
Yukarıdaki iki grafiğı daha iyi anlayabilmek ve karşılaştırabilmek için, 96. saatteki stasyoner hücre kültürü ve mikrotaşırıyıcı süspanse hücre kültürü ile üretilen Vero hücreleri sayımları Şekil 4.5’te yer alan grafikte gösterilmiştir.



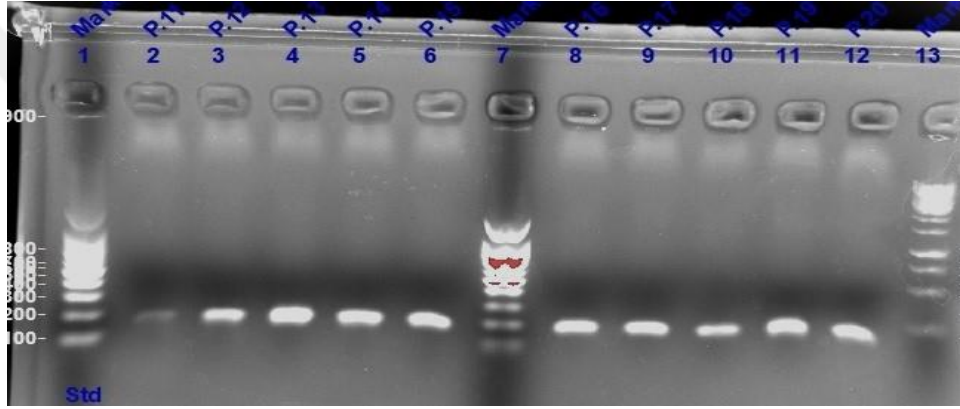
Şekil 4.5. Vero hücresinin stasyoner kültür ve mikrotaşırıyıcı süspanşyon kültürde karşılaştırmalı büyüme grafiğı. Hata çubukları standart sapmaları temsil etmektedir (n=3)

Grafikte mikrotaşırıyıcı süspanse kültür ile üretilen VeroCCL81 hücresinin stasyoner kültür ile üretilen VeroCCL81 hücrelerine oranla hücre sayısında artış gözlemlenmiştir.

İki farklı kültür sisteminde üretilen hücrelerin sentezlemiş olduğu *ace2* genlerinin varlığının gösterilmesi için yapılan mRNA izolasyonu sonrası gerçekleştirilen cDNA sentezinin başarısı, *ace2* promotor geni çoğaltılmak suretiyle doğrulanmıştır.



A

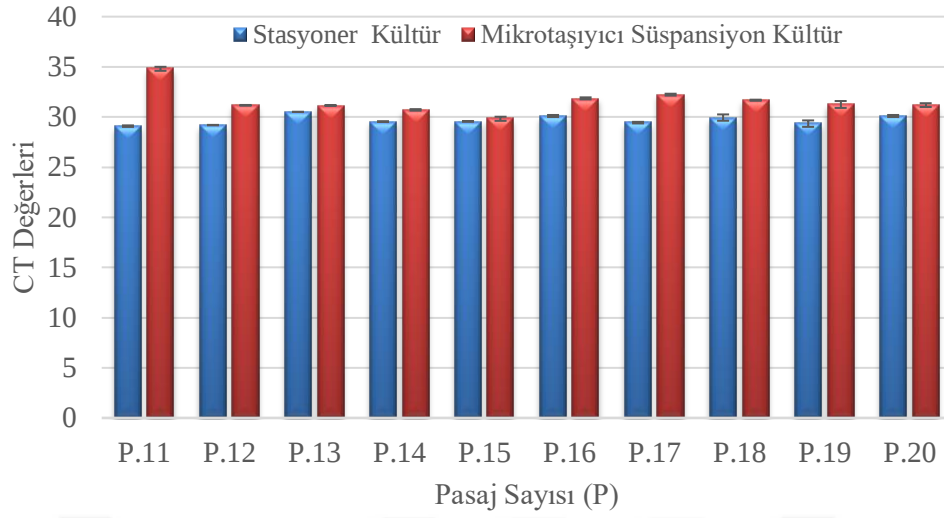


B

Şekil 4.6. Stasyoner (A) ve mikrotasıyıcılı süspansiyon kültürde (B) üretilen Vero hücrelerinin sentezlediği *ace2* promotor bölgesi

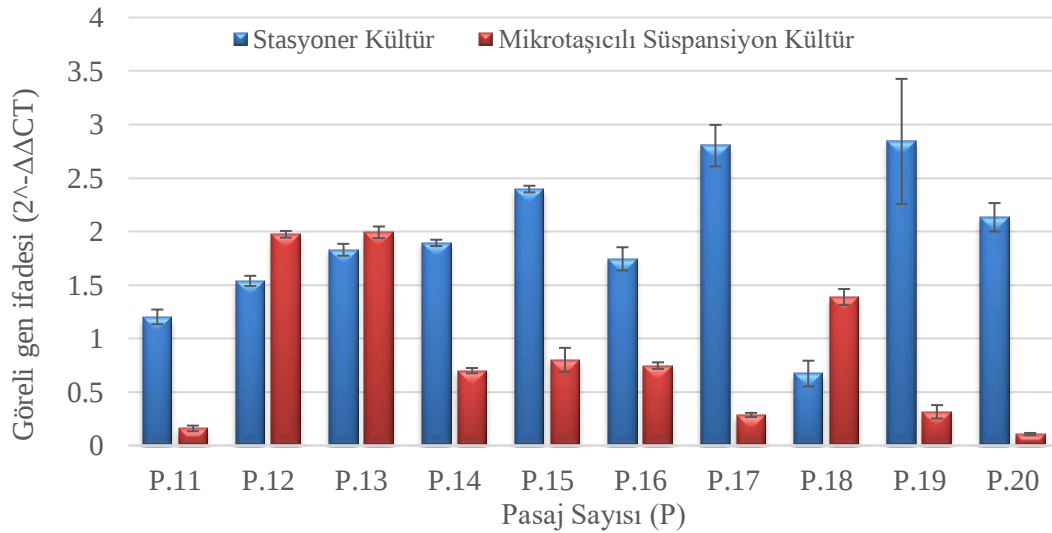
Şekil 4.6’de hem stasyoner kültürde hem de mikrotasıyıcı sistemle geliştirilen kültürde büyütülen Vero CCL81 hücrelerinin ACE-2 proteinini kodlayan gene ait promotor bölgesinin beklendiği üzere 169 bp uzunluğunda olduğu görüntülenmiştir.

Stasyoner kültür ve mikrotasıyıcılı süspansiyon kültürde üretilen Vero hücrelerinin *ace2* gen ifadesi RT-PCR gerçekleştirilerek görüntülenmiş, veriler hem CT değerlerine göre (Şekil 4.7) hem de $2^{-\Delta\Delta CT}$ göre göreceli gen ifadesi (Şekil 4.8) olarak grafiğe aktarılmıştır.



Şekil 4.7. Stasyonere kültür ve mikrotaşıyıcılı süspansiyon kültürde *ace2* gen ifadesinin RT-PCR CT Değerleri Grafiği

Stasyonere kültür ve mikrotaşıyıcılı süspansiyon kültürde üretilen Vero hücresi *ace2* geni ve *hprt1* geni için $2^{-\Delta\Delta CT}$ hesaplanarak Şekil 4.8’de gösterilmiştir. Grafikte mikrotaşıyıcılı süspansiyon kültüründe üretilen Vero hücresinde *ace2* ifadesinin stasyonere kültürde üretilen Vero hücresi *ace2* ifadesine oranla yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.8. Stasyonere kültür ve mikrotaşıyıcılı süspansiyon kültür sistemlerinde *ace2* gen ifadesi

Bu grafiklere göre de mikrotaşıyıcılı süspansiyon sistemlerinde *ace2* ifadesi stasyonere kültüre oranla daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde, hayvan ve insan hücre kültürleri, hastalıkların modellenmesi, kök hücre ve kanser araştırmaları, monoklonal antikor üretimi, rejeneratif tıp, terapötik protein üretimi ve aşı üretimine kadar canlı bilimin birçok dalında yaygın olarak kullanılan önemli araçlardan olup, tasarlanmış memeli hücre dizilerinden üretilen biyolojik ilaç ürünlerinin geliştirilmesi ile de biyoteknoloji ve ilaç endüstrilerinin temel dayanaklarından biridir (Silicka ve ark., 2017; Verma ve ark., 2020).

Hücre kültür sistemlerinin etkinliği birçok farklı faktörün karşılıklı etkileşimine bağlıdır. Hücrelerin bir yüzeye tutunması veya süspanse halde üremesi ve hücre sayısı hangi kültür sisteminde üretileceğini belirler. Hücre kültür sistemleri genel olarak “stasyonel kültür” veya “yüzeye bağımlı hücre kültürü” ve “süspanse hücre kültürü” olarak tanımlanabilir. Stasyonel hücre kültür sistemindeki hücreler bir yüzeye yapışarak üreme eğilimindedir. Hücre sayısı ve verimliliği, kullanılan hücre kültür kabının yüzey alanı ile sınırlıdır. Süspanse veya süspanسیون kültür sistemindeki hücreler, herhangi bir yüzeye tutunma ihtiyacı duymaksızın gaz alışverişi ve besin maddeleri transferinin yeteri kadar sağlanabildiği karıştırmalı ortamlarda ürerler. Bunların dışında, bu iki sistemin bir arada kullanıldığı yani hücrelerin bir yüzey üzerine yapışarak ki bu yüzeyler genellikle çeşitli mikrotasıyıcılar olup karıştırmalı süspanسیون kültürde çoğaldıkları mikrotasıyıcılı kültür sistemleri de mevcuttur. Her üç kültür sisteminin de kendilerine göre avantaj ve dezavantajları mevcuttur (Freshney, 2016). Ancak günümüzde biyoteknolojide endüstriyel boyutlarda ürün üretimi gerçekleştirilmek istendiğinde daha çok süspanse ya da mikrotasıyıcılı süspanse kültür sistemlerinden faydalanılır.

Vero hücreleri, araştırmalarda kullanılan en yaygın memeli sürekli hücre dizilerinden biri olup, 1960'lı yıllarda Afrika yeşil maymununun (*Cercopithecus aethiops*) böbreğinden elde edilmiştir. Bu yüzeye bağımlı hücre dizisi yaygın olarak viroloji çalışmalarında, kimyasalların, toksinlerin ve diğer maddelerin memeli hücreleri üzerindeki etkilerinin moleküler düzeyde değerlendirilmesinde, sınırlı da olsa hücre içi bakterilerin (örn. *Rickettsia* spp.; UNIT 3A.4) ve parazitlerin (örn. *Neospora*) çoğaltılması ve incelenmesinde de kullanılmıştır. Ayrıca, Vero hücreleri Amerika Birleşik Devletleri'nde hem canlı (rotavirüs, çiçek hastalığı) hem de inaktif (çocuk felci virüsü) viral aşının

üretimi için lisanslı ve dünya çapında Vero hücreleri, aralarında Kuduz virüsü, Reovirüs ve Japon ensefalit virüsün bulunduğu birçok farklı virüslerin üretiminde de kullanılmıştır (Ammerman ve ark., 2008).

Bu tez çalışması kapsamında, stasyonier kültür ve mikrotasıyıcılı süspansiyon kültür sisteminde çoğaltılan Vero hücreleri, hücre canlılığı, hücre morfolojisi, büyüme kinetiği ve SARS-CoV-2 virüsü hücresel reseptörü olan *ace2*'nin ifadesi yönünden karşılaştırılmıştır.

Kültür ortamında düzenli ve optimal bir çevre oluşturulabilmesi için fizikokimyasal koşulların optimum düzeyde sağlanması gereklidir (Freshney, 2016). Bu nedenle çalışmamızda, kültür pasajları sırasında, sıcaklık, pH gibi koşullar takip edilerek gerektiğinde düzenlenmiştir. Her iki kültür sisteminde de Vero hücresinin ardışık yapılan seri pasajları sırasında morfolojik olarak farklılıklar görülmemiş olup, hücreler epitelyal formlarını ve membran dinamiği korumuş, hücre içinde de artan granülüzasyonlar görülmemiştir.

Transforme ya da kanser kökenli devamlı hücre hatları seri olarak pasajlandıklarında, bölünme devamlı uyarıldığı için büyüme hızlarında artış gösterebilirler. Her iki kültür sisteminde de hücreler kültür ortamı ve koşullarına 4- 5.pasajdan itibaren tamamen uyum sağlamışlar, seri olarak pasajlanmalarından ve devamlı hücre hattı olmalarından kaynaklı pasaj sayısı ile doğru orantılı olarak hücre sayılarında da çok olmamakla birlikte artışlar görülmüştür. Ancak mikrotasıyıcılı sistemdeki hücrelerin yüzeye tutunduğu alanın mikrotasıyıcılara bağlı olarak stasyonier kültürden daha fazla olması ve ilerleyen pasajlarında etkisiyle de mikrotasıyıcılı sistemde hücre çoğalması daha fazla olmuştur.

Stasyonier hücre kültürü ve mikrotasıyıcılı süspansiyon hücre kültürlerinde *ace2* geninin ifadesi RT-PCR ile çalışılmış, veriler CT değerleri ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülüne göre görel gen ifadesi grafikleri oluşturulmuştur. Yapılan benzer çalışmalarda; farklı ökaryotik hücre hatlarında SARS-CoV'in hedef hücrelerini tanımlamak ve karakterize etmek için SARS-CoV'a duyarlı hücrelerin SARS-CoV reseptör proteinin ifadesi incelenmiştir. Bulgulara göre, SARS-CoV'a duyarlı hücrelerde *ace2* mRNA'sı konvensiyonel-PCR ile bizim çalışma bulgularımızda olduğu gibi 150-200 bp aralığında doğrulanmıştır. Gerçek zamanlı PCR sonuçlarına göre Vero E6, MRC5, Hep2 Huh-7, POEK ve PS hücresinde

SARS-CoV'a yüksek duyarlılık gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak virüse duyarlı olmayan hiçbir hücrede *ace2* mRNA'sına rastlanmamıştır (Hattermann ve ark.,2004). Bir diğer benzer bir çalışmada insan nazal ve bronşiyal solunum epitelinden ve Vero hücresinden *ace2* ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. RT-PCR yöntemi ile gerçekleştirilmiş bu çalışmada en yüksek *ace2* ekspresyonu, Vero E6 hücre hattında, farklılaşmış BCI-NS1.1 hücrelerinde ve in vitro olarak farklılaşmış nazal epitel hücrelerinde gözlenmiştir (Blume ve ark., 2021).

Bu çalışma kapsamında elde edilen bulgulara; mikrotaşyıcı süspansiyon kültürde mikrotaşyıcılar nedeniyle daha fazla yüzey alanına, karıştırmalı sistem olması nedeniyle de ortamdaki oksijenlenmenin ve besin alışverişinin hücre sayılarının artışına büyük katkı sağladığı gözlenmiştir. Yüzeye bağımlı ve bulunduğu ortamda bir desteğe ihtiyaç duyarak çoğalan Vero hücresi süspansiyon kültür sisteminde bu desteği mikrotaşyıcılara tutunarak sağlamış ve stasyoner kültürde olduğu gen ifadesinde bir kayıp olmamış hatta stasyoner kültüre göre daha yüksek düzeyde ifade olmuştur.

Sonuç olarak büyük ölçekte üretim yapılan karıştırmalı biyoreaktör sistemlerinde karıştırma sisteminin şekli, boyutu, hacmi ve ortam dinamiklerinin hücrenin mikrotaşyıcıya tutunma, çoğalma ve hücre membran metabolizmasına olduğu gibi membran proteinlerinin ifadesine de etkileri olabilmektedir. 2 boyutlu ve tek tabaka kültürlerde hücre çoğaltılması için kullanılan geleneksel cam veya plastik hücre kültürü flaskları ile yapılan hücre kültürü ve aşı üretimi belirli bir ölçek büyütme ile sınırlanabilmektedir. Oysaki, karıştırmalı biyoreaktörlerde mikrotaşyıcılar kullanılarak yapılan hücre büyütme ve ölçek büyütme, 3 ton, 5 ton, 10 ton gibi çok büyük ölçeklere rahatlıkla çıkabilmek için olanak sağlamaktadır. Ancak, karıştırmalı ortamlarda hücre büyümesini ve gelişimini etkileyebilecek çok fazla parametre (karışım hızı, karışım şekli, süresi, kayma gerilimleri vb.) mevcut olup, bunların da hücre büyümesinde ve dolayısıyla viral hücresele reseptörlerin bulunduğu hücre membranının antijenik bölgesindeki proteinlerin ifadesinde etkilerinin olabilmesi düşünülmektedir. Ancak bu sistemlerde bu açıklarını büyük hacimlerde hücre üretilebilme yetenekleri ile avantaja dönüştürmektedir. Bu bağlamda, kullanılan iki farklı üretim metodu arasında *ace2* gen ifadesine bakıldığında benzer sonuçlar elde edilmiş olup endüstriyel üretimler için kullanılmakta olan mikrotaşyıcı süspansiyon kültürlerinin ACE-2 reseptör protein ifadesine negatif

bir etkisinin olmadığı, üretim kapasitesi yönünden stasyoner kültürlere göre avantajlı olduğu saptanmıştır.



6. KAYNAKLAR

Ağaoğlu, Ö. K., Sidekli, Ö., (2020). Kantitatif RT-PCR (RT-qPCR) Çalışmalarında Uygun Housekeeping Genlerin (HKGs) Seçimi ve Validasyonu. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 17(1) 76-83

Ammerman, N. C., Beier-Sexton, M., & Azad, A. F. (2008). Growth and maintenance of vero cell lines. In *Current Protocols in Microbiology*, Issue SUPPL. 11.

Alfano, R., Pennybaker, A., Halfmann, P., & Huang, C. Y. H. (2020). Formulation and production of a blood-free and chemically defined virus production media for VERO cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(11), 3277–3285.

Beacon, T. H., Delcuve, G. P., & Davie, J. R. (2020). Epigenetic regulation of ACE2, the receptor of the SARS-CoV-2 virus. In *Genome Canadian Science Publishing*, Vol. 64, Issue 4, pp. 386–399.

Blume, C., Jackson, C. L., Spalluto, C. M., Legebeke, J., Nazlamova, L., Conforti, F., Perotin, J. M., Frank, M., Butler, J., Crispin, M., Coles, J., Thompson, J., Ridley, R. A., Dean, L. S. N., Loxham, M., Reikine, S., Azim, A., Tariq, K., Johnston, D. A., Mennella, V. (2021). A novel ACE2 isoform is expressed in human respiratory epithelia and is upregulated in response to interferons and RNA respiratory virus infection. *Nature Genetics*, 53(2), 205–214.

Castiaux, A. D., Spence, D. M., & Martin, R. S. (2019). Review of 3D cell culture with analysis in microfluidic systems. In *Analytical Methods*. Royal Society of Chemistry, Vol. 11, Issue 33, pp. 4220–4232.

[https://cytiva-delivery.sitecorecontenthub.cloud/api/public/content/digi-11574-pdf-\(01.04.2024\).](https://cytiva-delivery.sitecorecontenthub.cloud/api/public/content/digi-11574-pdf-(01.04.2024).)

Chen, F., Zhang, Y., Li, X., Li, W., Liu, X., Xue, X., (2021). The impact of ACE2 polymorphisms on COVID-19 disease: susceptibility severity, and therapy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Vol. 11, pp. 2.

Dayan S., (2021). COVID-19 ve Aşı. *Dicle Tıp Dergisi*, 48, 98–113.

Freshney, R.I., (2010). Types of Primary Culture. *Culture Of Animal Cells*, Wiley-Blackwell, New Jersey 2010, 163-186.

Freshney, R.I., (2016). *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*, Carl Gregory New Jersey 2010, 8-346.

Freshney, R.I., (2021). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, Wiley-Blackwell, New Jersey, 110-832.

- Hattermann, K., Müller, M. A., Nitsche, A., Wendt, S., Donoso Mantke, O., & Niedrig, M. (2005). Susceptibility of different eukaryotic cell lines to SARS-coronavirus. *Archives of Virology*, 150(5), 1023–1031.
- He, B., Chen, G., & Zeng, Y. (2016). Three-dimensional cell culture models for investigating human viruses. In *Virologica Sinica* Science Press (Vol. 31, Issue 5, pp. 363–379).
- Hou, Y. J., Okuda, K., Edwards, C. E., Martinez, D. R., Asakura, T., Dinnon, K. H., Kato, T., Lee, R. E., Yount, B. L., Mascenik, T. M., Chen, G., Olivier, K. N., Ghio, A., Tse, L. V., Leist, S. R., Gralinski, L. E., Schäfer, A., Dang, H., Gilmore, R., ... Baric, R. S. (2020). SARS-CoV-2 Reverse Genetics Reveals a Variable Infection Gradient in the Respiratory Tract. *Cell*, 182(2), 429-446.e14.
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. In *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 19, Issue 3, pp. 141–154.
- Johnson, C.M., Yang, S., Sellins, K.S., Frank, G.R., (2021) Selection of HPRT primers as controls for determination of mRNA expression in dogs by RT-PCR. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 47-5.1
- Jedrzejczak-Silicka M., (2017). History of cell culture. *New Insights into Cell Culture Technology* 1–42.
- Kang, Y. F., Sun, C., Zhuang, Z., Yuan, R. Y., Zheng, Q., Li, J. P., Zhou, P. P., Chen, X. C., Liu, Z., Zhang, X., Yu, X. H., Kong, X. W., Zhu, Q. Y., Zhong, Q., Xu, M., Zhong, N. S., Zeng, Y. X., Feng, G. K., Ke, C., Zeng, M. S. (2021). Rapid Development of SARS-CoV-2 Spike Protein Receptor-Binding Domain Self-Assembled Nanoparticle Vaccine Candidates. *ACS Nano*, 15(2), 2738–2752.
- Li, Y., Li, H., & Zhou, L. (2020). EZH2-mediated H3K27me3 inhibits ACE2 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 526(4), 947–952.
- Lima, R. S., Rocha, L. P. C., & Moreira, P. R. (2021). Genetic and epigenetic control of ACE2 expression and its possible role in COVID-19. In *Cell Biochemistry and Function* Vol. 39, Issue 6, pp. 713–726.
- Logan, M., Rinas, K., McConkey, B., & Aucoin, M. G. (2022). Vero cells gain renal tubule markers in low-calcium and magnesium chemically defined media. *Scientific Reports*, 12(1).
- Shen, C. F., Guilbault, C., Li, X., Elahi, S. M., Ansorge, S., Kamen, A., & Gilbert, R. (2019). Development of suspension adapted Vero cell culture process technology for production of viral vaccines. *Vaccine*, 37(47), 6996–7002.
- Shirbhate, E., Pandey, J., Patel, V. K., Kamal, M., Jawaid, T., Gorain, B., Kesharwani, P., & Rajak, H. (2021). Understanding the role of ACE-2 receptor in pathogenesis of COVID-19 disease: a potential approach for therapeutic intervention. In *Pharmacological Reports, Springer Science and Business Media Deutschland GmbH*, Vol. 73, Issue 6, pp. 1539–1550.

Smith, D., Price, D. R. G., Faber, M. N., Chapuis, A. F., & McNeilly, T. N. (2022). Advancing animal health and disease research in the lab with three-dimensional cell culture systems. In *Veterinary Record*, Vol. 191, Issue 1.

Verma A., Verma M., Singh A .(2020). Animal tissue culture principles and applications. *Animal Biotechnology* 269–293.

Yalcin, H. C., Sukumaran, V., Al-Ruweidi, M. K. A. A., & Shurbaji, S. (2021). Do changes in ace-2 expression affect sars-cov-2 virulence and related complications: A closer look into membrane-bound and soluble forms. In *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 22, Issue 13.

Wang, J., Zhao, H., & An, Y. (2022). ACE2 Shedding and the Role in COVID-19. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Vol. 11.

Wang, K., Chen, W., Zhang, Z., Deng, Y., Lian, J. Q., Du, P., Wei, D., Zhang, Y., Sun, X. X., Gong, L., Yang, X., He, L., Zhang, L., Yang, Z., Geng, J. J., Chen, R., Zhang, H., Wang, B., Zhu, Y. M., ... Chen, Z. N. (2020). CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1).