

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**SARS-CoV-2 SPIKE PROTEİNİNİN RESEPTÖR BAĞLANMA BÖLGESİNİN
(RBD), Fc BÖLGE İLE BİRLEŞTİRİLMİŞ FORMUNUN *Nicotiana Benthamiana*
BİTKİSİNDE MÜHENDİSLİĞİ VE ÜRETİMİ**

Ramazan Talha PALAZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HAZİRAN 2022
ANTALYA**

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**SARS-CoV-2 SPIKE PROTEİNİNİN RESEPTÖR BAĞLANMA BÖLGESİNİN
(RBD), Fc BÖLGE İLE BİRLEŞTİRİLMİŞ FORMUNUN *Nicotiana Benthamiana*
BİTKİSİNDE MÜHENDİSLİĞİ VE ÜRETİMİ**

Ramazan Talha PALAZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HAZİRAN 2022
ANTALYA**

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SARS-CoV-2 SPIKE PROTEİNİNİN RESEPTÖR BAĞLANMA BÖLGESİNİN
(RBD), Fc BÖLGE İLE BİRLEŞTİRİLMİŞ FORMUNUN *Nicotiana Benthamiana*
BİTKİSİNDE MÜHENDİSLİĞİ VE ÜRETİMİ**

Ramazan Talha PALAZ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez TÜSEB tarafından 8611 nolu proje ile desteklenmiştir.

HAZİRAN 2022

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SARS-CoV-2 SPIKE PROTEİNİNİN RESEPTÖR BAĞLANMA BÖLGESİNİN
(RBD), Fc BÖLGE İLE BİRLEŞTİRİLMİŞ FORMUNUN *Nicotiana Benthamiana*
BİTKİSİNDE MÜHENDİSLİĞİ VE ÜRETİMİ**

Ramazan Talha PALAZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez / / 202..... tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV (Danışman)

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

ÖZET

SARS-Cov-2 Spike Proteininin Reseptör Bağlanma Bölgesinin (RBD), Fc Bölge ile Birleştirilmiş Formunun *Nicotiana Benthamiana* Bitkisinde Mühendisliği ve Üretimi

Ramazan Talha PALAZ

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV

Haziran 2022; 32 sayfa

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2'nin (SARS-CoV-2) neden olduğu koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) pandemisi, küresel sağlık ve ekonomi için ciddi tehditler oluşturmıştır. COVID-19 salgını, SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı güvenli ve etkili aşılar duyulan ihtiyacı öne çıkarmaktadır. Günümüzde birçok aşı hastalıkla mücadele için kullanılmakta ve geliştirilmektedir. SARS-CoV-2'nin spike proteinindeki reseptör bağlama alanı (RBD), virüsün konak hücredeki anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) reseptörüne bağlanmasından sorumludur. Çoklu baskın nötralize edici epitoplar içerir ve COVID-19 aşılarının geliştirilmesi için önemli bir antijen görevi görür. Fc, füzyon proteininin doğru katlanmasını destekler ve antijen sunan hücrelere bağlanmayı artırır.

Bu tez çalışmasında RBD ve Fc bölgelerinin birleştirilmiş formunun (RBD-Fc) *Nicotiana Benthamiana* bitkisinde üretimi amaçlanmış olup bu bağlamda yapılan deneysel çalışmalar başarıyla gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak RBD-Fc proteini *N. Benthamiana* bitkisinde üretilmiştir. Ayrıca üretilen proteinin ACE2 reseptörüne bağlanma afinitesi olduğu belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2), Fc füzyon proteini, Reseptör bağlama alanı (RBD), SARS-CoV-2

JÜRİ: Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

ABSTRACT

Engineering and Production of the Receptor Binding Domain (RBD) of the SARS-Cov-2 Spike Protein, Fused with the Fc Domain, in *Nicotiana Benthamiana* Plant

Ramazan Talha PALAZ

Master's Degree Thesis, Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV

June 2022; 32 pages

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic, caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), has posed serious threats to global health and the economy. The COVID-19 pandemic highlights the need for safe and effective vaccines against SARS-CoV-2 infection. Nowadays, many vaccines are used and developed to combat the disease. The receptor binding domain (RBD) in the spike protein of SARS-CoV-2 is responsible for binding of the virus to the angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) receptor in the host cell. It contains multiple dominant neutralizing epitopes and serves as an important antigen for the development of COVID-19 vaccines. Fc promotes the correct folding of the fusion protein and enhances binding to antigen presenting cells.

In this thesis study, it was aimed to produce the combined form of the RBD and Fc regions (RBD-Fc) in *Nicotiana Benthamiana* plant, and experimental studies in this context were carried out successfully. As a result, RBD-Fc protein was produced in *N. Benthamiana* plant. In addition, it was determined that the produced protein has binding affinity for the ACE2 receptor.

KEYWORDS: Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2), Fc fusion protein, Receptor binding domain (RBD), SARS-CoV-2

COMMITTEE: Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

ÖNSÖZ

Öncelikle yüksek lisans eğitimim ve çalışmalarım boyunca bana her zaman bilgi ve tecrübeleri ile katkıda bulunan danışman hocam sayın Prof. Dr. Tarlan MAMEDOV'a teşekkürlerimi sunarım.

Tarımsal Biyoteknoloji bölümünün tüm kıymetli hocalarına ve deneysel çalışmalarında vermiş oldukları desteklerden dolayı laboratuvarımızın tüm lisansüstü öğrencilerine en içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim öğretim hayatım boyunca maddi ve manevi her zaman beni destekleyen ve veriğim her kararda yanımda olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Son olarakta her zaman yanımda olan hayat arkadaşım Elif Özekinci'ye tüm destekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
AKADEMİK BEYAN.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	3
2.1. Covid-19 Pandemisi ve Sars- CoV2.....	3
2.2. Koronavirüsün Genel Yapısı.....	4
2.2.1. Moleküler Biyolojik Özellikleri.....	4
2.2.2. Virüsün Yapısal Proteinleri.....	4
2.2.2.1. Nükleokapsid (N) Protein.....	4
2.2.2.2. Membran (M) Protein.....	4
2.2.2.3. Zarf (E) Protein.....	5
2.2.2.4. Spike (S) Protein.....	5
2.3. Virüsün Hücre ile Etkileşimi.....	6
2.4. Hastalığın Tanı ve Tedavisinde Kullanılan Yöntemler.....	7
2.4.1. Hastalığın Tanısı.....	7
2.4.1.1. Moleküler Testler.....	7
2.4.1.2. Serolojik Testler.....	8
3. MATERYAL VE METOT.....	9
3.1. Kullanılan Organizmalar.....	9
3.2. Kodon Optimizasyonu.....	9
3.3. Kullanılan Besiyerleri, Tampon Çözeltiler ve Diğerleri.....	9
3.4. RBD-Fc Füzyonunun Bitki Ekspresyon Sisteminde Kullanılan	
A. Tumefaciens ‘e Aktarımı.....	12
3.5. Nicotiana benthamiana Bitkisine A. Tumefaciens Aracılığı ile RBD-Fc	
Füzyon Proteininin İnfiltrasyonu.....	13

3.6. Western Blot ile Ekspresyon Analizi.....	14
3.7. SDS-page ile Rekombinant Protein Miktar Analizi.....	14
3.8. Ni-NTA Afinite Kromatografisi (IMAC).....	15
3.9. Hitrap Capto Q Purifikasyon Methodu.....	17
3.10. Stabilité Testi.....	18
3.11. RBD-Fc Proteininin ACE2'ye Bağlanma Afinitesinin Elisa Testi ile Kontrolü.....	18
3.12. Verilerin İstatiksel Analizi.....	21
4. BULGULAR VE TARTIşMA.....	22
4.1. A. Tumefaciens Aracılığı ile Bitkiye Gönderilen Rbd-Fc Proteininin En İyi Ekspre Olduğu Suş ve Günün Belirlenmesi.....	22
4.2. RBD-Fc Biyoktle retimi ve Analizi.....	22
4.3. Elde Edilen RBD-Fc Biyokütlesinin Pürifiye Edilmesi.....	23
4.4. Hitrap Capto Q Purifikasyon Methodu ile Saflaştırma Yapılması.....	24
4.5. Elisa Testi ile RBD-Fc Proteininin ACE2'ye Bağlanma Afinitesinin Değerlendirilmesi.....	25
4.6. RBD-Fc +37°C ve +4°C Stabilité Değerleri.....	28
5. SONUÇLAR.....	30
6. KAYNAKLAR.....	31
ZGEÇMİř	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “SARS-CoV-2 Spike Proteininin reseptör bağlanma bölgesinin (RBD), Fc bölge ile birleştirilmiş formunun *Nicotiana Benthamiana* bitkisinde Mühendisliği ve Üretimi ” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

21/06/2022

Ramazan Talha PALAZ

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	: Derece santigrat
g	: Gram
L	: Litre
µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
M	: Molar

Kisaltmalar

RBD	: Reseptör Bağlanma Bölgesi
Fc	: Fc Reseptörü
Sp	: Spike Proteini
gACE2	: Glikolize Anjiotensin Dönüştürücü Enzim
dACE2	: Deglikolize Anjiotensin Dönüştürücü Enzim
BSA Standart	: Bovine Serum Albumin Protein Standartı
EF	: Ödem Faktörü,
ELISA	: Enzim bağlı immünosorbent deneyi
kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
O.D.	: Optik Dansite

pH	: Çözeltinin asitlik veya bazlık derecesi
s	: Saat
SDS Page	: Sodyum Dodesil Sülfat-Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
sn	: Saniye
V	: Volt
CV	: Kolon hacmi
Xg	: Rölatif santrifüj kuvveti



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. SARS-CoV2 elektron mikroskobu görüntüsü.	3
Şekil 2.2. Covid-19 genomunun bölgeleri	4
Şekil 2.3. Koronavirüsün dört yapısal proteini	5
Şekil 2.4. Virüsün Konak hücreye girişi ve salınması	6
Şekil 3.1. E.coli suşlarında bulunan RBD-Fc'nin agaroz jel elektroforezi görüntüsü....	12
Şekil 3.2. İnkübasyon sonrası petride oluşan koloniler	13
Şekil 3.3. <i>Nicotiana benthamiana</i> bitkisine uygulanan agroinfiltrasyon işlemi.....	13
Şekil 3.4. Polihistidin etiketli proteinleri saflaştırmak için kullanılan metot	15
Şekil 3.5. AKTA Start cihazı	17
Şekil 3.6. İyon değişim kromatografisinde kullandığımız HiTrap CaptoQ kolonu.....	17
Şekil 3.7. Analizde kullanılan PVC mikrotitre plakası.....	19
Şekil 4.1. RBD1-Fc füzyon proteinin Western Blot analizi ile ekspresyon tayini	22
Şekil 4.2. N. Benthamiana bitkisinde ürteilen RBD-Fc protein biyokütlesinin western blot analizi	23
Şekil 4.3. Pürifiye edilmiş RBD-Fc proteininin western blot analizi	23
Şekil 4.4. RBD1-Fc proteininin iyon değişim kromatografisi sonucu saflaştırma profili.....	24
Şekil 4.5. AKTA sistemi kullanılarak iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan RBD1-Fc proteininin Western Blot analizi.....	25
Şekil 4.6. Plate kaplama işlemi	26
Şekil 4.7. RBD1-Fc proteininin 37° C'de stabilitesi	28
Şekil 4.8. RBD1-Fc proteininin +4° C'de stabilitesi.....	29

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Covid-19 tanı testleri	7
Çizelge 3.1. SDS-PAGE veya Western Blot analizi için 10% Poliakrilamid jel hazırlanmasında kullanılan kimyasalların miktarları	11
Çizelge 3.2. AKTA sisteminde CaptoQ iyon değişim kromatografisi program kurulum parametleri	18
Çizelge 4.1. Yapılan 3'lü tekrarların ortalama değerleri. PBS negatif kontrol olarak kullanılmıştır	27
Çizelge 4.2. 450 nm'de yapılan ölçüm sonuçları ile elde edilen ortalama değerlerin grafiksek gösterimi.....	27

1. GİRİŞ

Koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü 2 (SARS-CoV-2)'nin neden olduğu insandan insana geçebilen bulaşıcı bir hastalıktır. İlk vakaya Çin'in Hubei eyaletinin Wuhan şehrinde Aralık 2019 tarihinde karşılaşılmıştır. O zamandan beri yayılmaya devam etmiş ve hala yayılmaya devam eden bir pandemiye neden olmuştur. Bilinen ilk vakanın deniz ürünleri toptancı pazarında çalışan ya da bu pazarda bulunan birinde olduğu belirlenmiştir. Yarasa korona virüs örnekleriyle %96 genom seviyesinde benzerlik göstermektedir bu nedenle hastalığın hayvan kökenli olduğu düşünülmektedir. Viral genomun analizi, yeni koronavirüsün filogenetik olarak 2002 yılında viral bir salgının nedensel ajanı olan ciddi akut solunum sendromu koronavirüs (SARS-CoV)'e yakın olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, yeni koronavirüs “SARSCoV- 2 ” olarak adlandırılmıştır. COVID-19'un semptomları, hafif semptomlardan ağır hastalığa kadar değişkenlik göstermektedir. Yaygın semptomları arasında baş ağrısı, koku ve tat kaybı, burun tıkanıklığı ve burun akıntısı, öksürük, kas ağrısı, boğaz ağrısı, ateş ve nefes alma güçlüğü yer almaktadır.

Koronavirüsler, tek zincirli, zarflı RNA virüsleridir. Koronavirüsler RNA virüsleri içerisinde 27 ila 32 kb uzunluğunda, bilinen en büyük genoma sahiptir. RNA virüslerinin replikasyonunda mutasyon oranlarının DNA virüslerinden çok daha yüksek olduğu düşünülmektedir ve kopyaladıkları baz miktarı arttıkça hata yapma olasılıkları da artar, bu da yeni bir mutasyon gelişmesine neden olmaktadır. Bu mutasyonlar virüse yeni hücre tiplerini, yeni türleri enfekte etme yeteneği kazandırabilmektedir. Koronavirüslerdeki dört yapısal protein olgun virüs partikülü (virion) oluşumunda ve enfeksiyonun ortaya çıkmasında görev almaktadır. Bunlar; S (Spike) proteini, E (Envelope) proteini, M (Membran) proteini ve N (Nucleocapsid) proteinidir (Tatar vd. 2020).

Hastalığa yakalanan bireylerin tedavi aşamasında hidroklorokin, azitromisin, favipiravir, remdesivir, lopinavir/ritonavir gibi ilaçlar kullanılmaktadır. Kullanılan bu ilaçların tamamen etkili olduğu kesin olmamakla birlikte, halen klinik çalışmalar devam etmektedir. Bunun yanı sıra hastalığa yakalanmayı önlemek amacıyla çeşitli aşı çalışmaları yapılmaktadır. Bu aşılardan tümü vücudun bağışıklık sistemine COVID-19'a neden olan virüsü güvenli bir şekilde tanıtmayı ve yok etmeyi öğretecek şekilde tasarlanmıştır. COVID-19 aşılarının geliştirilmesi için, üç değişik yöntem kullanılmaktadır. Bunlar, 1. Cansız aşılardan: koronavirüsü bir hücre içinde üretildikten sonra bir şekilde etkisiz hale getirilmektedir. 2. Altbirim aşılardan: koronavirüsün diken proteini gibi antijenleri nano-parçacıklar içinde sunulmaktadır. 3. Çekirdek asidi aşılardan: Bunlar iki türdür; a) mRNA aşılardan: SARS-CoV-2 virüsünün diken proteinine ait kalıtsal bilgiyi (mRNA) içermektedir. b) Yönelimli (vektör) aşılardan: Bu aşılarda SARS-CoV-2'ye ait belirli bir kalıtsal bilgi (gen, DNA) başka zararsız bir virüse yüklenerek yönlendirilmektedir.

Bugüne kadar, DSÖ tarafından kayıt altına alınmış, ve klinik çalışmalarda denenilen 50'den fazla aşı adayı bulunmaktadır. mRNA aşılardan Modern/NIAID ve BioNTech/Pfzer aşıları yarışı en önde sürdürmektedir ve bir yılda bu yarışı bitirmişlerdir. Yöneyli aşılar AstraZeneca/University of Oxford, Johnson & Johnson ve Sputnik V aşıları; cansız virüs aşılardan Sinovac ve Sinopharm aşıları uygulamaya girmiştir. (Alkan ve Canatan 2021).

Fakat bu aşılar yeni oluşan mutasyonlara karşı aynı etkiyi gösterememektedir. Bu nedenle dünya genelinde SARS-CoV-2 virüslerinin olası mutasyona uğramış tüm varyantlarına karşı kararlı bir vadeli bağışıklığa sahip daha etkili COVID-19 aşılarının acilen ihtiyaç duyulmaktadır.

RBD, SARS-CoV2'nin S1 alt biriminde bulunur ve virüsün ACE2 reseptörüne bağlanarak viral girişine yardımcı olarak önemli rol oynamaktadır. Daha önceden MERS, SARS-CoV ve H5N1 influenza gibi Fc bölge ile kaynaştırılmış aşılar geliştirilmiştir. Yapılan bu aşı çalışmalarında Fc bölge ile birleştirilmiş olan aşılarda Fc bölgesinden yoksun olan aşılardan daha immünojenik olduğu tespit edilmiştir (Sun vd. 2021).

Fc reseptörü(Fc), B lenfositleri, foliküler dendritik hücreler, doğal öldürücü hücreler, makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller, bazofiller, insan trombositleri ve mast hücreleri dahil olmak üzere belirli hücrelerin yüzeyinde bulunan ve koruyucuya katkıda bulunan bir protein türüdür. Fc reseptörleri, enfekte hücrelere veya istilacı patojenlere bağlanan antikorlara bağlanmaktadır. Aynı zamanda fagositik veya sitotoksik hücreleri, mikropları ve enfekte hücreleri çeşitli yöntemlerle yok etmek için uyarmaktadır (Anderson 2003).

Ayrıca *Nicotiana benthamiana* bitkisinde COVID-19'a karşı umut verici aşı adayları olarak reseptör bağlama alanı (RBD) varyantlarını başarıyla üretilmiştir. Bu üretimde kullanılan bitki ekspresyon sistemleri yüksek ekspresyon kapasitesine sahiptirler ve rekombinant proteinlerin güvenli, hızlı ve ucuz bir şekilde üretimini sağlayabilmektedirler (Mamedov vd. 2021).

Bu tez çalışması, yapılan bu araştırmalar ışığında *Nicotiana Benthamiana* bitkisinde RBD-Fc birleştirilmiş formunun üretimini ve karakterizasyonu işlemlerini kapsamaktadır.

2.KAYNAK TARAMASI

2.1. Covid-19 Pandemisi ve Sars-CoV2

Aralık 2019’da Çin’in Wuhan Şehrinde ortaya çıkan pnömoni vakalarından izole edilen ve *Coronaviridae* ailesinden olduğu belirlenen virüs “severe acute respiratory syndrome coronavirus-2; SARS-CoV-2” olarak adlandırılmıştır. Diğer koronavirüsler gibi hayvan kaynaklı olan SARS-CoV-2’nin genetik analizleri, yarasalar koronavirüs popülasyonları ile aynı kökene sahip olduğunu göstermektedir. İnsanlar ve yarasalar arasında genellikle sınırlı bir temas olmasından dolayı, virüsün yarasalar yerine insanlar ile daha fazla temas halinde olan bir hayvan tarafından bulaşmış olacağı düşünülmektedir. Bu düşünceler konağın, evcil bir hayvan veya vahşi bir hayvan olabileceğini düşündürmüştür ancak henüz belirlenmemiştir (Mese vd. 2020).

İnsanları enfekte eden koronavirüslerin tarihçesi 1960 yıllarına dayanmaktadır. Ortaya çıkış hikayesi Tyrell ve Boyne tarafından üst solunum yolu enfeksiyonlu çocuklardan izole edilen ve B184 olarak adlandırılan virüs ile başlamıştır. Aynı dönemlerde Hamre ve Procknow soğuk algınlığı olan Tıp Fakültesi öğrencilerinin örneklerinden izole ettikleri yeni bir virüs tanımlamışlardır. Bu iki virüs örneği 229E olarak adlandırılmıştır. Tyrell’in öncülüğünde devam eden çalışmalar ile 1960 yıllarının sonlarına doğru bu yeni virüs grubunun bilinen myxo/paramyxoviruslar ile ilişkili olmadığı ve mikroskop görünümünün tavuklarda bronşiolit yapan virüsler ile benzerlik gösterdiği keşfedilmiştir. Elektron mikroskobu görüntüleri (Şekil 2.1) “TAÇ BENZERİ” çıkıntılar taşıdığı belirlenen bu virüs grubuna, Latince taç anlamına gelen “CORONA” kelimesinden ilham alınarak “CORONAVIRUS; CoV” adı verilmiştir (Mese vd. 2020).



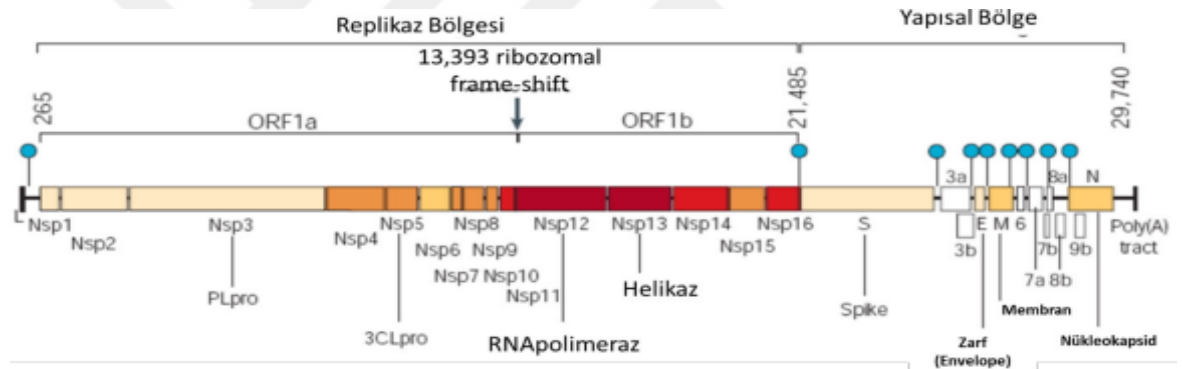
Şekil 2.1. SARS-CoV2 elektron mikroskobu görüntüsü

2.2. Koronavirüsün Genel Yapısı

2.2.1. Moleküler biyolojik özellikleri

Coronaviridae ailesinde sınıflandırılan koronavirüsler, insan ve hayvanlarda solunum ve sindirim yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Koronavirüsler zarflı RNA virusleridir. *Coronaviridae* ailesi *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* ve *Deltacoronavirus* olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır. Sars-CoV-2 virüsü ise *Betacoronavirus* alt grubunda bulunmaktadır (Davies vd. 1979).

Koronavirüslerin büyüklüğü 80-220nm arasında değişmektedir. Üzerinde çıkıntıları olan lipid yapıda geniş bir zarfa sahiplerdir (Şekil 2.2). Yaklaşık 27-32 kb uzunluğunda olan genomu, helikal simetrik bir nükleokapsid ile çevrelenmektedir. Tek sarmal, pozitif anlamlı RNA genomunun 5' ucu başlıklı (cap) ve 3' ucu poliadeniledir. Genomun 5'ucu translasyona uğramamış bölge (UTR) içerir ve yaklaşık 20 kb'lık ORF1a ve 1b bölgesi replikaz ve yapısal olmayan proteinleri (Nsp) kodlamaktadır. Genomun 3' ucu ise yapısal dört proteini (E, M, S, N proteinleri) kodlayabilen açık okuma çerçevesine sahiptir (Davies vd. 1979).



Şekil 2.2. Covid-19 genomunun bölgeleri

2.2.2. Virüsünün Yapısal Proteinleri

2.2.2.1. Nükleokapsid (N) protein

Nükleokapsidi oluşturan ve esas olarak Koronavirüs RNA genomuna bağlanma işlevi gören bir proteindir. Bu protein, viral genomla ilgili süreçlerde yer alırken, viral RNA'nın replikasyonu ve konağın viral enfeksiyona karşı hücresel yanıtında görev almaktadır (Ulasli vd. 2010).

2.2.2.2. Membran (M) proteini

Virüslerin bir araya gelme aşamasında, Membran (M) proteini, hücre zarlarını virüs ve konakçı faktörlerin yeni virüs parçacıkları yapmak için birleştiği bölgede görevlidir. Bu protein, çoğalma bölgesindeki ribonükleoprotein (RNP) ve S

glikoproteinleri ile etkileşime girerek veya bazı konak membran proteinlerini viral zarf haricinde tutabilen bir Transmembran protein (M-M) etkileşimleri sağlayarak tümleşmeyi teşvik eder (Ulasli vd. 2010).

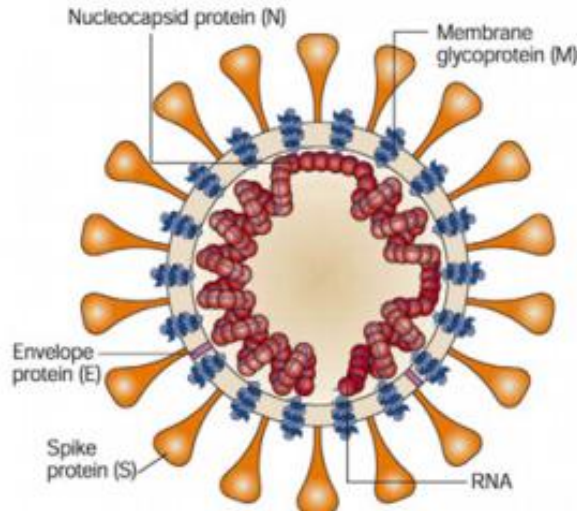
2.2.2.3. Zarf (E) proteini

Zarf (E) proteini, başlıca yapısal proteinlerin en küçük ama aynı zamanda en gizemli olanıdır. Bu protein replikasyon döngüsü sırasında enfekte olmuş hücrenin içinde bol miktarda eksprese edilirken virion zarfına sadece küçük bir kısmı dahil edilmektedir. Zarf proteini Endoplazmik Retikulum ve Golgi’de konumlanabileceği gibi bu iki organel arasında bir bölgede de bulunabilir. E proteini virüsün patogenezinde ve vironlarının salınmasında işlemleri sırasında önemli rol oynamaktadır (Ulasli vd. 2010).

2.2.2.4. Spike (S) proteini

Spike ya da S-glikoproteinindeki değişiklikler, konakçı Koronavirüs ve doku farklılaşmasındaki çeşitlilikten önemli derecede sorumludur. Spike proteini S1 ve S2 alt birimden oluşan tip 1 membran glikoproteindir. S2 alt birimi viral ve hücre zarlarının füzyonuna aracılık eden bir zar ötesi proteindir, S1 alt birimi ise reseptör bağlanma fonksiyonları ile ilişkilidir.

Bu nedenle S glikoprotein duyarlı hücrelere viral bağlanma daha kolay sağlanmaktadır ve bu sayede hücre füzyonu gözlenmekte ve nötralize edici antikolları indüklenmektedir (Ulasli vd. 2010).



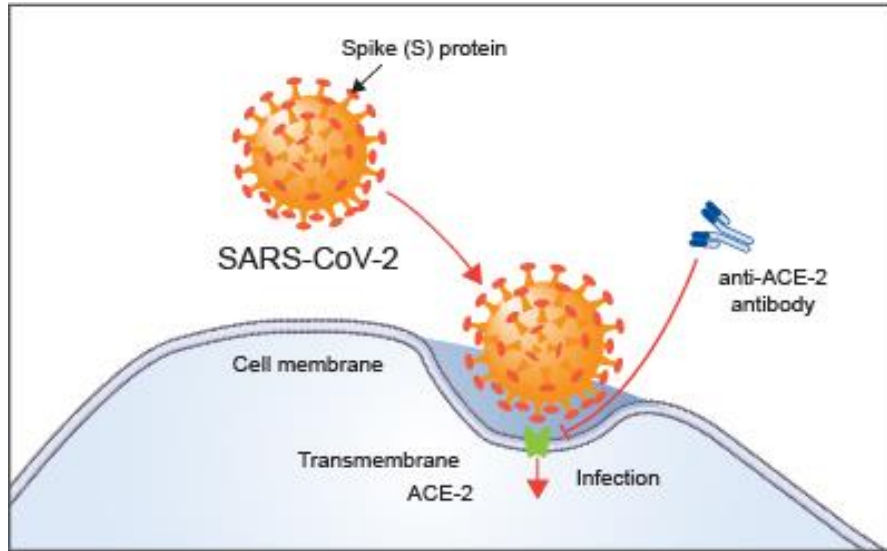
Şekil 2.3. Dört yapısal protein vardır: Spike (S/Başak) yüzey glikoproteini; membran (M) proteini (turuncu); Nükleokapsid (N) protein; ve zarf (E) proteini

2.3. Virüsün Hücre ile Etkileşimi

Damlacık yolu ile enfekte bir bireyin öksürmesi, hapşırması veya konuştuğu sırada, solunum salgılarında bulunan virüs, mukozayla doğrudan temas ederek bir başka bireyi enfekte edebilme yeteneğine sahiptir. Virüsün yapısal proteinlerinden biri olan S (Spike) proteini, virüsün hücre ile etkileşiminde önemli bir rol oynar. Bu protein hedef hücredeki reseptörü tanır ve virüsün hücre içine girmesine aracılık eder. Koronavirüs hastalığından sorumlu SARS-CoV-2 virüsüne aracılık etmekten sorumlu konakçı hücre reseptörünün ACE2 olduğu bilinmektedir (Gralinski vd. 2020).

ACE2, bir tip I transmembran proteindir. Birçok hücre tipinin yüzeyinde bulunur. Hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi için, daha büyük protein Anjiyotensinojen'i keserek küçük proteinler üreten bir enzim olarak görev almaktadır. PCR(Polimeraz zincir reaksiyonu) testi sonuçları neticesinde, ACE-2'nin ayrıca akciğer, böbrek ve gastrointestinal sistemde, SARS-CoV-2'ye sahip olduğu gösterilen dokularda eksprese edildiğini kanıtlamıştır. Yüzeyindeki sivri uçlu proteini (Spike) kullanan SARS-CoV-2 virüsü, hücrelerin girişi ve enfeksiyonu öncesinde ACE2 ile anahtar kilit modeli oluşturmaktadır. Bu nedenle, ACE2, virüs için reseptör aracılı hücreye giriş için bir kapı görevi görmektedir (Hoffmann vd. 2020).

Şekil 2.4'de görüleceği üzere, virüs reseptöre bağlandıktan sonra S proteininin yapısında bir değişim meydana gelmektedir. Meydana gelen bu değişim virüsün hücreye füzyonunu ve kılıfını çıkarmasını daha kolay kılmaktadır. Kılıfından kurtulan virüs, kendi RNA'sını hücre içine serbest bırakır. Virüs RNA'sı hücre içinde serbest kaldıktan sonra genomun aralıksız transkripsiyonun sonucu olarak bir dizi mRNA üretilmektedir. Bu işlem sırasında, viral proteinlerle translasyon gerçekleşmektedir. Son adım olarak oluşan bu viral proteinler ve RNA genomu Endoplazmik Retikulum ve Golgi cisimciği içindeki virionlar içinde birleşerek hücre dışına bütün bir virüs halinde serbest bırakılmaktadır (Xu vd. 2020).



Şekil 2.4. Virüsün Konak hücreye girişi ve salınması

2.4. Hastalığın Tanı ve Tedavisinde Kullanılan Yöntemler

2.4.1. Hastalığın tanısı

Hastalar üzerinde kullanılacak tanı testinin seçimi, bireydeki Covid-19 hastalığının bulunduğu evresine göre farklılıklar göstermektedir. Testin doğru sonuç vermesinde, örnek alma zamanı ve özellikle moleküler testlerde olmak üzere örneğin kalitesi en önemli parametrelerden bir tanesidir.

Çizelge 2.1. Covid-19 tanı testler

Tanı Testi	Numune Tipi	Ölçüt
Virüs Tespiti	Balgam veya Alveoler Lavaj Sıvısı	Sars-CoV-2 mevcut enfeksiyon
İmmün Yanıt Tespiti	Kan	Sars-CoV-2'ye geçmişte maruz kalma

Çizelge 2.1’de de görülen Covid-19 tanı testleri, temelde Nükleik Asit varlığını kontrol eden ve Antikor varlığını (immün yanıt oluşumunu) gözlemleyen testler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Hastalığın tanısında kullanılan testlerin temel prensibi, Sars-CoV-2 virüsünün genetik materyalinin ya da antijenik materyalinin virüse karşı oluşturmuş olduğu antikorların belirlenmesini temel almaktadır.

Virüs kültürü oluşturulabilme imkânı bulunsa bile laboratuvarlar için bulaşıcılık açısından risk taşımakta olması ve özel donanım gerektirdiği için bu seçenek çok fazla uygun değildir. Bu nedenle klinik tanı laboratuvarlarında Sars-CoV-2’ye ait genomun gözlemlendiği moleküler testler ile, antikorların saptandığı serolojik risk açısından daha güvenlidir (Patel vd. 2020).

2.4.1.1. Moleküler testler

Mevcut kullanılmakta olan moleküler testler PCR tabanlı bir yöntem ya da sekanslama ile virüsü tespit eden genomik tekniklerdir. Sars-CoV-2 virüsünün tam genomu, 10 Ocak 2020’de hastalığın görülmesinden kısa bir süre sonra bilim insanları tarafından yayınlanmıştır. Devam eden süreçte ise Covid-19 için tanı protokolü yayınlanmıştır. Pcr (Polimeraz zincir reaksiyon) bazlı bu protokol, DSO (Dünya sağlık örgütü) tarafından kullanım için uygun görülmüştür (DSÖ vd. 2020).

PCR testi ile viral kapsidi saran, E geninin varlığı ve RNA’ya bağlı RNA polimeraz enzim geninin varlığı tespit edilebilmektedir. Ancak viral RNA’yı saptayan testlerin başarısı, toplanan örnekte bulunan viral RNA’nın varlığına bağlı olarak değişmektedir. Test edilen en yaygın örnek türleri, nazofarenks ve/veya orofarenksten alınan sürüntü (swab) örnekleridir. Örnek alma işleminden sonra, viral RNA’yı swablardan çözeltiye aktarmak için bir viral transport medyum kullanılmaktadır. Daha sonra viral RNA, bu çözeltiden ekstrakte edilmekte ve çoğaltması sağlanmaktadır (CDC vd. 2019).

2.4.1.2. Serolojik Testler

Serolojik testler grubuna, en yaygın kullanılan dolaylı yoldan antikorları saptayan testler örnek gösterilebilir. Bu testler hastalığın ilk bulaştığı dönemlerden sonra serumda virüse karşı bağışıklık yanıtı olarak oluşan antikorları belirlemektedir. Diğer solunum yolu hastalıkları için antijen bazlı hızlı tanı testleri ile olan deneyim kıyaslanacak olursa, bu testlerin duyarlılığının çok değişken olması beklenmektedir. Bu durum her hasta grubunda farklılık göstermekle birlikte, Covid-19 hastalarının yarısının veya daha fazlasının gözden kaçırılabilceği anlamına gelmektedir. Ayrıca bu testlerde yanlış pozitif sonuçların ortaya çıkabileceği ve sürecin uzaması durumu da göz önünde bulundurulması gerekmektedir (Li vd. 2020).

Hızlı bir tanı testi olarak bilinen antikor testinin temel prensibi, kan veya plazma numunelerinde SARS-CoV-2'ye karşı gelişen IgG ve IgM antikorlarını nitel olarak tespit edebilmeye dayanmaktadır. Yapılan bir araştırma, IgM-IgG'nin birlikte yapıldığı testlerin, ayrı ayrı IgM veya IgG tespiti yapan testlere kıyasla daha duyarlı bir şekilde sonuç verdiği kanıtlanmıştır (Petherick 2020).

3. MATERYAL VE METOT

3.1.Kullanılan Organizmalar

Bir *E.coli* suşu olan *XL1Blue* ve *DH5α* ile bir *Agrobacterium* suşu olan *EHA* ve *AGL* mevcut olarak bulunan Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Tarlan Mammedov hocamızın laboratuvarından alınmıştır. Ayrıca tüm bu deneysel çalışmalarda Tarlan Mammedov hocamızın laboratuvarında yapılmıştır.

Çalışmalarda kullanılan *Nicotiana benthamiana* bitkisi Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji bölümü iklimlendirme odasında yetiştirildi ve deneylerde 1-1,5 aylık büyütülen bitkiler kullanıldı.

3.2.Kodon Optimizasyonu

RBD-Fc füzyon proteininin gen dizaynı Tarlan Mammedov tarafından yapılip ticari bir vektör ile elimize ulaşmıştır. Daha sonra bu vektörden bitki ekspresyon sisteminde kullanılmak üzere *Agrobacrium tumefaciens* şusuna aktarılmıştır.

3.3.Kullanılan Besiyerleri, Tampon Çözeltiler ve Diğerleri

LB agarlı Besiyeri (50mg/ml Kanamisin)

40 g LB-Broth Agar tartıldı ve 1 litre otoklavlı ddH₂O içinde çözdürüldü ardından solüsyon 121°C, 1 atm basınçta, 30 dakika otoklavlandı. Otoklavlanan LB agar solüsyonu su banyosunda 50°C'ye soğutuldu ve 1 litre LB agar besiyerine 1.5 ml 50 mg/ml stock kanamisin içerisinde 1 ml antibiyotik eklendi. LB agar Besiyeri petrilere 25 ml olacak şekilde döküldü ve +4°C'de saklandı.

Kanamisin antibiyotik stoğu(50mg/ml)

50mg/ml kanamisin stoğu için; 0,5 g kanamisinmonosülfat(cat n:) tartıldı. 10 ml ddH₂O içerisinde çözdürüldü. Solusyon 0.45 µm filtreden enjektör ile geçirildi, 500 µl olacak şekilde eppendorflara ayrıldı ve -20°C ye bozulmadan muhafaza edilmesi için kaldırıldı.

BBL Besiyeri (SYS)

800 ml otoklavlı ddH₂O içerisine 10 g soyahidrolyat, 5 gr maya özütü ve 5 g NaCl eklendi. Tüm karışım manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Oluşan çözelti pH: 7.0 olacak şekilde KOH ile ayarlandı ve son hacim 1 L' ye tamamlanarak; 121°C, 1 atm basınçta, 30 dakika otoklavlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

MMA Ortamı (10 mm MES, 10 mm MgCl₂)

800 ml otoklavlı ddH₂O içerisine 1.952 g MES ve 2.03 g MgCl₂.6H₂O eklendi. Oluşan karışım manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Çözelti Ph: 5.8 olacak şekilde NaOH ile ayarlandı, son hacim 1 L' ye tamamlanarak; 121°C, 1 atm basınçta, 30 dakika otoklavlandı ve +4°C'de muhafaza edildi.

Asetosiringon

Asetosiringon 100 mM stok olarak hazırlandı. 0,3924 g asetosiringon, 12 ml % 95 etanol ve 8 ml otoklavlı ddH₂O içinde çözdürüldü. Stok, 0.45 µm filtreden geçirildi ve 100 µl olacak şekilde -20°C'de muhafazası sağlandı.

90 % Gliserol

90 birim 100 % gliserol ve 10 birim otoklavlı ddH₂O karıştırıldı. Solüsyon 121°C, 1 atm basınçta, 30 dakika otoklavlanarak kullanıma hazır hale geldi.

1X Fosfat Tamponlu Salin (PBS)

1 adet PBS tablet 200 ml otoklavlı ddH₂O içerisinde çözdürüldü ve +4°C'de muhafaza edildi.

DIECA (sodyum dietilditiokarbamat)

1 M (dieca mw:225,31g/mol) olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan DIECA, infiltre edilen yaprakların ekspresyon kontrolünde 2 mm, purifikasyon için kullanılacak olan biyokütle için ise 1 mm konsatrasyonda kullanılmıştır.

5X Laemmlı Tampon (5X SDS)

Laemmlı buffer, içerisinde bulunan merkaptotanol sayesinde proteinlerin denatüre olmasını sağlar. 7.5 ml β-merkaptotanol içerisine 3.333 g SDS, 9.375 ml 1M Tris, 11.9 ml gliserol, 660 µl Bromofenol mavisi (% 0.01) eklendi. Çözelti pH: 6.8 olacak şekilde HCl ile ayarlandı. Dört birim protein örneği ve bir birim 5X Laemmlı Tampon ile karıştırılarak son konsatrasyon 1X olacak şekilde kullanıldı.

% 40 Akrilamid / Bis-akrilamid Çözeltisi

194.8 g akrilamid 150 ml otoklavlı ddH₂O içinde çözdürüldü. Ardından 5.2 g bis-akrilamid üzerine eklendi ve çözelti bir gece manyetik karıştırıcıda bırakılarak tamamen çözünmesi sağlandı. Bu çözünme işleminin ardından hacim ddH₂O ile 500 ml olacak şekilde tamamlandı. Akrilamid / bis-akrilamid solüsyonu ışık geçirmeyen bir şekilde +4°C'de muhafaza edildi.

1,5 M Tris-HCl Çözeltisi

185 g Tris, 800 ml otoklavlanmış ddH₂O içinde çözdürüldü. HCl ile pH: 8.8'e ayarlanarak son hacim 1 L'ye tamamlandı.

0.5 M Tris-HCl Çözeltisi

800 ml otoklavlanmış ddH₂O içinde 60 g Tris çözdürüldü. HCl ile pH: 6.8'e ayarlanarak son hacim 1 L'ye tamamlandı.

10 % SDS Tamponu

90 ml otoklavlı ddH₂O içerisine 10gr SDS eklendi ve manyetik karıştırıcıda çözünmeye bırakıldı. Oda sıcaklığında muhafazası sağlandı.

Sülfat / % 10 Amonyum (APS)

100 µg APS, 900 µl otoklavlı ddH₂O içerisinde çözdürüldü.

5X TBS ve 1X TBS

12.115 g Tris ve 43.88 g NaCl, 800 ml otoklavlanmış ddH₂O içinde çözdürüldü. pH, HCl ile 7.5'e ayarlandı. Otoklavlı ddH₂O ile hacim 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan bu çözelti 5X TBS'tir.

1 hacim 5X TBS ve 4 hacim otoklavlı ddH₂O ile karıştırılarak 5X TBS'ten 1X TBS hazırlanır. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Çizelge 3.1. SDS-PAGE veya WesterBlot analizi için 10% Poliakrilamid jel hazırlanmasında kullanılan kimyasalların miktarları

Malzemeler	ALT JEL	ÜST JEL
Otoklavlı ddH ₂ O	2.425 ml	1.98 ml
40 % Akrilamid-Bisakrilamid Çözeltisi	1.25 ml	0.312 ml
1,5 M Tris-HCl	1.25 ml	-
0,5 M Tris-HCl	-	0.787 ml
10 % SDS	50 µl	31.25 µl
TEMED	2.5 µl	3.125 µl
10 %APS	25 µl	15.62 µl

Yürütme Tamponu(Running Buffer)

800 ml otoklavlı ddH₂O içerisine 3.03 g Tris ve 14.3 g Glisin eklenerek manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Çözdürme işlemi sırasında çözeltiye 10 ml 10% SDS solusyonu eklendi ve son hacim 1 L' ye tamamlanarak hazır hale getirildi. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Transfer Tamponu(Transfer Buffer)

800 ml otoklavlı ddH₂O içerisine 5.8 g Tris ve 2.93 g Glisin eklenerek manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. Çözdürme işlemi sırasında çözeltiye 370 µl 10% SDS solusyonu eklendi ve son hacim 1 L' ye tamamlandı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Blotlama Çözeltisi (I-blok)

1 g blotting grade powder, 100 ml 1X TBS içinde çözüldü. +4°C'de muhafaza edildi.

Jel boyama solüsyonu (Coomassie Blue)

100 ml glacial asetik asit, 500 ml metanol ve 400 ml ddH₂O bir şişeye eklenerek karıştırıcıya konuldu. Bu sırada karışıma 1 gr Coomassie mavisi eklendi ve homojen olarak renk alana kadar karıştırılmaya devam edildi. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

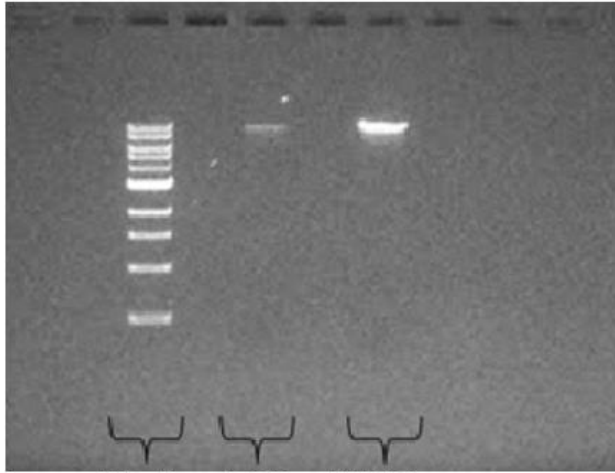
Destaining Solusyonu

200 metanol, 100 ml asetik asit ve 700 ml ddH₂O şişeye eklenerek mayatik

karıştırıcıda karıştırıldı. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.4. RBD-Fc Füzyonunun Bitki Ekspresyon Sisteminde Kullanılan *A. Tumefaciens*'e Aktarımı

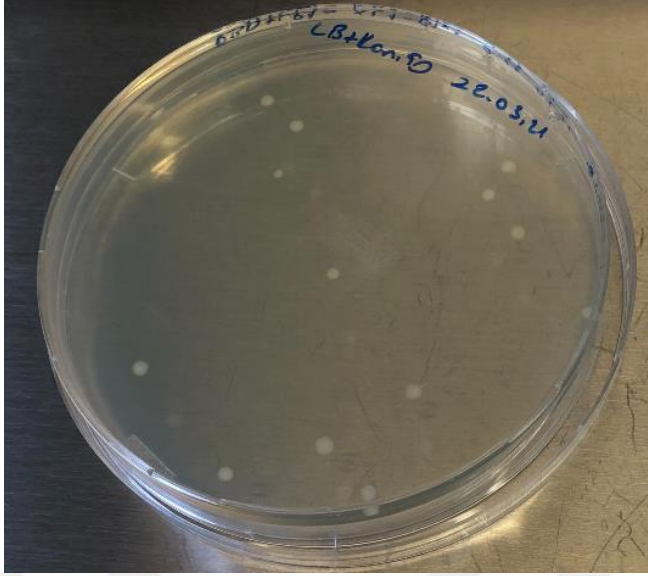
Öncelikle kodon optimizasyonu yapılarak bir vektör plazmit içerisinde laboratuvarımıza gelen RBD-Fc füzyonu, XhoI ve AgeI restriksiyon enzimleri ile kesilerek agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bu işlem sonrası genin, jelden geri kazanım yöntemi ile vektörden ayrılması sağlandı. Daha sonra RBD-Fc füzyonu *E.coli*'nin DH5 α ve XL1-Blue suşlarına aktarıldı ve bu işlemin ardından tekrar agaroz jel elektroforezi yapılarak kontrol sağlandı (Şekil 3.1). Petriye kanamisin antibiyotik direnci içeren petriye ekim yapıldı ve 37°C'de 1 gece büyümeye bırakıldı. Büyüyen kolonilerden tek koloni seçilerek sıvı besiyerine ekim yapıldı ve 37°C'de 1 gece çalkamalı inkübatörde büyümeye bırakıldı.



Marker DH5 α XL1Blue

Şekil 3.1. *E.coli* suşlarında bulunan RBD-Fc'nin agaroz jel elektroforezi görüntüsü

Bu işlemlerin ardından *E.Coli*'de bulunan RBD-Fc füzyonumuz elektroporasyon yöntemi ile *A. tumefaciens*'in EHA ve AGL suşlarına aktarıldı. Bu işlemin hemen ardından kanamisin antibiyotiği içeren petriye çizim yapılarak 3 gün 28°C'de inkübatörde büyümeye bırakıldı (Şekil 3.2). Daha sonra tek koloni seçimi yapılarak BBL sıvı besiyerine aktarıldı ve 1 gece 28°C inkübatörde çalkalamaya bırakıldı.



Şekil 3.2. İnkübasyon sonrası petride oluşan koloniler

3.5. *Nicotiana benthamiana* Bitkisine *A. Tumefaciens* Aracılığı ile RBD-Fc Füzyon Proteininin İnfiltrasyonu

Laboratuvarımızda daha önceden elektroporasyon ile *A. Tumefaciens*'e aktarmış olduğumuz RBD-Fc füzyon proteini 1 gecelik 28 °C çalkamalı inkübasyonun ardından büyümesinin kontrolü için spektrofotometre ile absorbans ölçümü yapıldı. Yapılan ölçüm sonucu yeterli ise BBL ortamında yeterince gelişen *Agrobacterium* kültürleri öncelikle 5000 g'de 5 dakika santrifüj ile çöktürüldü ve pelletleri indüksiyon için 2 saat Asetosiringon (150 uM) içeren MMA tamponun (10 mM MES, 10 mM MgCl₂) da yeniden oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. 2 saatlik sürenin ardından bitkilere infiltrasyon yöntemi ile RBD-Fc füzyonunu içeren bu karışım enjekte edilmiştir (Mamedov vd. 2021).



Şekil 3.3. *Nicotiana benthamiana* bitkisine uygulanan agroinfiltrasyon işlemi

3.6. Western Blot ile Ekspresyon Analizi

İnfiltrasyonu yapılan biyomastan 5 gün sonratüm yapraklardan homojen bir örnek alındı ve kalan yaprak kütlesi kullanılabilecek kadar -80°C'de muhafaza edildi. Yaprak numunesi, 3 katı hacimde ekstraksiyon tamponu (1X PBS, 2 mM DIECA) eklendi ve havanda ezilerek homojen hale getirildi. Daha sonra ependorf tüplere aktarılıp 20.000xg, 5dk, +4°C'de santrifüj edildi. Supernatant, pelletten ayrıldı ve 4 hacim supernatant ve 1 hacim Laemmli Tamponu karıştırıldı. Hazırlanan bu örnek su banyosunda 100°C'de 5dk kaynatıldı ve 10% poliakrilamid jelde, 100 Volt 15 dakika – 200 Volt 45 dakika yürütüldü. Daha sonra proteinler, transfer tamponu ile poliviniliden florür membran üzerine sandviç metodu ile 100 Volt da 1 saat transfer edildi. Membran, 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda 1% I-blok ile muamele edildi. 10µl primer antikor (anti-6XHis monoklonal antikor Cat. no. 652502) 10ml 1% I-blok hazırlanarak üzerine eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. 1 saat sonra I-blok ile 3 kere 5'er dakika yıkama yapıldı. Yıkamalardan sonra temizlenen membran sekonder antikor ile (Anti-Mouse IgG 3 µl + 10 ml I-blok) 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bırakıldı. 1 saatin sonunda 3 kere 5'er dakika I-blok ve 1 kere 5 dk'lık 1X TBS ile yıkandı. Membran son olarak SuperSignal West Pico Stable Peroxide (2,5 ml) ve Luminol/ Enhancer (2,5 ml) solüsyonları (SuperSignal West Pico, Thermo Fisher Scientific Grand Island, NY) ile 5 dakika karanlıkta inkübe edildi. Son olarak membranın, GeneGnome XRQ Chemiluminescence görüntüleme sistemi (Syngene Corp, ABD) kullanılarak görüntüleme işlemi yapıldı.

3.7. SDS-page ile Rekombinant Protein Miktar Analizi

Pürifiye etmiş olduğumuz proteinlerin miktar tayini için SDS-page Elektroforezi kullanılmaktadır. Daha önceden western blot için hazırladığımız örnekler tekrardan SDS-page için kullanıldı. %10 jel hazırlanarak yükleme yapıldı. 100 Volt 15 dakika – 200 Volt 45 dakika yürütüldü. Elektroforeden sonra jel, boyanmak için önce ddH₂O bulunan bir kaba alındı ve ardından oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcıda staining solüsyonu ile boyanmaya bırakıldı. Daha sonra ise jelin bant olmayan kısımlarının boyadan arınması için destaining solüsyonu ile yıkaması yapıldı. Bu işlem ile jelin gereksiz bölgeleri boyadan arındırılmış oldu ve bantların belirgin bir şekilde görünmesi sağlanmış oldu.

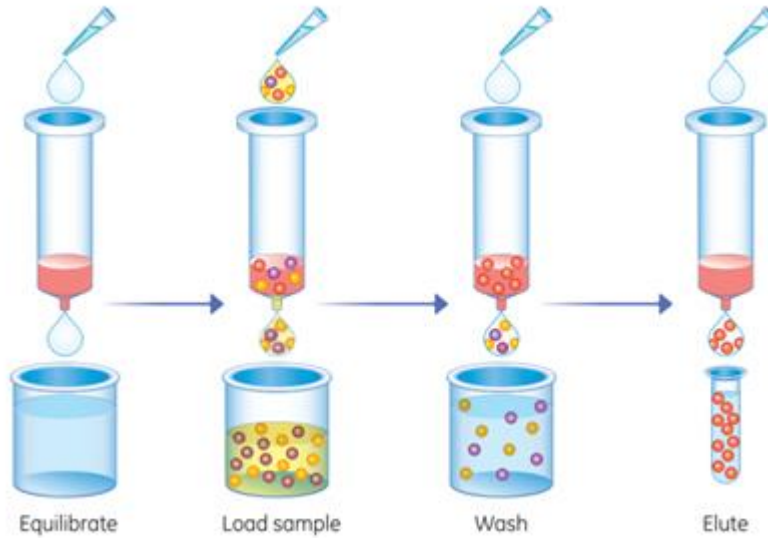
Fotosentezde görevli bir enzim olan Rubisco(Ribuloz 1,5 Bifosfat) molekülü bitkide çok fazla miktarda bulunmaktadır ve pürifikasyon işlemlerinde her zaman az veya çok miktarda Rubisco bulunabilir. RBD-Fc yaklaşık olarak 55-56 kDa ağırlığındadır. Rubisco ise 55 kDa ağırlığında olup iki proteinde yaklaşık olarak aynı ağırlıktadır. Bu nedenlerden dolayı jelde tam olarak ayırt edilememiş ve değerlendirme işlemleri spesifik olarak bizim istediğimiz proteinin (RBD-Fc) tayinini sağlayan western blot analizine göre yapılmıştır.

3.8. Ni-NTA Afinite Kromatografisi (IMAC)

Bitki tarafından üretilen rekombinant proteinler, HisPur™ Ni-NTA reçinesi (Kat. No. 88221, Thermo Fisher) kullanılarak immobilize metal iyon afinite kromatografisi (IMAC) ile saflaştırılmaya tabi tutulmuştur.

Bağlama tamponu, 20 mM sodyum fosfat, 300 mM sodyum klorür, 10 mM imidazol, pH 7.4 olacak şekilde hazırlanmıştır. Ekstraksiyon tamponu için, bağlama tamponuna 1 mM DIECA ilave edilmiştir. Yıkama tamponu, 20 mM sodyum fosfat, 300 mM sodyum klorür, 25 mM imidazol olarak hazırlanmıştır; pH 7.4. Elüsyon tamponu, 20 mM sodyum fosfat, 300 mM sodyum klorür, 250 mM imidazol içerir; pH 7.4. Saflaştırma için, RBD-Fc varyantını içeren yirmişer gram donmuş bitki yaprağı, 3 kat hacimde bitki ağırlığına sahip özütleme tamponunda öğütülmüştür ve ekstrakt, 20 dakika süreyle 4 ° C'de 13.000 g'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant, 10 kolon hacmi bağlama tamponu ile dengelenmiş 1 ml HisPur™ Ni-NTA reçinesi ile tek kullanımlık bir polipropilen kolon (Pierce) üzerine yüklendi ve sütun, baseline'a ulaşana kadar 10-15 kolon hacmi (CV) yıkama tamponu ile yıkanmıştır.

Proteinler 10 CV elüsyon tamponu ile elüsyonu sağlanmıştır. Elüsyon fraksiyonları 0,5 ml olacak şekilde 10 farklı eppendorf olarak toplanmış ve yıkanan fraksiyonlardaki protein konsantrasyonları Biodrop ile ölçülmüştür. Konsantrasyona göre, birleştirilmiş fraksiyonlar konsantre edilmiş ve 10K MWCO Millipore yoğunlaştırıcı ile PBS'ye karşı tampon değiştirilmiştir (Kat No: UFC801096, Merck). Konsantre edilmiş olan protein, kullanılabilece kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.4. Polihistidin etiketli proteinleri saflaştırmak için kullanılan metot (Sigmaaldrich)

Sodyum Fosfat Tamponu (20 mm, pH 7.4)

1M için: 28.38 g Na_2HPO_4 (Sodyum dibasic) 100 ml otoklavlı ddH₂O içerisinde çözdürüldü.

1M için: 13.8 g NaH_2PO_4 (Sodyum monobasic) 100 ml otoklavlı ddH₂O içerisinde çözdürüldü.

15.48 ml 1M Na_2HPO_4 , 4.52 ml 1M NaH_2PO_4 ve 17.59 g NaCl 800 ml otoklavlı ddH₂O içerisinde çözdürüldü ve NaOH ile pH 7.4' e ayarlanarak kullanıma hazır hale geldi. Oda sıcaklığında muhafaza edildi.

100 mm Stok İmidazol

0.34 g İmidazol hassas terazide tartıldı. 50 ml 20 mm sodyum fosfat tamponunda çözdürüldü ve +4°C'de muhafaza edildi.

10 mm İmidazol, Bağlama tampon

10 kolon hacmi olacak şekilde hazırlandı. 1 ml 100 mm imidazol ve 9 ml 20 mm sodyum fosfat tamponu karıştırıldı(1 ml Ni-NTA rezin için 10 ml bağlama tampon gereklidir). +4°C'de muhafaza edildi.

10 mm İmidazol, Ekstraksiyon Tamponu

Ekstraksiyon tamponu, ekstrakte edilecek olan bitki yaprağının 3 katı hacminde (örneğin 10 gr yaprak örneği için 30 ml ekstraksiyon tamponu) hazırlandı. 6 ml 100 mm imidazol ve 54 ml 20 mm sodyum fosfat tamponu bir falkon tüpe eklenip, tampon içerisine 1 mm olacak şekilde taze hazırlanmış 1M DIECA ilave edilerek vortex yardımı ile iyice karışması sağlandı . +4°C'de muhafaza edildi.

25 mm İmidazol, Yıkama Tamponu

12.5 ml 100 mM imidazol stok çözeltisi, 37.5 ml 20 mm Sodyum fosfat tamponu karıştırıldı. Kullanılana kadar +4°C'de muhafaza edildi. Kolon yıkanırken flow through biodrop(model vs) da ölçüm yapıldı. Konsantrasyon 0.01 olana kadar yıkama işlemine devam edildi.

250 mm İmidazol, Elüsyon Tamponu

0,851 g imidazol hassas terazide tartıldı ve 50 ml 20 mm sodyum fosfat tamponunda çözdürüldü. Kullanılana kadar +4°C'de muhafaza edildi. Elüsyonlar 10 kolon hacmi kadar toplandı.

3.9. Hitrap Capto Q Purifikasyon Methodu

Daha önce de bahsetmiş olduğum Rubisco sorunu nedeniyle proteinimiz tam olarak saf elde edilememiştir. Bu sorun sebebiyle sonraki aşamalarda yapılacak olan testlerin doğruluğu daha az olacaktır. Bu yüzden proteini daha saf hale getirmek amacı ile AKTA Start (Şekil 3.5) cihazından HiTrap Capto Q kolonunu (Şekil 3.6) kullanarak iyon değişirme kromatografisi yapılmıştır.



Şekil 3.5. AKTA Start cihazı

RBD1-Fc proteini 20 mM Tris-HCl (pH:8.0) içinde gece boyu diyaliz edilerek tampon değişimi yapıldı. HiTrap CaptoQ FF 1 mL kolon (Şekil 3.6), Çizelge 3.2’de belirtildiği koşullarda kurulan program doğrultusunda, 20 mM Tris-HCl ile dengelendi. Tamponunu değiştirmiş olduğumuz protein örneği kolona verilmeye başlandı. Daha sonra kolon 8 CV dengeleme tamponu ile yıkandı. Protein 8 CV elüsyon tamponu (20 mM Tris-HCl, 1M NaCl, pH:8.0) ile ayrıştırıldı. Oluşan grafik eğrilerine göre farklı fraksiyonlar toplandı ve bu toplanan fraksiyonlar Western Blot ile analiz edildikten sonra birleştirildi. PBS'ye karşı tampon değişimi yapılarak konsantre edildi. Protein Western Blot ile analiz edildi.



Şekil 3.6. İyon değişim kromatografisinde kullandığımız HiTrap CaptoQ kolonu

Çizelge 3.2. AKTA sisteminde CaptoQ iyon değişim kromatografisi program kurulum parametreleri

Kolon hacmi (CV)	1 ml
Akış hızı	1.0 ml/min
Basınç limiti	0.3 MPa
Örnek hacmi	3 ml
Dengeleme tampon hacmi	10 CV
Yıkama tampon hacmi	10 CV
Elüsyon	İsokratik
Elüsyon hacmi	15 CV
Fraksiyon hacmi	0.5 ml

3.10. Stabilite Testi

Stabilite testi, proteinlerin farklı sıcaklıklardaki fiziksel ve kimyasal özelliklerinin zamana göre değişimlerini belirlemeyi temel alır. Saf olarak elde edilen RBD-Fc proteini hacmi her tüpte 100 ng olacak şekilde ependorflara koyuldu. Haftanın her günü için 1 örnek olmak üzere toplam 7 örnek 37°C inkübatöre kaldırıldı. Her gün bir örnek alınarak -80°C'ye kaldırıldı. Aynı şekilde her 3 günde bir toplanmak üzere 5 ayrı tüp de +4°C'ye kaldırıldı. Her 3 günde bir tüp -80°C'ye kaldırılarak muhafaza edildi. Bu sayede 15 günlük +4°C stabilitesi yapılmış oldu.

Toplanan bu tüplerde bulunan proteinlerin western blot analizi ile miktarlarına bakılarak aktivitelerindeki değişimler yorumlandı.

3.11. RBD-Fc Proteininin ACE2'ye Bağlanma Afinitesinin Elisa Testi ile Kontrolü

ELISA, enzime bağlı immünosorbent testi olarak da bilinir ve antikor tabanlı bir doğrulama prosedürüdür. Sıvı bir numunedeki bir antijeni tespit etmek ve miktarını ölçmekte kullanılır. Temel prensibi enzim aktivitesine bağlı renk değişikliğine dayanır. Bu deney, bitkide üretmiş olduğumuz saf halde bulunan RBD-Fc proteinin ACE2 reseptörüne bağlanma afinitesini değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

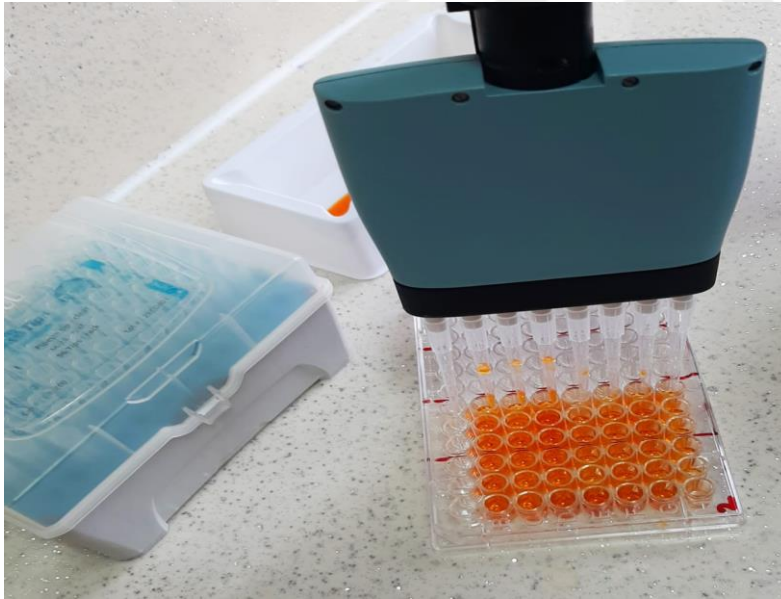
RBD-Fc proteini, bikarbonat / karbonat kaplama tamponu kullanarak uygun konsantrasyonlarda seyreltildi. Bir PVC mikrotitre plakasının (Şekil 3.7) kuyuları,

plakanın üst oyuklarına 100µl antijen seyreltmesi pipetleyerek antijenle kaplandı. Pozitif kontrol olarak daha önceden ACE2'ye bağlanabilen bir protein kullanıldı. Plaka parafilmle kaplanarak gece boyunca 4°C'de inkübeye bırakıldı.

İnkübasyondan sonra plakalar, oda sıcaklığında 2 saat süreyle blokaj tamponu ile bloke edildi. Bloke edildikten sonra, çeşitli konsantrasyonlarda ticari ve bitkide üretilen gACE2 ve dACE2 eklendi ve 3 saat 37 ° C'de inkübe edildi.

2 saat sonra, her bir oyuğa anti-His tag mAb (Cat. no. 6525 05, BioLegend, CA,United States) veya insan anti-ACE monoklonal antikor (Cat. no.375801, BioLegend, CA, United States) ilave edildi. Plaka, bloke edici çözelti (200 ul / kuyu) ile üç kez yıkandı. Yıkandıktan sonra kuyucuklar, anti-fare (Cat. no. 405306, BioLegend, CA,United States) veya anti-sıçan + anti-insan IgG antikor (Anti sıçan kat. no. MBS440123, Anti-insan kat. no. MBS440121, MyBioSource, San Diego, CA, United States) ile inkübe edildi. Plaka üç kez 1X PBS-T yıkama solüsyonu (5 dakika boyunca 200 ul / kuyu) ile yıkandı. Her kuyuya 200 ul Substrat Solüsyonu (Sigma) eklenmiştir.

Daha sonra plaka, oda sıcaklığında 30 dakika süreyle karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresinden sonra plaka, çok oyuklu bir plaka okuyucuda 450 nm'de okundu.



Şekil 3.7. Analizde kullanılan PVC mikrotitre plakası

Kaplama Tamponu (15 mm NaCO₃, 35 mm NaHCO₃)

0.15 g NaCO₃(Sodyum karbonat) ve 0.29 g NaHCO₃(Sodyum bikarbonat) 100 ml otoklavlı ddH₂O içerisinde manyetik karıştırıcıda çözdürüldü.

Yıkama Tamponu (PBS-T)

200 ml 1X PBS içerisine 0.1% Tween-20 eklenerek hazırlandı.

Bloklama Solüsyonu

200 ml 1X PBS içerisine 0.1% Tween-20, 1% blotting grade powder eklenerek manyetik karıştırıcıda çözdürüldü.

Primer Antikor

10 ml 1X PBS içerisine konsatrasyonu 1µl/µg olacak şekilde primer antikor (anti-6XHis monoklonal antikor Cat. no. 652502) primer eklendi .

Sekonder Antikor

Sekonder antikor 10 ml bloklama solüsyonuna 3µl Sekonder antikor (Anti-Mouse IgG) eklendi .

Fosfat-Sitrat Tamponu

0.2 M dibasic sodyumfosfat tamponu için 2.83 g Na_2HPO_4 100 ml otoklavlı ddH₂O da çözdürüldü. 0.1 M sitrik asit için 2.10 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 100 ml otoklavlı ddH₂O içerisinde çözdürüldü. 25.7 ml Na_2HPO_4 ve 24.3 ml $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ karıştırılarak ph 5.0'a ayarlandı.

OPD Substrat Solüsyonu(o-fenilendiamin dihidroklorür)

20 mg sodyum perborat tableti (Katalog Numarası P4922) 50 ml fosfat-sitrat tamponunda çözdürüldü. Kullanım öncesinde 0.05 M olacak şekilde 30% hidrojenperoksit eklendi.

3.12. Verilerin İstatistiksel Analizi

Çalışmalarda yapılan tüm deney ve analizlerin sonuçları bilgisayar ve laboratuvar ekipmanları ile düzenlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar Bulgular ve Tartışma bölümünde gösterilmiştir. Yapılan benzer çalışmalara bakılarak gerekli yorumlamalar yapılmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 *A. Tumefaciens* Aracılığı ile Bitkiye Gönderilen Rbd-Fc Proteininin En İyi Ekspre Olduğu Suş ve Günün Belirlenmesi

Elektroporasyon sonrası petride büyütmüş olduğumuz *A. Tumefaciens* varyantlarından tek koloni seçimi ve çoklu koloni seçmi yapıldı. Sıvı besiyesi olan BBL'e ekilerek 28°C 1 gece çalkalayıcıda büyümeye bırakıldı. Ertesi gün 12 farklı örneğin MMA ortamına aktarılarak *N. Benthamiana* bitkisine infiltrasyon işlemi yapıldı. 4, 5 ve 6. Günlerde yaprak toplanarak ekspresyon seviyelerini kontrol etmek için western blot analizi yapıldı (Şekil 4.1).



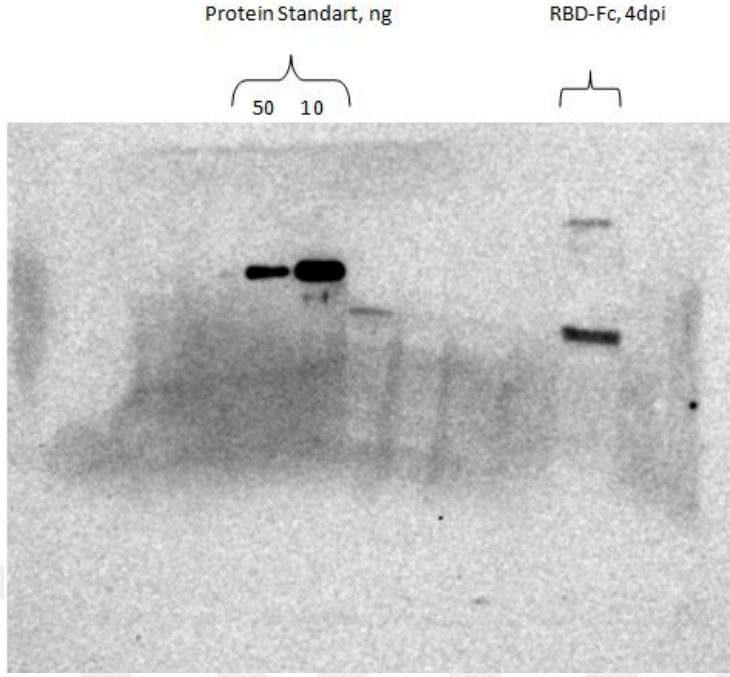
Şekil 4.1. RBD1-Fc füzyon proteinin Western Blot analizi ile ekspresyon tayini

Membran anti-His etiket antikoru ile etiketlendi. Bitkisel üretilen dPA83 proteinini kontrol olarak kullanıldı ve 50,100 ng olarak yüklendi.

Yapılan western blot sonucuna bakılarak en fazla ekspresyon sağlayan bant (EHA suşu N2 kolonisi, 4. Gün) ile biyokütle eldesi için çalışmalara devam edildi.

4.2 RBD-Fc Biyokütle Üretimi ve Analizi

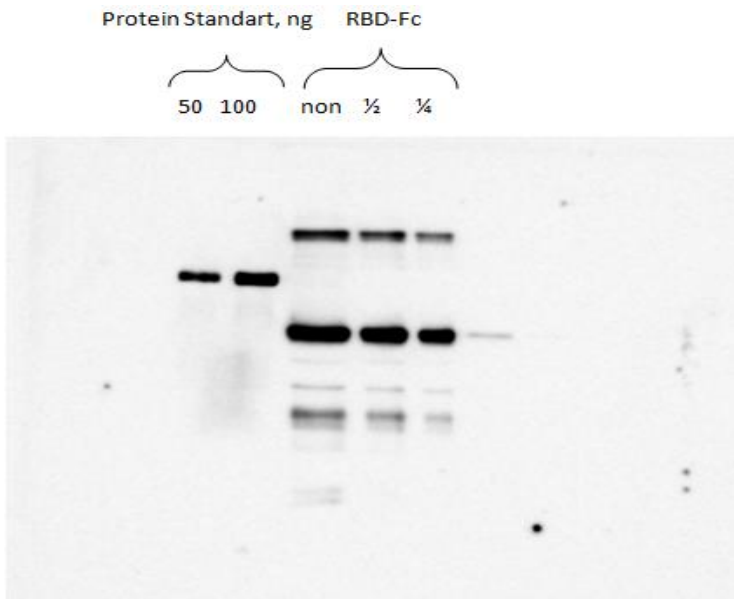
Daha önceden yapılmış olunan western blot analizi sonucunda ekspresyonun en fazla olduğu koloni ile en fazla ekspresyon sağlanan gün baz alınarak 30 g biyokütle üretimi yapıldı. Üretilen biyokütlenin western blot analizi yapıldı ve protein varlığı tespit edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. N. Benthamiana bitkisinde ürteilen RBD-Fc protein biyokütlesinin western blot analizi

4.3. Elde Edilen RBD-Fc Biyokütlesinin Pürifiye Edilmesi

Materyal ve metot kısmında bahsetmiş olduğumuz Ni-NTA afinite kromatografisi yöntemi kullanılarak 30 g yaprak püriye edilmiş ve yapılan pürifikasyon sonucu elde edilen 1.6 ml RBD-FC proteininin konsatrasyonu biodrop cihazı ile ölçülmüştür. Bu işlemten sonra proteinin spesifik olarak miktarını belirlemek için western blot analizi yapılmıştır (Şekil 4.3).

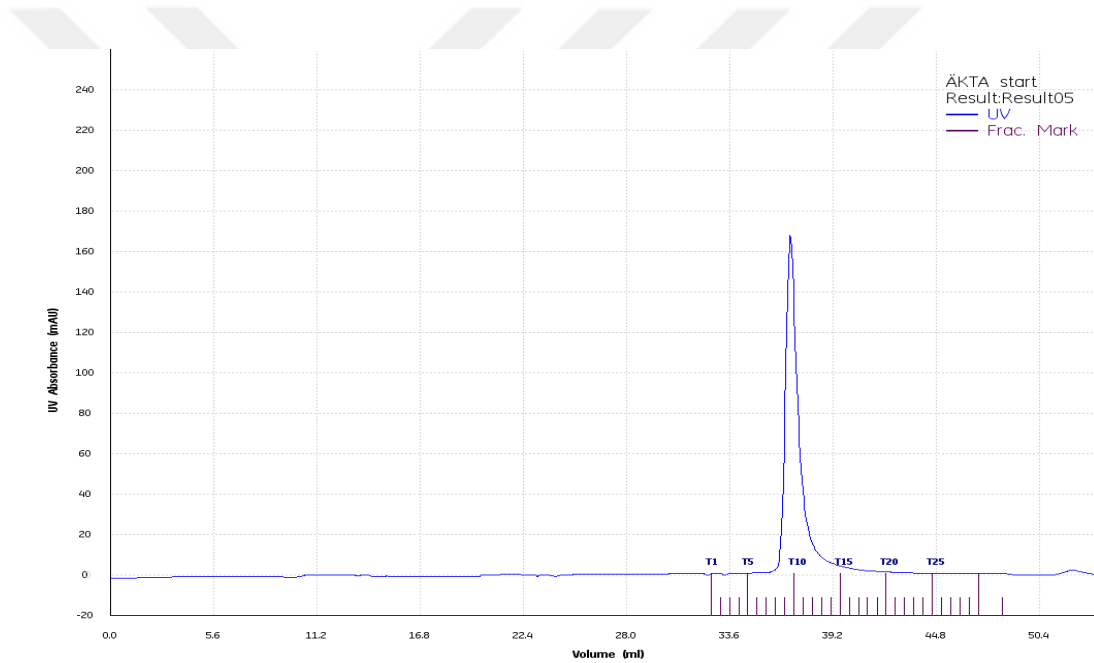


Şekil 4.3. Pürifiye edilmiş RBD-Fc proteininin western blot analizi

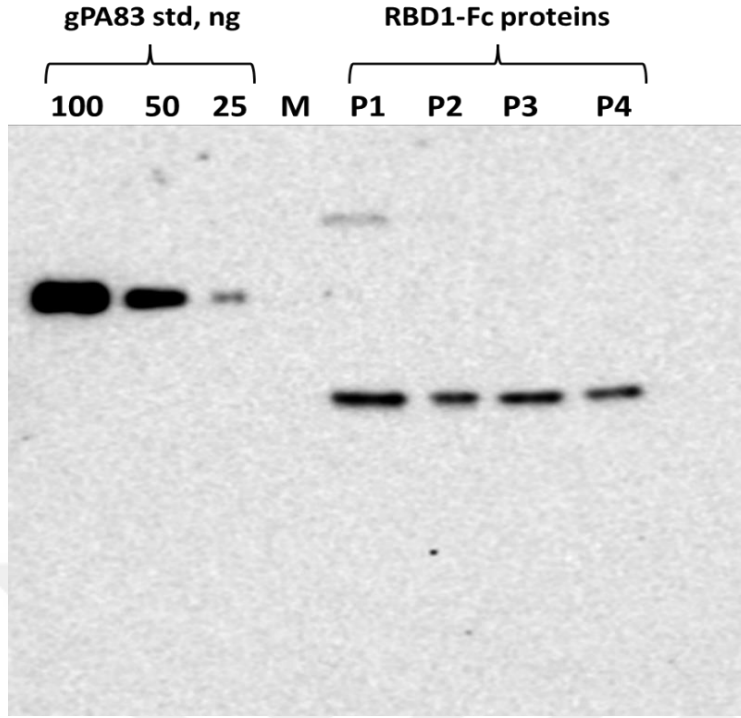
Yapılan bu western blot analizi ve biodrop ile ölçülen sonuçlar farklılık göstermektedir. Bunun en büyük nedeni ise proteinimiz ile birlikte kolona bağlanan Rubisco proteininden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu sebeple Rubiscodan kurtulmak amacı ile materyal metod kısmında bahsedilen Hitrap capto Q purifikasyon methodu uygulanmıştır.

4.4. Hitrap Capto Q Purifikasyon Methodu ile Saflaştırma Yapılması

Bir önceki kısımda da bahsedildiği gibi bu işlem daha saf bir protein elde edilmesi için yapılmıştır. Bu yöntem materyal metod kısmında anlatıldığı gibi yapılmıştır. İşlem sırasında oluşan grafiğe (Şekil 4.4) göre farklı fragmentler toplanarak western blot analizi yapılmıştır.



Şekil 4.4. RBD1-Fc proteininin iyon değişim kromatografisi sonucu saflaştırma profili

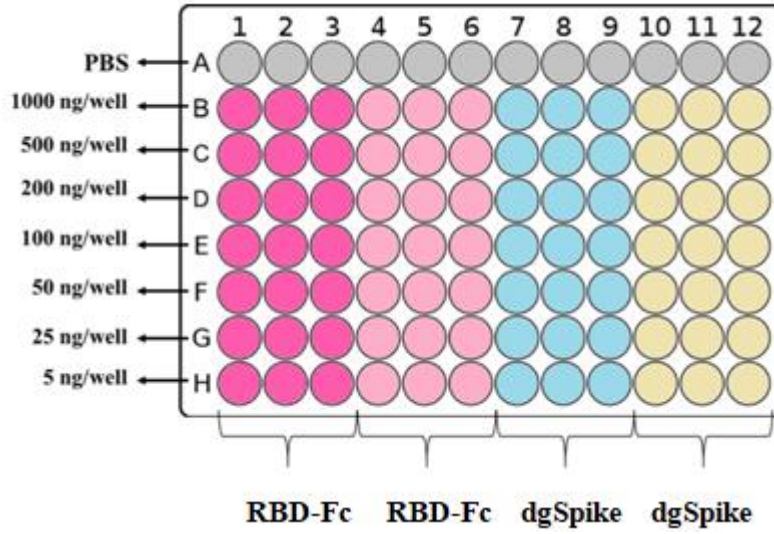


Şekil 4.5. AKTA sistemi kullanılarak iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan RBD1-Fc proteininin Western Blot analizi. Bitki de üretilen gPA83 proteini standard protein olarak kullanılmıştır. P1: Capto Q sonrası RBD1-Fc protein; P2: diyaliz sonrası RBD1-Fc proteini; P3: diyaliz öncesi RBD1-Fc proteini; P4: IMAC purifikasyonu ile saflaştırılmış RBD1-Fc proteini, M: boyanmış protein standardı

Yapılan bu kromatografi sonrası Rubiscodan uzaklaştırılmış daha saf bir protein elde edildiği varsayılmaktadır.

4.5. Elisa Testi ile RBD-Fc Proteininin ACE2'ye Bağlanma Afinitesinin Değerlendirilmesi

N. Benthamiana bitkisinde üretilmesini amaçladığımız ve başardığımız RBD-Fc proteini üretmemizdeki temel amaç olan ACE2 bağlanma afinitesinin değerlendirilmesi için materyal metot kısmında bahsi geçen Elisa testi kullanılmıştır ve görsel sonuçlar aşağıda görülmektedir.



Şekil 4.6. Plate kaplama işlemi. 1,2,3,10,11,12 numaralı kuyucuklarda glikolize ACE2 ile yapılırken 4,5,6,7,8,9 numaralı kuyucuklarda ise deglikolize ACE2 ile yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak deglikolize Spike proteini kullanılmıştır. Kullanılan ACE2 ve Spike proteinleri Prf. Dr. Tarlan Mammedov tarafından N. Benthamiana bitkisinde üretilerek daha önceden testler ile aktivitesi kanıtlanmıştır (Mamedov vd. 2021)

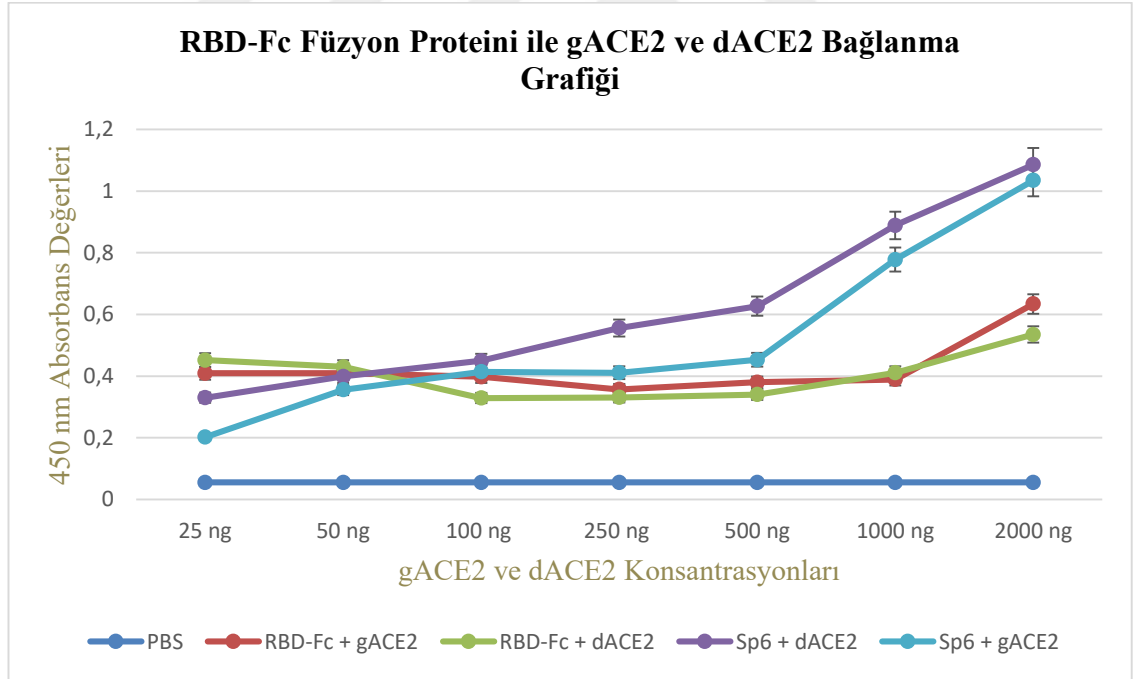
Bu testin temel mantığı ise OPD solüsyonunda bulunan HRP(yaban turbu peroksidazı) sayesinde enzim substrat aktivitesine bağlı olarak 450 nm'de tespit edilebilen sarı-turuncu bir renk vermesini sağlar. Renk yoğunluğu arttıkça bağlanmanın fazla olduğu anlaşılır. 30 dk inkübasyon sonrası örneklerin cihazda okuma işlemi yapıldı. 3 tekrar şeklinde yapılan bu deneyde okunan sonuçların ortalama değerleri alınarak tablo oluşturuldu (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Yapılan 3'lü tekrarların ortalama değerleri. PBS negatif kontrol olarak kullanılmıştır

ACE2 Konsantrasyonu	PBS	RBD-Fc + gACE2	RBD-Fc + dACE2	Sp6 + dACE2	Sp6 + gACE2
25 ng	0,055	0,409	0,452	0,33	0,202
50 ng	0,055	0,409	0,43	0,399	0,356
100 ng	0,055	0,398	0,329	0,45	0,414
250 ng	0,055	0,357	0,331	0,556	0,411
500 ng	0,055	0,38	0,34	0,627	0,453
1000 ng	0,055	0,389	0,411	0,889	0,778
2000 ng	0,055	0,634	0,535	1,086	1,035

Elde edilen bu değerler kullanılarak bir grafik oluşturuldu(Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. 450 nm'de yapılan ölçüm sonuçları ile elde edilen ortalama değerlerin grafiksek gösterimi

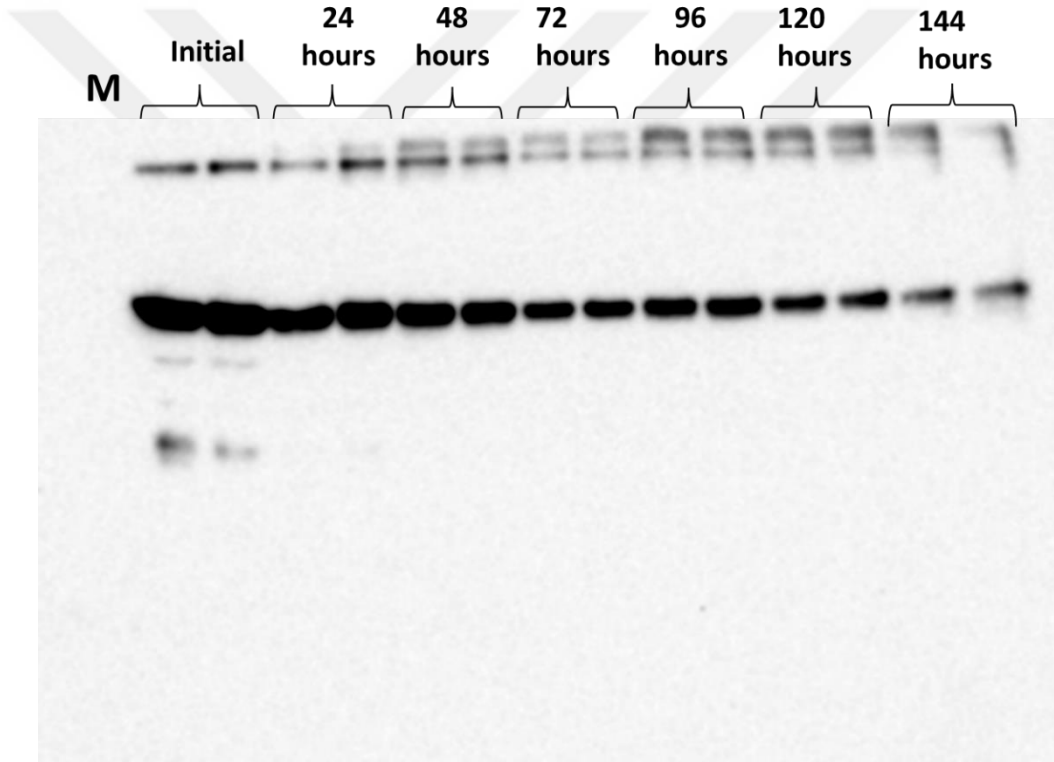


Grafikte görüldüğü üzere istenilen derecede yüksek bir afinite olmasa da hem dACE2 hem de dACE2'ye bağlanma gözlenmiştir. Sonuç olarak *N. Benthamiana* bitkisinde üretmiş olduğumuz RBD-Fc füzyon proteininin gACE2 ve dACE2 üzerinde bağlanma afinitesi tespit edilmiştir.

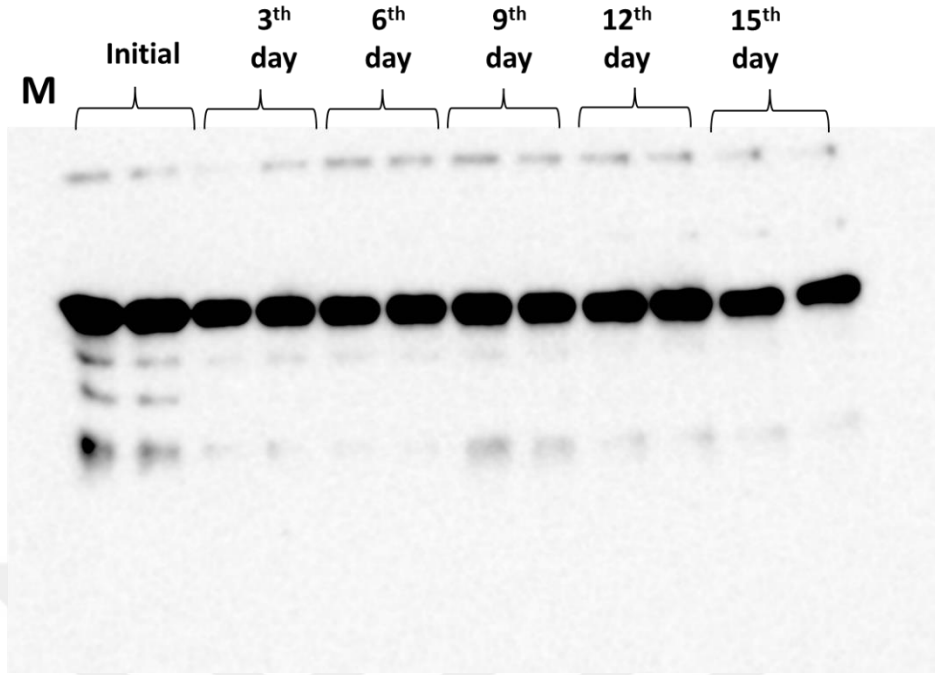
4.6. RBD-Fc +37°C ve +4°C Stabilite Değerleri

Bitki aracılı ekspresyon sistemi ile üretmiş olduğumuz RBD-Fc proteininin farklı sıcaklıklarda aktivite değerlerini ne kadar koruduğunu hesaplamak amacı ile stabilite testleri yapılmıştır. Bu test materyal metot kısmında bahsi geçtiği şekilde dizayn edilerek yapılmıştır. İşlem sonrasında toplanan örneklerin western blot analizi yapılmıştır (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8).

Yapılan western blot sonrası oluşan bantlara bakılarak aktivite değişimleri yorumlanmıştır.



Şekil 4.7. RBD1-Fc proteininin 37° C'de stabilitesi. Bitkide üretilen saflaştırılmış RBD1-Fc proteini, 37 ° C'de 24, 48, 72, 96, 120, ve 144 saat boyunca inkübe edildi ve Western blot (B) ile analiz edildi. Şeritler ~ 150 ng RBD1-Fc ile yüklendi. M: renk önceden alınmış protein standardı



Şekil 4.8. RBD1-Fc proteininin +4° C'de stabilitesi. Bitkide üretilen saflaştırılmış RBD1-Fc proteini, +4 ° C'de üçer günlük arayla 15 gün boyunca inkübe edildi ve Western blot ile analiz edildi. Şeritler ~ 150 ng RBD1-Fc ile yüklendi. M: boyanmış protein standardı

Western blot analizi sonuçlarına bakılarak, 37 ° C'de bekletilen proteinin 48 saat sonra yaklaşık % 50 bozunmaya uğrarken; +4°C'de ise stabilitesini koruduğu gözlenmiştir.

5. SONUÇLAR

Covid-19 pandemisi dünya çapında hızla yayılmaya devam eden oldukça patojenik bir koronavirüs hastalığıdır. RBD SARS-CoV-2'nin S1 alt biriminde bulunan ve ACE2'ye bağlanarak viral girişine aracılık eden bir proteindir. Fc fragmenti ise daha önceden yapılan çalışmalarda immünojeniteyi artırıcı etkisinden dolayı RBD proteini ile birleştirilmiş bitki aracılı ekspresyon sistemi ile üretilmesi planlanmıştır.

Yapılan tez çalışmaları kapsamında öncelikle RBD-Fc varyantının mühendisliği ve klonlamasını gerçekleştirdik. Bu genler bitki ekspresyon sisteminde kullanılan bir bakteri olan *A. Tumefaciens*'e aktarıldı ve *N. Benthmiana* bitkisine infiltrasyonu yapıldı. Belirlenen günde toplanan yapraklar Ni-kolonu kullanılarak saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi yapılan RBD-Fc füzyon proteini daha saf hale getirilmek için Akta start cihazından geçirildi. Bu işlen sonrasında RBD-Fc füzyon proteininin ACE2'ye bağlanma afinitesini test etmek için Elisa yöntemi kullanıldı. RBD-Fc füzyon proteininin gACE2 ve dACE2'ye bağlandığı gözlemlendi. Proteinin farklı sıcaklıklarda aktivitesinin zamana göre değişikliğine bakmak için de stabilite testleri yapıldı. Yapılan bu testlerin tamamına sonucu ve değerlendirilmesi Bulgular ve Tartışma kısmında bahsedilmektedir.

Özetle laboratuvarımızda yapılan tüm bu denelerin sonuçlarına bakılarak, RBD-Fc füzyon proteininin mühendisliği ve üretimi başarılı bir şekilde tamamlandığı söylenebilir.

6. KAYNAKLAR

- Alkan ŞŞ, Canatan D. COVID-19 aşılı. Canatan D, Alkan ŞŞ, editörler. *Güncel COVID19 Bilgileri*. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2021. p.39-46.
- Anderson R (2003). "Flavivirüsler tarafından hücre yüzeyi makromoleküllerinin manipülasyonu" . Virüs Araştırmalarındaki Gelişmeler . 59 : 229–74. doi : 10.1016 / S0065-3527 (03) 59007-8 . ISBN 9780120398591. PMC 7252169.
- CDC 2019–Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel. CDC- 006-00019, Revision: 02.
- "Coronavirus Update (Live)- Worldometer". www.worldometers.info. 22 Mart 2020 tarihinde kaynağından arşivlendi. Erişim tarihi: 16 Mart 2020.
- Davies HA, Macnaughton MR. *Comparison of the morphology of three coronaviruses*. Arch Virol 1979;59(1-2):25-33.
- Gralinski LE, Menachery VD. *Return of the coronavirus: 2019-nCoV*. Viruses 2020.
- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Kruger N, Muller M, Drosten C, Pohlmann S. *The novel coronavirus 2019 (2019-nCoV) uses the SARS-coronavirus receptor ACE2 and the cellular protease TMPRSS2 for entry into target cells*. bioRxiv. 2020.
- Li Z, Yi Y, Luo X, Xiong N, Liu Y, Li S, et al. *Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis*. J Med Virol 2020.
- Mamedov, T.; Gürbüzaslan, İ.; Ilgin, M.; Yuksel, D.; Mammadova, G.; Ozkul, A.; Hasanova, G. *High level production and characterization of truncated human angiotensin converting enzyme 2 in Nicotiana benthamiana plant as a potential therapeutic target in COVID-19*. May 2021 bioRxiv. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.05.17.444533>.
- Mamedov, T.; Yuksel, D.; Ilgin, M.; Gürbüzaslan, I.; Gulec, B.; Mammadova, G.; Ozdarendeli, A.; Yetiskin, H.; Kaplan, B.; Islam Pavel, S.T.; Uygut, M.A.; Hasanova, G. *Production and Characterization of Nucleocapsid and RBD Cocktail Antigens of SARS-CoV-2 in Nicotiana benthamiana Plant as a Vaccine Candidate against COVID-19*. Vaccines 2021, 9 1337. <https://doi.org/10.3390/vaccines9111337>.
- Mese S, Agacfidan A. Coronavirus: General Features and Current Approach. *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi* 2020; 3(Suppl.1): S14-S23. <https://doi.org/10.26650/JARHS2020-S1-0002>

Patel R, Babady E, Theel ES, Storch GA, Pinsky BA, George KS. et al, *Report from the American Society for Microbiology COVID-19 International Summit*, 23 March 2020: Value of diagnostic testing for SARS-CoV-2/COVID-19.

Petherick A. *Developing antibody tests for SARS-CoV-2*. Lancet 2020.

Sun, S., He, L., Zhao, Z., Gu, H., Fang, X., Wang, T., ... Sun, Y. (2021). *Recombinant vaccine containing an RBD-Fc fusion induced protection against SARS-CoV-2 in nonhuman primates and mice. Cellular & Molecular Immunology*, 18(4), 1070–1073. doi:10.1038/s41423-021-00658-z

Tatar B, Adar P. SARS-CoV-2: Mikrobiyoloji ve epidemiyoloji. Tepecik Eđit. ve Arařt. Hast. Dergisi. 2020;30(Ek sayı):27-35.

Ulasli M, Verheije MH, de Haan CA, Reggiori F. *Qualitative and quantitative ultrastructural analysis of the membrane rearrangements induced by coronavirus*. Cell Microbiol 2010;12(6):844-61.

World Health Organization. (2020). Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 2 March 2020.

Xu X, Chen P, Wang J, Feng J, Zhou H, Li X, et al. *Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission*. Sci China Life Sci. 2020.

ÖZGEÇMİŞ

Ramazan Talha PALAZ

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2020-2022	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji, Antalya
Lisans	Balıkesir Üniversitesi
2015-2019	Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik, Balıkesir