

**TEKNOFEST**  
**HAVACILIK, UZAY VE TEKNOLOJİ**  
**FESTİVALİ**

**BİYOTEKNOLOJİ İNOVASYON YARIŞMASI**

**PROJE DETAY RAPORU**

**FİKİR KATEGORİSİ**

**PROJE ADI:** COVID-19'a karşı ACE2 ve MHC -I reseptörü taşıyan rekombinant bakteriyofaj geliştirme

**TAKIM ADI:** VEGA

**TAKIM ID:** T3-23231-156

**DANIŞMAN ADI:** Dr. Özkan Fidan

## İçindekiler

### 1. Proje Özeti

Covid-19, insanları etkileyen, şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüsü 2'nin (SARS-CoV-2) neden olduğu solunum yolu sendromudur. 31 Aralık 2019'da daha önce insanlarda tespit edilmemiş yeni bir koronavirüs (2019-nCoV) tanımlanmıştır. Daha sonra 2019-nCoV hastalığının adı Covid-19 (2019-nCoV Hastalığı) olarak kabul edilmiştir [1]. Proje, faj görüntüleme (phage display) yöntemi ile M13 fajında ACE2 ve MHC sınıf I reseptörlerini ekspres ederek Covid-19 virüsünün etkisini olabildiği kadar hafifletmeyi amaçlamaktadır. Fajda ekspres olan ACE2'nin, virüsün spayk reseptörlerine bağlanacağı ve virüsün etkisini azaltarak bağışıklık sisteminin işini kolaylaştıracağı tahmin edilmektedir. Ayrıca, ekspres edilecek olan MHC-I reseptörü sayesinde bakteriyofaj ile birleşen koronavirüs kompleksi bağışıklık sistemi tarafından kolayca algılanıp ortadan kaldırılacaktır. Projede rekombinant fajları Covid-19 hastalarına hava ve kan yolu ile verilmesi hedeflenmektedir. Hava yolu ile fajların iletilme sebebi; oksijen tüplerinin içerisine yerleştirilen fajların hastanın doğrudan akciğerlerine inmesini sağlamak böylece akciğerde hızlı şekilde üreyen virüsü yavaşlatmaya çalışmak, ardından bağışıklık sisteminin bu virüsü ortadan kaldırması hedeflenmektedir.

### 2. Problem

Son yıllardaki en büyük ve günlük hayatı önemli ölçüde kısıtlayan tüm dünyayı etkisi altına alan pandemik salgın olan Covid-19 çok tehlikeli boyutlara ulaşarak ciddi bir sağlık problemi haline gelmiştir. Bu hastalığın sorumlusu olan yeni tip koronavirüs 2, insanın hücre yüzeylerinde bulunan ACE2 reseptörüne tutunarak hücre içerisine girerek ciddi vakalarda tansiyonun sürekli olarak düşmesine, son olarak da ölüme yol açmaktadır ve herhangi bir tedavi yöntemi bulunmaması sebebiyle 6,431,419 vakaya ve 379,728 ölüme sebep olmuştur (02.06.2020) [2]. Ayrıca bu sayı, alınan önlemlere rağmen her geçen gün hızlı bir şekilde artmaktadır çünkü Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO), Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri'ne (CDC) ve ABD Gıda ve İlaç İdaresi'ne (FDA) göre, şu anda 2019 şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü 2'nin (SARS-CoV-2) tedavisi ve önlenmesi için etkili olduğu kanıtlanmış hiçbir ilaç veya aşı yoktur [3]

### 3. Çözüm

Projede, klonlama deneylerinde en çok kullanılan *Escherichia coli* (XL1-Blue) bakterisinin kullanılması planlanmaktadır [4,5]. M13cp-*sg3* (no *g3*) [4] helper plazmit ile ACE2 ve MHC-I genlerini içeren bir fajmid elde edilecek şekilde bir deney tasarlanmıştır. ACE2, *f37* fajmidinde bulunan kaplama proteini III (pIII) bölgesine entegre edilirken [5], MHC-I reseptör geni ise *f37* fajmidinin kaplama proteini VII (pVII) bölgesine entegre edilecektir [5]. Böylece fajın pIII bölgesinde ACE2 ekspres edilirken, pVII bölgesinde MHC-I reseptörü ekspres edilmiş olacaktır (Figür 1.a). Helper plazmit ile fajmid tarafından enfekte edilecek olan bakteri *E.coli* XL1-Blue [5] türü olacaktır. Deneyin sonunda elde edilen rekombinant M13K07 fajların üzerinde ACE2'nin ekspres edilip edilmediği nikel kolon yöntemi ile tespit edilecektir. Bu rekombinant fajlar insana hava ve kan yolu ile verilecektir. Hastanın akciğerlerine ulaşan yüksek miktardaki

fajlar virüsle karşılaştığı zaman ACE2 ve spayk reseptörleri birbirini tanıyarak etkileşime girecektir (Figür 1.b). Oluşan ACE2-virüs kompleksi kana karıştığı takdirde fajda bulunan MHC-I reseptörü sayesinde bağışıklık sisteminin harekete geçmesi sağlanacaktır. Harekete geçen bağışıklık sistemi, virüs-faj kompleksini yok edecektir. Sonuç olarak, kana karışmamış olan virüs, akciğer ve üst solunum yollarında etkisiz hale getirilirken, kana karışmış olan virüs ise bağışıklık sistemi tarafından yok edilecektir. Ayrıca yapılan çalışmalar gösteriyor ki sahte ACE2 reseptörü virüsün spayk proteini ile etkileşime geçerek normal bir biçimde birbirlerine bağlanmaktadır [6].

#### 4. Yöntem

Proje hayata geçirilirken şu metotlar uygulanacaktır; alveolar tip II hücrelerinin izolasyonu, ACE2 ve MHC sınıf I reseptörlerine uygun sıvı-gaz ortamın hazırlanması, RNA ekstrasyonu ve izolasyonu, cDNA sentezi, özel primer dizaynı ve PCR ile reseptörlerinin saf gen diziliminin elde edilmesi, reseptörlere ait genlerin fajmide klonlanması, klonlanan fajmid ve yardımcı plazmidlerin *E.coli* XL1-Blue hücrelerine transformasyonu, ACE2 ekspresyonunun doğrulanması.

Virüsün spayk proteinleri Dr. Cihan Taştan ve arkadaşları [7] tarafından Türkiye’de izole edildiği için His-tag içeren spayk proteinin izole hali Dr. Cihan Taştan’dan talep edilecektir. ACE2 reseptörünün 2 alfa helix domaini ile spayk proteinleri etkileşime girdiği için [8] ACE2’nin sadece 2 alfa helix domaini izole halde kullanılacaktır. Bu domainler ise Krogan Lab’dan talep edilecektir [9]. Eğer taleplerimiz karşılıksız kalırsa aşağıdaki metotlar uygulanacaktır.

##### 4.1. Alveolar tip II hücre izolasyonu ve ACE2 ve MHC sınıf I reseptörlerine uygun ortamın hazırlanması

İnsanda ACE2 reseptörleri en çok ince ve kalın bağırsakta ekspres edilmektedir [10] fakat projemizde öncelikli olarak akciğer hedef alındığı için ACE2 ve MHC sınıf I reseptörleri elde etmek amacıyla akciğer hücreleri seçilecektir. Alveolar tip II hücreleri akciğerde ACE2 ekspres eden bir hücredir ve sağlıklı bir insan akciğerinden belirli bir miktarda doku alarak, buradan AT2 hücreleri Wang J. ve arkadaşlarının yayınladığı method [11] gibi izole edilecektir. İzole edilmiş hücreler, % 10 fetal sıgır serumu (FBS) ile desteklenmiş Dulbecco'nun Modifiye Kartal Ortamı (DMEM) içinde yeniden süspanse edilecektir. Ortama interlökin-13 (IL-13) ve interlökin-4 (IL-4) eklendiği zaman AT2 hücrelerinde ACE2 ekspresyonunun daha da artmış olduğu fark edildiği için projede bu kimyasallar kullanılacaktır [12]. % 50 Matrigel ve % 50 sıçan kuyruğu kollajeninin bir karışımı ile önceden kaplanmış 6 oyuklu veya 24 oyuklu Millicell ekleri üzerine cm<sup>2</sup> başına 1 x 10<sup>6</sup> yoğunlukta plakalanacaktır. 48 saatlik hücre yapışmasından sonra, ortama inaktive edilmiş insan serumu ve ek olarak 10 ng / ml keratinosit büyüme faktörü (KGF), 0.1 mM izobütiletmetil ksantin, 0.1 mM 8-Bromo-cAMP, 10 ng / ml IL-4 ve 10 ng / ml IL-13 maddeleri eklenecektir. Eklerden sonra, 8 günlük kültür ve gaz-sıvı koşulları altında 6 gün sonra hücreler hasat edilecektir [12].

##### 4.2. RNA ekstraksiyonu ve izolasyonu

2.000 xg hızda, oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj edilerek yaklaşık 5 milyon hücre hasat edilecektir. Süpernatant aspire edilecek ve 1 ml soğuk PBS eklenerek hücre pelletleri tekrar süspansiyon haline getirilecektir. 1 dakika boyunca oda sıcaklığında tam hızda mikrosantrifüj ile santrifüjlenecektir. Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) aspire edilecek ve 1 ml MLR (Trizol Life Technologies, TRI reaktifi Sigma-Aldrich, Isogen Nippon Gene, RNA-Stat-60 Tel-Test, FastPrep Pro Qbiogene) eklenecektir. Bir mikropestle ile veya homojenizatör ile hücreler homojenize edilecektir. Tüpler ters çevrilecek ve kuvvetlice vorteksleyerek hücreler parçalanacaktır. Nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrılmasını sağlamak için oda sıcaklığında 5 dakika boyunca homojenatlar inkübe edilecektir. Tüpe 0.2 ml kloroform eklenir, sonra 15 saniye boyunca kuvvetlice çalkalanacaktır. Oda sıcaklığında 2 ila 3 dakika inkübe edilecektir. 4 °C'de 15 dakika yüksek hızda mikrosantrifüj edilecektir. Daha sonra, ara fazı bozmadan, hemen üstte bulunan sulu faz, yeni bir RNaz içermeyen tüpe dikkatlice aktarılacaktır. 0.5 ml izopropanol eklenecektir ve birkaç kez ters çevrilerek iyice karıştırılacaktır. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilecektir. Maksimum hızda 10 dakika boyunca mikrosantrifüj edilecektir.. Süpernatantı dikkatlice atılacaktır. Daha sonra, 1 ml %75 etanol eklenecektir. Örnek vorteksleneyecektir ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilecektir. 10 dakikanın sonunda maksimum hızda 4 °C'de 5 dakika santrifüjlenecektir. Süpernatant dikkatlice çekilip atılacaktır. Pelet 20 ila 50 ul RNaz içermeyen dietilpirokarbonat (DEPC) içinde tekrar süspansiyon haline getirilecektir. RNA pelletini tamamen çözmek amacıyla 10 dakika boyunca 55 °C ila 60 °C'de örnek inkübe edilecektir. Artık RNA, -20 °C'de bir ay kalabilir hale gelirken -70 °C'de bir sene kalabilir hale gelecektir [13]. Son olarak RNA örneğinin kalitesi spektrofotometre ile tayin edilecektir.

### 4.3. ACE2 ve MHC sınıf I' e ait tek iplikçikli cDNA sentezi

RNA ekstraksiyonu ve izolasyonundan sonra cDNA sentezi metodu gelmektedir. DEPC'li su, RNA örneği, dNTP ve oligo (dt) kullanılacaktır. Daha sonra, dNTP ve oligodan (dt) 0.5 µl, RNA örneğinden 5 µl ve DEPC'li sudan yaklaşık 4 µl alınacak ve aynı Eppendorf içine konacaktır. Toplam karışım 10 µl'dir. Daha sonra, karışım 5 dakika boyunca 65 °C'de inkübe edilecektir. İnkübasyondan sonra, karışım 10 dakika boyunca buz üzerine bekletilir. Aynı bir eppendorf içine tampon ana karışımı hazırlanacaktır. Yaklaşık 4 µl 5x RT tampon, 0.5 µl RNaseOFF, 1 µl RTase alınır ve bir Eppendorfa koyulacaktır. İlk Eppendorf soğutulduktan sonra, tüm bileşenleri içeren ilk ve son Eppendorf yavaşça birleştirilecek ve santrifüjlenecektir. Daha sonra, son karışım 42 °C'de 60 dakika inkübe edilecektir. Daha sonra, on beş dakika boyunca 70 °C'de ısıtılacaktır [14]. Bundan sonra elde edilen cDNA'nın ilk iplikçığı, -20 °C'de saklanabilir veya alt deneylerde direk kullanılabilir. Bu adımların hepsi ACE2 ve MHC sınıf I reseptörleri için aynı cDNA kullanılarak fakat farklı primerler ile ayrı PCR'larda paralel olarak yapılacaktır.

### 4.4. PCR ile reseptörlerin DNA'sını elde etme

PCR için ACE2 alfa helix ve MHC sınıf I genlerine özel ileri ve geri primerler tasarlanacaktır. Bu işlem için GENBANK internet sitesi kullanılacaktır. Reaktifleri sırayla: su, tampon, dNTP'ler, MgCl<sub>2</sub>, özel forward ve reverse primerler, Phusion DNA polimeraz, Phusion 5X tamponu ve cDNA şeklinde 0.2 ml PCR tüplerine eklenecektir. Tüp içeriğinin tamamının

karişması için kısa süre santrifüjlenecektir. Daha sonra PCR makinesine örnek yerleştirilir. Böylece saf ACE2 alfa helix genleri ve MHC sınıf I genleri elde etmiş olacaktır.

#### 4.5. ACE2 ve MHC genlerinin fajmide klonlanması

PCR ile elde edilen saf ACE2 alfa helix genleri ve MHC sınıf I genleri pJET1.2/blunt klonlama vektörüne aktarılacaktır (Figür 2) [16]. İlk olarak ACE2 alfa helix genleri klonlama plazmitine aktarılacaktır. ACE2 alfa helix genleri pJET1.2/blunt klonlama plazmitine yerleştirmek için P1 ve P2 primerleri tasarlanacaktır. Bu primerlerin 5' ve 3' uçlarına f37 fajmidinin pIII bölgesine olan restriksiyon enzimlerinin sekansları ilave edilecektir. Böylece klonlama vektöründen bu enzimlerle kesip aynı enzimlerle kesilmiş f37 fajmidinin istenilen bölgesine kolayca yerleştirilecektir. Primer dizayn işlemi için GENBANK internet sitesi kullanılacaktır. Aynı şekilde MHC sınıf I genleri içinde pJET1.2/blunt klonlama vektörü kullanılacaktır. Aynı şekilde MHC sınıf I geni için dizayn edilecek olan P3 and P4 primerleri f37 fajmidin pVII bölgesindeki restriksiyon enzimlerini sekanslarını içerecektir. Bu primerlerle yapılan PCR reaksiyonundan elde edilen PCR framanları pJET1.2/blunt klonlama vektörünü direk ligasyon ile aktarıldıktan sonra, elde edilen plasmidler sekanslamaya gönderilerek ACE2 ve MHC-I genlerinin sekansları doğrulanacaktır. Doğrulanmış iki farklı genleri içeren plazmit vektörlerinden ilk olarak ACE2 alfa helix geni olan plazmit restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilecektir. Aynı restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak f37 fajmidinin pIII bölgesinin bir önceki dizileri kesilecektir. Aynı enzimle kesilen bu uçlar yapışkan uç olacaktır ve birbirleri ile uyumlu olacaklardır. Birbirine yapışan ACE2 geni ile fajmidin pIII bölgesi DNA ligaza maruz bırakılacaktır. Daha sonra MHC-I geni bulunan plasmid seçilen restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilecektir. Daha önce ACE2 genini eklediğimiz f37 fajmidinin pVII bölgesinin de bir önceki dizisi aynı restriksiyon endonükleaz ile kesilecektir böylelikle birbirleri ile uyumlu iki yapışkan uç elde edilmiş olacaktır. Bu uçlar da DNA ligaz sayesinde bağlanma reaksiyonu gerçekleşecektir. Son elde edilen fajmid restriksiyon enzimleri kullanılarak tekrar doğrulandıktan sonra klonlama işlemleri tamamlanmış olacaktır [17].

#### 4.6. Yardımcı plazmitin ve fajmidin transformasyonu

*E.coli* XL1-Blue hücreleri, transformasyona daha iyi hazırlanmak için besin yönünden zengin olan SOB (süper optimum broth) besiyerinde bir gece boyunca inkübe edilecektir. Daha sonra büyüyen hücreler, M13cp-*sg3* yardımcı plazmit için hücreleri daha uygun hale getirebilmek adına 2xYT besiyerine aktarılacaktır. M13cp-*sg3* yardımcı plazmit ve klonlamadan elde ettiğimiz f37 fajmidin elektroporasyon yöntemi ile *E.coli* XL1-Blue hücrelerine transforme edilecektir. 2xYT besiyerinde 30°C'de 250 rpm'de büyütülecek olan hücrelerden her transformasyon sonrasında koloniler toplanacaktır. Enfekte olan bakteriler, 2xYT besiyerinde 30 °C'de 250 rpm'de büyütülecektir. Faj üretimi için, büyütülen faj 4000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilecek ve elde edilen süpernatanttan toplanacaktır [4].

#### 4.7. ACE2 reseptörünün faj yüzeyinde ekspresyonunun doğrulanması

Dr. Cihan Taştan'dan talep edilen His-tag etiketli spayk proteini *E.coli* BL21(DE3)'de ekspres edilecektir daha sonra His-tag içeren spayk proteinleri çıkarılacak ve saflaştırılacaktır. Rekombinant ACE2 fajı ile His-taglı spayk proteinlerinin etkileşimleri için bir müddet çalkalanarak inkübe edilecektir. İnkübe edilen karışım nikel kolondan yürütülecektir. Nikel ile His-tag arasındaki etkileşim sonucu His-tag etiketli spayk proteinler nikel bağlanacaktır. Nikel kolonda hem His-tag içeren spayk proteinler ve o spayk proteine bağlanmış olan ACE2 fajı kalacaktır. Birkaç kez yıkama işlemi gerçekleştirdikten sonra seyreltilicektir. Yıkanan kolondaki His-tag içeren spayk protein ve rekombinant ACE2 fajı ilüsyon (elution) ile ayrıştırılır. Kontrol olarak diğer bir nikel kolona, ACE2 içermeyen fajlar ile inkübe edilen His-tag içeren spayk protein eklenecektir böylelikle ACE2 olmadığı için bakteriyofaj His-tag etiketli spayk proteinine bağlanamayacaktır. Her iki nikel kolondan elde edilen proteinleri SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez)'de yürütülecektir. Yürütülen bu proteinler moleküler kütlelerine göre ayrılır, His-tag etiketli spayk proteinin bağlanmış olduğu rekombinant ACE2 fajı, kontrol grubu olan His-tag etiketli spayk proteinlerden daha ağır olacağı için farklı bantlarda gözlemlenecektir [15]. Böylece, proteinlerin faj üzerinde doğru şekilde ekspres olduğu doğrulanmış olacaktır.

#### 4.8. Fajların gaz haline getirilmesi

Fajların gaz halinde hastaya verilebilmesi için faj içeren çözeltinin püskürtülecek olan sıvı bir aerosol kabının içine doldurulacaktır. Bu kap bir inhaler ya da oksijen tüpü olabilir. Daha sonra bu kabın kapağı, püskürtmeyi sağlayacak olan valf kısmı ve borusu takılacaktır. Son olarak valf kısmından basınç altında itici gaz içeriye gönderilecektir. Ancak itici gazın, üretilen fajlar üzerindeki negatif etkisini denemediği için henüz bilinmemektedir. Gönderilen itici gazın bir kısmı içerideki basınçla sıvılaşır ancak kabın üst kısmında bir miktar itici gaz katmanı da bulunur. Kabın içinde bulunan basınç ve sarmal yay yapısıyla birlikte düğmesine basılmadıkça valf kısmından sıvı püskürtülmez. Düğmesine basıldığında ise itici gazın etkisiyle kaptaki sıvı aerosol şeklinde dışarı püskürtülecek ve havada asılı kalacaktır. Proje, bu yöntemi kullanarak hayata geçirilecektir. Hastanelerde gözetim altında belirli dozlarla hastaya verilmesi en uygun seçenek olacaktır.

#### 5. Yenilikçi (İnovatif) Yönü

Covid-19'un çözümü kapsamında kullanılan birtakım destekleyici ilaçlar mevcuttur. Sıtma ve HIV gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan klorokin, remdesivir, favipiravir bu destekleyici ilaçlardan birkaçıdır. Günümüzde tedavide kullanılmak üzere ilaç geliştirme kapsamında antikör üretimi, plazma terapisi gibi birçok çalışma yapılmaktadır. Bizim projemize benzer olan bir çalışmada ise kanda çözülebilir olan sahte ACE2'nin virüsün spayk proteinleri için tuzak olarak kullanılmıştır ve başarı elde etmiştir [6]. Ancak koronavirüsü yakalayıp öldürebilen ve tedavide kullanılabilen bir ilaç henüz kullanıma sunulmamıştır. Aynı zamanda, aşı üretimi alanında da birçok çalışmalar vardır ama bu konuda da henüz kullanıma başlanmış bir aşı yoktur. Ayrıca geliştirilen aşılarda Covid-19'dan korunma yöntemi olarak kullanılabilir çünkü aşı bir tedavi yöntemi değildir. Bizim projemizde ise amaç rekombinant fajlar kullanarak Covid-19 hastalarını tedavi etmektir. Üretilen fajlar hastaya kan yolu ve oksijen tüpleri kullanılarak hava yolu ile

verilebilecektir. Hava yolu ile verilen fajlardaki ACE2 reseptörleri sayesinde hastaların akciğerinde virüslerin çoğalması engellenecektir. Hastaya verilme şekli, projemizi diğer çalışmalardan farklı kılmaktadır. Öte yandan, hava yolu ile verilmesi sayesinde direkt solunum sistemini hedef alan SARS-CoV-2 için etkili bir yöntem olması beklenmektedir. Ayrıca, entegre edilen MHC-I reseptörleri, koronavirüs-faj kompleksinin bağışıklık sistemi tarafından algılanmasını kolaylaştırarak bağışıklık sistemini harekete geçirecektir. Ağır durumdaki Covid-19 hastalarına serum yolu ile de elde edilen fajlar verilebilir. Hastalığın ilk evrelerindeki hastalara ise inhalatör şeklinde fajlar verilip hastalığın ağırlaşmasının önüne geçilecektir. Ayrıca, virüsün mutasyonla hedef reseptörünü değiştirmesi durumunda projemizde kullanılan reseptör de hedef reseptöre göre değiştirilip hastalığın tedavisinde kullanılabilir çünkü projemiz Covid-19 ve bunun gibi tek reseptöre bağlanan virüslerin sebep olduğu hastalıklara umut ışığı taşımaktadır. Özet olarak, projemiz kullandığımız fajlardaki ACE2 ile MHC-I reseptörleri ve hastaya verilme yöntemi ile diğer çalışmalardan farklı özellikler taşımaktadır.

## 6. Uygulanabilirlik

Proje, şuan teknoloji olgunluk seviyesi olarak 3. seviyeyi tamamlamış bulunmaktadır. Laboratuvar ortamına geçerek deneylere başlanması durumunda teknoloji olgunluk seviyesi 4'e çıkacaktır. Seviye 4 ve sonrası için bazı deney aşamaları gerçekleştirilecektir. Elde edilen fajların öncelikle *in vitro* ortamda denenmesi gerekmektedir. Fajların bulunduğu ortama konan Covid-19 virüsünün spayk proteinlerinin fajdaki ACE2 reseptörüne bağlanması bu ortamda incelenebilir. Daha sonra hayvanlarla yapılan deneylerin ardından insan deneylerine geçilecektir. Hayvan deneylerinde Covid-19 virüsüne karşı fajların etkisi ölçülecektir. Hastanelerde fajın kullanımına başlanmadan önce hayvanlarda yan etkisinin görülüp görülmemesine göre klinik denemeler yapılacaktır. Klinik araştırmalar için uzman laboratuvarlar ile anlaşma yapılacaktır. Bu aşamalardan uzmanlar sorumlu olacaklardır. Kişinin yaş, cinsiyet, vücut kitle endeksi, hastalık geçmişi, sigara içme durumu, akciğerlerde yakın zamanda geçirilen bir hastalık olup olmaması, zatürre geçmişi, kanser geçmişi ve kronik ilaç kullanıp kullanmaması gibi özellikleri göz önünde bulundurularak belirli dozlar ile tedavileri yapılacaktır. Bunun için kriterlere uygun gönüllü hastalar seçilecektir. Denemeler sonunda elde edilen ilacın kullanıma uygun olması takdirinde ilaçlar hastalara hastane ortamında ve doktor gözetiminde hava ve kan yolu ile verilecektir. Hastalar üzerinde başarı sağlayan ilaçlar Covid-19 ile mücadele eden diğer ülkelere satışı gerçekleştirilebilir. İlaç inhalatör, oksijen tüpü ve flakon gibi taşınabilir formda olduğu için kargo uçaklar ile bir ülkeden diğerine gönderilebilecektir. Özellikle de Covid-19'un pandemi haline gelmiş olduğunu ve tüm insanlığı tehdit ettiğini düşünürsek, bu satış, ülkemiz adına ilaç ve bilim sektörüne çok büyük katkılar sağlayacaktır.

## 7. Proje Fikrinin Hedef Kitlesi (Kullanıcılar):

Projemizin hedef kitlesi Sağlık Bakanlığı ile beraber SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş ilk evrelerdeki ve ağır durumdaki Covid-19 hastalarıdır.

## 8. Proje Ekibi

**Takım Lideri:** Beyza Çanakcımaksutoğlu

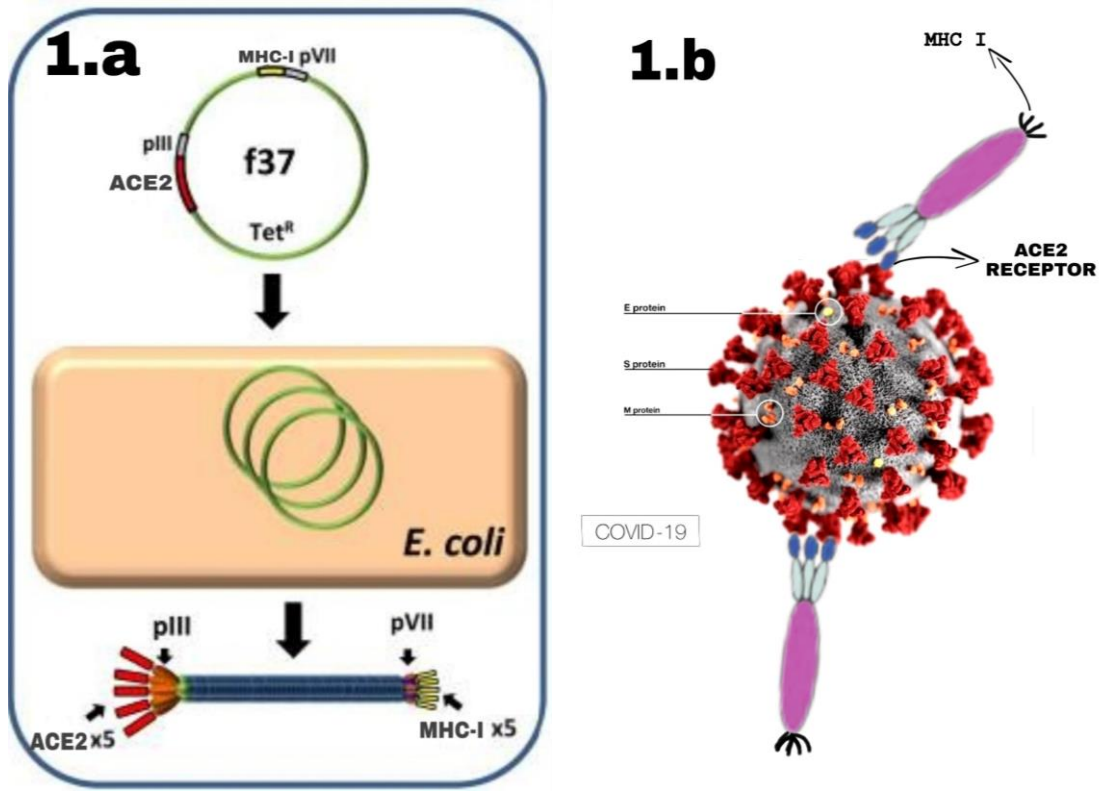
Adı Soyadı	Projedeki Görevi	Okul	Projeye veya problemle ilgili tecrübesi
Beyza Çanakcımaksutoğlu	Proje tasarımı, ACE2 ve MHC-I reseptörlerinin izolasyonu, cDNA sentezi ve reseptör genlerinin elde edilmesi	Abdullah Gül Üniversitesi	AGÜ- Kanser sinyal laboratuvarında hücre kültürü deneyimi AGÜ- İnsan genetiği hastalıkları laboratuvarında klonlama deneyimi
Didem Bayraktaroğlu	Bakterilerin büyümesi için ortam hazırlama, transformasyon ve bakteriden fajın elde edilmesi	Abdullah Gül Üniversitesi	AGÜ-Merkezi Araştırma Laboratuvarında bakteri izolasyonu deneyimi (2019-devam ediyor)
Kübra Yumuk	ACE2 ve MHC-I genlerini klonlama, Rekombinant faj elde edilmesi. Elde edilen fajların doğrulanması	Abdullah Gül Üniversitesi	AGÜ- Kanser sinyal laboratuvarında hücre kültürü deneyimi, AGÜ-Biyomühendislik Laboratuvarında yapay damar üretimi deneyimi.

## 9. Kaynaklar

1. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/global-research-onnovel-coronavirus-2019-ncov>
2. <https://www.worldometers.info/coronavirus/>
3. Clinical management of severe acute respiratory infection when novel coronavirus (nCoV) infection is suspected. (2020). Who.int. Retrieved 23 March 2020, from [https://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acute-respiratoryinfection-when-novel-coronavirus-\(ncov\)-infection-is-suspected](https://www.who.int/publications-detail/clinical-management-of-severe-acute-respiratoryinfection-when-novel-coronavirus-(ncov)-infection-is-suspected)
4. Chasteen, L & Ayriss, J & Pavlik, Peter & Bradbury, Andrew. (2006). Eliminating helper phage from phage display. Nucleic acids research. 34. e145.
5. Løset GÅ, Bogen B, Sandlie I (2011) Expanding the Versatility of Phage Display I: Efficient Display of Peptide-Tags on Protein VII of the Filamentous Phage. PLoS ONE 6(2): e14702.
6. Renzi F, Ghersi D. ACE2 fragment as a decoy for novel SARS-Cov-2 virus. bioRxiv; 2020. DOI: 10.1101/2020.04.06.028647.
7. Tastan, C., Yurtsever, B., Sir, G., Kancagi, D., Demir, S., & Abanuz, S. et al. (2020).

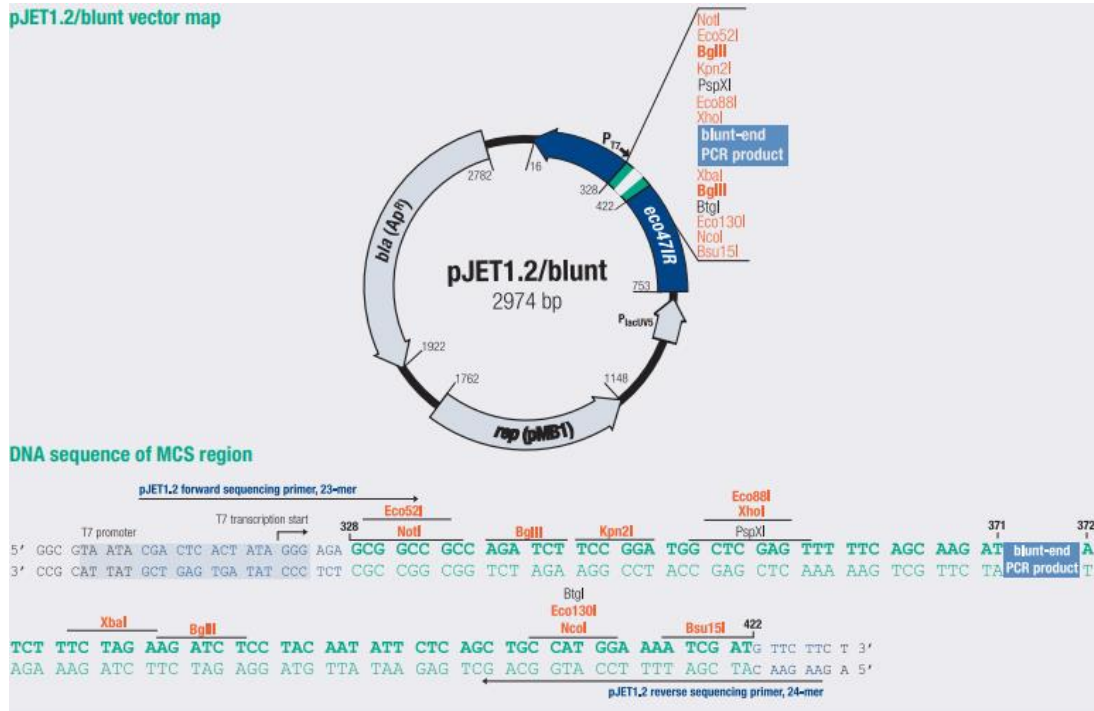


- SARS-CoV-2 Isolation and Propagation from Turkish COVID-19 patients. doi: 10.1101/2020.04.23.056309
8. Renzi F, Ghersi D. ACE2 fragment as a decoy for novel SARS-Cov-2 virus. bioRxiv; 2020. DOI: 10.1101/2020.04.06.028647.
  9. The Krogan Lab. (2020). Retrieved 26 May 2020, from <https://kroganlab.ucsf.edu/krogan-lab>
  10. Ace2 angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 2 [Mus musculus (house mouse)] - Gene - NCBI. (2020). Retrieved 22 May 2020, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=70008>
  11. Wang, J., Edeen, K., Manzer, R., Chang, Y., Wang, S., & Chen, X. et al. (2007). Differentiated Human Alveolar Epithelial Cells and Reversibility of their Phenotype In Vitro. *American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology*, 36(6), 661-668. doi: 10.1165/rcmb.2006-0410oc
  12. Qian, Z., Travanty, E. A., Oko, L., Edeen, K., Berglund, A., Wang, J., Ito, Y., Holmes, K. V., & Mason, R. J. (2013). Innate immune response of human alveolar type II cells infected with severe acute respiratory syndrome-coronavirus. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 48(6), 742–748. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-0339OC>
  13. Liu, X., & Harada, S. (2013). RNA isolation from mammalian samples. *Current protocols in molecular biology*, Chapter 4, . <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0416s103>
  14. Sciences, L., (PCR), P., & Transcription, R. (2020). 5 Steps to Optimal cDNA Synthesis | Thermo Fisher Scientific - UK. Retrieved 20 May 2020, from <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/pcr/reverse-transcription/5steps-cDNA.html>
  15. Spriestersbach, A., Kubicek, J., Schäfer, F., Block, H., & Maertens, B. (2015). Purification of His-Tagged Proteins. *Laboratory Methods In Enzymology: Protein Part D*, 1-15. doi: 10.1016/bs.mie.2014.11.003
  16. [Map and Features of pJET1.2/blunt Cloning Vector](#)
  17. DaRocha WD, Silva RA, Bartholomeu DC, Pires SF, Freitas JM, Macedo AM, Vazquez MP, Levin MJ, Teixeira SM, 2004. Expression of exogenous genes in Trypanosoma cruzi: improving vectors and electroporation protocols. *Parasitol Res*, 92(2): 113-120.



**Figür 1.a:** Kullanılacak fajmid ve onun *E.Coli*'ye aktarılması ile rekombinant M13K07 faj üretimi.

**Figür 1.b:** COVID-19 virüsünü çevreleyen rekombinant M13K07 fajlarının virüsün spayk proteinlerine bağlanması.



**Figür 2:** PCR ile elde edilen saf ACE2 alfa helix genleri ve MHC sınıf I genlerinin aktarılacağı klonlama vektörü.