

**REKOMBİNANT ANTİKOR FRAGMENTLERİNİN ÜRETİMİ VE GENETİK
MODİFİKASYONUYLA SİTOKİN ÖLÇÜMÜNE YÖNELİK İMMÜNOASSAY
GELİŞTİRİLMESİ**

**PRODUCTION AND GENETIC MODIFICATION OF ANTIBODY FRAGMENTS
FOR DEVELOPMENT OF A CYTOKINE DETECTION IMMUNOASSAY**

DİLEK ŞAHİNBAŞ

DOÇ. DR. EDA ÇELİK AKDUR

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2024

ÖZET

REKOMBİNANT ANTİKOR FRAGMENTLERİNİN ÜRETİMİ VE GENETİK MODİFİKASYONUYLA SİTOKİN ÖLÇÜMÜNE YÖNELİK İMMÜNOASSAY GELİŞTİRİLMESİ

Dilek ŞAHİNBAŞ

Doktora, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR

Mayıs 2024, 118 sayfa

İmmün yanıtın ve inflamasyonun düzenlenmesinde önemli rol oynayan sitokinler, birçok hastalığın tanısında biyobelirteç olarak kullanılırlar. Patojenlere ya da hastalıklara karşı gelişen bu immün yanıt sırasında sitokin derişimleri hızla değişir ve kontrol altına alınamazsa sepsis gibi ağır bir duruma sebep olabilir. Bu sebeple, sitokin seviyelerinin ölçümü erken tanı ve tedavide büyük önem taşımakta, hassas, hızlı ve ekonomik testlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Biyolojik örnekler içerisindeki bileşenlerin ölçümünde en hassas ve spesifik yöntemler, antikorların tanıyıcı molekül olarak kullanıldığı immünosensörlerdir. Yüksek afinite ve özgüllükleri sebebiyle biyosensörlerde tanıyıcı molekül olarak kullanılan monoklonal antikorlar (mAb), teşhis ve tedavide önemli bir yere sahiptir; fakat üretim maliyetleri yüksektir. Küçük, glikozillenmemiş antikor fragmentlerinin prokaryotlarda yüksek verimle üretilebilmesi, gerekli zaman ve maliyeti azaltır. Bu bağlamda, tek zincirli değişken fragmanı adı verilen scFv'ler, küçük boyutlu (25 kDa), mAb ile benzer özgüllük ve afiniteye sahip proteinlerdir. ScFv'ler, boyutları sebebiyle IgG'ye kıyasla daha kolay modifiye edilebildiğinden,

sensör yüzeylerine immobilizasyonlarında farklı yöntemler kullanılabilmesine olanak sağlar. ScFv'lerin yüzeye daha yüksek yoğunlukta ve yönlendirilerek bağlanabilmesi, fonksiyonel antijen bağlanma bölgelerinin sayısını artırır ve bu şekilde, biyosensörlerin hassasiyeti de artırılabilir.

Bu tez çalışmasında, çeşitli anti-sitokin scFv'lerin, *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterisinde rekombinant üretimi ve yüksek hassasiyetli immünoassaylerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bakteriyel üretimin avantajları (düşük maliyet, proses kontrol kolaylığı) kullanılarak kolay, hızlı, hassas ve düşük maliyetli bir immünoassay üretimi temel hedeftir. Sınırlı sayıda çalışmada üretilmiş anti-TNF α , anti-IL6, anti-IL1 β ve anti-IFN γ scFv'lerde, verim, geri kazanım, stabilite, bağlanma aktivitesi ve çözünürlük problemleri görülmektedir. Çözünürlük, stabilite, bağlanma aktivitesi ve üretim verimlerinin iyileştirilmesi amacıyla, *E. coli* SHuffle® T7 Express suşunun kullanımı, daha az oksitleyici sitoplazmik ortamı sayesinde çözünür formda scFv üretimi için ilk hedef olmuş; klonlama adımları gen kasetinin tasarımları doğrultusunda başarıyla tamamlanmıştır. Gen ve proses düzeyinde yapılan optimizasyonlar sonucunda bakteriyel rekombinant protein üretiminde sıkça görülen düşük protein çözünürlüğü ve düşük saflaştırma verimi elde edilmiş; problemin çözümü için sarkozil ile inkülyasyon cisimlerinden aktif protein eldesi sağlanmıştır. Bu yöntemde denatüre edici ajanlar kullanmadan ve tekrar katlama gibi zahmetli deneyler yapılmadan daha yüksek verimde protein elde etme avantajı doğmuştur. İnkülyasyon cisimlerinden protein üretim veriminin, çözünür fraksiyondan protein eldesine kıyasla 8-10 kat fazla olduğu görülmüş ve literatürle karşılaştırıldığında yüksek verim ve saflıkta scFv'ler elde edilmiştir (>%95 saflık, 23 mg/mL). Bu teknik, anti-sitokin scFv'ler haricinde, *E. coli*'de üretilecek diğer rekombinant proteinlerde de kullanılabilir. Üretim sonrası immobilize metal afinite kromatografi (IMAC) ile saflaştırılan scFv'lerin SDS-PAGE, Western Blot ve ELISA ile karakterizasyonları yapılmış; sonrasında ilk etapta AuNp ile işaretlenmiş ve yatay akışlı immünosensörler üretilmiştir. Test bölgesinde non-spesifik bağlanmanın görülmesi sebebiyle ELISA tabanlı testlerin üretimi tercih edilmiştir.

Sonuç olarak, sitokin ölçümü için kullanılan ticari mAb-temelli kitlerde genel olarak kullanılan ELISA yönteminde mAb fragmentleri (scFv) kullanılmış, teşhis

limiti (LoD) 49 pg/mL ve $K_d=0,77 \mu\text{M}$ afiniteye sahip stabil testler üretilmiş ve birçok hastalığın tanısında rol oynayabilecek bir biyoteknolojik ürün için literatüre katkı sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Rekombinant antikor, scFv, biyosensör, sitokin, immünoassay

ABSTRACT

PRODUCTION AND GENETIC MODIFICATION OF ANTIBODY FRAGMENTS FOR DEVELOPMENT OF A CYTOKINE DETECTION IMMUNOASSAY

Dilek ŞAHİNBAŞ

Doctor of Philosophy, Department of Bioengineering

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Eda ÇELİK AKDUR

May 2024, 118 pages

Cytokines, which play an important role in the regulation of immune responses and inflammation, are used as biomarkers in the diagnosis of many diseases. During this immune response to pathogens or diseases, cytokine concentrations change rapidly and can lead to a severe condition such as sepsis if not controlled. Therefore, the measurement of cytokine levels is of great importance in early diagnosis and treatment, and sensitive, rapid, and economical tests need to be developed. The most sensitive and specific methods for measuring components in biological samples are immunosensors using antibodies as receptor molecules. Monoclonal antibodies (mAbs), which are used as receptor molecules in biosensors due to their high affinity and specificity, have an important place in diagnosis and treatment; however, their production costs are high. Small, non-glycosylated antibody fragments can be produced in high yield in prokaryotes, reducing the time and cost required. In this context, scFvs, single-chain variable fragments, are small (25 kDa) proteins with similar specificity and affinity to mAbs. Since scFvs can be modified more easily than IgGs due to their size, they can be immobilized on sensor surfaces using different methods. The ability of scFvs to

bind to the surface with higher density and orientation increases the number of functional antigen binding sites, and thus the sensitivity of biosensors can be increased.

The aim of this thesis study is the recombinant production of various anti-cytokine scFvs in *Escherichia coli* (*E. coli*) bacteria, and the development of highly sensitive immunoassays. The main goal was to utilize the advantages of bacterial production (low cost, ease of process control) to produce an easy, rapid, sensitive, and low-cost immunoassay. Anti-TNF α , anti-IL-6, anti-IL1 β , and anti-IFN γ scFvs produced in a limited number of studies had problems regarding yield, recovery, stability, binding activity, and solubility. In order to improve solubility, stability, binding activity, and production yields, the use of *E. coli* SHuffle[®] T7 Express strain was the first target for the production of scFvs in soluble form thanks to its less oxidizing cytoplasmic environment; cloning steps were successfully completed in line with the designs of the gene cassette. As a result of optimizations at the gene and process level, low protein solubility and low purification yields, which are common in bacterial recombinant protein production, were obtained; to solve the problem, active protein was obtained from inclusion bodies with sarcosyl. This method has the advantage of obtaining protein in higher yields without the use of denaturing agents and laborious experiments such as refolding. The yield of protein production from inclusion bodies was 8-10 times higher than that from the soluble fraction, and scFvs were obtained with high yield and purity compared to the literature (>95% purity, 23 mg/mL). In addition to anti-cytokine scFvs, this technique can also be used for other recombinant proteins to be produced in *E. coli*. Following expression, scFvs purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) were characterized by SDS-PAGE, Western blot, and ELISA, and then initially labeled with AuNp and lateral flow immunosensors were produced. Due to non-specific binding at the test site, ELISA-based assays were preferred.

As a result, mAb fragments (scFv) were used in the ELISA method often employed in commercial mAb-based kits for cytokine measurement. Stable tests

with a limit of detection (LoD) of 49 pg/mL and an affinity of $K_d=0.77 \mu\text{M}$ were produced and contributed to the literature for a biotechnological product that can play a role in the diagnosis of many diseases.

Keywords: Recombinant antibody, scFv, biosensor, cytokine, immunoassay

TEŞEKKÜR

Danışman hocam Doç. Dr. Eda Çelik Akdur'a, doktora eğitimim süresince gelişimimi sağlayan her türlü akademik ve manevi katkısı, desteği ve yol göstericiliği için,

Prof. Dr. Halil Murat Aydın ve Doç. Dr. Açelya Yılmaz Aktuna'ya tez izleme komitemde bulunmayı kabul ettikleri, tezime ve motivasyonuma yaptıkları büyük katkıları için,

Dr. Öğr. Üyesi İlkay Koçer Kuloğlu'na karşılaştığım her türlü sorunun çözümüne vakit ayırdığı, bilimsel konularda düşünme, tartışma, konuşma şansını sağladığı için,

Tüm Laboratuvar 17 ekibine ve ekibe katkı sağlayan tüm stajyer öğrencilerimize, doktora yolculuğuna beraber başladığımız arkadaşım Çağıl Zeynep Süngü Akdoğan'a, Bome Trivitron ailesine, müdürüm Günce Bayram Severoğlu nezdinde tüm Ar-Ge ekibine kıymetli destekleri için,

Sevgili ev arkadaşım ve kuzenim Sema Şahinbaş'a stresli ve zor bir süreçte sabrı ve hoşgörüsü için, canım arkadaşlarım Bahar Bakar ve Gamze Azer Benlioğlu'na 15 yıllık dostlukları, muhabbetleri ve destekleri için,

Müstakbel eşim Yunus Gören'e, tezim süresince benimle birlikte uykusuz kaldığı, akademide ve hayatta en büyük destekçim olarak bana eşlik ettiği için,

Hayattaki en büyük şansım aileme, her adımımı cesaretle atmamı sağladıkları ve her zaman arkamda oldukları için sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak, 121M179 no'lu 1002 projesi ile TÜBİTAK'a ve FHD-2022-20221 no'lu BAP projesi ile Hacettepe Üniversitesi'ne tez çalışmama sağladığı maddi destek için, 100/2000 Doktora bursu için YÖK'e ve destekleriyle eğitimime katkı sağlayan Tolga Akertek, Neslihan Aydınoglu, Derya Acil Ekşi, Dilay Yalçın, Murat Öрге, Deniz Kayasu, Aslı Ensari Sel, Göksu Çalı, Sinem Gürün, İrem Çuvalcioğlu, Özay Yarkın, Merve Keskin, Haydar Yaycıoğlu, Zeynep Erman, Eda Canpolat, Pınar Dilek, Seda Gürsoy'a teşekkürlerimi sunarım.

Dilek ŞAHİNBAŞ

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sitokinler	3
2.2. Monoklonal Antikorlar	6
2.3. Antikor Fragmentleri ve Tek Zincirli Antikor Fragmentleri (scFv)	8
2.4. Antikor Mühendisliği ve Rekombinant DNA Teknolojisi	12
2.4.1. İnküzyon Cisimciklerinden (IB) Çözünür Protein Eldesi	14
2.5. Biyosensörler ve Sitokin Ölçümü	16
2.6. Antikor Tabanlı Biyosensörler (İmmünosensörler)	20
2.7. Kağıt Tabanlı İmmünosensörler	21
2.8. Enzim Bağlı İmmünosorbent Assay (ELISA)	24
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	29
3.1. Kullanılan Bakteriler, Plazmitler ve Kimyasallar	29
3.2. Rekombinant ScFv için Vektör Hazırlığı ve Klonlama Çalışmaları	29
3.2.1. Agaroz Jel Ekstraksiyonu	31
3.2.2. PCR Optimizasyonu	31
3.2.3. Ekleme Reaksiyonu (Ligasyon)	32
3.2.4. <i>E. coli</i> 'nin CaCl ₂ Metodu ile Transformasyonu	33
3.2.5. DNA Dizi Analizi	33
3.3. DNA Sekansı Doğrulanmış Vektörlerin Konakçı Hücreye Aktarılması ve Scfv'lerin Küçük Ölçekte Üretimi	34
3.4. Çözünür/Çözünmez Fraksiyonların Ayrımı ve Çözünürleştirme İşlemi	34

3.5. Üretilen scFv'lerin Saflaştırılması ve SDS-PAGE Jel Analizi.....	35
3.5.1. His-Afinite Saflaştırma.....	35
3.5.2. Toplam Protein Tayini	36
3.5.3. SDS-Poliakrilamid Jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western Blot Analizi	36
3.6. Rekombinant Scfv'lerin AuNp ile İşaretlenmesi.....	36
3.7. Yatay Akışlı Kağıt İmmünoşansörlerin Hazırlanması	37
3.7.1. Numune Pedi Hazırlığı	38
3.7.2. Reaksiyon Pedi Hazırlığı.....	38
3.7.3. Test Bölgesinin Hazırlanması	38
3.8. Enzim Bağlı İmmünoşansör Deneyi (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)	39
3.8.1. Dolaylı-ELISA.....	39
3.8.2. Sandviç ELISA	39
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	41
4.1. Anti-TNF α ve Anti-IL6 Scfv Gen Dizilimlerinin, Vektör ve Primerlerin Tasarımı ve Klonlama Çalışmaları	41
4.2. Anti-IFN γ -scFv ve Anti-IL1 β -scFv'lerinin Gen Kasetlerinin Tasarlanması ve Vektörlerin Oluşturulması.....	44
4.3. Scfv'lerin Küçük Ölçekte Üretimi, Saflaştırılması ve SDS-PAGE Jel Analizi	46
4.3.1. Üretim Sıcaklığı Optimizasyonu	46
4.3.2. İnkübasyon Süresi Optimizasyonu	49
4.3.3. Üretim Ortamı ve Suş Seçimi.....	50
4.3.4. Periplazmik Bölgede Çözünür Formda ScFv Üretimi	53
4.3.5. İndükleyici Derişimi ve Mg ⁺² İyonu Etkisi.....	58
4.4. İnküzyon Cisimciklerinden (IB) Çözünür Protein Eldesi.....	61
4.5. IB'den İzole Edilen ScFv'lerin Karakterizasyonu	64
4.6. Anti IL6-cys-scFv, Anti-IL1 β -cys-scFv ve Anti-IFN γ -cys-scFv'lerin Üretimi ve Karakterizasyonu	66
4.7 Rekombinant scFv'lerin AuNp ile İşaretlenmesi	69
4.8 Yatay Akışlı Kağıt İmmünoşansörlerin Üretimi	71
4.8.1 Test Bölgesi Scfv Derişiminin Belirlenmesi	71

4.8.2 Non-spesifik Bağlanmayı Azaltmaya Yönelik Yapılan Çalışmalar	73
4.9 ELISA Yöntemiyle Sitokin Ölçümüne Yönelik İmmünoassaylerin	
Hazırlanması	76
4.9.1. Dolaylı-ELISA	76
4.9.2. Sandviç ELISA.....	76
4.10 Üretim Sonrası Testler.....	79
4.10.1 Hassasiyet.....	79
4.10.2. Afinite	80
4.10.3 Stabilite.....	82
4.10.4. Özgüllük (Spesifite/Çapraz Reaktivite).....	83
5. SONUÇLAR.....	85
6. KAYNAKLAR	90
EKLER.....	101
EK 1 – Tez kapsamında üretilen scFv’lerin DNA sekansları.....	101
EK 2 – Anti-IL6-scFv mRNA ikincil yapıları.....	103
EK 3 – Farklı çözünürleştirme yöntemleri ile elde edilen Anti-IL6-scFv SDS- PAGE görüntüleri	105
EK 4 – Anti-Her2-scFv çözünür ve çözünmez fraksiyonlarının bağlanma aktivitelerinin karşılaştırılması	108
EK 5 – Anti-IL6-scFv disülfid bağı oluşumu kontrolü için Ellman testi.....	109
EK 6 – 10 µg/mL anti-IL6-scFv ile yapılan sandviç ELISA bağlanma aktivitesi sonuçları	110
EK 7 – Hassasiyet hesaplamaları için regresyon analizi örneği.....	111
EK 8 – Çevrimiçi “curve fitting” programı ile maksimum absorbansın yarısındaki scFv derişiminin belirlenmesi	112
EK 9 – Tezden Türetilmiş Yayınlar	113
EK 10 – Tezden Türetilmiş Bildiriler.....	114
EK 11 – Tezden Türetilmiş Projeler	115
EK 12 – Tez Çalışması Orjinallik Raporu	116
ÖZGEÇMİŞ	117

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. IgG antikorunun yapısı ve antikor fragmentleri [22]	7
Şekil 2.2. Papain ve pepsin enzim kesim bölgeleri ve kesim sonrası oluşan antikor fragmentleri [28].	9
Şekil 2.3. İnklüzyon cisimlerinden çözünür protein eldesi yöntemleri ([46]'den modifiye edilmiştir).....	15
Şekil 2.4. Biyosensörlerin sınıflandırılması [58].....	17
Şekil 2.5. Sandviç (A) ve yarışmalı (B) yatay akışlı testlerin şematik gösterimi [76].	24
Şekil 2.6. ELISA çeşitleri ve çalışma prensipleri [81].....	25
Şekil 3.1 Klonlama prosedürünün şematik gösterimi ([90]'dan esinlenilmiştir) .	30
Şekil 3.2. A: Yatay akışlı immünokromatografik sensor temsili [93] B: Tez kapsamında hazırlanan immünosensörler.....	37
Şekil 4.1 Tasarlanan A: klonlama, B: ekspresyon vektörleri.....	41
Şekil 4.2. Agaroz jel elektroforez L: 1 kb DNA Marker, 1 ve 2: çift kesilen pET28a (kalıp, 5230 bp), 3 ve 4: çift kesilen pUCIDT (klonlama vektörü, 2705 bp).	42
Şekil 4.3. ScFv-Cys ekspresyon kaseti	42
Şekil 4.4. Agaroz jel elektroforez L: 100 bp DNA Marker, 1: anti-TNF-scFv (783 bp), 2: anti-IL6-scFv (762 bp). A: Bağlanma sıcaklığı (annealing) 50°C, süre 60sn. B: Bağlanma sıcaklığı (annealing) 1: 52°C, 2: 48 °C, süre 55 sn.	43
Şekil 4.5. Restriksiyon kontrolü agaroz jel elektroforezi. L: 1 kb DNA Marker, 1 ve 8: Kesilmemiş kontrol plazmidi, 2-4: anti-TNF α -scFv (783 bp), 5-7: anti-IL6-scFv (762 bp), 9-11: anti-TNF α -cys-scFv (795 bp), 12-14: anti-IL6-cys-scFv (774 bp).....	44
Şekil 4.6. Kesim reaksiyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü; A: pet28a-anti-IL1 β -scFv B: pet28a-anti-IFN γ -scFv vektörlerinin oluşturulması için, L: 1 kb DNA Standardı, 1: Kesilmiş şablon DNA (5989 bp), 2: Kesilmiş pUCIDT klonlama vektörü (3547 bp).	45
Şekil 4.7. Restriksiyon kontrolü ile ideal koloni seçimi için yapılan agaroz jel elektroforezi görüntüleri A: pet28a-anti-IL1 β -scFv (5989bp-779 bp) B: pet28a-anti-IFN γ -scFv (5989bp-756 bp) vektörlerinin oluşturulması	

- için L: 1 kb DNA Standardı, 1: 1. koloni, 2: 2. koloni, 3: 3. Koloni, 4: 4. Koloni..... 46
- Şekil 4.8. Anti-TNF α ve anti-IL6-scFv 30°C'de yapılan üretimin SDS-PAGE analizi. A: Çözünür ve B: Çözünmez fraksiyon L: Protein Marker, 1 ve 2: Anti-TNF α -scFv, 3 ve 4: anti-IL6-scFv, 5: anti-TNF α -cys-scFv, 6 ve 7: anti-IL6-Cys-scFv, 8: pet28a..... 47
- Şekil 4.9. Anti-TNF α ve anti-IL6 scFv 16°C'de yapılan üretimin A: çözünür ve B: çözünmez fraksiyon SDS-PAGE analizi L: Protein Marker, 1 ve 2: anti-TNF α -scFv, 3: anti-IL6-scFv (4.saat), 4 ve 5: anti-IL6-scFv, 6: anti-TNF α -Cys, 7 ve 8: anti-IL6-cys-scFv, 9: pet28a 47
- Şekil 4.10. Anti-TNF α ve anti-IL6 scFv 16°C'de yapılan üretimin Western Blot analizi. L: Marker, 1 ve 2: anti-TNF α -scFv, 3 ve 4: anti-IL6-scFv, 5: anti-TNF α -cys-scFv, 6 ve 7: anti-IL6-cys-scFv, 8: pet28a, 9: anti-IL6-scFv-IF..... 48
- Şekil 4.11. Anti-TNF α ve anti-IL6-scFv inkübasyon süresi denemesi. A: Çözünür fraksiyon L: Protein Marker, 1-3: anti-TNF α -scFv (sırasıyla 24,30 ve 42. saat), 4-6: anti-IL6-scFv (sırasıyla 24,30 ve 42. saat), 7: pet28a, 8: anti-TNF α -scFv (16. sa), 9: anti-IL6-scFv (16.sa). B: Çözünmez fraksiyon. L: Marker, 1-4: anti-TNF α -scFv (sırasıyla 16, 24,30 ve 42. saat), 5-8: anti-IL6-scFv (sırasıyla 16, 24,30 ve 42. saat), 9: pet28a..... 49
- Şekil 4.12. Anti-TNF α -scFv suş seçimi A: çözünür ve B: çözünmez fraksiyon SDS-PAGE analizi L: Protein Marker, 1: pet28a (LB), 2: pet28a, 3: SHuffle (LB), 4: SHuffle (TB), 5: BLR(DE3) (TB), 6: Origami2 (TB), 7: BL21(DE3) (TB), 8: BL21Star(DE3) (TB)..... 51
- Şekil 4.13. Anti-IL6-scFv suş seçimi A: çözünür ve B: çözünmez fraksiyon SDS-PAGE analizi. L: Protein Marker, 1: pet28a (LB), 2: pet28a (TB), 3: SHuffle (LB), 4: SHuffle (TB), 5: BLR(DE3) (TB), 6: Origami2 (TB), 7: BL21(DE3) (TB), 8: BL21 Star(DE3) (TB)..... 51
- Şekil 4.14. Anti-TNF α ve anti-IL6 scFv farklı suş seçimi Western Blot analizi. A: 1-5: anti-IL6-scFv (sırasıyla BLR(DE3)-IF, BLR(DE3), BL21(DE3), Origami2, BL21(DE3)Star, L: Ladder, 7-9: anti-TNF α -scFv (sırasıyla BL21(DE3)-IF, BL21(DE3), Origami2, 10: pet28a..... 52

- Şekil 4.15. Anti-IL6-scFv'nin A: *E. coli* SHuffle® T7 Express ve B: BLR(DE3) (sağ)'te üretim sonrası saflaştırma deneyi SDS-PAGE analizi. L: Marker, CL: Hücre lizati, FT: Flowthrough, W: yıkama, E: elüsyon . 53
- Şekil 4.16. PCR ürünleri agaroz jel görüntüsü. A: 10 ng/µL, 1: anti-IL6-scFv, 2:anti-TNFα-scFv. B: 1 ve 2: 350 ng/µL template IL-6 scfv, 3: 10 ng/µL template anti-TNFα-scFv, 4: 100 ng/µL template anti-TNFα-scFv. C: 350 ng/µL template 1: anti-IL6-scFv, 2: anti-TNF-scFv 54
- Şekil 4.17. Restriksiyon enzimleriyle kesim sonrası agaroz jel görüntüsü. 1: anti-IL6-scFv, 2: anti-TNF-scFv, L: 1 kb DNA Marker, 3: kalıp DNA 54
- Şekil 4.18. Restriksiyon kontrolü agaroz jel görüntüsü. L: 1 kb DNA Marker, 1: Kesilmemiş anti-TNFα-ssMBP-scFv plazmidi, 2 ve 3: Kesilen anti-TNFα-ssMBP-scFv plazmid , 4: Kesilmemiş anti-IL6-ssMBP-scFv plazmid, 5 ve 6: Kesilen anti-IL6-ssMBP-scFv plazmid..... 55
- Şekil 4.19. Anti-IL6-ssMBP-scFv ve anti-IL6-scFv üretim sonrası A: SDS-PAGE ve B: Western Blott görüntüsü. IF: BLR(DE3)-IL6-scFv-insoluble fraction, L: Protein Marker, 1: pet28a, 2: BL21(DE3)-anti-IL6-ssMBP-scFv, 3: BLR(DE3)-anti-IL6-ssMBP-scFv, 4: BL21(DE3)-anti-IL6-scFv, 5: BLR(DE3)-anti-IL6-scFv, 6: BL21(DE3)-anti-IL6-ssMBP-scFv, 7: BLR(DE3)-anti-IL6-ssMBP-scFv, 8: pet28a..... 56
- Şekil 4.20. Anti-TNFα-ssMBP-scFv ve anti-TNFα-scFv üretim sonrası A: SDS-PAGE ve B: Western Blot görüntüsü L: Protein Marker, 1: pet28a, 2: BL21(DE3)-anti-TNFα-scFv, 3: BL21(DE3)-anti-TNFα-ssMBP-scFv, 4: BLR(DE3)-TNFα-scFv, 5: BLR(DE3)-anti-TNFα-ssMBP-scFv, 6: BL21(DE3)-anti-TNFα-scFv, 7: BL21(DE3)-anti-TNFα-ssMBP-scFv 56
- Şekil 4.21. Afinite saflaştırma sonrası sitoplazmik (A), periplazmik (B) ve hücre dışı (C) fraksiyonlardan elde edilen çözünür anti-IL6 scFv'nin SDS-PAGE analizi. Tüm yıkama ve elüsyon örnekleri toplam hacime göre normalize edilmiştir. CL: Hücre lizati, FT: Kolondan ilk çıkan (Flowthrough), W: Yıkama, E: Elüsyon..... 57
- Şekil 4.22. Anti-IL6-scFv üretimine indükleyici derişimi etkisi 59
- Şekil 4.23. Anti-IL6-scFv üretimine Mg⁺² iyonu derişimi etkisi SDS-PAGE (sol) ve Western Blot (sağ) analizi. L:Protein Marker, 1: Kontrol, 2: 0,5 mM MgCl₂, 3: 10 mM MgCl₂..... 60

Şekil 4.24. 10 mM MgCl ₂ ile yapılan üretim sonrası saflaştırma denemesi SDS-PAGE analizi.....	60
Şekil 4.25. Farklı çözünürleştirme yöntemleriyle elde edilen çözünür anti-IL6 scFv SDS-PAGE analizi: (A) Denatüre edici (6 M GuHCl), (B) Ilımlı (Mild) (pH 12) ve (C) Denatüre Etmeyen Çözünürleştirme (%1 w/v NLS). Örnekler toplam protein ile normalize edilmiştir. FT: Flowthrough, W: Yıkama, E: Elüsyon, SF: Çözünür fraksiyon; NLS: N-lauril sarkozin ile çözüldürülmüş protein [43].	62
Şekil 4.26 Saflaştırılmış anti-IL6-scFv bağlanma aktivitesi	64
Şekil 4.27 İndirgenmiş (+BME) ve indirgenmemiş (-BME) anti-IL6 scFv'nin SDS-PAGE analizi. Örnekler toplam proteine göre normalize edilmiştir. Üstteki ok dimerize anti-IL6-scFv'yi, alttaki ok ise disülfid bağa sahip anti-IL6-scFv'yi göstermektedir.	65
Şekil 4.28. Üretilen rekombinant scFv'lerin çözünür (SF) ve çözünmez fraksiyonları (IF) saflaştırma sonrası SDS-PAGE analizi.	67
Şekil 4.29. Üretilen rekombinant scFv'lerin çözünür (SF) ve çözünmez fraksiyonları (IF) saflaştırma sonrası Western Blot analizi.	67
Şekil 4.30. Saflaştırılmış scFv'lerin ticari antijenlerine bağlama aktivitesi (ELISA).	68
Şekil 4.31. Anti-IL6-scFv ve anti-IL6-cys-scFv'nin ticari antijenine bağlanma aktiviteleri.....	69
Şekil 4.32. AuNp ile anti-IL6-scFv ve anti-IL6-cys-scFv bağlanma UV-Vis spektra ölçümleri	70
Şekil 4.33 Altın nanopartiküle bağlanan IL6-scFv stabilite testi. Blank: Yüzeyine scFv bağlanmamış AuNp.....	71
Şekil 4.34. Test bölgesindeki scFv derişiminin sinyal şiddetine etkisi.....	72
Şekil 4.35. Test grubu (A) ve kontrol grubu (B) örneklerinde sinyal yoğunlukları	72
Şekil 4.36. AuNp yüzeyine (A) 400 µg (B) 100 µg anti-IL6-cys-scFv bağlama .	73
Şekil 4.37. Konjugat tampon değişikliğinin kontrol (C) ve test (T) gruplarında sinyal şiddetine etkisi	74
Şekil 4.38. AuNp-scFv bloklama işleminin sinyal şiddetine etkisi. (1) Bloklama yok, (2) %1 lizozim bloklama, (3) %1 kazein bloklama, (4) %1 PEG bloklama.	75

Şekil 4.39. Farklı derişimlerde IL6 antijen ve Anti-IL6-scFv'nin bağlanma aktivitesinin ELISA ile ölçümü	76
Şekil 4.40. Farklı yakalama antikoru derişimlerinde anti-IL6-scFv bağlanma aktivitesi	77
Şekil 4.41. Farklı tespit antikoru (Anti-IL6-scFv) derişimlerinde bağlanma aktivitesi	78
Şekil 4.42. Değişen antijen derişimlerinde ELISA immünoassay	78
Şekil 4.43. Lineer ölçüm aralığı	80
Şekil 4.44 Farklı antijen derişimleri ile kaplanan plaklarda scFv bağlanma aktivitesi	81
Şekil 4.45 Anti-IL6-scFv elüsyon ve tuzdan arındırılmış örneklerin gün bazında (0, 3, 7, 14) stabilite kontrolü amacıyla yapılan SDS-PAGE analizi. Örnekler toplam protein normalize yüklenmiştir. E: Elüsyon, DS: Tuzdan arındırılmış, RT: Oda sıcaklığı	82
Şekil 4.46 ELISA imünoassay stabilite testi	83
Şekil 4.47 Anti-IL6-scFv'nin IL6 ve IL1 sitokinlerine bağlanma aktivitesi	83

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. FDA onaylı antikor fragmentleri [31, 32].	10
Çizelge 2.2. MAb ve antikor fragmentlerinin ökaryotik ve prokaryotik sistemlerde üretimlerinin karşılaştırılması	13
Çizelge 2.3. Sitokin biyosensörü ile ilgili bazı çalışmalar ve kullanılan yöntemler	18
Çizelge 2.4. Ticari mAb temelli sitokin tayini kit örnekleri [67].....	19
Çizelge 3.1. PCR reaksiyon içeriği	31
Çizelge 3.2. PCR reaksiyon koşulları	32
Çizelge 3.3. Anti-IL6-scFv ve anti-TNF α -scFv için ligasyon reaksiyon koşulları	32
Çizelge 3.4. IFN ve IL1 için ligasyon reaksiyon koşulları	33
Çizelge 3.5. Çözünürleştirme işlemi için kullanılan tamponlar	35
Çizelge 4.1. ScFv genleri klonlama çalışmaları için tasarlanan primerler	43
Çizelge 4.2. Anti-IL6-scFv ile yapılan üretim verimleri	58
Çizelge 4.3. Farklı çözünürleştirme yöntemleri ile geri kazanılan çözünür ve saf scFv protein verimleri [43].....	63
Çizelge 4.4. Konjugat tamponlar ve içerikleri	74

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

BSA	Bovin Serum Albumin
BME	Beta-merkaptöetanol
CIAP	Calf intestinal alkaline phosphatase
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTNB	Ellman reaktifi, 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)
EB	Elüsyon Tamponu
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
ELISA	Enzim Bağlı İmmünosorbent Assay
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FT	Flow-through
HRP	Horseradish peroxidase
IB	İnklüzyon cisimi (body)
IF	Çözünmez fraksiyon
IPTG	İzopropil tiyogalaktozit
Kan	Kanamisin
LB	Luria Bertani broth
NLS	N-Lauroil Sarkozin
OD	Optik densite
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PBST	Tween-20 içeren fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ScFv	Tek Zincirli Antikor Fragmenti
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SF	Çözünür fraksiyon
TB	Terrific Broth

TBE

Tris-Borate-EDTA tamponu

1. GİRİŞ

Sitokinler, boyutları 8-40 kDa arasında değişen, bağışıklıkta önemli araçlar olarak hareket eden, çözünebilir sinyal proteinleridir. Başta bağışıklık hücreleri veya lökositler olmak üzere neredeyse tüm çekirdekli hücreler tarafından inflamatuvar bir uyarana yanıt olarak salgılanırlar. Bakteriyel/viral enfeksiyon, kanser, otoimmünite dahil olmak üzere birçok hastalık veya fizyolojik duruma bağlı immün tepkinin bir parçası olarak derişimleri değişir [1]. Sitokinler, birçok hastalığın kritik göstergeleridir ve sitokin seviyelerinin ölçümü bu hastalıkların mekanizmaları, ilerleyişi ve tedaviye yanıtı hakkında bilgi verir. Örneğin, IL-12 ve IFN- γ MS hastalığında ilk yükselen ve diğer sitokinlerin üretimini teşvik eden sitokinlerken, IL-4, IL-5, ve IL-13 astım ve alerjik reaksiyonlarda, IL-1 α ve IL-1 β Alzheimer'da, IFN α Lupus'da, IL-1, IL-6, ve TNF- α romatoid artirit, sepsis ve birçok kanser türünde indikatör rolü oynar [2]. IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , ve interferon (IFN)- γ majör proinflamatuvar sitokinlerdir ve inflamatuvar yanıtın oluşmasında kritik öneme sahiplerdir. Kritik işlevleri göz önüne alındığında, sitokin seviyelerinin zamanında ve doğru ölçümü, tanı ve tedavide büyük önem arz etmektedir [3, 4].

Yüksek özgüllük ve hassasiyete sahip mAb'lar, tanı ve tedavide yaygın olarak kullanılan proteinlerdir. Fonksiyonel olarak iki bağlanma bölgesi (Fab), bir kristalize fragmentten (Fc) meydana gelmektedir. Bağlanma bölgeleri ağır ve hafif zincirlerden oluşur ve antikorun değişken bölgesidir (Fv) [5]. Fv'ler stabil değildir; bu nedenle, stabil Fv antikorların geliştirilmesi amacıyla fonksiyonel tek zincirli antikor fragmanları (scFv) geliştirilmiştir [6]. Küçük boyutları sayesinde yüzeye direkt ve yüksek yoğunlukta immobilize edilebilirler ve bu sayede biyosensör hassasiyetlerinin arttırılmasını sağlayabilirler [7].

Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)'nin monoklonal antikor temelli tedaviler için onayladığı antikorların %50'den fazlası inflamasyon ve otoimmün hastalıkların tedavisine yönelik antikorlardır ve onaylanan ilaçların %50'si sitokin ligantlardır. Antikor fragmentleri, antikor çalışmalarının sadece %6'sını oluşturmaktadır [8]. Fakat tedavide olduğu kadar hastalıkların, bakteriyel ve viral enfeksiyonların, enflamasyon ve sepsisin teşhisi için de önemli olan bu ligantların

ölçümü için geliştirilen yöntemlerde öncelikli olarak, tanıyıcı molekül niteliğinde mAb'lar kullanılmıştır. Öte yandan, mAb'lara kıyasla, scFv'lerin de en az %50 seviyelerinde antijenine bağlanma aktivitesi gösterebildiği [9, 10], ancak üretim maliyetlerinin daha düşük olduğu düşünüldüğünde [11, 12] immünoassaylerin scFv kullanılarak geliştirilmesi önem arz etmektedir.

Bu tez kapsamında, proinflamatuvar sitokinlere özgü ekonomik immünoassaylerin geliştirilmesi için rekombinat scFv'lerin üretilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk aşamada, tanıyıcı biyomolekül olarak kullanılacak çeşitli antikor fragmentleri üretilmiştir. Pro-inflamatuvar sitokinlere yönelik scFv'lerin *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterisinde rekombinant üretilmesi ve sitokin ölçümü yapılabilmesine yönelik tamamen özgün bir çalışma olan bu tezde, bakteriyel üretimin avantajları (düşük maliyet, proses kontrol kolaylığı) kullanılarak bir immünoassay geliştirilmiştir. Tez kapsamında protein mühendisliği teknikleri ile geliştirilen anti-IL6-scFv antikor fragmanları literatüre kazandırılmış, birçok hastalığın tanısında büyük öneme sahip bir biyoteknolojik ürün için literatüre katkı sağlanmıştır. Anti-IL1 β ve anti-IFN γ scFv'lerinin rekombinat üretimi, modifikasyonu ve her üç antikor fragmentinin de ELISA immünoasseylerde kullanımı çalışmaları sonucunda elde edilen veriler, rekombinat anti-sitokin scFv üretimi ile tanıyıcı molekülün ve buna bağlı olarak biyosensör üretim maliyetlerinin azaltılması, ileriye yönelik hızlı tıbbi tanı kitlerinde ve biyosensör sistemlerinde kullanılmaya aday scFv fragmentlerinin üretilmesi çalışmalarına ve bu konuda know-how geliştirilmesine katkı sağlamıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sitokinler

Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, enfeksiyöz hastalıklar, özellikle düşük gelirli ülkelerde, başlıca ölüm nedenidir. Sitokinler ise enfeksiyon sırasında üretilen ve inflamasyon, doku onarımı, fibrosis gibi patolojik durumlarda immün sistemin çalışması için gerekli olan küçük proteinlerdir (<40 kDa). Fakat kontrolsüz bir immün yanıt durumunda fazla miktarda salgılanmaları, "sitokin fırtınası" olarak adlandırılan sistemik inflamasyona sebep olur [1-3]. Kontrolsüz bir sistemik inflamatuvar reaksiyon olan sitokin fırtınası ya da sitokin salım sendromu (Cytokine Release Syndrome (CRS)) virüs ya da bakteriler gibi patojenler tarafından tetiklendiği gibi, organ nakilleri, bazı ilaçlar (monoklonal antikor ya da T-hücre terapileri (CAR-T)) ya da sistemik hastalıklar (romatoid artrit, SLE) ve kanser sebebiyle de olabilir [4].

Köken hücrelerine veya etki mekanizmalarına göre, sitokinler interleukinler, lenfokinler, monokinler, interferonlar, koloni uyarıcı faktörler şeklinde ayrılırlar; pro-inflamatuvar sitokinler ve anti-inflamatuvar sitokinler olarak gruplandırılırlar. İmmün sistem, vücut için zararlı ve yabancı ajanların varlığında verdiği inflamator yanıtla bu ajanların eliminasyonunu, hasarın onarılmasını ve son aşamada bazal duruma dönülmesini sağlar. Bu durumda; immün hücrelerin iletişimi ve koordinasyonu, pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar sitokinlerin üretimi ve dengesi ile sağlanır. Bu mekanizmanın herhangi bir basamağındaki sorun, sitokinlerin aşırı üretimine ve sistemik bir hasara sebep olabilir. COVID-19 pandemisiyle birlikte yapılan birçok çalışma, sitokin fırtınasında görevli sayısız sitokinin görev aldığını, fakat interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, tümör nekroz faktörü (TNF)- α , ve interferon (IFN)- γ pro-inflamatuvar sitokin seviyelerinin bu yanıtın gelişmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir [2, 5].

Sitokinler, kan, interstisyel sıvılar (ISF), beyin omurilik sıvıları (CSF), tükürük, ter, gözyaşı, bağırsak, idrar ve dışkı gibi farklı vücut sıvılarında yaygın olarak bulunan bulunan moleküllerdir. Sağlıklı insanların serumundaki sitokin seviyeleri pM

mertebesindedir [6]. Farklı hastalıklarda değişiklik gösterse de, sitokin fırtınası gelişiminde kademeli bir inflamatuvar yanıt oluşturan pro-inflamatuvar sitokinlerin seviyeleri ağır ya da kritik durumdaki enfekte hastalarda 1000 kata kadar yükselir. Bu artış vesilesiyle, stokinler hastalıkların tespitinde ve ilerleyişinde biyobelirteç olarak kullanılabilirler [7, 8].

İnflamasyonun başlangıcı ve devamında görev alan bir sitokin olan TNF- α , farklı inflamatuvar hastalıklarda önemli rol oynar. Bu sebeple bu hastalıkların tedavisinde ilgi gören bir hedeftir. TNF- α 'nın hedeflenmesinde de monoklonal antikolar en iyi adaylardır. Monoklonal antikor kullanılarak geliştirilen ilk başarılı sitokin hedefli tedavi 1990'ların başında romatoid artirid tedavisi için geliştirilmiştir. Bu antikolar, sepsis durumunda TNF'yi hedeflemektedir. Bu tarihten sonra TNF-bloklayan biyolojik ilaçlar romatoid artirid dışında birçok hastalık için de kullanılmaya başlanmıştır. Infliximab (Remicade®), adalimumab (Humira®), golimumab (Simponi®), ve certolizumab pegol (Cimzia®), TNF- α inhibisyonunda klinikte kullanılan monoklonal antikolardır. Anti-TNF- α antikolarının kullanımı, inflamatuvar hastalıkların tedavisinde büyük ölçüde kabul görmektedir; ancak bunlar, yüksek üretim maliyeti, immünojenite ve düşük stabilite gibi dezavantajlara sahiptir. Bu problemlerin çözümünde ise antikor fragmentleri önemli bir alternatif olarak görülmektedir [9, 10].

Enfeksiyon ve doku yaralanmaları durumlarında ilk üretilen sitokinlerden biri olan IL-6, immün reaksiyonların uyarılmasını sağlayarak kronik inflamasyon ve otoimmünitede önemli rol oynar ve konak savunmasına katkıda bulunur [11]. IL-6'nın overekspresyonu romatoid artirid, osteoporoz, Castleman hastalığı gibi hastalıklara sebep olduğundan, monoklonal antikolarla anti-sitokin terapi uygulanarak, IL-6'nın nötralizasyonu sağlanır. Siltuximab (Sylvant®), sirukumab (Plivensia™), olokizumab, clazakizumab ve satralizumab IL-6 sinyal yolağının inhibisyonunu sağlayan antikolardır. Siltuximab 2014 yılında Castleman hastalığı tedavisi için FDA onayı almıştır. Faz çalışmaları devam eden diğer monoklonal antikoların güvenilirliği henüz kanıtlanmadığından klinikte kullanılmamaktadır. IL-6 sinyal yolağının bloklanması alternatif yolu, IL-6

reseptörünü (IL-6R) hedef alan antikordur. Tocilizumab (Actemra®) ve sarilumab (Kevzara®) FDA tarafından onaylanan ve romatoid artirid tedavisinde kullanılan anti-IL-6R antikordur. Ayrıca, IL-6R inhibisyonu için kullanılan bu antikordun bazı kanser türlerinin ve son zamanlarda COVID-19'un tedavisi için de klinik denemeleri yapılmaktadır [12].

IL1- β immün yanıt ve bağışıklıkta önemli diğer pro-inflamatuvar sitokindir. IL1 ailesi içinde en sık çalışılan ve en iyi karakterize edilen üyelerinden biridir. Özellikle monositler ve makrofajlar tarafından salgılanan IL1- β , 31 kDa'luk inaktif prokürsör olarak üretilir ve kaspaz-1 proteaz tarafından kesilerek aktif formuna getirilir. Artan üretimi, sistemik Juvenil İdiyopatik Artrit (SJIA), Kriyopirin İlişkili Periyodik Sendromlar (CAPS), multipl skleroz gibi birçok otoimmün sendroma sebep olabilmektedir. Canakinumab ve Gevokizumab, IL1- β 'yı hedefleyen monoklonal antikordur. Canakinumab (Ilaris®), 2013 yılında FDA tarafından onaylanmış ve kriyopirin ile ilişkili periyodik sendromların tedavisi için birçok ülkede kullanılmaktadır [13, 14].

IFN- γ immünomodülatör aktiviteye sahip bir pro-inflamatuvar sitokindir. T-hücreleri tarafından salgılanır ve makrofajları aktive ederek TNF- α ve IL-6 gibi diğer inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını sağlar. Antiviral ve antimikrobiyal bağışıklığı düzenleyerek hem kazanılmış hem doğuştan gelen bağışıklıkta görev alır [15]. IFN- γ ve/veya onun indüklediği kemokinlerin artan seviyelerinin hemofagositik lenfositosis (HLH), andaplastikanemi (AA) gelişiminde önemli rol oynar. Emapalumab (Gamifant®), bir anti-IFN γ antikordur ve 2018 yılında FDA tarafından onaylanarak HLH tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır [16].

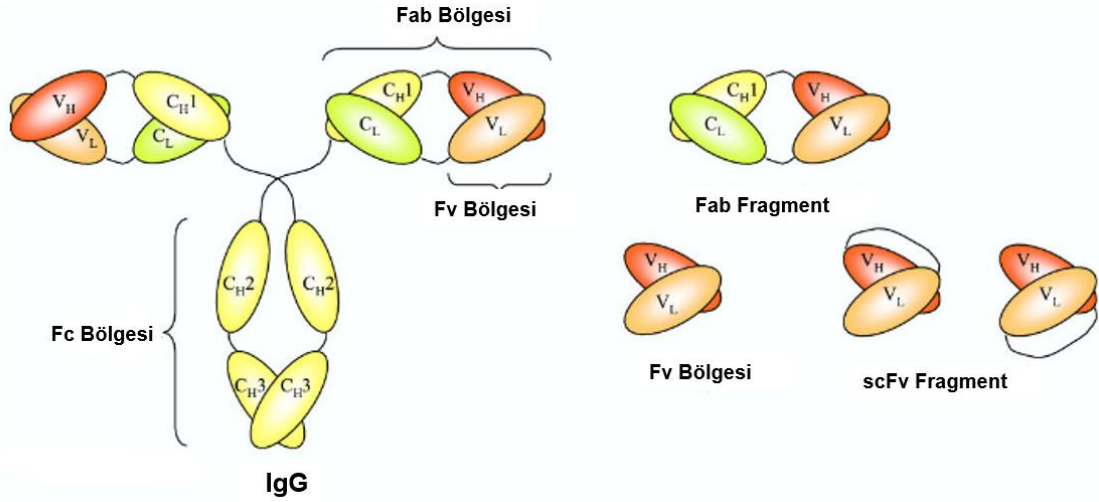
Sitokin seviyelerinde artıştan kaynaklı bu hastalıkların tedavisinde ilgili sitokine yönelik bir yol izlenebilirken, sitokin fırtınasında birçok faktör birlikte rol oynar. Sitokin seviyelerinin ölçümü, hastalığın seyrinin bilinmesi, gerekli tedavinin zamanında uygulanabilmesi ve uygulanan tedavinin etkisinin görülebilmesi açısından önemlidir.

2.2. Monoklonal Antikorlar

Monoklonal antikorlar, %37'lik bir oranla biyofarmasötiklerin ilk sırasında olup; %27 ile aşılar ve %10 ile rekombinant proteinler mAb'ları takip etmektedir. Monoklonal antikorlar, 2022 yılı verilerine göre 145,7 milyar dolarlık bir pazara sahiptir ve 2027'e kadar neredeyse iki kat artarak 248 milyar dolara ulaşması beklenmektedir [17-20].

Tanı ve tedavide yaygın olarak kullanılan antikorların 5 alt sınıfından (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE) serumda en fazla bulunan IgG, yaklaşık 150 kDa molekül ağırlığına sahip bir proteindir. Yapısal olarak 2 ağır (HC) ve 2 hafif (LC) zincirden oluşup, fonksiyonel olarak 3 alt-birime sahiptir: 2 antijen bağlanma bölgesi (Fab) ve bir efektör bölge (Fc, kristalize olabilen kısım). Fab bölgesi, antikorun antijene bağlandığı değişken (V domain-hypervariable) bölgedir; ağır ve hafif zincirin değişken (V_H, V_L) ve sabit (C-domain, C_H, C_L) bölgelerini içerir (Şekil 2.1) [21].

IgG, 2 Fab fragmenti içerir. Bu iki fragment disülfid bağları ile bir arada tutulur (hinge disulfide bridge). Disülfid köprü tiollerini içeren (Şekil 1) fragmentlere Fab' fragmentleri denirken, tiyol fonksiyonel grubu eksik olanlara Fab fragmentleri denir. Fab fragmentinden daha küçük olan bir diğer fragment ise antikor Fv fragmentidir, yalnızca V_H ve V_L alanlarından oluşur. Bu fragmentler, genellikle zayıf olmayan kovalent olmayan etkileşimlerle bir arada tutulurlar.



Şekil 2.1. IgG antikorunun yapısı ve antikor fragmentleri [22]

Ağır ve hafif zincirler yaklaşık 110 amino asit uzunluğundadır. Antikoru sabit bölgesi genel olarak kısa β -tabakaların kovalent olmayan etkileşimlerle bir araya gelmesiyle oluşur. Değişken bölge, yapısal olarak sabit bölgeye benzemekle beraber, antijen bağlanma bölgelerini de içermektedir. Antikoru antijene bağlanmasını açıklayan üç farklı yaklaşım bulunmaktadır: anahtar-kilit, indüklenmiş uyum (induced fit), konformasyonel seçim. Anahtar kilit modelinde, hem antikor hem antijende etkileşim bölgesinde minimum konformasyonel değişim olur. Her iki protein de bağlanma ve bağlanmama durumunda aynı konformasyona sahiptir. İndüklenmiş uyumda ise tersine bağlanma durumunda özellikle CDR (complementarity-determining regions) bölgelerinde konformasyonel değişiklik meydana gelir. Konformasyonel seçimde ise antikoru bağlanması antijenin mikro çevresine bağlı olarak aktive olmasına bağlıdır. Bu bölgelerde yapılan değişiklik, antikor-antijen etkileşimi ile antikoru özgüllük ve afinitesini etkiler [23].

İlk monoklonal antikor (muromonab-CD3 (OKT3)) 1975 yılında hibridoma teknolojisi ile üretilmiştir. Hibridoma teknolojisinde, tavşanlar veya fareler, bağışıklık sisteminin plazma ve bellek B hücrelerini güçlendirmek amacıyla birkaç hafta boyunca antijen uygulanarak bağışıklandırılır. Aktive olan B hücreleri (lenfositler), santrifüjle ayrıştırılır ve miyelom hücreleri ile birleştirilerek tek bir epitopa özgü bir antikoru sürekli üretimi sağlayan hibridoma hücreleri

oluşturulur. Hibridizasyon yalnızca ideal koşullar altında gerçekleşir ve en iyi durumda bile hibridoma hücrelerinin yalnızca %1-2'si antikor üretebilir. Antikor mühendisliği hibridoma teknolojisi ile başlamış olsa da bu yöntem düşük verimlilik, yüksek maliyet ve hayvan immünizasyonundan kaynaklı bağışıklığı tetikleme potansiyeli gibi limitasyonları sebebiyle rekombinant DNA teknolojileri gibi yeni yöntemlere yönelinmiştir [24].

Monoklonal antikorlar ve fragmentlerinin üretiminde öne çıkan bir diğer yöntem antikor gösterim teknolojisidir. Faj gösterim, maya gösterim ve mRNA gösterim gibi farklı tekniklerin olduğu teknolojide ilk adım, ilgilenilen sisteme klonlanabilecek ağır ve hafif zincir genlerinden oluşan bir kütüphane seçmektir. Kütüphaneyi istenen ifade sistemine klonladıktan sonra, genellikle tek zincirli değişken fragment (scFv) veya Fab formatındaki ağır ve hafif zincir kombinasyonları partikül yüzeyinde ifade edilir ve antijene bağlama yeteneklerine göre seçilir. Bağlanma yeteneği zayıf antikorlar, yıkama adımlarıyla uzaklaştırılarak en iyi antikor seçilmiş olur [21]. Bugün en başarılı şekilde uygulanan faj gösterim tekniğidir ve FDA tarafından onaylanan 14 terapötik antikor bu yöntemle üretilmiştir. Yöntem, 1985 yılında George P. Smith'in M13 filamentli fajının pIII minör kapsid proteinine kaynaşmış kısa peptitleri görüntüleyip afinite saflaştırmasına dayanmaktadır. Smith 2018 yılında bu keşif ile Nobel Kimya ödülü sahiplerinden biri olmuştur [25].

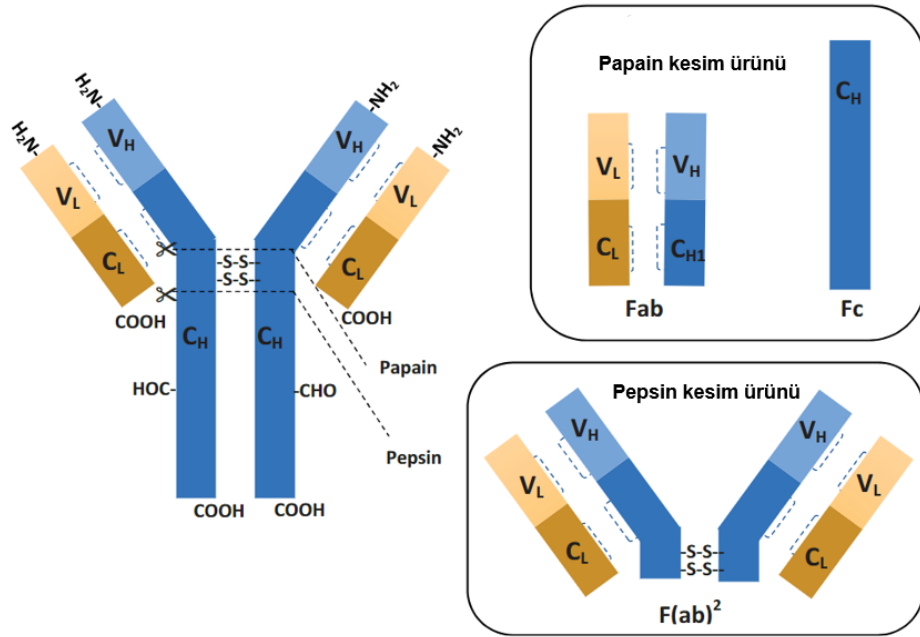
2.3. Antikor Fragmentleri ve Tek Zincirli Antikor Fragmentleri (scFv)

Son yıllarda mAb'larla ilgili yapılan çalışmalarda aktif fragment boyutunun azaltılması önem kazanmıştır. Antikorların modüler yapısı, antikor mühendisliği ya da enzimatik yöntemlerle daha küçük antijen bağlanma bölgelerinin (Fab, scFv, sdAb gibi) üretimine olanak sağlar [19, 26].

Bir Fab fragmenti hafif zincirin (LC) değişken hafif zincir (V_L) ve sabit hafif zincir (CL) bölgeleri ile ağır zincirin (HCs) değişken ağır zincir (V_H) ve sabit ağır zincir 1 (CH1) bölgelerini içerir. V_L ve V_H bölgeleri antijen bağlanma bölgesini oluşturur.

Fv fragmenti ise yalnızca V_H ve V_L alanlarından oluşur [27]. Fab ve scFv gibi antikor fragmentleri, daha iyi doku penetrasyonu için daha küçük boyutlu moleküllerin gerekli olduğu durumlar için ortaya çıkan fragmentlerdir. Daha küçük boyutlu fragmentlerin kullanılması, hedefe daha yüksek yoğunlukta bağlanması ile etkili dozu artırarak gücü artırabilir [24].

Antikor fragmenti üretimi için iki temel yöntemden biri olan enzimatik proteolizdir. Bu yöntem için genel olarak papain ve pepsin kullanılır. Papain üst disülfid bağlarından keserek, her IgG molekülünden 2 monovalan Fab ve bir Fc elde etmek için kullanılır. Pepsin, disülfid bağlarının altından keserek bir IgG başına bir bivalent $F(ab')^2$ üretir ve bir indirgeyici varlığında ise 2 adet $F(ab')$ molekülü elde etmek için kullanılır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Papain ve pepsin enzim kesim bölgeleri ve kesim sonrası oluşan antikor fragmentleri [28].

1960'lardan beri pepsin kullanılarak enzimatik antikor parçalanması üzerine birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, çoğu laboratuvar hala her özel antikor için parçalanma sürecini optimize etmek zorundadır. Parçalanma için ticari kitler

mevcuttur ancak, enzimatik parçalama, agregasyon veya denatürasyona sebep olarak antikor fragmentinin fonksiyonu bozabilir [29].

Fab, keşfinin eski olmasından dolayı, klinikte onaylanan ilk antikor fragmentidir. Abciximab, 1993 yılında onaylanan ve trombosit agregasyonunu önlemek için kullanılan bir Fab'dır. Trombosit yüzeyindeki bir proteinle etkileşime girerek pıhtılaşma faktörlerinin bağlanmasını engeller. Certolizumab pegol, TNF α reseptörlerini tanıyan humanize bir Fab'dır. Romatoid artrit tedavisi için 2009 yılında onaylanmıştır. PEG ile konjuge edilen bu molekül, plazma yarı ömrü 14 güne kadar artırılmış ve bu da enjeksiyon aralığının uzatılmasını sağlamıştır. Ranibizumab, VEGF-A'yı hedefleyen ve 2006 yılında onaylanan, yaşa bağlı makula dejenerasyonunun bazı formlarının tedavisinde kullanılan bir humanize Fab'dır [30]. Çizelge 2.1 FDA'nın onayladığı antikor fragmentlerini göstermektedir.

Çizelge 2.1. FDA onaylı antikor fragmentleri [31, 32].

Adı	Ticari Adı	Hedef	Format	FDA onayı	Konakçı
Abciximab	Reopro	GPIIb/IIIa	Fab	1994	Memeli
Ranibizumab	Lucentis	VEGF	Fab	2006	<i>E. coli</i>
Certolizumab	Cimzia	TND	Fab	2008	<i>E. coli</i>
Balimumab	Blinicyto	CD19, CD3	scFv	2014	<i>E. coli</i>
Idarucizumab	Praxbind	Diabigatran	Fab	2015	CHO
Moxetumomab	Lumoxiti	CD22	dsFv	2018	<i>E. coli</i>
Brolucizumab	Beovu	VEGF-A	scFv	2019	<i>E. coli</i>
Caplacizumab	Cabilivi	Willebrand factor	VHH	2019	<i>E. coli</i>

Tek zincirli antikor fragmentleri (scFv) ilk olarak 1988 yılında Fab fragmentin minimalist formu olarak geliştirilmiştir. V_H ve V_L bölgelerinin 10-25 amino asitlik esnek bir glisin-serin zinciriyle sentetik olarak bağlandığı, yaklaşık 25-30 kDa bir yapıdır [33]. Küçük boyutlarının sonucu olarak antikor fragmentleri “kritik epitoplara” ulaşma, yüksek tümör penetrasyonu ve düşük immünojenisite (Fc bölgesi olmadığından) gibi avantajlara sahiptir. Ayrıca küçük, glikozillenmemiş antikor fragmentlerinin prokaryotlarda yüksek verimle üretilmesi, gerekli zaman ve maliyeti azaltır [34].

ScFv’ler genellikle hibridoma teknolojisiyle üretilirler fakat mevcut bir monoklonal antikordan da genetik mühendisliği teknikleriyle elde edilebilirler. Bunun için, bir tam antikorun değişken bölgelerinin klonlanması, scFv oluşturmak için V_H ve V_L bölgelerinin bir linkerla birleştirilmesi, bunların ekspresyon vektörlerinde klonlanması ve rekombinant fragmentin ekspresyonu ve saflaştırılması gerekmektedir. Bu yöntemler dışında scFv’ler, faj gösterimi yöntemi ile faj yüzeyinde bir bakteriyofajın genellikle kapsid proteini ile (pIII) füzyon halinde üretilirler. Bölüm 2.2’de belirtilen avantajları sebebiyle scFv’lerin üretiminde bakteriyel ekspresyon sistemleri de yaygın olarak kullanılmaktadır [35].

ScFv’ler küçük boyutları sebebiyle IgG’ye kıyasla daha kolay modifiye edilebildiğinden, sensör yüzeylerine immobilizasyonlarında farklı yöntemler kullanılabilmesine olanak sağlar. Antikorların yüzeye immobilizasyonunda kullanılan geleneksel yöntem, proteinde bulunan serbest amin ($-NH_2$) gruplarından yüzeye bağlanmadır. Fakat bu yöntemde bağlanmanın sağlanacağı bölge seçilemez, immobilizasyon rastgele olur. Rastgele bağlanmadaki problem, immobilizasyonun antijen bağlanma bölgelerinden gerçekleşebilmesidir. Antijen bağlanma bölgesinin oryantasyonu, antikorun solüsyon içerisindeki analitle etkileşiminde önemli rol oynar. Yüzeydeki bu rastgele bağlanma, konformasyonel bir heterojeniteye sebep olur ve bu durum antikorun reaktivitesini düşürerek immünosensörün hassasiyetini etkiler [27, 36].

2.4. Antikor Mühendisliği ve Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant DNA teknolojisi, farklı konaklar veya ekspresyon sistemleri kullanılarak tam antikordan antikor fragmentlerine kadar çeşitli biyoterapötiklerin üretilmesinde kullanılır. Bu teknolojinin en önemli avantajı, antikor üretiminde genetik manipülasyon imkanıdır. Diğer yöntemlere kıyasla, rekombinant DNA teknolojisi ile protein üretiminde tüm prosesin optimizasyonu mümkün olduğundan, yüksek verimle protein ekspresyonu da mümkündür. Rekombinant antikor üretimi, genetik mühendisliği tekniklerinin gelişmesiyle birlikte genetik manüpülasyonla istenen konfigürasyon ve bağlanma özelliklerine sahip, saflaştırma verimi yüksek, serum yarı-ömürleri arttırılmış proteinlerin üretimine olanak tanır [37].

Rekombinant antikorların üretiminde farklı ekspresyon sistemleri kullanılabilir. Memeli hücrelerin tercih edilme sebebi mAb'ların post translasyonel modifikasyona ihtiyaç duyan büyük ve kompleks bir protein olmasıdır. Bu sebeple klinikte kullanılan mAb'ların %62'si CHO (Chinese Hamster Ovary) hücrelerinde üretilirken, %4'ü *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterisinde üretilmektedir [38]. Öte yandan *E. coli*, düşük maliyet ve düşük çoğalma gereksinimleri, protein üretimi için iyi karakterize edilmiş fizyolojisi ve genetiği, çok sayıda vektör ve suşa sahip olması, 30 yıldır araştırmalarda kullanılması sebebiyle geniş çaplı deneyim birikimi, rekombinant proteinlerin nispeten kısa sürede seri üretim kabiliyeti, manipülasyon kolaylığı avantajları sebebiyle daha az alt akım prosesine ihtiyaç duyar. Bu nedenle, rekombinant proteinlerin üretimi için değerli bir konakçıdır ve ekspresyon sistemlerinin tasarlanması son yıllarda fazlaca ilgi görmektedir.

Bu avantajlarının yanında, özellikle disülfid bağlar (doğru katlanmayı sağlayarak antikorun bağlanma aktivitesini etkiler) içeren proteinler için *E. coli*'de üretimin bazı sınırlamaları vardır (Çizelge 2.2). Bu sebeple, antikor fragmentleri daha oksitleyici bir ortam olan periplazmada üretilir. Fakat periplazmanın hacim sınırlaması sebebiyle düşük ekspresyon verimine sahiptir. Bu problemin çözümü ise, daha az oksitleyici sitoplazmik ortam için mutant suşların (*gor*-/*trx*B-) ya da

çözünür (soluble) formda üretim için bazı peptid takılarının (N- veya C- terminal) kullanılmasıdır [20, 39, 40].

E. coli'de rekobinant protein üretimini etkileyen faktörler, ya ekspresyon düzeyindeki faktörler (genetik faktörler) ya da proses düzeyindeki faktörlerdir (farklı fermantasyon ölçeklerindeki fiziksel ve çevresel faktörler). Bu faktörlerin optimizasyonu her protein türüne göre farklılık gösterir ve bu nedenle, rekombinant proteinin maksimum ekspresyon seviyelerine ulaşılması konusunda genel bir kılavuz yoktur. Proses düzeyinde üretim ortamı, indükleyici derişimi, karıştırma ve/veya havalandırma hızı gibi parametreler optimize edilirken, gen düzeyinde kodon optimizasyonu ile gen dizilimi, protein çözünürlüğü, protein katlanma hızı parametrelerinin optimizasyonu yapılmaktadır. Kodon optimizasyonu (Gene Designer, OPTIMIZER ve TIsigner), protein çözünürlüğü (Protein-Sol, SoluProt, ccSol) ve mRNA ikincil yapı tahmini (mFold, RNAFold) için birçok yazılım ve *in silico* araç mevcuttur. Bu araçlar, olası mRNA ikincil yapısının, gen dizisinin minimum serbest enerjisinin (MFE), ribozom bağlanma bölgesinin (RBS) ve AUG başlangıç kodonunun konumlarının belirlenmesi ve görsel olarak sunulmasına olanak sağlar [41].

Çizelge 2.2. MAb ve antikor fragmentlerinin ökaryotik ve prokaryotik sistemlerde üretimlerinin karşılaştırılması

Antikor Özellikleri	Prokaryotik Sistem	Ökaryotik Sistem
Moleküler Ağırlık	Düşük	Yüksek
Format	Antikor fragmentleri	Antikor fragmenti, tam IgG
S-S Bağları	Sınırlı	Kısıtlama yok
Agregasyon	İnklüzyon cisimleri	Yok (native)
Katlanma	Yanlış katlanma riski	Doğru katlanma
Glikozilasyon	Sınırlı	Kısıtlama yok
Maliyet	Düşük	Yüksek

Alternatif ifade sistemleri, gen ve proses düzeyinde optimizasyon araçları mevcut olmasına rağmen, her proteinin yüksek verim veya katalitik/işlevsel aktiviteye sahip olacağına garanti yoktur. Bunun iki temel sebebi olabilmektedir: rekombinant proteinlerin yoğun üretiminin neden olduğu konak yükü ve sınırlı post-translasyonel modifikasyon (PTM) kapasitesi sonucu inklüzyon cisimciklerinin oluşumu. Rekombinant proteinlerin, özellikle de toksik proteinlerin üretimi, konakçı için DNA replikasyon, transkripsiyon ve translasyon yükü ve post-translasyonel modifikasyonlarda tüketilen ek enerji gereksinimine sebep olur. Fonksiyonel aktif proteinlerin üretimi önemli bir optimizasyon amacıdır [42]. Bu sebeple, IB'lerden aktif ve saf protein eldesi için de çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.

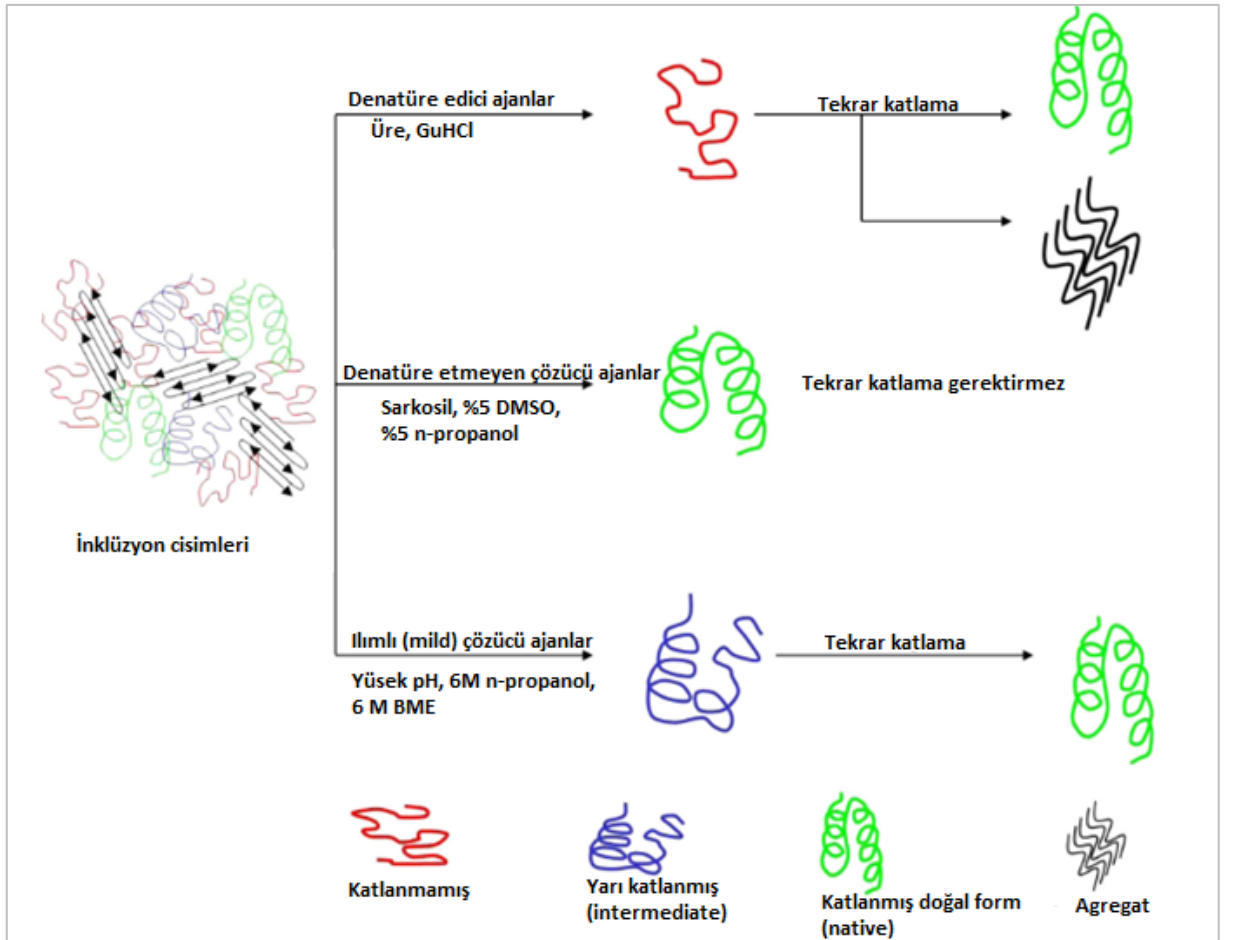
2.4.1. Inklüzyon Cisimciklerinden (IB) Çözünür Protein Eldesi

E. coli rekombinant protein üretiminde en popüler bakteriyel konaktır. Fakat memeli türevi rekombinant proteinlerin bakteriyel ekspresyon sistemlerinde aşırı ekspresyonu genellikle yoğun şekilde paketlenmiş protein agregatları olan IB'lerin oluşumuna sebep olur. Ökaryotik proteinler ifade edilirken, özellikle post-translasyonel modifikasyonların eksikliği proteinin yanlış katlanmasına sebep olur. Disülfid bağlarının oluşumu, proteinin düzgün katlanmasında önemlidir. Bu nedenle, özellikle PTM yoğun heterolog proteinlerin ekspresyonu, çoğunlukla yanlış katlanmış proteinler oluşturarak agregatlara sebep olur. Ancak, rekombinant proteinlerin inklüzyon cisimcikleri şeklinde üretiminin, yüksek miktarda protein eldesi, düşük protein kontaminasyonu, kolay izolasyon ve metabolik kararlılıkları sebebiyle proteolitik parçalanmadan korunma gibi, bazı avantajları vardır [43].

E. coli'de protein ekspresyonunda IB oluşumunu en aza indirmeye yönelik çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bununla birlikte, inklüzyon cisimcikleri içindeki rekombinant proteinin toplam hücresel proteinlerin %30-40'ını oluşturmaktadır ve IB'ler %90'a kadar saf rekombinant proteinden içerebilmektedir. Bu sebeple, inklüzyon cisimciklerinin üretilmesi ve ardından çözündürülmesine yönelik

protokollerin, daha yüksek hacimde ürün üretmek için uygun bir strateji olduğu kanıtlanmıştır. [44, 45]

İnklüzyon cisimlerinden doğru katlanmış çözünür protein eldesi için birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler; denatüre edici ajanlar, ılımlı (mild) ajanlar ve denatüre etmeyen ajanlar ile protein eldesi şeklinde sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. İnklüzyon cisimlerinden çözünür protein eldesi yöntemleri ([46]'den modifiye edilmiştir).

Üre, GuHCl gibi denatüre edici ajanlar kullanılarak çözünür protein eldesinde, katlanmada görev alarak üç boyutlu yapıyı sağlayan disülfid bağları kırılıp, protein lineer bir forma getirilerek çözünürleştirilir ve sonrasında tekrar katlama işlemi yapılır. İlımlı ajanlarla ise (yüksek pH, n-propanol, BME) yarı katlı bir form elde

edilerek tekrar katlanma başarısını artırmak hedeflenmektedir. Denatüre etmeyen ajanlar (sarkozil, DMSO gibi) kullanıldığında elde edilen protein derişiminin düşük olduğu durumlar olsa da, tekrar katlama gibi uzun ve zahmetli bir işlem gerektirmediğinden tercih edilebilmektedir [46].

Denatüre edici yöntemler geleneksel yöntemlerdir. İzolasyon, çözdürme, saflaştırma ve tekrar katlama basamaklarından oluşur. Proteinin üç boyutlu yapısını tamamen bozup doğal yapısına (native) tekrar katlama işlemi, geri kazanımı etkileyen en önemli basamaktır. Farokhi-Fard ve arkadaşları [47] rekombinant ant-IL1-RAP IB izolasyonu ve çözdürme işlemi için 8 M Üre içeren bir tampon kullanmış ve üç farklı yöntemle tekrar katlama işlemi uygulamıştır ve en yüksek geri kazanımı %11,2 olarak elde etmiştir. Sharma ve arkadaşları [48] ranibizumab üretimi sonrası çözdürme işleminde DTT kullanmış, çözdürdüğü IB'lerden %32 gerikazanım elde etmiştir. Protein yapılarını tamamen açmayan ılımlı denatüranlar kullanılarak IB'lerin çözünürleştirilmesi, doğal benzeri yapıyı koruyabileceğinden geri kazanımını iyileştirebilir. Sarker ve arkadaşları [49], 2 M üre %5 DMSO, %5 n-propanol kullanarak %29 verimle saf E53-scFv elde etmiştir. Chura-Chambi ve arkadaşları [50], %81 verimle hGH proteini elde ederken, Maleki ve arkadaşları, 8M ürenin gradient azaltılmasıyla 0,7 mg/mL aktif anti-CD20-scFv elde etmiştir. IB'lerin %5 n-propanol [51], Triton-X [52] ve N-lauril sarkozin (NLS) [43, 53, 54] gibi denatüre edici olmayan maddelerle çözüldürülmesi, proteinin mevcut doğal benzeri ikincil yapısını korudukları için yeniden katlama adımına gerek kalmadan aktif rekombinant proteinlerin ekstraksiyonu ile sonuçlanır.

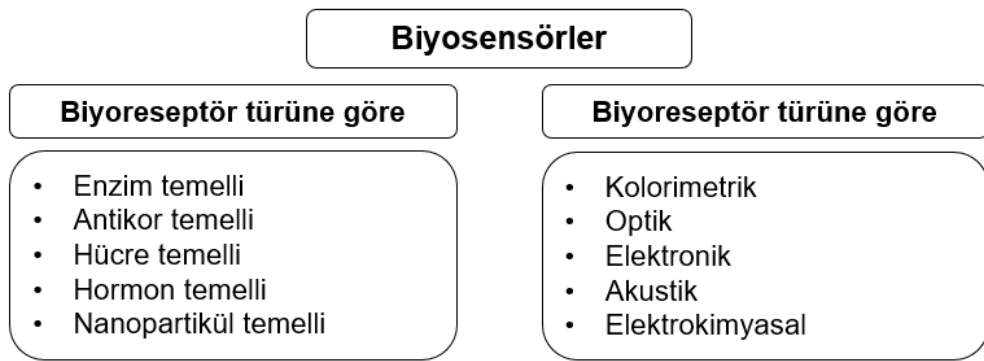
2.5. Biyosensörler ve Sitokin Ölçümü

Biyosensörler, biyolojik bir element kullanılarak ölçülebilir bir sinyal üreten sensörlerdir. Tasarımına göre, patojenler, toksik kimyasallar, hormonlar gibi birçok analitin çok düşük derişimlerini dahi ölçebilen biyosensörler üç bileşenden oluşur: hedef analit sinyalini tanıyan bir biyoreseptör (enzim, antikor, aptamer, protein gibi), tespit edilen sinyali faydalı bir çıktıya dönüştüren bir dönüştürücü

(elektrokimyasal, optik, kolorimetrik, manyetik) ve çıktı sinyalini analiz eden ve işleyen bir sinyal işlemcisi.

Özellikle medikal alanda, hastalıkların erken teşhisi, tedavi şansını artırdığından hızlı, hassas ve güvenilir bir şekilde ölçüm yapan biyosensörlerin geliştirilmesi önemlidir. Bir biyosensörün kilit parçası olan dedektör genellikle biyolojik reseptörlerden oluşur. Gıda ve çevre kirliliklerinin ölçülmesinde, medikal alanda tanı ve tedavide, ilaç araştırmalarında yaygın olarak kullanılan biyosensörler, kullanılan biyolojik reseptörlere bağlı olarak, enzimatik sensörler, immünosensörler, nükleik asit sensörleri, hücre sensörleri, biyomimetik sensörler gibi çeşitli kategorilere ayrılabilir (Şekil 2.4) [55, 56].

Biyosensörler 1960'larda Clark ve Lyons'un öncülüğünde başlamıştır. İlk enzim tabanlı sensör 1967 yılında Updike ve Hicks tarafından üretilmiştir. Enzim biyosensörleri, immobilizasyon yöntemleri, enzimlerin van der Waals kuvvetleri, iyonik bağ veya kovalent bağ ile adsorpsiyonu üzerine geliştirilmiştir. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan enzimler oksidoredüktazlar, polifenol oksidazlar, peroksidazlar ve aminooksidazlardır [57].



Şekil 2.4. Biyosensörlerin sınıflandırılması [58]

Kronik hastalıkların teşhisi genellikle zaman alıcı ve zor bir iştir. Sitokinler, immün modülasyon ajanları olarak görev yapan ve çift yönlü çalışan immün sistemin en önemli çözünür proteinlerden biridir. Enfeksiyonu ortadan kaldırmak için kritik

öneme sahip olmalarının yanı sıra, aşırı üretimleri bağışıklık sisteminin aşırı tepkisi nedeniyle doku ve organ hasarına yol açabilir. Bu nedenle, hastalıkların, hastalık yönetiminin ve ciddi patofizyolojik durumlara müdahalelerin hassas, güvenilir ve hızlı bir şekilde tespiti için hassas yöntemlere ihtiyaç vardır [6]. Sitokinlerin fizyolojik etkisi diğer sitokinlerin derişimlerine bağlı olarak değışiklik gösterir. Bu sebeple bir ağ (network) şeklinde çalışan sitokinlerin çoklu ölçümü (tek bir örnekte birçok sitokinin birden ölçümü) gereklidir [8, 59]. Sitokin ölçümü hastalığın seyrinin bilinmesi, gerekli tedavinin zamanında uygulanabilmesi ve uygulanan tedavinin etkisinin görülebilmesi açısından önemlidir.

Düşük derişimleri, *in vivo* kararsızlıkları, dinamik sekresyonları ve kompleks sitokin ağları nedeniyle sitokinleri tespit etmek zordur. Klinik uygulamada sitokinleri ölçmek için en popüler yöntemler başta ELISA olmak üzere immünoassaylerdir [6]. SPR tabanlı immünosensörler yüksek hassasiyete sahiptir. Fakat non-spesifik sinyaller özellikle biyolojik sıvılar gibi örneklerde problem yaratırlar. Elektrokimyasal biyosensörler ucuz hassas ve kısa sürede analiz yapabilirken, çoklu ölçüm yapabilme gibi geliştirilmesi gereken yönlerde sahiptir [8]. Çizelge 2.3'de sitokin biyosensörleri ile ilgili yapılan bazı çalışmalar ve yöntemlerin analiz süresi, LoD gibi özellikler bakımından karşılaştırılması gösterilmiştir.

Çizelge 2.3. Sitokin biyosensörü ile ilgili bazı çalışmalar ve kullanılan yöntemler*

Sitokin	Ölçüm tekniği	LoD	Örnek hacmi	Süre	Referans
IL-6	FI	0,37 pg/mL	70 µL	15 dk	[60]
IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-γ, TNF-α	FI	40,96 pg/mL	50 µL	~ 3 sa	[61]
IL-2, IL-4, IL-6 IL-10, TNF-α, IFN-γ	SPR	5-20 pg/mL	1 µL	40 dk	[62]

IL-6, TNF- α , IL-10, IL-4	SPR	20 pg/mL	30 dk	[63]
IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α	SPR	\leq 20 pg/mL	30 dk	[63]
IL-6, IL-1 β , TNF- α	EC	5–150 pg/mL	30 dk	[64]

*floresan immünoassay (FI), surface plasmon resonance (SPR), elektrokimyasal metod (EC)

Sitokin ölçümü için kullanılan ticari mAb-temelli kitlerde genel olarak ELISA ve Luminex[®] kullanılmaktadır (Çizelge 2.4). Luminex[®], floresan mikrokürelerin mikropilaka üzerinde kullanılmasıyla çok sayıda analitin aynı anda ölçümünün yapılabilirdiği bir immünoassaydır [65].

Çizelge 2.4. Ticari mAb temelli sitokin tayini kit örnekleri [67].

Firma	Platform	Kit adı
Invitrogen	Luminex	Human Cytokine Plex Panel
Bio-Rad	Luminex	Bio-Plex Pro [™] Human Cytokine Plex
Millipore	Luminex	MILLIPLEX [®] MAP Plex Kit
BioSource	Luminex	Human UltraSensitive Cytokine Ten-Plex
Linco	Luminex	Human cytokine LincoPlex/MilliPlex Map
eBioscience	Akış sitometri	Human Th1/Th2 11-Plex FlowCytomix [™]
LEGEND	Akış sitometri	plex [™] Th cytokine 13-Plex Panel
BD	Akış sitometri	Human Enhanced Sensitivity 3-Plex kit
BD	Akış sitometri	Human Th1/Th2 Cytokine Kit
Miltenyi	Akış sitometri	MACSPlex Cytokine kit

Derişimleri hızla değişen sitokinlerin, hastane ihtiyacına sebep olmadan erken tespit edilebilmesi için periyodik ölçümü gerekebilir. Bu ihtiyaçtan doğan kolay ulaşılabilir, ucuz, hızlı ve hassas, hasta başı testlerin geliştirilmesi için en uygun sensörlerden biri de kağıt tabanlı biyosensörlerdir. Yüzeyi kimyasal ya da fiziksel olarak kolayca modifiye edilebilir ve porozitesi herhangi bir pompalama kaynağına ihtiyaç duymadan kapiler akışa müsaade eder. Bunların yanında, kağıt materyal, kolay bulunabilir, biyouyumlu ve tek kullanımlık (disposable) olması gibi avantajlara da sahiptir [66].

2.6. Antikor Tabanlı Biyosensörler (İmmünosensörler)

Biyosensör tasarımı, moleküler biyoloji, protein mühendisliği, afinite kimyası, nükleik asit moleküler dinamikleri, nanoteknoloji, malzeme bilimi gibi çeşitli alanları da içeren çok disiplinli bir alandır. Bu avantajı kullanarak, biyosensörlerin tasarımında kullanılan bioreseptörler, sensörün analitik performansına uyacak şekilde özelleştirilebilir. Kompleks bir ortamda bir ortamda yüksek özgüllük, iyi karakterize edilmiş bağlama özellikleri, yüksek stabilite ve tercihen düşük maliyetle büyük ölçekli üretim imkanlarından dolayı, antikorlar biyosensörlerde bioreseptör olarak kullanılabilirler. Antikorların biyosensörlere entegre edilmesi, *in vitro* ve *in vivo* biyosensörlerin üretimini büyük ölçüde kolaylaştırmıştır. İmmünosensör olarak bilinen afinite-bazlı biyosensörler güvenilir hedef/analit tespiti, otomatikleştirme/dijitalleştirme avantajları sebebiyle klasik analitik yaklaşımların dezavantajlarını ortadan kaldırabilirler [68].

Monoklonal antikora dayalı immünosensörler, 30 yıldan fazla bir süredir var olan ve hala klinik ve araştırma alanlarında yaygın olarak kullanılan en önemli tanı araçlarından biridir. mAb'ların makul bir bölümü, biyosensör yüzeylerine immobilizasyon sırasında öngörülemeyen konformasyon değişiklikleri, biyolojik aktivite kaybı veya Fc kısmı aracılığıyla istenmeyen reaktiviteler nedeniyle fonksiyonlarını kaybedebilir. Bu nedenle, antikorun sensör yüzeyine immobilizasyonu biyosensör tasarımında önemli bir faktördür [69].

İmmobilize edilmiş tam uzunluktaki antikor, yüzeye farklı şekillerde yönlendirilebilir: yan yönlü (bir Fc ve bir Fab alanı yüzeye bağlı), kuyruk yönlü (Fc alanı yüzeye bağlı), baş yönlü (iki Fab alanı yüzeye bağlı) ve düz yönlü (üç alan yüzeye bağlı). Eğer antikorların antijen bağlama bölgeleri, hedef proteiniyle etkileşim için kullanılabilir durumdaysa, biyosensörden maksimum performans elde edilebilir. Antikorların antijen bağlama bölgeleri üzerinden (yan yönlü, baş yönlü ve düz yönlü) bağlanması, antijen bağlama aktivitesinde bir azalmaya veya ortadan kaldırmaya neden olur. Bu nedenle, antikorların yönelimlerini kontrol etmek, geliştirilmiş biyosensör duyarlılığı için önemlidir. Rekombinant antikor fragmentleri, düşük moleküler ağırlık, yüksek esneklik, yüksek özelleştirilebilirlik ve hedef proteine kolay erişim gibi özelliklere sahiptir, bu da onları tam uzunluktaki antikorların güçlü bir alternatifi haline getirir [70, 71].

Tanıyıcı moleküllerinin transdüser yüzeyine yüksek yoğunlukta bağlanması, biyosensör geliştirmenin en kritik adımlarından biridir. Ab immobilizasyonu için uygun stratejiler, gereken biyosensör türüne bağlı olarak değişir. Tam boyutlu Ab'nin tahmini moleküler boyutları 15 x 7 x 3.5 nm iken, en küçük Ab fragmentleri olan VHH fragmentleri, sadece 4 x 2.5 x 3.5 nm'dir. Biyosensör yüzeyleri mikrometre ölçeğinde olduğundan, Ab fragmenti ne kadar küçükse, yüzeye immobilize edilebilecek prob miktarı o kadar fazla olabilir, bu da hassasiyetin artırılmasını sağlayabilmektedir [69].

2.7. Kağıt Tabanlı İmmünosensörler

İn-situ analizler için, hasta-başı (point-of-care (POC)) olarak adlandırılan cihazlar, geleneksel tekniklere göre oldukça hızlı, erken tespitine olanağı sunan, böylece proaktif hastalık tedavisini kolaylaştıran ve sonuç olarak hastalığın daha ciddi durumlara ilerlemesini önleyen çok çeşitli tanı araçlarını bir araya getirmektedir. POC cihazları ile sadece hastalık değil, hastanın genel durumu da takip edilebilmekte olup, bunlar kişiselleştirilmiş tıp olarak adlandırılan sürecin bir parçasıdır. Kağıt-bazlı immünosensörler, son on yılda hızla artarak önemli POC araçları olmuşlardır. Bir kağıt taban ve elektrokimyasal sensörü birleştiren kağıt bazlı biyosensörler, farklı sağlık senaryolarına uygulanabilir ve selüloz kağıdın

esnek, biyouyumlu, çevre dostu, ucuz, yaygın olarak bulunabilen, hafif ve hidrofilik olması, modifikasyona uygun olması sebebiyle önemli avantajlara sahiptir [66].

Kağıt tabanlı biyosensörler, biyolojik bir sıvı içerisindeki bir biyobelirtecin varlığını test edebilen kağıt şeritlerdir. Kağıt tabanlı sensörlerin bir çoğu immünosensördür ve tanıyıcı molekül olarak antikorlar kullanılmaktadır. Antikorlar genellikle, test çizgisinde gözle görülür bir renk oluşumuna sebep olan bir partikül ile (altın nanopartikül gibi) işaretlenirler ve farklı varyasyonları olsa da genellikle kağıt materyali olarak nitroselüloz kullanılmaktadır [72].

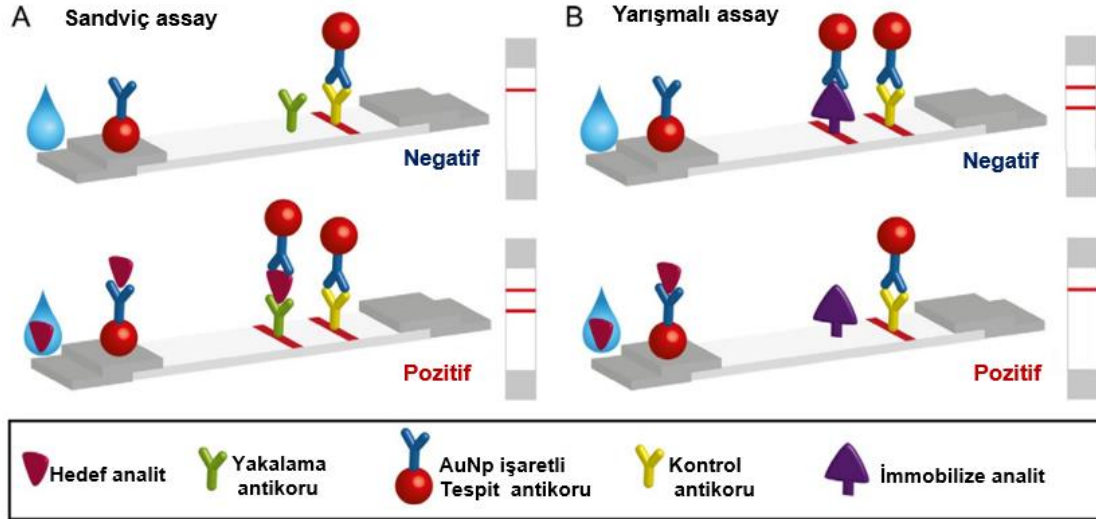
Kağıt materyallerin yüzeyi, kimyasal ya da fiziksel olarak kolayca modifiye edilebilir ve porozitesi herhangi bir pompalama kaynağına ihtiyaç duymadan kapiler akışa müsaade edebilmektedir. Bunların yanında, kağıt materyal, kolay bulunabilir, biyouyumlu ve tek kullanımlık (disposable) olması gibi avantajlara da sahiptir [66]. Tasarımının kolaylığı ve düşük maliyeti sebebiyle en sık kullanılan sensörlerinden biri haline getirmiştir. Yaygın kullanılan bir tahlil olan ve reçetesiz satılan gebelik testine ek olarak, tarım, çevre koruma, antibiyotikler, bulaşıcı hastalık etkenleri gibi çok sayıda kağıt tabanlı biyosensör ticari olarak mevcuttur. Avantajlarının yanında, kalitatif veya yarı kantitatif sonuç vermesi, düşük hassasiyete sahip olması gibi dezavantajlara da sahiptir [72, 73].

Kağıt tabanlı biosensörler, daldırma çubuğu (dipstick) biosensörleri, yatay akış testleri (LFA) ve mikroakışkan kağıt tabanlı (μ PADs) biyosensörler olarak üçe ayrılabilir. Daldırma çubuğu testi, örneği tanıyıcı molekül bağlanmış bir kağıt parçasına damlatma esasına dayanır ve en bilinen örnek pH şeridi olarak kabul edilebilir; fakat sıklıkla ihtiyaç duyulan tanı amaçlı karmaşık tasarımları yapılamamaktadır. Bu sebeple, son yıllarda mevcut kağıt immünosensörler LFA veya μ PAD şeklindedir [74].

LFA'da numunenin bir test şeridi boyunca hareketi kılcal kuvvetlere dayanan basit bir test olsa da ölçülebilir bir sinyal üretmek, son kullanıcıya kullanımı kolay bir cihaz sunmak için birçok parametrenin optimize edilmesi gereklidir. LFA'lar genellikle yarışmalı (competitive) veya sandviç olmak üzere iki farklı şekilde tasarlanır (Şekil 2.5).

Yarışmalı testler de kendi içinde iki farklı şekilde tasarlanabilmektedir. İlki, örnek içindeki hedef ile etiketli bir hedefin (biyoreseptöre hedeften daha az afiniteye sahip bir molekül olabilir) konjuge pedin test çizgisi üzerindeki yakalama biyoreseptörü için rekabet ettiği testlerdir. İkincisinde ise, örnek içindeki hedef ile test çizgisindeki hedef (test çizgisi yakalama (capture) biyoreseptörü olarak davranır) etiketli bioreseptör için rekabet eder. Yarışmalı LFA, yüksek hedef derişimlerinde düşük bir sinyal verdiğiinden ve kanca etkisinden (hook effect) etkilenmediğinden, yüksek derişimlere sahip hedeflerin tespiti için özellikle kullanışlıdır. Genellikle küçük hedef moleküller (<1 kDa) için kullanılır (örneğin, ilaçlar ve toksinler gibi), ancak büyük analitlere de uyarlanabilmektedir [73, 75].

Sandviç LFA, orta ve büyük boyutlu analitlerin (proteinler, antikorlar, bakteriler ve hücreler) tespiti için en çok kullanılan stratejidir. Hedef molekül, tespit bioreseptörü ile test çizgisindeki yakalama biyoreseptörü arasında kalarak bir sandviç model oluşturur. Örnek içindeki hedef miktarıyla orantılı olarak artan bir sinyal elde edilir. Bu tür bir testin geliştirilmesi için, hedefin farklı bölgelerine bağlanan iki biyoreseptör gereklidir. Örneğin, iki farklı monoklonal antikor veya bir etiketli monoklonal antikor ve bir poliklonal antikor, sandviç etkisi oluşturulmasını sağlamak için kullanılır. Sandviç LFA, çok yüksek hedef derişimlerinde kanca etkisine maruz kalabilir ve yarışmalı testlere göre yanlış- pozitif sonuçlara daha yatkındır [73, 75].



Şekil 2.5. Sandviç (A) ve yarışmalı (B) yatay akışlı testlerin şematik gösterimi [76].

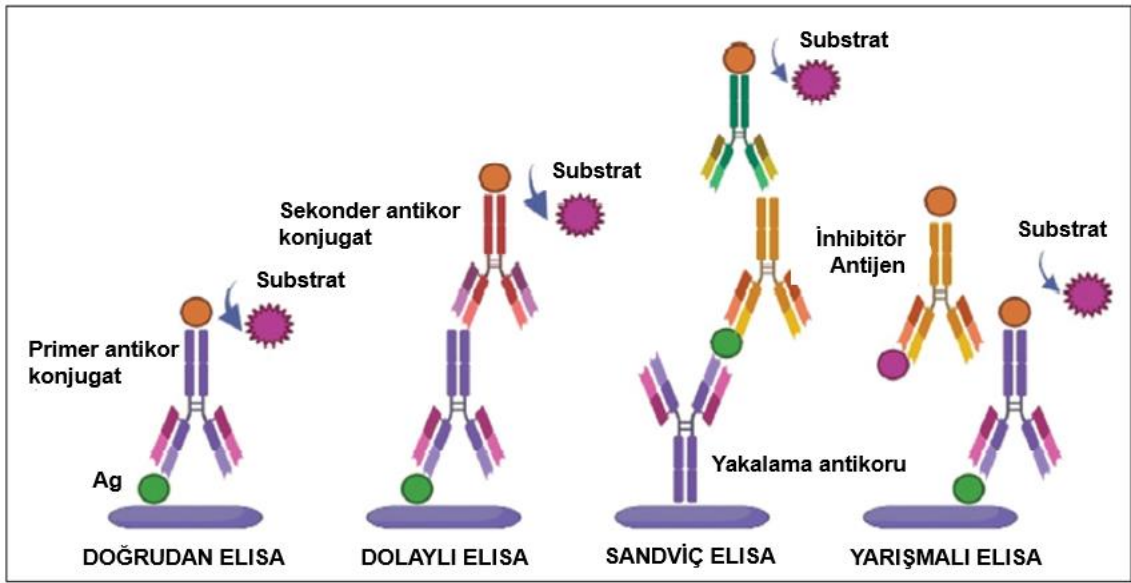
2.8. Enzim Bağlı İmmünosorbent Assay (ELISA)

İmmünoassayler, antikorların seçiciliği ve spesifitesini kullanarak kantitatif ölçüm yapan analitik metotlardır. İmmünoassayler, klinik teşhislerde en yaygın kullanılan immünokimyasal yöntemdir ve radyoimmünoassay, ELISA, immünofloresan, kemilüminesan immünoassay, enzime-bağlı floresan gibi birçok türü mevcuttur [77].

ELISA, immünolojik reaksiyonları tespit etmek ve ölçmek için enzimlerin katalitik özelliklerini kullanır ve peptitlerin, proteinlerin, antikorların ve hormonların tespitinde sıklıkla kullanılan, plaka bazlı bir test tekniğidir. Güvenilir, hassas ve spesifiktir. Hassasiyeti enzim-substrat ilişkisi, özgüllüğü antikor-antijen spesifik bağlanması sebebiyledir. Plaka yüzeyine tutuklanan antijen üzerine eklenen enzim-bağlı antikorun bağlanması ve sonrasında ortama substratın eklenmesiyle kolorimetrik bir sinyalin alınması temeline dayanır [78, 79].

ELISA, mikrolakaların kullanılmasıyla çok sayıda analitin aynı anda ölçümünün yapılabilirdiği yüksek hassasiyet ve özgüllüğe sahip bir immünoassaydir [65]. Doğrudan (direkt), dolaylı (indirekt), sandviç ve yarışmalı olmak üzere dört tür ELISA (Şekil 2.6) vardır [78]. ELISA tipine bağlı olarak, test için birincil ve/veya

ikincil antikoru, analit/antijen, kaplama antikoru/antijen, tampon, yıkama ve substrat/kromojen gereklidir. Birincil antikor, sadece ilgi duyulan proteine bağlanan özel bir antikordur. Buna karşılık, ikincil antikor, enzim ile bağlanmamış birincil antikora bağlanan, enzim-bağlı ikinci bir antikordur. ELISA protokolünde, plakanın kuyucuklarına farklı antijen/antikor derişimleri seri dilüsyon ile eklenir. Plaka okuyucuda absorbands verileri elde edildikten sonra, seri seyreltme verilerinden bir standart eğri, x-ekseninde derişim ve doğrusal bir ölçek kullanılarak y-ekseninde absorbands ile çizilir [80].



Şekil 2.6. ELISA çeşitleri ve çalışma prensipleri [81]

Doğrudan-ELISA en kolay yöntemdir. Antijen, plaka üzerine adsorbe edilir, ardından bloklayıcı bir proteinle (genellikle BSA) serbest bağlanma bölgeleri bloklanır. Enzim-bağlı antikor kompleksi kuyulara eklenir. Antikor, antijeni ile etkileşime girerek bir kompleks oluşturur ve bağlanmayan antikorlar yıkanır. Daha sonra enzimin substratı eklenir ve antijen miktarına doğrudan bağlı, ölçülebilir bir sinyal alınır [77, 78].

Dolaylı-ELISA, doğrudan-ELISA ile benzer basamakları içerir; fakat iki antikorun kullanıldığı iki adımlı bir yöntemdir. Birincil antikor, antijen ile inkübe edilir, yıkama adımları sonrası işaretli bir ikincil antikor ile inkübe edilir. Bu teknik, her antijen

molekölü başına birden fazla etiketli antikorun bağlanabilmesi nedeniyle yüksek duyarlılığa sahiptir [77, 78].

Ticari kitlerin çoğunda kullanılan yöntem olan sandviç ELISA, iki antikor arasındaki antijeni ölçer. Hem monoklonal hem de poliklonal antikorlar, sandviç ELISA sistemlerinde yakalama (capture) ve tespit (detection) antikorları olarak kullanılabilirler. Monoklonal antikorlar, tek bir epitopu tanır; bu sebeple, genellikle tespit antikoru olarak kullanılır. Poliklonal antikorlar ise, mümkün olduğunca fazla sayıda antijen bağlayabilmek amacıyla yakalama antikoru olarak kullanılırlar. Sandviç ELISA'nın avantajı hassasiyetidir; doğrudan veya dolaylı ELISA'ya kıyasla iki ila beş kat daha hassastır [77, 78].

Yarışmalı ELISA, orijinal antijen (ölçülmek istenen) ve ikincil antijen olmak üzere iki antijenin kullanıldığı rekabetçi bir bağlanma temeline dayanır. Yarışmalı ELISA'da, birincil antikor (etiketlenmemiş), örnek antijen ile inkübe edilir ve antikor-antijen kompleksi aynı antijen ile kaplanmış plakalara eklenir. Örnekteki antijen sayısı ne kadar fazlaysa, o kadar az antikor, kuyudaki antijene bağlanabilir, bu nedenle bir "rekabet" gerçekleşir. Enzim-bağlı ikincil bir antikorun kuyulara eklenmesi sonrası, substratın eklenmesi ve florasan sinyalin alınmasıyla ölçüm yapılır. Yarışmalı ELISA'da, örnek antijen derişimi ne kadar yüksekse, alınan sinyal o kadar zayıftır [77, 78].

Bugün, çoğu klinik protein belirteçli testler, ELISA ile yapılmaktadır. Zaman alıcı ve ekipman ihtiyacı olan bir yöntem olsa da, bu yöntem yerine genellikle LC-MS tabanlı sistemler de pahalı ve teknik olarak kompleks metotlardır. Son yıllarda geliştirilen mikroarray'ler, antikor kaplı 96 veya 384 kuyucuklu plaka formatında klinik teşhiste kullanılmaktadır. Bu array'ler basit ve yüksek seçiciliğe sahiptir ve proteinlerin çoklu ölçümüne olanak tanıyan, otomatik veya yarı otomatik sistemlerdir. Floresans (Luminex, Myriad RBM), elektrokimilüminesans (Roche Diagnostics, Mesoscale Discovery) veya yüzey plazmon rezonansı (Horiba Inc., BIO-RAD; Biacore Life Sciences, GE Healthcare) ölçüm teknolojilerini kullanmaktadır ve hastane laboratuvarlarında da kullanılmaktadır. Fakat bu ticari

cihazlar, çipler ve reaktan kitleri gibi özel sarf malzemeleri gerektirir, bu sebeple pahalı ve kaynakların sınırlı olduğu noktada hasta-başı uygulamalarda kullanımı sınırlıdır [82].

In vitro tanı (IVD), hastanelerde hastalıkların teşhis etmek ve gelişimini izlemek için vazgeçilmez bir araç haline gelmiştir. Mevcut IVD teknolojileri, küçük moleküller, proteinler, nükleik asitler gibi çeşitli biyobelirteçleri tespit etmek için rutin olarak kullanılmaktadır. ELISA ise özgülüğü, yüksek hassasiyeti ve yüksek tarama kapasitesi nedeniyle en popüler immünolojik testlerden biridir. Bu sebeple, düşük maliyetli, stabil ve tekrarlanabilir bir şekilde hedef moleküllerin tanınmasını geliştirmek çeşitli inovasyonlar yapılmaktadır. Hassasiyetini arttırmak, nükleik asitlerin ve nanomalzemelerin kullanımı, çoklu ölçüm yapabilmek için manyetik partiküller ve mikroakışkan çiplerin kullanımı, maaliyeti azaltmak için antikor yerine aptamerlerin kullanımı gibi yenilikler IVD uygulamaları için büyük potansiyele sahiptir [83]. ScFv'ler bütünsel antikorlara kıyasla küçük boyutlara sahip olduğundan yüzeye yüksek yoğunlukta bağlanabilirler [84]. Bütünsel monoklonal antikorlarla benzer antijene bağlanma aktivitesi gösteren [40], fakat bakteriyel üretimleri sebebiyle daha düşük üretim maliyetlerine [85] sahip olan scFv'ler IVD uygulamalarında önem arz etmektedir.

Klinik uygulamada sitokinleri ölçmek için en popüler yöntemler, hassasiyetleri sebebiyle enzime bağlı immünosorbent spot (ELISpot) ve enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA) dahil olmak üzere immünoassaylerdir [6]. Bu sebeple hali hazırda kullanılan sandviç ELISA yöntemine ek olarak literatürde ELISA tabanlı birçok çalışma mevcuttur. Aalen ve arkadaşları, TNF α ve IL6 sitokinlerinin ölçümü için ticari ELISA testlere alternatif olarak biyoluminesans bazlı ELISA geliştirerek ölçümde alınan sinyalleri 80 kat artırarak pM seviyesinde ölçüm yapabilmıştır[86]. Giorgi-Coll ve arkadaşları, aptamer bazlı bir sandviç assay geliştirerek 1,95 μ g/mL hassasiyette IL6 sitokin ölçümü yapmışlardır [87]. Russel ve arkadaşları, anti-IL6 antikorlar kullanarak mikroeletrotlar yardımıyla bir immünoassay tasarlamış ve pg/mL seviyesinde IL6 sitokin ölçümü yapabilmıştır [88]. Alexandre vd., IL6 sitokin ölçümü için mikroakışkan teknoloji

kullanarak tam bir ELISA protokolünü bir mikroakışkan çip üzerinde gerçekleştirmiş ve 10 pg/mL hassasiyette ölçümler yapabilecek bir immünosensör geliştirmeye çalışmıştır [89].

Özetle, ELISA tabanlı immünoassayler, hassasiyetleri, güvenilirlikleri ve çeşitli uygulamalara uyarlanabilirlikleri nedeniyle klinik uygulamalarda sitokin tespiti için vazgeçilmez araçlardır. ELISA tabanlı biyosensörlerin geliştirilmesi, ELISA'nın kullanım avantajları ile yenilikçi özellikleri birleştirerek tanı ve tedavide hassas, kullanımı kolay ve düşük maliyetli çözümler sunacaktır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Bakteriler, Plazmitler ve Kimyasallar

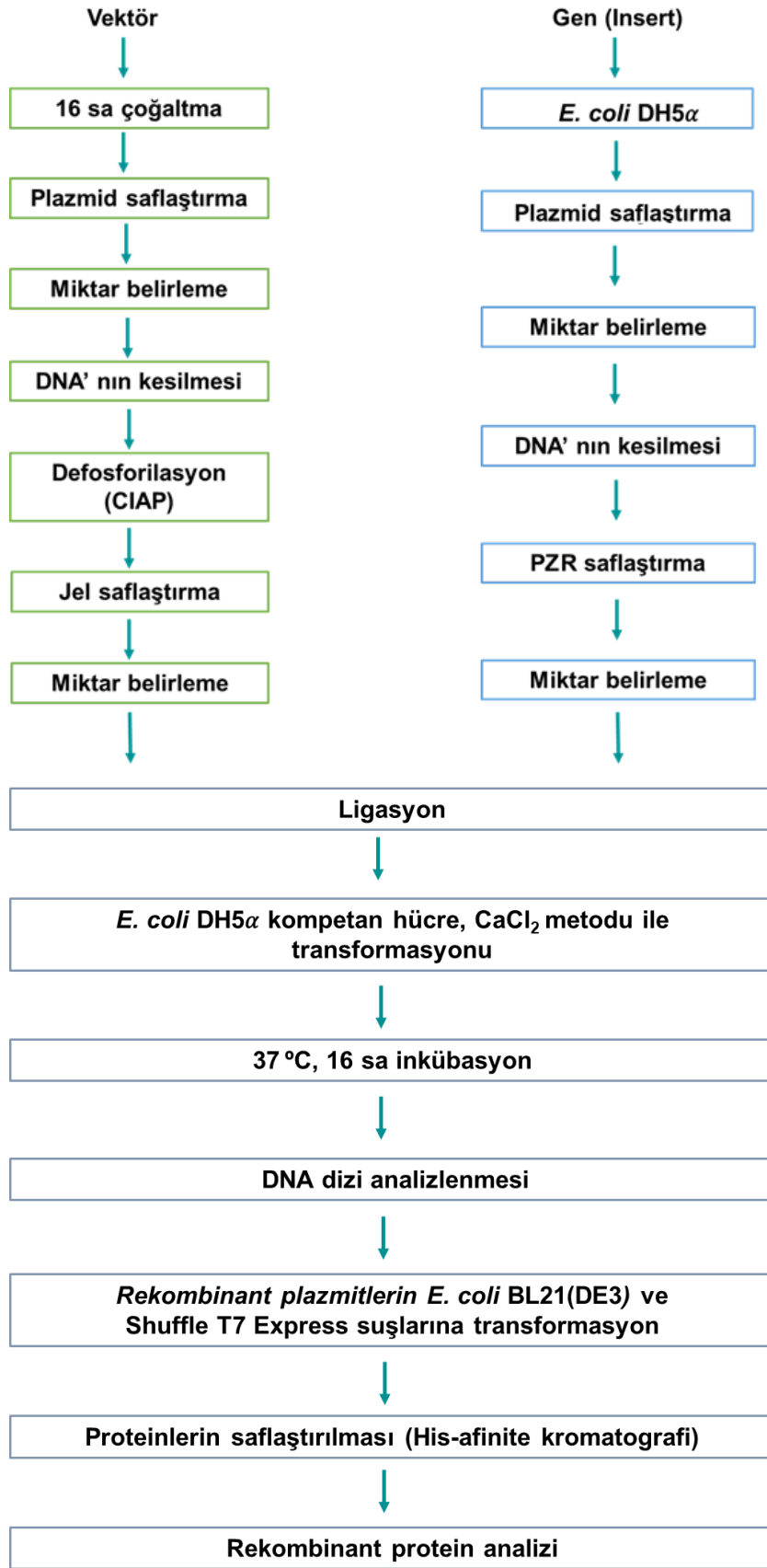
Klonlama çalışmalarında *Escherichia coli* DH5 α , scFv üretim çalışmalarında *Escherichia coli* SHuffle T7 Express, BL21(DE3) suşları kullanılmıştır. Anti-TNF α -scFv, anti-IL6-scFv, anti-IL1 β -scFv ve anti-IFN γ -scFv genleri pUCIDT(Kan) plazmit içerisinde sentetik olarak temin edilmiş, ekspresyon vektörü olarak pET28a(+) kullanılmıştır. Klonlama çalışmalarında scFv genlerinin çoğaltılması için Vent DNA polimeraz, gen bölgesinin klonlama vektöründen ekspresyon vektörüne aktarılması için *Nde*I, *Nco*I ve *Hind*III restriksiyon enzimleri kullanılmıştır.

E. coli suşlarının çoğaltılması için Luria-Bertani (LB, 10 g/L tripton, 5 g/L maya ekstraktı, 10 g/L NaCl), Terrific Broth (TB, 12 g/L tripton, 24 g/L maya ekstraktı, 9,4 g/L K₂HPO₄ 2,2 g/L K₂HPO₄), Hanahan's Broth (SOB), LB agar, protein üretiminin indüklenmesi için izopropil β -D-1-tiogalaktopiranosit (IPTG), seçici çoğaltma için Kanamisin antibiyotiği kullanılmıştır.

Rekombinat protein ekstraksiyon ve analizi çalışmalarında; lizozim, Triton-X, N-lauril sarkozin (Sarkozil), Bradford ve Comassie boya, BSA, %30 akrilamid/bisakrilamid, amonyum persülfat (APS), sodyum dodesil sülfat (SDS), anti-6xHis-tag-HRP ve Opti-4CN Substrat Kit kullanılmıştır. Protein-AuNp işaretleme işlemi için 20 nm altın nanopartikül kullanılmış, partikülün ve scFv'lerin hazırlanması için 10 mM sitrat tampon (pH 6,5) kullanılmıştır.

3.2. Rekombinant ScFv için Vektör Hazırlığı ve Klonlama Çalışmaları

Şekil 3.1 vektör hazırlığı ve klonlama çalışmalarını özetlemektedir.



Şekil 3.1 Klonlama prosedürünün şematik gösterimi ([90]'dan esinlenilmiştir)

3.2.1. Agaroz Jel Ekstraksiyonu

Tasarımı yapılan klonlama vektörü içerisinde temin edilen nükleotit kasetlerinin pET28a ekspresyon vektörüne aktarılması için öncelikle her iki plazmit de *NdeI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesilerek (37°C'de 2 saat) %1 (w/v) agaroz jele yüklenmiştir. 100 V, 45 dk koşturulan DNA örnekleri, DNA transillüminatör cihazı ile görüntülenerek kullanılacak bantlar jelden kesilmiş, jel ekstraksiyon protokolüne uygun olarak saflaştırılmıştır. Bunun için, ilk olarak kesilen jel parçası üzerine QG tamponu eklenerek jel 65°C'de eritilmiş ve santrifüj kolonuna aktararak 13000 rpm, 1 dk santrifüj edilmiştir. PE tampon ile yıkanan kolona son olarak 40 µl EB tampon eklenerek 1 dk, oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve santrifüj sonrası elüsyon örneği derişimi nanodrop okuması ile belirlenmiştir. Saflaştırılan kalıp DNA (backnone-pET28a) ve gen kaseti (gen kasedi DNA) aynı enzimlerle kesilerek daha sonra birleştirilmek üzere -20°C'de saklanmıştır.

3.2.2. PCR Optimizasyonu

Tasarlanan nükleotit kasetleri, primerler yardımıyla polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. 50 µL hacimde hazırlanan reaksiyon içeriği ve koşulları Çizelge 3.1 ve 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. PCR reaksiyon içeriği

	Hacim (µL)	Son derişim
Thermopol tampon (10x)	5,0	1X
dNTP (10 mM)	1,0	200 µM
İleri primer (10 µM)	1,0	0,2 µM
Geri primer (10 µM)	1,0	0,2 µM
Kalıp DNA (10 ng/µL)	1,0	0,02 ng
Vent DNA polimeraz	0,5	0,5-1 ünite
Steril dH ₂ O	40,5	

Çizelge 3.2. PCR reaksiyon koşulları

	Sıcaklık	Süre
Denatürasyon	95°C	2-5 dk
30 döngü	95°C	15-30 sn
	50°C (IL6)	15-30 sn
	54°C (TNF)	
	72°C	55 sn
Uzama	72°C	5 dk
Saklama	4°C	∞

PCR sonrası ürün % 1 (w/v) agaroz jelde yürütülerek uzunlukları kontrol edilmiş, PCR saflaştırma kiti ile saflaştırılmıştır.

3.2.3. Ekleme Reaksiyonu (Ligasyon)

Ligasyon reaksiyonu için, gen kaseti ve vektör DNA, T4 DNA ligaz ile birleştirilmiş, 16°C'de 16 st reaksiyon sonrası elde edilen ligasyon ürünü -20°C'de saklanarak transformasyon için kullanılmıştır. Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4 ligasyon reaksiyonu koşullarını göstermektedir.

Çizelge 3.3. Anti-IL6-scFv ve anti-TNF α -scFv için ligasyon reaksiyon koşulları

	Kontrol (μ L)	L1 (μ L)	L2 (μ L)
Kalıp DNA (vektör) (100 ng)	6,3	6,3	6,3
Gen kasedi (33 ng)	-	1,3	1,2
T4 ligaz	1,0	1,0	1,0
10x ligasyon tampon	2,0	2,0	2,0
dH ₂ O	10,7	9,5	9,6
Toplam	20,0	20,0	20,0

Çizelge 3.4. IFN ve IL1 için ligasyon reaksiyon koşulları

	Kontrol 1 (µL)	L1 (µL)	Kontrol 2 (µL)	L2 (µL)
Kalıp DNA (vektör)	9,1	9,1	8,6 L	8,6
Gen kaseti	-	3,3	-	8,4
T4 ligaz	1,0	1,0	1,0	1,0
10x ligasyon tampon	2,0	2,0	2,0	2,0
dH ₂ O	7,9	4,6	8,4	-
Toplam	20	20	20	20

3.2.4. *E. coli*'nin CaCl₂ Metodu ile Transformasyonu

Kompetan hücre hazırlığı için, -86°C stoktan alınan hücre, 6 mL LB ortam içerisine alınarak çalkalayıcı inkübatörde 37°C, 200 rpm, 16 saat inkübe edilmiştir. Bu kültürden alınan hücre 6 mL LB ortama 1:100 oranda alınarak aynı inkübasyon koşullarında OD₆₀₀ 0,3-0,4 olana kadar inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda 3000xg, 4°C, 10 dk santrifüjle toplanan hücreler 0,1 M soğuk CaCl₂ ile süspansiyon edilmiş, 50 µL hacminde kompetan hücre içerisine 3 µL plazmid eklenerek ısı şoklama sonucunda hücrelerin içine plazmid alımı sağlanmıştır. Transformasyon sonrası hücreler, seçici antibiyotik içeren katı ortama yayılmış ve 37°C'de 16 saat inkübe edilmiştir. Seçilen koloniler sıvı ortamda 37°C'de 200 rpm'de çoğaltıldıktan sonra, -86°C'de saklanmak üzere gliserollü stokları hazırlanmıştır.

3.2.5. DNA Dizi Analizi

Seçilen kolonilerden saflaştırılan plazmidler önce restriksiyon analizi ile kontrol edilmiş, içinde doğru boyutta gen kaseti taşıyan plazmidler, dizi analizi için tasarlanmış primerler kullanılarak, hizmet alımı yoluyla dizinlenmiştir.

3.3. DNA Sekansı Doğrulan Vektörlerin Konakçı Hücreye Aktarılması ve Scfv'lerin Küçük Ölçekte Üretimi

Elde edilen rekombinant plazmidler, *E. coli* BL21(DE3) ve SHuffle® T7 Express suşlarına CaCl₂ metodu ile transformasyonunun ardından, kanamisinli LB agar besisi ortamına ekilmiş ve BL21(DE3) için 37°C'de, SHuffle için 30°C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Sonraki gün çoğalan hücrelerden seçilen koloniler, içerisinde antibiyotik bulunan LB besisi ortamına inoküle edilerek bir gece 37°C'de çoğaltılmış ve 250 mL flasklarda 50 mL LB içeren ortama başlangıç OD₆₀₀ 0,06 olacak şekilde altkültüre alınmıştır. OD₆₀₀ 0,6-0,8 olana kadar çoğaltılan *r-E. coli*, 0,1 mM izopropil β-D-tiogalaktopiranosit (IPTG) ile indüklenmiştir. Çalkalamalı inkübatörün sıcaklığı düşürülerek (16°C, 25°C, 30°C), 16 st üretim yapılmıştır. Hücreler 4000xg, 15 dk, 4°C'de ultrasantrifüjle ortamdan ayrıldıktan sonra üretim sonrası analizleri yapılmıştır. Bu aşamada, indükleyici derişimi (0,05-1 mM), üretim ortamı sıcaklığı (16°C, 30°C), üretim/indükleme süresi (t=16, 20, 24, 36, 48 h) ve üretim ortamı (LB, TB) için en iyileme çalışmaları yapılmıştır.

3.4. Çözünür/Çözünmez Fraksiyonların Ayrımı ve Çözünürleştirme İşlemi

Üretim sonunda santrifüjle toplanan her 1 mL hücre pelleti 100 µL fosfat tampon ile (1x PBS) süspanse edilerek, sonikatörle parçalanmıştır (30 sn açık, 40 sn kapalı, 4 tur, buzda). 13000 rpm, 4°C, 10 dk santrifüj yapıldıktan sonra alınan süpernetant "çözünür fraksiyon" olarak ayrılmıştır. 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0) ile 3 kez yıkanan pellet, 250 µL 1x PBS (%2 (w/v) SDS içeren) ile süspanse edilerek 10 dk kaynatılmıştır. Sonrasında 13000xg, 10 dk, oda sıcaklığında santrifüj yapılarak alınan süpernetant, "çözünmez fraksiyon (IF)" olarak ayrılmıştır. IF'den çözünür fraksiyon eldesi için kullanılan tamponlar Çizelge 3.4'te verilmiştir. İşlem için üretim sonunda toplanan pellet, lizis tamponla süspanse edilip, 15-20 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiş, sonrasında sonikasyon ve santrifüj işlemleri ile çözünür fraksiyon ayrılmıştır. Kalan pellet önce yıkama tamponu-1 ile, sonra yıkama tamponu-2 ile ikişer kez yıkandıktan sonra çözünürleştirme tamponu ile süspanse edilmiştir. Oda sıcaklığında hafif çalkalama ile inkübe edildikten sonra 10000xg, 4°C, 30 dk santrifüj yapılan

örneğin süpernetantı alınarak çözünürleştirilmiş (solubilized) fraksiyon olarak ayrılmıştır.

Çizelge 3.5. Çözünürleştirme işlemi için kullanılan tamponlar

Lizis tampon	50 mM Tris, 100 mM NaCl, %0,1 Triton-X, 100 µg/mL lizozim, pH:8,0
Yıkama tamponu 1	50 mM Tris, 100 mM NaCl, %0,1 Triton-X, pH:8,0
Yıkama tamponu 2	50 mM Tris, pH: 8,0
Çözünürleştirme tamponu	50 mM Tris, %1 (w/v) Sarcosyl, pH:8,0

Denatüre edici yöntemle çözdürme işlemi için izolasyon işleminden sonra IF, denatüre edici tampon (50 mM sodyum fosfat, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, 6 M GuHCl pH 7.4) içerisinde çözdürülerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Dantürasyon sonrası, denatüre edici koşullarda His-Afinite saflaştırma yapılmıştır.

İlimli ajanlar kullanılarak IF çözünürleştirme işlemi için, izole edilen IF çözünürleştirme tamponunda (100 mM Tris-Cl, pH: 12,0) oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. pH 12, His-afinite saflaştırma için uygun bir pH olmadığından tekrar katlama işlemi sonrası saflaştırma yapılmıştır. Tekrar katlama işlemi, katlama tamponu (50 mM Tris-Cl, %10 sükroz, pH:7,5) içerisine damla damla eklenerek yapılmıştır.

3.5. Üretilen scFv'lerin Saflaştırılması ve SDS-PAGE Jel Analizi

3.5.1. His-Afinite Saflaştırma

Üretilen rekombinant scFv'ler, immobilize metal afinite kromatografisi metodu ile saflaştırılmıştır. Proteinin eldesi için hücreler santrifüjle toplanıp parçalanmış (lizis) ve tekrar sanrifüj sonrası silika mikroküreler ile etkileştirilerek 6xHis takılı

scFv'ler ortamdan ayrılmış, yıkama ve elüsyon işlemleri sonrası saflaştırma yapılmıştır. Saflaştırma sonrası imidazolün uzaklaştırılması için 20 µm membran üzerinde damla yöntemi ile diyaliz yapılmıştır.

3.5.2. Toplam Protein Tayini

Saflaştırılan scFv'lerin toplam protein derişimi Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. 10 µl örnek, 200 µl Bradford reaktifi (ticari) ile karıştırılarak oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiş ve 595 nm'de absorbans okunmuştur. BSA ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi kullanılarak protein derişimi hesaplanmıştır.

3.5.3. SDS-Poliakrilamid Jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve Western Blot Analizi

SDS poliakrilamid jel elektroforezi için saflaştırılmış scFv örnekleri tamponla karıştırılarak, kaynayan su içinde 5 dk kaynatılmıştır. Daha sonra örnekler ve protein standartı 100 V'da koşturulmuş, süre sonunda protein bantlarının görünürlüğü için ticari 'Coomasie mavisı' ile boyanarak jel görüntüleme kabiniinde fotoğraflanmıştır. Proteinlerin saflaştırma oranı jel görüntü analiz yazılımı ile gerçekleştirilmiştir.

Rekombinant proteinin yerini ve varlığını belirleyebilmek için Western Blot analizi yapılmıştır. Comassie mavisı ile boyanan jeldeki aynı örnekleri içeren diğer bir jel de polivinil diflorür (PVDF) membrana aktarılıp (50 V, 3 saat) HRP konjuge anti-His antikoru (1:1000) ile 1 saat muamele edilmiştir. Spesifik scFv bantları görüntülenmesi için Opti-4CN kalorimetrik kit kullanılarak görüntülenmiştir.

3.6. Rekombinant Scfv'lerin AuNp ile İşaretlenmesi

İmmobilizasyon işlemi için AuNp solüsyonu içerisine, 100 µg/mL scFv (10:1 hacimde) eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 st inkübe edilmiştir. Antikorum nanopartiküle bağlanması UV spektrofotometrede (~520 nm) kontrol edilmiştir. Spektrumda maksimum absorbansta görülen kayma (3-6 nm) scFv'lerin AuNp'e

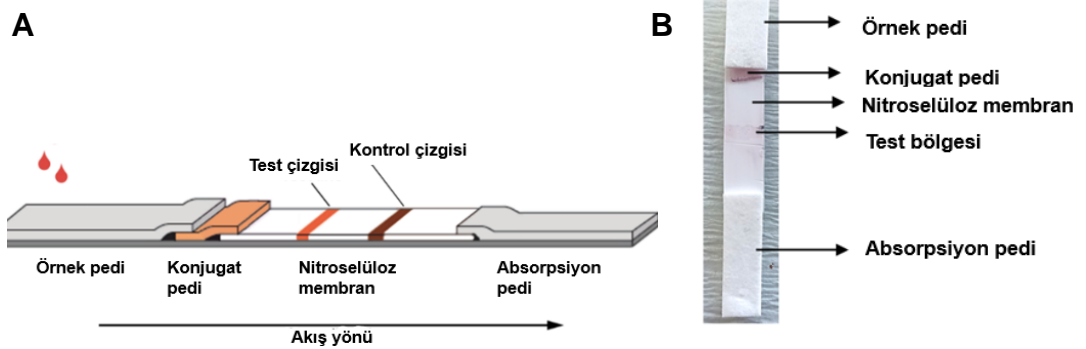
bağlandığını göstermektedir [91, 92]. AuNp-scFv bağlama işleminin ardından UV spektrumları ölçülerek karşılaştırılmıştır.

Antikor derişimi, pH ve AuNp oranı bağlanma verimini etkileyen parametrelerdir. Bu sebeple, scFv derişimi (10-100 µg/mL) için optimum koşullar belirlenmiştir.

İmmobilizasyon işlemi için belirlenen tamponla pH ayarlaması yapılan AuNp solüsyonu içerisine, uygun scFv:AuNp oranına göre scFv eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 st inkübe edilmiştir. Antikoron nanopartiküle bağlanması UV spektrofotometrede (~520 nm) kontrol edilmiştir.

3.7. Yatay Akışlı Kağıt İmmunosensörlerin Hazırlanması

Yatay akış prensibine göre çalışan kağıt tabanlı immünokromatografik biyosensörler dört ana kısımdan oluşur (Şekil 3.2) numunenin damlatıldığı numune pedi, işaretlenmiş antikorların bulunduğu reaksiyon pedi (Konjugat Ped), akışın gerçekleştiği test ve kontrol çizgilerinin bulunduğu nitroselüloz membran ve numuneden kalan sıvının toplandığı adsorbent ped.



Şekil 3.2. A: Yatay akışlı immünokromatografik sensör temsili [93] B: Tez kapsamında hazırlanan immünosensörler.

Kesim aletleri etanolle temizlendikten sonra, nitroselüloz membran 25×4 mm, numune pedi 10×4 mm, reaksiyon pedi 5×4 mm ve absorbent ped 15×4 mm boyutlarında kesilmiştir.

3.7.1. Numune Pedi Hazırlığı

Numune pedi ve absorbent ped, 1x PBS (%0,5 BSA, % 0,05 Tween 20) tampona tamamen ıslanana kadar daldırılmış ve 37°C, 1 saat etüvde kurutulmuştur.

3.7.2. Reaksiyon Pedi Hazırlığı

Ligand/antikor bağlanmasının gerçekleştiği reaksiyon pedinin hazırlaması için AuNp-scFv konjugatı Bölüm 3.6'da anlatıldığı şekliyle hazırlanmıştır. Konjugasyon işlemi sonunda 10000 rpm, 20 dk santrifüj edilerek süpernetant alınmış ve AuNp-scFv konjugat tampon'da çözülmüştür (1x PBS, %5 sükröz, %0,25 Tween 20). 20 µL AuNp-scFv konjugatı, konjugat pedine damlatılmış ve ped 37°C'de etüvde 1 saat kurutulmuştur.

3.7.3. Test Bölgesinin Hazırlanması

Üretilen rekombinant scFv'ler 3 mg/mL olacak şekilde PBS tamponla seyreltilmiş ve 0,5 µL/cm şeklinde nitroselüloz membranın konjugat pedinin koyulacağı uçtan 12 mm uzağına damlatılmıştır. ScFv'lerin membran üzerine sabitlenmesi için, 37°C, 1 saat etüvde kurutulmuştur. Etanolle temizlenmiş bir cam üzerine membran, absorbant ped, konjugat ped, örnek pedi 2 mm üst üste gelecek şekilde koyularak kağıt biyosensörler hazırlanmıştır. 1 µg/mL antijen çözeltisi damla damla (80 µL) örnek pedine damlatılıp test sonucuna bakılmıştır (15-20 dk). Negatif kontrol için aynı derişimde hazırlanan lizozim ve 1x PBS çözeltisi örnek pedine aynı hacimde damlatılmıştır.

3.8. Enzim Bağlı İmmünosorbent Deneyi (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

3.8.1. Dolaylı-ELISA

Rekombinant üretilen anti-sitokin scFv'lerin antijen seçiciliğini ve bağlanmasını belirlemek amacıyla 96-kuyuluk mikrotitre plakalarda ELISA testi yapılmıştır. Kuyular, antijen ile 50 µL 1xPBS tamponunun içinde bir gece boyunca 4°C'de kaplanmıştır. Kaplandıktan sonra, yıkama tamponu (PBS içinde çözülmüş %0,05 Tween-20 ve %0,3 BSA) ile 3 defa yıkanmıştır. Daha sonra, kuyular bloklama tamponu (yıkama tamponu içinde çözülmüş %5 süt tozu) ile 3 saat bloklanmıştır. Yıkama tamponu ile üç defa yıkanan plakaya, saflaştırılan scFv'ler yıkama tamponu ile seri dilüsyonlarla seyreltilerek 100 µL hacminde eklenmiş ve 1 sa inkübe edilmiştir. Tüm örneklerden en az iki tekrar yapılmıştır. Üç defa yıkama işleminden sonra ikincil antikor (HRP konjuge anti-6xHis-tag antikor) çözeltisi ile 1 saat etkileştirme sağlanmıştır. Tekrar yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra, her kuyuya 100 µL TMB-ELISA substratı eklenmiştir. Reaksiyon sonlandırma işlemi 2 M sülfirik asit ile yapılmıştır. Örneklerin absorbansı, H₂SO₄ ilavesinden sonra 450 nm'de ölçülmüştür.

3.8.2. Sandviç ELISA

Sitokin tespiti için kullanılan kitlerde hassasiyetinin daha yüksek olması sebebiyle yaygın olarak sandviç ELISA kullanılmaktadır. Bir yakalama ve tespit antikorları arasında antijenin ölçülmesi metoduna dayanır [94]. Anti-IL6-scFv'inin antijene bağlanma hassasiyetinin belirlenmesi için 96-kuyuluk plakalarda ELISA testi yapılmıştır. Kuyular, ticari poliklonal anti-IL6 antikorları ile 50 µL 1xTBS tamponunun içinde 3 saat oda sıcaklığında kaplanmıştır. Kaplandıktan sonra, yıkama tamponu (PBS içinde çözülmüş %0,05 Tween-20 ve %0,3 BSA) ile 3 defa yıkanmıştır. Daha sonra, kuyular bloklama tamponu ile 3 saat bloklanmıştır. Yıkama tamponu ile üç defa yıkanan plakaya, 100 µL IL6 antijen eklenmiş ve 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası plak üç defa yıkanmış ve saflaştırılan scFv'ler yıkama tamponu ile seri dilüsyonlarla seyreltilerek 100 µL hacminde eklenerek 1 saat inkübe edilmiştir. Tüm örneklerden en az iki tekrar yapılmıştır. Üç defa yıkama işleminden sonra ikincil antikor çözeltisi ile 1 saat etkileştirme sağlanmıştır. Tekrar yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra, her kuyuya 100 µL

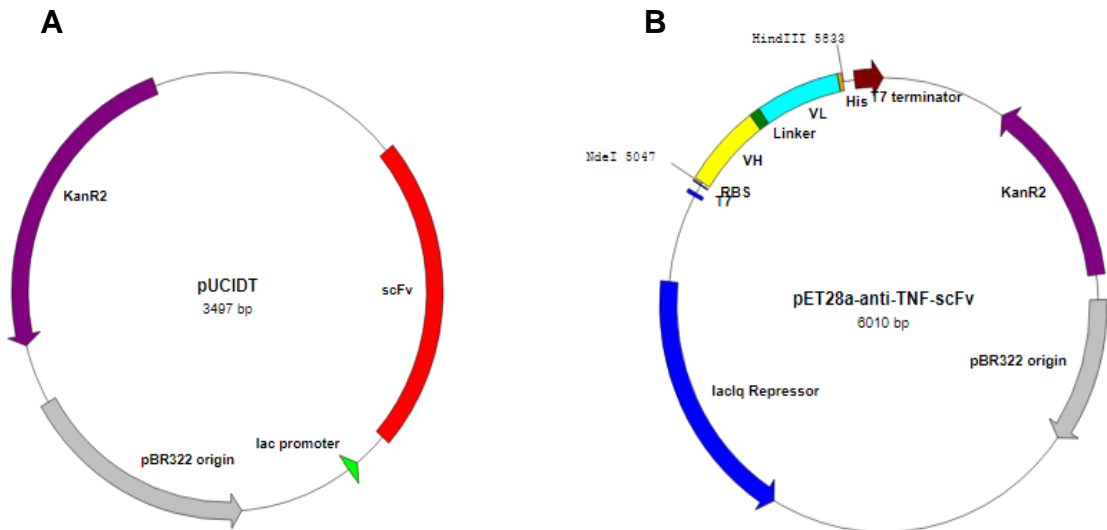
TMB-ELISA substratı eklenmiştir. Reaksiyon sonlandırma işlemi 2 M sülfirik asit ile yapılmıştır. Örneklerin absorbanası, H₂SO₄ ilavesinden sonra 450 nm'de ölçülmüştür

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Anti-TNF α ve Anti-IL6 Scfv Gen Dizilimlerinin, Vektör ve Primerlerin Tasarımı ve Klonlama Çalışmaları

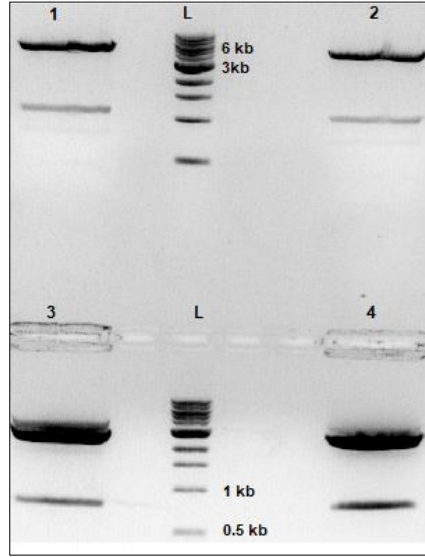
Nükleotid kasetlerinin oluşturulması için anti-TNF α (GenBank: KY072973.1) ve anti-IL6 (IMGT: 9051) scFv'lerinin gen dizilimleri kodon optimizasyonu yapılarak pUCIDT klonlama plazmidi (Şekil 4.1.A) içerisinde temin edilmiş ve pET28a ifade (ekspresyon) vektörüne (Şekil 4.1.B) klonlanmıştır.

Anti-TNF α ve anti-IL6 scFv'ler insan kaynaklı proteinlerdir. Bu proteinlerin *E. coli*'de ekspresyonu için bakterinin tercih edeceği kodonlar farklı olacağından, protein ekspresyon başarısı bakımından kodon optimizasyonu gereklidir. Çalışma kapsamında, anti-TNF α ve anti-IL6 scFv'ler için DNA sekansları, ücretsiz optimizasyon programları [95] kullanılarak ve tasarlanacak primer de dikkate alınarak düzenlenmiş, restriksiyon enzimi tanıma bölgeleri eklenmiş (*NdeI*, *HindIII*), protein çözünürlüğü açık kaynak programları (SoluProt, ProteinSol, ccSol) kullanılarak kontrol edilmiş, sonrasında klonlama plazmidi seçilerek (Şekil 4.1 A), gen kasedi sentetik olarak sentezletilmiştir.



Şekil 4.1 Tasarlanan A: klonlama, B: ekspresyon vektörleri

ScFv sekansının, ekspresyon vektörüne (Şekil 4.1 B) aktarılması için hem klonlama vektörü hem laboratuvar stoklarımızda bulunan pET28a vektörü aynı enzimlerle (*Nde*I ve *Hind*III) kesilmiş ve kesim sonrası DNA uzunlukları %1 agaroz jelde doğrulanmıştır (Şekil 4.2). Klonlamada kullanılacak bantlar jelden kesilerek saflaştırılmış ve ligasyon sonrası *E. coli* DH5α suşuna aktarılmıştır.



Şekil 4.2. Agaroz jel elektroforez L: 1 kb DNA Marker, 1 ve 2: çift kesilen pET28a (kalıp, 5230 bp), 3 ve 4: çift kesilen pUCIDT (klonlama vektörü, 2705 bp).

V_H-V_L sekansları (aralarında linker), 6xHis, C-terminal sistein (TCG kodon) içerecek şekilde tasarlanan (Şekil 4.3) scFv'lerin eldesi için Çizelge 4.1'de verilen primerler tasarlanmış ve Çizelge 3.2'de reaksiyon parametreleri verilen PCR koşulları ile çoğaltılmıştır.

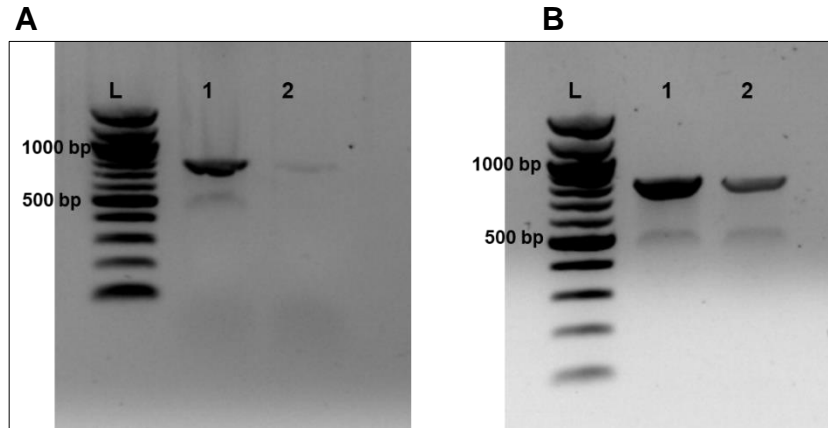


Şekil 4.3. ScFv-Cys ekspresyon kaseti

Çizelge 4.1. ScFv genleri klonlama çalışmaları için tasarlanan primerler

#	Primer	Sekans (5' → 3')
F1	NdeI-TNFscfvVH-fwd	AGACATATGCCGTCGTCCGCTGTAG
R1	HindIII-Stop-GGSC-6xHis-TNFscFvVL-rev	CGCAAGCTTTTAGCATGAGCCGCCATG GTGATGATGGTGATGGGTAG
F2	NdeI-IL6 ScfvVH-fwd	AGTCATATGCAGGTGCAATTAAAGGAAT CTG
R2	HindIII-Stop-GGSC-6xHis-IL6 ScFvVL-rev	CGCAAGCTTTTAGCATGAGCCGCCATG GTGATGATGGTGATGTTTG
F3	NcoI-IL6 scFvVH-fwd	AGTCCATGGGACAGGTGCAATTAAAGG AATCTG
R3	HindIII-Stop-6xHis-rev	AGTAAGCTTTTAATGGTGATGATGGTG
F4	NcoI-TNF scFvVH-fwd	AGACCATGGGACCGTCGTCCGCTGTAG

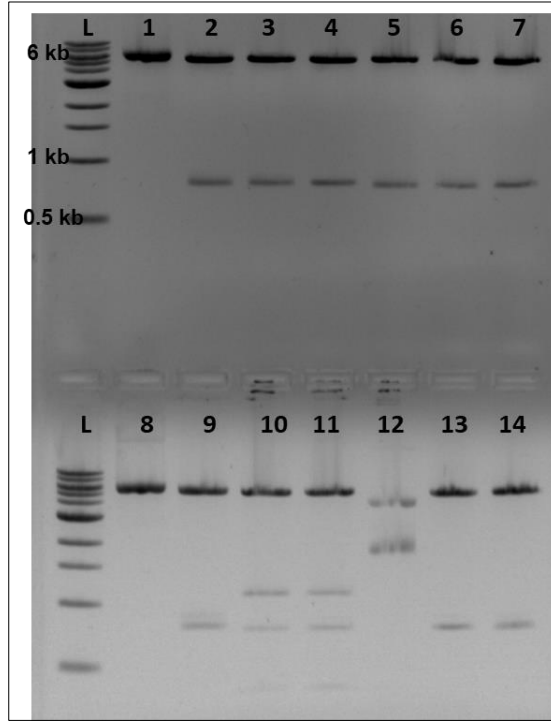
Polimeraz zincir reaksiyonları sonucunda, DNA moleküllerinin tanımlanması ve ayrılması için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. PCR ürünlerinin istenilen büyüklüklerde ve saflıkta olduğu görülmüş (Şekil 4.4) ve saflaştırma yapılmıştır.



Şekil 4.4. Agaroz jel elektroforez L: 100 bp DNA Marker, 1: anti-TNF-scFv (783 bp), 2: anti-IL6-scFv (762 bp). A: Bağlanma sıcaklığı (annealing) 50°C, süre 60sn. B: Bağlanma sıcaklığı (annealing) 1: 52°C, 2: 48 °C, süre 55 sn.

Saflaştırma sonrası elde edilen diziler, *NdeI* ve *HindIII* enzimleri ile kesilmiş ve kesim sonrası kalıp DNA ile ligasyon yapılarak ekspresyon vektörleri

oluşturulmuştur. Oluşturulan ekspresyon vektörleri *E. coli* DH5 α 'ya transforme edilmiş ve LB agarda çoğaltılmıştır. Her scFv için (anti-TNF α -scFv, anti-TNF α -cys-scFv, anti-IL6-scFv, anti-IL6-cys-scFv) üçer koloni seçilerek restriksiyon kontrolü yapılmıştır (Şekil 4.5). İçinde doğru boyutta gen kasedi (insert DNA) taşıyan plazmidler, dizi analizi için tasarlanmış primerler kullanılarak, hizmet alımı yoluyla dizinlenmiştir. Dizinleme sonuçları ücretsiz ApE plasmid Editor v2.0 ve BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) yazılımı kullanılarak incelenmiştir. Tasarlanan plazmid ile gen sekansı %100 uyumlu olan plazmidler üretim deneyleri için seçilmiştir.



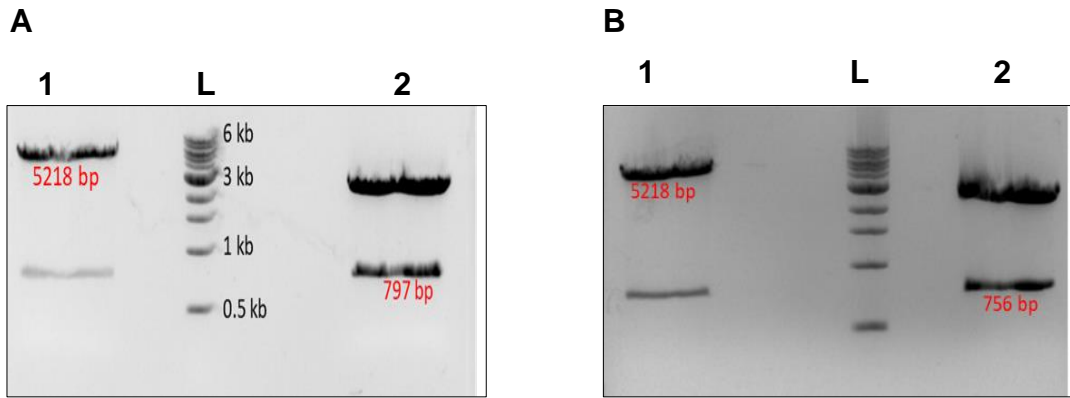
Şekil 4.5. Restriksiyon kontrolü agaroz jel elektroforezi. L: 1 kb DNA Marker, 1 ve 8: Kesilmemiş kontrol plazmid, 2-4: anti-TNF α -scFv (783 bp), 5-7: anti-IL6-scFv (762 bp), 9-11: anti-TNF α -cys-scFv (795 bp), 12-14: anti-IL6-cys-scFv (774 bp).

4.2. Anti-IFN γ -scFv ve Anti-IL1 β -scFv'lerinin Gen Kasetlerinin Tasarlanması ve Vektörlerin Oluşturulması

Nükleotid kasetlerinin oluşturulması için anti-IL1 β (PDB: 2KH2) ve anti-IFN γ (Uniprot: A2KBC7) scFv'lerinin gen dizilimleri ve V_H-V_L sekansları (aralarında linker), 6xHis, C-terminal sistein (TCG kodon) içerecek şekilde tasarlanmış [95-

97] DNA sekansı, kodon optimizasyonu yapılarak pUCIDT klonlama plazmidi (Şekil 4.1.A) içerisinde sentetik olarak temin edilmiş ve ekspresyon vektörüne (Şekil 4.1.B) aktarılmıştır. Ekspresyon vektörünün oluşturulması için, pUCIDT plazmidi ve şablon plazmid olarak kullanılan pet28a-anti-IL6-scFv *NdeI* ve *HindIII* enzimleri ile kesilmiş ve DNA uzunlukları %1'lik agaroz jelde doğrulanmıştır (Şekil 4.6).

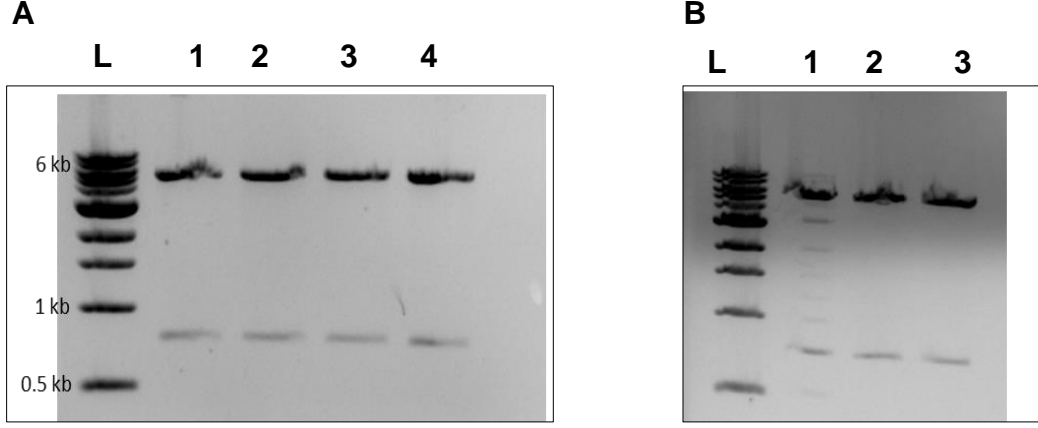
Klonlamada kullanılacak bantlar jelden kesilerek jel ekstraksiyon kiti ile saflaştırılmıştır. Ekstraksiyon sonrası örnek derişimleri nano-spektrofotometre ile ölçülmüş ve ligasyon reaksiyonu ile 16°C'de 16 sa birleştirilmiştir. Ligasyon ürünü -20°C'de saklanarak transformasyon için kullanılmıştır.



Şekil 4.6. Kesim reaksiyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü; A: pet28a-anti-IL1 β -scFv B: pet28a-anti-IFN γ -scFv vektörlerinin oluşturulması için, L: 1 kb DNA Standardı, 1: Kesilmiş şablon DNA (5989 bp), 2: Kesilmiş pUCIDT klonlama vektörü (3547 bp).

Oluşturulan ekspresyon vektörleri *E. coli* DH5 α 'ya transforme edilmiş ve LB agarda çoğaltılmıştır. Transformasyon sonrası seçilen kolonilerden saflaştırılan plazmidler önce restriksiyon analizi ile kontrol edilmiş (Şekil 4.7) içinde doğru boyutta insert DNA taşıyan plazmidler, dizi analizi için tasarlanmış primerler kullanılarak, hizmet alımı yoluyla dizinlenmiştir. Dizinleme sonuçları ücretsiz ApE plasmid Editor v2.0 ve BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) yazılımı kullanılarak

incelenmiştir. Tasarlanan plazmid ile %100 uyumlu olan plazmidler üretim denemeleri için seçilmiştir.



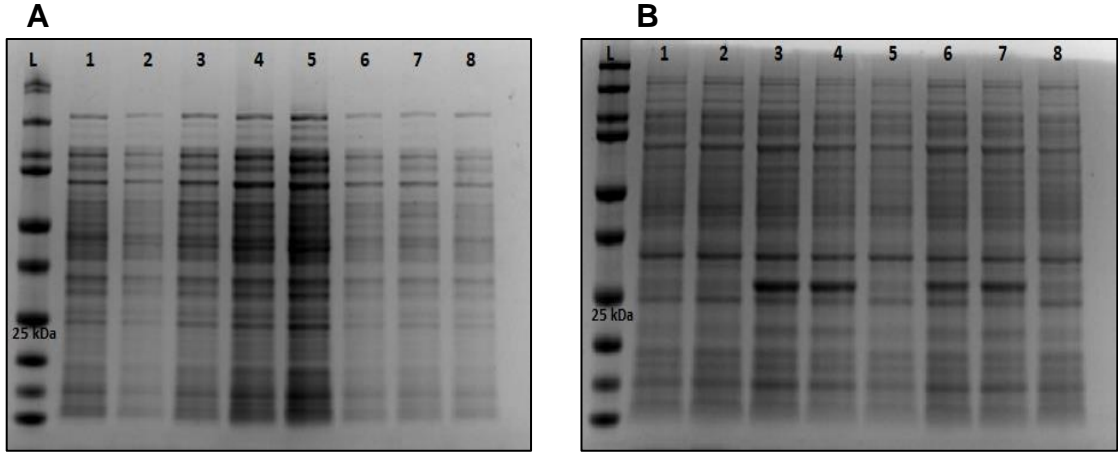
Şekil 4.7. Restriksiyon kontrolü ile ideal koloni seçimi için yapılan agaroz jel elektroforezi görüntüleri A: pet28a-anti-IL1 β -scFv (5989bp-779 bp) B: pet28a-anti-IFN γ -scFv (5989bp-756 bp) vektörlerinin oluşturulması için L: 1 kb DNA Standardı, 1: 1. koloni, 2: 2. koloni, 3: 3. Koloni, 4: 4. Koloni

4.3. Scfv'lerin Küçük Ölçekte Üretimi, Saflaştırılması ve SDS-PAGE Jel Analizi

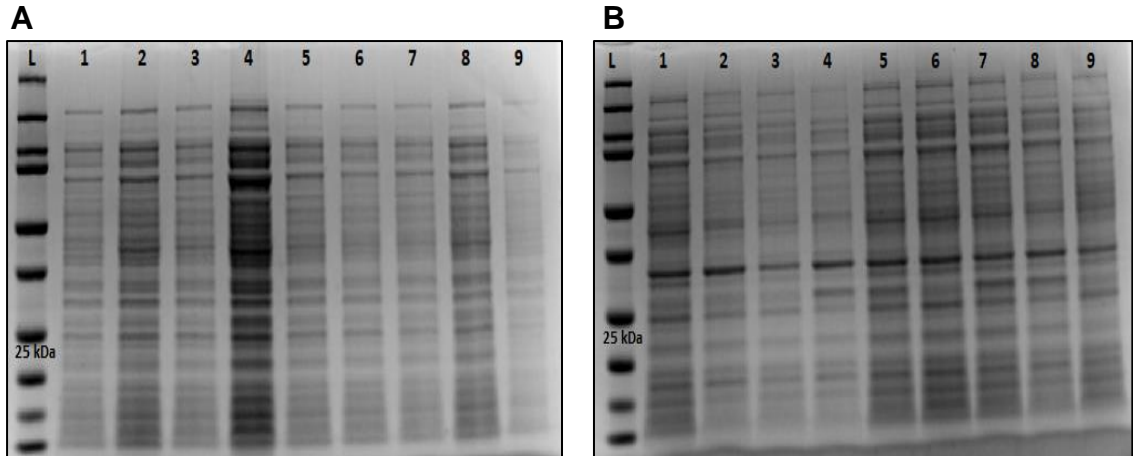
4.3.1. Üretim Sıcaklığı Optimizasyonu

E. coli'de rekombinant protein üretiminde protein çözünürlüğü etkileyen faktörler, ekspresyon seviyesinde ve proses seviyesinde faktörler olmak üzere sınıflandırılabilir. Ekspresyonu etkileyen faktörler, gen ve protein sekansına bağlı olarak çözünürlük ve katlanmayı etkileyen faktörlerdir [41]. Bu sebeple, scFv sekansları tasarım sırasında kodon seçimi, nadir kodon varlığı, çözünürlük değerleri açısından kontrol edilmiştir. Proses seviyesi faktörleri ise, üretim ortamı, sıcaklık, inkübasyon süresi, indükleyici derişimi ve konakçı suş seçimi gibi faktörlerdir. Sıcaklık, bakteride protein üretim hızını doğrudan etkilediğinden, protein katlanmasını ve çözünürlüğü etkileyen bir parametredir. Düşük sıcaklıkta protein sentez hızı azaldığından, çözünür fraksiyon artar [98].

Ekspresyon için tasarlanan plazmidler *E. coli* SHuffle® T7 Express suşuna transforme edilmiştir. Alt kültürleme sonrası 6 mL LB+Kan ortamında çoğaltılan hücreler OD₆₀₀=0,06'da IPTG ile indüklenerek 30°C (Şekil 4.8) ve 16°C'de (Şekil 4.9), 16 saat üretim yapılmıştır. Üretim sonunda ultrasantrifüjle toplanan hücreler 1xPBS ile süspansiyon edilip sonikatörle parçalanmış, sonrasında tekrar santrifüjlenerek çözümlü fraksiyon ayrılmıştır.



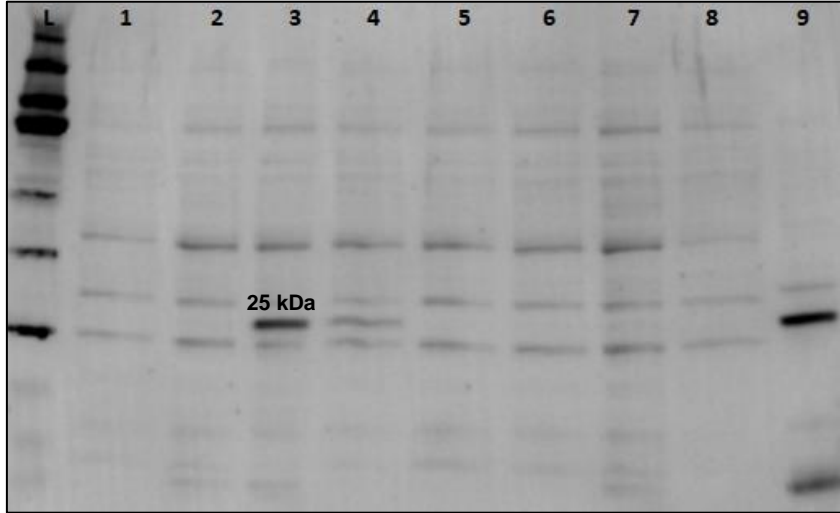
Şekil 4.8. Anti-TNF α ve anti-IL6-scFv 30°C'de yapılan üretimin SDS-PAGE analizi. A: Çözünür ve B: Çözünmez fraksiyon L: Protein Marker, 1 ve 2: Anti-TNF α -scFv, 3 ve 4: anti-IL6-scFv, 5: anti-TNF α -cys-scFv, 6 ve 7: anti-IL6-Cys-scFv, 8: pet28a



Şekil 4.9. Anti-TNF α ve anti-IL6 scFv 16°C'de yapılan üretimin A: çözümlü ve B: çözümlü olmayan fraksiyon SDS-PAGE analizi L: Protein Marker, 1 ve 2: anti-TNF α -scFv, 3: anti-IL6-scFv (4 saat), 4 ve 5: anti-IL6-scFv, 6: anti-TNF α -Cys, 7 ve 8: anti-IL6-cys-scFv, 9: pet28a

30°C (Şekil 4.8) ve 16°C (Şekil 4.9)'de yapılan üretimlerin eşit hacim yüklenerek yapılan SDS-PAGE analizinde, 27 kDa boyutunda beklenen scFv proteinleri için her iki koşulda da çözümlü fraksiyonda birikim (overekspresyon) görülememiştir. Benzer şekilde, anti-IL6-scFv ve anti-IL6-cys-scFv üretiminde, toplam protein örneklerinin yalnız çözümlü fraksiyonlarında bant gözlenmiştir.

Şekil 4.10, 16°C'de yapılan üretimin Western Blot analizini göstermektedir. Şekil 4.7'de anti-IL6-cys-scFv çözümlü fraksiyonda gözlenen bant Western Blot'ta gözlenemezken, anti-IL6-scFv çözümlü ve çözümlü olmayan fraksiyonda beklenen büyüklükte (27 kDa) bant görülmüştür.



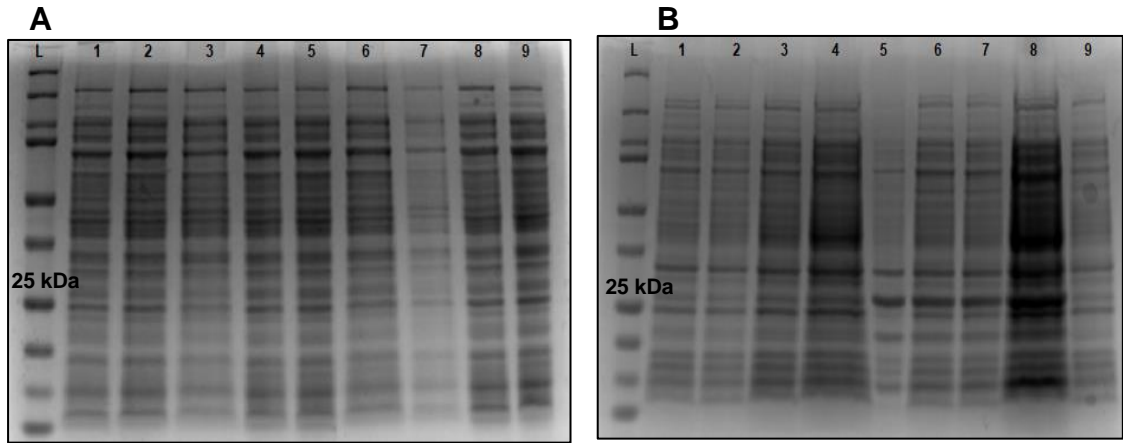
Şekil 4.10. Anti-TNF α ve anti-IL6 scFv 16°C'de yapılan üretimin Western Blot analizi. L: Marker, 1 ve 2: anti-TNF α -scFv, 3 ve 4: anti-IL6-scFv, 5: anti-TNF α -cys-scFv, 6 ve 7: anti-IL6-cys-scFv, 8: pet28a, 9: anti-IL6-scFv-IF

SDS-PAGE analizine göre sıcaklık düşüşü ile çözümlü olmayan fraksiyondaki azalma fark edilirken, çözümlü fraksiyonda bariz bir artış gözlenememiştir. Fakat düşük sıcaklığın çözümlü fraksiyon verimini artırdığı, antijenik aktivite ve stabiliteyi iyileştirdiği bilindiğinden [40, 99], sonraki çalışmalara 16°C ile devam edilmiştir.

4.3.2. İnkübasyon Süresi Optimizasyonu

İnkübasyon süresi optimizasyonu için, kanamisin içeren 20 mL LB ortamda çoğaltılan ve 0,1 mM IPTG ile indüklenen hücrelerden t=16, 24, 30 ve 42. saatlerde örnekler toplanmıştır. Bölüm 3.4'te belirtildiği şekliyle ekstrakte edilen scFv'lerin çözüner fraksiyonlarına toplam protein tayini yapılmış ve SDS-PAGE jele eşit miktarda toplam protein (10 µg) yüklenmiştir. Çözünmez fraksiyonlara ise ekstraksiyon sırasında kullanılan %1 SDS (w/v) sebebiyle Bradford yöntemiyle protein derişimi tayini yapılamamış ve her örnek çözüner fraksiyonlarıyla eşit hacimde jele yüklenmiştir.

Şekil 4.11 farklı inkübasyon sürelerinde alınan örneklerin SDS-PAGE analizini göstermektedir. İndüksiyonun erken saatlerinde alınan örneklerde ekspresyon seviyesinin ve toplam proteinin düşük olduğu görüldüğünden (Şekil 4.9, 3 nolu örnek), inkübasyonun 16. saati ve sonrasında toplanan örneklerle protein tayini ve SDS-PAGE analizi yapılmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Anti-TNFα ve anti-IL6-scFv inkübasyon süresi denemesi. A: Çözünür fraksiyon L: Protein Marker, 1-3: anti-TNFα-scFv (sırasıyla 24,30 ve 42. saat), 4-6: anti-IL6-scFv (sırasıyla 24,30 ve 42. saat), 7: pet28a, 8: anti-TNFα-scFv (16. sa), 9: anti-IL6-scFv (16.sa). B: Çözünmez fraksiyon. L: Marker, 1-4: anti-TNFα-scFv (sırasıyla 16, 24,30 ve 42. saat), 5-8: anti-IL6-scFv (sırasıyla 16, 24,30 ve 42. saat), 9: pet28a

Eşit protein miktarı yüklenen (10 µg) çözünür fraksiyon ve çözünür fraksiyonları ile eşit hacim yüklenen çözünmez fraksiyon örneklerinde, inkübasyon süresi artışının bir etkisi olmadığı görüldüğünden ve inkübasyon süresinin kısılması üretim verimliliğini (g/L/h) artırdığından, sonraki deneylerde inkübasyon süresi 16 saat olarak belirlenmiştir.

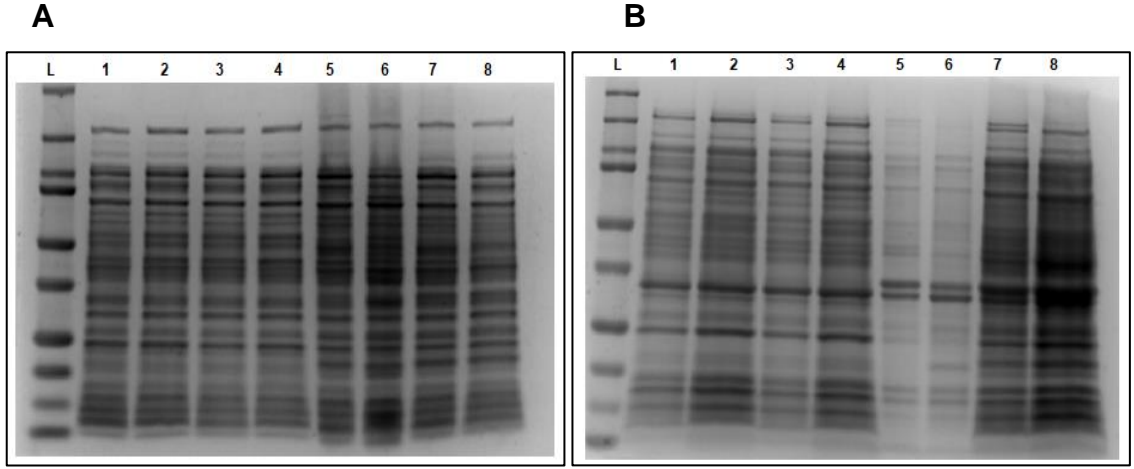
4.3.3. Üretim Ortamı ve Suş Seçimi

Üretim ortamındaki karbon ve nitrojen kaynakları ile bunların derişimleri, mikrobiyal çoğalma ve protein üretiminde sınırlayıcı faktörlerdendir. Üretim ortamının zenginleştirilmesi, bazı komponentlerin (maya ekstraktı, gliserol, glikoz, pepton, magnezyum klorür) eklenmesi, protein üretimi hızını, katlanmasını ve çözünürlüğünü etkilemektedir [100]. Bu sebeple, LB ortamının yanı sıra TB ortamda da üretim yapılmış ve üretim sonunda toplam protein tayini ve SDS-PAGE analizi ile karşılaştırılmıştır.

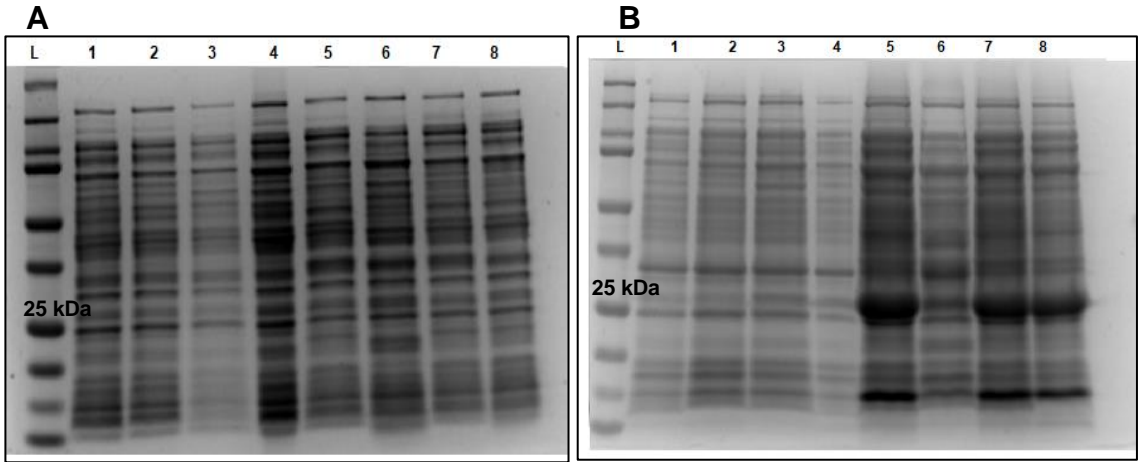
Anti-IL6-scFv ve anti-TNF α -scFv, *E. coli* BLR(DE3), BL21(DE3), Origami2, BL21 STAR (DE3), SHuffle® T7 Express suşlarına trasforme edilmiş, seçilen kolonilerle kanamisin içeren 6 mL TB ortamda 16 saat üretim yapılmıştır. Üretim ortamı karşılaştırması yapılabilmesi için SHuffle® T7 Express LB ortamda da üretime alınmıştır. İndükleme sonrası sıcaklık, SHuffle® T7 Express'te 16°C, diğer suşlarda 30°C şeklinde ayarlanmıştır. Üretim sonunda toplanan çözünür fraksiyon örneklerine toplam protein tayini sonrası SDS-PAGE jele eşit miktarda toplam protein (10 µg) yüklenmiştir. Çözünmez fraksiyonlarda ise, ekstraksiyon sırasında kullanılan %1 SDS (w/v) sebebiyle Bradford yöntemiyle protein derişimi tayini yapılamamış ve her örnek çözünür fraksiyonlarıyla eşit hacimde jele yüklenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.12, 4.13 ve 4.14'te verilmiştir.

Anti-TNF α -scFv için suş ve ortam değişikliğinin belirgin bir fark yaratmadığı görülürken, anti-IL6-scFv için TB ortamda toplam proteinin 6 kat (0,2 mg/mL ve 1,2 mg/ml) arttığı görülmüştür (Şekil 4.12). Bu sebeple sonraki çalışmalarda TB ortamda üretim yapılmıştır. Suş değişikliği, anti-IL6-scFv için çözünür fraksiyonda

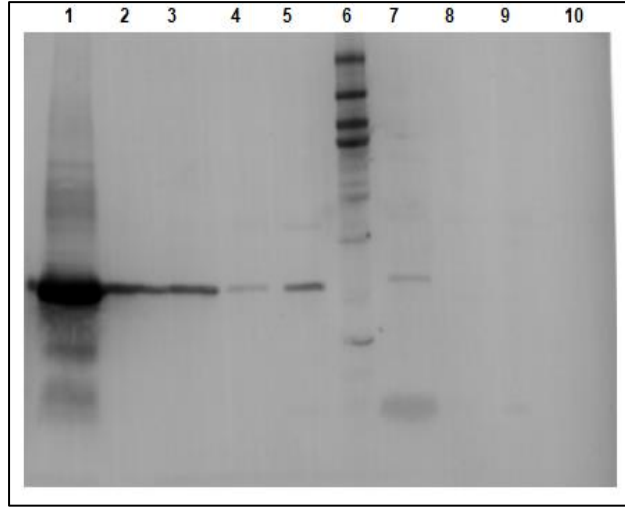
SHuffle T7 Express, çözünmöz fraksiyonlara bakıldığında BLR(DE3) suşunun öne çıktığı görölmektedir (Şekil 4.13 ve 4.14).



Şekil 4.12. Anti-TNF α -scFv suş seçimi A: çözünmöz ve B: çözünmöz fraksiyon SDS-PAGE analizi L: Protein Marker, 1: pet28a (LB), 2: pet28a (TB), 3: SHuffle (LB), 4: SHuffle (TB), 5: BLR(DE3) (TB), 6: Origami2 (TB), 7: BL21(DE3) (TB), 8: BL21Star(DE3) (TB).



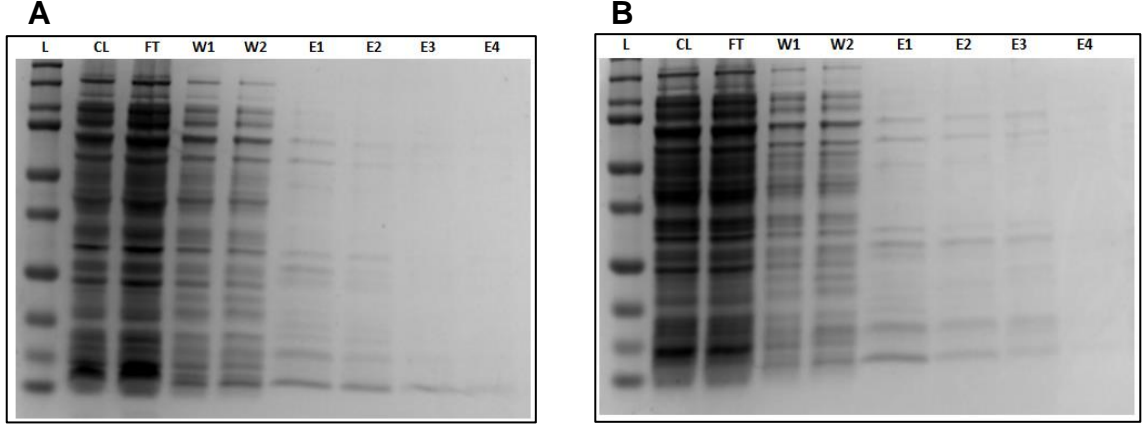
Şekil 4.13. Anti-IL6-scFv suş seçimi A: çözünmöz ve B: çözünmöz fraksiyon SDS-PAGE analizi. L: Protein Marker, 1: pet28a (LB), 2: pet28a (TB), 3: SHuffle (LB), 4: SHuffle (TB), 5: BLR(DE3) (TB), 6: Origami2 (TB), 7: BL21(DE3) (TB), 8: BL21Star(DE3) (TB).



Şekil 4.14. Anti-TNF α ve anti-IL6 scFv farklı suş seçimi Western Blot analizi. A: 1-5: anti-IL6-scFv (sırasıyla BLR(DE3)-IF, BLR(DE3), BL21(DE3), Origami2, BL21(DE3)Star, L: Ladder, 7-9: anti-TNF α -scFv (sırasıyla BL21(DE3)-IF, BL21(DE3), Origami2, 10: pet28a.

E. coli SHuffle T7 Express, protein katlanmasında rol oynayan disülfid bağ oluşumunu sağlayabilmesi ve daha oksitleyici bir sitoplazmik ortama sahip olabilmesi için genetik olarak modifiye edilmiş (trxb⁻, gor⁻, aphC^{*}) bir suştur. Yapılan çalışmalar, bu suş ile üretilen rekombinant proteinlerin daha yüksek çözünürlük ve bağlanma aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir [40, 101]. Bu sebeple sonraki çalışmalarda karşılaştırma yapabilmek için bir sonraki basamak olan His-afinite saflaştırma yapılırken her iki suşta da deneme yapılmıştır.

Anti-TNF α -scFv çözünür fraksiyon ekspresyonunun saflaştırma çalışmaları için yeterli olmayacağı görüldüğünden, anti-IL6-scFv BLR(DE3) ve SHuffle suşlarında yapılan üretimlerle His-tag afinite saflaştırma yapılmıştır. Kanamisin içeren 20 mL TB ortamda, 25°C'de, 16 saat üretim yapılmış ve sonrasında His-afinite saflaştırma yapılmıştır. Şekil 4.15 saflaştırma sonrası yapılan SDS-PAGE analizini göstermektedir.

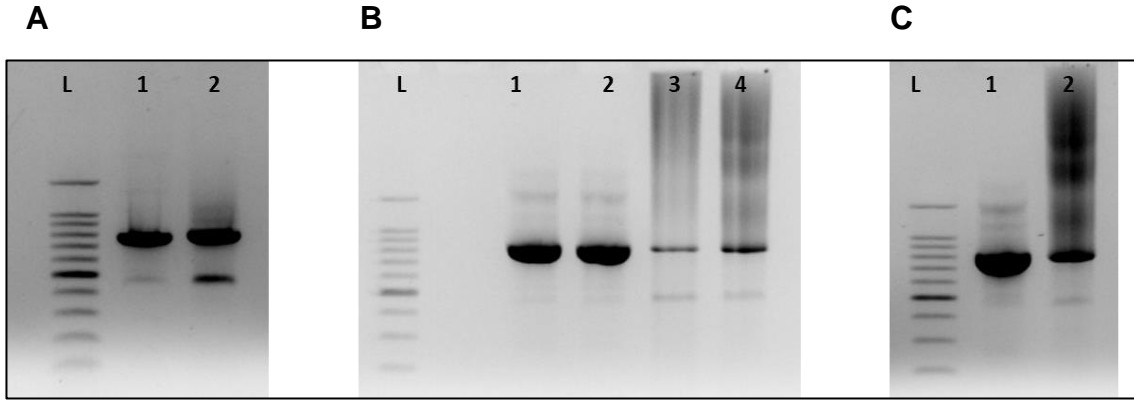


Şekil 4.15. Anti-IL6-scFv'nin A: *E. coli* SHuffle® T7 Express ve B: BLR(DE3) (sağ)'te üretim sonrası saflaştırma deneyi SDS-PAGE analizi. L: Marker, CL: Hücre lizati, FT: Flowthrough, W: yıkama, E: elüsyon

Her iki suşta da benzer şekilde, ekspresyon seviyesinin düşük olduğu, çözümlü fraksiyon elüsyonlarından tek bant elde edebilmek için yetersiz olduğu görülmüştür. Yapılan optimizasyonlara rağmen istenilen saflıkta scFv elde edilemediğinden, periplazmik bölgede üretim yapılmasına karar verilmiş ve ssMBP sinyal peptidinin eklenmesi için tekrar primer tasarımı ve klonlama çalışmaları yapılmıştır.

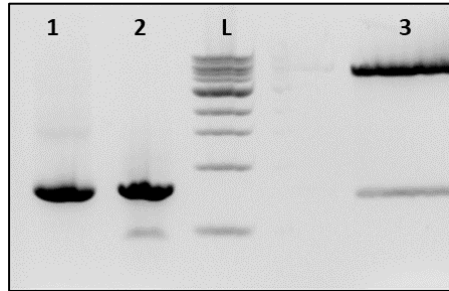
4.3.4. Periplazmik Bölgede Çözünür Formda ScFv Üretimi

Çözünür protein ekspresyon seviyesini artırmak için yapılan fermantasyon koşulları optimizasyonları, saf scFv protein eldesi için yeterli olmadığından, periplazmik bölgede üretim yapılmasına karar verilmiş ve scFv dizisine ssMBP sinyal peptidinin eklenebilmesi için Çizelge 4.1'de verilen F3, R3 ve F4 primerleri tasarlanmıştır. Tasarlanan primerlerle PCR optimizasyonu yapılmıştır. Farklı şablon DNA derişimleri sonucu elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsünü Şekil 4.16'te verilmiştir. 10, 100 ve 350 ng/µL şablon DNA kullanılan reaksiyonlarda en uygun derişimin, her iki scFv için de 10 ng/µL olduğu görülmektedir.



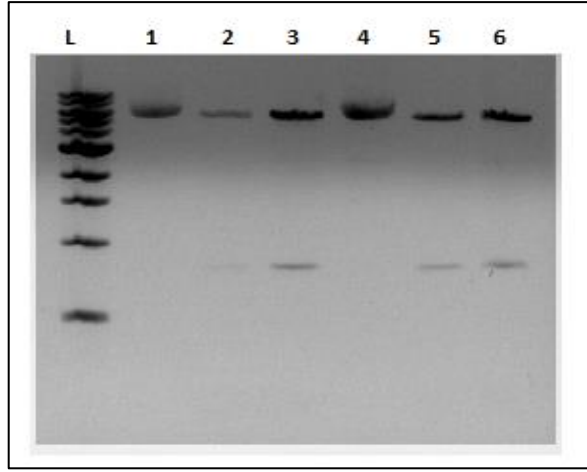
Şekil 4.16. PCR ürünleri agaroz jel görüntüsü. A: 10 ng/μL, 1: anti-IL6-scFv, 2:anti-TNFα-scFv. B: 1 ve 2: 350 ng/μL template IL-6 scfv, 3: 10 ng/μL template anti-TNFα-scFv, 4: 100 ng/μL template anti-TNFα-scFv. C: 350 ng/μL template 1: anti-IL6-scFv, 2: anti-TNF-scFv

PCR reaksiyonu sonrası restriksiyon enzimleriyle (*NcoI* ve *HindIII*) kesilen PCR ürünleri ve kalıp DNA büyüklükleri agaroz jelde görüntülenerek (Şekil 4.17) teyit edilmiş ve saflaştırma sonrası ligasyon reaksiyonu ile birleştirilmiştir.



Şekil 4.17. Restriksiyon enzimleriyle kesim sonrası agaroz jel görüntüsü. 1: anti-IL6-scFv, 2: anti-TNF-scFv, L: 1 kb DNA Marker, 3: kalıp DNA

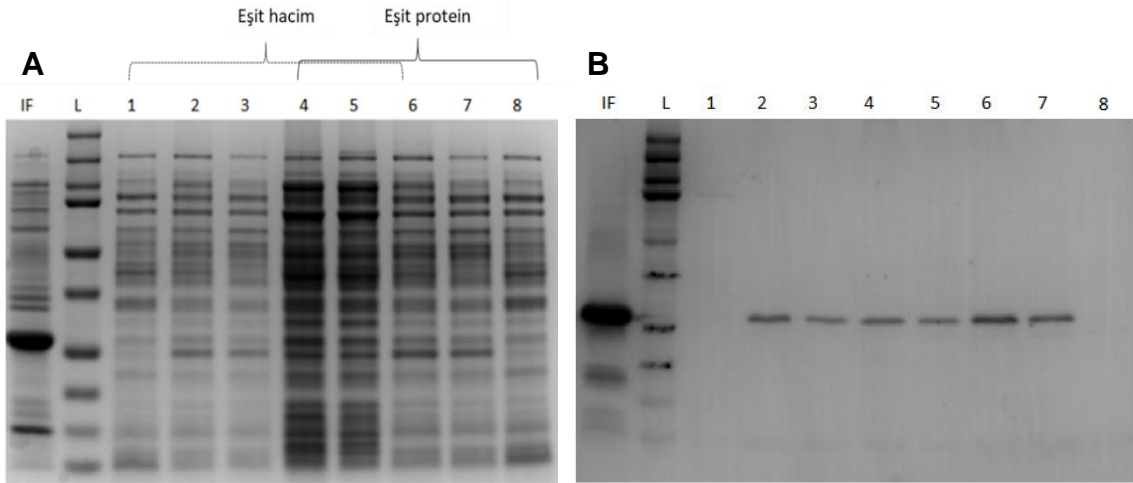
Oluşturulan ekspresyon vektörleri *E. coli* DH5α'ya aktarılarak kanamisin içeren LB agarda çoğaltılmış ve restriksiyon kontrolü yapılmıştır (Şekil 4.18). Kesim sonrası doğru büyüklükte DNA fragmenti içeren plazmidler sekans analizine gönderilerek, tasarımla %100 uyumlu vektör üretim deneyleri için seçilmiştir.



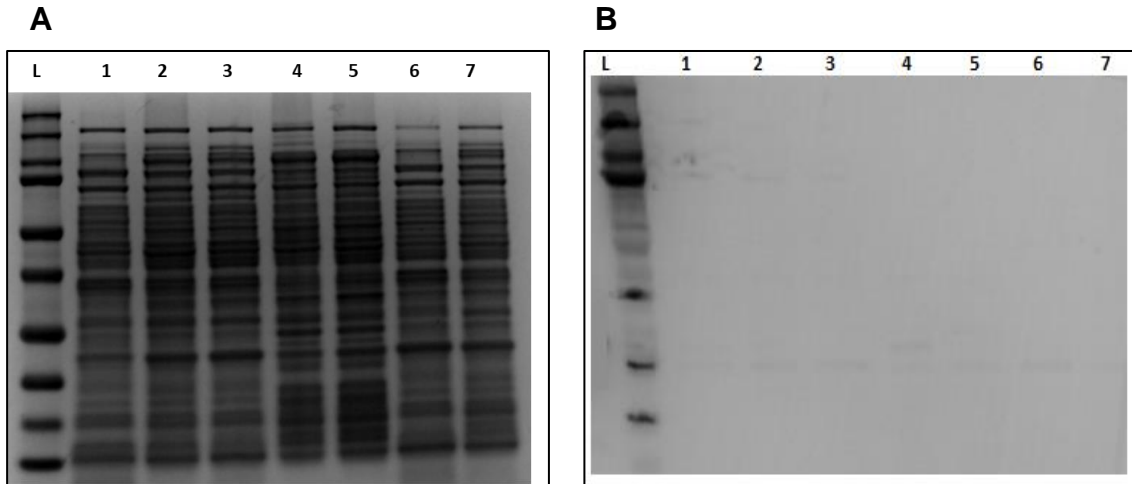
Şekil 4.18. Restriksiyon kontrolü agaroz jel görüntüsü. L: 1 kb DNA Marker, 1: Kesilmemiş anti-TNF α -ssMBP-scFv plazmidi, 2 ve 3: Kesilen anti-TNF α -ssMBP-scFv plazmid , 4: Kesilmemiş anti-IL6-ssMBP-scFv plazmid, 5 ve 6: Kesilen anti-IL6-ssMBP-scFv plazmid.

Sekansı doğrulanan anti-IL6-ssMBP-scFv ve anti-TNF α -ssMBP-scFv plazmidleri, BL21(DE3) ve BLR(DE3) suşlarına transforme edilmiş ve 6 mL TB ortamda, 25°C'de 16 saat üretim sonunda, 4°C, 4000xg, 15 dk santrifüjle toplanan hücrelerden sonikasyon ve santrifüj sonrası scFv çözümler fraksiyonları toplanmış ve toplam protein tayini sonrası SDS-PAGE ve Western Blot analizleri yapılmıştır (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). Sinyal peptidinin olmadığı duruma karşılaştırma yapılabilmesi için ssMBP eklenmemiş vektörler de üretime alınmış ve TB ortamda çoğaltılan hücrelerin tüm hücre lizisi sonrası protein tayini ve SDS-PAGE ile analizleri yapılmıştır.

Anti-IL6-ssMBP-scFv ve anti-IL6-scFv üretim sonrası SDS-PAGE ve Western Blot analizine göre, çözümler fraksiyon ekspresyonunda protein birikiminde bariz bir fark görülemedi, Western Blot bantlarından yapılan kıyaslama ile BL21(DE3)'te yapılan anti-IL6-ssMBP-scFv'nin saflaştırma denemelerine alınmasına karar verilmiştir. Anti-TNF α -ssMBP-scFv ve anti-TNF α -scFv üretim sonrası analizlerinde ise, periplazmik üretim sonunda da Western Blot analizinde hiç bant görülmemesi sebebiyle (Şekil 4.20), sonraki denemelere yalnızca anti-IL6-scFv ve IL6-cys-scFv ile devam edilmesine karar verilmiştir.



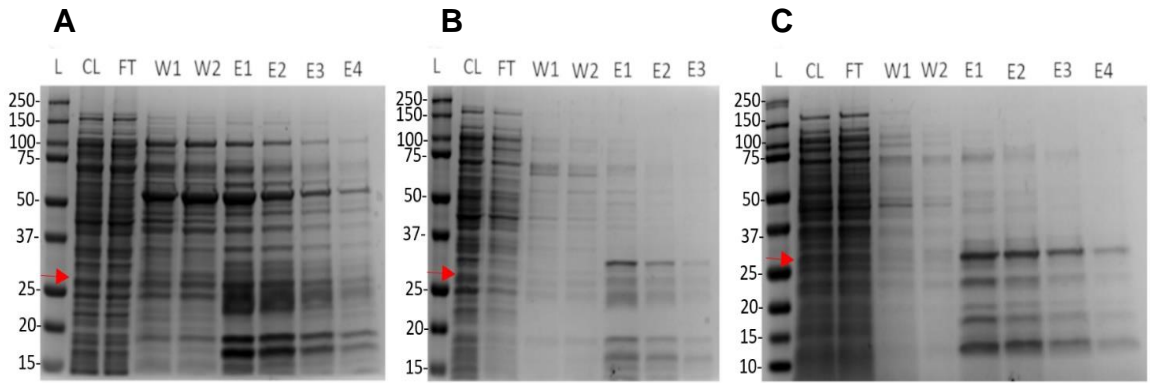
Şekil 4.19. Anti-IL6-ssMBP-scFv ve anti-IL6-scFv üretim sonrası A: SDS-PAGE ve B: Western Blott görüntüsü. IF: BLR(DE3)-IL6-scFv-insoluble fraction, L: Protein Marker, 1: pet28a, 2: BL21(DE3)-anti-IL6-ssMBP-scFv, 3: BLR(DE3)-anti-IL6-ssMBP-scFv, 4: BL21(DE3)-anti-IL6-scFv, 5: BLR(DE3)-anti-IL6-scFv, 6: BL21(DE3)-anti-IL6-ssMBP-scFv, 7: BLR(DE3)-anti-IL6-ssMBP-scFv, 8: pet28a



Şekil 4.20. Anti-TNF α -ssMBP-scFv ve anti-TNF α -scFv üretim sonrası A: SDS-PAGE ve B: Western Blot görüntüsü L: Protein Marker, 1: pet28a, 2: BL21(DE3)-anti-TNF α -scFv, 3: BL21(DE3)-anti-TNF α -ssMBP-scFv, 4: BLR(DE3)-TNF α -scFv, 5: BLR(DE3)-anti-TNF α -ssMBP-scFv, 6: BL21(DE3)-anti-TNF α -scFv, 7: BL21(DE3)-anti-TNF α -ssMBP-scFv

Periplazmik bölgede üretilen anti-IL6-ssMBP-scFv'den yüksek saflıkta protein elde edebilmek ve SHuffle T7 Express suşundan elde edilen sitoplazmik protein verimini karşılaştırabilmek amacıyla, 100 mL TB ortamda, 25°C'de 16 saat üretim yapılmıştır. Üretim sonunda santrifüjle toplanan hücre lizatlarından elde edilen çözünür proteinlere His-afinite saflaştırma yapılarak elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 4.21A).

MBP sinyal peptidi ile periplazmik bölgede birikimi hedeflenen proteinlerin sadece hücre içi değil, hücre dışına da yönlendirme olduğu bilindiğinden [102, 103], ssMBP sinyal peptidi ile yapılan üretimin hücre dışı fraksiyonu da toplanmış ve aynı koşullarda His-afinite saflaştırma yapılmıştır (Şekil 4.21B ve Şekil 4.21 C).



Şekil 4.21. Afinite saflaştırma sonrası sitoplazmik (A), periplazmik (B) ve hücre dışı (C) fraksiyonlardan elde edilen çözünür anti-IL6 scFv'nin SDS-PAGE analizi. Tüm yıkama ve elüsyon örnekleri toplam hacime göre normalize edilmiştir. CL: Hücre lizatı, FT: Kolondan ilk çıkan (Flowthrough), W: Yıkama, E: Elüsyon.

SDS-PAGE analizi (Şekil 4.21) değerlendirildiğinde, sitoplazmik ortamdaki yapılan saflaştırmanın periplazmaya, periplazmik ortamdaki yapılan saflaştırmanın ise ekstraselüler (Şekil 4.21) ortama göre daha kirli elüsyon örneklerine sahip olduğu görülmüştür. Sebebi, sitoplazmanın periplazmaya, periplazmanın ekstraselüler ortama kıyasla daha zengin protein ortamına sahip olmasından kaynaklıdır.

Her üç kompartmandaki toplam protein derişimleri de göz önüne alınarak hesaplanan verim değerleri incelendiğinde (Çizelge 4.2), en yüksek verimin (19 mg/mL) SHuffle T7 Express'te sitoplazmik ortamda yapılan üretimde elde edildiği görülmüştür.

Çizelge 4.2. Anti-IL6-scFv ile yapılan üretim verimleri

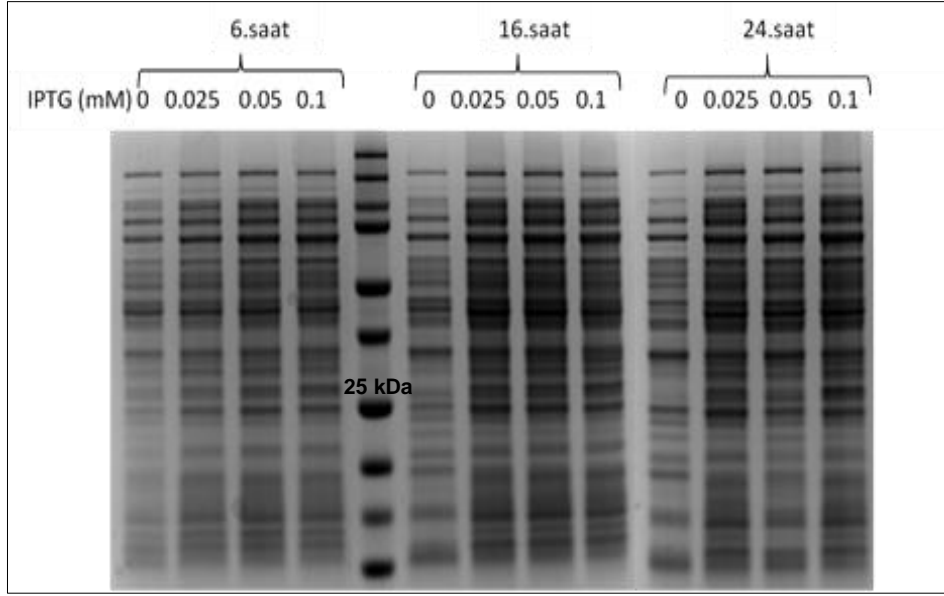
Suş	Toplam protein (mg/mL)	% scFv	scFv (mg/mL)	Üretim verimi (mg/L)
BL21(DE3) (ekstraselüler)	0,3	5,8	0,017	17
BL21(DE3) (periplazmik)	0,7	4,2	0,029	0,7
SHuffle T7 Express (stoplazmik)	3,6	5,3	0,19	19

4.3.5. İndükleyici Derişimi ve Mg⁺² İyonu Etkisi

E. coli'de protein ekspresyonunda inklüzyon cisimlerinin oluşumunun en önemli sebebi proteinin doğru katlanamamasıdır. Protein translasyon hızı, katlanma hızından büyükse protein katlanmadan agregate olabilmektedir. Çözünür protein derişimini artırmaya yönelik olarak, proteinin doğru katlanması için gereken sürenin sağlanması gereklidir ve bu durum ekspresyon hızını düşürerek sağlanabilmektedir. İndükleyici derişimi, ekspresyon hızını etkileyen önemli bir parametredir; derişimi azaldıkça protein ekspresyon hızı yavaşlamaktadır [104].

Protein ekspresyonunda önemli bir parametre olan indükleyici derişiminin etkisinin görülebilmesi için, 15 mL TB ortamda, 25°C'de üretim yapılmıştır. Hücre OD₆₀₀'si 0,6-0,8 aralığında farklı derişimlerde IPTG ile indüklenmiş ve t=6, 16, 24. saatlerde alınan örneklere SDS-PAGE analizi yapılmıştır (Şekil 4.22). Eşit hacim örnek yüklenerek yapılan SDS-PAGE analizinde, 6 saatlik üretimin ekspresyon için yetersiz olduğu görülmüş, inkübasyon süresini uzatmanın ise üretimi

etkilemediği görülmüştür. Bunun yanı sıra, 0,1 mM IPTG derişimi altında ekspresyon seviyesinin düştüğü görülürken, indükleyici artışının ekspresyonu baskıladığı görülmüştür.

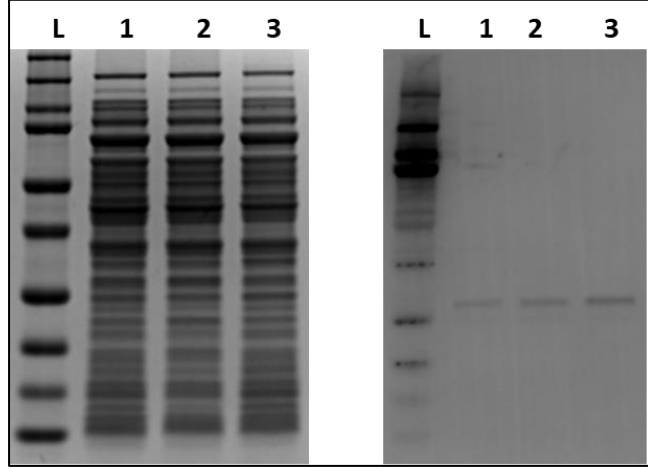


Şekil 4.22. Anti-IL6-scfv üretimine indükleyici derişimi etkisi

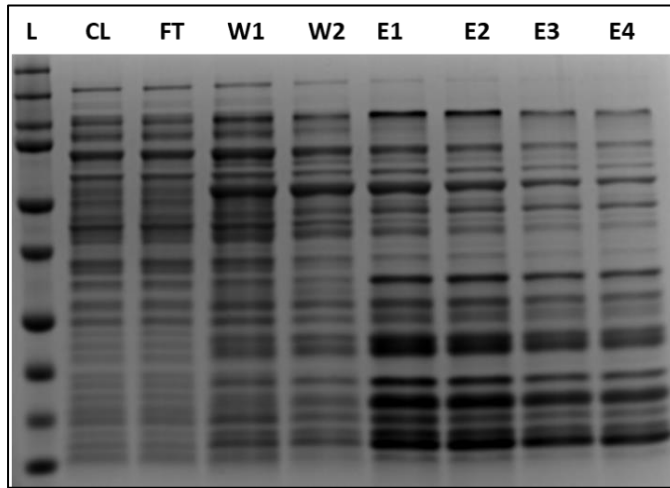
E. coli'de çözümlü protein üretiminde Mg^{+2} iyonlarının pozitif etkisi bilindiğinden [105, 106], ortama 0,5 mM ve 10 mM derişimlerinde $MgCl_2$ eklenerek çözümlü protein ekspresyonuna etkisi incelenmiştir. 15 mL TB ortamda, 25°C'de, 16 saat yapılan üretim sonunda, toplam protein derişimleri ölçülen örneklerin SDS-PAGE ve Western Blot analizi yapılmıştır (Şekil 4.23). Kontrol grubuna $MgCl_2$ eklemesi yapılmamış ve aynı koşullarda üretim yapılarak karşılaştırılmıştır. 10 mM $MgCl_2$ eklemesinin çözümlü protein ekspresyonunu olumlu etkilediği görülmüş ve sonraki üretim ortamları bu şekilde hazırlanmıştır.

Anti-IL6-scfv, *E. coli* SHuffle® T7 Express'de 50 mL TB ortamda, 10 mM $MgCl_2$ eklemesiyle 25°C'de 16 saat üretilmiş ve sonrasında saflaştırma yapılmıştır. Toplam protein tayini yapılan örneklerin SDS-PAGE analizi yapılmış (Şekil 4.24) ve elüsyonlarda saf protein elde edilememiştir. Yapılan çalışmalara rağmen

çözünür protein ekspresyon seviyesinin, saf protein eldesi ve sonraki basamaklar için yeterli olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.23. Anti-IL6-scFv üretimine Mg²⁺ iyonu derişimi etkisi SDS-PAGE (sol) ve Western Blot (sağ) analizi. L:Protein Marker, 1: Kontrol, 2: 0,5 mM MgCl₂, 3: 10 mM MgCl₂



Şekil 4.24. 10 mM MgCl₂ ile yapılan üretim sonrası saflaştırma denemesi SDS-PAGE analizi

Yapılan tüm optimizasyonlara rağmen çözünür fraksiyondan scFv protein eldesinin yeterli olmadığına karar verilmiş, bu durumda çözünmeyen fraksiyondan çözünür protein elde etme yöntemine geçiş yapılmıştır.

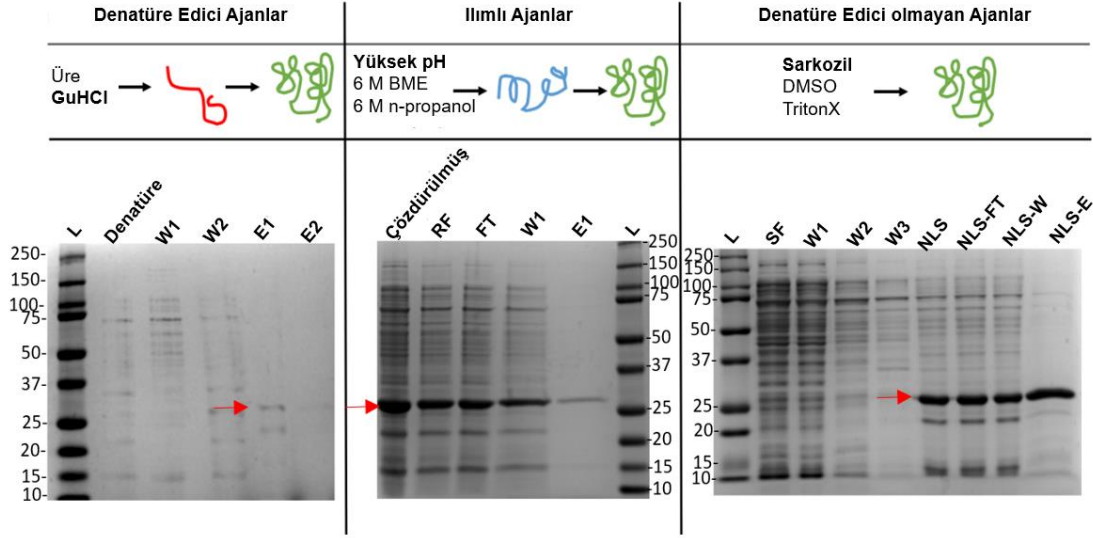
4.4. İnküzyon Cisimciklerinden (IB) Çözünür Protein Eldesi

IB çözünürleştirilmesi için üç farklı yöntem kullanılmıştır; denatüre edici, ılımlı (mild) ve denatüre edici olmayan yöntem. Denatüre edici ajanlar ile IB çözünürleştirmede, proteinin 3D yapısını oluşturan S-S bağlarının indirgenmesiyle disülfid bağlarının kırılmasını içeren bir denatürasyon adımı vardır [47, 107, 108].

Denatürasyon için, yüksek derişimlerde üre ve GuHCl gibi denatüre edici ajanlar kullanılır. Tez kapsamında 6 M GuHCl kullanılmış ve ardından His-afinite saflaştırması yapılmış, elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 4.25A).

İB'lerin ılımlı çözünürleştirme yöntemlerinde kullanılan ajanlar, protein moleküllerini kısmi katlanmış (kısmi çözülmüş) duruma getirir [46]. Tez kapsamında, ılımlı çözünürleştirme için alkali pH kullanılmış, pH'sı 6-12 arasında değişen çözünürleştirme çözeltileri kullanılarak protein geri kazanımına bakılmıştır (Ek-3). Beklendiği gibi, çözünürleştirilen protein miktarı artan pH ile artmıştır ve bu sebeple saflaştırma, pH=12 tamponu (Bölüm 3.4) ile çözdürülen proteinle yapılmıştır. Saflaştırma sonrası elde edilen fraksiyonlar SDS-PAGE analiz edilmiştir (Şekil 4.25B).

Yapılan son çalışmalar [51, 109], denatüre edici olmayan ajanlarla IB'den aktif ve doğru katlanmış protein elde edilebildiğini göstermiştir. Bu sebeple, dört farklı denatüre edici olmayan ajan kullanılmış (Ek-3) ve geri kazanımı en yüksek durumun %1 NLS kullanıldığı koşul olduğu görülmüştür. Bu sebeple, %1 NLS içeren çözelti ile çözdürülen protein, His-afinite saflaştırma sonrası SDS-PAGE ile analiz edilmiştir (Şekil 4.25C).



Şekil 4.25. Farklı çözünürleştirme yöntemleriyle elde edilen çözünür anti-IL6 scFv SDS-PAGE analizi: (A) Denatüre edici (6 M GuHCl), (B) Ilımlı (Mild) (pH 12) ve (C) Denatüre Etmeyen Çözünürleştirme (%1 w/v NLS). Örnekler toplam protein ile normalize edilmiştir. FT: Flowthrough, W: Yıkama, E: Elüsyon, SF: Çözünür fraksiyon; NLS: N-lauril sarkozin ile çözdürülmüş protein [43].

Ilımlı çözücünün kullanıldığı durumda verimin, denatüre edici çözünürleştirmeye göre, denatüre edici olmayan ajanların kullanıldığı durumdaki verimin ise ılımlı çözücüye göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.3, denatüre edici, ılımlı ve denatüre edici olmayan koşullarda elde edilen toplam çözünür protein miktarını, saflığını ve toplam verimi özetlemektedir. Tüm yöntemlerin verimleri karşılaştırıldığında, en yüksek verimin %1 NLS kullanıldığı durum olduğu görülmektedir. Bu sebeple, sonraki çalışmalarda IB'den çözünür scFv eldesi için %1 NLS kullanılmıştır.

Çizelge 4.3. Farklı çözünürleştirme yöntemleri ile geri kazanılan çözünür ve saf scFv protein verimleri [43].

Metot	Çözünürleştirilmiş IB protein (mg/mL)	Safılık (%)	Çözünür ve Saf protein (mg/mL)	Safılık (%)	Çözünür ve saf protein verimi (mg/L)
<u>Denatüre edici</u>	7,1	7,2	0,9	59,3	1,0
<u>Ilımlı</u>	7,2	21	0,03	100	0,6
<u>Non-Denatüre edici</u>					
NLS (%0,2)	4,6	6,9	0,12	16,4	0,4
NLS (%1)	18,7	40,0	0,9	81,0	14,4
Triton-X	0,6	16,7	0,03	19,1	0,1
DMSO	0,5	25,8	0,04	22,7	0,18
Üre	0,2	9,0	0,05	32,1	0,2

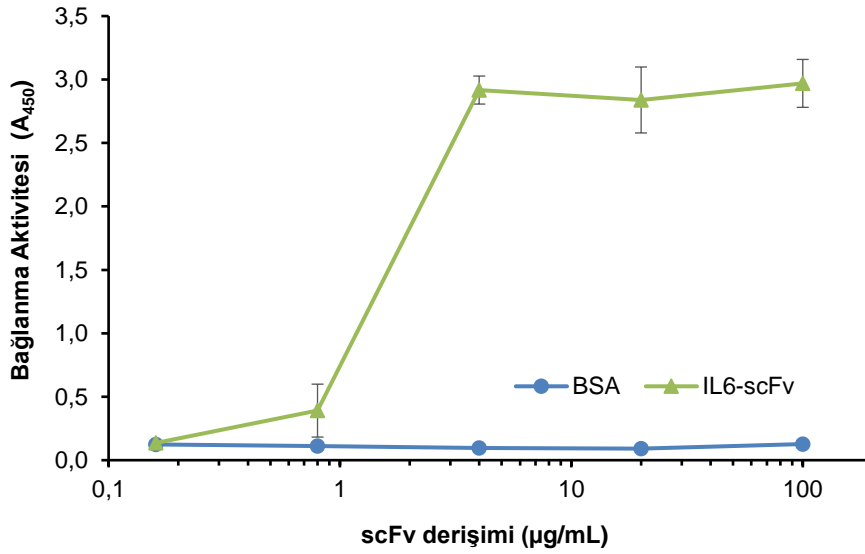
IB'lerin yapısı üzerine yapılan son çalışmalar [51, 109, 110] bunların biyolojik olarak aktif ve doğru katlanmış rekombinant proteinler içeren protein agregatları olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, denatüre edici olmayan ajanların kullanımı, pahalı ve zaman alıcı yeniden katlama prosedürlerine ihtiyaç olmadan doğru katlanmış proteinler elde etmek açısından önemlidir.

Anti-IL6-scFv, dört farklı denatüre edici olmayan ajan ile (%1 (v/v) Triton-X, %5 (v/v) DMSO, 2 M Üre ve %0.2-1 (w/v) NLS) çözdürülüp, izolasyondan sonra saflaştırılmıştır. %1'lik NLS ile çözünürleştirme ve saflaştırılma sonrasında yüksek miktarda (14,4 mg/L) ve saflıkta (%81) protein elde edilmiştir. Saflaştırma

sonunda tüm elüsyonlar toplanıp tuzdan uzaklaştırma (tampon değişimi) yapıldıktan sonra en az %95 saflıkta 23 mg/mL verimde anti-IL6-scFv elde edilmiştir (Ek-3). Literatürde yapılan diğer çalışmalarla [111, 112] karşılaştırıldığında en az on kat daha yüksek verim elde edilmiştir (Çizelge Ek-3.1).

4.5. IB'den İzole Edilen ScFv'lerin Karakterizasyonu

Anti-IL6-scFv'nin antijene bağlanma aktivitesinin belirlenmesi için dolaylı-ELISA yapılmıştır. Bunun için plaklar 50 µL, 1 µg/mL ticari IL6 antijeni ile kaplanmış ve 100 µL, 0-100 µg/mL anti-IL6-scFv seri seyreltme yapılarak kuyulara eklenmiştir (Şekil 4.26).



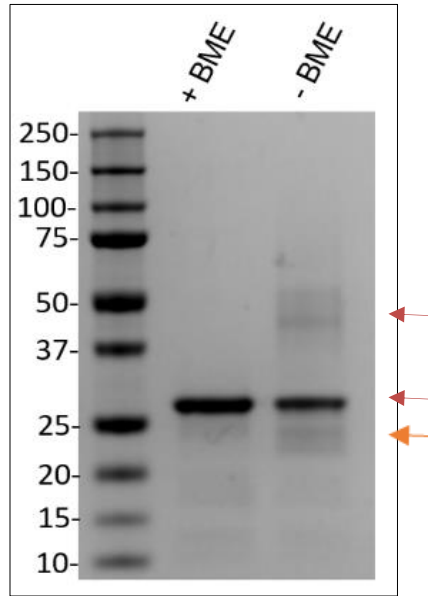
Şekil 4.26 Saflaştırılmış anti-IL6-scFv bağlanma aktivitesi

Anti-IL6-scFv ekspresyonu ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda bağlanma aktivitesi kontrolü için kullanılan yöntemler farklılık göstermektedir. Ehsani vd. [111] SPR, Krebs vd. [113] ile Gejima vd. [114] ELISA kullanmıştır. Aktivite analizi için ELISA kullanan çalışmalarda, antijen kaplama derişimi farklılık gösterse de benzer yöntemi kullanan Krebs ve arkadaşlarının çalışmasında antijen miktarı 10-kat daha fazla olmasına rağmen tez kapsamında

elde edilen anti-IL6-scFv'lerin OD₄₅₀ ile ölçülen bağlanma aktivitelerinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

IB'den elde edilen scFv'lerin bağlanma aktiviteleri çözünür fraksiyondan elde edilen scFv'ler ile kıyaslanmış (Ek-4), beklenildiği gibi çözünür fraksiyondan elde edilen scFv'lerin aktiviteleri yaklaşık iki kat daha yüksek ölçülmüştür. NLS her ne kadar denatüre etmeyen bir ajan olarak kullanılsa da protein aktivitesi üzerindeki negatif etkileri [115] de bilinmektedir. Bu sebeple, bu yöntemle elde edilen scFv'lerin aktivitesinin ikincil yapısını yeterince koruduğu ve doğal forma yakın bir aktivite gösterdiği söylenebilmektedir.

ScFv'ler V_H ve V_L zincirlerinde β -tabakaları birbirine bağlayan iki adet disülfid bağı (intra-domain) içerir ve bu bağlar üç boyutlu yapıda ve antijene afinitesinde önemli rol oynar [116, 117]. Disülfid bağı oluşumunu doğrulamak için indirgeyici ve indirgeyici olmayan koşullarda SDS-PAGE analizi yapılmıştır (Şekil 4.27).



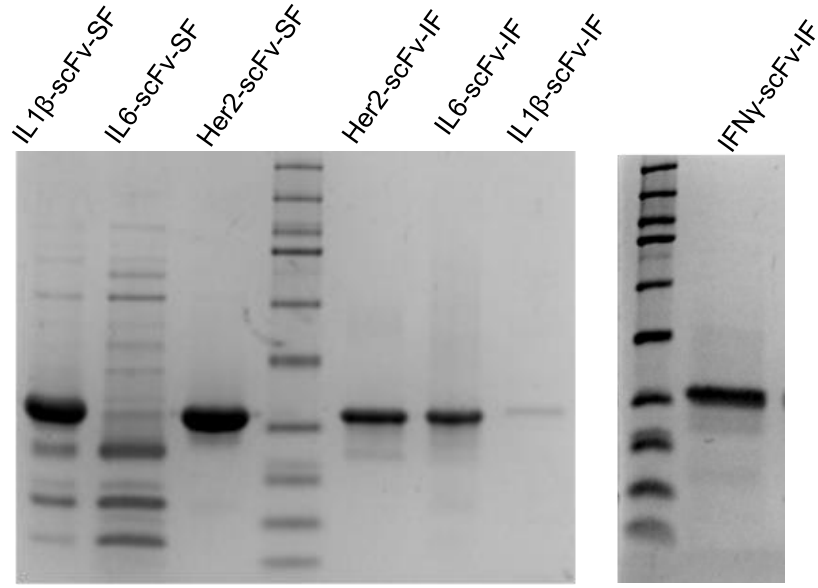
Şekil 4.27 İndirgenmiş (+BME) ve indirgenmemiş (-BME) anti-IL6 scFv'nin SDS-PAGE analizi. Örnekler toplam proteine göre normalize edilmiştir. Üstteki ok dimerize anti-IL6-scFv'yi, alttaki ok ise disülfid bağına sahip anti-IL6-scFv'yi göstermektedir.

İndirgeme işlemi BME kullanılarak yapılmıştır. BME olmadığı koşulda, beklendiği gibi, scFv üç protein bandına sahiptir; ancak detanürasyon koşulu altında, scFv molekül içi disülfid köprüsünün indirgenmesi nedeniyle, 27 kDa'da tek bant şeklinde görülmektedir. İndirgeyici olmayan koşullar altında alt bantın yoğunluğunun artması disülfid bağlarının proteini daha kompakt hale getirmesine ve böylece daha düşük bir moleküler ağırlıkta görünmesine bağlanmıştır; 27 kDa üzeri bantlar ise scFv dimerizasyonunu göstermektedir. Disülfid bağı oluşumu, Ellman testi [118] ile de teyit edilmiştir (Ek-5). Proteinde disülfid bağı oluşumu olmadığına serbest tiyol grupları oluşmaktadır. Ellman testinin prensibi, tiyol grupları ile Ellman reaktifi DTNB arasındaki reaksiyon sonucu renk oluşmasına dayanmaktadır. Rengin yoğunluğu, tiyol gruplarının varlığıyla doğru orantılıdır. Hücre lizati ve BSA'nın kontrol grubu olarak kullanıldığı testte, anti-IL6-scFv ve BSA'da renk oluşumu görülmemiştir.

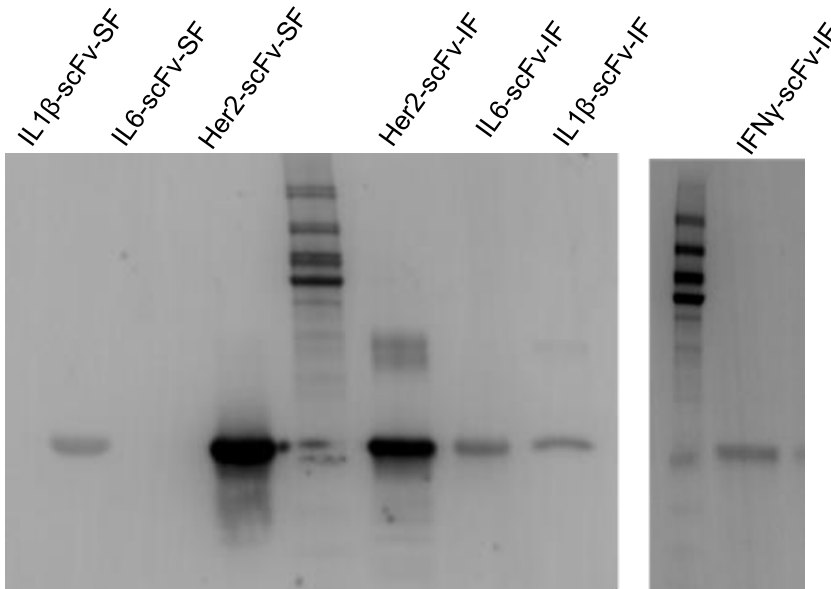
4.6. Anti IL6-cys-scFv, Anti-IL1 β -cys-scFv ve Anti-IFN γ -cys-scFv'lerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Sitokinlerin ölçümüne dayalı immünosensörlerin üretimi için dört farklı hedefe yönelik (TNF α , IL6, IL1 β , IFN γ) scFv'lerin üretimi hedeflenmiş; anti-IL6-scFv ile üretim koşullarının belirlenmesi ve ayrıca scFv'lerin çözünür fraksiyonda elde edilememesi üzerine çözünürleştirme yönteminin seçim ve optimizasyonu deneyleri yapılmıştır.

Belirlenen üretim ve saflaştırma yöntemleri ile tasarımları ve klonlama çalışmaları yapılan (Bölüm 4.1 ve 4.2) anti-IL6-cys-scFv, anti-IL1 β -cys-scFv ve anti-IFN γ -cys-scFv'leri üretimleri yapılmış, çözünür /çözünmez fraksiyonlarının kontrolü için her iki fraksiyon da saflaştırılmış, SDS-PAGE (Şekil 4.28) ve Western Blot (Şekil 4.29) analizi yapılmıştır. Örnekler toplam proteine (2 μ g) göre normalize edilmiştir. Her2-scFv jele pozitif kontrol olarak yüklenmiştir. Anti-IL1 β -cys-scFv için SF'de bant gözlenirken IF'de bant görülmemiştir. Anti-IL6-cys-scFv ve anti-IFN γ -cys-scFv ise SF'de yeterli protein birikimi olmadığından elüsyon örneklerinde saflaştırma sağlanamamıştır. IF elüsyon örneklerinde ise %98'in üzerinde bir saflık elde edilmiş ve bu örneklerin Western Blot analizi yapılmıştır.

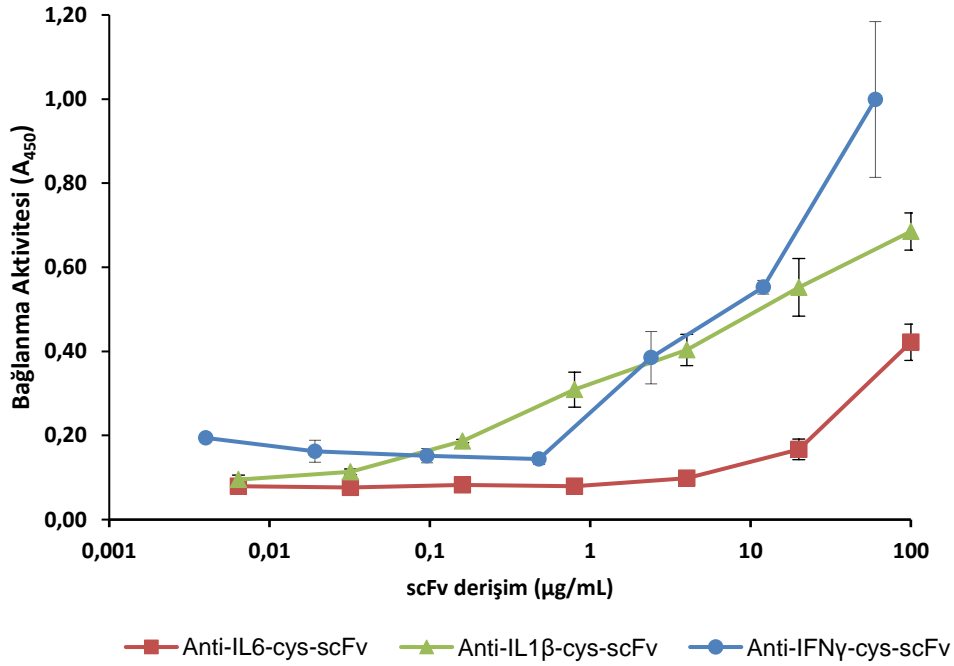


Şekil 4.28. Üretilen rekombinant scFv'lerin çözümlü (SF) ve çözümlü olmayan (IF) fraksiyonları saflaştırma sonrası SDS-PAGE analizi.

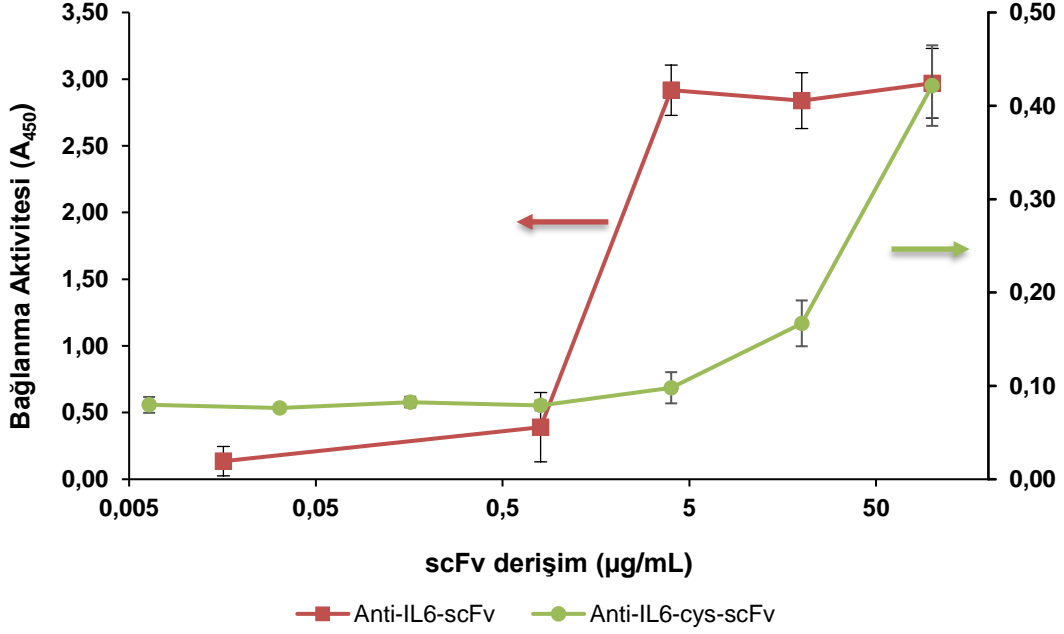


Şekil 4.29. Üretilen rekombinant scFv'lerin çözümlü (SF) ve çözümlü olmayan (IF) fraksiyonları saflaştırma sonrası Western Blot analizi.

Safılaştırılan ve birincil karakterizasyonu yapılan scFv'lerin bağlanma aktivitelerinin ölçülmesi için ELISA yapılmıştır. Plaklar tüm scFv'ler için 50 µL, 1 µg/mL ticari antijenleri ile kaplanmış ve 100 µL, 0-100 µg/mL scFv seri seyreltme yapılarak kuyulara eklenmiştir. Anti-IL6-scFv ile karşılaştırıldığında 450 nm'de okunan sinyal değerlerinin daha düşük olduğu ve scFv'lerin antijene bağlanmada doygunluk noktasının görülememesinin sebebinin, immünosensörlere yönelik tasarlanırken altın yüzeye bağlanmayı kolaylaştıran sistein aminoasidinin alınan sinyali gölgelemesinden kaynaklı olabileceği (Western Blot analizlerinde olduğu gibi) düşünülmektedir. Şekil 4.31 anti-IL6-scFv ve anti-IL6-cys-scFv'nin antijene bağlanma aktivitesini göstermektedir ve aynı derişimdeki anti-IL6-scFv'nin sistein ekli formuna kıyasla daha yüksek sinyal verdiği görülmektedir.



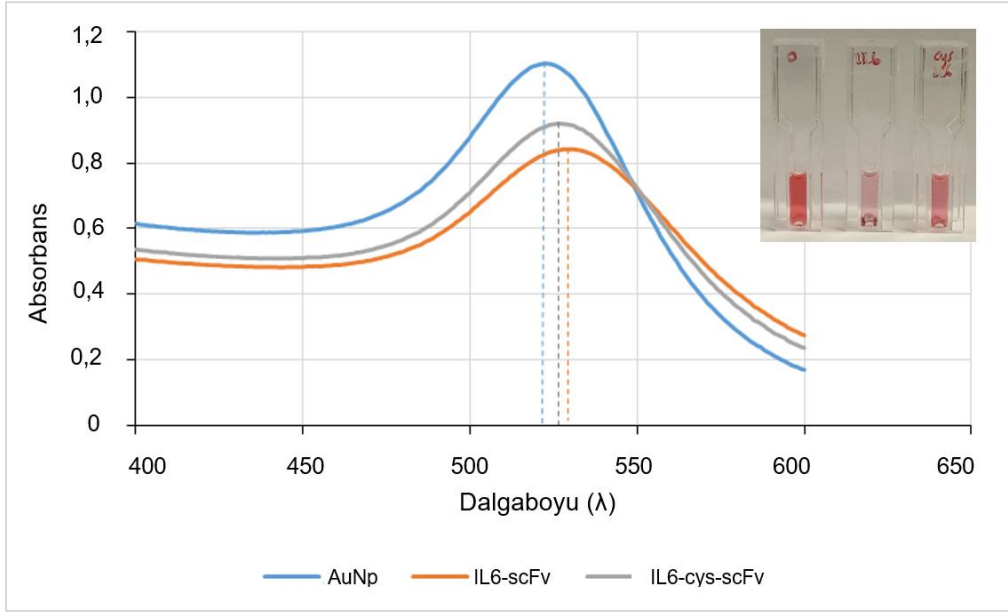
Şekil 4.30. Safılaştırılmış scFv'lerin ticari antijenlerine bağlanma aktivitesi (ELISA).



Şekil 4.31. Anti-IL6-scFv ve anti-IL6-cys-scFv'nin ticari antijenine bağlanma aktiviteleri

4.7 Rekombinant scFv'lerin AuNp ile İşaretlenmesi

Altın nanopartiküller, yüzey plazmon özellikleri sebebiyle boyutlarına bağlı olarak 500-600 nm aralığında pik verirler. Partikül büyüklüğü arttıkça pik verdiği dalgaboyu da artar. 20 nm AuNp, ~520 nm'de pik verir ve yüzeyi fonksiyonelleştirildiğinde, pik tepe noktası 2-3 nm kadar kaymaktadır. Pik pozisyonunun fazla kayması ve pik genişliğinin artması, agregasyonun belirtisidir [119]. Bölüm 3.6'da belirtildiği şekilde scFv'lerin partiküle bağlanma işleminin ardından 400-600 nm aralığında UV-Vis spektrumu ölçülmüştür. Şekil 4.32'de görüldüğü gibi kör (blank) örneğine kıyasla pik genişliği değişmezken, λ_{max} 2-3 nm kayması, bağlanmanın başarılı olduğunu göstermektedir.

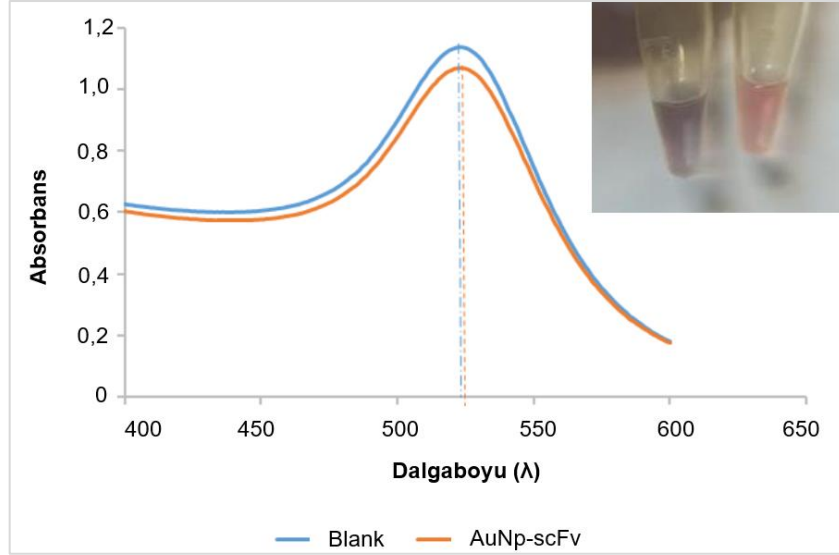


Şekil 4.32. AuNp ile anti-IL6-scFv ve anti-IL6-cys-scFv bağlanma UV-Vis spektra ölçümleri

Tez kapsamında, scFv'lere sistein aminoasidi eklenerek AuNp yüzeye daha yoğun, yönlendirilmiş ve stabil bir bağlanma hedeflenmiştir. Genetik modifikasyon ve protein üretimi basamakları sonrasında anti-IL6-scFv ve anti-IL6-cys-scFv altın nanopartükülle işaretlenmiş ve bağlanma grafikleri karşılaştırılmıştır. Partikül renk değişimlerine bakıldığında (Şekil 4.32-üst), anti-IL6-cys-scFv'de renk değişiminin daha az olduğu, anti-IL6-scFv'de ise rengin maviye daha yakın olduğu görülmüştür. Bu durum, anti-IL6-cys-scFv ile yapılan işaretlemede agregasyonun daha az, bağlanmanın daha başarılı olduğunun göstergesidir [92, 120, 121].

AuNp ile işaretlenmesi sonrası, işaretli scFv'lerin 1 hafta boyunca 4°C'de saklanmış ve 1 hafta sonunda 400-600 nm aralığında UV-vis spektrumu ölçülmüştür (Şekil 4.33). İşaretli partikülün spektrumunun hala blank'le benzer bir eğri göstermesi, tepe noktasında 1-2 nm kayma olması ve %20 NaCl eklemesi sonrası sağ üst köşede renk değişimleri verilen örneklerde partikül renginin hala pembe olması, AuNp-scFv'nin stabil olduğunu göstermektedir. Bu durum, scFv ile yapılan işaretlemede agregasyonun olmadığı, bağlanmanın başarılı olduğunun göstergesidir. Yüzeyi proteinle kaplanmayan partikül NaCl eklenmesi

sonucu agrege olur ve rengi maviye dönmektedir [92, 120]. Bu sebeple, anti-IL6-cys-scFv yatay akışlı immüno sensör üretimlerinde kullanılmak üzere AuNp ile işaretlenerek hazırlanmış ve +4°C'de saklanmıştır.

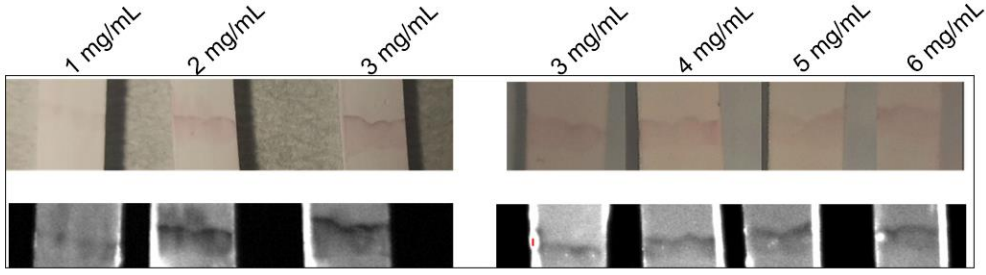


Şekil 4.33 Altın nanopartiküle bağlanan IL6-scFv stabilite testi. Blank: Yüzeğine scFv bağlanmamış AuNp.

4.8 Yatay Akışlı Kağıt İmmüno sensörlerin Üretimi

4.8.1 Test Bölgesi Scfv Derişiminin Belirlenmesi

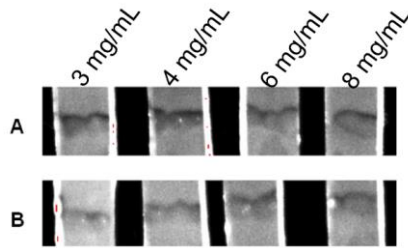
Test bölgesindeki scFv derişiminin belirlenmesi için 1, 2, 3, 4, 6, 8 mg/mL anti-IL6-cys-scFv nitroselüloz membranın üst kısımdan 12 mm uzağa 1 µL damlatılmış (çizilmiş), 37°C'de 1 saat kurutulduktan sonra sensörler hazırlanmıştır. Şekil 4.34 bu şekilde hazırlanan ve örnek pedine 1 µg/mL IL6 antijeni damlatılan testlerin sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 4.34. Test bölgesindeki scFv derişiminin sinyal şiddetine etkisi

3 mg/mL üzeri scFv derişiminin sinyal şiddetine olumlu bir etkisi görülmediğinden sonraki denemeler için test bölgesine sabitlenen scFv derişimi 3 mg/mL olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu örnekleri, test grubu için hazırlanan antijen örnekleriyle aynı derişimde, lizozim ile (1 µg/mL) ile hazırlanmıştır.

Şekil 4.35'te görüldüğü üzere, kontrol grubu örneklerinde de test grubu örneklerine benzer bir sinyal alınması test çizgisi üzerinde non-spesifik bağlanma problemi olduğunu göstermiştir. Bu sebeple sonraki çalışmalarda, kontrol grubu örneklerinde görülen non-spesifik bağlanmayı azaltmaya yönelik çalışmalar yapılmıştır



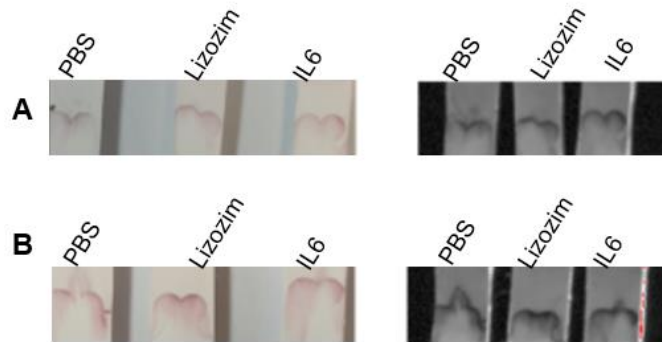
Şekil 4.35. Test grubu (A) ve kontrol grubu (B) örneklerinde sinyal yoğunlukları

4.8.2 Non-spesifik Bağlanmayı Azaltmaya Yönelik Yapılan Çalışmalar

Yatay akışlı immünoensörlerle ilgili en sık karşılaşılan problem, protein ya da altın nanopartikülün test materyaline non-spesifik adsorpsiyonudur [122]. Non-spesifik bağlanmanın azaltmaya yönelik stratejiler ise genellikle;

- Membranın ve/veya partikülün bloklanması
- Kullanılan tampon çözeltilerin iyonik şiddetinin değiştirilmesi (pH değişikliği, tuz yüzey aktif madde eklemeleri)
- Test bölgesi ve partikül yüzeyindeki tanıyıcı molekül derişiminin değiştirilmesi
- Konjugat ped/örnek pedlerine ön işlem uygulanması şeklindedir [73].

AuNp yüzeyine bağlanan scFv derişiminin artırılarak, partikül bloklama işlemine ihtiyaç duymadan partikül yüzeyinde test bölgesine non-spesifik bağlanacak kısımların kapatılması ve test çizgisinde alınan sinyal yoğunluğunun kontrol örneklerine kıyasla artırılması hedeflenmiştir. Şekil 4.36 AuNp yüzeyine bağlanan scFv derişiminin artırılması durumunda kontrol (PBS ve 1 µg/mL lizozim) ve test gruplarındaki (1 µg/mL IL6 antijen) sinyal yoğunlukları görülmektedir. Partikül yüzeyine bağlanan scFv derişiminin artırılması, alınan sinyali arttırmış, fakat non-spesifik bağlanmada belirgin bir azalmaya sebep olmamıştır.



Şekil 4.36. AuNp yüzeyine (A) 400 µg (B) 100 µg anti-IL6-cys-scFv bağlama

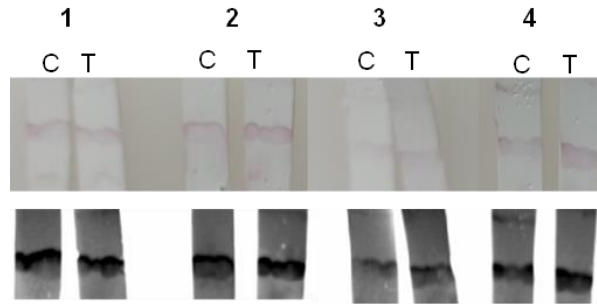
AuNp-scFv bağlanma işlemi sonrası santrifüjle bağlanmayan scFv'ler uzaklaştırılıp, AuNp-scFv konjugatı, konjugat tampon ile süspansede edilmektedir.

Konjugat-tampon pH'ı değişikliği, tuz ve yüzey aktif madde eklemelerinin etkisinin incelenmesi amacıyla Çizelge 4.4'te verilen tamponlar kullanılmıştır.

Çizelge 4.4. Konjugat tamponlar ve içerikleri

Tampon	İçerik
Konjugat Tampon 1	1x PBS, %5 sükröz, %0.25 Tween 20, pH 7,4
Konjugat Tampon 2	50 mM Tris-Cl, %5 sükröz, %0,25 Tween 20, pH 8,0
Konjugat Tampon 3	1x PBS, %5 sükröz, %0,25 Tween 20, % 1 NaCl, pH 7,4
Konjugat Tampon 4	1x PBS, %5 sükröz, %0,25 Tween 20, %0.1 SDS, pH 7,4

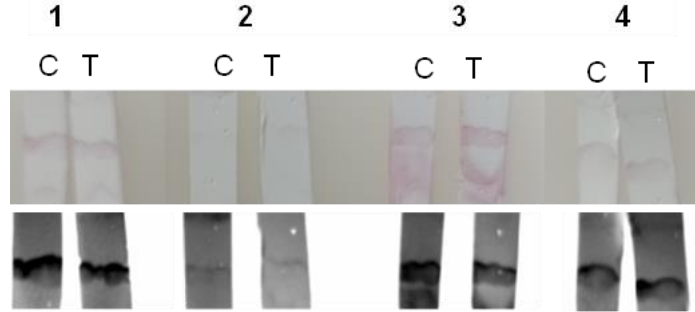
Şekil 4.37'da görüldüğü gibi konjugat tampona tuz ekleme işleminin (3) sinyal şiddetini azalttığı, pH artışının (2) ise sinyali artırdığı görülmüştür. Fakat konjugat tampon değişikliğinin, non-spesifik sinyalin test grubuna kıyasla azaltılmasına yönelik bir etkisi olmamıştır.



Şekil 4.37. Konjugat tampon değişikliğinin kontrol (C) ve test (T) gruplarında sinyal şiddetine etkisi

AuNp-scFv konjugatının bloklanma işleminin sinyal şiddeti ve non-spesifik bağlanmaya etkisinin görülebilmesi için AuNp-scFv, konjugasyon sonrası %1 lizozim, %1 kazein ve %1 PEG ile 30 dk, oda sıcaklığında inkübe edilerek

bloklanmıştır. Şekil 4.38 bloklama işlemi sonrası konjugat pede uygulanan ve test edilen sensörlerin sinyal şiddetlerini göstermektedir.



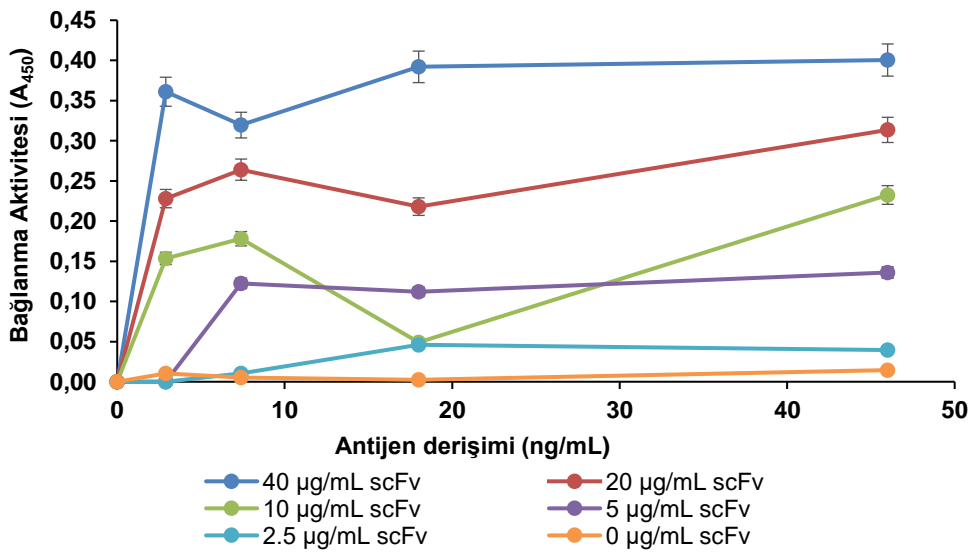
Şekil 4.38. AuNp-scFv bloklama işleminin sinyal şiddetine etkisi. (1) Bloklama yok, (2) %1 lizozim bloklama, (3) %1 kazein bloklama, (4) %1 PEG bloklama.

Lizozim ve PEG ile bloklama işleminin sinyal şiddetini azalttığı, kazein ile bloklama işleminin ise membran üzerinde kirliliğe sebep olduğu görülmüş, tüm durumlarda da non-spesifik bantların azaltılmasına yönelik olumlu bir etki görülememiştir. Bu sebeple en iyi koşulun bloklama yapılmayan durum olduğu görülmüştür. LFA'da antikor-antijen bağlanmasını birçok faktör etkileyebilmektedir. Sandviç LFA'da ideal durumda, tek bir antijen düz bir yüzeydeki bir antikora ve nanopartiküle bağlı ikinci antikora bağlanır. Ancak gerçekte hem nanopartikül hem de nitroselüloz membran üzerindeki sterik engel, spesifik olmayan adsorpsiyonlara sebep olarak bu bağlanmayı etkiler [122]. Sonuç olarak, istenilen seçicilikte kağıt biyosensörler elde edilememiş olması sebebiyle, B-planı olarak öngörülen ve yaygın olarak kullanılan ELISA yöntemine geçilmiştir. ScFv'ler imünosensörlere yönelik tasarlanırken, altın yüzeye bağlanmayı kolaylaştıran sistein aminoasidinin hem Western Blot'ta hem ELISA'da anti-His-antikoronun bağlanmasını kısmen engellediği ve alınan sinyali gölgelediğinden ELISA immünoassayler için sistein içermeyen anti-IL6-scFv kullanılmıştır.

4.9 ELISA Yöntemiyle Sitokin Ölçümüne Yönelik İmmünoassaylerin Hazırlanması

4.9.1. Dolaylı-ELISA

ELISA immünoassay için en uygun antijen ve antikor derişiminin belirlenebilmesi için seri seyreltme yapılarak farklı derişimlerde antijenle (0-45 ng/mL) kaplanan plak üzerine farklı derişimlerde scFv (0-40 µg/mL) uygulanmış ve bağlanma aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Şekil 4.39, bu antijen/antikor derişim taraması sonucu elde edilen bağlanma aktivitelerini göstermektedir. Buna göre tüm scFv derişimlerinde de 10 ng/mL antijen derişiminden sonra doygunluğa ulaşıldığı görülmüştür. Bu sebeple, sonraki denemede antijen derişim taramasının 10 ng/mL altına düşürülmesine ve bağlanma aktivitesinde belirgin bir sinyal görülebilmesi için 40 µg/mL scFv derişimlerinin kullanılmasına karar verilmiştir.



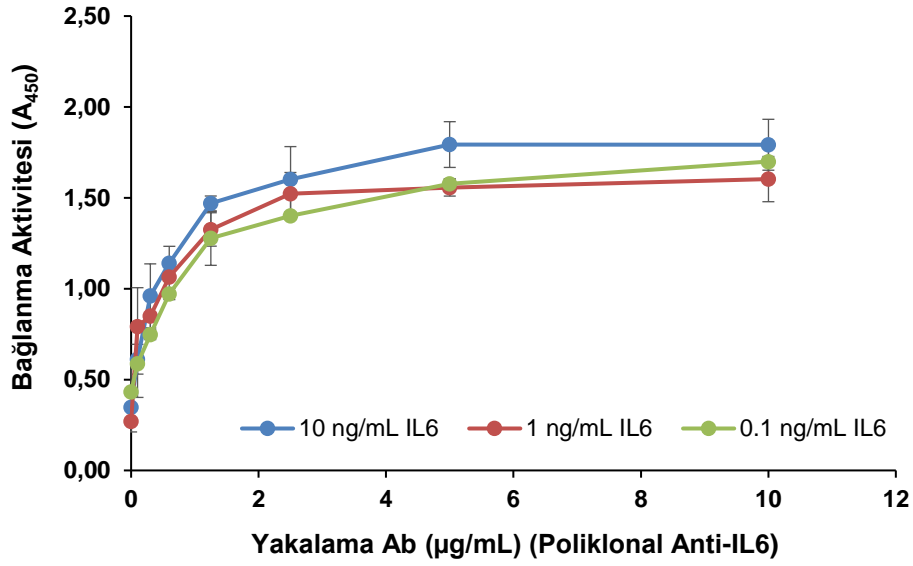
Şekil 4.39. Farklı derişimlerde IL6 antijen ve Anti-IL6-scFv'nin bağlanma aktivitesinin ELISA ile ölçümü

4.9.2. Sandviç ELISA

4.9.2.1 Yakalama Antikoru Derişiminin Belirlenmesi

Yakalama antikoru kaplama derişiminin belirlenmesi için 0-10 µg/mL ticari poliklonal anti-IL6 antikoru 2 kat seri seyreltmelerle plaklara kaplanmış, üç farklı

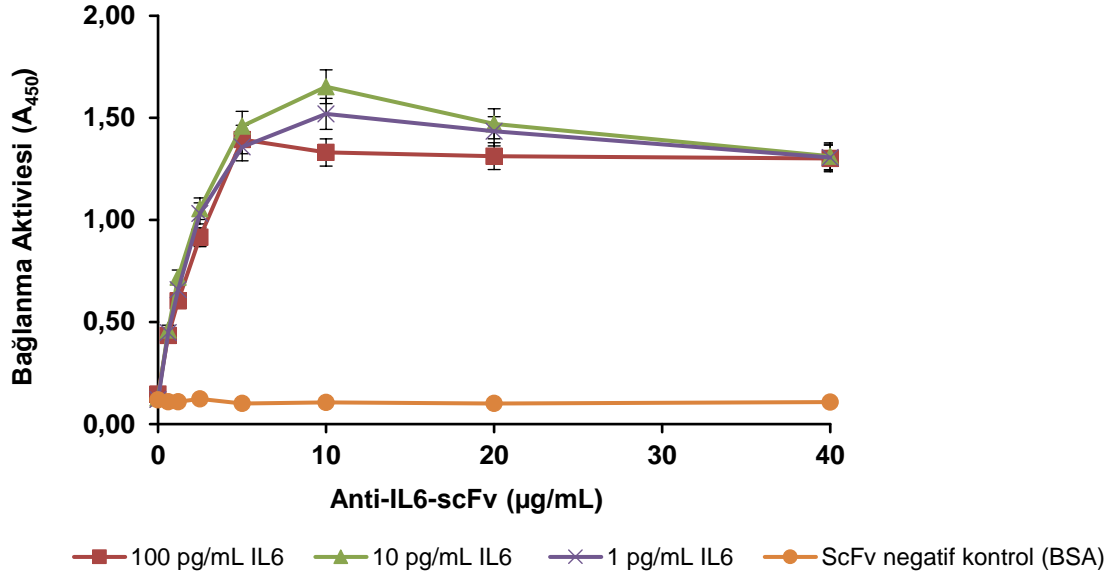
antijen derişiminde (0,1 ng/mL, 1 ng/mL ve 10 ng/mL), 40 µg/ml anti-IL6-scFv ile bağlanma aktivitesi incelenmiştir (Şekil 4.40). Yakalama antikorumun düşük derişimlerinde bile (< 1 µg/mL) en düşük antijen derişiminde (0,1 ng/mL) yüksek bağlanma aktivitesi gösterdiğinden, kaplama antikoru derişimi 0,5 µg/mL olarak seçilmiştir. Antijen derişiminin ise 0,1 ng/mL ve altının taranmasına karar verilmiştir.



Şekil 4.40. Farklı yakalama antikoru derişimlerinde anti-IL6-scFv bağlanma aktivitesi

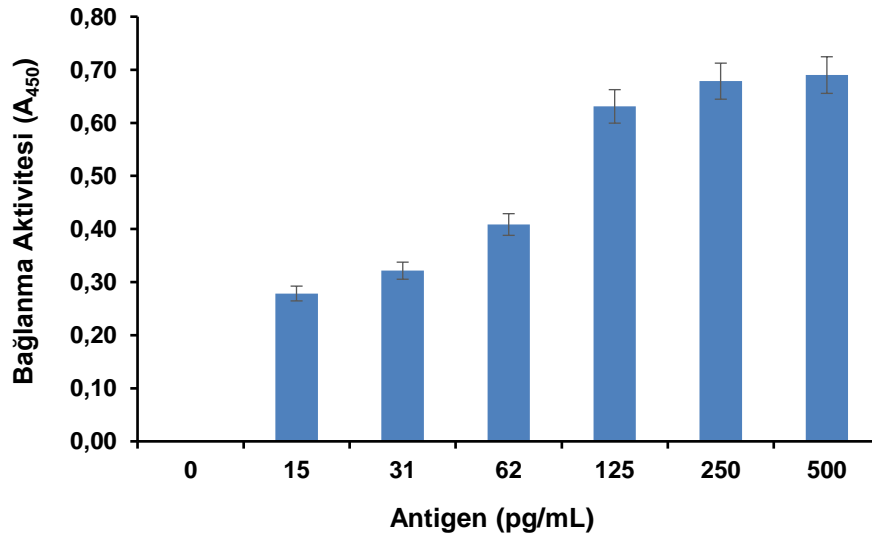
4.9.2.2. Tespit Antikoru Derişiminin Belirlenmesi

Tespit antikoru derişiminin belirlenmesi için 0,5 µg/mL ticari poliklonal anti-IL6 antikoru plaklara kaplanmış, üç farklı antijen derişiminde (0,1 pg/mL, 10 pg/mL ve 100 pg/mL), 0-40 µg/mL anti-IL6-scFv (2 kat seri seyreltmeler ile) ile bağlanma aktivitesi incelenmiştir (Şekil 4.41). 20 µg/mL scFv derişiminin altındaki derişimlerde, değişen antijen derişimindeki (2 kat seri seyreltme ile) ölçüm hassasiyeti fazlaca düştüğünden ve anlamlı bir bağlanma aktivitesi alınamadığından (Şekil Ek-6), 40 µg/mL tespit antikoru derişimi (anti-IL6-scFv) seçilmiştir.



Şekil 4.41. Farklı tespit antikoru (Anti-IL6-scFv) derişimlerinde bağlanma aktivitesi

Şekil 4.42, 40 µg/mL tespit antikoru derişimi (anti-IL6-scFv), 0,5 µg/mL yakalama antikoru (poliklonal anti-IL6) seçilerek farklı IL6 antijen derişimlerinde alınan sinyalleri göstermektedir.



Şekil 4.42. Değişen antijen derişimlerinde ELISA immünoassay

Hazırlanan ELISA immünoassayler ile 0-500 pg/mL aralığında anlamlı ölçümler yapıldığı görülmüş ve hassasiyet, afinite, stabilite, özgüllük gibi üretim sonrası testleri yapmıştır.

4.10 Üretim Sonrası Testler

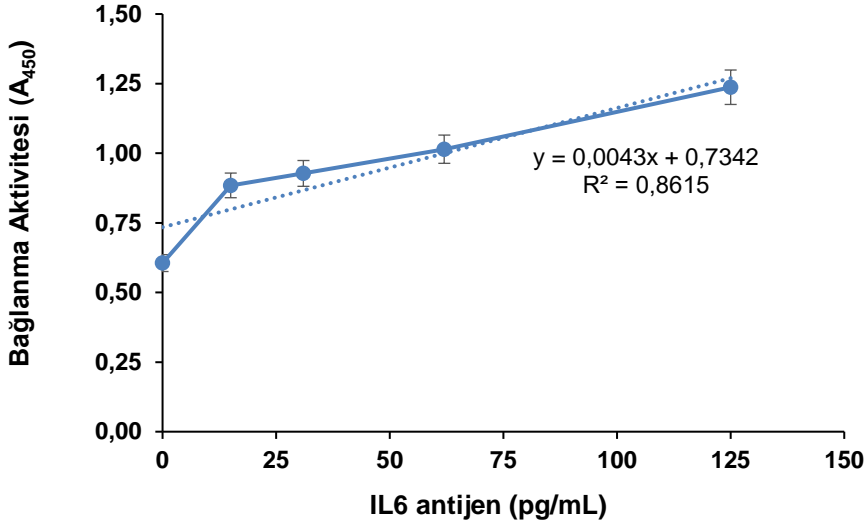
4.10.1 Hassasiyet

Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsüne (CLSI)'a göre tespit sınırı (limit of detection, LoD), bir numunede tespit edilebilen en düşük analit ölçüm miktarı olarak tanımlanmıştır [123]. LoD değeri, blank (kör) örneğinin standart sapmasının (σ) kalibrasyon eğrisi eğimine (s) oranının 3,3 katı olarak tanımlanır (Eşitlik 4.1) [72, 124, 125].

$$LOD = 3.3 * \left(\frac{\sigma}{s}\right) \quad (4.1)$$

Test hassasiyetinin belirlenmesine yönelik olarak ELISA testi sonucu elde edilen kalitatif ölçümle LoD değeri hesaplanmıştır. LoD hesaplaması için, bağlanma aktivitesi eğrisinin lineer bölgesi (Şekil 4.43) verileri kullanılarak 'Excel regresyon analizi' araçları kullanılmıştır. Regresyon analiz sonuçlarında verilen (Ek-7) eğim ve standart hata değerlerine göre LoD 49 pg/mL olarak hesaplanmıştır. Bu değer, tez önerisi sırasında hedeflenen 500 pg/mL değerinden yaklaşık 10 kat daha düşüktür.

Çoğu sitokinin vücut sıvılarındaki homeostatik değişimleri ya tespit edilemez ya da pg/mL değişimlerindedir. Fakat hastalık durumunda sitokinlerin değişimi 1.000 kata kadar artabilir [8]. Zira, sağlıklı bireylerde IL6 sitokini kan serumunda yaklaşık 20 pg/mL altında seyrederken, hastalık durumunda en az 3 kat artmaktadır [126, 127].



Şekil 4.43. Lineer ölçüm aralığı

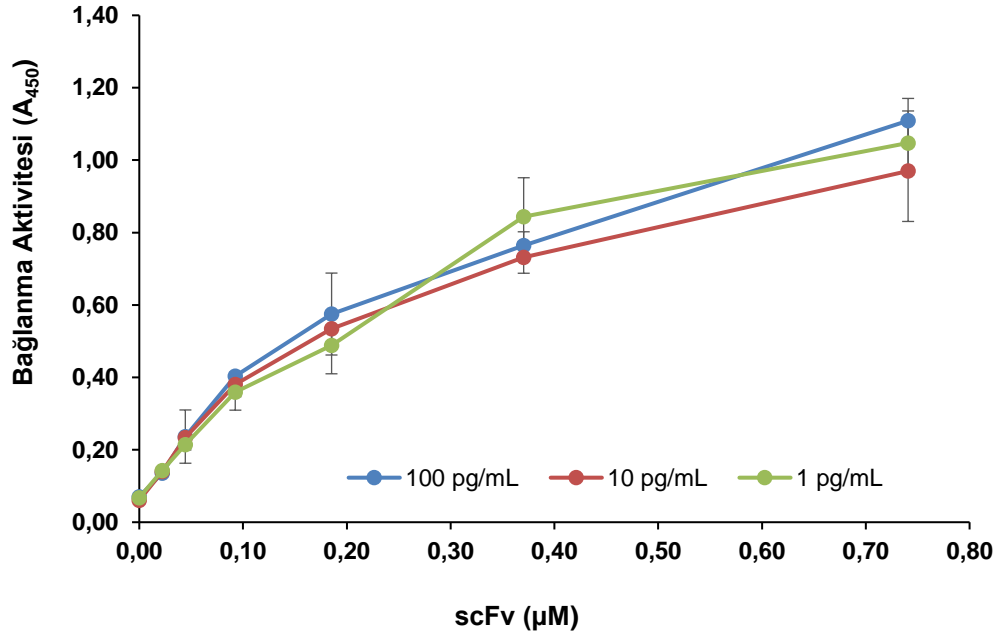
Literatürdeki yakın tarihli örneklerde Çizelge 2.3'te verildiği gibi, tam antikorlarla hazırlanan sensörlerin hassasiyeti 0-150 pg/mL aralığındadır. Bu çalışmalarla karşılaştırıldığında, bir scFv ile hazırlanan bu çalışmada yüksek hassasiyette olduğu söylenebilmektedir.

4.10.2. Afinite

Ayrılma sabiti (dissociation constant, K_d) değerinin ELISA yöntemiyle belirlenmesi için Beatty metodu (Eşitlik 4.2) [128] kullanılmıştır. Plaklar 100, 10 ve 1 pg/mL IL6 ile kaplanmış ve Bölüm 3.8.1'deki gibi ELISA yapılmıştır. Elde edilen verilerle çizilen bağlanma aktivitesi eğrisi (Şekil 4.44) çizilmiştir. K_d en az iki farklı antijen derişimi ile kaplanmış eğrilerin maksimum absorbansının yarısındaki (OD_{50} ya da X_{50}) scFv derişimi dikkate alınarak hesaplanır. OD_{50} değerinin elde edilmesi için çevrimiçi bir programdan faydalanılmış (Ek-8), aşağıda verilen denkleme göre her iki antijen derişimi için (1 pg/mL ve 10 pg/mL için $n=10$, 10 pg/mL ve 100 pg/mL için $n=10$, 1 pg/mL ve 100 pg/mL için $n=100$) ayrı bir K_d hesaplanmıştır ve üç K_d değerinin ortalaması alınmıştır.

$$K_d = \frac{n[scFv']_t - [scFv]_t}{n-1} \quad (4.2)$$

Denkleimde $[scFv]_t$ ve $[scFv]_f$ iki farklı antijen derişiminde ölçülen OD_{50} derişimlerini ifade ederken, n antijenin seyreltme faktörünü ifade eder. Buna göre hesaplanan K_d değerleri 10 pg/mL ve 100 pg/mL için 0,97 μ M, 1 pg/mL ve 10 pg/mL için 0,43 μ M, 1 pg/mL ve 100 pg/mL için 0,92 μ M'dır. Ortalama K_d değeri 0,77 μ M ($0,77 \times 10^{-6}$ M) olarak hesaplanmıştır.



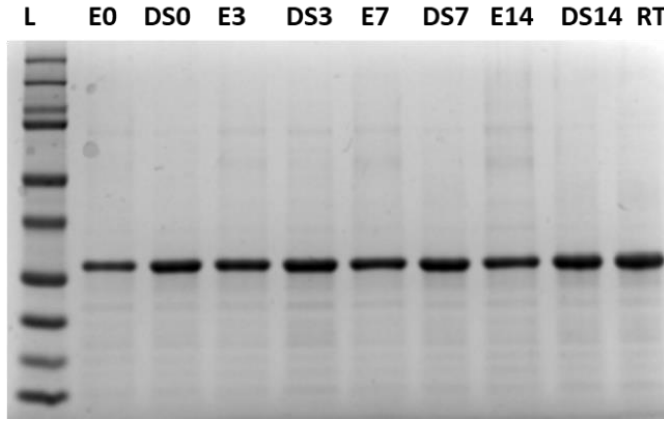
şekil 4.44 Farklı antijen derişimleri ile kaplanan plaklarda scFv bağlanma aktivitesi

Antikorların çoğunluğu mikromolar (10^{-6}) ila nanomolar (10^{-9}) aralığında K_d değerlerine sahiptir. K_d değeri arttıkça afinite azalacağından nanomolar seviyesinde afiniteler yüksek, mikromolar seviyesindekiler düşük kabul edilir. Ticari anti-IL6-mAb afiniteleri 10^{-9} - 10^{-12} M seviyelerindedir. ScFv'ler mAb'ın sadece değişken bölgelerinden oluşmaktadır ve monovalenttir. MAb'lar daha büyük bir bağlanma yüzeyine sahiptir (değişken ve sabit bölgeleri içerdіğinden) ve birden fazla bağlanma bölgesi içerir ve avidite afiniteyi etkileyen bir parametredir. Bu sebeple tam uzunluktaki mAb'lere kıyasla daha az stabil ve daha düşük afiniteye sahip olabilirler. Ayrıca, scFv'lerin bakteriyel üretilmesi, IB'den izole edilmesi ve saflaştırılması sırasında maruz kaldığı ajanların üç

boyutlu yapıyı etkileyebileceği bilinmektedir. Bu sebeple antijene bağlanma yeteneğini (afinite) de kısmen etkilemesi normaldir.

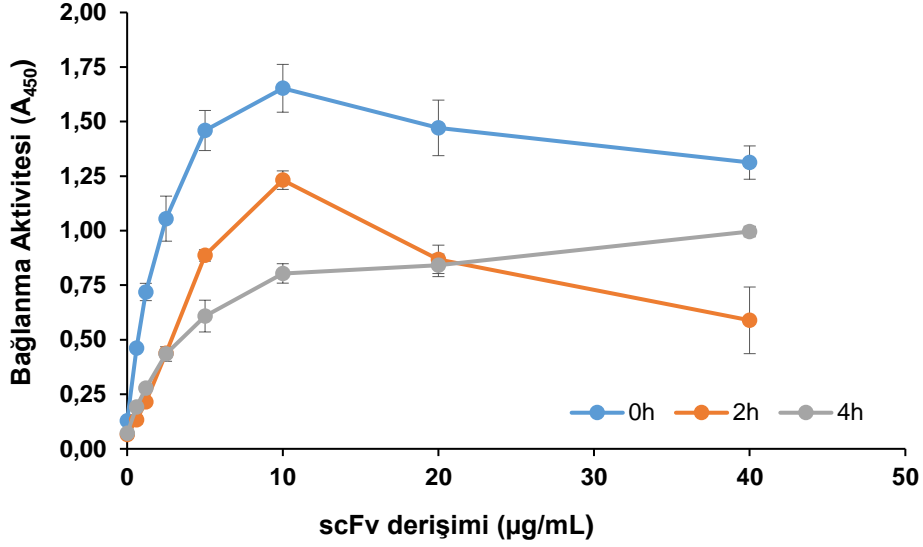
4.10.3 Stabilite

Stabilite testi için öncelikle 2 hafta boyunca belirli aralıklarla (0, 3, 7, 14. gün) alınan elüsyon ve tuzdan arındırılmış örnekleri SDS-PAGE jeline eşit hacim yüklenerek analiz edilmiştir (Şekil 4.45). Proteinlerin, 4°C'de 2 hafta, oda sıcaklığında 24 saat boyunca stabilitesini koruduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.45 Anti-IL6-scFv elüsyon ve tuzdan arındırılmış örneklerin gün bazında (0, 3, 7, 14) stabilite kontrolü amacıyla yapılan SDS-PAGE analizi. Örnekler toplam protein normalize yüklenmiştir. E: Elüsyon, DS: Tuzdan arındırılmış, RT: Oda sıcaklığı

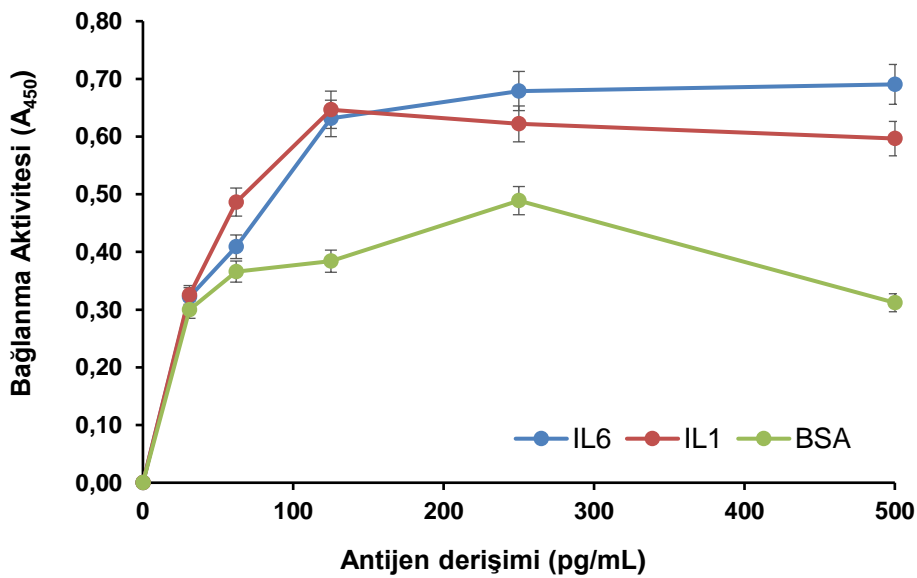
ELISA immünoassay'lerin stabilitesinin belirlenmesi için ise saflaştırılan anti-IL6-scFv'ler 4°C'de 4 hafta saklanmış 3.8.2'de belirtildiği gibi ELISA yapılmıştır. Şekil 4.46'da görüldüğü gibi saklama süresi arttıkça bağlanma aktivitesi azalmıştır; fakat 4°C'de 2 hafta saklanan örneğin aktivitesinin saflaştırma sonrası aktivitesine yakın olduğu görülmektedir. Bu sebeple scFv'lerin 4°C'de en az 1 hafta stabil kaldığı söylenebilir.



Şekil 4.46 ELISA imünoassay stabilite testi

4.10.4. Özgüllük (Spesifisite/Çapraz Reaktivite)

Özgüllük kontrolü için Bölüm 3.8.2'deki gibi sandviç ELISA yapılmıştır. Plaklar, 0,5 µg/mL ticari poliklonal anti-IL6 ile kaplanarak, 40 µg/mL anti-IL6-scFv'nin IL6 ve IL1 antijenlerine bağlanma aktivitesi test edilmiştir. Anti-IL6-scFv'nin, yapı olarak benzer bir sitokin olan IL1β antijenine de benzer aktiviteyle bağlandığı görülmüştür (Şekil 4.47).



Şekil 4.47 Anti-IL6-scFv'nin IL6 ve IL1 sitokinlerine bağlanma aktivitesi

Anti-IL6-scFv, IB'den izole edilerek saflaştırılmıştır. İzolasyon sırasında kullanılan ajanlar scFv tersiyer yapısında değişikliklere sebep olarak fonksiyonunu ve spesifitesini etkileyebilmektedir [115, 129]. ScFv'ler yalnızca V_H ve V_L zincirleri ve bunları bağlayan esnek bir zincir olması sebebiyle, yapısal olarak mAb'lara göre daha esnek yapılardır. Bu konformasyonel esneklik scFv'nin yapısal kararlılığını azaltarak, yapısal olarak birbirine benzeyen antijenlere bağlanmasına sebep olabilmektedir [130].

5. SONUÇLAR

- TNF- α , IL-6, IL1 β sitokinlerine spesifik scFv'lerin kodon optimizasyonu yapılmış, çözünlük, ekspresyon skoru, mRNA ikincil yapıları analizleri yapılmış ve pUCIDT klonlama vektörü içerisinde temin edilmiş, klonlama çalışmalarıyla pET28a ekspresyon vektörüne klonlanmıştır.
- Anti-TNF α ve anti-IL6 scFv'lerin yüzeye bağlanma özelliklerini iyileştirmek amacıyla, anti-TNF α -cys-scFv ve anti-IL6-cys-scFv formundaki yapıları için gerekli primerler tasarlanmış, PCR koşulları optimize edilerek gen kasatleri çoğaltılmış, ekspresyon vektörleri oluşturulmuş ve dizileme sonucu tasarlanan sekansla %100 uyumlu plazmidler seçilmiştir.
- Ekspresyon vektörleri, çözünlür formda rekombinant protein üretimi amaçlandığı için, daha az oksitleyici sitoplazmik ortama sahip *E. coli* SHuffle T7 Express suşuna aktarılmıştır.
- Çözünlür fraksiyonda, 27 kDa büyüklüğünde biriken (overekspresyon) bir protein bandı elde edebilmek amacıyla sıcaklık, inkübasyon süresi, üretim ortamı ve suş optimizasyonu yapılmıştır. Buna göre üretim sıcaklığının düşürülmesi ve inkübasyon süresinin uzatılmasının çözünlür protein üretiminde beklenen olumlu etkiyi yapmamıştır. Fakat düşük sıcaklığın stabilizeye, kısa inkübasyon süresinin verimliliğe olumlu etkisi göz önüne alınarak, üretimlerin 25°C'de 16 saat yapılmasına karar verilmiştir.
- Üretim ortamı seçiminde TB ortamda yapılan üretimlerde daha yüksek derişimde toplam protein elde edilmiştir. Suş seçiminde ise benzer şekilde çözünlür fraksiyonlarda belirgin bir fark görülememiş fakat, toplam protein derişimleri ve Western görüntüleri dikkate alınarak *E. coli* SHuffle ve *E. coli* BLR(DE3) ile saflaştırma çalışmaları yapılmıştır.
- Her iki suş için de His-afinite saflaştırmalarında beklenen %95 saflıktaki protein bandı elde edilememiş, bu sebeple periplazmik bölgede üretim

yapabilmek için nükleotit dizilerine ssMBP sinyal peptidi eklenmesine karar verilmiş ve bu sebeple tekrar klonlama çalışmaları yapılmıştır.

- BL21(DE3)'te periplazmik bölgede üretimi yapılan proteinlerin üretim verimleri SHuffle T7 Ekspresste yapılan üretim verimleri ile karşılaştırılmış, en yüksek verim SHuffle T7 Ekspresste elde edildiğinden, Mg^{+2} iyon ve indükleyici derişiminin çözüner protein üretimine etkisi incelenmiştir. Denemeler sonucunda 0,1 mM IPTG derişimi altının ekspresyonda yetersiz kaldığı, üzeri derişimlerin üretimi baskıladığı, 10 mM $MgCl_2$ 'ün ise çözüner proteini pozitif yönde etkilediği görülmüştür.
- Fermantasyon koşulları optimizasyonlarının sonunda TB ortamda, 10 mM $MgCl_2$ eklemesi ve 0,1 mM IPTG indüklemesiyle 16 saat üretim yapılmış ve His-afinite ile saflaştırılmıştır. Saflaştırma sonunda istenilen saflıkta çözüner protein elde edilemediğinden, inklüzyon cisimlerinden çözüner protein elde etme yöntemleri denenmiştir.
- IB'den çözüner protein elde edebilmek için denatüre edici, ılımlı ve denatüre edici olmayan üç farklı yöntem kullanılmış, her üç yöntem protein geri kazanımları ve verimleri açısından karşılaştırılmıştır. En yüksek saflık (>%95) ve verim (23 mg/mL) denatüre edici olmayan yöntemde anyonik bir deterjan olan sarkozilin %1 (w/v) oranında kullanılmasıyla elde edilmiş, tekrar katlama protokolüne ihtiyaç duymaması sebebiyle de sonraki çalışmalarda IB'den çözüner protein elde edebilmede bu yöntem kullanılmıştır.
- Üretim ve optimizasyon çalışmaları anti-TNF α ve anti-IL6 scFv'ler ile yapılmış, sonrasında klonlama çalışmaları yapılmış olan anti-IL1 β ve anti-IFN γ scFv'leri bu üretim ve saflaştırma metotları kullanılarak elde edilmiştir. Anti-TNF α -scFv yapılan tüm optimizasyon çalışmalarına rağmen, eksprese edilemediğinden karakterizasyon çalışmaları da yapılamamıştır.
- Anti-IFN γ -scFv IB'de üretilebilmiş fakat üretim ve saflaştırma sonrası elde edilen protein derişimi sonraki çalışmalar için yetersiz kalacağından, ELISA

ile bağlanma aktivitesi belirlendikten sonraki çalışmalarda kullanılmamıştır. Anti-IL1 β -cys-scFv ise çözünür fraksiyonda üretilebilmiş fakat yüzeye bağlanma özelliklerini iyileştirme amaçlı eklenen sistein aminoasidi Western ve ELISA çalışmalarında sinyali blokladığı ve ölçüm sonuçlarını etkilediğinden, bağlanma aktivitesi belirlendikten sonra immünoensör çalışmalarına alınamamıştır. Sonraki tüm çalışmalar IB'den elde edilen anti-IL6-scFv ile yapılmıştır.

- Saflaştırılan ve birincil karakterizasyonu yapılan scFv'lerin bağlanma aktivitelerinin ölçülmesi için ELISA yapılmıştır. Çözünür/çözünmez fraksiyondan elde edilen scFv'lerin aktivitelerinin karşılaştırılması için Her2-scFv ile ELISA deneyi yapılmış, buna göre IF'den elde edilen scFv'lerin bağlanma aktivitelerinin SF'den elde edilene kıyasla daha düşük olduğu, fakat benzer bir aktivite gösterdiği görülmüştür. Saflaştırılan scFv'ler ayrıca, disülfid bağı oluşumu açısından indirgeyici olmayan SDS-PAGE (non-reducing) ve Ellman testi ile teyit edilmiştir.
- Üretilen rekombinant scFv'lerin yatay akışlı biyosensör üretimi için Au partikülle işaretlenmesi ve sisteinli scFv ile sisteinsiz scFv'ler patiküle bağlanma yetenekleri açısından karşılaştırılması için anti-IL6-scFv ve anti-IL6-cys-scFv kullanılmıştır. AuNp-scFv konjugasyonunun başarısını gösteren, UV-spektrofotometrede gözlenen (~520 nm) spektrumda tepe noktasında kayma (2-3 nm) tespit edilmesi ile ilişkilendirilir. Partikül yüzeyine bağlandıktan sonra agregasyon deneyi ile karşılaştırılan iki scFv'den anti-IL6-cys-scFv'nin yüzeye (agregasyona sebep olmadan) daha yüksek derişimlerde (100 μ g/mL) bağlandığı görülmüştür.
- AuNp ile işaretlenen anti-IL6-cys-scFv'ler yatay akışlı immünoensörleri hazırlanmış ve en az bir stokinin ölçümünü yapabilen biyosensörün üretilmesi hedeflenmiştir. Test bölgesinde non-spesifik bağlanma görülmüş, bunun çözümü için yapılan tüm denemelere (test bölgesi scFv derişimi, AuNp-scFv oranı, partikül ve kağıt blokama işlemleri, konjugat tampon değişikliği gibi) rağmen olumlu bir sonuç elde edilememiştir. Bu sebeple, tezde B-planı olarak öngörülen ELISA yöntemine geçilmiştir.

- ScFv'lerin antijene bağlanma aktiviteleri çalışmaları dolaylı-ELISA yöntemi ile yapılmış, immünoensör amaçlı kullanımı için ticari kitlerde de yaygın kullanılan sandviç ELISA yöntemi kullanılmıştır.
- Sandviç ELISA immünoassay için yakalama (poliklonal anti-IL6, 0,5 µg/mL) ve kaplama antikör (anti-IL6-scFv, 40 µg/mL) derişimleri optimize edilmiş ve antijen ölçüm aralığı belirlenmiştir (0-500 pg/mL).
- ELISA immünoassay ile, scFv'lerin, hassasiyet, afinite, stabilite, seçicilik/özgüllük özellikleri ölçülmüştür. LoD değeri 49 pg/mL olarak hesaplanmış ve tez kapsamında hedeflenen minimum LoD değerine (500 pg/mL) ulaşılmıştır. Literatürde sitokin ölçümü yapan immünoassaylerle karşılaştırıldığında hassasiyeti yüksek testler elde edildiği görülmüştür.
- Afinite hesaplamaları için değişen scFv derişimlerinin (0-40 µg/mL) 3 farklı antijen derişiminde (1, 10, 100 pg/mL) bağlanma aktiviteleri ölçülmüş, çevrimiçi program yardımıyla maksimum absorbansın yarısındaki scFv derişimleri bulunarak Beatty yöntemi ile K_d hesaplanmıştır. Buna göre ELISA testleri için tespit antikoru olarak kullanılan scFv'lerin K_d değeri 0,77 µM olarak bulunmuştur. Bu değer tam monoklonal antikörlerle karşılaştırıldığında scFv'nin düşük bir afiniteye sahip olduğunu göstermiş, bunun sebebinin antikörün tek zincirli bir fragment olması, aviditesi ve IB'den izole edilerek elde edilmesi sebebiyle üç boyutlu yapısındaki değişiklikler olduğu düşünülmüştür.
- Stabilite testleri için, saflaştırılan scFv'ler 4°C'de saklanmış ve belirli zaman aralıklarında (0, 3, 7, 14. gün) alınan örnekler SDS-PAGE jeline eşit protein derişiminde yüklenerek kontrol edilmiş ve bant yoğunluklarının değişmediği, proteinin degrede olmadığı görülmüştür. ELISA immünoassay stabilitesi testi için ise saflaştırmanın hemen sonrasında, 4°C'de 2 hafta saklanmış ve 4°C'de 4 hafta saklanmış scFv'ler ile ELISA yapılmış, 4. haftaya doğru alınan sinyallerin azaldığı fakat 2 hafta saklama sonrası bağlanma aktivitelerinin saflaştırma sonrası aktivitesine yakın olduğu görülmüştür.

- ELISA immünoassay'lerin özgüllüklerinin test edilmesi için anti-IL6-scFv'nin IL6 ve IL1 antijenlerine bağlanma aktivitesi ölçülmüş, anti-IL6-scFv'nin IL1 antijenine IL6 ile benzer aktivitede bağlandığı görülmüştür. Literatürde IB'den çözünen protein elde eden diğer çalışmalara da bakıldığında, proteinin izolasyon yönteminin protein aktivitesi, stabilitesi, spesifitesi üzerinde olumsuz etkilere sebep olabileceği görülmüştür. Üç boyutlu yapıda bozulmaların olması mAb'lara kıyasla daha esnek yapıda olan scFv'lerin birbirine benzeyen antijenlere bağlanmasına sebep olabileceği görülmüştür.

Sonuç olarak, bu tez kapsamında, temel hedeflere ulaşılmış, inflamasyonda önemli etkiye sahip olan IL-6 pro-inflamatuvar sitokinine karşı antikor fragmentleri (scFv) *E. coli* bakterisinde üretilmiş, immünoassay geliştirilmesine yetecek düzeyde saflaştırılmıştır. İlk etapta, gen ve proses düzeyinde yapılan optimizasyonlara rağmen, bakteriyel rekombinant protein üretiminde en sık karşılaşılan düşük protein çözünürlüğü ve düşük saflaştırma verimi problemleri ile karşılaşmış, problemin çözümü için sarkozil ile inkülyasyon cisimlerinden protein elde edilmiştir. IB'den protein üretim veriminin, çözünen fraksiyondan protein eldesine kıyasla 8-10 kat fazla olduğu görülmüştür ve tez kapsamında uluslararası literatüre katkı sağlanmıştır. Tezin ana hedefi olan kağıt biyosensörlerin üretimi sağlanamasa da, sitokin ölçümü için kullanılan ticari mAb-temelli kitlerde genel olarak kullanılan ELISA yöntemiyle bir immünoassay tasarlanmıştır. Literatürle kıyaslandığında, afinite ve özgüllük özelliklerinin geliştirilmesi gerekse de, ticari kitlerde tanıyıcı molekül olarak kullanılan mAb'lar yerine üretimi nispeten daha kolay ve maliyetleri daha düşük olan scFv'lerin üretimi ve geliştirilmesi önem arz etmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] S. Kany, J.T. Vollrath, B. Relja, Cytokines in Inflammatory Disease, *Int J Mol Sci* 20(23) (2019).
- [2] C. Zanza, T. Romenskaya, A.C. Manetti, F. Franceschi, R. La Russa, G. Bertozzi, A. Maiese, G. Savioli, G. Volonnino, Y. Longhitano, Cytokine Storm in COVID-19: Immunopathogenesis and Therapy, *Medicina (Kaunas)* 58(2) (2022).
- [3] M. Ahmar Rauf, M. Nisar, H. Abdelhady, N. Gavande, A.K. Iyer, Nanomedicine approaches to reduce cytokine storms in severe infections, *Drug Discov Today* 27(11) (2022) 103355.
- [4] N. Lukan, "Cytokine storm", not only in COVID-19 patients. Mini-review, *Immunol Lett* 228 (2020) 38-44.
- [5] R. de la Rica, M. Borges, M. Gonzalez-Freire, COVID-19: In the Eye of the Cytokine Storm, *Front Immunol* 11 (2020) 558898.
- [6] G. Liu, C. Jiang, X. Lin, Y. Yang, Point-of-care detection of cytokines in cytokine storm management and beyond: Significance and challenges, *View (Beijing)* 2(4) (2021) 20210003.
- [7] A. Shimabukuro-Vornhagen, P. Godel, M. Subklewe, H.J. Stemmler, H.A. Schlosser, M. Schlaak, M. Kochanek, B. Boll, M.S. von Bergwelt-Baildon, Cytokine release syndrome, *J Immunother Cancer* 6(1) (2018) 56.
- [8] J.A. Stenken, A.J. Poschenrieder, Bioanalytical chemistry of cytokines--a review, *Anal Chim Acta* 853 (2015) 95-115.
- [9] C. Garbers, S. Heink, T. Korn, S. Rose-John, Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine, *Nat Rev Drug Discov* 17(6) (2018) 395-412.
- [10] A.A. Alizadeh, M. Hamzeh-Mivehroud, S. Dastmalchi, Production and Purification of a Novel Anti-TNF-alpha Single Chain Fragment Variable Antibody, *Adv Pharm Bull* 5(Suppl 1) (2015) 667-72.
- [11] T. Tanaka, M. Narazaki, T. Kishimoto, IL-6 in inflammation, immunity, and disease, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6(10) (2014) a016295.
- [12] Y. Chen, S.L. Klein, B.T. Garibaldi, H. Li, C. Wu, N.M. Osevala, T. Li, J.B. Margolick, G. Pawelec, S.X. Leng, Aging in COVID-19: Vulnerability, immunity and intervention, *Ageing Res Rev* 65 (2021) 101205.
- [13] N. Kaneko, M. Kurata, T. Yamamoto, S. Morikawa, J. Masumoto, The role of interleukin-1 in general pathology, *Inflamm Regen* 39 (2019) 12.
- [14] G. Lopez-Castejon, D. Brough, Understanding the mechanism of IL-1beta secretion, *Cytokine Growth Factor Rev* 22(4) (2011) 189-95.

- [15] C.T. Ng, L.Y. Fong, M.N.H. Abdullah, Interferon-gamma (IFN-gamma): Reviewing its mechanisms and signaling pathways on the regulation of endothelial barrier function, *Cytokine* 166 (2023) 156208.
- [16] P. Merli, C. Quintarelli, L. Strocchio, F. Locatelli, The role of interferon-gamma and its signaling pathway in pediatric hematological disorders, *Pediatr Blood Cancer* 68(4) (2021) e28900.
- [17] A.S. Bhat, G. Bleck, D. Rabuka, The next step of homogeneous bioconjugate development, *Bioprocess International* 12(9) (2014) 10-25.
- [18] R. Fu, L. Carroll, G. Yahioğlu, E.O. Aboagye, P.W. Miller, Antibody Fragment and Affibody ImmunoPET Imaging Agents: Radiolabelling Strategies and Applications, *ChemMedChem* 13(23) (2018) 2466-2478.
- [19] D. Mikiewicz, N. Lukasiewicz, M. Zielinski, V. Cecuda-Adamczewska, A. Bierczynska-Krzysik, A. Romanik-Chruscielewska, M. Kesik-Brodacka, Bacterial expression and characterization of an anti-CD22 single-chain antibody fragment, *Protein Expression and Purification* 170 (2020).
- [20] F. Yaghoobizadeh, M.R. Ardakani, M.M. Ranjbar, H. Galehdari, M. Khosravi, Expression, purification, and study on the efficiency of a new potent recombinant scFv antibody against the SARS-CoV-2 spike RBD in *E. coli* BL21, *Protein Expr Purif* 203 (2023) 106210.
- [21] D.R. Goulet, W.M. Atkins, Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics, *J Pharm Sci* 109(1) (2020) 74-103.
- [22] M. Johnson, *Antibody Structure and Antibody Fragments*, 2013. <https://www.labome.com/method/Antibody-Structure-and-Antibody-Fragments.html>. (Accessed 27.08.2023).
- [23] M.L. Chiu, D.R. Goulet, A. Teplyakov, G.L. Gilliland, *Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics*, *Antibodies* 8(4) (2019).
- [24] S. Pirkalkhoran, W.R. Grabowska, H.H. Kashkoli, R. Mirhassani, D. Guiliano, C. Dolphin, H. Khalili, *Bioengineering of Antibody Fragments: Challenges and Opportunities*, *Bioengineering (Basel)* 10(2) (2023).
- [25] B. Valldorf, S.C. Hinz, G. Russo, L. Pekar, L. Mohr, J. Klemm, A. Doerner, S. Krah, M. Hust, S. Zielonka, *Antibody display technologies: selecting the cream of the crop*, *Biol Chem* 403(5-6) (2022) 455-477.
- [26] A. Bates, C.A. Power, *David vs. Goliath: The Structure, Function, and Clinical Prospects of Antibody Fragments*, *Antibodies* 8(2) (2019).
- [27] V. Crivianu-Gaita, M. Thompson, *Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: An overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements*, *Biosensors & Bioelectronics* 85 (2016) 32-45.

- [28] S. Huleani, M.R. Roberts, L. Beales, E.H. Papaioannou, *Escherichia coli* as an antibody expression host for the production of diagnostic proteins: significance and expression, *Crit Rev Biotechnol* 42(5) (2022) 756-773.
- [29] A.W.L. Kinman, R.R. Pompano, Optimization of Enzymatic Antibody Fragmentation for Yield, Efficiency, and Binding Affinity, *Bioconjug Chem* 30(3) (2019) 800-807.
- [30] O. Kitten, P. Martineau, Antibody alternative formats: antibody fragments and new frameworks, *M S-Medecine Sciences* 35(12) (2020) 1092-1097.
- [31] T.H. Kang, B.L. Seong, Solubility, Stability, and Avidity of Recombinant Antibody Fragments Expressed in Microorganisms, *Front Microbiol* 11 (2020) 1927.
- [32] X. Lyu, Q. Zhao, J. Hui, T. Wang, M. Lin, K. Wang, J. Zhang, J. Shentu, P.A. Dalby, H. Zhang, B. Liu, The global landscape of approved antibody therapies, *Antib Ther* 5(4) (2022) 233-257.
- [33] V.J. Bruce, A.N. Ta, B.R. McNaughton, Minimalist Antibodies and Mimetics: An Update and Recent Applications, *Chembiochem* 17(20) (2016) 1892-1899.
- [34] R.A. Beckman, L.M. Weiner, H.M. Davis, Antibody constructs in cancer therapy - Protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors, *Cancer* 109(2) (2007) 170-179.
- [35] P. Munoz-Lopez, R.M. Ribas-Aparicio, E.I. Becerra-Baez, K. Fraga-Perez, L.F. Flores-Martinez, A.A. Mateos-Chavez, R. Luria-Perez, Single-Chain Fragment Variable: Recent Progress in Cancer Diagnosis and Therapy, *Cancers (Basel)* 14(17) (2022).
- [36] N. Backmann, C. Zahnd, F. Huber, A. Bietsch, A. Pluckthun, H.P. Lang, H.J. Guntherodt, M. Hegner, C. Gerber, A label-free immunosensor array using single-chain antibody fragments, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(41) (2005) 14587-14592.
- [37] B.V. Ayyar, S. Arora, S.S. Ravi, Optimizing antibody expression: The nuts and bolts, *Methods* 116 (2017) 51-62.
- [38] M.L.d. Santos, W. Quintilio, T.M. Manieri, L.R. Tsuruta, A.M. Moro, Advances and challenges in therapeutic monoclonal antibodies drug development, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 54(spe) (2018).
- [39] C.J. Huang, H. Lin, X. Yang, Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements, *J Ind Microbiol Biotechnol* 39(3) (2012) 383-99.
- [40] I. Kocer, E.C. Cox, M.P. DeLisa, E. Celik, Effects of variable domain orientation on anti-HER2 single-chain variable fragment antibody expressed in the *Escherichia coli* cytoplasm, *Biotechnol Prog* (2020) e3102.

- [41] K.A.R. Packiam, R.N. Ramanan, C.W. Ooi, L. Krishnaswamy, B.T. Tey, Stepwise optimization of recombinant protein production in *Escherichia coli* utilizing computational and experimental approaches, *Applied Microbiology and Biotechnology* 104(8) (2020) 3253-3266.
- [42] Z.X. Zhang, F.T. Nong, Y.Z. Wang, C.X. Yan, Y. Gu, P. Song, X.M. Sun, Strategies for efficient production of recombinant proteins in *Escherichia coli*: alleviating the host burden and enhancing protein activity, *Microb Cell Fact* 21(1) (2022) 191.
- [43] D. Şahinbaş, E. Çelik, Enhanced production and single step purification of biologically active recombinant anti-IL6 scFv from *Escherichia coli* inclusion bodies, *Process Biochemistry* 133 (2023) 151-157.
- [44] A.K. Rani, R. Katiyar, A.S. Rathore, Bioprocessing of inclusion bodies from *E. coli*. to produce bioactive recombinant proteins, *Biochemical Engineering Journal* 203 (2024).
- [45] S. Mital, G. Christie, D. Dikicioglu, Recombinant expression of insoluble enzymes in *Escherichia coli*: a systematic review of experimental design and its manufacturing implications, *Microb Cell Fact* 20(1) (2021) 208.
- [46] A. Singh, V. Upadhyay, A.K. Upadhyay, S.M. Singh, A.K. Panda, Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process, *Microb Cell Fact* 14 (2015) 41.
- [47] A. Farokhi-Fard, E. Bayat, A. Beig Parikhani, S. Komijani, H. Aghamirza Moghim Aliabadi, S. Sardari, B. Gharib, F. Barkhordari, K. Azadmanesh, M. Karimipoor, H. Bakhshandeh, F. Davami, Bacterial production and biophysical characterization of a hard-to-fold scFv against myeloid leukemia cell surface marker, IL-1RAP, *Mol Biol Rep* 50(2) (2023) 1191-1202.
- [48] R. Sharma, S. Anupa, A.S. Rathore, Refolding of proteins expressed as inclusion bodies in *E. coli*, *Methods Mol Biol* 2617 (2023).
- [49] A. Sarker, A.S. Rathore, R.D. Gupta, Evaluation of scFv protein recovery from *E. coli* by in vitro refolding and mild solubilization process, *Microb Cell Fact* 18(1) (2019) 5.
- [50] R.M. Chura-Chambi, C.S. Farah, L. Morganti, Human growth hormone inclusion bodies present native-like secondary and tertiary structures which can be preserved by mild solubilization for refolding, *Microb Cell Fact* 21(1) (2022) 164.
- [51] P. Singhvi, A. Saneja, R. Ahuja, A.K. Panda, Solubilization and refolding of variety of inclusion body proteins using a novel formulation, *Int J Biol Macromol* 193(Pt B) (2021) 2352-2364.
- [52] A. Guevara, C. Lugo, A.J. Montilla, M. Calabokis, J. Ferreira, J.C. Martinez, J. Bubis, Cloning, expression, solubilization, and purification of a functionally active recombinant cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit-like protein PKAC1 from *Trypanosoma equiperdum*, *Protein Expr Purif* 192 (2022) 106041.

- [53] M.A. Massiah, K.M. Wright, H. Du, Obtaining Soluble Folded Proteins from Inclusion Bodies Using Sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS: Application to LB and M9 Minimal Media, *Curr Protoc Protein Sci* 84 (2016) 6 13 1-6 13 24.
- [54] A.R. Park, S.W. Jang, J.S. Kim, Y.G. Park, B.S. Koo, H.C. Lee, Efficient recovery of recombinant CRM197 expressed as inclusion bodies in *E.coli*, *PLoS One* 13(7) (2018) e0201060.
- [55] V. Naresh, N. Lee, A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors, *Sensors (Basel)* 21(4) (2021).
- [56] C. Ji, Y. Zhou, R.M. Leblanc, Z. Peng, Recent Developments of Carbon Dots in Biosensing: A Review, *ACS Sens* 5(9) (2020) 2724-2741.
- [57] P. Mehrotra, Biosensors and their applications - A review, *J Oral Biol Craniofac Res* 6(2) (2016) 153-9.
- [58] M.B. Kulkarni, N.H. Ayachit, T.M. Aminabhavi, Biosensors and Microfluidic Biosensors: From Fabrication to Application, *Biosensors (Basel)* 12(7) (2022).
- [59] J.S. Kim, J.Y. Lee, J.W. Yang, K.H. Lee, M. Effenberger, W. Szpirt, A. Kronbichler, J.I. Shin, Immunopathogenesis and treatment of cytokine storm in COVID-19, *Theranostics* 11(1) (2021) 316-329.
- [60] D. Huang, H. Ying, D. Jiang, F. Liu, Y. Tian, C. Du, L. Zhang, X. Pu, Rapid and sensitive detection of interleukin-6 in serum via time-resolved lateral flow immunoassay, *Anal Biochem* 588 (2020) 113468.
- [61] S.A. Hall, D. Stucke, B. Morrone, D. Lebelt, A.J. Zanella, Simultaneous detection and quantification of six equine cytokines in plasma using a fluorescent microsphere immunoassay (FMIA), *Methodsx* 2 (2015) 241-248.
- [62] P. Chen, M.T. Chung, W. McHugh, R. Nidetz, Y. Li, J. Fu, T.T. Cornell, T.P. Shanley, K. Kurabayashi, *ACS nano*, Multiplex Serum Cytokine Immunoassay Using Nanoplasmonic Biosensor Microarrays, (2015).
- [63] J. Zhu, J. He, M. Verano, A.T. Brimmo, A. Glia, M.A. Qasaimeh, P. Chen, J.O. Aleman, W. Chen, An integrated adipose-tissue-on-chip nanoplasmonic biosensing platform for investigating obesity-associated inflammation, *Lab Chip* 18(23) (2018) 3550-3560.
- [64] H. Wei, S. Ni, C. Cao, G. Yang, G. Liu, Graphene Oxide Signal Reporter Based Multifunctional Immunosensing Platform for Amperometric Profiling of Multiple Cytokines in Serum, *ACS Sens* 3(8) (2018) 1553-1561.
- [65] K. Tenda, B. van Gerven, R. Arts, Y. Hiruta, M. Merckx, D. Citterio, Paper-Based Antibody Detection Devices Using Bioluminescent BRET-Switching Sensor Proteins, *Angew Chem Int Ed Engl* 57(47) (2018) 15369-15373.
- [66] M. Gutierrez-Capitan, A. Baldi, C. Fernandez-Sanchez, Electrochemical Paper-Based Biosensor Devices for Rapid Detection of Biomarkers, *Sensors (Basel)* 20(4) (2020).

- [67] G. Liu, M. Qi, M.R. Hutchinson, G. Yang, E.M. Goldys, Recent advances in cytokine detection by immunosensing, *Biosens Bioelectron* 79 (2016) 810-21.
- [68] D.S. Dkhar, R. Kumari, S. Mahapatra, Divya, R. Kumar, T. Tripathi, P. Chandra, Antibody-receptor bioengineering and its implications in designing bioelectronic devices, *Int J Biol Macromol* 218 (2022) 225-242.
- [69] D. Saerens, L. Huang, K. Bonroy, S. Muyldermans, Antibody Fragments as Probe in Biosensor Development, *Sensors (Basel)* 8(8) (2008) 4669-4686.
- [70] A.K. Trilling, J. Beekwilder, H. Zuilhof, Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview, *Analyst* 138(6) (2013) 1619-27.
- [71] S. Gao, J.M. Guisan, J. Rocha-Martin, Oriented immobilization of antibodies onto sensing platforms - A critical review, *Anal Chim Acta* 1189 (2022) 338907.
- [72] D.R. Hristov, C. Rodriguez-Quijada, J. Gomez-Marquez, K. Hamad-Schifferli, Designing Paper-Based Immunoassays for Biomedical Applications, *Sensors (Basel)* 19(3) (2019).
- [73] C. Parolo, A. Sena-Torralba, J.F. Bergua, E. Calucho, C. Fuentes-Chust, L. Hu, L. Rivas, R. Alvarez-Diduk, E.P. Nguyen, S. Cinti, D. Quesada-Gonzalez, A. Merkoci, Tutorial: design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays, *Nat Protoc* 15(12) (2020) 3788-3816.
- [74] G. Zhu, X. Yin, D. Jin, B. Zhang, Y. Gu, Y. An, Paper-based immunosensors: Current trends in the types and applied detection techniques, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 111 (2019) 100-117.
- [75] S.A. Lim, M.U. Ahmed, Introduction to Immunosensors, in: M.U. Ahmed, M. Zourob, E. Tamiya (Eds.), *Immunosensors*, The Royal Society of Chemistry 2019, p. 0.
- [76] E. Calucho, C. Parolo, L. Rivas, R. Álvarez-Diduk, A. Merkoçi, Nanoparticle-based lateral flow assays, *Paper Based Sensors* 2020, pp. 313-359.
- [77] C. Karunakaran, M. Pandiaraj, P. Santharaman, *Immunosensors, Biosensors and Bioelectronics* 2015, pp. 205-245.
- [78] M. Alhaji, M. Zubair, A. Farhana, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, StatPearls Publishing-NCBI Bookshelf (2023).
- [79] S. Hosseini, P. Vazquez-Villegas, M. Rito-Palomares, S. Martinez-Chapa, *Enzyme-linked Immunosorbent Assay(ELISA)*, SpringerBriefs in Forensic and Medical Bioinformatics (2018).
- [80] BosterBio, *ELISA Handbook Principle, Troubleshooting, Sample Preparation and Assay Protocols*. (Accessed 10.11.2023 2023).
- [81] M. Khan, S.H. Shah, M. Salman, M. Abdullah, F. Hayat, S. Akbar, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay versus Chemiluminescent Immunoassay: A*

General Overview, *Global Journal of Medical, Pharmaceutical, and Biomedical Update* 18 (2023).

[82] C. Cristea, A. Florea, M. Tertis, R. Sandulescu, *Immunosensors, Biosensors - Micro and Nanoscale Applications* 2015.

[83] P. Peng, C. Liu, Z. Li, Z. Xue, P. Mao, J. Hu, F. Xu, C. Yao, M. You, *Emerging ELISA derived technologies for in vitro diagnostics*, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 152 (2022).

[84] C. Xu, X. Chen, M. Yang, X. Yuan, A. Zhao, H. Bao, *Simple strategy for single-chain fragment antibody-conjugated probe construction*, *Life Sci* 239 (2019) 117052.

[85] O. Spadiut, S. Capone, F. Krainer, A. Glieder, C. Herwig, *Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments*, *Trends in Biotechnology* 32(1) (2014) 54-60.

[86] E.A. van Aalen, B. Rosier, T. Jansen, S.F.A. Wouters, R.T. Vermathen, H.J. van der Veer, J. Yeste Lozano, S. Mughal, J.M. Fernandez-Costa, J. Ramon-Azcon, J.M.J. den Toonder, M. Merckx, *Integrated Bioluminescent Immunoassays for High-Throughput Sampling and Continuous Monitoring of Cytokines*, *Anal Chem* 95(23) (2023) 8922-8931.

[87] S. Giorgi-Coll, M.J. Marin, O. Sule, P.J. Hutchinson, K.L.H. Carpenter, *Aptamer-modified gold nanoparticles for rapid aggregation-based detection of inflammation: an optical assay for interleukin-6*, *Mikrochim Acta* 187(1) (2019) 13.

[88] C. Russell, A.C. Ward, V. Vezza, P. Hoskisson, D. Alcorn, D.P. Steenson, D.K. Corrigan, *Development of a needle shaped microelectrode for electrochemical detection of the sepsis biomarker interleukin-6 (IL-6) in real time*, *Biosens Bioelectron* 126 (2019) 806-814.

[89] L. Alexandre, A. Bendali, I. Pereiro, M. Azimani, S. Dumas, L. Malaquin, T.D. Mai, S. Descroix, *Modular microfluidic system for on-chip extraction, preconcentration and detection of the cytokine biomarker IL-6 in biofluid*, *Sci Rep* 12(1) (2022) 9468.

[90] M. Akdogan, *Polihidroksialkanoatların Genetiği Değiştirilmiş Bakterilerde Üretimi, Karakterizasyonu Ve Matematiksel Modellenmesi*, Kimya Mühendisliği, Hacettepe, Ankara, 2021.

[91] S. Gandhi, I. Banga, P.K. Maurya, S.A. Eremin, *A gold nanoparticle-single-chain fragment variable antibody as an immunoprobe for rapid detection of morphine by dipstick*, *RSC Advances* 8(3) (2018) 1511-1518.

[92] M. Iarossi, C. Schiattarella, I. Rea, L. De Stefano, R. Fittipaldi, A. Vecchione, R. Velotta, B.D. Ventura, *Colorimetric Immunosensor by Aggregation of Photochemically Functionalized Gold Nanoparticles*, *ACS Omega* 3(4) (2018) 3805-3812.

[93] <https://www.lateralflows.com/lateral-flow-assays/>. (Accessed 26.08.2023).

- [94] P. Hornbeck, Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Current Protocols in Immunology*, , 1 (1992).
- [95] <https://www.idtdna.com/pages/tools/codon-optimization-tool>. (Accessed 08.05.2024).
- [96] B.K. Bhandari, C.S. Lim, P.P. Gardner, TISIGNER.com: web services for improving recombinant protein production, *Nucleic Acids Res* 49(W1) (2021) W654-W661.
- [97] M. Zuker, Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Res* 31(13) (2003) 3406-15.
- [98] A. Bhatwa, W. Wang, Y.I. Hassan, N. Abraham, X.Z. Li, T. Zhou, Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications, *Front Bioeng Biotechnol* 9 (2021) 630551.
- [99] C.J. Huang, H. Lin, X.M. Yang, Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 39(3) (2012) 383-399.
- [100] J. Kaur, A. Kumar, J. Kaur, Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements, *Int J Biol Macromol* 106 (2018) 803-822.
- [101] M. Ahmadzadeh, F. Farshdari, M. Behdani, L. Nematollahi, E. Mohit, Cloning, Expression and One-Step Purification of a Novel IP-10-(anti-HER2 scFv) Fusion Protein in *Escherichia coli*, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*.
- [102] G.R.M. Kleiner-Grote, J.M. Risse, K. Friehs, Secretion of recombinant proteins from *E. coli*, *Engineering in Life Sciences* 18(8) (2018) 532-550.
- [103] J.H. Choi, S.Y. Lee, Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 64(5) (2004) 625-635.
- [104] R. Mohammadinezhad, H. Farahmand, S.A.H. Jalali, A. Mirvaghefi, Efficient osmolyte-based procedure to increase expression level and solubility of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) nucleoprotein in *E. coli*, *Appl Microbiol Biotechnol* 102(9) (2018) 4087-4100.
- [105] Z. Yıldırım, E. Çelik, Periplasmic and extracellular production of cellulase from recombinant *Escherichia coli* cells, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 92(2) (2017) 319-324.
- [106] A.B. Khalilvand, S. Aminzadeh, M.H. Sanati, F. Mahboudi, Media optimization for SHuffle T7 *Escherichia coli* expressing SUMO-Lispro proinsulin by response surface methodology, *BMC Biotechnol* 22(1) (2022) 1.

- [107] L.P. Malpiedi, C.A. Díaz, B.B. Nerli, A. Pessoa, Single-chain antibody fragments: Purification methodologies, *Process Biochemistry* 48(8) (2013) 1242-1251.
- [108] P. Singhvi, A. Saneja, S. Srichandan, A.K. Panda, Bacterial Inclusion Bodies: A Treasure Trove of Bioactive Proteins, *Trends Biotechnol* 38(5) (2020) 474-486.
- [109] P. Singhvi, J. Verma, N. Panwar, T.Q. Wani, A. Singh, M. Qudratullah, A. Chakraborty, A. Saneja, D.P. Sarkar, A.K. Panda, Molecular Attributes Associated With Refolding of Inclusion Body Proteins Using the Freeze-Thaw Method, *Front Microbiol* 12 (2021) 618559.
- [110] S.B. Mousavi, S.J. Davarpanah, Solvent extraction of recombinant interferon alpha-2b from inclusion bodies and efficient refolding at high protein concentrations, *Protein Expr Purif* 197 (2022) 106110.
- [111] P. Ehsani, A. Meunier, F. Nato, A. Jafari, A. Nato, P. Lafaye, Expression of anti human IL-4 and IL-6 scFvs in transgenic tobacco plants, *Plant Molecular Biology* 52(1) (2003) 17-29.
- [112] R. Gejima, K. Tanaka, T. Nakashima, S. Hashiguchi, Y. Ito, K. Yoshizaki, K. Sugimura, Human single-chain Fv (scFv) antibody specific to human IL-6 with the inhibitory activity on IL-6-signaling, *Human Antibodies* 11(4) (2003) 121-129.
- [113] B. Krebs, H. Griffin, G. Winter, S. Rose-John, Recombinant Human Single Chain Fv Antibodies Recognizing Human Interleukin-6, *The Journal of Biological Chemistry* 273 (5) (1998) 2858–2865.
- [114] R. Gejima, K. Tanaka, T. Nakashima, S. Hashiguchi, Y. Ito, K. Yoshizaki, K. Sugimura, Human single-chain Fv (scFv) antibody specific to human IL-6 with the inhibitory activity on IL-6-signaling, *Human Antibodies* 11 (2003) 121–129.
- [115] A. Lopez-Cano, P. Sicilia, C. Gaja, A. Aris, E. Garcia-Fruitos, Quality comparison of recombinant soluble proteins and proteins solubilized from bacterial inclusion bodies, *N Biotechnol* 72 (2022) 58-63.
- [116] M.J. Seo, K.J. Jeong, C.E. Leysath, A.D. Ellington, B.L. Iverson, G. Georgiou, Engineering antibody fragments to fold in the absence of disulfide bonds, *Protein Sci* 18(2) (2009) 259-67.
- [117] J.X. Zhao, L. Yang, Z.N. Gu, H.Q. Chen, F.W. Tian, Y.Q. Chen, H. Zhang, W. Chen, Stabilization of the single-chain fragment variable by an interdomain disulfide bond and its effect on antibody affinity, *Int J Mol Sci* 12(1) (2010) 1-11.
- [118] V. Lim, K.K. Peh, S. Sahudin, Synthesis, characterisation, and evaluation of a cross-linked disulphide amide-anhydride-containing polymer based on cysteine for colonic drug delivery, *Int J Mol Sci* 14(12) (2013) 24670-91.

- [119] Y. Liu, Y. Liu, R.L. Mernaugh, X. Zeng, Single chain fragment variable recombinant antibody functionalized gold nanoparticles for a highly sensitive colorimetric immunoassay, *Biosens Bioelectron* 24(9) (2009) 2853-7.
- [120] R. Kozlowski, A. Ragupathi, R.B. Dyer, Characterizing the Surface Coverage of Protein-Gold Nanoparticle Bioconjugates, *Bioconjug Chem* 29(8) (2018) 2691-2700.
- [121] N. Mustafaoglu, T. Kiziltepe, B. Bilgicer, Site-specific conjugation of an antibody on a gold nanoparticle surface for one-step diagnosis of prostate specific antigen with dynamic light scattering, *Nanoscale* 9(25) (2017) 8684-8694.
- [122] H. de Puig, I. Bosch, L. Gehrke, K. Hamad-Schifferli, Challenges of the Nano-Bio Interface in Lateral Flow and Dipstick Immunoassays, *Trends Biotechnol* 35(12) (2017) 1169-1180.
- [123] A. Forootan, R. Sjoback, J. Bjorkman, B. Sjogreen, L. Linz, M. Kubista, Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR), *Biomol Detect Quantif* 12 (2017) 1-6.
- [124] Y. Wang, R. Vaidyanathan, M.J.A. Shiddiky, M. Trau, Enabling Rapid and Specific Surface-Enhanced Raman Scattering Immunoassay Using Nanoscaled Surface Shear Forces, *Acs Nano* 9(6) (2015) 6354-6362.
- [125] A. Shrivastava, V. Gupta, Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods, *Chronicles of Young Scientists* 2(1) (2011).
- [126] S.M. Russell, A. Alba-Patino, E. Baron, M. Borges, M. Gonzalez-Freire, R. de la Rica, Biosensors for Managing the COVID-19 Cytokine Storm: Challenges Ahead, *ACS Sens* 5(6) (2020) 1506-1513.
- [127] V. Vasquez, J. Orozco, Detection of COVID-19-related biomarkers by electrochemical biosensors and potential for diagnosis, prognosis, and prediction of the course of the disease in the context of personalized medicine, *Anal Bioanal Chem* 415(6) (2023) 1003-1031.
- [128] J.D. Beatty, Beatty B.G., V. W.G., Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay, *Journal of Immunological Methods* 100 (1987) 173-179.
- [129] I.P. Maksum, Y. Yosua, A. Nabel, R.D. Pratiwi, S. Sriwidodo, U.M.S. Soedjanaatmadja, Refolding of bioactive human epidermal growth factor from *E. coli* BL21(DE3) inclusion bodies & evaluations on its in vitro & in vivo bioactivity, *Heliyon* 8(4) (2022).
- [130] K.-M. Poon, F.C.-H. Tam, Y.-L. Chui, P.-L. Lim, Single-chain Fv fragment lacks carrier specificity of the native antibody, *Molecular Immunology* 39 (2002) 19-24.

- [131] J.G. Vermeulen, F. Burt, E. van Heerden, E. Cason, M. Meiring, Evaluation of in vitro refolding vs cold shock expression: Production of a low yielding single chain variable fragment, *Protein Expr Purif* 151 (2018) 62-71.
- [132] G. Yusakul, P. Nuntawong, S. Sakamoto, P. Ratnatilaka Na Bhuket, T. Kohno, N. Kikkawa, P. Rojsitthisak, K. Shimizu, H. Tanaka, S. Morimoto, Bacterial Expression of a Single-Chain Variable Fragment (scFv) Antibody against Ganoderic Acid A: A Cost-Effective Approach for Quantitative Analysis Using the scFv-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, *Biol Pharm Bull* 40(10) (2017) 1767-1774.
- [133] C. Li, Y. Wang, T. Liu, M. Niklasch, K. Qiao, S. Durand, L. Chen, M. Liang, T.F. Baumert, S. Tong, M. Nassal, Y.M. Wen, Y.X. Wang, An E. coli-produced single-chain variable fragment (scFv) targeting hepatitis B virus surface protein potently inhibited virion secretion, *Antiviral Res* 162 (2019) 118-129.
- [134] J.-W. Hyun, K. Lee, J.-H. Kim, D.-W. Sim, K.-T. Byun, S.-J. Jung, J.C. Paeng, T.-B. Kang, J. Park, C.-G. Kim, H.-S. Won, Extracellular production of an anti-HER2 single-chain variable antibody fragment in *Escherichia coli*, *Process Biochemistry* 111 (2021) 87-94.
- [135] C. Tunghirun, V. Narkthong, W. Chaicumpa, S. Chimnaronk, Interference of dengue replication by blocking the access of 3' SL RNA to the viral RNA-dependent RNA polymerase, *Antiviral Res* 182 (2020) 104921.
- [136] Z. Wang, J. Zhang, X. Wang, D. Wei, High level expression and characterization of the recombinant immunotoxin DAB389-4D5 scFv targeting HER2/neu-positive ovarian carcinoma cells, *Process Biochemistry* 80 (2019) 26-34.
- [137] A. Sain, P. Sen, K. Venkataraman, M.A. Vijayalakshmi, Expression of a Tagless Single-Chain Variable Fragment (scFv) of Anti-TNF-alpha by a Salt Inducible System and its Purification and Characterization, *Protein and Peptide Letters* 28(11) (2021) 1272-1280.
- [138] V. Gupta, I.P. Sudhakaran, Z. Islam, N.N. Vaikath, I. Hmila, T. Lukacsovich, P.R. Kolatkar, O.M.A. El-Agnaf, Expression, purification and characterization of alpha-synuclein fibrillar specific scFv from inclusion bodies, *PLoS One* 15(11) (2020) e0241773.
- [139] R. Maleki, A. Rahimpour, M. Rajabibazl, Construction and evaluation of wild and mutant ofatumumab scFvs against the human CD20 antigen, *Prep Biochem Biotechnol* 53(3) (2023) 239-246.

EKLER

EK 1 – Tez kapsamında üretilen scFv'lerin DNA sekansları

Anti-TNF-scFv (792 bp):

CATATGCCGTCGTCGCTGTAGGTGTTTTAGGTGAGGCATGGTATAGTTTTG
GGCGGACCGGACAGCAGCTGTGCCGCTTCCGGCTTTACCTTTTCATCCTA
CGCGATGAGTTGGGTCCGCCAAGCGCCAGGAAAAGGCTTAGAGTGGGTT
TCATCCATCGCTAACAAAGGTCACGAGACACGTTACGTTGATTCGGTGAAG
GGGCGCTTTACAATTTACGCGATAACTCAAAGAACACGTTGTATCTGCAA
ATGAACAGTCTTCGCGCGGAGGATACTGCTGTTTATTACTGTGCGAAATAT
GCAGGAACATTTGATTACTGGGGACAAGGAACATTAGTTACGGTATCTAGT
GGTGGCGGAGGCTCAGGCGGAGGGGGAAGTGGGGGCGGAGGGTCAACA
GATATTCAGATGACGCAAAGTCCCAGCTCATTGTCCGCAAGCGTCGGTGA
CCGCGTGACAATCACCTGCCGTGCGTCACAAAGCATCTCTTCATACTTAAA
TTGGTATCAACAAAAACCCGGAAAGGCTCCCAAACCTTCTGATTTATGCCGC
CTCGATGTTACAATCCGGGGTCCCCAGCCGTTTTTCCGGTAGCGGGTCAG
GCACAGATTTCACTGACGATTTTCGTCACTGCAGCCTGAATATTTTGCAA
CGTATTACTGCCAACAGGCGCGTAGTTGGCCGCCTACTTTTGGGCAAGGT
GATCAAGGAGGTAACCAGACTGGCCGTCCACACATTATTATCGCAATTACG
GGCGCTACCCATCACCATCATCACCATTA AAAAGCTT

Anti-IL6-scFv (774 bp):

CATATGCAGGTGCAATTAAGGAATCTGGACCTGGTCTTGTCCCGTCACAG
AGCTTATCGATTACGTGTACTGTAAGCGATTTCTCATTAAACCAACTATGGTG
TGCATTGGGTTCCGCCAGTCGCCGGGTAAGGGTTTAGAATGGCTGGGAGTT
ATTTGGTCCGGGGGGAGTACTGATTATAACGCCGCTTTTATTAGCCGCTTG
AGTATCTCAAAGACAACCTCCAAGAGCCAAGTGTTTTTTCGAGATGAATAGC
CTTCAAGCCGACGATACAGCCATTTATTATTGTGCGCGTAACGGTAACCGT
TATTATGGCTATGCATTGGACTACTGGGGGCAAGGAACATCAGTAACCGTT
AGTTCAGGGGGCGGTGGGTCCGGGGGAGGGGGCAGTGGCGGTGGAGGC
TCTGATGTTGTCATGACGCAAACGCCATTAAGCCTTCCTGTGTCTCTGGGC
GACCAAGCTAGTATCTCCTGCCGCTCATCCCAATCCATTGTCCATTCCAAT
GGCAATACGTA CTTGGAAATGGTACTTACAAAAGCCGGGACAGTCGCCCAA
GTTATTGATCTACACAGTCTCCAACCGCTTATCGGGTGTGCCCGACCGTTT
CAGCGGGAGTGGTAGCGGAACGGATTTTACCTTGAAAATCTCACGCGTAG
AGGCCGAGGATCTTGGCGTTTACTATTGCTTTCAGGGCTCGCATGGCCCG
TACACGTTTTGGTGGCGGTACAAAATTGGAAATCAAACATCACCATCATCAC
CATTAAAAGCTT

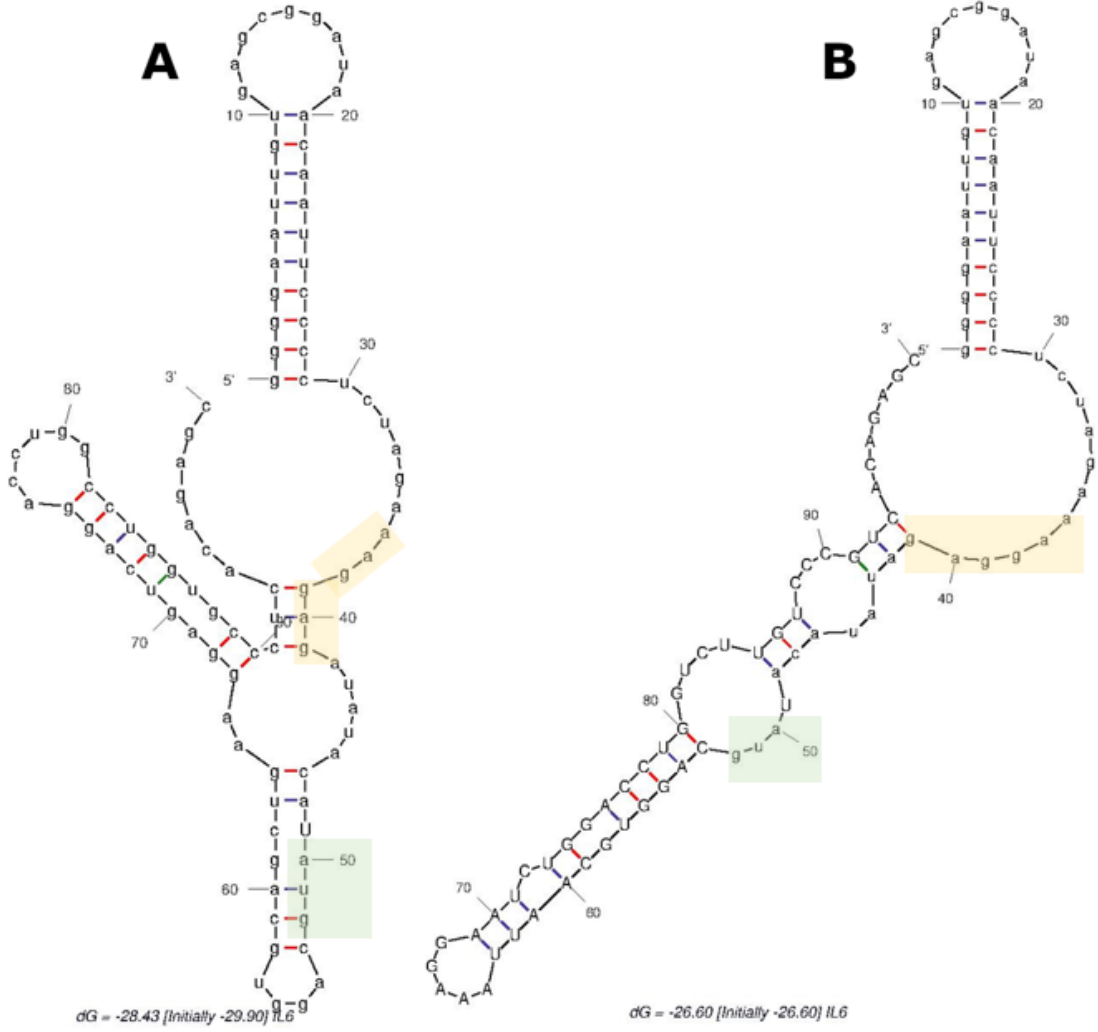
Anti-IL1 β -scFv (797 bp):

CCATGGGACATATGGATATCCAAATGACGCAATCGCCGTCGTCCCTTTCTG
CGTCTGTGGGCGACCGTGTACGATCACTTGTCTGACCTCGGGCAATATT
CACAATTATCTTACATGGTACCAGCAAAGCCAGGGAAAGCCCCCAGTTA
CTTATCTATAACGCGAAAACCTTAGCCGATGGAGTACCAAGCCGCTTTAGT
GGATCGGGATCCGGTACCCAGTTCACCCTGACAATCTCATCGCTGCAACC
CGAGGATTTGCGCAACTACTATTGCCAGCATTTTTGGTCGTTACCGTTTAC
TTTCGGACAAGGTACGAAGGTAGAAATTAACGCACAGGGGGCGGAGGCT
CTGGAGGCGGAGGTAGCGGGGGTGGTGGCTCCGGTGGAGGGGGATCTG
AAGTACAATTGGTGAATCGGGAGGAGGCTTAGTTCAGCCAGGAGGCAGT
TTACGCCTTAGCTGTGCCGCATCTGGCTTTGATTTAGTCGTTATGACATG
AGTTGGGTTTCGCCAAGCCCCTGAAAACGCTTGGAATGGGTAGCCTACAT
CTCGTCAGGAGGAGGTTCAACCTACTTCCCTGACACAGTAAAAGGTCGTTT
CACCATTTCTCGTGATAACGCCAAGAATACCCTTTATCTTCAGATGAATTCC
TTGCGTGCTGAGGATACTGCCGTGTATTATTGTGCACGCCAAAACAAGAAA
CTTACCTGGTTTGACTATTGGGGCCAAGGTACGTTAGTAACCGTATCCAGC
CACCACCATCACCACCACGGTGGTTCGTGCTAAAAGCTT

Anti-IFN γ -scFv (773 bp):

CCATGGGACATATGGAGGTTCAATTAGTTCAGAGCGGGGCGGAGGTGAAG
AAGCCAGGGGAGAGTTTAAAAATTAGTTGTAAAGGTTTCAGGGTATAATTTT
ACAAGTTATTGGATTGGGTGGGTGCGTCAAATGCCCGGAAAAGGTCTTGA
GCTTATGGGAATTATTTACCCTGGCGATTCCGGATACCCGTTATAGTCCTAG
CTTTCAGGGACAGGTTACAATCTCAGCGGATAAGAGTATCTCTACAGCATA
TCTGCAGTGGAGTTCTCTTAAAGCAAGCGACACAGCTATGTATTACTGTGG
TAGCGGCTCGTACTTCTATTTTCGACCTGTGGGGACGCGGTACGTTAGTCA
CGGTTAGTAGCGGTGGTGGTGGATCTGGCGGCGGGGGTTCAGGGGGCG
GGGGTAGTGAGATTGTATTAACCTCAGAGCCCTGGTACGCTGTCTCTGTCA
CCTGGCGAACGCGCCACCTTGTCTGTGCGCATCACAGAGCGTATCGTC
AAGTTACCTTGCTTGGTACCAGCAAAGCCTGGGCAAGCGCCACGCCTTT
TAATTTATGGGGCTAGTTCACGTGCAACTGGAATCCCTGATCGTTTCAGCG
GGAGTGGCTCAGGAACCGATTTTACGTTGACTATCAGCCGCTTAGAACCA
GAGGATTTGCGCGTTTACTATTGTGAGCGTAGCGGTGGATCTTCATTTACT
TTTGGCCCTGGTACAAAGGTAGACATCAAACACCACCATCACCACCACGG
TGTTTCGTGCTAAAAGCTT

EK 2 – Anti-IL6-scFv mRNA ikincil yapıları



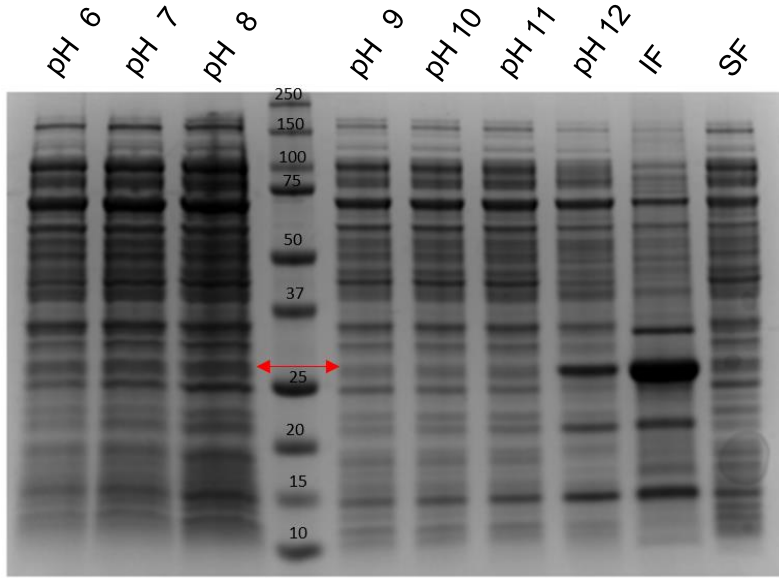
Şekil Ek 2 Anti-IL6-scFv için olası mRNA'nın olası ikincil yapıları. Başlangıç (A) ve optimize edilmiş (B) diziler (transkripsiyon başlangıç bölgesinden itibaren 100 nt). Yeşil bölge AUG başlangıç kodonunu, sarı bölge ise RBS dizisini vurgulamaktadır.

Çizelge Ek 2 TIsigner kullanılarak başlangıç ve optimize edilmiş anti-IL6 scFv kodonları için açılma enerjisi (opening energy), ekspresyon skoru ve çözünürlük olasılığının tahmini

Sekans	Açılma enerjisi^a	Ekspresyon skoru^b	Çözünürlük^c
Başlangıç	11,6	63,9	0,27
Optimize	7,7	94,6	0,27

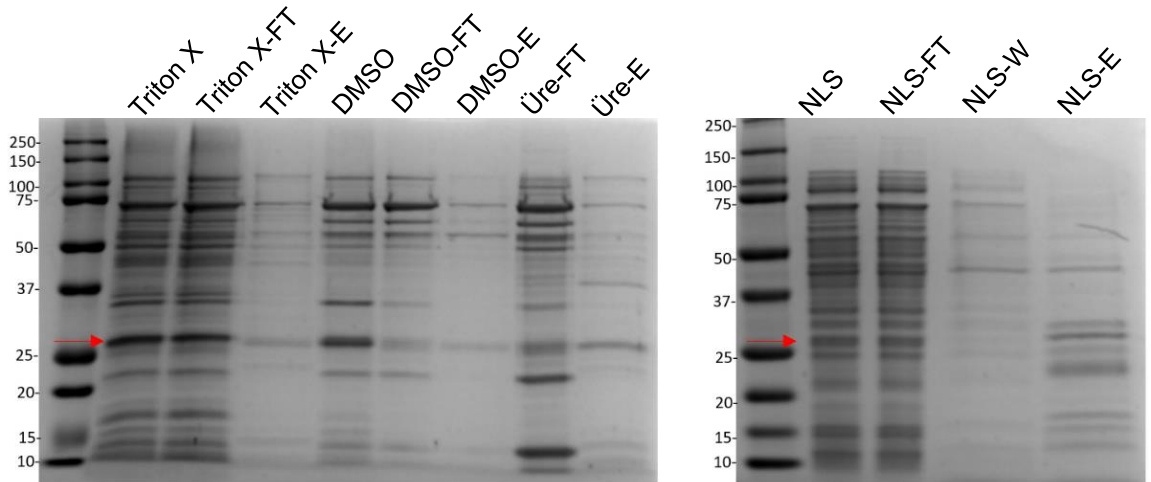
^aAçılma enerjisi, eşleşmiş nükleotidlerin ayrılması için gereken enerjidir (kcal/mol), ^bAçılma enerjisini göre ekspresyon ölçeği (düşükten yükseğe 0-100), ^cÇözünürlük olasılığı.

EK 3 – Farklı çözünürleştirme yöntemleri ile elde edilen Anti-IL6-scFv SDS-PAGE görüntüleri



Şekil Ek 3.1. Çözünürleştirme tamponunun pH değerinin (6.0 ila 12.0) protein geri kazanımı üzerindeki etkisi.

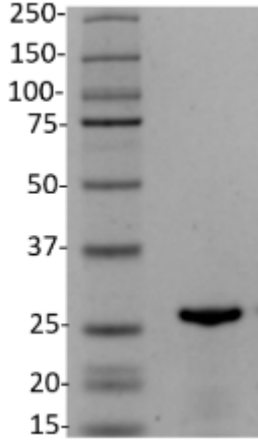
IF: Çözünmeyen fraksiyon, SF: Çözünür fraksiyon. Tüm yıkama ve elüsyon numuneleri toplam hacme göre normalize edilmiştir. Ok anti-IL6-scFv'yi göstermektedir.



Şekil Ek 3.2. Farklı denatüre edici olmayan ajanların IB'lerin çözünürleştirilmesi ve saflaştırılması üzerindeki etkisi. 50 mM Tris tamponu (pH:8,0) içinde;

Triton-X: %1 (v/v), DMSO: %5 (v/v), Üre: 2 M veya %0,2 (w/v) NLS.

FT: Akış, W: Yıkama, E: Elüsyon fraksiyonları. Tüm yıkama ve elüsyon örnekleri toplam hacme göre normalize edilmiştir. Ok anti-IL6 scFv'yi göstermektedir.



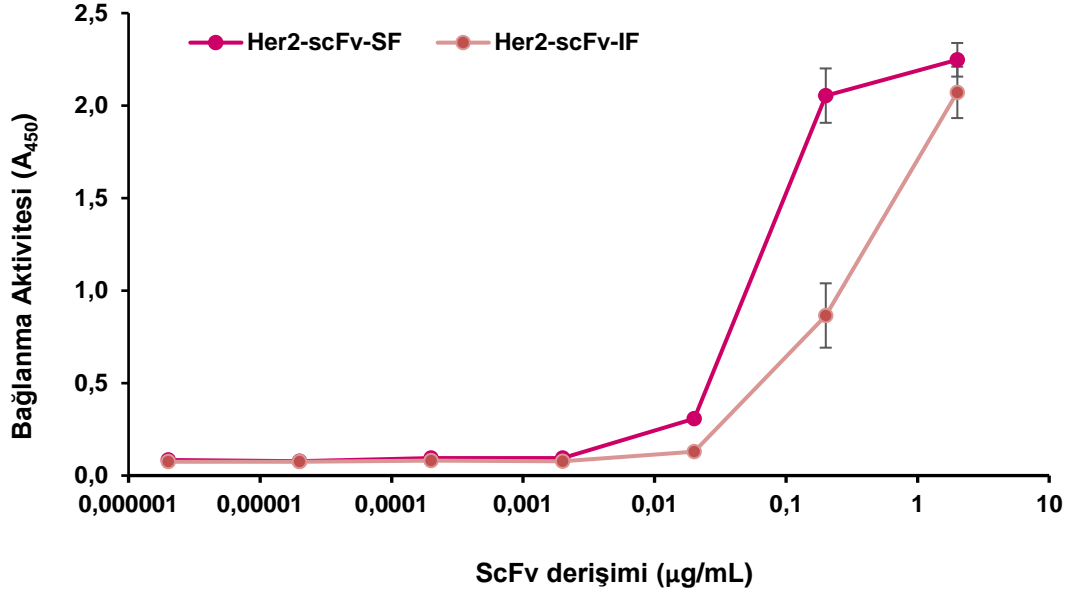
Şekil Ek 3.3. %1 NLS ile çözümlenerek saflaştırılan >%95 saflıkta anti-IL6-scfv

Çizelge Ek 3.1. Farklı kaynaklarda r-scFv üretim verimleri [43]

scFv	Kaynak	Verim (mg/L)	Yorum	Referans
Anti-TFI	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	1-3,5	Çözünür, inaktif	Vermulen vd., 2018 [131]
Anti-GAA	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	5,6	IB, tekrar katlama	Yusakul vd., 2017 [132]
Anti-G12	<i>E. coli</i> SHuffle T7 Express	2,0	Çözünür	Li vd., 2019 [133]
Anti-Her2	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	2,5	Çözünür (MBP füzyon)	Hyun vd, 2021 [134]
Anti-Her2	<i>E. coli</i> SHuffle T7 Express	9,3	Çözünür	Kocer vd., 2021 [40]
Anti-RdRP	<i>E. coli</i> SHuffle T7 Express	1.7-2,8	Çözünür (MBP füzyon)	Tunghirun vd., 2020 [135]
Anti-Her2	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	30	Çözünür (toksin füzyon)	Wang vd., 2019 [136]
Anti-TNF	<i>E. coli</i> GJ1158	10	IB, tekrar katlama	Sain vd., 2022 [137]
Anti- α -syn	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	0,5	IB, tekrar katlama	Gupta vd., 2020 [138]
Anti-IL-1RAP	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	21	IB, tekrar katlama	Farokhi-Fard vd., 2023 [47]
Anti-CD20	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	7-8	IB, tekrar katlama	Maleki vd., 2022 [139]

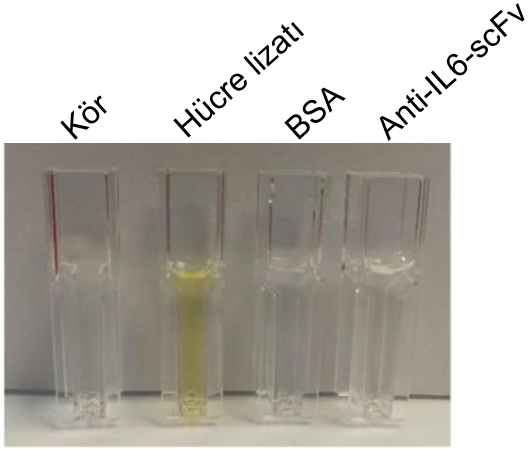
Anti-IL6	Phage library	-	Çözünür	Krebs vd., 1998 [113]
Anti-IL6	Phage library	-	Çözünür, inaktif	Gejima vd., 2003 [112]
Anti-IL6	Tobacco plants	0.7-1.4	Çözünür	Ehsani vd., 2003 [111]
Anti-IL6	<i>E. coli</i> SHuffle T7 Express	23	IB, tekrar katlama ihtiyacı yok	Şahinbaş ve Çelik, 2023 [43]

EK 4 – Anti-Her2-scFv çözünür ve çözünmez fraksiyonlarının bağlanma aktivitelerinin karşılaştırılması



Şekil Ek 4. *E. coli* Shuffle T7 Express suşundan eksprese edilen ve inklüzyon cisimlerinden denatüre olmayan yöntemle (IF) veya doğrudan çözünür fraksiyondan (SF) saflaştırılan anti-Her2 scFv'nin bağlanma aktivitesi. Plakalar 50 µL 0,2 µg/mL ticari rekombinant insan Her-2 ile kaplanmıştır. Absorbans 450 nm'de ölçülmüştür.

EK 5 – Anti-IL6-scFv disülfid bağı oluşumu kontrolü için Ellman testi

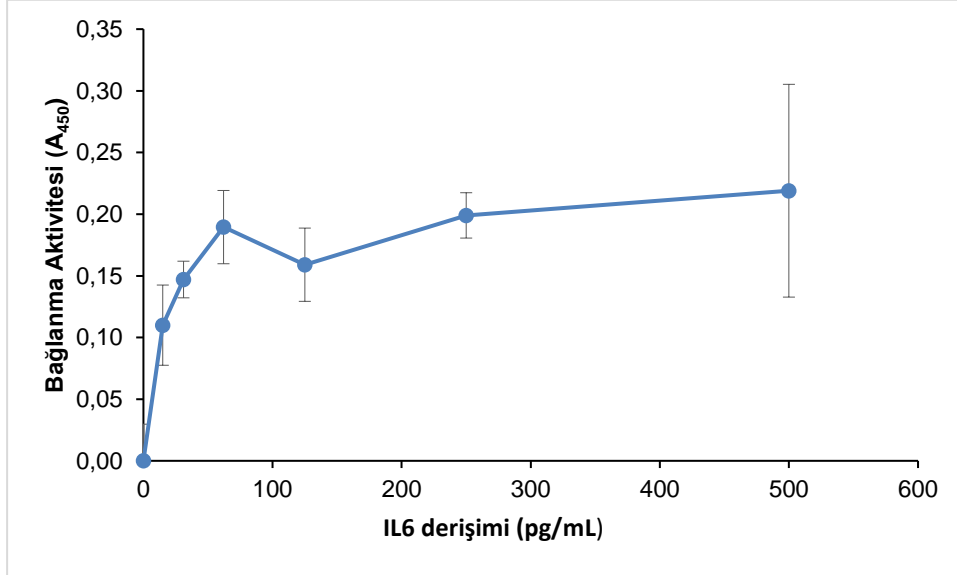


Şekil Ek5. Ellman testi reaksiyon sonucu renk oluşumu

Çizelge Ek5. Ellman testi A_{412} absorbans değerleri

Örnek	Abs ₄₁₂
Hücre lizati	0,504
BSA	0,004
IL6-scFv	0,027

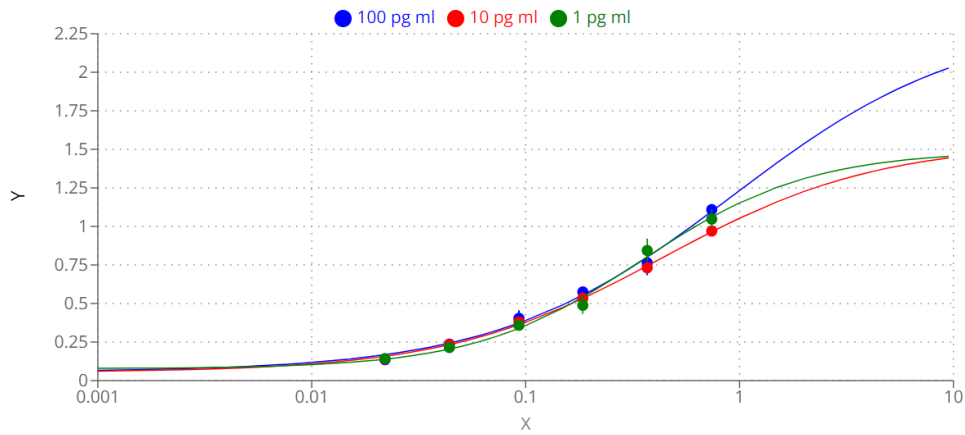
EK 6 – 10 µg/mL anti-IL6-scFv ile yapılan sandviç ELISA bağlanma aktivitesi sonuçları



EK 7 – Hassasiyet hesaplamaları için regresyon analizi örneği

<i>Regresyon İstatistikleri</i>									
Çoklu R	0.928151								
R Kare	0.861465								
Ayarlı R Kare	0.815286								
Standart Hata	0.098169								
Gözlem	5								
ANOVA									
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Anlamlılık F</i>				
Regresyon	1	0.179782324	0.179782324	18.65512	0.022867916				
Fark	3	0.028911476	0.009637159						
Toplam	4	0.2086938							
	<i>Katsayılar</i>	<i>Standart Hata</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-değeri</i>	<i>Düşük %95</i>	<i>Yüksek %95</i>	<i>Düşük 95.0%</i>	<i>Yüksek 95.0%</i>	
Kesişim	0.734178	0.063745732	11.51728851	0.001405	0.53131062	0.937045	0.531311	0.937045	
X Değişkeni 1	0.004284	0.000991799	4.319157007	0.022868	0.001127388	0.00744	0.001127	0.00744	

EK 8 – Çevrimiçi “curve fitting” programı ile maksimum absorbansın yarısındaki scFv derişiminin belirlenmesi



X₅₀ Regression Results [100 pg ml]

Parameter	Value
X ₅₀	0.9236
Equations	
Equation	$Y = 0.0568 + \frac{2.3371 - 0.0568}{1 + \left(\frac{X}{0.9236}\right)^{-0.794}}$

X₅₀ Regression Results [10 pg ml]

Parameter	Value
X ₅₀	0.4364
Equations	
Equation	$Y = 0.0538 + \frac{1.5407 - 0.0538}{1 + \left(\frac{X}{0.4364}\right)^{-0.8653}}$

X₅₀ Regression Results [1 pg ml]

Parameter	Value
X ₅₀	0.3521
Equations	
Equation	$Y = 0.0772 + \frac{1.4897 - 0.0772}{1 + \left(\frac{X}{0.3521}\right)^{-1.1111}}$

<https://www.aatbio.com>

EK 9 – Tezden Türetilmiş Yayınlar

Şahinbaş, D., Çelik, E., Enhanced production and single step purification of biologically active recombinant anti-IL6 scFv from Escherichia coli inclusion bodies, *Process Biochemistry*, 133 (2023) 151-157.

EK 10 – Tezden Türetilmiş Bildiriler

Koçer İ., **Şahinbaş D.**, Cilasun S., Çelik E., 5-7/03/2020. Production of ScFv Antibody Fragments and Their Applications. International Biotechnology Congress (BIOTürkiye-2020), İstanbul, Türkiye, Abstract Book, P39 (oral presentation).

EK 11– Tezden Türetilmiş Projeler

- **TÜBİTAK 1002 (121M179)-** Sitokin Fırtınasının Teşhisine Yönelik Rekombinant anti-TNF ve anti-IL6 Antikor Fragmentlerinin Üretimi ve Genetik Modifikasyonu
- **Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Hızlı Destek Projesi (FHD-2022-20221)-** Rekombinant Antikor Fragmentlerinin Üretimi ve Genetik Modifikasyonuyla Sitokin Ölçümüne Yönelik İmmünoassay Geliştirilmesi