

BİYOTEKNOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

2022

- 1. Ö*** Z******* EX VIVO GEN TERAPİSİYLE HİPOPARATİROİDİZM TEDAVİSİ MODELİ OLUŞTURMA
- 2. G***** D******* DEVELOPMENT OF WHOLE BLOOD STAGE VACCINE FOR MALARIA TREATMENT VIA CRISPR-GENE EDITING TECHNOLOGY

EX VIVO GEN TERAPİSİYLE HİPOPARATİROİDİZM TEDAVİSİ MODELİ OLUŞTURMA

ÖZET

Hipoparatiroidi (hipo-PT), vücuttaki parathormon (PTH) eksikliği sebebiyle başlıca kalsiyum seviyesindeki düşüş ve fosfat seviyesindeki artışın eşlik ettiği, yaşamın devamı için mutlaka tedavi edilmesi gereken bir hastalıktır. Kronik hipo-PT'nin konvansiyonel tedavisinde yüksek dozlarda oral Ca ve D vitamini takviyelerinin ömür boyu kullanımı zorunludur. Söz konusu tedavi küratif olmayıp semptomatik olmakla beraber, uzun vadede kullanımında hastada çok ciddi yan etkiler görülebilmektedir. Bu sebeple hipo-PT için yeni ve alternatif terapi yaklaşımlarının geliştirilmesinin gerekliliği açıkça görülmektedir.

Gen terapisi, özellikle küratif tedavisi bulunmayan hastalıklar için kullanılabilecek olan, son yıllarda yenilenen vektör tasarımlarıyla birlikte hem güvenilirliğinin hem de etkinliğinin artırılmış olduğu bir terapi metodudur. Bu sebeple çalışmamızda, sıçanlar üzerinde *ex vivo* gen terapisi metoduyla hipoparatiroidi tedavisi modeli oluşturabilmenin mümkün olabileceğinin gösterilebilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamız hipo-PT tedavisinde hem “otolog primer hücrelerin kullanıldığı ilk *ex vivo* gen terapisi” çalışması olup, hem de söz konusu hastalığın tedavisinde vektör olarak “lentiviral vektörler”in kullanılmış olduğu ilk çalışmadır. Daha önce sıçanlar üzerinde hipo-PT için gen terapisi çalışmaları gerçekleştirilmiş olsa bile, söz konusu çalışmalarda *in vivo* yöntem kullanıldığından, terapötik genin vücutta dağılabileceği hücreleri/dokuları tahmin edebilmek mümkün değildir. Oysa *ex vivo* gen terapisi çok daha güvenli ve kontrollü bir uygulama sağlayabilmektedir. Çalışmamızda ayrıca otolog hücrelerin kullanımı sayesinde immun reddin de önüne geçilebilmesi amaçlanmıştır.

Tezimizde her bir deney hayvanından alınan deri parçasından, hayvanın kendine ait otolog primer hücreler kültüre edilerek çoğaltılmış ve insan parathormon geni (hPTH) taşıyan lentiviral vektörler üretilerek, söz konusu otolog hücreler lentiviral vektörlerle transdükte edilmiştir. Transdüksiyon sonrası hücrelerin hPTH genini genomlarına entegre ederek yüksek miktarda biyolojik aktif hPTH üretimi ve salgılaması yaptığı floresan mikroskop görüntüleri ve biyokimyasal testler sayesinde doğrulanmıştır. Söz konusu hücreler sıçan vücuduna subkutan olarak enjekte edildikten sonra ise tüm deney hayvanlarında hPTH üretimi doğrulanarak, sıçanlarda *ex vivo* gen terapisi ile hipo-PT tedavisinin mümkün olabileceği gösterilmiştir. Ancak terapi sonrası sıçan serumundan ölçülen hPTH değerlerinin, sıçanlardaki fizyolojik PTH referans değer aralığının altında kaldığı görülmektedir. Bunun sebebinin terapötik hücrelerin enjeksiyon sonrasında sadece çok az bir kısmının vücuda engraft olabilmemesi, büyük bir kısmının ise engraft olamadığı için vücuttan uzaklaştırılması ve bu yüzden hormon seviyelerinin fizyolojik referans değer aralığının altında kalması olduğu düşünülmektedir.

Sonraki çalışmalarda, çalışma yönteminin optimize edilerek terapötik hücreler için uygun bir hücrenel taşıyıcıyla beraber enjeksiyon uygulanması, bu sayede terapötik hücrelerin sıçan vücuduna engraft olabılme oranlarının ve dolayısıyla hPTH üretim miktarlarının yükseltilebilmesi planlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Hipoparatiroidizm, gen terapisi, ex vivo gen terapisi, lentiviral vektör, otolog primer hcre

CREATING A TREATMENT MODEL FOR HYPOPARATHYROIDISM VIA EX-VIVO GENE THERAPY

SUMMARY

Hypoparathyroidism (hypo-PT) is a disease, caused by the lack of parathormone (PTH) and accompanied by a decrease in the calcium and an increase in the phosphate levels in serum. Lifelong use of high doses of oral Ca and vitamin D supplements are mandatory in the conventional treatment of chronic hypo-PT. Although the conventional treatment is symptomatic but not curative, it may cause very serious side effects in long-term use. Therefore, the necessity of developing new alternative therapies for hypo-PT is clearly seen.

Gene therapy is a therapy method that can be preferred especially for the diseases that do not have a curative or effective treatment. Both its reliability and effectiveness have been increased in recent years due to the renewed gene transfer vector designs. Therefore it's aimed to show that it is possible to create an ex vivo gene therapy method for hypo-PT treatment on rats

Our study is both the “first ex vivo gene therapy using autologous primary cells” and the “first study using lentiviral vectors for gene delivery” in the treatment of hypo-PT. Even if, *in vivo* gene therapy studies for hypo-PT have been performed before, “*ex vivo* method” which is preferred in our study, is more safer and manageable than “*in vivo* method”. In our study, it was also aimed to prevent immune rejection by using autologous primary cells.

In our thesis, separate skin biopsies were excised from experimental animals and separate autologous cell cultures were created for each animal. At the same time, lentiviral vector particles which are carrying “hPTH therapeutic gene” was constructed and then the autologous cells were transduced by lentiviral vectors to integrate the therapeutic gene hPTH into their genomes. Following transduction, high amounts of biologically active hPTH production and secretion from autologous cells was confirmed by both fluorescent microscope images and biochemical tests. Thereafter therapeutic cells were injected subcutaneously into the rat body and hPTH production was confirmed in all experimental animals, demonstrating that “treatment of hypo-PT with ex vivo gene therapy in rats” may be feasible.

However, it is observed that the hPTH values measured from the serum of rats after the therapy, remained below the physiological PTH reference range, it is estimated that the reason for this is that only a small amount of the therapeutic cells could engraft in the body after the injection, and the vast majority of them are removed due to the fact that they couldn't engraft into the body. As a result, due to the inadequate engraftment ratios of therapeutic cells, it is thought that hPTH levels remained below the physiological PTH reference ranges.

In our future studies, it is planned to optimize the study protocol and to apply the injection of therapeutic cells with a suitable cellular matrix, thereby increasing the engraftment ratios of therapeutic cells into the rat body and thus the amount of hPTH production.

Keywords: Hypoparathyroidism, gene therapy, ex vivo gene therapy, lentiviral vector, autologous primary cells

DEVELOPMENT OF WHOLE BLOOD STAGE VACCINE FOR MALARIA TREATMENT VIA CRISPR-GENE EDITING TECHNOLOGY

SUMMARY

Malaria remains a major global health problem among mainly in pregnant women and children, which resulted in death of hundreds of thousands of humans. One of the greatest challenges for malaria treatment is drug resistance against antimalarial drugs. Therefore, eradication of malaria can only be achieved with the application of very potent and safe vaccines. However, there is no malaria vaccine currently available, and the most advanced subunit vaccine candidate has recently reported efficacy between 0-30% against clinical malaria cases. On the other hand, live attenuated whole parasites used in experimental vaccination trails induced complete sterile protection. However, the inefficiency of gene editing technologies has limited their use in generating live attenuated vaccines.

Four members (NT1, NT2, NT3, and NT4) of the nucleoside transporter gene family play an important role in the purine transfer from the host to human malaria parasites. In this thesis, we developed nucleoside transporter 1 deficient *Plasmodium yoelii* and *Plasmodium berghei* via CRISPR-Cas9 gene editing methods. The CRISPR/Cas9 system is an emerging genome-editing technology that is used to edit the gene for various living organisms. CRISPR/Cas9 system sheds light on *Plasmodium* (*P. yoelii*, *P. falciparum*, etc.) to modify the targeted genes based on homologous recombination. We also generated a mixed live attenuated blood-stage malaria vaccine model using that NT1 deficient plasmodium strains. Equally mixed *Pbnt1(-)* and *Pynt1(-)* parasites in single subcutaneous fresh or frozen doses were injected in a group of mice and conferred sterile protection against intravenous infectious blood-stage challenge with wild-type parasites of *P. berghei* ANKA and *P. yoelii* 17X-NL strains. This data may indicate that a single subcutaneous sub-patent dose of two species of genetically-growth-attenuated parasites, can protect humans against two *Plasmodium* spp. infections. NT1 knockout parasites could be developed in cultures provided with supra-physiological concentrations of purine and shipped to endemic areas in frozen-stock doses stored in liquid nitrogen.

In this thesis, we also evaluated the role of the nucleoside transporter 4 gene (NT4) in the *Plasmodium* life cycle as a potential malaria vaccine target. Herein, NT4 deficient *P. berghei* parasites were generated, and in the erythrocytic stage, significant differences have not been observed. However, oocyst egress and sporozoite invasion of salivary glands are restricted in the mosquito stage. Moreover, the *Pbnt4(-)* salivary glands and hemolymph sporozoites did not develop infectivity. As a result of these results, the NT4 gene could be a promising target for the next malaria transmission-blocking studies.

Keywords: Malaria, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii*, CRISPR-Cas9, Blood-stage vaccine, Nucleoside Transporter 1, Nucleoside Transporter 4

CRISPR GEN DÜZENLEME TEKNOLOJİSİ İLE SITMA TEDAVİSİNDE KULLANILACAK CANLI ZAYIFLATILMIŞ KAN EVRESİ AŞISI GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Sıtma insanlık tarihinin ilk yıllarından beri özellikle gebe ve çocukları etkileyen ve binlerce insanın ölümüne yol açmış başlıca küresel sağlık problemlerinden biridir. Sıtma tedavisinde karşılaşılan en büyük zorluk sıtma ilaçlarına karşı gelişen ilaç direncidir. Sıtmanın yok edilebilmesi için aşılama en güvenilir ve önemli yöntemlerden biridir. Ancak sıtma tedavisinde kullanılacak mevcut bir aşının bulunmadığı ve geliştirilen alt birim aşı adayları etkinliğinin % 0-30 arasında olduğu rapor edilmiştir. Diğer yandan, deneysel aşılamalarda kullanılan canlı zayıflatılmış aşılardan steril bağışıklığı indüklediği gösterilmiştir. Ancak gen düzenleme teknolojilerinin yetersiz olması canlı zayıflatılmış aşılardan geliştirilmesini sınırlamaktadır.

İnsan sıtma türünde nucleosit transport gen ailesinin 4 üyesi (NT1, NT2, NT3 ve NT4) tanımlanmıştır ve her bir aile üyesinin konakçıdan pürin alımında rol oynadığı düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında nucleosit transport 1 geni *P. yoelii* ve *P. berghei* suşlarından CRISPR-Cas9 gen düzenleme yöntemiyle silinmiştir. CRISPR-Cas9 teknolojisi, çeşitli canlı organizma genlerinin düzenlenmesinde kullanılmaktadır. CRISPR-Cas9 teknolojisi homolog rekombinasyon temelli gen hedefleme yöntemini geliştirmede ışık tutmaktadır. Bu çalışmada ayrıca üretilen nükleosit transport 1 geni silinmiş parazit suşları ile karışık doz canlı zayıflatılmış kan evresi sıtma aşısı modeli geliştirilmiştir. Eşit miktarda *Pbnt1(-)* ve *Pynt1(-)* parazitleri karıştırılarak taze ya da dondurulmuş formda oluşturulan aşılardan tek doz subkutan yolla farklı fare gruplarına injekte edilmiştir. Ardından aşının etkinliği yabancı tür *P. berghei* ANKA ve *P. yoelii* 17-XNL ile intravenöz olarak injekte edilerek incelenmiş ve steril koruma gözlemlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, genetik yöntemlerle zayıflatılmış iki farklı parazit türünün tek doz deri altı subpatent injeksiyonunun insanlarda da iki farklı türdeki sıtma enfeksiyonuna karşı koruyucu olabileceğini düşündürmektedir. NT1 geni silinmiş parazitler pürin içeren kültürlerde üretilebilir ve endemik bölgelere dondurulmuş dozlar olarak sıvı nitrojen içinde gönderilebilir.

Bu tezde ayrıca nükleosit transport 4 geninin plazmodium yaşam döngüsündeki rolü potansiyel sıtma aşısı hedefi olarak incelenmiştir. NT4 nakavt *P. berghei* parazitleri üretilmiş, bu parazitlerin kan evresindeki gelişiminde belirli bir farklılık görülmemiştir. Ancak, sporozoitlerin ookistlerden çıkışı ve tükrük bezini istilasında bir kısıtlanma gözlemlenmiştir. Ayrıca, tükrük bezi ve hemolenften toplanan *Pbnt4(-)* sporozoitlerinin enfeksiyona sebep olmadığı belirlenmiştir. Sonuç olarak gelecekteki NT4 geni sıtma transmisyon blokaj çalışmaları için umut vaadedicidir.

Anahtar Kelimeler: Sıtma, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii*, CRISPR-Cas9, kan evresi aşısı, Nucleosit Transport 1, Nucleosit Transport 4