

BİYOTEKNOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

2023

1. N***** S****
Ç**** Generation Of Plasmid-Based Eukaryotic Model To Investigate Biology Of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Nucleoprotein And Glycoproteins
2. M*****
A***** Mekanik Dayanımları İyileştirilmiş Polimerik Hidrojel Sistemleri
3. E*** K***** Affinite Ajanlarının Aspergillus Oryzae'de Üretim Platformunun Oluşturulması
4. H**** K**** Nanoparçacık Yüklü Hidrojeller
5. Ü*** Y*****
K**** Cytolysins Expressing Liver Stage Parasites As Novel Live Attenuated Malaria Vaccines

KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ VİRÜSÜ NÜKLEOPROTEİNİN VE GLİKOPROTEİNLERİNİN BİYOLOJİSİNİN ÇALIŞILMASINDA PLAZMİT TEMELLİ ÖKARYOTİK MODEL OLUŞTURULMASI

ÖZET

Milyonlarca insanın ölümüne sebep olarak insanlık tarihine yön veren pek çok farklı pandemiye RNA virüsleri sebep olmuştur. İnfluenza A virüsü, çocuk felci virüsü, rotavirüsler, dang virüsü, hepatit C virüsü, Batı Nil humması virüsü, sarı humma virüsü ve kızamık virüsü gibi ciddi insan patojenlerinin çoğu RNA virüsleridir. Küreselleşmeyle birlikte insanların birbirleriyle ve doğadaki diğer canlılarla etkileşimi günden güne artmaktadır. Bu durum, RNA virüslerinin binlerce yıldır dolaşımında kalmalarını sağlayan hızlı uyum yetenekleri sebebiyle yeni konakçılar bulmasını kolaylaştırabilmekte ve yeni pandemilerin önünü açabilecek virüs varyantlarının ortaya çıkmasını tetikleyebilmektedir. Son COVID-19 salgınında da görüldüğü gibi, RNA virüsleri zamanla daha da endişe verici bir halk sağlığı sorunu haline gelmektedir. RNA virüslerinin bağışıklık sisteminden kaçma konusundaki mahir yetenekleri bazı durumlarda etkin antiviral ilaçların geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Aşı ve antivirallerin üretimi için de öncelikle virüs yaşam döngüsünün aydınlatılması gerekmektedir. Bu amaca hizmet eden sağlam yöntemlerin oluşturulması, hastalığın altında yatan moleküler mekanizmaların araştırılmasında kritik bir role sahiptir.

Genel terminolojide, ileri genetik, bir fenotipin genetik temelini araştırılmasını ifade ederken, ters genetik, genetik değişikliklerin fenotip üzerindeki etkisinin incelenmesini ifade eder ki, viroloji bağlamında ters genetik, bir virüsün tamamen cDNA'dan üretilmesi anlamına gelir. Ters genetik sistemleri yüksek patojeniteye sahip virüslerin yaşam döngüleri, bağışıklık yanıtlarından kaçış yolları, virüs-konakçı etkileşimleri, aşı geliştirilme veya vektör olarak kullanılabilir olacak özelleştirilmiş virüslerin üretimi gibi çalışmaların BSL-2 koşullarında yapılabilmesine imkan tanıyan etkili ve kullanışlı araçlardır. Bu sistemler, virüslere ait yaşam döngüsünün moleküler temelini tüm yönleriyle belirlenebileceği mutasyon analizlerine imkan tanımaktadır. Pek çok yüksek derecede patojenik RNA virüsünün biyolojisi hakkında muazzam miktarda bilgi, özellikle minigenomların da dahil olduğu VLP sistemlerini içeren araştırmalardan elde edilmiştir. Viral genomların replikasyonu ve transkripsiyonu minigenom sistemleri kullanılarak modellenirken, hedef hücrelerin morfogenezi, tomurcuklanması ve enfeksiyonu, transkripsiyon ve replikasyon açısından yetkin virüs benzeri partiküller kullanılarak simüle edilmektedir. Virüs yaşam döngüsü ve hastalığın patofizyolojisi konusundaki bilinmeyen mekanizmaları aydınlatmak üzere yapılan virüs benzeri parçacık çalışmaları (VLPs), insan hayatını etkileyen bu virüslere karşı etkili antiviral stratejilerin geliştirilmesinde hayati öneme sahiptir. Virüs benzeri parçacıkların, enfeksiyona sebep olabilecek genomik materyalden yoksun olması, dünyadaki birçok araştırmacının kolayca erişebileceği BSL-2 laboratuvarlarında bu tarz virüslerle yapılacak çalışmaları kolaylaştırmaktadır.

Geçtiğimiz yıllarda, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), salgın potansiyelleri ve karşı önlemlerin olmaması veya yetersiz olması nedeniyle en fazla halk sağlığı riski taşıyan ve öncelikli olarak araştırılması gereken enfeksiyon ajanları hakkında bir liste yayınlamıştır. Ülkemiz için de klinik öneme sahip Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) ve COVID-19 hastalıkları bu listede ilk iki sırayı paylaşmaktadır. Buradan hareketle, bu tezde hem KKKA'nın etiyolojik ajanı olan Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü (KKKAV)'nin biyolojisinin ve immunolojisinin çalışılabilirdiği, hem de COVID-19 pandemisinin müsebbibi Şiddetli Akut Solunum Sendromu Coronavirüs 2 (SARS-CoV-2)'ye yönelik aşı adayları geliştirme çalışmalarına temel oluşturacak farklı VLP sistemlerinin geliştirilmesi adına çeşitli viral protein ekspresyon çalışmaları yapılmıştır.

Kırım- Kongo Kanamalı Ateşi, KKKAV'nin neden olduğu kene kaynaklı viral hemorajik bir hastalıktır. KKKA, insanlarda, sağlık sisteminin kalitesine göre %5 ila %80 arasında değişen ölüm oranlarına sahip sporadik salgınlara neden olmaktadır. Şimdiye kadar Afrika, Asya ve Avrasya'yı kapsayan geniş bir coğrafi alanda 30'dan fazla ülkede virüs izolasyonu ve/veya hastalık bildirilmiştir. Virüsün *Hyalomma* keneleri aracılığıyla artan bulaş nedeniyle üç milyar insan hastalığa yakalanma riski altındadır. Bununla birlikte, dünyada en fazla vaka Türkiye'den bildirilmektedir. 2002 ile 2018 yılları arasında 11.041 vaka bildirildiğinden, KKKA Türkiye'de halk sağlığını tehdit eden ve büyüyen bir endişe haline geldi. Enzootik alanda bulunan enfekte keneler ile temas insanlarda KKKA'ya neden olmaktadır. İnsanlar dışındaki omurgalı konakçılar, enfeksiyondan sonra yalnızca asemptomatik geçici viremiden muzdariptir. Vücut sıvıları veya kontamine tıbbi ekipman ile doğrudan temas, nozokomiyal enfeksiyonların ana nedenleridir ve kesim sırasında viremik bir hayvanın dokuları veya sıvıları ile temas, insana bulaşmanın başka bir yoludur. İnsanlarda KKKA çok farklı klinik tablo ile seyredebilir. Hafif seyreden bir hastalıktan, şiddetli ve ölümcül seviyelere ulaşan bir hastalığa dönüşebilir. Şu anda KKKA için onaylanmış bir aşı veya ilaç bulunmadığından, tedavinin birincil odak noktası hastalara destekleyici bakım sağlamaktır.

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü negatif tek sarmallı zarflı bir RNA virüsüdür. Viral genom, sırasıyla RNA'ya bağımlı viral RNA polimeraz, glikoproteinler ve nükleoproteinler gibi yapısal proteinleri kodlayan L, M ve S segmentleri olarak adlandırılan üç tek sarmallı negatif RNA moleküllerinden oluşur. Her segmentte tek bir açık okuma çerçevesi (ORF) ve yüksek düzeyde korunmuş ve birbirine komplementer kodlayıcı olmayan terminal tamamlayıcı diziler bulunmaktadır. Her iki uç arasındaki kovalent olmayan etkileşim, viral polimerazın bağlanması için fonksiyonel bir promotör bölge olma görevini üstlenmektedir. CCHFV M segmentinden iki viral glikoprotein, Gn ve Gc üretilmektedir ve konak hücreye bağlanma ve internalizasyondan sorumludur. S segmentten üretilen nükleoproteinler (Np), viral genomun kapsüllenmesi ve RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) ile birlikte bir ribonükleoprotein kompleksinin oluşturulması, ardından konakçı hücrede viral replikasyonun ve transkripsiyonun başlatılması için çok önemlidir.

Bulaş riskinin yüksek olması ve BSL-4 tesislerinin gerekliliği canlı virüs ile yapılan çalışmaları kısıtlamaktadır. Bu nedenle, virüs biyolojisi hakkında, özellikle tekil proteinler tarafından sağlanan her bilgi, literatüre değerli katkılar sağlayacaktır. Bu amaçla ilk olarak, KKKAV viral proteinleri Huh-7 hücrelerinde pcDNA 3.1 plazmidi aracılığıyla üretilmiş ve hem post-transkripsiyonel hem de post-translasyonel analizlerle viral proteinlerin ekspresyonları gösterilmiştir. ELISA ile yapılan immünolojik analizlerde, çeşitli viral protein kombinasyonlarının, farklı KKKAV

VLP'lerin üretimini destekleyebileceğine dair bazı veriler elde edilmiştir. Ayrıca, benzersiz bir ambisense minigenom sistemi geliştirilmiştir. Bu sistemin ileride yapılacak VLP çalışmalarına dahil edilmesi, KKKAV Kelkit 06 suşu için transkripsiyonel ve giriş yetkin bir VLP üretilmesinin yolunu açabileceği düşünülmektedir.

İkinci olarak, bu tezde, insanlık tarihinde dönüm noktası sayılabilecek ölçüde yıkıcı sonuçlarına mağruz kaldığımız COVID-19 pandemisinin müsebbibi SARS-CoV-2'ye yönelik çalışmalar yapılmıştır. 2019' un sonunda, Çin'in Wuhan şehrinde, kaynağı bilinmeyen bir dizi oldukça bulaşıcı şiddetli pnömoni vakası ortaya çıkmıştır. Moleküler biyolojideki modern gelişmeler sayesinde, bu durumun altında yatan viral ajan, ilk vakadan sonraki bir ay içinde tanımlandı ve SARS-CoV ile %79,6 sekans benzerliği nedeniyle SARS-CoV-2 olarak adlandırıldı. Yüksek bulaşma hızı nedeniyle birkaç ay içinde "koronavirüs hastalığı 2019" (COVID-19) olarak bilinen ve insan sağlığı ve kamu güvenliği için ciddi bir küresel tehdit oluşturan bir pandemiye dönüşmüştür. Ocak 2023 itibariyle 215 ülke ve bölgede 661 milyonu aşan vaka ve 6,69 milyondan fazla ölüm belgelenmiştir. İnsanlar arasında viral bulaşmanın, enfekte hastaların öksürmelerinden, hapşirmalarından veya konuşmalarından salınan solunum partikülleri yoluyla doğrudan meydana geldiği bilinmektedir. Bu yüzden, dünyanın birçok ülkesinde, çeşitli aralıklarla evde kalma emirleri, sokağa çıkma yasakları, karantinalar, güvenlik kordonları ve benzeri toplumsal kısıtlamalar gibi ilaç dışı müdahaleler uygulanmak zorunda kalınmıştır. Bu süreçte ek olarak, sporadik mutasyonlar ve rekombinasyonlar sebebiyle, virüsün daha geniş bir alana yayılmasına veya nötralize edici antikorlardan kaçabilmesine imkan tanıyan yeni varyantlar da ortaya çıkmıştır.

COVID-19'un etiyolojik ajanı SARS-CoV-2, zarflı, pozitif tek sarmallı bir RNA virüsüdür. Virionda S, M, N ve E olarak adlandırılan yapısal proteinleri bulunmaktadır. E proteini iyon kanalı aktivitesine sahiptir ve olgun virüs partikülünün oluşumunda önemli olduğu düşünülmektedir. Nükleoprotein (N), pozitif anlamda viral RNA'ya yüksek afinite ile bağlanır ve onu konakçı nükleazlardan korur. M proteini virionda bol miktarda bulunur ve nükleokapside bağlanarak viral genomun paketlenmesine yardımcı olur. S proteini, virüsün hücre yüzeyindeki anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) reseptörlerine bağlanmasına ve ardından endozomlara alınmasına aracılık eder.

SARS-CoV-2 ile enfekte olan çoğu insan, virüs replikasyonunun esas olarak üst solunum yollarıyla sınırlı olduğu hafif ila orta şiddette bir hastalık geliştirse de, bazılarında hayatı tehdit eden bir pnömoniye dönüşmektedir ve yüzde %1 oranında fatalite görülmektedir. COVID-19' a yakalan kişilerin yaklaşık %3-20'sinde hastalık ağır seyretmektedir ve bunların yaklaşık %10-30'u için yoğun bakıma ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durum sağlık sistemleri üzerinde büyük bir baskı oluşturmuştur. Şu anda, COVID-19' a karşı spesifik bir tedavinin henüz geliştirilmemesi COVID-19'un patogenezeine ilişkin sınırlı anlayışımızı vurgulamaktadır.

COVID-19'a karşı aşı geliştirme çalışmaları, viral genom dizilimi yapılı yapılmaz eşli görülmemiş bir hızla başlatıldı. Spike proteinin virüs giriş mekanizmasındaki önemli rolü nedeniyle, tüm protein veya reseptör bağlanma alanı (RBD) gibi kritik parçalar aşı tasarımında ana hedef antijen olarak kullanılmıştır. Bu kapsamda, yalnızca Spike veya tüm yapısal proteinleri içeren VLP'lerle yapılan mevcut klinik çalışmaların aksine, bu çalışmada, viral proteinlerin değişik kombinasyonları ile farklı VLP'lerin üretimine odaklanılmıştır. SARS-CoV-2 proteinleriyle bir VLP yapısı oluşturmak için minimum protein içeriğinin M ve E proteinleri olduğu öngörüsü ve S ve N

proteinlerinin antijenik özellikleri nedeniyle SEM, SEN, SENM ve ENM olarak adlandırılan dört farklı SARS-CoV-2 VLP plazmidi tasarlanmıştır. amacıyla çeşitli kombinasyonlarda çoklu ekspresyon kasetleri taşıyan dört farklı plazmit oluşturulmuştur. Bu plazmitler, farklı viral ifade kasetleri kombinasyonlarının sıralı olarak klonlanmasıyla inşa edilmiştir. Viral genlerin maya genomuna entegrasyonu sonrası *P. pastoris* GS115 suşu ile yapılan ekspresyon çalışmalarında, viral proteinler çeşitli antikolar kullanılarak tespit edilmiştir. Bu çalışmalar VLP sistemlerinin transkripsiyonel biyoteknolojide kullanımına dair örnek bir çalışmayı temsil etmektedir ve aşı adaylarının immünojenitesini ve güvenliğini inceleyen ileri klinik çalışmalara veri sağlayabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu tezde yapılan deneyler, zamanımızın en ciddi insan viral patojenlerinden ikisi olan CCHFV ve SARS CoV-2'nin immünojenik açıdan önemli viral antijenik proteinlerinin ökaryotik hücrelerde ekspresyonunu ve saptanmasını göstermiştir. Bu çalışmalar laboratuvarımızda ilerideki çalışmalar için gerekli olacak kritik bir altyapı oluşturmuştur. Plazmid bazlı ekspresyon sistemlerinden yeterli miktarlarda ve ticari olarak anlamlı VLP'lerin üretilmesi ve gösterilmesi için daha fazla optimizasyona ihtiyaç duyulmaktadır. Bu virüslerin biyolojisi ve immünojenitesi ile ilgili soruları VLP ve minigenom yaklaşımları ile ele almak için, farklı ifade modelleri ile ayrıntılı denemeler, dizilerin optimizasyonu, alternatif transkripsiyon sistemleri ve kararlı ifadeler gibi bu optimizasyonların yapılması gerektiğinin altı çizilmelidir.

Anahtar Kelimeler: RNA virüsleri, RNA virüsü enfeksiyonları, Arbovirüsler, Corona virüsü enfeksiyonları, COVID-19 aşılı

MEKANİK DAYANIMLARI İYİLEŞTİRİLMİŞ POLİMERİK HİDROJEL SİSTEMLERİ

ÖZET

Yumuşak malzemelerin kullanıldığı pek çok alanda jellerin iyi mekanik özelliklere sahip olmaları kritik önem taşımaktadır. Doğal ya da sentetik polimerlerden elde edilen jeller birtakım avantajlara sahip olsalar da fizyolojik sıvılarda çok fazla şişerek genellikle çok kırılğan bir yapıya dönüşmektedirler. Bu tezin amacı, mekanik özellikleri kontrol edilebilir ve geliştirilebilir hidrojel elde edilebilmesi için, ağ yapıda moleküler seviyede bir enerji dağılım mekanizması oluşturmaktır. Bu amaç doğrultusunda hazırlanan bu tez iki bölüm şeklinde tasarlanmış olup ilk kısımda doğal bir polimer olan nişasta, ikinci kısımda ise sentetik Pluronik F127 (PF127) zincirleri kullanılarak hidrojeller hazırlanmış ve literatürde mevcut nişasta ve PF127 esaslı jellerin mekanik dayanımları arttırılmıştır.

Tezin ilk bölümünde, sırasıyla lineer ve dallanmış şekilde bağlanan aynı tekrar birimlerine sahip iki homopolimer olan amiloz ve amilopektin zincirlerinden oluşan nişasta kullanılmıştır. Nişasta, yapısında bulunan hidroksil gruplarının varlığından dolayı, hidrojellerin oluşumunu içeren çeşitli uygulamalarda işlevselliğin değiştirilmesi ve geliştirilmesi amacıyla kolaylıkla modifiye edilebilir. Doğrudan çapraz bağlama durumunda, nişasta zincirlerindeki hidroksil gruplarının bir kısmı, iki veya çok işlevli bileşiklerle reaksiyona girmeye duyarlıdır. Nişastayı çapraz bağlamak amacıyla polisakkarit kimyasında en yaygın kullanılan çapraz bağlayıcı olan epiklorohidrin (ECH) kullanılmıştır. ECH üzerindeki epoksi ve halojenür grubu, nişasta yapısındaki hidroksit grubu ile reaksiyona girerek iki polimer zincirini çapraz bağlamaktadır. Bu tezde yüksek amiloz içeriğine sahip nişasta (Hylon VII) - ECH hidrojellerinin viskoelastik özellikleri araştırılmıştır. Reaksiyon bileşenlerinin konsantrasyonuna, nişastanın amiloz oranına ve yapıya başka bir polisakkarit olan Hyaluronik asit (HA) katılımına bağlı olarak jel özelliklerinin değişimi incelenmiştir. Elde edilen malzemeler şişme, viskoelastik ve morfolojik özellikleri açısından değerlendirilmiştir. Elastik ve viskoz modüller, nişasta ve ECH konsantrasyonlarına bağlı olarak artarken, NaOH'ın mol oranının, çapraz bağlama reaksiyonlarında anahtar bir parametre olduğu bulunmuştur. Devamlı basamak-deformasyon testi sırasında düşük amiloz oranı içeren ağ yapının, sol-jel geçişleri sonrası başlangıç mekanik dayanımının yaklaşık %92 ± 4'ünü kaybettiği görülmüştür. Amiloz oranı arttırıldığında ise ağ yapı sol-jel geçişlerinden sonra tamamen orijinal hallerine dönmüştür. Yüksek amiloz oranlı jeller için zamana bağlı relaksasyon testleri gerçekleştirilmiş ve yapısal dinamiklerin, HA'nın daha küçük ve daha kararlı gözenek yapılarıyla birleştirilmesiyle bir miktar bastırıldığı gözlemlenmiştir.

Tezin ikinci kısmında, "Poloksamerler" olarak da bilinen ve FDA tarafından insan kullanımı için onaylanan Pluronikler kullanılmıştır. Bu moleküller hidrofilik polietilen oksit (PEO) ve hidrofobik polipropilen oksit (PPO) zincirlerinin PEO-PPO-PEO üçlü blok şeklinde birleştiği yapılardır. Pluroniklerin en önemli özelliği, konsantrasyona bağlı farklı geçiş sıcaklıklarında ısıya duyarlı misel oluşturmalarıdır. Yüksek konsantrasyonlarda, sol-jel geçişi oda sıcaklığının altında gerçekleşir. Bu nedenle, polimer oda sıcaklığında su içinde çözüldüğünde, PPO'nun hidrofobik doğası nedeniyle miseller kendiliğinden birleşir. Pluronik çözeltileri düşük sıcaklıklarda sıvı halde iken, belirli sıcaklık değerlerinin üzerine çıktıklarında jel formuna geçmekte ve soğutulduğunda tekrar sıvı hale gelmektedir. Pluronik ailesi içerisinde, medikal ve farmasötik uygulamalarda en çok tercih edilen üye, yüksek suda çözünürlüğü ve nispeten uzun hidrofobik birimleri sayesinde yüksek hidrofobik etkileşimlere sahip Pluronik® F127 (PF127)'dir. Pluronik kopolimerler, belli bir sıcaklıkta çok hızlı bir şekilde sıvı halden jel formuna geçseler de oluşan hidrojellerin mekanik dayanımlarının yetersiz olması nedeniyle fizyolojik koşullarda uzun süre dayanamazlar. Bu durum Pluronik temelli sistemlerin en önemli dezavantajlarından biridir.

Hem mekanik olarak güçlü hem de enjekte edilebilir jeller elde etmek için sıcaklığa duyarlı PF127 miselleri, ışığa duyarlı kumarin ve azobenzen gruplarını tekrar eden birimler olarak taşıyan amfifilik kopolimerlerle birleştirilmiştir. Böylece sıcaklığa duyarlı PF127 esaslı akıllı jellerin mekanik dayanımlarının iyileştirilmesinin yanı sıra ışık duyarlılığına sahip enjekte edilebilir yapıların elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla toplamda dört monomer sentezlenmiş ve tersinir katılma-ayrılma zincir transfer (RAFT) polimerizasyonu yoluyla polimerize edilmiştir. Sentezlenmiş olan polietilen glikol (PEG) bazlı makroRAFT ajanı kullanılarak amfifilik diblok terpolimerler elde edilmiştir. Kopolimerlerin yapıları, karakterize edilmiş ve amfifilik diblok terpolimerler, suda miseller halinde bir araya getirilmişlerdir. UV ışık altında kromofor grupların varlığına bağlı misel çekirdeklerinin çapraz bağlanması UV spektroskopisi ile incelenmiştir. Jellerin reolojik özellikleri sıcaklık, bileşim, UV maruz kalma süresi, gerinim ve frekansın bir fonksiyonu olarak değerlendirilmiş enjekte edilebilirlikleri analiz edilmiştir. Hazırlanan formülasyonların hem ısıya hem de ışığa cevap verdiği, PF127 yapılarına kıyasla mekanik özelliklerinin iyileştiği ve enjekte edilebilir olduğu ortaya konmuştur. Son aşamada ise sisteme fonksiyonlandırılmış kitosan (f-kitosan) dahil edilmesiyle gözenekler arttırılarak ilaç taşıma uygulamalarında kullanılmaya yönelik ilk adımlar atılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nişasta, hidrojel, epiklorohidrin, hyaluronik asit, Pluronik, akıllı jel, enjekte edilebilir jel, amfifilik kopolimer, kumarin, reoloji.

MECHANICALLY ENHANCED POLYMERIC HYDROGEL SYSTEMS

SUMMARY

In many areas where soft materials are used, it is critical that hydrogels have good mechanical properties. Although gels obtained from natural or synthetic polymers have some advantages, they swell too much in the liquid under physiological conditions and generally turn into a very fragile structure. The aim of this thesis is to provide viscoelasticity in the entire gel by creating a mechanism that provides energy distribution in the network structure at the molecular level to obtain a hydrogel with controllable mechanical properties. This thesis is designed in two parts, in the first part, hydrogels were prepared using a natural polymer starch and in the second part, synthetic Pluronic F127 (PF127) chains were prepared, and various experiments were carried out to mechanically improve the starch and PF127-based gels available in the literature.

In the first part of the thesis, starch consisting of amylose and amylopectin, two homopolymers with the same repeating units connected in linear and branched manner, respectively, was used. The starch's abundant hydroxyl groups can be easily modified to modify and improve its functionality, including the formation of hydrogels to obtain products for a variety of applications. In the case of direct cross-linking, some of the hydroxyl groups in the starch chains are susceptible to reacting with di- or polyfunctional compounds. The use of epichlorohydrin to cross-link starch is most common in polysaccharide chemistry. The epoxy and halide groups on the ECH react with the hydroxide group in the starch structure and cross-link the two polymer chains. In this thesis, viscoelastic properties of high amylose starch (Hylon VII) - epichlorohydrin (ECH) hydrogels were investigated. The effect of the concentration amounts of the reaction components, the amylose ratio and the incorporation of hyaluronic acid, a naturally occurring linear polysaccharide, on the properties of the cross-networks were investigated. The obtained materials were examined in terms of swelling, viscoelastic and also morphological properties. The mole ratio of NaOH was found to be a key parameter in crosslinking reactions, while the elastic and viscous modules increased depending on starch and ECH concentrations. During the continuous step-deformation test, the low amylose cross mesh lost approximately $92 \pm 4\%$ of its initial mechanical strength, and the HA and non-HA high amylose gels completely returned to their original state after sol-gel transitions. Time-dependent relaxation tests were performed for high amylose gels, and it was observed that the structural dynamics were somewhat suppressed by combining HA with smaller and more stable pore structures.

In the second part of the thesis, Pluronic, also known as "poloxamers" and approved for human use by the FDA, were used. These molecules are structures where

hydrophilic polyethylene oxide (PEO) and hydrophobic polypropylene oxide (PPO) chains combine in the form of PEO-PPO-PEO triblock. The most important feature of the Pluronics is their temperature-based micelles formation thanks to the heat-sensitive PPO units with a concentration-dependent transition temperature. At high concentrations, sol-gel transition occurs below room temperature. Therefore, when the polymer is dissolved in water at room temperature, the micelles self-assemble due to the hydrophobic nature of PPO. While Pluronic solutions are in liquid form at low temperatures, they turn into gel form when they rise above certain temperature values and become liquid again when cooled. Within the Pluronic family, the most preferred member in medical and pharmaceutical applications is Pluronic® F127 due to its high-water solubility and high hydrophobic interactions thanks to its relatively long hydrophobic units. Although Pluronic copolymers change from liquid state to gel form very quickly at a certain temperature, they cannot last for a long time in physiological conditions due to insufficient mechanical strength of the hydrogels formed. This is one of the most important disadvantages of Pluronic-based systems.

To obtain gels that are both mechanically strong and injectable, temperature sensitive Pluronic F127 micelles were combined with amphiphilic copolymers bearing photosensitive coumarin and azobenzene groups as repeating units. Thus, besides increasing the mechanical strength of temperature sensitive PF127 based smart gels, it is aimed to obtain injectable structures with light sensitivity. For this purpose, a total of four monomers were synthesized and polymerized by reversible addition-dissociation chain transfer (RAFT) polymerization. Amphiphilic diblock terpolymers were obtained by using macroRAFT material based on pre-synthesized polyethylene glycol (PEG). The structures of the copolymers were characterized and the amphiphilic diblock terpolymers were combined in water as micelles. Cross-linking of chromophore groups and micelle nuclei under UV light was investigated by UV spectroscopy. The rheological properties of the gels were evaluated as a function of temperature, composition, UV exposure time, strain and frequency, and their injectability was analyzed. It has been revealed that the prepared formulations respond to both heat and light, their mechanical properties are improved compared to PF127 structures, and they are injectable. At the last stage, the first steps were taken to be used in drug delivery applications by increasing the pores by adding f-chitosan to the system.

Keywords: Starch, hydrogel, epichlorohydrin, hyaluronic acid, Pluronic, smart gel, injectable gel, amphiphilic copolymer, coumarin, rheology.

NANOPARÇACIK YÜKLÜ HİDROJELLER

ÖZET

Dokuların veya organların polimer bazlı bir malzeme ile desteklenmesinde veya değiştirilmesinde biyofonksiyonellik ve biyouyumluluk önemlidir. Yüksek su içeriğine sahip, çapraz bağlı hidrofilik polimer zincirlerinden oluşan hidrojeller, son yıllarda klasik malzemelerden, uyaranlara duyarlı akıllı malzemelere dönüşmüşlerdir.

Akıllı jeller tasarlamak üzere yola çıkılan bu tezin ilk kısmında stearil metakrilat (SM) ve vinilpirolidon (VP) bazlı, kendini iyileştiren ve şekil hafıza özelliklerine sahip biyouyumlu SM- x ağları hazırlandı. Çeşitli potansiyel biyoygulamalardaki gereksinimleri karşılayan jeller elde etmek için mol oranları kademeli olarak hidrofilikten hidrofobik birimlere %10 ila %90 arasında değiştirildi. Elde edilen jellerin zamana bağlı bir viskoelastik karaktere sahip olmalarının yanı sıra, jellerin mekanik özellikleri, reaksiyon ortamına verilen SM miktarı ile kontrol edildi. Düşük SM içerikli jeller başlangıç modül değerlerine tam olarak geri dönemezken, \geq %60 konsantrasyonlarda elde edilen jellerin kendini iyileştirme davranışında da etkili olan dinamik hidrofobik etkileşimler nedeniyle tamamen geri dönüşümlü olduğu gözlemlendi. Ayrıca tüm ağlar kalıcı şekillerini saniyeler içinde tamamen geri çağırarak şekil hafıza özelliğine sahip olduğu ortaya konulmuş oldu. Suyla temas açısı ile yakından ilişkili olarak SM- x hidrojelleri üzerine ekilen insan derisi fibroblast hücrelerinin canlılığının, tüm x değerlerinde %82'nin üzerinde olduğu bulundu. Bulgular neticesinde, SM- x jel numunelerinin geniş özellik yelpazesi, çeşitli biyomedikal uygulamalardaki ihtiyaçları karşılamak üzere önemli bir potansiyele sahip olduğu ortaya kondu.

Tezin ikinci kısmında ise farklı geometrilerde ve yapılarıdaki metalik nanoparçacıkların özellikleri optimize edilen SM- x hidrojel ağlarına dahil edilmesiyle nanokompozit hidrojeller geliştirildi. Bu durum tamamen farklı iki malzeme türünün yenilikçi bir kombinasyonu ve yapısal bir çeşitliliğidir. Nanoparçacıkların daha az aglomare olması, mekanik güç ve uyaranlar karşısında sinerjistik özellik göstermesi sayesinde ileri fonksiyonel gelişmiş malzemeler oluşturuldu. Sıcaklığa duyarlı SM-VP hidrojellerinin ağ yapılarına akıllı malzeme özelliklerinin artırılması için altın nanoküre (AuNS) ve gümüş nanoküp (AgNC) parçacıkları farklı oranlarda dahil edildi. Elde edilen nanokompozitler jellerin (Nc) nanoparçacıklar varlığında fototermal etkiye etkiye sahiptirler. Bu özellik Nc'ler hem ışığa hem de ısıya duyarlı jeller haline getirildi. Sentezlenen Nc jeller uygulanacak alana özgü testlerle farklı özellikler sergiledi. Örneğin, ışık kaynağı altında kendini iyileştirme özelliği AgNc-0.08 jellerinde en iyi sonucu verirken, şekil hafıza özelliği açısından AgNc-0.02 jellerinde sonuç belirgin bir farklılık gösterdi. Matriks içindeki nanoparçacıklar sayesinde SM- x versiyonuna kıyasla sıcaklık altında AgNc-0.08 jelleri kendini

iyileştirme özelliği gösterirken, AgNc-0.02 jelleri ise Şekil hafıza özellikleri açısından belirgin bir farklılık gösterdi. Nc- x hidrojelleri üzerine ekilen insan derisi fibroblast hücrelerinin canlılığı, tüm x değerlerinde %80'in üzerinde olduğu bulundu. Bu tez kapsamında nanoparacak yüklü hidrojellerin, uyarılar karşısında değişimler göstererek teknolojide yumuşak robotiklerden 4D sistemlere, biyomalzemelerden tıbbaya kadar çeşitli alanlarda uygulamalar için potansiyel adaylar olabileceği gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Akıllı malzemeler, kendini iyileştirme, Şekil hafıza, stearil metakrilat, vinil pirolidon, altın nanoküre, gümüş nanoküp, fototermal etki, nanokompozit.

NANOPARTICLE LOADED HYDROGELS

SUMMARY

Biofunctionality and biocompatibility are important when supporting or replacing tissues or organs with a polymer-based material. Hydrogels consisting of cross-linked hydrophilic polymer chains with high water content have transformed from classical materials to smart materials sensitive to stimuli in recent years.

In the first part of this thesis, which set out to design smart gels, biocompatible SM-*x* networks with self-healing and shape memory properties were prepared based on stearyl methacrylate (SM) and vinylpyrrolidone (VP). The mole ratios were gradually changed from hydrophilic to hydrophobic units from 10% to 90% to obtain gels meeting the requirements in various potential bioapplications. Besides having a time-dependent viscoelastic character of the obtained gels, the mechanical properties of the gels were controlled by the amount of SM introduced into the reaction medium. While the gels with low SM content could not fully return to the initial modulus values, it was observed that the gels obtained at $\geq 60\%$ concentrations were completely reversible due to dynamic hydrophobic interactions, which also had an effect on the self-healing behavior. In addition, it was revealed that all networks have shape memory feature by fully recalling their permanent shapes in seconds. Closely related to the angle of contact with water, the viability of human skin fibroblast cells seeded on SM-*x* hydrogels was found to be over 82% at all *x* values. As a result of the findings, the wide range of properties of SM-*x* gel samples revealed that it has significant potential to meet the needs in various biomedical applications.

In the second part of the thesis, nanocomposite hydrogels were developed by incorporating metallic nanoparticles of different geometries and structures into SM-*x* hydrogel networks whose properties were optimized. This is an innovative combination and structural variation of two completely different material types. Advanced functional materials have been created thanks to the fact that nanoparticles are less agglomerated and show synergistic properties against mechanical power and stimuli. Gold nanospheres (AuNS) and silver nanocubes (AgNC) particles were included in different proportions to increase smart material properties in the network structures of temperature-sensitive SM-VP hydrogels. The obtained nanocomposites have a photothermal effect in the presence of gels (Nc) nanoparticles. This property made Ncs into both light- and heat-sensitive gels. The synthesized Nc gels exhibited different properties with the tests specific to the area to be applied. For example, the self-healing property under light source gave the best results in AgNc-0.08 gels, while the result showed a significant difference in AgNc-0.02 gels in terms of shape memory

property. Thanks to the nanoparticles in the matrix, AgNc-0.08 gels showed a self-healing feature under temperature compared to the SM- x version, while AgNc-0.02 gels showed a significant difference in shape memory properties. The viability of human skin fibroblast cells seeded on Nc- x hydrogels was found to be over 80% at all x values. Within the scope of this thesis, it has been shown that nanoparticle-loaded hydrogels can be potential candidates for applications in various fields, from soft robotics to 4D systems, from biomaterials to medicine, by showing changes in response to stimuli.

Keywords: Smart materials, self-healing, shape memory, stearyl methacrylate, vinyl pyrrolidone, gold nanosphere, silver nanocube, photothermal effect, nanocomposite.

CYTOLYSINS EXPRESSING LIVER STAGE PARASITES AS NOVEL LIVE ATTENUATED MALARIA VACCINES

SUMMARY

Malaria is amongst the deadliest of infectious diseases globally. It is a vector-borne disease transmitted by the bite of female *Anopheles* mosquitos. Causative agents are *Plasmodium* species protozoan parasites. There are 5 species that are known to cause disease in humans. Over 3 billion people are at risk of malaria transmission. Prevention methods such as vector control and seasonal mass drug administration are effective tools for malaria control but with increasing resistance to frontline drugs, efficient vaccine development becomes imperative for malaria elimination. Ideal malaria vaccine should protect against the most common *Plasmodium* species and should have more than 75% efficacy, and a long-lasting protection. Only available vaccine so far is RTS,S which underperforms the expectations. Complex biology and various immune evasion strategies of *Plasmodium* parasites makes vaccine development challenging. Pre-erythrocytic stages are the bottleneck of development in vertebrate hosts. Vaccine strategies against this stage are so far the most promising. Live-attenuated whole sporozoite vaccines have been proven to confer sterile protection. Various genetic modification strategies allowed precise attenuation profiles which led to development of genetically attenuated parasites (GAP). In this thesis study, we designed two alternative attenuation strategy to be evaluated as GAP vaccines that aimed for late liver stages arrest in rodent malaria model. Both candidates had similar designs: knockout of an essential liver stages gene, and expression of a bacterial cytolysin protein. Selected genes, LISP1 and LISP2, are only expressed during liver stages. Bacterial cytolysins sequences of Streptolysin O (SLO) from *Streptococcus pyogenes* and Listeriolysin O (LLO) from *Listeria monocytogenes* were replaced with coding sequences of target genes. Resulting strains, Δ LISP1::SLO and Δ LISP2::LLO, were phenotypically analyzed for all life cycle stages of the parasite. To understand the effect of cytolysins, we replaced the cytolysin sequences with fluorescent proteins that would also work as reporter genes for liver stages expression (Δ LISP1::mNeonGreen and Δ LISP2::mTurquoise2). Cytolysin expressions significantly improved attenuation profiles of both strains. BALB/c mice were immunized with both strains and immunized mice were challenged against wild type sporozoites. As a result, Δ LISP1::SLO strain were completely attenuated. Δ LISP1::SLO strain-immunization of mice could protect against lower numbers of sporozoites but could not protect against higher numbers of sporozoites. In contrast, attenuation profile of Δ LISP2::LLO strain were strong, but there were occasional breakthrough infections. Δ LISP2::LLO strain-immunization of mice conferred sterile protection against extremely high numbers of sporozoites. Attenuation profile of Δ LISP2::LLO can be improved with various modifications, and this strategy can easily be applied to human malaria as a promising vaccine candidate in future studies.

Keywords: genetic attenuation, *Plasmodium*, pre-erythrocytic stages, vaccine

SİTOLİZİN EKSPRESYONU YAPAN KARACİĞER AŞAMASI PARAZİTLERİNİN YENİLİKÇİ CANLI ZAYIFLATILMIŞ SITMA AŞISI OLARAK KULLANILMASI

ÖZET

Sıtma, küresel olarak, en ölümcül bulaşıcı hastalıklardan biridir. Dişi Anofel sivrisineğinin ısırması ile bulaşan vektör kaynaklı bir hastalıktır. Hastalık etkeni, *Plasmodium* türü protozoan parazitlerdir. İnsanlarda hastalığa neden olduğu bilinen 5 türü vardır. 3 milyardan fazla insan sıtma bulaşma riski altındadır. Vektör kontrolü ve mevsimsel toplu ilaç uygulaması gibi önleme yöntemleri sıtma kontrolü için etkili araçlardır; ancak majör ilaçlara karşı artan ilaç direnci, sıtmanın ortadan kaldırılması için etkili aşı geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. İdeal sıtma aşısı, en yaygın *Plasmodium* türlerine karşı koruma sağlamalı ve %75'ten fazla etkinliğe ve uzun süreli korumaya sahip olmalıdır. Şimdiye kadar mevcut olan tek aşı, beklentilerin altında performans gösteren RTS,S'dir. *Plasmodium* parazitlerinin karmaşık biyolojisi ve sahip olduğu çeşitli immün kaçış mekanizmaları, aşı geliştirmeyi zorlaştıran etkenlerdir. Pre-eritrositik aşamalar, omurgalı konakçılarda gelişimin darboğaz noktasıdır. Şimdiye kadar geliştirilen aşı adayları arasında en umut verici olanlar bu aşamayı hedefleyen stratejilerdir. Canlı zayıflatılmış tam sporozoit aşuların tam koruma sağladığı kanıtlanmıştır. Çeşitli genetik modifikasyon yöntemleri, genetik olarak zayıflatılmış parazitlerin (GAP) gelişmesine yol açan güçlü atenüasyon stratejileri geliştirilebilmesini sağlamaktadır. Bu tez çalışmasında, kemirgen sıtma modelinde, karaciğerin geç evrelerinde gelişimin durdurulmasını amaçlayan GAP aşuları olarak değerlendirilmek üzere iki alternatif atenüasyon stratejisi tasarlandı. Her iki aşı adayının da hayati bir karaciğer aşaması geninin delesyonu ile eş zamanlı olarak bir bakteriyel sitolizin proteininin ekspresyonunu sağlayacak şekilde benzer tasarımları bulunmaktadır. Seçilen hedef genler, LISP1 ve LISP2, ekspresyonları yalnızca karaciğer evrelerinde yapılan genlerdir. Çalışma kapsamında, *Streptococcus pyogenes* Streptolysin O (SLO) ve *Listeria monocytogenes* Listeriolysin O (LLO) bakteriyel sitolizin proteinlerinin kodlayan dizileri, hedef genlerin kodlayan dizileriyle değiştirildi. Ortaya çıkan suşların (Δ LISP1::SLO ve Δ LISP2::LLO) fenotipik analizleri parazitin tüm yaşam döngüsü aşamalarında yapıldı. Ayrıca, sitolizin dizileri floresan protein dizileriyle değiştirilerek hem sitolizinlerin etkisini analiz edebilmek hem de karaciğer evreleri ifadesi için raportör genler olarak kullanılmak amacıyla kontrol suşları elde edildi (Δ LISP1::mNeonGreen ve Δ LISP2::mTurquoise2). Sitolizin ekspresyonları, her iki suşun atenüasyon profillerini önemli ölçüde arttırmıştır. BALB/c fareleri, her iki suşla immünize edildi ve immünize fareler, yabancıl tip sporozoitlere karşı test edildi. Sonuç olarak, Δ LISP1::SLO suşu tamamen atenüe edilmiştir. Farelerin Δ LISP1::SLO suşu ile aşılınması, düşük sayıda sporozoitlere karşı koruma sağlayabilse de yüksek sayıda sporozoitlere karşı koruma sağlayamamıştır. Buna karşılık, Δ LISP2::LLO suşu ise kuvvetli atenüasyon profili göstermiştir, ancak nadiren kan aşaması enfeksiyonlarına yol açabilmektedir. Δ LISP2::LLO suşu ile immünize edilen farelerde son derece yüksek sayıda

sporozoitlere karşı tam koruma sağlanmıştır. *ΔLISP2::LLO* suşunun atenüasyon profilinin, çeşitli modifikasyonlarla iyileştirilebilmesi mümkündür ve bu strateji, gelecekteki çalışmalarda umut verici bir aşı adayı olarak insan sıtma parazitlerine kolaylıkla uygulanabilecektir.

Anahtar Kelimeler: genetik atenüasyon, *Plasmodium*, pre-eritrositik aşamalar, aşı

AFFİNİTE AJANLARININ *ASPERGILLUS ORYZAE*'DE ÜRETİM PLATFORMUNUN OLUŞTURULMASI

ÖZET

Biyoteknolojik uygulama alanlarında affinite ajanı olarak kullanılan monoklonal antikorlar(mAbs)'ın yüksek verimde heterolog olarak ifadelenmeleri; fonksiyonellik için üç boyutlu katlanma ve çözünürlük özelliklerinde karşılaşılan problemler ve/veya maliyetli üretim yöntemlerine ihtiyaç duyulması nedeniyle sınırlanmaktadır. Tek domainli ağır zincir antikorlar(VHH) ise, mAbs'e kıyasla önemli üstünlüklere sahip ve yalnızca tek bir ağır zincirden oluşması sebebiyle daha küçük boyuttaki, eşsiz antikor parçalarıdır. VHH'ler küçük boyutu, düşük immünojenliği ve yüksek çözünürlüğü ile dikkat çekici affinite ajanları olarak, tanı, tedavi ve görüntüleme teknikleri dahil olmak üzere pek çok biyoteknolojik uygulamada mAbs'nin yerlerini almaya başlamıştır.

Aspergillus oryzae (*A. oryzae*), uzun yıllardır fermentasyon teknolojisinde ve biyoteknolojik ürünlerin endüstriyel ölçekte üretiminde tercih edilen ve Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından Genel Olarak Güvenli (GRAS) statüsü verilmiş olan ipliksi fungidir. Taksonomik olarak kendisine en yakın *Aspergillus* türleri ile kıyaslandığında, *A. oryzae* genomunda özellikle hidrolitik enzimleri kodlayan genler bakımından daha fazla gene sahiptir. Bu güçlü salgılama mekanizması *A. oryzae*'i affinite ajanlarının büyük ölçekte ve güvenilir olarak üretimi için ideal bir platform haline getirmektedir.

Bu tez çalışmasında, *pyrG* geni bakımından oksotrof haline getirilen *A. oryzae*'nin konak mikroorganizma olarak kullanıldığı biyoteknolojik bir platformun inşa edilmesi ve inşa edilen bu ifadelenme platformunun affinite ajanlarının üretiminde kullanılabileceğinin kanıtlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla affinite ajanı olarak seçilen ribonükleik asit A (RNaz A)'ya karşı spesifik olan anti-RNaz A VHH proteininin, küçük ölçekte ve fermentör düzeyinde üretilerek saflaştırılmasının gerçekleştirilmesi istenmiştir.

A. oryzae'de, fonksiyonel ve yüksek verimde ürün alabilmek, ayrıca saflaştırma aşamalarında uygulanabilir kullanışlı metodolojilerin izlenebilmesi için, ifadelenmeyi sağlayacak olan gen kasedinin dizaynı ve oluşturulması önem arz etmektedir. Bunun için, *pyrG* oksotrofinin homolog rekombinasyon yoluyla sağlanmasında, *pyrG* genini kodlayan açık okuma dizisinin bitişiğindeki dizileri barındıran ve doğrusal hale getirilmiş delesyon vektörünün, yabani tip *A. oryzae* suşuna aktarılması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında, yabani tip *A. oryzae* RIB40 konak mikroorganizması, *pyrG* geni olmaksızın, *pyrG* geninin açık okuma çerçevesinin yukarı ve aşağı bölgelerinden oluşturulan delesyon vektörü ile transforme edilmiştir.

Böylece homolog rekombinasyon yoluyla *pyrG* geninin yabani tip *A. oryzae* genomundan silinmesi sağlanmıştır. Gen delesyonunun seçici kültür koşullarında, tekrarlı kültürleme ve qPZR analizi yöntemleri ile doğrulaması gerçekleştirilmiştir. Doğrulan *pyrG* oksotrof *A. oryzae* mikroorganizması rekombinant anti-RNaz A VHH proteininin ifadenmesi çalışmalarında kullanılmıştır.

Anti-RNaz A VHH proteinini kodlayıcı dizi, C-terminaline bağlı 8xHis-tag ile amilaz sinyal sekansı kullanılarak, amilaz promotörü altında olacak şekilde, *A. oryzae*'e göre kodon optimize olarak sentezlettirilmiştir. Transformasyon çalışmaları protoplast aracılı transformasyon yöntemi ile sağlandıktan ve rekombinant anti-RNaz A VHH proteinini ifadeleyen koloninin doğrulanması çalışmaları yapıldıktan sonra, küçük ölçekte ifadenme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Küçük ölçekte ifadenmenin başarı ile gerçekleştirilmesini takiben, 6 L'lik fermentörde büyük ölçekte üretim çalışmaları hayata geçirilmiştir.

İfadelenen rekombinant anti-RNaz A VHH proteini, C-terminalindeki 8xHis-tag'den yararlanılarak immobilize metal affinite kromatografisi (IMAC) yöntemiyle saflaştırılmıştır. Buna göre; küçük ölçekte ifadenmeden elde edilen verim 44 mg/L olarak tespit edilirken, fermentörde yapılan ifadenmeden elde edilen verim 1.4 g/L olarak belirlenmiştir. İleri saflaştırma işlemleri jel filtrasyon kromatografisi ile sağlanmış ve ifadelenen rekombinant anti-RNaz A VHH proteininin monomerik özellikte olduğu bu yöntem ile kanıtlanmıştır. Toplam üretilen protein ve ifadelenen rekombinant protein konsantrasyonu dansitometrik olarak analiz edilmiş ve bovin serum albümin(BSA)'inin standart olarak kullanıldığı Bradford tekniğiyle belirlenmiştir.

Anti-RNaz A VHH'in, hedef antijeni olan RNaz A ile spesifik etkileşiminin belirlenmesinde; pull-down analizi, jel filtrasyon kromatografi analizi ve yüzey plazmon rezonans (SPR) analizi gerçekleştirilmiştir. Pull-down analizi spesifik etkileşimin varlığını gösterirken, jel filtrasyon kromatografi analizi ifadelenen anti-RNaz A VHH'in hedef antijeni ile bağlanabilen doğru üç boyutlu katlanma yapısında olduğunu kanıtlamıştır. SPR analizinde ise hedef antijen ile bağlanma affinitesi 1.9 nM olarak ölçülmüştür. Ölçülen bağlanma affinitesi, *Escherichia coli* (*E. coli*)'de üretilen anti-RNaz A VHH'in bağlanma affinitesinden yaklaşık 18.3 kat daha fazladır.

Elde edilen veriler, kurulan *pyrG* oksotrof *A. oryzae* platformunda, anti-RNaz A VHH affinite ajanının büyük ölçekte ve yüksek bağlanma affinitesi ile doğru üç boyutlu formda ve monomerik olarak üretilerek, başarılı bir şekilde saflaştırıldığını ortaya koymaktadır.

Buradan hareketle tez kapsamında varılan sonuçlar; çeşitli biyoteknolojik uygulama ve araştırma çalışmalarında ihtiyaç duyulan yüksek hacimde ve hedef antijenine yüksek bağlanma affinitesi gösteren VHH affinite ajanlarının, düşük maliyetle ifadenmesinde, tez kapsamında inşa edilen *pyrG* oksotrof *A. oryzae* ifadenme sisteminin, güçlü salgılama yeteneği sayesinde ideal bir platform olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: *Aspergillus oryzae*, *pyrG*, affinite ajanı, VHH, nanokorlar, RNaz A, bağlanma affinitesi, biyoteknolojik platform

DEVELOPING A BIOTECHNOLOGICAL PLATFORM FOR THE PRODUCTION OF AFFINITY REAGENTS IN *ASPERGILLUS ORYZAE*

SUMMARY

Antibodies are important molecules produced by living organisms' immune systems in reaction to foreign particles or antigens. For many years, monoclonal antibodies (mAbs) have been employed for therapeutic, diagnostic, and imaging applications. However, it is well known that mAb production has been limited by recombinant technologies due to their large (150 kDa) and complex structure, which includes disulfide bonds and precise post-translational modification required for the functionality. The main difficulties encountered in producing mAbs on a large scale include solubility and folding issues in *Escherichia coli* (*E. coli*) expression systems and the requirement of expensive and time-consuming production methods for obtaining low levels of mAbs in mammalian expression systems.

Single-domain heavy chain antibody (VHH), also referred to as a nanobody, is a distinct class of antibody that Hamers first identified in camelids in 1993 as a component of heavy-chain antibodies (HCAs). Due to its size of 4 nm and 2.5 nm in diameter, VHH is approximately 13 kDa and free of the light (L)-chain. Despite the fact that VHH only has three complementarity-determining regions (CDRs), it ensures extremely specific antigen binding affinity when compared to typical mAbs, which have six CDRs to sustain binding to an antigen. Furthermore, the prolonged CDR3 loop of VHH expands the binding surface by forming a convex structure to bind the concave antigens with great specificity, allowing it to interact with antigens like enzymes that mAbs cannot. The hydrophobic amino acids in the VL domain of conventional mAbs were replaced with smaller hydrophilic amino acids to compensate for the lack of the VL domain in VHH. Therefore, VHH can easily penetrate tissues owing to its small size compared to mAbs. The immunogenicity of VHH is low as domains share high sequence identity with human VH, but it can be arranged if it is required as VHH is easily modified. Due to its small size, high specificity and affinity, resilience to heat and denaturing chemicals, low immunogenicity, and high tissue penetration capability, VHH possesses special qualities that make it suitable as an affinity reagent.

High-yield heterologous expression of mAbs, which are utilized as affinity reagents in biotechnological applications, is hampered by issues with three-dimensional folding and solubility challenging, as well as the requirement for expensive production procedures. On the other hand, VHHs are unique antibody fragments that are smaller in size than mAbs and have considerable advantages over them. VHHs have begun to

replace mAbs in various biotechnological applications, including diagnostic, therapeutic, and imaging technologies, due to their small size, low immunogenicity, and excellent solubility behaviour.

Aspergillus oryzae (*A. oryzae*) is a filamentous fungus that has been preferred in fermentation technology and industrial-scale production of biotechnological products for many years, and has been given a Generally Safe (GRAS) status by the United States Food and Drug Administration (FDA). Compared to the taxonomically closest *Aspergillus* species, *A. oryzae* possesses more genes in its genome, especially in terms of genes encoding hydrolytic enzymes. *A. oryzae*'s robust secretion system makes it an ideal platform for the large-scale and reliable production of affinity reagents.

The purpose of this thesis is to construct a biotechnological platform using *A. oryzae* as a host, which has evolved to become *pyrG* auxotrophic, and to demonstrate that a *pyrG* auxotrophic *A. oryzae* expression platform can be used to produce affinity reagents. Additionally, it was desired to purify the anti-RNase A VHH protein, which is specific to ribonucleic acid A (RNase A), which was chosen as the affinity reagent, on a small scale and at the fermenter level.

The wild type *A. oryzae* RIB40 host microorganism was initially transformed by a deletion vector constructed from the upstream and downstream regions of the *pyrG* gene's open reading frame, without *pyrG* gene. Thus, homologous recombination was used to eliminate the *pyrG* gene from the wild-type *A. oryzae* genome. The *pyrG* gene encodes the orotidine monophosphate decarboxylase enzyme, which plays a role in the pyrimidine pathway; therefore, a *pyrG* auxotroph colony develops resistance to 5-FOA (5-fluoroorotic acid) and requires uracil and uridine for survival. To confirm gene deletion, repeated streaking method on selective culture medium and qPCR analysis were performed. The expression studies of the recombinant anti-RNase A VHH protein were carried out using the *pyrG* auxotroph *A. oryzae* bacterium, whose gene deletion was confirmed.

The coding sequence of the anti-RNase A VHH protein, which was codon-optimized for *A. oryzae*, was synthesized under the amylase promoter, using the amylase signal sequence and an 8xHis tag attached to the C-terminus of the protein. After the transformation was achieved by the protoplast-mediated transformation method and the confirmation studies of the colony expressing the recombinant anti-RNase A VHH protein were performed, small-scale expression was carried out. VHH was successfully produced and secreted in the soluble form at approximately 13 kDa. Following the successful implementation of small-scale expression, large-scale production was practiced in a 6 L fermenter.

Recombinant anti-RNase A VHH, which was expressed in *A. oryzae*, was purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) method utilizing the 8xHis-tag at the C-terminus. The production yield achieved from small-scale expression was calculated to be 44 mg/L, and the yield from expression in the fermenter was calculated to be 1.4 g/L. Gel filtration chromatography was conducted for further purification, and it was demonstrated that the expressed recombinant anti-RNase A VHH protein is monomeric. Total produced protein and expressed recombinant protein concentration were analyzed densitometrically and determined by the Bradford assay using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

Pull-down, gel filtration, and surface plasmon resonance (SPR) analyses were completed to ascertain the specific interaction of anti-RNase A VHH with its target antigen, RNase A. Gel filtration chromatography assay revealed that the expressed

anti-RNase A VHH possessed the correct three-dimensional folding structure and could bind with its target antigen, while pull-down assay confirmed the existence of a specific interaction between anti-RNase A VHH and RNase A. The binding affinity of anti-RNase A VHH expressed in *A. oryzae* against RNase A was determined to be 1.9 nM in the SPR analysis.

According to the results, the anti-RNase A VHH affinity reagent was successfully purified on a large scale with a high binding affinity, resulting in the correct three-dimensional structure and monomeric behaviour on the the established *pyrG* auxotroph *A. oryzae* platform.

From this perspective, the conclusions reached within the scope of the thesis prove that the *pyrG* auxotroph *A. oryzae* expression system, thanks to its strong secretion ability, is an ideal platform for the cost-effective production of VHH affinity reagents, which are required in various biotechnological applications and research studies, in high volume and with high binding affinity to the target antigen.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, *pyrG*, affinity reagents, VHH, nanobodies, RNase A, binding affinity, biotechnological platform