

BİYOTEKNOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

2024

1. **F*******
B*** B******* Kurkumin yüklü PLGA-DSPE hibrit nanopartiküllerin hazırlanması, karakterizasyonu ve in vitro etkinliğinin incelenmesi
2. **H**** Ş******* Over kanser tedavisinde reseptör hedefli in siliko ligand tasarımının in vitro incelenmesi

KURKUMİN YÜKLÜ PLGA - DSPE HİBRİT NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE *IN VITRO* ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Poly (D, L Lactic-co-Glycolic acid) (PLGA) biyoyumlu, biyobozunur ve FDA onaylı bir biyopolimerdir. Bu polimer, emülsiyon- solvent evaporasyon yöntemi ile nano miseller hazırlanmasının kolay olması ayrıca, hidrofobik ilaçların taşınması için elverişli olması ile diğer biyoyumlu polimerlerden ayrılmaktadır. Kurkumin ise, *Curcuma longa* rizomlarından izole edilen, çok sayıda önemli biyolojik aktiviteye sahip bir doğal bileşiktir. Bu biyoaktivitelerin arasında ilk olarak kanser hücrelerinin kurkumin etkisiyle proliferasyonunun inhibe edilmesi ve apoptoza yönelmesi gelmektedir. Buna ek olarak kurkuminin kemoterapi ilaçlarının indüklediği direnç ile ilişkili genlerin aktivasyonunu ve proteinlerin ekspresyon seviyesini düşürdüğü bilinmektedir. Bu proteinlerin ekspresyon seviyesini düşürmek, kanser hücrelerinde ortaya çıkan kemoterapi direncinin gelişmesini engellemeyi ve kemoterapi ilacının daha etkili hale gelmesini sağlamaktadır.

Daha önce laboratuvarımızda yapılan PLGA nano-misellerine 125 µg/mL kurkumin yüklemiş ve uygulandığı kanser hücrelerinde NF-κB seviyelerindeki değişim incelemiştir. Bu çalışmanın sonucunda kurkumin'in NF-κB seviyesini düşürmekte başarılı olduğu ancak PLGA nano-misellerinin bu proteinin tüm alt birimlerini etkin şekilde düşürmek için gerekli olan konsantrasyona ulaşamadığı fark edilmiştir. Bu sorun iki sebepten kaynaklanmış olabilir. Kurkumin NF-κB'nin tüm alt birimlerinin seviyesini düşüremeyen bir bileşiktir veya PLGA'nın taşıdığı kurkumin miktarı bu etkinliği elde etmek yetersiz kalmaktadır. Bu tez çalışması ile amacımız, PLGA'nın kurkumin taşımak için sahip olduğu hidrofobik kapasiteyi yine biyoyumlu ve FDA onaylı bir fosfolipit olan DSPE ile arttırmaktır. Bunun için "Emülsifikasyon- Solvent Evaporasyon" ve "Film Oluşturma-Rehidratasyon Yöntemi" olmak üzere iki farklı

yöntem ile PLGA-DSPE hibrit nano-miselleri hazırlandı, hesaplamalı moleküler modelleme yöntemleri ile polimer ve lipidin uyumu incelenmiş ve fizikokimyasal olarak karakterizasyonu tamamlandı. Ardından kurkumin taşımak için hidrofobik kapasitesi geliştirilen PLGA'nın bir kemoterapi ajanı olan 5 – Flourourasil (5-FU) kullanıldığında biyolojik etki açısından iyileşme davranışları *in vitro* olarak incelenmiştir. “Film Oluşturma–Rehidratasyon Yöntemi” yöntemi ile hazırlanan nanomiseller ile taşınan kurkumin miktarının 250 µg/mL'ye kadar yükseldiği başarılı bir şekilde gösterilmiştir. Kurkumin yüklü nano-misellerin fizikokimyasal karakterizasyonu Dynamic Light Scattering (DLS) FT-IR, Differential Scanning Chalorimetry (DSC) ve HPLC ile gerçekleştirilmiştir. DLS yöntemi ile boyutu 120 nm (sayıca %) olarak tespit edilen nano-misellerde DSC ve FT-IR yöntemleri ile kurkumin'in başarılı bir şekilde nano-partikülün çekirdek kısmına yerleştiği ve DSPE'nin PLGA'nın tüm fonksiyonel grupları ile etkileştiği tespit edilmiştir. HPLC yöntemi ile oluşturulan hibrit nano-miselin içinde tuzağa düşürülen kurkumin miktarının yüzde enkapsülasyon etkinliği (%EE) %92,006 ve yükleme kapasitesi (%DL) %7,301 olarak ölçülmüştür. Kurkumin'in hibrit nano-miselden salım mekanizması incelenmiş ve Korsmeyer–Peppas modelinin en uygun model olduğu tespit edilmiştir. Buna göre kurkumin'in hibrit nano-misellerden salımının nano-taşıyıcının şişmesine bağlı olarak, difüzyon ile gerçekleştiği ortaya çıkmıştır. Elde edilen optimize formülasyonun stabilitesi yukarıda bahsedilen analiz yöntemleri ile, çeşitli ortam (oda sıcaklığı, liyoflizasyon sonrası ve besiyerinde) ve çeşitli sürelerde incelenmiş ve hazırlanan formülasyonun yüksek ölçekte üretim sırasında pazarlamaya uygun olduğu tespit edilmiştir.

Tüm bunlarla birlikte kurkumin yüklü DSPE-PLGA hibrit nano-miselleri için hesaplamalı moleküler modelleme çalışmaları (kuantum kimyasal küme modelleri ve periyodik DFTB+ hesaplamaları) gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak oluşturulan PLGA, DSPE ve kurkumin matriksinde kurkumin'in sadece DSPE veya PLGA ile değil, her ikisi ile etkileşimde olduğu, DSPE'nin PLGA zincirlerini bir arada tutmakta büyük etkisi olduğu ve üçlü sistemin birlikte oldukça kararlı bir sistem ortaya çıkardığı tespit edilmiştir. Bu sonuç stabilite çalışmaları ile uyumludur.

Son olarak 250 mg/mL kurkumin taşıyan optimize DSPE-PLGA hibrit nano-misellerinin *in vitro* biyolojik etkisi LoVo insan kolorektal kanser hücre hattı ve sağlıklı kolon hücre hattı CCD-1072Sk üzerinde incelenmiştir. Bunun için öncelikle 5-FU'nun IC₅₀ değeri 440.9 µM olarak hesaplanmış ve ilerleyen deneylerde 5-FU'nun

bu konsantrasyonu kurkumin yüklü optimize hibrit nano-miseller ile kombinasyon halinde kullanılmıştır. Optimize formülasyonun kanser hücreleri üzerindeki apoptoz etkisi akridin turuncusu (AO)/ etidyum bromür (EB) çift boyaması, DAPI boyama, floresan mikroskop incelemesi ve akış sitometrisi cihazında Annexin V-FITC ve PI boyama ile gerçekleştirilmiş ve optimize formülasyonun apoptoz üzerindeki etkisi serbest kurkumin'e kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bunu takiben Western Blot yöntemi ile apoptotik protein artışı incelenmiştir. P53 proteininin, NP ile 5-FU kombinasyon uygulaması sonucu oluşan protein ekspresyon düzeylerinin yalnızca NP uygulamasına kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olduğu sonucu elde edilmiştir. Bununla uyumlu olarak kemoterapi ve hibrit nano-taşıyıcının taşıdığı kurkumin'in kombine kullanımında hücre içi rekatif oksijen türleri (ROS) oranlarında anlamlı artış gözlenmiştir. Son olarak optimize DSPE-PLGA hibrit nano-misellerinin kurkumin'in hücre içine girişindeki etkisi incelenmiştir.

Sonuç olarak optimize DSPE-PLGA hibrit nano-miselinin PLGA'nın kurkumin taşıma kapasitesinin başarılı bir şekilde iki katına çıkardığı tespit edilmiş ve 5-FU ile kombine tedavide kemoterapinin etkinliğini arttırdığı tespit edilmiştir. *In vivo* çalışmalar ile hazırlanan optimize hibrit nano-formülasyonun etkinliğini incelemek araştırmanın bir sonraki basamağı olarak tasarlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nano ilaç taşıyıcı sistem, Polimerik misel, PLGA, Kurkumin, Kolon kanseri, Kemoterapi

PREPARATION, CHARACTERISATION AND IN VITRO EVALUATION OF CURCUMIN LOADED PLGA-DSPE HYBRID NANO PARTICLES

SUMMARY

It is a very common method to use polymer and lipid structured biological materials in the preparation of nano drug carrier systems. Poly (D, L Lactic-co-Glycolic acid) (PLGA) is a biocompatible, biodegradable, and FDA-approved biopolymer. It is very easy to produce nano-micelles from this polymer and is suitable for transporting hydrophobic drugs, distinguishing it from other biocompatible polymers. Apart from this, Curcumin is a natural compound isolated from the rhizomes of the *Curcuma longa* plant, also known as turmeric, and has many important bioactivities for humans. It has been reported that curcumin has cell cycle-inhibiting, proliferation-interfering, anti-inflammatory and apoptosis-inducing effects on cancer cells. Among these bioactivities, the inhibition of cancer cell proliferation and increase their tendency to apoptosis are first. In addition, Curcumin is known to reduce the level of proteins associated with chemotherapy resistance. Reducing the expression level of these proteins prevents the development of chemotherapy resistance in cancer cells and makes the chemotherapy drug more effective.

Our group had previously conducted many studies with PLGA nano-micelles, and in one of them, they loaded 125 $\mu\text{g/mL}$ Curcumin into the nano-micelle and examined the change in NF- κB levels in cancer cells it administered. As a result of this study, it was noticed that curcumin was successful in reducing the level of NF- κB , but the amount required to reduce all subunits of this protein was insufficient. This problem could be caused by two reasons. Curcumin is a compound that cannot reduce the level of all subunits of NF- κB or the amount of curcumin carried by PLGA is too small to achieve this effectiveness. Similarly, the reason why the *in vivo* activity of curcumin is not found to be high enough is due to the insufficient bioavailability of the molecule and consequently the molecule accumulates in the target area in too low amounts. In order to fully measure the relationship between curcumin-loaded nanocarriers and resistance, a high amount of curcumin must first be delivered to the target.

In this thesis, we tried to increase the hydrophobic capacity of PLGA to transport curcumin with DSPE, which is a biocompatible and FDA-approved phospholipid. For this purpose, PLGA-DSPE hybrid nano-micelles were prepared with two different methods, namely "Emulsification-Solvent Evaporation" and "Film Preparation-Rehydration Method" and their physicochemical characterization was completed. Afterward, PLGA, with enhanced hydrophobic capacity for carrying curcumin, was used with 5-FU, a chemotherapy agent, and the healing behaviors regarding biological effects were examined in-vitro. It has been successfully shown that the amount of curcumin carried by nano micelles prepared by the "Film Formation-Rehydration Method" method increases up to 250 $\mu\text{g/mL}$. Physicochemical characterization of curcumin-loaded nano-micelles was performed with Dynamic Light Scattering (DLS) FT-IR, Differential Scanning Calorimetry (DSC), and HPLC. It was determined that curcumin was successfully encapsulated in the core of the nano-particle and DSPE interacted with all functional groups of PLGA by DSC and FT-IR methods in nano-micelles whose size was determined as 120 nm (number%) by the DLS method. The percent encapsulation efficiency (%EE) of the amount of curcumin trapped in the hybrid nano-micelle formed by HPLC method was measured as 92.006% and the drug loading capacity (DL%) as 7.301%. The release mechanism of curcumin from the hybrid nano-micelle was investigated and the Korsmeyer–Peppas model was found to be the most suitable one. Accordingly, it was revealed that the release of curcumin from hybrid nano micelles occurs by diffusion due to swelling of the nanocarrier. The stability of the obtained optimized formulation was examined by the above-mentioned analysis methods, in various media (room temperature, after lyophilization, and in the medium) and at various times, and it was determined that the prepared formulation was suitable for marketing during high-scale production.

In addition, Computational Molecular Modeling for curcumin-loaded DSPE-PLGA hybrid nano micelles was performed with Quantum chemical cluster models, Periodic DFTB+ calculations, and Molecular dynamics (MD) simulations. As a result, it has been determined that curcumin interacts not only with each DSPE or PLGA individually but with both, DSPE has a great effect on keeping the PLGA chains together, and the triple system together creates a very stable system in the formed PLGA, DSPE and curcumin matrix. This result is compatible with stability studies.

Finally, the *in vitro* biological effect of optimized DSPE-PLGA hybrid nano micelles carrying 250 $\mu\text{g/mL}$ curcumin was investigated on transfected LoVo human colorectal

cancer cell line (LoVo-Luc) and Healthy colon cell line CCD-1072. For this, firstly, the IC₅₀ value of 5-FU was calculated as 440.9 μM, and in further experiments, this concentration of 5-FU was used together with optimized hybrid nano-micelles loaded with curcumin. The apoptosis effect of the optimized formulation on cancer cells was performed by Acridine orange (AO) / ethidium bromide (EB) double staining, DAPI staining, fluorescence microscopy, and Annexin V-FITC and PI staining on flow cytometry. The effect of the optimized formulation on apoptosis was statistically compared to free curcumin and was found significant. Following this, apoptotic protein increase and resistance-related beta catenin protein were examined by Western Blot method. It was concluded that the protein expression levels of the mentioned proteins resulting from the combination application of drug-loaded nanoparticles and 5-FU were significantly higher than the application of nanoparticles alone. In line with this, a significant increase in intracellular reactive oxygen species (ROS) rates were observed in the combined use of chemotherapy and curcumin carried by the hybrid nanocarrier. Finally, the effect of optimized DSPE-PLGA hybrid nano-micelles on the intracellular entry of curcumin was investigated.

As a result, It was determined that the optimized DSPE-PLGA hybrid nano-micelle successfully doubled the curcumin carrying capacity of PLGA and increased the efficacy of chemotherapy in combination treatment with 5-FU. Examining the effectiveness of the optimized hybrid nano-formulation prepared by *in vivo* studies was designed as the next step of the research.

Key Words: Nano drug delivery system, Polymeric micelle, PLGA, Curcumin, Colon cancer, Chemotherapy

OVER KANSER TEDAVİSİNDE RESEPTÖR HEDEFLİ *IN SILICO* LİGAND TASARIMININ *IN VİTRO* İNCELENMESİ

ÖZET

İnsan östrojen reseptör alfa ($ER\alpha$), büyüme, metabolizma ve gelişimde rol oynayan östrojenle indüklenebilen birçok genin transkripsiyonunu düzenleyen bir nükleer reseptör ailesi üyesidir. $ER\alpha$ 'nın dokularda aşırı ifade edilmesi ilişkili olduğu sinyal yollarını aktive etmesine neden olarak, hücrede DNA mutasyonlarının birikmesine, çoğalan hücrelerin neoplastik dönüşümüne ve tümörün ilerlemesine yol açar. Özellikle $ER\alpha$ ekspresyonu ve aktivasyonu hormona bağımlı kanser türlerinin gelişimi için birincil öneme sahiptir. Hormona bağımlı kanser tedavisinde $ER\alpha$ 'yı hedefleyen çalışmalar, hücrelerde apoptozu uyarması ve epitelyal mezenkimal geçişi inhibe etmesiyle kanser tedavisinde uygun bir terapötik hedef olduğunu göstermiştir. Ancak endokrin tedavisine karşı zamanla gelişen direncin üstesinden gelebilmek için $ER\alpha$ 'ya yönelik alternatif yaklaşımlar ligand bağlama alanından çıkıp $ER\alpha$ -DNA veya $ER\alpha$ -kofaktör etkileşimleri (reseptör kutusunun (NR) LxxLL motifinin hidrofobik oyuk) üzerinde yoğunlaşmaktadır. Hedefli tedavilerde özellikle son yıllarda, terapötik peptitlerle, $ER\alpha$ -kofaktör etkileşimleri gibi protein-protein etkileşimlerinin (PPI) inhibe edilmesi hastalıkların tedavisinde genel bir strateji haline gelmiştir.

Lineer peptit motiflerine göre farmakolojik açıdan daha yüksek performans gösteren, hedefe daha iyi bir afinite ile bağlanan kısırılmış (siklik) peptitler, yeni ve hedefe yönelik inhibitörler olarak kapsamlı bir şekilde son yıllarda araştırılmaktadır. Bu yüzden bu tez çalışmasında; $ER\alpha$ 'da yer alan çeşitli α -sarmal baskın protein-protein etkileşimlerini hedefleyen siklik peptitler, kofaktör bağlanma inhibitör bölgesi (LxxLL) baz alınarak tasarlanmıştır. Bu bölgeye özgü gerçekleştirilen *in silico* çalışmalarımızda, $ER\alpha$ 'ya bağlanan en kritik amino asitlerin kısırılmadığı, aksine serbest bırakıldığı siklik peptit tasarımının mümkün olduğu gösterilmiştir. Bu sayede, yeni dizayn edilen siklik peptitler, $ER\alpha$ 'ya hem özgün hem de biyoesdeğerliği yüksek bir biçimde bağlanan, literatürde sunulan motiflere büyük bir üstünlük sağlayacak şekilde *in silico* olarak hesaplanmıştır. Referans siklik peptit (SP1) ile tez kapsamında türetilen yeni siklik peptitler (SP2 ve SP3) Fmoc kimyası kullanılarak, katı-faz peptit sentez yöntemi ile sentezlenmiş ve DEAD yöntemi ile halkasallaştırılmıştır. Elde edilen lineer ve siklik ham peptitler LC-MS ile analiz edilip, karakterize edildikten sonra ters faz HPLC ile saflaştırılmış ve *in vitro* deneylerde kullanılmıştır. Tez çalışmasında $ER\alpha$ inhibitörü olarak TPBM ticari küçük molekülü, östrojen ile rekabet etmeden $ER\alpha$ 'ya karşı peptitlerimiz ile benzer etki mekanizmasına sahip olduğu için referans molekül olarak kullanılmıştır. Gerçekleştirdiğimiz *in vitro* çalışmalar neticesinde tasarladığımız yeni siklik peptitlerin sadece aktif formadaki $ER\alpha$ (östrojen (E2) ile kompleks haline gelmiş) üzerinde etkili olduğu, E2'den yoksun ortamdaki siklik peptitlerin $ER\alpha$ (+) hücrelerinde herhangi bir etkisi olmadığı gözlemlendi. Bu durum siklik peptitlerin tasarımında, sadece $ER\alpha$ 'nın aktif formunda açığa çıkan LxxLL motifine bağlandığının göstergesi olmuştur. Aynı zamanda E2 ile

desteklenmiş hücre kültürü ortamında SP'lerin ER α eksprese etmeyen kanser ve sağlıklı hücre hatlarında herhangi bir toksik etki gösterememiş sadece ER α eksprese eden hücreler üzerinde antiproliferatif etki göstermiş olması, peptitlerin ER α üzerinden hücre büyümesini inhibe ettiğini desteklemiştir. Ayrıca oluşturulan peptit kombinasyonlarının hücre hatları üzerinde antiproliferatif ve toksik etki gösterdiği hücre canlılık testleri vasıtasıyla belirtilmiştir.

En etkili kombinasyon grubun SP2 + SP3 ve SP1 + SP2 + SP3'ün hücrelerin ER α ile ilişki yollarında ve önemli apoptoz belirteçleri üzerindeki etkisi de hem gen hem de protein bazında açığa çıkarılmıştır. qPCR ve Western Blot'tan elde edilen veriler içsel apoptoz yolunda rol oynayan *p53*, *p21*, *Bax* ve *Bcl-2* 'nin yanı sıra dışsal apoptoz yolunda rol oynayan *kaspaz-8*'in değişen ekspresyon profilleri hücrelerin siklik peptit kombinasyon tedavisi sonrası her iki apoptoz yolu üzerinden etkileyebileceğini göstermiştir. Yapılan akış sitometrisi analizleri ile etkili kombinasyonlarla tedavi edilen hücrelerdeki kaspaz 3/7 aktivitesinin artışı ile Annexin V belirteçlerinin aşırı ifadesi hücreleri yoğun olarak erken ve geç apoptoza sürüklediğini desteklemiştir. Bunlara ilave, *Bcl-2* ekspresyonunun ve mitokondriyel membran bütünlüğünün ölçüldüğü akış sitometrisi analizlerinde siklik peptit kombinasyon tedavisi sonrasında hücrelerde *Bcl-2* inaktivasyonun ve mitokondriyel membran bütünlüğü bozulmuş hücre sayısındaki anlamlı artışlar *Bcl-2* sinyal yolunun etkisiz hale getirildiği ve apoptozun mitokondri yoluyla gerçekleştiğini kanıtlamıştır. Ayrıca hücrelere sadece peptit ve peptit kombinasyonları uygulandıktan sonra hücre içinde dağılım gösteren sitoplazmik ve nükleer ER α aktivasyonlarında düşüşün meydana gelmesi siklik peptitlerin ER α 'ya spesifik olduğunu kanıtlar nitelikte olmuştur. Buna ek olarak, MCF-7 hücrelerinin proliferasyonunda önemli bir rolü üstlenen hatta hormon direnci ile güçlü bir ilişkisi bulunan sitoplazmik ER α 'nın, siklik peptit tedavisinden sonrasında aktivitesinin çarpıcı bir şekilde azalmasının apoptozun bu yolak üzerinden indüklediği ilgi çekici bir bulgu olarak elde edilmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışması kapsamında, ER α hedeflemesi için siklik peptitler tasarlanmış, sentezlenmiş ve ER α (+) hücreleri üzerindeki inhibitör etkisi çeşitli *in vitro* çalışmalarla desteklenmiştir. Sonuçlarımızda siklik peptitlerin hücrelerin hem içsel hem de dışsal apoptoz yolunda etkili olarak hücrelerin ölüm mekanizmalarını indüklediği sunulmuştur. Bu tez kapsamında geliştirdiğimiz yeni siklik peptitlerin, yeni teknolojilerle daha da iyileştirilmesinin mümkün olduğunu ve hali hazırda klinik tedavilere alternatif ya da yeni peptit kombinasyon tedavilerinin oluşturulmasında yardımcı bir yaklaşım olabileceğini göstermekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Hesaplamalı kimya, koaktivatör bağlanma inhibitörleri, stabilize edilmiş siklik peptitler, insan östrojen reseptörü alfa (ER α), kanser

IN VITRO INVESTIGATION OF RECEPTOR TARGETED *IN SILICO* LIGAND DESIGN IN OVARIAN CANCER THERAPY

SUMMARY

Human estrogen receptor alpha (ER α) is a nuclear receptor family member that regulates the transcription of many estrogen-inducible genes involved in growth, metabolism, and development. Overexpression of ER α in tissues activates its associated signaling pathways, leading to the accumulation of DNA mutations in the cell, neoplastic transformation of proliferating cells, and tumor progression. ER α expression and activation are of primary importance for developing hormone-dependent cancers. Studies targeting ER α in hormone-dependent cancer therapy have shown that it is a suitable therapeutic target in cancer treatment by inducing cell apoptosis and inhibiting epithelial-mesenchymal transition. However, to overcome the resistance to endocrine therapy that develops over time, alternative approaches to ER α are moving away from the ligand binding domain and focusing on ER α -DNA or ER α -cofactor interactions (the hydrophobic groove of the LxxLL motif of the receptor box (NR)). In targeted therapies, especially in recent years, the inhibition of protein-protein interactions (PPIs), such as ER α -cofactor interactions by therapeutic peptides, has become a general strategy for treating diseases.

Cyclic peptides, which bind to the target with a better affinity and perform pharmacologically better than linear peptide motifs, have been extensively investigated as novel and targeted inhibitors in recent years. Therefore, in this thesis, cyclic peptides targeting various α -helix-dominant protein-protein interactions in ER α were designed based on the cofactor binding inhibitor region (LxxLL). Our *in silico* studies have shown that it is possible to design cyclic peptides in which the most critical amino acids binding to ER α are not restricted but instead released. In this way, newly designed cyclic peptides have been calculated *in silico* that bind to ER α in a unique and highly bioequivalent manner, providing a major advantage over the motifs presented in the literature. The reference cyclic peptide (SP1) and the novel cyclic peptides derived in this thesis (SP2 and SP3) were synthesized by solid-phase peptide synthesis method using Fmoc chemistry and cyclized by DEAD method. The obtained linear and cyclic crude peptides were analyzed and characterized by LC-MS, purified by reverse phase HPLC, and used in *in vitro* experiments. In the thesis study, the TPBM commercial small molecule was used as a reference as it has a similar mechanism of action with our peptides against ER α without competing with estrogen as an ER α inhibitor. As a result of our *in vitro* studies, it was observed that the new cyclic peptides we designed were only effective on ER α (complexed with estrogen (E2)) in the active form, while cyclic peptides in E2-deprived medium did not affect ER α (+) cells. This indicated that the cyclic peptides' design binds only to the LxxLL motif exposed in the active form of ER α . At the same time, in an E2-supplemented cell culture medium, SPs did not show any toxic effect on cancer and healthy cell lines that do not express ER α but only showed the antiproliferative effect on ER α -expressing cells, supporting that the peptides inhibit cell growth via ER α . In addition,

the antiproliferative and toxic effects of the peptide combinations on cell lines were indicated by cell viability tests.

The effect of the most effective combination group, SP2 + SP3 and SP1 + SP2 + SP3, on ER α -related pathways and important apoptosis markers of cells was determined at both the gene and protein level. The data obtained from qPCR and Western blot showed that the altered expression profiles of p53, p21, Bax, and Bcl-2, which are involved in the intrinsic apoptosis pathway, as well as caspase-8, which is involved in the extrinsic apoptosis pathway, showed that the cells were affected through both apoptosis pathways after cyclic peptide combination therapy. Flow cytometry analyses showed that increased caspase 3/7 activity and over-expression of Annexin V markers in cells treated with the effective combinations intensely drove the cells to early and late apoptosis. In addition, flow cytometry analysis of Bcl-2 expression and mitochondrial membrane integrity showed that Bcl-2 inactivation and significant increases in the number of cells with impaired mitochondrial membrane integrity after cyclic peptide combination treatment supported that the Bcl-2 signaling pathway was inactivated and apoptosis occurred through mitochondria. In addition, the decrease in cytoplasmic and nuclear ER α activations distributed in the cell after treatment of cells with only peptides and peptide combinations proved that cyclic peptides were specific for ER α . In addition, cytoplasmic ER α , which plays an important role in the proliferation of MCF-7 cells and has a strong relationship with hormone resistance, decreased dramatically after cyclic peptide treatment, indicating that apoptosis is induced through this pathway.

In conclusion, within the scope of this thesis, cyclic peptides for ER α targeting were designed and synthesized, and their inhibitory effect on ER α (+) cells was supported by various *in vitro* studies. The results show that cyclic peptides induce cell death mechanisms by acting on both the cells' intrinsic and extrinsic apoptosis pathways. It has been demonstrated that the new cyclic peptides we have developed within the scope of this thesis can be further improved with latest technologies and can be an alternative to current clinical treatments or a helpful approach to creating new peptide combination therapies.

Keywords: Computational chemistry, coactivator binding inhibitors, stabilized cyclic peptides, human estrogen receptor alpha (ER α), cancer