

# BİYOTEKNOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI 2022

1. F\*\*\*\* Ü\*\*\*\* Lantanum Karbonat'ın Böbreğin Endokrin Fonksiyonlarına Etkisi
2. B\*\*\*\* N\*\*\*\* Ç\*\*\*\* Glioblastoma Hücrelerinde İntegrin  $\alpha 10$ 'un PLGA Nano Partiküllerine Yüklenmiş Sirna ile Baskılanması
3. E\*\*\*\* K\*\*\*\* Paklitaksel Yüklü Polimerik Nanopartiküllerin Sentezi ve Kombinasyonel Terapi Etkinliğinin Belirlenmesi
4. B\*\*\*\* K\*\*\*\* Likit Biyopside Glioblastoma Multiforme Genetik Biyobelirteçlerinin Araştırılması
5. E\*\*\*\* M\*\*\*\* PTCH1 Geninde Meydana Gelen Epigenetik Değişimlerin Mide Kanserli Olgularda İncelenmesi

## İnsan Solunum Sinsityal Virüsünün Protein Dizisi Çeşitliliği Dinamiklerinin İncelenmesi

### ÖZET

İnsan solunum sinsityal virüsü (hRSV), dünya çapında en bulaşıcı virüslerden biridir ve bronşiolit ve pnömoni gibi alt solunum yolu enfeksiyonlarına yol açabilir. Lisanslı profilaktik hRSV aşısı bulunmamaktadır. hRSV'nin büyük ölçekli proteom çapında dizi çeşitliliği analizinde kullanılacak ve epitop bazlı hRSV aşısı tasarımı için potansiyel aşı hedeflerinin tanımlanmasına yol açacak çok sayıda hRSV dizisi halka açık veri tabanlarında mevcuttur.

Bu çalışma, virüsün mevcut tüm protein dizilerine odaklanmıştır. Dizi verileri, halka açık NCBI Virüs ve Virüs Patojen Veritabanı ve Analiz Kaynağı (VIPR) veritabanlarından toplanmıştır. Protein dizisi verileri havuz oluşturularak birleştirilmiş ve benzer diziler CD-HIT kullanılarak çıkarılmıştır. Bireysel protein veri kümeleri oluşturmak için 11 hRSV proteininin UniProt referans kayıtları kullanılarak toplanan diziler üzerinde BLASTp analizi yapılmıştır. Her protein veri seti, MUSCLE programı kullanılarak hizalanmıştır. Dizi çeşitliliği, proteinin uzunluğu boyunca örtüşen her 9-mer (nonamer) (1-9, 2-10, vb.) pozisyonu için Shannon entropisi kullanılarak ölçülmüştür. Bundan sonra, T-hücre epitopları, IEDB veritabanı kullanılarak deneysel olarak ispatlanan epitoplar ile eşleştirilmiş ve IEDB'nin önerdiği yardımcı araçlar kullanılarak epitop tahmini yapılmıştır. Tahmin sonuçlarımızı desteklemek için, seçilen epitopların MHC I ve II'ye karşı moleküler docking analizleri ve moleküler dinamik simülasyonları yapılmıştır.

VIPR ve NCBI Virus veritabanlarından toplanan toplam dizi sayısı 93.382'dir. Benzer dizilerin çıkartılmasından sonra, sayı 12.413'e düşmüştür (~%87'lik bir azalma). hRSV için gözlemlenen maksimum entropi değeri, M2-2 proteininde 43'üncü nonamer pozisyonunda ~4.2 olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, proteom çapında ortalama entropi genel olarak düşüktür (~0.8) ve bu nedenle yüksek korunmuşluk göstermektedir ve bu değerler ~0.5 (protein N) ile ~2.3 (protein M2-2) arasındadır. Varyantların çoğu (~%55) 0 ile 1 entropi aralığı arasındadır. Nonamer pozisyonlarının yaklaşık yarısı (~%51) yüksek oranda korunmuş olarak sınıflandırılmıştır (indeks insidansı  $\geq$  %90). Epitop tahmini için 2269 yüksek oranda korunmuş nonamer dizisi seçilmiştir. 2269 nonamer dizisinden, sırasıyla MHC Sınıf I ve II için 997 ve 235 epitop tahmin edilmiştir.

Bu çalışma, hRSV proteomundaki dizi çeşitliliği ve bunların potansiyel aşı hedefleri hakkında bilgi sağlamaktadır. Proteomun ve tahmin edilen epitoplarının yüksek düzeyde korunması, profilaktik hRSV aşısı tasarımı için daha fazla araştırmanın gerekliliğini ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Viral dizi analizi, immünoinformatik, aşı hedef keşfi

# GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE İNTEGRİN $\alpha 10$ 'UN PLGA NANO PARTİKÜLLERİNE YÜKLENMİŞ siRNA İLE BASKILANMASI

## ÖZET

Kanser, dünyada ölüm nedenlerinin başında gelen bir hastalıktır ve birçok çeşitleri bulunmaktadır. En tehlikeli kanser sınıfına dahil olabilecek bir kanser türü de glioblastoma kanseridir ve beyin çevresine yayılabilen en yaygın ve ölümcül bir tümördür. Histolojik olarak nekroz ve endotel proliferasyon ile tanımlanan glioblastoma, yetişkin bireylerde görülen en yaygın ve agresif birincil beyin tümörüdür. Tanı ve tedavisinde birçok zorluk yaşanmaktadır. Bu olumsuzlukları en aza indirmek amacıyla nano taşıyıcı sistemler ile ilacın kontrollü ve hedefli iletimi mümkün hale getirilmeye başlanmıştır. Ayrıca, kanser hücrelerinde fazla eksprese olan genlerin ve ürünlerinin bilinmesiyle bu genlerin terapötik hedef olduğu çalışmalar artmıştır ve bu doğrultuda tümör bölgelerinde fazla eksprese olan genlerin susturulmasına yönelik çalışmalar günümüzde odak noktası olmuştur. Ribonükleik asit (RNA)'yı seçici bir şekilde hedefleyebilen antisens oligonükleotidler ile antisens teknolojisi bu alanda önemli ajanlar sunmaktadır. Bu terapötik ajanlardan biri olan küçük enterferans yapan (si-RNA)'lar ile hedeflenmiş mesajcı RNA (mRNA)'nın parçalanması mümkün hale gelmiştir. Böylece kanser hücresinin gelişimine sebep olan protein susturularak kanser tedavisi gerçekleştirilebilir. İntegrinler,  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirinden oluşan heterodimerik hücre yüzeyi reseptörleridir ve hücre dışı matrisi hücre iskeletine bağlarlar. Ayrıca tümör hücreleri üzerindeki hücre dışı matris ve integrin reseptörleri arasındaki etkileşimlerin, hücre göçü ve proliferasyonu gibi tümör hücresi süreçlerinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir. Özellikle, integrin  $\alpha 10$  proteinini ifade eden *ITGA10* geninin yüksek ifadesi, glioma hastalarında daha kötü bir genel hayatta kalma olasılığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Biz de çalışmamızda, biyoyumlu, biyobozunur ve ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından insanlar üzerinde kullanımına onay alınmış bir polimer olduğu için Poli (D,L-laktid-ko-glikolid) (PLGA) nanopartikülleri ile glioblastoma hücrelerine terapötik madde olan integrin  $\alpha 10$ 'u hedefleyen siRNA'nın taşınabilmesini ve sonuçta kanser hücresindeki değişimi incelemeyi amaçladık. Böylece, PLGA nanopartikülleri ile siRNA taşınmasının etkinliği, PLGA nanopartikül aracılı siRNA'nın glioblastoma hücrelerindeki integrin  $\alpha 10$ 'u baskılama etkinliği ve integrin  $\alpha 10$ 'un baskılanması ile kanser hücrelerindeki değişikliğin incelenerek

PLGA nanopartikülleri ile taşınan siRNA'nın glioblastoma hücrelerindeki integrin  $\alpha 10$ 'u hedeflenmesiyle glioblastoma kanseri için olası bir terapötik yaklaşım öne sürülebilecektir.

**Anahtar Kelimeler: gen tedavisi, PLGA, nano taşıyıcı, si-RNA, integrin, glioblastoma kanseri**

## PAKLİTAKSEL YÜKLÜ POLİMERİK NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE KOMBİNASYONEL TERAPİ ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

### ÖZET

Kanser, vücudun hemen hemen her yerinde başlayabilen, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyüdüğü ve sonrasında vücudun diğer bölgelerine yayıldığı bir hastalık olup insan hayatını tehdit etmektedir. Kanserın mevcut temel tedavisi kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahaleyi içerir; bunlar arasında kemoterapi basit ve uygun süreci nedeniyle klinikte yaygın olarak uygulanmaktadır. Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahinin koordineli olarak uygulandığı geleneksel tedavi yöntemlerinin toksisite, vücutta spesifik olmayan bölgelere dağılma, zayıf oral biyoyararlanım ve ilaç dozunun ayarlanamaması gibi dezavantajları bulunması sebebiyle daha etkin, kişiye ve hastalığın türüne özel teşhis/tedavi sistemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Yeni nesil kombine tedavi yöntemleri arasında bulunan fotodinamik terapi (FDT), fototermal terapi (PTT), manyetik hipertermi gibi tedaviler umut vadeden yöntemler arasındadır. Bu yöntemlerin kombinasyonel terapide kullanılması, ilaç taşıyıcı sistemlerin etkinliğini artırmak ve antikanser ilacı tümör bölgesine hedeflemek açısından potansiyel bir tedavi yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada hidrofobik kemoterapi ilacı paklitakselin (PTX), foto duyarlılaştırıcı ajan protoporfirin IX (PpIX) ile kombinasyonel tedavide kullanılması amaçlanmıştır. Öncelikle RAFT polimerizasyon yöntemi ile diblok kopolimeri hazırlanmış protoporfirin IX ve şeker bileşenleri ile azit-alkin halka katılma click reaksiyonu ile glikopolimerler sentezlenmiştir. Nanoçöktürme yöntemi ile paklitaksel glikopolimerlere enkapsüle edilerek misel formülasyonları hazırlanmıştır. Daha sonra, sadece FDT özellikli ilaç içermeyen glikopolimer bazlı miseller (GM) ve kemo-FDT özellikli paklitaksel içeren glikopolimerik misellerin (GM-PTX), A549 akciğer kanseri hücre hattı ve CCD-1079Sk sağlıklı fibroblast hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Kırmızı ışığı absorplayan/ışınım yapan PpIX taşıyan, biyouyumlu, biyobozunur ve NIR'la tetiklenen singlet oksijen duyarlı ilaç salımı yapan glikopolimerik misel bazlı taşıyıcı platformların sentezi ve elde edilen misel yapılarının akciğer kanser hücrelerini hedeflemesi ile literatüre yeni bir FDT-Kemo kombinasyonel terapi kazandırması açısından önem taşımaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Akciğer kanseri, protoporfirin IX, paklitaksel, polimerik nanotaşıyıcı sistemler, kombinasyonel terapi

# LİKİT BİYOPSİDE GLİOBLASTOMA MULTİFORME GENETİK BİYOBELİRTEÇLERİNİN ARAŞTIRILMASI

## ÖZET

Günümüzde kanser tanısı, evrelemesi ve prognozu için en yaygın kullanılan temel araç solid tümör olmakla birlikte bu yöntem invaziv bir cerrahi biyopsi yöntemidir. Ancak, bir tümör büyüdükçe zamanla değişebilir, yayılır ve kanser önleyici ilaçlara maruz kalır. Hastalık ilk teşhis edildiğinde alınan tümör biyopsileri, kanserin daha sonraki durumunu yansıtmayabilir. Kanser hakkında güncel bilgi almak için tekrarlanan biyopsiler ağrı, enfeksiyon ve kanama gibi olası komplikasyonlara neden olabilir. Vücudun farklı bölgelerine yayılan kanser hücreleri başladığı bölgedeki kanserden farklı olabilir. Bu sebeple, vücudun bir bölgesinden alınan bir tümör biyopsisinin vücuttaki kanseri yeterince temsil etmesi mümkün değildir.

Likit biyopsi, kanda dolaşan tümör hücrelerini veya tümör hücrelerinin DNA parçalarını tespit etmek amacıyla gerçekleştirilen invaziv olmayan bir yöntemdir. Kan; dolaşımdaki hücreler, trombositler, hücre dışı veziküller, mRNA, miRNA, protein ve hücre dışı DNA (cfDNA) gibi birçok biyolojik materyal içerir. Kanser hastalarının kanındaki cfDNA'nın bir kısmı da tümör hücreleri tarafından apoptoz, nekroz veya aktif salgı yoluyla salınan dolaşımdaki tümör DNA'sını (ctDNA) içerir. Tümörler hacim olarak büyüdükçe ve sayıları arttıkça, ctDNA ve CTC (dolaşan tümör hücreleri) kan dolaşımına salınır. Bu durumda dolaşımdaki kan kullanılıp klinik açıdan önemli olan ctDNA dizisindeki tümöre özgü mutasyonlar, yeni bir kanser biyobelirteç tipi olarak işlev görebilir.

Glioblastoma multiforme (GBM) erişkinlerde en sık görülen beyin tümörüdür. En hızlı seyirli ve ölümcül tümörlerdendir. GBM'nin yüksek heterojenliği, tanıyı ve terapötik müdahaleyi engeller ve doğru hasta sınıflandırmasına ve kişisel tedaviye olanak tanıyan erken tanı için biyobelirteçlerin belirlenmesine ihtiyaç duyar. Tümör ilerlemesinin moleküler profilini tanımlamak için tekrarlanan cerrahi her zaman mümkün olmayabilir. Bu nedenle, likit biyopsi özellikle GBM'leri saptamak, moleküler olarak karakterize etmek için umut verici bir yaklaşımdır. Ayrıca tümörün ilerlemesini yöneterek ve tedaviye yanıtı izleyerek kanserin erken teşhisini

kolaylaştırabilen ve hasta takibini geliştirebilen potansiyel bir klinik faydaya da sahip olduğu düşünülmektedir.

Araştırmamızda hasta (n=10) ve kontrol grubu (n=3), GBM ile önceden ilişkilendirilmiş ve ayrıca ilişkili olabileceği düşünülen 63 gen bölgesi, hotspot ekzon ile ekzon-intron birleşme bölgelerini içeren yeni nesil dizileme paneli (YND) ile incelendi. Panel on gönüllü hastanın solid tümör ve plazmalarında, sağlıklı kontrol grubunun ise plazmalarında Illumina NextSeq 500/550Dx ile gerçekleştirildi. Biyoinformatik iş akışı ve analizleri için QIAGEN Clinical Insight (QCI) yazılımı kullanıldı.

Çalışmada yedi hastanın dokusunda patojenik olduğu bilinen ve/veya novel varyantlar saptandı. Altı hastada TP53, dört hastada PTEN, bir hastada MET, bir hastada EGFR geninde mutasyon saptandı. Yapılan kopya sayısı değişimi (CNV) analizlerinde ise beş hastada EGFR, iki hastada MET, bir hastada PDGFRA, bir hastada KIT, bir hastada RPN2 genlerinde normalin üzerinde okuma sayısı alındı. Hastaların dokusunda saptanan mutasyonlar ve amplifikasyonlar, likit biyopsi örneklerinde tespit edilemedi.

**Anahtar Kelimeler:** Biyoteknoloji, panel dizileme, biyobelirteç, onkoloji, glioblastoma

# ***PTCH1* GENİNDE MEYDANA GELEN EPİGENETİK DEĞİŞİMLERİN MİDE KANSERLİ OLGULARDA İNCELENMESİ**

## **ÖZET**

Gastrik kanser (GC) dünyada teşhisi konulan dördüncü en sık kanser olmakla beraber, mortalitesi yüksek ve prognozu kötü bir malignitedir. Yapılan moleküler çalışmalarda, hedhehog sinyal yolağının bir proteini olan *PTCH1* reseptör regülasyonunun bozulmasının mide kanserine sebep olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, bu çalışmada cerrahi gastrektomi uygulanmış mide kanserli olgulardan rezekte edilen tümör dokularında, *PTCH1* geninin epigenetik değişimi ve buna bağlı olarak ortaya çıkan ekspresyonel farklılıkların incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, gastrik kanser tanılı, 50-70 yaş aralığında, 13 erkek ve 9 kadın hastadan cerrahi gastrektomi ile rezekte edilmiş tümör dokusu ve tümörden uzak bir bölgeden alınmış kontrol dokusu dahil edildi. Elde edilen dokulardan ticari izolasyon kiti yardımıyla DNA izole edildi. İzole edilen DNA'ların konsantrasyonları belirlendikten sonra uygun koşullarda bisülfid dönüşümü yapıldı ve EpiTect Metil 2 PCR Sistemi yardımıyla metile ve metile olmayan primerler kullanılarak kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ile *PTCH1* genindeki metilasyon profilindeki değişimler belirlendi. Protein düzeyindeki değişimler için homojenize doku örneklerinden ELISA yardımıyla *PTCH1* protein ekspresyonları ölçüldü. RT-PCR sonucunda metile primerlerin kullanıldığı düzenekte çoğunlukla tümör dokusundan elde edilen örneklerin erime sıcaklığı ile tümör uzak dokulardan elde edilen örneklerin erime sıcaklığı arasında yaklaşık  $0.5 \pm 0.25$  derece değişimin olduğu ve bu nedenle tümörlü dokuların metilasyon profillerinin sağlıklı dokuya oranla değiştiği tespit edildi. Protein ekspresyonu sonuçları değerlendirildiğinde *PTCH1* protein miktarının kanserli dokularda anlamlı derecede arttığı tespit edildi ( $p < 0,05$ ). Elde edilen sonuçlar gastrik kanser oluşumunda etkisinin olabileceği düşünülen ve *PTCH1* genindeki metilasyon profilinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmediğinden *PTCH1* proteinindeki değişimin direk epigenetik değişimler ile ilişkili olmadığını

düşündürmektedir. Bu nedenle, bu sonuçlar çevresel etkiler sonucu oluşan epigenetik değişimlerin gastrik kanser oluşumunda etkisinin sınırlı olduğuna işaret etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Gastrik kanser, *PTCH1* geni, epigenetik, RT-PCR.