

# BİYOTEKNOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

## 2023

1. **Ş\*\*\*\* N\*\* K\*\*\*\*\*  
C\*\*\*\*\*** İyileştirilmiş Özelliklere Sahip Nişasta Temelli Nanokompozit Hidrojeller
2. **G\*\*\*\*\* B\*\*** Fibrinolitik Lumbrokinaz Enziminin Filamentli Mantar *Aspergillus Oryzae*'de Üretimi ve Saflaştırılması
3. **D\*\*\*\*\* G\*\*\*\*\*** Fibrinolitik Enzim Olan Nattokinaz'ın *Aspergillus Oryzae*'de Üretimi ve Saflaştırılması Özet
4. **İ\*\*\*\*\*  
K\*\*\*\*\*** Luteolinin Meme Kanseri Hücrelerine ve Yaşlanma ile İlişkili Salgı Fenotipine Karşı Parakrin Etkilerinin Araştırılması

# İYİLEŞTİRİLMİŞ ÖZELLİKLERE SAHİP NİŞASTA TEMELLİ NANOKOMPOZİT HİDROJELLER

## ÖZET

Doğal polimerler biyouyumluluğu, biyobozunurlukları, toksik olmaması gibi birçok özelliği sebebiyle özellikle biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere hidrojel sentezinde tercih edilmektedir. Bu tez kapsamında hidrojel sentezinde en çok kullanılan doğal polimerlerden biri olan nişastanın avantajlarından faydalanarak uygulama alanını genişletmek amacıyla özgün nişasta jelleri hazırlamaya karar verildi. Amiloz/Amilopektin oranının nişasta jelleri üzerindeki bilinen etkisi dikkate alınarak çalışmalar için yüksek Amiloz içeren nişasta Hylon VII kullanıldı. Ancak birçok doğal polimerle hazırlanan hidrojelde olduğu gibi nişastadan elde edilen hidrojellerin de en büyük dezavantajı mekanik dayanıksızlığıdır. Kırılma, bükülme, katlanma gerektiren uygulamalarda bu kırılğan hidrojeller gereksinimleri tam olarak karşılayamamaktadır. Tez kapsamında nişasta hidrojellerinin mekanik dayanımını iyileştirmek amacıyla ağ yapıda enerji dağılımını moleküler seviyede sağlayan bir mekanizma oluşturulması ve böylelikle viskoelastik dağılımın artırılması için iki yöntem kullanıldı. İlk olarak bir nano yapı birimi olan epoksi gruplarıyla fonksiyonlandırılmış 8 kollu kübik glisidil-Polihebral Oligomerik Silseskioksan (g-POSS) nişastanın çapraz bağlanması için kullanıldı ve özgün tek ağ yapıları nanokompozit bir jel elde edildi. İkinci olarak tek ağ yapı varlığında 2 farklı monomer ile ikinci bir ağ yapı oluşturularak çift ağ yöntemi kullanıldı.

Elde edilen nanokompozit nişasta jellerinin karakterizasyon çalışmaları jel fraksiyonu, şişme ölçümleri, temas açısı, SEM analizi, reolojik analizler ve tek eksenli uzama-sıkıştırma ölçümleriyle ayrıntılı olarak incelendi. Mekanik dayanımı iyileşmiş jeller için çalışmanın son aşamasında protein salım uygulamalarında kullanılmak üzere *in vitro* salım ortamı oluşturuldu. Hidrojellerin enzim gibi uyarılara yanıt verebilmesi protein salımını kontrol etmek ve hedeflendirmek için önemli bir özelliktir. Bu doğrultuda nişastanın katalizini sağlayan  $\alpha$ -amilaz varlığında jellerin bozunması sağlandı ve  $\alpha$ -amilaz yokluğunda aynı salım ortamı sağlanarak protein salım kinetiği kıyaslandı. Gelecek çalışmalar için  $\alpha$ -amilaz enzimine duyarlı mekanik dayanımı iyileşmiş jeller, protein veya ilaç salım sistemlerinde potansiyel ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılması bakımından umut vaat etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Nişasta, glisidil-Polihebral Oligomerik Silseskioksan, Hidrojel, Mekanik dayanım, Nanokompozit, Çift ağ yapı, Reoloji, Protein salım.

## FİBRİNOLİTİK LUMBROKİNAZ ENZİMİNİN FİLAMENTLİ MANTAR *Aspergillus oryzae*'de ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASI

### ÖZET

Solucan *Lumbricus bimastus*, vücut boşluğunda ve sindirim sisteminde keşfedilen lumbrokinaz adı verilen fibrinolitik bir enzime sahiptir. Lumbrokinaz özellikle Asya'da uzun yıllardır birçok hastalığın tedavisinde gıda takviyesi olarak kullanılan, klinik onayı almış ve etkinliği kanıtlanmış antitrombotik bir ajandır. Homolog üretim kaynağı lumbrokinaz PI239 için *L. bimastus*'dur. Homolog olarak üretimlerinin kısıtlı, zor, zaman alıcı ve pahalı olması sebebiyle araştırmacılar bu enzimin heterolog çalışmalarına da yönelmiştir. Lumbrokinazın homolog üretimi düşük verimlidir ancak, heterolog üretimi sayesinde üretilen proteinin verimi artırılabilir. Lumbrokinazın şüana kadar sadece bakteri *Escherichia coli*, maya *Pichia pastoris*, keçi sütü, ayçiçeği ve tütün bitkisinde heterolog olarak üretimi yapılmıştır. Ancak literatürdeki varolan çalışmalar incelendiğinde, filamentli bir mantar olan *Aspergillus oryzae*'nin daha önce lumbrokinazın heterolog üretiminde hiç konak ekspresyon sistemi olarak kullanılmadığı tespit edilmiştir. *A. oryzae*, hem yüksek miktarlarda enzim üretme yeteneğine sahip olduğundan hem de GRAS (genel olarak güvenli kabul edilen) statüsünde olduğundan dolayı homolog ve heterolog enzim üretimi için önemli bir endüstriyel kaynak olmuştur. Dolayısıyla fibrinolitik ve trombolitik etkilere sahip olan lumbrokinaz PI239, ilk defa bu çalışmada *A. oryzae*'de başarıyla üretilmiş ve saflaştırılmıştır. C-terminaline 6 tane histidin etiketlenmiş ve TAKA-Amilaz proteinine füzyon olacak şekilde *A. oryzae*'ye kodon optimize edilen lumbrokinaz PI239 enzimi, pUC19 plazmid vektörüne ligasyon yapılarak sentezletirilmiştir. Sentezlenen vektör önce *E. coli* TOP10 hücrelerine soğuk kalsiyum klorür metodu ile transforme edilmiştir. Transforme koloniler Ampisilinli Luria Broth (LB) besiyerine ekilmiştir ve ekspresyon başlatılmıştır. Ekspresyon sonrası midiprep izolasyonu yapılmıştır. EcoRI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesim ve jel ekstraksiyonu sonrası DNA'nın *A. oryzae*'ye protoplast yöntemi ile transformasyonu sağlanmıştır. Daha sonra, CD agar plaklarına ekimi yapılarak koloniler seçilmiştir. Daha spesifik koloniler ve protein salınımları için koloniler DPY besiyerinde inoküle edilmiştir. Daha sonra en iyi koloni seçilerek büyüme hacimli ekspresyon başlatılmıştır. Üretilen histidin etiketli rekombinant protein IMAC metodu (İmmobilize Metal Afinite Kromatografisi) ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan proteinin varlığı SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi) ve Western Blot yöntemi ile ispatlanmıştır. Tampon değişim yöntemi ile protein imidazolden arındırılmıştır ve proteinin konsantrasyonu Bradford yöntemi ile 87 µg/mL olarak saptanmıştır. Ardından titanyumla hazırlanmış trombositten zengin fibrin (T-PRF) ve lökosit zengin fibrin (L-PRF) pıhtılarına fibrinolitik lumbrokinaz enzimi eklenerek oda sıcaklığında 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. 150. saatte kontrol grubu hariç tüm

fibrin pıhtıları tamamen çözünmüştür. Protrombin Testi (PT) ile enzimin pıhtılaşma süresine etkisine bakılmıştır ve kontrol grubuna kıyasla pıhtılaşma süresi 5 saniye daha geç gerçekleşmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Aspergillus oryzae*, Bradford, IMAC, lumbrokinaz, protoplast transformasyonu.

## FİBRİNOLİTİK ENZİM OLAN NATTOKİNAZ'IN *ASPERGILLUS* *ORYZAE*'DE ÜRETİMİ VE SAFLAŞTIRILMASI

### ÖZET

Dünyadaki ölümlerin büyük bir kısmı trombotik hastalık kaynaklıdır. Trombotik hastalıklar, kan hastalığı olarak bilinse de günümüzdeki yaygın birçok hastalığın sebebi olabilir; bunların içinde en ciddi ve ölüme sebep veren hastalıklardan biri de kardiyovasküler hastalıklardır. Bu hastalıkların tedavisi için uzun yıllardır antikoagülan ve antiplatelet ilaçlar kullanılmaktadır, ancak bu ilaçlar trombozu çözmede yeterli etki göstermemektedirler. Fakat fibrinolitik enzimler, kan damarı içindeki fibrin pıhtısını parçalama ve pıhtı üzerinde hareket etme yeteneğine sahiptirler. Bu nedenle fibrinolitik enzimler, kardiyovasküler hastalıklar başta olmak üzere birçok trombotik hastalığın tedavisinde büyük önem taşımaktadır. Nattokinaz adlı bir fibrinolitik enzim, *Bacillus subtilis natto*'nun *aprN* geni tarafından kodlanır. Nattokinaz, soya fasulyesi ürünü natto'nun fermentasyonu sırasında *Bacillus subtilis* tarafından üretilir. Nattokinaz, trombolitik ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde kullanılan ve ileri çalışmalar için umut vadeden bir enzimdir. Nattokinaz, antitrombotik, antihipertansif, antikoagülan, anti-aterosklerotik ve nöroprotektif etkilere sahiptir. Ayrıca nattokinaz, birçok ülkede “nutrasötik” olan doğal bir üründür. Oral uygulamaya uygun olup kanıtlanmış bir güvenlik profiline sahiptir, kullanımı ucuzdur ve diğer farmasötik ürünlere göre birçok avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda Nattokinaz enziminin *Aspergillus oryzae*'de üretilmesi ve saflaştırılması hedeflenmiştir. Bu çalışma literatürde bir ilk niteliğindedir. *A. oryzae*, kolay kültüre edilebilme, optimize edilebilme, hızlı büyüme, güçlü protein salgılama yeteneklerine sahiptir. Ayrıca *A. oryzae*, yüksek verimli, güvenli ve düşük maliyetli olması nedeniyle bu çalışma için seçilmiştir. Son zamanlarda, enzim üretiminde konak hücre olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bunun sebebi ise *A. oryzae*'nin amilolitik ve proteolitik enzimler gibi büyük miktarlarda hidrolitik enzim üretebilme yeteneğidir. Bu yetenek sayesinde *A. oryzae*, homolog ve heterolog enzim üretimi için önemli bir kaynak oluşturmaktadır.

Bu çalışmada Nattokinaz geni, C-Terminaline 8xHis-tag etiketlenerek, *Aspergillus* kodon optimizasyonuna uyarlanmış ve Amilaz genine füzyon edilmiş şekilde GenScript tarafından sentezlenmiştir. Ardından kalsiyum klorür yöntemi ile kompetent bakteriye (*Escherichia coli* One Shot) transforme edilmiştir. Ampisilin dirençli LB besiyerinden koloni seçilerek plazmit izolasyonu yapılmıştır. Plazmit, restriksiyon enzimleriyle doğrusal hale getirilmiş ve Agaroz Jel Elektroforezi yapılmıştır. Jelden hedef DNA tespit edilerek ve izolasyonu yapılarak *A. oryzae*'e transformasyonu gerçekleştirilmiştir (Protoplast Aracılı Transformasyon). Örnekler CD Agar plakalarına ekilmiş ve 5-7 gün 30°C'de inkübe edilmiştir. Koloniler SDS-PAGE'de kontrol edilmiştir. Seçilen koloniler DPY besiyerinde kültür edilmiş ve 5-7 gün 30°C'de inkübe edilerek ekspresyonları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra ekspresyonu tamamlanan proteinlerin saflaştırılması için IMAC metodu kullanılmıştır.

Ekspresyon kontrolü ve protein analizi için SDS-PAGE ve ardından Western Blot yapılarak protein saptanmıştır. Yapılan Western Blot sonucunda, Nattokinaz enziminin füzyon şekilde üretimi ve saflaştırılmasının başarıyla gerçekleştirildiği görülmüştür. Çalışma sonucunda 106.66 mg/L NTK enzimi üretilmiştir. İki adet aktivite testi yapılmıştır. Protrombin zamanı testinde, NTK'nın pıhtılaşmayı yaklaşık 8sn yavaşlattığı, pıhtılaşma yüzdesini ciddi oranda düşürdüğü ve INR sonucunda pıhtılaşmayı ciddi oranda yavaşlattığı görülmüştür. Yapılan diğer aktivite testi ise titanyum tüplerde kandan elde edilmiş fibrin parçalarının enzim olan mikrosantrifüj tüplerine aktarılması ve parçalanmanın olup olmadığını gözlemlemek esasına dayanır. Gözlem sonucunda 5-7 gün içinde fibrinin tamamen parçalandığı görülmüştür. Yapılan aktivite testleri sonucunda NTK'nın biokatif bir enzim olduğu kanıtlanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** *Aspergillus oryzae*, Fibrinolitik enzim, Nattokinaz, Protein saflaştırma, Protein üretimi, Transformasyon

# **LUTEOLİNİN MEME KANSERİ HÜCRELERİNE ve YAŞLANMA ile İLİŞKİLİ SALGI FENOTİPİNE KARŞI PARAKRİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

## **ÖZET**

Yaşlanma, genetik bir program tarafından düzenlenen ve organizmada çevresel faktörlerin etkisiyle meydana gelen yapısal, işlevsel ve psikolojik değişmelerin toplamıdır. İlerleyen kronolojik yaşla bağlı bir dizi hastalık için en büyük risk faktörüdür. Yaşlanmanın kanser hastalığıyla olan ilişkisine dair yapılan çalışmalarda görüş, yaşlanan hücrelerin dokularda biriktiği ve yaşlanmayla birlikte dejenerasyona yol açtığı yönündedir. Dolayısıyla temel yaşlanma sürecine yapılan müdahaleler kanser hastalığı başta olmak üzere yaşa bağlı birçok hastalığı iyileştirme konusunda umut vaat etmektedir.

Temel yaşlanma sürecinin ayırt edici özelliklerinden biri hücresel yaşlanmadır. Hücresel yaşlanma, bölünebilen hücreler tarafından benimsenen çok yönlü bir stres tepkisidir. Yapılan in vivo çalışmalarda, çeşitli sitokin, kemokin, büyüme faktörü ve proteaz içeren karmaşık bir mekanizma ile yaşlanmayla ilişkili salgılama fenotipinin (SAPS) oluştuğu ve buna bağlı olarak hücre proliferasyonunun geri döndürülemez bir şekilde durdurulduğu gösterilmiştir. Salgılama fenotipini (SAPS) baskılayabilen düzenleyici molekülleri belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda, önemli bir SAPS bileşeni olan IL-6 üzerinden bazı flavonoidler salgı fenotipi (SAPS) inhibitörü olarak tanımlanmıştır. Bu flavonoid grubunun yaşlanma sürecini baskılayabileceği ve sinyal iletim yollarını düzenleyebileceği fikrini desteklemektedir.

Luteolin, birçok bitki türünde yaygın olarak bulunmaktadır. Hücre üzerinde metastaz, apoptoz ve anjiyogenez dahil olmak üzere karsinogenezin ilerlemesindeki bir çok noktayı bloke edebilen bir flavonoid olduğu gösterilmiştir. Literatür bilgileri dahilinde luteolinin yapısı, etkilediği hücresel yollar ve tümör gelişimi

üzerindeki etkileri göz önüne alındığında, SAPS fenotipi ile ilişkili olması hipotezini gündeme getirmiştir.

Proje kapsamında luteolin flavonoidinin, meme kanseri hücreleri üzerinde, proliferasyonu ve yaşlanmayla ilişkili stres yanıtı olan salgı fenotipini (SAPS) hangi ölçüde baskıladığını göstermek amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda çalışmada yaşlandırılmış fibroblast hücre modeli oluşturulacaktır. Daha sonra bu hücrelerin meme kanseri hücreleri üzerindeki parakrin etkileri incelenecektir. Luteolin uygulanan bu hücrelerde, IL-6/NF-κB sinyal iletim yolağını düzenleyerek salgı fenotipinin baskılması ve kanser hücrelerinin proliferasyon, migrasyon özelliklerinin engellenebildiğini göstermek hedeflenmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Luteolin, SASP, Hüresel Yaşlanma, IL-6.