

BİYOTEKNOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

2024

1. Ö**** B***** Kırım Kongo Kanamalı Ateş Virüsü Kelkit Suşu Proteinlerinin Ökaryotik Hücrelerde Stabil İfadesi
2. B*** S***** Kanser Hücre Membranı Kaplı Manyetik Nanoparçacıkların Sentezi ve Glioblastoma Tedavisinde Sitotoksik Etkinliğinin İncelenmesi

KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞ VİRÜSÜ KELKİT SUŞU PROTEİNLERİNİN ÖKARYOTİK HÜCRELERDE STABİL İFADESİ

ÖZET

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA), insanlarda ciddi hastalığa neden olan zoonotik bir bulaşıcı hastalıktır. Bu hastalık özellikle vektör kenelerin endemik olduğu ülkelerde yüksek ölüm oranı ile karakterizedir. KKKAV'nün biyolojisi ve immunolojisine yönelik çalışmalarda viral proteinler diğer viral sistemde olduğu gibi büyük öneme sahiptir. KKKAV proteinlerinin çeşitli süreçlerdeki önemi birçok araştırmalarda ele alınmış ve bu çalışmalarda KKKAV proteinleri genellikle geçici ifade sistemleri kullanılarak üretimi sağlanmıştır. Bununla birlikte, proteinlerin stabil ifadesi tüm çalışmalar için zaman içerisinde tutarlı ve güvenilir bir model olmaktadır. Bu yüksek lisans tez çalışmasında, insan hücrelerindeki glikozilasyon süreçlerini taklit edebilen ökaryotik hücre hatları kullanarak KKKAV glikoproteinlerinin ve nükleoproteinlerinin stabil ekspresyon ile sürekli bir şekilde üretilmesini amaçlanmıştır. Bunun için insan hepatoselüler hücre hatları (Huh-7), KKKAV proteinlerinin stabil ifadesinde kullanılmıştır. Hücrelerde seleksiyon için seçici antibiyotiklere olan dirençleri, MTT analizi ile değerlendirilmiştir. KKKAV NP, PreGn ve PreGc kodlayan plazmitler Lipofectamine® 3000 ve polietilenimine (PEI) gibi transfeksiyon ajanlarının yardımıyla hücrelere aktarılmıştır. KKKAV nükleoproteinlerini ve glikoproteinlerini kararlı bir şekilde ifade eden hücreler, antibiyotiklere dirençli olan kolonilerin seleksiyonu ile üretilmiştir. Hücrelerde transfekte edilen genin stabil ekspresyon için genoma entegrasyonunun tespiti, transfekte edilen KKKAV genlerine özgü primerler tasarlanarak polimeraz zincir reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Genomik düzeydeki doğrulamaların yanı sıra hücrelerdeki hedef proteinlerin ifadesi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, Western blot, enzim immünoanalizleri ve immunfloresan analizleri ile de test edilmiştir. Yapılan deneyler, KKKAV proteinlerinin stabil hücrelerde başarılı bir şekilde ifade edildiğini göstermiştir. Western blot analizi, stabil hücre hatlarında üretilen proteinlerin beklenen boyutta olduğunu ve antijenitelerini doğrularken, EIA analizi bunların antijenik özellikleri tekrar test edilmiştir. Ayrıca, immunfloresan yöntemle mikroskopik görüntüleme üretilen proteinlerin hücreler içindeki lokalizasyonunu ortaya koymuştur. Özetle, bu tez çalışmasında, stabil hücrelerde KKKAV'nün nükleoprotein ve glikoproteinleri başarılı bir şekilde üretilmiştir. Bu stabil hücre hatlarının, KKKAV'nün biyolojisi, immunolojisi ve patojenezi üzerine daha detaylı araştırmalarda önemli araçlar olarak hizmet etmesi beklenmektedir; çünkü bu virüs, araştırılması gereken öncelikli patojenlerden biri olarak kabul edilmektedir.

Anahtar Kelimeler: KKKAV, Glikoprotein, Nükleoprotein, Stabil ifade.

ÖZET

KANSER HÜCRE MEMBRANI KAPLI MANYETİK NANOPARÇACIKLARIN SENTEZİ VE GLİOBLASTOMA TEDAVİSİNDE SİTOTOKSİK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Glioblastoma (GBM), yetişkinlerde en sık görülen ve en ölümcül primer beyin kanseridir. GBM'de cerrahi rezeksiyondan sonra hastalığın tedavisinde kemoterapi en yaygın yöntemdir. Ancak GBM'de ilaç tedavisinin klinik etkinliği çok tatmin edici değildir. GBM için etkili ilaç dağıtımı, zayıf fizikokimyasal özellikler, terapötik moleküllerin düşük hedefleme yeteneği ve hem kan-beyin bariyerinin (KBB) em de kan-beyin tümör bariyerinin (KBTB) varlığı nedeniyle büyük ölçüde sınırlıdır. Bu nedenle GBM tedavisinde fizyolojik ve patolojik engelleri aşan yeni terapötik platformların geliştirilmesine acil ihtiyaç vardır. Bilim insanları, nanotaşıyıcı sistemlerin biyouyumluluğunu ve aktif hedefleme yeteneğini artırmak için hücre membranı (HM) kamuflajı gibi yeni tedavi yaklaşımları geliştirmeye odaklanmaktadır. Hücre membranı nanopartiküllerin kullanımı, geleneksel uygulamalara geniş bir işlevsellik yelpazesi sunmak için etkili bir yaklaşım haline gelmektedir. Hücre membranlarını nanopartikül yapılarla birleştirerek doğal biyomimetik nanoyapılar elde etmek gelişen bir araştırma alanıdır. Hücre membranlarının nanopartiküller üzerine kaplanması etkili bir biyo-arayüz sağlamaktadır. Bu nanotaşıyıcıların karmaşık biyolojik aktiviteleri doğrudan kopyalayan yüzeylere sahip olarak tasarlanmasıyla, esas olarak hücre zarından türetilen ve ana hücrenin özelliklerini taklit eden yapıların oluşumu sağlanarak vücutta uzun süreli dolaşım ve aktif hedefleme sağlanabilmektedir. Bu çalışmada sentezlenen biyomimetik nanoplatformun GBM tedavisindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. İlk olarak manyetik demir oksit parçacıkları birlikte çöktürme yöntemiyle sentezlenmiştir. Manyetik demir oksit parçacıklarının boyut dağılımı ve zeta potansiyeli dinamik ışık saçılımı (DLS) aracılığıyla analiz edilmiştir. İnsan beyninden izole edilmiş glioblastoma astrositomalarından U87-MG hücre hattından membran fragmentleri izole edilmiş ve zar proteinlerinin tespiti western blot yoluyla gerçekleştirilmiştir. Daha sonra koekstrüzyon yöntemiyle biyomimetik nano platform ($Fe_3O_4@U87HM$) birleştirilmiştir. Tersiyer butoksit korumalı lizin metakrilat (*tBoc*₂LzMA), temozolomid metakrilat (TMZMA) ve 2-hidroksi-etil metakrilat (HEMA) ünitelerini içeren kopolimerler RAFT polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Daha sonra *tBoc* koruma grupları asidik hidroliz reaksiyonu yoluyla uzaklaştırılmıştır. Polimerler Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi, jel geçirgenlik kromatografisi ve Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (¹H NMR, GPC ve FTIR) analizleri ile karakterize edilmiştir. GPC analizinde polimerler monomodal dağılım sergilemiştir. Elektrostatik etkileşimlerden yararlanılarak nihai biyomimetik nanoplatform ($Fe_3O_4@U87HM@P$) hazırlanmıştır. Biyomimetik nanoplatformların boyutu ve morfolojisi TEM analizi kullanılarak karakterize edilmiştir. Elde edilen nanoplatformun U87-MG glioblastoma kanser hücre ve kontrol hücre hattı olarak CCD-1079Sk sağlıklı insan fibroblast hücre

hattına karşı tedavi edici etkisi 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi ile sitotoksisite açısından değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Glioblastoma Multiform, Temozolomid, biyomimetik nanoplatform