

ÖZET

Hipotalamustan salınan ve bir nöropeptit olan büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH) ile reseptörünün kolon, pankreas, prostat, yumurtalık, meme gibi pek çok kanser hücrelerinde anlatımına bağlı aktif sinyal iletimi olduğu bilinmektedir. GHRH sinyalinin peptit antagonistleri kullanılarak bloke edilmesinin karsinojenik etkisinin çeşitli kanser hücrelerinde *in vitro* ve *in vivo* ortamda gösterilmektedir. Bu durum GHRH sinyalinin bloke edilmesinin terapötik bir stratejisini ortaya koymaktadır. Aptamerler, hedef moleküle yüksek bağlanma afinitesi olan küçük nükleik asit molekülleri olarak teşhis, tedavi gibi amaçlar çerçevesinde kullanılmaktadır. Yeni jenerasyon modifiye aptamerlerin terapötik etkinliğinin yüksek olması sebebiyle magnetik bead teknolojiye dayalı X-Aptamer üretilmektedir.

Bu tez ile amacımız GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerin üretilmesi, karakterize edilmesi ve anti-karsinojenik etkisinin GHRH anlatımı olan kanser hücreleri üzerinde GHRH sinyaline ket vurması göz önünde bulundurularak incelenmesidir. Biyolojik aktivitesi ilk 29 amino asitte bulunan GHRH (1-29) peptidinin biotinlenmesini takiben, magnetik beadlere tutturularak modifiye aptamer kütüphanesi ile muamele edilerek çoğaltılan, dizi analizi ile sekansı belirlenen olası 5 tane X-Aptamerden GHRH 1-29 peptidine bağlanma afinitesi TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerler için 2 kat olduğu dot blot yöntemi ile tespit edilmiştir. Doza bağlı olarak TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerin GHRH (1-29) peptidine bağlanma afiniteleri (Kd) sigma plot programı aracılı non-linear regreasyon yöntemi ile belirlenmiştir. TKY.T2.08 için 48,19 nM ve TKY.T2.09 için 24,20 nM olduğu tespit edilmiştir. Her iki X-Aptamerin GHRH ligand ile hücre yüzeyine bağlandığı immunofloresan (IF) yöntemi ile belirlenmiştir ve GHRH sinyali aşağı yolağı elemanları olan GH ve GHRH-R anlatımına ket vurduğu IF boyalamalar ile MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde gösterilmiştir. 72 saat boyunca 500 nM TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin MIA PaCa-2 pankreas kanseri, HT29 kolon kanseri, PC3 prostat kanseri hücrelerinde bağlı Ca^{+2} miktarını arttırsa da cAMP miktarı üzerinde istatistiksel açıdan belirgin bir baskılayıcı etki göstermemektedir. Ayrıca TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin en fazla HT29 kolon kanseri ve MIA PaCa-2 pankreatik kanser hücrelerinin hücre canlılığına istatistiksel açıdan belirgin ket vurma ve mitokondriyel membran potansiyelini düşürme etkileri tespit

edilmiştir. Seçili GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerlerinin hücre döngüsü üzerine etkisi irdelendiğinde TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerin hücre döngüsüne ket vurmada en fazla HT29 kolon kanseri ve MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde en az PC3 prostat kanseri hücrelerinde SubG1 hücre popülasyonu birikimine neden olduğu PI hücre akış sitometresi analiz ile gösterilmiştir. GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerin apoptotik ölüm üzerine etkisi irdelendiğinde floresan boyama ve PI sonuçları ile paralellik göstererek hem TKY.T2.08 hem de TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin en yüksek apoptotik etkisi yine GHRH anlatımı yüksek olan MIA PaCa-2 pankreatik kanseri ve HT29 kolon kanseri hücrelerinde olduğu Annexin V/PI hücre akış sitometresi ile gösterilmiştir.

Sonuç olarak bu tez ile ilk defa GHRH 1-29 özgü X-Aptamer sentez edilmiş, liganda bağlanma afiniteleri gösterilmiş, GHRH sinyal yolağında ket vurma potansiyeli GH ve GHRH-R anlatımlarına ket vurma etkisi üzerinden belirlenmesinin yanında, GHRH anlatımı ve salgı profiline göre hücre canlılığına ket vurma, apoptotik ölümü tetikleme en fazla MIA PaCa-2 pankreas kanseri ve HT29 kolon kanseri hücrelerinde en az PC3 prostat kanseri hücrelerinde olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: GHRH 1-29, Prostat Kanseri, Pankreas Kanseri, Kolon Kanseri, X-Aptamer

SUMMARY

It is known that active signal transduction in many cancer cells such as colon, pancreas, prostate, ovary, breast, is caused by the expression of hypothalamic neuropeptide growth hormone releasing hormone (GHRH), and its receptor. Demonstration of the carcinogenic effect of blocking the GHRH signal with peptide antagonists in various cancer cells *in vitro* and *in vivo* provides a therapeutic strategy for blocking the GHRH signal. Aptamers are used as a small nucleic acid molecule with high binding affinity to the target molecule for purposes such as diagnosis and treatment. Due to high therapeutic efficiency of the new generation X-Aptamer which is produced by magnetic bead technology.

With this thesis, our aim is to produce and characterize X-Aptamers specific to GHRH (1-29) and to examine the anti-carcinogenic effect by inhibiting the GHRH signal on cancer cells with GHRH expression. Following biotinylation of GHRH (1-29) peptide, which has the biological activity in the first 29 amino acids, new X-Aptamers are produced by attaching to magnetic beads and applying modified aptamer library. Five putative GHRH 1-29 specific X-Aptamers are determined by sequence analysis. The binding affinity of two of five putative GHRH (1-29) specific X-Aptamers (TKY.T2.08 and TKY.T2.09) have two-fold higher binding affinity (Kd) as compared to non-aptamers by dot-blot analysis. The Kd levels of TKY.T2.08 and TKY.T2.09 X-Aptamers were determined by the non-linear regression method in sigma plot. Kd values for TKY.T2.08 and TKY.T2.09 were 48.19 nM and 24.20 nM, respectively. By immunofluorescence staining, both X-Aptamers binds to GHRH-R via GHRH ligand in MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells and inhibits GHRH signaling downstream elements expression such as GH and GHRH-R. 500 nM TKY.T2.08 and TKY.T2.09 aptamers were applied to MIA PaCa-2 pancreatic cancer, HT29 colon cancer, PC3 prostate cancer cells for 72 hours. Although each X-Aptamers increased the intracellular Ca⁺² levels, they do not show a statistically significant suppressive effect on the amount of cAMP concentrations. In addition, the effects of TKY.T2.08 and TKY.T2.09 X-Aptamers on HT29 colon cancer and MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells were statistically significant in inhibiting cell viability and decreasing mitochondrial membrane potential. The effect of selected GHRH 1-29 specific X-Aptamers on cell cycle and SubG1 population were examined by PI staining FACS

flow analysis. Although there was no effect of X-Aptamers on cell cycle phases, higher SubG1 cell accumulation was determined highest in HT29 colon and MIA PaCa-2 pancreatic cancers cells but low in PC3 prostate cancer cells. The effect of GHRH 1-29 specific X-Aptamers on apoptotic death is performed by Annexin V/PI cell flow cytometry, it was shown that the apoptotic effect of both TKY.T2.08 and TKY.T2.09 X-Aptamers is highest in MIA PaCa-2 pancreatic cancer and HT29 colon cancer cells, which has also high GHRH expression.

As a summary, with this thesis, for the first time GHRH 1-29 specific X-Aptamer was synthesized, ligand binding affinities were shown, the potential inhibitive effect on GHRH signaling via suppressive effect on GH and GHRH-R expressions, as well as inhibit cell viability loss according to GHRH expression and secretion profile was determined. In addition, two GHRH (1-29) specific X-Aptamers induced cell viability and mitochondrial membrane potential loss and triggered apoptotic cell death higher in MIA PaCa-2 pancreatic cancer and HT29 colon cancer cells, low in PC3 prostate cancer cells.

Key words: GHRH 1-29, Prostate Cancer, Pancreatic Cancer, Colon Cancer, X-Aptamers,