

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**BÜYÜME HORMONU SALGILATICI HORMON (GHRH) 1-29 ÖZGÜ
APTAMERLERİN SENTEZLENMESİ KARAKTERİZASYONU VE
ANTİ-KARSİNOJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep Elif APAYDIN

1600005983

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

TEMMUZ 2020

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**BÜYÜME HORMONU SALGILATICI HORMON (GHRH) 1-29 ÖZGÜ
APTAMERLERİN SENTEZLENMESİ KARAKTERİZASYONU VE
ANTİ-KARSİNOJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep Elif APAYDIN

1600005983

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

Jüri Üyeleri: Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA

Prof. Dr. Elif Damla ARISAN (Gebze Teknik Üniversitesi)

TEMMUZ 2020

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım ve yüksek lisans eğitimim süresince değerli fikirlerini ve tecrübelerini benden esirgemeyen, her aşamada yol gösterici olan ve yetişmemde çok büyük emeği geçen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Lisans, yüksek lisans eğitimim ve laboratuvarında çalıştığım süre boyunca bilgi ve deneyimleriyle eğitim hayatıma olan yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL, Sayın Prof. Dr. Elif Damla ARISAN, Sayın Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA'a,

Yüksek lisans eğitim boyunca laboratuvarında birlikte çalıştığım her zaman yanımda bana destek olan, bilgilerini ve tecrübelerini bana aktarmaktan çekinmeyen Araş. Gör. Burcu AYHAN ŞAHİN'e

Laboratuvara geldiğim ilk günden itibaren hoşgörü ile beni karşılayan Araş. Gör. Özge BERRAK, Araş. Gör. Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ, Araş. Gör. Alp AYAN ve Araş. Gör. Sinan MERİÇ'e

Yüksek lisans eğitimim boyunca her daim yanımda olan ve desteğini her zaman hissettiren sevgili Araş. Gör. Tamer GÜMÜŞ'e

Lisans eğitimin boyunca yanımda ve yüksek lisans eğitimimde uzakta da olsalar her zaman destek olan sevgili arkadaşlarım Yeşim Damla USTA KATIRCI, Nurbanu İNCE, Zennur BERBER'e

Yüksek lisans arkadaşlarım sevgili Fadina KURYAYEVA, Börteçine SEVGİN, Mervenur ÇOBAN'a

Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olarak beni destekleyen okumanın en büyük erdem olduğunu söyleyen canım babam İsmail APAYDIN, benim için her türlü fedakarlıkta bulunup sonsuz destek veren bir tanecik annem Tülay APAYDIN ve bu hayatta şansım olduğuna inandığım abim Emre APAYDIN'a teşekkür ederim.

Bu tez TÜBİTAK 1001 Projesi (Proje no: 117Z254, 2017-2020) tarafından desteklenmiştir. Bu proje kapsamında verdiği destekten dolayı TÜBİTAK'a ve projem için çalışma olanağı sağlayan İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarına teşekkürü borç bilirim.



Temmuz, 2020

Zeynep Elif APAYDIN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	iii
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	xii
SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ	xvi
ÖZET	xvii
SUMMARY	xix
BÖLÜM 1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1 GİRİŞ	1
1.2 AMAÇ	3
BÖLÜM 2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 KANSER	4
2.1.1 Kanser Epidemiyolojisi	7
2.1.2 Kanser ve Büyüme Faktörleri	9
2.1.2.1 Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)	9
2.1.2.2 İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF)	10
2.1.2.3 Tümör Büyüme Faktörü-Beta (TGF- β)	12
2.1.2.4 Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF)	12
2.1.2.5 Trombosit Türevi Büyüme Faktörü (PDGF)	13
2.1.2.6 Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	13
2.2 BÜYÜME HORMONU SALGILATICI HORMON (GHRH)	14
2.2.1 GHRH Sinyali	16
2.2.2 GHRH ve Kanser	17
2.2.3 GHRH Agonistleri	18
2.2.4 GHRH Antagonistleri	19
2.3 APTAMER	21
2.3.1 Üstel Zenginleştirme ile Ligandların Sistemik Evrimi (SELEX)	22
2.3.1.1 SELEX Tipleri	23
2.3.2 Aptamerlerin Uygulama Alanları	24
2.3.2.1 Aptamerlerin Terapötik Olarak Kullanımı	24
2.3.2.2 Aptamer Tabanlı Biyosensörler	25

2.3.2.3 Biyomedikal Görüntüleme için Aptamerler.....	26
2.3.2.4 Aptamer Modifikasyonu ve Aptamer ile Hedefe Yönelik İlaç	26
2.4 X-APTAMER	27
BÖLÜM 3 MATERYAL VE METHOD.....	28
3.1 KULLANILAN MATERYALLER	28
3.1.1 Kullanılan Cihazlar	28
3.1.2 Hücre Kültürü Donanımları	28
3.1.3 Kullanılan Kimyasallar	28
3.1.4 Kullanılan Tamponlar	28
3.2 KULLANILAN YÖNTEMLER	28
3.2.1 GHRH 1-29 Peptidinin Biotinlenmesi	28
3.2.2 X-Aptamer Seçilimi	28
3.2.2.1 X-Aptamer Kütüphanesinin Hazırlanması.....	28
3.2.2.2 Negatif Seçilim.....	29
3.2.2.3 Hedef Proteinin Manyetik Boncuklarla Birleştirilmesi	29
3.2.2.4 Pozitif Birincil Seçilim.....	29
3.2.2.5 Putatif Aptamerlerin Kesilmesi.....	30
3.2.2.6 Spin Kolon Tampon Değişimi	30
3.2.2.7 İkincil Seçilim	30
3.2.2.8 PCR ve Jel Analizi	30
3.2.2.9 İlave Başlangıç Havuzu PCR.....	31
3.2.2.10 GHRH'ye Özgü X-Aptamer Adaylarının Dizilerinin Belirlenmesi Ve Sentezlenmesi.....	31
3.2.3 Dot Blot.....	31
3.2.4 ELİSA	32
3.2.5 Hücre Kültürü.....	32
3.2.5.1 Hücrelerin Büyütülmesi	32
3.2.5.2 Hücrelerin Kaldırılması, Sayımı ve Pasajlanması	32
3.2.5.3 Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi	33
3.2.6 Protein İzolasyonu.....	33
3.2.7 Bradford ile Protein Miktar Tayini Yöntemi	34
3.2.8 İmmunoblotlama	34
3.2.8.1 Poliakrilamid Jelin Hazırlanması	34
3.2.8.2 Proteinlerin Hazırlanması.....	34

3.2.8.3 Islak Transfer ve Bloklama	35
3.2.8.4 Primer ve Sekonder Antikor	35
3.2.8.5 Görüntü Alınması.....	35
3.2.9 Doza ve Zamana Bağlı Hücre Canlılık Testi (MTT)	36
3.2.10 cAMP Miktarının Tespit Edilmesi	36
3.2.11 Floresan Boyama.....	37
3.2.11.1 Diheksilokarbosiyanin İyodür (DiOC ₆) Boyama	37
3.2.11.2 Propidyum İyodür (PI) Boyama.....	37
3.2.11.3 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama.....	37
3.2.11.4 İmmünofloresan (IF)	38
3.2.11.5 Biotin işaretli X-Aptamerlerin MIA PaCa-2 hücre yüzeyine bağlandığının immunofloresan boyama ile gösterilmesi	39
3.2.11.6 Ca ⁺² Green Boyaması.....	39
3.2.12 Hücre Akış Sitometresi	39
3.2.12.1 PI Analizi	39
3.2.12.2 Annexin V/PI Analizi.....	40
3.2.13 İstatistiksel Analiz.....	40
BÖLÜM 4 SONUÇLAR.....	41
4.1 GHRH 1-29 Özgü X-Aptamerlerin Sentez Edilmesi ve Dizilerinin Belirlenmesi	41
4.2 GHRH 1-29 Özgü X-Aptamerlerin Bağlanma Afinityelerinin Gösterilmesi	46
4.3 Farklı Hücre Hatlarında GHRH Anlatım Profillerinin Gösterilmesi	49
4.4 GHRH 1-29 Özgü Potansiyel X-Aptamerlerin GHRH Sinyali Üzerine Ket Vurucu Etkisinin Gösterilmesi.....	52
4.5 GHRH 1-29 Özgü X-Aptamerlerin MIA Paca-2, HT29, PC3 Ve PNT1A Hücre Hatlarında Hücre Canlılığı ve Mitokondriyel Membran Potansiyeli Üzerine Etkilerinin Gösterilmesi	57
4.6 GHRH 1-29 Özgü X-Aptamerlerin MIA Paca-2, HT29, PC3 Ve PNT1A Hücre Hatlarında Hücre Döngüsü Üzerine Etkilerinin PI Boyaması ile Hücre Akış Sitometresinde Gösterilmesi	71
4.7 GHRH 1-29 Özgü X-Aptamerlerin MIA Paca-2, HT29, PC3 Ve PNT1A Hücre Hatlarında Apoptotik Ölüm Üzerine Etkilerinin Annexin V/PI Boyaması ile Hücre Akış Sitometresinde Gösterilmesi.....	75
BÖLÜM 5 TARTIŞMA.....	79

KAYNAKÇA.....	90
EKLER.....	104
ÖZGEÇMİŞ	113



TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1 GHRH 1-29 Özgü X-Aptamer Sentez Kiti ile Elde Edilen Potansiyel X-Aptamerlerin Nükleotid Dizileri	42
Tablo 5.1 Kullanılan Cihazların Listesi	104
Tablo 5.2 Hücre Kültürü Donanımları	105
Tablo 5.3 Kullanılan Kimyasalların Listesi	106
Tablo 5.4 Kullanılan Tamponların İçeriği	109
Tablo 5.5 4X Laemmlı Tamponu İçeriği	111
Tablo 5.6 Kemiluminesans Görüntüleme Tamponları İçeriği	111
Tablo 5.7 %12 (v/v) Poliakrilamid Jel İçeriği.....	111
Tablo 5.8 İmmünoflöresan (IF) Kullanılan Kimyasallar İçeriği.....	112

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Kanserin oluşum mekanizması [16].....	5
Şekil 2.2 Kansere hücrelerinin 10 temel özelliği [17]	6
Şekil 2.3 Kansere tiplerinin şematik olarak gösterimi	7
Şekil 2.4 Dünya sağlık örgütü 2018 verilerine göre erkeklerde ve kadınlar ilk 10 sırada yer alan kansere türleri ve görülme sıklığı [22]	8
Şekil 2.5 Dünya sağlık örgütü 2018 verilerine göre kansere türlerinde görülen hasta ve ölüm oranları [22]	9
Şekil 2.6 Kanserojenite ile ilgili kritik hücresel fonksiyonları düzenleyen epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGF-R) kaynaklı sinyallerinin şematik olarak gösterimi [24]	10
Şekil 2.7 IGF sinyalinin şematik gösterimi [28]	11
Şekil 2.8 GHRH'nin çeşitli formlarının amino asit dizilerinin şematik olarak gösterimi [41]	15
Şekil 2.9 GHRH/GH/IGF1 Sinyal yolağının şematik olarak gösterimi [53]	17
Şekil 2.10 GHRH agonistlerinin hücreler üzerindeki etkilerinin şematik olarak gösterilmesi [42].....	19
Şekil 2.11 Aptamerlerin yapısı, özellikleri ve biyomedikal uygulamaları için fonksiyonel olarak gösterimi [74]	21
Şekil 2.12 SELEX yönteminin şematik olarak gösterilmesi [81]	23
Şekil 2.13 Biyosensörlerin çalışma prensibinin şematik olarak gösterimi [89].....	25
Şekil 4.1 GHRH 1-29 özgü X-Aptamer sentez kiti kullanılarak elde edilen potansiyel X-Aptamerlerin PCR sonuçlarının agaroz jelde gösterilmesi	41
Şekil 4.2 TKY.T2.02 potansiyel GHRH 1-29 özgü X-Aptamer için serbest enerji değerleri ve olası iki boyutlu yapılarının gösterilmesi.....	43
Şekil 4.3 TKY.T2.06 potansiyel GHRH 1-29 özgü X-Aptamer için serbest enerji değerleri ve olası iki boyutlu yapılarının gösterilmesi.....	44
Şekil 4.4 TKY.T2.07 potansiyel GHRH 1-29 özgü X-Aptamer için serbest enerji değerleri ve olası iki boyutlu yapılarının gösterilmesi.....	44
Şekil 4.5 TKY.T2.08 potansiyel GHRH 1-29 özgü X-Aptamer için serbest enerji değerleri ve olası iki boyutlu yapılarının gösterilmesi.....	45
Şekil 4.6 TKY.T2.09 potansiyel GHRH 1-29 özgü X-Aptamer için serbest enerji değerleri ve olası iki boyutlu yapılarının gösterilmesi.....	46

Şekil 4.7 GHRH 1-29 peptidi ile GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerlerin bağlanma afinitelerinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi.....	47
Şekil 4.8 GHRH 1-29 özgü potansiyel TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin X-Aptamer dozuna bağlı (0-1000 nM) olarak bağlanma afinitelerinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi	48
Şekil 4.9 GHRH 1-29 özgü potansiyel TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin GHRH 1-29 peptit dozuna bağlı (0-1000 nM) olarak bağlanma afinitelerinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi	49
Şekil 4.10 MIA PaCa-2, HT29, LNCaP, PNT1A, PC3 hücre hatlarında GHRH anlatım profillerinin immnoblottlama yöntemi ile gösterilmesi	50
Şekil 4.11 MIA PaCa-2, HT29, PC3, PNT1A, LNCaP hücre hatlarında GHRH anlatım profillerinin İmmunofloresan (IF) yöntemi ile gösterilmesi	51
Şekil 4.12 MIA PaCa-2, HT29, LNCaP, PNT1A, PC3 hücre hatlarında medyaya salınan GHRH miktarının GHRH ELİSA yöntemi ile gösterilmesi	52
Şekil 4.13 X-Aptamerlerin GHRH sinyali aşağı yolak elemanları olan GH ve GHRH-R anlatımları üzerine etkisinin immunofloresan (IF) yöntemi ile gösterilmesi	53
Şekil 4.14 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerlerin GHRH sinyaline ket vurucu etkisinin hücre içi cAMP aktivitesine bağlı olarak gösterilmesi.....	54
Şekil 4.15 TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerlerin MIA PaCa-2, HT29, PC3 ve PNT1A hücre hatlarından GHRH sinyaline ket vurucu etkisinin Ca^{+2} green boyaması ile gösterilmesi.....	56
Şekil 4.16 GHRH 1-29 özgü potansiyel TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerin hücrelerde bağlanma bölgelerinin X-Aptamer dozuna bağlı (0-500 nM) olarak immunofloresan (IF) yöntemi ile gösterilmesi.....	57
Şekil 4.17 TKY.T2.02 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerin MIA PaCa-2, HT29, PC3 ve PNT1A hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemiyle gösterilmesi.....	59
Şekil 4.18 TKY.T2.06 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerin MIA PaCa-2, HT29, PC3 ve PNT1A hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemiyle gösterilmesi	60
Şekil 4.19 TKY.T2.07 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerin MIA PaCa-2, HT29, PC3 ve PNT1A hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemiyle gösterilmesi.....	62

Şekil 4.20 TKY.T2.08 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerin MIA PaCa-2, HT29, PC3 ve PNT1A hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemiyle gösterilmesi	63
Şekil 4.21 TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerin MIA PaCa-2, HT29, PC3 ve PNT1A hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemiyle gösterilmesi	65
Şekil 4.22 TKY.T2.02 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerinin DNA kondenzasyonu, hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyama yöntemiyle gösterilmesi.....	66
Şekil 4.23 TKY.T2.06 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerinin DNA kondenzasyonu, hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyama yöntemiyle gösterilmesi.....	67
Şekil 4.24 TKY.T2.07 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerinin DNA kondenzasyonu, hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyama yöntemiyle gösterilmesi.....	68
Şekil 4.25 TKY.T2.08 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerinin DNA kondenzasyonu, hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyama yöntemiyle gösterilmesi.....	69
Şekil 4.26 TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerinin DNA kondenzasyonu, hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyama yöntemiyle gösterilmesi.....	70
Şekil 4.27 GHRH 1-29 özgü potansiyel TKY.T2.07, TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerin Anti-Proliferatif etkisinin MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde PI analizi yöntemi ile gösterilmesi	72
Şekil 4.28 GHRH 1-29 özgü potansiyel TKY.T2.07, TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerin Anti-Proliferatif etkisinin HT29 kolon kanseri hücre hattında PI analizi yöntemi ile gösterilmesi	73
Şekil 4.29 GHRH 1-29 özgü potansiyel TKY.T2.07, TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerin Anti-Proliferatif etkisinin PC3 prostat kanseri hücre hattında PI analizi yöntemi ile gösterilmesi	74
Şekil 4.30 GHRH 1-29 özgü potansiyel TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerin Anti-Proliferatif etkisinin PNT1A normal epitel prostat hücre hattında PI analizi yöntemi ile gösterilmesi	75

Şekil 4.31 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerlerin apoptotik etkisinin MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücre hattında Annexin V / PI analizi yöntemi ile gösterilmesi	76
Şekil 4.32 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerlerin apoptotik etkisinin HT29 kolon kanseri hücre hattında Annexin V / PI analizi yöntemi ile gösterilmesi.....	77
Şekil 4.33 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerlerin apoptotik etkisinin PC3 prostat kanseri hücre hattında Annexin V / PI analizi yöntemi ile gösterilmesi.....	78



KISALTMA LİSTESİ

3-D	Üç Boyutlu
aa	Amino Asit
Akt/PKB	Protein Kinaz B
AMD	Makula Dejeneresansı
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenozin Trifosfat
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
cDNA	Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit
CLB	Hücre Özütleme Tamponu
CREB	Cyclic Amp-Response Element Baağlanma Protein
DAPI	4,6-Diamidino-2-Fenilindol
DiOC6	3,3'-Diheksilokarbosiyanin İyodür
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Dinukleotidtrifosfat
EBV	Epstein Barr Virüs
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGF-R	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ELİSA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ELONA	Enzyme Linked Oligonucleotide Assay
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay

ERK	Hücre Dışı Sinyal ile Düzenlenen Kinaz
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FGF-R	Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
FITC	Fluorescein İsothiocyanate
GH	Büyüme hormonu
GHRH	Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon
GHRH-R	Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon Reseptörü
GSK-3β	Glikojen Sentaz Kinaz 3 Beta
HER	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
HPV	İnsan Papilloma Virüsü
HRP	Horseradish Peroxidase
HTS	Yüksek Verimli Sekanslama
IF	İmmünoflöresan
Ig	İmmunoglobulin
IGF 1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
IL-1β	İnterlökin 1 Beta
MAPK	Mitojenle Aktifleştirilmiş Protein Kinaz
miRNA	Mikro Ribonükleik Asit
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
MTT	3-(4,5-Dimetiltriazol-2-İl)-2,5-Difeniltetrazolium Bromid
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
PACAP	Hipofiz Adenilat-Siklaz Aktive Edici Polipeptit

PBS	Phosphate Buffered Saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonları
PD1	Programlı Ölüm 1
PDAC	Pankreatik Duktal Adenokarsinom
PDGF	Trombosit Türevi Büyüme Faktörü
PDGF-R	Trombosit Türevi Büyüme Faktörü Reseptörü
PD-L1	Programlı Ölüm Ligand 1
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
pGHRH-R	Hipofiz Tipi Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon Reseptörü
PI	Propidyum İyodür
PI3K	Fosfatidilinositol-3-Kinaz
PKA	Protein Kinaz A
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türevi
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
RT-PCR	Reverse Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SCLC	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
sDNA	Tek Zincirli Deoksiribo Nükleik Asit
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SELEX	Üstel Zenginleştirme ile Ligandların Sistemik Evrimi
siRNA	Susturucu Ribo Nükleik Asit
SPIO	Süperparamanyetik Demir Oksit

SPR	Yüzey Plazma
ssDNA	Çift Zincirli Deoksiribo Nükleik Asit
SSTN	Somatostatin
STAT3	Sinyal Transdüktör ve Transkripsiyon Aktivatörü 3
SV	Splice Variant
TBS	Tris Buffered Saline
TBS-T	Tris Buffered Saline- Tween 20
TEMED	Tetrametiletildiamin
TGF-β	Tümör Büyüme Faktörü-Beta
TGF-β-R	Tümör Büyüme Faktörü-Beta-Resptörü
TK	Tirosin Kinaz
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VIP	Vazoaktif Bağırsak Polipeptidi

EMBOL VE BİRİM LİSTESİ

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
μM	Mikromolar
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
cm	Santimetre
cm²	Santimetre kare
cm³	Santimetre küp
g	Yer Çekimi Kuvveti (Gravity)
kDa	Kilo Dalton
mA	Miliamper
ml	Mililitre
μl	Mikrolitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
V	Volt
μg	Mikrogram

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 tetiklemesi 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,

BÖLÜM 1 GİRİŞ VE AMAÇ

1.1 GİRİŞ

Kanser dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinin arasında ikinci sırada yer almaktadır. Erkeklerde en fazla akciğer, prostat ve kolon kanseri görülmektedir. Kadınlarda ise en fazla meme, akciğer ve kolon kanseri tespit edilmektedir. Kanser, hücrelerin anormal ve kontrolsüz olarak çoğalmasıyla ortaya çıkmaktadır [1]. Kanser hücrelerinin 10 önemli özelliği bulunmaktadır. Bu 10 özellikten metastaz ve anjiyogenez kanser hücrelerinin vücudun farklı bölgelerine yayılabilmesine olanak sağlamaktadır. Kanser hücrelerinin oluşturduğu tümörler iyi huylu ve kötü huylu olarak ikiye ayrılmaktadır. İyi huylu tümörler buldukları ortamlarda kalırlar ve metastaz özelliği göstermezler, kötü huylu tümörler ise buldukları ortamlardan ayrılarak metastaz yapabilen tümörlerden oluşmaktadır [2]. Kanser için risk faktörleri yaşam şekillerine, yaşa, cinsiyete ve aile öykülerine bağlı olarak değişmektedir. Sigara ve alkol kullanımı, obezite, diyet, fiziksel hareketsizlik ve hormonal faktörler gibi yaşam tarzı faktörleri kanserin temel nedenlerini oluşturmaktadır [3].

Büyüme faktörleri hücrel büyüme, çoğalma ve hücrel farklılaşmada uyarıcı yeteneğe sahip proteinlerdir. Hücrelerinde yüzeyinde bulunan reseptörlerle etkileşime girerek hücrelerinin büyümesini kontrol etmektedirler. Reseptörlerde meydana gelen herhangi bir mutasyonda durumda reseptör sürekli aktif halde kalmaktadır ve hücre sürekli olarak büyümeye, çoğalmaya başlamaktadır. Böylece kanser hücreleri oluşmaktadır [4].

Büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH), hipofiz bezinden büyüme hormonunun (GH) salımını düzenleyen hipotalamik bir peptid nörohormonudur. Bir otokrin / parakrin büyüme faktörü olarak işlev gören GHRH, GHRH reseptörlerinin (GHRH-R'ler) aracılık ettiği çeşitli ekstrapitüiter hücreler veya dokular üzerinde doğrudan etkilemektedir [5]. GHRH, hipotalamik nöronlar tarafından üretilen ve ön hipofiz bezinde GH sentezini ve salınmasını uyaran nöro-salgılayıcı bir peptittir. GH salımının kontrol edilmesine ek olarak, GHRH dolaylı olarak GHRH / GH / IGF-1 sinyal yoluyla tümör hücreleri ve diğer birçok dokuda bulunan hücrelerin proliferasyonunu

düzenlemektedir [6]. GHRH, peptit hormonlarının ait olduğu sekretin ailesinin üyeleri arasında yer almaktadır. GHRH 40-44 amino asitten oluşmaktadır ve tam biyolojik aktiviteye sahip olan GHRH sekansı, 29 N-terminal amino asitten [GHRH (1-29) NH₂] oluşmaktadır. Bu GHRH dizisi, GHRH'nin agonistik ve antagonistik analoglarının geliştirilmesi için çekirdek peptidi oluşturmaktadır [7].

GHRH ve reseptörü çeşitli hipotalamik normal ve tümör dokularında, bağışıklık hücrelerinde ve kanser hücrelerinde eksprese edilmektedir. Normal veya neoplastik dokularda, aşırı miktarda GHRH üretilmesi hücre proliferasyonunu uyarmaktadır ve apoptotik hücre ölümünü önleyerek mitojenik bir rol oynamaktadır [8].

GHRH antagonistleri, güçlü antikanser ve antiinflamatuvar aktivitelere sahip peptit analogları olarak görev almaktadır. GHRH antagonistleri, tümör hücrelerini hedef aldıklarında *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda büyüme potansiyellerini neredeyse ortadan kaldırdıklarından dolayı çeşitli malignitelere karşı en gelişmiş terapötik yaklaşımları temsil etmektedirler. GHRH antagonistleri, GHRH-R'ye bağlanma ve böylece GHRH-R aktivasyonunu bloke etme konusunda GHRH ile yarışçı olabilmektedirler [9].

Tek hedefli oligonükleotitlerin çeşitli hedef bileşikler için afinite molekülleri olarak kullanılması fikri ilk olarak 1990'da ortaya çıkmaktadır. Fikir, hedef moleküller ile spesifik etkileşimlere izin veren benzersiz üçüncül yapılar oluşturan tek iplikli oligonükleotitlerin karakteristiğine dayanmaktadır [10]. Aptamerler, üstel zenginleştirme ile ligandların sistematik evrimi (SELEX) olarak bilinen bir *in vitro* moleküler evrim yöntemi ile üretilmektedir. SELEX deneyleri, küçük bileşikler, proteinler, nanopartiküller veya canlı hücreler gibi çeşitli hedef moleküllere veya elementlere karşı gerçekleştirilebilmektedir [11]. Dolayısıyla aptamerler, afinite saflaştırması için reaktifler ve antikörlerin yerini almak için biyosensörler olarak kullanılabilirler. Ayrıca, Aralık 2004 yılında yaşa bağlı makula dejenerasyonunun tedavisi için bir anti-vasküler endotelial büyüme faktörü aptameri (macugen) FDA tarafından onay olarak kullanılmaktadır [12].

1.2 AMAÇ

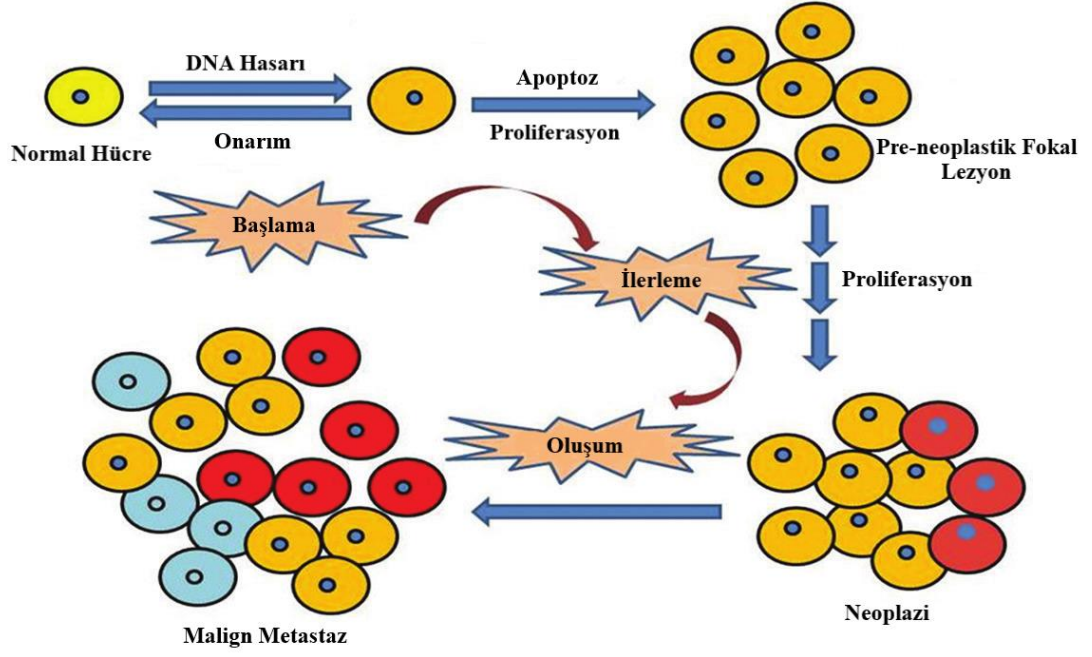
Bu tez ile amacımız, literatürde pek çok çalışma ile GHRH sinyalinin karsinojenik etkisinin yanında GHRH-R sinyalini bloke edici GHRH peptit antagonistlerinin anti-karsinojenik etkisinin olduğunun belirlenmesine istinaden GHRH sinyalinin bloke edilmesinin peptit antagonistlerine alternatif olarak hedef moleküle yüksek bağlanma afinitesi gösteren aptamerlerin GHRH 1-29 özgü sentez edilmesi ve bağlanma afinitesinin gösterilmesi ve GHRH anlatımı yüksek kanser hücreleri üzerinde karsinojenik etkisinin irdelenmesi amaçlanmaktadır.



BÖLÜM 2 GENEL BİLGİLER

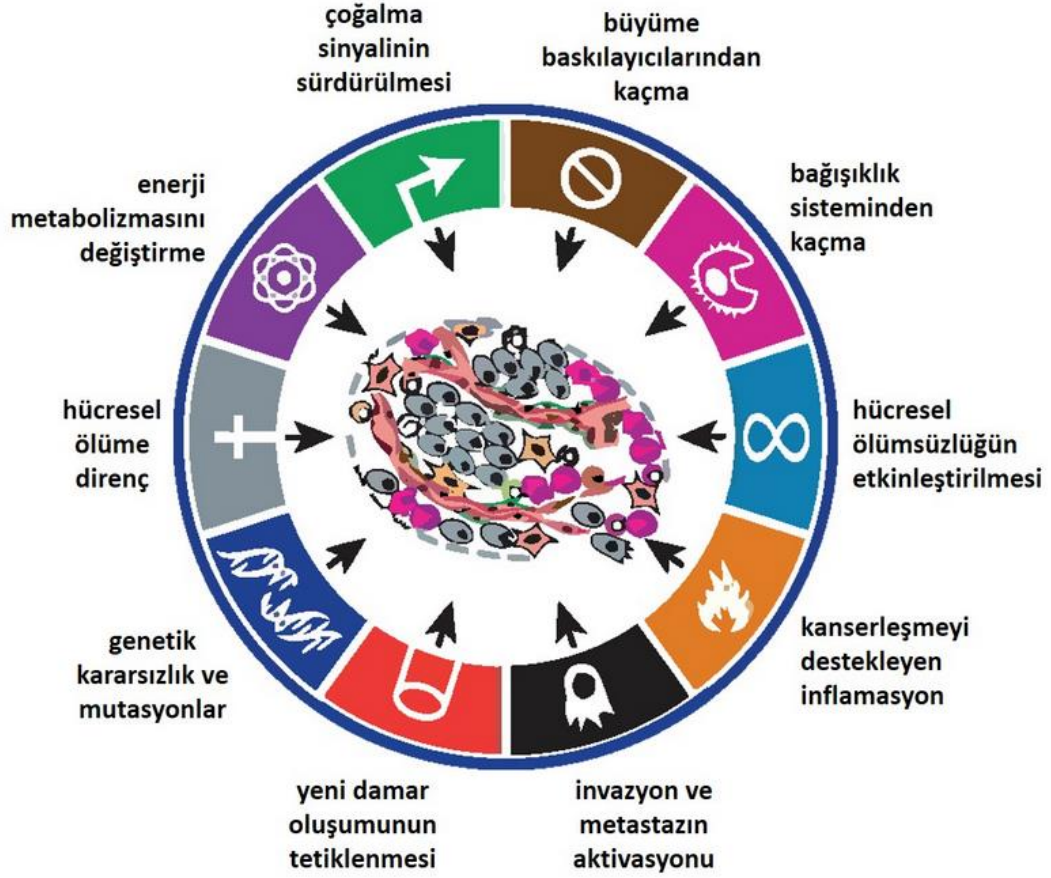
2.1 KANSER

Kanser, hücrelerin normal özelliklerini değiştiren moleküler değişikliklerin birikmesinin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu değişiklikler kontrol sisteminin düzgün çalışmamasına yol açmaktadır. Düzgün çalışabilen sistemlerde aşırı büyüme ve kontrolsüz hücre çoğalması önlenmektedir [13]. Normal hücreler sürekli olarak hücrenin bölünmesi, başka bir hücre tipine farklılaşması veya ölmesi gerektiğini belirten sinyallere maruz kalmaktadır. Kanser hücrelerinde onkogenleri aktive eden, genetik dengesizlikleri tetikleyen veya tümör baskılayıcı genlerin susmasına sebep olan mutasyonlar sıklıkla meydana gelmektedir. Normal koşullar altında hücreler DNA zincirlerindeki hasarı tespit edebilmekte ve çeşitli hasar tamir mekanizmalarıyla onarabilmektedir. DNA’da meydana gelen hasar oranı yüksek olduğunda yada tamir edilemediği durumlarda ise hücre programlanmış hücre ölüm (apoptoz) mekanizmasını aktif hale getirmektedir [14]. Kanser hücrelerinde ortaya çıkan mutasyonlar hücre döngüsünün durdurulmasında görevli kontrol mekanizmalarını etkisiz hale getirebilmektedir veya hücre döngüsünü düzenleyicisini aşırı aktif hale getiren yeni bir mutasyon gerçekleştirmektedir. Kontrolsüz büyüme, apoptozdan kaçma gibi özellikler kazanan hücre bu şekilde kanser hücresine dönüşmektedir [15]. Kanser hücrelerinin oluşum mekanizması Şekil 2.1’de gösterilmektedir [16].



Şekil 2.1 Kanserin oluşum mekanizması [16]

2000 yılında yayınlanan Hannah ve Weinberg'e ait çalışmaya göre bir hücrenin kanser hücresi olabilmesi için 10 özelliğe sahip olması gerekmektedir [17]. Bu özelliklerin içinde kanser hücrelerinin çeşitli dokulara yayılma ve kendilerine yeni damar sistemleri oluşturmak gibi özellikleri de bulunmaktadır. Bir kanser hücresinin bulunduğu ortamdan lenf sistemini veya damar sistemini kullanarak başka bir ortama yayılması metastaz olarak adlandırılmaktadır. Kanser hücreleri normal hücrelerden çok daha hızlı çoğaldığı için fazla miktarda enerjiye ve atık maddelerin daha hızlı uzaklaştırılmasına ihtiyaç duymaktadır. Aynı zamanda kanser hücresinin farklı doku ve organlara yayılması için damar oluşumunu stimüle etmesi gerekmektedir. Kanser hücresinin, var olan damarlardan yeni damar uzantıları oluşturması anjiyogenez olarak adlandırılmaktadır [18]. Kanser hücrelerinin 10 özelliği Şekil 2.2'de özetlenmektedir.



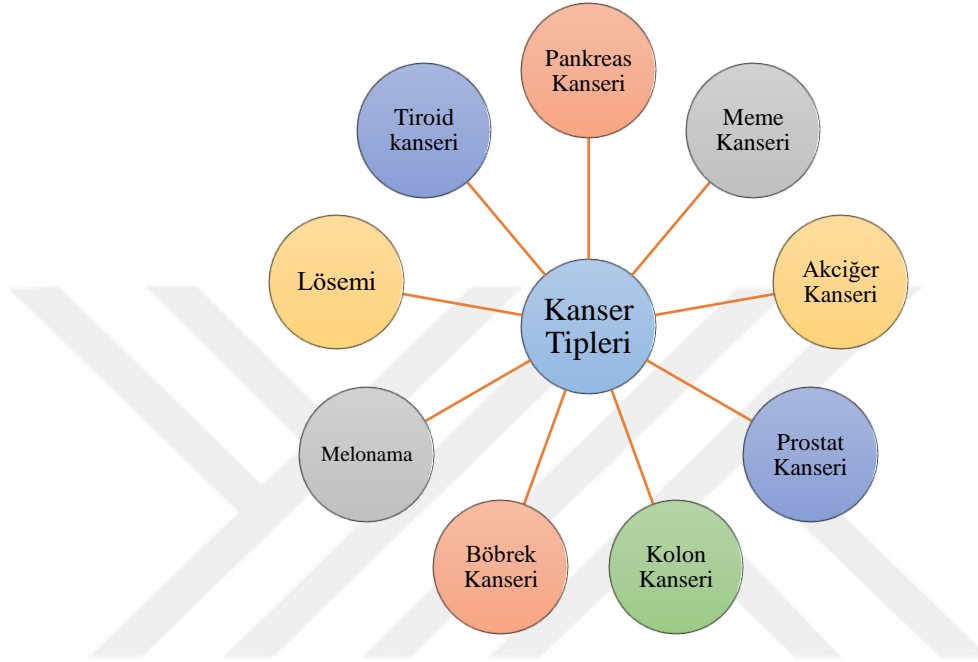
Şekil 2.2 Kanser hücrelerinin 10 temel özelliği [17]

Kanser hücreleri metastaz ve anjiyogenez özellikleri sayesinde buldukları ortamlarda veya başka ortamlara yayılarak tümörler oluşturmaktadır. Tümörler benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) olarak sınıflandırılmaktadır [13]. Benign tümörler kanser olmayan lokalize lezyonlardan oluşmaktadır. Metastaz veya anjiyogenez özellikleri bulunmadığı için yayılma özelliği göstermezler. Yine de klinik sorunlara neden olabildikleri için cerrahi operasyonlar ile alınmaktadırlar ve tekrar oluşma özellikleri bulunmamaktadır. Malign tümörler ise kanserli lezyonlardan oluşmaktadır. Hızlı büyüdükleri ve çevresindeki dokuları istila edebildikleri için kanser açısından önem arz etmektedirler. Malign tümörler insan vücudunda diğer dokulara metastaz yolu ile ulaşabilmekte ve uzak organlarda kolonize olabilmektedir. Dört adet tümör tipi bulunmaktadır:

- A. Karsinomlar: Değiştirilmiş epitel hücrelerinden kaynaklanmaktadır.
- B. Sarkomlar: Kas, kemik, yağ veya bağ dokusundaki değişikliklerden kaynaklanmaktadır.

- C. Lenfoma: Kemik iliğinden türeyen lenfatik sistem hücrelerinden oluşmaktadır.
- D. Miyelomlar: Antikor oluşturan özelleşmiş beyaz kan hücrelerinden oluşmaktadır [19].

Kanser hücrelerinin oluştuğu ortamlara göre isimler almaktadır ve çeşitli kanser tipleri bulunmaktadır. Bazı kanser tipleri Şekil 2.3 gösterilmektedir.



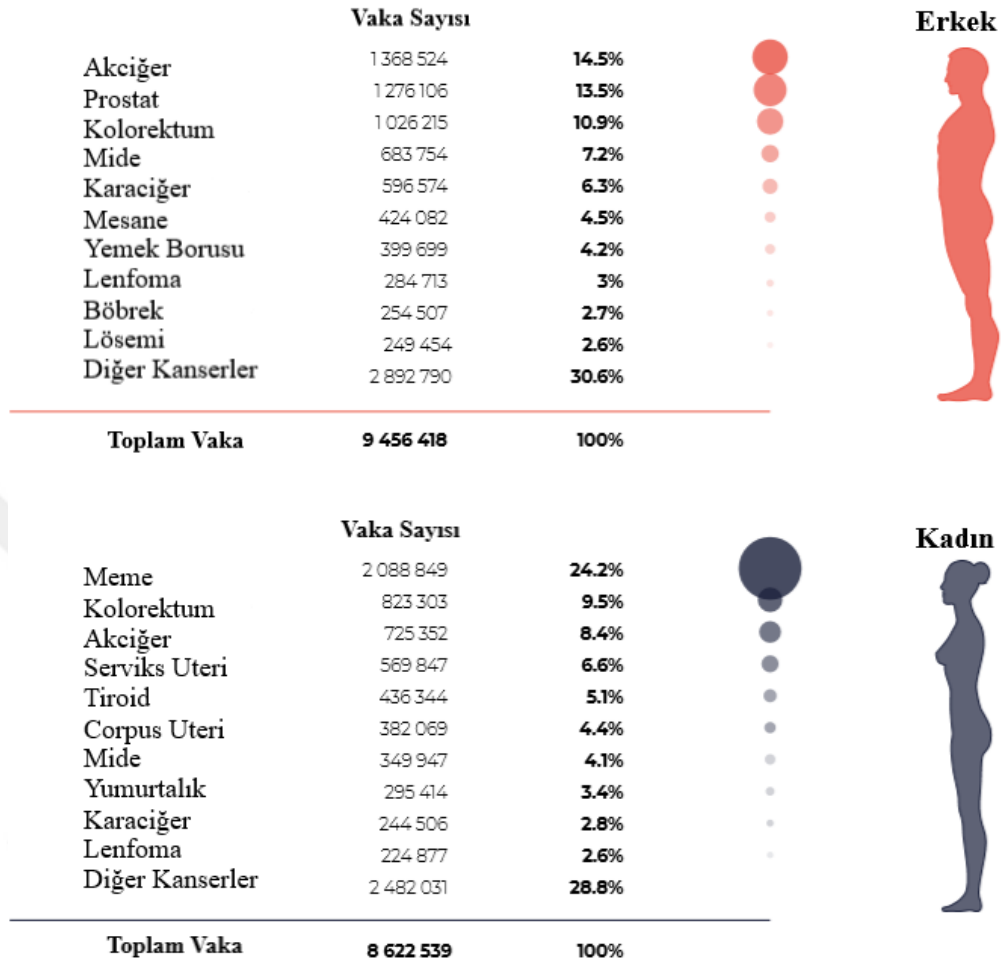
Şekil 2.3 Kanser tiplerinin şematik olarak gösterimi

Kanser için risk faktörleri yaşam şekillerine, yaşa, cinsiyete ve aile öykülerine bağlı olarak değişmektedir. Sigara ve alkol kullanımı, obezite, diyet, fiziksel hareketsizlik ve hormonal faktörler gibi yaşam tarzı faktörleri kanserin temel nedenlerini oluşturmaktadır. Kansere bağlı ölümlerin %25-30 tütün kullanımına ve %30-35'in diyetle ilişkili anormalliklere bağlı olduğunu, %15-20'sinin insan papilloma virüsü (HPV), Epstein-Barrvirüs (EBV) vb. enfeksiyonlar ile alakalı olduğunu ve kalan yüzdelerde, radyasyon, stres, fiziksel aktivite eksikliği, çevresel kirleticilere maruz kalma vb. faktörleri içerdiğini göstermektedir [20].

2.1.1 Kanser Epidemiyolojisi

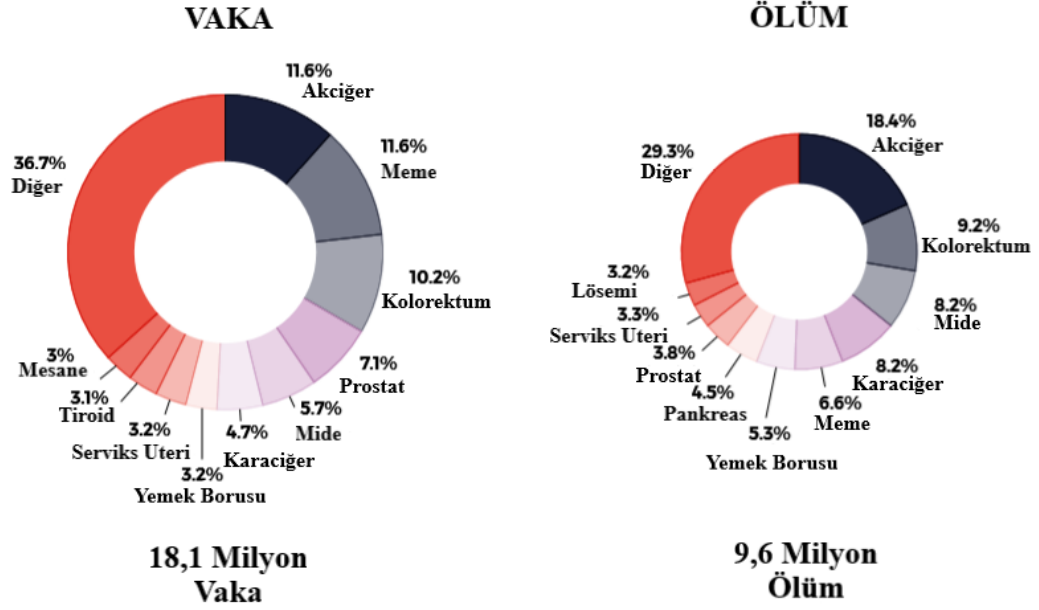
Kanser, dünya çapında en önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Küresel olarak kanser, ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır [21]. Dünya sağlık örgütü 2018 verilerine göre erkeklerde en fazla %14,5 oranıyla akciğer, %13,5 oranıyla prostat ve %10,9 oranıyla kolorektum kanserleri görülmektedir. Kadınlarda

ise ilk sıralarda %24,2 oranıyla meme, %9,5 oranıyla kolorektum ve %8,4 oranıyla akciğer kanseri ilk sıralarda yer almaktadır [22].



Şekil 2.4 Dünya sağlık örgütü 2018 verilerine göre erkeklerde ve kadınlar ilk 10 sırada yer alan kanser türleri ve görülme sıklığı [22]

2018 dünya sağlık örgütü verilerine göre dünya çapında 18,1 milyon kanser hastası bulunmaktadır ve aynı verilere göre 9,6 milyon insan kanser hastalığına bağlı olarak vefat etmektedir. Dünyada şu anda %11,6 oranıyla en yaygın olarak görülen kanser tipi akciğer kanseridir ve ölümlerinde %18,4'unu oluşturmaktadır. İkinci sırada ise meme kanseri yer almaktadır. Dünyada %11,6 oranında görülmektedir ve ölümlerin sadece %6,6'sını oluşturmaktadır. Üçüncü sırada ise %10,2 oranıyla kolorektum kanseri yer almaktadır ve ölümlerin %9,2'sini oluşturmaktadır [22].



Şekil 2.5 Dünya sağlık örgütü 2018 verilerine göre kanser türlerinde görülen hasta ve ölüm oranları [22]

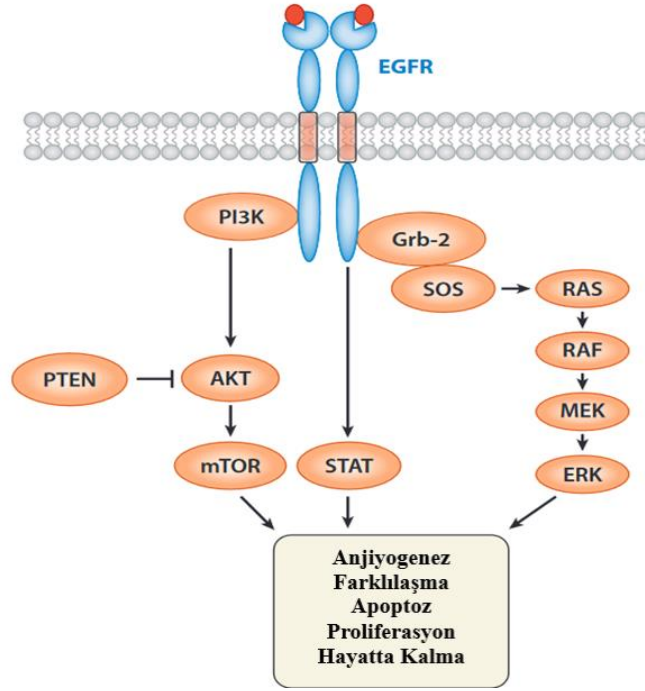
2.1.2 Kanser ve Büyüme Faktörleri

Hücrelerin yüzeyinde bulunan reseptörler genetik olarak değişmektedir ve onkojenik reseptörlere dönüşmektedirler. Onkojenik reseptörler sınırsız hücre bölünmesini sağlayan sinyaller göndermektedir. Bu sinyaller tümör oluşumuna ve kanserin ilerlemesine yol açmaktadır. Büyüme faktörü sinyalizasyonunu kodlayan genlerde metabolik aktiviteler sırasında ya da çevresel mutajenler etkisiyle amplifikasyon veya mutasyonlar oluşmaktadır. Bu durum çeşitli kanser türlerinde en sık görülen genetik değişiklikler arasında yer almaktadır. Amplifiye veya mutasyona uğramış büyüme faktörü reseptörleri ilişkili mutasyona uğramış sinyal proteinleri, esas olarak plazma membranı içinde bulunmaktadır ve tümör hücrelerinin büyüme kontrol noktalarından bağımsız olarak çoğalmalarını sağlamaktadır [23].

2.1.2.1 Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

EGF-R geni, kromozom 7'nin (7p11.2) kısa kolunda bulunmaktadır ve Tirosin kinaz (TK) aktivitesi ile 170 kDa tip I transmembran büyüme faktörü reseptörünü kodlamaktadır. EGF-R, HER1, HER2, HER3 ve HER4'ü içeren HER / erbB reseptör ailesi içinde yer almaktadır. Bu reseptörler benzer moleküler yapılar sergilemektedir [24]. Farklı tiplerde insan kanserlerinde sıklıkla mutasyona uğramaktadırlar ve aşırı eksprese edilmektedirler. Şu anda klinik uygulamada benimsenen çoklu kanser

tedavilerinin hedefi haline gelmektedirler [25]. Hücre içi sinyalizasyon esas olarak RAS-RAF-MEK-MAPK yolu, PI3K-PTEN-AKT yolu ve transkripsiyon (STAT) yolunun sinyal iletimi ve aktivatörü aracılığıyla sağlanmaktadır. EGF-R'nin fazla miktarda üretilmesi aşağı yönlü EGF-R sinyalinde, proliferasyon, anjiyogenez, metastaz ve apoptozun engellenmesiyle ilişkilendirilmektedir [24].



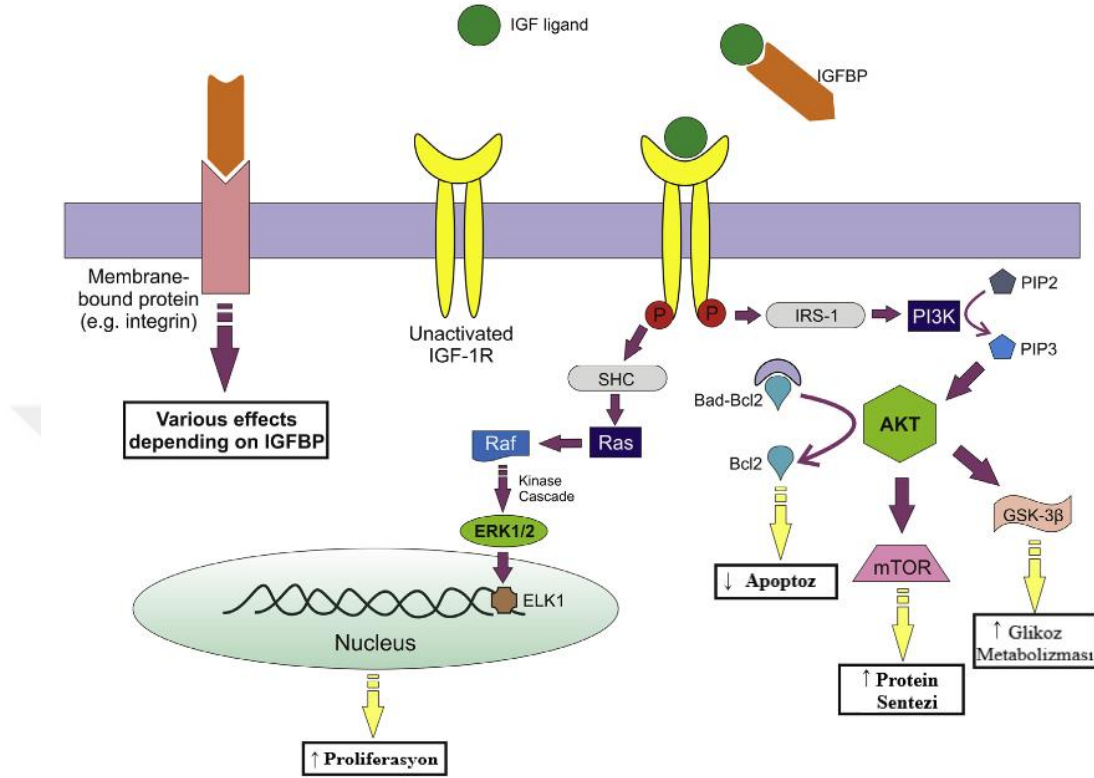
Şekil 2.6 Kanserojenез ile ilgili kritik hüresel fonksiyonları düzenleyen epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGF-R) kaynaklı sinyallerinin şematik olarak gösterimi [24]

EGF-R ailesinin reseptörleri, ligandları ayrıca tümör hücreleri ve tümör mikro ortamı arasındaki karmaşık etkileşimlere aracılık etmektedir. EGF-R'de TK'nın yanlış aktivasyonu, tümör hücresinin apoptozunu inhibe etmektedir ve tümörün ilerlemesine katkıda bulunmaktadır. EGF-R ayrıca integrin yolağıyla da etkileşime girebilmektedir. Hücre motilitesini ve istilasını düzenleyerek metastazı teşvik edebilmektedir. Bu bulgular EGF-R'yi terapötik müdahale için akılcı bir hedef haline getirmektedir ve EGF-R'yi hedefleyen ajanların gelişimini desteklemektedir [24].

2.1.2.2 İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF)

PI3K / AKT / mTORC1 sinyal yolağında yer alan IGF-1 sinyali, hücre büyümesinde, onkogenik transformasyon ve kanserde önemli roller oynamaktadır [26]. IGF sinyali, hücre proliferasyonu ve sağ kalımı gibi kritik hüresel süreçleri düzenleyen bir mekanizmada yer almaktadır. IGF'nin IGF-1 ve IGF-2 olmak üzere iki tane ligandı

bulunmaktadır. Ligandların hedef tirozin kinaz reseptörleri, IGF-1 reseptörü (IGF1-R), insülin reseptörü (INS-R), IGF-2 reseptörü (IGF2-R) ve IGF-bağlayıcı proteinlerden oluşmaktadır [27].



Şekil 2.7 IGF sinyalinin şematik gösterimi [28]

IGF'lerin IGF1-R'ye güçlü bir şekilde bağlanma ve hücre proliferasyonu ile ilişkili yolları aktive etme kabiliyetinden dolayı IGF ve IGF1-R etkileşimi, kanser hücrelerinde büyüme ve metastazda rol aldıkları bilinmektedir. IGF-R'ler normal fizyolojik koşullar altında IGF sinyali düzenlenmektedir. Bununla birlikte, genetik anormallikler veya kromozomal değişiklikler IGF ligandlarının ve IGF1-R'nin düzensiz ekspresyonu ile sonuçlanabilmektedir. Örnekler arasında meme kanserinde saptanan IGF genlerinde IGF1-R gen amplifikasyonu ve mutasyonu, gastrointestinal stromal tümör (GIST) ve osteosarkom oluşturmaktadır. IGF1-R'nin kendisinde aktive edici nokta mutasyonları bildirilmemektedir ancak prostat kanseri ve uveal melanomda anti-proliferatif IGF2-R'nin mutasyonel inaktivasyonu veya heterozigotluk kaybı raporları bulunmaktadır. IGF2 baskısı kaybının fare modellerinde malignite gelişimini artırdığı gösterilmektedir ve klinik olarak kolorektal kanser, Wilms tümörü ve hepatoselüler karsinom ile ilişkilendirilmektedir [29].

2.1.2.3 Tümör Büyüme Faktörü-Beta (TGF- β)

TGF- β sinyali transdüksiyonu, proliferasyon, göç, farklılaşma, embriyonik gelişim, bağışıklık yanıtı, yara iyileşmesi, anjiyogenez gibi temel biyolojik süreçlerin dahil olduğu çok sayıda hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. TGF- β ailesi üyeleri, serin / treonin kinaz aktivitesi taşıyan hücre yüzeyi reseptör komplekslerinin oluşumunu indükleyerek biyolojik süreçleri düzenlemektedir. TGF- β -R ailesi ise, çeşitli hücre tiplerinde eksprese edilen ve TGF-1 ligand bağlanması üzerine iletilen sinyallerle farklı hücre görevleri düzenleyen üç membran reseptörünü (TRI, TRII ve TRIII) içermektedir. Hem TRI hem de TRII hücre içi kinaz alanları bulunmaktadır [30]. Bu ailenin üyelerin sinyalizasyonunda gerçekleşen bozukluklar sonucu hem tümörlerin gelişmesinde hem de metastazda önemli artışlar meydana gelmektedir. Etkileri kanser hücrelerinin ötesinde, tümör mikroçevresine ve tüm organizmayı etkilemektedir. TGF- β yolu, tüm karsinogenez aşamaları boyunca tümör büyümesi ve metastazı için elverişli bir mikro ortam oluşturulmasına katkıda bulunmaktadır [31].

2.1.2.4 Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF)

VEGF protein ailesi VEGF (veya VEGF-A), VEGF-B, VEGF-C ve VEGF-D, VEGF-F, plasental büyüme faktörü (PlGF) ve bunların VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3 reseptörlerini içermektedir. VEGF-A, normal ve anormal durumlarda birçok anjiyojenik süreç için gerekli olan ve tüm VEGF ailesi üyeleri arasında en belirgin anjiyojenik faktör olan bir dimerik glikoproteini oluşturmaktadır. VEGF-A, vasküler endotel hücre çoğalmasını uyarma kapasitesine ve vasküler geçirgenliği artırma yeteneğine sahiptir. Ayrıca endotel hücrelerin hayatta kalmasını ve göç etmesini desteklemektedir. VEGF-A, embriyonik gelişim, yara iyileşmesi, kadın üreme döngüsü, kanser, kardiyovasküler hastalık gibi fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli rolleri bulunmaktadır. VEGF-B, yetişkin miyokard, iskelet kası ve pankreasta eksprese edilmektedir. Yetişkin dokularda VEGF-C en çok kalp, plasenta, yumurtalık, ince bağırsak ve tiroid bezinde belirgin olarak ifade edilmektedir. VEGF-D ise yetişkin dokularında, özellikle akciğer, kalp, iskelet kası, kolon ve ince bağırsakta bulunmaktadır [32]. 3 adet VEGF tirozin kinaz reseptörü tanımlanmıştır: VEGFR-1, VEGFR-2 ve VEGFR-3. VEGFR-1 ve VEGFR-2 baskın olarak vasküler endotel hücreler tarafından eksprese edilmektedir. VEGFR-3 genellikle lenfatik endotel hücrelerde bulunmaktadır. Tümörlerin neovaskülarizasyonu, besin akışı sağlayarak

büyümelerini ve metastazlarını kolaylaştırmaktadır. Yeni kan damarları, tümör yatağını çeşitli çözümler aracılığıyla ve aynı kökenli reseptörlerinin düzenlenmiş etkileşimini içeren karmaşık bir işlemde besleyen mevcut vaskülatürden endotel hücrelerin çoğalması ve yer değiştirmesi sonucu oluşmaktadır. VEGF çoğu tümörde ekspresyon edilir ve ekspresyonu tümör ilerlemesi ile ilişkilendirilmektedir [33]. VEGF'nin çeşitli hücreler ve dokularda fizyolojik vasküler homeostaz için gerekli olması, tümör büyümesi ve metastazının moleküler patogenezinde önemli olduğu göstermektedir. Tümör hücreleri ve onları çevreleyen stromalar tarafından salgılanan VEGF, yapısal olarak anormal ve yeni kan damarlarının oluşumuna yol açan endotel hücrelerin proliferasyonunu ve hayatta kalmasını uyarır. VEGF mRNA'sı, insan tümörlerinin çoğunda aşırı ekspresyon edilmektedir ve invazivlik, vasküler yoğunluk, metastaz, rekürrens ve prognoz ile ilişkilendirilmektedir [34].

2.1.2.5 Trombosit Türevi Büyüme Faktörü (PDGF)

Trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), mezankimal kökenli hücrelerin normal gelişimi için önemli bir sinyal yoludur. PDGF sinyalleme ağı iki tirozin kinaz reseptörü, PDGF-R alfa (PDGF-R α) ve PDGF-R beta (PDGF-R β) ve beş ligand PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC ve PDGF-DD'den oluşmaktadır. Sinyal yolunun otokrin uyarımı, gliomalar, gastro-intestinal stromal tümörler (GIST'ler) ve kronik miyelomonositik lösemi gibi çeşitli neoplazmalarda sıklıkla görülmektedirler. Ek olarak, parakrin PDGF-R sinyalleşmesinin düzensizliği, göç, istila, anjiyogenez ve lenf anjiyogenezini kolaylaştırmak için tümör destekleyici bir şekilde hücre dışı matris yeniden şekillenmesine neden olabilmektedir [35].

2.1.2.6 Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

Fibroblast Büyüme Faktörü reseptörü (FGF-R) ailesi dört üyeden oluşmaktadır. FGF-R1, FGF-R2, FGF-R3, FGF-R4, bunlar hücre dışı ligandlar tarafından uyarılabilen ve aktive edilebilen immünoglobulin (Ig) süper familyasına ait tirozin kinaz aktivitesine sahip transmembran reseptörleridir. FGF-R ailesi üyeleri, üyeler arasında ve evrim boyunca yüksek oranda korunmuş bir amino asit sekansına sahiptirler. Yine de ligand bağlanma kapasitelerinde ve dokuya özgü dağılımında farklılıklar bulunmaktadır. Yapısal olarak, FGF-R, büyük bir hücre dışı ligand bağlanma alanı, tek bir zardan sarmal ve iki bölünmüş tirozin kinaz alanı içeren hücre içi bir kısımdan oluşmaktadır. Hücre dışı kısım, asit kutusu adı verilen yüksek derecede korunmuş glutamat, aspartat ve serin bakımından zengin bir dizi içeren birinci ve ikinci Ig döngüsü arasında bir

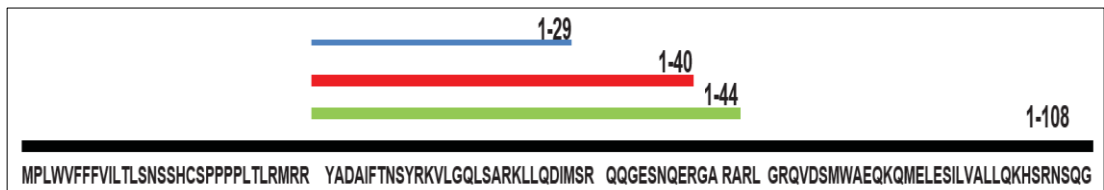
bağlayıcı bölge ile üç immüoglobulin benzeri alan içermektedir. İkinci ve üçüncü Ig alanları FGF bağlanmasında rol oynamaktadır [36]. FGF / FGFR tirozin kinaz sinyal yolu, embriyogenez sırasında çoklu biyolojik olayları düzenleyerek ve yetişkin dokuların bakım ve onarımında işlev görmektedir. Bu yol aynı zamanda hem tümör oluşumunda hem de çeşitli kanser türlerinde kemorezistans gelişiminde rol oynamaktadır. FGF-R sinyal yolunun bir veya daha fazla bileşenin bloke edilmesi bazı klinik çalışmalarda ve klinik öncesi çalışmalarda incelenmektedir. Bununla birlikte, erken bulgular, FGF-R genindeki değişikliklerin, çeşitli kanser türleri arasında eşit şekilde meydana gelmediğini ve kanser türleri arasında değişen karmaşık etkileşimlerin varlığını düşündürmektedir [37]. Son zamanlarda, artan çalışmalar, çeşitli kanser türlerinde FGF / FGF-R sinyalleşmesinin onkoterapiye direnç ile yakın bağlantısını göstermektedir. Bu çalışmalar FGF / FGF-R'yi kanserlerde oldukça potansiyel bir tedavi hedefi haline getirmektedir ve FGF / FGF-R'yi hedefleyen ilaçlar anti-tümör tedavisi çalışmasında anlamlı ve umutlu bir alan olmuştur. Günümüzde onkologlar ve bilim adamları kanser tedavisinde FGR/FGF-R inhibitörlerine karşı dirençli tedavi hedefi olarak görmekte ve bu alanda çokça çalışma gerçekleştirilmektedir. [38].

2.2 BÜYÜME HORMONU SALGILATICI HORMON (GHRH)

Hipofiz bezinin ön kısmındaki somatotroplar tarafından salgılanan büyüme hormonu (GH), büyümeyi düzenleyici bir hormon olarak işlev görmektedir. Üretimi ve salgılanması, somatostatin, GH ve insülin büyüme faktörü 1 (IGF-1) aşağı yönlü faktörlerle birlikte GHRH tarafından kontrol edilmektedir [39]. GHRH, hipotalamik nöronlar tarafından üretilerek ve ön hipofiz bezinde GH sentezini ve salınmasını uyaran nöro-salgılayıcı bir peptittir [40]. GHRH ve reseptörleri sadece hipotalamus ve hipofizde eksprese edilmemektedir, aynı zamanda periferik dokularda da eksprese edilmektedir. GHRH, sadece büyüme hormonu salgılanmasının değil, aynı zamanda birçok hücre ve dokulardaki çeşitli hücresel fonksiyonların önemli bir düzenleyicisidir [41]. GH salımının kontrol edilmesine ek olarak, GHRH dolaylı olarak GHRH / GH / IGF-1 sinyal yoluyla tümör hücreleri ve diğer birçok dokuda bulunan hücrelerin proliferasyonunu düzenlemekte görevlidir. GHRH ayrıca hedef hücreler üzerindeki GHRH reseptörüne bağlanıp parakrin / endokrin mekanizmalarını kullanarak hücre büyümesini doğrudan düzenleyebilmektedir [42]. GHRH G-proteinine bağlı reseptörü (GHRH-R), farklı periferik dokularda ve hücre tiplerinde eksprese edilmektedir [43].

Bununla birlikte, nöroendokrin tümörler dışındaki dokularda ekstra GHRH üretimi tanımlanmaktadır [44]. Son birkaç yılda GHRH'nin hipofiz dışındaki dokular üzerinde etkili olduğunu gösteren ve aslında GHRH'nin bilinenden daha geniş bir role sahip olduğunu gösteren araştırmalar bulunmaktadır [41]. Hipofizde ve periferik dokularda GHRH, adenil siklaz, cAMP ve protein kinaz A (PKA) kaskadını uyaran bir G proteinine bağlı reseptöre bağlanmaktadır [45]. Reseptör ile bağlandıktan sonra GHRH, GH ekspresyonunu ve salımını düzenlemek için gerekli olan diğer hücre içi habercilerin Ca^{+2} seviyeleri ve cAMP response element-binding (CREB) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu aktive veya inhibe etmektedir [46].

GHRH, glukagon, sekretin, hipofiz adenilat-siklaz aktive edici polipeptidi (PACAP), vazoaaktif bağırsak polipeptidi (VIP) ve diğerlerini de içinde barındıran peptid hormonlarının ait olduğu sekretin ailesinin bir üyesidir [47]. GHRH 40-44 amino asitten oluşmaktadır ve tam biyolojik aktiviteye sahip olan GHRH sekansı, 29 N-terminal amino asitten [GHRH (1-29) NH₂] oluşmaktadır. Bu GHRH dizisi, GHRH'nin agonistik ve antagonistik analoglarının geliştirilmesi için çekirdek peptidi oluşturmaktadır [48]. Çeşitli formlardaki GHRH peptidlerinin amino asit (aa) dizileri şematik olarak aşağıda verilmektedir siyah çizgi ile temsil edilen pre-pro GHRH 1-108 aa dizilerini, yeşil çizgi ise GHRH 1-44 aa dizilerini, kırmızı çizgi GHRH 1-40 aa dizilerine karşılık gelen biyolojik olarak aktif formlardır. Mavi çizgi ile temsil edilen bölge ise GHRH 1-29 olarak bilinen tam olarak biyolojik aktiviteye sahip olan peptiddin aa dizilimidir. (Şekil 2.8).



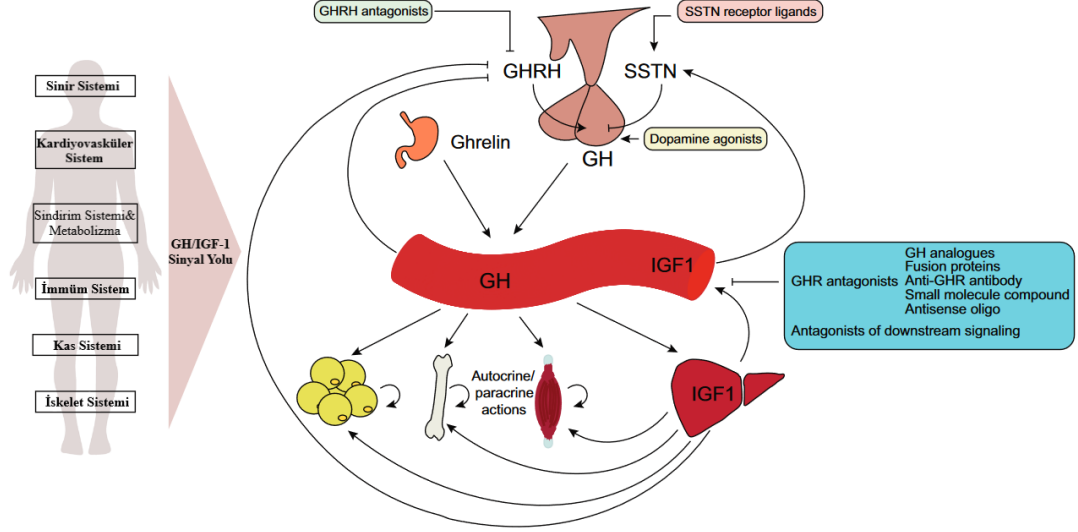
Şekil 2.8 GHRH'nin çeşitli formlarının amino asit dizilerinin şematik olarak gösterimi [41]

Hipofizde GHRH'nin etki gösterebilmesi için GHRH reseptörleri (GHRH-R) aracılık etmektedir. GHRH-R, sınıf II G protein bağlı bir reseptördür ve yedi transmembran domeni içermektedir. GHRH reseptörü, VIP ve PACAP reseptörleri ile homologdur. Tam uzunlukta GHRH-R, periferik dokularda geniş bir şekilde eksprese edilmemektedir, fakat GHRH-R varyantları bulunmaktadır [41]. GHRH reseptörünün Splice variant 1 (SV-1), sadece N-terminal hücre dışı alanlarında GHRH-R'den farklı

olan fonksiyonel bir reseptördür. GHRH-R'nin ilk 89 amino asidi, SV-1 reseptöründe farklı 25 amino asit sekansı ile değiştirilmektedir [49]. Ligand bağımlı aktivitesinin yanı sıra SV-1 liganddan bağımsız olarak aktivite göstermektedir [50]. Bu aktivite ile ligand bağlanması olmasa bile sinyal yolağında aşağı yönlü sinyalleri iletmektedir. SV-1 liganddan bağımsız olarak aktivite göstermesine rağmen maksimum aktivite göstermesi için GHRH tarafından düzenlemeler gerekmektedir [41].

2.2.1 GHRH Sinyali

GHRH / GH / IGF-1 kaskadı, fiziksel ve metabolik homeostaza katkıda bulunan temel bir endokrin düzenleyici yolak özelliği taşımaktadır. GHRH, hipotalamusta sentezlenmektedir ve depolanmaktadır. İhtiyaç duyulduğu zaman hipofiz bezine taşınmaktadır; burada hipofizdeki GHRH'ye özgü reseptöre bağlanarak sinyali aktive etmektedir. GH, GHRH tarafından uyarıldığında hipofizin ön kısmında bulunan somatotroplar tarafından salgılanmaktadır. Dolaşımdaki GH, etkisini GH reseptörleriyle bağlanarak veya IGF-1 ile dolaylı etkileşim yoluyla gerçekleştirmektedir [42]. IGF-1 çoğunlukla karaciğer ve kas tarafından üretilmektedir. Kemik, kıkırdak, iskelet kası, adiposit ve kardiyomiyosit gibi çoklu dokularda hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve olgunlaşmasını düzenlemektedir. IGF-1 sinyal yolağı ile GHRH-GH metabolizmaya, epidermise, bağ dokusuna, büyümeye, glukoz ve lipit kontrolü dahil kan homeostazına katkıda bulunmaktadır [51]. Dolaşımdaki GH seviyeleri, GHRH / GH / IGF-1 yolu uzun döngü geri beslemesi ve kısa döngü geri besleme mekanizmaları ile düzenlenmektedir. GHRH, hem GHRH / GH / IGF-1 kaskadı üzerinden hem de çevre hücreler üzerindeki GHRH-R'ye doğrudan bağlanma yoluyla iletişim kurmaktadır, GHRH / GH salgısının herhangi bir dengesizliği ile ilişkili olabilecek hastalıkların tedavi edilmesi için hem agonistler hem de antagonistler aracılıyla terapötik potansiyel bulunmaktadır [52].



Şekil 2.9 GHRH/GH/IGF1 Sinyal yolağının şematik olarak gösterimi [53]

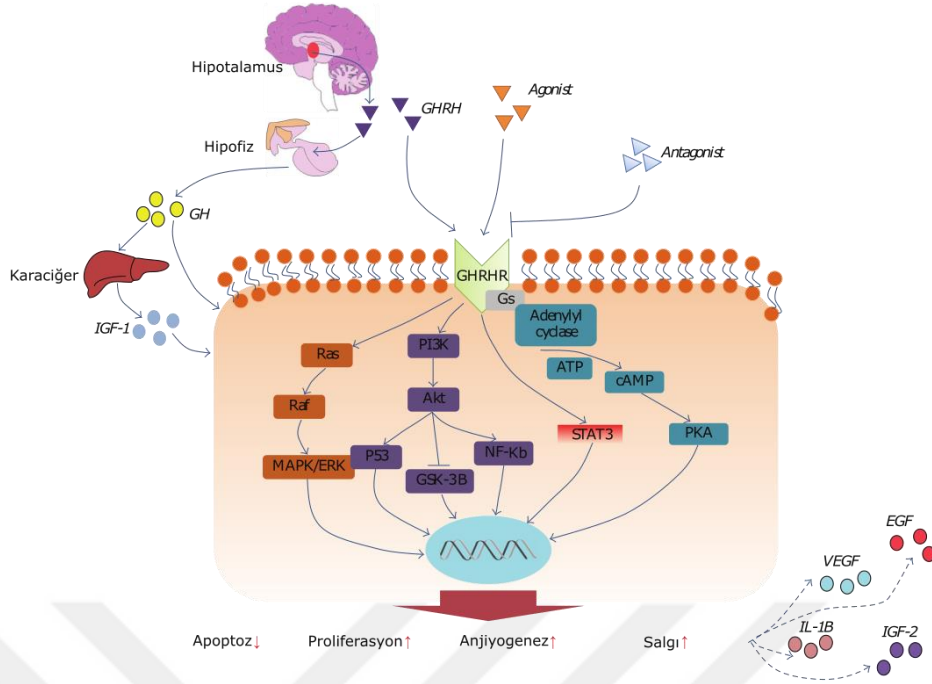
2.2.2 GHRH ve Kanser

GHRH ve reseptörü çeşitli hipotalamik normal ve habis dokularda, bağışıklık hücrelerinde ve kanser hücrelerinde eksprese edilmektedir. Normal ve neoplastik dokularda, aşırı miktarda GHRH üretilmesi hücre proliferasyonunu uyararak ve apoptotik hücre ölümünü önleyerek mitojenik bir rol oynamaktadır. Bu etkiler, GHRH-R'nin 4 farklı varyantı ile sağlanmaktadır. SV1, GHRH-R ile en yüksek yapısal homolojiye sahiptir [54]. GHRH ve GHRH reseptörleri, ekstrapitüiter dokularda ve çeşitli tümörlerde eksprese edilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar SV1 reseptörünün liganddan bağımsız bir aktiviteye sahip olduğunu ve ayrıca ERK1 / 2 yolunu GHRH-R doğrultusunda aktive edebildiğini göstermektedir. Ayrıca, akciğer, göğüs ve prostat kanseri hücre hatlarında GHRH gen ekspresyonunun düşürülmesi, GHRH'nin kanserlerde bir büyüme faktörü olduğu kavramını destekleyerek çoğalma oranlarını önemli ölçüde azalmaktadır. İlginç bir şekilde, GHRH, LNCaP prostat kanseri hücre hattının indirgeme / oksidasyon (redoks) tepkimeleri durumunu etkileyerek reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini arttırmaktadır [55]. Yumurtalık, testis ve sindirim sistemi dahil olmak üzere çeşitli dokularda GHRH ve reseptörlerinin varlığı, GHRH'nin bu dokularda düzenleyici bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. Daha önce belirtildiği gibi, biyolojik veya immünolojik olarak aktif GHRH ve GHRH'yi kodlayan mRNA, meme, endometriyum ve yumurtalık kanserleri dahil olmak üzere birçok malign tümöründe bulunmaktadır. GHRH ayrıca küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) hücre hatları tarafından

üretilmektedir ve glioma kültür hücrelerinde GHRH'yi kodlayan mRNA tespit edilmektedir. Bu tümörlerde GHRH'nin, reseptörleri yoluyla IGF-1 veya IGF-2 salgılanmasının düzenlenmesinde rol oynayan bir otokrin / parakrin büyüme faktörü olarak işlev göstermektedir [56].

2.2.3 GHRH Agonistleri

GHRH agonistleri, kimyasal olarak modifiye edilmiş amino asit sekanslarına sahip doğal GHRH'nin analoglarıdır. Agonistler doğal GHRH'ye kıyasla daha yüksek aktivite ve daha iyi stabilite sergilemektedirler bundan dolayı klinik uygulamalar için daha uygun bulunmaktadırlar [45]. GHRH agonistleri, doğrudan reseptör bağlanması ve hücre proliferasyonunu uyararak periferik dokuları etkileyebilmektedirler. Birden fazla hücre tipi etkilenebilir; örneğin, GHRH agonisti JI-38'in, doğal GHRH reseptörünün bir fibroblast ekleme varyantı yoluyla fibroblastları aktive ederek yara iyileşmesini arttırdığı bilinmektedir [57]. Son zamanlarda klinik uygulamalar için yapılan araştırmalarla geliştirilmekte olan bir dizi yeni seçici ve daha güçlü GHRH agonistik analogları üretilmektedir. Bunlar MR-356, MR-361 ve MR-367'yi içermektedir [58]. GHRH analoglarının ve bunların ayırt edici rollerinin tümör hücrelerine karşı normal hücreler üzerindeki etkileri Şekil 2.10'de özetlenmektedir [42].



Şekil 2.10 GHRH agonistlerinin hücreler üzerindeki etkilerinin şematik olarak gösterilmesi [42]

GHRH agonisti MR409'un çeşitli insan kanser hücreleri üzerindeki etkileri araştırılmaktadır. Araştırmalar sonucunda küçük hücreli akciğer kanseri hücrelerinde hücre canlılığını arttırdığı, hücresel cAMP üretimini indüklediği ve apoptoza teşvik ettiği görülmektedir. *İn vitro* olarak MR409, GHRH agonistlerinin aksine akciğer kanseri hücreleri üzerinde antagonistik etki göstermektedir. Bununla birlikte, *in vivo* olarak gerçekleştirilen çalışmalarda MR409, farelerde akciğer kanserlerinin büyümesini inhibe ettiği ortaya çıkmaktadır [5].

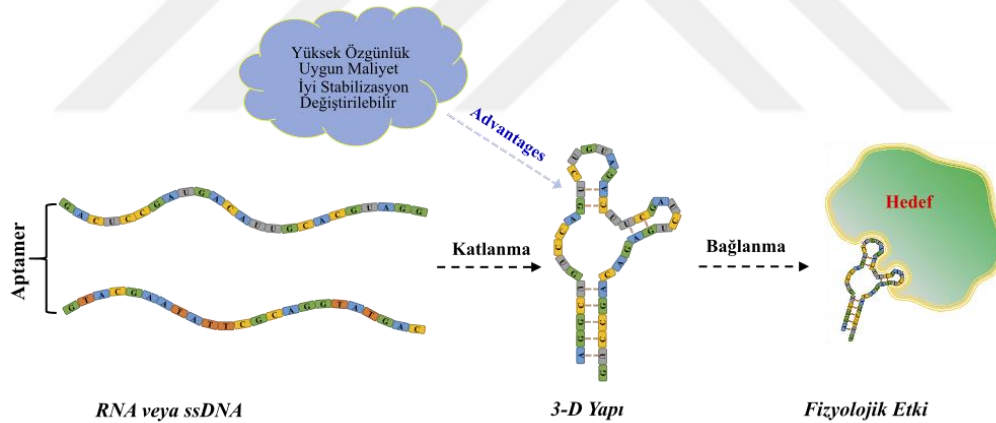
2.2.4 GHRH Antagonistleri

GHRH antagonistleri, güçlü antikanser ve antienflamatuar aktivitelere sahip peptid analoglarıdır. GHRH antagonistleri, tümör hücrelerini hedefledikleri ve hem *in vivo* hem de *in vitro* büyüme potansiyellerini yüksek miktarda ortadan kaldırdıklarından, çeşitli malignitelere karşı en gelişmiş terapötik yaklaşımı temsil etmektedirler [41]. GHRH ve GHRH-R'nin üretimi, meme ve yumurtalık kanserleri dahil olmak üzere çeşitli tümör hücrelerinde gerçekleşmektedir [29]. Tümör hücrelerinde bu gibi lokal olarak üretilen GHRH, tümör hücresi çoğalmasını ve metastazını doğrudan etkileyen biyoaktif bağışıklık tepkilerini tetiklemektedir. Bununla birlikte, GHRH antagonistleri, tümör mikroçevresinde aktif olan GHRH / GHRH-R'nin lokalize cevaplarına karşı koyarak tümör ilerlemesini baskılayabilmektedir. GHRH

antagonistleri, GHRH-R'ye bağlanma ve böylece GHRH-R aktivasyonunu bloke etme konusunda GHRH ile yarışmaktadır [59]. Son 25 yıldır, GHRH antagonistlerinin antitümör özellikleri meme, prostat, pankreas, kolon, akciğer, yumurtalık, beyin ve lenfosit kanser hücreleri üzerinde çalışılmaktadır. GHRH'nin MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde Ras ve Raf'ın fosforilasyonu yoluyla MAPK aktivasyonuna neden olmaktadır. GHRH antagonistleri MZ-J-7-138 ve JV-1-92'nin bu yolu bloke ettiği ve akciğer karsinomunu baskıladığı bilinmektedir [60]. Ayrıca GHRH antagonisti JMR-132'nin Akt ve ERK yollarını baskılayarak prostat kanseri hücre büyümesini inhibe ettiği de yapılan çalışmalarda gösterilmektedir [61]. Tüm bu çalışmalar, GHRH ve antagonistleri için çoklu potansiyel hedefleri ortaya çıkaran tümör hücrelerinde büyüme regülasyonu ile sinyal yollarının karmaşıklığını doğrulamaktadır. Anjiyogenez, GHRH antagonistlerinin antitümör etkileri için birincil hedef olarak kullanılan tümörlerin büyümesini, genişlemesini ve metastazını kontrol eden merkezi bir aktivitedir [62]. GHRH antagonisti MZ-J-7-114'ün vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'nin aktivitelerini bloke etmekle kalmayıp epidermal büyüme faktörü (EGF) ve VEGF reseptörlerinin ekspresyonunu aşağı yönde regüle ederek anjiyogenezi ve tümör büyümesini etkili bir şekilde azaltmaktadır [63]. GHRH antagonistleri olan, JMR-132 ve JV-1-38, PC3 prostat kanseri hücre hattında hücre proliferasyonunu baskılamaktadır ve proliferasyon markeri olan PCNA seviyelerini düşürmektedir. Aynı zamanda hücre döngüsünün S-fazında biriken hücrelerin artmasına, G1 ve G2 / M fazlarında ise bir azalmaya yol açmaktadır. S-fazı durdurmaya ve apoptotik hücrelerin artmasına neden olmaktadır [64]. GHRH antagonistleri, prostat [65], meme [66], yumurtalık [67], böbrek hücresi karsinomları [68], akciğer karsinomları [63] ve çeşitli deneysel kanserlerin *in vivo* olarak büyümesini baskılamaktadır. GHRH'nin antagonistik analoglarının inhibe edici etkisi, kısmen hipofizden GHRH uyarılmış GH salınımının baskılanması yoluyla endokrin mekanizmaları ile uygulanmaktadır, bu durumda IGF-1 üretiminin azalmasına ve serum IGF-1 miktarında bir azalmaya neden olmaktadır. GHRH antagonistlerinin anti-tümör etkilerine doğrudan mekanizmalar aracılığıyla da aracılık edebilmektedir. Bu mekanizmalardan biri, otokrin / parakrin IGF-1 veya IGF-2'nin tümörlerden salgılanmasının inhibisyonuna dayanırken, en önemli yol, otokrin GHRH'nin tümörlerde etkisinin bloke edilmesini içermektedir. GHRH antagonistleri anti-tümör aktivitesi, çeşitli kanserlerde içsel GHRH, GHRH-R ve GHRH-R SV'lerinin geniş ekspresyonundan dolayı onkolojik açıdan önemlidir [45].

2.3 APTAMER

Aptamerler, ilk olarak 1990'ların başında tanımlandığından beri çeşitli alanlarda kullanılmaktadır [69]. "Aptamer" kelimesi, "takım elbise" anlamına gelen Latince "aptus" kelimesinden ve aptamerlerin özellikle istenen hedeflerle etkileşime girme potansiyeline sahip olduğunu gösteren "bölüm" anlamına gelen "meros" yunanca son ekinden gelmektedir. Aptamerler, moleküler ağırlığı yaklaşık 10 ila 30 kDa arasında değişen ve antikorlardan daha küçük olan kısa tek sarmallı DNA veya RNA'lardan oluşmaktadır [70]. RNA ile karşılaştırıldığında, DNA *in vitro* ortamda daha kararlıdır bundan dolayı DNA aptamerleri daha çok tercih edilmektedir [71]. Aptamerler, büyük özgüllük, yüksek afinite, düşük immünojenisite, nano ölçekli boyut (çapları yaklaşık 1-2 nm'dir) dahil olmak üzere bol avantajlara sahiptir ve ayrıca kimyasal bileşik ile modifiye edilmeleri kolaydır [72]. Aptamerler, hidrojen bağlanması, aromatik halkaların istiflenmesi, tuz köprüleri, Van der Waals etkileşim kuvvetleri ve diğer elektrostatik etkileşimlerin yanı sıra şekil tamamlayıcılığı gibi bağlanma kuvvetleri ile üç boyutlu yapıda olmaları nedeniyle hedeflere kolaylıkla bağlanabilmektedir [73].



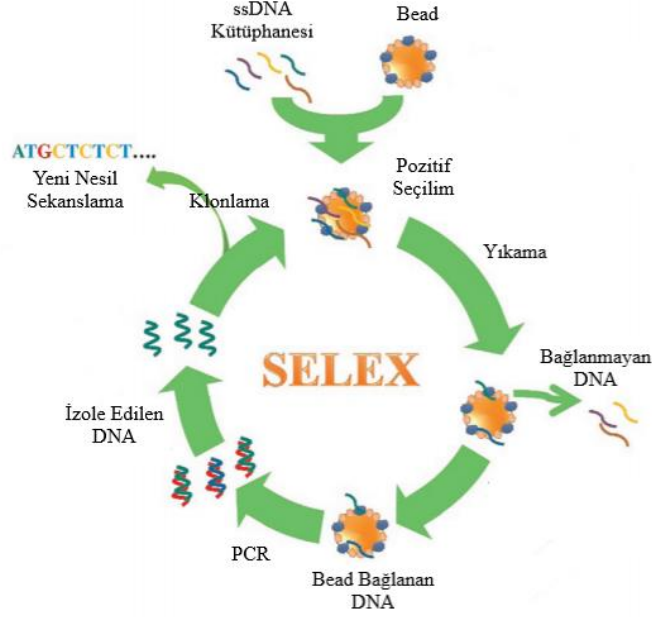
Şekil 2.11 Aptamerlerin yapısı, özellikleri ve biyomedikal uygulamaları için fonksiyonel olarak gösterimi [74]

Aptamerler, doğal olarak oluşan ligandlardan farklı olarak laboratuvar ortamında tasarlanmış oligonükleotid dizilerinden oluşmaktadır [75]. Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler, düz parçaların istiflenmesi ve şekil tamamlayıcılığı yoluyla reseptörler, antijenler ve biyobelirteçler gibi çeşitli hedefleri spesifik olarak tanıyabilmektedir ve bunlarla etkileşime girebilmektedir [76]. Hedeflere bağlandığında, aptamerler antagonizm, agonizm, baskılama ve yıkım gibi bir dizi biyokimyasal etkiyi indüklemektedir [77]. Son yıllarda aptamerlerin

biyomedikal amaçlar için kullanım potansiyeli çeşitli alanlarda değerlendirilmiştir. Aptamerler moleküler tedavi, tanı, biyolojik tarama, biyomedikal görüntüleme, ilaç güçlendirme ve hedeflenen ilaç dağıtımında kullanılmak için değerlendirilmektedir. Aptamerler, iyi yapılandırılmış teknikler kullanılarak spesifik molekülleri hedefleyecek şekilde özelleştirilebilmektedir [78]. Aptamerler, Üstel Zenginleştirme ile Ligandların Sistemik Evrimi (SELEX) tekniği ile sistematik bir şekilde sentezlenmektedir [74].

2.3.1 Üstel Zenginleştirme ile Ligandların Sistemik Evrimi (SELEX)

Aptamerler, Tuerk ve Ellington grupları tarafından ayrı ayrı geliştirilen “Ligandların Üstel Zenginleştirme ile Sistemik Evrimi” (SELEX) yöntemi olarak adlandırılan evrensel bir süreçle elde edilmektedirler [79]. SELEX, tekrarlayan bağlama, ayırma ve çoğalma aşamaları döngülerini içeren yinelemeli bir süreçtir. SELEX işlemi, primer bağlanmasını kolaylaştırmak için her biri bilinen iki dizi bölgesi tarafından rastgele bir bölge içeren 1016 diziden oluşan sentetik oligonükleotidin birleşik kütüphanesiyle başlamaktadır. Kütüphane bir hedef moleküle beraber inkübe edilmektedir. Ayırma adımı, hedefe bağlanan aptamer sekanslarının spesifik olmayan sekanslardan ayrılmasını içermektedir. Ayırma SELEX sürecinde kritik bir adım olduğundan, adımı basitleştirmek veya ayırma verimliliğini artırmak için farklı stratejiler bulunmaktadır. Hedefe bağlı oligonükleotitler, PCR (DNA-SELEX) veya ters transkripsiyon (RT) - PCR (RNA-SELEX) ile ayrılmaktadır ve çoğaltılmaktadır. Sonuçta elde edilen çift sarmallı DNA, yüksek bağlanma ile birden fazla seçim döngüsü ve amplifikasyon süreci üreten sekanslar geçiren yeni oligonükleotit kütüphanesine dönüştürülmektedir [80].



Şekil 2.12 SELEX yönteminin şematik olarak gösterilmesi [81]

SELEX, yüksek afiniteli aptamerlerin hedefe karşı seçilmesinde köklü ve yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. SELEX ile aptamerler pratik olarak küçük moleküller, proteinler, bakteriler, virüsler ve hatta bütün hücreler dahil olmak üzere herhangi bir hedefe karşı seçilebilmektedir. Farklı SELEX yöntemleri araştırmacılar tarafından ihtiyaçlarına uygun olarak ve tüm seçim sürecini daha verimli hale getirmek için geliştirilmektedir [82].

2.3.1.1 SELEX Tipleri

SELEX, tekrarlanan ayrılma ve amplifikasyon turları ile belirli bir hedef için yüksek bir afiniteye sahip nükleik asit ligandlarının birleşik kütüphanesinden aşamalı saflaştırmayı içeren bir işlemdir. Son yıllarda aptamer teknolojisinin gelişmesiyle birlikte, çeşitli aptamerlerin çok çeşitli moleküllere karşı geliştirilmesine izin veren çeşitli modifiye SELEX işlemleri ortaya çıkmaktadır [83]. Geleneksel SELEX yöntemi kullanarak aptamer üretimi birkaç haftadan bir aya kadar sürmektedir. İstenen aptamerin tipine bağlı olarak geleneksel SELEX sırasında çeşitli seçim aşamaları uygulanmaktadır. DNA aptamerleri söz konusu olduğunda, kimyasal olarak sentezlenmiş bir DNA kütüphanesi hedef moleküller ile inkübe edilmektedir. RNA aptamer seçiminde, in vitro transkripsiyon ve ters transkripsiyonun ek aşamaları eklenmektedir. Aptamerleri zenginleştirmek için genellikle 20 tur seçim yapılması gerekmektedir. Geleneksel SELEX köklü ve etkili bir yöntemdir fakat büyük zaman ve işgücü tüketimi nedeniyle alternatif yöntemler tercih edilmektedir [84]. Hücre-

SELEX, doğal konformasyonlarında hücre yüzeyi üzerindeki proteinler, reseptörler ve moleküler biyobelirteçler gibi biyomoleküler hedefler için aptamerlerin tanımlanması, hastalıklar için spesifik etkili problemlerin geliştirilmesi için potansiyel bir araç olarak ortaya çıkmaktadır. Canlı hücreler kullanarak aptamerleri tanımlamak için kullanılan yöntem yaygın olarak hücre-SELEX olarak bilinmektedir [82]. Bead SELEX, hedefin sabitlenmesi için manyetik boncuklar kullanılmaktadır. Manyetik boncuk esaslı SELEX adı verilen bu yöntemde, hedef protein manyetik boncuklar üzerinde hareketsizleştirilmektedir ve bir oligonükleotid kütüphanesi ile inkübe edilmektedir. Manyetik ayırıcı ile bağlanmamış oligonükleotitlerden ayrılan bir hedef aptamer kompleksiyle sonuçlanmaktadır [85].

2.3.2 Aptamerlerin Uygulama Alanları

Aptamerler, biyomimetik yapıları ve sentetik prosedürleri nedeniyle "kimyasal antikolar" olarak kabul edilmektedir. Aptamerler, akıllı sistemlerin geliştirilmesinde yüksek kullanım potansiyeli olan pleiotropik ligandlardır [86]. Bugüne kadar, aptamerler moleküler biyogörüntüleme, *in vitro* ve *in vivo* hastalık teşhisi, hedefe yönelik tedaviden hedefe yönelik ilaç verilmesine kadar çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Bir tür nükleik asit ilacı olarak aptamerler, kanser hücrelerinin büyümesini engellemek ve apoptozu teşvik etmek, hedef moleküllerine bağlanma, sinyal iletim yoluna müdahale etme ve hücre sinyallemesini düzenleme mekanizmalarını kullanarak işlev göstermektedir [73]. Aptamerler moleküler hedefleri spesifik olarak tanıyabilir ve biyolojik aktivitelerini modüle edebilmektedir, bu da aptamerlerin terapötik ve teşhis amaçlı kullanılmasına izin vermektedir [74].

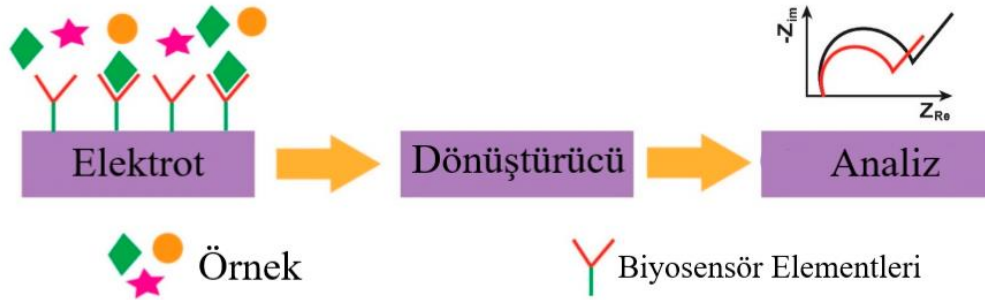
2.3.2.1 Aptamerlerin Terapötik Olarak Kullanımı

Aptamerler, patolojik süreçlere müdahale ederek biyolojik yolların düzenlenmesinde görev almaktadır [87]. Aptamerler teşhis amaçlı biyobelirteçleri hedeflemek için de kullanılabilir. Şu anda, sadece bir aptamer ilacı (Macugen) FDA tarafından onaylanmıştır, ancak diğerleri de klinik çalışmalarda değerlendirilmektedir. Ek olarak, aptamerler yaşlanma ile ilgili bozuklukları, obezite ve *diabetes mellitus*, kardiyovasküler hastalıklar, bulaşıcı hastalıklar, kan pıhtılaşması, kemik hastalıkları, immünolojik hastalıklar ve kanserleri tedavi etmek için kullanılmaktadır [74]. Teşhis amacıyla kullanılan aptamerler, teşhisi sağlamak için tipik olarak uygun nanoparçacıklara konjüge edilmektedir. Son zamanlarda, aptamerler hastalık önleme ve tedavi için potansiyel ajanlar olarak dikkat çekmektedir. Aptamerler, geleneksel

yaklaşımlara daha hassas alternatif tedaviler sağlayabilmektedir. Aptamer esaslı terapötik yaklaşımların geleneksel tanı ve ilaç tedavisine kıyasla önemli avantajları bulunmaktadır. Bu avantajlar, aptamerlerin tedavi sırasında hedeflenen hastalığa spesifikliğı ve hedef moleküle özgü olarak düzenlenmesinden kaynaklanmaktadır [88].

2.3.2.2 Aptamer Tabanlı Biyosensörler

Aptamerler, biyosensör bileşeni olarak kullanım için ideal olan yüksek afiniteli ve özgüllüğe sahip hedef moleküllere bağlanabilmektedir. Aptasensörler olarak da bilinen aptamer bağlantılı biyosensörler, floresans, kemilüminesans, elektrokimya veya immünoüminesans teknikleri kullanılarak tespit edilebilmektedirler. Aptamer bazlı biyosensörler, hastalık markerleri, patojenler, antibiyotikler, toksinler, kirlilikler ile diğer kimyasallar veya biyomoleküllerin doğru ve hızlı bir şekilde saptanması için kullanılmaktadır. Biyosensörler, aptamerlerin hastalık hedeflerine özgüllüğünü ve biyolojik yanıtlarını saptanabilir bir sinyale dönüştürmek için kullanılmaktadır [74]. Biyosensörler, bir dönüştürücü ve biyolojik bir yanıtı tanıyan biyolojik bir elementten oluşmaktadır.



Şekil 2.13 Biyosensörlerin çalışma prensibinin şematik olarak gösterimi [89]

Şekil 2.13’de verildiğı gibi biyosensörler, üç ana bölümden oluşmaktadır. Biyolojik element, enzim, antikor veya nükleik asitten oluşmaktadır. Dönüştürücü, bir tanılama göstergesi sağlamak için sinyali dönüştürmektedir ve son olarak algılama sonuçlarının öncelikli olarak alınan sinyalin görüntülenmesini sağlayan ilgili elektronik veya veri analiz sistemi bulunmaktadır [89].

2.3.2.3 Biyomedikal Görüntüleme için Aptamerler

Aptamer ile modifiye edilmiş problemler kullanılarak çeşitli hastalık belirteçlerinin invazif olmayan görüntülenmesinin, geleneksel görüntüleme tekniklerine göre birçok avantajı bulunmaktadır. Ligand aracılı invazif olmayan görüntüleme, hücre ve moleküler düzeylerde hastalıkların görsel olarak gözlemlenmesini sağlamaktadır [90]. Bu teknik, erken tanı ve tedavi için yüksek doğruluk ve öngörülebilirlik sağlamaktadır. Tanının erken safhada gerçekleşmesi hastalığın iyileşme şansını artırmaktadır. Aptamer destekli biyomedikal görüntüleme, bir aptameri bir flüoresan moleküle veya bir flüoresan aracı veya manyetik rezonans görüntüleme (MRI), ultrason ve pozitron emisyon tomografisi (PET) gibi diğer tomografik tekniklere bağlayarak doğrudan veya aktifleştirilebilir optik görüntüleme yoluyla elde edilebilmektedir. Optik görüntüleme, aptamer bağlantılı sinyal transdüserlerinin floresan veya biyoluminesansını tespit etmek için kullanılabilir. Optik görüntüleme, aptamerleri kullanarak hastalıkların görselleştirilmesi için basit ve düşük maliyetli bir çözüm sunmaktadır [91]. Aptamerler hedeflerine karşı yüksek bir afiniteye sahip olmalarına rağmen, kısa yarılanma ömürleri nedeniyle *in vivo* olarak belirli dokularda hedefe ulaşmakta zorluk yaşamaktadır. Doku hedeflemesini iyileştirmek için, aptamerler genellikle altın / gümüş gibi nanopartiküllerle, silika nanopartiküller ve kuantum noktaları dahil olmak üzere çeşitli nanovektörlerle konjüge edilmektedir. Aptamer aracılı tomografik görüntüleme, aptamer uygulamasının her geçen gün daha önemli bir alan haline gelmektedir. Aptamerler, hedeflenmiş MRI, ultrason ve PET görüntüleme için kullanılan sinyal artırıcılara da konjüge edilebilmektedir. Aptamer bazlı MRI kontrast maddeleri genellikle bir aptamerin süper paramanyetik demir oksit (SPIO) nanopartiküller ile bağlanmasıyla üretilmektedir [92].

2.3.2.4 Aptamer Modifikasyonu ve Aptamer ile Hedefe Yönelik İlaç

Aptamerler doğrudan terapötik RNA'lara hibridize edilmekte ve terapötik RNA'yı hedef bölgeye yönlendirmek için aktif hedefleme ligandları olarak hizmet etmektedir. Hücre veya reseptöre özgü kimerik RNA'ların prototip RNA'ların *in vivo* farmakokinetik dağılımlarını iyileştirdiği ve reseptör aracılı endositoz ile hücrelere taşınmasını kolaylaştırdığı gösterilmektedir [93]. Aptamer-ilaç konjugatlarının tasarımı yenilikçi bir ilaç modifikasyon tekniğidir ve bu konjugatlarda aptamer, farmakolojik etkiler göstermez veya ana bileşiğin aktivitesini modüle etmemektedir, ancak terapötik molekülü ilgili dokuya hedeflemektedir. Günümüzde antibiyotik

direnci klinik tedavilerde sınırlayıcı etki gösteren önemli bir etmendir. Lijuan ve arkadaşları, antibiyotik direncinin üstesinden gelmeye yardımcı olan bakteriyel biyofilmlere nüfuz etmek için aptamer-ampisilin konjugatları geliştirmektedir [94]. Bu konjugatlar, tek başına her iki bileşenden daha fazla belirgin sinerjistik antibakteriyel aktivite uygulamaktadır. Lokal ve metastatik tümör lezyonlarını tedavi etmek için bir aptamerin sitotoksik bir ilaca bağlanması bir başka önemli aptamer uygulaması olarak kullanılmaktadır.

Aptamerler, sinerjistik etkileşim, spesifik ilaç iletimine ilham vererek ve düşük performans gösteren varlıklara afinite sağlayarak ilaçları veya aktif maddeleri güçlendirmek için kullanılmaktadır [95].

2.4 X-APTAMER

X-Aptamer teknolojisi, kütle spektrometrik teknikleri ile klinik tanı ve araştırmalarda yüksek duyarlılık analizleri için yeni bir proteomik yaklaşım olarak kullanılmaktadır. X-Aptamerlerde, amino asit benzeri yan zincirler, fosforoditioatlar ve küçük moleküller gibi çok çeşitli kimyasal modifikasyonlar kullanılmaktadır. X-Aptamerler, yüksek özgüllük ve afiniteye sahip hedef proteinlere bağlanmasına izin veren kimyasal olarak modifikasyonlara uğramaktadır. X-Aptamerler, düşük molekül ağırlıklı substratlara veya makromoleküllere karşı spesifik tanıma özelliklerine sahiptirler [96]. X-Aptamer teknolojisi, aptamerlerin hücre tipleri arasındaki fenotipik olarak farklılıkları tanımlayabilmektedir. Bu sebepten kanser biyolojisi alanında başarılı bir şekilde kullanılmaktadırlar [97]. SELEX yöntemi kullanılarak geliştirilen birçok aptamer, terapötik kullanım için gerekli olan bağlanma afinitesine ve özgüllüğüne sahip değildir [98]. Hedeflenen proteinlerle daha güçlü etkileşime giren daha işlevsel olan çeşitli X-Aptamerler, geleneksel aptamerlerin performansını iyileştirmek için önem oluşturmaktadır [99]. X-Aptamerler geleneksel SELEX aptamerlerine bir alternatif olarak geliştirilerek kullanılmaktadır. X-Aptamerler, boncuk esaslı kütüphaneler kullanılarak bir turun sonunda seçile bilmektedirler. Bu tür kütüphanelerde, değişikliklerin çeşitliliği ve kombinasyonu enzimatik yöntemlerle gerçekleştirilebilecek olanlardan çok daha verimlidir [100]. Bu seçim için kullanılan kütüphaneye dahil edilen modifikasyonlar 5-pozisyon değiştirilmiş deoksiürdinlerden (5-amino-, 5-fenol- ve 5-indol-) oluşmaktadır [101].

BÖLÜM 3 MATERYAL VE METHOD

3.1 KULLANILAN MATERYALLER

3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar ekler bölümünde Tablo 5.1 verilmiştir.

3.1.2 Hücre Kültürü Donanımları

Hücre kültüründe kullanılan donanımlar ekler bölümünde Tablo 5.2 verilmiştir.

3.1.3 Kullanılan Kimyasallar

Deneyle sırasında kullanılan kimyasal maddeler ekler bölümünde Tablo 5.3 verilmiştir.

3.1.4 Kullanılan Tamponlar

Deneyle sırasında kullanılan tamponların içeriği ekler bölümünde Tablo 5.4 verilmiştir.

3.2 KULLANILAN YÖNTEMLER

3.2.1 GHRH 1-29 Peptidinin Biotinlenmesi

GHRH 1-29 peptidinin biotinlenmesi için Thermo Scientific™ EZ-Link™ NHS-SS-PEG4-Biotin (katalog numarası: 21442) kiti kullanılmıştır ve kitin önerdiği şekilde protokol uygulanmıştır. Kit kullanılmadan önce ilk olarak oda sıcaklığına getirilmiştir. GHRH 1-29 peptidi asetik asitte çözüldüğü için pH değeri kitin önerdiği şekilde 7,2-8,0 aralığına getirilmiştir. 10 mM olacak şekilde biotin DMSO ile hazırlanmıştır ve kitin protokolünde bulunan hesaplama işlemlerine göre uygun miktarda protein ve biotin bir araya getirilmiştir. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra biotinlenmiş protein -20°C’de saklanmıştır.

3.2.2 X-Aptamer Seçilimi

GHRH 1-29 proteinine özgü X-Aptamerlerin seçilimi, AM Biotechnologies firmasının satın alınan X-Aptamer seçim kiti (seri numarası:2018-OPR3-TT-du-ISTNBL) ile yapılmıştır.

3.2.2.1 X-Aptamer Kütüphanesinin Hazırlanması

İlk olarak seçim için kullanılacak olan A ve B tamponu hazırlanmıştır. X-Aptamer kütüphanesinin hazırlanması için, 10 ml Seçilim Tamponu B ile resüspanse edilerek 3000 g’de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant, geriye

yaklaşık 100 µl kalacak şekilde uzaklaştırılmıştır ve pellet 3 ml Seçilim Tamponu B ile resüspanse hale getirilmiştir. 95⁰C su banyosunda 5 dakika inkübasyon sonrası yavaş yavaş oda sıcaklığına inmesi beklenmiştir. 7 ml Seçilim Tamponu A eklendikten sonra 3000 g'de 10 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Süpernatant, geriye yaklaşık 100 µl kalacak şekilde uzaklaştırılmış ve pellet total hacim 1,8 ml olacak şekilde Seçilim Tamponu A ile resüspanse edilerek 2 ml'lik santrifüj tüpüne alınmıştır.

3.2.2.2 Negatif Seçilim

Manyetik boncuklar (InvitrogenTM DynabeadsTM M-280 Streptavidin katalog numarası: 11205D) resüspanse edilmiştir. 62,5 µl manyetik boncuk 1,5 ml santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Tüp manyetik standı yerleştirilerek süpernatant atılmış ve toplamda 3 defa 500 µl Seçilim Tamponu A ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası manyetik boncuklar 50 µl Seçilim Tamponu A ile resüspanse edilmiş ve hazırlanan X-Aptamer kütüphanesine karıştırılarak oda sıcaklığında 1 saat döndürülerek inkübe edilmiştir. Tüp manyetik standı yerleştirilerek süpernatant (manyetik boncuklara bağlanmayan kütüphane boncukları) 15 ml falkon tüpüne aktarılmıştır. Kütüphane boncukları 3 defa 10 ml Seçilim Tamponu A ile yıkandıktan sonra 1,8 ml Seçilim Tamponu A ile resüspanse edilerek 2 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır.

3.2.2.3 Hedef Proteinin Manyetik Boncuklarla Birleştirilmesi

0,5 mg manyetik boncuk 1,5 ml santrifüj tüpüne alınmıştır, manyetik standta süpernatant uzaklaştırılmıştır. 250 µl Seçilim Tamponu B toplamda 3 defa yıkanmıştır. 10 µg hedef protein toplam hacim 100 µl olacak şekilde Seçilim Tamponu B içinde oda sıcaklığında 30 dakika döndürülerek inkübe edilmiştir. Tüp manyetik standı alınmıştır ve süpernatant uzaklaştırılmış 3 defa 200 µl Seçilim Tamponu B ile yıkandıktan sonra 100 µl Seçilim Tamponu A ile resüspanse edilmiştir.

3.2.2.4 Pozitif Birincil Seçilim

Negatif seçim sonrası elde edilen kütüphane ile manyetik boncuklarla birleştirilen proteinler bir araya getirilmiş ve oda sıcaklığında 90 dakika döndürülerek inkübe edilmiştir. Elde edilen karışımın yarısı 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne aktarılmış, manyetik standı alınmış, süpernatant atılmıştır. Kalan karışım da pelletin üzerine eklenerek standı alınmış ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Manyetik partiküller 500 µl Seçilim Tamponu A ile bağlanmayan kütüphane boncukları kalmayana kadar yıkanmıştır. Son

iki yıkamada Seçilim Tamponu B kullanılmıştır. Pellet 50 µl Seçilim Tamponu B ile resüspanse edilmiştir.

3.2.2.5 Putatif Aptamerlerin Kesilmesi

Pozitif birincil seçim sonucunda elde edilen 50 µl manyetik boncuğa 50 µl 1 N NaOH eklenmiş ve 65°C’de 30 dakika inkübe edildikten sonra reaksiyon 40 µl 2 M Tris-HCl ile nötralize edilmiştir. Tüp standı alınmış ve süpernatant temiz bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır.

3.2.2.6 Spin Kolon Tampon Değişimi

Kolonun alt kapağı kırılmıştır, 1,5 ml toplama tüpüne yerleştirilmiş ve 1500 g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolonun içerisindeki resinin üzerine 300 µl Seçilim Tamponu B eklenmiş ve 1500 g’de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Kolon yeni bir 1,5 ml toplama tüpüne alınmıştır. Bir önceki aşamada elde edilen kesilen aptamerler resinin üzerine eklenmiştir. 1500 g’de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon atılmış, toplama tüpünde kalan çözelti “Kesilmiş oligonükleotid havuzu” olarak adlandırılmıştır.

3.2.2.7 İkincil Seçilim

2 tane 1,5 ml santrifüj tüpü alınarak Tüp 1 ve Tüp 2 olarak etiketlenmiştir. Bütün tüplere 15 µl kesilmiş oligonükleotid havuzu eklenmiştir. İkinci tüpe 30 µl 500 nM işaretli hedef protein (Biotinli GHRH 1-29) ve 105 µl Seçilim Tamponu B eklenmiştir. Birinci tüpe 135 µl Seçilim Tamponu B eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 saat döndürülerek inkübe edilmiştir. 15 µl manyetik boncuk 3 defa 500 µl Seçilim Tamponu B ile yıkanmış ve 15 µl Seçilim Tamponu B ile resüspanse edilmiştir. 5 µl yıkanmış manyetik boncuk ikinci tüpe eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika döndürülerek inkübe edilmiştir. Tüp manyetik standı alınarak 3 defa 150 µl Seçilim Tamponu B ile yıkanmış ve 100 µl Seçilim Tamponu B ile resüspanse edilmiştir.

3.2.2.8 PCR ve Jel Analizi

İkincil seçim sonrası elde edilen tüplerden 10 µl kalıp olarak kullanılarak PCR yapılmıştır. Her bir tüp için uygun revers primer kullanılmıştır (Tüp 1 için revers primer 1; Tüp 2 için revers primer 2). Toplam 100 µl reaksiyon hacmi ve final konsantrasyonları 1X PCR Tamponu, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,4 µM forward primer, 0,4 µM uygun revers primer, 1 U Taq polimeraz olacak şekilde reaksiyon tüpleri hazırlanmıştır. 94°C’de 1 dakika ilk denatürasyon; döngüler 94°C’de 30 saniye,

50°C’de 30 saniye, 72°C’de 1 dakika; 72°C’de 3 dakika son uzama koşullarıyla PCR yapılmıştır. Her bir tüp için 14 döngü, 18 döngü ve 22 döngü PCR yapılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek UV Görüntüleme Cihazında görüntüler elde edilmiştir.

3.2.2.9 İlave Başlangıç Havuzu PCR

Biotinli yakalama oligosu 20 µl nükleaz içermeyen distile su ile hazırlanmıştır. 50 µl Invitrogen™ Dynabeads™ M-280 Streptavidin manyetik boncukları 1,5 ml santrifüj tüpüne alınmış, 3 defa 100 µl Seçilim Tamponu B ile yıkandıktan sonra 25 µl PBS ile resüspanse edilmiş ve 5 µl biotinli yıkama oligosu eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. 3 defa 100 µl 1X PBS ile yıkanmış ve 100 µl PBS ile resüspanse edilmiştir. İkincil seçim sonunda elde edilen Tüp 1’den 10 µl alınarak biotinli yakalama oligosu ve manyetik boncuk içeren çözeltiye ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. 3 defa 200 µl 1X PBS ile yıkanmış ve 100 µl PBS ile resüspanse edilmiştir. Bu örnekten 10 µl alınarak PCR için kalıp olarak kullanılmıştır. 22 döngü PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.10 GHRH’ye özgü X-Aptamer adaylarının dizilerinin belirlenmesi ve sentezlenmesi

Tüp 1 ve Tüp 2 içindeki örnekler tek bir tüpte bir araya getirilerek Yeni Nesil Dizileme için kitin satın alındığı firmaya gönderilmiştir. Yeni Nesil Dizileme ve aday X-Aptamerlerin 5’ biotin işaretiyle sentezlenmesi ilgili firma tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 Dot Blot

Aptamerler 95°C’de 10 dakika inkübe edilmiştir ve yavaşça oda sıcaklığına soğutulmuştur. Aptamerlerin sıcaklığı oda sıcaklığına indikten sonra aptamer ile GHRH 1-29 proteini temiz eppendorfa koyularak +4°C’de 1 gece çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Thermo Scientific™ Nitrocellulose Membrane 0.45 µm (Katalog numarası: 88018) uygun boyutlarda kesilmiştir ve üzerine yuvarlaklar çizilmiştir. Her bir yuvarlakta toplam hacim 10 µl olacak şekilde GHRH 1-29 bağlanma tamponu (15mM tris, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂) ile hazırlanmış olan aptamer-protein birleşimi emdirilmiştir. Oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Membranın üstüne Thermo Scientific™ HRP/streptavidin (1:10000 TBS-T ile hazırlanan) eklenmiştir ve 3 saat boyunca oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda

HRP/streptavidin tekrar kullanılmak için temiz falcona alınmıştır ve +4°C'de saklanmıştır. Membran 4 defa TBS-T ile yıkanmıştır. Membranda her dot üstüne 10 µl TMB-H₂O₂ eklenmiştir ve CCD kamera ile çekim alınmıştır.

3.2.4 ELİSA

Hücrelerin GHRH anlatım miktarının tespit edilmesi için Elabscience human GHRH ELİSA (katalog numarası: e-el-h1146) kiti kullanılmıştır. Kuyulara 100 µl standartlardan ve örneklerden eklenmiştir. 37°C'de 90 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda üst sıvı uzaklaştırılmıştır ve 100 µl biotinylated detection ab eklenmiştir. 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Üst faz atılmıştır ve 3 defa 350 µl yıkama tamponu ile yıkama işlemi yapılmıştır. 100 µl HRP konjugat eklenmiştir ve 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Üst sıvı uzaklaştırılmıştır ve 5 kez 300 µl yıkama tamponu ile yıkama işlemi yapılmıştır. Her kuyuya 90 µl substrat reaktifi eklenmiştir ve 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir. 50 µl stop solüsyonu eklenmiştir. Bio-Rad Mikroplaka okuyucuda 450 nm absorbans değerinde ölçüm alınmıştır. Standartların konsantrasyonu ve absorbans değerleri kullanılarak konsantrasyon-absorbans değerleri grafiği oluşturulmuştur. Standart eğrinin denkleminde yararlanılarak örneklerin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.2.5 Hücre Kültürü

3.2.5.1 Hücrelerin Büyütülmesi

Deneyler sırasında kullanılan PC-3 (ATCC® CRL-1435™), MIA PaCa-2 (ATCC® CRL-1420™), PNT1A ve HT29 (ATCC® HTB-38™), LNCaP (ATCC® CRL-1740) hücre hatları American Tissue Culture Collection'dan (ATCC) temin edilmiştir. Hücreler %10 Fetal Sığır Serum (FBS), 10U/ml penisilin ve 100µg/ml streptomisin eklenen RPMI (roswell park memorial institute), DMEM (dulbecco's modified eagle's medium), McCoy's 5A besiyerlerinde %5 CO₂ içeren 37°C'de etüvde büyütülmüştür.

3.2.5.2 Hücrelerin Kaldırılması, Sayımı ve Pasajlanması

Petri kabında bulunan medya uzaklaştırılmıştır. 1 ml 1X PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. 1 ml Tripsin-EDTA eklenmiştir ve 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde 5 dakika inkübe edilmiştir. 5 dakika sonrasında Tripsin-EDTA'nın etkinliğinin durdurmak için Tripsin-EDTA miktarı ile eşit miktarda medya ortama eklenerek hücreler falcona aktarılmıştır. +4°C'de 2000 g'de 5 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine 1 ml medya eklenerek pipetaj

yapılmıştır ve hücreler homojenize edilmiştir. Hücre süspansiyonunda 10 µl alınmıştır, Neubauer hemositometresi kullanılarak hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. 1ml'deki hücre sayısının hesaplanabilmesi için çıkan değer 10^4 ile çarpılmıştır. Petri kabına uygun miktarda hücre eklenerek pasajlama işlemi yapılmıştır.

3.2.5.3 Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Bu işlem için hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırıldıktan sonra, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 2000g'de 5 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin üzerine dondurma işlemi için Fetal Sığır Serum (FBS) içinde hazırlanmış %10'luk DMSO (Dimetil sülfoksit) kullanılmıştır. 1 ml dondurma tamponu pellet üzerine eklenir ve pellet homojen hale getirilir. Hücreler Thermo Scientific™ Mr. Frosty™ Freezing Container içine koyularak -80°C 'de saklanmıştır. Hücelere çözdürülme işlemi uygulanırken -80°C 'den veya sıvı azottan çıkartıldıktan sonra, hızlı bir şekilde önceden 37°C 'ye ısıtılmış 1 ml besiyeri ile çözdürülmüştür. 1 ml hücre süspansiyonu uygun petri kaplarına ekilmiştir. Geriye kalan 1 ml hücre süspansiyonu $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 2000g'de 5 dakika santrifüj işlemi yapılmıştır ve süpernatant uzaklaştırılmıştır böylece DMSO'de uzaklaştırılmış olur. Hücrelerin üzerine 1 ml medya eklenerek pipetaj yapılmıştır ve hücreler homojenize edilerek uygun petri kaplarına ekilmiştir. Hücreler çözdürülme işleminden 4 saat sonra kontrol edilmiştir. Yapışma miktarına göre petrinin içinde bulunan medya yeni bir petriye alınmıştır ve üzerine yeni medya eklenmiştir.

3.2.6 Protein İzolasyonu

PC3, HT29, MIA PaCa-2, LNCaP ve PNT1A hücre hatları Tripsin-EDTA ile kaldırılarak homositometre yardımıyla sayılmıştır. 100 mm'lik petrilere 2×10^5 hücre olacak şekilde uygun besiyerleri ile ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücreler morfoloji alması amacıyla 1 gece 37°C %5 CO_2 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası GHRH anlatım profilini incelemek için besiyerleri yeni besiyeri ile değiştirilmiştir ve 48 saat boyunca 37°C %5 CO_2 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyerleri ortamdan uzaklaştırılarak 1X PBS ile kazıyıcı yardımıyla kazıma işlemi yapılmıştır. Bu işlemden sonra içinde hücre bulunan 1X PBS eppendorflara alınarak 2 dakika 1000 g'de santrifüj işlemi gerçekleştirilerek pellet oluşması sağlanmıştır. Bu işlem tüm hücrelerin toplanması amacıyla 2 defa tekrar edilmiştir. Santrifüj ile pellet oluşturması sağlanan hücelere hücre lizis tamponu (CLB) ilave edilmiştir. Örneklerin oda sıcaklığında çalkalayıcıda 20 dakika boyunca inkübasyonu gerçekleştirildikten sonra

20 dakika 16000 g'de +4 °C'de santrifüj işlemi uygulanmıştır, üst faz yeni eppendorflara alınarak -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.7 Bradford ile Protein Miktar Tayini Yöntemi

İzole edilen proteinlerin miktarlarının belirlenmesi için Bovine Serum Albumin kullanılarak standartlar oluşturulmuştur ve standartlar temel alınarak izole edilen proteinlerin miktarları tespit edilmiştir. Artan miktarlarda (1,5 µg, 3 µg, 4,5 µg, 6 µg, 7,5 µg) Bovine Serum Albumin ve örneklerden 1 µl alınarak 96-kuyucuklu plakaya 2 tekrarlı olacak şekilde eklenmiştir. Bovine Serum Albumin ve örneklerin eklendiği kuyucuklara 200 µl Bradford Solüsyonu ilave edilmiştir ve 5 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası Bio-Rad mikrolakaya okuyucuda 595 nm absorbans değerinde ölçüm yapılmıştır. BSA örneklerinin konsantrasyon ve absorbans değerleri kullanılarak konsantrasyon-absorbans değerleri grafiği çizilmiştir ve standart eğri oluşturulmuştur. Bu eğrinin denklemine göre, örneklerin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.2.8 İmmunoblotlama

3.2.8.1 Poliakrilamid Jelin Hazırlanması

Proteinlerin büyüklük miktarlarına bağlı olarak birbirinden ayrılması için SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi uygulanmıştır. Hazırlanan %12 ve %4'lük jelin içeriği Ekler bölümünde Tablo 5.7'de verilmiştir. İlk olarak %12'lik yürütme jeli içeriği beherde hazırlanmıştır, 1 mm boşluk bulunan camlar arasına dökülmüş ve üzerine izopropanol alkol eklenmiştir. Jel döküldükten sonra polimerleşme reaksiyonunun gerçekleşmesi için bir süre beklenmiştir. İzopropanol alkol distile su yardımıyla uzaklaştırılmış ve fazla izopropanol alkol filtre kâğıdı ile temizlenmiştir. Daha sonra %4'lük yükleme jeli beherde hazırlanmıştır ve yürütme jelinin üzerine iki camın arası tamamen dolana kadar dökülmüştür. Camlara uygun tarak camlar arasına yerleştirilerek yükleme jeli polimerleşme reaksiyonu için belli bir süre oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3.2.8.2 Proteinlerin Hazırlanması

Bradford yöntemi ile protein miktarları tespit edildikten sonra immnoblottlama yöntemi için 4X Laemmli tamponu (içeriği Tablo 5.5'de verilmiştir) ve belirlenen µg miktarında protein örnekleri 1:3 oranında karıştırılmıştır. 95°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir ve 10000 g 30 saniye santrifüj yapılmıştır. Bu şekilde proteinler

Poliakrilamid jel sistemine yüklenmeye hazır hale getirilmiş olur. 80 V yürütme tamponu içinde marker ve örnekler poliakrilamid jelin son kısmına gelene kadar yürütme işlemi yapılmıştır.

3.2.8.3 Islak Transfer ve Bloklama

Yürütme işleminden sonra kalın cam ve ince cam spatula yardımıyla birbirinden ayrılarak yürütme tamponunun içeriğinde bulunan SDS'i uzaklaştırmak için distile suyla yıkanmıştır. Yükleme jeli spatulayla kesilerek uzaklaştırılmıştır ve transfer tamponu içine alınmıştır. Poliviniliden florid (PVDF) membran metanol içinde aktif hale getirilerek önce methanoldan uzaklaştırmak için distile suya daha sonra da transfer tamponu içine alınmıştır. Filtre kâğıdı ve süngerler transfer tamponu ile ıslatılmıştır. Kasetin şeffaf yüzeyinden başlayarak önce sünger-filtre kâğıdı-membran-SDS-Poliakrilamid jel-filtre kâğıdı-sünger şeklinde sandviç oluşturulmuştur ve kaset kapatılmıştır. Tankın içine transfer tampon eklenmiştir ve hazırlanan kaset siyah taraf siyah yöne bakacak şekilde yerleştirilerek 220 mA transferi gerçekleştirilecek proteinin büyüklüğüne göre dakikası ayarlanarak transfer işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfer işleminden sonra %5'lik yağsız süt tozu (%0,1 Tween-20 içeren 1X TBS) ile hazırlanan bloklama solüsyonunda 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

3.2.8.4 Primer ve Sekonder Antikor

Primer ve sekonder antikor %5'lik yağsız süt tozu (%0,1 Tween-20 içeren 1X TBS) içinde hazırlanmıştır. Primer antikor 1:1000 dilüsyon ile, Sekonder antikor ise 1:3000 dilüsyon ile hazırlanmıştır. İnkübasyon sonrası, primer antikor ile 2 gün boyunca +4°C sıcaklıkta rollerda inkübe edilmiştir. Primer antikorun inkübasyon süresi dolduktan sonra membran 10 dakika 3 kez TBS-Tween-20 ile yıkanmıştır ve yıkama işleminden sonra, membranlar sekonder antikora alınmıştır ve 2 gün boyunca +4°C sıcaklıkta rollerda inkübe edilmiştir.

3.2.8.5 Görüntü Alınması

Sekonder antikor uygulaması sonrası membranlar 2 defa 10 dakika TBS-Tween-20 ve 1 defa 5 dakika TBS ile yıkanmıştır. Görüntülerin çekilebilmesi için kemiluminesans tamponları hazırlanması gerekmektedir. Hazırlanan kemiluminesans tamponları Ekler bölümünde Tablo 5.6 verilmiştir. A ve B tamponu olarak isimlendirilen bu çözeltiler 1:1 oranında karıştırılıp 5 dakika karanlıkta reaksiyonların gerçekleşmesi için inkübe edilmiştir. İnkübe edildikten sonra membranlar bu çözeltiliye aktarılır ve 2-3 dakika

inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra kemiluminesans görüntüleme sisteminde Bio-rad ChemiDoc™ MP cihazı kullanılarak CCD kamera ile çekim alınmıştır.

3.2.9 Doza ve Zamana Bağlı Hücre Canlılık Testi (MTT)

Hücreler 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 5×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir ve bir gece %5 CO₂ içeren 37°C'lik etüvde morfoloji almaları için inkübe edilmiştir. Daha sonra hücrelerin medyaları alınarak hücrelere 95°C'de 10 dk inkübe edilerek oda sıcaklığına yavaşça soğutulmuş aptamerler (Ana Stok:100 µM) 0,1 µM, 0,25 µM, 0,5 µM aptamer dozları medya ile hazırlanarak uygulanmıştır. Aptamer uygulamasından 24, 48 ve 72 saat sonra hücrelerin besiyerine her kuyuya 10 µl 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) tuzu eklenmiştir. Hücrelerin 4 saat 37°C'de %5 CO₂ inkübasyonu sonrasında sadece canlı hücreler hidrojenaz enzimi vasıtasıyla mitokondrilerinde metabolize ettiği MTT tuzunu formazan kristallerine dönüştürmüştür. İnkübasyon sonrası içinde MTT tuzu bulunan besiyeri uzaklaştırılmıştır ve 100 µl DMSO (Dimethyl sulfoxide) eklenmiştir. 10 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra Formazan kristallerinin DMSO'da çözünmesiyle Bio Rad Mikropilaka okuyucuda 570-655 nm absorbans değerlerinde ölçüm yapılarak hücre canlılığı hesaplanmıştır.

3.2.10 cAMP Miktarının Tespit Edilmesi

Hücrelere 72 saat boyunca 0,5 µM aptamer uygulandıktan sonra hücrelerdeki cAMP miktarının tespit edilebilmesi için Cell Signaling Technology Cyclic AMP XP® Assay Kit (katalog numarası:4339) kullanılmıştır. Kitin protokolü değişiklik yapılmadan uygulanmıştır. İlk olarak hücreler 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 2×10^4 hücre olacak şekilde FBS bulunmayan medya ile ekilmiştir. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması için 37°C'de %5 CO₂ inkübe edildikten sonra 0,5 µM aptamer uygulanmıştır ve 72 saat inkübe edilmiştir. 10X hücre lizis tamponu içinde 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) bulunacak şekilde 1X hücre lizis tamponuna çevrilmiştir. Hücreler 2 defa soğuk 1X PBS ile yıkanmıştır ve petrilerin içine 100 µl 1X hücre lizis tamponu eklenerek 10 dakika boyunca buz üstünde inkübe edilmiştir. Kitin içinde bulunan standartlar 1X hücre lizis tamponu kullanılarak hazırlanmıştır. Örneklerden ve standartlardan 50 µl alınarak 50 µl HRP-linked cAMP tamponu ile karıştırılmıştır. Karışım kitin 96 kuyucuklu plakasına aktarılmıştır ve 3 saat boyunca oda sıcaklığında orbital çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her kuyu

300 µl 1X yıkama tamponu ile 4 defa yıkanmıştır. 100 µl TMB solüsyonu eklenerek 5 dakika karanlık ortamda inkübe edildikten sonra Bio-Rad mikropılaka okuyucuda 450 nm absorbans değeriinde ölçüm yapılmıştır. Standartların konsantrasyonu ve absorbans değeriileri kullanarak konsantrasyon-absorbans değeriileri grafiği oluşturulmuştur. Standart eğriinin denkleminde yararlanılarak örneklerin cAMP konsantrasyonları hesaplanmıştır.

3.2.11 Floresan Boyama

3.2.11.1 Diheksilokarbosiyanin İyodür (DiOC₆) Boyama

Hücre hatlarında mitokondri membran potansiyelindeki değerişikleri göstermek amacıyla DiOC₆ boyama işleme yapılmıştır. Bu amaçla 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine her bir kuyuda 5x10⁴ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması için 37⁰C’de %5 CO₂ inkübe edildikten sonra 500 nM aptamer uygulanmıştır ve 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında her bir kuyucuğa 1nM DiOC₆ (ana stok: 4mM) boyası uygulanarak 15 dakika boyunca 37⁰C’de %5 CO₂ etüvde bekletilip floresan mikroskobunda mavi filtre altında çekim alınmıştır.

3.2.11.2 Propidyum İyodür (PI) Boyama

PI, canlı hücrelerin membranlarından geçemeyen ancak ölü hücrelerde membran potansiyellerinin bozulmasından kaynaklı olarak hücre içine girerek DNA’ya bağlanabilen bir boyadır. Bu özelliğinden dolayı floresan mikroskobu altında canlı ve ölü hücrelerin birbirinden ayırt edilmesinde kullanılmaktadır. Bu amaçla 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine her kuyuda 5x10⁴ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması 37⁰C’de %5 CO₂ beklendikten sonra hücrelere 500 nM aptamer uygulanarak 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben her bir kuyucuğa 2 µg/ml PI (ana stok: 50 mg/ml) boyası uygulanarak 30 dakika etüvde bekletildikten sonra floresan mikroskobunda yeşil filtrede ölü hücreler kırmızı renk olarak görüntülenmiştir.

3.2.11.3 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama

Hücre hatlarında DNA kırıklarının gösterilmesinde DAPI boyası kullanılmaktadır. DAPI boyası floresan mikroskobunda açık mavi renk (aqua) dalga boyundaki ışığı absorbe ederek mavi renkte bir ışık yaymaktadır. Bu amaçla 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine her bir kuyucukta 5x10⁴ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere 500 nM aptamer

uygulanmıştır. 72 saat sonra her bir kuyucuğa 1µg/ml DAPI (ana stok: 1mM) boyası uygulanarak 10 dakika etüvde bekletildikten sonra floresan mikroskobu altında mavi filtrede DNA gözlemlenmiştir.

3.2.11.4 İmmünoflöresan (IF)

Hücrelerdeki GHRH ve GH anlatımını göstermek amacıyla İmmünoflöresan (IF) yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan kimyasalların içerikleri Ekler bölümünde Tablo 5.8'de verilmiştir. Hücreler coversliplerin üzerine 2×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. 1 gece 37°C 'de %5 CO_2 ile etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra medyalar uzaklaştırılmıştır ve 3 defa 1X PBS ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Coversliplerin üstüne 15 dakika boyunca -80°C 'de soğutulmuş %100 metanol yavaş bir şekilde eklenmiştir ve 10 dakika inkübe edilmiştir. Metanol uzaklaştırılmıştır ve coverslipler kurumaya bırakılmıştır. 3 kere 1X PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. 1 ml %0,1 Triton X-100 (1X PBS içinde) eklenmiştir ve 15 dakika inkübe edilmiştir. 3 kere 1X PBS ile, 3 kere 500 µl PBB solüsyonu ile yıkama işlemi uygulanmıştır. 1 ml bloklama solüsyonu ile oda sıcaklığında orbital karıştırıcıda (10-15 g) de 60 dakika inkübe edilmiştir. 3 kere 500 µl PBB solüsyonu ile yıkanmıştır. Hazırlanan primer coverslipin üzerini kaplayacak şekilde yerleştirilmiştir. Daha sonra kuyuların üzerine gergin bir şekilde ıslak filtre kâğıdı ile kapatılmıştır ve üzeri folyo ile kaplanmıştır ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de orbital çalkalayıcıda (10-15 g) gece boyu inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 3 kere 500 µl PBB solüsyonu ile yıkanmıştır. Hazırlanan sekonder coverslipin üzerine koyulmuştur. Daha sonra kuyuların üzerine gergin bir şekilde ıslak filtre kâğıdı koyulmuştur ve $+4^{\circ}\text{C}$ çalkalayıcıda (10-15 g) 60 dakika inkübe edilmiştir. 3 kere 500µl PBB solüsyonu ile yıkanmıştır. Eğer ikili boyama işlemi yapılacaksa tekrar bloklama solüsyonu eklenmiştir ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilme aşamasından protokol diğer boyama işlemi için tekrarlanmıştır. Son işlem yapıldıktan sonra 1 µl DAPI (ana stok: 1 mM) boyası (1X PBS ile 1:1000 dilüsyon) coverslipin üzerine koyulmuştur ve 10 dakika orbital çalkalayıcıda karanlıkta inkübe edilmiştir. Lam üzerine 1 damla 1X PBS damlatılmıştır ve coverslip hücreler altta kalacak şekilde lam üzerine kapatılmıştır ve floresan mikroskobu ile çekim alınmıştır. Çekim sonrası coverslip tekrar petrolere alınmıştır üzerine 1ml 1X PBS içinde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

3.2.11.5 Biotin işaretli X-Aptamerlerin MIA PaCa-2 hücre yüzeyine bağlandığının immunofloresan boyama ile gösterilmesi

MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücreleri doza bağlı aptamerlerin (0-500 nM) hücrelere bağlandığını göstermek üzere her kondüsyon için coversliplere 2×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Ekimi takiben 72 saat 0, 50, 100, 250, 500 nM aptamer uygulaması bitiminde metanol ile hücreler fikse edilmiş ve permeabilizasyon işlemini takiben hücrelere 1 μ l Streptavidin çözeltisi ile 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiş, 1 μ l Biotin çözeltisi eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübe edilip, 3 defa PBB ile yıkanarak immunofloresan bloklama çözeltisi ile oda sıcaklığında 1 saat bloklanmıştır (Invitrogen™ Endogenous Biotin-Blocking Kit Katalog Numarası: E21390). Bloklama sonrası hücreler 3 defa 1X PBS ile yıkandıktan sonra 1X PBS ile 1:1000 oranında hazırlanan Streptavidin-Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific katalog numarası: S11223) ile oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. 3 defa PBS ile yıkama sonrasında 1ml PBS içinde 1 μ g/ml DAPI uygulanarak 10 dakika inkübe edilmiştir. Hücrelerin fikse halde bulunduğu lameller temiz bir lam üzerine ters kapatılarak floresan mikroskopta görüntüler alınarak fotoğraflar çekilmiştir.

3.2.11.6 Ca⁺² Green Boyaması

Hücreler 12 kuyucuklu petrilere 2×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler yapışması için 1 gece 37°C'de %5 CO₂ etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 0,5 μ M aptamer uygulanmıştır ve 72 saat inkübasyondan sonra her kuyuya 1 μ M Ca⁺² Green (Thermo Fisher Scientific katalog numarası: C3011MP) eklenerek 45 dakika 37°C inkübe edilmiş ve floresan mikroskobu altında mavi filtrede çekim alınmıştır.

3.2.12 Hücre Akış Sitometresi

3.2.12.1 PI Analizi

Aptamer uygulamasına bağlı olarak hücre popülasyonunun hücre devri fazlarındaki dağılımını DNA içeriğine göre analiz etmek için PI boyası kullanılmaktadır. Bu amaçla 6 kuyucuklu petriye her bir kuyuda 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere 0,5 μ M dozunda aptamer 72 saat boyunca uygulanmıştır. İnkübasyon sonrasında hücreler Tripsin-EDTA yardımıyla kaldırılmıştır. +4°C'de 2000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen hücre pelletleri 1X PBS ile 2 defa yıkandıktan sonra 500 μ l %70'lik soğuk etanol ile fiksasyon işlemi yapılmıştır. 1 hafta boyunca -20°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler +4°C'de 2000 g'de 5 dakika

santrifüj edilerek etanol uzaklaştırılmıştır. Ardından 1X PBS ile yıkanan hücre pelletine santrifüjleme işlemi yapılmıştır ve 1X PBS uzaklaştırılmıştır. Daha sonra pelletler önce 245 µl 1X PBS’de çözülüp sonrasında ise 25 µg RNaz (10 mg/ml) ve 25 µg PI boyası (10 mg/ml) ile muamele edilmiştir. 37⁰C’de karanlıkta 30 dakika inkübe edilerek hücreler FL-2A filtresi (585/400 nm) kullanılarak 10³ hücrenin (BD Accuri™ C6) hücre akış sitometresi cihazında analizi yapılmıştır.

3.2.12.2 Annexin V/PI analizi

Hücreler 3x10⁵ olacak şekilde 6 kuyucukluk petrilere ekilmiştir ve yapıştıktan sonra 500 nM X-Aptamer uygulanmıştır. 72 saat boyunca 37⁰C’de inkübe edildikten sonra Tripsin-EDTA ile kaldırılarak 2 defa soğuk PBS ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra BD biosciences FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit (Katalog Numarası: 556547) içinde bulunan 10X bağlanma tamponu 1X bağlanma tamponuna çevrilmiştir ve 100µl eklenerek pellet resüspanse hale getirilmiştir. Annexin V ve PI boyasından 3µl eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildikten sonra hücre akış sitometresi cihazında FL-3A ve FL-2A filtrelerinde 1x10³ hücre okutulmuş (BD Accuri™ C6) analizi yapılmıştır.

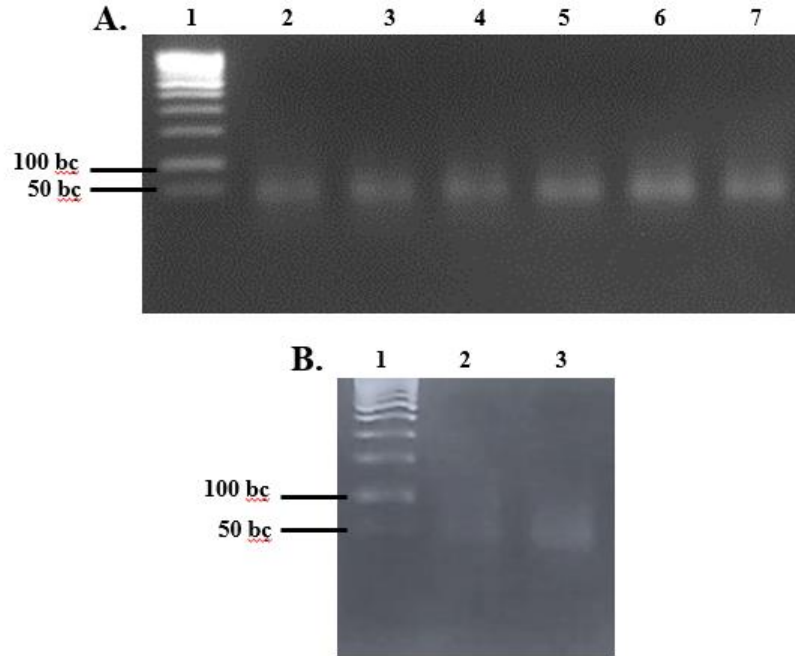
3.2.13 İstatistiksel Analiz

Elde edilen sonuçlar en az üç deney tekrarının ortalamasıdır. Deneylerden elde edilen tüm sayısal sonuçlar GraphPad Prism 8.0. kullanılarak grafik haline dönüştürülmüş ve istatistiksel olarak analizleri bu program sayesinde gerçekleştirilmiştir. Anlamlı değişimler için p değeri sırasıyla ns ≥ 0,05, * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001, **** p ≤ 0,0001 olarak verilmiştir. GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerlerinin olası iki boyutlu yapıları ve potansiyel serbest enerji düzeyleri mfold web (tool) programı (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>) kullanılarak çizilmiştir. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerlerinin Kd değerlerinin hesaplanabilmesi için Sigma Plot 14.0 programı non-linear regresyon analizi kullanılmıştır.

BÖLÜM 4 SONUÇLAR

4.1 GHRH 1-29 ÖZGÜ X-APTAMERLERİN SENTEZ EDİLMESİ VE DİZİLERİNİN BELİRLENMESİ

Potansiyel yüksek afiniteli GHRH 1-29 özgü aptamer sentez edebilmek amacı ile AM Biotechnologies firmasından satın alınan aptamer sentez kiti kullanılmıştır. GHRH 1-29 özgü aptamerler kitin üretici firmasının önerdiği şekilde yapılan deneyler ile elde edilmiştir. 1 numaralı tüpün içine DNA havuzu, 2 numaralı tüp içine biotinleşmiş GHRH 1-29, magnetik partiküller ve DNA havuzu eklenmiştir. Deneysel prosedür uygulandıktan sonra %2,5 agaroz jel görüntülerine göre yaklaşık olarak 80 bç GHRH 1-29 özgü X-Aptamerler elde edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 GHRH 1-29 özgü X-Aptamer sentez kiti kullanılarak elde edilen potansiyel X-Aptamerlerin PCR sonuçlarının agaroz jelde gösterilmesi

Tüp 1: DNA kütüphanesi, Tüp 2: DNA kütüphanesi+ Biotinli GHRH 1-29+ magnetik partikül

A. 1. 50 bp marker 2. Tüp 1 14 döngü 3. Tüp 1 18 döngü 4. Tüp 1 22 döngü 5. Tüp 2 14 döngü 6. Tüp

2 18 döngü 7. Tüp 2 22 döngü B. 1. 50bp Marker, 2. Tüp 1 22 döngü, 3. Tüp 2 22 döngü

X-Aptamerler, AM Biotechnologies firmasından satın alınan GHRH özgü X-Aptamer sentez kiti kullanılarak elde edilmiştir. Kitin önerdiği protokol değiştirilmeden uygulanmıştır. GHRH 1-29 peptidi biotinleşmiştir ve DNA havuzu ile inkübe edilerek GHRH 1-29 özgü X-Aptamerler seçilmiştir. Seçilen X-Aptamerler PCR yöntemi kullanılarak 14-18-22 döngü olacak şekilde çoğaltılmıştır. PCR ürünleri %2,5'lük agaroz jelde görüntülenmiştir.

PCR ürünleri yeni nesil sekanslama işlemi için AM Biotechnologies firmasına gönderilmiştir. Yeni nesil sekanslama işlemi firma tarafından gerçekleştirilmiştir. Firmadan gelen yeni nesil dizileme sonuçlarına göre GHRH 1-29 peptidi için 5 adet potansiyel X-Aptamer sentezlenmiştir. Sentezlenen X-Aptamerlerin nükleotid dizileri Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1 GHRH 1-29 özgü X-Aptamer sentez kiti ile elde edilen potansiyel X-Aptamerlerin nükleotid dizileri

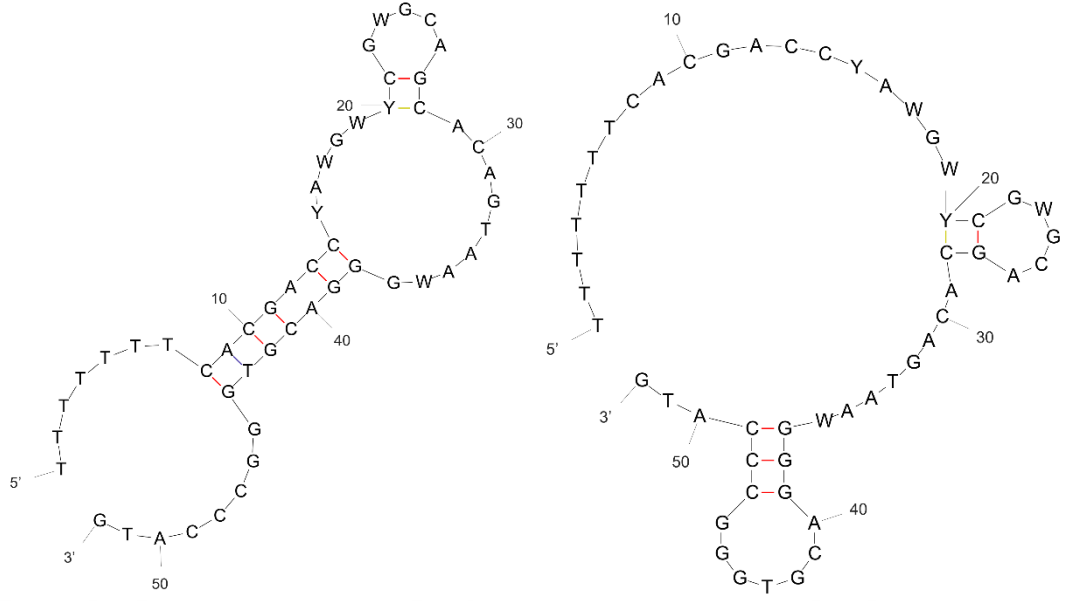
GHRH 1-29 özgü X-Aptamerler AM Biotechnologies firması tarafından yeni nesil sekanslama işlemi ile sentez edilmiş ve sentez edilen X-Aptamerlerin nükleotid dizileri firma tarafından bildirilmiştir.

Sentez işlemi firma tarafından yapılarak elimize ulaştırılmıştır.

APTAMER İSİMLERİ	GHRH 1-29 ÖZGÜ APTAMERLERİN NÜKLEOTİD DİZİLERİ
TKY.T2.02	TTTTTTCACGACCYAWGWYCGWGCAGCACAGTAAWGGGACGTGGGCCCCATG
TKY.T2.06	TTTTTTTGCCACCYCCGWYCGWGGCCACAGAYAWGCAGTGXCGYGCCATG
TKY.T2.07	TTTTTTCACGACGYACGWYCGWGGACGAACCAWTCACCGTGGGCCCCATG
TKY.T2.08	TTTTTTTGCCACAYWWGWYCGGGGGACGAACCACAAGGGCGTGGGCCCCATG
TKY.T2.09	TTTTTTCACGACAYGCCYGTGGGCAACGAACCGCACGCCCGTGGGCCCCATG

GHRH 1-29 özgü elde edilen potansiyel X-Aptamerlerin nükleotid dizilerine göre potansiyel GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerin olası iki boyutlu yapıları mfold web (tool) programı kullanılarak belirlenmiştir (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>). Bazı X-Aptamerlerin potansiyel serbest enerji düzeneğine göre alternatif olarak birden çok olası iki boyutlu yapısı çizilmiştir. Mfold programında DNA folding form seçilmiştir. Katlanma sıcaklığı olarak 37⁰C olarak ayarlanmıştır. İyon konsantrasyonu 1 M Na⁺ ve 0 M Mg⁺⁺ olarak belirlenmiştir ve DNA dizisi ise linear olarak seçilmiştir. Bu tercihler kullanılarak olası iki boyutlu yapılar oluşturulmuştur.

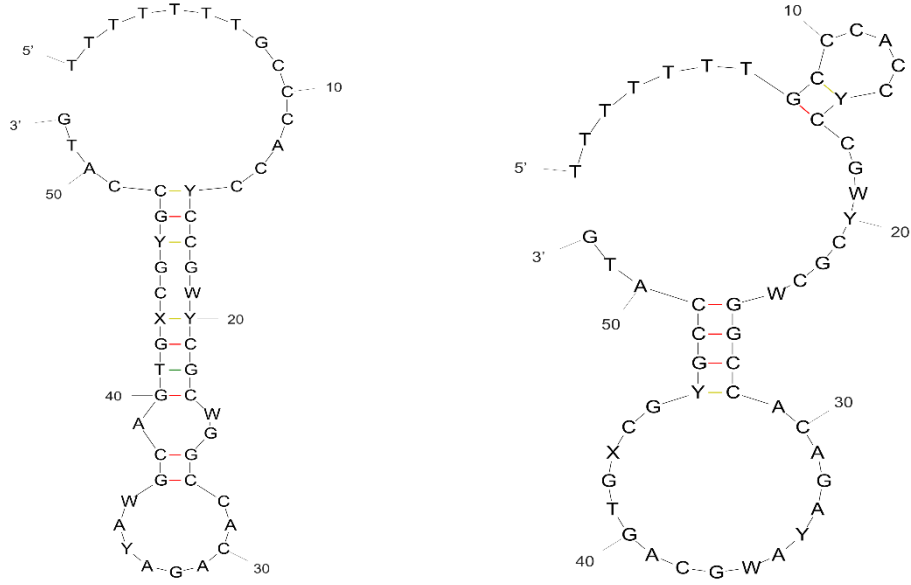
TKY.T2.02 potansiyel GHRH 1-29 özgü X-Aptameri için 2 farklı iki boyutlu yapısı bulunmuştur. Bu iki boyutlu yapılar için ilk potansiyel serbest enerji değeri 3,82 çıkmış ve diğer değer 2,92 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 TKY.T2.02 potansiyel GHRH 1-29 özgü X-Aptamer için serbest enerji değerleri ve olası iki boyutlu yapılarının gösterilmesi

TKY.T2.02 potansiyel GHRH 1-29 özgü X-Aptamer için potansiyel serbest enerji değerleri ve olası iki boyutlu yapıları Mfold programı kullanılarak belirlenmiştir.

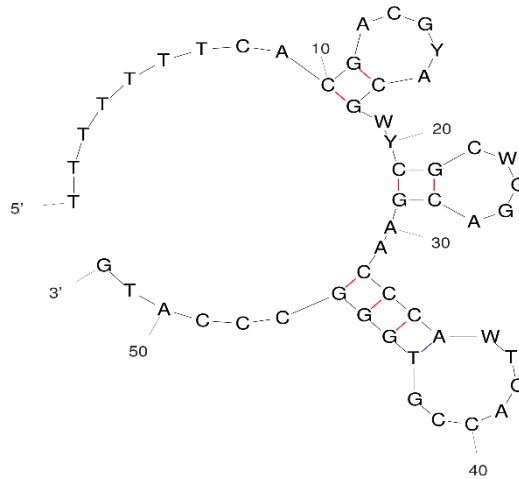
TKY.T2.06 potansiyel GHRH 1-29 özgü X-Aptameri için Mfold programı 2 farklı iki boyutlu yapı çizilmiştir. Bu iki boyutlu yapılar için ilkinde potansiyel serbest enerji değeri 4,07 belirlenmiş diğer olası 2D yapı için serbest enerji değeri 3,68 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 TKY.T2.06 potansiyel GHRH 1-29 özgü X-Aptamer için serbest enerji değerleri ve olası iki boyutlu yapılarının gösterilmesi

TKY.T2.06 potansiyel GHRH 1-29 özgü X-Aptamer için potansiyel serbest enerji değerleri ve olası iki boyutlu yapıları Mfold programı kullanılarak belirlenmiştir.

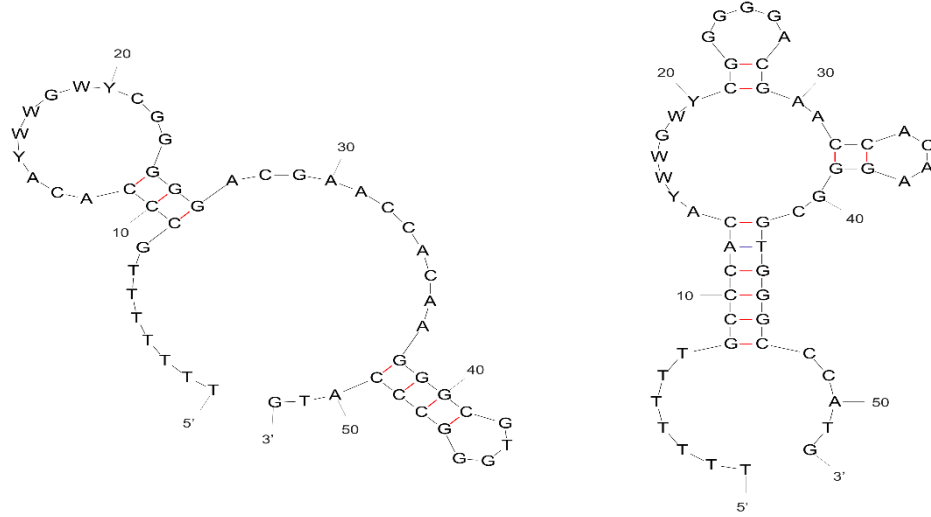
TKY.T2.07 potansiyel GHRH 1-29 özgü X-Aptameri için 1 tane iki boyutlu yapı çizilmiştir. Bu iki boyutlu yapı için potansiyel serbest enerji değeri 5,78 çıkmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 TKY.T2.07 potansiyel GHRH 1-29 özgü X-Aptamer için serbest enerji değerleri ve olası iki boyutlu yapılarının gösterilmesi

TKY.T2.07 potansiyel GHRH 1-29 özgü X-Aptamer için potansiyel serbest enerji değerleri ve olası iki boyutlu yapıları Mfold programı kullanılarak belirlenmiştir.

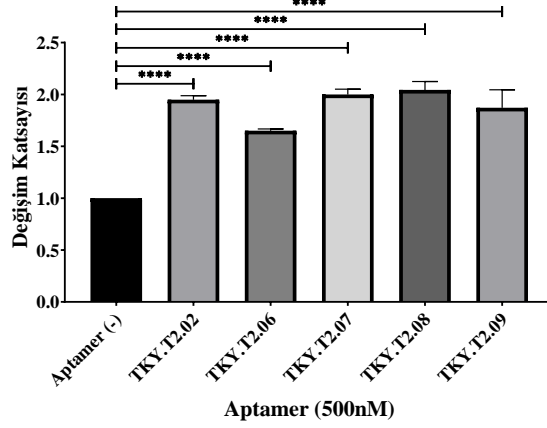
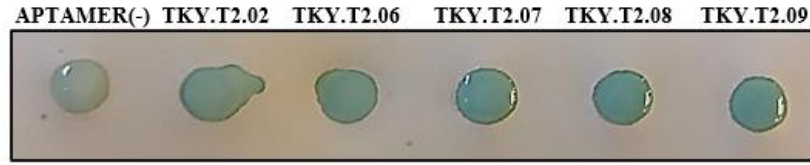
TKY.T2.08 potansiyel GHRH 1-29 özgü X-Aptameri için mfold programı 2 farklı iki boyutlu yapı oluşturulmuştur. Bu iki boyutlu yapılar için ilkinde potansiyel serbest enerji değeri 6,44 çıkmıştır. Diğeri için bu değer 5,84'tür (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 TKY.T2.08 potansiyel GHRH 1-29 özgü X-Aptamer için serbest enerji değerleri ve olası iki boyutlu yapılarının gösterilmesi

TKY.T2.08 potansiyel GHRH 1-29 özgü X-Aptamer için potansiyel serbest enerji değerleri ve olası iki boyutlu yapıları Mfold programı kullanılarak belirlenmiştir.

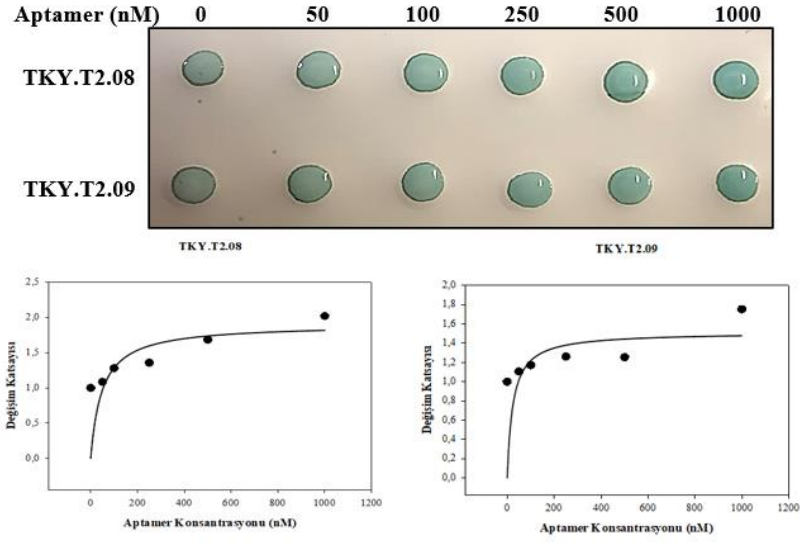
TKY.T2.09 potansiyel GHRH 1-29 özgü X-Aptameri için 1 tane iki boyutlu yapı çizilmiştir. Bu iki boyutlu yapı için potansiyel serbest enerji değeri 7,57 çıkmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.7 GHRH 1-29 peptidi ile GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerlerin bağlanma afinitelerinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi

GHRH 1-29 peptidi ile GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerin bağlanma afinitelerinin tespit edilmesi için 500 nM X-Aptamer ile 500nM GHRH 1-29 peptidi inkübe edilmiştir ve membrana emdirilmiştir. HRP/Streptavidin uygulanmıştır ve TMB-H₂O₂ reaksiyonu ile renk değişimi oluşturulmuştur (**** p ≤ 0,0001).

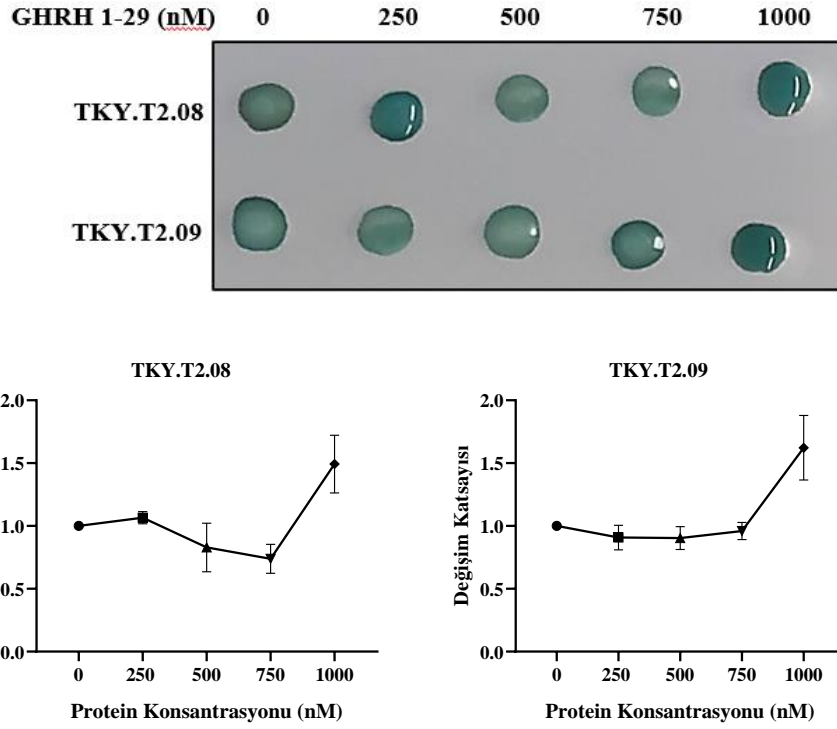
Sentez edilen X-Aptamerlerden sırası ile 2 kat ve 1,8 kat spot analizinde yüksek çıkan TKY.T2.08, TKY.T2.09 doza bağlı GHRH 1-29 peptide bağlanma afiniteleri tespit edilmiştir. Bunun için ilk olarak 500 nM GHRH 1-29 peptidi sabit tutularak 0 ile 1000 nM arasında değişen X-Aptamer miktarları kullanılarak bağlanma afinitelerine göre seçilen TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 potansiyel GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlere dot blot uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 500 nM GHRH 1-29 peptidi için X-Aptamer miktarı arttıkça orantılı olarak bağlanma afinitesinde artmaktadır. Image J programı kullanılarak elde edilen değerler kullanılarak sigma plot programı ile non-linear regrasyon analizi üzerinden grafik çizilmiştir. Oluşturulan grafikler kullanılarak her iki X-Aptamer içinde K_d değerleri hesaplanmıştır. Sigma plot programı aracılı analize göre TKY.T2.08 GHRH 1-29 özgü X-Aptameri için K_d değeri 48.19 nM belirlenmiştir. TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptameri için K_d değeri 24.20 nM olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 GHRH 1-29 özgü potansiyel TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin X-Aptamer dozuna bağlı (0-1000 nM) olarak bağlanma afinitelerinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi

0-1000 nM dozlarında GHRH 1-29 özgü TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerleri 500 nM GHRH 1-29 peptidi ile inkübe edilmiştir ve membrana emdirilmiştir. HRP/Streptavidin uygulanmıştır ve TMB-H₂O₂ reaksiyonu ile renk değişimi oluşturulmuştur.

Seçili olası GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerin doza bağlı GHRH 1-29 peptidine bağlanma afiniteleri dot blot analizi ile tespit edilmeye çalışılmıştır. 500 nM X-Aptamer miktarı sabit alınarak 0 ile 1000 nM arasında GHRH 1-29 peptidi için yapılmıştır. Her iki X-Aptamer içinde 750 nM GHRH 1-29 miktarına kadar azalma ve 1000 nM GHRH 1-29 proteininde ise TKY.T2.08 X-Aptameri için 1,4 kat, TKY.T2.09 X-Aptameri için 1,6 kat artış görülmüştür (Şekil 4.9).



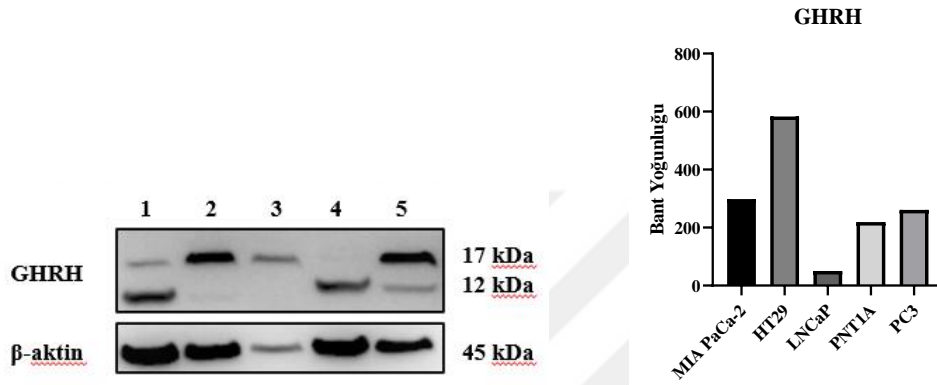
Şekil 4.9 GHRH 1-29 özgü potansiyel TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin GHRH 1-29 peptit dozuna bağlı (0-1000 nM) olarak bağlanma afinitelerinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi

500 nM GHRH 1-29 özgü TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerleri 0-1000 nM GHRH 1-29 peptidi ile inkübe edilmiştir ve membrana emdirilmiştir. HRP/Streptavidin uygulanmıştır ve TMB-H₂O₂ reaksiyonu ile renk değişimi oluşturulmuştur.

4.3 FARKLI HÜCRE HATLARINDA GHRH ANLATIM PROFİLLERİNİN GÖSTERİLMESİ

GHRH 1-29 peptidine özgü seçili X-Aptamerlerin GHRH anlatımı olan ve aktif GHRH-R sinyaline sahip kanser hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkisinin gösterilmesi için laboratuvarımızda hali hazırda mevcut olan kanser hücrelerinde GHRH sentez ve salınımı immunoblotlama, immunofloresan ve ELİSA yöntemleri ile gösterilmiştir. Prostat Kanseri hücre hattı PC3, pankreas kanseri hücre hattı MIA PaCa-2, normal epitel hücre hattı PNT1A, kolon kanseri hücre hattı HT29 ve prostat kanseri hücre hattı LNCaP hücrelerinde GHRH protein anlatımın gösterilebilmesi için immunoblotlama yöntemi kullanılmıştır. MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde GHRH 12 kDa GHRH protein izoformunun anlatımının yüksek olduğu tespit edilmiştir. HT29 kolon kanseri hücrelerinde 17 kDa GHRH protein izoformunun anlatımının olduğu tespit edilmiştir. LNCaP prostat kanseri hücrelerinde 17 kDa GHRH anlatımının HT29 kolon kanseri hücrelerine kıyasla daha düşük olduğu tespit

edilmiştir. PNT1A normal epitel prostat hücrelerinde 12 kDa GHRH anlatımının olduğu belirlenmiştir. PC3 prostat kanseri hücrelerinde ise 17 kDa GHRH anlatımının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ve daha az oranda 12 kDa anlatımı tespit edilmiştir (Şekil 4.10). İmmunoblotlama sonuçlarına göre MIA Paca-2 pankreatik kanser, HT-29 kolon kanseri ve PC3 prostat kanseri hücrelerinden yüksek GHRH anlatımının olduğu, LNCaP prostat kanseri hücreleri ve PNT1A prostat epitel hücresinde GHRH anlatımının düşük olduğu tespit edilmiştir.

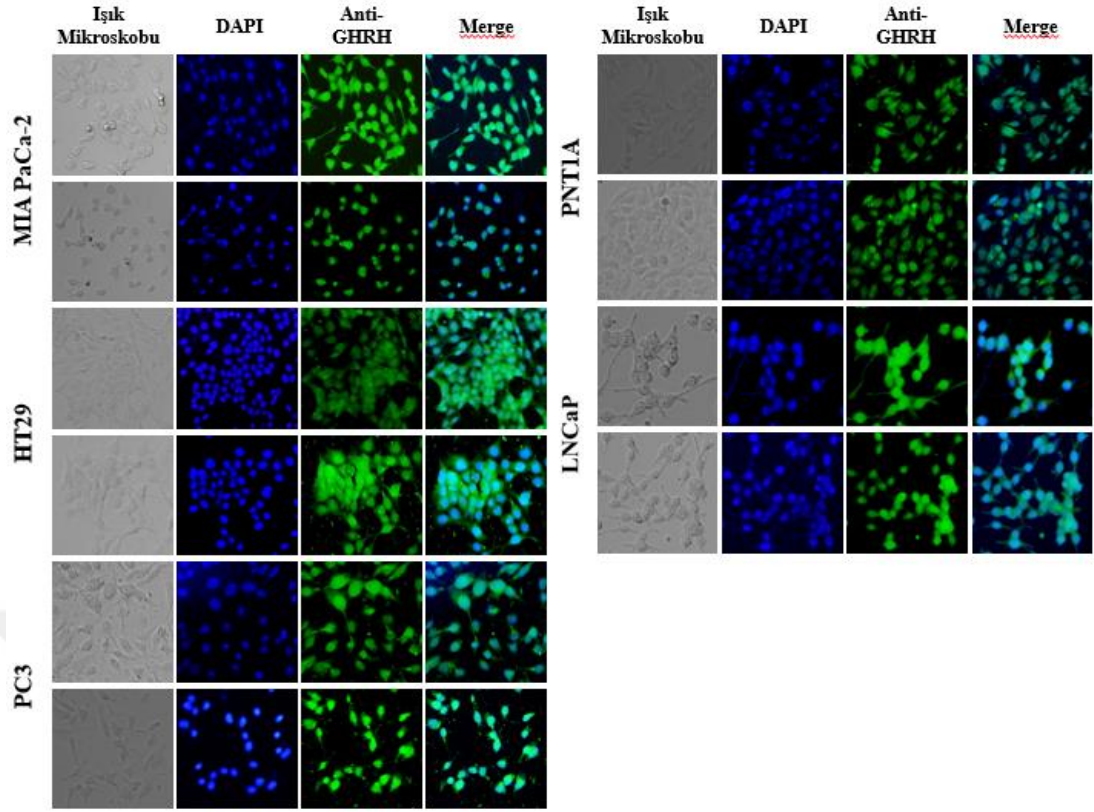


Şekil 4.10 MIA PaCa-2, HT29, LNCaP, PNT1A, PC3 hücre hatlarında GHRH anlatım profillerinin immnoblottlama yöntemi ile gösterilmesi

1. MIA PaCa-2 2. HT 29 3. LNCaP 4. PNT1A 5. PC3

Hücreler 100 mm'lik petrilere ekilmiştir, morfoloji aldıktan sonra medyaları değiştirilmiştir. 48 saat sonra protein izolasyonu uygulanmıştır. 80 µg protein hazırlanarak %12'lik SDS-PAGE jelde yürütülmüştür ve PVDF membrana aktarılmıştır. Bio-Rad ChemiDoc™ MP cihazı kullanılarak CCD kamera ile çekim alınmıştır.

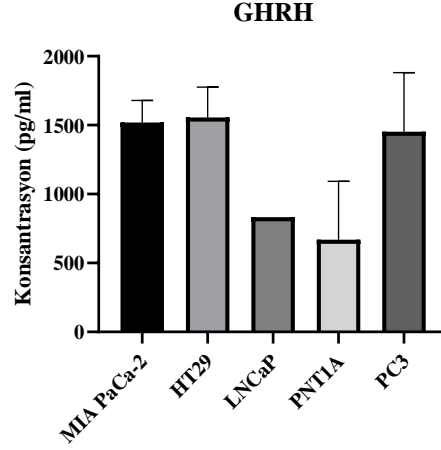
Elde edilen immnoblottlama sonuçlarında GHRH proteinin 12 kDa ve 17 kDa olan iki varyantı belirlenmiştir. GHRH proteini anlatım profilleri tespit edilen kanser hücre hatlarında immunofloresan boyama yöntemi uygulanmıştır. İmmunoblotlama sonuçları ile paralellik gösterecek şekilde pankreas kanseri hücre hattı olan MIA PaCa-2, kolon kanseri hücre hattı HT29 ve prostat kanseri hücre hattı olan PC3 hücrelerinde yüksek miktarda GHRH anlatımı olduğu immunofloresan yöntemi ile tespit edilmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 MIA PaCa-2, HT29, PC3, PNT1A, LNCaP hücre hatlarında GHRH anlatım profillerinin İmmunofloresan (IF) yöntemi ile gösterilmesi

Hücreler lamaların üzerine ekilmiştir ve morfoloji aldıktan sonra medyaları yeni medya ile değiştirilmiştir. 48 saat sonra hücreler fikse edilmiştir. GHRH antikoruna uygulanmıştır ve floresan mikroskobu altında çekim alınmıştır (Büyütme oranı: 20x).

İmmunofloresan ve immunoblotlamadan elde edilen sonuçlarla MIA PaCa-2, HT29, PC3 ve PNT1A hücrelerinde GHRH anlatımı tespit edildikten sonra hücrelerin medyaya salınan GHRH miktarını belirlemek için ELISA yöntemi kullanılmıştır. Standart proteinlerin konsantrasyonlarına göre farklı hücre hatlarında medyada bulunan GHRH konsantrasyonu hesaplanmıştır ve grafik çizilmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde pankreas kanseri hücre hattı olan MIA PaCa-2 1518 pg/ml, HT29 kolon kanseri hücre hattı için 1556 pg/ml, prostat kanseri hücre hattı LNCaP için 832 pg/ml, normal epitel prostat hücre hattı PNT1A için 668 pg/ml ve prostat kanseri hücre hattı olan PC3 için 1453 pg/ml GHRH proteininin medyaya salındığı tespit edilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 MIA PaCa-2, HT29, LNCaP, PNT1A, PC3 hücre hatlarında medyaya salınan GHRH miktarının GHRH ELİSA yöntemi ile gösterilmesi

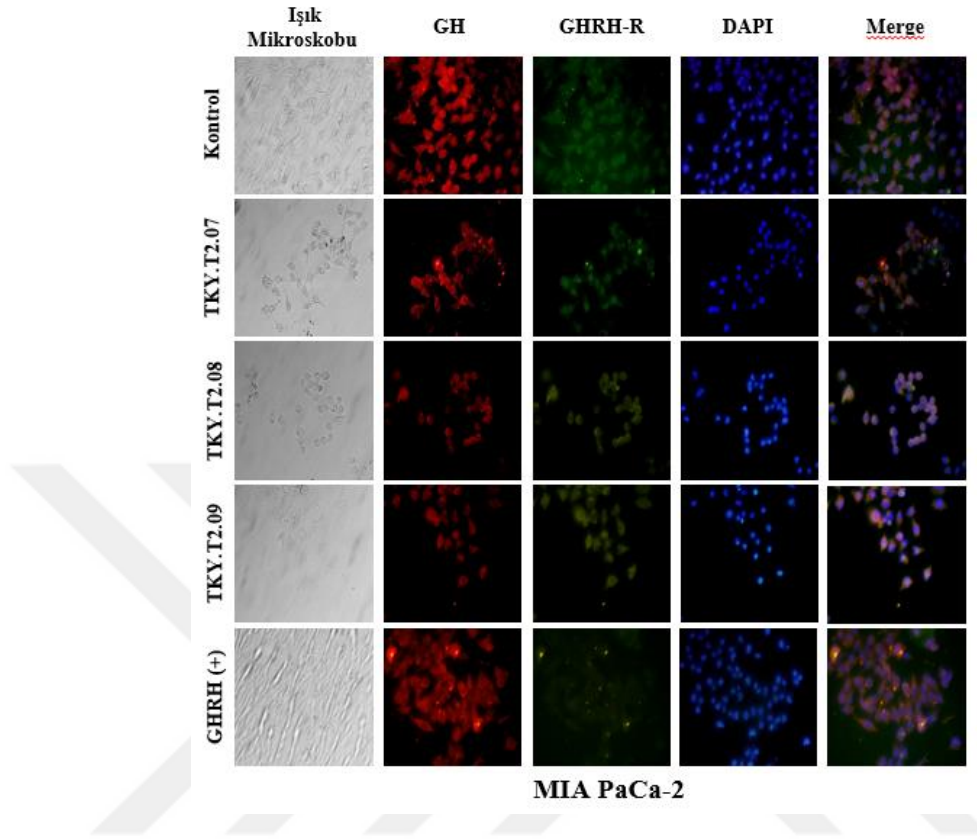
Hücreler ekildikten 48 sonra medyaları alınmıştır ve filtreden geçirilmiştir. Elabscience human GHRH ELİSA kiti kullanılarak deney gerçekleştirilmiştir.

Immnofloresan, immunoblotlama ve ELİSA deneylerinden elde edilen veriler değerlendirildiğinde pankreas kanseri hücre hattı olan MIA PaCa-2 ve kolon kanseri hücre hattı olan HT29 hücrelerinde en yüksek GHRH anlatım profilinin olduğu tespit edilmiştir. MIA PaCa-2 ve HT29 hücrelerine kıyasla prostat kanseri hücre hattı olan PC3 ve LNCaP daha az GHRH anlatımının olduğu tespit edilmiştir. PNT1A hücre hattında normal epitel hücrelerinde daha az GHRH anlatımı tespit edilmiştir.

4.4 GHRH 1-29 ÖZGÜ POTANSİYEL X-APTAMERLERİN GHRH SİNYALİ ÜZERİNE KET VURUCU ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ

GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerlerin GHRH sinyali üzerine ket vurucu etkisini gösterebilmek amacıyla GHRH'in aşağı yolak elemanları GH ve GHRH-R anlatım profilleri IF yöntemiyle en yüksek GHRH anlatımı bulunan pankreas kanseri hücre hattı olan MIA PaCa-2 hücrelerinde gösterilmiştir. Hücrelere 72 saat boyunca 500 nM GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerler uygulanmıştır ve MIA PaCa-2 hücre hattında GHRH anlatımının artırılması amacıyla hücrelere dışarıdan ilave olarak 500 nM GHRH 1-29 peptidi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kontrol grubu hücrelerine kıyasla TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin GH ve GHRH-R anlatımına büyük oranda ket vurduğu görülmüştür. TKY.T2.07 X-Aptamerin ise diğer aptamerlere göre daha az ket vurucu etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Pozitif kontrol

olarak GHRH 1-29 peptidi her hücreye verilerek yüksek GH ve GHRH-R anlatım profilleri gösterilmiştir (Şekil 4.13).

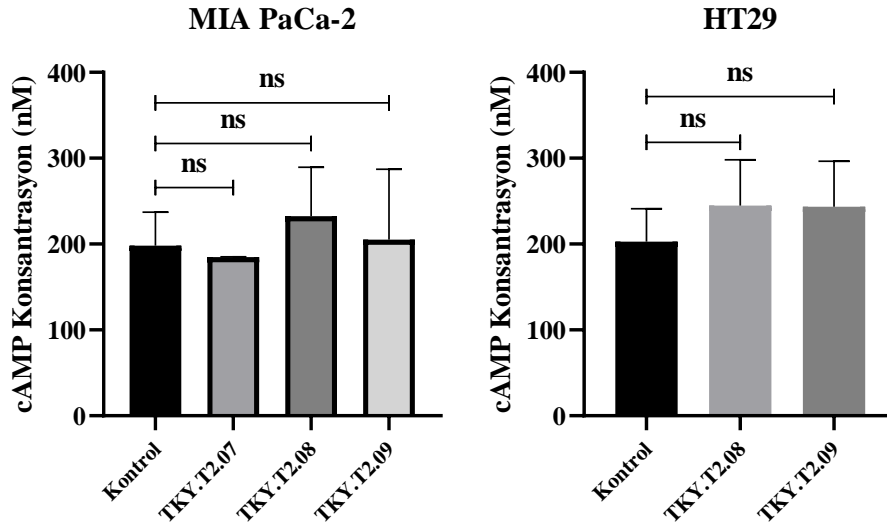


Şekil 4.13 X-Aptamerlerin GHRH sinyali aşağı yolak elemanları olan GH ve GHRH-R anlatımları üzerine etkisinin immunofloresan (IF) yöntemi ile gösterilmesi

Hücreler lamların üzerine ekilmiştir ve morfoloji aldıktan sonra 500 nM GHRH 1-29 özgü TKY.T2.07, TKY.T2.08, TKY.T2.09 X-Aptamerleri 72 saat boyunca hücrelere uygulanmıştır. 72 saatin sonunda hücreler fikse edilmiştir. GH ve GHRH-R antikorları uygulanmıştır ve floresan mikroskobu altında çekim alınmıştır (Büyütme oranı: 20x).

MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde GHRH sinyaline ket vurduğu GH ve GHRH-R incelenerek immunofloresan yöntemiyle tespit edildikten sonra GHRH sinyalinin en çok etki ettiği cAMP aktivitesi kontrol edilmek istenmiştir. Böylece GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerlerin GHRH sinyaline ket vurucu etkisinin hücre içi cAMP aktivitesine bağlı olarak pankreas kanseri hücre hattı MIA PaCa-2 ve kolon kanseri hücre hattı HT29 belirlenmiştir. MIA PaCa-2 hücre hattı için kontrol grubunda 198 nM, TKY.T2.07 için 184 nM, TKY.T2.08 için 232 nM, TKY.T2.09 için 205 nM cAMP aktivitesi belirlenmiştir. HT29 hücre hattı için kontrol grubunda 202 nM, TKY.T2.08 için 244 nM, TKY.T2.09 için 243 nM cAMP aktivitesi belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerlerin kontrol grubuna göre cAMP hücre içi konsantrasyonunu üzerinde istatistiksel olarak herhangi bir farklılığa neden olmadığı ve MIA PaCa-2 hücre hattında TKY.T2.08 istatistiksel olarak anlamlı olmadan cAMP konsantrasyonu arttığı tespit edilmiştir. Bu nedenden dolayı iki seçili X-Aptamer TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GH ve GHRH-R'nin baskıladığını gösterdiğimiz için tekrar cAMP konsantrasyonu gösterilmeye çalışılmıştır. HT29'da GHRH anlatımı yüksek olduğu için MIA PaCa2 hücrelerindeki sonuçlar X-Aptamerlerin cAMP konsantrasyonu üzerindeki etkinliği irdelenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde istatistiksel olarak kontrole kıyasla belirgin bir farklılık tespit edilememiş olsa da her iki X-Aptamerde cAMP konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerlerin GHRH sinyaline ket vurucu etkisinin hücre içi cAMP aktivitesine bağlı olarak gösterilmesi

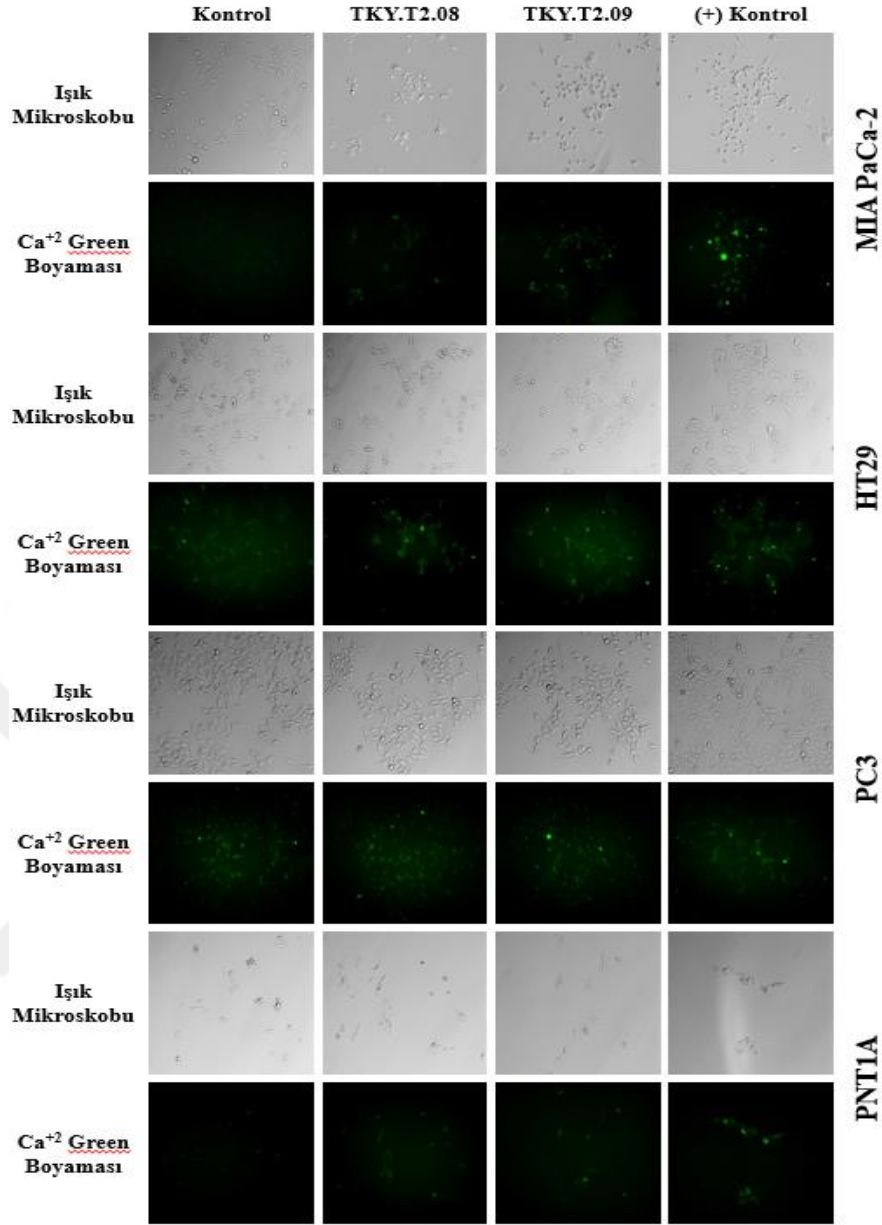
Hücreler içinde FBS bulunmayan medya ile ekilmiştir. Morfolojileri oluşuktan sonra 500 nM GHRH 1-29 özgü TKY.T2.07, TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerleri 72 saat boyunca uygulanmıştır.

Uygulama sonunda Cell Signaling Technology Cyclic AMP XP® Assay Kit kullanılarak deney gerçekleştirilmiştir (ns ≥ 0,05).

MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde bağlı olan Ca^{+2} miktarı incelendiğinde TKY.T2.09'un TKY.T2.08 kıyasla daha fazla Ca^{+2} ışıması yaptığı tespit edilmiştir. HT29 bir başka GHRH anlatımı olan kolon kanseri hücrelerinde ise her iki X-Aptamer içinde Ca^{+2} ışıması tespit edilmiştir. Fakat TKY.T2.08 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerinin daha fazla Ca^{+2} ışımasına neden olduğu belirlenmiştir. PC3 prostat kanseri hücre hattında MIA PaCa-2 ve HT29 hücre hatlarına kıyasla daha az GHRH

anlatımı olsa da bu hücrelerde TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin Ca^{+2} üzerine etkisi Ca^{+2} green boyaması ile belirlenmiştir. PNT1A normal epitel prostat hücrelerinde az miktarda GHRH anlatımı olsa da her iki X-Aptamerinde Ca^{+2} üzerine etkisi Ca^{+2} green boyamasında tespit edilememiştir. Pozitif kontrol olarak bütün hücrelerde 10 μ M tunikamisin uygulanmıştır ve hücrelerde bulunan bağlı Ca^{+2} miktarı belirlenmiştir (Şekil 4.15).



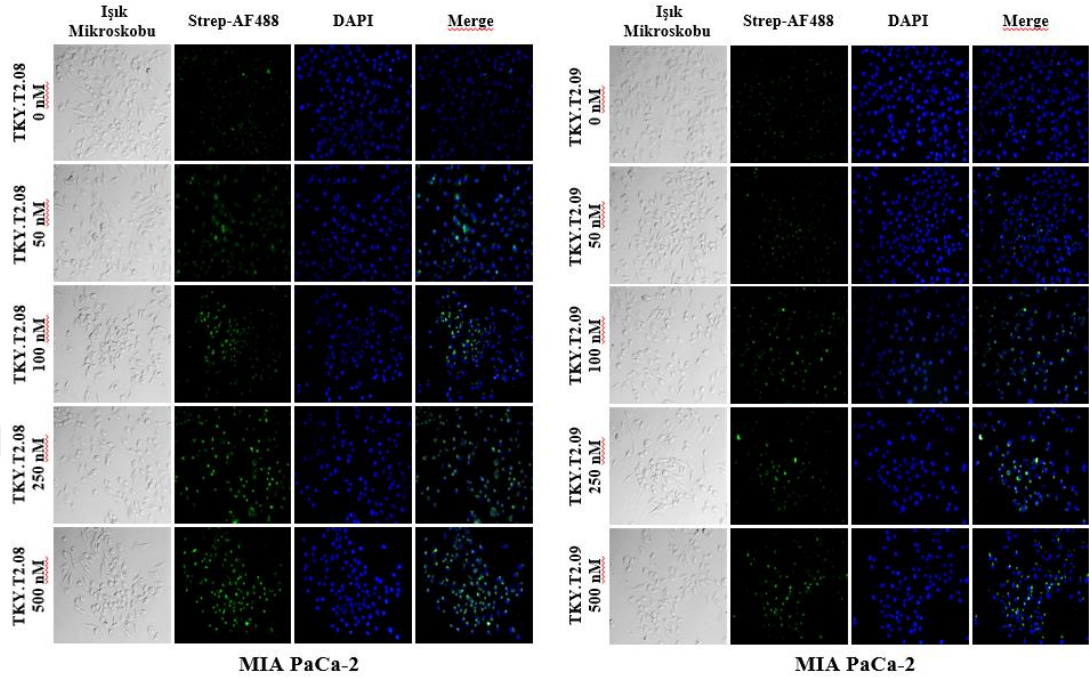


Şekil 4.15 TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerlerin MIA PaCa-2, HT29, PC3 ve PNT1A hücre hatlarından GHRH sinyaline ket vurucu etkisinin Ca⁺² green boyaması ile gösterilmesi

Hücreler morfoloji aldıktan sonra 500 nM TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerler 72 saat boyunca uygulanmıştır. Pozitif kontrol olarak 10µM tunikamisın kullanılmıştır. Uygulamadan sonra 1 µM Ca⁺² green boyası eklenmiştir ve floresan mikroskobu altında çekim alınmıştır (Büyütme Oranı: 20x).

GHRH 1-29 özgü sentez edilen X-Aptamerlerin en yüksek GHRH anlatımı olan MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde bağlanma afiniteleri immunofloresan boyama ile 5' ucu biotinle işaretli olan olası X-Aptamerlere Streptavidin-Alexa Fluor 488 uygulaması ile tespit edilmiştir. MIA PaCa-2 hücrelerine doza bağlı X-Aptamer

miktarı arttığında reseptöre bağlanma miktarının arttığı tespit edilmiştir. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09'un ligandla beraber hücre yüzeyine bağlandığı immunofloresan yöntemiyle belirlenmiştir (Şekil 4.16).



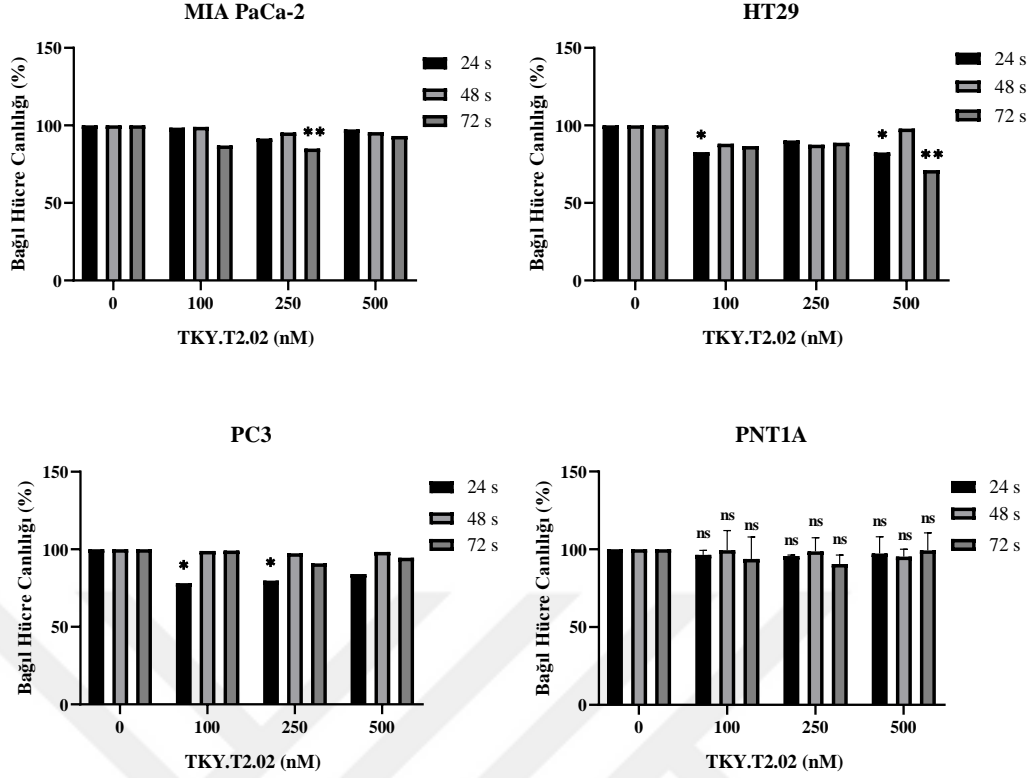
Şekil 4.16 GHRH 1-29 özgü potansiyel TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerin hücrelerde bağlanma bölgelerinin X-Aptamer dozuna bağlı (0-500 nM) olarak immunofloresan (IF) yöntemi ile gösterilmesi

Hücrelerin ekimi gerçekleştirildikten sonra morfoloji almaları beklenmiştir. Morfoloji alan hücrelere 0-500 nM TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerleri 72 saat boyunca uygulanmıştır. Uygulamadan sonra hücreler fikse edilmiş, Endojen Biotin Bloklama Kiti uygulanmasını takiben, Streptavidin Alexa Fluor 488 ile muamele edilerek floresan mikroskobunda bağlanma afiniteleri gösterilmiştir (Büyütme Oranı: 20x).

4.5 GHRH 1-29 ÖZGÜ X-APTAMERLERİN MIA PACA-2, HT29, PC3 VE PNT1A HÜCRE HATLARINDA HÜCRE CANLILIĞI VE MİTOKONDRİYEL MEMBRAN POTANSİYELİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN GÖSTERİLMESİ

X-Aptamerlerin GHRH 1-29 bağlanma afiniteleri tespit edildikten sonra GHRH anlatım profillerine göre seçilen HT29 kolon kanseri, MIA PaCa-2 pankreas kanseri, PC3 prostat kanseri ve PNT1A normal epitel prostat hücre hatlarında X-Aptamerlerin hücre canlılığı üzerine etkisinin tespit edilebilmesi için zamana ve doza bağlı olarak hücre canlılığı testi (MTT) uygulanmıştır. Hücrelere 24 saat, 48 saat, 72 saat olmak üzere 0-500 nM arasında değişen X-Aptamer miktarları uygulanmıştır.

TKY.T2.02 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptameri için elde edilen MTT sonuçlarına göre MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücre hattında 24 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için hücre canlılığı %98, 250 nM için hücre canlılığı %91, 500 nM için hücre canlılığı %97 olarak tespit edilmiştir. 48 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için %99, 250 nM için %95, 500 nM için %95 hücre canlılığı görülmüştür. 72 saat için değerlendirildiğinde hücre canlılık değerlerinin 100 nM için %87, 250 nM için %85, 500 nM için %93'e düştüğü tespit edilmiştir. HT29 kolon kanseri hücre hattında 24 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için hücre canlılığı %82, 250 nM için hücre canlılığı %90, 500 nM için hücre canlılığı %82 olarak tespit edilmiştir. 48 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için %88, 250 nM için %87, 500 nM için %97 hücre canlılığı görülmüştür. 72 saat için değerlendirildiğinde hücre canlılık değerlerinin 100 nM için %86, 250 nM için %88, 500 nM için %71 olduğu tespit edilmiştir. PC3 prostat kanseri hücre hattında 24 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için hücre canlılığı %78, 250 nM için hücre canlılığı %79, 500 nM için hücre canlılığı %84 olarak tespit edilmiştir. 48 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için %98, 250 nM için %97, 500 nM için %98 hücre canlılığı görülmüştür. 72 saat için değerlendirildiğinde hücre canlılık değerlerinin 100 nM için %99, 250 nM için %90, 500 nM için %94 olarak elde edilmiştir. PNT1A normal epitel prostat hücre hattında 24 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için hücre canlılığı %96, 250 nM için hücre canlılığı %95, 500 nM için hücre canlılığı %97 olarak tespit edilmiştir. 48 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için %99, 250 nM için %98, 500 nM için %95 hücre canlılığı görülmüştür. 72 saat için değerlendirildiğinde hücre canlılık değerlerinin 100 nM için %93, 250 nM için %90, 500 nM için %99 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.17).

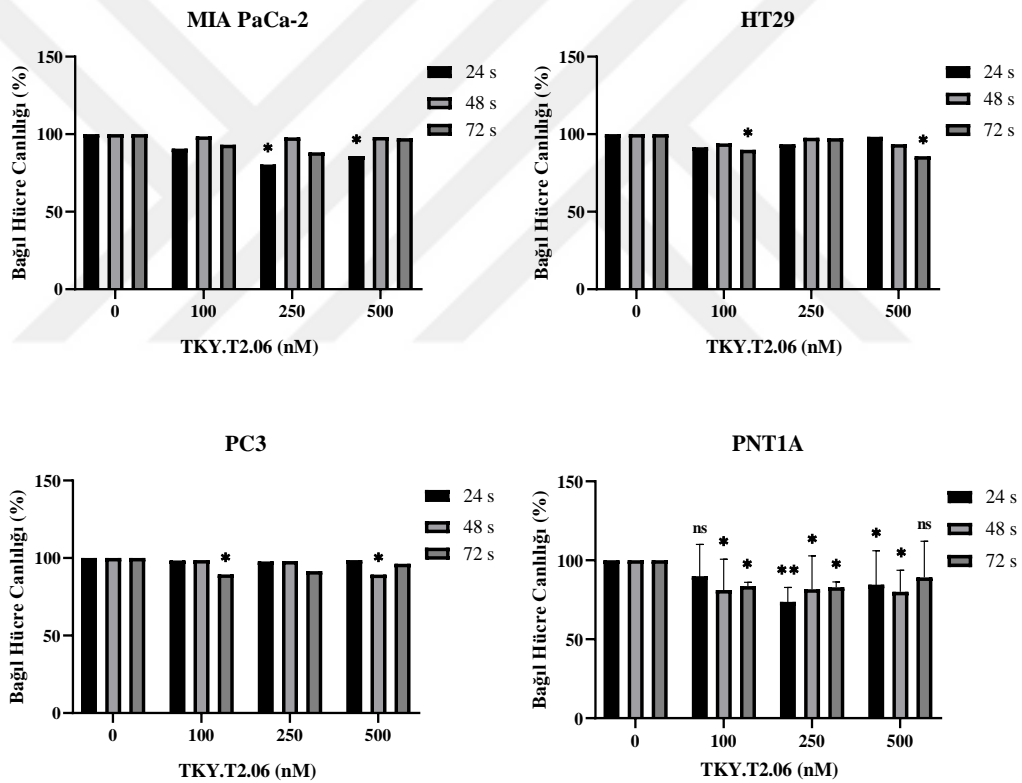


Şekil 4.17 TKY.T2.02 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerin MIA PaCa-2, HT29, PC3 ve PNT1A hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemiyle gösterilmesi

Hücreler 24 s, 48 s ve 72 s boyunca 0-500 nM GHRH 1-29 özgü X-Aptamer ile inkübe edildikten sonra MTT yöntemiyle analiz edilmiştir. MIA PaCa-2, HT29, PC3 deney grupları 4 tekrarlı 1 deneyin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. PNT1A deney grubu 4 tekrarlı 2 deneyin ortalaması alınarak hesaplanmıştır (ns \geq 0,05, * $p \leq$ 0,05, ** $p \leq$ 0,01).

TKY.T2.06 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptameri için elde edilen MTT sonuçlarına göre MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücre hattında 24 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için hücre canlılığı %90, 250 nM için hücre canlılığı %80, 500 nM için hücre canlılığı %85 olarak tespit edilmiştir. 48 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için %98, 250 nM için %97, 500 nM için %98 hücre canlılığı görülmüştür. 72 saat için değerlendirildiğinde hücre canlılık değerlerinin 100 nM için %93, 250 nM için %88, 500 nM için %97'e düştüğü görülmüştür. HT29 hücre hattında 24 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için hücre canlılığı %91, 250 nM için hücre canlılığı %93, 500 nM için hücre canlılığı %98 olarak tespit edilmiştir. 48 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için %94, 250 nM için %97, 500 nM için %93 hücre canlılığı görülmüştür. 72 saat için değerlendirildiğinde hücre canlılık değerlerinin 100 nM için %89, 250 nM için %97, 500 nM için %85'e düştüğü

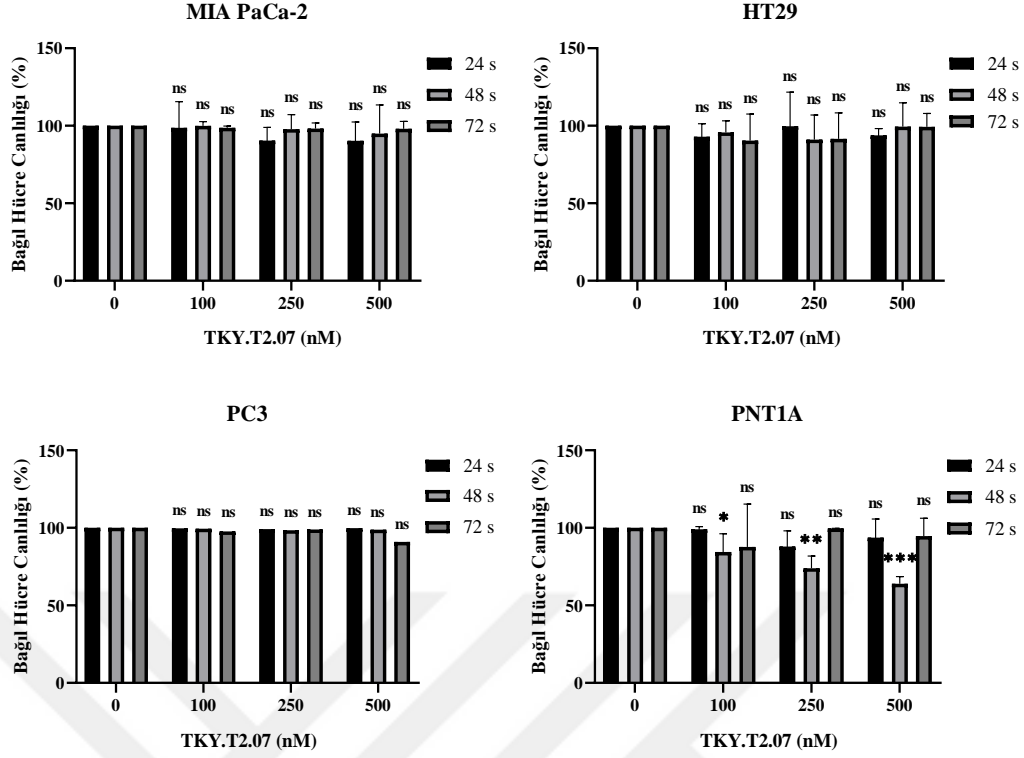
görülmüştür. PC3 prostat kanseri hücre hattında 24 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için hücre canlılığı %98, 250 nM için hücre canlılığı %97, 500 nM için hücre canlılığı %98 olarak tespit edilmiştir. 48 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için %98, 250 nM için %98, 500 nM için %89 hücre canlılığı görülmüştür. 72 saat için değerlendirildiğinde hücre canlılık değerlerinin 100 nM için %89, 250 nM için %91, 500 nM için %96'e düştüğü görülmüştür. PNT1A normal epitel prostat hücre hattında 24 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için hücre canlılığı %89, 250 nM için hücre canlılığı %73, 500 nM için hücre canlılığı %84 olarak tespit edilmiştir. 48 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için %81, 250 nM için %81, 500 nM için %80 hücre canlılığı görülmüştür. 72 saat için değerlendirildiğinde hücre canlılık değerlerinin 100 nM için %83, 250 nM için %82, 500 nM için %89'e düştüğü görülmüştür (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 TKY.T2.06 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerin MIA PaCa-2, HT29, PC3 ve PNT1A hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemiyle gösterilmesi

Hücreler 24 s, 48 s ve 72 s boyunca 0-500 nM GHRH 1-29 özgü X-Aptamer ile inkübe edildikten sonra MTT yöntemiyle analiz edilmiştir. MIA PaCa-2, HT29, PC3 deney grupları 4 tekrarlı 1 deneyin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. PNT1A deney grubu 4 tekrarlı 2 deneyin ortalaması alınarak hesaplanmıştır (ns \geq 0,05, * $p \leq$ 0,05, ** $p \leq$ 0,01).

TKY.T2.07 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptameri için elde edilen MTT verilerine göre MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücre hattında 24 saatin ardından değerlendirildiğinde 100 nM için hücre canlılığı %98, 250 nM için hücre canlılığı %90, 500 nM için hücre canlılığı %90 olarak tespit edilmiştir. 48 saatin ardından değerlendirildiğinde 100 nM için %99, 250 nM için %97, 500 nM için %94'e kadar gerilemiştir. 72 saatin ardından değerlendirildiğinde ise hücre canlılık değerleri 100 nM için %98, 250 nM için %98, 500 nM için %98 olarak karşımıza çıkmıştır. HT29 kolon kanseri hücre hattında 24 saatlik uygulama sonucunda 100 nM için hücre canlılığı %92, 250 nM için hücre canlılığı %99, 500 nM için hücre canlılığı %93 olarak tespit edilmiştir. 48 saatlik uygulama sonucunda 100 nM için %95, 250 nM için %91, 500 nM için %99 hücre canlılığı görülmüştür. 72 saatlik uygulama sonucunda karşılaşılan hücre canlılık değerleri 100 nM için %90, 250 nM için %91, 500 nM için %99 olarak tespit edilmiştir. PC3 prostat kanseri hücre hattında 24 saat için aptamer uygulamasının sonuçları değerlendirildiğinde 100 nM için hücre canlılığı %99, 250 nM için hücre canlılığı %99, 500 nM için hücre canlılığı %99 olarak tespit edilmiştir. 48 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için %99, 250 nM için %98, 500 nM için %98 hücre canlılığı görülmüştür. 72 saat için değerlendirildiğinde hücre canlılık değerlerinin 100 nM için %97, 250 nM için %98, 500 nM için %90'a düştüğü görülmüştür. PNT1A normal epitel prostat hücre hattında 24 saat için değerlendirildiğinde 100 nM uygulama sonucunda hücre canlılığı %99, 250 nM uygulama sonucunda hücre canlılığı %87, 500 nM uygulama sonucunda hücre canlılığı %93 olarak tespit edilmiştir. 48 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için %84, 250 nM için %73, 500 nM için %63 hücre canlılığı görülmüştür. 72 saat için değerlendirildiğinde ise hücre canlılık değerleri 100 nM için %87, 250 nM için %99, 500 nM için %94 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.19).

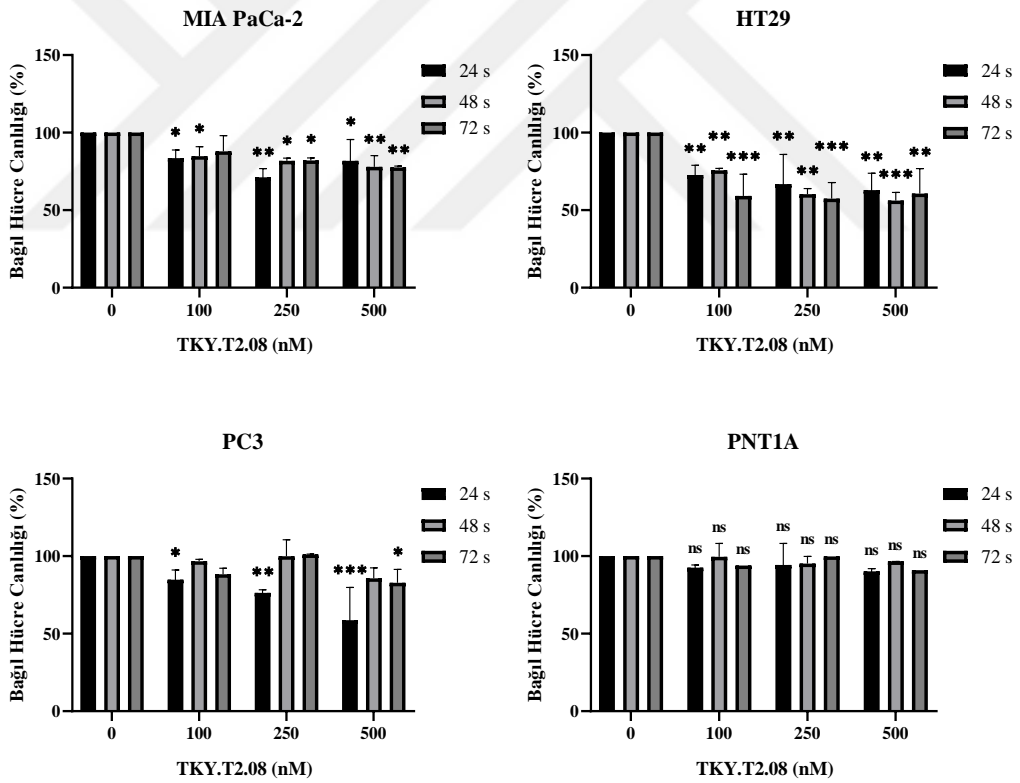


Şekil 4.19 TKY.T2.07 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerin MIA PaCa-2, HT29, PC3 ve PNT1A hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemiyle gösterilmesi

Hücreler 24 s, 48 s ve 72 s boyunca 0-500 nM GHRH 1-29 özgü X-Aptamer ile inkübe edildikten sonra MTT yöntemiyle analiz edilmiştir. MIA PaCa-2, HT29, PNT1A deney grupları 4 tekrarlı 2 deneyin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. PC3 deney grubu 4 tekrarlı 1 deneyin ortalaması alınarak hesaplanmıştır (ns \geq 0,05, * $p \leq$ 0,05, ** $p \leq$ 0,01, *** $p \leq$ 0,001).

TKY.T2.08 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptameri uygulamasının ardından elde edilen MTT sonuçlarına göre MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücre hattında 24 saatlik aptamer uygulaması değerlendirildiğinde 100 nM dozu için hücre canlılığı %83, 250 nM dozu için hücre canlılığı %71, 500 nM dozu için hücre canlılığı %81 olarak tespit edilmiştir. 48 saatin ardından değerlendirildiğinde 100 nM için %84, 250 nM için %81, 500 nM için %77 hücre canlılığı görülmüştür. 72 saat için değerlendirildiğinde hücre canlılık değerlerinin 100 nM için %87, 250 nM için %82, 500 nM için %77'e gerilediği saptanmıştır. HT29 kolon kanseri hücre hattında 24 saatin ardından değerlendirildiğinde 100 nM için hücre canlılığı %72, 250 nM için hücre canlılığı %66, 500 nM için hücre canlılığı %62 olarak tespit edilmiştir. 48 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için %75, 250 nM için %60, 500 nM için hücre canlılığı %56'a kadar gerilemiştir. 72 saat için değerlendirildiğinde hücre canlılık değerlerinin

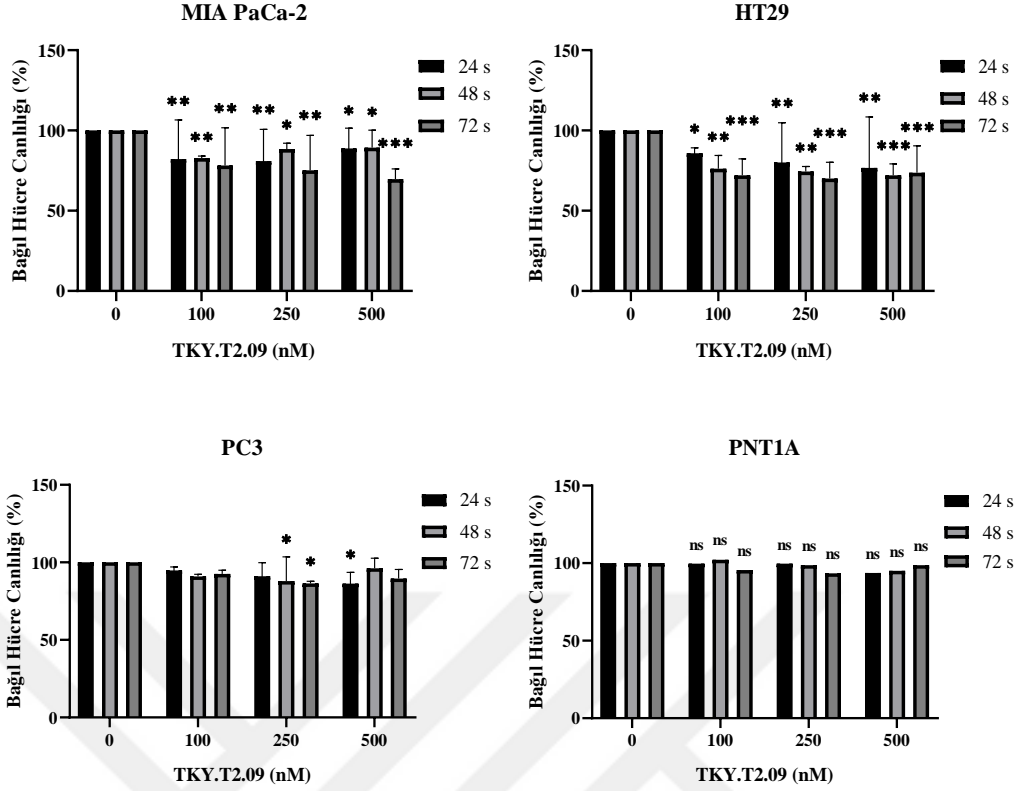
100 nM için %59, 250 nM için %57, 500 nM için %60 olarak saptanmıştır. PC3 prostat kanseri hücre hattında 24 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için hücre canlılığı %84, 250 nM için hücre canlılığı %76, 500 nM için hücre canlılığı %58'ya kadar gerilediği tespit edilmiştir. 48 saatin ardından değerlendirildiğinde 100 nM için %96, 250 nM için %99, 500 nM için %85 hücre canlılığı görülmüştür. 72 saat için değerlendirildiğinde ise hücre canlılık değerleri 100 nM için %88, 250 nM için %100, 500 nM için %82 olarak tespit edilmiştir. PNT1A normal epitel prostat hücre hattında 24 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için hücre canlılığı %92, 250 nM için hücre canlılığı %94, 500 nM için hücre canlılığı %90 olarak tespit edilmiştir. 48 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için %99, 250 nM için %95, 500 nM için %96 hücre canlılığı görülmüştür. 72 saat için değerlendirildiğinde değerler 100 nM dozu için %93, 250 nM dozu için %99, 500 nM dozu için %90 hücre canlılığı tespit edilmiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 TKY.T2.08 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerin MIA PaCa-2, HT29, PC3 ve PNT1A hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemiyle gösterilmesi

Hücreler 24 s, 48 s ve 72 s boyunca 0-500 nM GHRH 1-29 özgü X-Aptamer ile inkübe edildikten sonra MTT yöntemiyle analiz edilmiştir. MIA PaCa-2, HT29, PC3, PNT1A deney grupları 4 tekrarlı 2 deneyin ortalaması alınarak hesaplanmıştır (ns $\geq 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptameri için MTT sonucunda elde edilen verilere göre MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücre hattında 24 saat 100 nM aptamer uygulaması için hücre canlılığı %82, 250 nM aptamer uygulaması için hücre canlılığı %80, 500 nM aptamer uygulaması için hücre canlılığı %88 olarak tespit edilmiştir. 48 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için %82, 250 nM için %88, 500 nM için %89 hücre canlılığı görülmüştür. 72 saat için değerlendirildiğinde hücre canlılık değerlerinin 100 nM için %78, 250 nM için %75, 500 nM için %69'e gerilediği görülmüştür. HT29 kolon kanseri hücre hattında 24 saat değerleri 100 nM için hücre canlılığı %82, 250 nM için hücre canlılığı %80, 500 nM için hücre canlılığı %76 olarak karşımıza çıkmaktadır. 48 saat için değerlendirildiğinde 100 nM için %76, 250 nM için %74, 500 nM için %72 hücre canlılığı görülmüştür. 72 saat için değerlendirildiğinde hücre canlılık değerlerinin 100 nM için %72, 250 nM için %70, 500 nM için %73 olarak saptanmıştır. PC3 prostat kanseri hücre hattı 24 saat aptamer uygulaması için değerlendirildiğinde, 100 nM'da hücre canlılığı %94, 250 nM'da hücre canlılığı %91, 500 nM'da hücre canlılığı %86'ye kadar gerilediği saptanmıştır. 48 saat aptamer uygulaması için değerlendirildiğinde, 100 nM'da %90, 250 nM'da %87, 500 nM'da %96 hücre canlılığı saptanmıştır. 72 saat aptamer uygulaması için değerlendirildiğinde hücre canlılık değerlerinin 100 nM için %92, 250 nM için %86, 500 nM için %89'ye düştüğü görülmüştür. PNT1A normal epitel prostat hücre hattındaki sonuçlara baktığımızda ise 24 saat için 100 nM için hücre canlılığı %99, 250 nM için hücre canlılığı %99, 500 nM için hücre canlılığı %93 olarak tespit edilmiştir. 48 saat için 100 nM için %100, 250 nM için %98, 500 nM için %95 hücre canlılığı görülmüştür. 72 saat için hücre canlılık değerleri 100 nM uygulamada %95, 250 nM uygulamada %93, 500 nM uygulamada %98'olarak belirlenmiştir (Şekil 4.21).



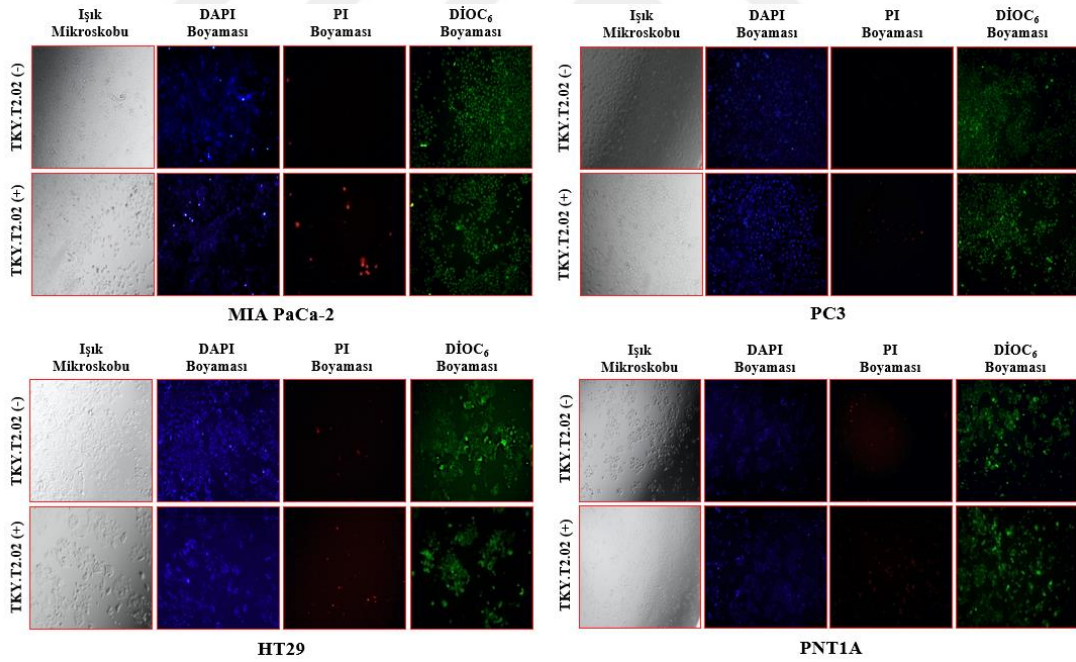
Şekil 4.21 TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerin MIA PaCa-2, HT29, PC3 ve PNT1A hücrelerinde doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisinin MTT yöntemiyle gösterilmesi

Hücreler 24 s, 48 s ve 72 s boyunca 0-500 nM GHRH 1-29 özgü X-Aptamer ile inkübe edildikten sonra MTT yöntemiyle analiz edilmiştir. MIA PaCa-2, HT29, PC3, PNT1A deney grupları 4 tekrarlı 2 deneyin ortalaması alınarak hesaplanmıştır (ns $\geq 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Bütün X-Aptamerler için MTT sonuçları değerlendirildiğinde bağıl hücre canlılığına göre X-Aptamerler için 72 saat ve 500 nM aptamer miktarı seçilmiştir. Seçilen zaman ve doz kullanılarak DAPI, PI ve DİOC₆ floresan boyamaları gerçekleştirilmiştir. DAPI boyası canlı ve ölü hücre membranlarından geçebilir. DNA'da timin ve adenin bakımından zengin olan bölgelere bağlanarak DNA'da meydana kırıkların tespit edilmesinde veya hücre içindeki çekirdeğin gösterilmesinde kullanılmaktadır. PI boyaması ile hücre ölümünü göstermektedir. Ölü hücrelerin membran potansiyelleri bozulmaktadır ve PI boyası membrandan geçerek DNA'ya bağlanmaktadır. Bu şekilde ölü hücreler ve canlı hücreler birbirinden ayrılmaktadır. DİOC₆ boyası mitokondri membran potansiyel etkisinin gösterilmesi için kullanılmaktadır.

TKY.T2.02 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerinin GHRH anlatım profilinin yüksek olduğu MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde DAPI boyamasında kontrol

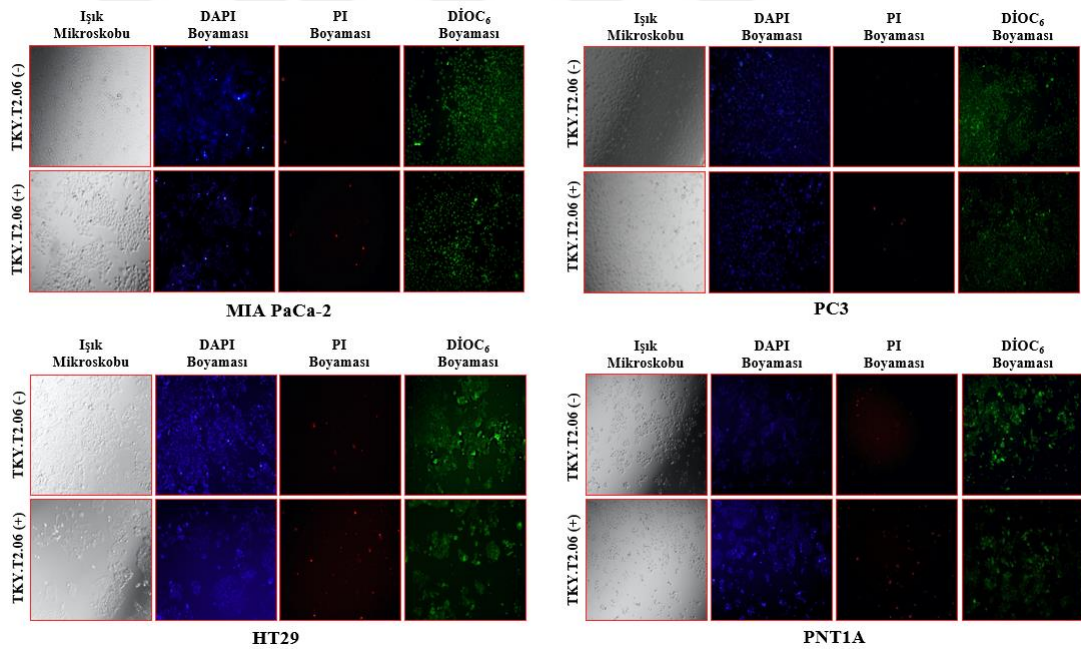
grubuna kıyasla DNA kondenzasyonunda artış olduğu tespit edilmiştir. PI boyaması sonuçlarına göre kontrol grubuna kıyasla ölü hücre sayısında artış olduğu görülmüştür. DİOC₆ boyaması sonuçlarına göre kontrol grubuna kıyasla mitokondri membran potansiyelinin artış olmadığı görülmüştür. GHRH anlatım profilinin yüksek olduğu bilinen diğer kanser hücresi HT29 kolon kanseri hücrelerinde DAPI boyamasında kontrol grubuna kıyasla DNA kondenzasyonunda değişiklik görülmemiştir. PI boyaması sonuçlarına göre kontrol grubuna kıyasla ölü hücre sayısında artış olduğu görülmüştür. DİOC₆ boyaması sonuçlarına göre kontrol grubuna kıyasla mitokondri membran potansiyelinin artış olmadığı görülmüştür. Prostat kanseri hücre hattı olan PC3 hücrelerinde elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde kontrol grubuna kıyasla DNA kondenzasyonunda, ölü hücre sayısında ve mitokondri membran potansiyelinde artış olduğu tespit edilmiştir. PNT1A normal epitel prostat hücrelerinde DNA kondenzasyonunda ve mitokondri membran potansiyelinde artış olduğu tespit edilmiştir fakat PI boyaması sonuçlarına göre ölü hücre sayısında artış görülmemiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22 TKY.T2.02 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerinin DNA kondenzasyonu, hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyama yöntemiyle gösterilmesi

Hücreler 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 5×10^4 olacak şekilde ekilmiştir. 72 saat boyunca 500 nM TKYT2.02 GHRH 1-29 özgü X-Aptameri uygulanmıştır. Uygulamanın sonunda 1 nM DİOC₆, 2 µg/ml PI, 1 µg/ml DAPI boyası uygulanmıştır ve floresan mikroskopu altında çekim alınmıştır (Büyütme oranı: 20x).

TKY.T2.06 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamer için MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücre hattında kontrol grubuna kıyasla DNA kondenzasyonunda, ölü hücre sayısında ve mitokondri membran potansiyelinde artış olduğu tespit edilmiştir. HT29 kolon kanseri hücre hattının sonuçları incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla DNA kondenzasyonunda ve mitokondri membran potansiyelinde azalış olduğu ve PI boyası incelendiği zaman ölü hücre sayısında artış olduğu tespit edilmiştir. PC3 prostat kanseri hücre hattının sonuçları incelendiğinde kontrol grubuna kıyasla DNA kondenzasyonunda artış olduğu görülmüştür. PI boyaması sonuçlarına göre az miktarda ölü hücre sayısında artış olduğu görülmüştür. DiOC₆ boyaması sonuçlarına göre mitokondri membran potansiyelinde değişiklik olmadığı görülmüştür. PNT1A hücrelerinde elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre DNA kondenzasyonunda artış olduğu fakat ölü hücre sayısı ve mitokondri membran potansiyelinde herhangi bir değişiklik tespit edilmemiştir (Şekil 4.23).

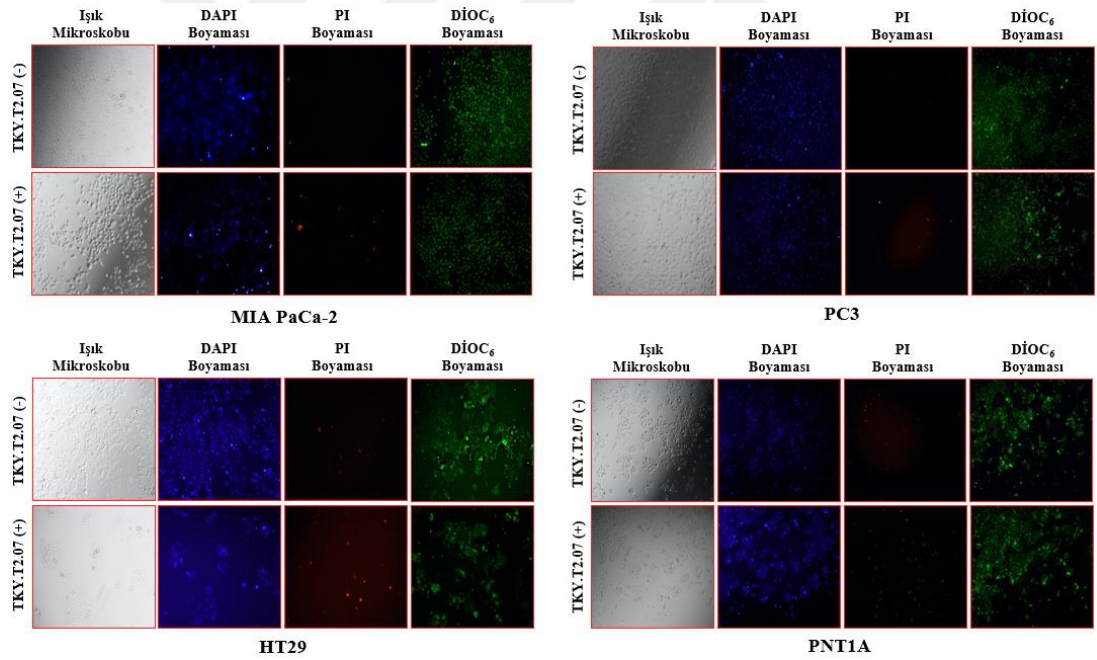


Şekil 4.23 TKY.T2.06 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerinin DNA kondenzasyonu, hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyama yöntemiyle gösterilmesi

Hücreler 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 5×10^4 olacak şekilde ekilmiştir. 72 saat boyunca 500 nM TKYT2.06 GHRH 1-29 özgü X-Aptameri uygulanmıştır. Uygulamanın sonunda 1 nM DiOC₆, 2 µg/ml PI, 1 µg/ml DAPI boyası uygulanmıştır ve floresan mikroskobu altında çekim alınmıştır (Büyütme oranı: 20x).

TKY.T2.07 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerinin DAPI, PI ve DiOC₆ boyamasının sonuçları değerlendirildiğin GHRH anlatımının fazla olduğunu

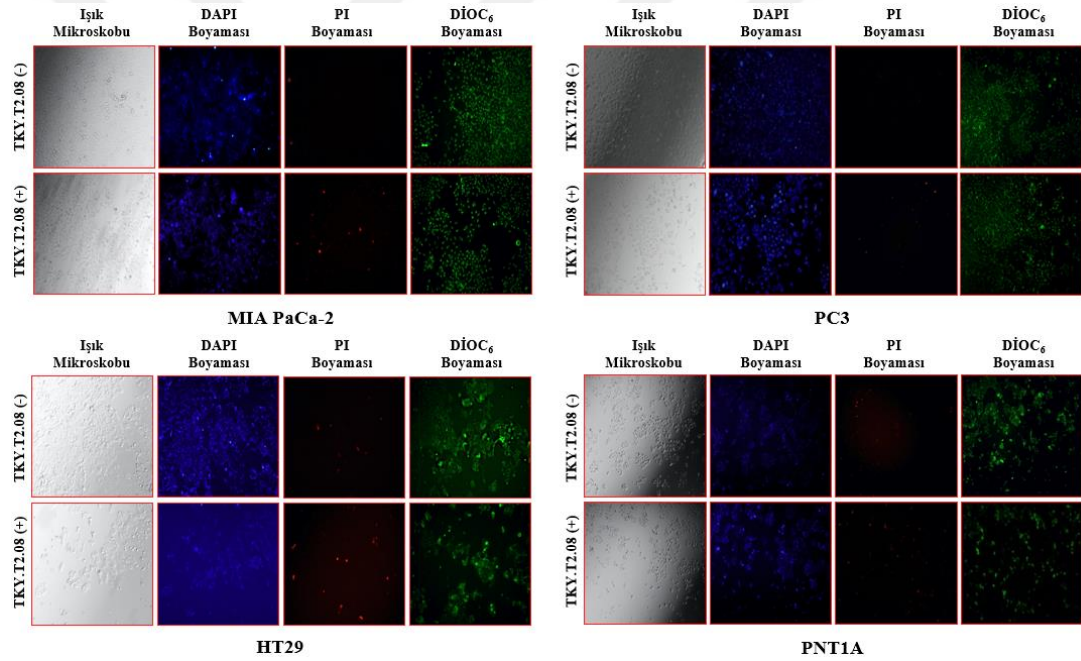
bildiğimiz MIA PaCa-2 pankreas hücre hattında kontrol grubuna kıyasla DNA kondenzasyonunda ve mitokondri membran potansiyelinde herhangi bir değişiklik görülmemiştir. PI boyaması sonuçlarına göre kontrol grubuna kıyasla ölü hücre sayısında artış olduğu görülmüştür. GHRH anlatımı yüksek olan HT29 kolon kanseri hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla DNA kondenzasyonunda değişim görülmemiştir. PI boyamasında kontrol grubuna göre ölü hücre sayısında artış görülmüştür. DiOC₆ boyamasına göre mitokondri membran potansiyelinde azalma olduğu tespit edilmiştir. MIA PaCa-2 ve HT29 hücre hatlarına göre GHRH anlatımın az olduğu PC3 prostat kanseri hücrelerinde kontrol grubuna göre DNA kondenzasyonunda herhangi bir değişiklik olmamıştır. Mitokondri membran potansiyelinde ve ölü hücre sayısında az miktarda artış tespit edilmiştir. Kanser hücre hattı olmamasına rağmen GHRH anlatımı tespit edilen PNT1A epitel prostat hücrelerinde ise kontrol grubuna kıyasla DNA kondenzasyonunda, ölü hücre sayısında ve mitokondri membran potansiyelinde artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.24).



Şekil 4.24 TKY.T2.07 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerinin DNA kondenzasyonu, hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyama yöntemiyle gösterilmesi

Hücreler 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 5×10^4 olacak şekilde ekilmiştir. 72 saat boyunca 500 nM TKYT2.07 GHRH 1-29 özgü X-Aptameri uygulanmıştır. Uygulamanın sonunda 1 nM DiOC₆, 2 µg/ml PI, 1 µg/ml DAPI boyası uygulanmıştır ve floresan mikroskobu altında çekim alınmıştır (Büyütme oranı: 20x).

TKY.T2.08 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerinin floresan boyaması sonuçları değerlendirildiğinde MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücre hattında kontrol grubuna göre DNA kondenzasyonunda artış olmuştur. Mitokondri membran potansiyelinde değişiklik gözlenmemiştir. PI boyaması sonuçlarına göre kontrol grubuna kıyasla ölü hücre sayısında artış olmuştur. HT29 kolon kanseri hücre hattında sonuçlar değerlendirildiğinde kontrol grubuna kıyasla DNA kondenzasyonunda, ölü hücre sayısında ve mitokondri membran potansiyelinde artış olduğu görülmüştür. PC3 prostat kanseri hücre hattının sonuçları değerlendirildiğin kontrol grubuna kıyasla DNA kondenzasyonunda ve mitokondri membran potansiyelinde artış görülmüştür fakat PI boyaması sonuçlarına göre ölü hücre sayında değişiklik olmamıştır. PNT1A normal prostat hücresinde sonuçlar değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre değişiklik görülmemiştir (Şekil 4.25).

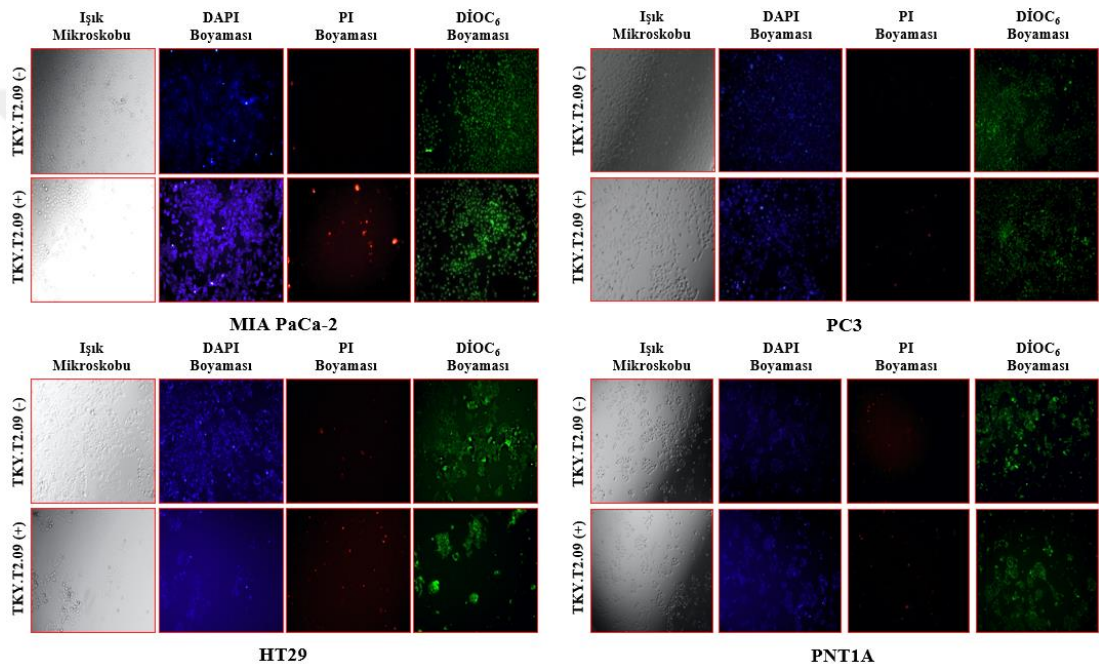


Şekil 4.25 TKY.T2.08 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerinin DNA kondenzasyonu, hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyama yöntemiyle gösterilmesi

Hücreler 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 5×10^4 olacak şekilde ekilmiştir. 72 saat boyunca 500 nM TKY.T2.08 GHRH 1-29 özgü X-Aptameri uygulanmıştır. Uygulamanın sonunda 1 nM DiOC₆, 2 µg/ml PI, 1 µg/ml DAPI boyası uygulanmıştır ve floresan mikroskobu altında çekim alınmıştır (Büyütme oranı: 20x).

TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerlerinin GHRH anlatımı yüksek olan MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücre hattında sonuçları ele alındığında kontrol grubuna göre DNA kondenzasyonunda, ölü hücre sayısında ve mitokondri membran

potansiyelinde artma tespit edilmiştir. HT29 kolon kanseri hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla DNA kondenzasyonunda herhangi bir artış görülmemiştir. Ölü hücre sayısında ve mitokondri membran potansiyelinde artış olduğu tespit edilmiştir. PC3 prostat kanseri hücre hattında kontrol grubuna kıyasla DNA kondenzasyonunda artış olmuştur. PI ve DiOC₆ boyaması sonuçlarına göre ölü hücre sayısında ve mitokondri membran potansiyelinde az miktarda artış görülmüştür. PNT1A normal prostat hücrelerinde elde edilen sonuç değerlendirildiğinde kontrol grubuna göre DNA kondenzasyonunda ve ölü hücre sayısında anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Mitokondri membran potansiyelinde az miktarda azalma görülmüştür (Şekil 4.26).

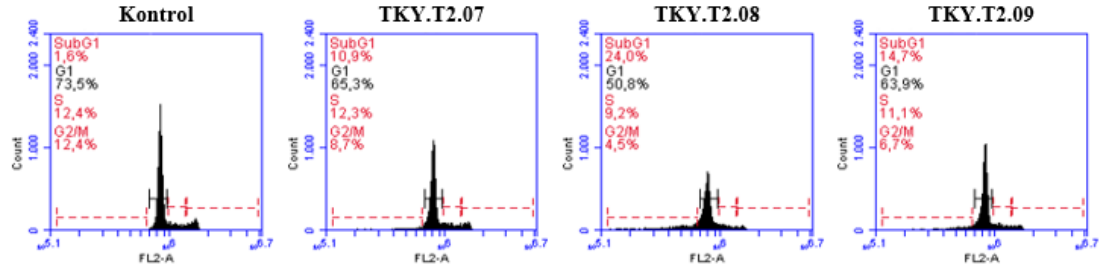


Şekil 4.26 TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerinin DNA kondenzasyonu, hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin floresan boyama yöntemiyle gösterilmesi

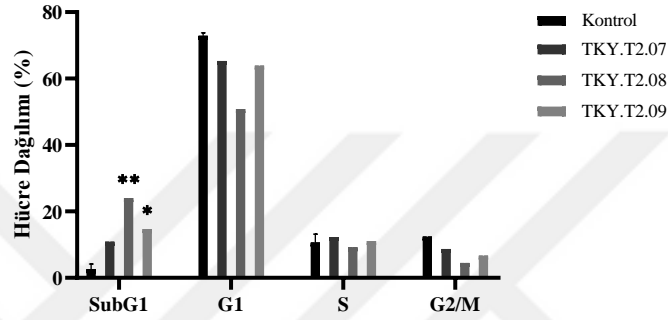
Hücreler 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisine 5×10^4 olacak şekilde ekilmiştir. 72 saat boyunca 500 nM TKYT2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptameri uygulanmıştır. Uygulamanın sonunda 1 nM DiOC₆, 2 µg/ml PI, 1 µg/ml DAPI boyası uygulanmıştır ve floresan mikroskobu altında çekim alınmıştır (Büyütme oranı: 20x).

4.6 GHRH 1-29 ÖZGÜ X-APTAMERLERİN MIA PACA-2, HT29, PC3 VE PNT1A HÜCRE HATLARINDA HÜCRE DÖNGÜSÜ ÜZERİNE ETKİLERİNİN PI BOYAMASI İLE HÜCRE AKIŞ SİTOMETRESİNDE GÖSTERİLMESİ

GHRH anlatımına sahip kanser hücre hatlarında GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerlerin hücre döngüsü üzerine etkisinin gösterilmesi için PI boyaması hücre akış sitometresinde tespit edilmiştir. GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerin hücre döngüsü üzerine etkisinin tespit edilmesi için PI boyaması yapılmıştır. MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücre hattında kontrol grubunda SubG1 fazının değeri %1,6, G1 fazının değeri %73,5, S fazı değeri %12,4, G2/M fazının ise %12,4 olarak tespit edilmiştir. TKY.T2.07 X-Aptamer için SubG1 fazının değeri %10,9, G1 fazının değeri %65,3, S fazı değeri %12,3, G2/M fazının ise %8,7 olarak elde edilmiştir. TKY.T2.08 X-Aptamer için SubG1 fazının değeri %24, G1 fazının değeri %50,8, S fazı değeri %9,2, G2/M fazının ise %4,5 olarak elde edilmiştir. TKY.T2.09 X-Aptamer için SubG1 fazının değeri %14,7, G1 fazının değeri %63,9, S fazı değeri %11,1, G2/M fazının ise %6,7 olduğu tespit edilmiştir. TKY.T2.08 GHRH 1-29 özgü X-Aptamer MIA Paca-2 pankreatik kanseri hücreleri üzerinde SubG1 popülasyonun diğer X-Aptamerlere kıyasla istatistiksel olarak belirgin artışa neden olduğu tespit edilmiştir (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$) (Şekil 4.27).



MIA PaCa-2

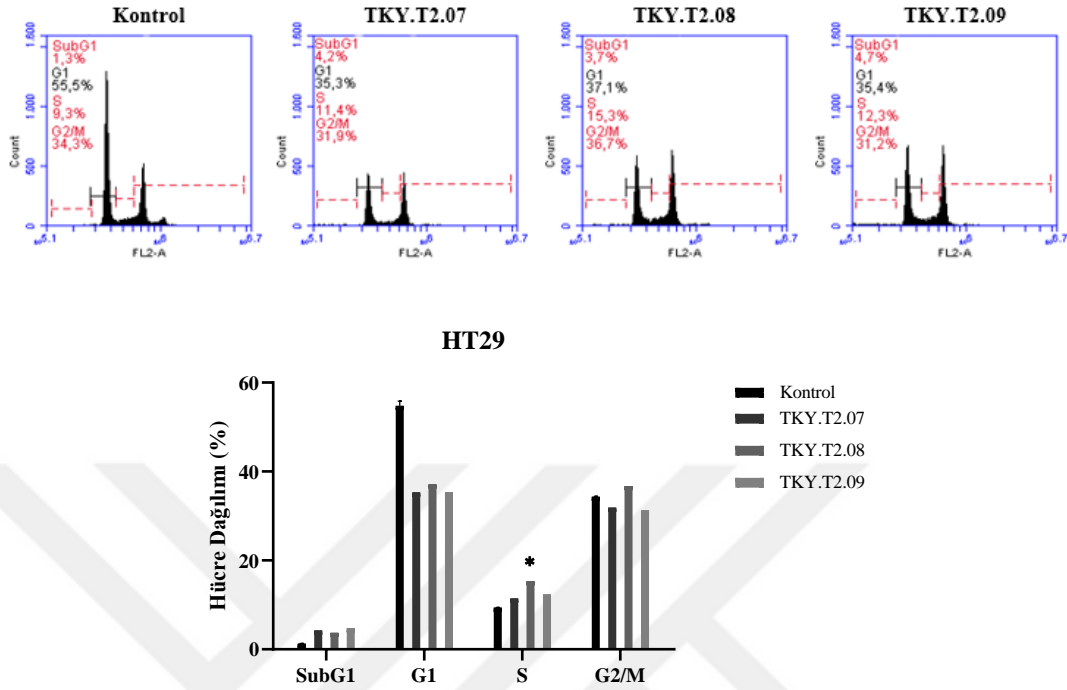


Şekil 4.27 GHRH 1-29 özgü potansiyel TKY.T2.07, TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerin Anti-Proliferatif etkisinin MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde PI analizi yöntemi ile gösterilmesi

MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine 72 saat boyunca 500 nM GHRH 1-29 özgü TKY.T2.07, TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerleri uygulanmıştır. Uygulamadan sonra hücreler fikse edilmiştir ve -20°C 'de 1 hafta inkübe edilmiştir. 25 μg RNaz (10 mg/ml) ve 25 μg PI boyası (10 mg/ml) ile muamele edilmiştir ve BD Accuri™ C6 hücre akış sitometresi cihazında okutulmuş ve analizi yapılmıştır (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

HT 29 kolon kanseri hücre hattında kontrol grubunda SubG1 fazının değeri %1,3, G1 fazının değeri %55,5, S fazı değeri %9,3, G2/M fazının ise %34,3 olarak tespit edilmiştir. TKY.T2.07 X-Aptamer için SubG1 fazının değeri %4,2, G1 fazının değeri %35,3, S fazı değeri %11,4, G2/M fazının ise %31,9 olarak elde edilmiştir. TKY.T2.08 X-Aptameri için SubG1 fazının değeri %3,7, G1 fazının değeri %37,1, S fazı değeri %15,3, G2/M fazının ise %36,7 olarak elde edilmiştir. TKY.T2.09 X-Aptameri için SubG1 fazının değeri %4,7, G1 fazının değeri %35,4, S fazı değeri %12,3, G2/M fazının ise %31,2 olduğu tespit edilmiştir. PI analiz sonuçlarına göre tüm seçili X-Aptamerler HT29 kolon kanseri hücrelerinde SubG1 popülasyonunu arttırdığı tespit edilmişken, en etkin TKY.T2.09 X-Aptamerin HT29 kolon kanseri hücrelerinde

SubG1 popülasyonunun kontrol hücelere kıyasla istatistiksel olarak artış tespit edilememiştir (* $p \leq 0,05$) (Şekil 4.28).

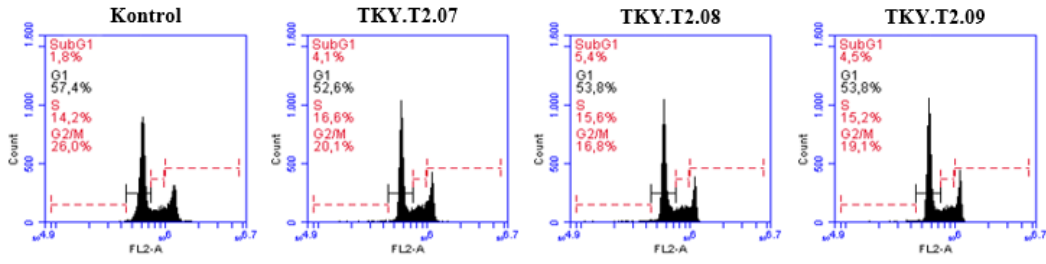


Şekil 4.28 GHRH 1-29 özgü potansiyel TKY.T2.07, TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerin Anti-Proliferatif etkisinin HT29 kolon kanseri hücre hattında PI analizi yöntemi ile gösterilmesi

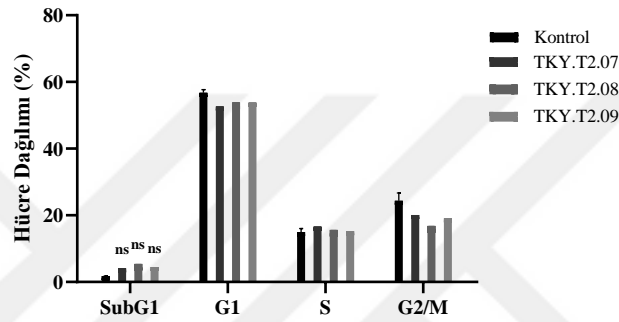
HT29 kolon kanseri hücrelerine 72 saat boyunca 500 nM GHRH 1-29 özgü TKY.T2.07, TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerleri uygulanmıştır. Uygulamadan sonra hücreler fikse edilmiştir ve -20°C'de 1 hafta inkübe edilmiştir. 25 µg RNaz (10 mg/ml) ve 25 µg PI boyası (10 mg/ml) ile muamele edilmiştir ve BD Accuri™ C6 hücre akış sitometresi cihazında okutulularak analizi yapılmıştır (* $p \leq 0,05$).

PC3 prostat kanseri hücre hattında kontrol grubunda SubG1 fazının değeri %1,8, G1 fazının değeri %57,4, S fazı değeri %14,2, G2/M fazının ise %26 olarak tespit edilmiştir. TKY.T2.07 X-Aptamer için SubG1 fazının değeri %4,1, G1 fazının değeri %52,6, S fazı değeri %16,6, G2/M fazının ise %20,1 olarak elde edilmiştir. TKY.T2.08 X-Aptameri için SubG1 fazının değeri %5,4, G1 fazının değeri %53,8, S fazı değeri %15,6, G2/M fazının ise %16,8 olarak elde edilmiştir. TKY.T2.09 X-Aptameri için SubG1 fazının değeri %4,5, G1 fazının değeri %53,8, S fazı değeri %15,2, G2/M fazının ise %19,1 olduğu tespit edilmiştir. PI analiz sonuçlarına göre tüm seçili X-Aptamerler PC3 prostat kanseri hücrelerinde SubG1 popülasyonunu arttırdığı tespit edilmişken, en etkin TKY.T2.08 X-Aptamerin PC3 prostat kanseri hücrelerinde

SubG1 popülasyonunu kontrol hücelere kıyasla akkumulasyona neden olduğu tespit edilememiştir ($ns \geq 0,05$) (Şekil 4.29).



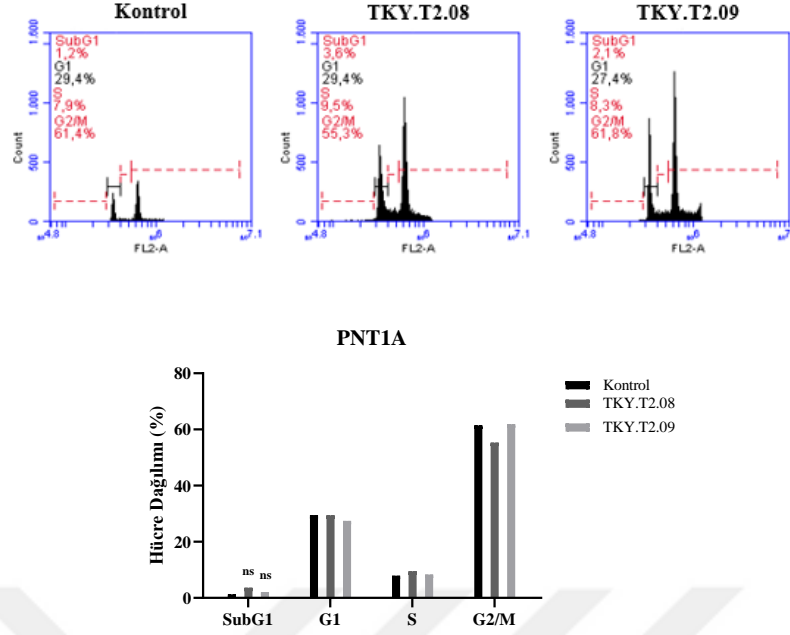
PC3



Şekil 4.29 GHRH 1-29 özgü potansiyel TKY.T2.07, TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerin Anti-Proliferatif etkisinin PC3 prostat kanseri hücre hattında PI analizi yöntemi ile gösterilmesi

PC3 prostat kanseri hücrelerine 72 saat boyunca 500 nM GHRH 1-29 özgü TKY.T2.07, TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerleri uygulanmıştır. Uygulamadan sonra hücreler fikse edilmiştir ve -20°C'de 1 hafta inkübe edilmiştir. 25 µg RNaz (10 mg/ml) ve 25 µg PI boyası (10 mg/ml) ile muamele edilmiştir ve BD Accuri™ C6 hücre akış sitometresi cihazında okutulularak analizi yapılmıştır ($ns \geq 0,05$).

PNT1A normal epitel prostat hücre hattında kontrol grubunda SubG1 fazının değeri %1,2, G1 fazının değeri %29,4, S fazı değeri %7,9, G2/M fazının ise %61,4 olarak tespit edilmiştir. TKY.T2.08 X-Aptameri için SubG1 fazının değeri %3,6, G1 fazının değeri %29,4, S fazı değeri %9,5, G2/M fazının ise %55,3 olarak elde edilmiştir. TKY.T2.09 X-Aptameri için SubG1 fazının değeri %2,1, G1 fazının değeri %27,4, S fazı değeri %8,3, G2/M fazının ise %61,8 olduğu tespit edilmiştir. PNT1A normal epitel prostat hücre hattında ise tüm seçili GHRH (1-29) özgü X-Aptamerlerin SubG1 popülasyonu üzerinde akkumulasyonun düşük olduğu belirlenmiştir ($ns \geq 0,05$) (Şekil 4.30).

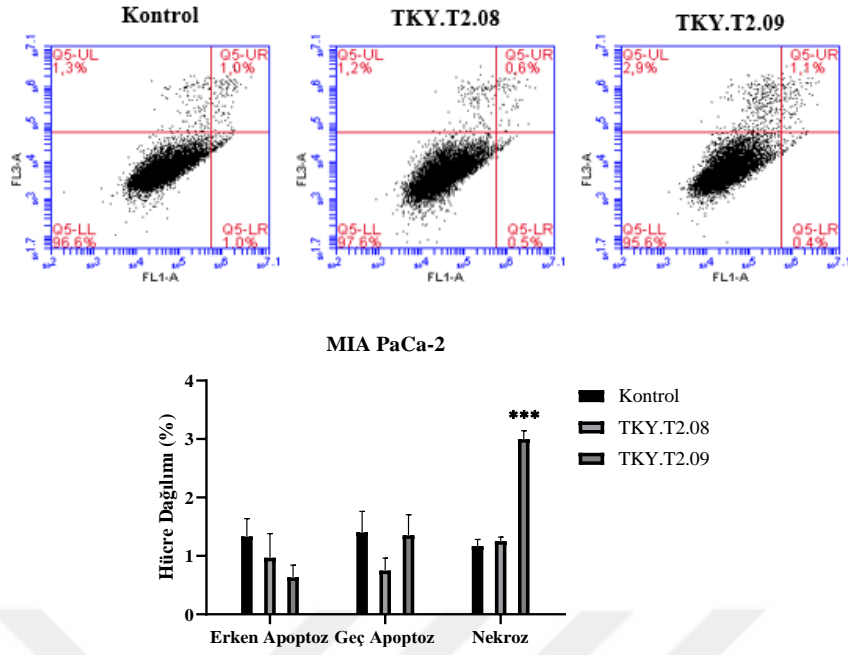


Şekil 4.30 GHRH 1-29 özgü potansiyel TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerin Anti-Proliferatif etkisinin PNT1A normal epitel prostat hücre hattında PI analizi yöntemi ile gösterilmesi

PNT1A normal epitel prostat hücrelerine 72 saat boyunca 500 nM GHRH 1-29 özgü TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerleri uygulanmıştır. Uygulamadan sonra hücreler fikse edilmiştir ve -20°C 'de 1 hafta inkübe edilmiştir. 25 μg RNaz (10 mg/ml) ve 25 μg PI boyası (10 mg/ml) ile muamele edilmiştir ve BD Accuri™ C6 hücre akış sitometresi cihazında okutularak analizi yapılmıştır (ns \geq 0,05).

4.7 GHRH 1-29 ÖZGÜ X-APTAMERLERİN MIA PACA-2, HT29, PC3 VE PNT1A HÜCRE HATLARINDA APOPTOTİK ÖLÜM ÜZERİNE ETKİLERİNİN ANNEXİN V/PI BOYAMASI İLE HÜCRE AKIŞ SİTOMETRESİNDE GÖSTERİLMESİ

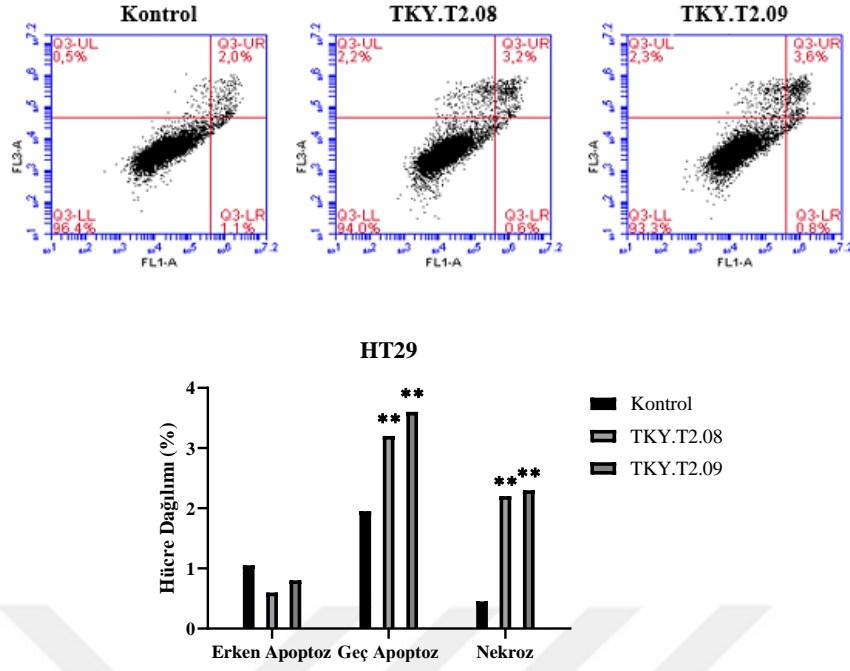
GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerinin apoptotik ölüm üzerine etkilerinin tespit edebilmek amacıyla Annexin V/PI boyaması yöntemi uygulanmıştır. MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücre hattında kontrol grubunda %1 oranında erken apoptoz, %1 oranında geç apoptoz ve %1,3 oranında nekroz olduğu tespit edilmiştir. TKY.T2.08 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerde %0,5 oranında erken apoptoz, %0,6 oranında geç apoptoz ve %1,2 oranında nekroz olduğu tespit edilmiştir. TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerde %0,4 oranında erken apoptoz, %1,1 oranında geç apoptoz ve %2,9 oranında nekroz olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.31).



Şekil 4.31 GHRH 1-29 özgül potansiyel X-Aptamerlerin apoptotik etkisinin MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücre hattında Annexin V / PI analizi yöntemi ile gösterilmesi

MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine 72 saat boyunca 500 nM GHRH 1-29 özgül TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerleri uygulanmıştır. BD biosciences FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit kullanılmıştır ve BD Accuri™ C6 hücre akış sitometresi cihazında okutulmuş ve analizi yapılmıştır (***) ($p \leq 0,001$).

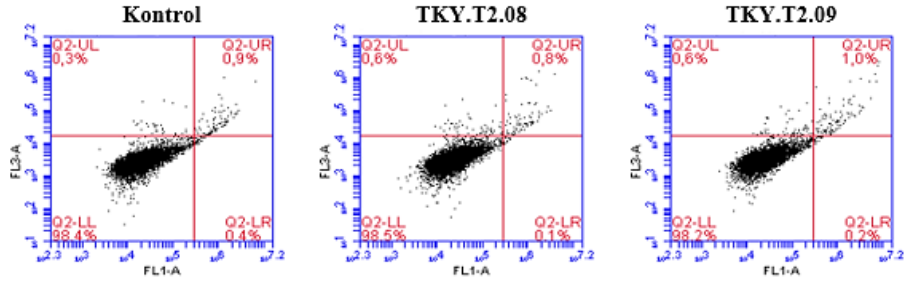
HT29 kolon kanseri hücre hattında kontrol grubunda %1 oranında erken apoptoz, %1 oranında geç apoptoz ve %1,3 oranında nekroz olduğu tespit edilmiştir. TKY.T2.08 GHRH 1-29 özgül X-Aptamerde %0,5 oranında erken apoptoz, %0,6 oranında geç apoptoz ve %1,2 oranında nekroz olduğu tespit edilmiştir. TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgül X-Aptamerde %0,4 oranında erken apoptoz, %1,1 oranında geç apoptoz ve %2,9 oranında nekroz olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.32). Hem TKY.T2.08 hem de TKY.T2.09 GHRH (1-29) özgül X-Aptamerlerin HT29 kolon kanseri hücreleri üzerinde geç apoptotik etkisinin yanında nekrotik etkisinin de olduğu tespit edilmiştir.



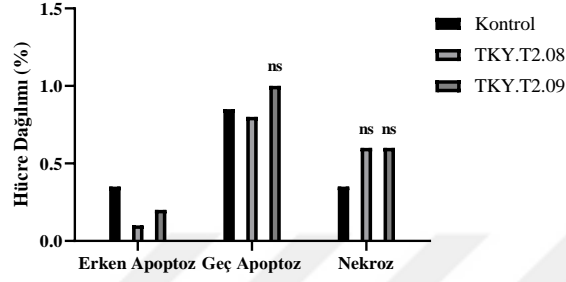
Şekil 4.32 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerlerin apoptotik etkisinin HT29 kolon kanseri hücre hattında Annexin V / PI analizi yöntemi ile gösterilmesi

HT29 kolon kanseri hücrelerine 72 saat boyunca 500 nM GHRH 1-29 özgü TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerleri uygulanmıştır. BD biosciences FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit kullanılmıştır ve BD Accuri™ C6 hücre akış sitometresi cihazında okutulularak analizi yapılmıştır (** p ≤ 0,01).

PC3 prostat kanseri hücre hattında kontrol grubunda %0,4 oranında erken apoptoz, %0,9 oranında geç apoptoz ve %0,3 oranında nekroz olduğu tespit edilmiştir. TKY.T2.08 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerde %0,1 oranında erken apoptoz, %0,8 oranında geç apoptoz ve %0,6 oranında nekroz olduğu tespit edilmiştir. TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerde %0,2 oranında erken apoptoz, %1 oranında geç apoptoz ve %0,6 oranında nekroz olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.33).



PC3



Şekil 4.33 GHRH 1-29 özgü potansiyel X-Aptamerlerin apoptotik etkisinin PC3 prostat kanseri hücre hattında Annexin V / PI analizi yöntemi ile gösterilmesi

PC3 prostat kanseri hücrelerine 72 saat boyunca 500 nM GHRH 1-29 özgü TKY.T2.08 ve TKY.T2.09

X-Aptamerleri uygulanmıştır. BD biosciences FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit

kullanılmıştır ve BD Accuri™ C6 hücre akış sitometresi cihazında okutulularak analizi yapılmıştır (ns \geq 0,05).

BÖLÜM 5 TARTIŞMA

Dünya sağlık örgütü 2018 verilerine göre kanser dünya çapında ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır [21]. Dünya sağlık örgütü 2018 verilerine göre dünyada en fazla akciğer, meme ve kolorektüm kanserleri görülmektedir [22]. Yaşam biçimi, yaş, cinsiyet, aile öyküleri, sigara ve alkol kullanımı, obezite, diyet, fiziksel hareketsizlik ve hormonal faktörler gibi yaşam tarzı faktörleri kanserin temel nedenleri arasında yer almaktadır [102].

Pankreas kanseri, dünya çapında en yaygın kanser tiplerinden biri olmamasına rağmen, en yüksek mortalite oranlarından birine sahip olan bir kanser tipleri arasında yer almaktadır [103]. Pankreas kanseri hastalarının 5 yıllık sağkalım oranı %5 ile %10 arasında değişmektedir ve ortalama sağ kalım süreleri ise tanı koyulduktan sonra 5-6 ay arasında olmaktadır. Pankreas kanseri olan hastaların büyük bir çoğunluğu, hastalığın ileri evresine ulaşmadan önce belirgin semptomlar göstermemektedir [104]. Pankreas malignitelerinin yaklaşık %90'ı pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) oluşturmaktadır. Düşük erken teşhis oranı, hızlı ilerleme, ilaç direncinin gelişimi ve uygun tedavinin olmaması gibi ana faktörler pankreas kanserinin kötü prognozuna yol açmaktadır [105]. Pankreas kanserinde cerrahi yöntemler, radyoterapi, kemoterapi ve immünoterapi dahil olmak üzere çeşitli tedavi seçenekleri bulunmaktadır [103].

Kolon kanseri çok faktörlü ve heterojen bir kanser tipi olarak bilinmektedir. Hastalarının yaklaşık olarak %20'sinin aile öyküsüne bakıldığında yakınlarında hastalık olduğu tespit edilmektedir ve kolon kanserlerinin %3 ile %5 oranında kalıtsal olduğu tespit edilmiştir [106]. Kolon kanserinin tespitinde kullanılan kolonoskopinin, yaygın olarak kullanılabilir hale gelmesiyle günümüzde erken aşamada kolon kanseri kolayca teşhis edilmektedir. Genellikle, kolon kanserinin %71 oranında kolonda ve %29 oranında rektum bölgesinde tespit edilmektedir [107]. Dünya Sağlık Örgütüne göre, 2018 yılında dünya çapında 1,80 milyon yeni kolon kanseri vakası bulunmaktadır ve 862.000 hasta kolon kanserinden vefat etmektedir [107]. Kolon kanseri tedavisi gören kişilerin önemli miktarlarda iyileşmelere rağmen, metastatik kolon kanseri olan hastaların prognozu zayıftır ve yaklaşık olarak 30 aylık ortalama genel sağkalım oranları bulunmaktadır [108].

Prostat kanseri, yılda tahmini 1.600.000 vaka ve 366.000 ölüm ile dünya çapında erkeklerde en sık görülen kutanöz olmayan kanser tipleri arasında yer almaktadır

[109]. Prostat kanserinin gelişme olasılığındaki artış yaş artıkça belirli oranlarda artış göstermektedir ve 39 yaşında %0.005 iken, 40-59 yaş aralığında risk oranı %2,2'i ve 60-79 yaş aralığında risk oranı %13,7 olacak şekilde artış göstermektedir ve ortalama görülme yaşı 66'dır [110].

GHRH, hipotalamusta üretilen bir nöropeptiddir. Ön hipofizde GHRH, hipofiz tipi GHRH reseptörüne (pGHRH-R) bağlanarak büyüme hormonunun (GH) sentezini ve salgılanmasını ve hipofiz hücrelerinin çoğalmasını düzenlemektedir. GHRH ayrıca kardiyak koruma, pankreatik adacıkların rejenerasyonu, yara iyileşmesi, sağkalım ve anti-apoptotik etkileri içeren ekstrapitüiter hücreler ve dokularda doğrudan faaliyetler yürütmektedir [111]. GHRH, glukagon, sekretin, vazoaaktif bağırsak peptidi (VIP) ve hipofiz adenilat siklaz aktive edici peptit (PACAP) içeren bir peptit ailesinin içinde yer almaktadır [112]. GHRH ve reseptörü çeşitli hipotalamik normal ve malign dokularda, bağışıklık hücrelerinde ve kanser hücrelerinde eksprese edilmektedir. Aşırı miktarda GHRH üretilmesi hücre proliferasyonunu uyararak ve apoptotik hücre ölümünü önleyerek mitojenik bir rol oynamaktadır. Bu etkiler, GHRH-R'nin 4 farklı varyantı ile sağlanmaktadır [54]. Tümörlerde üretilen GHRH ve reseptörleri tarafından oluşturulan uyarıcı döngüler, GHRH peptit antagonistleri tarafından bloke edilebilmektedir ve bu da tümör büyümesinin inhibisyonuna neden olmaktadır. Son zamanlarda, MIA-602 ve MIA-690 gibi yeni GHRH peptit antagonistleri, anti-kanser aktivitesi, yüksek bağlanma afinitesi ve GH/IGF I üzerinde düşük endokrin etkisi ile sentezlenmektedir. Bu analoglar tiroid, akciğer, gastrik, böbrek, prostat ve endometriyal kanserde ve ayrıca glioblastoma, kolorektal adenokarsinom, lenfoma ve retinoblastomda güçlü inhibitör etkiler göstermektedir [111]. Bir diğer GHRH antagonisti olan JMR-132 ve JV-1-38'in PC3 prostat kanseri hücreleri ile ksenogref yapılan farelerde tümör proliferasyonunu ve metastazını önemli ölçüde azalttığı görülmektedir [113]. Başka bir yapılan çalışmada ise PC3 ve LNCaP prostat kanseri hücreleri üzerinde JMR-132 ve JV-1-38 peptit antagonistlerin hücre döngüsünü inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gösterilmektedir [64].

Aptamerler, moleküler ağırlığı yaklaşık 10 ile 30 kDa arasında değişen ve antikorlardan daha küçük olan kısa tek sarmallı DNA veya RNA'lardan oluşmaktadırlar [70]. Aptamerler, doğal olarak oluşan ligandlardan farklı olarak laboratuvar ortamında tasarlanmış oligonükleotid dizilerinden oluşmaktadırlar [75]. X-Aptamer teknolojisi, kütle spektrometrik teknikleri ile klinik tanı ve araştırmalarda

yüksek duyarlılık analizleri için yeni bir proteomik yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. X-Aptamerler, amino asit benzeri yan zincirler, fosforoditioatlar ve küçük moleküller gibi çok çeşitli kimyasal modifikasyonları ile etkinlikleri ve bağlanma afiniteleri arttırılmaktadır. X-Aptamerlerin yüksek özgüllük ve afiniteye sahip hedef proteinlere bağlanmasına izin veren kimyasal olarak modifiye edilmiş aptamerlerden oluşmaktadır [96]. Peugaptanib olarak da bilinen Macugen vasküler endotelial büyüme faktörünü hedefleyen bir aptamer olarak üretilmektedir. Macugen, retinadaki yaşa bağlı makula dejenerasyonunu (AMD) tedavi etmek için 2004 yılında FDA tarafından onaylanmış bir aptamerler arasında yer almaktadır. Bu hastalık, gözün koroidinin (retinanın altındaki vasküler doku) VEGF ile uyarılan kan damarlarının büyümesinden kaynaklanmaktadır ve 50 yaşın üzerindeki insanlarda körlüğün önde gelen nedenleri arasında yer almaktadır [114]. Macugen göze enjekte edildiğinde VEGF'nin hareketlerini bloke eden VEGF'ye antagonist etki olarak çalışmaktadır. Bu daha sonra göz içinde bulunan kan damarlarının büyümesini, sızıntı ve şişmeleri azaltmaktadır [115].

GHRH sinyalini bloke etmek üzere GHRH peptit antagonistlerinin *in vitro* ve *in vivo* ortamda pek çok kanser hücresinde apoptotik etkisinin gösterilmesi ve literatür taraması yapıldığında henüz GHRH (1-29) özgü aptamerin sentez edilmemiş olmasından dolayı bu tez ile amacımız literatürde GHRH ve GHRH-R anlatımına bağlı aktif GHRH sinyali olan kanser hücrelerinde GHRH özgü X-Aptamerlerin sentez edilmesi ve karsinojenik etkilerinin irdelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak GHRH 1-29 peptidine özgü X-Aptamerleri magnetik bead teknoloji kullanılarak yüzeylerine tutturulan kütüphaneler aracılı PCR tabanlı hedef moleküle özgü çoğaltılmış nükleotit dizilerinin, yeni nesil sekanslama işlemi ile filtrelenmesini takiben potansiyel beş X-Aptamer belirlenmiştir. Yakın zamanda SELEX dışı aptamer üretimi olarak ön görülen X-Aptamer teknolojisi kullanılarak immun hücre döngüsü proteini olan programlı ölüm 1 (PD1) ve programlı ölüm ligand 1 (PD-L1) özgü X-Aptamerler sentez edilmiştir [101]. Şizofreni gibi kompleks hastalıkların moleküler mekanizmasının aydınlatılması amacı ile C4A ve ApoB gibi biyobelirteçlerin serum örneklerinde belirlenebilmesi için C4A ve ApoB özgü X-Aptamerler sentez edilmiştir [97].

Aptamerlerin hedef moleküle bağlanma etkinliklerinin ortaya konması ve yüksek hedef moleküler aptamerlerin bağlanmasının tespit edilmesi için dot blot yöntemi

[116], yüzey plazma (SPR) analizi [117], ELONA [118], EMSA [119] gibi teknikler kullanılmaktadır. Laboratuvarımızda hali hazırda imkanlar dahilinde bu tekniklerden en kolay, ucuz olanı olan dot blot yöntemi tercih edilmiştir. GHRH 1-29 özgü ilk defa sentez edilen 5 olası X-Aptamerden GHRH 1-29 peptidine en yüksek bağlanma eğilimi gösteren TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 adı verilen X-Aptamerlerin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Dot blot, SPR analizi, ELONA veya EMSA yöntemleri ile hedef moleküle yüksek bağlanma afinitesi gösteren X-Aptamerlerin Kd değerlerinin belirlenmesi için doza bağlı X-Aptamerlerin hedef molekül ile etkileşiminin floresan, kemulimunesans gibi yöntemler ile işaretlenerek Sigmaplot14 (Systat Software Inc., USA) programı aracılığı ile tespit edilmiştir [120]. Literatürdeki bu bilgi ışığında, bu tez kapsamında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin doza bağlı olarak GHRH (1-29) ile bağlanma afiniteleri dot blot yöntemi ile tespit edilmiştir. Sigma plot programı kullanılarak non-lineer regresyon analizi ile yapılmıştır [121]. Analiz sonucunda TKY.T2.08 GHRH 1-29 özgü X-Aptameri için Kd değeri 48.19 nM belirlenmiştir. TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptameri için Kd değeri 24.20 nM olarak belirlenmiştir. Çıkan sonuçlara göre TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerinin GHRH 1-29 peptidine bağlanma afinitesinin daha yüksek olduğu tespit edilmektedir (Şekil 4.8). Böylece GHRH (1-29) bağlanma afiniteleri her iki X-Aptamer için benzerlik gösterse de Kd değerlerinin yaklaşık birbirinin iki katı olması söz konusudur. Bunun nedeni literatürde aptamer Kd değerlerinin hesaplanmasında SPR gibi daha hassas tekniklerin dot blot veya ELONA gibi uzun süren ve pek çok teknik alt basamaktan oluşması kaynaklı olabileceği düşünülmektedir [122]. Aptamerlerin potansiyel iki boyutlu yapılarının, serbest enerji değerlerinin özellikle hedef molekül ile bağlanma açısından önem arz ettiği bilinmektedir. Sekonder yapı analiz için serbest enerji minimizasyonuna bağlı algoritma üzerinden RNA/DNA sekonder yapı çizimleri için web araçları söz konusudur [123]. Bu araçlar doğrultusunda çizilen olası sekonder yapılara bakıldığında TKY.T2.08 serbest enerji değeri 6,44 ve 5,84 olan iki formunun söz konusu olurken, TKY.T2.09 için serbest enerji değerinin 7,57 olarak tek form şeklinde olması aptamerlerin olası sekonder yapı kazanımlarına bağlı olarak Kd değerlerinin farklılık göstermesi şeklinde yorumlanabilir (Şekil 4.5, Şekil 4.6).

GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerinin kanser hücreleri üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla literatürde GHRH ve GHRH-R anlatımının var olduğu bilinen MIA PaCa-2

Pankreas kanseri hücreleri, HT29 kolon kanseri hücreleri ve PC3 prostat kanseri hücreleri taranmıştır. Literatür incelendiğinde 2002 yılında Busto ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda MIA PaCa-2 pankreas kanseri ve HT29 kolon kanseri hücrelerinde GHRH reseptörlerinin anlatımına mRNA seviyesinde bakılmaktadır sonuçlara göre MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücre hattında ve HT29 kolon kanseri hücre hattı incelendiği SV1 ve SV2 reseptör varyantlarının olduğu tespit edilmektedir. Aynı çalışmada GHRH için mRNA anlatımı olduğu MIA PaCa-2 ve HT29 hücre hatları için tespit edilmektedir [124]. 2001 yılında Chopin ve Herington tarafından gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda PC3 prostat kanseri hücre hattında GHRH anlatımının var olduğu immunohistokimyasal boyama yöntemiyle protein seviyesinde var olduğu gösterilmektedir [125]. Ayrıca RT-PCR yöntemiyle de PC3 hücre hattında GHRH-R anlatımının olduğu gösterilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda farklı kanser hücre hatlarında GHRH anlatımının tespit edilmesi amacıyla immüno blotlama yöntemi ile GHRH peptidinin protein düzeyinde anlatımları tespit edilmektedir. MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde 12 kDa, HT29 kolon kanseri hücrelerinde 17 kDa, PC3 prostat kanseri hücrelerinde ise 12 kDa ve 17 kDa GHRH izoformunun bulunduğu tespit edilmektedir (Şekil 4.10). Elde edilen sonuçları doğrulamak amacıyla immunofloresan yöntemiyle de protein anlatımlarına bakılmış ve en yüksek GHRH anlatımının MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde olduğu tespit edilmiştir. MIA PaCa-2 pankreas kanseri, HT29 kolon kanseri, PC3 prostat kanseri hücrelerinin medyaya ne kadar GHRH proteini saldıgını tespit etmek amacıyla ELİSA yöntemi kullanılmıştır. Pankreas kanseri hücre hattı olan MIA PaCa-2 1518 pg/ml, HT29 kolon kanseri hücre hattı için 1556 pg/ml ve prostat kanseri hücre hattı olan PC3 için 1453 pg/ml GHRH proteininin medyaya salındığı tespit edilmiştir (Şekil 4.12).

Normal fizyolojik kondüsyonda hipotalamik GHRH peptidi hipofiz bezi hücreleri yüzeyindeki kendine özgü G-protein bağlı reseptör ailesi üyesi olan GHRH-R bağlanarak hipofiz bezi somatotrof hücrelerinin GH sentezini uyarır [126]. GHRH ile GHRH-R bağlanmasını takiben aktive olan adenilil siklaz enzimine bağlı cAMP üretimi, intrasellüler cAMP miktarının artmasına bağlı olarak aktive olan protein kinaz A (PKA) ve hücre içi Ca^{+2} influx durumuna bağlı olarak GH ekzositozu gerçekleşmektedir [127]. Ayrıca GHRH sinyaline bağlı PKA ve cAMP akkümüasyonu sonuç cAMP cevap elementi bağlanma proteini (CREB) aktive olmasına bağlı GHRH-R transkripsiyonel aktivasyonu gerçekleşmektedir [126]. Bu

bilgiler ışığında, GHRH 1-29 özgü X-Aptamerler için yapılan dot blot deneyinde en yüksek afiniteye sahip TKY.T2.07, TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 X-Aptamerlerinin GHRH sinyali üzerindeki ket vurucu etkisinin ortaya konması amacı ile GH, GHRH-R anlatım profilleri, cAMP miktarı ve bağlı kalsiyum miktarı incelenmiştir. X-Aptamerlerin GH ve GHRH-R anlatımı üzerindeki etkisi en yüksek GHRH anlatımı olan MIA PaCa-2 pankreatik kanser hücrelerinde gösterilmiştir. Dot blot analizi ile paralellik göstererek, düşük bağlanma afinitesi olan TKY.T2.07'nin TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 kıyasla daha az GH ve GHRH-R anlatımı üzerinde ket vurucu etkisi gösterilmiştir. Hem TKY.T2.08 hem de TKY.T2.09'in bazal GHRH anlatımına bağlı hedef proteinler üzerinde ket vurucu etkisi ilk defa bu tez kapsamında gösterilmiştir (Şekil 4.13).

Aktif GHRH sinyalinin hücre içi PKA aktivasyonuna bağlı cAMP oluşumuna [126] ve GHRH'nin EGFR'nin PKA yoluyla aktivasyonunu indüklediğini göstermektedir [128]. Bu bağlamda GHRH agonistleri ve antagonistlerinin cAMP miktarına etkisi incelendiğinde 2018 yılında Shen ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen deneyler sonucunda GHRH agonisti olan MR409 hücrelere 0-90 dakika boyunca 10nM uygulandığında 60 dakikada cAMP miktarı zirve noktasına ulaşmaktadır. Uyarılan GHRH reseptörleri cAMP/PKA aktivitesini arttırmaktadır. Böylece hücrelerde bulunan sitoplazmik cAMP miktarı artmaktadır. Gene aynı çalışmada kullanılan GHRH antagonisti MIA602 hücrelere 0-90 dakika boyunca 10nM uygulanmaktadır. Hücre sitoplazmasında bulunan cAMP miktarını düşürmektedir [129]. 2018 yılında Schally ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen deneylerde bu sefer akciğer kanseri hücrelerinde GHRH agonisti olan MR409 ve GHRH antagonisti MIA602'nin cAMP üzerine etkileri incelendiğinde gene aynı sonuçlarla karşılaşılmaktadır [5]. Sonuç olarak GHRH agonistleri GHRH reseptörlerine bağlanarak sitoplazma içinde bulunan cAMP miktarını arttırmaktadır. GHRH antagonistleri ise GHRH ile yarışçı davranarak GHRH yerine GHRH reseptörüne bağlanarak GHRH'nin bağlanmasını engellemekte ve aşağı yolları inhibe etmektedir. Bu tez kapsamında GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerinden TKY.T2.07, TKY.T2.08 ve TKY.T2.09'nin hem MIA PaCa-2 pankreas kanseri hem de HT29 kolon kanseri hücrelerinde GHRH sinyaline ket vurma potansiyeli cAMP konsantrasyonuna bağlı incelendiğinde herhangi bir istatistiksel farklılığın olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.14). GHRH sinyalinde cAMP konsantrasyonu önemli bir hedef sekonder mesajcı olsa da X-Aptamerlerin uygulama

süresinin 72 saat zaman zarfında deneysel süreçte gerçekleştirilmesi, hücrelerde GHRH sinyali için cAMP konsantrasyonu esas sinyale ket vurma açısından erken bir hedef olarak görülmektedir.

GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerinin GHRH sinyaline ket vurucu etkisinin kontrol edilebilmesi için GHRH yolağında sinyal belirteci olan hücre içi Ca^{+2} iyonunun artışından yararlanılarak X-Aptamerlerin etkisi tespit edilmektedir. Hücrelerdeki Ca^{+2} dengesinin bozulması hücrelerde anormal proliferatif etkilere sebep olarak tümör oluşmasına sebep olmaktadır [130]. GHRH-R anlatımın bulunduğu bilinen pankreas kanseri MIA PaCa-2, kolon kanseri HT29, prostat kanseri PC3 ve normal epitel hücresi PNT1A hücrelerinde Ca^{+2} green boyaması yapılarak X-Aptamer uygulamasından kaynaklı olarak intrasellüler Ca^{+2} iyonu birikimi gösterilmektedir. Sonuçlar incelendiğinde TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerinin pankreas kanseri MIA PaCa-2, kolon kanseri HT29, prostat kanseri PC3 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla Ca^{+2} iyonu seviyesinin arttığı tespit edilmektedir. GHRH 1-29 özgü X-Aptamerler GHRH yerine bağlanması veya GHRH'nin reseptör ile bağlanma epitopik bölgesine bağlanarak reseptörleri bloke etmek şeklinde olabilir ve böylece GHRH sinyal yolağını inaktif hale getirebilmektedir. Bu durumda hücre içinde bulunan Ca^{+2} iyonları kullanılamaz ve hücre içinde birikmeye başlamaktadır. Ca^{+2} green boyaması ile hücre içinde biriken Ca^{+2} iyonları gösterilerek GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerin GHRH sinyaline ket vurucu etkisi gösterilmektedir (Şekil 4.15). GHRH X-Aptamerlerinin GHRH sinyali üzerindeki ket vurucu etkisinin irdelenmesinde cAMP konsantrasyonunun öneminin yanında hücre içi serbest Ca^{+2} miktarının artışının önemi bilinmektedir [126]. Tez kapsamındaki deney sonuçlarına göre GHRH sinyalinde rol alan sekonder mesajıcılardan cAMP miktarının 72 saat zaman zarfında değil erken zaman sürecinde etkisi olabileceği düşünülse de hücre içi Ca^{+2} miktarının 72 saat X-Aptamer uygulanmasında artışının görülmesi hücre içi Ca homeostazını bozarak hücrelerde ölümü tetiklediği düşünülmektedir [130].

GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerin hücre canlılığına etkisinin anlaşılabilmesi için MTT deneyi gerçekleştirilmektedir. Mitokondrisi işlevsel olan hücrelerin tetrazolium tuzlarını redükte ederek formazan kristallerine çevirmesi durumu izlenmiş, ve formazan kristallerin yarattığı renk farklılığı ile canlılık testi değerlendirilmektedir [131]. 2018 yılında Schally ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen deneyler sonucunda GHRH antagonisti MIA602 96 saat boyunca $5\mu M$ uygulanmaktadır.

Uygulama sonucunda akciğer kanseri hücrelerinde hücre canlılığının %60 civarına indiği tespit edilmektedir [5]. Bu tezde ise 0-500 nM arasında konsantrasyona sahip olan GHRH 1-29 özgü X-Aptamerler 24-72 saat boyunca pankreas kanseri MIA PaCa-2, kolon kanseri HT29, prostat kanseri PC3 ve normal epitel hücresi PNT1A hücrelerine uygulanmaktadır. TKY.T2.02, TKY.T2.06 ve TKY.T2.07 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerinin MIA PaCa-2 pankreas kanseri, HT29 kolon kanseri, PC3 prostat kanseri ve PNT1A normal epitel hücreleri üzerine bağlı hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı azalmalara sebep olmamaktadır (Şekil 4.17, Şekil 4.18, Şekil 4.19). TKY.T2.08 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerinin bağlı hücre canlılığı MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde değerlendirildiğin 72 saat 500 nM X-Aptamer uygulaması sonucunda bağlı hücre canlılığı %77 oranlarına inmektedir. HT29 kolon kanseri hücrelerinde ise bağlı hücre canlılığı 72 saat 500 nM X-Aptamer uygulamasından sonra %60 oranlarını inmektedir. PC3 prostat kanseri hücrelerinde 72 saat boyunca 500 nM X-Aptamer uygulamasından sonra bağlı hücre canlılığının %82 oranına indiği görülmektedir. PNT1A normal epitel hücrelerinde ise bağlı hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı değişimler olmamaktadır (Şekil 4.20). TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerinin bağlı hücre canlılığı üzerine etkisi incelendiğinde, MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücre hattında 72 saat boyunca 500 nM X-Aptamer uygulandığında bağlı hücre canlılığı %69 oranına inmektedir. HT29 kolon kanseri hücrelerinde ise bu oran %73 inmektedir. PC3 prostat kanseri hücrelerinde 72 saat 500 nM TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptameri uygulandığında ise bağlı hücre canlılığı %89 olarak tespit edilmektedir. PNT1A normal epitel prostat hücrelerinde bağlı hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı değişimler olmamıştır (Şekil 4.21). Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde pankreas kanseri MIA PaCa-2, kolon kanseri HT29 ve prostat kanseri PC3 hücrelerinin TKY.T2.02, TKY.T2.06 ve TKY.T2.07 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerleri TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerine göre daha dirençli bir profil sergilemektedir. Bu durum GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerinin bağlanma afinitelerinden kaynaklı olabilmektedir. Çünkü dot blot deneyi ile TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerin GHRH 1-29 peptidine TKY.T2.02, TKY.T2.06 ve TKY.T2.07 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerine daha yüksek afinite bağlandığı gösterilmektedir. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerinin bağlı hücre canlılığına etkileri ayrıntılı olarak incelendiğinde TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 özgü X-Aptamerinin HT29 kolon kanseri hücrelerine bağlı hücre canlılığı olarak daha fazla

etki ettiği görülmektedir. MIA PaCa-2 pankreas kanseri, HT29 kolon kanseri ve PC3 prostat kanseri hücrelerinde GHRH anlatım profilleri incelendiğinde MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde yoğun olarak 12 kDa izoformunun bulunduğu az miktarda ise 17 kDa izoformunun bulunduğu görülmektedir. HT29 kolon kanseri hücrelerinde GHRH'nin sadece 17 kDa izoformunun olduğu görülmektedir. PC3 prostat kanseri hücrelerinde yoğun olarak 17 kDa izoformunun bulunduğu az miktarda ise 12 kDa izoformunun bulunduğu görülmektedir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 zg X-Aptamerlerinin HT29 kolon kanseri hücrelerinde en etkili olmasının sebebi bu hücrelerin GHRH 17 kDa sahip izoformunu bulundurmasından kaynaklı olabilmektedir. PC3 prostat kanseri ve en yüksek GHRH anlatımına sahip MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde GHRH'nin 12 kDa izoformunun bulunması X-Aptamerlerin hücrelere etkisinde değişikliğe sebep olabilmektedir. Sonuç olarak her bir kanser tipinde farklı GHRH izoformlarının anlatımının olması ve farklı GHRH sinyalinin olması kaynaklı olarak X-Aptamerlerinin hücre canlılık üzerine etkisinde değişiklik oluşmaktadır.

GHRH 1-29 zg X-Aptamerlerinin DNA kondenzasyonunda, hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli üzerine etkisinin incelenebilmesi için floresan boyama yöntemi kullanılmaktadır. MIA PaCa-2 pankreas kanseri, HT29 kolon kanseri, PC3 prostat kanseri ve PNT1A normal epitel hücrelerine 72 saat boyunca 500 nM GHRH 1-29 zg X-Aptamerler uygulanmaktadır. Sonuçlar değerlendirildiğinde TKY.T2.02, TKY.T2.06 ve TKY.T2.07 GHRH 1-29 zg X-Aptamerleri için bağlı hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı değişimler olmamaktadır (şekil 4.22, şekil 4.23, şekil 4.24). Fakat TKY.T2.02 GHRH 1-29 zg X-Aptamer için DNA kondenzasyonunda, hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli açısından değerlendirildiğinde sadece GHRH anlatımı en yüksek olan MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücre hattında DNA kondenzasyonunda ve hücre lmde artış olduğu görülmektedir. TKY.T2.06 ve TKY.T2.07 GHRH 1-29 zg X-Aptamerleri için DNA kondenzasyonunda, hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyelinde anlamlı değişiklikler bulunmamaktadır. TKY.T2.08 GHRH 1-29 zg X-Aptameri için MIA PaCa-2 pankreas kanseri ve HT29 kolon kanseri hücrelerinde DNA kondenzasyonunda, hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyelinde anlamlı miktarlarda artış olduğu görülmektedir. Fakat PC3 prostat kanseri hücrelerinde X-Aptamer uygulaması sonucunda anlamlı değişiklik görülmemektedir. Elde edilen

sonuçlar bağıl hücre canlılığı ile kıyaslandığında benzer sonuçlar elde edilmektedir. unk bağıl hücre canlılığı sonuçlarında en fazla HT29 kolon kanseri hücrelerine etki ederken en az PC3 prostat kanseri hücrelerine etki etmektedir (Şekil 4.25). TKY.T2.09 GHRH 1-29 zė X-Aptameri için sonuçlar değerlendirildiğinde en fazla MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde DNA kondenzasyonunda, hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyelinde artış olduğu görülmektedir. HT29 kolon kanseri hücreleri için ise DNA kondenzasyonunda, hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyelinde MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerine göre daha az etki ettiği görülmektedir. PC3 prostat kanseri hücrelerinde ise anlamlı değişikliklerin olmadığı görülmektedir (Şekil 4.26). Elde edilen sonuçlar bağıl hücre canlılığı ile kıyaslandığında HT29 kolon kanseri hücrelerinde bağıl hücre canlılığı açısından daha etkili olduğu görülmekteydi fakat DNA kondenzasyonunda, hücre ölümü ve mitokondri membran potansiyeli açısından MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde TKY.T2.09 GHRH 1-29 zė X-Aptamerinin daha etkili olduğu görülmektedir. GHRH 1-29 zė X-Aptamerlerin anti-proliferatif etkisinin gösterilebilmesi için PI boyaması yapılmaktadır. Hücre akış sitometresi cihazında okutularak ve analizi yapılarak sonuçlar değerlendirilmektedir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde TKY.T2.07, TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 zė X-Aptamerlerinin MIA PaCa-2 pankreas kanseri, HT29 kolon kanseri ve PC3 prostat kanseri hücrelerinde Sub G1 popülasyonunda artış olduğu tespit edilmiştir. Sub G1 popülasyonunda artışlar olması hücrelerin apoptoza gittiğinin bir göstergesidir (Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29).

GHRH 1-29 zė X-Aptamerlerin MIA PaCa-2 pankreas kanseri, HT29 kolon kanseri ve PC3 prostat kanseri hücreleri üzerinde apoptotik etkilerinin öğrenilebilmesi için Annexin V/PI boyaması yapılmaktadır. En yüksek GHRH anlatımına sahip MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücre hattında TKY.T2.09 GHRH 1-29 zė X-Aptamerinin hücreleri nekrotik lme götürdüğü tespit edilmektedir. TKY.T2.08 GHRH 1-29 zė X-Aptameri ise PI boyaması sonucunda elde edilen apoptotik ölüm sonuçlarını desteklememektedir. TKY.T2.08 GHRH 1-29 zė X-Aptamerinde MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinde herhangi bir lme sebep olmadığı görülmektedir (Şekil 4.31). HT29 kolon kanseri hücrelerinde TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 GHRH 1-29 zė X-Aptamerleri geç apoptotik ve nekrotik lme sebep olmaktadır (Şekil 4.32). PC3 prostat kanseri hücrelerinde ise TKY.T2.08 GHRH 1-29 zė X-Aptamerin sadece nekrotik lme sebep olduğu görülmektedir. TKY.T2.09 GHRH 1-29 zė X-

Aptamerinin ise hem geç apoptotik hem de nekrotik ölüme sebep olduğu tespit edilmektedir (Şekil 4.33).

Sonuç olarak bu tez kapsamında ilk defa GHRH 1-29 özgü potansiyel beş X-Aptamer sentez edilmiş, GHRH bağlanma afiniteleri gösterilmiş, potansiyel beş X-Aptamerden iki tanesinin (TKY.T2.08 ve TKY.T2.09) GHRH sinyaline GH, GHRH-R anlatımını baskılayarak, cAMP konsantrasyonunda belirgin bir farklılığa neden olmadan, hücre içi Ca^{+2} iyon miktarında artış göstererek, canlılığını azalttığı, apoptotik ve nekrotik ölüme neden olduğu özellikle MIA PaCa-2 pankreas kanseri, HT29 kolon kanseri gibi GHRH sentez ve salınımı yüksek olan kanser hücrelerinde gösterilmektedir. Gelecekte GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerin GHRH ligandının epitopik bağlanma bölgeleri belirlenmesi deneyleri ile GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerinin bağlanma ve etki mekanizmalarının irdelenmesi, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile GHRH 1-29 özgü X-Aptamerlerinin farklı GHRH sinyaline sahip hücreler üzerinde etkisi farklı hücre ölüm tipleri üzerinden irdelenmesi gerekmektedir.

KAYNAKÇA

- [1] J. Ferlay *et al.*, “Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods,” *International Journal of Cancer*. 2019, doi: 10.1002/ijc.31937.
- [2] B. N. Vajaria and P. S. Patel, “Glycosylation: a hallmark of cancer?,” *Glycoconj. J.*, vol. 34, no. 2, pp. 147–156, 2017, doi: 10.1007/s10719-016-9755-2.
- [3] P. S. Roy and B. J. Saikia, “Cancer and cure: A critical analysis,” *Indian Journal of Cancer*. 2016, doi: 10.4103/0019-509X.200658.
- [4] B. Erdogan and D. J. Webb, “Cancer-associated fibroblasts modulate growth factor signaling and extracellular matrix remodeling to regulate tumor metastasis,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 45, no. 1, pp. 229–236, Feb. 2017, doi: 10.1042/BST20160387.
- [5] A. V. Schally *et al.*, “Agonists of growth hormone-releasing hormone (GHRH) inhibit human experimental cancers in vivo by down-regulating receptors for GHRH,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 115, no. 47, pp. 12028–12033, 2018, doi: 10.1073/pnas.1813375115.
- [6] S. Leone *et al.*, “Increased pain and inflammatory sensitivity in growth hormone-releasing hormone (GHRH) knockout mice,” *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, vol. 144, no. July, p. 106362, 2019, doi: 10.1016/j.prostaglandins.2019.106362.
- [7] A. V. Schally, X. Zhang, R. Cai, J. M. Hare, R. Granata, and M. Bartoli, “Actions and Potential Therapeutic Applications of Growth Hormone-Releasing Hormone Agonists,” *Endocrinology*, vol. 160, no. 7, pp. 1600–1612, 2019, doi: 10.1210/en.2019-00111.
- [8] X. Xiong *et al.*, “Splice variant of growth hormone-releasing hormone receptor drives esophageal squamous cell carcinoma conferring a therapeutic target,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 117, no. 12, pp. 6726–6732, 2020, doi: 10.1073/pnas.1913433117.
- [9] L. Muñoz-Moreno, M. J. Carmena, A. V. Schally, J. C. Prieto, and A. M. Bajo,

- “Stimulation of neuroendocrine differentiation in prostate cancer cells by GHRH and its blockade by GHRH antagonists,” *Invest. New Drugs*, vol. 38, no. 3, pp. 746–754, 2020, doi: 10.1007/s10637-019-00831-2.
- [10] F. Odeh *et al.*, “Aptamers chemistry: Chemical modifications and conjugation strategies,” *Molecules*, vol. 25, no. 1, 2020, doi: 10.3390/molecules25010003.
- [11] X. Zou, J. Wu, J. Gu, L. Shen, and L. Mao, “Application of aptamers in virus detection and antiviral therapy,” *Front. Microbiol.*, vol. 10, no. JULY, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.01462.
- [12] T. Adachi and Y. Nakamura, “Aptamers: A review of their chemical properties and modifications for therapeutic application,” *Molecules*, vol. 24, no. 23, 2019, doi: 10.3390/molecules24234229.
- [13] A. B. Kunnumakkara *et al.*, “Cancer — An Overview and Molecular Alterations in Cancer,” *Fusion Genes and Cancer*, pp. 1–15, 2017, doi: 10.1142/9789813200944_0001.
- [14] S. Shenoy, “Cell plasticity in cancer: A complex interplay of genetic, epigenetic mechanisms and tumor micro-environment,” *Surg. Oncol.*, vol. 34, no. December 2019, pp. 154–162, 2020, doi: 10.1016/j.suronc.2020.04.017.
- [15] S. R. Pawar, S. S. Jangam, and S. A. Waghmare, “Anti-Cancer Herble Drugs: an Overview,” *J. Drug Deliv. Ther.*, vol. 8, no. 4, pp. 48–58, 2018, doi: 10.22270/jddt.v8i4.1749.
- [16] V. Mishra, S. Thakur, P. Kesharwani, P. Gupta, and M. Vyas, “Precision medicine in cancer treatment: An update,” *Asian J. Pharm.*, vol. 12, no. 1, pp. S9–S12, 2018.
- [17] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: The next generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [18] G. M. Cooper, “The Development and Causes of Cancer,” *Cell A Mol. Approach*, 2000, doi: 10.1016/j.pbb.2009.09.001.
- [19] R. Smith, *Cancer Cell Mechanics in Chemoresistance and Chemotherapeutic Drug Exposure*. 2019.

- [20] I. Marín De Mas, L. Torrents, C. Bedia, L. K. Nielsen, M. Cascante, and R. Tauler, “Stoichiometric gene-to-reaction associations enhance model-driven analysis performance: Metabolic response to chronic exposure to Aldrin in prostate cancer,” *BMC Genomics*, vol. 20, no. 1, pp. 1–12, 2019, doi: 10.1186/s12864-019-5979-4.
- [21] M. M. Russo and T. Sundaramurthi, “An Overview of Cancer Pain: Epidemiology and Pathophysiology,” *Semin. Oncol. Nurs.*, vol. 35, no. 3, pp. 223–228, 2019, doi: 10.1016/j.soncn.2019.04.002.
- [22] WHO, *WHO report on cancer: Setting priorities investing wisely and providing care for all*. 2020.
- [23] J. Bi *et al.*, “Oncogene Amplification in Growth Factor Signaling Pathways Renders Cancers Dependent on Membrane Lipid Remodeling,” *Cell Metab.*, vol. 30, no. 3, pp. 525-538.e8, 2019, doi: 10.1016/j.cmet.2019.06.014.
- [24] G. da Cunha Santos, F. A. Shepherd, and M. S. Tsao, “EGFR Mutations and Lung Cancer,” *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, vol. 6, no. 1, pp. 49–69, 2011, doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130206.
- [25] S. Sigismund, D. Avanzato, and L. Lanzetti, “Emerging functions of the EGFR in cancer,” *Mol. Oncol.*, vol. 12, no. 1, pp. 3–20, 2018, doi: 10.1002/1878-0261.12155.
- [26] A. Lyons *et al.*, “Insulin-like growth factor 1 signaling is essential for mitochondrial biogenesis and mitophagy in cancer cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 41, pp. 16983–16998, 2017, doi: 10.1074/jbc.M117.792838.
- [27] Andersson, Åman, and Stenman, “IGF2/IGF1R Signaling as a Therapeutic Target in MYB-Positive Adenoid Cystic Carcinomas and Other Fusion Gene-Driven Tumors,” *Cells*, vol. 8, no. 8, p. 913, 2019, doi: 10.3390/cells8080913.
- [28] S. K. Denduluri *et al.*, “Insulin-like growth factor (IGF) signaling intumorigenesis and the development of cancer drug resistance,” *Genes Dis.*, vol. 2, no. 1, pp. 13–25, 2015, doi: 10.1016/j.gendis.2014.10.004.
- [29] E. Osher and V. M. Macaulay, “Therapeutic Targeting of the IGF Axis,” *Cells*, vol. 8, no. 8, p. 895, 2019, doi: 10.3390/cells8080895.

- [30] J. Ma, G. Sanchez-Duffhues, M.-J. Goumans, and P. ten Dijke, “TGF- β -Induced Endothelial to Mesenchymal Transition in Disease and Tissue Engineering,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, no. April, pp. 1–14, 2020, doi: 10.3389/fcell.2020.00260.
- [31] C. Neuzillet *et al.*, “Targeting the TGF β pathway for cancer therapy,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 147, pp. 22–31, 2015, doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.001.
- [32] N. El Baba, M. Farran, E. A. Khalil, L. Jaafar, I. Fakhoury, and M. El-Sibai, “The Role of Rho GTPases in VEGF Signaling in Cancer Cells,” *Anal. Cell. Pathol.*, vol. 2020, pp. 1–11, 2020, doi: 10.1155/2020/2097214.
- [33] M. I. Costache, M. Ioana, S. Iordache, D. Ene, C. A. Ilexandr. Costache, and A. Săftoiu, “VEGF Expression in Pancreatic Cancer and Other Malignancies: A Review of the Literature,” *Rom. J. Intern. Med.*, vol. 53, no. 3, pp. 199–208, 2015, doi: 10.1515/rjim-2015-0027.
- [34] R. S. Apte, D. S. Chen, and N. Ferrara, “VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development,” *Cell*, vol. 176, no. 6, pp. 1248–1264, Mar-2019, doi: 10.1016/j.cell.2019.01.021.
- [35] S. Jansson *et al.*, “The PDGF pathway in breast cancer is linked to tumour aggressiveness, triple-negative subtype and early recurrence,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 169, no. 2, pp. 231–241, 2018, doi: 10.1007/s10549-018-4664-7.
- [36] A. Astolfi, M. A. Pantaleo, V. Indio, M. Urbini, and M. Nannini, “The Emerging Role of the FGF/FGFR Pathway in Gastrointestinal Stromal Tumor,” *International journal of molecular sciences*, vol. 21, no. 9, 2020, doi: 10.3390/ijms21093313.
- [37] A. E. Hegab *et al.*, “Effect of FGF/FGFR pathway blocking on lung adenocarcinoma and its cancer-associated fibroblasts,” *J. Pathol.*, vol. 249, no. 2, pp. 193–205, 2019, doi: 10.1002/path.5290.
- [38] Y. Zhou, C. Wu, G. Lu, Z. Hu, Q. Chen, and X. Du, “FGF/FGFR signaling pathway involved resistance in various cancer types,” *J. Cancer*, vol. 11, no. 8, pp. 2000–2007, 2020, doi: 10.7150/jca.40531.

- [39] T. Stepień *et al.*, “Stimulatory effect of growth hormone-releasing hormone (GHRH(1-29)NH₂) on the proliferation, VEGF and chromogranin A secretion by human neuroendocrine tumor cell line NCI-H727 in vitro,” *Neuropeptides*, vol. 43, no. 5, pp. 397–400, 2009, doi: 10.1016/j.npep.2009.08.005.
- [40] L. Recinella *et al.*, “Antiinflammatory, antioxidant, and behavioral effects induced by administration of growth hormone-releasing hormone analogs in mice,” *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1–14, 2020, doi: 10.1038/s41598-019-57292-z.
- [41] H. Kiaris, I. Chatzistamou, A. G. Papavassiliou, and A. V. Schally, “Growth hormone-releasing hormone: Not only a neurohormone,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 22, no. 8, pp. 311–317, 2011, doi: 10.1016/j.tem.2011.03.006.
- [42] X. Xia, Q. Tao, Q. Ma, H. Chen, J. Wang, and H. Yu, “Growth Hormone-Releasing Hormone and Its Analogues: Significance for MSCs-Mediated Angiogenesis,” *Stem Cells Int.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/8737589.
- [43] C. G. Ziegler *et al.*, “Expression of neuropeptide hormone receptors in human adrenal tumors and cell lines: Antiproliferative effects of peptide analogues,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 37, pp. 15879–15884, 2009, doi: 10.1073/pnas.0907843106.
- [44] H. Kiaris, A. V. Schally, and A. Kalofoutis, “Extrapituitary Effects of the Growth Hormone-Releasing Hormone,” *Vitam. Horm.*, vol. 70, pp. 1–24, 2005, doi: 10.1016/S0083-6729(05)70001-7.
- [45] N. Barabutis and A. V. Schally, “Growth hormone-releasing hormone: Extrapituitary effects in physiology and pathology,” *Cell Cycle*, vol. 9, no. 20, pp. 4110–4116, 2010, doi: 10.4161/cc.9.20.13787.
- [46] S. Pech-pool *et al.*, “Thyrotropin-releasing hormone (Trh) and somatostatin (sst), but not growth hormone- releasing hormone (ghrh) nor ghrelin (ghrl), regulate expression and release of immune growth hormone (gh) from chicken bursal b-lymphocyte cultures,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 4, 2020, doi: 10.3390/ijms21041436.
- [47] N. M. Sherwood, S. L. Krueckl, and J. E. Mcrory, “The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon

- superfamily,” *Endocr. Rev.*, vol. 21, no. 6, pp. 619–670, 2000, doi: 10.1210/er.21.6.619.
- [48] M. Kovács *et al.*, “A correlation of endocrine and anticancer effects of some antagonists of GHRH,” *Peptides*, vol. 31, no. 10, pp. 1839–1846, 2010, doi: 10.1016/j.peptides.2010.07.006.
- [49] A. Schally and J. Varga, “Antagonists of Growth Hormone-Releasing Hormone in Oncology,” *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, vol. 9, no. 3, pp. 163–170, 2006, doi: 10.2174/138620706776055449.
- [50] H. Kiaris *et al.*, “Ligand-dependent and -independent effects of splice variant 1 of growth hormone-releasing hormone receptor,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 16, pp. 9512–9517, 2003, doi: 10.1073/pnas.1533185100.
- [51] M. R. Ehlers, “Recombinant human GHRH(1-44)NH 2: Clinical utility and therapeutic development program,” *Endocrine*, vol. 14, no. 1, pp. 137–141, 2001, doi: 10.1385/ENDO:14:1:137.
- [52] K. E. Mayo *et al.*, “Regulation of the pituitary somatotroph cell by GHRH and its receptor,” in *Recent Progress in Hormone Research*, 2000.
- [53] M. Lu, J. U. Flanagan, R. J. Langley, M. P. Hay, and J. K. Perry, “Targeting growth hormone function: strategies and therapeutic applications,” *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–11, 2019, doi: 10.1038/s41392-019-0036-y.
- [54] H. Pópulo *et al.*, “Inhibitory Effects of Antagonists of Growth Hormone-Releasing Hormone (GHRH) in Thyroid Cancer,” *Horm. Cancer*, vol. 8, no. 5–6, pp. 314–324, 2017, doi: 10.1007/s12672-017-0307-4.
- [55] Schally, “Effects of growth hormone-releasing hormone and its agonistic and antagonistic analogs in cancer and non-cancerous cell lines,” *Int. J. Oncol.*, vol. 36, no. 5, pp. 547–557, Mar. 2010, doi: 10.3892/ijo_00000613.
- [56] M. Doga, S. Bonadonna, A. Burattin, and A. Giustina, “Ectopic secretion of growth hormone-releasing hormone (GHRH) in neuroendocrine tumors: Relevant clinical aspects,” *Annals of Oncology*. 2001, doi: 10.1093/annonc/12.suppl_2.s89.

- [57] H. Kiaris, A. V. Schally, R. Busto, G. Halmos, S. Artavanis-Tsakonas, and J. L. Varga, “Expression of a splice variant of the receptor for GHRH in 3T3 fibroblasts activates cell proliferation responses to GHRH analogs,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 1, pp. 196–200, 2002, doi: 10.1073/pnas.0125909999.
- [58] R. Cai *et al.*, “Synthesis of new potent agonistic analogs of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and evaluation of their endocrine and cardiac activities,” *Peptides*, vol. 52, pp. 104–112, 2014, doi: 10.1016/j.peptides.2013.12.010.
- [59] A. Siejka, H. Lawnicka, G. Melen-Mucha, E. Motylewska, J. Komorowski, and H. Stepien, “Antineoplastic Action of Growth Hormone-Releasing Hormone (GHRH) Antagonists,” *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.*, vol. 7, no. 1, pp. 56–63, 2011, doi: 10.2174/157489212798358010.
- [60] G. Siriwardana, A. Bradford, D. Coy, and P. Zeitler, “Autocrine/paracrine regulation of breast cancer cell proliferation by growth hormone releasing hormone via Ras, Raf, and mitogen-activated protein kinase,” *Mol. Endocrinol.*, vol. 20, no. 9, pp. 2010–2019, 2006, doi: 10.1210/me.2005-0001.
- [61] F. G. Rick *et al.*, “Antagonists of growth hormone-releasing hormone inhibit growth of androgen-independent prostate cancer through inactivation of ERK and Akt kinases,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 5, pp. 1655–1660, 2012, doi: 10.1073/pnas.1120588109.
- [62] E. M. Langer *et al.*, “ZEB1-repressed microRNAs inhibit autocrine signaling that promotes vascular mimicry of breast cancer cells,” *Oncogene*, vol. 37, no. 8, pp. 1005–1019, 2018, doi: 10.1038/onc.2017.356.
- [63] C. A. Kanashiro, A. V. Schally, M. Zarandi, B. D. Hammann, and J. L. Varga, “Alterations of EGFR/HER, angiogenesis and apoptosis pathways after therapy with antagonists of growth hormone releasing hormone and bombesin in non-small cell lung cancer,” *Int. J. Oncol.*, vol. 30, no. 4, pp. 1019–1028, 2007, doi: 10.3892/ijo.30.4.1019.
- [64] L. Muñoz-Moreno *et al.*, “Anti-proliferative and pro-apoptotic effects of GHRH antagonists in prostate cancer,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 32, pp. 52195–52206,

2016, doi: 10.18632/oncotarget.10710.

- [65] N. Barabutis and A. V. Schally, “Antioxidant activity of growth hormone-releasing hormone antagonists in LNCaP human prostate cancer line,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 51, pp. 20470–20475, 2008, doi: 10.1073/pnas.0811209106.
- [66] S. Buchholz *et al.*, “Potentiation of mammary cancer inhibition by combination of antagonists of growth hormone-releasing hormone with docetaxel,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 6, pp. 1943–1946, 2007, doi: 10.1073/pnas.0610860104.
- [67] I. Chatzistamou *et al.*, “Inhibition of growth and metastases of MDA-MB-435 human estrogen-independent breast cancers by an antagonist of growth hormone-releasing hormone,” *Anticancer. Drugs*, vol. 12, no. 9, pp. 761–768, 2001, doi: 10.1097/00001813-200110000-00008.
- [68] G. Halmos, A. V. Schally, J. L. Varga, A. Plonowski, Z. Rekasi, and T. Czompoly, “Human renal cell carcinoma expresses distinct binding sites for growth hormone-releasing hormone,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 19, pp. 10555–10560, 2000, doi: 10.1073/pnas.180313097.
- [69] K. Sefah, D. Shangguan, X. Xiong, M. B. O’Donoghue, and W. Tan, “Development of DNA aptamers using cell-selex,” *Nat. Protoc.*, vol. 5, no. 6, pp. 1169–1185, 2010, doi: 10.1038/nprot.2010.66.
- [70] M. A. G. De Castro, C. Hobartner, and F. Opazo, “Aptamers provide superior stainings of cellular receptors studied under superresolution microscopy,” *PLoS One*, vol. 12, no. 2, pp. 1–16, 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0173050.
- [71] J. Yan *et al.*, “Advances in aptamer screening technologies,” *Talanta*, vol. 200, no. March, pp. 124–144, 2019, doi: 10.1016/j.talanta.2019.03.015.
- [72] J. Zhou and J. Rossi, “Aptamers as targeted therapeutics: Current potential and challenges,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 16, no. 3, pp. 181–202, 2017, doi: 10.1038/nrd.2016.199.
- [73] Y. Zhong, J. Zhao, and F. Chen, *Advances of aptamers screened by Cell-SELEX in selection procedure, cancer diagnostics and therapeutics*. Elsevier Inc.,

2020.

- [74] B. Guan and X. Zhang, "Aptamers as versatile ligands for biomedical and pharmaceutical applications," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 15, pp. 1059–1071, 2020, doi: 10.2147/IJN.S237544.
- [75] A. Murata and S. Sato, "Computational Design of RNA Libraries for In Vitro Selection of Aptamers," *Methods Mol. Biol.*, vol. 1111, pp. 17–28, 2014, doi: 10.1007/978-1-62703-755-6.
- [76] M. Kinoshita, "Binding of an RNA aptamer and a partial peptide of a prion protein: Crucial importance of water entropy in molecular recognition," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 11, pp. 6861–6875, 2014, doi: 10.1093/nar/gku382.
- [77] C. Wiraja *et al.*, "Aptamer technology for tracking cells' status & function," *Mol. Cell. Ther.*, vol. 2, no. 1, p. 33, 2014, doi: 10.1186/2052-8426-2-33.
- [78] M. Darmostuk, S. Rimpelova, H. Gbelcova, and T. Ruml, "Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology," *Biotechnol. Adv.*, vol. 33, no. 6, pp. 1141–1161, 2014, doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.02.008.
- [79] X.-X. Yu, K.-L. Ge, N. Liu, J.-Y. Zhang, M.-L. Xue, and Y.-L. Ge, "Selection and Characterization of a Novel DNA Aptamer, Apt-07S Specific to Hepatocellular Carcinoma Cells," *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. Volume 14, pp. 1535–1545, 2020, doi: 10.2147/dddt.s244149.
- [80] V. Giudice, F. Mensitieri, V. Izzo, A. Filippelli, and C. Selleri, "Aptamers and antisense oligonucleotides for diagnosis and treatment of hematological diseases," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 9, 2020, doi: 10.3390/ijms21093252.
- [81] D. K. Yang, L. C. Chen, M. Y. Lee, C. H. Hsu, and C. S. Chen, "Selection of aptamers for fluorescent detection of alpha-methylacyl-CoA racemase by single-bead SELEX," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 62, pp. 106–112, 2014, doi: 10.1016/j.bios.2014.06.027.
- [82] H. Kaur, "Recent developments in cell-SELEX technology for aptamer selection," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1862, no. 10, pp. 2323–2329, 2018, doi: 10.1016/j.bbagen.2018.07.029.
- [83] S. C. B. Gopinath, "Methods developed for SELEX," *Anal. Bioanal. Chem.*,

vol. 387, no. 1, pp. 171–182, 2007, doi: 10.1007/s00216-006-0826-2.

- [84] Yiyang Dong, *Aptamers for Analytical Applications*. 2018.
- [85] H. Ye *et al.*, “Orientation selection of broad-spectrum aptamers against lipopolysaccharides based on capture-SELEX by using magnetic nanoparticles,” *Microchim. Acta*, vol. 184, no. 11, pp. 4235–4242, 2017, doi: 10.1007/s00604-017-2453-3.
- [86] A. M. L. S. M. Christopher, “Aptamer-based targeted therapy,” *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 1, pp. 100–106, 2016, doi: 10.1016/j.gde.2016.03.011.
- [87] A. Parashar, “Aptamers in therapeutics,” *J. Clin. Diagnostic Res.*, vol. 10, no. 6, pp. BE01–BE06, 2016, doi: 10.7860/JCDR/2016/18712.7922.
- [88] J. Tan *et al.*, “Aptamer-Functionalized Fluorescent Silica Nanoparticles for Highly Sensitive Detection of Leukemia Cells,” *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 11, no. 1, 2016, doi: 10.1186/s11671-016-1512-8.
- [89] N. I. Khan and E. Song, “Lab-on-a-chip systems for aptamer-based biosensing,” *Micromachines*, vol. 11, no. 2, pp. 1–30, 2020, doi: 10.3390/mi11020220.
- [90] L. Hassanzadeh, S. Chen, and R. N. Veedu, “Radiolabeling of nucleic acid aptamers for highly sensitive disease-specific molecular imaging,” *Pharmaceuticals*, vol. 11, no. 4, 2018, doi: 10.3390/ph11040106.
- [91] M. Zhao *et al.*, “A GPC3-specific aptamer-mediated magnetic resonance probe for hepatocellular carcinoma,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 13, pp. 4433–4443, 2018, doi: 10.2147/IJN.S168268.
- [92] L. Zhu, L. Wang, Y. Liu, D. Xu, K. Fang, and Y. Guo, “CAIX aptamer-functionalized targeted nanobubbles for ultrasound molecular imaging of various tumors,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 13, pp. 6481–6495, 2018, doi: 10.2147/IJN.S176287.
- [93] S. Yoon and J. J. Rossi, “Aptamers: Uptake mechanisms and intracellular applications,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 134, no. January, pp. 22–35, 2018, doi: 10.1016/j.addr.2018.07.003.
- [94] C. Lijuan, Y. Xing, W. Minxi, L. Wenkai, and D. Le, “Development of an

- aptamer-ampicillin conjugate for treating biofilms,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 483, no. 2, pp. 847–854, 2017, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.016.
- [95] S. Kruspe and P. H. Giangrande, “Aptamer-siRNA chimeras: Discovery, progress, and future prospects,” *Biomedicines*, vol. 5, no. 3, pp. 1–20, 2017, doi: 10.3390/biomedicines5030045.
- [96] W. He *et al.*, “X-aptamers: A bead-based selection method for random incorporation of druglike moieties onto next-generation aptamers for enhanced binding,” *Biochemistry*, vol. 51, no. 42, pp. 8321–8323, 2012, doi: 10.1021/bi300471d.
- [97] C. Walss-Bass *et al.*, “X-Aptamer Technology Identifies C4A and ApoB in Blood as Potential Markers for Schizophrenia,” *Mol. Neuropsychiatry*, vol. 5, no. 1, pp. 52–59, 2019, doi: 10.1159/000492331.
- [98] X. Yang, N. Li, and D. G. Gorenstein, “Strategies for the discovery of therapeutic aptamers,” *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 6, no. 1, pp. 75–87, Jan. 2011, doi: 10.1517/17460441.2011.537321.
- [99] B. N. Gawande *et al.*, “Selection of DNA aptamers with two modified bases,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 114, no. 11, pp. 2898–2903, 2017, doi: 10.1073/pnas.1615475114.
- [100] N. D. Abeydeera *et al.*, “Evoking picomolar binding in RNA by a single phosphorodithioate linkage,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, no. 17, pp. 8052–8064, 2016, doi: 10.1093/nar/gkw725.
- [101] H. Wang, C. H. Lam, X. Li, D. L. West, and X. Yang, “Selection of PD1/PD-L1 X-Aptamers,” *Biochimie*, vol. 145, pp. 125–130, 2018, doi: 10.1016/j.biochi.2017.09.006.
- [102] T. A. Graham and A. Sottoriva, “Measuring cancer evolution from the genome,” *J. Pathol.*, vol. 241, no. 2, pp. 183–191, 2017, doi: 10.1002/path.4821.
- [103] T. Mitchell, L. Clarke, A. Goldberg, and K. S. Bishop, “Pancreatic Cancer Cachexia: The Role of Nutritional Interventions,” *Healthcare*, vol. 7, no. 3, p. 89, 2019, doi: 10.3390/healthcare7030089.
- [104] B. Lan, S. Zeng, R. Grützmann, and C. Pilarsky, “The role of exosomes in

- pancreatic cancer,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 18, 2019, doi: 10.3390/ijms20184332.
- [105] S. Zeng, M. Pöttler, B. Lan, R. Grützmann, C. Pilarsky, and H. Yang, “Chemoresistance in pancreatic cancer,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 18, pp. 1–19, 2019, doi: 10.3390/ijms20184504.
- [106] F. Domenica *et al.*, “The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer,” *Cancers (Basel)*, vol. 11, no. 1017, pp. 3–5, 2019.
- [107] M. Ahmed, “Colon Cancer: A Clinician’s Perspective in 2019,” *Gastroenterol. Res.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–10, 2020, doi: 10.14740/gr1239.
- [108] D. Ciardiello *et al.*, “Immunotherapy of colorectal cancer: Challenges for therapeutic efficacy,” *Cancer Treat. Rev.*, vol. 76, no. March, pp. 22–32, 2019, doi: 10.1016/j.ctrv.2019.04.003.
- [109] G. Wang, D. Zhao, D. J. Spring, and R. A. Depinho, “Genetics and biology of prostate cancer,” *Genes Dev.*, vol. 32, no. 17–18, pp. 1105–1140, 2018, doi: 10.1101/gad.315739.118.
- [110] Z. Melegh and S. Oltean, “Targeting angiogenesis in prostate cancer,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 11, pp. 1–16, 2019, doi: 10.3390/ijms20112676.
- [111] T. Villanova *et al.*, “Antagonists of growth hormone-releasing hormone (GHRH) inhibit the growth of human malignant pleural mesothelioma,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2019, doi: 10.1073/pnas.1818865116.
- [112] C. Zhang *et al.*, “Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor Antagonist Modulates Lung Inflammation and Fibrosis due to Bleomycin,” *Lung*, vol. 197, no. 5, pp. 541–549, 2019, doi: 10.1007/s00408-019-00257-w.
- [113] L. Muñoz-Moreno *et al.*, “Inhibitory effects of antagonists of growth hormone-releasing hormone on growth and invasiveness of PC3 human prostate cancer,” *Int. J. Cancer*, vol. 132, no. 4, pp. 755–765, 2012, doi: 10.1002/ijc.27716.
- [114] C. A. Stein and D. Castanotto, “FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017,” *Mol. Ther.*, vol. 25, no. 5, pp. 1069–1075, 2017, doi: 10.1016/j.ymthe.2017.03.023.

- [115] D. Huang *et al.*, “VEGF-B inhibits hyperglycemia- and Macugen-induced retinal apoptosis,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. January, pp. 1–10, 2016, doi: 10.1038/srep26059.
- [116] M. Sypabekova, A. Bekmurzayeva, R. Wang, Y. Li, C. Nogues, and D. Kanayeva, “Selection, characterization, and application of DNA aptamers for detection of Mycobacterium tuberculosis secreted protein MPT64,” *Tuberculosis*, vol. 104, pp. 70–78, 2017, doi: 10.1016/j.tube.2017.03.004.
- [117] S. Wang, Y. Dong, and X. Liang, “Development of a SPR aptasensor containing oriented aptamer for direct capture and detection of tetracycline in multiple honey samples,” *Biosens. Bioelectron.*, 2018, doi: 10.1016/j.bios.2018.02.051.
- [118] R. Stoltenburg, P. Krafčiková, V. Víglašký, and B. Strehlitz, “G-quadruplex aptamer targeting Protein A and its capability to detect Staphylococcus aureus demonstrated by ELONA,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. March, pp. 1–12, 2016, doi: 10.1038/srep33812.
- [119] D. G. Ahn *et al.*, “RNA aptamer-based sensitive detection of SARS coronavirus nucleocapsid protein,” *Analyst*, 2009, doi: 10.1039/b906788d.
- [120] M. N. Ara, M. Hyodo, N. Ohga, K. Hida, and H. Harashima, “Development of a Novel DNA Aptamer Ligand Targeting to Primary Cultured Tumor Endothelial Cells by a Cell-Based SELEX Method,” *PLoS One*, vol. 7, no. 12, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0050174.
- [121] M. Wongphatcharachai *et al.*, “Neutralizing DNA aptamers against swine influenza H3N2 viruses,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 51, no. 1, pp. 46–54, 2013, doi: 10.1128/JCM.02118-12.
- [122] L. S. Rotherham, C. Maserumule, K. Dheda, J. Theron, and M. Khati, “Selection and Application of ssDNA Aptamers to Detect Active TB from Sputum Samples,” *PLoS One*, vol. 7, no. 10, pp. 1–11, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0046862.
- [123] C. Wang, G. Yang, Z. Luo, and H. Ding, “In vitro selection of high-affinity DNA aptamers for streptavidin,” *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 2009, doi: 10.1093/abbs/gmp022.

- [124] R. Busto *et al.*, “The expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and splice variants of its receptor in human gastroenteropancreatic carcinomas,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 18, pp. 11866–11871, 2002, doi: 10.1073/pnas.182433099.
- [125] L. K. Chopin and A. C. Herington, “A potential autocrine pathway for growth hormone releasing hormone (GHRH) and its receptor in human prostate cancer cell lines,” *Prostate*, vol. 49, no. 2, pp. 116–121, 2001, doi: 10.1002/pros.1125.
- [126] L. E. Fridlyand, N. A. Tamarina, A. V. Schally, and L. H. Philipson, “Growth hormone-releasing hormone in diabetes,” *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 7, no. OCT, pp. 1–7, 2016, doi: 10.3389/fendo.2016.00129.
- [127] E. Peverelli, G. Mantovani, A. G. Lania, and A. Spada, “cAMP in the pituitary: An old messenger for multiple signals,” *Journal of Molecular Endocrinology*. 2013, doi: 10.1530/JME-13-0172.
- [128] E. Vacas *et al.*, “Growth hormone-releasing hormone induced transactivation of epidermal growth factor receptor in human triple-negative breast cancer cells,” *Peptides*, vol. 86, pp. 153–161, 2016, doi: 10.1016/j.peptides.2016.11.004.
- [129] J. Shen *et al.*, “Regulation of Vascular Calcification by Growth Hormone–Releasing Hormone and Its Agonists,” *Circ. Res.*, vol. 122, no. 10, pp. 1395–1408, May 2018, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312418.
- [130] L. B. Bergantin, “Diabetes and cancer: Debating the link through Ca²⁺/cAMP signalling,” *Cancer Lett.*, vol. 448, no. February, pp. 128–131, 2019, doi: 10.1016/j.canlet.2019.02.017.
- [131] P. Kumar, A. Nagarajan, and P. D. Uchil, “Analysis of cell viability by the MTT assay,” *Cold Spring Harb. Protoc.*, vol. 2018, no. 6, pp. 469–471, 2018, doi: 10.1101/pdb.prot095505.

EKLER

Tablo 5.1 Kullanılan Cihazların Listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Santrifüj	5427R	Eppendorf
Santrifüj (Büyük)	5810/5810R	Eppendorf
Spin mini spin plus	SN0708	LabNet
Yatay elektroforez sistemi	Gel XL ultra V-2	BioRad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Mikropipet (0,5µl-10µl)	EH52836	Thermo Fisher Scientific
Mikropipet (20µl-200µl)	EH46925	Thermo Fisher Scientific
Mikropipet (200µl-1000µl)	T27274	Thermo Fisher Scientific
Otoklav	OTO32	Nüve
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab
Distile Su Cihazı	TANKPE030	Millipore Direct Q-5UV
pH Metre	A111	Thermo Fisher Scientific
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Buzdolabı (No frost)	4263TMB	Arçelik
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab
Dry heat sterilizer	FN120	Nüve
Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad

Laminar Flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
Inverted Mikroskop	Model: XDS-1B	SOIF
İnkübatör	Heracell	Thermo Fisher Scientific
Florasın Mikroskobu	Model: 1X71	Olympus
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature Freezer, U725 innova	New Brunswick Scientific
Elektroforez Aletleri	Mini-Sub Cell GT Cell	BioRad
Facs Flow Cihazı	AC6531180147	BD ACURI C6
PVDF Membran	88518	Thermo Fisher Scientific

Tablo 5.2 Hücre Kültürü Donanımları

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
75 cm ² hücre büyütme kapları	90076	TPP
25 cm ² hücre büyütme kapları	90026	TPP
100 mm hücre büyütme kapları	93100	TPP
60 mm hücre büyütme kapları	93060	TPP
Steril pipetler (5ml)	94005	TPP
Steril pipetler (10ml)	94010	TPP
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	99722	TPP
Enjektör seti	21G Yeşil uç iğneli	ASTRAJECT

Tripsin-EDTA	25200-056	Gibco
Penisilin/Streptomisin	15140-122	Gibco
Fetal Bovine Serum	10500-064	Gibco
PC3 hücreleri	CRL-1435	ATCC
PNT1A hücreleri	95012614	ATCC
HT29 hücreleri	HTB-38	ATCC
MIA PaCa-2	CRM-CRL-1420	ATCC
LNCaP	CRL-1740	ATCC
RPMI Medium	21875034	Gibco
DMEM Medium	11960044	Gibco
McCoy's 5A	26600023	Gibco
Etüv	Heracell 1150	Thermo Fisher Scientific
Hemastometre	-	Neubauer
Laminar flow	12469,2	Thermo Fisher Scientific

Tablo 5.3 Kullanılan Kimyasalların Listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Etanol	CAS 64-17-5	ALKO MED
Saf Etanol	32221	SIGMA-ALDRICH
Metanol	24229	SIGMA-ALDRICH
İzopropanol	K44518295 321	MERCK
2-merkaptetanol	S4805940 517	MERCK
Akrilamid / Bis-Akrilamid 30% çözelti	A9099	SIGMA-ALDRICH

Amonyum persülfat	A2941	Applichem
Coomassie Blue Belirteci	A3480	Applichem
DMSO	K46505343 517	MERCK
DMSO	D2650	SIGMA-ALDRICH
EDTA	A2937	Applichem
DiOC ₆ Boya	2129966	Fluka
PI Boya	P4170-100MG	SIGMA-ALDRICH
DAPI Boya	D1306	Thermo Fisher Scientific
Fetal Bovine Serum (FBS)	P290310	Pan Biotech
p-Coumaric Asid	C9008-1G	SIGMA-ALDRICH
Luminol	A2185	Applichem
MTT Solüsyonu	M2128-5G	SIGMA-ALDRICH
Phosphate buffered saline (PBS)	BE17-51-5F	LONZA
Sığır Serum Albumin (BSA)	A2153-10G	SIGMA-ALDRICH
Sodyum dedosil sülfat (SDS)	UN1888	Applichem
Protein İzolasyonu Tamponu	78501	Thermo Fisher Scientific
Page Ruller Plus Prestained Protein Ladder	26620	Thermo Fisher Scientific
Agaroz	A9539	SIGMA-ALDRICH
Tris Baz	648310	CALBIOCHEM
Asetik Asid	27225	SIGMA-ALDRICH
Ethidium Bromide	E1510	SIGMA-ALDRICH

Tris-HCl	648317	CALBIOCHEM
Amonyum Asetat	1,110115,1000	MERCK
Fenol Kloroform	A2279,0250	Applichem
Sodyum Klorür	A2941	Applichem
Tween-20	S6740684 348	MERCK
TEMED	A1148,0100	Applichem
Yağsız Süt Tozu	SC-2325	Santa Cruz Biotechnology
Glisin	3570	CALBIOCHEM
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	K39218400838	MERCK
Millipore Falcon Centrifugal Filters	4FC901024	MERCK
Ponceau Read Belirteci	A1405	Applichem
Hidroklorik Asit	K43804717 239	MERCK
Kloroform	UN1888	Applichem
GHRH 1-29 Peptidinin Biotinleme Kiti	21442	Thermo Fisher Scientific
GHRH 1-29 Proteinine Özgü X- Aptamerlerin Seçilim Kiti	2018-OPR3-TT- du-ISTNBL	AM Biotechnologies
Dynabeadstm M-280 Streptavidin	11205D	Invitrogen
Nitrocellulose Membrane 0.45 Mm	88018	Thermo Fisher Scientific
Ghrh Elisa	e-el-h1146	Elabscience
Cyclic Amp Xp® Assay Kit	4339	Cell Signaling Technology
GHRH 1-29 Peptid	G6771	SIGMA-ALDRICH

GHRH	TP760890	Origene
GH	sc-374266	Santa Cruz Biotechnology
Endogenous Biotin-Blocking Kit	E21390	Invitrogen
Streptavidin-Alexa Fluor 488	S11223	Thermo Fisher Scientific
Fitc Annexin V Apoptosis Detection Kit	556547	BD biosciences

Tablo 5.4 Kullanılan Tamponların İeriği

10X TBS	87,6 gr NaCl 12,11 gr Tris-Baz 500 ml distile su ile manyetik karıştırıcı ile çözdürülür. pH 8'e yapıldıktan sonra distile su ile toplam hacim 1000 ml yapılır. Hazırlanan 10X TBS kullanılmak üzere 1X TBS'e çevrilir. Çevirmek için; 100 ml 10X TBS mezür ile ölçülür, üzerine 900 ml distile su eklenerek 1X TBS'e dönüştürülür.
1X TBS-Tween-20	1X TBS-Tween-20 için; ilk olarak 10X TBS yukarıda anlatıldığı şekilde 1X TBS'e dönüştürülür. 1X TBS'e %10 olacak şekilde Tween-20 eklenir ve distile su ile toplam hacim ayarlanır.
10X PBS	80 gr NaCl, 2 gr KCl, 14.4 gr Na ₂ HPO ₄ , 2.4 gr KH ₂ PO ₄ hassas terazi ile tartılır. 500 ml distile su ile manyetik karıştırıcıda resüspanse edilir. pH metre yardımıyla pH 7,4 e ayarlandıktan sonra toplam hacim distile su ile 1000 ml 'e tamamlanır. Hazırlanan 10X PBS kullanılmak için 1X PBS'e dönüştürülür. Bunun içinde 100 ml 10X PBS alınarak 900 ml distile su 1000 ml'e tamamlanarak 1X PBS'e dönüştürülür.
Hücre Besiyeri	500 ml negatif besiyeri içerisine 50 ml fetal sığır serumu (FBS) ve 5 ml Penisilin-Streptomisin (10,000

	U/ml) eklenir. 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek kullanılır.
Protein Standardı (Bovine Serum Albumin = BSA)	0,015 gr Albumin hassas terazi ile tartılır. 10 ml distile su ile resüspanse edilerek. 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek kullanım için hazırlanır.
Bradford Reagent	100 mg Comassie Brilliant Blue (6-250) terazi yardımıyla tartılır. 50 ml %95 etanol de çözdürülür. 100 ml %85 Fosforik asit eklenir. Çözelti 1 litreye tamamlanarak 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek kullanıma hazırlanır.
Hücre Lizis Tamponu (CLB)	1 adet tablet Proteinaz inhibitörü 10 ml memeli protein ekstraksiyon reaktifi (M-PER) ile resüspanse hale getirilerek hazırlanır.
Mild Strip Tamponu	15 gr glisin, 1 gr SDS terazi ile tartılır 500 ml distile su ile manyetik karıştırıcı yardımıyla resüspanse hale getirilerek 10 ml Tween-20 eklenir. pH metre yardımıyla pH 2,2'e ayarlanır ve toplam hacim 1000 ml tamamlanır.
% 10 Ammonium Persulphate Solution (APS)	100 mg Ammonium persulfate 1 ml distile suda mikro pipet yardımıyla resüspanse hale getirilerek hazırlanır.
Coumaric Asit (CA)	0,15 gr P-Coumaric asit 10 ml dimetilsülfoksit (DMSO)'da çözdürülür.
Luminol	0,44 gr Luminol 10 ml dimetilsülfoksit (DMSO)'da çözdürülür.
10X Yürütme Tamponu	30,3 gr Tris-baz, 114 gr Glisin ve 1 gr Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) terazide tartılarak 500 ml distile su içinde çözdürülür. pH metre ile pH: 8.3 e ayarlanır ve toplam hacim 1000ml'e tamamlanır. Hazırlanan 10X yürütme tamponu kullanılmak için 1X yürütme tamponuna dönüştürülür. 100 ml 10X yürütme tamponu ve 900 ml

	distile suyla 1000 ml'e tamamlanarak 1X'e dönüştürülür.
10X Transfer Tamponu	33,3 gr Tris-baz ve 144 gr Glisin terazi ile tartılarak 500 ml distile su içinde manyetik karıştırıcı yardımıyla resüspanse hale getirilir. pH metre ile pH: 8.3 e ayarlanır. 10X transfer tamponu 1X transfer tamponuna dönüştürülerek kullanılır. 100 ml 10X transfer tamponu, 150 ml metanol ve 750 ml distile suyla toplam hacim 1000 ml e tamamlanarak 1X'e dönüştürülür.
Hücre Dondurma Medyası	45 ml FBS ve 5 ml dimetilsülfoksit (DMSO) karıştırılır. 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek kullanıma hazır hale getirilir.

Tablo 5.5 4X Laemmlı Tamponu İçeriği

Tris Baz (1.0 M, pH 6.8)	10 ml
SDS	4.0 g
Gliserol	20 ml
β-Merkaptoetanol	10 ml
Bromofenol Mavisi	0.1 g
Distile Su	50 ml'e tamamlanır.

Tablo 5.6 Kemiluminesans Görüntüleme Tamponları İçeriği

	A Tamponu	B Tamponu
Distile Su	9 ml	9 ml
Tris-Baz pH:8,5	1 ml	1 ml
Coumaric Asit	75 µl	-
Luminol	150 µl	-
H ₂ O ₂	-	15µl

Tablo 5.7 %12 (v/v) Poliakrilamid Jel İçeriği

	Üst Jel (%4)	Alt Jel (%12)
Distile su	1,5 ml	3,4 ml
1,5 M Tris-HCl, pH: 8,8	-	2,5 ml
0,5 M Tris-HCl, pH: 6,8	0,625 ml	-
%10 SDS	0,025 ml	0,1 ml
Akrilamid/Bis-Akrilamid (%30, %0,8 w/v)	0,335 ml	4 ml
Amonyum Persulfat (APS) (%10)	50 µl	80 µl
TEMED	5 µl	10 µl

Tablo 5.8 İmmünoflöresan (IF) Kullanılan Kimyasallar İçeriği

PBB solüsyonu	Bloklama solüsyonu	Triton X-100 solüsyonu
0,1g BSA 20ml 1X PBS	0,1g BSA 5ml 1X PBS	%0,1 Triton X-100 1X PBS

ÖZGEÇMİŞ

1. **Adı Soyadı:** Zeynep Elif APAYDIN



İletişim Bilgileri:

Adres: İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, MOBİGEN 34156 Bakırköy-İstanbul

Telefon: +90 546 261 24 60

E-posta: zeynepapaydin93@gmail.com

2. **Doğum Tarihi:** 01.03.1993

3. **Ünvanı:** Yüksek Lisans Öğrencisi

4. **Öğrenim Durumu:**

Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi, Türkiye	2012-2017
Ön Lisans	Sağlık Kurumları İşletmeciliği	İstanbul Üniversitesi, Türkiye	2017-2021
Yüksek Lisans	Moleküler Biyoloji ve Genetik	İstanbul Kültür Üniversitesi, Türkiye	2018-2020

5. **Yönetilen Lisans ve Yüksek Lisans Tezleri**

5.1 Yüksek Lisans Tezi

“Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon (GHRH) 1-29 özgü aptamerlerin sentezlenmesi karakterizasyonu ve anti-karsinojenik etkilerinin araştırılması” İstanbul Kültür Üniversitesi, Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN.

6. Ulusal ve Uluslararası Projeler

1. “SELEX Yöntemi ile Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon (GHRH) Sinyalini Engelleyen Aptamerlerin Sentezi, Karakterize Edilmesi, Anti-Proliferatif, Anti-Karsinojenik Etkisinin Prostat, Meme, Kolon ve Servikal Kanseri Hücrelerinde İrdelenmesi” (TÜBİTAK 1001 Projesi, Proje numarası: 117Z254, 2018-2020, Bursiyer)

7. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

1. **Zeynep-Elif APAYDIN**, Ulku GUNGOR, Burcu AYHAN-SAHIN, Pinar OBAKAN-YERLIKAYA, Elif-Damla ARISAN, Ajda COKER-GURKAN “Triptolide-Mediated Apoptotic Cell Death Accelerated by Metformin co-treatment in Miapaca-2 Cells” Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings, 40.1 (2019): 13. doi:10.3390/proceedings2019040013
2. **Zeynep-Elif APAYDIN**, Ayten UÇAR, Güneş KİBAR, Pinar OBAKAN-YERLIKAYA, Elif-Damla ARISAN, Ajda ÇOKER-GÜRKAN “Detection of Valine-Glutamic Acid Alteration via FAM-Labelled Probe and Streptavidin-Conjugated Magnetic Particule In Pregnant Sickle Cell Anemia Patients cffDNA” Uluslararası Biyoteknoloji Kongresi Bildiri Kitabı, Osmanlı Külliyesi Kongre Merkezi, 5-7 Mart 2020, İstanbul-Türkiye
3. **Zeynep-Elif APAYDIN**, Burcu AYHAN-SAHIN, Ajda COKER-GURKAN, Pinar OBAKAN-YERLIKAYA, Elif-Damla ARISAN “Synthesis and Characterization of X-Aptamers Against Growth Hormone Releasing Hormone (1-29) Peptide and Investigate Their Apoptotic Effect on MIA PaCa-2, HT29 and PC3 Cells” 17th International Conference on Cancer Research proceeding book, June 15-16, 2020, Webinar

8. Çalışma ve Araştırma Deneyimleri

1. 06.2015-07.2015 Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi, Kayseri-Türkiye, Yaz Stajı.
2. 06.2016-07.2016 Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU, Ankara-Türkiye, Yaz Stajı.

9. Ödüller ve Burslar

1. TUBİTAK, 1001 Araştırma Projesi, Bursiyer (2018-2020)
2. Zeynep-Elif APAYDIN, Ulku GUNGOR, Burcu AYHAN-SAHIN, Pinar OBAKAN-YERLIKAYA, Elif-Damla ARISAN, Ajda COKER-GURKAN “Triptolide-Mediated Apoptotic Cell Death Accelerated by Metformin co-treatment in Miapaca-2 Cells” Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings, 40.1 (2019): 13. doi:10.3390/proceedings2019040013, En İyi Poster Ödülü

10. Aldığı Sertifikalar

1. Mart 2019, Uluslararası Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, A Kategorisi

11. Katıldığı Bilimsel Kongre/Seminer/Sempozyum ve Bilimsel Toplantılar

1. Second International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İstanbul Teknik Üniversitesi, 22-23 Kasım 2013, İstanbul, Türkiye.
2. 1.st International Forensic Biology & Genetics Congress, Ankara Üniversitesi, 27-28 Kasım 2014, Ankara-Türkiye.
3. 2.Kök Hücre Temelli Tedavilerde Güncel Yaklaşımlar, İstanbul Kültür Üniversitesi, 9 Aralık 2016, İstanbul-Türkiye.
4. 3rd International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy, Erciyes Üniversitesi, 18-20 Aralık 2019, Kayseri-Türkiye
5. International Biotechnology Congress, Ottoman Archive Complex, 5-7 Mart 2020, İstanbul- Türkiye.
6. 17th International Conference on Cancer Research, 15-16 Haziran 2020, Webinar.