

**T.C.  
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**BÜYÜME HORMONU SALGILATICI HORMONA [GHRH (1-44)] ÖZGÜ X-  
APTAMERLERİN SENTEZLENMESİ, KARAKTERİZASYONU VE ANTI-  
KARSİNOJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ  
Burcu AYHAN ŞAHİN**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**MAYIS 2021**

T.C.  
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**BÜYÜME HORMONU SALGILATICI HORMONA [GHRH (1-44)] ÖZGÜ X-  
APTAMERLERİN SENTEZLENMESİ, KARAKTERİZASYONU VE ANTI-  
KARSİNOJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DOKTORA TEZİ**

**Burcu AYHAN ŞAHİN**

**1700000983**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN  
Diğer Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Özge ÇELİK  
Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA  
Prof. Dr. Elif Damla ARISAN (G.T.Ü.)  
Doç. Dr. Betül YILMAZ (M.Ü.)**

**MAYIS 2021**

## ÖNSÖZ

Tez çalışmam ve doktora sürecimde bana her konuda destek ve yol gösterici olan sayın danışman hocam Prof. Dr. Ajda Çoker Gürkan'a üzerimdeki emeğinden ötürü sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Gerek ders sürecimde, gerekse deneysel süreçlerimde kıymetli bilgi birikimlerini benden esirgemeyen, beni her zaman destekleyen değerli hocalarım Prof. Dr. Zeynep Narçin ÜNSAL'a, Prof. Dr. Elif Damla ARISAN'a ve Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA'ya,

Doktoraya başladığım günden itibaren hem laboratuvarında hem de özel hayatımda bana çok büyük emekleri geçen, yaşadığım zorlu dönemlerde her daim yanımda olan çok sevgili arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Özge RENCÜZOĞULLARI'na ve Arş. Gör. Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ'a,

Laboratuvara ve işe girdiğim ilk günden itibaren bana yardımcı olan, birlikte çok güzel zamanlar geçirdiğimiz değerli çalışma arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Alp AYAN'a, Arş. Gör. Sinan MERİÇ'e ve Arş. Gör. Tamer GÜMÜŞ'e,

2 yıl boyunca laboratuvarında birlikte çalıştığım, her zaman desteğine ihtiyaç duyduğum, en zor zamanlarımdaki en büyük desteğim canım Zeynep Elif APAYDIN'a,

Birlikte çok az çalışma fırsatımız olmasına rağmen uyum içinde çalıştığımız sevgili İlayda SÖNMEZ'e,

Bu çalışmayı gerçekleştirebilmem için çok büyük fedakarlıklarda bulunan, her konuda her zaman elini omzumda hissettiğim sevgili eşim Batuhan ŞAHİN'e, bana anneliği ilk kez tattıran, hayatımı değiştiren, kıymetlim Naz ŞAHİN'e ve gelişiyile mutluluğumuza mutluluk katan, bu tez için belki de bilmeden en büyük fedakarlığı yapan pamuğum Can ŞAHİN'e,

35 yıldır, hayatımın her alanında her anında yargılamadan sorgulamadan bana destek olan, canımdan öte bir tanecik annem Saniye AYHAN'a, hayatın bana sunduğu en büyük nimetlerden olan, varlığına her zaman minnet duyduğum canım kardeşim İshak Burak AYHAN'a, bana kan bağı olmadan da bir insanın en az kardeşin kadar sevebileceğini gösteren sevgili kardeşim Elif ŞENGÜL AYHAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Fiziken yanımda olamasa da, öğrettiği fikir ve davranışları sayesinde varlığımı her daim hissettiğim, eğitim hayatım boyunca en büyük destekçim olan ve beni daima izlediğine inandığım kıymetli babam Fehmi AYHAN'a sonsuz teşekkür ediyor ve bu tezi kendisine ithaf ediyorum.

Bu tez çalışması, 117Z254 numaralı TÜBİTAK 1001 projesi desteği ile gerçekleşmiştir. Bu kapsamda desteğinden dolayı TÜBİTAK'a ve deneylerimi gerçekleştirdiğim İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümüne teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
KISALTMALAR .....	vi
SİMGE LİSTESİ.....	x
TABLO LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
TÜRKÇE ÖZET .....	xvi
YABANCI DİL ÖZET .....	xviii
<b>1 GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
1.1 GİRİŞ .....	1
1.2 AMAÇ.....	3
<b>2 GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>4</b>
2.1 KANSER.....	4
2.2 KANSER EPİDEMİYOLOJİSİ.....	5
2.3 KANSER TEDAVİ STRATEJİLERİ.....	6
2.4 KANSER VE BÜYÜME FAKTÖRLERİ.....	8
2.5 KANSER VE BÜYÜME HORMONU SALGILATICI HORMON.....	10
2.6 BÜYÜME HORMONU SALGILATICI HORMON .....	11
2.7 GHRH SİNYAL YOLAĞI .....	14
2.8 GHRH AGONİSTLERİ.....	16
2.9 GHRH ANTAGONİSTLERİ.....	17
2.10 APTAMER.....	21
2.11 APTAMERLERİN KULLANIM ALANLARI.....	23
2.11.1 İlaç Taşıyıcılığı.....	24
2.11.2 Moleküler Görüntüleme .....	24
2.11.3 Deteksiyon .....	25
2.11.4 Biyosensörler .....	25
2.11.5 Yeni İlaç Geliştirilmesi .....	25
2.12 SELEX .....	26
2.13 SELEX TİPLERİ .....	27
2.13.1 Membran-Temelli SELEX.....	27
2.13.2 Kapiler Elektroferez-Temelli SELEX.....	27
2.13.3 Hücre-SELEX .....	28
2.13.4 Afinite Kromatografisi-Temelli SELEX.....	29

2.13.5	Manyetik Boncuk-Temelli Selex .....	30
2.14	APOPTOZ.....	30
2.14.1	Ekstrinsik Yolak.....	32
2.14.2	İntrinsik Yolak .....	33
<b>3</b>	<b>MATERYAL VE METOT .....</b>	<b>35</b>
3.1	KULLANILAN MATERYALLER .....	35
3.1.1	Kullanılan Cihazlar .....	35
3.1.2	Hücre Kültürü Donanımları .....	35
3.1.3	Kullanılan Kimyasallar .....	35
3.1.4	Kullanılan Tamponlar .....	35
3.2	YÖNTEMLER .....	35
3.2.1	Bakteri Total Protein Lizatı Elde Edilmesi ve İnklüzyon Cisimciklerinin Çözünür Hale Getirilmesi .....	35
3.2.2	His-GHRH proteinin saflaştırılması.....	36
3.2.3	Memeli Hücrelerden Protein İzolasyonu .....	37
3.2.4	Bradford Protein Miktar Tayini Yöntemi .....	37
3.2.5	İmmunoblotlama .....	38
3.2.5.1	SDS-Poliakrilamid Jelin Hazırlanması .....	38
3.2.5.2	Protein Örneklerinin Hazırlanması ve SDS-Poliakrilamid Jele Yüklenmesi .....	38
3.2.5.3	Proteinlerin Membrana Transfer Edilmesi ve Bloklama .....	38
3.2.5.4	Membrana Antikor Uygulaması ve Görüntü Alınması.....	39
3.2.5.5	Membranların striplenmesi .....	39
3.2.6	Memeli Hücrelere Transfeksiyon.....	39
3.2.7	RNA izolasyonu, cDNA, qRT-PCR.....	40
3.2.8	GHRH ELISA yöntemi .....	41
3.2.9	Hücre Sağkalım Analizi .....	41
3.2.10	Kristal Viyole Koloni Formasyon Deneyi .....	41
3.2.11	Yarı Yumuşak Agar Koloni Formasyon Deneyi.....	42
3.2.12	X-aptamer seçilimi .....	42
3.2.12.1	X-Aptamer Kütüphanesinin Hazırlanması.....	42
3.2.12.2	Negatif Seçilim.....	42
3.2.12.3	Hedef Proteinin Manyetik Boncuklarla Birleştirilmesi.....	43
3.2.12.4	Pozitif Birincil Seçilim.....	43
3.2.12.5	Putatif Aptamerlerin Kesilmesi.....	43
3.2.12.6	Spin Kolon Tampon Değişimi .....	44
3.2.12.7	İkincil seçilim.....	44

3.2.12.8	PZR ve Jel Analizi .....	44
3.2.12.9	İlave Başlangıç Havuzu PZR .....	45
3.2.12.10	GHRH'ye özgü X-aptamer adaylarının dizilerinin belirlenmesi ve sentezlenmesi .....	45
3.2.13	Dot blot yöntemi .....	45
3.2.14	Hücre Kültürü.....	46
3.2.15	MTT Hücre Canlılığı testi.....	46
3.2.16	Floresan Boyama (DAPI-PI-DiOC <sub>6</sub> ).....	46
3.2.16.1	DAPI Boyama .....	46
3.2.16.2	PI Boyama.....	46
3.2.16.3	DiOC <sub>6</sub> Boyama .....	47
3.2.17	Hücre Döngüsü Analizi.....	47
3.2.18	Annexin V-FITC / PI Apoptoz Testi.....	47
3.2.19	cAMP Analizi .....	47
3.2.20	Ca <sup>+2</sup> Green Boyaması.....	48
3.2.21	İmmunofloresan (IF) yöntemi.....	48
3.2.22	Biotin-Steptavidin bağlanma affinitesinin immunofloresan boyama ile gösterilmesi .....	49
3.2.23	Aptamer-GHRH bağlanma afinitesinin immunofloresan boyama ile gösterilmesi .....	50
3.2.24	Aptamerlerin serum stabilitesinin gösterilmesi.....	50
3.2.25	Yüzey Plazmon Rezonansı (Surface Plasmon Resonance, SPR) yöntemi ile aptamerlerin bağlanma afinitelerinin belirlenmesi .....	51
3.2.26	Aptamerlerin Reaktif Oksijen Türleri oluşumuna etkisinin belirlenmesi .....	51
3.2.27	Asılı damla modeline göre aptamerlerin koloni çaplarına etkisinin belirlenmesi .....	51
3.2.28	İstatistiksel analiz .....	51
<b>4</b>	<b>SONUÇLAR .....</b>	<b>53</b>
4.1	Aptamer Sentezi İçin Hedef Proteinin Bakteriyel Kaynaktan Elde Edilmesi 53	
4.2	Aptamer Sentezi İçin Hedef Proteinin Bakteriyel Kaynaktan Elde Edilmesi 55	
4.3	X-Aptamer Seçilimi .....	59
4.4	Aday X-Aptamerlerin Olası İki Boyutlu Yapılarının Belirlenmesi .....	62
4.5	Aday X-Aptamerlerin Hedef Proteine Bağlanma Afinitelerinin Dot Blot Yöntemi ile Gösterilmesi .....	63
4.6	Aday X-Aptamerlerin Hedef Proteine Bağlanma Afinitelerinin SPR Yöntemi ile Gösterilmesi .....	70
4.7	Aday X-Aptamerlerin Serum Stabilitesinin Belirlenmesi.....	70

4.8	Farklı Kanser Hücrelerinin Endojen GHRH Ekspresyonlarının Belirlenmesi .....	72
4.9	Aday X-Aptamerlerin Endojen GHRH Ligandına Bağlanma Afinitesinin İmmunofloresan Yöntemi ile Gösterilmesi.....	73
4.10	Aday X-Aptamerlerin GHRH Sinyal Yolağı Elemanlarına Etkisinin Belirlenmesi .....	76
4.11	Aday X-Aptamer Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi .....	80
4.12	Aday X-Aptamerlerin Reaktif Oksijen Türleri Oluşumuna Etkilerinin Araştırılması.....	84
4.13	Aday X-Aptamerlerin Hücre Döngüsü Üzerine Etkilerinin Araştırılması.	85
4.14	Aday X-Aptamerlerin Apoptotik Etkilerinin Gösterilmesi.....	88
<b>5</b>	<b>TARTIŞMA .....</b>	<b>92</b>
	<b>KAYNAKÇA .....</b>	<b>103</b>
	<b>EKLER.....</b>	<b>117</b>

## KISALTMALAR

<b>GLOBOCAN:</b>	The Global Cancer Observatory (Global Kanser Gözlemevi)
<b>GH</b>	: Büyüme Hormonu
<b>GHR</b>	: Büyüme Hormonu Reseptörü
<b>GHRH</b>	: Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon
<b>GHRHR</b>	: Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon Reseptörü
<b>Ca<sup>+2</sup></b>	: Kalsiyum (+2) yüklü iyonu
<b>cAMP</b>	: Siklik Adenozin Mono Fosfat
<b>mRNA</b>	: Mesajcı Ribonükleik Asit
<b>5-FU</b>	: 5-Florourasil
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>PZR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>SELEX</b>	: Ekspansiyel Zenginleştirme ile Sistemik Ligand Geliştirme
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>VEGF</b>	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
<b>BH3</b>	: Bcl-2 Homoloji 3
<b>CSF-1</b>	: Koloni Uyarıcı Faktör-1
<b>EGF</b>	: Epidermal Büyüme Faktörü
<b>FGF</b>	: Fibroblast Büyüme Faktörü
<b>HB-EGF</b>	: Heparine Bağlanan EGF
<b>NRG</b>	: Nöregulin
<b>TGF</b>	: Transforme edici Büyüme Faktör
<b>IGF-1</b>	: İnsülin-benzeri Büyüme Faktörü-1
<b>SV1</b>	: Splays Varyant 1
<b>cDNA</b>	: Komplementer DNA
<b>Gs</b>	: Uyarıcı G proteini
<b>GTP</b>	: Guanozin trifosfat
<b>GDP</b>	: Guanozin difosfat
<b>PKA</b>	: Protein Kinaz A
<b>CREB</b>	: cAMP Cevap Elementi Bağlanma Proteini
<b>PLC/IP</b>	: Fosfolipaz C/ İnositol Fosfat
<b>NO</b>	: Nitrik Oksit
<b>cGMP</b>	: Siklik Guanozin Monofosfat
<b>MAPK</b>	: Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz

<b>ERK</b>	: Ekstraselüler sinyalle düzenlenen kinaz
<b>JAK2</b>	: Janus Kinaz 2
<b>STAT3</b>	: Transkripsiyonun Sinyal İletici ve Aktivatörü 3
<b>Arg</b>	: Arjinin
<b>Tyr</b>	: Tirozin
<b>Dat</b>	: Desaminotirozin
<b>Agm</b>	: Agmatin
<b>Orn</b>	: Ornitin
<b>Ser</b>	: Serin
<b>AMPK</b>	: AMP ile Aktive olan Kinaz
<b>mTOR</b>	: Rapamisinin Memeli Hedefi
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	: Tümör Nekroz Faktörü- $\alpha$
<b>Abu</b>	: $\alpha$ -aminobutirik asit
<b>Ac</b>	: Asetil
<b>Har</b>	: Homoarjinin
<b>Ibu</b>	: İzobutiril
<b>Nle</b>	: Norlösin
<b>PhAc</b>	: Fenilasetil
<b>Tyr(Me)</b>	: O-metiltirozin
<b>Amp</b>	: Para-amidino-fenilalanin
<b>Tyr(Et)</b>	: O-etiltirozin
<b>MMP2</b>	: Matriks Metalloproteinaz 2
<b>Ada</b>	: 12-aminododekanoil
<b>Aoc</b>	: 8-aminooktanoik asit
<b>Cpa</b>	: 4-kloro-Phe
<b>Dca</b>	: Dodekanoil
<b>Fpa5</b>	: Pentafloro-Phe
<b>Me-Ala</b>	: N-metil Ala
<b>HIV</b>	: İnsan İmmünyetmezlik Virüsü
<b>PEG</b>	: Polietilenglikol
<b>Ome</b>	: O-metilasyon
<b>LNA</b>	: Kilitli nükleik asit
<b>PSMA</b>	: Prostat-spesifik membran antijeni
<b>GAPDH</b>	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
<b>siRNA</b>	: Küçük interferans RNA

<b>His</b>	: Histidin
<b>ELISA</b>	: Enzime-bağlı immunosorbent testi
<b>PSA</b>	: Prostat-spesifik antijen
<b>AMD</b>	: Yaş bağlı maküler dejenerasyon
<b>FDA</b>	: Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>AML</b>	: Akut myeloid lösemi
<b>HGF</b>	: Hepatosit büyüme faktörü
<b>PDGF</b>	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
<b>IgE</b>	: İmmunoglobulin E
<b>GST</b>	: Glutasyon S-transferaz
<b>Mg<sup>+2</sup></b>	: Magnezyum (+2) yüklü iyonu
<b>TRAIL</b>	: TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand
<b>FADD</b>	: Fas-ilişkili ölüm domeyni
<b>TRADD</b>	: TNF reseptör-ilişkili ölüm domeyni
<b>DED</b>	: Ölüm efektör domeyni
<b>DISC</b>	: Ölüm-indükleyici sinyalizasyon kompleksi
<b>Bcl-2</b>	: B hücresi lenfoma-2
<b>AIF</b>	: Apoptoz-indükleyici faktör
<b>Apaf-1</b>	: Apoptoz proteaz aktive eden faktör-1
<b>PARP</b>	: Poli-(ADP-Riboz) polimeraz
<b>LB</b>	: Luria-Bertani
<b>dk</b>	: Dakika
<b>BSA</b>	: Bovine Serum Albumin
<b>SDS</b>	: Sodyum dodesil sülfat
<b>PAGE</b>	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>PVDF</b>	: Poliviniliden florid
<b>TBS-T</b>	: Tris-tamponlu tuz-Tween 20
<b>HRP</b>	: Yabani turp peroksidazı
<b>PBS</b>	: Fosfat-tamponlu tuz
<b>FBS</b>	: Fetal Sığır Serumumu
<b>qRT-PCR</b>	: kantitatif-Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
<b>sn</b>	: Saniye
<b>bp</b>	: Baz çifti
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin tetra asetik asit

<b>DiOC<sub>6</sub></b>	: 3,3'- Diheksiloksakarbosiyenin iyodür
<b>TMB</b>	: Tetrametilbenzidin
<b>ATCC</b>	: Amerikan-tipi kültür koleksiyonu
<b>ECACC</b>	: Onaylanmış hücre kültürleri Avrupa koleksiyonu
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>MTT</b>	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromür
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>DAPI</b>	: 4'6-diamidino-2-fenilindol
<b>PI</b>	: Propidyum iyodür
<b>FITC</b>	: Florosein izotiyosiyanat
<b>IF</b>	: İmmunofloresan
<b>SPR</b>	: Yüzey Plazmon Rezonansı
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>H<sub>2</sub>DCFDA</b>	: 2',7'-diklorodihidrofloresein diasetat
<b>ANOVA</b>	: Varyans analizi
<b>K<sub>a</sub></b>	: Disosiasyon sabiti
<b>PC1</b>	: Proprotein Konvertaz 1

## SİMGE LİSTESİ

<b><math>\alpha</math></b>	: Alfa
<b><math>\beta</math></b>	: Beta
<b><math>\gamma</math></b>	: Gamma
<b><math>^{\circ}\text{C}</math></b>	: Santigrat derece
<b>L</b>	: Litre
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>g</b>	: Yerçekimsel kuvvet
<b>mg</b>	: Miligram
<b><math>\mu</math></b>	: Mikro
<b><math>\mu\text{l}</math></b>	: Mikrolitre
<b><math>\mu\text{g}</math></b>	: Mikrogram
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>%</b>	: Yüzde
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>V</b>	: Volt
<b>A</b>	: Amper
<b>M</b>	: Molar
<b>N</b>	: Normal
<b>nM</b>	: Nanomolar
<b><math>\mu\text{M}</math></b>	: Mikromolar
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>U</b>	: Ünite
<b><math>\mu\text{m}</math></b>	: Mikrometre

## **TABLO LİSTESİ**

<b>Tablo 1. qRT-PZR reaksiyonunda kullanılan primerler:</b> .....	40
<b>Tablo 2. Aday X-aptamerlerin adları ve nükleotid dizileri</b> .....	61
<b>Tablo 3. Kullanılan Cihazların Listesi</b> .....	117
<b>Tablo 4. Kullanılan Hücre Kültürü Donanımları</b> .....	118
<b>Tablo 5. Kullanılan Kimyasalların Listesi</b> .....	119
<b>Tablo 6. Kullanılan Tamponların İçeriği</b> .....	124
<b>Tablo 7. %4-12'lik SDS-Poliakrilamid Jel İçeriği</b> .....	129
<b>Tablo 8. Kemilüminesans Görüntüleme Tampon İçerikleri</b> .....	129
<b>Tablo 9. X-aptamer Seçilim Tamponlarının İçerikleri</b> .....	129



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Dünya genelinde kanser tiplerine göre A. Erkeklerde, B. Kadınlarda, C. Toplam insidans ve mortalite oranları [1] .....	6
Şekil 2.2 Kanser başlıca göstergeleri ve bu göstergelere yönelik hedefli terapi seçeneklerinin gösterilmesi [23] .....	8
Şekil 2.3. Kanser gelişim basamakları ve bu basamaklarda rol alan önemli büyüme faktörleri [22] .....	9
Şekil 2.4. GHRH geninin genomik lokasyonu [54] .....	12
Şekil 2.5. GHRH geninin yapısı. ....	12
Şekil 2.6. Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon Reseptörünün (GHRH-R) şematik yapısı [61] .....	14
Şekil 2.7. GHRH Sinyal Yolağı [6] .....	15
Şekil 2.8. GHRH antagonistleri ve amino asit dizisindeki değişiklikler [76] .....	20
Şekil 2.9. En son sentezlenen MIA serisi GHRH antagonistleri ve amino asit dizisindeki değişiklikler [70] .....	20
Şekil 2.10. Aptamer ve hedef protein etkileşiminin şematik olarak gösterilmesi [90] .....	22
Şekil 2.11. Bir nükleotidin kimyasal yapısı ve olası kimyasal modifikasyon bölgeleri .....	23
Şekil 2.12. Geleneksel aptamer ve Spiegelmer (L-aptamer) şematize edilmesi [91] .....	23
Şekil 2.13. Aptamerlerin kullanım alanları .....	24
Şekil 2.14. Kapiler elektroforez yöntemiyle aptamer seçilimi [14] .....	28
Şekil 2.15. Hücre-SELEX yönteminin şeması [107] .....	29
Şekil 2.16. Afinite Kolonu kullanılarak kütüphaneden aptamer seçilmesi [111] .....	30
Şekil 2.17. Manyetik boncuklar yardımıyla aptamer seçilimi [14] .....	30
Şekil 2.18. Apoptozun ekstrinsik yolağı [117] .....	33
Şekil 2.19. Apoptozun intrinsik yolağı [120] .....	34
Şekil 3.1. pCMV3-SP-N-His-NCV Negatif kontrol vektörünün şeması .....	36
Şekil 3.2. pCMV3-SP-His-ORF His-GHRH vektörünün şeması .....	36
Şekil 4.1. Bakteriyel klonlarda GHRH protein ifadesinin immunoblotlama ile gösterilmesi A. GHRH immunoblotlama görüntüsü B. Membrana transfer sonrası jelin Coomassie Brilliant Blue boyası ile boyanması .....	53
Şekil 4.2. Yüksek hacimli bakteriden izole edilen total protein örneklerinde GHRH protein varlığının gösterilmesi .....	54
Şekil 4.3. Saflaştırılan His-GHRH proteininin varlığının immunoblotlama ile gösterilmesi .....	55
Şekil 4.4. His ve His-GHRH transfekte edilen HEK293 kolonilerinde GHRH anlatımının immunofloresan yöntemi ile gösterilmesi .....	56
Şekil 4.5. His-GHRH vektörü transfekte edilen hücrelerde GHRH anlatımının qRT-PCR ile gösterilmesi (**** p<0,0001) .....	57
Şekil 4.6. His-GHRH vektörü transfekte edilen HEK293 hücrelerindeki A. GHRH protein anlatımının immunoblotlama ile gösterilmesi B. Medyaya salınan GHRH miktarının GHRH ELISA yöntemi ile belirlenmesi (****p<0,0001) .....	58
Şekil 4.7. GHRH ifadesinin artırılmasının HEK293 hücre proliferasyonu, büyümesi ve koloni oluşumuna etkisinin gösterilmesi. A. MTT hücre proliferasyonu yöntemi B. Hücre sağkalm analizi C. Kristal viyole koloni	

formasyonu deneyi D. Yarı yumuşak agar koloni formasyonu deneyi (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).....	59
Şekil 4.8. Prokaryotik His-GHRH hedefine yönelik gerçekleştirilen X-aptamer seçilimi PZR görüntüleri .....	60
Şekil 4.9. Ökaryotik His-GHRH hedefine yönelik gerçekleştirilen X-aptamer seçilimi PZR görüntüleri .....	61
Şekil 4.10. Aday x-aptamerlerin olası iki boyutlu şekilleri.....	62
Şekil 4.11. Aday X-aptamerlerin hedef proteine bağlanma afinitelerinin dot-blot yöntemi ile gösterilmesi (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001).....	64
Şekil 4.12. TKY2.T1.01 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi .....	65
Şekil 4.13. TKY2.T1.02 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi .....	65
Şekil 4.14. TKY2.T1.03 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi .....	65
Şekil 4.15. TKY2.T1.04 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi .....	65
Şekil 4.16. TKY2.T1.05 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi .....	66
Şekil 4.17. TKY2.T1.06 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi .....	66
Şekil 4.18. TKY2.T1.08 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi .....	66
Şekil 4.19. TKY2.T1.11 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi .....	66
Şekil 4.20. TKY2.T1.12 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi .....	67
Şekil 4.21. TKY2.T1.13 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi .....	67
Şekil 4.22. TKY2.T1.15 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi .....	67
Şekil 4.23. TKY2.T1.17 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi .....	67
Şekil 4.24. TKY.T1.01 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi .....	68
Şekil 4.25. TKY.T1.02 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi .....	68
Şekil 4.26. TKY.T1.03 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi .....	68
Şekil 4.27. TKY.T1.04 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi .....	68
Şekil 4.28. TKY.T1.05 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi .....	69
Şekil 4.29. Aday x-aptamerinin hedef protein dozuna bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi .....	69
Şekil 4.30. TKY2.T1.13 aptamerinin doza ve zamana bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin SPR yöntemi ile gösterilmesi .....	70
Şekil 4.31. Aday X-Aptamerlerin Serum Stabilitelerinin Belirlenmesi. ....	71
Şekil 4.32. Hücrelerdeki GHRH ekspresyonunun immunofloresan yöntemi ile gösterilmesi .....	72

Şekil 4.33. Hücrelerdeki GHRH ekspresyonunun immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi (****p<0,0001) .....	73
Şekil 4.34. Hücrelerde medyaya salınan GHRH miktarının ELISA yöntemi ile hesaplanması.....	73
Şekil 4.35. TKY2.T1.08 aptamerinin endojen GHRH ligandına bağlanma afinitesinin immunofloresan yöntemi ile gösterilmesi .....	74
Şekil 4.36. TKY2.T1.08 aptamerinin endojen GHRH ligandına bağlanma afinitesinin immunofloresan yöntemi ile gösterilmesi .....	75
Şekil 4.37. Medyaya salınan GHRH ile aptamerlerin bağlanma afinitesinin gösterilmesi .....	76
Şekil 4.38. Aday X-aptamerlerin GHRH'nin hedefi olan GH ve GHRH-R ekspresyonu üzerine etkisinin immunofloresan yöntemi ile gösterilmesi.....	77
Şekil 4.39. Aptamer uygulamasının hücre içi kalsiyum miktarına etkisinin MIA PaCa-2 hücrelerinde gösterilmesi.....	78
Şekil 4.40. Aptamer uygulamasının hücre içi kalsiyum miktarına etkisinin HT29 hücrelerinde gösterilmesi .....	78
Şekil 4.41. Aptamer uygulamasının hücre içi kalsiyum miktarına etkisinin PC3 hücrelerinde gösterilmesi .....	79
Şekil 4.42. Aptamer uygulamasının hücre içi kalsiyum miktarına etkisinin PNT1a hücrelerinde gösterilmesi.....	79
Şekil 4.43. Aptamer uygulanan MIA PaCa-2 ve HT29 hücrelerinde cAMP seviyelerinin belirlenmesi (****p<0,0001) .....	79
Şekil 4.44. Aday X-aptamerlerin MTT yöntemi ile MIA PaCa-2 hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi .....	80
Şekil 4.45. Aday X-aptamerlerin MTT yöntemi ile HT29 hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi.....	81
Şekil 4.46. X-aptamerlerin MTT yöntemi ile PC3 hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi.....	81
Şekil 4.47. Aday X-aptamerlerin MIA PaCa-2 hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli ve hücre ölümü üzerine etkisinin floresan boyama ile gösterilmesi .....	82
Şekil 4.48. Aday X-aptamerlerin HT29 hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli ve hücre ölümü üzerine etkisinin floresan boyama ile gösterilmesi. 83	
Şekil 4.49. Aday X-aptamerlerin PC3 hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli ve hücre ölümü üzerine etkisinin floresan boyama ile gösterilmesi. 84	
Şekil 4.50. Aday X-aptamerlerin Reaktif Oksijen Türleri oluşumuna etkisinin MIA PaCa-2 hücrelerinde incelenmesi .....	85
Şekil 4.51. Aday X-Aptamerlerin MIA PaCa-2 hücrelerinde Hücre Döngüsü Üzerine Etkilerinin Propidyum İyodür (PI) FACS Yöntemi ile Gösterilmesi ...	86
Şekil 4.52. Aday X-Aptamerlerin HT29 hücrelerinde Hücre Döngüsü Üzerine Etkilerinin Propidyum İyodür (PI) FACS Yöntemi ile Gösterilmesi.....	87
Şekil 4.53. Aday X-Aptamerlerin PC3 hücrelerinde Hücre Döngüsü Üzerine Etkilerinin Propidyum İyodür (PI) FACS Yöntemi ile Gösterilmesi.....	88
Şekil 4.55. Aday X-Aptamerlerin MIA PaCa-2 hücrelerinde Hücre Ölümü Üzerine Etkilerinin Annexin V-Propidyum İyodür (PI) FACS Yöntemi ile Gösterilmesi .....	89
Şekil 4.56. Aday X-Aptamerlerin HT29 hücrelerinde Hücre Ölümü Üzerine Etkilerinin Annexin V-Propidyum İyodür (PI) FACS Yöntemi ile Gösterilmesi .....	90

**Şekil 4.57. Aday X-Aptamerlerin PC3 hücrelerinde Hücre Ölümü Üzerine Etkilerinin Annexin V-Propidyum İyodür (PI) FACS Yöntemi ile Gösterilmesi** ..... 91



## TÜRKÇE ÖZET

Enstitüsü	:	Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Anabilim Dalı	:	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı	:	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı	:	Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN
Tez Türü ve Tarihi	:	Doktora – Mayıs 2021

## KISA ÖZET

### BÜYÜME HORMONU SALGILATICI HORMONA [GHRH (1-44)] ÖZGÜ X-APTAMERLERİN SENTEZLENMESİ, KARAKTERİZASYONU VE ANTİ-KARSİNOJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Burcu AYHAN ŞAHİN

Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon (GHRH), hipotalamustan salınan bir nöropeptittir ve farklı kanser türlerinde ekspresyonunda artış olduğu literatürde ortaya koyulmuştur. Bu artan ekspresyonun bloke edilmesi amacıyla çeşitli peptid antagonistleri sentezlenmiş ve bu antagonistlerin anti-kanser etkisi çeşitli kanser tiplerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir. Bu kapsamda, GHRH sinyalinin bloke edilmesi, çeşitli kanser tiplerinde önemli bir terapötik yaklaşım olarak karşımıza çıkmaktadır. Aptamerler, yüksek özgünlükle hedef moleküllere bağlanabilen tek iplikli oligonükleotidlerdir ve ilaç taşıyıcılığı, görüntüleme, deteksiyon, yeni ilaç geliştirilmesi gibi farklı amaçlarla kullanılabilir. Aptamerler geleneksel olarak SELEX adı verilen bir yöntemle seçilmekle birlikte, hedefe bağlanma afinitesinin ve nükleazlara karşı stabilitesinin artırıldığı manyetik boncuk tabanlı farklı yöntemlerle de elde edilebilmektedir. Bu yöntemlerden bir tanesi olan x-aptamer seçilimi, patentli bir teknik olup modifiye edilmiş nükleotitler içermekte ve bu sayede hedef moleküle bağlanma afinitesi daha yüksek ve nükleazlara karşı stabilitesi daha yüksek olan x-aptamerlerin seçilimi mümkün olmaktadır. Bu tez çalışmasında, GHRH (1-44)'e özgü x-aptamerlerin sentezlenmesi, karakterizasyonu ve GHRH sinyalini bloke ederek çeşitli kanser hücrelerindeki anti-karsinojenik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, GHRH gen bölgesini taşıyan plazmidleri içeren prokaryotik *E. coli* ve ökaryotik HEK293 hücrelerinden elde edilen GHRH proteini hedef olarak kullanılarak, manyetik boncuk teknolojisi yardımıyla x-aptamer seçilimi gerçekleştirilmiş ve 19 adet putatif x-aptamer elde edilmiştir. Elde edilen x-aptamerlerin rekombinant GHRH proteinine bağlanma afiniteleri Dot blot yöntemi ile araştırılmış ve aptamer uygulaması ile proteine bağlanma afinitesinin 1,5 ila 4 kata kadar arttığı belirlenmiştir. Ayrıca aptamer dozuna bağlı gerçekleştirilen Dot blot yöntemi sonucunda non-lineer regresyon analizi yapılarak aptamerlerin disosiasyon sabiti (Kd) değerleri hesaplanmıştır. TKY2.T1.13 aptameri ile gerçekleştirilen SPR analizi sonucunda bu aptamer için Kd değeri 47,5 nM olarak tespit edilmiş ve non-lineer regresyon analizi ile elde edilen 57,5 nM Kd değerine yakın bir değer olarak gösterilmiştir. Aptamerler süreye bağlı olarak insan serumu ile muamele edilerek aptamerlerin serum stabilitesi araştırılmış ve aptamerlerin çoğunlukla 72 saate kadar insan serumunda %50'nin üzerinde stabil kaldığı belirlenmiştir. TKY2.T1.08 ve

TKY2.T1.13 aptamerlerinin hücre içerisinde yer alan endojen GHRH'ye doza bağı olarak artan bağlanma afinitesi MIA PaCa-2 hücrelerinde immunofloresan yöntemi ile gösterilmiştir. Putatif x-aptamerlerin GHRH sinyal yolağına etkisinin araştırılması için aşağı yolak elemanları olan GH ve GHRH-R ekspresyonuna etkileri immunofloresan yöntemi ile gösterilmiş ve aptamer uygulaması ile bu proteinlerin ekspresyonlarındaki azalma gösterilmiştir. Ayrıca, TKY2.T1.08 ve TKY2.T1.13 x-aptamerlerinin MIA PaCa-2 pankreas, HT29 kolorektal ve PC3 prostat kanseri hücrelerinde hücre canlılığına ket vurduğu ve mitokondriyal membran potansiyelini düşürdüğü belirlenmiştir. Putatif x-aptamerlerin hücre döngüsü üzerine etkileri araştırıldığında ise TKY2.T1.13 aptamerinin MIA PaCa-2, HT29 ve PC3 hücrelerinde SubG1 popülasyonunu arttırdığı, TKY2.T1.08 aptamerinin ise HT29 ve PC3 hücrelerinde G2/M popülasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Putatif x-aptamerlerin hücre ölümü üzerine etkileri Annexin V/PI hücre akış sitometrisi yöntemi ile araştırılmış ve TKY2.T1.13 x-aptamerinin MIA PaCa-2, HT29 ve PC3 hücrelerinde geç apoptotik hücre popülasyonunda artışa neden olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında GHRH (1-44) proteinine özgü x-aptamer sentezi ilk kez gerçekleştirilmiş, sentezlenen x-aptamerlerin hedef proteine bağlanma afiniteleri gösterilmiş ve GHRH sinyal yolağına ket vurarak antikarsinojenik etkileri MIA PaCa-2, HT29 ve PC3 hücrelerinde gösterilmiştir.

**Anahtar Sözcükler: GHRH, x-aptamer, SELEX, SPR, kanser, anti-karsinojenik etki**

**Bilim Dalı Sayısal Kodu: 20610**

## YABANCI DİL ÖZET

Institute	:	Institute of Graduate Studies
Department	:	Molecular Biology and Genetics
Programme	:	Molecular Biology and Genetics
Supervisor	:	Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN
Degree Awarded and Date	:	Doctorate – May 2021

## ABSTRACT

### SYNTHESIS, CHARACTERISATION AND INVESTIGATION OF ANTI-CARCINOGENIC EFFECTS OF X-APTAMERS AGAINST GROWTH HORMONE RELEASING HORMONE [GHRH (1-44)]

Burcu AYHAN ŞAHİN

Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) is a neuropeptide secreted from hypothalamus and it was stated to be expressed highly in different cancer types. In order to block this increased expression, various peptide antagonists has been synthesized and anti-cancer effects of these antagonists were shown in different cancer types *in vitro* and *in vivo*. In this manner, blockage of GHRH signaling is an important therapeutic approach in various cancers. Aptamers are single-stranded oligonucleotides that can bind target molecules with high specificity and is being used for different purposes such as drug carrier, imaging, detection and new drug development. Aptamers are selected by a method called SELEX conventionally, yet they can be obtained by magnetic bead-based different methods in which target binding affinities and stability against nucleases have been enhanced. One of these methods, x-aptamer selection, is a patented technique which contains modified nucleotides and by this means it is possible to select x-aptamers that have higher target binding affinity and more stability against nucleases. In this thesis study, it was aimed to synthesize and characterize x-aptamers against GHRH (1-44) and investigation of these x-aptamers' GHRH signal blocking and anti-carcinogenic effects in different cancer cell lines. For this purpose, GHRH obtained from prokaryotic *E. coli* and eukaryotic HEK293 which bears plasmids encoding GHRH open reading frame was used as a target, and x-aptamer selection was performed by magnetic bead technology. By this way, 19 putative x-aptamers were selected. Binding affinities of these x-aptamers to recombinant GHRH were searched by Dot blot method and it was shown that binding affinity of aptamers were increased 1.5 to 4-fold by aptamer treatment. Also, dissociation constant (Kd) of x-aptamers were calculated by non-linear regression according to aptamer dose-dependent dot blot method. Kd value of TKY2.T1.13 was detected as 47,5 nM as a result of SPR analysis which is in parallel with Kd value calculated by non-linear regression, 57,5 nM. X-aptamers were treated with human serum in time-dependent manner to investigate the serum stability of x-aptamers and it was shown that x-aptamers were stable more than 50% up to 72 hours in human serum. Increased binding affinity of TKY2.T1.08 and TKY2.T1.13 to intracellular GHRH was demonstrated by immunofluorescence method in MIA PaCa-2 cells. In order to search the effect of putative x-aptamers on GHRH signaling

pathway, the effects on expression of downstream targets GH and GHRH-R was indicated by immunofluorescence method and x-aptamer treatment decreased the expression of these proteins. Besides, TKY2.T1.08 and TKY2.T1.13 x-aptamers were shown to impede cell viability and reduced mitochondrial membrane potential in MIA PaCa-2 pancreatic, HT29 colorectal and PC3 prostate cancer cell lines. When the effects of x-aptamers on cell cycle was investigated, TKY2.T1.13 x-aptamer was increased SubG1 population in MIA PaCa-2, HT29 and PC3 cells while TKY2.T1.08 increased G2/M population in HT29 and PC3 cells. The effects of putative x-aptamers on cell death was searched by Annexin V/PI flow cytometry method and TKY2.T1.13 x-aptamer increased late apoptotic cell population in MIA PaCa-2, HT29 and PC3 cells. In conclusion, within the context of this thesis study, x-aptamers against GHRH (1-44) was selected for the first time, the binding affinity of selected x-aptamers to target has been shown and anti-carcinogenic effects of the x-aptamers via inhibition of GHRH signaling pathway were demonstrated.

**Key Words: GHRH, x-aptamer, SELEX, SPR, cancer, anticarcinogenic effect**

**Science Code: 20610**

# 1 GİRİŞ VE AMAÇ

## 1.1 GİRİŞ

Dünya genelinde, bulaşıcı olmayan hastalıklar global ölümlerin büyük çoğunluğundan sorumludur ve kanser bu ölüm sebeplerinin başında gelmektedir. Global Kanser Gözlemevi (The Global Cancer Observatory, GLOBOCAN) 2018 verilerine göre kanser insidansı ve mortalitesi dünyada hızla artmaktadır [1]. Kanser gelişiminde çevresel faktörler de etkili olsa da kanser hücrelerinin karakteristik özelliği olan kontrolsüz çoğalma ve apoptotik ölümden kaçma gibi özelliklerin bazı büyüme faktörleri ve nöropeptidlerin kontrolü altında olduğu literatürde ifade edilmektedir [2]. Son dönemde hipotalamus kaynaklı endokrin peptidlerin kanser gelişimi görülen dokularda reseptörleriyle birlikte anlatımının varlığı belirlenmiştir. Bu endokrin hormonlardan biri olan büyüme hormonu (Growth Hormone, GH) ve reseptörünün (Growth Hormone Receptor, GHR) meme kanseri doku örneklerinde histopatolojik olarak anlatım profilleri gösterilmiş [3], otokrin GH anlatımı kazandırılan meme kanseri hücrelerinin invazif-metastatik profilinin yüksek olduğu *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile gösterilmiştir [4]. GH sentezlenmesi ve salınması için hipotalamustan salınan Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon (Growth Hormone Releasing Hormone, GHRH), ön hipofiz bezi hücrelerinin yüzeyindeki GHRH reseptörüne (GHRHR) bağlanarak,  $Ca^{+2}$  ve siklik adenzin monofosfat (cAMP) içeren sinyal yollarının aktivasyonu yolu ile GH salınımını uyarmaktadır. GHRH geni üzerinden 108 amino asitlik öncül hormon olarak sentez edilen, posttranslasyonel modifikasyonlar ile 44 amino asit uzunluğunda aktif hormon halini alan GHRH'nin ve reseptörünün (GHRHR) periferik dokularda anlatımının varlığı tespit edilmiştir [5], [6]. Ayrıca prostat, meme, yumurtalık, akciğer, pankreas, lenfoma gibi birçok tümör biyopsi örneği ve hücre hatlarında hem mesajcı RNA (mRNA) hem protein seviyesinde GHRH anlatımı gösterilmiştir [7]. GHRH/GHRHR sinyalizasyonuna ket vurma stratejisi ile GHRH özgü antagonist peptitlerin sentezlenmesi, karakterizasyonu ve anti-karsinojenik etkisi akciğer, meme, prostat, pankreas, kolorektal gibi kanserlerde *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir [8], [9]. Ancak GHRH peptit antagonistlerinin

terapötik etkinliğinin cisplatin, 5-Florourasil (5-FU), docetaxel gibi ilaçlar ile kombine ilaç uygulamaları ile artırılması, *in vivo* ortamlarda GHRH antagonistlerinin peptit özellikleri kaynaklı serum stabilite problemleri terapötik etkinliklerinin azalmasına neden olmaktadır [10]. Aptamerler, kendilerine özgü kararlı üç boyutlu yapı oluşturabilen ve hedef moleküllere yüksek özgünlükte bağlanabilen tek iplikli oligonükleotidler olup, bağlanma kapasitesi, baz eşleşmesi değil, oligonükleotidlerin üç boyutlu konformasyonu sonucu meydana gelmektedir [11]. Aptamerler hedef moleküle bağlanma kapasiteleri bakımından antikordlardan daha yüksek özgüllükte ve affinitede oldukları tespit edilmiş, DNA/RNA bazlı moleküller olarak tespit edilmişlerdir. İlk defa Tuerk ve Gold [12] tarafından aptamerlerin sentezi DNA/RNA kütüphanesinin hedef molekül ile konformasyonel bağlanmasını takiben, hedef moleküle yüksek bağlanma etkinliği gösteren nükleotit dizilerin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması döngüsünün ardı ardına tekrar edilmesi olan Ekspansiyonlu enginleştirme ile Sistemik Ligand Geliştirme (Systemic Evolution of Ligands by Exponential enrichment, SELEX) tekniği ile sentez edilmektedir [13]. PZR ile amplifiye edilen hedef moleküle yüksek bağlanma gösteren nükleotid dizilerin klonlanması ve dizi analizi ile tespit edilmesi ile potansiyel aptamerlerin eldesi gerçekleşmektedir. Ancak SELEX döngüsü esnasında gerçekleşen bağlanmaları takiben üretilen aptamerlerin hedefe yüksek bağlanma potansiyeli olmaması kaynaklı olarak farklı tip SELEX metotları teknik açıdan geliştirilmiştir. Hedef moleküle, hedef-kütüphane birleşme sürecine göre membran, kapiler elektroforez, mikrofluidik, manyetik boncuk, hücre SELEX teknikleri geliştirilmiştir [14]. Ayrıca, SELEX aracılı sentez edilen aptamerlerin hedef proteine bağlanma affinitelerinin artırılması, sekonder yapılarının stabiliteilerinin yükseltilmesi amacı ile DNA/RNA aptamerlerinin kimyasal modifikasyonları ile etkinlikleri ve affiniteleri yükseltilmektedir [15]. Bu kapsamda biyoteknoloji firmaları aracılı yeni teknolojiler geliştirilmiştir. Özellikle kit bazlı nükleik asit kütüphanesi ile hedef molekülün buluşma etkinliğini arttırmak üzerine bead bazlı metotlar geliştirilmiştir. Modifiye edilmiş patentli bir teknik olan X-aptamer sentezi ile hedef moleküle bağlanma affinitesi yüksek, modifiye edilmiş nükleotit ile aptamerlerin sekonder yapılarının artırılması sağlanabilmektedir [16].

## 1.2 AMAÇ

Bu tezin amacı, anti-karsinojenik etkiye sahip GHRH antagonist peptitlerine alternatif olarak GHRH özgü aptamerlerin X-aptamer teknoloji ile sentez edilmesi, GHRH bağlanma affinitelerinin belirlenerek, kolon, pankreas, prostat kanseri hücreleri üzerinde anti-proliferatif, anti-karsinojenik etkilerinin gösterilmesidir.



## 2 GENEL BİLGİLER

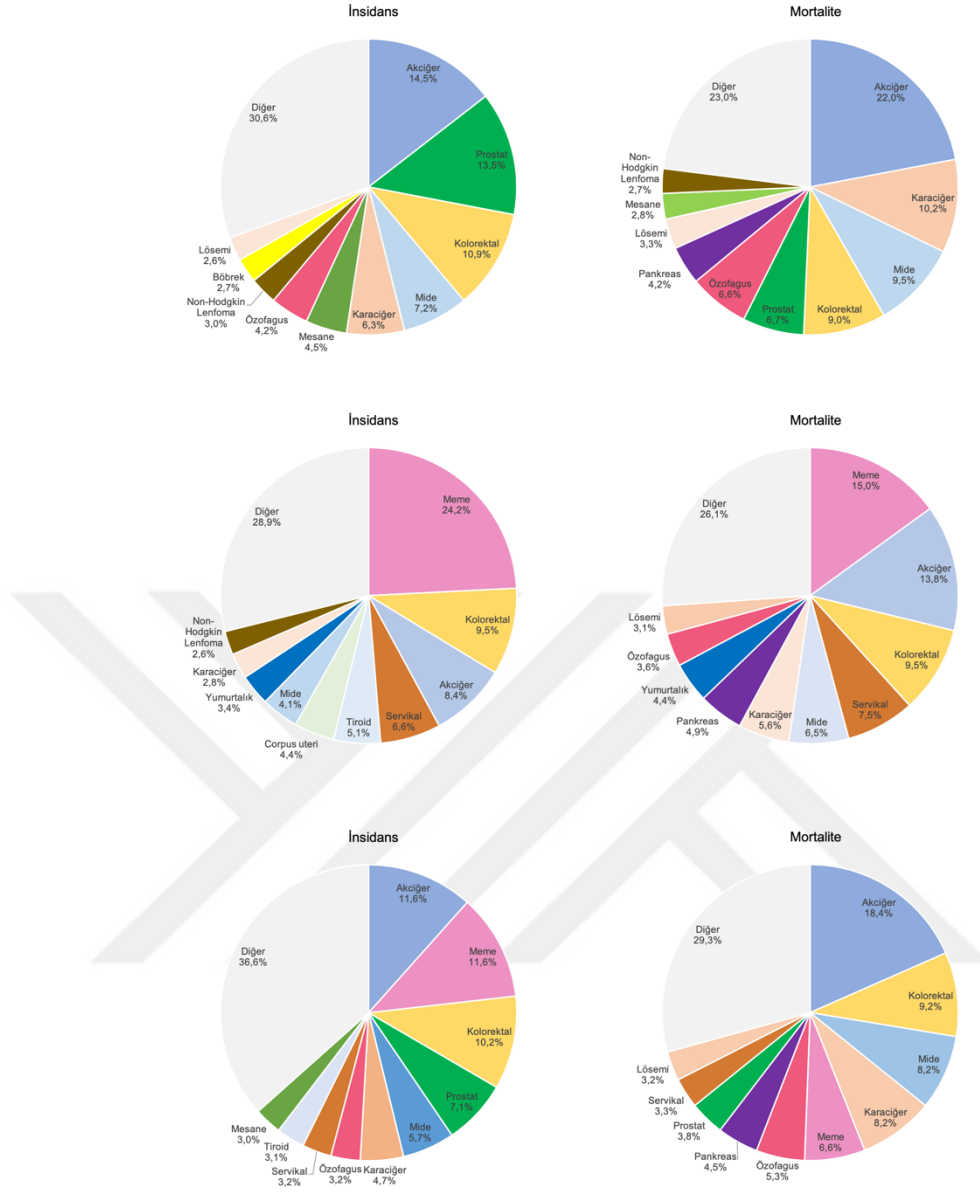
### 2.1 KANSER

İnsan vücudunda yer alan milyonlarca hücre; büyür, bölünür ve sağlıklı hale geldiğinde kendi ölümünü indükler. Bazı durumlarda, çeşitli faktörlerin etkisiyle, sürekli büyüyen anormal hücreler meydana gelebilir [17]. Kanser, vücuttaki birçok organ veya dokuda meydana gelebilen, anormal hücrelerin kontrolsüzce büyümesi ve yayılması ile karakterize edilen hastalıklar grubudur. Yayılma, anormal bir şekilde büyüyen hücrelerin çevre dokulara invazyonu ve diğer organlara dağılması anlamına gelir ve metastaz olarak adlandırılır. Metastaz kontrol altına alınamazsa, kanser kaynaklı ölümün temel sebebi olabilir [18], [19]. Kanser, vücutta çok farklı çeşitteki hücrelerden herhangi birinin anormal proliferasyonu ile oluşabileceği için, karakter olarak birbirinden farklı olan yüzden fazla kanser tipi bulunmaktadır. Birçok kanser, üç ana grupta toplanabilir: karsinomalar, sarkomalar ve lösemiler veya lenfomalar. Karsinomalar epitel kaynaklıdır ve insan kanserlerinin yaklaşık %85-90'lık kısmını oluşturur. Sarkomalar bağ dokunun solid tümörleridir. Lösemiler ve lenfomalar ise kan ve immün sistem hücrelerinden köken alır. Bu grupların içinde de anormal hücrenin köken aldığı doku veya organa göre, akciğer, meme, prostat kanseri gibi ekstra sınıflandırma yapılmaktadır [20]. Kansere neden olan etmenler her tip kanser için tamamen anlaşılmasa da, hastalığın ortaya çıkmasına etki ettiği bilinen pek çok faktör bulunmaktadır. Bu risk faktörlerinin bir kısmı kontrol edilebilir çevresel faktörler iken bir kısmı ise kişi tarafından kontrol edilemeyen genetik ve epigenetik faktörlerdir. Bütün bu risk faktörlerinden biri veya birkaçı, aynı anda veya sırayla etki ederek kanser oluşumu ve gelişimini başlatabilir veya arttırabilir [19]. Kanser oluşumuna katkı sağlayan risk faktörleri arasında radyasyon, tütün ve alkol kullanımı, Ultraviyole (UV) maruziyeti, çeşitli hormonlar, çeşitli virüsler, onkogen veya tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar, yetersiz beslenme, obezite, fiziksel aktivite eksikliği, çeşitli kimyasallar yer almaktadır. Tedavi ise kanser tipine göre öncelik sıralaması değişmekle birlikte kemoterapi, cerrahi operasyon ve radyoterapiyi içermektedir. Katı

(solid) ve ulaşılması nispeten daha kolay olan tümörlerde öncelik cerrahi operasyon iken, lösemi ve lenfomada kemoterapi kullanılmaktadır [17], [20].

## 2.2 KANSER EPİDEMİYOLOJİSİ

Dünya genelinde kanser insidansı ve mortalitesi gün geçtikte artmakta ve bu artışın en büyük nedenlerinden biri olarak, toplumların yaşlanması ve popülasyonların büyümesinin yanı sıra çeşitli teknolojik ve sosyoekonomik değişiklikler nedeniyle risk faktörlerinin dağılımındaki farklılıklar gösterilmektedir [1]. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre, 70 yaş öncesi ölümlerin sebepleri sıralamasında 172 ülkenin 91'inde kanser birinci veya ikinci sırada yer alırken 22 ülkede ise üçüncü veya dördüncü sırada yer almaktadır [19]. Dünya genelinde, erkeklerde görülme sıklığı bakımından ilk sırada akciğer kanseri yer alırken bunu prostat ve kolorektal kanserler izlemektedir. Ölüm oranlarına bakıldığında ise yine akciğer birinci sırada iken karaciğer ve mide kanserleri sırasıyla ikinci ve üçüncü sırada bulunmaktadır. Kadınlarda ise insidans ve mortalite bakımından meme kanseri ilk sırada yer almaktadır. Sıralamayı insidans bakımından kolorektal ve akciğer kanserleri oluştururken, mortalite bakımından akciğer kanseri ikinci sırada kolorektal kanserler de üçüncü sırada yer almaktadır (Şekil 2.1). Global olarak insidans ve ölüm oranlarına bakıldığında her beş erkekten birinin ve her altı kadından birinin hastalığa yakalanacağı, her sekiz erkekten birinin ve her on kadından birinin bu hastalıktan hayatını kaybedeceği öngörülmektedir [1], [19].



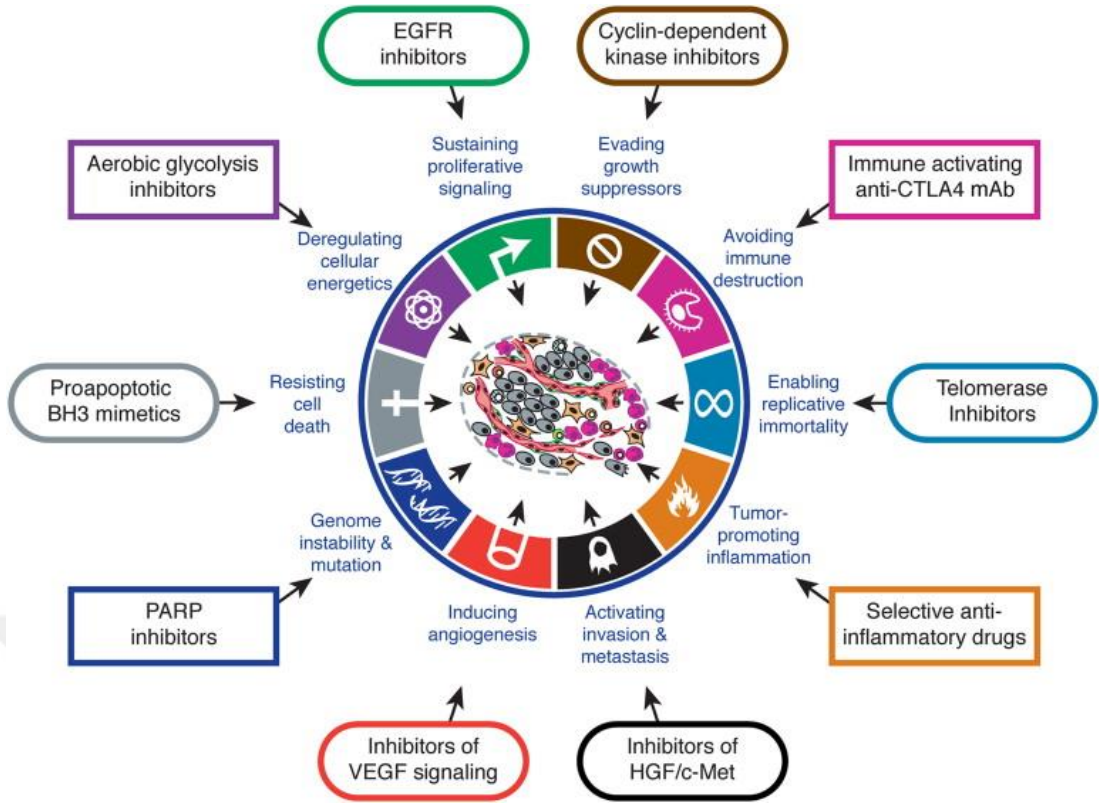
**Şekil 2.1. Dünya genelinde kanser tiplerine göre A. Erkeklerde, B. Kadınlarda, C. Toplam insidans ve mortalite oranları [1]**

### 2.3 KANSER TEDAVİ STRATEJİLERİ

Kanser patogenezi ve moleküler mekanizmaları ile ilgili yıllar boyu yapılan araştırmalar sonucunda, insan kanserlerinin tedavisinde mekanizma temelli hedefli terapilerin kullanılabilirliği ortaya çıkmıştır. Hızla artan sayıdaki hedefli terapi yöntemleri, kanserin bir veya birden fazla göstergesine olan etkilerine göre sınıflandırılabilir. Hedefli terapide kullanılan yöntemlerin verimliliği, belirlenen göstergelerin önemini de doğrulamaktadır. Eğer bir gösterge gerçekten tümör gelişimi için önemli ise, bu göstergenin inhibisyonu tümör büyümesini azaltmalıdır. Ancak,

kanser göstergeleri farklı sinyal yolları tarafından düzenlendiğinden, sadece bir yolağı inhibe eden bir hedefli terapötik ajan hedef aldığı göstergeyi tamamen inaktive edemeyebilir [21]. Bu durumda bazı kanser hücreleri hayatta kalabilir ve bulunduğu şartlarla bulunduğu ortama uyum sağlayabilir, sonuçta nüks gözlenebilir. Bu durumda bu yolların çoğunu veya tamamını hedefleyerek direnç oluşumunu engellemek daha kalıcı bir çözüm elde edilmesini sağlayabilir. Bununla birlikte, kanser hücreleri tedaviye cevap olarak belirli göstergelere bağlılığını azaltıp başka bir gösterdeye daha hale gelerek ilaca karşı direnç geliştirebilir [22].

Kanserin temel göstergeleri Hanahan ve Weinberg tarafından yayınlanmıştır [23]. Bu göstergelere yönelik olarak hedefli terapilerin planlanması, hastalığa özel tedavi stratejilerinin geliştirilmesi bakımından önem arz etmektedir. Bu kapsamda, kanserin en önemli göstergelerinden biri olan proliferatif sinyallerin devam ettirilmesine yönelik olarak büyüme faktörü inhibitörleri kullanılabilir. Büyüme baskılayıcılarından kaçma göstergesine yönelik olarak ise hücre döngüsü regülatörlerinden olan siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri gösterilebilir. Bunların haricinde monoklonal antikorlarla immün sistemin harekete geçirilmesi, telomeraz inhibitörleri kullanılarak replikatif ölümsüzlüğün aşılması, anti-enflamatuar ajanlar yardımıyla enflamasyonun önüne geçilmesi, epitelyal-mezenkimal geçişi teşvik eden proteinlerin inhibitörleri kullanılarak invazyonu ve metastazın engellenmesi, Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF) sinyal inhibitörleri aracılığıyla anjiyojenezin baskılanması, proapoptotik BH3 taklitleri ile apoptozun indüklenmesi, aerobik glikoliz inhibitörleri yoluyla enerji metabolizmasının bozulması kansere ve göstergelerine yönelik hedefli terapilerde kullanılabilecek yöntemler olarak gösterilmektedir (Şekil 2.2) [23].

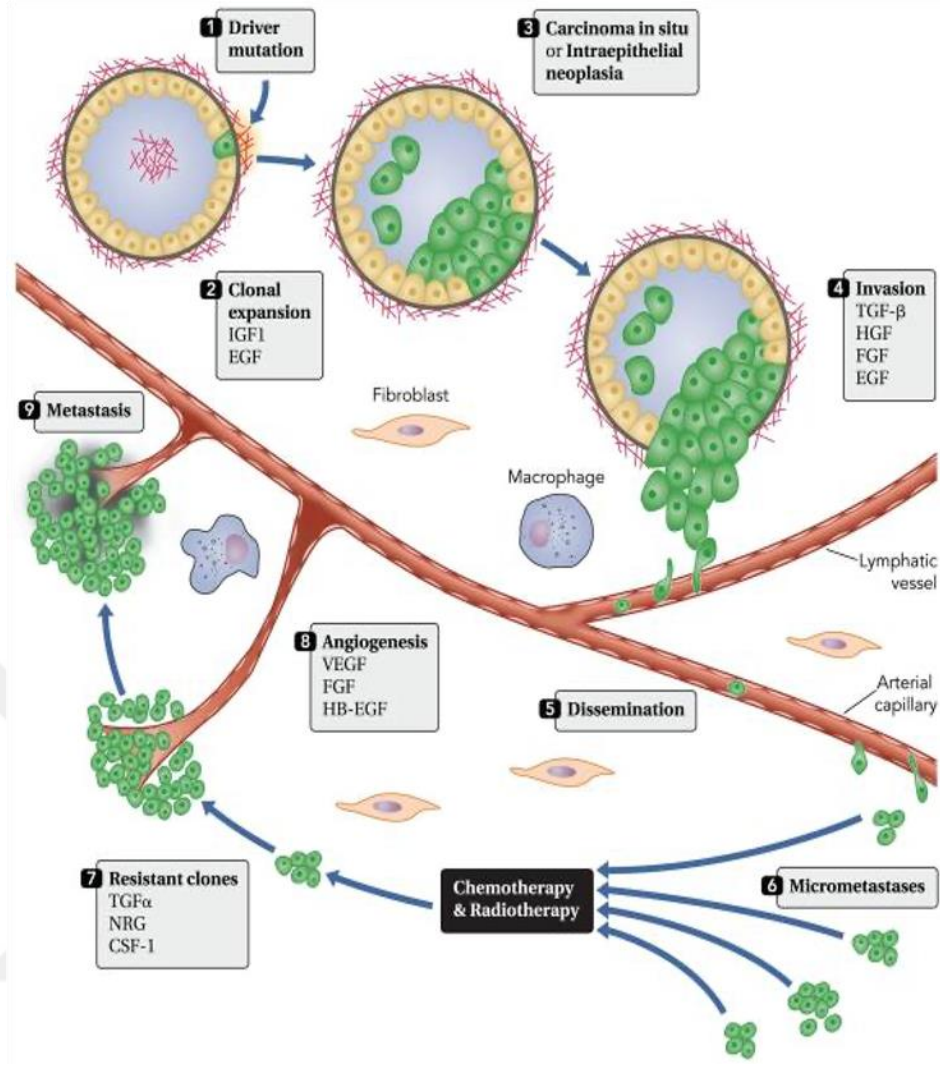


**Şekil 2.2 Kanserın başlıca göstergeleri ve bu göstergelere yönelik hedefli terapi seçeneklerinin gösterilmesi [23]**

## 2.4 KANSER VE BÜYÜME FAKTÖRLERİ

1954 yılında, civciv embriyolarına aktarılan sarkoma hücrelerini sinir liflerinin daha hızlı sarmaladığının gözlemlenmesi [24], kanser hücreleri ile sinir uyarıcı bir faktör arasında bir ilişki olabileceği ile ilgili ilk kanıtı oluşturmaktadır. Sonrasında yapılan çalışmalarda ise tümörlerden elde edilen transforme hücrelerin büyüme faktörü salgıladığı ve bu büyüme faktörlerinin tümörlerle ekstraselüler matriks ve stromal hücreler arasındaki etkileşim için aracı moleküller olduğu ortaya çıkarılmıştır [25].

Büyüme faktörleri, kinaz aktivitesi gösteren membran reseptörlerine bağlanarak hücre içi sinyalizasyon yollarını uyararak polipeptidlerdir. Bir hücrede hayatta kalma ve büyüme avantajı sağlayan bir mutasyonun oluşmasıyla başlayan onkogenik transformasyon, tümör gelişimi ve metastatik karsinomalara dönüşüm, çok basamaklı bir süreçtir ve bu sürecin hemen her basamağında büyüme faktörleri önemli görev alırlar (Şekil 2.3) [22].



**Şekil 2.3. Kanser gelişim basamakları ve bu basamaklarda rol alan önemli büyüme faktörleri [22]**

**CSF-1:** Koloni uyarıcı faktör-1; **EGF:** Epidermal büyüme faktörü; **FGF:** Fibroblast büyüme faktörü; **HB-EGF:** Heparin-binding EGF; **NRG:** Nöregulin; **TGF:** Transforme edici büyüme faktörü; **VEGF:** Vasküler endotel büyüme faktörü

Şekil 2.3'te görüldüğü üzere, kanser gelişim süreci, bir hücreye hayatta kalma ve büyüme avantajı sağlayan bir mutasyon ile başlar (1). Mutasyona sahip olan klonun büyümesi ve ilerlemesi epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor, EGF) ve insülin-benzeri büyüme faktörü-1 (insülin-like growth factor 1, IGF-1) gibi büyüme faktörlerinin etkisiyle gerçekleşir ve çoğunlukla lümen içi lezyonlar görülür (2 ve 3). Sonraki basamakta epitelyal polaritenin azalması, mezenkimal fenotipin kazanılması ve proteazların salgılanmasıyla kanser hücreleri hareket etmeye ve komşu dokulara penetre olmaya başlar. İnvazyon (4) olarak bilinen bu basamak, onkogenler, tümör

supresörler ve transforme edici büyüme faktörü (transforming growth factor, TGF), fibroblast büyüme faktörü (fibroblast growth factor, FGF) gibi büyüme faktörleri tarafından kontrol edilir. Daha sonra kanser hücreleri yayılmak için kan ve lenf dolaşımını kullanır, damarlara girer ve çıkar (5). Bu şekilde mikrometastaz yapan hücreler (6) yeni mutasyonlar ve kanser hücrelerinin otokrin olarak ürettikleri koloni uyarıcı faktör-1 (colony stimulating factor-1, CSF-1), nöregulin (neuregulin, NRG) gibi büyüme faktörlerinin etkisiyle kemoterapiye dirençli kolonilerin oluşmasına destek olur (7). Meydana gelen dirençli kolonilerin beslenmesi amacıyla yeni damarlar oluşturulması, anjiyojenez, tümör ve stroma hücrelerinden salgılanan vasküler endotel büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor, VEGF), FGF gibi büyüme faktörleri aracılığıyla gerçekleşir (8). Bu şekilde gelişen makrometastazlar belirli hedef organlara yerleşir [25].

## **2.5 KANSER VE BÜYÜME HORMONU SALGILATICI HORMON**

Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon (Growth Hormone Releasing Hormone, GHRH) peptidi ilk olarak hipotalamus dışında pankreatik bir tümörden izole ve karakterize edilmesine rağmen [6], [26], peptidin kanser oluşumu üzerine etkisi uzun yıllar boyunca çalışılmamış, bunun yerine endokrin etkileri araştırılmıştır [27]. Ancak hem GHRH'nin hipofiz dışında birçok farklı dokuda ekspresyonunun gösterilmesi hem de GHRH antagonistlerinin proliferasyonu inhibe ettiğinin gösterilmesiyle bu peptidin endokrin görevleri dışında farklı görevleri de olduğunu ortaya koymuş ve böylelikle bu peptidle ilgili araştırmalar farklı alanlara yayılmıştır [27], [28]. Özellikle kanser hücrelerinin kendi proliferasyonunu uyaran büyüme faktörleri ürettiğinin ve bu şekilde hücre bölünmesinin sürekli olarak uyarılmasına neden olduğunun ortaya koyulmasından sonra [20], GHRH ile kanser gelişimi arasındaki ilişki daha çok çalışılmaya başlanmıştır. Ayrıca, GHRH sinyal yolağında yer alan ve GHRH'nin aşağı sinyal yolu hedeflerinden biri olan IGF-1 ile karsinogenez arasındaki bağlantının tanımlanmasıyla birlikte [29], GHRH'nin de kanser oluşumu ve gelişiminde rolü olabileceği düşüncesi ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu kapsamda yapılan çalışmalardan bir tanesinde normalde GHRH ekspresyonu göstermeyen fibroblastlara GHRH analogları uygulandığında fibroblastların proliferasyonunun uyarıldığı ve c-myc protoonkogenlerinin ekspresyonlarının indüklendiği belirlenmiştir [27], [30]. Ayrıca akciğer, meme, yumurtalık, pankreas kanseri gibi farklı kanser türlerinde GHRH

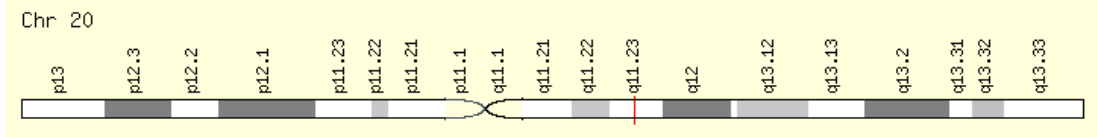
antagonisterinin uygulanmasıyla hücre proliferasyonu ve tümör büyümesi inhibe edilmesine rağmen, GH ve IGF-1 seviyelerinde değişiklik olmadığı, bir başka deyişle GHRH'nin karsinogenezde otokrin/parakrin rolü olduğu gösterilmiştir [27].

Homeostatik şartlarda GHRH, hipotalamusun yanı sıra plasenta [31], yumurtalık [32], prostat [33], testis [34], lenfositler [35], böbrek [36], karaciğer [30], akciğer [37], kalp [38], iskelet kası [28] gibi dokularda ektopik olarak üretilmektedir. Çeşitli kanserlerde GHRH ekspresyonu kontrol edildiğinde ise meme [39], endometriyal [40], yumurtalık [41], akciğer [42], kemik [7], pankreas [43], prostat [33], glioblastoma [44], adrenal karsinoma [45], kolorektal [43] gibi birçok kanser türünde GHRH ekspresyonu belirlenmiştir. Aynı doğrultuda, GHRH'nin bağlandığı reseptör olan GHRH-R spesifik olarak hipofizde ekprese edilirken, hipofiz tümörleri haricindeki tümörlerde çoğunlukla hipofiz tipi GHRH-R ifadesi bulunmamaktadır. Bunun yerine hipofiz tipi GHRH-R'nin kesilmiş versiyonu olan farklı splay varyantları prostat [46], kolorektal [47], akciğer [48], meme [49], yumurtalık [50], pankreas [36], gastrik kanser [43] gibi kanserlerde tanımlanmıştır. GHRH ve reseptörünün ötopik ekspresyonları dışında ektopik ekspresyonlarının varlığı, GHRH'nin kanserlerin patogenezinde otokrin/parakrin büyüme faktörü olarak rol alabileceğini desteklemektedir [27], [28], [30].

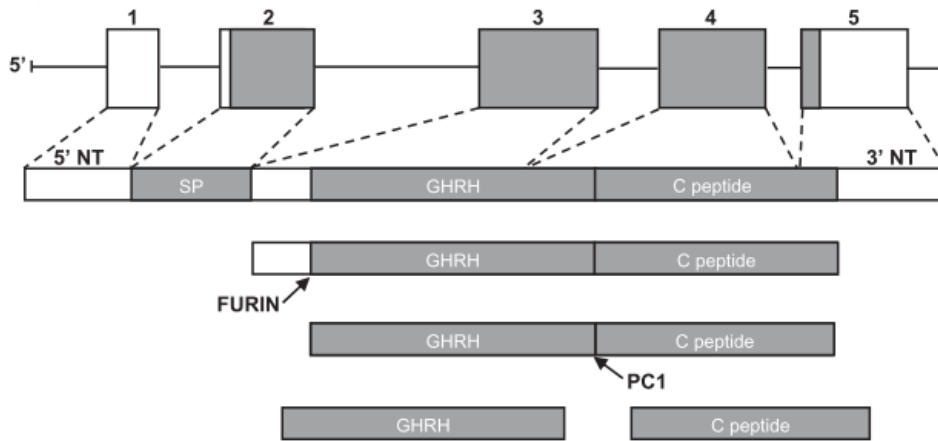
## **2.6 BÜYÜME HORMONU SALGILATICI HORMON**

Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon hipotalamustan salgılanan ve görevi hipofiz bezinden Büyüme Hormonu (GH) salgılanmasını uyarmak olan bir nöroendokrin peptiddir [39], [51]–[53]. Hipofiz bezinin anterior lobunda bulunan ve büyüme hormonu salgılayan somatotrof hücrelerini uyaran hipotalamik bir faktörün varlığı çok uzun yıllar önce belirlenmesine rağmen, bu faktörün izolasyonu ve karakterizasyonu uzun bir süre boyunca yapılamamıştır [6]. 1981 yılında bu faktörün karsinoid ve pankreatik tümörlerde ektopik üretiminin gösterilmesinin ardından 1982 yılında birbirinden ayrı çalışan iki grup, akromegaliye neden olan iki pankreatik tümörden, daha sonra GHRH olarak adlandırılacak olan faktörün izolasyonunu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir. Bu tümörlerden izole edilen 40 ve 44 amino asitlik iki GHRH formunun, hipotalamik GHRH formlarıyla aynı olduğu belirlenmiştir [6], [26].

İnsan GHRH geni 20. kromozomun q kolunda, 20q11.23 bandında haritalanmıştır (Şekil 2.4). Toplamda beş ekzondan oluşur ve genomda 10.814 bazlık bir bölgeyi kaplar [6], [54]. Ekzon 1, 5' transle edilmeyen bölgeyi içerirken, ekzon 2, 3, 4 ve 5'in 5' kısmı pre-pro-GHRH'yi kodlar. Ekzon 5'in 3' ucu ise 3' transle edilmeyen bölgeyi içerir (Şekil 2.5). GHRH geninden kodlanan mRNA'dan, 108 amino asitten oluşan öncül pre-pro-GHRH sentezlenir. Pre-pro-GHRH, tipik bir sinyal peptidi, 44 amino asitlik GHRH (YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRQQGESN) ve 31 amino asitten oluşan ve fonksiyonu belli olmayan bir C-terminal peptidini kodlar. Beşinci ekzonun 5' bölgesinde iki splay-akseptör bölgenin farklı kullanımıyla c-terminal peptidinde bulunan Ser-103'ün olmadığı 107 amino asitlik ikinci bir izoform sentezlenir. Pre-pro-GHRH, öncelikle N-terminal bölgesinden Furin enzimi tarafından kesilerek 8,8 kDa büyüklüğünde ara form oluşur. Oluşan bu ara form ise PC1 enzimi tarafından kesilir ve sonuçta olgun GHRH ve c-terminal peptidi (GHRH-ilişkili protein, GHRH-RP) meydana gelir [6]. GHRH, insan hipotalamusunda ilk olarak gebeliğin 18. ve 29. haftaları arasında, fetal hipofiz somatotroplarının oluşumuyla görülür. Yenidoğan kordon kanında GHRH seviyeleri yüksek olmakla birlikte ergenlik çağına kadar yavaş yavaş düşer [5].



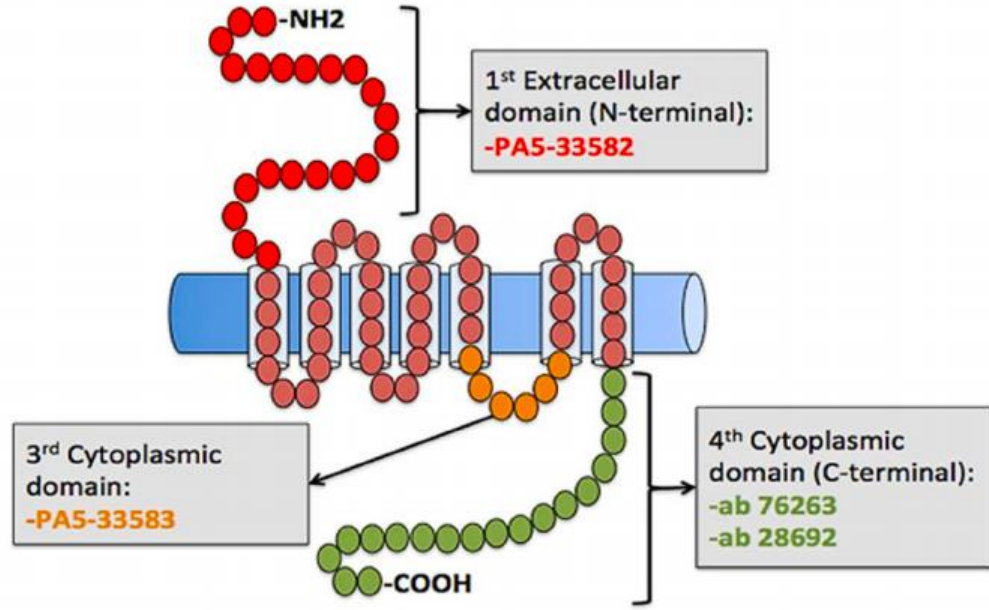
**Şekil 2.4. GHRH geninin genomik lokasyonu [54]**



**Şekil 2.5. GHRH geninin yapısı.**

5' NT: 5' transle edilmeyen bölge; 3' NT: 3' transle edilmeyen bölge [4]

GHRH, hücre membranında yer alan spesifik reseptörüne (GHRH-R) bağlanarak etkisini gösterir. GHRH-R, G Protein-Bağlı Reseptör B-II süper ailesi üyesidir [55]. G protein-bağlı reseptörlerin karakteristik özelliği 7 adet transmembran heliks içermeleridir. Ayrıca, B süper ailesi reseptörler büyük yapılı ekstraselüler n-terminal domeyni içermektedir (Şekil 2.6) [56]. GHRH-R geni 7. kromozomun p kolunda 7p14.3 bölgesinde haritalanmıştır [55]. 13 ekzondan oluşur ve alternatif mRNA splay mekanizmaları sonucu farklı izoformları bulunmaktadır. Birçok memelide GHRH-R proteininin ana formu 423 amino asitten oluşmaktadır. Bununla birlikte, birçok türün hipofizinde fonksiyonel önemleri tam olarak bilinmeyen, farklı uzunluk ve yapıda C-terminal içeren, daha az görülen izoformlar bulunmaktadır [5]. Bu izoformlar arasında GHRH-R'ye en fazla yapısal benzerlik gösteren Splays Varyant 1 (SV1)'dir [57]. SV1 cDNA dizilemesi, SV1'in hipofiz tipi GHRH-R den sadece ilk 334 nükleotid bakımından farklı olduğunu, böylelikle oluşan protein dizisinde hipofiz tipi GHRH-R'nin ekstraselüler bölgesindeki ilk 89 amino asitin yerini SV1'de 25 amino asitin aldığını göstermiştir [58]. Schally ve arkadaşları tümörlerde SV1'i tanımlamış ve cDNA'sını dizilemiştir. Ayrıca SV1'in tümörlerin birçoğunda ve normal dokularda bulunduğunu, ligand-bağımlı ve ligand-bağımsız aktivite gösterdiğini, böylelikle reseptör olarak fonksiyonel olduğunu göstermiştir [26]. GHRH-R ve splays varyantları hipotalamusun yanı sıra, plasenta, böbrek, testis, yumurtalık, gastrointestinal kanal, hepatositler, akciğer endotel hücreleri, pankreatik adalar, tiroid hücreleri gibi periferel dokularda da eksprese edilmektedir [51], [52], [55], [58], [59]. Öte yandan, GHRH-R ve splays varyantlarının kolorektal kanserler, meme kanseri, prostat, beyin ve papiller tiroid kanseri gibi farklı kanser tiplerinde de ekspresyonu belirlenmiştir [39], [57], [59]. Seitz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada üçlü negatif meme kanseri dokularında hipofiz tipi GHRH-R %25 oranında eksprese ediliyorken SV1 ise %70 oranında eksprese edilmektedir [60].

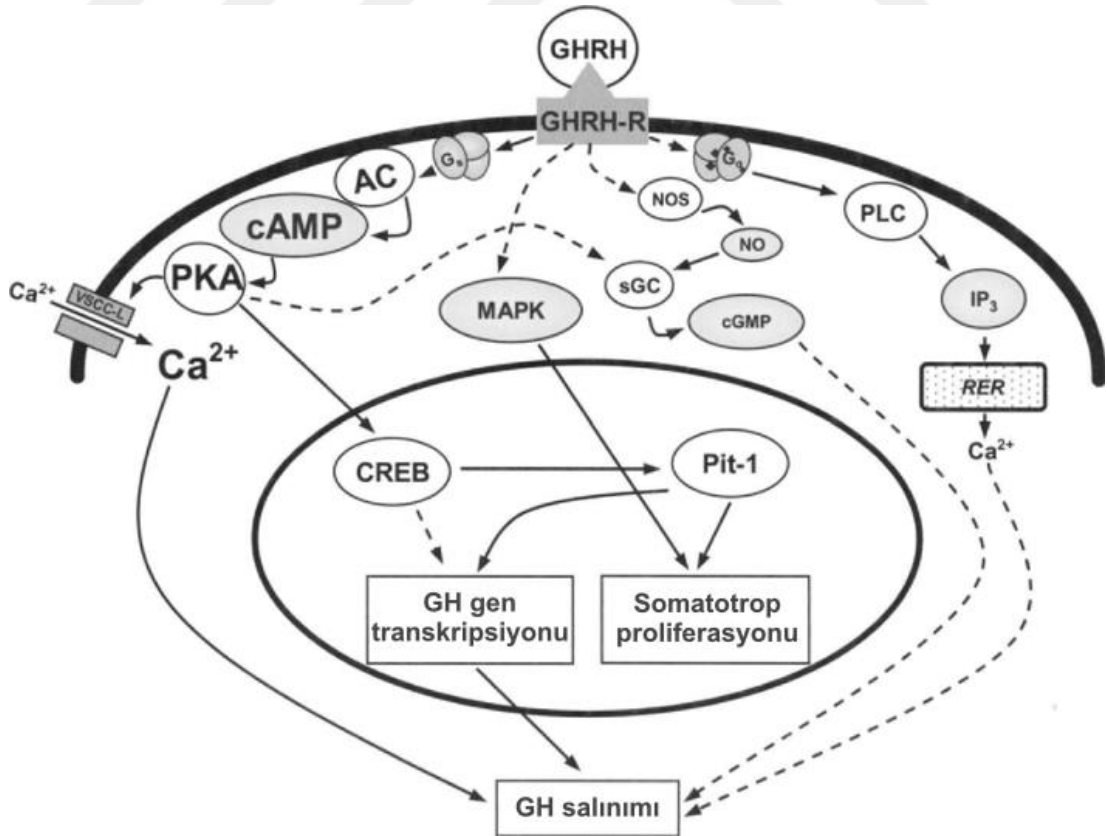


**Şekil 2.6. Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormon Reseptörünün (GHRH-R) şematik yapısı [61]**

## 2.7 GHRH SİNYAL YOLAĞI

GHRH reseptörü uyarıcı G proteini (Gs) gibi heterotrimerik G-proteinlerine bağlıdır. Gs proteini  $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\gamma$ -alt ünitelerinden oluşur.  $\alpha$ -alt ünitesi GTP bağlanma proteini iken,  $\beta$ - ve  $\gamma$ -alt üniteleri plazma membranına bağlıdır ve normal durumda GDP-bağlı olan  $\alpha$ -alt ünitesine yüksek afinite ile bağlıdır [62]. GHRH hipotalamustan salındıktan sonra reseptörüne bağlanmasıyla, reseptörde konformasyon değişikliği meydana gelir ve reseptör, Gs proteininin  $\alpha$ -alt ünitesine GTP bağlanmasını katalizleyerek uyarıcı G proteinini aktive eder. GTP bağlanması adenilil siklazı uyarır ve hücre içi cAMP seviyesini artırır. cAMP artışı, protein kinaz A (PKA)'yı uyarır. PKA, cAMP-cevap elementi bağlanma proteinini (CREB) fosforile ederek aktive eder. CREB bir transkripsiyon faktörüdür ve fosforile olarak aktive olması, GH1 geninin ve GHRH-R geninin transkripsiyonunu artırır. Ayrıca, GHRH reseptörlerinin aktivasyonu, somatotroflarda bir sodyum kanalının açılmasına ve böylelikle depolarizasyonuna neden olur. Hücre içi voltajdaki değişiklik, voltaj-kapılı kalsiyum kanallarının açılmasını uyarır ve kalsiyumun hücreye girişine izin verir. Hücre içi kalsiyum miktarının artması, salgı bezlerinde depolanan GH'nin salgılanmasını uyarır. GHRH ile indüklenen GH salınımı ayrıca fosfolipaz C/inositol fosfat (PLC/IP) yolağına bağlıdır. Bunların yanı sıra nitrik oksit (NO) ve siklik guanozin monofosfat (cGMP)

sinyal yolağı da GHRH'ye bağı GH salınımını düzenler [5], [39], [52], [53]. Alternatif olarak GHRH,  $\beta$ - ve  $\gamma$ -alt üniteleri aracılığıyla Ras/MAPK yolağını uyararak hücre büyümesini teşvik eder [53] (Şekil 2.7). GHRH peptidinin reseptöre bağlanması ikili domeyn bağlanma modelinde gerçekleşmektedir. Bu modele göre, peptidin C-terminalinde yer alan 22. pozisyondaki lösin, 23. pozisyondaki lösin ve 27. pozisyondaki metiyonin gibi hidrofobik amino asitler, reseptörün ekstraselüler domeyninde yer alan hidrofobik bölge ile etkileşime girmektedir. Öte yandan, peptidin N-terminalinde bulunan 1. pozisyondaki tirozin, 3. pozisyondaki aspartik asit, 4. pozisyondaki alanin gibi amino asitler ise reseptörün transmembran domeynine bağlanarak konformasyonel değışiklikler yolu ile reseptörün sitoplazmik bölgesini aktive etmekte ve çeşitli biyolojik cevaplara neden olmaktadır [56]. GHRH ve reseptörleri, proliferasyon, migrasyon, anjiyojenez ve çeşitli dokularda neoplastik transformasyon gibi hücreyel yollarda yer alır [39]. Ayrıca ekzojen GHRH uygulamasının farklı doku ve hücre tiplerinde proliferasyon, sağkalım, apoptoz, farklılaşma ve yara iyileşmesini düzenlediğı bilinmektedir. Öte yandan, GHRH'nin kalp fonksiyonunu arttırdığı, rat kalplerinde enfarktüs büyüklüğünü azalttığı, kardiyak kök hücre proliferasyonu ve sağ kalımı üzerinde etkisi olduğu da gösterilmiştir [53].



Şekil 2.7. GHRH Sinyal Yolağı [6]

## 2.8 GHRH AGONİSTLERİ

GHRH peptidinde yer alan bazı amino asitlerin kimyasal olarak modifiye edilmesi sonucu elde edilen peptidler GHRH agonistleri olarak adlandırılır. GHRH agonistleri hipofizden GH salınmasını uyarırlar, cAMP/PKA, ERK ve JAK2/STAT3 sinyal yolları aracılığı ile büyüme ve proliferasyonun uyarılmasını indüklerler, bu nedenle ilk olarak büyüme hormonu eksikliğinin tedavisinde kullanılmak üzere sentezlenmişlerdir. Hücrelerdeki doğal GHRH'ye göre daha yüksek aktivite gösterirler, bu nedenle klinik uygulama için uygundurlar. Hipofizden GH salınmasının yanı sıra, periferal dokularda GHRH reseptörüne bağlanırlar ve hücre proliferasyonunu uyarırlar [63]. GHRH peptidinin biyolojik aktivitesi N-terminalindeki 29 amino asitlik kısımda bulunduğundan, agonistlerin geliştirilmesi için bu kısa peptid kullanılmıştır. Bugüne kadar yüzden fazla GHRH antagonisti sentezlenmiştir [26]. İlk seri agonistler peptidin C-terminalindeki <sup>29</sup>Arg yerine Agmatin (Agm), N-terminalindeki <sup>1</sup>Tyr yerine Desaminotirozin (Dat) eklenmesiyle elde edilen MZ-2 serisi agonistlerdir. Bu değişiklikler peptidin C- ve N-terminallerini enzimatik degradasyona karşı koruduğu belirlenmiştir. <sup>29</sup>Arg-Agm ve <sup>1</sup>Tyr-Dat değişikliklerinin yanı sıra, peptiddeki bazı aminoasitlerin değiştirilmesiyle oluşturulan MZ-2 serisi diğer agonistlerle yapılan çalışmalarda bu agonistlerin GHRH(1-29) peptide göre *in vivo* daha uzun süreli etki gösterdiği ve GH salgılayıcı aktiviteyi arttırdıkları belirlenmiştir [64]. Peptidin 12. ve 21. pozisyonundaki bazik lizin amino asidinden dolayı bu bölgelerin enzimatik degradasyona daha açık olduğu ön görüşüyle, bir önceki MZ-2 serisi agonistlerde yapılan değişikliklere ek olarak, 12. ve 21. pozisyonlardaki lizin yerine Ornitin (Orn) eklenerek JI serisi agonistler oluşturulmuştur. Kimyasal oksidasyonu ve kemotripsin ile degradasyonu engelleyen değişiklikler de uygulanarak JI serisi agonistlerin etkisi artırılmaya çalışılmıştır. Yapılan biyolojik aktivite deneylerinde JI-36 ve JI-38'in klinik uygulamaya daha uygun olduğu gösterilmiştir [65]. JI-38 kullanılarak yapılan çalışmalarda JI-38'in fibroblastları aktive ederek yara iyileşmesini arttırdığı [63], kardiyoprotektif etkilerinin olduğu [38], bir kemirgen modelinde akut iskemik hasar sonrası kardiyak onarımı uyardığı ve kardiyak performansı arttırdığı [66], pankreatik adacık hücrelerinin çoğalması ve yenilenmesini uyardığı [67] gösterilmiştir. JI serisi agonistlerin umut vaat eden sonuçlarından sonra, potansiyelin daha da artmasını amaçlayan MR serisi agonistler sentezlenmiş ve bu seri agonistlerin endokrin

aktivitelerinin ve reseptör bağlanma afinitelerinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir [68]. Ayrıca, MR serisi agonistlerin peptid zincirindeki aminoasitlerin bir çoğu sentetik veya kodlanmayan amino asitlerle değiştirildiği için degradasyona daha az duyarlı olduğu ve *in vivo* çalışmalarda yarılanma ömrünün daha uzun olduğu gösterilmiştir [58]. Yapılan çalışmalarda agonist MR-403'ün hücre koruyucu etkisi olduğu [63], MR-356'nın ise daha yüksek intravenöz aktiviteye sahip olduğu [26] ortaya koyulmuştur. MR serisinde en çok araştırılan agonist olan MR-409 ile yapılan çalışmalarda ise, bu agonistin küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, kolorektal kanser ve pankreas kanseri hücrelerinin hücre canlılığını teşvik ettiği, G1-S fazına geçişi uyardığı ve apoptozu azalttığı [69], GHRH-R eksprese eden akciğer, mide, prostat, meme gibi farklı kanserlerde *in vivo* tümör büyümesine katkı sağladığı, akciğer kanseri hücrelerinde hücresel cAMP üretimini uyardığı [26] gösterilmiştir.

GHRH agonistleri etkilerini reseptör aracılığıyla gösterdiklerinden dolayı, kardiyak miyositler, pankreatik  $\beta$ -hücreleri gibi reseptör eksprese eden dokuları hedefler. Bu nedenle agonist kullanılarak gerçekleştirilen terapiler hedefli terapi olarak nitelendirilebilir [58]. GHRH ve agonistleri, kalp ve koroner vaskülatür de dahil olmak üzere periferik dokuların bütünlüğü ve dayanıklılığında önemli rol oynar [63].

## 2.9 GHRH ANTAGONİSTLERİ

Biyoaktif peptidlerin terapötik kullanımını arttırmak için proteolitik degradasyondan koruyacak stratejilerin geliştirilmesi için doğal olmayan amino asitlerin eklenmesi, konformasyonel kısıtlamalar, büyük polimerik işaretler takılması gibi sentetik malipulasyonlar yapılmaktadır [70]. GHRH dizisinin N-terminalindeki 29 amino asitlik kısmı tam biyolojik aktiviteye sahip olduğundan GHRH antagonistlerinin geliştirilmesi için hedef bölgedir [52]. GHRH peptidinin ikinci pozisyonundaki alaninin D-arjinine yer değiştirmesi sonucu GHRH antagonistinin (Robberecht antagonisti) oluştuğunun keşfedilmesiyle [71], GHRH 1-29 peptidi kullanılarak solid faz sentezinde çeşitli amino asitlerin değiştirilmesi sonucu çeşitli serilerde GHRH antagonistleri üretilmiştir [26]. Bu antagonistler GHRH reseptörüne bağlanmak için GHRH ile yarışmakta ve reseptöre bağlandıklarında GHRH-R aktivasyonunu bloke etmektedirler [63], [72], [73]. Bu şekilde, GHRH antagonistleri GHRH'nin *in vivo* ve *in vitro* etkilerini güçlü bir şekilde antagonize eden, potansiyel antikanser ve anti-enflamatuar aktiviteye sahip olan peptid analoglarıdır [8], [9]. GHRH antagonistleri

ile yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, bu antagonistlerin akciğer, meme, prostat, yumurtalık, pankreas, kolorektal, tiroid, glioblastoma gibi birçok kanser türünde direk olarak tümör hücrelerine etki ederek apoptozu arttırdığı ve proliferasyonu azalttığı gösterilmiştir [8], [9], [39], [59]. Ayrıca, antagonist uygulamasının, GH salınması ve GH ile indüklenen IGF-1 üretimini inhibe etmesinin yanı sıra, GHRH ve reseptörlerinin oluşturduğu uyarıcı döngüyü bloke ederek GHRH'nin otokrin/parakrin etkisinin inhibisyonu yolu ile tümör büyümesini azalttığıyla ilgili sonuçlar ortaya koyulmuştur [57], [59]. GHRH antagonistlerinin tümör oluşumunda rol oynayan ERK1/2 ve JAK/STAT sinyal yollarını baskıladığı [74], ayrıca akciğer kanseri hücrelerinde AMPK'yı aktive ederek Akt/mTOR sinyalizasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [75].

Robberecht antagonistinin ratlarda GH salınımını baskıladığının gösterilmesinden sonra, antitümör aktivitenin artırıldığı daha potansiyeli yüksek antagonistler sentezlenmesi için çalışılmaya başlanmıştır. Bu kapsamda sentezlenen ilk antagonistler MZ-4-71 ve MZ-5-156 Robberecht antagonistine göre 7-19 kat daha yüksek potansiyele sahip olduğu bulunmuştur [76]. MZ-5-156, A549 akciğer kanseri hücrelerine uygulandığında p53'ün indüklendiği gösterilmiştir [9]. MZ serisi antagonistlerden sonra antagonistik potansiyeli daha yüksek olan, 9., 28. ve 29. pozisyonlarda arjinin, D-arjinin veya homoarjinin içeren JV-1-36 ve JV-1-38 antagonistleri sentezlenmiştir (Şekil 2.8) [76]. Antagonist JV-1-36'nın, TNF- $\alpha$  uygunlanmış ve uygulanmamış miyotüplerde, GHRH'nin sağ kalım ve anti-apoptotik etkilerini yok ettiği ortaya koyulmuştur [53]. Daha sonra 8., 9. ve 10. pozisyonlarda farklı değişiklikler içeren JV-1-63, JV-1-65 ve JV-1-68 antagonistleri ve sonrasında amino ucunda yağ asidi grupları bulunan MZ-J-7-110 ve MZ-J-7-114 sentezlenmiştir (Şekil 2.8) [76]. MZ-J-7-114 antagonisti VEGF aktivitesini bloke etmiş ve EGF ve VEGF reseptörlerinin ekspresyonunu düşürmüştür, böylelikle anjiyogenez ve tümör büyümesini önemli ölçüde azaltmıştır [63]. Bu değişikliklerin yanı sıra, 11., 12., 20. ve 21. pozisyonlardaki lizin ve arjininlerin histidin ve ornitine değiştirilmesi ile MZ-J-7-118, MZ-J-7-138 ve JMR-132 antagonistleri sentezlenmiştir. Elde edilen bu antagonistler, o zamana kadar sentezlenen antagonistler içinde en potansiyel anti-tümör etkiye sahip olanlar olarak belirlenmiştir. Serum GH ve IGF-1 seviyelerindeki inhibisyonun *in vivo* incelenmesi sonucu JV-1-65, MZ-J-7-110, MZ-J-7-118, MZ-J-7-138 ve JMR-132 antagonistlerinin endokrin aktiviteleri JV-1-63, MZ-4-71 ve MZ-5-

156'ya göre daha zayıf olmasına rağmen anti-kanser potansiyelinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir [76]. MZ-J-7-138 antagonistinin prostat kanserindeki koruyucu etkisinin doğal tip p53 ün indüklenmesi ile ilişkili olduğu, özellikle PC3, DU145 ve MDA-PCa-3b zenograflarının büyümesini p53 indüksiyonu yolu ile baskılandığı rapor edilmiştir [9]. Ayrıca, MZ-J-7-138 ve JV-1-92 antagonistlerinin Ras ve Raf fosforilasyonunu bloke ettiği ve bu yolla akciğer kanseri büyümesini baskıladığı kanıtlanmıştır [63]. Antagonist JMR-132 ile yapılan çalışmalara bakıldığında, JMR-132'nin nüde farelerde kolon karsinoma hacmini %75'e kadar azalttığı, HCT116 hücrelerinde hücre bölünmesinin S-fazında tutulmasını sağladığı ve intrinsik yolak aracılığı ile apoptozu indüklediği, LNCaP hücrelerinde p53 seviyesini kontrol hücrelere göre arttırdığı, prostat kanseri hücre büyümesini Akt ve ERK yollarını baskılayarak inhibe ettiği gösterilmiştir [9], [46], [57], [77].

Yakın zamanda dizayn edilen MIA (Miami) serisi (Şekil 2.9) GHRH antagonistleri (MIA-602, MIA-606 ve MIA-690) tümöral GHRH reseptörlerine karşı yüksek bağlanma afinitesi göstermekte ve çeşitli kanser hücre hatlarında ve farelerde büyümeyi baskılamaktadır [26], [39]. MIA-602 antagonisti uygulamasıyla, bir tümör invazyonu belirteci olan MMP2 aktivitesinin azaldığı, glioblastoma, meme ve yumurtalık kanseri hücrelerinde hücre canlılığının ve hücre motilitenin azaldığı, sıgır pulmoner arter hücrelerinde ERK1/2 ve JAK2/STAT3 yollarının aktivasyonunun baskılandığı, hücre içi P53 ve pAMPK seviyelerinin arttığı, endotel bariyer bütünlüğünün desteklendiği gözlemlenmiştir [59], [78], [79]. Yapılan çalışmalar sonucu yayınlanan veriler incelendiğinde, antagonist MIA-690 hücre motiliteyi bloke etmiş, GHRH ile artan nörit hücre sayısındaki artışı bloke etmiştir [39], [80]. MIA-602 ve MIA-690, tiroid kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe etmiş, apoptozu indüklemiş, *in vivo* tiroid tümör büyümesini ve anjiyojenezi inhibe etmiş, küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde hücre canlılığını azaltmış, apoptozu arttırmış, hücre cAMP seviyelerini ve migrasyonu azaltmış, farelerde tümör büyümesinin inhibisyonunun yanı sıra hücre döngüsünü G1/S kontrol noktasında tutarak proliferasyonu inhibe etmiş ve invazyonda azalmaya neden olmuştur [81], [82]. MIA-602, MIA-606, MIA-690 antagonistleri ile normal prostat hücreleri (RWPE-1) ve prostat tümörlerinde (LNCaP ve PC3) yapılan çalışmada GHRH antagonistlerinin tümör hücrelerinde proliferasyonu azalttığı, proapoptotik/antiapoptotik molekül oranını arttırarak apoptotik hücre sayısını ve

hücrelerin S fazında tutulmasını indüklediği, epitelyal-mezenkimal geçişi bloke ettiği gösterilmiştir [83].

Normal dokuların ve tümör dokuların GHRH analogları ile düzenlenmesi, doku onarımı ve antitümör uygulamalar bakımından umut vaat eden klinik yaklaşımlardır.

Amino acid residue	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29			
hGHRH (1-29)NH <sub>2</sub>	H-	Tyr	Ala	Asp	Ala	Ile	Phe	Thr	Asn	Ser	Tyr	Arg	Lys	Val	Leu	Gly	Gln	Leu	Ser	Ala	Arg	Lys	Leu	Leu	Gln	Asp	Ile	Met	Ser	Arg-NH <sub>2</sub>		
Robberecht's antagonist Ac-		D-Arg																												-NH <sub>2</sub>		
MZ-4-71 Ibu-		D-Arg				Phe(4-Cl)									Abu															Nle	Agm	
MZ-5-156 PhAc-		D-Arg				Phe(4-Cl)									Abu																Nle	Agm
JV-1-36 PhAc-		D-Arg				Phe(4-Cl)				Arg					Abu																Nle	D-Arg Har-NH <sub>2</sub>
JV-1-38 PhAc-		D-Arg				Phe(4-Cl)				Har Tyr(Me)					Abu																Nle	D-Arg Har-NH <sub>2</sub>

Amino acid residue	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29					
hGHRH (1-29)NH <sub>2</sub>	H-	Tyr	Ala	Asp	Ala	Ile	Phe	Thr	Asn	Ser	Tyr	Arg	Lys	Val	Leu	Gly	Gln	Leu	Ser	Ala	Arg	Lys	Leu	Leu	Gln	Asp	Ile	Met	Ser	Arg-NH <sub>2</sub>				
JV-1-63 PhAc-		D-Arg				Phe(4-Cl)				Har	Amp				Abu																Nle	D-Arg Har-NH <sub>2</sub>		
JV-1-65 PhAc-		D-Arg				Phe(4-Cl)				Amp	Tyr(Me)				Abu																	Nle	D-Arg Har-NH <sub>2</sub>	
JV-1-68 PhAc-		D-Arg				Phe(4-Cl)				Amp					Abu																	Nle	D-Arg Har-NH <sub>2</sub>	
MZ-J-7-110 HOOC-(CH <sub>2</sub> ) <sub>12</sub> -CO-		D-Arg				Phe(4-Cl)				Amp	Tyr(Me)				Abu																	Nle	D-Arg Har-NH <sub>2</sub>	
MZ-J-7-114 CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CO-		D-Arg				Phe(4-Cl)				Amp	Tyr(Me)				Abu																		Nle	D-Arg Har-NH <sub>2</sub>
MZ-J-7-118 CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CO-		D-Arg				Phe(4-Cl)			Ala	His	Tyr(Et)	His			Abu																		Nle	D-Arg Har-NH <sub>2</sub>
MZ-J-7-138 CH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -CO-		D-Arg				Phe(4-Cl)			Ala	His	Tyr(Et)	His	Orn		Abu																		Nle	D-Arg Har-NH <sub>2</sub>
JMR-132 PhAc		D-Arg				Phe(4-Cl)			Ala	Har	Tyr(Me)	His			Abu																		Nle	D-Arg Har-NH <sub>2</sub>

Şekil 2.8. GHRH antagonistleri ve amino asit dizisindeki değişiklikler [76]

**Abu**,  $\alpha$ -aminobutirik asit; **Ac**, asetil; **Agm**, agmatin; **Har**, homoarjinin; **Ibu**, izobutiril; **Nle**, norlösin; **PhAc**, fenilasetil; **Tyr(Me)**, O-metiltirozin; **Amp**, para-amidino-fenilalanin; **Orn**, ornitin; **Tyr(Et)**, O-etiltirozin

Code	Position of amino acid <sup>a</sup>													Molecular Mass				
	0	2	6	8	9	10	11	12	15	17	20	21	27	28	29	30	Calculated	Measured <sup>b</sup>
GHRH (1-29)		Ala	Phe	Asn	Ser	Tyr	Arg	Lys	Gly	Leu	Arg	Lys	Met	Ser	Arg			
JV-1-36	PhAc	D-Arg	Cpa	-	-	-	-	-	Abu	-	-	-	Nle	D-Arg	Har-NH <sub>2</sub>			
JMR-132	-	-	-	Ala	Har	Tyr(Me)	His	-	-	-	His	-	-	-	-			
MIA-125	CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> -CO-Ada	D-Arg	Cpa	Ala	Har	Tyr(Me)	His	Lys	Abu	Leu	His	Lys	Nle	D-Arg	Har-NH <sub>2</sub>	Agm	3964.37	3965.47
MIA-313	Ac-Aoc	-	-	-	-	-	-	Orn	-	-	-	-	-	-	-	-	3857.23	3868.24
MIA-408	-	-	-	Me-Ala	-	-	-	Lys	-	-	-	-	-	-	-	-	3783.17	3785.92
MIA-435	Ac-Ada	-	-	Ala	-	-	-	Orn	-	-	-	Orn	-	-	-	-	3796.18	3797.26
MIA-457	PhAc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3872.30	3873.42
MIA-459	PhAc-Ada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3872.21	3873.35
MIA-469	Ac-Ada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3993.36	3994.65
MIA-473	PhAc-Ada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4069.39	4070.52
MIA-479	Ac-Ada	-	-	Fpas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3852.17	3853.42
MIA-485	CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> -CO-Ada	-	-	Cpa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4133.51	4134.62
MIA-491	Dca-Ada	-	-	Fpas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3992.33	3993.45
MIA-499	PhAc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3928.20	3929.40
MIA-601	CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> -CO-Ada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4189.50	4190.72
MIA-602	PhAc-Ada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3928.20	3929.22
MIA-603	Dca-Ada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3992.33	3993.44
MIA-604	PhAc-Ada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4041.30	4042.32
MIA-606	-	-	-	Me-Ala	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4056.32	4057.34
MIA-610	PhAc	-	-	Cpa	Ala	-	Fpas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3931.14	3932.22
MIA-612	Ac-Ada	-	-	Fpas	-	-	Tyr(Me)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4049.35	4050.38
MIA-640	PhAc	-	-	Cpa	-	-	Fpas	-	-	-	Glu	-	-	-	-	-	3947.10	3948.30
MIA-690	PhAc-Ada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Leu	-	-	-	-	-	3931.14	3933.13

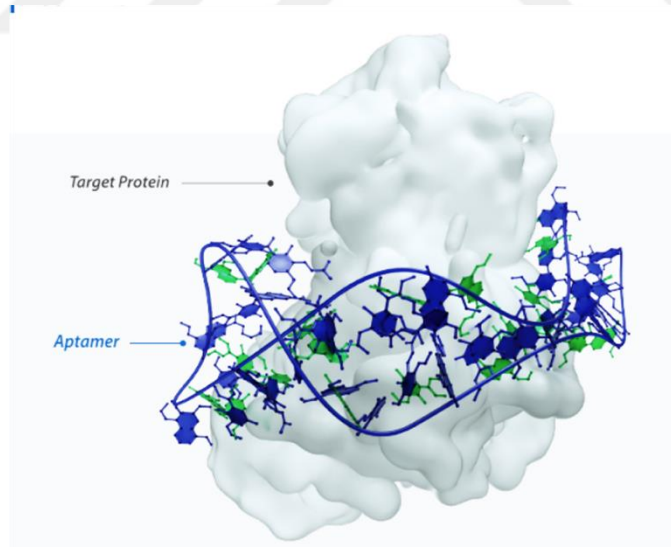
Şekil 2.9. En son sentezlenen MIA serisi GHRH antagonistleri ve amino asit dizisindeki değişiklikler [70]

**Abu**,  $\alpha$ -aminobutirik asit; **Agm**, agmatin; **Ada**, 12-aminododekanoil; **Aoc**, 8-aminooktanoik asit; **Cpa**, 4-kloro-Phe; **Dca**, dodekanoil; **Fpa5**, pentafloro-Phe; **Har**, homoArg; **Me-Ala**, N-metil Ala; **PhAc**, fenilasetil; **Tyr(Me)**, O-etiltirozin

## 2.10 APTAMER

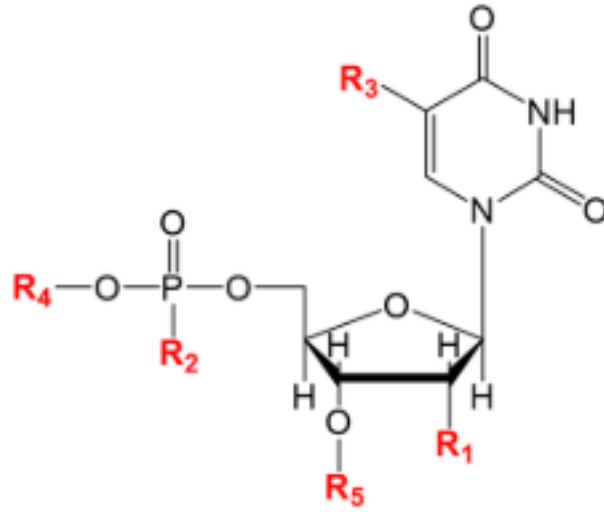
Aptamerler, kendilerine özgü sekonder ve tersiyer katlanmalar yaparak üç boyutlu yapılar oluşturabilen, çok çeşitli hedeflere yüksek afinite ve hassasiyetle etkileşim kurabilen tek iplikli sentetik DNA veya RNA oligonükleotidleridir (Şekil 2.10) [14], [15], [84], [85]. Hedefleri aynı molekül olsa dahi, RNA ve DNA aptamerleri dizi ve katlanma özellikleri bakımından birbirinden farklı olabilir [14]. Nükleik asitlerle proteinlerin bir araya gelmesi durumu ilk olarak 1980'li yıllarda HIV ve adenovirüslerle yapılan çalışmalarda bu virüslerin küçük RNA'lar kodladığı ve bu RNA'ların viral veya hücrel proteinlere yüksek afinite ve spesifisite ile bağlandığının gösterilmesiyle ortaya çıkmıştır [86]–[88]. Küçük moleküller, proteinler, peptidler, lipidler, toksinler ve hatta hücreler aptamerlerin hedefi olabilir [11], [89]. Aptamerler, negatif yüklü şeker-fosfat omurgalarından dolayı negatif yüklüdür ve hedef proteinlerin pozitif yüklü bölgeleriyle etkileşime girmeye eğilimleri vardır [15]. Yük etkileşimleri haricinde Van der Waals kuvvetleri ve Hidrojen bağları da bağlanmadan sorumludur. Elektrostatik etkilerin yanı sıra, aptamerlerin oluşturduğu halka, saç tokası yapıları gibi çeşitli yapılar aptamerlerin hedefle üç boyutlu kontaklar kurarak daha fazla etkileşime olanak sağlar [11]. Aptamerlerin keşfinden önce hedef moleküllere yüksek afinite seçicilikle bağlandıkları bilinen antikorlar yaygın olarak kullanılmaktaydı. Ancak aptamerlerin de hedeflerine hassasiyet, seçicilik ve afinite ile bağlandıklarının ortaya çıkmasıyla aptamerler sıklıkla antikorlarla karşılaştırılmıştır [84]. Aptamerlerin antikorlara kıyasla önemli avantajları vardır. Düşük üretim maliyetleri, üretim için canlı hayvan ihtiyacı olmaması ve laboratuvarında büyük ölçeklerde sentezlenebilir olması, daha küçük olması, daha az immunojenitesi olması ve dolayısıyla çoklu kez uygulanabilir olması, toksik olmaması, geniş çapta pH ve sıcaklık stabilitesi sağlaması, daha uzun saklama süresi ve daha kararlı olması, kimyasal modifikasyon konusunda daha çok özgürlük sağlaması, büyüklüğü ve esnekliği sebebiyle saklı epitoplara bağlanabilmesi ve doku penetrasyonuna olanak sağlaması, üretim lotları arasında kalite bakımından fark olmaması aptamerlerin antikorlara karşı sahip olduğu avantajlardır [11], [84], [85],

[89]. Öte yandan, aptamerlerin antikorlara kıyasla dezavantajlı olduğu noktalar da bulunmaktadır. En önemli dezavantajlarından biri aptamerlerin yüküdür. Aptamerler, oligonükleotid dizisinin şeker-fosfat omurgasından dolayı net negatif yüke sahiptir, bu nedenle hidrofilik özelliktedir ve pozitif yüklü hedeflere daha yüksek afinite gösterirler. Ayrıca nükleazlar tarafından hızla degrade edilirler. Proteinlerin 22 amino asitten oluşan yapı taşlarına göre aptamerler sadece dört tane nükleik asit yapı taşı içerir, bu durum olası katlanmaların çeşitliliğini sınırlandırır. Nükleotid yapı taşlarında gerçekleştirilen kimi modifikasyonlarla bu dezavantajların kısmen üstesinden gelinir. Ancak bu modifikasyonlar, aptamerlerin geleneksel yöntemle sentezlenmesi aşamasında maliyeti arttırmaktadır [84]. Doğal RNA ve DNA endojen nükleazlara oldukça duyarlı olduğu için, aptamerlerin nükleazlardan korunması ve stabilitesinin artırılması amacıyla şeker-fosfat omurgasında kimyasal modifikasyonlar dahil edilebilir. Bu maksatla nükleotidlerin farklı pozisyonlarına çeşitli modifikasyonlar yapılması (Şekil 2.11), fosfodiester bağ modifikasyonları, plazma nükleazları tarafından tanınmayan L-nükleotidlerle oluşturulan ayna görüntü oligonükleotidlerin kullanılması (Spiegelmer) gibi farklı stratejiler kullanılabilir [15] (Şekil 2.12).



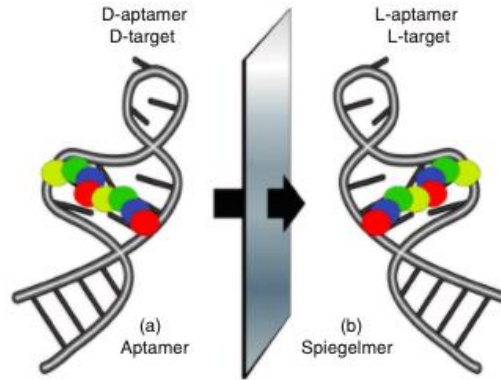
**Şekil 2.10. Aptamer ve hedef protein etkileşiminin şematik olarak gösterilmesi**

[90]



**Şekil 2.11. Bir nükleotidin kimyasal yapısı ve olası kimyasal modifikasyon bölgeleri**

**R<sub>1</sub>**: OMe, NH<sub>2</sub>, F, LNA, vs. **R<sub>2</sub>**: S, S<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, vs. **R<sub>3</sub>**: çeşitli fonksiyonel yan zincirler. **R<sub>4</sub>**: 5' uç modifikasyonları, PEG, kolesterol, vs. **R<sub>5</sub>**: 3' uç modifikasyonları, PEG, kolesterol, invert dT, vs. **OMe**: O-metilasyon, **LNA**: Kilitli nükleik asit (locked nucleic acid), **PEG**: Polietilenglikol [15]

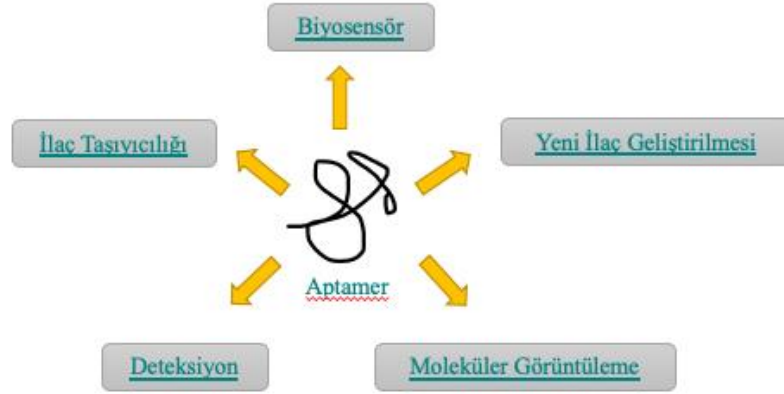


**Şekil 2.12. Geleneksel aptamer ve Spiegelmer (L-aptamer) şematize edilmesi**  
[91]

## 2.11 APTAMERLERİN KULLANIM ALANLARI

Nükleik asit aptamerler kendilerine özgü hassasiyet ve özgüllükle hedef molekülleri tanıyarak bağlanabildiklerinden dolayı, birçok alanda biyosensörler (işaretleme ve deteksiyon), nanoteknoloji uygulamaları, ilaç taşıyıcılığı ve ilaç geliştirilmesi, viral ve

bakteriyel deteksiyon, moleküler görüntüleme gibi çok sayıda uygulamada kullanılabilir (Şekil 2.13) [14], [84], [89].



**Şekil 2.13. Aptamerlerin kullanım alanları**

### 2.11.1 İlaç Taşıyıcılığı

Hücre yüzey reseptörlerine bağlanan aptamerlere çeşitli ilaçlar konjuge edilerek ilaçların direkt olarak hücreye taşınması sağlanabilmektedir [14]. Örneğin, yapılan bir çalışmada, önemli bir prostat kanseri belirteci olan prostat-spesifik membran antijeni (PSMA) eksprese eden hücelere özgü aptamer A10 ile PSMA(-) hücelere özgü aptamer DUP-1 streptavidin köprüsü ile birleştirilerek ikili aptamer probu elde edilmiştir. Bu ikili aptamer probunun A10 bölgesine kemoterapötik ilaç doksorubisin konjuge edilmiş, böylelikle hem PSMA(+) hem de PSMA(-) prostat kanseri hücelere kemoterapötik ilacın taşınması sağlanmıştır [92]. Yapılan başka bir çalışmada ise PSMA(+) LNCaP hüceleri için A10 aptamere anti-Lamin A/C ve anti-GAPDH siRNA'ları streptavidin köprüsü ile konjuge edilmiştir. Elde edilen konjugat hücelere uygulandığında, hücelerin 30 dakika gibi bir sürede konjugatı aldığı ve etkili bir şekilde gen ekspresyonunun siRNA-aracılı olarak inhibe edildiği belirlenmiştir [93].

### 2.11.2 Moleküler Görüntüleme

Aptamerler, toksik olmamaları, hedefe yüksek spesifisite göstermeleri ve kan dolaşımında hızla difüze olmaları nedeniyle, bir florofor, kuantum dot veya diğer materyallerle konjuge edilerek moleküler düzeyde görüntüleme için kullanılabilir ve klinik analiz ve diyagnozda sonuçların doğruluğunu artırabilmektedir [14]. A10-DUP-1 aptamer kompleksine kuantum dot konjuge edilmesiyle sadece prostat kanseri

hücrelerine bağlandığı, normal prostat hücrelerine ve diğer kanser hücrelerine bağlanmadığı gösterilmiştir [94].

### **2.11.3 Deteksiyon**

Aptamerler, deteksiyon için çeşitli moleküllerle konjuge edilerek deteksiyon için de kullanılabilir. Örneğin, komplike bir prosedür olan ve birçok kimyasal kullanımı gerektiren immunoblotlama yöntemi, antikorlar yerine kuantum dot ile konjuge edilmiş Histidin (His) işaretine spesifik RNA aptamerleri kullanılarak hedef proteinin kolaylıkla tespit edilmesi sağlanmıştır [95]. Ayrıca yine antikorların deteksiyon için kullanıldığı bir yöntem olan enzime-bağlı immunosorbent testinde (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) antikorlar yerine aptamerler kullanılarak hedef proteinin deteksiyonu gerçekleştirilmiştir [96].

### **2.11.4 Biyosensörler**

Aptamerlerin hedefi tanıma molekülü olarak kullanıldığı biyosensörler, “aptasensör” olarak adlandırılmaktadır. Geliştirildikleri metodolojilere bağlı olarak elektrokimyasal, floresan temelli, kolorimetrik temelli aptasensörler gibi farklı çeşitleri bulunmaktadır [14]. Küf zehiri olarak bilinen okratoksin A için, altın yüzeylere immobilize edilen aptamer kullanılarak elektrokimyasal bir aptasensör geliştirilmiştir [97]. Prostat kanserinin erken aşamada tespit edilebilmesi için, prostat kanseri hücrelerinin salgıladığı prostat-spesifik antijene (PSA) özgü seçilen aptamere tiol grubu konjuge edildikten sonra altın kaplı silikon elektrot üzerine immobilize edilecek aptasensör oluşturulmuştur [98].

### **2.11.5 Yeni İlaç Geliştirilmesi**

2004 yılında, vasküler endotel büyüme faktörüne (VEGF) özgü geliştirilen aptamer, Macugen (Pegaptanib), neovasküler yaşa bağlı maküler dejenerasyon (age-related macular degeneration, AMD) hastalığının tedavisi için Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu’ndan (Food and Drug Administration, FDA) onay almıştır [99]. Macugen, 28 baz çifti uzunluğunda bir RNA aptameridir ve degradasyona karşı korunması için şeker-fosfat omurgası modifiye edilmiş ayrıca yarılanma ömrünün uzatılması için ise 20 kDa büyüklüğünde polietilen glikol (PEG) ile konjuge edilmiştir. Neovasküler AMD hastalığında anormal kan damarı büyümesinin temel indükleyicisi, VEGF’nin 165 amino asit uzunluğundaki izoformudur (VEGF<sub>165</sub>) ve Macugen, bu izoforma özgü

bulunan heparin-bağlanma bölgesine spesifisite ile bağlanacak şekilde SELEX yöntemi ile sentezlenmiştir [100]. Böylelikle, Macugen VEGF<sub>165</sub>'in heparin-bağlanma bölgesine bağlanarak, VEGF<sub>165</sub>'in Tip-1 ve Tip-2 reseptörlerine bağlanarak aktivitesini bloke eder [99], [100]. Ayrıca akut myeloid lösemi (AML) için nükleolin-spesifik aptamer AS1411, karotid arter hastalığı için vonWillebrand-spesifik aptamer ARC1779, antikoagülasyon için trombin-spesifik aptamer NU172 klinik denemededir [14]. Macugen haricinde, farklı büyüme faktörlerine özgü aptamerler de sentezlenmekte ve çeşitli hastalıklarda terapötik etkinliği araştırılmaktadır. Hepatosit büyüme faktörüne (Hepatocyte Growth Factor, HGF) özgü geliştirilen DNA aptamerinin fare modellerinde karaciğer hasarını baskıladığı ve *in vivo* terapötik potansiyelinin olduğu bildirilmiştir [101]. Trombosit kaynaklı büyüme faktörüne (Platelet-derived growth factor, PDGF) özgü geliştirilen aptamerin ELISA benzeri bir yöntem kullanılarak PDGF tespitinde kullanılabilirdiği gösterilmiştir [102]. Fibroblast büyüme faktörü 2'ye (Fibroblast growth factor 2, FGF2) özgü sentezlenen aptamerin ise EGF ve FGF2'ye bağlı gelişen akciğer kanseri hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği *in vitro* ortamda ortaya konulmuştur [103].

## 2.12 SELEX

Virüsler tarafından kodlanan küçük RNA segmentlerinin proteinlere yüksek afinite ile bağlandığının gösterilmesinden sonra, 1990 yılında Gold ve Szostak'ın grupları, sırasıyla T4 RNA polimeraza ve çeşitli organik boyalara bağlanan RNA ligandlarının RNA kütüphaneleri kullanılarak *in vitro* ortamda geliştirilebileceğini gösterilmiştir [12], [104]. Bu *in vitro* proses, Tuerk ve Gold tarafından SELEX (Systemic Evolution of Ligands by Exponential Enlargement) olarak [12], sonuçta elde edilen RNA ligandlar ise Ellington ve Szostak tarafından "aptamer" olarak adlandırılmıştır [104]. Bu yöntemin tanımlanmasıyla birlikte çeşitli hedeflere yönelik *in vitro* aptamerler araştırılmaya ve sentezlenmeye başlanmıştır ve SELEX yöntemi aptamer seçilmesi için temel yöntem olarak kullanılmaktadır [14].

SELEX yöntemi, rastgele düzenlenen yaklaşık  $10^{15}$  oligonükleotid içeren bir kütüphane içerisinden, belirlenen hedefe yüksek afinite gösteren aptamerlerin seçilmesi için kullanılır. Yöntemin ilk basamağı oligonükleotid kütüphanelerinin hazırlanmasıdır. Oligonükleotid kütüphaneleri, primerlerin bağlanması için dizisi bilinen bölgelerin arasına genellikle 20-40 merlik rastgele dizilmiş oligonükleotidlerin

oluşturduğu dizisi bilinmeyen bölgelerin birleştirilmesiyle elde edilir. İkinci basamakta hedefle kütüphane bir araya getirilir, üçüncü basamakta hedefe bağlanan oligonükleotidler bağlanmayan oligonükleotidlerden ayrılır, dördüncü basamakta ise hedefe bağlanan oligonükleotidler Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılarak bir sonraki döngüde kullanılacak olan yeni kütüphaneyi oluşturur [14], [85]. İkinci, üçüncü ve dördüncü basamaklar bir seçim döngüsünü oluşturur ve geleneksel SELEX yönteminde hedefe bağlanan aptamerlerin zenginleştirilmesi amacıyla yaklaşık 20 seçim döngüsü gerçekleştirilir. Döngüler sonunda elde edilen aptamerlerin tanımlanması için DNA/RNA dizileme yapılır [85]. Bu şekilde oluşturulan aptamerler çeşitli biyolojik testlerle karakterize edilir [14].

## **2.13 SELEX TIPLERİ**

Geleneksel SELEX yönteminde aptamerlerin doğru seçilimi için gerekli olan döngü sayısının fazlalığı nedeniyle yöntem deneysel olarak uzun sürmektedir. Bu süreyi kısaltmak ve aptamer seçilimi sırasında hedefe afinitesi daha fazla olan aptamerlerin daha doğru bir şekilde seçilebilmesi için geleneksel yöntemde çeşitli modifikasyonlar yapılmıştır [85].

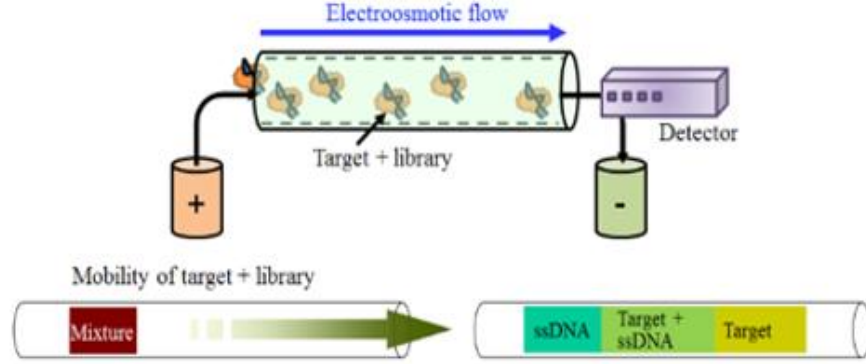
### **2.13.1 Membran-Temelli SELEX**

Tuerk ve Gold tarafından yöntemin tanımlandığı çalışmada kullanılan bu strateji, protein hedeflerinin immobilizasyonu için nitroselüloz membranların kullanımını içerir. Nitroselüloz membranların amino asitlere afinitesi vardır ve bu sayede proteinlerin hızlı ve kolay bir şekilde immobilize olmasını sağlarlar. Aptamer ve SELEX yöntemi ilk geliştirildiği dönemlerde hedef olarak genellikle proteinler kullanıldığı için ilk çalışmalarda genellikle bu yaklaşım uygulanmıştır. Ancak seçim için en az 12 döngü gerektiriyor olması ve membranların küçük moleküller ve peptidlere bağlanamıyor olması yöntemin kısıtlamalarıdır [14].

### **2.13.2 Kapiler Elektroferez-Temelli SELEX**

Molekülleri yüklerine ve büyüklüklerine göre elektrik alan etkisiyle ayıran kapiler elektroferez yöntemi kullanılarak, hedefe bağlanan oligonükleotidler mobilite kayması yaratması nedeniyle bağlanmayan oligonükleotidlerden ayrılabilir (Şekil 2.14) [14]. Bu yöntem, güçlü bağlanan oligonükleotidlerle zayıf bağlananların ayırımı

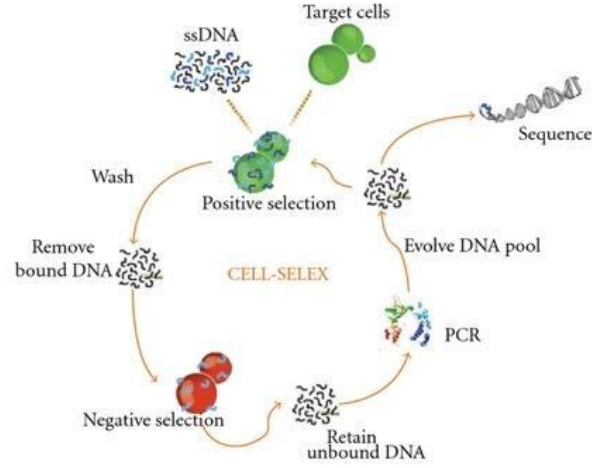
için komplike bir basamak içerdiğinden 2-4 döngü gibi erken seçim döngülerinde aptamer seçiliminin başarıyla gerçekleştirilebilmesini sağlar [14], [85]. Nöropeptid Y ve insan immunoglobulin E (IgE)'yi hedefleyen aptamer bu yöntem kullanılarak sadece dört seçim döngüsü sonucu elde edilmiştir [105], [106].



**Şekil 2.14. Kapiler elektroforez yöntemiyle aptamer seçilimi [14]**

### 2.13.3 Hücre-SELEX

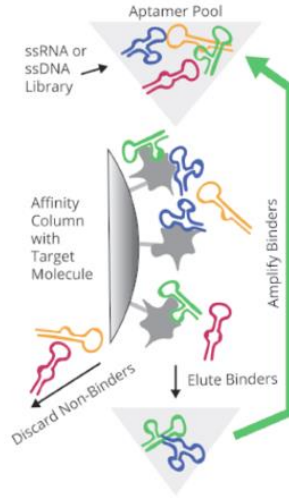
Tekli proteinleri veya molekülleri hedefleyen klasik SELEX yöntemlerinin aksine, bu yöntemle hücre yüzeyindeki ekstraselüler proteinler ve hücreye özgü yapılar hedeflenmektedir (Şekil 2.15) [107]. Hedefin, yani hücrelerin, bir yüzeye immobilize edilmesi çok uygulanabilir bir yöntem olmadığından dolayı, bağlanmayan oligonükleotidlerin ayrılması için adheren hücreler için yıkama süspansiyonlu hücreler için ise santrifüjleme kullanılır. Ayrıca hücre yüzeyini ve birçok hücrenin yüzeyinde ortak olarak bulunan bölgeleri tanıyan oligonükleotidlerin ayrılması için her döngüde negatif seçim yapılması gerekliliği bu yöntemin dezavantajıdır. Ancak bu yöntemle aptamer seçilimi bir kez gerçekleştirildiğinde, elde edilen aptamerler hücre hedeflemesi için çok güçlüdür [14]. Bu yöntemle küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattı SBC3 için [108], yumurtalık kanseri hücre hatları TOV-21G ve CAO-3 için [109] ve glioblastoma hücre hattı U251 [110] için aptamerler izole edilmiştir.



Şekil 2.15. Hücre-SELEX yönteminin şeması [107]

#### 2.13.4 Afinite Kromatografisi-Temelli SELEX

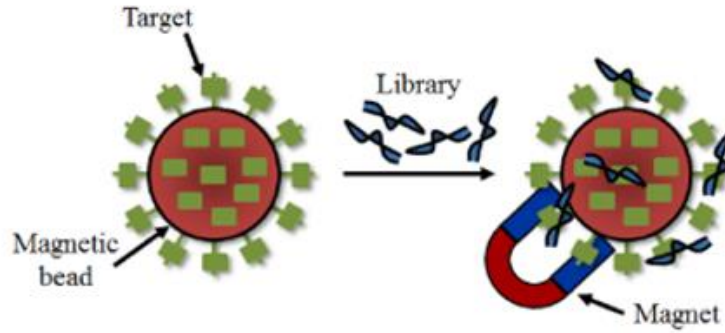
Afinite kromatografisi, biyokimyasal bir karışımdan belirli bileşenlerin ayrılması için kullanılan, immobil faz olarak genellikle agaroz-temelli boncuklar kullanılan ve kullanılan bu boncukların bir kolon sistemine paklendiği bir yöntemdir [111]. Hedef molekülün kolon sistemindeki boncuklara immobilizasyonu sayesinde kütüphane ve hedefin birleştirilmesi ve bağlanmayan oligonükleotidlerin ayrılması aşamasında SELEX yöntemine entegre edilebilir (Şekil 2.16). Hedef molekülün immobilizasyonu aşamasında proteinler için glutasyon S-transferaz (GST) ve His gibi işaretler kullanılabilirken, küçük moleküller ise kimyasal reaksiyon yolu ile boncuklara fikse edilir. Bu imkânı sağladığından dolayı, küçük moleküller için aptamer seçilimine uygun bir yöntemdir. Yöntemin kısıtlanması ise, hedefin afinite işaretini veya kimyasal reaksiyon için gerekli fonksiyonel grubu içermediği durumda uygulanamıyor olmasıdır [14].



Şekil 2.16. Afinite Kolonu kullanılarak kütüphaneden aptamer seçilmesi [111]

### 2.13.5 Manyetik Boncuk-Temelli Selex

Afinite kromatografisi yönteminde kullanılan boncukların manyetik boncuklarla değiştirilmesi sonucu elde edilen yöntemdir. Manyetik boncuklarla aptamer kütüphanesi birleştirildikten sonra boncuklara bağlanmayan oligonükleotidler bir mıknatıs yardımıyla kolaylıkla ayrılabilir (Şekil 2.17) [14].



Şekil 2.17. Manyetik boncuklar yardımıyla aptamer seçilimi [14]

## 2.14 APOPTOZ

Apoptoz, belirli morfolojik özellikler ile karakterize edilen programlanmış hücre ölüm yöntemi olmakla birlikte [112], apoptoz kelimesi ilk olarak 1972 yılında, çeşitli fizyolojik ve patolojik çevresel uyaranlar tarafından başlatılan veya inhibe edilen, hücre ölümünün morfolojik olarak farklı bir türünü tanımlamak için kullanılmıştır [113]. Memeli hücrelerinde gerçekleşen apoptozun mekanizmaları, *Caenorhabditis elegans* model organizmasında yapılan çalışmalarla anlaşılmaya başlanmış ve bu

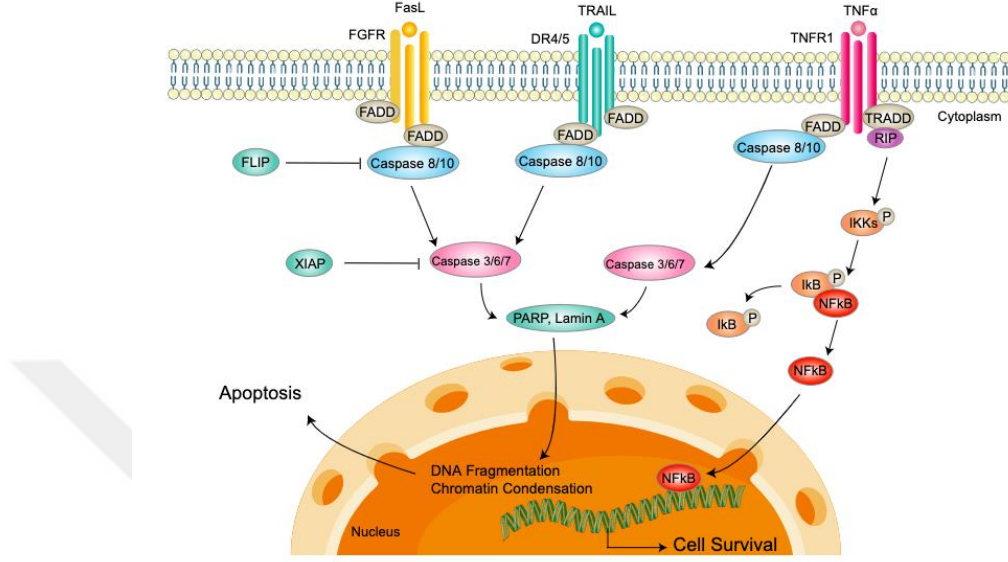
organizmanın gelişi sırasında belirli hücrelerin bütün bireylerde önemli bir doğruluk ve kontrol altında programlı olarak öldüğünün belirlenmesiyle, apoptoz “programlanmış hücre ölümü” olarak kabul edilmeye başlanmıştır [114]. Apoptoz fizyolojik koşullarda gelişim, yaşlanma ve dokulardaki hücre popülasyonunu korumak için homeostatik bir mekanizma olarak meydana gelmekle birlikte, organizmanın savunma mekanizmasında veya hücreler herhangi bir hastalık veya toksik ajan tarafından hasar gördüğünde de ortaya çıkmaktadır [112]. Bir bütün olarak bakıldığında, apoptoz, “kaspaz” adı verilen bir grup sistein proteazın aktivasyonunu içeren, oldukça koordine bir şekilde devam eden, genellikle enerji-bağımlı kompleks bir kaskadı ifade etmektedir [112]. Işık ve elektron mikroskobu görüntüleri, apoptoz süresince çeşitli morfolojik değişiklikler olduğunu ortaya çıkarmıştır. Apoptozun erken evrelerinde hücre küçülmesi, sitoplazmanın yoğunlaşması ve organellerin daha sıkı paketlenmesi ve kromozom kondensasyonu (piknoz) ışık mikroskobu ile görüntülenebilirken, elektron mikroskobu ile hücre içi değişiklikler daha belirgin bir şekilde tanımlanabilmektedir [112]. Kromatinin sitoplazmada düzensiz olarak dağılması ile meydana gelen nükleus fragmentasyonu sonrası, hücre yüzeyinde çıkıntılar oluşmakta ve hücre fragmentleri bu apoptotik cisimciklere ayrılmaktadır. Apoptotik cisimcikler nüklear fragment içeren veya içermeyen, sıkıca paketlenmiş organelleri ihtiva eden sitoplazmadan oluşmaktadır. Bu cisimcikler membrandan ayrıldıktan sonra makrofajlar veya parankimal hücreler tarafından fagosite edildiğinden, apoptoz sürecinde veya apoptotik hücrelerin ortadan kaldırılması aşamasında enflamatuar reaksiyon meydana gelmez [112]. Belirtilen morfolojik değişikliklerin haricinde apoptotik hücreler, protein kesilmesi, proteinlerin çapraz bağlanması, DNA degradasyonu gibi çeşitli biyokimyasal değişiklikler göstermekte ve bu kapsamda kaspaz adı verilen sistein proteazlar büyük önem taşımaktadır. Kaspazlar hücrede genellikle inaktif proenzim olarak sentezlenmektedir ve bir kere aktive olduklarında diğer prokaspazları da aktive edebildikleri ve böylece proteaz kaskadını başlatabildikleri için apoptotik sinyalin amplifiye olmasına ve hızlı hücre ölümüne neden olabilmektelerdir. Bugüne kadar birçok kaspaz tanımlanmış ve genel olarak üç kategoriye ayrılmışlardır, başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9, -10), efektör kaspazlar (kaspaz-3, -6, -7) ve enflamatuar kaspazlar (kaspaz-1, -4, -5). Bu kaspazlar haricinde kaspaz-11 apoptozun düzenlenmesi ve septik şok sırasında sitokin olgunlaşmasında, kaspaz-12 endoplazmik-spesifik apoptozun yürütülmesi ve amiloid- $\beta$  sitotoksitesinde görev almakta, kaspaz-13 ve kaspaz-14 ise sırasıyla sıgırlarda

embriyonik dokularda eksprese edilmektedir. Proteinlerin çapraz bağlanması, dokulardaki transglutaminazın ekspresyonu ve aktivasyonu ile gerçekleştirilmektedir. Ayrıca  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$ -bağımlı endonükleazlar tarafından DNA'nın yıkılması sonucu karakteristik DNA ladder görüntüsü jelde görüntülenebilmektedir. Apoptotik hücrelerde meydana gelen bir başka biyokimyasal değişiklik ise hücre yüzey belirteçlerinin ekspresyonundaki değişiklikler yoluyla, apoptotik hücrelerin komşu hücreler tarafından fagositoz için tanınmasının sağlanmasıdır. Fizyolojik koşullarda membranına sitoplazmik yüzeyinde eksprese edilen fosfatidilserin, apoptotik hücrelerde membranın ekstraselüler yüzeyinde eksprese edilmektedir ve fagositlerin apoptotik hücreyi tanınması için iyi bilinen bir tanıma ligandıdır. Bütün bu değişiklikler göz önüne alındığında apoptoz, moleküler olayların enerji-bağımlı kaskadını içeren, oldukça kompleks ve sofistike bir mekanizmadır ve iki ana apoptotik yolak olduğu bilinmektedir, ekstrinsik (ölüm reseptörü yolağı) ve intrinsik (mitokondriyal) yolak.

#### **2.14.1 Ekstrinsik Yolak**

Ekstrinsik (ölüm reseptörü-bağımlı) apoptotik sinyalizasyon, Tümör Nekroz Faktörü Reseptörü (TNFR) ailesinin üyesi olan transmembran ölüm reseptörlerinin (TNFR, Fas, TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand -TRAIL- reseptörü gibi) ekstraselüler domeynlerine, kendilerine özgü ekstraselüler TNF ailesi üyesi ligandların (TNF, Fas ligand, TRAIL gibi) bağlanması ile başlar [115], [116]. Ölüm reseptörlerinin hücre içi "ölüm domeyni" adı verilen domeynleri bulunmaktadır ve bu domeynler apoptozun indüklenmesinde kritik olarak yer alırlar [115]. İlgili ligand tarafından ölüm reseptörünün aktive olmasıyla reseptörde konformasyonel değişiklik meydana gelir ve sitoplazmik ölüm domeyni diğer ölüm domeyni içeren proteinlerle etkileşime girer [115]. Adaptör proteinler Fas-ilişkili ölüm domeyni (Fas-associated death domain, FADD) ve TNF reseptör-ilişkili ölüm domeyni (TNF receptor-associated death domain, TRADD), prokaspaz-8 ile ortak olarak ölüm efektör domeyni (death effector domain, DED) içerir ve böylece başlatıcı prokaspaz-8 ve/ya 10'u protein kompleksi ile bir araya getirerek ve ölüm-indükleyici sinyalizasyon kompleksi (death-inducing signaling complex, DISC) oluşumunu sağlar ve prokaspaz-8'in otokatalitik aktivasyonu teşvik eder [115], [116]. Başlatıcı kaspazların aktivasyonu, efektör kaspazlar olan kaspaz-3, -6 ve -7'nin aktivasyonuna ve hücre canlılığı için önemli substratların kesilmesine neden olmaktadır [115]. Bazı hücreler sadece ekstrinsik yolağa cevap olarak ölmez ve kaspaz-8 tarafından indüklenen bir amplifikasyon

basamağına ihtiyaç duyar. Bu durumda, kaspaz-8 Bid (BH3-interacting domain death agonist) proteinini kesilim için hedefler ve aktif t-Bid fragmentini üretir. t-Bid proapoptotik multi-domeyn proteinleri aktive eder ve aynı zamanda intrinsik yolağı aktive eder [115] (Şekil 2.18).

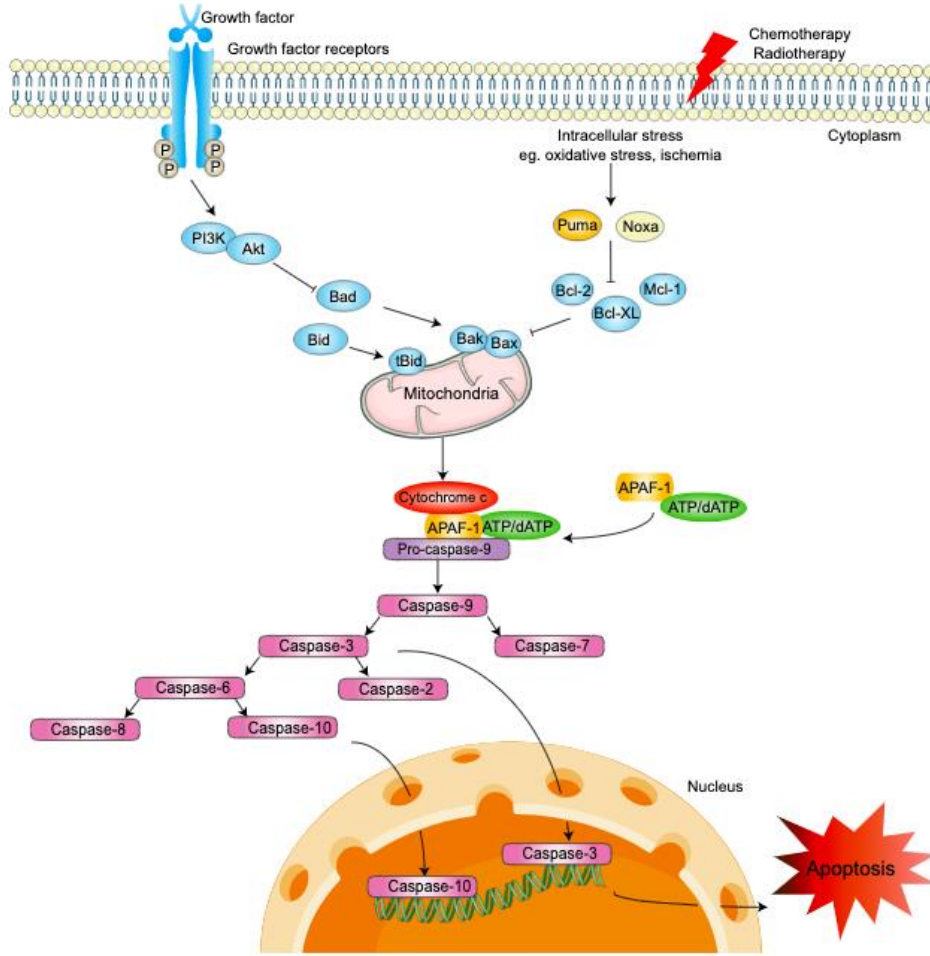


Şekil 2.18. Apoptozun ekstrinsik yolağı [117]

### 2.14.2 İntrensik Yolak

İntrensik (mitokondri-bağımlı) apoptotik yolak, bir reseptör sinyalizasyonundan bağımsız olarak, radyasyon, kemoterapötik ajanlar gibi farklı stres koşullarına cevap olarak mitokondride birleşen intraselüler sinyaller tarafından yönetilir [115], [118]. Onarılamayan genetik hasar, hipoksi, sitozolik kalsiyumun oldukça yüksek konsantrasyonu ve şiddetli oksidatif stres gibi internal uyarılar, intrinsik mitokondriyal yolağın başlamasını tetikler [115]. Apoptotik uyarıcıyı takiben, B hücreli lenfoma 2 (Bcl-2) ailesinin proapoptotik üyeleri Bax ve Bak, antiapoptotik Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1 proteinlerini nötralize eder ve mitokondriyal dış membran permeabilitesinin artmasına neden olur, böylece normalde membranlar arası boşlukla yer alan sitokrom c, apoptoz-indükleyici faktör (AIF), endonükleaz G gibi proteinler sitozole dağılır. Sitokrom c, sitozoldeki Apaf-1 (apoptoz proteaz aktive eden faktör-1) ile etkileşime girerek apoptozom adı verilen kompleksi oluşturur ve prokaspaz-9 proteolizi ile birlikte aktive olmasını sağlayarak kaspaz kaskadını başlatır ve efektör kaspazlar kaspaz-3, -6 ve -7 aktive olur [115], [116]. Efektör kaspazların aktivasyonu ile nükleus fragmente olur ve nüklear membran yıkılmaya başlar. Bu aşamada kaspaz-

3'ün hücre içinde kinazlar, DNA kontrol proteinleri gibi birçok farklı hedefi bulunmaktadır [118]. Bu hedeflerden bir tanesi, poli (ADP-Riboz) polimeraz (PARP) olup, kaspaz-3 tarafından PARP'ın 89 kDa ve 24 kDa'luk iki parçaya kesilmesi, apoptozun en önemli belirteçlerinden biri olarak bilinmektedir [119]. Kaspazların aktivasyonu sonrası çeşitli morfolojik değişiklikleri takiben hücre ölümü gerçekleşir [118] (Şekil 2.19).



Şekil 2.19. Apoptozun intrinsik yolağı [120]

## 3 MATERYAL VE METOT

### 3.1 KULLANILAN MATERYALLER

#### 3.1.1 Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Ekler bölümünde Tablo 3’de verilmiştir.

#### 3.1.2 Hücre Kültürü Donanımları

Hücre kültüründe kullanılan donanımlar Ekler bölümünde Tablo 4’de verilmiştir.

#### 3.1.3 Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Ekler bölümünde Tablo 5’te verilmiştir.

#### 3.1.4 Kullanılan Tamponlar

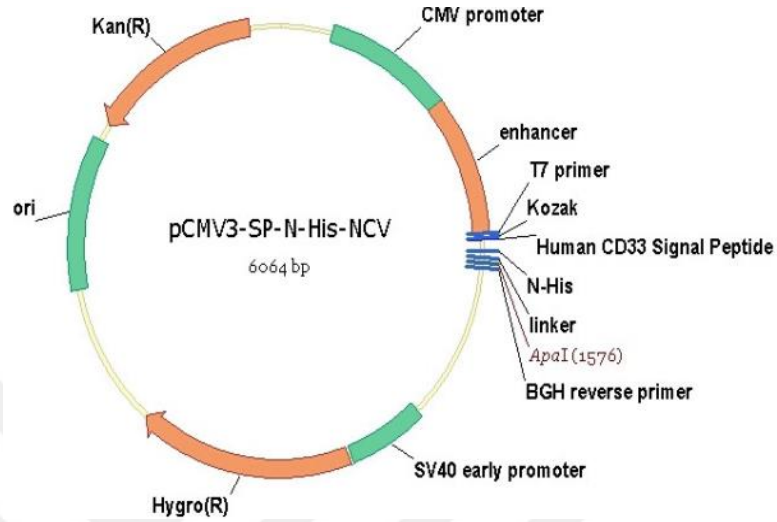
Çalışmada kullanılan tamponların içeriği Ekler bölümünde Tablo 6’da verilmiştir.

### 3.2 YÖNTEMLER

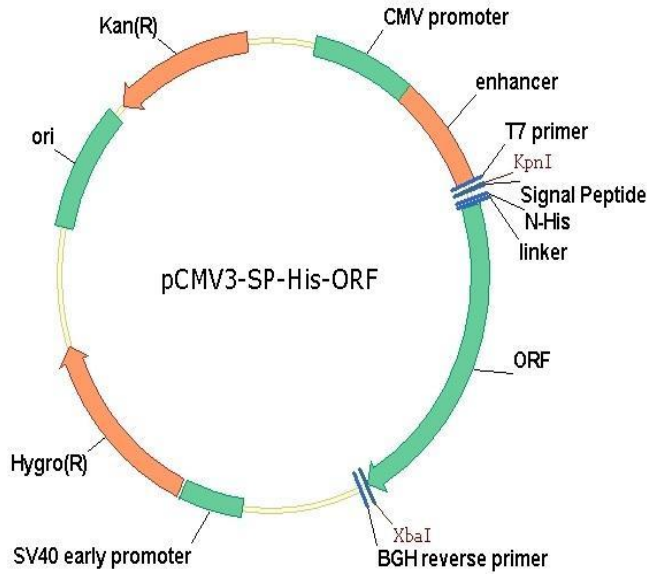
#### 3.2.1 Bakteri Total Protein Lizatı Elde Edilmesi ve İnkluzyon Cisimciklerinin Çözünür Hale Getirilmesi

His işaretine sahip pCMV3-SP-N-His-NCV (Sino Biological, CV023) (Şekil 3.1) negatif kontrol ve His-ışaretili GHRH cDNA açık okuma bölgesine sahip pCMV3-SP-His-ORF (Sino Biological, HG15602-NH) (Şekil 3.2) vektörü transforme edilmiş *Escherichia coli* HB101 suşları -80°C den çıkarılmış ve 50 µg/ml Kanamisin içeren LB besiyerinde büyütülmüştür. Gece boyu 37°C’de büyütülen bakteriler (1 L), 3000 x g’de 5 dk +4°C’de çöktürülerek LB besi yeri uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 8 ml Bakteri Total Protein İzolasyonu için Lizis Tamponu eklenerek pellet resüspanse edilmiş ve buzda 30 dakika inkübasyon sonrası üç defa 30 saniye sonikasyon yapılan örnekler 20000 x g’de 45 dakika +4°C’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant, temiz bir 1,5 ml santrifüj tüpüne (Eppendorf tüp) alınmış ve “Bakteri Total Protein Lizatı” olarak adlandırılmıştır. Pellet üzerine 3,5 ml İnkluzyon

Cisimcikleri Çözdürme Çözeltilisi eklenerek resüspanse edilmiş ve 1 saat oda sıcaklığında rollerda döndürülerek inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası yüksek hızda 15 dakika +4°C’de santrifüj yapılmış ve süpernatant temiz Eppendorf tüpüne alınarak “Çözünür hale getirilen pellet” olarak adlandırılmıştır.



Şekil 3.1. pCMV3-SP-N-His-NCV Negatif kontrol vektörünün şeması



Şekil 3.2. pCMV3-SP-His-ORF His-GHRH vektörünün şeması

### 3.2.2 His-GHRH proteinin saflaştırılması

His-işaretli GHRH (1-44) proteininin saflaştırılması için Invitrogen™ Dynabeads™ His-Tag Isolation and Pulldown manyetik boncukları kullanılmıştır. Bu amaçla, 2 mg Dynabeads™ manyetik boncuk temiz bir Eppendorf tüpüne aktarılmış ve tüp manyetik standı yerleştirilmiştir. 1-2 dakika bekleme sonrası manyetik boncuklar manyetik

standa doğru tüpün kenarında toplanmış, bu şekilde boncukların saklandığı saklama tamponu “süpernatant” olarak ayrılmış, bu süpernatant mikropipet ile çekilerek uzaklaştırılmış ve boncukları içeren tüp manyetik standdan uzaklaştırılmıştır. Bu sırada, bakteri total protein lizati veya çözünür hale getirilen pellet, toplam hacim 700 µl olacak şekilde His-Tag 1X Bağlanma/Yıkama tamponu ile karıştırılmıştır. Hazırlanan Protein-Bağlanma/Yıkama tamponu karışımı manyetik boncukların üzerine eklenmiş ve 10 dakika oda sıcaklığında tüp döndürücüde döndürülerek inkübe edilmiştir. Daha sonra Eppendorf tüp manyetik standda yerleştirilmiş ve 1-2 dakika inkübasyon sonrası oluşan süpernatant uzaklaştırılmıştır. GHRH proteini ile bağlanan manyetik boncuklar 4 defa 300 µl His-Tag 1X Bağlanma/Yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Bağlanan proteinleri boncuklardan ayırmak için boncukların üzerine 25 µl His Elusyon tamponu eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika tüp döndürücüde inkübe edilmiştir. Tüp manyetik standda alınmış ve süpernatant “Saflaştırılmış GHRH proteini” olarak temiz bir Eppendorf tüpe alınmıştır.

### **3.2.3 Memeli Hücrelerden Protein İzolasyonu**

Memeli hücrelerden protein izolasyonu için hücreler uygun kültür kaplarında büyütüldükten sonra 1X PBS ile yıkanmış ve 1X PBS eklenerek hücre kazıyıcı yardımıyla kazanmıştır. Eppendorf tüplerine toplanan hücreler tekrar 1X PBS ile yıkandıktan sonra hücre yoğunluğuna göre 30-50 µl Hücre Lizis Tamponu ile resüspanse edilmiş ve oda sıcaklığında 20 dakika çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Süre sonunda 16.000 x g’de 20 dakika +4°C’de santrifüjlenmiş ve süpernatant “total protein lizati” olarak temiz tüplere alınarak -20°C’de saklanmıştır.

### **3.2.4 Bradford Protein Miktar Tayini Yöntemi**

İzole edilen proteinlerin miktarlarının belirlenmesi için Bradford yöntemi uygulanmıştır. Artan miktarlarda (1,5 µg, 3 µg, 4,5 µg, 6 µg, 7,5 µg) Bovine Serum Albumin (BSA) ve konsantrasyonu ölçülmek istenen örneklerden 1’er µl alınarak 96-kuyucuklu plakanın kuyucuklarına eklenmiştir. Bütün kuyucuklara 200 µl Bradford Solüsyonu ilave edilmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında ışık almayan ortamda inkübasyon sonrası mikropiplaka okuyucuda 595 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır. BSA örneklerinin konsantrasyon ve absorbans değerleri kullanılarak konsantrasyon-absorbans grafiği çizilmiş ve standart eğri oluşturulmuştur. Bu eğrinin denklemine göre, örnek konsantrasyonları hesaplanmıştır.

### **3.2.5 İmmunoblotlama**

#### **3.2.5.1 SDS-Poliakrilamid Jelin Hazırlanması**

Proteinlerin büyüklüklerine göre birbirinden ayrılması amacıyla SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez yapılmıştır. Bu aşamada hazırlanan jelin içeriği Ekler bölümünde

Tablo 7’de verilmiştir. Öncelikle %12’lik yürütme jeli içeriği hazırlanmış, 1 mm boşluğa sahip camlar arasına dökülmüş ve üzerine izopropanol eklenmiştir. Dökülen jel polimerleştikten sonra izopropanol uzaklaştırılmış ve fazla izopropanol filtre kağıdı ile temizlenmiştir. Daha sonra %4’lük yükleme jeli içeriği hazırlanmış ve yürütme jelinin üzerine dökülmüştür. 1 mm boşluklu cama uygun taraklar camlar arasına yerleştirilerek yükleme jeli polimerleşmeye bırakılmıştır.

#### **3.2.5.2 Protein Örneklerinin Hazırlanması ve SDS-Poliakrilamid Jele Yüklmesi**

Bradford yöntemine göre hesaplanan konsantrasyon doğrultusunda 40 µg protein örneği 5X Laemmlı Yükleme tamponu ile 4:1 oranında karıştırılmış ve 95°C’de 5 dakika inkübe edilmiştir. Bu sırada hazırlanan jellerdeki taraklar çıkarılarak dikey elektrofrez sistemine yerleştirilmiş ve camlar arasına ve tankın içine SDS-PAGE Yürütme Tamponu ilave edilmiştir. Hazırlanan örnekler 10000 x g’de 30 saniye +4°C’de santrifüj edildikten sonra ilk kuyucuğa protein marker ve diğer kuyucuklara örnekler yüklenmiştir. Yükleme tamamlandıktan sonra 70-80 V’ta yaklaşık 3 saat yürütme gerçekleştirilmiştir.

#### **3.2.5.3 Proteinlerin Membrana Transfer Edilmesi ve Bloklama**

Yürütme işlemi sonrası camlar birbirinden ayrılarak jel çıkarılmış ve yükleme jeli kesilerek atılmıştır. Yürütme jeli önce distile suya sonra transfer tamponuna alınmıştır. PVDF membran metanol içerisinde aktifleştirilmiş ve sonrasında önce distile suya sonra transfer tamponuna alınmıştır. Filtre kağıtları ve süngerler de transfer tamponuna alınmıştır. Transfer sandviç aparatı sünger-filtre kağıdı- membran-jel-filtre kağıdı-sünger sırasıyla hazırlanmış ve transfer tankına alınmıştır. Tankın içi transfer tamponu ile doldurulmuş ve 220 A akımda protein büyüklüklerine göre 20 dakika-1 saat arası transfer gerçekleştirilmiştir. Transfer sonrası membran %5’lik bloklama sütüne alınarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir.

#### **3.2.5.4 Membrana Antikor Uygulaması ve Görüntü Alınması**

Çalışmada kullanılan primer ve sekonder antikorlar %5'lik Bloklama sütü ile hazırlanmıştır. Primer antikorlar 1:500-1:1000, sekonder antikorlar 1:1000-1:3000 aralığında kullanılmıştır. Bloklama süresi sonunda bloklama sütünden alınan membranlar primer antikorla gece boyu +4°C'de rollerda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası membranlar 3 defa 15'er dakika TBS-T ile yıkandıktan sonra primer antikorun kökeniyle uyumlu olacak şekilde HRP-bağlı sekonder antikora alınmış ve gece boyu +4°C'de rollerda inkübe edilmiştir. Sekonder antikor uygulaması sonrası membranlar 3 defa 10'ar dakika TBS-T ve 1 defa 5 dakika TBS ile yıkanmıştır. Görüntülerin eldesi için kemiluminesans A ve B tampon çözeltileri 1:1 oranında karıştırılıp 5 dakika inkübe edildikten sonra membranlar bu çözeltiliye alınmış ve 3 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda kemiluminesans görüntüleme sisteminde CCD kamera ile çekim alınmıştır.

#### **3.2.5.5 Membranların striplenmesi**

İmmunoblotlama sonrası membrandaki antikorların proteinlerden ayrıştırılarak yıkanması ve membrana farklı bir antikorla immunoblotlama yapılması amacıyla membranlar görüntüleme sonrasında 2 defa 8'er dakika stripleme tamponu ile, 2 defa 5'er dakika 1X PBS ile ve 2 defa 8'er dakika TBS-T ile çalkalayıcıda yıkanmış ve sonrasında bloklama işleminden itibaren standart immunoblotlama yöntemi uygulanmıştır.

#### **3.2.6 Memeli Hücrelere Transfeksiyon**

His- ve His-GHRH vektörlerinin HEK293 hücrelerine aktarılması için hücreler 6-kuyucuklu plakalara 600.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat sonra hücrelerdeki besi yeri uzaklaştırılarak 1800 µl taze besi yeri eklenmiştir. Transfeksiyon karışımı şu şekilde hazırlanmıştır: 200 µl FBS içermeyen MEM besi yeri içine 1 µg vektör ve 3 µl transfeksiyon ajanı eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 15 dakika sonunda, hazırlanan transfeksiyon karışımı, taze besi yeri eklenen hücrelerin üzerine damla damla eklenmiş ve 48 saat inkübe edilmiştir. 48 saat sonunda artan konsantrasyonlarda (0-300 µg/ml) Higromisin yaklaşık 10-12 gün boyunca uygulanarak koloni oluşumu beklenmiş ve oluşan koloniler yeni hücre kültür kaplarında büyütülerek seçilim yapılmıştır.

### 3.2.7 RNA izolasyonu, cDNA, qRT-PCR

His-GHRH plazmidi aktarılan HEK293 hücrelerindeki GHRH ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla His- ve His-GHRH plazmidi aktarılan hücreler ve aktarım yapılmayan doğal tip ücreler 60 mm hücre kültür kaplarına ekilmiş ve 48 saatlik inkübasyon sonrası PureZol RNA İzolasyon Ajanı (BioRad, Hercules, California, ABD) kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır. Kısaca, hücrelerin besiyeri uzaklaştırılarak PureZol eklenmiş ve kültür kabının yüzeyi yıkanarak hücrelerin kalkması ve parçalanması sağlanmıştır. PureZol ile kalkan hücreler 1,5 ml santrifüj tüpüne toplanarak oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. Hücre lizatının üzerine kloroform eklenmiş, 15 sn vortekslelendikten sonra oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiş ve 12.000 x g'de 15 dk +4°C'de santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası ara faza değmeden, üst şeffaf faz temiz bir 1,5 ml santrifüj tüpüne alınmış ve üzerine izopropanol eklenerek karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. 12.000 x g'de 10 dk +4°C'de santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atılarak pellet %75 etanol ile yıkanmıştır. 7.500 x g'de 5 dk +4°C'de santrifüj yapılmış, süpernatant atılmış, ve tüpün ağzı açık bırakılarak 5 dk pelletin kuruması sağlanmıştır. Pellet, RNaz içermeyen su ile çözülerek -80°C'de saklanmıştır. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonu ölçülmüş ve %1'lik agaroz jelde yürütülerek degradasyon bakımından kontrol edilmiştir. RNA izolasyonu ve kontrolü sonrası cDNA'ya dönüştürülmüştür. RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesi için iScript cDNA Sentez Kiti (BioRad) kullanılmıştır. Üreticinin talimatlarına göre, RNA, reverse transkriptaz ve reaksiyon karışımı bir PCR tüpünde karıştırılarak termal döngüleyicide 25°C'de 5 dk, 46°C'de 20 dk, 95°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Sentezlenen cDNA örnekleri -20°C'de saklanmıştır. Hücrelerdeki GHRH gen ekspresyonunun belirlenmesi için cDNA, Tablo 1 de verilen GHRH ve 18S'e özgü primerler ve SYBR Green PCR karışımı qPCR striplerinde karıştırılmıştır. Hazırlanan örnekler CFX Connect Real Time PCR Sistemine (BioRad) yerleştirilerek 55°C bağlanma sıcaklığında Real Time PCR gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonrası elde edilen C<sub>T</sub> ve reaksiyon verimi değerleri kullanılarak PFAFFL [121] yöntemine göre hücrelerdeki GHRH gen ifadesindeki kat değişimi hesaplanmıştır.

**Tablo 1. qRT-PZR reaksiyonunda kullanılan primerler:**

Gen adı	Primer Dizileri	Bağlanma sıcaklığı
---------	-----------------	--------------------

GHRH (230 bp) F: 5'-TATGCAGATGCCATCTTCAC-3' 51°C  
R: 5'-TCATCCCTGGGAGTTCCTGC-3'  
18S rRNA (70 bp) F: 5'-CTACCACATCCAAGGAAGGCA-3' 55°C  
R: 5'-TTTTTCGTCACCTCCCCG-3'

### 3.2.8 GHRH ELISA yöntemi

Medyaya salınan GHRH miktarının tespit edilebilmesi için hücreler 60 mm hücre kültür kaplarına ekildikten sonra 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası besi yeri Amicon Ultra-15 filtrelere (Merck Millipore, C7715) aktarılarak 5000 x g'de 45 dk santrifüj edilerek yoğunlaştırılmıştır. Santrifüj sonrası filtre arasında kalan sıvı bir eppendorf tüpe alınmış ve GHRH ELISA testi için kullanılmıştır. GHRH ELISA testi (Human GHRH ELISA Kit, Elabscience, E-EL-H1146) için GHRH antikoru ile kaplı kuyucuklara 100'er µl standart veya filtrelenen örnek eklenerek 37°C'de 90 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda antikora bağlanmayan örnekler ve standartlar kuyucuklardan uzaklaştırılmış, 100 µl/kuyucuk olacak şekilde Biotinli Deteksiyon Antikoru eklenmiş ve 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. 3 defa 350 µl yıkama tamponu ile yıkanan kuyucuklar 100 µl HRP-Konjugat ile 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyucuklar 5 kez yıkama tamponu ile yıkanarak 90 µl substrat reaktif eklenmiştir. 37°C'de 15 dk inkübasyon sonrası 50 µl stop solüsyonu eklenmiş ve 450 nm dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak öncelikle standart grafik oluşturulmuş, sonrasında da örneklerdeki GHRH miktarı hesaplanarak Graphpad 8.0 programında grafik çizilerek analiz yapılmıştır.

### 3.2.9 Hücre Sağkalım Analizi

Hücre sağkalım analizi için hücreler  $5 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 6-kuyucuklu plakalara ekildikten 24, 48 ve 72 saat sonra Tripsin-EDTA ile kaldırılmış ve 2000 x g'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası pellet 1 ml besiyeri ile çözülmüş ve hücre süspansiyonundan 50 µl alınarak 50 µl Tripan mavisi ile karıştırılmıştır. Canlı hücreler (boyanmamış hücreler) sayılarak grafikler oluşturulmuştur.

### 3.2.10 Kristal Viyole Koloni Formasyon Deneyi

Hücrelerin kültür petrisinde koloni oluşturma kapasitesinin belirlenmesi için, hücreler  $5 \times 10^3$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu plakanın kuyucuklarına ekilmiştir.

Hücrelerin koloni oluşturması için 10-12 gün beklendikten sonra hücreler 1X PBS ile yıkanmış, 5 dakika 3 ml %100 metanol ve 1 ml asetik asit ile fikse edilmiş ve kristal viyole ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda hücreler distile su ile yıkanmış ve mikroskop altında koloniler görüntülenerek koloni çapları ölçülmüştür.

### **3.2.11 Yarı Yumuşak Agar Koloni Formasyon Deneyi**

Hücrelerin üç boyutlu ortamda koloni oluşturma kapasitesinin belirlenmesi için yapılan yarı yumuşak agar koloni formasyon deneyi için 1:1 oranında %0,5'lik agar ve %20 FBS içeren besiyeri hazırlanarak 6-kuyucuklu plakanın kuyucuklarına dökülmüştür. Agarın donmasını takiben, %0,3'lük agar, medya ve  $3 \times 10^4$  hücre karıştırılarak donan agarın üzerine dökülmüştür. Hücrelerin koloni oluşturması için 10-12 gün beklendikten sonra oluşan koloniler DiOC<sub>6</sub> ile boyanmış ve ışık ve floresan mikroskopunda görüntüler alınmıştır. Ayrıca kolonilerin çapları ölçülerek grafik oluşturulmuştur.

### **3.2.12 X-aptamer seçilimi**

GHRH proteinine özgü X-Aptamerlerin seçilimi, X-Aptamer seçim kiti (AM Biotechnologies Katalog Numarası 2018-OPR3-TT-du-ISTNBL ) ile yapılmıştır.

#### **3.2.12.1 X-Aptamer Kütüphanesinin Hazırlanması**

Seçilim için kullanılacak olan tamponlar hazırlandıktan sonra X-Aptamer kütüphanesi, 10 ml Seçilim Tamponu B ile resüspanse edilerek  $3.000 \times g$ 'de oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant, geriye yaklaşık 100 µl kalacak şekilde uzaklaştırılmış, pellet 3 ml Seçilim Tamponu B ile resüspanse edilmiş ve 95°C su banyosunda 5 dakika inkübasyon sonrası yavaş yavaş oda sıcaklığına inmesi için yaklaşık 30 dakika bekletilmiştir. 7 ml Seçilim Tamponu A eklendikten sonra  $3.000 \times g$ 'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. 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.

#### **3.2.12.2 Negatif Seçilim**

Manyetik boncuklar (Invitrogen™ Dynabeads™ His-Tag Isolation and Pulldown) resüspanse edilmiş ve 62,5 µl manyetik boncuk 1,5 ml santrifüj tüpüne aktarılmıştır.

Tüp manyetik standda yerleştirilerek süpernatant atılmış ve toplamda 3 defa 500 µl Seçilim Tamponu A (Tablo 9) 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 standda 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.

### **3.2.12.3 Hedef Proteinin Manyetik Boncuklarla Birleştirilmesi**

0,5 mg manyetik boncuk 1,5 ml santrifüj tüpüne alınmış, manyetik standda süpernatant uzaklaştırılmıştır. 250 µl Seçilim Tamponu B (Tablo 9) 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 standda alınmış, süpernatant uzaklaştırılmış ve 3 defa 200 µl Seçilim Tamponu B ile yıkandıktan sonra 100 µl Seçilim Tamponu A ile resüspanse edilmiştir.

### **3.2.12.4 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 standda alınmış, süpernatant atılmıştır. Kalan karışım da pelletin üzerine eklenerek standda 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.

### **3.2.12.5 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 standda alınmış ve süpernatant temiz bir santrifüj tüpüne aktarılmıştır.

### 3.2.12.6 Spin Kolon Tampon Değişimi

Kolonun alt kapağı kırılmış, 1,5 ml toplama tüpüne yerleştirilmiş ve 1500 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolonun içerisindeki resinin üzerine 300 µl Seçilim Tamponu B eklenmiş ve 1500 x 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 x g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon atılmış, toplama tüpünde kalan çözelti "Kesilmiş oligonükleotid havuzu" olarak adlandırılmıştır.

### 3.2.12.7 İkincil seçim

4 tane 1,5 ml santrifüj tüpü alınarak Tüp 1, Tüp 2, Tüp 3 ve Tüp 7 olarak etiketlenmiştir. Bütün tüplere 15 µl kesilmiş oligonükleotid havuzu eklenmiştir. İkinci ve üçüncü tüplere 30 µl 500 nM işaretli hedef protein (His-GHRH) ve 105 µl Seçilim Tamponu B eklenmiştir. Birinci ve yedinci tüplere 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, üçüncü ve yedinci tüplere eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika döndürülerek inkübe edilmiştir. Tüp manyetik standa alınarak 3 defa 150 µl Seçilim Tamponu B ile yıkanmış ve 100 µl Seçilim Tamponu B ile resüspanse edilmiştir.

### 3.2.12.8 PZR ve Jel Analizi

İkincil seçim sonrası elde edilen tüplerden 10 µl kalıp olarak kullanılarak PZR yapılmıştır. Her bir tüp için uygun revers primer kullanılmıştır (Tüp 1 için revers primer 1; Tüp 2 için revers primer 2; Tüp 3 için revers primer 3; Tüp 7 için revers primer 7). Toplam 100 µl reaksiyon hacmi ve final konsantrasyonları 1X PZR Tamponu, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 PZR yapılmıştır. Her bir tüp için 14 döngü, 18 döngü ve 22 döngü PZR yapılmıştır. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jelde yürütülerek UV Görüntüleme Cihazında görüntüler elde edilmiştir.

### **3.2.12.9 İlave Başlangıç Havuzu PZR**

Biyotinli 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 biyotinli 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 biyotinli yakalama oligosu ve manyetik boncuk içeren çözeltiye ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. 3 defa 200 µl PBS ile yıkanmış ve 100 µl PBS ile resüspanse edilmiştir. Bu örnekten 10 µl alınarak PZR için kalıp olarak kullanılmıştır. 22 döngü PZR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.12.10 GHRH'ye özgü X-aptamer adaylarının dizilerinin belirlenmesi ve sentezlenmesi**

Tüp 1, Tüp 2, Tüp 3 ve Tüp 7 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' biyotin işaretiyle sentezlenmesi ilgili firma tarafından gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.13 Dot blot yöntemi**

Aday X-Aptamerler 95°C'de 10 dakika denatüre edilmiş ve üç boyutlu yapı kazanması için oda sıcaklığına yavaş yavaş soğuması beklenmiştir. Oda sıcaklığına soğuyan aptamerler Dot Blot bağlanma tamponu içinde toplam hacim 10 µl olacak şekilde protein ile bir araya getirilmiş ve +4°C'de gece boyu inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnekler 1'er µl olacak şekilde nitroselüloz membrana emdirilmiştir. Membrandaki örnekler kurduğunda tekrar 1'er µl örnekler emdirilmiş ve bu şekilde bütün örnekler bitene kadar membrana emdirilmeye devam edilmiştir. Membran üzerindeki örnekler tamamen kurduğunda membrana HRP-Streptavidin konjugat solüsyonu eklenmiş ve oda sıcaklığında karanlık ortamda 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası membran 5 defa 1X TBS-T ile 5'er dakika yıkanmıştır. Yıkama sonrası membrandaki fazla tampon filtre kağıdına emdirilerek membran kurutulmuş ve her bir dot üzerine 10 µl TMB substrat çözeltisi eklenmiştir. Beyaz tabla üzerinde görüntüler elde edilmiştir.

### **3.2.14 Hücre Kültürü**

HEK293 (ATCC® CRL-1573™), PC-3 (ATCC® CRL-1435™), HT-29 (ATCC® HTB-38), LNCaP (ATCC® CRL-1740), MIA PaCa-2 (ATCC® CRL-1420), PNT1a (ECACC, 95012614), T-47D (ATCC® HTB-133) ve MDA-MB-468 (ATCC® HTB 132) hücre hatları %10 FBS ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren sırasıyla MEM, RPMI, McCoy's 5A, RPMI, DMEM, RPMI, RPMI ve %15 FBS ve %1 Penisilin-Streptomisin içeren DMEM:F12 medyaları içerisinde 37°C %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda inkübe edilmiştir. Hazırlanan medyalar 0,22 µM por çaplı filtre ile steril edilerek kullanılmıştır.

### **3.2.15 MTT Hücre Canlılığı testi**

MTT hücre canlılığı testi için hücreler her kuyucukta 5.000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekildikten 24 saat sonra farklı dozlarda (0,1 µM, 0,25 µM, 0,5 µM) aday X-aptamer uygulaması yapılmıştır. Aptamer uygulaması sonrası 24., 48. ve 72. saatlerde hücrelere 50 µg MTT ajanı (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) eklenmiş, 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kristallere dokunulmaksızın medya uzaklaştırılmış ve formazan kristalleri 100 µl DMSO ile çözülmüştür. Daha sonra 570 nm – 655 nm ikili dalga boyunda absorbans ölçülmüştür. Elde edilen değerler kullanılarak kontrol hücrelerine göre doza ve zamana bağlı yüzde canlılık hesaplanmış ve Graphpad 8.0 programı kullanılarak grafikler oluşturulmuştur.

### **3.2.16 Floresan Boyama (DAPI-PI-DiOC<sub>6</sub>)**

#### **3.2.16.1 DAPI Boyama**

Hücreler 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş, 24 saat sonra aday X-aptamerler uygulanmıştır. 72 saat inkübasyon sonrası her kuyucuğa 1 µg/ml DAPI ilave edilmiş ve 10 dakika 37°C'de inkübe edildikten sonra floresan ataçmanlı mikroskopta aqua filtre ile 358 nm excitation / 461 nm emission dalga boylarında görüntülenerek fotoğraflar çekilmiştir.

#### **3.2.16.2 PI Boyama**

Hücreler 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş, 24 saat sonra aday X-aptamerler uygulanmıştır. 72 saat inkübasyon sonrası her kuyucuğa 2

$\mu\text{g/ml}$  PI (Propidyum İyodür) ilave edilmiş ve 30 dakika  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildikten sonra floresan ataçmanlı mikroskopta yeşil filtre ile 493 nm excitation / 636 nm emission dalga boylarında görüntülenerek fotoğraflar çekilmiştir.

### **3.2.16.3 DiOC<sub>6</sub> Boyama**

Hücreler 5000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş, 24 saat sonra aday X-aptamerler uygulanmıştır. 72 saat inkübasyon sonrası her kuyucuğa 1 nM DiOC<sub>6</sub> ilave edilmiş ve 15 dakika  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildikten sonra floresan ataçmanlı mikroskopta mavi filtre ile 482 nm excitation / 504 nm emission dalga boylarında görüntülenerek fotoğraflar çekilmiştir.

### **3.2.17 Hücre Döngüsü Analizi**

Hücre döngüsü analizi için hücreler her kuyucukta 100.000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve yapışması için 24 saat beklenmiştir.  $0,5 \mu\text{M}$  aday X-aptamerler uygulanarak 72 saat inkübe edildikten sonra Tripsin-EDTA çözeltisi ile plakalardan kaldırılan hücreler 1X PBS ile yıkanmış ve %70 etanol eklenerek  $-20^\circ\text{C}$ 'de 1 hafta fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası hücreler çöktürülmüş ve 1X PBS içerisinde  $4 \text{ mg/ml}$  PI ve  $20 \text{ mg/ml}$  RNaz A eklenerek  $37^\circ\text{C}$ 'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler Hücre Akış Sitometrisi Cihazında FL-2 dedektöründe okutularak analizi yapılmıştır.

### **3.2.18 Annexin V-FITC / PI Apoptoz Testi**

Annexin V-FITC / PI Apoptoz testi (556547-BD Biosciences) için hücreler 200.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6-kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 24 saat sonunda  $0,5 \mu\text{M}$  aday X-aptamerler uygulanarak 72 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda Tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler 1X PBS ile yıkanmış ve  $100 \mu\text{l}$  Bağlanma tamponu içinde resüspanse edilmiştir.  $5 \mu\text{l}$  Annexin V-FITC ve  $5 \mu\text{l}$  PI eklendikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiş ve akabinde  $400 \mu\text{l}$  Bağlanma Tamponu ilave edilerek Hücre Akış Sitometrisi ile analiz edilmiştir.

### **3.2.19 cAMP Analizi**

Hücrelerdeki cAMP miktarlarının belirlenmesi için (#4339, Cell Signaling Technologies) hücreler 12-kuyucuklu plakalara 20.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildikten 24 saat sonra aday X-aptamerler serum içermeyen medya içinde

hazırlanarak uygulanmıştır. 72 saat inkübasyon sonunda hücreler 2 defa soğuk 1X PBS ile yıkanmış ve hücrelerin üzerine 1X lizis tamponu eklenerek buz üzerinde 10 dakika bekletilmiştir. Standartlar lizis tamponu ile seri dilüsyon yapılarak hazırlanmıştır. Örnekler ve standartlar, HRP-bağlı cAMP solüsyonu ile karıştırılarak kit kuyucuklarına eklenmiş ve oda sıcaklığında 3 saat boyunca orbital çalkalayıcıda çalkalanmıştır. Süre sonunda örnekler kuyulardan uzaklaştırılmış ve 4 defa 1X yıkama tamponu ile yıkanmıştır. 100 µl TMB solüsyonu eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. 100 µl stop solüsyonu koyularak 450 nm dalgaboyunda absorbans ölçümleri yapılmıştır. Standart grafik çizilerek örneklerdeki cAMP konsantrasyonları hesaplanmış ve Graphpad 8.0 ile analiz edilerek grafikler çizilmiştir.

### **3.2.20 Ca<sup>+2</sup> Green Boyaması**

Ca<sup>+2</sup> Green Boyama için hücreler 50.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6-kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 24 saat yapışması beklendikten sonra aday X-aptamerler (0,5 µM) uygulanmıştır. 72 saat inkübasyon sonrası kuyucuklara 1 µM Ca<sup>+2</sup> Green<sup>TM</sup>-1 eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda floresan ataçmanlı mikroskopta mavi filtre ile 506 nm excitation / 531 nm emission dalga boylarında görüntülenerek fotoğraflar çekilmiştir. Pozitif kontrol olarak Tunikamisin (10 µM) ön uygulaması yapılmıştır.

### **3.2.21 Fura-2 Boyaması**

Fura-2 boyaması için hücreler 50.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6-kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 24 saat sonra aday X-aptamerler (0,5 µM) uygulanmıştır. 72 saat inkübasyon sonrası kuyucuklara 2 µM Fura-2 eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda floresan ataçmanlı mikroskopta mavi filtre ile 506 nm excitation / 531 nm emission dalga boylarında görüntülenerek fotoğraflar çekilmiştir. Pozitif kontrol olarak rekombinant GHRH ön uygulaması yapılmıştır. Floresan çekimi sonrası hücreler Tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılmış ve Hücre Akış Sitometrisi ile analiz edilmiştir.

### **3.2.21 İmmunofloresan (IF) yöntemi**

6 kuyucuklu plakanın kuyucuklarına lamel koyularak hücreler bu lameller üzerine her kuyucukta 500 µl medya içerisinde 20.000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat

sonunda hücreler yapıştıktan sonra aday X-aptamerler uygulanmış ve 72 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda hücreler 1X PBS ile 3 kez yıkanmış ve fiksasyon için soğuk metanol ile 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra metanol uzaklaştırılmış ve hücreler kuruyunca Permeabilizasyon Çözeltisi uygulanarak 15 dakika bekletilmiştir. Sonrasında hücreler 3 defa 1X PBS ile, ardından 3 defa PBB çözeltisi ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası hücrelere immunofloresan bloklama tamponu eklenmiş ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. 3 defa PBB ile yıkama sonrası PBB içerisinde hazırlanan 1:50 GH antikorunu uygulanarak gece boyu inkübasyon yapılmıştır. Sonraki gün GH primer antikorunu uzaklaştırılmış, 3 defa PBB ile yıkanmış ve Alexa Fluor 555 konjuge sekonder antikorla +4°C’de 1 saat muamele edilmiştir. Süre sonunda sekonder antikor uzaklaştırılarak hücreler PBB ile 3 defa yıkanmış ve tekrar oda sıcaklığında 1 saat bloklama çözeltisi ile bloklanmıştır. Sonrasında ise 1:50, PBB içinde hazırlanan GHRH-R antikorunu ile +4°C’de gece boyu muamele edilmiştir. Ertesi gün GHRH-R antikorunu uzaklaştırılmış ve 3 defa PBB ile yıkanan hücrelere FITC konjuge sekonder antikor +4°C’de 1 saat uygulanmıştır. İnkübasyon sonrası PBS ile yıkanan hücrelere 1ml PBS içinde 1 µg/ml DAPI uygulanarak 10 dakika inkübe edildikten sonra hücrelerin fikse halde bulunduğu lameller temiz bir lam üzerine ters kapatılarak floresan mikroskopta yeşil, mavi (482 nm excitation / 504 nm emission dalga boylarında) ve aqua (358 nm excitation / 461 nm emission dalga boylarında) filtrelerde görüntüler alınarak fotoğraflar çekilmiştir.

### **3.2.22 Biotin-Steptavidin bağlanma affinitesinin immunofloresan boyama ile gösterilmesi**

Bu yöntemde hücreler standart IF yöntemindeki şekilde ekilmiş, aptamer uygulaması yapılmıştır. İnkübasyon süresi (72 saat) bitiminde fiksasyon ve permeabilizasyon işlemini takiben hücrelere Endojen Biotin Bloklama Kiti uygulanmıştır. Kısaca hücrelere 1 damla Streptavidin çözeltisi eklenmiş, 37°C’de 30 dakika inkübe edilmiş, ardından 1 damla Biotin çözeltisi eklenerek yine 37°C’de 30 dakika inkübe edildikten sonra 3 defa PBB ile yıkanarak immunofloresan bloklama çözeltisi ile oda sıcaklığında 1 saat bloklanmıştır. Bloklama sonrası hücreler 3 defa 1X PBS ile yıkandıktan sonra 1X PBS ile 1:1000 oranında hazırlanan Streptavidin-Alexa Fluor 488 ile oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. 3 defa PBS ile yıkama sonrasında 1ml PBS içinde 1 µg/ml DAPI uygulanarak 10 dakika inkübe edilmiştir. Hücrelerin fikse halde bulunduğu lameller temiz bir lam üzerine ters kapatılarak floresan mikroskopta mavi

(482 nm excitation / 504 nm emission dalga boylarında) ve aqua (358 nm excitation / 461 nm emission dalga boylarında) filtrelerde görüntüler alınarak fotoğraflar çekilmiştir.

### **3.2.23 Aptamer-GHRH bağlanma afinitesinin immunofloresan boyama ile gösterilmesi**

Bu yöntemde hücreler standart IF yöntemindeki şekilde ekilmiş, aptamer uygulaması yapılmıştır. İnkübasyon süresi (72 saat) bitiminde fiksasyon, permeabilizasyon immunofloresan bloklama tamponu ile bloklama işlemlerini takiben hücreler PBB'de 1:50 hazırlanan GHRH primer antikoru +4°C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Ertesi gün primer antikor uzaklaştırılmış, hücreler PBB ile yıkanmış ve Alexa Fluor 568 konjuge sekonder antikor ile +4°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda sekonder antikor uzaklaştırılarak hücreler PBB ile 3 defa yıkanmış ve Endojen Biotin Bloklama Kiti uygulanmıştır. 3 defa PBB ile yıkanarak immunofloresan bloklama çözeltisi ile oda sıcaklığında 1 saat bloklanmıştır. Bloklama sonrası hücreler 3 defa 1X PBS ile yıkandıktan sonra 1X PBS ile 1:1000 oranında hazırlanan Streptavidin-Alexa Fluor 488 ile oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. 3 defa PBS ile yıkama sonrasında 1ml PBS içinde 1 µg/ml DAPI uygulanarak 10 dakika inkübe edilmiştir. Hücrelerin fikse halde bulunduğu lameller temiz bir lam üzerine ters kapatılarak floresan mikroskopta yeşil, mavi (482 nm excitation / 504 nm emission dalga boylarında) ve aqua (358 nm excitation / 461 nm emission dalga boylarında) filtrelerde görüntüler alınarak fotoğraflar çekilmiştir.

### **3.2.24 Aptamerlerin serum stabilitesinin gösterilmesi**

Aptamerlerin serum stabilitesinin gösterilmesi için 5 µl 10 µM aptamer ile 5 µl insan serumu bir araya getirilerek 37°C'de 0 saat, 1 saat, 3 saat, 6 saat, 24 saat, 48 saat, 72 saat, 96 saat ve 120 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi biten örnekler -80°C'de saklanmıştır. Bütün örneklerin inkübasyonu tamamlandığında örnekler, %2,5'lük agaroz jelde yürütülerek UV görüntüleme cihazında görüntülenmiştir. Elde edilen jel görüntülerindeki bant yoğunlukları Image J programı ile hesaplanmış ve aptamerlerin % stabilite grafikleri çizilmiştir.

### **3.2.25 Yüzey Plazmon Rezonansı (Surface Plasmon Resonance, SPR) yöntemi ile aptamerlerin bağlanma afinitelerinin belirlenmesi**

SPR analizi için CM-5 çipine doza bağlı olarak (250 nM-4000 nM) GHRH 1-29 peptidi yüklenmiştir. İnkübasyon süresi sonrası, TKY2.T1.13 aptameri üç tekrarlı olarak 120-12000 saniye BiaCore T200 cihazında yürütülmüştür. Single cycle kinetik parametreleri analiz edilmiş ve heterojen ligandlar kinetik analizi ile modelleme yapılmıştır. Analiz sonucu aptamerin  $K_d$  değerleri ve bağlanma grafikleri elde edilmiştir.

### **3.2.26 Aptamerlerin Reaktif Oksijen Türleri oluşumuna etkisinin belirlenmesi**

Aptamerlerin reaktif oksijen türleri oluşumuna etkisinin belirlenmesi için MIA PaCa-2, HT29 ve PC3 hücreleri 6-kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiş, sonraki gün aptamer uygulaması yapılmıştır. Aptamerler ile 70 saatlik inkübasyon sonrası birer kuyucuğa 0,5 mM  $H_2O_2$  pozitif kontrol olarak uygulanmış ve hücreler 2 saat daha inkübe edildikten sonra besiyeri uzaklaştırılmıştır. Hücrelere 5  $\mu$ M  $H_2DCFDA$  uygulanmış, 30 dk inkübe edilmiş ve floresan mikroskopunda mavi (482 nm excitation / 504 nm emission dalga boylarında) filtrede görüntüler elde edilmiştir. Floresan görüntülerin elde edilmesi sonrası hücreler Tripsin-EDTA kullanılarak kaldırılmış ve Hücre Akış Sitometrisi cihazında analiz edilmiştir.

### **3.2.27 Asılı damla modeline göre aptamerlerin koloni çaplarına etkisinin belirlenmesi**

Asılı damla modelini uygulamak için hücreler aptamerler ile birlikte 60 mm hücre kültür kabının kapak kısmına her damlada 30  $\mu$ l besiyerinde 10.000 hücre olacak şekilde damla damla ekilmiştir. Kültür kabına 3 ml 1X PBS eklenmiştir. Ekim tamamlandığında kapak ters çevrilerek kapatılmış hücrelerin asılı halde duran damlalar içerisinde koloni oluşturması beklenmiştir. Ekimden sonra 24 saatte bir oluşan koloniler görüntülenmiş, çapları ölçülmüş ve görüntüler elde edilmiştir. 72.saatte damlalara DiOC<sub>6</sub> uygulanmış ve floresan ataçmanlı mikroskopta görüntüler elde edilmiştir.

### **3.2.28 İstatistiksel analiz**

Deneyler en az üç kez tekrarlanmış ve ortalamaları alınmıştır. Deneysel sonuçlar GraphPad Prism versiyon 8 kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Dot blot

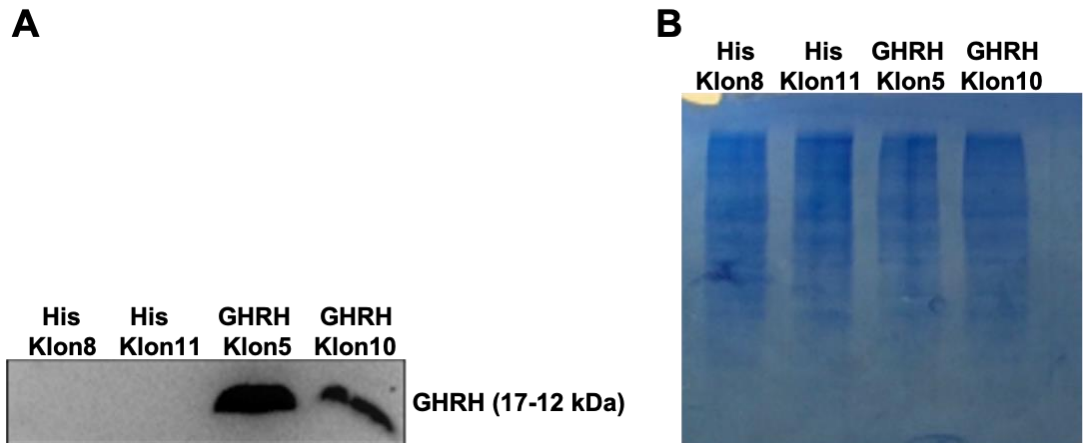
ve serum stabilite deneyleri sonucu elde edilen görüntüler Image J Jel analiz programı ile analiz edilerek bant yoğunlukları hesaplanmıştır. Dot blot sonucu elde edilen dot yoğunlukları Sigma Plot programı kullanılarak non lineer regresyon analizi gerçekleştirilmiştir. 2-way ANOVA Bonferroni's multiple comparison test kullanılarak istatistiksel değışiklikler hesaplanmıştır. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001



## 4 SONUÇLAR

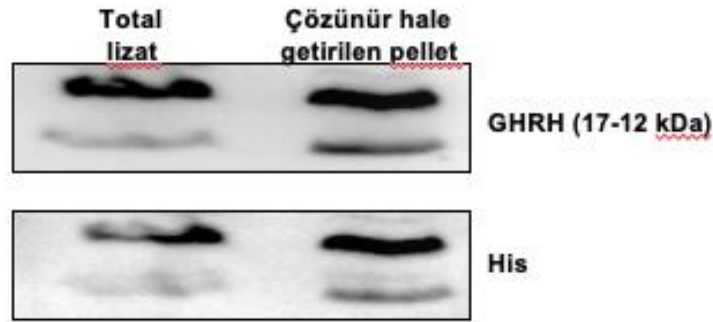
### 4.1 Aptamer Sentezi İçin Hedef Proteinin Bakteriyel Kaynaktan Elde Edilmesi

X-aptamer seçilim kiti için hedef protein olarak kullanılmak üzere GHRH proteinin saflaştırılması amacıyla öncelikle sadece His işareti içeren pCMV3-SP-N-His-NCV ve His işaretli GHRH açık okuma çerçevesine sahip pCMV3-SP-His-ORF vektörü içeren bakteri (*E. coli* HB101) klonları LB besiyerinde büyütülmüş ve total protein izolasyonu yapılmıştır. Protein örneklerinden 40 µg alınarak %15'lik SDS-Poliakrilamid jelde yürütülmüş, PVDF membrana aktarılmış ve anti-GHRH primer antikoru ile immunoblotlama yapılmış ve bu şekilde bakteriyel klonlardaki GHRH proteini kontrol edilmiştir (Şekil 4.1). Elde edilen membran görüntüsünde His işaretli vektör içeren bakteriyel kolonilerde GHRH protein ekspresyonu görülmezken His işaretli GHRH vektörü içeren bakteriyel kolonilerde GHRH protein ekspresyonu gösterilmiştir. Ayrıca, protein örneklerinin yürütüldüğü jelden proteinlerin membrana transfer işlemi sonrası jelin Coomassie Boyama Tamponu ile yıkanması ile His işaretli vektör içeren bakteriyel kolonilerden izole edilen proteinlerin varlığı gösterilmiştir (Şekil 4.1-B)



Şekil 4.1. Bakteriyel klonlarda GHRH protein ifadesinin immunoblotlama ile gösterilmesi A. GHRH immunoblotlama görüntüsü B. Membrana transfer sonrası jelin Coomassie Brilliant Blue boyası ile boyanması

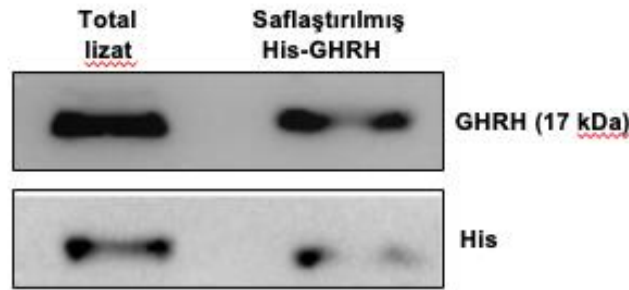
İmmunoblotlama sonucuna göre daha yoğun bant profili gösteren GHRH klon 5, sonraki deneylerde kullanılmak üzere seçilmiştir. GHRH klon 5 bakterilerinden His işaretli GHRH proteinini saflaştırmak adına bakteriler daha yüksek hacim LB besi yerinde büyütülmüş ve Total protein lizatı ve çözünür hale getirilen pellet elde edilmiştir. Elde edilen protein lizatları yine %15'lik SDS-poliakrilamid jelde yürütülerek anti-GHRH antikoru ile immunoblotlama yapılmıştır. Yapılan deney sonucunda her iki total protein örneğinde de GHRH proteini tespit edilmekle birlikte çözünür hale getirilen pellette özellikle 12 kDa'lık izoformun miktarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2). Bakterilere aktarılan ve GHRH açık okuma bölgesi içeren vektörde GHRH açık okuma bölgesiyle aynı promotor tarafından kontrol edilen ve açık okuma bölgesinin 5' ucunda bulunan 10 adet His amino asidini kodlayan bir dizi olduğundan dolayı translasyon sonucu elde edilen protein, His-işareti taşımaktadır. Bu işaret kullanılarak, anti-GHRH antikoru ile elde edilen görüntünün doğrulanması amacıyla, görüntüleme sonrası membrana strip yapılarak His-işaretime özgü antikor ile tekrar immunoblotlama yapılmıştır. His-işareti 10 adet His amino asidinden oluştuğundan yaklaşık 1,5 kDa ağırlığa sahiptir, ancak GHRH proteini ile konjuge olarak sentezlendiği için anti-GHRH immunoblotlama görüntüsü ile aynı yerde bantlar elde edilmiştir. Bu sayede anti-GHRH antikoru kullanılarak elde edilen bantların His-işareti GHRH proteinine ait olduğu doğrulanmıştır.



**Şekil 4.2. Yüksek hacimli bakteriden izole edilen total protein örneklerinde GHRH protein varlığının gösterilmesi**

Elde edilen bakteriyel protein lizatlarında GHRH proteininin varlığının immunoblotlama ile gösterilmesini takiben, bu protein lizatlarından His-GHRH proteininin saflaştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, elde edilen total protein lizatları His-manyetik boncuklarla birleştirilerek total protein içerisindeki GHRH

proteinlerinin His işaretlerinden manyetik boncuklara bağlanması sağlanmıştır. Bağlanma işlemi için öngörülen bağlanma süresi sonunda, manyetik boncuklara bağlanmayan protein örnekleri uzaklaştırılmış ve yıkama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Yıkamalar sonrasında Elusyon tamponu ile His işaretli GHRH proteinleri manyetik boncuklardan ayrıştırılarak, saflaştırılmış His-GHRH proteini elde edilmiştir. Saflaştırılan örneklerin konsantrasyon tayini Bradford yöntemi ile yapılmış ve saflaştırma işlemi ile elde edilen GHRH proteininin varlığı, GHRH özgül primerlerle yapılan immunoblotlama ile gösterilmiştir (Şekil 4.3). Şekil 4.3’de gösterilen GHRH immunoblotlama görüntüsünün doğrulanması amacıyla yine membrana stripleme yapılarak anti-His antikoruna ile yeniden immunoblotlama yapılmış ve GHRH sonucu ile aynı yerde sonuç elde edilmiştir (Şekil 4.3). Böylelikle, X-aptamer seçilim kitinde kullanılmak üzere His-GHRH proteini bakteriyel örneklerden saflaştırılmıştır.

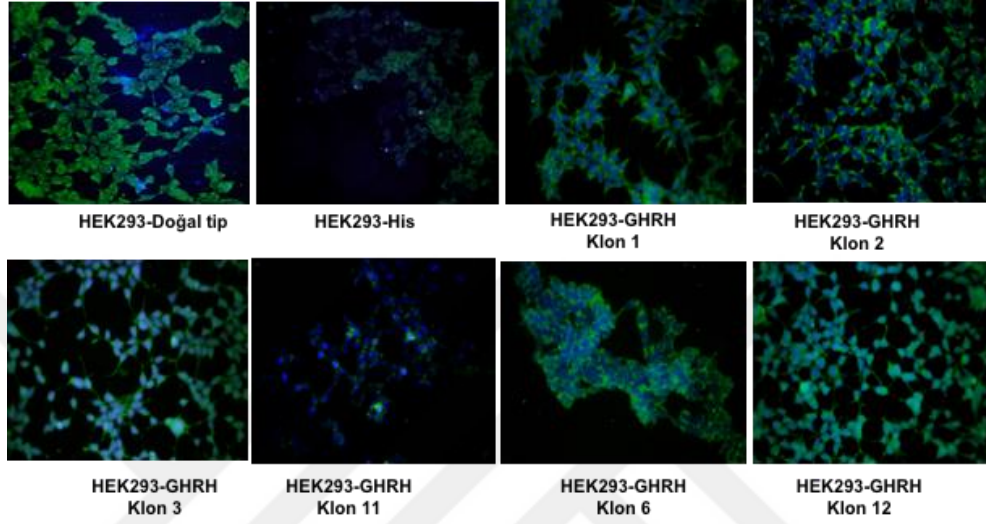


**Şekil 4.3. Saflaştırılan His-GHRH proteininin varlığının immunoblotlama ile gösterilmesi**

#### **4.2 Aptamer Sentezi İçin Hedef Proteinin Ökaryotik Kaynaktan Elde Edilmesi**

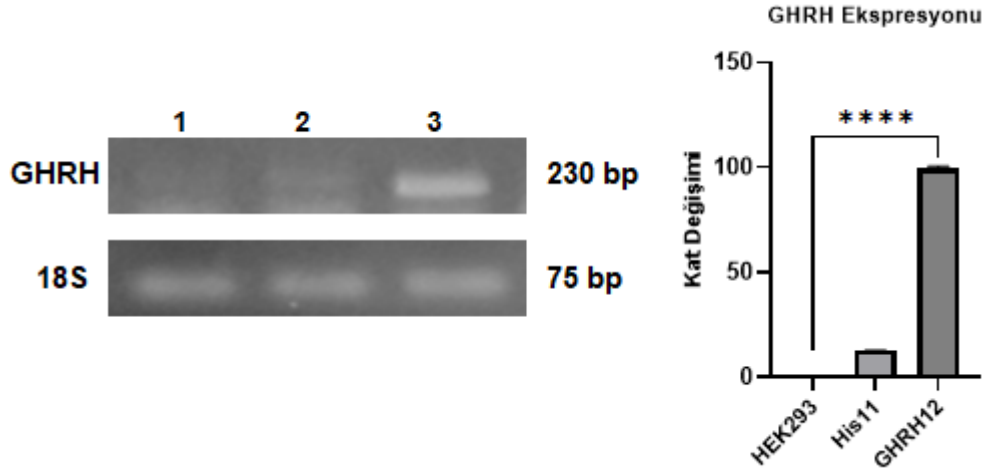
Bakteriyel kaynaktan His-GHRH proteininin saflaştırılmasının yanı sıra, prokaryotik sistemlerde post-translasyonel modifikasyonların olmaması nedeniyle ökaryotik kaynaktan da His-GHRH proteini elde edilmesi ve bu proteinlerin de aptamer seçiliminde hedef olarak kullanılması planlanmıştır. Bu nedenle, normal halde GHRH protein anlatımı görülmeyen insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293) kullanılmış ve bakterilere aktarılan His- (pCMV3-SP-N-His-NCV) ve His-GHRH (pCMV3-SP-His-ORF) vektörleri lipozomal ajan aracılığıyla HEK293 hücrelerine transfekte edilmiştir. Transfekte hücreler Higromisin seçilimine tabii tutulmuş ve 10-12 gün higromisin uygulaması sonucu oluşan koloniler toplanarak GHRH anlatımları

bakımından test edilmiştir. GHRH anlatımlarının test edilmesi için öncelikle immunofloresan yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde kullanılan anti-GHRH antikorunu tespit etmek için Alexa Fluor 488 ile konjuge edilmiş sekonder antikor uygulanmış ve mavi filtre ile yeşil ışımalar görüntülenmiştir. Hücrelerin nükleusları DAPI boyama ile belirlenmiştir. Buna göre GHRH klon 12’de GHRH ekspresyonu tespit edilmiştir (Şekil 4.4).



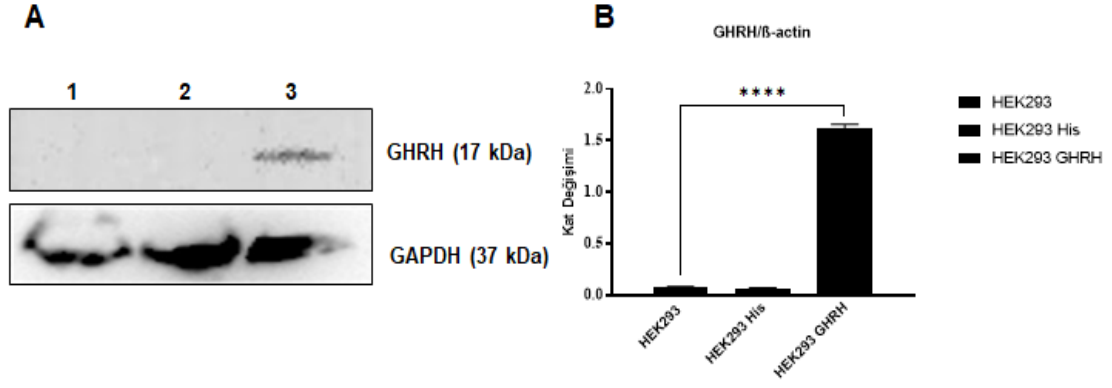
**Şekil 4.4. His ve His-GHRH transfekte edilen HEK293 kolonilerinde GHRH anlatımının immunofloresan yöntemi ile gösterilmesi**

İmmunofloresan yöntemiyle elde edilen sonuçların doğrulanması amacıyla HEK293 doğal tip, HEK293 His Klon 11 ve HEK293 GHRH Klon 12 hücrelerinden RNA izole edilerek cDNA’ya dönüştürülmüş ve GHRH ve 18S primerleri ile qRT-PCR yapılmıştır. Reaksiyon sonrası örnekler %1,5’luk agaroz jelde yürütülmüş, sayısal  $C_T$  değerleri kullanılarak da GHRH gen ifadesindeki değişiklikler PFAFFL yöntemiyle hesaplanmıştır. Yapılan sayısal analiz sonucunda HEK293 GHRH klon 12 hücrelerinde HEK293 doğal tip hücrelere kıyasla GHRH gen ifadesinde 99.96 katlık artış gösterilmiştir (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Örneklerin agaroz jel görüntüsü de bu datayı desteklemektedir (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5. His-GHRH vektörü transfekte edilen hücrelerde GHRH anlatımının qRT-PCR ile gösterilmesi (\*\*\*\* p<0,0001)**

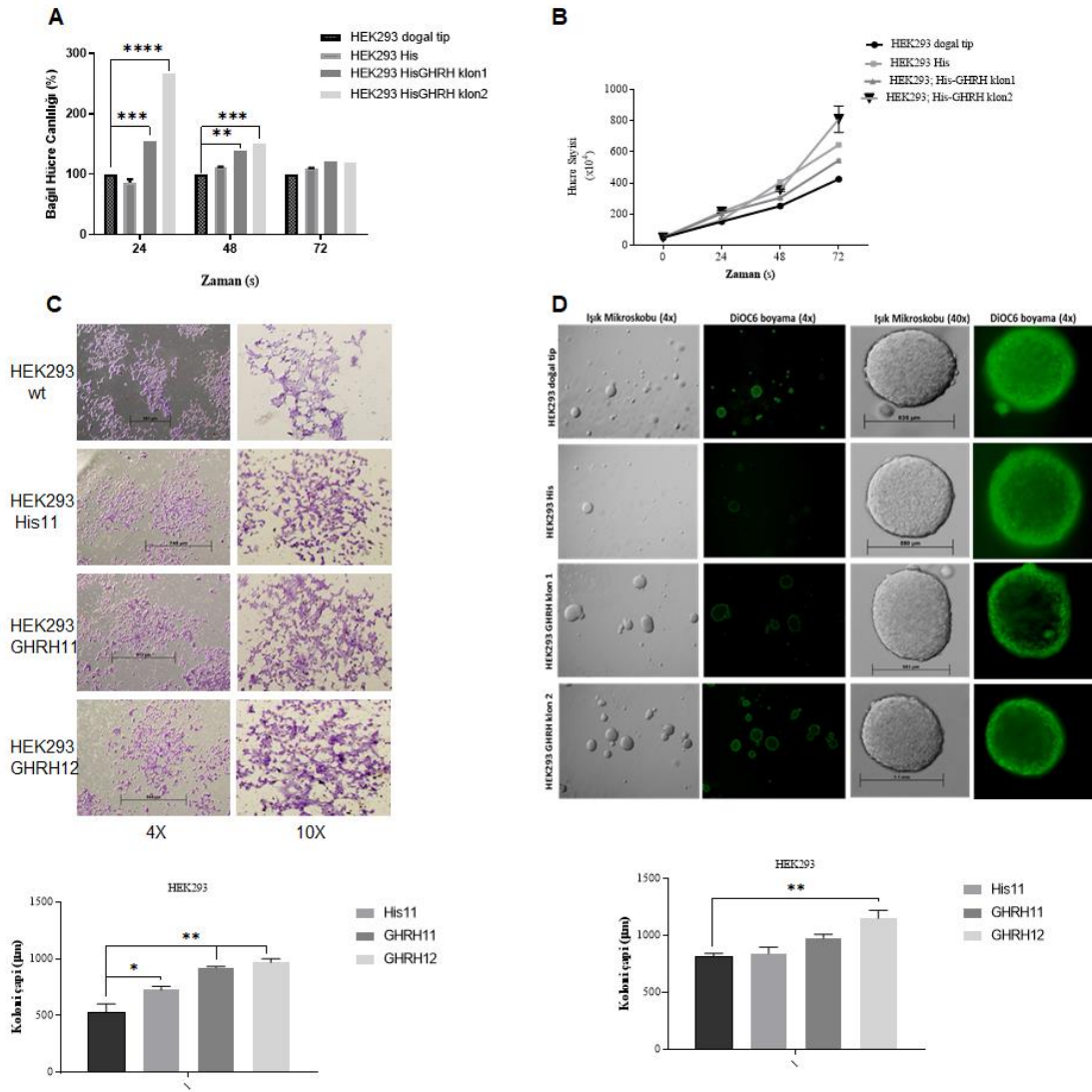
HEK293 hücrelerine His-GHRH vektörünün kalıcı transfeksiyonu sonrası hücrelerdeki GHRH ifadesindeki artışın protein seviyesinde gösterilmesi için hücrelerden total protein izole edilmiş, izole edilen proteinlerden 80 µg %15'lik SDS-poliakrilamid jelde ayrılmış ve PVDF membrana transfer sonrası anti-GHRH antikoruyla immunoblotlama yapılmıştır. Elde edilen sonuçta, beklendiği üzere, HEK293 doğal tip ve negatif kontrol His vektörü transfekte edilen hücrelerde GHRH protein anlatımı belirlenmezken His-GHRH vektörü transfekte edilen HEK293 GHRH Klon 12 hücrelerinde GHRH proteini anlatımı tespit edilmiştir. Ayrıca membrana strip yapılarak anti-GAPDH primeri ile yeniden immunoblotlama yapılmıştır. GAPDH, yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır (Şekil 4.6-A). GHRH bir hormon olduğundan dolayı, sentezlendikten sonra hücre dışına salınmaktadır. Bu nedenle, medyadaki GHRH miktarını kontrol etmek amacıyla, HEK293 doğal tip, His klon 11 ve GHRH klon 12 hücreleri 48 saat büyütüldükten sonra medyaları toplanarak filtreden geçirilmiş ve medyaya salınan GHRH miktarı GHRH ELISA testi ile kontrol edilmiştir. ELISA testi sonuçlarına göre doğal tip HEK293 hücrelerinde medyaya salınan GHRH konsantrasyonu 18,72 pg/ml iken, His klon 11 hücrelerinde 3,16 pg/ml, GHRH klon 12 hücrelerinde ise 685,38 pg/ml'dir. Medyaya salınan GHRH miktarlarındaki değişiklik grafik olarak verilmiştir (Şekil 4.6-B) (\*\*\*\*p<0,0001).



**Şekil 4.6. His-GHRH vektörü transfekte edilen HEK293 hücrelerindeki A. GHRH protein anlatımının immunoblotlama ile gösterilmesi B. Medyaya salınan GHRH miktarının GHRH ELISA yöntemi ile belirlenmesi**

(\*\*\*\* $p < 0,0001$ )

HEK293 hücrelerinde GHRH anlatımının artırılmasının biyolojik aktiviteye etkisinin de belirlenmesi ve GHRH anlatım artışıyla sinyal yolağının indüklendiğinin gösterilmesi amacıyla, HEK293 doğal tip, His- vektörü transfekte edilen ve His-GHRH vektörü transfekte edilen hücrelerde hücre proliferasyonu, sağ kalımı ve koloni oluşturma kapasitesini göstermek için MTT hücre proliferasyonu testi, hücre sağkalım analizi, kristal viyole koloni formasyon testi ve yumuşak agar koloni formasyon deneyi yapılmıştır. Yapılan MTT hücre proliferasyon testi ile His-GHRH transfekte edilen hücrelerde kontrol hücrelere kıyasla hücre proliferasyonunda önemli ölçüde artış olduğu görülmektedir (Şekil 4.7-A). Her 24 saatte bir canlı hücrelerin sayıldığı sağkalım analizinde de His-GHRH vektörü transfekte edilen hücrelerde canlı hücre sayısının doğal tipe göre zamana bağlı olarak arttığı gösterilmiştir (Şekil 4.7-B). Kristal viyole ve yarı yumuşak agar koloni formasyon deneylerinde ise His-GHRH vektörü transfekte edilen hücrelerin oluşturduğu kolonilerin çaplarının doğal tip hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.7-C,D) (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

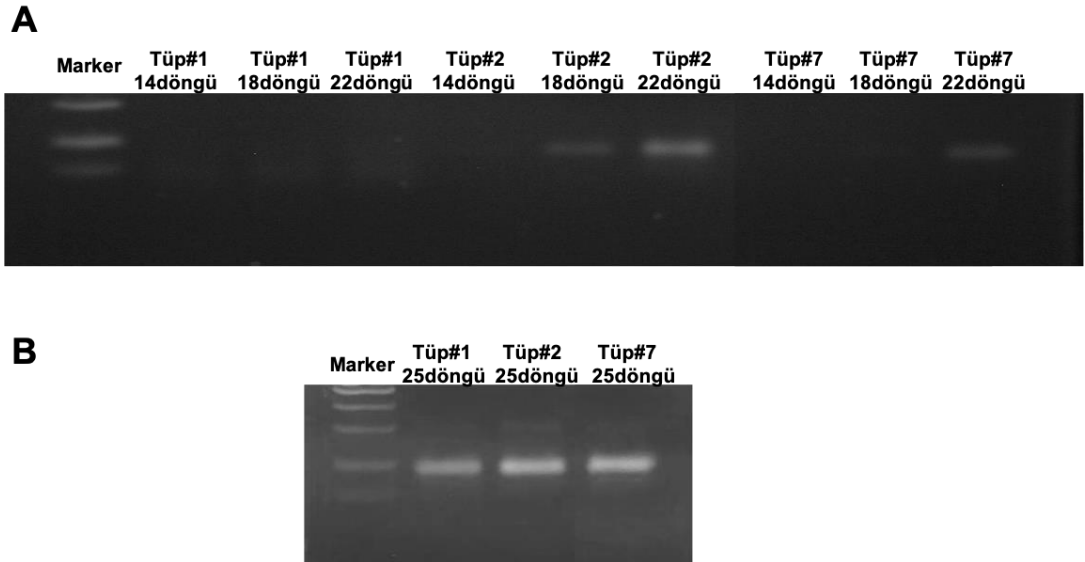


**Şekil 4.7. GHRH ifadesinin arttırılmasının HEK293 hücre proliferasyonu, büyümesi ve koloni oluşumuna etkisinin gösterilmesi. A. MTT hücre proliferasyonu yöntemi B. Hücre sağkalım analizi C. Kristal viyole koloni formasyonu deneyi D. Yarı yumuşak agar koloni formasyonu deneyi (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ )**

### 4.3 X-Aptamer Seçilimi

Aday X-aptamerlerin seçilimi için hedef proteinlerin elde edilmesinin ardından X-aptamer seçilimine geçilmiştir. Bu amaçla öncelikle Seçilim Tamponu A ve B hazırlanmış ve X-aptamer kütüphanesi bu tamponlarla hazırlanmıştır. Yöntem, His veya Biotin işaretli proteinlerin, bu işaretlere afinitesi olan manyetik boncuklara tutturulmasına dayanmaktadır. Bu nedenle öncelikle X-aptamer kütüphanesi manyetik

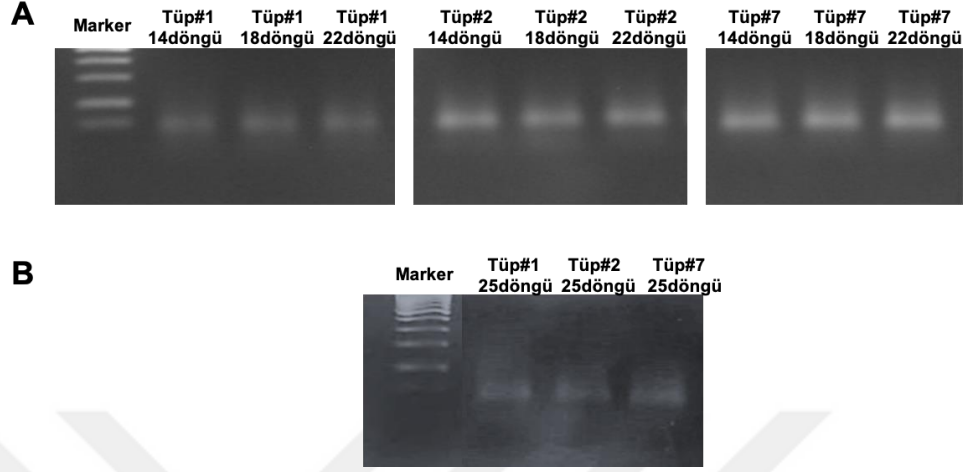
boncuklarla bir araya getirilerek boncuğa afinite gösteren aday X-aptamerler kütüphaneden uzaklaştırılmıştır (Negatif seçim). Bu aşamadan sonra hem bakteriyel hem ökaryotik kaynaklı His-GHRH proteini hedef olarak kullanılacağı için aptamer kütüphanesi ikiye bölünmüştür. Hedef proteinler (bakteriyel kaynaklı ve ökaryotik kaynaklı) manyetik boncuklarla birleştirildikten sonra X-aptamer kütüphanesiyle bir araya getirilmiştir. Hedef proteine bağlanan aday X-aptamerlerin hedef proteinden ayrılması işlemi sıcaklık ve sodyum hidroksit uygulamasıyla gerçekleştirilmiş ve kesilmiş oligonükleotid havuzu elde edilmiştir. Prokaryotik His-GHRH hedefine yönelik gerçekleştirilen kısımda üretici firmanın önerisine göre 3 tane tüp hazırlanmıştır (Tüp #1, Tüp #2 ve Tüp #7). Tüp #1'e, sadece kesilmiş oligonükleotid havuzu, Tüp #2'ye kesilmiş oligonükleotid havuzu ile birlikte manyetik boncuklar ve hedef protein, Tüp #7'ye ise kesilmiş oligonükleotid havuzu ve manyetik boncuklar eklenmiştir. İnkübasyon süreleri sonunda tüplerdeki örnekler kalıp olarak kullanılarak 14 döngü, 18 döngü ve 22 döngü PZR yapılmıştır (Şekil 4.8-A). Tüp #2 ve Tüp #7 için artan döngü sayısı ile birlikte PZR ürün miktarında artma tespit edilmiştir. Ancak Tüp #1'de PZR reaksiyonu çalışmadığı için üreticinin önerisiyle ilave başlangıç havuzu PZR yapılmıştır. Her üç tüpteki örnekler için tekrar 25 döngü PZR yapılmış (Şekil 4.8-B) ve tüpler bir araya getirilerek dizileme için hazır hale getirilmiştir.



**Şekil 4.8. Prokaryotik His-GHRH hedefine yönelik gerçekleştirilen X-aptamer seçilimi PZR görüntüleri**

Ökaryotik His-GHRH hedefine yönelik seçim yine aynı şekilde gerçekleştirilmiştir. Değişen döngü sayılarında yapılan PZR reaksiyonu sonuçlarında, her 3 tüpte de

reaksiyon gözlemlenmiştir (Şekil 4.9-A). Reaksiyon sonuçlarına göre her 3 tüp için de tekrardan 22 döngü PZR yapılmış ve tüpler bir araya getirilerek dizileme için hazır hale getirilmiştir (Şekil 4.9-B)



**Şekil 4.9. Ökaryotik His-GHRH hedefine yönelik gerçekleştirilen X-aptamer seçilimi PZR görüntüleri**

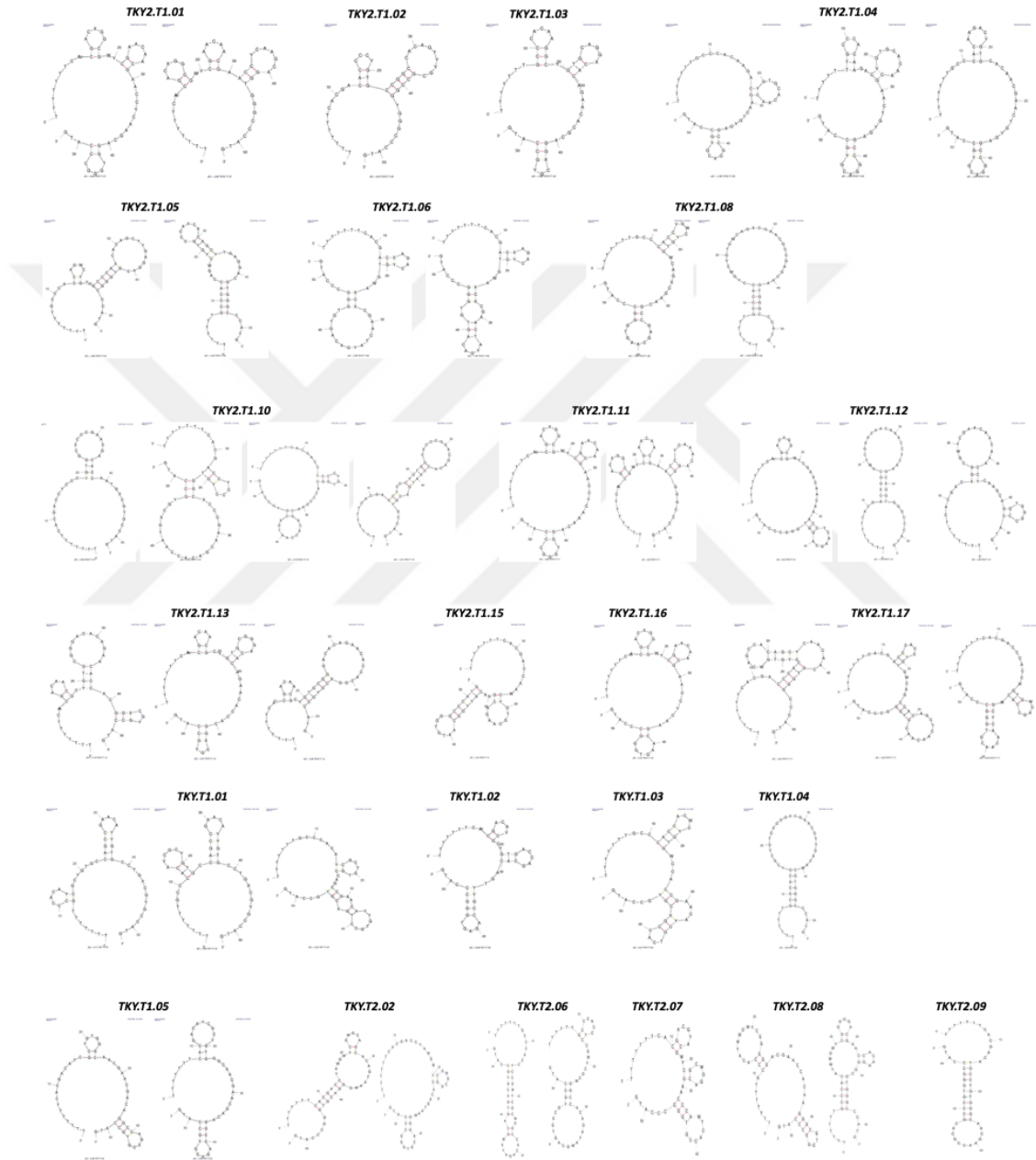
Prokaryotik ve ökaryotik hedeflere yönelik hazırlanan tüplerdeki örnekler kitin temin edildiği firmaya geri gönderilmiş ve firma, yeni nesil dizileme yöntemi ile tüplerde bulunan aday X-aptamerlerin dizilerini belirlemiştir. Bu kapsamda elde edilen aday x-aptamerlerin dizileri Tablo 2’de verilmiştir.

**Tablo 2. Aday X-aptamerlerin adları ve nükleotid dizileri**

TKY2.T1.01	TTTTTTCACGACXGGCGWYCGAACAACGAACCYCAAGCAGGTGGGCCCATG
TKY2.T1.02	TTTTTTCACGACACCCYGTGCCGGCCACAGTYYGCGCCGGTGGGCCCATG
TKY2.T1.03	TTTTTTTGCCACAAAGGCGTGCAGGXCACAGAACACGCAGGXCGYGCCATG
TKY2.T1.04	TTTTTTTGCCACAAGACYGTGCACAACGAAGTGYGAGCCGGXCGYGCCATG
TKY2.T1.05	TTTTTTTGCCACCAGWCYGTGCCAXCACAGCYGAGGACGTGGGCCCATG
TKY2.T1.06	TTTTTTCACGACXAGACYGTGWAXCXCGAAGTAYGACAGTGTGGGCCCATG
TKY2.T1.08	TTTTTTTGCCACCYGCYGTGWCAGXCAGAACGCCGAGCAAGTGGGCCCATG
TKY2.T1.10	TTTTTTCACGACCYCCYGTGGCXCCGAACGACACCAATGXCGYGCCATG
TKY2.T1.11	TTTTTTCACGACXGGCGWYCGAACAACGAACCYCAAACAGGTGGGCCCATG
TKY2.T1.12	TTTTTTCACGACXGGCGWYCGAACAACAAACCYCAAGCAGGTGGGCCCATG
TKY2.T1.13	TTTTTTCACGACAACGCGTGCAGGACACAGAACCACGGXCGYGCCATG
TKY2.T1.15	TTTTTTCACGACCAAWCYGTGCAAGACGAACAYGGCAATGTGGGCCCATG
TKY2.T1.16	TTTTTTCACGACXGGCGWYCGAACAACGAACCYCAAGCAAGTGGGCCCATG
TKY2.T1.17	TTTTTTCACGACCACCYGTGWCAGCCACAGCYCAACAACGTGGGCCCATG
TKY.T1.01	TTTTTTGCCCACAYCGCYGTGCCAGCCGAACAYYGTGCCTGXCGYGCCATG
TKY.T1.02	TTTTTTCACGACAYCGCYGTGACCAGCACAGTYYGCCAGAGTGGGCCCATG
TKY.T1.03	TTTTTTGCCCACCACWCYGTGWCCACCGAACAYCGTCACCGXCGYGCCATG
TKY.T1.04	TTTTTTGCCCACGYCGCYGTGAGGGXCGAACGYGACAWCGTGGGCCCATG
TKY.T1.05	TTTTTTCACGACAYCGCYGTGGGCAACGAACGACAGGCCAGGXCGYGCCATG

#### 4.4 Aday X-Aptamerlerin Olası İki Boyutlu Yapılarının Belirlenmesi

Aday X-aptamerlerin dizilerinin belirlenmesini takiben, bu aday X-aptamerler 5' ucu biyotin işaretli olarak firma tarafından sentezlenmiştir. Bir sonraki aşamada aday X-aptamerlerin olası iki boyutlu yapıları “mfold” [122] programı ile çizilmiştir (<http://www.unafold.org/mfold/applications/dna-folding-form.php>) (Şekil 4.10)

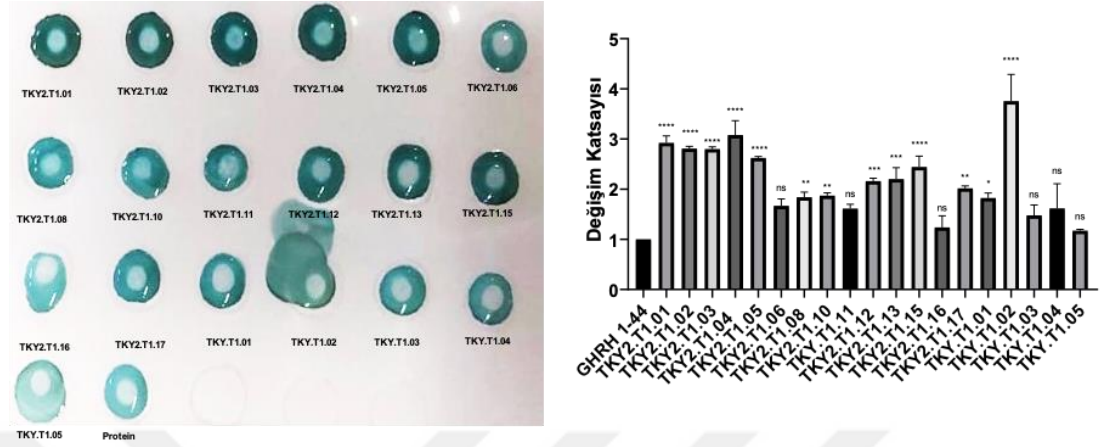


Şekil 4.10. Aday x-aptamerlerin olası iki boyutlu şekilleri

#### 4.5 Aday X-Aptamerlerin Hedef Proteine Bağlanma Afinitelerinin Dot Blot Yöntemi ile Gösterilmesi

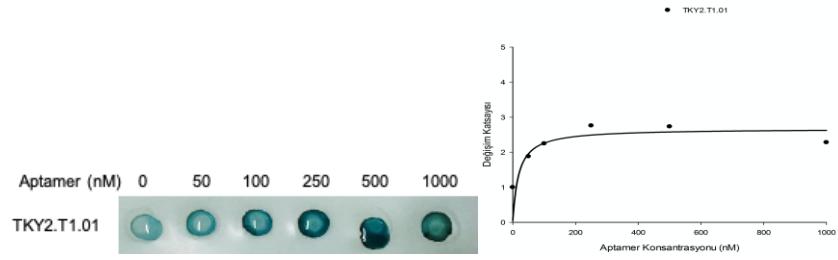
Aday X-aptamerlerin olası 2 boyutlu şekillerinin belirlenmesinin ardından, bu aptamerlerin hedef proteine bağlanma afinitelerinin gösterilmesi amacıyla Dot Blot yöntemi uygulanmıştır. Kısaca, hedef protein aday X-aptamerlerle bağlandıktan sonra nitroselüloz membrana emdirilmiş ve HRP/TMB solüsyonları ile kolorimetrik analiz yapılmıştır. Bu kapsamda öncelikle, sabit aptamer dozu ve sabit protein dozu kullanılarak genel afinite taraması yapılmıştır. Elde edilen dot yoğunlukları Image J programı ile ölçülmüş ve aptamer uygulanmayan hedef proteinin dot yoğunluğuna kıyasla aptamer uygulamalarının dot yoğunluğunu ne kadar arttırdığı hesaplanmıştır (Şekil 4.11). Buna göre, TKY2.T1.01 için hedef proteine bağlanma eğilimi dot-blot bant yoğunluğu değerlerine göre 2,92 kat artmıştır. TKY2.T1.02 için hedef proteine bağlanma eğilimi dot-blot bant yoğunluğu değerlerine göre 2,80 kat artmıştır. TKY2.T1.03 için hedef proteine bağlanma eğilimi dot-blot bant yoğunluğu değerlerine göre 2,80 kat artmıştır. TKY2.T1.04 için hedef proteine bağlanma eğilimi dot-blot bant yoğunluğu değerlerine göre 3,07 kat artmıştır. TKY2.T1.05 için hedef proteine bağlanma eğilimi dot-blot bant yoğunluğu değerlerine göre 2,62 kat artmıştır. TKY2.T1.06 için hedef proteine bağlanma eğilimi dot-blot bant yoğunluğu değerlerine göre 1,66 kat artmıştır. TKY2.T1.08 için hedef proteine bağlanma eğilimi dot-blot bant yoğunluğu değerlerine göre 1,83 kat artmıştır. TKY2.T1.10 için hedef proteine bağlanma eğilimi dot-blot bant yoğunluğu değerlerine göre 1,87 kat artmıştır. TKY2.T1.11 için hedef proteine bağlanma eğilimi dot-blot bant yoğunluğu değerlerine göre 1,61 kat artmıştır. TKY2.T1.12 için hedef proteine bağlanma eğilimi dot-blot bant yoğunluğu değerlerine göre 2,15 kat artmıştır. TKY2.T1.13 için hedef proteine bağlanma eğilimi dot-blot bant yoğunluğu değerlerine göre 2,2 kat artmıştır. TKY2.T1.15 için hedef proteine bağlanma eğilimi dot-blot bant yoğunluğu değerlerine göre 2,44 kat artmıştır. TKY2.T1.16 için hedef proteine bağlanma eğilimi dot-blot bant yoğunluğu değerlerine göre 1,23 kat artmıştır. TKY2.T1.17 için hedef proteine bağlanma eğilimi dot-blot bant yoğunluğu değerlerine göre 2,01 kat artmıştır. TKY.T1.01 için hedef proteine bağlanma eğilimi dot-blot bant yoğunluğu değerlerine göre 1,82 kat artmıştır. TKY.T1.02 için hedef proteine bağlanma eğilimi dot-blot bant yoğunluğu değerlerine göre 3,75 kat artmıştır. TKY.T1.03 için hedef proteine bağlanma eğilimi dot-blot bant yoğunluğu değerlerine göre 1,47 kat artmıştır.

TKY.T1.04 için hedef proteine bağlanma eğilimi dot-blot bant yoğunluğu değerlerine göre 1,61 kat artmıştır. TKY.T1.05 için hedef proteine bağlanma eğilimi dot-blot bant yoğunluğu değerlerine göre 1,17 kat artmıştır.

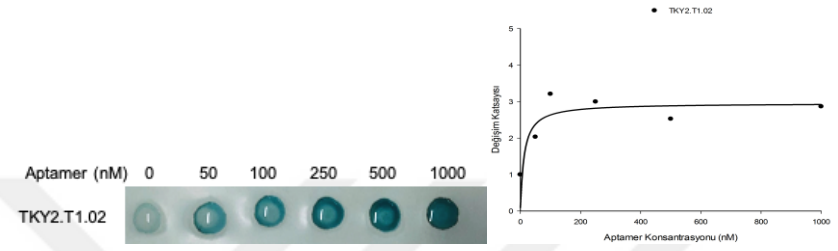


**Şekil 4.11. Aday X-aptamerlerin hedef proteine bağlanma afinitelerinin dot-blot yöntemi ile gösterilmesi (\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001)**

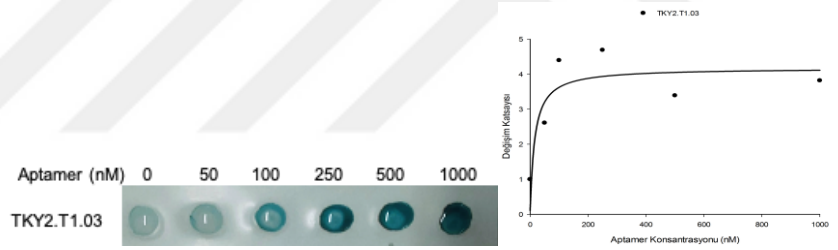
Aday X-aptamerlerin sabit aptamer ve protein konsantrasyonlarında hedef proteine bağlanma afinitelerinin gösterilmesinin ardından artan aptamer dozuna bağlı olarak aday X-aptamerlerin bağlanma afinitesindeki değişimler yine dot blot yöntemi ile gösterilmiş ve elde edilen dot yoğunluklarına göre konsantrasyona bağlı olarak bağlanma afinitesindeki değişiklik grafiği çizilmiştir. Çizilen grafikler üzerinden non-lineer regresyon analizi yapılmış ve aptamerlerin hedeften ayrılma katsayısı ( $K_d$ , Dissociation constant) Sigma Plot programı ile hesaplanmıştır. Buna göre TKY2.T1.01 aptamerinin  $K_d$  değeri 18,317 nM olarak, TKY2.T1.02 aptamerinin  $K_d$  değeri 12,173 nM olarak, TKY2.T1.03 aptamerinin  $K_d$  değeri 15,168 nM olarak, TKY2.T1.04 aptamerinin  $K_d$  değeri 32,969 nM olarak, TKY2.T1.05 aptamerinin  $K_d$  değeri 2,911 nM olarak, TKY2.T1.06 aptamerinin  $K_d$  değeri 36,07 nM olarak, TKY2.T1.08 aptamerinin  $K_d$  değeri 22,708 nM olarak, TKY2.T1.11 aptamerinin  $K_d$  değeri 149,05 nM olarak, TKY2.T1.13 aptamerinin  $K_d$  değeri 57,536 nM olarak, TKY2.T1.15 aptamerinin  $K_d$  değeri 115,612 nM olarak, TKY2.T1.17 aptamerinin  $K_d$  değeri 34,88 nM olarak, TKY.T1.03 aptamerinin  $K_d$  değeri 2,50 nM olarak, TKY.T1.04 aptamerinin  $K_d$  değeri 6,09 nM olarak, TKY.T1.05 aptamerinin  $K_d$  değeri 22,71 nM olarak belirlenmiştir (Şekil 4.12- Şekil 4.28).



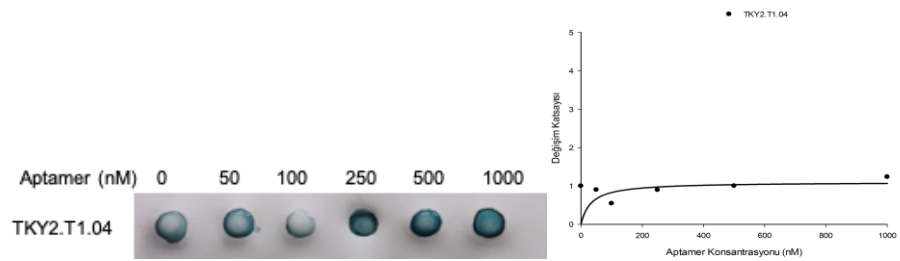
**Şekil 4.12. TKY2.T1.01 aptamerinin doza bağı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi**



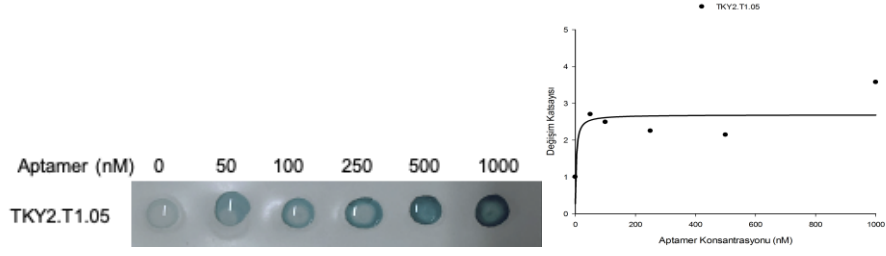
**Şekil 4.13. TKY2.T1.02 aptamerinin doza bağı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi**



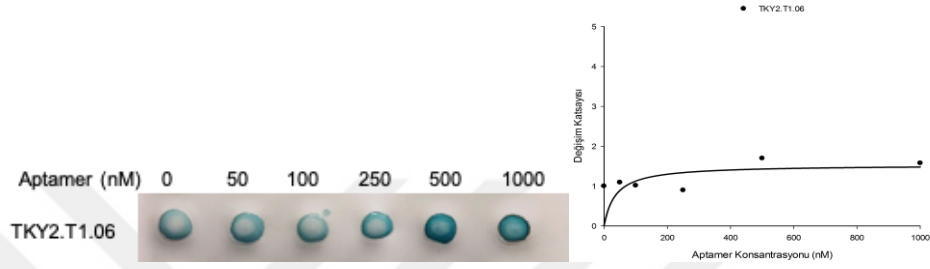
**Şekil 4.14. TKY2.T1.03 aptamerinin doza bağı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi**



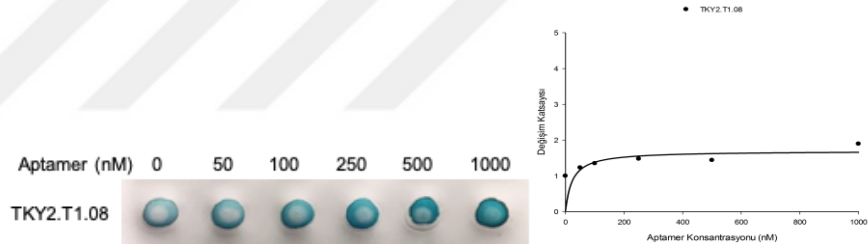
**Şekil 4.15. TKY2.T1.04 aptamerinin doza bağı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi**



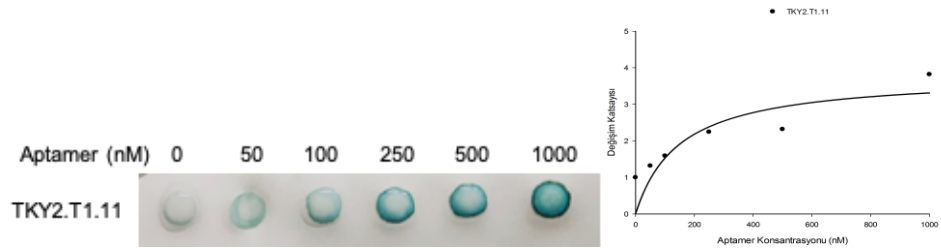
**Şekil 4.16. TKY2.T1.05 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi**



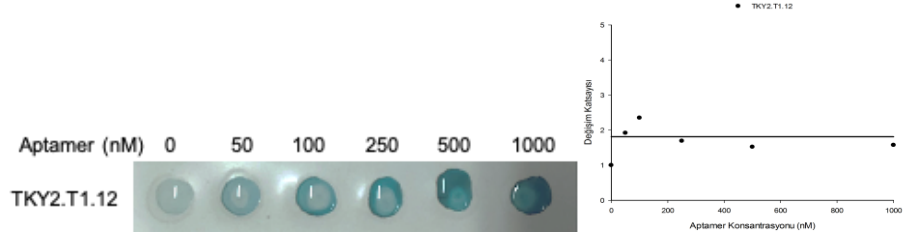
**Şekil 4.17. TKY2.T1.06 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi**



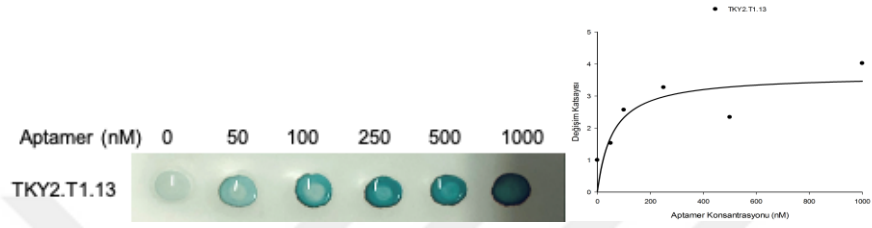
**Şekil 4.18. TKY2.T1.08 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi**



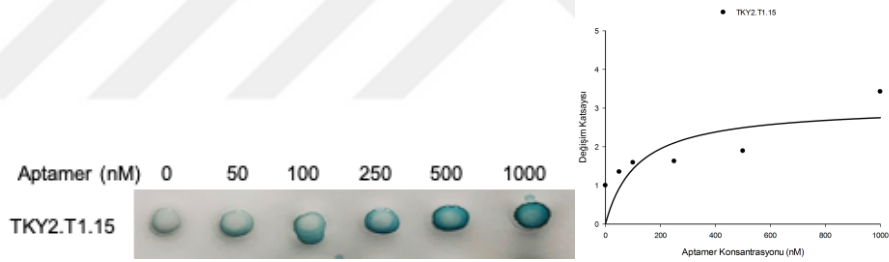
**Şekil 4.19. TKY2.T1.11 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi**



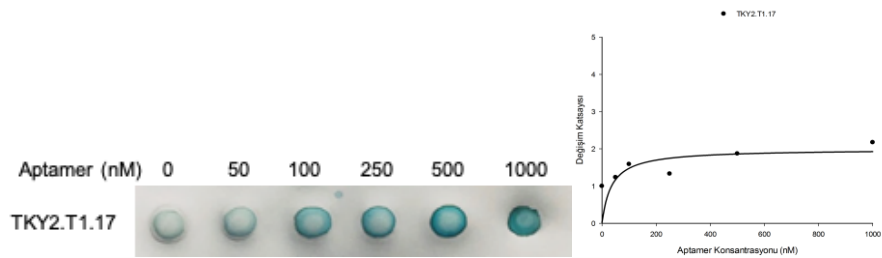
**Şekil 4.20. TKY2.T1.12 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi**



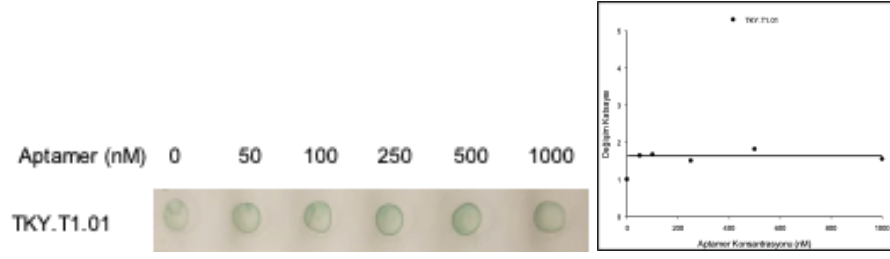
**Şekil 4.21. TKY2.T1.13 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi**



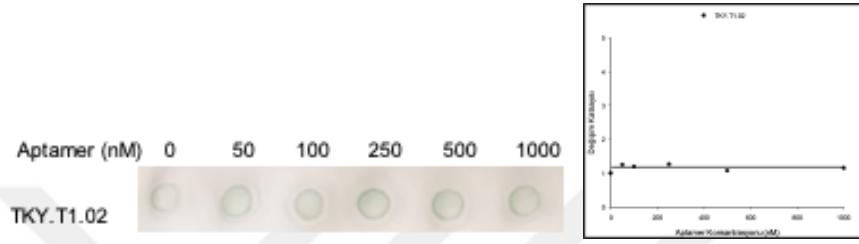
**Şekil 4.22. TKY2.T1.15 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi**



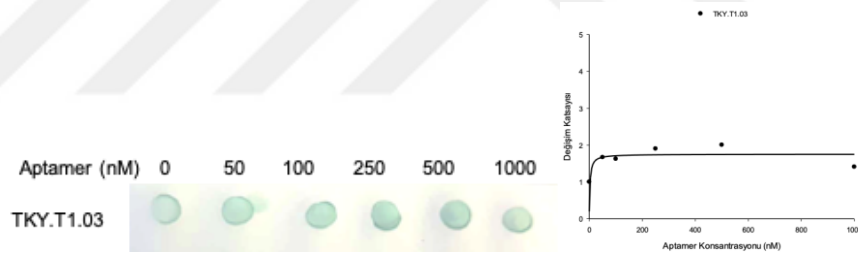
**Şekil 4.23. TKY2.T1.17 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi**



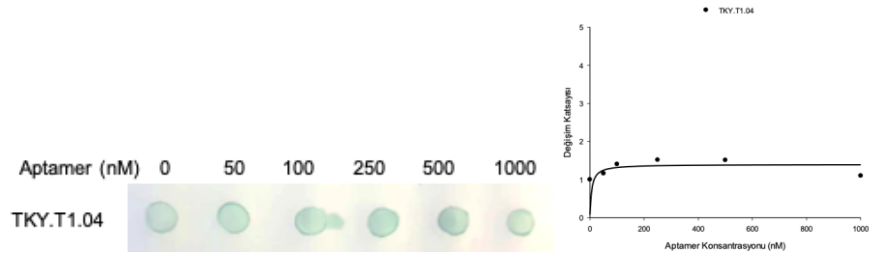
**Şekil 4.24. TKY.T1.01 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi**



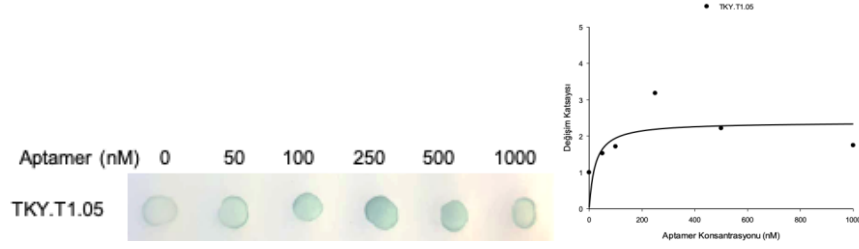
**Şekil 4.25. TKY.T1.02 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi**



**Şekil 4.26. TKY.T1.03 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi**

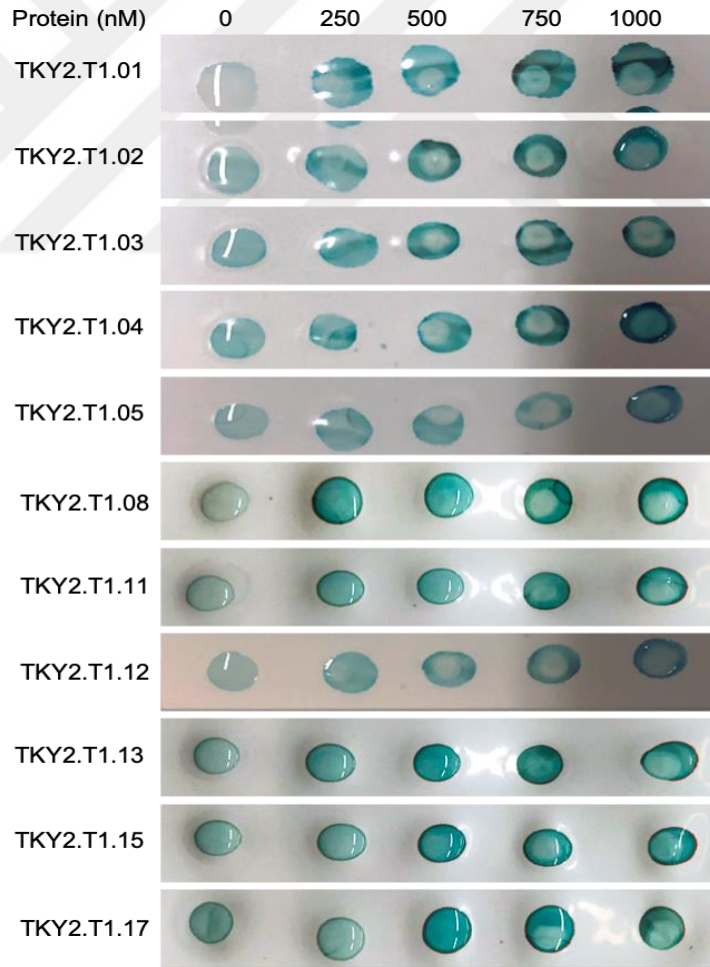


**Şekil 4.27. TKY.T1.04 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi**



**Şekil 4.28. TKY.T1.05 aptamerinin doza bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi**

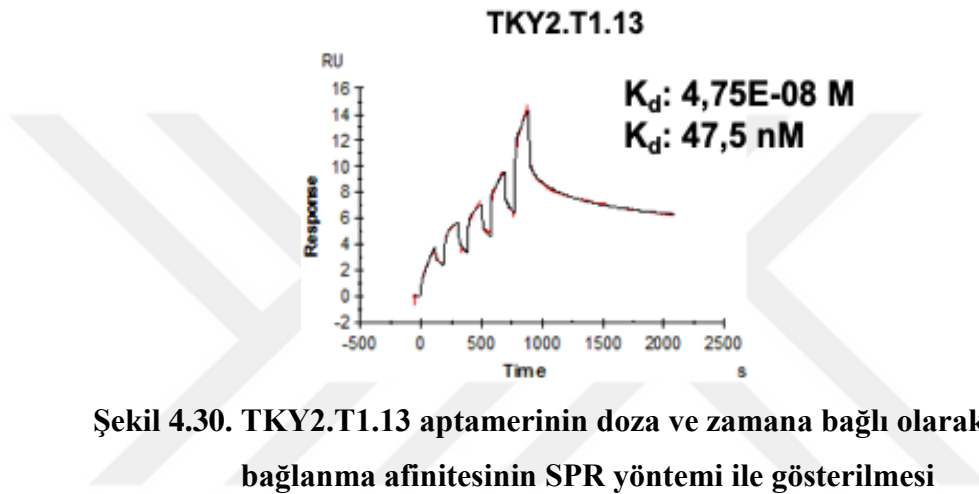
Aday X-aptamerlerin artan aptamer dozunda hedef proteine bağlanma afinitelerinin gösterilmesinin ardından artan protein dozuna bağlı olarak aday X-aptamerlerin bağlanma afinitesindeki değişimler yine dot blot yöntemi ile gösterilmiş ve elde edilen dot yoğunluklarına göre hedef protein konsantrasyonuna bağlı olarak bağlanma afinitesindeki değişiklik grafiği çizilmiştir (Şekil 4.29).



**Şekil 4.29. Aday x-aptamerinin hedef protein dozuna bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin dot blot yöntemi ile gösterilmesi**

#### 4.6 Aday X-Aptamerlerin Hedef Proteine Bağlanma Afinitelerinin SPR Yöntemi ile Gösterilmesi

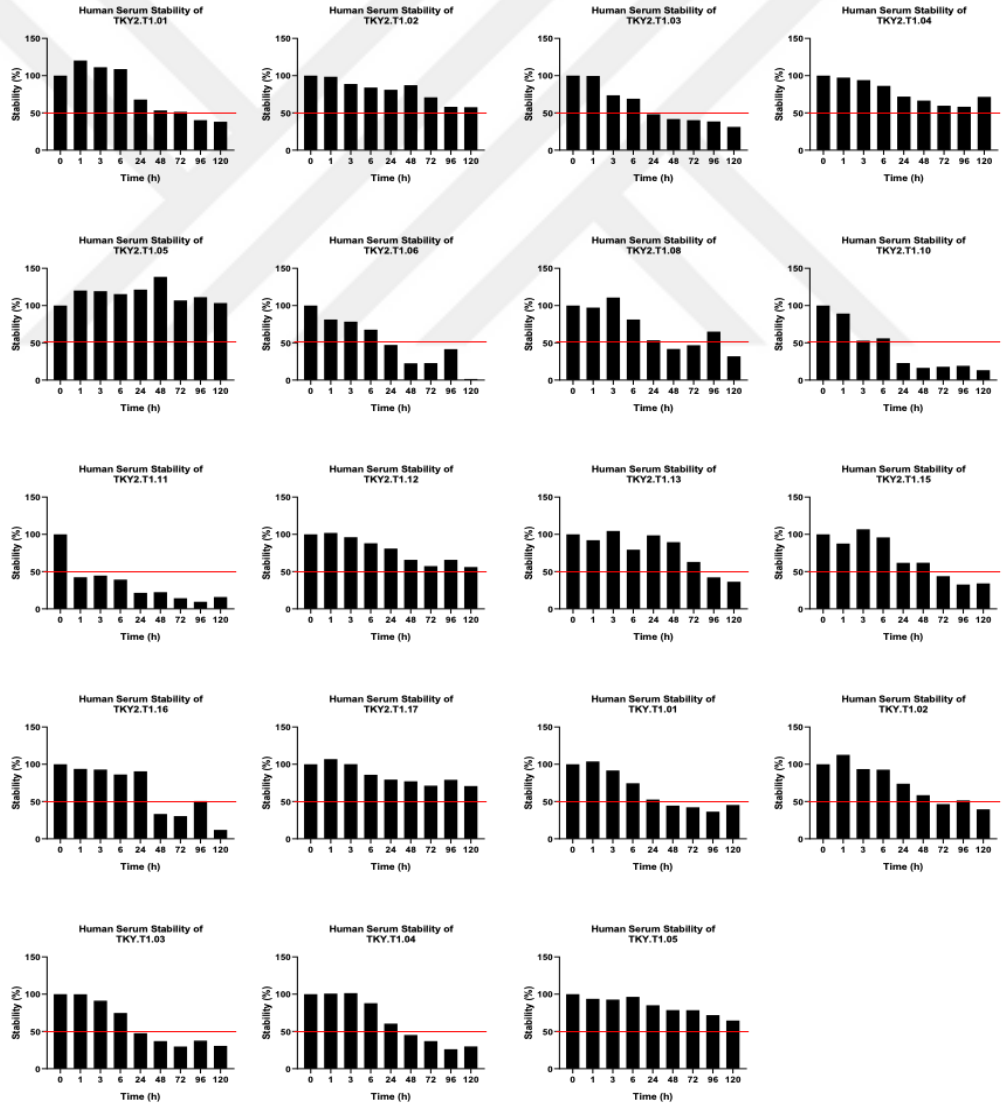
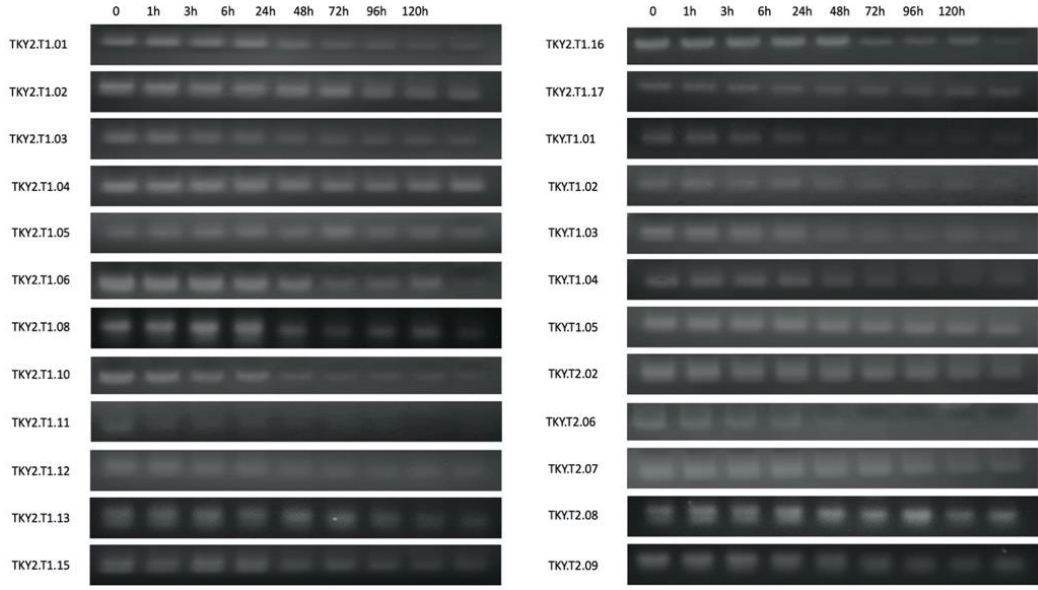
Moleküller arasındaki etkileşimlerin analiz edilmesinde kullanılan SPR yöntemi, aday x-aptamer ve hedef protein arasındaki doza ve zamana bağlı etkileşimin gösterilmesi amacıyla kullanılmıştır. Deney, gerçek zamanlı olarak gerçekleştirilmiş olup, elde edilen sonuçlar grafiğe aktarılarak disosiasyon sabiti ( $K_d$ ) hesaplanmıştır. Deney üç tekrarlı gerçekleştirilmiş ve  $K_d$  değerleri TKY2.T1.13 aptameri için 47,5 nM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. TKY2.T1.13 aptamerinin doza ve zamana bağlı olarak hedefe bağlanma afinitesinin SPR yöntemi ile gösterilmesi

#### 4.7 Aday X-Aptamerlerin Serum Stabilitesinin Belirlenmesi

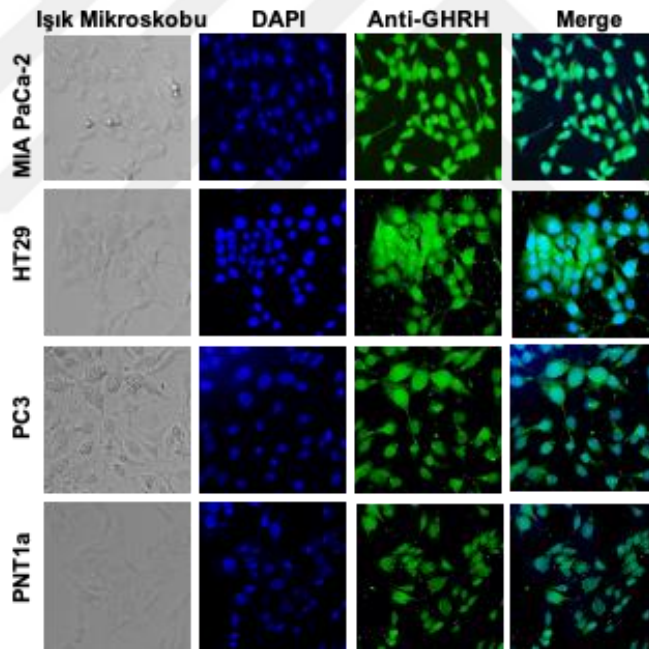
Aptamerlerin insan serum içerisindeki stabilitesinin belirlenmesi amacıyla aday X-aptamerler insan serumu ile bir araya getirilerek 0 saat, 1 saat, 3 saat, 6 saat, 24 saat, 48 saat, 72 saat, 96 saat ve 120 saat inkübe edilmiş ve süre sonunda %2,5'lük agaroz jelde görüntülenmiştir. Jel görüntüsü incelendiğinde 48 saat sonunda aptamerlerin büyük ölçüde degrade olduğu belirlenmiştir. Jelde görüntülenen bant yoğunlukları ölçülerek 0. saate kıyasla grafik çizilmiştir. TKY2.T1.08 kodlu aptamer 72 saat sonunda %46 oranında stabil kalabilirken, TKY2.T1.13 kodlu aptamer ise 48 saat sonunda %89 oranında 72 saat sonunda ise %63 oranında stabil kalabilmiştir (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. Aday X-Aptamerlerin Serum Stabilitelerinin Belirlenmesi.

#### 4.8 Farklı Kanser Hücrelerinin Endojen GHRH Ekspresyonlarının Belirlenmesi

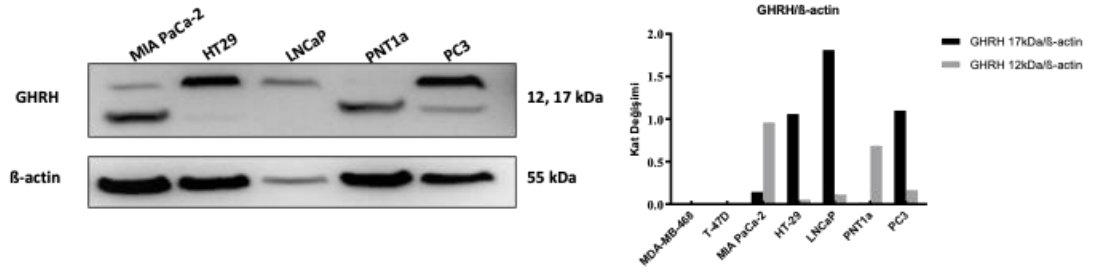
Aday X-aptamerlerin hücre dışı ortamda hedef proteine bağlanma afinitelerinin dot blot yöntemi ile gösterilmesinin ardından, bu aptamerlerin hücrelerde eksprese edilen endojen hedef GHRH'ye bağlanma afinitelerinin gösterilmesi ve biyolojik aktivitesinin test edilmesi amacıyla, literatürde GHRH proteini eksprese ettiği bilinen pankreas kanseri, kolorektal kanser ve prostat kanseri hücre hatlarıyla hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Aday X-aptamerlerin hücelere uygulanması öncesinde hücre kültüründe kullanılacak olan hücreler GHRH ekspresyonu bakımından test edilmiştir. Bu amaçla öncelikle pankreas kanseri MIA PaCa-2, kolorektal kanser HT29, prostat kanseri PC3 ve sağlıklı prostat epiteli PNT1a hücreleri büyütülerek anti-GHRH antikoruna ile immunofloresan yapılmış ve çalışılan hücre hatlarındaki GHRH ekspresyonu gösterilmiştir (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. Hücrelerdeki GHRH ekspresyonunun immunofloresan yöntemi ile gösterilmesi

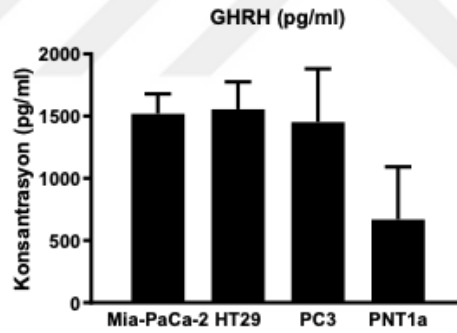
İmmunofloresan deneyini doğrulamak amacıyla hücrelerden protein izole edilerek anti-GHRH, anti-GHRH-R ve anti- $\beta$ -actin primer antikorları kullanılarak immunoblotlama yapılmıştır. Yapılan immunoblotlama sonucunda hücrelerin, farklı seviyelerde olmakla birlikte, GHRH proteinini eksprese ettikleri belirlenmiştir. Elde edilen jel görüntülerindeki bant yoğunlukları Image J programı ile ölçülerek yükleme

kontrolü olarak kullanılan  $\beta$ -actin bantlarının yoğunluklarına oranlanmış ve ekspresyon değişimi hesaplanarak grafik çizilmiştir (Şekil 4.33).



**Şekil 4.33. Hücrelerdeki GHRH ekspresyonunun immunoblotlama yöntemi ile gösterilmesi (\*\*\*\* $p < 0,0001$ )**

GHRH bir hormon olduğundan dolayı sentez sonrası paketlenip salgılanması ihtimali düşünülerek, çalışılan hücrelerde medyaya salınan GHRH miktarı ELISA yöntemi ile hesaplanmıştır. MIA PaCa-2 hücrelerinde medyadaki GHRH miktarı 1518 pg/ml iken, HT29 hücrelerinde 1556 pg/ml, PC3 hücrelerinde 1453 pg/ml ve PNT1a hücrelerinde 668 pg/ml'dir (Şekil 4.34).

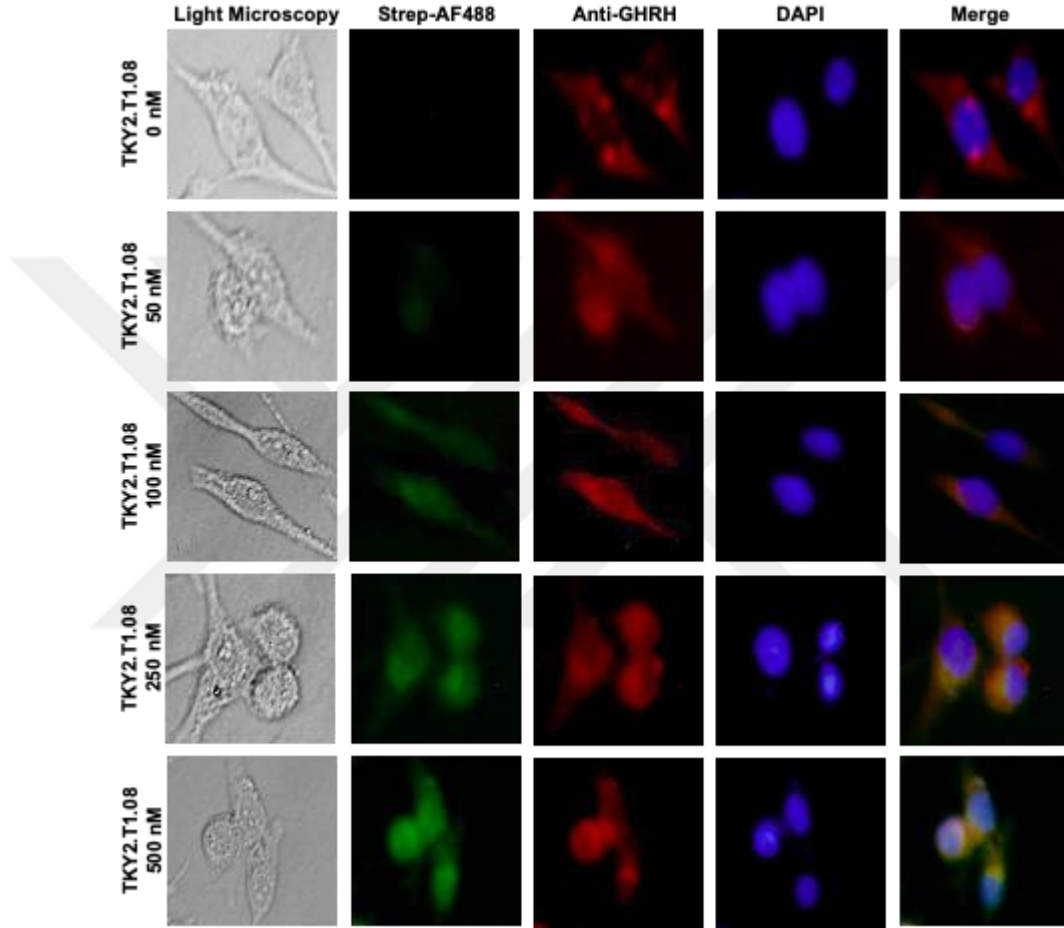


**Şekil 4.34. Hücrelerde medyaya salınan GHRH miktarının ELISA yöntemi ile hesaplanması**

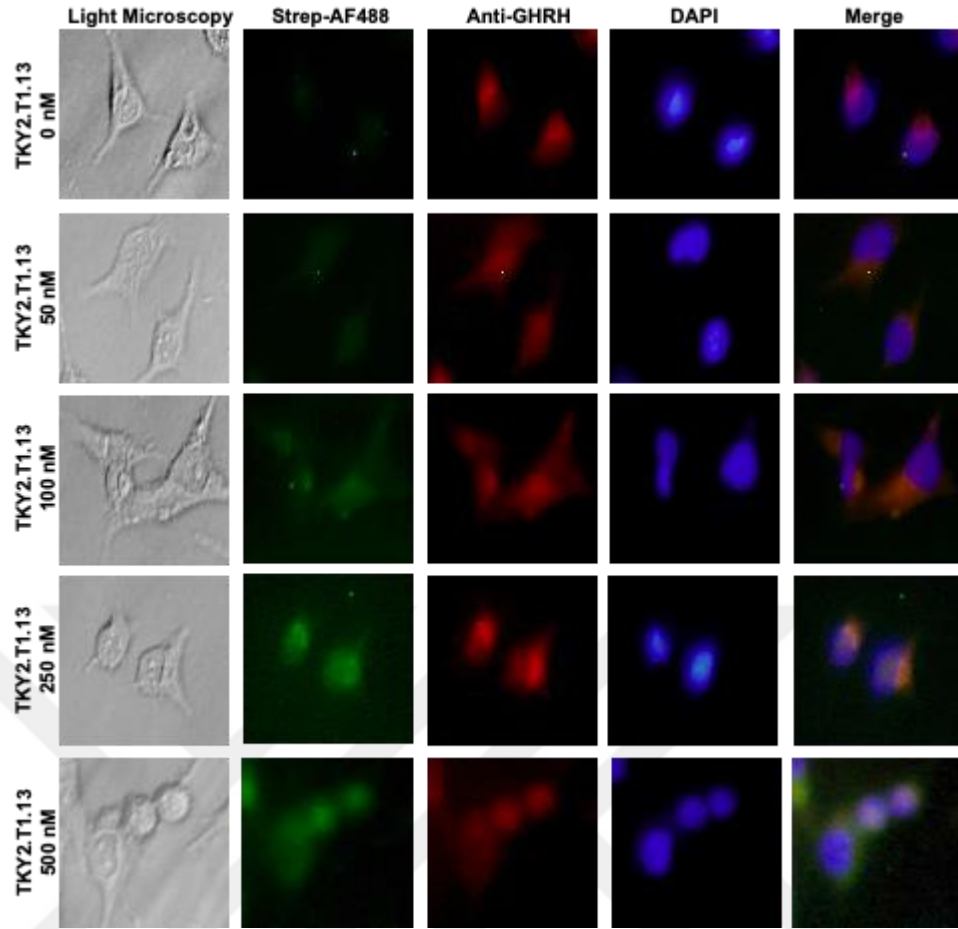
#### **4.9 Aday X-Aptamerlerin Endojen GHRH Ligandına Bağlanma Afinitesinin İmmunofloresan Yöntemi ile Gösterilmesi**

Aday X-aptamerlerin endojen GHRH ligandına bağlanma afinitesinin ve biyolojik aktivitesinin gösterilmesi için seçilen hücrelerde GHRH ekspresyonunun gösterilmesinden sonra, aday X-aptamerlerin endojen GHRH ligandına bağlanma afinitesi immunofloresan yöntemi ile gösterilmiştir. Bu amaçla, MIA PaCa-2 hücrelerine artan dozlarda aday X-aptamer uygulanmış ve X-aptamerin 5' ucuna

konjuge halde bulunan biyotine özgü Streptavidin-Alexa Fluor 488 konjugatı ve anti-GHRH antikoruna ile ikili boyama yapılarak aptamer ve ligand ışımalarının çakışıp çakışmadığı kontrol edilmiştir. Alınan sonuçlar incelendiğinde, TKY2.T1.08 ve TKY2.T1.13 uygulanan hücrelerde aptamere ait ışımalar ile GHRH'yi gösteren ışımaların aynı yerde olduğu, dahası artan aptamer dozuna bağlı olarak aptamer ışımalarının arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.35, Şekil 4.36).

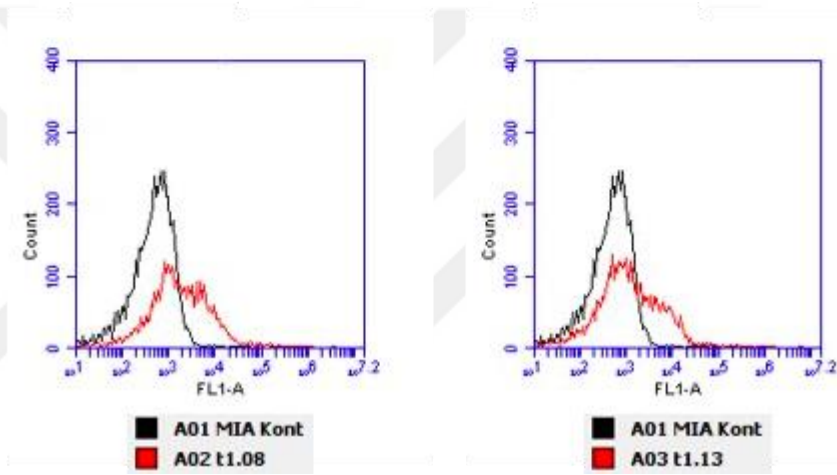
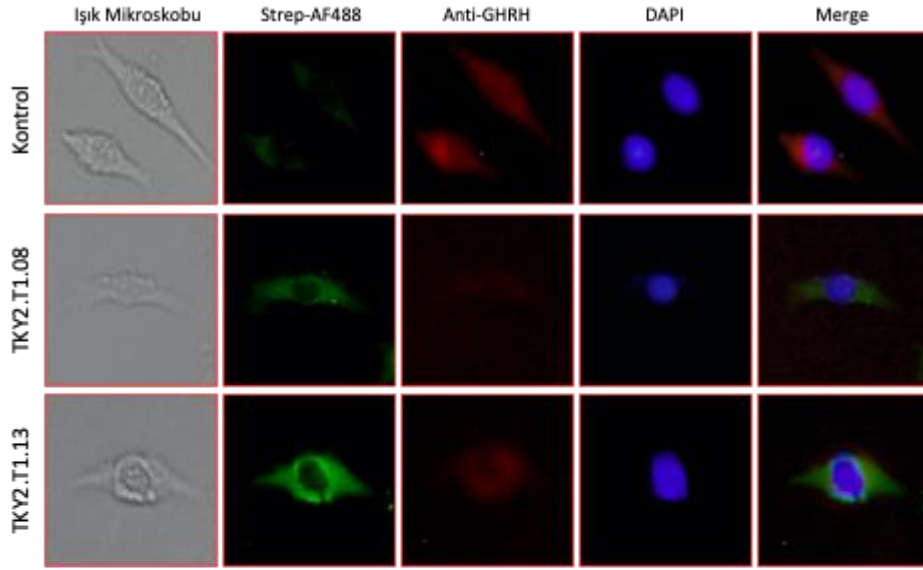


**Şekil 4.35. TKY2.T1.08 aptamerinin endojen GHRH ligandına bağlanma afinitesinin immunofloresan yöntemi ile gösterilmesi**



**Şekil 4.36. TKY2.T1.08 aptamerinin endojen GHRH ligandına bağlanma afinitesinin immunofloresan yöntemi ile gösterilmesi**

GHRH bir hormon olması nedeniyle, hücrede üretildikten sonra medyaya salınacağından dolayı, aptamerlerin immunofloresan yöntemi ile endojen GHRH'ye bağlanma afinitesinin belirlenmesinin yanı sıra, hücrelerden salınan medyadaki GHRH'ye bağlanma afinitesinin gösterilebilmesi için, hücreler immunofloresan için 12-kuyucuklu plakalara ekilmiş, aptamer uygulaması yapılmış, 72 saat inkübe edilmiş ve süre sonunda besiyeri temiz bir eppendorfa alınarak Streptavidin-konjuge Alexa Fluor 488 ile inkübe edilerek Hücre Akış Sitometrisi ile analiz edilmiştir. Buna göre, aptamer uygulaması yapılmayan kontrol hücreler ile kıyaslandığında, TKY2.T1.08 ve TKY2.T1.13 aptamerleri uygulanan hücrelerde hücre populasyonunda kayma meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 4.37).

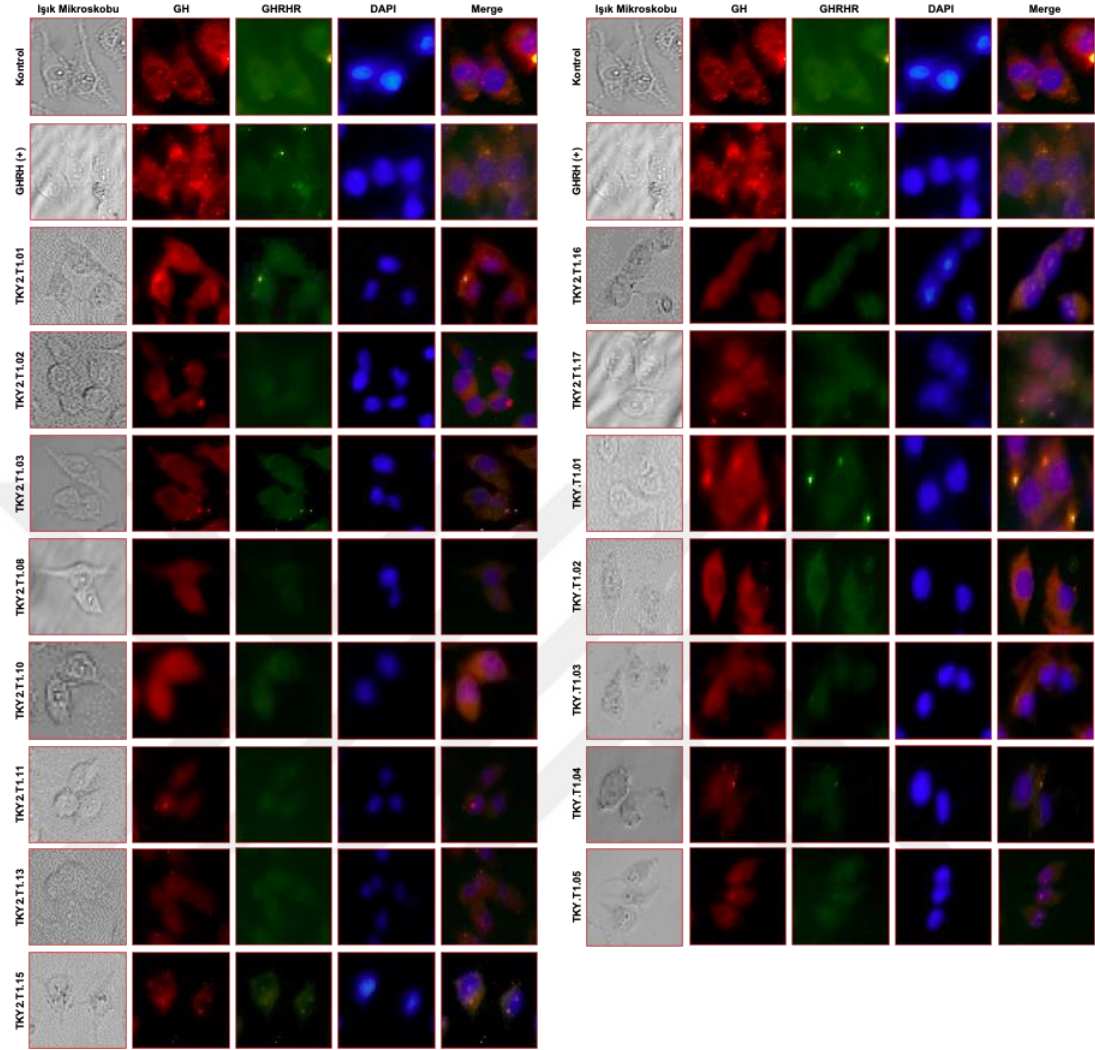


**Şekil 4.37. Medyaya salınan GHRH ile aptamerlerin bağlanma afinitesinin gösterilmesi**

#### **4.10 Aday X-Aptamerlerin GHRH Sinyal Yolağı Elemanlarına Etkisinin Belirlenmesi**

Aday X-aptamerlerden biri olan TKY2.T1.08'in hücrelerde üretilen endojen GHRH ligandına bağlanması gösterildikten sonra, bu bağlanmanın GHRH sinyal yolağı üzerine etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. GHRH sinyalinin en önemli hedefi GH olduğundan dolayı öncelikle aptamer uygulamasının GH ve GHRH-R ekspresyonuna etkisi MIA PaCa-2 hücrelerinde immunofloresan yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, TKY2.T1.02, TKY2.T1.03, TKY2.T1.08, TKY2.T1.10, TKY2.T1.11, TKY.T1.02 ve TKY.T1.05 uygulamasının hücrelerdeki GH ve GHRH-R ekspresyon seviyesini önemli ölçüde düşürdüğü gözlemlenmiştir. Bu deneyde

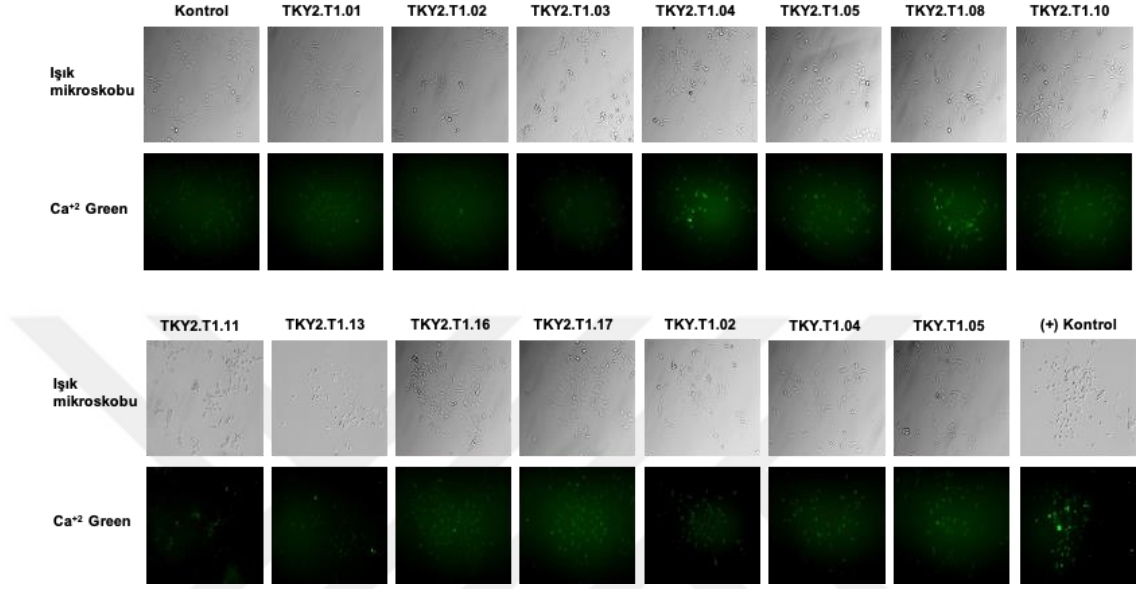
hücrelere ayrıca ekzojen GHRH uygulaması yapılarak GH ve GHRH-R ekspresyonu indüklenmiş ve bu örnekler pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 4.38).



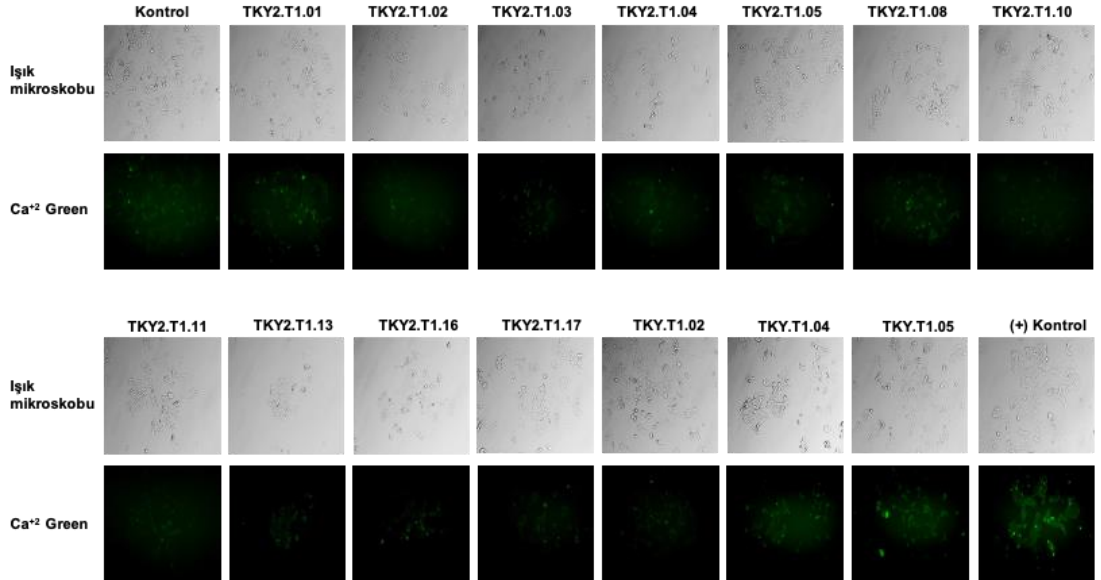
**Şekil 4.38. Aday X-aptamerlerin GHRH'nin hedefi olan GH ve GHRH-R ekspresyonu üzerine etkisinin immunofloresan yöntemi ile gösterilmesi**

GHRH, hücre membranında yer alan reseptörüne bağlandığında, fosfolipaz C aracılığıyla veya voltaj kapılı kalsiyum kanallarının uyarılması yoluyla kalsiyum salınımını indükler. Bu nedenle, aptamerlerin GHRH sinyal yolağı üzerine etkisi araştırılırken hücre içi kalsiyum yoğunluğu  $Ca^{+2}$  Green boyası ile gösterilmiştir. MIA PaCa-2, HT29, PC3 ve PNT1a hücrelerine aptamer uygulamasını takiben  $Ca^{+2}$  Green boyası uygulanmış ve floresan mikroskop altında fotoğraflar çekilmiştir. MIA PaCa-2 hücrelerinde TKY2.T1.04, TKY2.T1.08, TKY2.T1.16, TKY2.T1.17, TKY.T1.04 ve TKY.T1.05 uygulamasıyla kalsiyum miktarında artma görülmüştür (Şekil 4.39). HT29 hücrelerinde ise TKY2.T1.01, TKY2.T1.04, TKY2.T1.05 TKY2.T1.08, TKY2.T1.16,

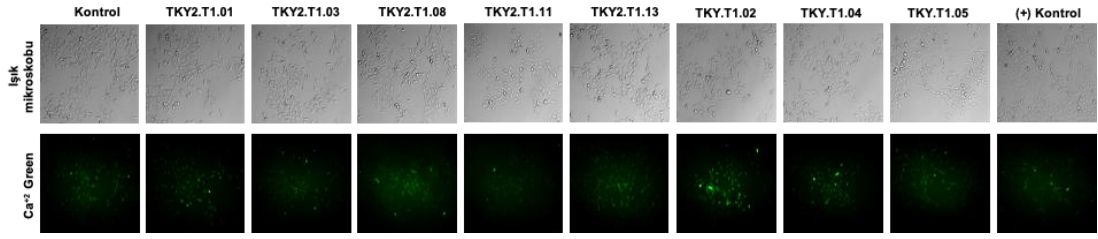
TKY.T1.04 ve TKY.T1.05 uygulaması kalsiyum miktarını önemli ölçüde arttırmıştır (Şekil 4.40). PC3 hücrelerinde TKY2.T1.01, TKY2.T1.08, TKY2.T1.13, TKY.T1.02 ve TKY.T1.04 kalsiyum miktarını arttırırken (Şekil 4.41), PNT1a hücrelerinde aptamer uygulaması hücre içi kalsiyum miktarlarında anlamlı bir değişiklik meydana getirmemiştir (Şekil 4.42).



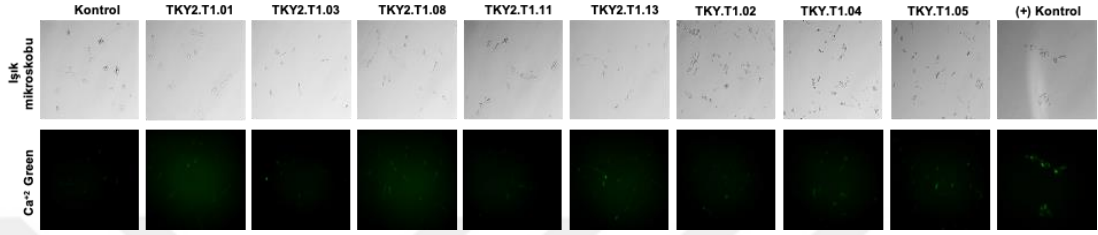
**Şekil 4.39. Aptamer uygulamasının hücre içi kalsiyum miktarına etkisinin MIA PaCa-2 hücrelerinde gösterilmesi**



**Şekil 4.40. Aptamer uygulamasının hücre içi kalsiyum miktarına etkisinin HT29 hücrelerinde gösterilmesi**

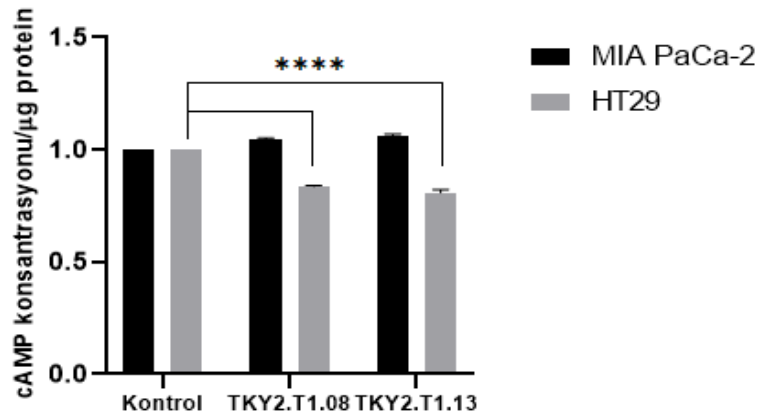


**Şekil 4.41. Aptamer uygulamasının hücre içi kalsiyum miktarına etkisinin PC3 hücrelerinde gösterilmesi**



**Şekil 4.42. Aptamer uygulamasının hücre içi kalsiyum miktarına etkisinin PNT1a hücrelerinde gösterilmesi**

GHRH ligandının reseptöre bağlanmasıyla başlayan sinyal yolağında G proteinine GTP bağlanmasıyla adenilil siklaz uyarıldığı ve hücre içi cAMP seviyesinde artış meydana geldiğinden, aptamer uygulaması ile hücrelerde siklik AMP miktarlarındaki değişiklik cAMP deteksiyon kiti ile belirlenmeye çalışılmıştır. MIA PaCa-2 hücrelerinde aptamer uygulaması sonrası hücrelerdeki cAMP miktarının total proteine oranı kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik göstermezken, HT29 hücrelerinde ise aptamer uygulaması ile yaklaşık %20 azalma göstermektedir (Şekil 4.43) (\*\*\*\*p<0,0001)

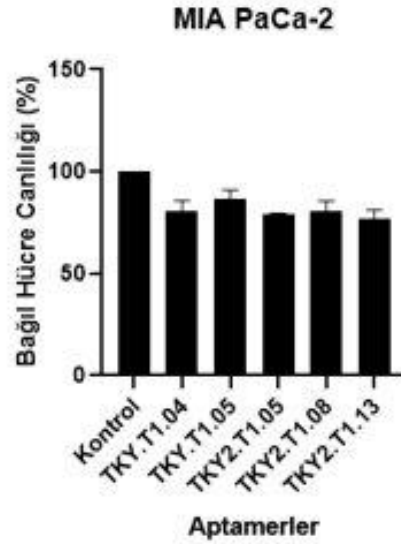


**Şekil 4.43. Aptamer uygulanan MIA PaCa-2 ve HT29 hücrelerinde cAMP seviyelerinin belirlenmesi (\*\*\*\*p<0,0001)**

#### 4.11 Aday X-Aptamer Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

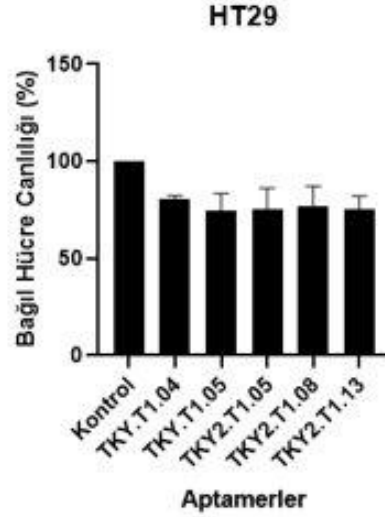
Aday X-Aptamerlerin olası GHRH sinyaline ket vurması sonucu hücre canlılığının nasıl etkilendiğinin belirlenmesi amacıyla, GHRH eksprese ettiği daha önce belirlenen (Şekil 4.32, Şekil 4.33) üç hücre hattı kullanılarak 500 nM aptamer dozu doz ve 72 saat uygulama süresi ile MTT Hücre Proliferasyonu deneyi gerçekleştirilmiştir.

Yapılan MTT deneyleri sonucunda, MIA PaCa-2 hücrelerinde TKY.T1.04 numaralı aptamer uygulaması, hücre canlılığında kontrol hücrelere oranla %17, TKY.T1.05 numaralı aptamer uygulaması %14, TKY2.T1.05 numaralı aptamer uygulaması %16, TKY2.T1.08 numaralı aptamer uygulaması %18, TKY2.T1.13 numaralı aptamer uygulaması ise %22 oranında azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.44).



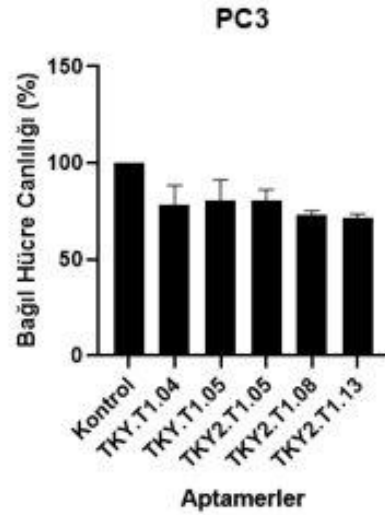
**Şekil 4.44. Aday X-aptamerlerin MTT yöntemi ile MIA PaCa-2 hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi**

HT29 hücreleriyle yapılan MTT deneyinde ise, TKY.T1.04 numaralı aptamer uygulaması, hücre canlılığında kontrol hücrelere oranla %15, TKY.T1.05 numaralı aptamer uygulaması %22, TKY2.T1.05 numaralı aptamer uygulaması %25, TKY2.T1.08 numaralı aptamer uygulaması %23, TKY2.T1.13 numaralı aptamer uygulaması ise %25 oranında azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.45).



**Şekil 4.45. Aday X-aptamerlerin MTT yöntemi ile HT29 hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi**

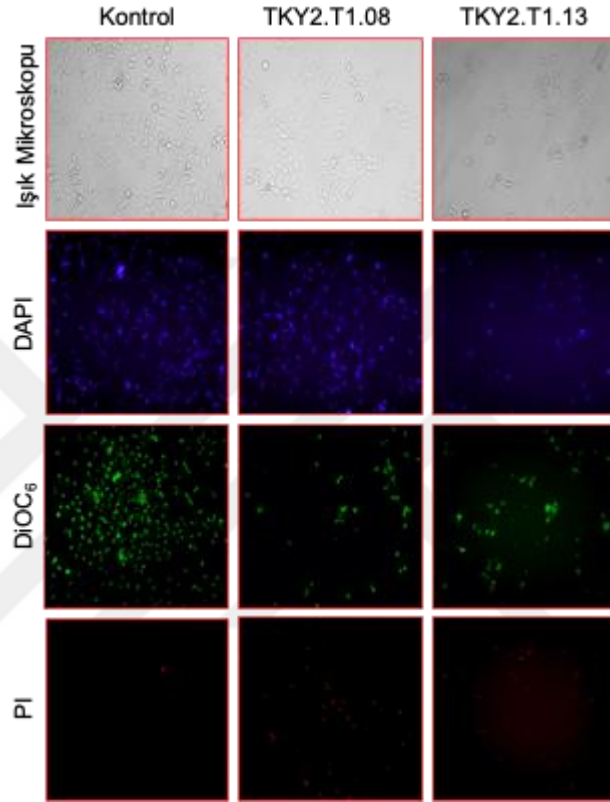
PC3 hücreleriyle yapılan MTT deneyinde ise TKY.T1.04 numaralı aptamer uygulaması, hücre canlılığında kontrol hücrelere oranla %15, TKY.T1.05 numaralı aptamer uygulaması %17, TKY2.T1.05 numaralı aptamer uygulaması %18, TKY2.T1.08 numaralı aptamer uygulaması %25, TKY2.T1.13 numaralı aptamer uygulaması ise %27 oranında azalmaya neden olmuştur (Şekil 4.46).



**Şekil 4.46. X-aptamerlerin MTT yöntemi ile PC3 hücre canlılığı üzerine etkisinin gösterilmesi**

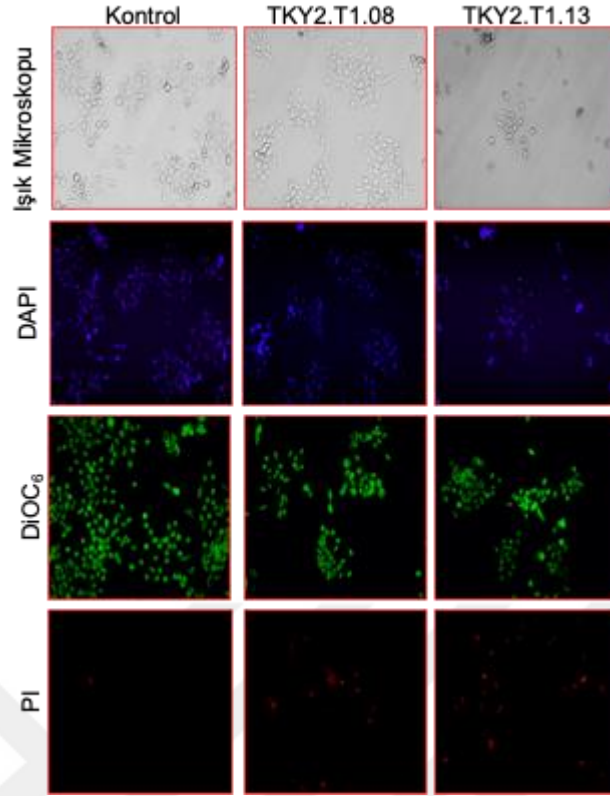
Aday X-aptamerlerin hücre canlılığına etkisinin MTT yöntemi ile belirlenmesinin ardından X-aptamerlerin mitokondriyal membran potansiyeli ve hücre ölümü üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla MIA PaCa-2, HT29 ve PC3 hücreleri aptamer

uygulamasý sonrası DAPI, DiOC<sub>6</sub> ve PI floresan boya larý ile boyanmýþ ve floresan mikroskop altında incelemeler yapýlmýþtir. Floresan ışımlar incelendiğinde, MIA PaCa-2 hücrelerine TKY2.T1.08 ve TKY2.T1.13 uygulamasý, hücre ölümünü arttırmýþtir. DAPI ve DiOC<sub>6</sub> boyamalarına bakıldıđında ise aptamer uygulamasý ile hücre canlılıđı ve mitokondriyel membran potansiyelinde azalma gözlemlenmiþtir (Şekil 4.47)



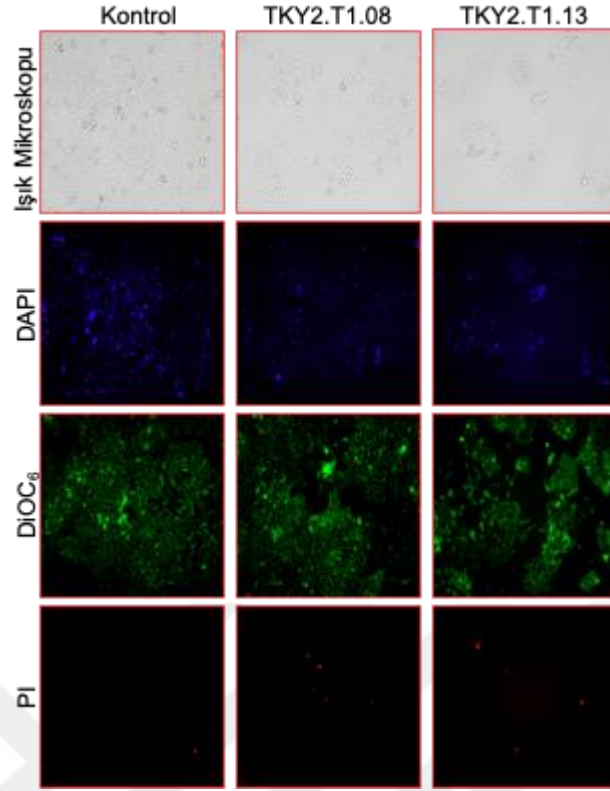
**Şekil 4.47. Aday X-aptamerlerin MIA PaCa-2 hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli ve hücre ölümü üzerine etkisinin floresan boyama ile gösterilmesi**

HT29 hücrelerinde TKY2.T1.08 ve TKY2.T1.13 uygulamasý sonucu hücre ölümünde artma, mitokondriyel membran potansiyelinde azalma tespit edilmiþtir (Şekil 4.48).



**Şekil 4.48. Aday X-aptamerlerin HT29 hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli ve hücre ölümü üzerine etkisinin floresan boyama ile gösterilmesi**

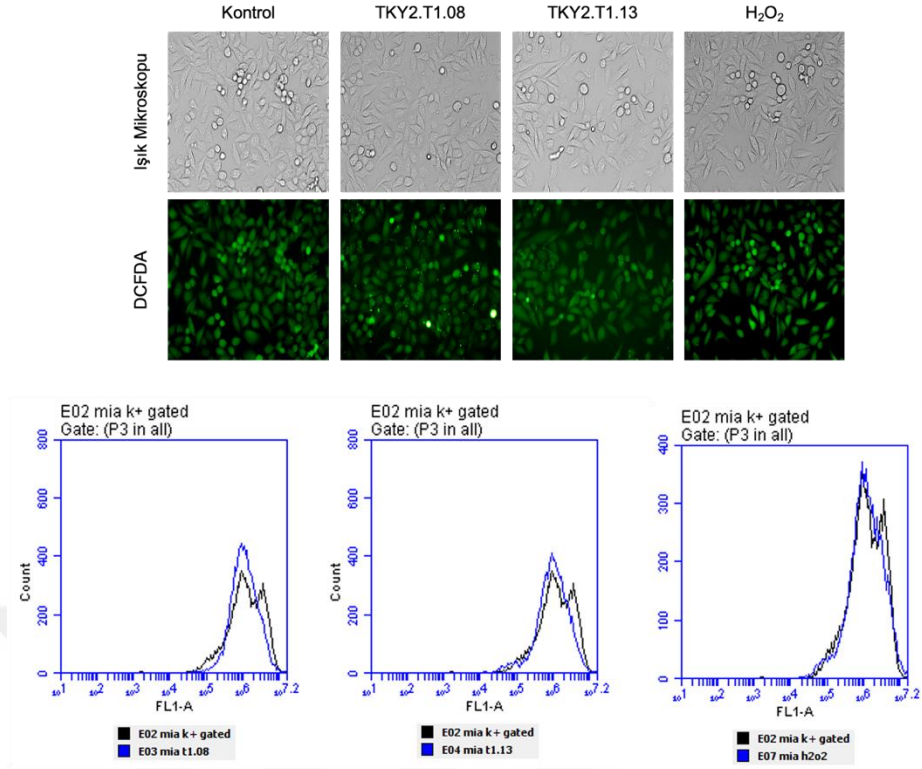
Aptamer uygulamasının PC3 hücrelerinde hücre ölümü ve canlılığı üzerine etkileri incelendiğinde ise, aptamer uygulamasının yine hücre ölümünü arttırdığı ve canlılıkta azalmaya neden olduğu görülmekle birlikte bu etkinin MIA PaCa-2 ve HT29 hücrelerinde olduğu kadar belirgin olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.49)



**Şekil 4.49. Aday X-aptamerlerin PC3 hücrelerinde mitokondri membran potansiyeli ve hücre ölümü üzerine etkisinin floresan boyama ile gösterilmesi**

#### **4.12 Aday X-Aptamerlerin Reaktif Oksijen Türleri Oluşumuna Etkilerinin Araştırılması**

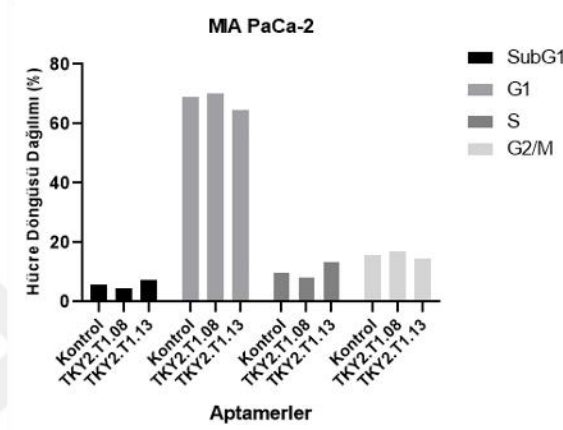
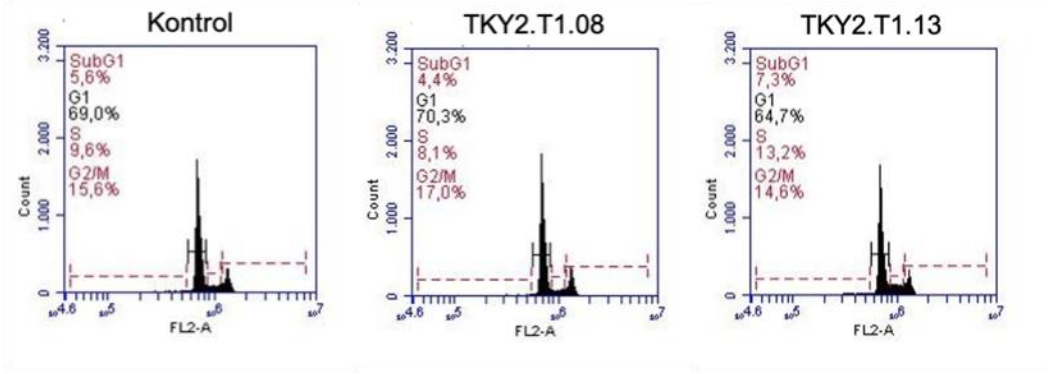
Aday X-aptamerlerin hücrelerde reaktif oksijen türleri oluşumuna etkisi H<sub>2</sub>DCFDA floresan boyası ile belirlenmiştir. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hücrelere pozitif kontrol olarak uygulanmıştır. Floresan mikroskopu altında elde edilen görüntüler incelendiğinde, TKY2.T1.08 ve TKY2.T1.13 aptamerlerinin uygulandığı hücrelerde dotların kontrol hücrelerine oranla arttığı, bu aptamerlerin MIA PaCa-2 hücrelerinde reaktif oksijen türleri oluşumunu indüklediği görülmüştür (Şekil 4.50).



**Şekil 4.50. Aday X-aptamerlerin Reaktif Oksijen Türleri oluşumuna etkisinin MIA PaCa-2 hücrelerinde incelenmesi**

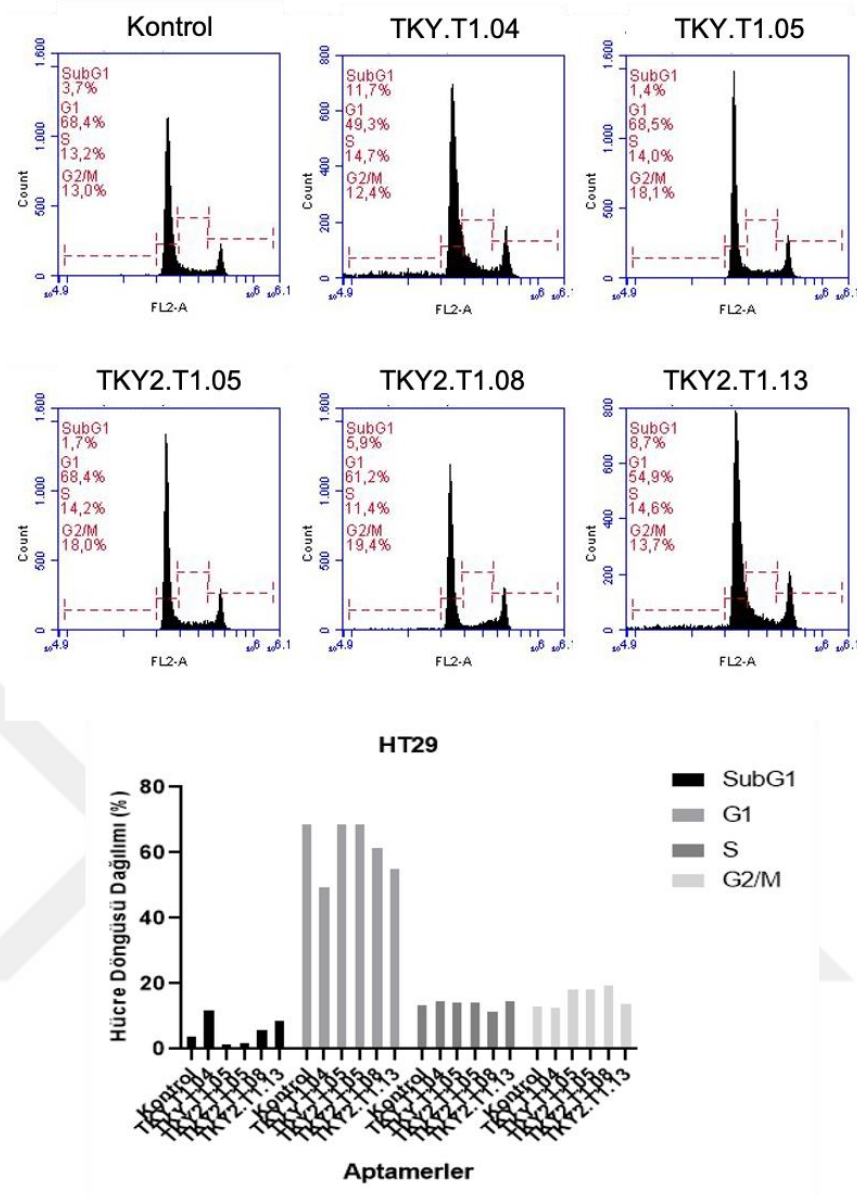
#### 4.13 Aday X-Aptamerlerin Hücre Döngüsü Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Aday X-aptamerlerin hücre canlılığı ve hücre ölümü üzerine etkilerinin belirlenmesinin ardından hücre döngüsü üzerine etkileri MIA PaCa-2, HT29 ve PC3 hücrelerinde propidyum iyodür (PI) FACS yöntemi ile araştırılmıştır. Aday X-aptamer uygulamasının MIA PaCa-2 hücrelerinde hücre döngüsüne etkisi incelendiğinde TKY2.T1.13 uygulaması ile SubG1 fazındaki hücre popülasyonunda artış meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 4.51).



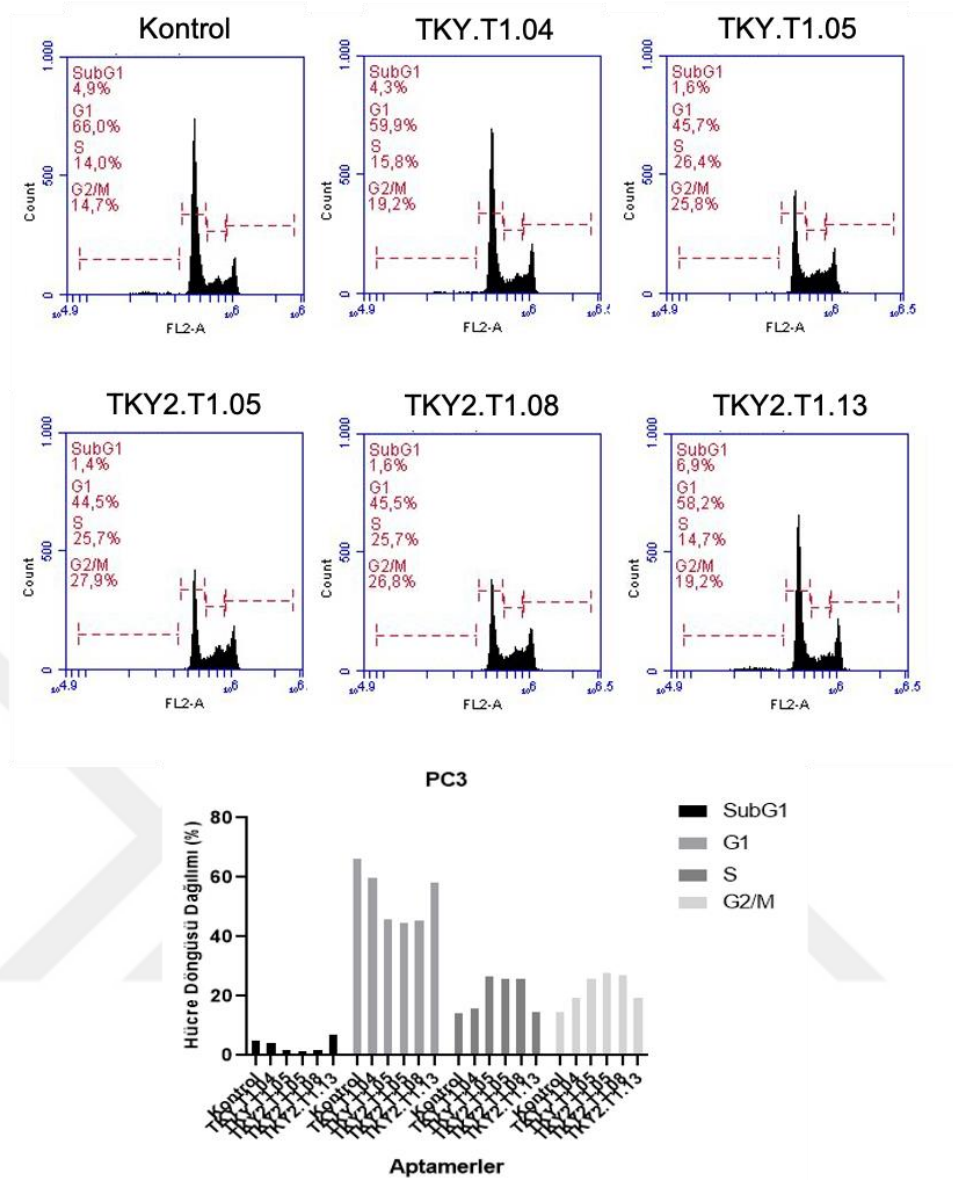
**Şekil 4.51. Aday X-Aptamerlerin MIA PaCa-2 hücrelerinde Hücre Döngüsü Üzerine Etkilerinin Propidyum İyodür (PI) FACS Yöntemi ile Gösterilmesi**

Aday X-aptamer uygulamasının HT29 hücrelerinde hücre döngüsüne etkisi incelendiğinde TKY.T1.04, TKY2.T1.08 ve TKY2.T1.13 aptamerleri hücre döngüsünün SubG1 fazındaki hücre popülasyonunda artışa neden olmakla birlikte, TKY2.T1.08 uygulamasının G2/M fazındaki hücre popülasyonunu da arttırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.52).



**Şekil 4.52. Aday X-Aptamerlerin HT29 hücrelerinde Hücre Döngüsü Üzerine Etkilerinin Propidyum İyodür (PI) FACS Yöntemi ile Gösterilmesi**

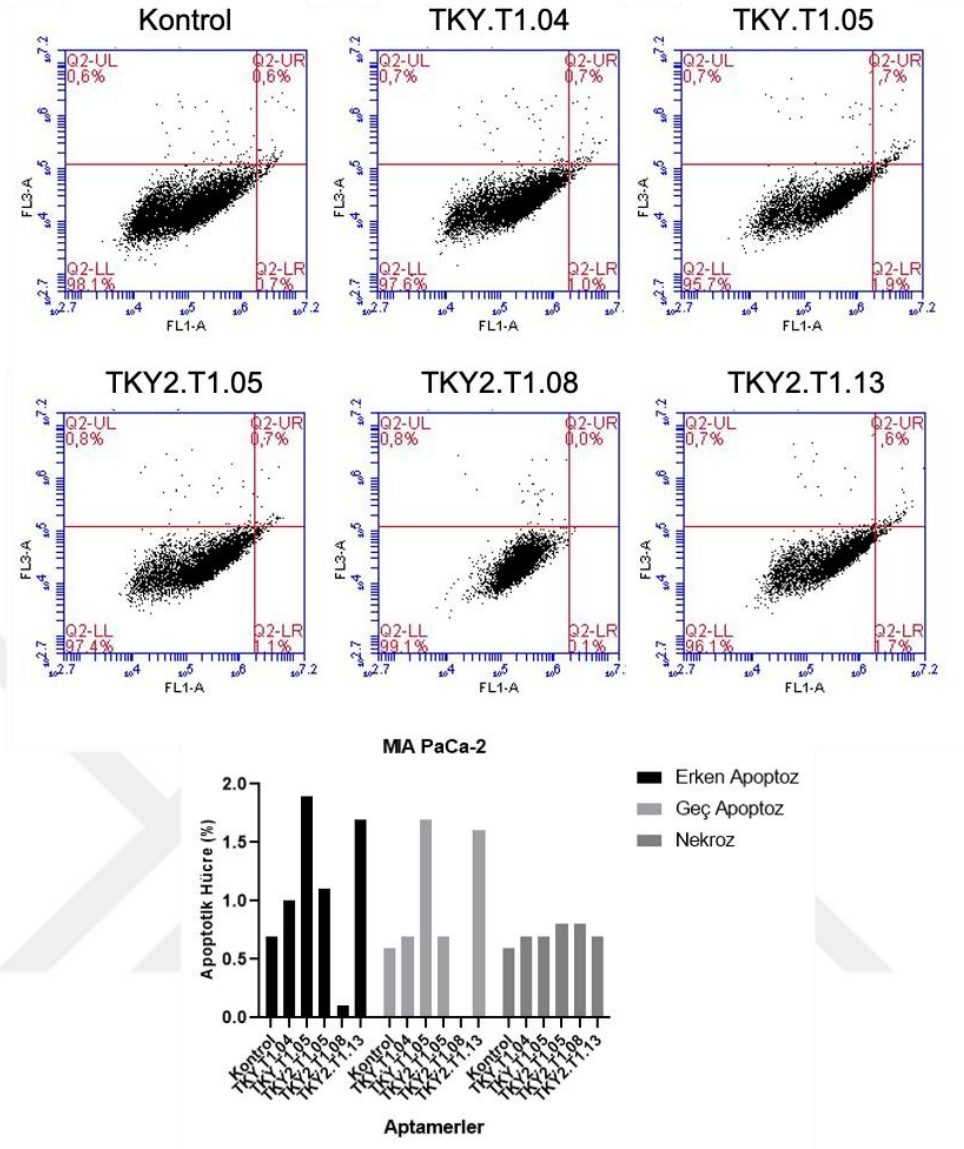
Aday X-aptamer uygulamasının PC3 hücrelerinde hücre döngüsüne etkisi incelendiğinde TKY2.T1.13 aptamer uygulamasının hücre döngüsünün SubG1 ve G2/M fazlarındaki hücre popülasyonunda artışa neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.53).



**Şekil 4.53. Aday X-Aptamerlerin PC3 hücrelerinde Hücre Döngüsü Üzerine Etkilerinin Propidyum İyodür (PI) FACS Yöntemi ile Gösterilmesi**

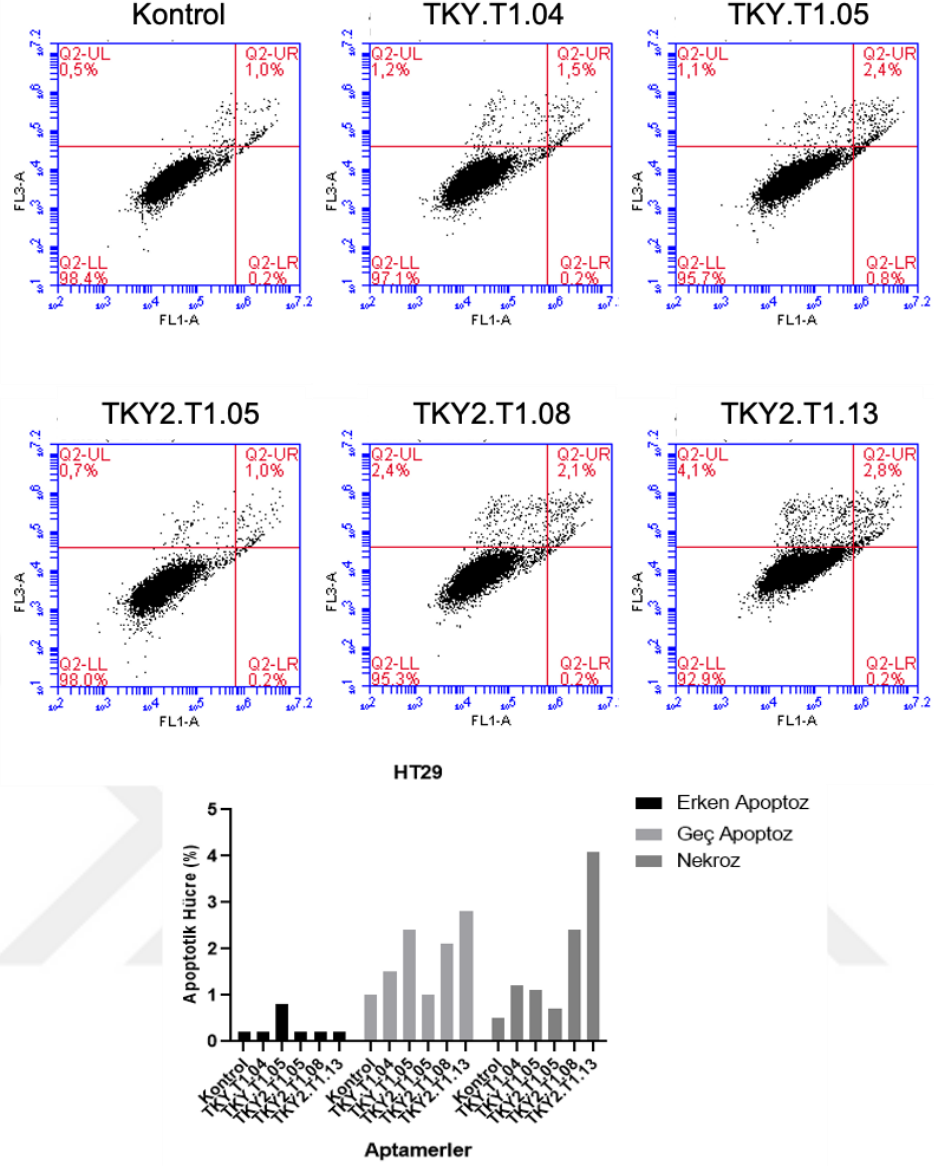
#### 4.14 Aday X-Aptamerlerin Apoptotik Etkilerinin Gösterilmesi

Aday X-aptamerlerin farklı hücre hatlarında hücre ölümünü arttırdığının gösterilmesi üzerine, apoptotik hücre oranlarının belirlenmesi amacıyla MIA PaCa-2, HT29 ve PC3 hücreleri x-aptamer uygulaması sonrası Annexin V-FITC/PI boya ile boyandıktan sonra hücre akış sitometresi cihazında analizler yapılmıştır. Buna göre MIA PaCa-2 hücrelerinde TKY2.T1.13 aptamer uygulaması apoptotik hücre oranını önemli ölçüde arttırmıştır (Şekil 4.54).



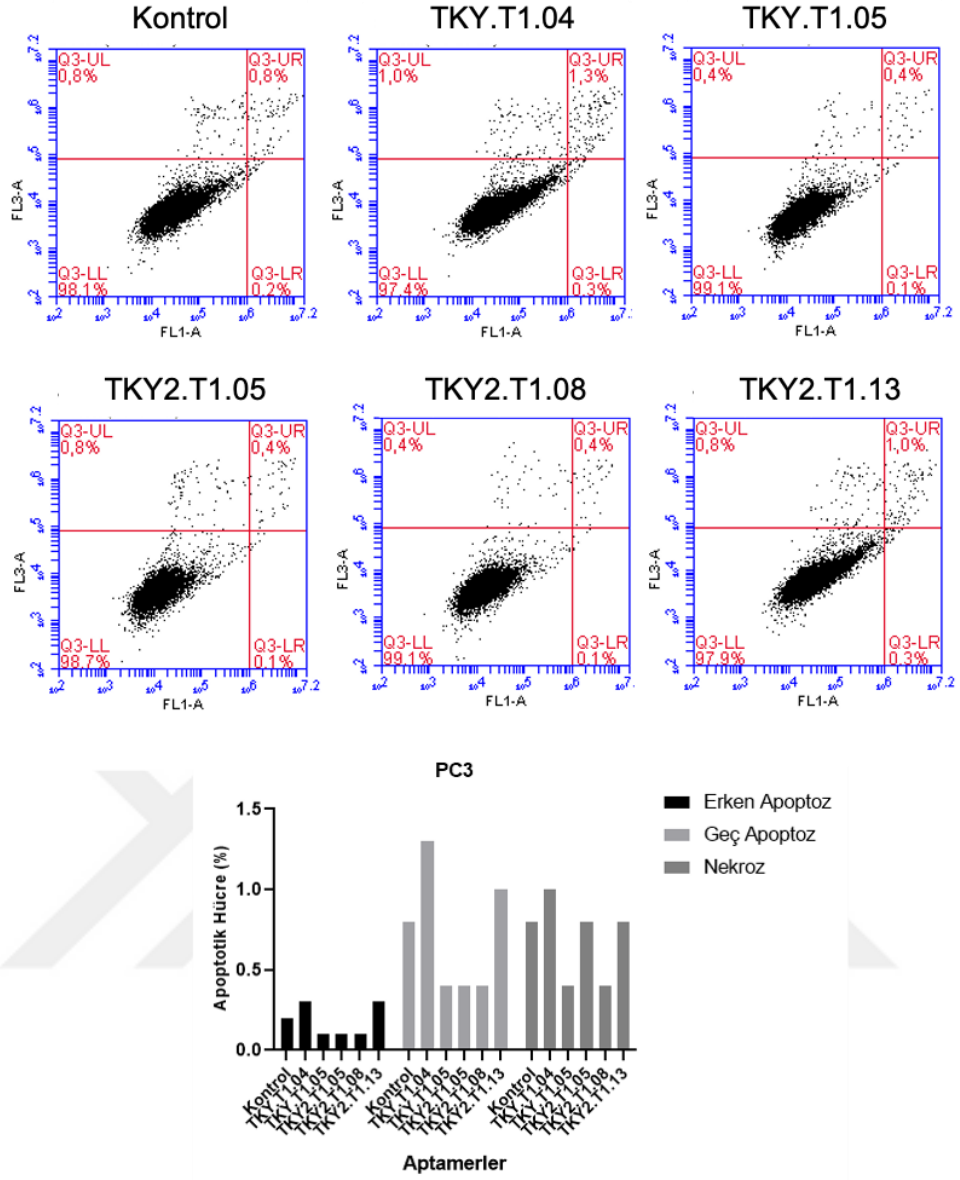
**Şekil 4.54. Aday X-Aptamerlerin MIA PaCa-2 hücrelerinde Hücre Ölümü Üzerine Etkilerinin Annexin V-Propidyum İyodür (PI) FACS Yöntemi ile Gösterilmesi**

X-aptamer uygulamasının HT29 hücrelerinde hücre ölümüne etkisi incelendiğinde ise, TKY2.T1.08 ve TKY2.T1.13 aptamerlerinin geç apoptotik hücre oranını arttırdığı gösterilmiştir (Şekil 4.55)



**Şekil 4.55. Aday X-Aptamerlerin HT29 hücrelerinde Hücre Ölümü Üzerine Etkilerinin Annexin V-Propidyum İyodür (PI) FACS Yöntemi ile Gösterilmesi**

X-aptamer uygulamasının PC3 hücrelerinde hücre ölümüne etkisi incelendiğinde ise, TKY2.T1.13 aptamerinin geç apoptotik hücre oranını arttırdığı gösterilmiştir (Şekil 4.56).



**Şekil 4.56. Aday X-Aptamerlerin PC3 hücrelerinde Hücre Ölümü Üzerine Etkilerinin Annexin V-Propidyum İyodür (PI) FACS Yöntemi ile Gösterilmesi**

## 5 TARTIŞMA

Kansere karşı kullanılan tedavi yöntemleri incelendiğinde, normal hücrelerin neoplastik hücelere dönüşmesi sonucu kazandığı veya kaybettiği özelliklerin hedef olarak alındığı “hedefli terapiler” önemli bir yere sahiptir. Hedefli terapilerde, kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran moleküler genetik değişiklikler, moleküler hedefli ilaçların geliştirilmesinde moleküler hedefler olarak kullanılabilir [123]. Kanser hücreleri normal hücreler ile kıyaslandığında ise en önemli değişiklik, sürekli aktif olan büyüme ve çoğalma sinyali ile birlikte artan proliferasyon hızı olmakla birlikte, kanser hücrelerinin hücre ölümünden kaçma, anjiyogenez, immün sistemden kaçma gibi özellikler kazandığı da gözlemlenmektedir. Bu nedenle, özellikle kanserli hücreleri normal hücrelerden ayırt eden bu özelliklerin hedeflenmesi ile, normal hücelere zarar vermeksizin kanserli hücrelerin belirlenerek büyümenin durdurulması veya hücre ölümünün indüklenmesi, kanser tedavi stratejilerinde sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Moleküler hedefli terapiler, kinaz inhibitörleri gibi küçük moleküller, terapötik monoklonal antikorlar, terapötik kanser aşılı ve gen düzenlenmesi ile gerçekleştirilebilmektedir.

GHRH, pankreas [43], prostat [33], yumurtalık [41] ve akciğer kanseri [42] gibi birçok kanser tipinde ektojik olarak ekspre edildiği bilinen bir nöropeptiddir. GHRH/GHRHR ekspresyonu ve biyolojik olarak aktif sinyal nedeniyle, GHRH’yi hedefleyen terapötik rejimler önemli bir potansiyele sahiptir. Bu kapsamda GHRH peptidinin biyolojik aktiviteye sahip olan GHRH NH<sub>2</sub> (1-29) peptidinde çeşitli modifikasyonlar yapılarak birçok GHRH peptid antagonisti sentezlenmiştir [26]. Bu antagonistlerin GHRH reseptörüne bağlanmak ve reseptör aktivasyonunu bloke etmek için GHRH ile rekabet ettiği gösterilmiştir [124]. Böylelikle, bu antagonistlerin akciğer, meme, prostat, yumurtalık, kolorektal ve pankreas kanserleri gibi birçok kanser tipinde tümör hücreleri üzerinde doğrudan etki yoluyla proliferasyonu inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir [9], [39]. GHRH antagonistleri, GHRH sinyalini bloke etmek için çalışılmasına rağmen, bu antagonistlerin peptid yapıda olması, antagonistlerin *in vivo* kullanımını sınırlandırır. Bununla birlikte, literatürde

GHRH'ye karşı bildirilmiş bir aptamer bulunmamaktadır. Bu nedenle bu çalışmada GHRH'ye karşı bir aptamerin seçilmesi, hedefe bağlanma afinitelerinin karakterize edilmesi ve GHRH antagonistlerine benzer bir strateji ile aptameri bir ligand olarak yakalayarak GHRH'nin hedeflenmesi ve GHRH sinyalinin bloke edilmesinin araştırılması amaçlanmıştır.

Moleküler hedefli kanser terapilerinde kullanılabilecek yöntemlerden biri aptamerlerin kullanımınıdır. Nükleik asit aptamerleri, çeşitli sekonder katlanmalar yoluyla üç boyutlu bir yapı oluşturarak, küçük iyonlardan bütün hücreye kadar çok çeşitli moleküllere yüksek afinite ve özgüllük ile etkileşime girebilen tek sarmallı sentetik DNA veya RNA oligonükleotidleridir [15], [85]. Küçük moleküller, proteinler, peptidler, toksinler ve hatta hücreler dahil birçok molekül aptamerlerin hedefi olabilir [11]. Aptamerler, oligonükleotid yapıları nedeniyle plazma nükleazları tarafından kolaylıkla parçalanabilir. Bu zorluk, endonükleazlar tarafından tanınmayan L-konformasyon nükleotidleri kullanılarak, nükleotidlerin farklı pozisyonlarında, fosfodiester bağlarında ve oligomerizasyonda yapılan bazı modifikasyonlarla aşılabilir [15]. Genel olarak aptamerler, bir biyosensörde yakalama anahtar molekülü olarak tercih edilmelerine ve kemoterapötik ajanlarla konjuge edilmelerine rağmen, aptamer bazlı hormon hedefleme teknolojisi yaklaşımları hala korunmaktadır. Aptamerler daha küçük, daha az immunojenik, daha düşük maliyetli, daha kararlı, kimyasal modifikasyonlara daha yatkın ve fizyolojik olmayan koşullardan sonra renatürasyon kabiliyetine sahip olduklarından, peptid veya antikordlardan daha çok tercih edilirler [11], [84]. Yapısal avantajlarından dolayı metabolik hastalıkların tedavisinde bazı hedef moleküllere karşı aptamerler tercih edilmiştir. Bu aptamerler arasında Macugen, yaşa bağlı maküler dejenerasyon hastalığının tedavisi için vasküler endotel büyüme faktörünü (VEGF) hedefleyen FDA onaylı ilk RNA aptameridir [99]. Aptamerler, geleneksel olarak, yaklaşık 20 adet nükleotidin rastgele bir şekilde bir araya gelmesiyle oluşturulan bir kütüphane içinden, SELEX (Systemic Evolution of Ligands by Exponential Enlargement, Üstel Genişleme ile Ligandların Sistemik Evrimi) adı verilen bir yöntemle seçilirler. Bu yöntemde, aptamer kütüphanesinin hedef moleküle bir araya getirilmesi, hedefe bağlanmayan aptamer adayları uzaklaştırılması, hedefe bağlanan aptamer adayları hedeften ayrılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması işlemlerinin 2-20 kez tekrarlanması sonucu elde edilen DNA veya RNA ipliklerinin dizisi belirlenmektedir. Yöntem yeni bir yöntem olmakla birlikte çeşitli

avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Yöntemin en önemli dezavantajı, bu yöntemle seçilen aptamerlerin sınırlı sayıda modifikasyona sahip olması ve seçilimin gerçekleşebilmesi için genellikle 8-15 seçim turu gerçekleştirilmesi gerekmesi nedeniyle zaman alıcı bir yöntem olmasıdır [125]. Bu nedenle, daha fonksiyonel gruplar ve daha fazla stabilite sağlayan yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu nedenle, aptamerlerin stabilitesini arttırmak için, çeşitli modifikasyonlar yapılmaktadır. Yeni geliştirilen teknolojilerden biri olan X-aptamerler, dizisindeki bazı nükleotidlere protein-benzeri veya ilaç-benzeri yan zincirler eklenerek hem nükleazlara karşı stabilitenin hem de hedef moleküllere afinitenin artırıldığı spesifik aptamerlerdir [126]. X-aptamer seçim kiti, tek seferde beşe kadar farklı hedefe karşı aynı anda aptamer seçilimine izin veren, manyetik boncuk temelli, hızlı ve özgüllüğü yüksek X-aptamerlerin seçilmesine olanak sağlamaktadır [16]. Firmanın önerileri doğrultusunda seçim gerçekleştirildikten sonra yeni nesil dizileme ile aday X-aptamer dizileri belirlenmekte ve bu diziler 3'-Biyotin işareti ile firma tarafından sentezlenerek aday X-aptamerler temin edilmektedir. X-aptamer teknolojisi ve seleksiyonu yeni ortaya çıkan bir sistem olmasına rağmen farklı çalışmalarda kullanılmaktadır. Son zamanlarda, X-aptamer teknolojisi kullanılarak şizofreni için potansiyel biyobelirteçler tanımlanmıştır [127]. İki immün kontrol noktası proteini olan PD-1 ve PD-L1'e karşı X-aptamerleri de bu teknoloji tarafından seçilmiştir [128]. Bu çalışmada büyüme hormonu salgılatıcı hormona karşı X-aptamerler de bu teknoloji kullanılarak X-aptamer seçim kiti ile seçilmiştir.

Hedefe özgü aptamer seçimini gerçekleştirebilmek adına en önemli basamaklardan biri hedefin seçimi ve seçilen hedefin saflaştırılmasıdır. Bu çalışmada Büyüme Hormonu Salgılatıcı Hormona (GHRH) özgü aptamerlerin seçilmesi ve karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, öncelikle hedef protein olan GHRH'nin saflaştırılması çalışmaları yapılmıştır. Bu deneyde hedef proteinin saflaştırılması amaçlandığı için, ekspresyon vektörü, GHRH açık okuma bölgesinin 5' bölgesinde 10 adet Histidin amino asiti kodlayan bölge olacak şekilde seçilmiştir (Şekil 3.2). Böylelikle bu bölgeden transkripsiyon ve translasyon sonucu sentezlenen protein, N-terminalinde His-işareti olan protein olacaktır. Bununla birlikte, herhangi bir açık okuma bölgesi içermeyen, sadece 10 adet Histidin amino asiti kodlayan bölge içeren vektör ise negatif kontrol olarak seçilmiştir (Şekil 3.1). Hedef proteinin elde edilmesi için, GHRH açık okuma çerçevesi içeren ve sadece Histidin kodlayan bölge

içeren vektörlerin aktarılmış olduğu *E. coli* HB101 suşları büyütülerek protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzole edilen proteinler SDS-poliakrilamid jelde yürütülerek anti-GHRH antikor kullanılarak immunoblotlama yapılmıştır. His-işaretli GHRH vektörü içeren klonlarda GHRH ekspresyonunun varlığı teyit edilirken, sadece His-işaretli vektörü içeren klonlarda ise GHRH ekspresyonunun olmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.1). Coomassie Brilliant Blue, asidik ortamda proteinlerle mavi kompleks oluşturan ve protein elektroforezi yapılan jellerde proteinlerin gösterilmesi için kullanılan bir boyadır [129]. İmmunoblotlama görüntüsünde protein ekspresyonu görülmeyen bölgelerde protein olduğunu göstermek için proteinlerin yürütüldüğü jel Coomassie Brilliant Blue G-250 içeren boyama çözeltisi içerisinde boyanarak fotoğraflanmış ve immunoblotlama görüntüsünde GHRH proteini görünmeyen His Klon 8 ve His Klon 11 örneklerinde protein olduğu bu şekilde gösterilmiştir. Aptamer seçiminde kullanılmak üzere saflaştırma yapabilmek için büyük ölçekli protein sentezine ihtiyaç duyulduğundan, His-GHRH vektörü içeren *E. coli* HB101 Klon 5 yüksek hacimde büyütülerek protein izolasyonu tekrarlanmıştır. Rekombinant proteinlerin üretilmesi için kullanılan özellikle *E. coli* bakterilerinde proteinler agregatlar oluşturabilmekte ve bu agregatlar inklüzyon cisimciği olarak adlandırılmaktadır [130]. Bu cisimciklerin denatüre edilmesi için yüksek konsantrasyonlu üre veya guanidin hidroklorür kullanılmaktadır [131]. Bu nedenle özellikle yüksek hacimli bakterilerden protein izolasyonu yapılırken bakterilerin duvarı ve membranının parçalanması sonucu elde edilen total lizatın yanı sıra, pellete yüksek konsantrasyonda üre içeren inklüzyon cisimciği solubilizasyon çözeltisi eklenerek pellette yer alan inklüzyon cisimciklerinin denatüre edilerek çözünür hale getirilmesi amaçlanmıştır. Bu yöntemle elde edilen total lizat ve çözünür hale getirilen pellet örnekleri, anti-GHRH antikor ile immunoblotlama yapılarak her iki örnekteki GHRH protein varlığı gösterilmiştir. Ayrıca bakterilere aktarılan vektörler His-işaretli GHRH kodladığından dolayı, anti-GHRH antikor ile elde edilen bantların doğruluğu, anti-His işaretine özgü antikorlar kullanılarak doğrulanmaya çalışılmıştır.

Rekombinant proteinlerin saflaştırılması amacıyla, hedef proteini kodlayan gen bölgesini içeren vektörlerde çeşitli işaretleri kodlayan bölgeler de yer almaktadır. Bu işaretlerden biri olan His işareti, boyutunun küçük olması ve düşük immunojenitesinden dolayı sıklıkla tercih edilmektedir [132]. Histidin rezidueları Nikel ( $Ni^{+2}$ ) ve Bakır ( $Cu^{+2}$ ) gibi metal iyonlarına yüksek afinite göstermeleri

nedeniyle, bu iyonların bağılı olduğu matriksler kullanılarak His-işaretli proteinler kolaylıkla saflaştırılabilmektedir [133].  $Ni^{+2}$  gibi metal iyonları, agaroz veya sefadeks gibi matrikslere immobilize edilebildiği gibi, manyetik boncuklara da immobilize edilebilmekte, böylelikle saflaştırma işlemi daha kolay ve hızlı gerçekleştirilebilir [134]. Bu kapsamda, His işaretli GHRH proteini,  $Ni^{+2}$  immobilize edilen manyetik boncuklar kullanılarak saflaştırılmış ve saflaştırma sonucunda elde edilen GHRH proteininin varlığı immunoblotlama ile gösterilmiştir (Şekil 4.3)

Önceki sonuçlara bakıldığında, His-GHRH rekombinant proteininin fazla miktarda üretimi bakteri hücrelerinde çok daha hızlı yapılabilmektedir. Ökaryotik hücrelerde ise protein sentezi bakterilere kıyasla daha yavaş gerçekleşmektedir [135]. Bununla birlikte bakteriyel protein sentez sistemi translasyon sonrası modifikasyonlardan yoksun olduğundan ve yöntem sonunda sentezlenecek olan aptamerler ökaryotik hücrelere uygulanarak biyolojik aktivite kontrol edileceğinden dolayı aptamer seçilimi hem bakteriyel kaynaklı proteinler hem de ökaryotik kaynaklı proteinler hedef alınarak gerçekleştirilmiştir. His işaretli GHRH vektörünün aktarılması için, normal koşullarda GHRH eksprese etmeyen insan embriyonik böbrek hücreleri HEK293 hücre hattı kullanılmıştır [136]. HEK293 hücreleri His- ve His-GHRH vektörleri ile stabil bir şekilde transfekte edilmiş ve stabil hücrelerden izole edilen protein hedef olarak kullanılmıştır. Stabil olarak transfekte edilen hücrelerdeki GHRH ekspresyonu ise immunoblotlama ve GHRH ELISA yöntemleri ile doğrulanmıştır (Şekil 4.6). Stabil hücrelerdeki GHRH ekspresyonunun hücre büyümesini, proliferasyonunu ve koloni oluşturma potansiyelini arttırdığı ise yapılan biyolojik aktivite deneyleri ile gösterilmiştir (Şekil 4.7).

Nükleik asit bazlı ilaç keşfinde artan teknoloji ile tasarlanan, DNA kütüphanesi ile yüklü manyetik boncukların kullanılması ile yeni nesil aptamer seçilimi, ticari olarak x-aptamer olarak adlandırılmaktadır. Bu çalışmada, ticari olarak satılan x-aptamer seçim kiti kullanılarak, manyetik boncuk tabanlı PCR ürünlerinin klonlanması ve dizilenmesinin ardından, 19 adet putatif x-aptamer, AM BioTechnologies (Houston, ABD) tarafından sentezlenmiştir (Tablo 2). Mfold, Zuker'in [122] enerji minimizasyonu yöntemini kullanarak bir DNA veya RNA molekülünün optimal ve optimale yakın sekonder yapılarını tahmin eden bir programdır ve genellikle tek iplikli DNA aptamerlerinin şematik profillerinin ve  $\Delta G$  seviyelerinin fizyolojik koşullar altında tahmin edilmesinde tercih edilir. Mfold programının aptamerlerin iki boyutlu

yapısını kabul edilebilir doğrulukta oluşturabildiği bildirilmiştir [137] ve aptamerlerin iki boyutlu yapılarının tahmin edilmesi amacıyla farklı çalışmalarda kullanılmıştır [138], [139]. Bu çalışmada da x-aptamer seçim kiti ile seçilen x-aptamerlerin iki boyutlu yapıları mfold programı ile belirlenmiştir (Şekil 4.10). Gerçekleştirilen mfold analizine göre, TKY2.T1.01, TKY2.T1.04, TKY2.T1.05, TKY2.T1.06, TKY2.T1.08, TKY2.T1.10, TKY2.T1.11, TKY2.T1.12, TKY2.T1.13, TKY2.T1.17, TKY.T1.01 ve TKY.T1.05 putatif x-aptamerleri iki veya daha fazla olası iki boyutlu yapıya sahiptir. Bununla birlikte, TKY2.T1.02, TKY2.T1.03, TKY2.T1.15, TKY2.T1.16, TKY.T1.02, TKY.T1.03 ve TKY.T1.04 putatif x-aptamerleri ise bir adet olası iki boyutlu yapı profiline sahiptir. TKY2.T1.02, TKY2.T1.04, TKY2.T1.05, TKY2.T1.06, TKY2.T1.08, TKY2.T1.10, TKY2.T1.12, TKY2.T1.13, TKY2.T1.15, TKY2.T1.17, TKY.T1.03 ve TKY.T1.04 aptamerleri ise uzun ve geniş bir profile sahiptir. Aptamer seçimi için kullanılan yeni nesil x-aptamer teknolojisi ile seçilen aptamerler fosforoditioat, indol veya fenol ile modifiye edilmiş deoksiüridin gibi modifiye nükleotidler içermektedir [16]. Mfold analizinde elde edilen birden fazla olası yapı tahminleri ve farklı yapı profilleri, aday x-aptamerlerdeki modifiye edilen nükleotidlerin mfold programı tarafından doğru tanımlanmamasından kaynaklanıyor olabilir.

Seçilen aptamerlerin sentezlenmiş ligandlarına karşı bağlanma afinitesinin belirlenmesi amacıyla Sypabekova ve Li dot-blot yöntemini tercih etmiştir [140], [141]. Bu kapsamda bu çalışmada seçim sonrası elde edilen 19 putatif x-aptamerin hedef GHRH ligandına afinitesinin belirlenmesi için dot blot yöntemi kullanılmıştır. Putatif x-aptamerlerin 3' Biyotin işareti, hedef GHRH NH<sub>2</sub> (1-44) ligandına bağlanma afinitelerinin belirlenmesinde avantaj sağlamıştır. Yöntem sonunda aptamer uygulanmayan dot yoğunluğu baz alınarak aptamer uygulanan dotlardaki yoğunluklardaki göreceli değişiklikler belirlenmiştir. Buna göre TKY2.T1.01, TKY2.T1.02, TKY2.T1.03, TKY2.T1.04, TKY2.T1.05, TKY2.T1.08, TKY2.T1.10, TKY2.T1.12, TKY2.T1.13, TKY2.T1.15, TKY2.T1.17, TKY.T1.01 ve TKY.T1.02 x-aptamerleri hedef proteine anlamlı ölçüde yüksek bağlanma afinitesi göstermektedir. aptamerlerin etkinliğinin ve hedef moleküllere karşı aptamerlerin bağlanma eğiliminin değerlendirilebilmesi için, uygun hedeflerin seçimi aptamer seçim sürecindeki en önemli adımlardan biridir [142]. Genel olarak dot blot yöntemi, ligandlarla aptamerlerin K<sub>d</sub> değerlerini belirlemek için kullanılır [140]. Bu çalışmada da her

putatif x-aptamer için, artan aptamer dozunda aptamerler proteinler ile bir araya getirilerek dotlar oluşturuldu ve dot-blot yöntemi uygulandı. Elde edilen görüntülerdeki dot yoğunluğunun SigmaPlot programında gerçekleştirilen non-lineer regresyon analize istinaden, TKY2.T1.01, TKY2.T1.02, TKY2.T1.03, TKY2.T1.04, TKY2.T1.05, TKY2.T1.08, TKY2.T1.11, TKY2.T1.13, TKY2.T1.15, TKY2.T1.17, TKY.T1.03, TKY.T1.04 x-aptamerlerinin  $K_d$  değerleri sırasıyla 18.3, 12.17, 15.16, 32.9, 2.91, 22.7, 149.05, 57.5, 115.6, 34.8, 2.50, 6.09, 22.7 nM olarak hesaplanmıştır. Dot blot yöntemi ile elde edilen sonuçların doğrulanması için, doza bağlı aptamer-ligand dot blot analizinin yanı sıra, seçilen TKY2.T1.13 için SPR analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.30). SPR yöntemi, katı-sıvı faza immobilize edilen hedefler ile solüsyon içerisindeki partnerlerinin etkileşiminin deteksiyonu için kullanılan bir yöntemdir ve bir reaksiyonun kinetik parametrelerinin ve denge sabitinin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Aptamer çalışmalarında ise, aptamer-hedef ligand komplekslerinin analizi için kullanılmaktadır [143]. Buna göre, TKY2.T1.13 putatif x-aptamerinin bağlanma afinitesinin gösterilmesi için SPR yöntemi uygulanmış ve  $K_d$  değeri 47,5 nM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.30). Aynı aptamer için doza bağlı dot blot yöntemiyle hesaplanan  $K_d$  değeri ise 57,5 nM olarak hesaplanmıştır ve dot blot sonucu elde edilen değer, SPR ile elde edilen değere yakın olması, yapılan çalışmanın güvenilirliğini arttırmaktadır.

Aptamerler, birer terapötik ajan olarak değerlendirilse dahi, sıcaklık ve nükleaz içeren özel koşullarda stabilitesi farklı olabilmektedir [144]. Aptamerlerin stabiliteilerinin değerlendirilebilmesi için, aptamerlerin artan sürelerde serum ile muamele edilerek elektroforetik olarak bütünlüğünün değerlendirilmesi çeşitli yayınlarda uygulanmıştır [145], [146]. Bu nedenle, yapılan çalışmada eşit hacimde insan serumu ve aptamerler bir araya getirilerek zamana bağlı olarak 37°C de inkübasyonu sonrası aptamerlerin serum stabiliteileri zamana bağlı olarak değerlendirilmiştir. Buna göre, TKY2.T1.02, TKY2.T1.03, TKY2.T1.04, TKY2.T1.05, TKY2.T1.13, TKY2.T1.15, TKY2.T1.17 ve TKY.T1.05 putatif x-aptamerlerinin serum stabiliteileri 120 saate kadar uzamıştır (Şekil 4.31). Yapılan serum stabilitesi, dot blot ve sekonder yapılarının belirlenmesi sonucu elde edilen veriler birlikte incelendiğinde TKY2.T1.08 ve TKY2.T1.13 aptamerleri sonraki deneyler için hedef iki aptamer olarak seçilmiştir.

Putatif x-aptamerlerin rekombinant GHRH hedefine bağlanma afinitelerinin ve insan serumundaki stabiliteilerinin belirlenmesinin ardından *in vitro* ortamda GHRH

eksprese eden hücrelerde GHRH ligandına bağlanma afinitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda literatürde GHRH ekspresyonu bildirilen pankreas, kolorektal ve prostat kanseri hücre hatları MIA PaCa-2, HT29 ve PC3 hücreleri ile insan prostat epitel hücre hattı PNT1a hücrelerindeki GHRH ekspresyonunun gösterilmesi amacıyla GHRH immunofloresan, immunoblotlama ve ELISA yöntemleri uygulanmış ve belirtilen hücrelerdeki GHRH ekspresyonu gösterilmiştir (Şekil 4.32, Şekil 4.33, Şekil 4.34).

Immunofloresan, florofor ile işaretli spesifik antikolar kullanılarak bir doku veya hücredeki çeşitli bileşenlerin görüntülenmesine olanak sağlayan önemli bir tekniktir. Özellikle farklı floroforlar taşıyan farklı antikoların aynı anda kullanılarak yöntemin uygulanması ile ligandların bağlanma profili tespit edilebilir [147]. Bu çalışmada putatif x-aptamerler 3' biyotin işareti ile sentezlendiğinden dolayı, bu işareti tanıyan streptavidin ve ona konjuge Alexa Fluor 488 floroforu hücreye uygulanan x-aptamerlerin gösterilmesi için, anti-GHRH antikoru uygulaması sonrası bu antikora özgü sekonder antikora konjuge Alexa Fluor 568 hücrelerde sentezlenen GHRH ligandının gösterilmesi için kullanılarak ikili immunofloresan yöntemi uygulanmıştır. Bu uygulamada MIA PaCa-2 pankreas kanseri hücre hattında hücre yüzeyine bağlanmasını göstermek için kullanılmıştır. Immunofloresan sonuçlarına göre, TKY2.T1.08 ve TKY2.T1.13 x-aptamerlerinin 50 nM konsantrasyondan başlayarak hücre membranına bağlanmakta ve bu bağlanma, uygulanan x-aptamer dozu ile orantılı olarak artmaktadır. Aynı zamanda, x-aptamerlerin görüntülerdeki ışımalarının, GHRH'ye özgü antikoların ışması ile paralellik göstermesi, uygulanan x-aptamerlerin GHRH ile birlikte hücre yüzeyine bağlandığı konusunda ipucu vermektedir. Her iki aptamer için de özellikle 250 nM ve 500 nM aptamer dozlarında bağlanma profilindeki etki önemli ölçüde gözlemlenmektedir. Buradan yola çıkarak daha ileri çalışmaların GHRH'nin epitop bölgelerinde TKY2.T1.08 ve TKY2.T1.13 aptamerlerinin bağlanma bölgesini bulması ve ayrıca aptamer bağlı GHRH'nin GHRH'ye bağlanma bölgesinin tanımlanması için *in silico* analizler gerçekleştirilebilir. Bunun yanı sıra, *in vitro* analizler ile bu x-aptamerlerin GHRH sinyali üzerindeki inhibe edici etkisi belirlenebilir.

İmmunofloresan yöntemi ile putatif x-aptamerlerin hücre içindeki GHRH hedeflerine bağlanma profilinin belirlenmesinin ardından, aptamerlerin aynı koşullarda medyaya salınan serbest GHRH'ye bağlanabilme kapasitelerinin de belirlenebilmesi

amaçlanmıştır. Bu doğrultuda hücre ekimleri ve aptamer uygulamasının ardından, immunofloresan için yapılacak fiksasyon öncesi hücrelerin besi yeri toplanarak Streptavidin-AlexaFluor 488 ile inkübe edildikten sonra Hücre Akış sitometrisi cihazında okutulmuştur. FACS Flow analizi sonucunda aptamer uygulanan örneklerin popülasyonunda kontrol popülasyonuna göre kayma gözlemlenmesi, aptamerlerin medyadaki serbest GHRH'ye de bağlanabildiği konusunda bilgi vermektedir.

Putatif x-aptamerler GHRH ligandını hedef alacak şekilde seçilmiştir. Ancak ligandın hangi bölgesine bağlandığı ile ilgili ön görüşü olmadığından, aptamerin bağlanma bölgesi, GHRH'nin reseptörüne bağlanma bölgesi ile ilişkili olup olmadığını belirleyebilmek adına, aptamer uygulaması ile GHRH sinyal yolağında yer alan downstream hedeflerde değişiklik olup olmadığı araştırılmıştır. GHRH sinyal yolağı incelendiğinde (Şekil 2.7) yolağın son hedefi GH salgılamasıdır. Ayrıca GHRH ekspresyonunun artması, pozitif geri besleme mekanizması ile reseptörünün ekspresyonunu arttırmaktadır [6]. Bu nedenle, MIA PaCa-2 hücrelerinde aptamer uygulaması sonrası GH ve GHRHR ekspresyonu immunofloresan yöntemi ile incelenmiştir. Hücrelere ekzojen rekombinant GHRH uygulanması GHRH sinyal yolağını tetikleyeceğinden dolayı pozitif kontrol olarak kullanılmış ve kontrol hücrelere göre hem GH hem GHRHR ekspresyonundaki artış gösterilmiştir. TKY2.T1.02, TKY2.T1.03, TKY2.T1.11, TKY2.T1.17 uygulamalarında GH ve GHRHR ekspresyonu daha aktif iken, özellikle TKY2.T1.08, TKY2.T1.13, TKY.T1.02 ve TKY.T1.03 uygulamalarında sinyalin büyük ölçüde baskılandığı tespit edilmiştir.

GHRH sinyal yolağının önemli noktalarından biri ise GHRH'nin reseptöre bağlanmasıyla konformasyon değişikliğine uğrayan reseptörün uyarıcı G proteinini aktive ederek cAMP salgılamasını uyarmasıdır [6]. Bu durum G-protein bağlı reseptörlerin ortak özelliği olduğundan ve bu reseptörler farmasötik sanayinin en önemli araştırma alanlarından biri olduğundan, hücrelerde cAMP miktarının deteksiyonu için farklı yöntemler geliştirilmiştir [148]. Bu çalışmada da bu yöntemlerden bir tanesi olan akümülyasyon yöntemi ile hücrelerdeki cAMP miktarı tespit edilmiştir. Buna göre HT29 hücrelerinde TKY2.T1.08 ve TKY2.T1.13 uygulaması ile cAMP miktarı bakımından kontrol hücrelere kıyasla anlamlı bir düşüş gözlemlenmektedir. MIA PaCa-2 hücrelerinde ise anlamlı bir düşüş gözlemlenmemektedir. Bu durum, aptamer uygulaması sonrası baz alınan zaman

dilimi ile ilgili olabilir. cAMP salınımı, sinyal yolağının aktivasyonunun ardından tetiklenen ilk olay olduğundan, bu hücrelerde belirlenen uygulama süresinden daha erken zaman noktalarında deney durdurularak tekrarlanırsa beklenen etki bu hücrelerde de gözlemlenebilecektir.

GHRH'nin en önemli biyolojik fonksiyonu Büyüme Hormonunun salgılanmasını uyarak hücre büyümesini ve çoğalmasını tetiklemesidir [39]. Ekzojen GHRH uygulamasının ise farklı hücrelerde proliferasyonu indüklediği, yara iyileşmesini hızlandırdığı literatürde bildirilmektedir [53]. Aksine, GHRH peptid antagonistlerinin ise GHRH sinyalizasyonunu baskılayarak hücre proliferasyonuna ket vurduğu Populo ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir [81]. Bu çalışmada da uygulanan aptamerlerin hücre canlılığına keyt vurucu etkisi MIA PaCa-2, HT29 ve PC3 hücrelerinde incelenmiştir. Yapılan MTT hücre canlılığı testi ile TKY2.T1.08 ve TKY2.T1.13 putatif x-aptamerlerinin her üç hücre hattında da hücre canlılığına en çok ket vuran aptamerler olduğu gösterilmiştir.

Reaktif Oksijen Türleri (ROS), mitokondriyal oksidatif metabolizma sırasında veya çevresel streslere karşı hücrel cevap sürecinde üretilmekte ve diyabet, kanser, nörodejenerasyon gibi hastalıklarla ilişkilendirilmektedir [149]. Ayrıca, endojen veya ekzojen olarak üretilen ROS, anti-apoptotik proteinlerin fonksiyonunu inhibe eden pro-apoptotik Bcl-2 proteinlerini aktive eden p53 ve/ya JNK proteinlerini aktive ederek apoptotik yolağın indüklenmesini sağlar [150]. GHRH antagonistleri MIA-602 ve MIA-690'ın reaktif oksijen türleri oluşumunu indüklediği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir [151]. Putatif x-aptamerlerin ROS oluşumuna olası etkisi H<sub>2</sub>DCFDA floresan boyama ile araştırılmıştır. Floresan mikroskop görüntüleri incelendiğinde, aptamer uygulaması yapılan örneklerde DCFDA sinyalinde artış olduğu gözlemlenmektedir. Hidrojen peroksitin pozitif kontrol olarak kullanıldığı bu deneyin sonucuna göre putatif x-aptamerlerin hücre içi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu indüklemektedir (Şekil 4.50).

Dai ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, multiple myeloma hücrelerini spesifik olarak tanıyan TY04 DNA aptamerinin bu hücrelerde hücre döngüsünde tutulmaya neden olarak hücre büyümesini inhibe ettiği rapor edilmiştir [152]. Ayrıca RAD52'ye karşı geliştirilen aptamerin akut myeloid lösemi hücrelerinde hücre döngüsünü S/G2 fazında bloke ettiği ortaya koyulmuştur [153]. Bu çalışmada seçilen putatif x-aptamerlerden TKY2.T1.08'in HT29 ve PC3 hücrelerinde G2/M fazında

hücre döngüsünü bloke ederen bu fazdaki hücre popülasyonunu arttırdığı, TKY2.T1.13 x-aptamerinin ise hücre döngüsünün SubG1 fazında tutulmaya neden olarak bu fazdaki popülasyonda artışa neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.51).

Literatüre bakıldığında, luteinize edici hormona [154], tiroksin hormonuna [155], kortizol hormonuna [156] karşı aptamerler sentezlenmiş ve karakterize edilmiş olmasına rağmen, GHRH'ye karşı aptamer sentezlenmesi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu çalışma, GHRH'ye karşı x-aptamerlerin sentezlendiğini bildiren ve sentezlenen aptamerleri dot-blot, immunofloresan ve SPR analizi ile karakterize eden ilk çalışmadır.

Sonuç olarak, gerçekleştirilen bu çalışma, GHRH (1-44) peptidine karşı üç adet putatif x-aptamerin seçimini, sentezini, karakterizasyonunu ve anti-proliferatif etkilerini gösteren ilk rapordur. GHRH'yi hedefleyen ve GHRH sinyal mekanizmasını inhibe etmek üzere tasarlanan çeşitli peptid antagonistleri geliştirilmiş olmasına rağmen, GHRH'yi hedefleyen herhangi bir x-aptamer literatürde bulunmamaktadır. Bu çalışmada literatürde bulunan bu eksiklik giderilmeye çalışılmış ve GHRH NH<sub>2</sub> (1-44) peptidini hedefleyerek x-aptamer teknolojisi ile anti-GHRH x-aptamerler seçilmiştir. Seçim sonrası yeni nesil dizileme yöntemi ile GHRH NH<sub>2</sub> (1-44)'ye karşı 19 putatif x-aptamer sentezlenmiştir. Bu aptamerler arasında, TKY2.T1.01, TKY2.T1.02, TKY2.T1.03, TKY2.T1.04, TKY2.T1.05, TKY2.T1.12, TKY2.T1.13, TKY. T1.01 ve TKY.T1.02 x-aptamerlerinin dot blot analizi ile yüksek bağlanma afinitesi ve düşük K<sub>d</sub> değerleri olduğu gösterilmiştir. Aptamerlerin serum stabilitesi ve iki boyutlu yapı analizleri de göz önüne alındığında TKY2.T1.13 SPR analizi için seçilmiştir. Ayrıca TKY2.T1.08 ve TKY2.T1.13 x-aptamerleri, yüksek GHRH eksprese eden ve salgılayan hücre hatları kullanılarak *in vitro* sistemlerde bağlanma yetenekleri bakımından karakterize edilmiştir. Bu x-aptamerlerin GHRH sinyalizasyonu üzerindeki potansiyel inhibe edici etkisinin ve GHRH ligandları üzerindeki x-aptamerler için bağlanma bölgelerinin belirlenmesi için yeni çalışmalar ileri aşamalarda yapılabilir. Ek olarak daha fazla *in vitro*, *in vivo* ve *in silico* analiz yapılarak bu iki yeni x-aptamer etkinliğinin GHRH sinyali üzerindeki etkisi vurgulanabilir.

## KAYNAKÇA

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, Nov. 2018.
- [2] P. J. Woll, "Neuropeptide growth factors and cancer," *British Journal of Cancer*, vol. 63, no. 3. Nature Publishing Group, pp. 469–475, 1991.
- [3] G. Di Bella, B. Colori, and R. Scanferlato, "The over-expression of GH/GHR in tumour tissues with respect to healthy ones confirms its oncogenic role and the consequent oncosuppressor role of its physiological inhibitor, somatostatin: A review of the literature," *Neuroendocrinology Letters*. 2018.
- [4] Y. J. Chen *et al.*, "Autocrine human growth hormone stimulates the tumor initiating capacity and metastasis of estrogen receptor-negative mammary carcinoma cells," *Cancer Lett.*, 2015.
- [5] K. Lin-Su and M. P. Wajnrach, "Growth hormone releasing hormone (GHRH) and the GHRH receptor," *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, vol. 3, no. 4. pp. 313–323, Dec-2002.
- [6] M. M. Malagon, R. Vazquez-Martinez, A. J. Martinez-Fuentes, F. Gracia-Navarro, and J. P. Castaño, "GHRH," in *Handbook of Biologically Active Peptides*, Elsevier Inc., 2013, pp. 784–791.
- [7] R. Busto *et al.*, "Expression of mRNA for growth hormone-releasing hormone and splice variants of GHRH receptors in human malignant bone tumors," *Regul. Pept.*, 2002.
- [8] A. Siejka, N. Barabutis, and A. V. Schally, "GHRH antagonist inhibits focal adhesion kinase (FAK) and decreases expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human lung cancer cells in vitro," *Peptides*, vol. 37, no. 1, pp. 63–68, Sep. 2012.
- [9] N. Barabutis, A. V. Schally, and A. Siejka, "P53, GHRH, inflammation and cancer," *EBioMedicine*, vol. 37. Elsevier B.V., pp. 557–562, 01-Nov-2018.
- [10] A. V. Schally, R. Perez, N. L. Block, and F. G. Rick, "Potentiating effects of GHRH analogs on the response to chemotherapy," *Cell Cycle*. 2015.
- [11] V. Calzada, "Aptamers in Diagnostic and Molecular Imaging Applications,"

- 2019.
- [12] C. Tuerk and L. Gold, "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase," *Science* (80- . ), 1990.
- [13] A. Boussebayle, F. Groher, and B. Suess, "RNA-based Capture-SELEX for the selection of small molecule-binding aptamers," *Methods*, 2019.
- [14] K. M. Song, S. Lee, and C. Ban, "Aptamers and their biological applications," *Sensors*. 2012.
- [15] T. Adachi and Y. Nakamura, "Aptamers: A review of their chemical properties and modifications for therapeutic application," *Molecules*. 2019.
- [16] 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, Oct. 2012.
- [17] P. Vanita, V. Subrahmanyam, and K. Jhansi, "Issue 4 • 1000128 J Carcinogene Mutagene Citation," *Cancer. J Carcinog. Mutagen.*, vol. 2, p. 128, 2011.
- [18] "Cancer." [Online]. Available: [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1). [Accessed: 25-Mar-2020].
- [19] American Cancer Society, "Cancer Facts & Figures 2019," Atlanta, 2019.
- [20] "The Development and Causes of Cancer - The Cell - NCBI Bookshelf." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>. [Accessed: 26-Mar-2020].
- [21] P. Gotwals *et al.*, "Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy," *Nature Reviews Cancer*. 2017.
- [22] N. Vasani, J. Baselga, and D. M. Hyman, "A view on drug resistance in cancer," *Nature*. 2019.
- [23] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 04-Mar-2011.
- [24] S. Cohen, R. Levi-Montalcini, and V. Hamburger, "A NERVE GROWTH-STIMULATING FACTOR ISOLATED FROM SARCOMA 37 AND 180," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1954.
- [25] E. Witsch, M. Sela, and Y. Yarden, "Roles for Growth Factors in Cancer Progression," *Physiology*, vol. 25, no. 2. American Physiological Society, pp. 85–101, 2010.
- [26] 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. Oxford University Press, pp. 1600–1612, 2019.
- [27] H. Kiaris, M. Koutsilieris, A. Kalofoutis, and A. V. Schally, “Growth hormone-releasing hormone and extra-pituitary tumorigenesis: Therapeutic and diagnostic applications of growth hormone-releasing hormone antagonists,” *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 12, no. 8. pp. 1385–1394, 01-Aug-2003.
- [28] R. Granata, “Peripheral activities of growth hormone-releasing hormone,” *Journal of Endocrinological Investigation*. 2016.
- [29] G. Fürstenberger and H. J. Senn, “Insulin-like growth factors and cancer,” *Lancet Oncology*. 2002.
- [30] N. Barabutis and A. V. Schally, “Growth hormone-releasing hormone: Extrapituitary effects in physiology and pathology,” *Cell Cycle*, vol. 9, no. 20. Taylor and Francis Inc., pp. 4110–4116, 15-Oct-2010.
- [31] A.-X. Liu *et al.*, “Impact of Axis of GHRH and GHRH Receptor on Cell Viability and Apoptosis of the Placental Choriocarcinoma Cell Line,” *Curr. Mol. Med.*, vol. 16, no. 3, pp. 299–311, Mar. 2016.
- [32] O. Khorram, M. Garthwaite, E. Grosen, and T. Golos, “Human uterine and ovarian expression of growth hormone-releasing hormone messenger RNA in benign and malignant gynecologic conditions,” *Fertil. Steril.*, 2001.
- [33] P. Popovics, A. V. Schally, L. Salgueiro, K. Kovacs, and F. G. Rick, “Antagonists of growth hormone-releasing hormone inhibit proliferation induced by inflammation in prostatic epithelial cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2017.
- [34] C. G. Martínez-Moreno *et al.*, “Growth hormone (GH) and GH-releasing hormone (GHRH): Co-localization and action in the chicken testis,” *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 199, pp. 38–45, Apr. 2014.
- [35] A. Stephanou, R. A. Knight, and S. L. Lightman, “Production of a growth hormone-releasing hormone-like peptide and its mRNA by human lymphocytes,” *Neuroendocrinology*, vol. 53, no. 6, pp. 628–33, Jun. 1991.
- [36] A. Havt *et al.*, “The expression of the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor and its splice variants in normal and neoplastic human tissues,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 48, pp. 17424–17429,

Nov. 2005.

- [37] J. T. Allen, C. A. Bloor, R. K. Kedia, R. A. Knight, and M. A. Spiteri, "Expression of growth hormone-releasing factor, growth hormone, insulin-like growth factor-1 and its binding proteins in human lung," *Neuropeptides*, vol. 34, no. 2, pp. 98–107, Apr. 2000.
- [38] V. Florea *et al.*, "Agonists of growth hormone-releasing hormone stimulate self-renewal of cardiac stem cells and promote their survival," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 48, pp. 17260–17265, Dec. 2014.
- [39] 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, Dec. 2016.
- [40] H. M. Wu, A. V. Schally, J. C. Cheng, M. Zarandi, J. Varga, and P. C. K. Leung, "Growth hormone-releasing hormone antagonist induces apoptosis of human endometrial cancer cells through PKC $\delta$ -mediated activation of p53/p21," *Cancer Lett.*, vol. 298, no. 1, pp. 16–25, Dec. 2010.
- [41] A. Papadia *et al.*, "Growth hormone-releasing hormone antagonists inhibit growth of human ovarian cancer," *Horm. Metab. Res.*, vol. 43, no. 11, pp. 816–820, Oct. 2011.
- [42] N. Barabutis, A. Siejka, and A. V. 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, Mar. 2010.
- [43] 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, Sep. 2002.
- [44] G. Mezey *et al.*, "Prognosis in human glioblastoma based on expression of ligand growth hormone-releasing hormone, pituitary-type growth hormone-releasing hormone receptor, its splicing variant receptors, EGF receptor and PTEN genes.," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 140, no. 10, pp. 1641–1649, Oct. 2014.
- [45] S. Freddi *et al.*, "Expression of growth hormone-releasing hormone receptor splicing variants in human primary adrenocortical tumours," *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 62, no. 5, pp. 533–538, May 2005.
- [46] 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.*, 2012.
- [47] E. Theophanous *et al.*, “The immunohistochemical expression of growth hormone-releasing hormone receptor splice variant 1 is a favorable prognostic marker in colorectal cancer,” *Mol. Med.*, vol. 15, no. 7–8, pp. 242–7, Jul. 2009.
- [48] Z. Szereday *et al.*, “Antagonists of growth hormone-releasing hormone inhibit the proliferation of experimental non-small cell lung carcinoma,” *Cancer Res.*, vol. 63, no. 22, pp. 7913–9, Nov. 2003.
- [49] F. Köster *et al.*, “Triple-negative breast cancers express receptors for growth hormone-releasing hormone (GHRH) and respond to GHRH antagonists with growth inhibition,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 116, no. 2, pp. 273–279, 2009.
- [50] Z. Rekasi, T. Czompoly, A. V. Schally, and G. Halmos, “Isolation and sequencing of cDNAs for splice variants of growth hormone-releasing hormone receptors from human cancers,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 97, no. 19, pp. 10561–10566, Sep. 2000.
- [51] T. Cui and A. V. Schally, “Growth hormone-releasing hormone (GHRH) and its agonists inhibit hepatic and tumoral secretion of IGF-1,” *Oncotarget*, vol. 9, no. 47, pp. 28745–28756, Jun. 2018.
- [52] I. Czikora *et al.*, “Protective effect of Growth Hormone-Releasing Hormone agonist in bacterial toxin-induced pulmonary barrier dysfunction,” *Front. Physiol.*, vol. 5 JUL, p. 259, 2014.
- [53] D. Gallo *et al.*, “GH-releasing hormone promotes survival and prevents TNF- $\alpha$ -induced apoptosis and atrophy in C2C12 myotubes,” *Endocrinology*, vol. 156, no. 9, pp. 3239–3252, Sep. 2015.
- [54] “GHRH Gene - GeneCards | SLIB Protein | SLIB Antibody.” [Online]. Available: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GHRH>. [Accessed: 01-Mar-2020].
- [55] “GHRHR Gene - GeneCards | GHRHR Protein | GHRHR Antibody.” [Online]. Available: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GHRHR&keywords=GHRH-R>. [Accessed: 01-Mar-2020].
- [56] M. T. Matsoukas and G. A. Spyroulias, “Dynamic properties of the growth hormone releasing hormone receptor (GHRHR) and molecular determinants of

- GHRH binding,” *Mol. Biosyst.*, vol. 13, no. 7, pp. 1313–1322, Jun. 2017.
- [57] F. Hohla, T. Winder, R. Greil, F. G. Rick, N. L. Block, and A. V. Schally, “Targeted therapy in advanced metastatic colorectal cancer: Current concepts and perspectives,” *World J. Gastroenterol.*, vol. 20, no. 20, pp. 6102–6112, May 2014.
- [58] T. Cui *et al.*, “Agonistic analogs of growth hormone releasing hormone (GHRH) promote wound healing by stimulating the proliferation and survival of human dermal fibroblasts through ERK and AKT pathways,” *Oncotarget*, vol. 7, no. 33, pp. 52661–52672, Aug. 2016.
- [59] P. Catanuto *et al.*, “Expression of Receptors for Pituitary-Type Growth Hormone-Releasing Hormone (pGHRH-R) in Human Papillary Thyroid Cancer Cells: Effects of GHRH Antagonists on Matrix Metalloproteinase-2,” *Horm. Cancer*, vol. 6, no. 2–3, pp. 100–106, Jun. 2015.
- [60] S. Seitz *et al.*, “Combination of GHRH antagonists and docetaxel shows experimental effectiveness for the treatment of triple-negative breast cancers,” *Oncol. Rep.*, vol. 30, no. 1, pp. 413–418, Jul. 2013.
- [61] B. Kővári, S. Vranic, C. Marchio, A. Sapino, and G. Cserni, “The expression of GHRH and its receptors in breast carcinomas with apocrine differentiation—further evidence of the presence of a GHRH pathway in these tumors,” *Hum. Pathol.*, 2017.
- [62] N. Tuteja, “Signaling through G protein coupled receptors,” *Plant Signaling and Behavior*. 2009.
- [63] 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 International*. 2016.
- [64] M. ZARANDI, V. CSERNUS, L. BOKSER, S. BAJUSZ, K. GROOT, and A. V. SCHALLY, “Synthesis and in vitro and in vivo activity of analogs of growth hormone-releasing hormone (GH-RH) with C-terminal agmatine,” *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1990.
- [65] J. Izdebski, J. Pinski, J. E. Horvath, G. Halmos, K. Groot, and A. V. Schally, “Synthesis and biological evaluation of superactive agonists of growth hormone-releasing hormone,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1995.
- [66] R. M. Kanashiro-Takeuchi *et al.*, “Activation of growth hormone releasing hormone (GHRH) receptor stimulates cardiac reverse remodeling after

- myocardial infarction (MI),” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 2, pp. 559–563, Jan. 2012.
- [67] B. Ludwig *et al.*, “Agonist of growth hormone-releasing hormone as a potential effector for survival and proliferation of pancreatic islets,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010.
- [68] 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*, 2014.
- [69] 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, Nov. 2018.
- [70] M. Zarandi *et al.*, “Synthesis and structure-activity studies on novel analogs of human growth hormone releasing hormone (GHRH) with enhanced inhibitory activities on tumor growth,” *Peptides*, vol. 89, pp. 60–70, Mar. 2017.
- [71] P. Robberecht *et al.*, “Structural requirements for the activation of rat anterior pituitary adenylate cyclase by growth hormone-releasing factor (grf): Discovery of (n-ac-tyr1, d-arg2)-grf(1–29)-nh2 as a grf antagonist on membranes,” *Endocrinology*, vol. 117, no. 5, pp. 1759–1764, 1985.
- [72] R. D. Kineman, “Antitumorigenic actions of growth hormone-releasing hormone antagonists,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 2. National Academy of Sciences, pp. 532–534, 18-Jan-2000.
- [73] 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, Sep. 2000.
- [74] A. Siejka, A. V. Schally, and N. Barabutis, “Activation of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 pathway by growth hormone-releasing hormone,” *Cell. Mol. Life Sci.*, 2010.
- [75] A. Siejka, N. Barabutis, and A. V. Schally, “GHRH antagonist MZ-5-156 increases the expression of AMPK in A549 lung cancer cells,” *Cell Cycle*, 2011.
- [76] A. V. Schally, J. L. Varga, and J. B. Engel, “Antagonists of growth-hormone-releasing hormone: An emerging new therapy for cancer,” *Nature Clinical*

*Practice Endocrinology and Metabolism*. 2008.

- [77] F. Hohla *et al.*, “GHRH antagonist causes DNA damage leading to p21 mediated cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells,” *Cell Cycle*, vol. 8, no. 19, pp. 3149–3156, Oct. 2009.
- [78] S. Bellyei, A. V. Schally, M. Zarandi, J. L. Varga, I. Vidaurre, and E. Pozsgai, “GHRH antagonists reduce the invasive and metastatic potential of human cancer cell lines in vitro,” *Cancer Lett.*, vol. 293, no. 1, pp. 31–40, Jul. 2010.
- [79] M. A. Uddin *et al.*, “GHRH antagonists support lung endothelial barrier function,” *Tissue Barriers*, vol. 7, no. 4, p. 1669989, Oct. 2019.
- [80] 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*, Jul. 2019.
- [81] 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, Dec. 2017.
- [82] H. Wang, X. Zhang, I. Vidaurre, R. Cai, W. Sha, and A. V. Schally, “Inhibition of experimental small-cell and non-small-cell lung cancers by novel antagonists of growth hormone-releasing hormone,” *Int. J. Cancer*, vol. 142, no. 11, pp. 2394–2404, Jun. 2018.
- [83] L. Muñoz-Moreno, A. V. Schally, J. C. Prieto, M. J. Carmena, and A. M. Bajo, “Growth hormone-releasing hormone receptor antagonists modify molecular machinery in the progression of prostate cancer,” *Prostate*, vol. 78, no. 12, pp. 915–926, Sep. 2018.
- [84] A. Ruscito and M. C. DeRosa, “Small-molecule binding aptamers: Selection strategies, characterization, and applications,” *Frontiers in Chemistry*. 2016.
- [85] K. Yoshimoto, “Selection technologies and applications of nucleic acid aptamers,” *Anal. Sci.*, 2019.
- [86] C. M. Dollins, S. Nair, and B. A. Sullenger, “Aptamers in immunotherapy,” *Human Gene Therapy*, vol. 19, no. 5. NIH Public Access, pp. 443–450, 01-May-2008.
- [87] B. A. Sullenger, H. F. Gallardo, G. E. Ungers, and E. Gilboa, “Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication,” *Cell*, vol. 63, no. 3, pp. 601–608, Nov. 1990.
- [88] R. P. O’Malley, T. M. Mariano, J. Siekierka, and M. B. Mathews, “A

- mechanism for the control of protein synthesis by adenovirus VA RNAI,” *Cell*, vol. 44, no. 3, pp. 391–400, Feb. 1986.
- [89] R. N. Veedu, “Medicinal chemistry of aptamers,” *Curr. Top. Med. Chem.*, 2015.
- [90] “About Aptamer – Aptamer Sciences.” [Online]. Available: <http://aptsci.com/en/aptamer/aptamer/>. [Accessed: 16-Apr-2020].
- [91] K. E. Maier and M. Levy, “From selection hits to clinical leads: progress in aptamer discovery,” *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*. 2016.
- [92] K. Min *et al.*, “Dual-aptamer-based delivery vehicle of doxorubicin to both PSMA (+) and PSMA (-) prostate cancers,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 8, pp. 2124–2132, Mar. 2011.
- [93] T. C. Chu, K. Y. Twu, A. D. Ellington, and M. Levy, “Aptamer mediated siRNA delivery,” *Nucleic Acids Res.*, 2006.
- [94] K. Min *et al.*, “Simultaneous electrochemical detection of both PSMA (+) and PSMA (-) prostate cancer cells using an RNA/peptide dual-aptamer probe,” *Chem. Commun.*, 2010.
- [95] S. Shin, I. H. Kim, W. Kang, J. K. Yang, and S. S. Hah, “An alternative to Western blot analysis using RNA aptamer-functionalized quantum dots,” *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2010.
- [96] J. Vivekananda and J. L. Kiel, “Anti-Francisella tularensis DNA aptamers detect tularemia antigen from different subspecies by Aptamer-Linked Immobilized Sorbent Assay,” *Lab. Investig.*, 2006.
- [97] D. N. MAZAAFRIANTO, A. ISHIDA, M. MAEKI, H. TANI, and M. TOKESHI, “An Electrochemical Sensor Based on Structure Switching of Dithiol-modified Aptamer for Simple Detection of Ochratoxin A,” *Anal. Sci.*, vol. 35, no. 11, pp. 1221–1226, Nov. 2019.
- [98] B. P. Crulhas, A. E. Karpik, F. K. Delella, G. R. Castro, and V. A. Pedrosa, “Electrochemical aptamer-based biosensor developed to monitor PSA and VEGF released by prostate cancer cells,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 409, no. 29, pp. 6771–6780, Nov. 2017.
- [99] D. Vavvas and D. J. D’Amico, “Pegaptanib (Macugen): Treating Neovascular Age-Related Macular Degeneration and Current Role in Clinical Practice,” *Ophthalmology Clinics of North America*, vol. 19, no. 3. pp. 353–360, Sep-2006.

- [100] C. A. Stein and D. Castanotto, “FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017,” *Molecular Therapy*, vol. 25, no. 5. American Society of Gene and Cell Therapy, pp. 1069–1075, 03-May-2017.
- [101] R. Ueki *et al.*, “A chemically unmodified agonistic DNA with growth factor functionality for in vivo therapeutic application,” *Sci. Adv.*, vol. 6, no. 14, p. eaay2801, Apr. 2020.
- [102] L. Guo and Q. Zhao, “Thrombin-linked aptamer assay for detection of platelet derived growth factor BB on magnetic beads in a sandwich format,” *Talanta*, vol. 158, pp. 159–164, Sep. 2016.
- [103] J. Hamamoto *et al.*, “The FGF2 aptamer inhibits the growth of FGF2-FGFR pathway driven lung cancer cells,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 503, no. 3, pp. 1330–1334, Sep. 2018.
- [104] A. D. Ellington and J. W. Szostak, “In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands,” *Nature*, vol. 346, no. 6287, pp. 818–822, 1990.
- [105] S. D. Mendonsa and M. T. Bowser, “In vitro selection of aptamers with affinity for neuropeptide Y using capillary electrophoresis,” *J. Am. Chem. Soc.*, 2005.
- [106] S. D. Mendonsa and M. T. Bowser, “In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis,” *Anal. Chem.*, 2004.
- [107] Y. M. Chang, M. J. Donovan, and W. Tan, “Using aptamers for cancer biomarker discovery,” *Journal of Nucleic Acids*. 2013.
- [108] T. Kunii, S. I. Ogura, M. Mie, and E. Kobatake, “Selection of DNA aptamers recognizing small cell lung cancer using living cell-SELEX,” *Analyst*, vol. 136, no. 7, pp. 1310–1312, Apr. 2011.
- [109] D. Van Simaey, D. López-Colón, K. Sefah, R. Sutphen, E. Jimenez, and W. Tan, “Study of the Molecular Recognition of Aptamers Selected through Ovarian Cancer Cell-SELEX,” *PLoS One*, vol. 5, no. 11, p. e13770, Nov. 2010.
- [110] D. A. Daniels, H. Chen, B. J. Hicke, K. M. Swiderek, and L. Gold, “A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 26, pp. 15416–15421, Dec. 2003.
- [111] “The Importance of Negative Aptamer Selection Aptamer Selection The Origination of Negative Aptamer Selection Achieving Selectivity for Highly Similar Molecules,” 2018.
- [112] S. Elmore, “Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death,” *Toxicologic*

- Pathology*, vol. 35, no. 4. NIH Public Access, pp. 495–516, 2007.
- [113] J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie, “Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics,” *Br. J. Cancer*, vol. 26, no. 4, pp. 239–257, 1972.
- [114] H. R. Horvitz, “Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*,” in *Cancer Research*, 1999, vol. 59, no. 7 SUPPL.
- [115] G. Pistrutto, D. Trisciuoglio, C. Ceci, Alessia Garufi, and G. D’Orazi, “Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies,” *Aging*, vol. 8, no. 4. Impact Journals LLC, pp. 603–619, 2016.
- [116] S. Goldar, M. S. Khaniani, S. M. Derakhshan, and B. Baradaran, “Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment,” *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 16, no. 6. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention, pp. 2129–2144, 2015.
- [117] “Extrinsic Apoptosis Pathway - Creative Diagnostics.” [Online]. Available: <https://www.creative-diagnostics.com/extrinsic-apoptosis-pathway.htm>. [Accessed: 08-May-2020].
- [118] Y. Kiraz, A. Adan, M. Kartal Yandim, and Y. Baran, “Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis,” *Tumor Biology*, vol. 37, no. 7. Springer Netherlands, pp. 8471–8486, 01-Jul-2016.
- [119] G. V. Chaitanya, J. S. Alexander, and P. P. Babu, “PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration,” *Cell Communication and Signaling*, vol. 8. BioMed Central, p. 31, 2010.
- [120] “Intrinsic Apoptosis Pathway - Creative Diagnostics.” [Online]. Available: <https://www.creative-diagnostics.com/intrinsic-apoptosis-pathway.htm>. [Accessed: 08-May-2020].
- [121] M. W. Pfaffl, “A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR,” *Nucleic Acids Res.*, 2001.
- [122] M. Zuker, “Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction,” *Nucleic Acids Res.*, 2003.
- [123] Y. T. Lee, Y. J. Tan, and C. E. Oon, “Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity,” *European Journal of Pharmacology*, vol. 834. Elsevier B.V., pp. 188–196, 05-Sep-2018.
- [124] 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, p. 8737589, 2016.
- [125] N. Mencin *et al.*, “Optimization of SELEX: Comparison of different methods for monitoring the progress of in vitro selection of aptamers,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 91, pp. 151–159, Mar. 2014.
- [126] G. L. Lokesh *et al.*, “X-Aptamer selection and validation,” in *Methods in Molecular Biology*, 2017.
- [127] C. Walss-Bass *et al.*, “X-Aptamer Technology Identifies C4A and ApoB in Blood as Potential Markers for Schizophrenia,” *Mol. Neuropsychiatry*, 2019.
- [128] H. Wang, C. H. Lam, X. Li, D. L. West, and X. Yang, “Selection of PD1/PD-L1 X-Aptamers,” *Biochimie*, 2018.
- [129] C. Arndt, S. Koristka, A. Feldmann, R. Bergmann, and M. Bachmann, “Coomassie brilliant blue staining of polyacrylamide gels,” in *Methods in Molecular Biology*, vol. 1853, Humana Press Inc., 2018, pp. 27–30.
- [130] E. García-Fruitós, “Inclusion bodies: A new concept,” *Microbial Cell Factories*, vol. 9. BioMed Central, p. 80, 01-Nov-2010.
- [131] A. Singh, V. Upadhyay, A. K. Upadhyay, S. M. Singh, and A. K. Panda, “Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process,” *Microbial Cell Factories*, vol. 14, no. 1. BioMed Central Ltd., 25-Mar-2015.
- [132] C. L. Young, Z. T. Britton, and A. S. Robinson, “Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications,” *Biotechnol. J.*, vol. 7, no. 5, pp. 620–634, May 2012.
- [133] A. Spriestersbach, J. Kubicek, F. Schäfer, H. Block, and B. Maertens, “Purification of His-Tagged Proteins,” in *Methods in Enzymology*, vol. 559, Academic Press Inc., 2015, pp. 1–15.
- [134] “Document Connect.” [Online]. Available: [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/DynabeadsHisTagIsolationPulldown\\_man.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/DynabeadsHisTagIsolationPulldown_man.pdf). [Accessed: 11-Mar-2021].
- [135] G. L. Rosano and E. A. Ceccarelli, “Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges,” *Frontiers in Microbiology*, vol. 5, no. APR. Frontiers Research Foundation, p. 172, 17-Apr-2014.

- [136] “Search: NOT celline\_category\_rna:HEK 293;Not detected - The Human Protein Atlas.” [Online]. Available: [https://www.proteinatlas.org/search/NOT+celline\\_category\\_rna%3AHEK+293%3BNot+detected/78](https://www.proteinatlas.org/search/NOT+celline_category_rna%3AHEK+293%3BNot+detected/78). [Accessed: 14-Mar-2021].
- [137] A. Afanasyeva, C. Nagao, and K. Mizuguchi, “Prediction of the secondary structure of short DNA aptamers,” *Biophys. Physicobiology*, vol. 16, no. 0, pp. 287–294, 2019.
- [138] I. Jeddi and L. Saiz, “Three-dimensional modeling of single stranded DNA hairpins for aptamer-based biosensors,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, Dec. 2017.
- [139] T. Bhardwaj, A. S. Rathore, and S. K. Jha, “The selection of highly specific and selective aptamers using modified SELEX and their use in process analytical techniques for Lucentis bioproduction,” *RSC Adv.*, vol. 10, no. 48, pp. 28906–28917, Aug. 2020.
- [140] 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*, 2017.
- [141] Q. Li, Y. Huo, Y. Guo, X. Zheng, W. Sun, and Z. Hao, “Generation and applications of a DNA aptamer against Gremlin-1,” *Molecules*, 2017.
- [142] H. Y. Kong and J. Byun, “Nucleic acid aptamers: New methods for selection, stabilization, and application in biomedical science,” *Biomolecules and Therapeutics*, vol. 21, no. 6. Korean Society of Applied Pharmacology, pp. 423–434, 2013.
- [143] C. Di Primo, E. Dausse, and J. J. Toulmé, “Surface plasmon resonance investigation of RNA aptamer-RNA ligand interactions,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 764, pp. 279–300, 2011.
- [144] C. Kratschmer and M. Levy, “Effect of Chemical Modifications on Aptamer Stability in Serum,” *Nucleic Acid Ther.*, vol. 27, no. 6, pp. 335–344, Dec. 2017.
- [145] J. P. Dassie *et al.*, “Targeted inhibition of prostate cancer metastases with an RNA aptamer to prostate-specific membrane antigen,” *Mol. Ther.*, vol. 22, no. 11, pp. 1910–1922, Jun. 2014.
- [146] Z. Chen, H. Liu, A. Jain, L. Zhang, C. Liu, and K. Cheng, “Discovery of aptamer ligands for hepatic stellate cells using SELEX,” *Theranostics*, 2017.

- [147] K. Im, S. Mareninov, M. F. P. Diaz, and W. H. Yong, “An introduction to performing immunofluorescence staining,” in *Methods in Molecular Biology*, 2019.
- [148] C. Williams, “cAMP detection methods in HTS: Selecting the best from the rest,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 3, no. 2. Nature Publishing Group, pp. 125–135, 2004.
- [149] P. D. Ray, B. W. Huang, and Y. Tsuji, “Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling,” *Cellular Signalling*, vol. 24, no. 5. NIH Public Access, pp. 981–990, May-2012.
- [150] M. Redza-Dutordoir and D. A. Averill-Bates, “Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species,” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, vol. 1863, no. 12. Elsevier B.V., pp. 2977–2992, 01-Dec-2016.
- [151] 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.*, vol. 116, no. 6, pp. 2226–2231, Feb. 2019.
- [152] H. Dai *et al.*, “Aptamer TY04 inhibits the growth of multiple myeloma cells via cell cycle arrest,” *Tumor Biol.*, vol. 35, no. 8, pp. 7561–7568, Aug. 2014.
- [153] Y. Xu *et al.*, “RAD52 aptamer regulates DNA damage repair and STAT3 in BRCA1/BRCA2-deficient human acute myeloid leukemia,” *Oncol. Rep.*, vol. 44, no. 4, pp. 1455–1466, Oct. 2020.
- [154] S. Liang *et al.*, “Measuring luteinising hormone pulsatility with a robotic aptamer-enabled electrochemical reader,” *Nat. Commun.*, 2019.
- [155] D. Lévesque, J. D. Beaudoin, S. Roy, and J. P. Perreault, “In vitro selection and characterization of RNA aptamers binding thyroxine hormone,” *Biochem. J.*, 2007.
- [156] A. Abidin *et al.*, “Current and potential developments of cortisol aptasensing towards point-of-care diagnostics (POTC),” *Sensors (Switzerland)*, vol. 17, no. 5. MDPI AG, 22-May-2017.

## EKLER

**Tablo 3. Kullanılan Cihazların Listesi**

<b>Adı</b>	<b>Ürün Kodu</b>	<b>Firma</b>
pH metre	A111	Thermo Scientific
Manyetik karıştırıcı / Isı Bloğu	SB162	Stuart
Hassas terazi	LE6202S	Sartorius
Distile su cihazı	TANKPE030	Millipore
Ultra Saf Su Cihazı	Direct Q-5UV	Millipore
Çalkalamalı inkübatör	Excella E25	New Brunswick Scientific
Soğutmalı Santrifüj	5430R	Eppendorf
Soğutmalı Santrifüj	5810R	Eppendorf
Buz makinası	AF80	Scotsman
Sonikatör	UW2070	Bandelin
Analog tüp roller	SRT9D	Stuart Equipment
Manyetik stand	DynaMag-2	Invitrogen
Tüp döndürücü	SRT6D	Stuart
Mikroplaka okuyucu	iMark	BioRad
Dikey jel elektroforez sistemi	Mini Protean Tetra Cell 1658004	BioRad
Güç kaynağı	PowerPac Basic	BioRad
Transfer sistemi	TransBlot Turbo 10016505C	BioRad
Kemiluminesans Görüntüleme Cihazı	ChemiDoc MP 1708280	BioRad
Termal Döngüleyici	MyCycler	BioRad
Su banyosu	BM302	Nüve
UV Transillüminatör Görüntüleme Cihazı	GelDoc XR	BioRad
Laminar Flow	HeraSafe KS 12	Thermo Scientific
Mini Spin Cihazı	Mini-6k	MiuLab

Vorteks	SA8	Stuart
Yatay Jel Elektroforez Sistemi	Wide Mini-Sub Cell GT	BioRad
Mikrodalga Fırın	MD595	Arçelik
Otoklav	OT 032	Nüve
Otoklav	OT 090	Nüve
Kuru Hava (Sterilizatör) Cihazı	FN120	Nüve
Hücre Akış Sitometri Cihazı	BD Accuri C6	BD Biosciences
Orbital Çalkalayıcı	GyroTwister	Labnet
Floresan Ataçmanlı Mikroskop	IX71	Olympus
Inverted mikroskop	BDS-500	SOIF
Real Time PCR Cihazı	CFX Connect	Bio-Rad
Sıvı Azot Tankı	Arpege 40	Air Liquide
-80°C Dondurucu	Ultra Low Temperature Freezer ULUF	Arctico
-80°C Dondurucu	U725	New Brunswick Scientific
Derin dondurucu	2041 D	Arçelik
Buzdolabı	4263 TMB	Arçelik
Mikropipet (0,5 – 10 µl)	Bravo B10-1	Capp
Mikropipet (10 – 100 µl)	Bravo B100-1	Capp
Mikropipet (100 – 1000 µl)	Bravo B1000-1	Capp

**Tablo 4. Kullanılan Hücre Kültürü Donanımları**

Adı	Ürün Kodu	Firma
6-kuyucuklu plaka	92006	TPP
12-kuyucuklu plaka	92012	TPP
96-kuyucuklu plaka	92096	TPP
25 cm <sup>2</sup> hücre kültür kabı	90026	TPP
75 cm <sup>2</sup> hücre kültür kabı	90076	TPP
60 mm hücre kültür kabı	93060	TPP
100 mm hücre kültür kabı	93100	TPP
Serolojik pipet (5ml)	94005	TPP

Serolojik pipet (10ml)	94010	TPP
0,22 µm şırınga filtresi	99722	TPP
Enjektör	6944425888871, Yeşil uç iğneli 21G	Astraject
CO <sub>2</sub> inkübatör	HeraCell 150i 51026280	Thermo Scientific
CO <sub>2</sub> inkübatör	HeraCell 150	Thermo Scientific
Hücre kazıyıcı	280 mm	Greiner Bio-One
15 ml falkon	91015	TPP
50 ml falkon	91050	TPP
Hemositometre	40441	Assistent Germany
Kriyovial tüp	5042000C	CAPP
Pipet ucu (1000 µl)	5130130	CAPP
Pipet ucu (200 µl)	4130075	CAPP
Pipet ucu (10 µl)	5030010	CAPP

**Tablo 5. Kullanılan Kimyasalların Listesi**

Adı	Ürün Kodu	Firma
Tris Baz	648310	Calbiochem
Tris-HCl	648317	Calbiochem
Hidroklorik asit	100317	Merck
Sodyum klorür	S7653-5KG	Sigma-Aldrich
Üre	161-0731	BioRad
Triton-X-100	T8787-100ML	Sigma
Lizozim	89833	Thermo Scientific
EDTA içermeyen Proteaz İnhibitör Kokteyli	A32955	Thermo Scientific
İmidazol	15805168	Fischer Scientific
Guanidin Hidroklorür	1324GR250	Neofroxx
β-merkaptoetanol	M3148	Sigma Aldrich
Kanamisin	A1493,0010	AppliChem
LB Broth	LBL405.1	BioShop

Dynabeads™ His-Tag Isolation and Pulldown Manyetik Boncuk	10103D	Invitrogen
Dynabeads™ M-280 Streptavidin Manyetik Boncuk	11205D	Invitrogen
Sığır Serum Albumin (BSA)	A2153	Sigma Aldrich
Coomassie Brilliant Blue G-250	A3480	Applichem
Metanol	24229	Sigma Aldrich
Fosforik asit	100573.2500	Merck
Akrilamid/Bisakrilamid %30 37,5:1	A3699	Sigma Aldrich
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	1177GR100	Neofroxx
APS	A2941	Applichem
TEMED	A1148	Applichem
İzopropanol	34863	Sigma Aldrich
Gliserol	GB0232	BioBasic
Bromfenol mavisi	A2331,0025	AppliChem
Glisin	3570	Calbiochem
Protein Marker	PageRuler Plus 26620	Thermo Scientific
PVDF membran	88518	Thermo
Yağsız Süt Tozu	1172KG001	Biofroxx
Tween-20	822184	Merck
p-Kumarik Asit	C9008	Sigma Aldrich
Luminol	A2185	Applichem
Ponceau S	A1405	Applichem
Hidrojen Peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	107209	Merck

GHRH ELISA Testi	E-EL-H1146	Elabscience
Sodyum fosfat monobazik	A4229,1000	AppliChem
Sodyum fosfat dibazik	A2943,1000	Sigma Aldrich
MgCl <sub>2</sub>	MB040-100G	HIMEDIA
Nitroselüloz membran	1620115	BioRad
TMB substrat çözeltisi	N301	Thermo Scientific
NaOH	106498.1000	Merck
X-Aptamer Seçilim Kiti	AM Biotechnologies	2018-OPR3-TT-du-ISTNBL
Borik Asit	A2940,0500	AppliChem
EDTA	A2937	Appllichem
Agaroz	35-1010	PeqLab Biotech
100 bp DNA marker	GeneRulerSM0241	Thermo Scientific
1 kb DNA marker	GeneRulerSM0311	Thermo Scientific
RedSafe	21141	Intron Biotechnology
HRP-Streptavidin Konjugat Solüsyonu	N100	Thermo Scientific
FBS	10500-064	Gibco
Penisilin-Streptomisin	P06-07350	PAN BioTech
RPMI Besiyeri	P04-18047	PAN BioTech
DMEM Besiyeri	P04-03590	PAN BioTech
McCoy's 5A Besiyeri	BE12-688F	Lonza
DMEM:F12 Besiyeri	D8437-500ML	Sigma
HEK293	CRL-1573	ATCC
PC3 hücreleri	CRL-1435	ATCC
HT-29 hücreleri	HTB-38	ATCC
LNcaP hücreleri	CRL-1740	ATCC

MIA PaCa-2 hücreleri	CRL-1420	ATCC
PNT1a hücreleri	95012614	ECACC
MDA-MB-468 hücreleri	HTB-132	ATCC
T-47D	HTB-133	ATCC
Trypsin-EDTA	SH30042.01	Hyclone
MTT Ajanı	3580GR005	Biofroxx
DMSO	D8418	Sigma Aldrich
DAPI	1322MG025	Biofroxx
PI	P4170	Sigma Aldrich
DiOC <sub>6</sub>	318426	Sigma Aldrich
10X PBS	P04-53500	Pan Biotech
Kristal Viyole	C0775	Sigma
Absolute Etanol	100983.2511	Merck
Etanol	CAS 64-17-5	Alko Med
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	556547	BD Biosciences
cAMP XP® Assay Kit	4339	Cell Signaling Technologies
Ca <sup>+2</sup> Green™-1	C3011MP	Invitrogen
Tunikamisin	A2242,0005	Applichem
Anti-GH Primer Antikor	sc-374266	Santa Cruz Biotechnologies
Anti-GHRH-R Primer Antikor	Sc-54201	Santa Cruz Biotechnologies
Anti-GHRH Primer Antikor	TA324986	Origene
Anti-His Tag (D3I1O) Primer Antikor	12698	Cell Signaling Technologies

Anti-PARP Antikor	Primer	9542	Cell Technologies	Signaling
Anti-β-actin Antikor	Primer	12620	Cell Technologies	Signaling
Anti-Rabbit Sekonder Antikor	HRP-Bağlı	7074	Cell Technologies	Signaling
Anti-mouse IgG (H+L), F(ab') <sub>2</sub> Fragment (Alexa Fluor® 555 Conjugate)		4409	Cell Technologies	Signaling
Rabbit anti-Goat IgG (H+L) Antibody, FITC	Secondary	31509	Invitrogen	
Endojen Bloklama Kiti	Biyotin	E21390	Thermo Scientific	
Streptavidin-FITC konjugat		SA1001	Invitrogen	
FuGene Transfeksiyon Ajanı	HD	E2311	Promega	
Higromisin		1358MG250	Neofroxx	
PureZol RNA İzolasyon Ajanı		7326890	Bio-Rad	
Kloroform		UN1888	Applichem	
iScript cDNA Sentez Kiti		1708891	Bio-Rad	
iQ SYBR Green Supermix		170-8880	Bio-Rad	
RNase free dH <sub>2</sub> O		129112	Qiagen	
Amicon falkon santrifugal filtre		UFC900324	Merck	
M-PER Protein Reagent	Mammalian Extraction	78501	Thermo Scientific	
Tripan mavisi		EBT-001	NanoEnTek	
Asetik asit		27225	Sigma Aldrich	

Amonyum Asetat	101115.1000	Merck
----------------	-------------	-------

**Tablo 6. Kullanılan Tamponların İçeriği**

Kanamisin (50 mg/ml) Stok Çözeltisi	0,5 g Kanamisin tartılmış, 10 ml'e kadar distile su ile çözüldükten sonra 0,22 µm por çaplı filtreden geçirilerek kullanılmıştır. -20°C'de saklanır.
LB Broth	20 gram LB Broth tartılmış, 1L'ye kadar distile su ile çözüldükten sonra otoklavlanarak kullanılmıştır.
Bakteri Total Protein İzolasyonu için Lizis Tamponu	20 mM Tris-HCl pH: 7,5, 300 mM NaCl, 2M Üre, %2 Triton X-100, 1mg/ml Lizozim ve 1X EDTA içermeyen Proteaz İnhibitor Kokteyli karıştırılarak hazırlanır.
İnkluzyon Cisimcikleri Çözdürme Çözeltisi	20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM İmidazol, 6 M Guanidin Hidroklorür karıştırılarak hazırlanır.
His-Tag 2X Bağlanma/Yıkama Tamponu	100 mM Sodyum fosfat pH: 8, 600 mM NaCl, %0,02 Tween <sup>TM</sup> -20 karıştırılarak hazırlanır. Hazırlanan tampon, kullanım öncesi 1:2 oranında seyreltilerek 1X konsantrasyona getirilmiş ve uygulama sırasında 1X tampon kullanılmıştır.
His Elusyon Tamponu	50 mM Sodyum fosfat pH: 8, 300 mM NaCl, %0,01 Tween <sup>TM</sup> -20, 300 mM İmidazol karıştırılarak hazırlanır.

Memeli Hücre Lizis Tamponu (Cell lysis buffer, CLB)	10 ml M-PER Memeli Protein Ekstraksiyon ajanına 1 tablet Proteaz inhibitör eklenerek hazırlanmıştır. +4°C’de saklanmıştır.
Bovine Serum Albumin (BSA, Protein Standardı)	0,015 gram BSA tartılmış, 10 ml distile suda çözülmüş ve 0,22 µm’lik filtreden geçirilerek kullanılmıştır. +4°C’de saklanmıştır.
Bradford Solüsyonu	0,05 gram Coomassie Brilliant Blue (G-250) boyası tartılarak 50 ml metanolde çözdürmüştür. Üzerine 100 ml %85 fosforik asit (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) eklenmiş ve hazırlanan çözelti 500 ml distile suya eklendikten sonra filtre kağıdı ile süzöldükten sonra 350 ml distile su ile son hacim 1 litreye tamamlanmıştır. +4°C’de saklanmıştır.
Amonyum Persülfat	0,1 gram amonyum persülfat tartılmış ve 1 ml distile suda çözdürülerek kullanılmıştır. -20°C’de saklanmıştır.
5X Laemmli Yükleme Tamponu	60 mM Tris-HCl pH:6,8, %2 SDS, %10 Gliserol, %5 β-merkaptolanol, %0,01 Bromfenol mavisi karıştırılarak hazırlanır.
SDS-PAGE Yürütme Tamponu	10X konsantrasyonda Yürütme tamponu hazırlamak için 30,3 gram Tris, 114 gram Glisin ve 1 gram SDS tartılmış, 500 ml distile suda çözdürölmüş ve pH’ı 8.3’e ayarlandıktan sonra son hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Bu şekilde

	<p>hazırlanan tampon, kullanım öncesi 1:10 seyreltilerek 1X konsantrasyona dönüştürülmüş ve 1X olarak kullanılmıştır. +4°C’de saklanmıştır.</p>
Transfer Tamponu	<p>10X konsantrasyonda Transfer tamponu hazırlamak için 33,3 gram Tris ve 144 gram Glisin tartılmış, 500 ml distile suda çözdürülmüş ve pH’ı 8.3’e ayarlandıktan sonra son hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan tampon, kullanım öncesi 100 ml 10X Transfer tamponu, 150 ml metanol ve 750 ml distile su ile 1X’e dönüştürülerek kullanılmıştır. +4°C’de saklanmıştır.</p>
10X TBS	<p>10X konsantrasyonda TBS tamponu hazırlamak için 86,6 gram NaCl ve 12,11 gram Tris tartılmış, 500 ml distile suda çözdürülmüş ve pH’ı 8’e ayarlandıktan sonra son hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan tampon, kullanım öncesi 1:10 seyreltilerek 1X konsantrasyonu dönüştürülmüş ve 1X olarak kullanılmıştır. Oda sıcaklığında saklanmıştır.</p>
TBS-Tween (TBS-T)	<p>500 ml 1X TBS ile 500 µl Tween<sup>TM</sup>-20 karıştırılarak hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında saklanmıştır.</p>
%5 Bloklama Sütü	<p>2,5 gram yağsız süt tozu tartılmış ve 50 ml’ye TBS-T ile tamamlanmıştır.</p>

Kumarik Asit	0,15 gram P-kumarik asit 10 ml DMSO'da çözdürülerek hazırlanmıştır. +4°C'de saklanmıştır.
Luminol	0,44 gram Luminol 10 ml DMSO'da çözdürülerek hazırlanmış ve -20°C'de saklanmıştır.
Membran Stripleme Tamponu	15 gram glisin, 1 gram SDS ve 10 ml Tween-20 yaklaşık 800 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra pH'ı 2,2'ye ayarlanmış ve son hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında saklanmıştır.
10X PBS	10X konsantrasyonda PBS tamponu hazırlamak için 80 gram NaCl, 2 gram KCl, 14,4 gram Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ve 2,4 gram KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 500 ml distile suda çözdürülmüş ve pH'ı 7,4'e ayarlandıktan sonra son hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan tampon, kullanım öncesi 1:10 seyreltilerek 1X konsantrasyonu dönüştürülmüş ve 1X olarak kullanılmıştır. Oda sıcaklığında saklanmıştır.
10X TBE	10X konsantrasyonda TBE tamponu hazırlamak için 108 gram Tris ve 55 gram Borik asit 500 ml distile suda çözdürülmüş, 40 ml 0,5 M EDTA (pH:8) eklenmiş ve son hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan tampon, kullanım öncesi 1:10

	seyreltilerek 1X konsantrasyonu dönüştürülmüş ve 1X olarak kullanılmıştır.
Dot Blot Bağlanma Tamponu	15 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> karıştırılarak hazırlanmıştır.
PBB Tamponu	0,1 gram BSA tartılmış ve 20 ml 1X PBS içerisinde çözülerek PBB çözeltisi hazırlanmıştır. +4°C'de saklanmıştır.
Permeabilizasyon Çözeltisi	10 µl Triton-X-100 10 ml 1X PBS ile karıştırılarak hazırlanmıştır. +4°C'de saklanmıştır.
İmmunofloresan Bloklama Tamponu	0,1 gram BSA, 5 ml 1X PBS içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. +4°C'de saklanmıştır.
Hücre Medyası	Temin edilen DMEM, MEM, McCoy's 5a ve RPMI besiyerleri, son konsantrasyonları %10 FBS %1 Penisilin-Streptomisin olacak şekilde karıştırılıp 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek hazırlanmıştır. +4°C'de saklanmıştır.
Hücre Dondurma Medyası	9 ml FBS içerisine 1 ml DMSO eklendikten sonra 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek hazırlanmıştır. -20°C'de saklanmıştır.

**Tablo 7. %4-12'lik SDS-Poliakrilamid Jel İçeriği**

	%12 Yürütme Jeli (Alt Jel)	%4 Yükleme Jeli (Üst Jel)
dH <sub>2</sub> O	1,7 ml	1,537 ml
Tris-HCl	1,25 ml (1,5 M, pH 8.8)	0,625 ml (0,5 M, pH 6.8)
% 10 SDS	50 µl	25 µl
Akrilamid/Bisakrilamid %30 37,5:1	2 ml	0,335 ml
% 10 APS	40 µl	12,5 µl
TEMED	5 µl	2,5 µl

**Tablo 8. Kemilüminesans Görüntüleme Tampon İçerikleri**

	Tampon A	Tampon B
dH <sub>2</sub> O	9 ml	9 ml
Tris Baz pH: 8,5	1 ml	1 ml
Kumarik asit	75 µl	-
Luminol	150 µl	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	15 µl

**Tablo 9. X-aptamer Seçilim Tamponlarının İçerikleri**

	Tampon A	Tampon B
PBS pH:7,4	1X	1X
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	1 mM
Tween <sup>TM</sup> -20	% 0,05	% 0,05
BSA	% 0,2	-