

ÖZET

Büyüme hormonu salgılatıcı hormon (GHRH) ve büyüme hormonu salgılatıcı hormon reseptörünün (GHRH-R) birçok kanser tipinde anlatımının belirlenmiş olması, GHRH karşı antagonistlerinin anti karsinojenik etki göstermesi GHRH sinyalinin bloke edilmesinin önemini ortaya koymuştur. Aptamerler hedef molekülüne yüksek bağlanma affinitesi gösteren tek zincirli DNA veya RNA molekülleridir. Bu tez ile amacımız GHRH özgü aptamerlerin anti-karsinojenik etkisinin MiaPaca Pankreas Kanseri ve HT29 Kolon Kanserinde gösterilmesidir. GHRH (1-29) peptidine özgü TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerlerinin doza ve zamana bağlı olarak Mia Paca-2 ve HT29 hücrelerinde hücre canlılığına ket vurduğu belirlenmiştir. Ayrıca 500 nM konsantrasyonda 72 saat boyunca TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamer uygulamasının yara kapanmasını engellediği, koloni çapını düşürdüğü, hücre ölümünü tetikleyip, Reaktif Oksijen Türevleri (ROS) oluşumunu indüklediği ve mitokondriyal membran potansiyeline ket vurduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Mia Paca-2 pankreas kanseri hücrelerinde her iki aptamerin etkin bir şekilde GHRH sinyali aşağı yolak elemanları olan GH ve GHRHR anlatımını engelleyerek GHRH sinyalini bloke ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca hem MiaPaca pankreas kanseri hem HT29 kolon kanseri hücre hatlarında TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerlerinin hücre koloni çaplarını küçülttüğü, TKY.T2.09 aptamerinin etkisinin daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Hem TKY.T2.08 hem de TKY.T2.09 aptamerlerinin hücre döngüsünü G2/M fazında tuttuğu hem de subG1 popülasyonunu indükleyerek apoptotik ölüme neden olduğu hücre akış sitometresi analizleri ile gösterilmiştir. Hem HT29 hem MiaPaca hücre hatlarından TKY.T2.08 uygulamasının EMT sinyali üzerinde ket vurucu etkisi E-kaderin anlatımını arttırdığı, N-Kaderin anlatımını ise baskılanması ile gösterilmiştir. Ayrıca TKY.T2.08 aptamerinin MiaPaca hücre hattında Bip, PERK, ATF-6 anlatımlarını arttırarak, TKY.T2.09 aptamerinin ise HT29 hücre hattında Calnexin- CHOP, ATF-6 anlatımlarını arttırarak, MiaPaca hücre hattında IRE1 α , PERK, ATF-6 anlatımlarını arttırarak ER stresi indüklediği belirlenmiştir. Ayrıca her iki aptamerin Atg5, Atg12 anlatımını indükleyip, LC3 kesilimini arttırarak otofajiyi uyardığı gösterilmiştir. TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerlerinin apoptotik ölüm üzerinde indükleyici etkisi PARP kesilimi, PUMA anlatımının arttırılması, BclxL anlatımının baskılanması ile MiaPaca ve HT29 hücre hatlarında gösterilmiştir. Sonuç olarak GHRH özgü TKY.T2.08 ve TKY.T2.09 aptamerlerinin MiaPaca-2 ve HT29

hücrelerinde EMT sinyalini baskılayarak hücre proliferasyonuna ket vurduğu, hücre canlılığını mitokondri membran potansiyelini düşürerek engellediği tespit edilmiştir. Bunlara ilaveten, her iki aptamerin otofaji ve ER stresi indükleyerek apoptotik ölüme yol açtıkları belirlenmiştir.

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



ABSTRACT

The expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and growth hormone-releasing hormone receptor (GHRH-R) in many cancer types, and the anti-carcinogenic effect of GHRH antagonists have revealed the importance of blocking the GHRH signal. Aptamers are single-stranded DNA or RNA molecules that show high binding affinity to the target molecule. With this thesis, our aim is to demonstrate the anti-carcinogenic effect of GHRH-specific aptamers in MiaPaca Pancreatic Cancer and HT29 Colon Cancer. It has been determined that TKY.T2.08 and TKY.T2.09 aptamers specific to the GHRH (1-29) peptide inhibit cell viability in Mia Paca-2 and HT29 cells depending on the dose and time-dependent manner. In addition, it was determined that aptamer application of TKY.T2.08 and TKY.T2.09 for 72 hours at 500 nM concentration prevented wound healing, decreased colony diameter, triggered cell death, induced Reactive Oxygen Derivatives (ROS) formation, and impeded mitochondrial membrane potential. In addition, it has been determined that in Mia Paca-2 pancreatic cancer cells, both aptamers effectively block the GHRH signal by inhibiting GHRH signal downstream elements GH and GHRHR expression. In addition, it was concluded that TKY.T2.08 and TKY.T2.09 aptamers decreased the cell colony diameters and the effect of TKY.T2.09 aptamer was higher in both MiaPaca pancreatic cancer and HT29 colon cancer cell lines. It has been shown by cell flow cytometry analysis that both TKY.T2.08 and TKY.T2.09 aptamers keep the cell cycle in the G2/M phase and induce apoptotic death by inducing the subG1 population. The inhibitory effect of TKY.T2.08 application on the EMT signal from both HT29 and MiaPaca cell lines was shown to increase the expression of E-cadherin and suppress the expression of N-cadherin. In addition, TKY.T2.08 aptamer increased the expression of Bip, PERK, ATF-6 in the MiaPaca cell line and the TKY.T2.09 aptamer increased Calnexin-CHOP, ATF-6 expressions in the HT29 cell line, and IRE1 α , PERK, ATF-6 in the MiaPaca cell line. It was determined that by increasing their expressions, they induced ER stress. In addition, both aptamers have been shown to induce autophagy by inducing Atg5, Atg12 expression and increasing LC3 cleavage. Inductive effect of TKY.T2.08 and TKY.T2.09 aptamers on apoptotic death has been demonstrated in MiaPaca and HT29 cell lines by PARP cleavage, enhancement of PUMA expression, and suppression of BclxL expression. As a result, it was determined that GHRH-specific aptamers TKY.T2.08 and TKY.T2.09 inhibit cell

proliferation by suppressing EMT signal in MiaPaca-2 and HT29 cells and inhibit cell viability by preventing mitochondrial membrane potential. In addition, both aptamers were determined to cause apoptotic cell death via inducing autophagy and ER stress.

Keywords: GHRH 1-29, X-Aptamer, Colon Cancer, Pancreatic Cancer, Apoptosis

