

ÖZET

Büyüme Hormonu (BH) geninde mutasyonlara bağlı olarak BH sentez, salınım ve sinyal bozukluğuna bağlı büyüme geriliğine İzole Büyüme Hormonu Eksikliği (İBHE) denir. Farklı etnik kökene sahip İBHE sendromlu kişilerde BH geninde pek çok mutasyon varlığı tespit edilmiştir. Ancak tespit edilen BH gen mutasyonlarının BH biyolojik aktivitesi üzerine etkisi tam olarak bilinmemektedir. Ancak doğal tip BH'nun hücre proliferasyonu, invazyon-metastaz üzerine etkisi *in vitro* ve *in vivo* modellerde gösterilmiştir. Hücre içinde büyüme ve farklılaşma üzerine etkisi bilinen doğal aminler (putresin, spermidin, spermin) Poliaminler (PA) miktarı ve PA anabolizmasında rol alan Ornitin dekarboksilaz (ODC) enzim aktivitesi bu süreçte önem arz etmektedir. Ayrıca cüce farelerde (BH-) ODC anlatımı üzerinde baskılayıcı etkisi gösterilen miR-27a'nın önemi ortaya konulmuştur. Bu tez ile amacımız; İBHE sendromlu çocuklarda tespit edilen ve büyüme geriliğine neden olan Alanin Serin (A13S), 166. Fenilalanin delesyonu (Δ F166), Treonin Alanin (T24) mutasyonlarının BH sinyaline bağlı hücre farklılaşma büyüme, proliferasyon üzerine etkisinde PA miktarının ve ODC anlatım profilinin irdelenmesi ODC'yi hedef alan miR27a üzerinden moleküler mekanizmasının HEK293 hücrelerinde ortaya konulmasıdır. Doğal tip BH, A13S, Δ F166, T24A mutasyonlarını taşıyan gen içeren pcDNA3.1 aracılı yaratılan HEK293 hücrelerinde doğal tip BH anlatımının BH yoksun HEK293 hücrelerine kıyasla proliferasyon, çoğalma, koloni oluşturma ve EMT sinyalinin (N-kaderin, vimentin, Slug anlatım artışı) aktive olduğu, STAT moleküllerinin indüklendiği gösterilmiştir. Ancak mutant (A13S, Δ F166, T24A) BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerinin doğal tip BH sinyaline sahip HEK293 kıyasla bu profillerinin mutasyona bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca BH yoksun hücrelere kıyasla doğal tip BH anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde ODC anlatımının ve PA miktarının yüksek olduğu gösterilmiştir. Literatürde ODC inhibitörü olarak ifade edilen miR27a'nın anti-miR27a ile baskılanması durumunda hücre proliferasyonu ve bölünmesinde, koloni çapında artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Eş zamanlı putresin miktarlarının arttığı, ODC'nin indüklendiği en belirgin olarak doğal tip BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde gösterilmiştir. Bunlara ek olarak BH salınımı ile ilişkili olduğu bilinen miRNA anlatım profilleri zamana bağlı olarak irdelendiğinde, miRNA-663, miR-2861, miR-663, miR-3152, miR-3185 anlatımlarının aktif doğal

tip BH sinyaline sahip hücelere kıyasla BH yoksun ve mutant BH (A13S, ΔF166, T24A) anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde daha düşük olduğu belirlenmiştir. miR27a taklit eden mimics uygulanması durumunda ise ODC anlatımının azalmasına bağlı olarak putresin miktarının düştüğü, hücre bölünme, koloni oluşumu üzerine baskılayıcı etkisi olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak bu tez ile doğal tip BH sinyalinin EMT sinyali üzerinden hücre çoğalması, bölünmesi ve koloni oluşturmayı HEK293 model hücrelerde indüklerken, ODC anlatımını, intrasellüler PA miktarını arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca A13S, ΔF166, T24A BH mutasyonlarının ise doğal tip BH sinyaline kıyasla bu etkilerinin istatistiksel olarak azaldığı ilk defa bu tez ile gösterilmiştir. Tez kapsamında ODC hedef alan miR27a'nın BH varlığında EMT sinyali ve PA anabolik yolak üzerinde etki ederek hücre proliferasyon-bölünmesi üzerine baskılayıcı etkisinin moleküler mekanizması ilk defa bu tez kapsamında gösterilmiştir.

SUMMARY

Isolated Growth Hormone Deficiency (IGHD) is a syndrome caused by depletion of Growth Hormone (GH) synthesis, release, and irregular GH signaling due to GH mutations that leads to growth retardation. Various mutations within the GH gene was reported in IGHD syndrome children/adults with different ethnic origins. However, the effect of GH gene mutations on the biological activity of GH has not been investigated yet. In case, the effect of biologically active GH signaling leads cell proliferation, invasion-metastasis *in vitro* and *in vivo* models. Natural amines, putresin, spermidine, spermine, have been known as cell growth and differentiation action and the important role of Ornithine decarboxylase (ODC) which act on PA anabolism and intracellular PA levels. In addition, the importance of miR-27a has been shown to exert a suppressive effect on ODC expression in dwarf mice models (lack of GH expression). Our aim in this thesis is to modulate the role of Alanin Serin (A13S), 166. Phenylalanine deletion (F166Del), Treonin Alanine (T24) mutations within the GH gene that were detected in IGHD syndrome children regarding GH signaling and ODC expression on cell growth, proliferation and differentiation. In addition, to evaluate the molecular mechanism underlying GH mutation dependent effect on ODC activity through miR27a. HEK293 cells expressing wild type GH, A13S, F166Del, T24A mutations induced cell proliferation, colony formation and trigger EMT signaling (N-cadherin, vimentin, Slug expression increase) as compared to GH-deficient HEK293 cells through STAT molecule activations depend on the mutation type. In addition, it was shown that the expression of ODC and the amount of intracellular PA levels were increased in HEK293 cells expressing wild type GH compared to GH deficient HEK293 cells. According to the literature, miR27a was shown as an inhibitor for ODC expression. In this thesis, the inhibition of miR-27a expression through anti-miR27a transfection leads acceleration in colony diameter, cell proliferation and division through blockage of its effect on ODC. Concominantly, the increase in intracellular PA levels due to increased ODC expression following anti-miR27a transfection has been determined in wild type GH compared to GH- HEK293 cells. Similarly, all mutant GH expressing HEK293 cells ODC expression and PA levels were increased in HEK293 cells. In addition, miRNA expression profiles, which are known to be associated with the release of GH, are examined in a time-dependent manner, whereas miRNA-663, miR-2861, miR-663, miR-3152, miR-3185 expressions

are increased in wild type GH expression HEK293 cells compared to GH- and mutant GH (A13S, F166Del, T24A) expressing HEK293 cells. In contrast, transfection of mimics against miR27a leads depletion of putresin due to decrease ODC expression and colony formation in wild type GH expressing HEK293 cells. In conclusion, this thesis shows that wild type GH signal increases cell proliferation, division and colony formation in HEK293 model cells *via* EMT signal, while ODC expression increases intracellular PA amount. In addition, it was shown for the first time that these effects of A13S, F166Del and T24A GH mutations were decreased statistically significant compared to the wild type GH signal. In this thesis, the molecular mechanism of miR27a that targets ODC targeting cell-mediated effect on cell proliferation-division by acting on the EMT signal and PA anabolic pathway has been shown for the first time by this thesis.