

**T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**BÜYÜME HORMONU GENİNDEKİ (GH) A13S, F166DEL, T24A  
MUTASYONLARININ BÜYÜME HORMONU SİNYALİ,  
POLİAMİN METABOLİZMASI VE İLİŞKİLİ MİRNA ANLATIM  
PROFİLLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN HEK293 HÜCRE  
HATTINDA İRDELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kadriye KOYUNCU**

**1600007163**

**Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik**

**NİSAN 2019**

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

**BÜYÜME HORMONU GENİNDEKİ (GH) A13S, F166DEL, T24A  
MUTASYONLARININ BÜYÜME HORMONU SİNYALİ,  
POLİAMİN METABOLİZMASI VE İLİŞKİLİ MİRNA ANLATIM  
PROFİLLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN HEK293 HÜCRE  
HATTINDA İRDELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Kadriye KOYUNCU**

**1600007163**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 24 Mayıs 2019**

**Tezin Savunulduğu Tarih: 30 Nisan 2019**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN**

**Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Elif Damla ARISAN**

**Dr. Öğr. Üyesi Fatemah BAHADORİ (Bezmialem Üniversitesi)**

**NİSAN 2019**

# İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER .....	i
ÖNSÖZ .....	iv
KISALTMALAR .....	v
SEMBOL LİSTESİ .....	vii
ŞEKİL LİSTESİ .....	viii
TABLO LİSTESİ .....	xi
ÖZET .....	xii
SUMMARY .....	xiv
BÖLÜM I. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
1.1 GİRİŞ .....	1
1.2. AMAÇ .....	2
BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1 BÜYÜME HORMONU (BH) BİYOLOJİK FONKSİYONU .....	4
Büyüme Hormonunun Salgısının Kontrolü .....	6
2.2. BH GEN LOKUSU .....	7
2.2.1. Büyüme Hormonu Sinyali .....	9
2.3. AKROMEGALİ HASTALIĞI .....	11
2.4. İZOLE BÜYÜME HORMON EKSİKLİĞİ SENDROMU .....	12
2.4.1. İBHE sendromunda tespit edilen BH gen mutasyonları .....	13
2.4.2. BH gen mutasyonlarının BH proteinin biyolojik fonksiyonu üzerine etkisi .....	15
2.5. JAK/STAT SİNYAL YOLAĞI .....	17
2.6. Epitel Mezenkimal Geçiş (EMT) .....	19
2.7. microRNA (miRNA) .....	22
2.7.1. BH salgılanması üzerine etkisi olan miRNA'lar .....	24

2.8. POLİAMİN .....	25
2.8.1. Poliamin Anabolizması .....	26
2.8.2. Poliamin Katabolizması .....	27
BÖLÜM III. MATERYAL VE METOT .....	29
3.1. KULLANILAN MATERYALLER .....	29
3.1.1. Kullanılan Cihazlar .....	29
3.1.2. Hücre Kültürü Donanımları .....	29
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar .....	29
3.1.4. Kullanılan Tamponlar .....	29
10X TBS .....	29
1X TBS-Tween .....	29
10X PBS.....	29
Besiyeri Hazırlanması .....	29
3.2. YÖNTEMLER .....	31
3.2.1. Hücre Kültürü.....	31
3.2.3. Stabil Hücre Hattı Eldesi.....	32
3.2.4. Plazmit İzolasyonu .....	32
3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Retriksiyon Enzim Kesimi .....	33
3.2.6. Transfeksiyon.....	33
3.2.7. Total RNA İzolasyonu .....	33
3.2.8. GH Eliza.....	34
3.2.11. MTT Hücre Canlılığının Belirlenmesi .....	36
3.2.12. Hücre Sağ Kalım Analizi .....	36
3.2.13. Floresans Boyamalar .....	36
3.2.13.4. Revers Transkriptaz PZR (RT-PZR) Analizleri.....	37
3.2.14. Yarı Yumuşak Agar Yöntemi .....	38
3.2.15. Koloni Oluşumunun Kristal Viyole ile Gösterilmesi.....	38

3.2.18. Protein İzolasyonu.....	39
3.2.19. Bradford Protein Miktar Tayini .....	39
3.2.20. İmmunoblotlama Yöntemi .....	40
3.2.21. Poliamin Miktarlarının Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Tayini .....	41
3.2.22. Anti-miR-27a Transfeksiyonu .....	41
<b>BÖLÜM IV. SONUÇLAR .....</b>	<b>43</b>
<b>BÖLÜM V. TARTIŞMA .....</b>	<b>64</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>76</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>86</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>91</b>

## ÖNSÖZ

Tez çalışmamı tamamlama sürecinde bilgileri ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, her konuda desteğini esirgemeyen ve göstermiş olduğu sabrından dolayı çok saygı duyduğum değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan Sayın Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL, Sayın Prof. Dr. Elif Damla ARISAN ve Sayın Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA'ya,

Deneyisel çalışmalarımızda büyük bir özveri ile deneyimlerini bizden esirgemeyen ve destek olan Araş. Gör. Özge BERRAK, Araş. Gör. Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ ve Araş. Gör. Burcu AYHAN ŞAHİN'e,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca laboratuvar çalışmalarını birlikte gerçekleştirdiğim, sabrını ve desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşım Elif KANSIZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans arkadaşlarım; Esra Nur GÜLTEKİN, Berre AKDENİZ, Kübra ERGÜN, Selen SİPAHİ, Hatice KURNAZ, Didem AKÇAMLI, Özlem ALBAYRAK, Orçun OKUMUŞ, Tuğba YENİGÜN, Ülkü GÜNGÖR, Mervenur ÇOBAN, Börteçine SEVGİN ve Resul KAYA'ya küçük veya büyük yardımlarından dolayı,

Tez çalışmalarım boyunca desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen, göstermiş oldukları sabır ve anlayıştan dolayı sevgili babam Sefer KOYUNCU, annem Sabriye KOYUNCU, abilerim, kardeşlerim ve yengeme,

Bursiyer kapsamında görev aldığım TÜBİTAK 216Z104 nolu projeye ve İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarlarına vermiş oldukları olanaklar için teşekkürlerimi sunarım.

## KISALTMALAR

<b>Akt:</b>	Protein kinaz B
<b>AP-1:</b>	Aktif protein 1
<b>APS:</b>	Amonyum Persülfat
<b>AZ:</b>	Antizim
<b>AZI:</b>	Antizim İnhibitörü
<b>Bax:</b>	Bcl-2 ilişkili X proteini
<b>Bcl-2:</b>	B-hücre lenfoma 2
<b>BH:</b>	Büyüme Hormonu
<b>BH+:</b>	Büyüme hormonu anlatımı indüklenmiş
<b>cDNA:</b>	Komplementer DNA
<b>CO<sub>2</sub>:</b>	Karbondioksit
<b>DAPI:</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DiOC<sub>6</sub>:</b>	3, 3'-diheksiloksakarbosianin iyodür
<b>DMSO:</b>	Dimetil sülfoksit
<b>EDTA:</b>	Etilen diamin tetra asetik asit
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:</b>	Hidrojen Peroksit
<b>HPLC:</b>	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
<b>IGF-I:</b>	İnsülin benzeri büyüme faktörü
<b>MAPK:</b>	Mitojenle aktifleştirilmiş protein kinaz
<b>miRNA:</b>	Mikro ribonükleik asit
<b>MMP:</b>	Matriks metalloproteinaz
<b>MTT:</b>	Metiltiazol difeniltetrazolyum bromür
<b>ODC:</b>	Ornitin dekarboksilaz
<b>PA:</b>	Poliamin
<b>PAO:</b>	Poliamin Oksidaz
<b>PBS:</b>	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
<b>PI:</b>	Propidyum iyodür
<b>PI3K:</b>	Fosfotidilinositol-3 kinaz
<b>Put:</b>	Putresin
<b>PVDF:</b>	Poliviniliden florid
<b>qRT-PCR:</b>	Quantitative reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu

<b>ROS:</b>	Reaktif oksijen türevleri
<b>RT-PCR:</b>	Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
<b>SDS:</b>	Sodyum dodesil sülfat
<b>SDS-PAGE:</b>	SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi
<b>SMO:</b>	Spermin oksidaz
<b>Spd:</b>	Spermidin
<b>Spm:</b>	Spermin
<b>SSAT:</b>	Spermidin spermin asetil transferaz
<b>TBS:</b>	Tris tamponlu tuz çözeltisi
<b>TCA:</b>	Trikloroasetik asit
<b>TEMED:</b>	Tetrametletilendiamin
<b>VEGF:</b>	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
<b>WHO:</b>	Dünya Sağlık Örgütü



## SEMBOL LİSTESİ

<b>%</b>	: Yüzde
<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>µM</b>	: Mikromolar
<b>bç</b>	: Baz çifti
<b>cc</b>	: Santimetre küp
<b>cm</b>	: Santimetre
<b>cm<sup>2</sup></b>	: Santimetre kare
<b>IC<sub>50</sub></b>	: Yarım maksimum inhibitör konsantrasyonu
<b>kDa</b>	: Kilo Dalton
<b>mA</b>	: Mili amper
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>V</b>	: Volt

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Büyüme Hormonunun biyolojik fonksiyonları .....	5
Şekil 2. BH salınımını etkileyen hipofizotropik hormonlar [12].....	7
Şekil 3. İnsan büyüme hormonu gen ailesi .....	63
Şekil 4. BH-N genomik dizisi, eksonlar: altı çizili bold, intronlar: italik.....	8
Şekil 5. İnsan büyüme hormonu amino asit dizisi.....	8
Şekil 6. İnsan büyüme hormonu üç boyutlu yapısı ( <a href="https://www.drugbank.ca/drugs/DB00052">https://www.drugbank.ca/drugs/DB00052</a> ) .....	9
Şekil 7. Büyüme hormonu sinyal yolağı .....	10
Şekil 8. Doğal tip, A13S, T24A, ΔF166 BH mutant proteinlerin sekonder yapısını gösteren modeller ( <a href="https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/">https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/</a> ).....	17
Şekil 9. Büyüme hormonunun protein yapısı .....	18
Şekil 10. GH/GHR/JAK-STAT sinyal yolağı.....	19
Şekil 11. Epidermal Mezenkimal geçiş belirteçleri .....	19
Şekil 12. miRNA moleküllerinin biyogenezi ve taşınımı.....	23
Şekil 13. Hedef mRNA yıkımı .....	24
Şekil 14. Poliamin metabolizması.---katabolizma; biyosentez. dcAdoMet: dekarboksile S-adenosil-L-metiyonin; AdoMet: S-adenosil-L-metiyonin; MTA: Metiltiyoadenosin; AdoMetDC: S Adenosil-L-metiyonin dekarboksilaz; MAT: Metiyoninadenosil transferaz; SSAT: Spermidin/spermin asetiltrasferaz; APAO: Asetilpoliamin oksidaz.....	27
Şekil 15. BH A13S, ΔF166, T24A ve doğal tip GH geni içeren pcDNA3.1 plazmitleri ile pcDNA3.1 boş vektörün agaroz jelde görüntülenmesi.....	43
Şekil 16. BH genin BH A13S, ΔF166, T24A ve doğal tip BH geni içeren pcDNA3.1 plazmitlerindeki PCR sonucu. ....	44
Şekil 17. A. HEK293 BH-, BH+ doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında BH anlatımının RT-PZR ile gösterilmesi. B. HEK293 BH-, BH+ doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında BH anlatımının immünoblotlama yöntemi ile gösterilmesi .....	45
Şekil 18. HEK293 BH-, BH+ doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında 24-48 saat içinde BH anlatımının immunofloresan ile gösterilmesi .	45

Şekil 19. HEK293 BH-, BH+ doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında besiyerine salınan BH miktarının ELIZA yöntemi ile gösterilmesi .	46
Şekil 20. A. STAT3, 1, Slug anlatımının RT-PCR, B. İmmunoblotlama ile gösterilmesi, C. pGL_STAT5 plazmiti aracılı lusiferaz deneyi ile STAT5 biyolojik aktivite profilinin HEK293 BH-, BH+ doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında gösterilmesi .....	47
Şekil 21. Doğal tip, A13S, ΔF166, T24A BH stabil anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde A. Zamana bağlı hücre canlılığının MTT testi ile gösterilmesi, B. büyüme eğrisinin tripan mavisi boyaması ile gösterilmesi.....	48
Şekil 22. A.HEK293 BH-, BH+ doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında A. koloni oluşumunun kristal viyole ile gösterilmesi, B. yarı yumuşak agar yöntemi ile koloni çaplarının gösterilmesi. *p: <0.05, **p: < 0.001, ***p: <0.0001.....	49
Şekil 23. HEK293 BH-, BH+ doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında hücre canlılığı ve mitokondri membran potansiyeli üzerine mutasyonların etkisinin 48 saat zaman zarfında Mitotracker/DAPI ve DiOC6 boyaması ile gösterilmesi .....	50
Şekil 24. HEK293 BH-, BH+ doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında VEGF, TIMP1, Vimentin, MMP2, Snail, 18S, STAT-1, STAT-3, Slug genlerinin 24 saat (sol), 48 saat (sağ) RT-PZR ait agaroz jel görüntüleri .....	51
Şekil 25. HEK293 BH-, BH+ doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında E-kaderin, N-kaderin, Snail, Slug, β-katenin, Vimentin, c-Myc, c-Jun, JNK anlatım profillerine ait immunoblotlama sonucu .....	52
Şekil 26. HEK293 BH-, BH+ doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A BH sinyali olan HEK293 hücrelerinde zamana bağlı olarak miRNA-663, miRNA-3152, miRNA-3185, miRNA-2861, miRNA-27a anlatım profillerinin qRT-PZR ile gösterilmesi .....	53
Şekil 27. HEK293 BH-, BH+ doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında A. Zamana bağlı ODC anlatım profillerine ait RT-PZR sonucu, B. ODC anlatımının immunoblotlama sonucu, C. PA miktarının HPLC ile gösterilmesi .....	55
Şekil 28. Doğal tip, A13S, ΔF166, T24A BH stabil anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde bağıl hücre canlılığının 48 saat (sağ) boyunca anti-miR27a uygulanmasının ardından MTT testi ile gösterilmesi.....	56

Şekil 29. Doğal tip, A13S, ΔF166, T24A BH stabil anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde koloni oluşumunun anti-miR27a uygulanmasının ardından zamana bağlı olarak asılı damla modeli ile gösterilmesi.....	57
Şekil 30. HEK293 BH-, BH+ doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarının anti-miR27a uygulanmasının ardından zamana göre büyüme eğrisinin tripan mavisi boyaması ile gösterilmesi .....	58
Şekil 31. A. HEK293 BH-, BH+ doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında anti-miR27a uygulanmasının ardından ODC, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, STAT3, 5 anlatım profiline ait immunoblotlama sonucu, B. total poliamin miktarının HPLC yöntemi ile gösterilmesi.....	59
Şekil 32. Doğal tip, A13S, ΔF166, T24A BH stabil anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde bağıl hücre canlılığının 48 saat (sağ) boyunca mimics-mir27a uygulanmasının ardından MTT testi ile gösterilmesi.....	60
Şekil 33. HEK293 BH-, BH+ doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarının mimics-miR27a uygulanmasının ardından zamana göre büyüme eğrisinin tripan mavisi boyaması ile gösterilmesi .....	61
Şekil 34. Doğal tip, A13S, ΔF166, T24A BH stabil anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde koloni oluşumunun mimics-mir27a uygulanmasının ardından zamana bağlı olarak asılı damla modeli ile gösterilmesi.....	Error! Bookmark not defined.
Şekil 35. A. HEK293 BH-, BH+ doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında mimics-miR27a uygulanmasının ardından ODC anlatım profiline ait immunoblotlama sonucu, B. Total poliamin miktarının HPLC yöntemi ile gösterilmesi.....	61
Şekil 36. Tez sonuçlarının şematik açıklaması.....	74

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1. Büyüme hormonu mutasyonları .....</b>	<b>15</b>
<b>Tablo 2. EMT/MET’de yer alan miRNA’lar .....</b>	<b>20</b>
<b>Tablo 3. Tümör invazyon ve metastazında rol oynayan miRNA’lar .....</b>	<b>21</b>
<b>Tablo 4: RT-PCR’da kullanılan primerlerin optimum bağlanma sıcaklıkları.....</b>	<b>37</b>
<b>Tablo 5. Kullanılan cihazların listesi.....</b>	<b>81</b>
<b>Tablo 6. Hücre kültürü donanımları.....</b>	<b>82</b>
<b>Tablo 7. Kullanılan kimyasalların listesi.....</b>	<b>83</b>
<b>Tablo 8. ECL solüsyon içeriği .....</b>	<b>85</b>
<b>Tablo 9. %12’lik SDS-PAGE Jel içeriği.....</b>	<b>85</b>

## 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 ( $\Delta$ 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,  $\Delta$ 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,  $\Delta$ 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.

# BÖLÜM I. GİRİŞ VE AMAÇ

## 1.1 GİRİŞ

Büyüme Hormonu (BH), postnatal büyüme üzerine etkisi olan, ön hipofiz bezinden salınan ve 191 amino asitten oluşan bir hormondur. BH'nın biyolojik fonksiyonları arasında kemik, karaciğer, kas ve yağ dokusu hücrelerinin yüzeylerinde konumlanan Büyüme Hormonu Reseptörü (BHR) bağlandıktan sonra İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I (IGF-I) anlatımını indükleyerek proliferasyon, büyüme, farklılaşma üzerinde etki göstermesidir. Çocukluk çağındaki BH eksikliğinin büyüme üzerine ket vurucu etkileri olduğu bilinmektedir. Postnatal gelişim için genetik ve çevresel faktörlerin kontrolü altında normal seviyelerde salınan BH, bazı çocuklarda ve erişkinlerde genetik ya da travmatolojik durumlardan dolayı sentez edilememekte, az veya biyolojik olarak inaktif halde üretilmektedir. Bu durumda çocuklarda büyüme geriliği, erişkinlerde psikolojik, metabolik rahatsızlıklara neden olan Büyüme Hormonu Eksikliği (BHE) sendromu açığa çıkmaktadır. BH uyarı testlerine ve fizyolojik uyarılara karşı BH salımının yetersizliği İzole Büyüme Hormonu Eksikliği (İBHE) sendromu olarak isimlendirilmektedir. Çocukluk dönemindeki BH eksikliği, değişik oranlarda boyca kısalık, büyümede gerilik, kemik yoğunluğunda azalma, baskın olarak trunkal dağılımda aşırı yağlanma, yağsız doku kütlesi ve açlık hipoglisemi gibi etkiler tespit edilmiştir. Ayrıca BH, anabolizma, insulintrofik ve insülin antagonisti olarak karbonhidrat metabolizması üzerinde karmaşık rollere sahip olduğu tespit edilmiştir.

BHE sendromu, BH genindeki mutasyonlar sonucu biyolojik olarak inaktif BH sentezine bağlı BH/BHR sinyalinin blokajı büyüme geriliği ile seyretmektedir. BHE sendromu BH geninde delesyon, nokta, splise hata mutasyonlarına bağlı olarak üretilen inaktif BH protein kaynaklı olduğu bilinmektedir. İzole edilen büyüme hormonu eksikliği IA ve II tipleri, BH1 genindeki büyük delesyonlar ve anlamsız mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. IB türü, BH geninin 4. intronunda nükleotit değişikliği sonucu mRNA'da başarısız splise veya GHRHR genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Tip III, BTK genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. BH proteininde disülfid bağı yapan Cys182, Cys189 site direkt (doğrudan) mutageniz ile alanin dönüştürülmesi BH salınımı üzerinden herhangi bir etki göstermezken, Cys53

ve Cys165 ise BH salınımını engellediği ve hem BHR ile bağlanmayı hem de JAK/STAT sinyaline ket vurduğu tespit edilmiştir.

Mutant BH proteinin biyolojik olarak inaktivasyonunda rol alan önemli sinyal yolu JAK/STAT sinyal yolunun hücre büyüme, farklılaşma, inflamasyon ve onkogenik özelliği olduğu da bildirilmiştir. Onkogenlerden c-Jun, c-fos, c-Myc gibi JAK/STAT sinyal yolağının pozitif olarak etkilediği hedef genler arasında gösterilmektedir. BH aşağı yolak elemanları arasında yer alan c-myc proteinin hücre çoğalması, farklılaşması, hücre siklusu ve tümör gelişimi gibi pek çok hücresel döngü için önem arz eden Poliaminler (PA) sentezinden sorumlu Ornitin dekarboksilaz (ODC) geni anlatımını c-myc bağlanma bölgesi aracılı gerçekleştirdiği de bilinmektedir. Doğal poliaminler; putresin, spermidin ve spermin olup, hücre içindeki seviyeleri, PA katabolik enzimlerin (SMO, PAO, SSAT) kontrolünde asetile edilerek veya bir önceki formlarına yıkılarak kontrol altında tutulurlar. Böylece hem BH hem de PA'lerin hücre bölünmesi, proliferasyonu üzerine etkisi bilinen bu moleküllerin c-myc gibi protein üzerinden ilişkili olmalarını destekler nitelikte literatürde ODC anlatımı üzerinde inhibitif etkisi gösterilen miR27a'nın düşük BH bağlı cüce farelerde gösterilmiştir. MikroRNA (miRNA)'lar kısa, kodlama yapmayan tek zincirli RNA'lar olup, 19-25 nükleotitden oluşan post-transkripsiyonel açıdan hedef genlerin mRNA'larının 3'UTR bölgelerine bağlanarak susturdukları gösterilmiştir. miRNA'ların hücre büyümesi, proliferasyonu, apoptoz, immün sistem ve hücre farklılaşması mekanizmalarının düzenlenmesinde hedef aldıkları genlerin anlatımlarını etkilemeleri sebebiyle önem taşımaktadırlar. BH ile miRNA anlatımlarının etkisi üzerine literatürde, rBH (1-10 µg/kg/gün) tedavisi uygulanan sağlıklı kişilerin serumlarında miR-3152, miR-3185, miR-663 ve miR-2861 anlatımlarının azaldığı tespit edilmiştir.

## **1.2. AMAÇ**

Literatürdeki bilgiler ışığında hücre çoğalması, proliferasyon, bölünme üzerinde etkisi olan BH ile ODC enzimi arasındaki ilişkinin miRNA anlatım profilleri üzerinden doğal tip ve mutant BH anlatımı yaratılan HEK293 stabil hücre hatlarında irdelenmesi hedeflenmiştir. Bu tezin ile BH geninde A13S, ΔF166, T-24A gen mutasyonlarının BH sinyali üzerine potansiyel ket vurucu etkisi incelenmesi yanında, bu mutasyonlara sahip BH proteini üreten HEK293 hücrelerinde, mutasyonlara göre hücre proliferasyonu, metastaz, invazyon, büyüme üzerine etkisinin PA metabolizması göz önüne alınarak irdelenmesi de amaçlanmıştır. Ayrıca bu tezin hedefi; BH salınımı ile

ilişkili olduğu bilinen miR-3152, miR-3185, miR-663 ve miR-2861 anlatım profillerinin mutasyona bağlı olarak irdelenmesi yanında, ODC üzerinde inhibitif etkisi olan miR27a'nın anlatım profilinin BH mutasyon tipleri ile ilişkilendirilmesi ve miR27a hedef alan anti-miR ile mimic uygulaması yapılarak BH mutasyonlarına bağlı ODC anlatım profilleri, PA miktarı, EMT rol alan anahtar moleküllerin anlatım profillerinin irdelenmesi amaçlanmıştır.



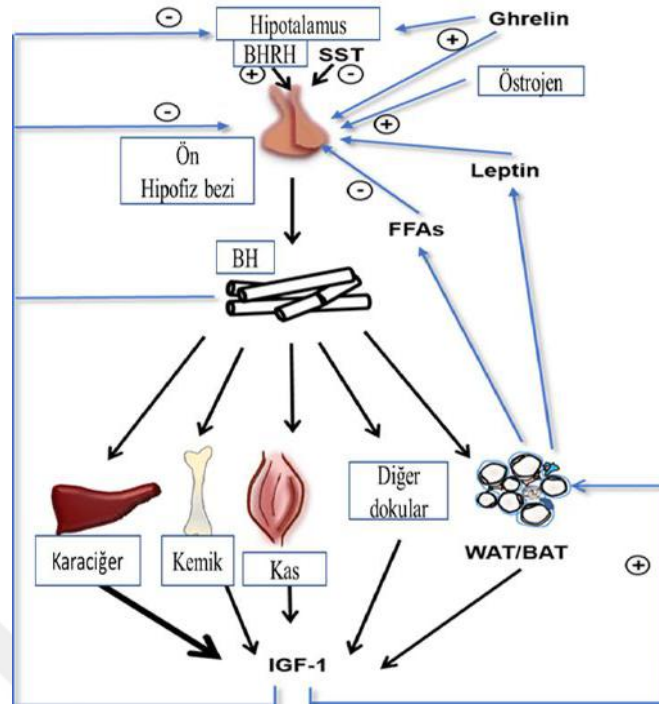
## **BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER**

Postnatal büyüme üzerinden etkisi olan hipofiz kaynaklı endokrin hormon olan büyüme hormon (BH)'dur. BH ön hipofiz bezinden doğum sonrası sentez edilip salınan bir hormon olup, bebeklik döneminde kanda en yüksek miktarda seviyeye sahip olup, puberti sonrası zaman içinde miktarı azalarak hayat boyu düşük miktarda da olsa salınımı devam eden bir hormondur. BH; kas, kemik, yağ dokusu üzerinde büyümeyi tetikleyen, protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmaları üzerinde etkisi bulunan bir hormondur [1]. Ayrıca BH'nin sinir sistemi ve immün sistem üzerinde de etkisi tespit edilmiştir. Hayat boyu miktarına bağlı olarak insan gelişimini etkileyen BH'nin puberti öncesi ve sonrası azlığı veya yüksek olması pek çok klinik vakaya neden olduğu bilinmektedir.

### **2.1 BÜYÜME HORMONU (BH) BİYOLOJİK FONKSİYONU**

Hipofiz kaynaklı BH'nun postnatal büyüme üzerine etkisinin BH sinyalinin protein, yağ, karbonhidrat metabolizması üzerine etkisi kaynaklı olduğu bilinmektedir [1]. BH'nun protein metabolizması üzerine etkisi; membrandan hücre içine amino asit alımını hızlandırıp hücre içi amino asit seviyesini ve çekirdekte RNA oluşumu için transkripsiyonu arttırmakta olduğu gösterilmiştir. Ayrıca BH, protein sentezinde translasyonel aşama üzerinde indükleyici etkisi ile protein anabolizmasını arttırdığı, IGF-1 ise BH'nin prednizonla oluşan protein katabolizmasını önlediği tespit edilmiştir [2].

Protein metabolizması yanında BH'nun yağ metabolizması üzerine etkisi irdelendiğinde enerji için yağların kullanımını arttırmak ve yağ dokusunda lipolizi artırıp yağ asitlerinin serbestleşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir [3]. Tüm vücut dokularında yağ asitlerinin asetil koenzim A ya dönüşümünü ve asetil koenzim-A'nın enerji için kullanımını hızlandırmaktadır. Yüksek BH'nun yağ asidi serbestleşmesi ve asetil koenzim A artmakta, asetil koenzim A'dan asetoasetik asit oluşumunda artma ile ketozise neden olabildiği gösterilmiştir. BH karaciğerde ve kaslarda yağların (gliserol üzerinden) glukoz sentezinde kullanılmasını hızlandırmaktadır. Ayrıca BH'nun esas hedef molekülü olarak pek çok metabolizmayı etkilemede yardımcı olacak şekilde karaciğer dolaşımdaki IGF-1 olduğu belirlenmiştir (Şekil 1) [4].



**Şekil 1. Büyüme Hormonunun biyolojik fonksiyonları [5].**

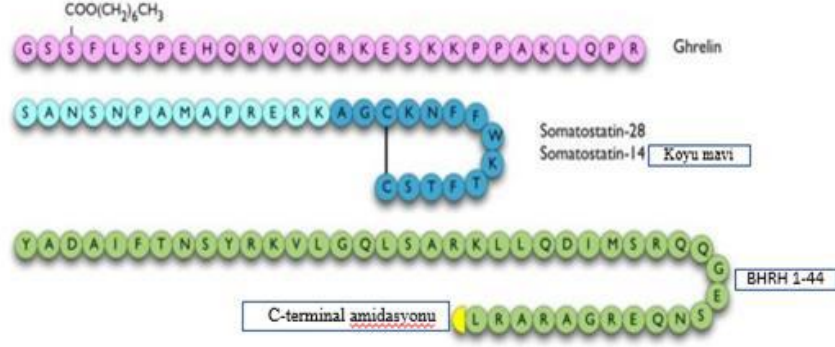
BH'nun karbonhidrat metabolizması üzerine etkisi ise; BH'nın plazma düzeyindeki artış ile önce glikozun hücreler tarafından tutulup glikojen şeklinde depolanmasını sağlayarak hücrelere glikoz alınması azalmaktadır. Aynı zamanda özellikle kas hücrelerinin glikoz kullanımını azaltmak, yağ metabolizmasının ve asetilkoenzim A'nın artmasına neden olarak glikoliz ve glikojenolizin baskılanmasına sebep olduğu gösterilmiştir [6]. BH'nin oluşturduğu hiperglisemi pankreas langerhans adacıklarında  $\beta$  hücrelerini uyarıp insülin salgısında artışa neden olduğu gösterilmiştir. İnsülin salgısında artış hipoglisemiye düzeltmekte, ancak  $\beta$  hücrelerinin sürekli uyarılmaları sonucunda diyabetes mellitus görülebilmektedir [7]. BH'nun uzun kemiklerin ucundaki epifiz kıkırdaklarında yeni kıkırdak yapımını (kondrogenezi) kondroitin sülfat oluşumu sırasında sülfat aktarımını artırarak hızlandırmak ve kıkırdağın yeni kemik dokusuna dönüşümünü sağlamakta olduğu gösterilmiştir. Bunlara ek olarak, barsaklarda  $Ca^{+2}$  emilimini arttırmakta, böbrekler yoluyla  $Na^{+}$  ve  $K^{+}$  kaybını azaltmakta ve plazma fosfor düzeyini yükseltmek olduğu gösterilmiştir [8].

BH büyüme, üreme, beslenme, metabolizma, osmoregülasyon ve bağışıklık sistemi işlevlerini içeren geniş bir fizyolojik fonksiyon dizisini düzenlemektedir. BH'nin hareketleri, dokular arasında yaygın olarak konumlanan BH reseptörleri (BHR) tarafından gerçekleştirilmektedir. BH'nin etkisi, BHR'lerin JAK-STAT, PI3K-Akt, ERK ve PKC dahil olmak üzere birkaç hücrel efektör sistemine bağlı etkisi ile yayıldığı

gösterilmiştir [9]. Büyüme hormonu salgılatıcı hormon (BHRH), hipofiz adenilat siklaz aktive edici polipeptit (PACAP) ve interlökin-1 (IL-1) gibi ajanlar, adenilil siklaz (AC) aktivasyonu yoluyla hipofizden BH salgılanmasını uyarmaktadır. Fare somatotroflarında BHRH tedavisi cAMP sentezini ve sitosolik PKA aktivitesini arttırmakta, bu da BH salgılanmasına yol açmaktadır. Fare hipofiz hücrelerinde, tirozin kinaz inhibitörlerinin, fosfodiesteraz aktivitesini inhibe ederek BHRH ile indüklenen cAMP birikimini ve BH salgısını güçlendirdiği de gösterilmiştir [10].

### **Büyüme Hormonunun Salgısının Kontrolü**

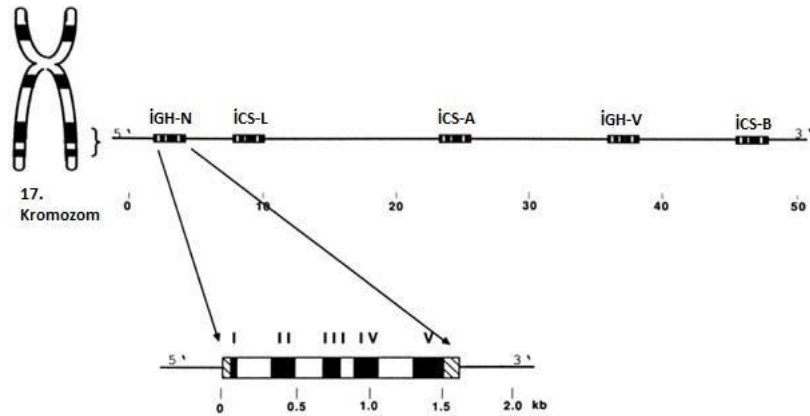
Büyüme hormonu salgılanması, büyüme hormonu serbest bırakma hormonu (BHRH) ve somatotropin salınımı inhibe edici faktör (SRIF) olarak da adlandırılan bir BH salgılanmasını önleyici hormon olan somatostatin tarafından kontrol edilmektedir. Bunun yanında, ghrelin BHRH'nin sekresyonunu arttırmak için hipotalamusun etkilerini arttırarak BH salgılanmasını arttırmak için somatotroplar üzerinde etkili olabilmektedir. BHRH, vasoaktif intestinal peptid (VIP), glukagon ve bu ailede PACAP olarak adlandırılan olası atadan peptidi içeren bir gastrointestinal ve nörohormonlar ailesinin bir üyesi olarak bilinmektedir [11]. BHRH hipotalamus tarafından üretilmekte ve anterior hipofiz bezinde BH sentezini ve salınımını uyarmaktadır. BHRH sadece BH salgılanmasında değil, aynı zamanda birçok hücre ve organda çeşitli hücresel fonksiyonların da önemli bir düzenleyicisi olarak gösterilmektedir. BHRH'lerinin aktivasyonu ayrıca beta-hücrelerinde gen transkripsiyonunun, proliferasyonun ve ERK ve Akt sinyal yolu üzerinde etki ederek hücresel sağ kalım aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir [12]. BHRH, BHRH (1-40) ve (1-44) olmak üzere her ikisi de insan hipotalamusun da (246, 247) bulunan 108 amino asitlik bir preprohormondan üretilmektedir (Şekil 2) [13]. C-terminali 30-44 residuelleri, 1-29 kalıntıları tam biyoaktivite gösterdiği için, dağıtılabılır gibi görünmektedir. BHRH, BH geninin transkripsiyonunu ve ayrıca hücre içi BH salınımını uyaran adenilat siklazı (248) aktive eden yedi transmembran alan G-protein bağlı reseptörüne (GPCR) bağlanmaktadır. BHRH, BH sentezinin ve salgılanmasının temel uyarıcısı özelliği yanında, somatostatin ise BH salınımının güçlü olmayan bir ön-inhibitörü olarak bilinmekte ve BHRH'ye karşı hipofiz BH yanıtını modüle etmektedir. BH salgılanmasının üçüncü bir regülatörü, belirgin bir BH uyarıcı aktiviteye sahip olan ghrelin olarak bilinmektedir [14].



Şekil 2. BH salınımını etkileyen hipofizotropik hormonlar [13].

## 2.2. BH GEN LOKUSU

İnsanda 17. kromozom üzerinde bulunan büyüme hormonu geni hipofiz bezi kökenli bir hormon olup 17. kromozom üzerinde beş tane BH geni bulunmaktadır [15]. Bu gen ailesi insan büyüme hormonu normal (İBH-N), insan koryonik somatomammotropin L (İCS-L), insan koryonik somatomammotropin A (İCS-A), insan büyüme hormonu varyantı (İBH-V), insan koryonik somatomammotropin B (İCS-B) olarak sırasıyla kromozom üzerinde dizilmektedir. Bu gen ailesinde İBH-N ve İBH-V birbirine benzer yapıya sahip olduğu ve sadece İBH-N hipofiz bezinde, İBH-V plasentada eksprese edilmektedir [16]. Ayrıca İBH-N geni 5 ekzon ve 4 intron bölgesinden oluşmaktadır (Şekil 3).



Şekil 3. İnsan büyüme hormonu gen ailesi [118].

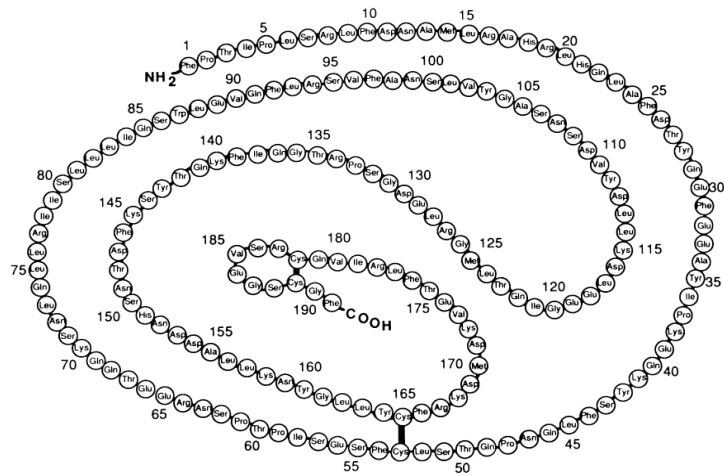
Büyüme hormonu geni 5 ekzon, 4 introndan meydana gelen bir gen olup, genin uzunluğu 814 bç'dir. Aşağıdaki şekilde 4'de ekson-intron dizileri verilen BH geni üzerinden 693 bç uzunluğunda mRNA sentez edilmektedir.



AGGATCCCAAGGCCAACTCCCCGAACCACTCAGGGTCTGTGGACAGCTCACCTAGCTGCAATGGCTACAGGTAAGCG  
CCCCTAAAATCCCTTTGGCACAATGTGTCTGAGGGGAGAGGCAGCGACCTGTAGATGGGACGGGGGCACTAACCCCTCA  
GGTTTGGGGTTCTGAATGTGAGTATCGCCATCTAAGCCAGTATTTGGCCAATCTCAGAAAGCTCCTGGCTCCCTGGA  
GGATGGAGAGAGAAAAACAACAGCTCCTGGAGCAGGGAGAGTGTGGCCTCTTGCCTCTCCGGCTCCCTCTGTTGCCCT  
CTGGTTTCTCCCCAGGCTCCCGACGTCCTCGTCTCTGGCTTTTGGCCTGCTCTGCCTGCCCTGGCTTCAAGAGGGCAG  
TGCCTTCCCAACCATTCCTTTATCCAGGCTTTTGGACAACGCTATGCTCCCGCCCATCGTCTGCACCAGCTGGCCTTT  
GACACCTACCAGGAGTTTGTAAGCTCTTGGGGAAATGGGTGCGCATCAGGGGTGCCAGGAAGGGGTGACTTTCCCCCGCT  
GAAATAAGAGGAGGAGACTAAGGAGCTCAGGGTTTTCCCGACCCGAAAATGCAGGCAGATGAGCACACGCTGAGCT  
AGGTTCCAGAAAAGTAAAATGGGAGCAGGTCTCAGCTCAGACCTTGGTGGGCGGTCTTCTCTAGGAAGAAGCCTAT  
ATCCCAAAGGAACAGAAGTATTCATTCCTGCAGAACCCCGACCTCCCTCTGTTTCTCAGAGTCTATTCCGACACCT  
CCAACAGGGAGGAACAACAAGAAATCCGTGAGTGGATGCCTTCTCCCGAGCGGGATGGGGGAGACCTGTAGTCAG  
AGCCCCGGGACGACAGCCAATGCCCGTCTTGGCCCTGCAGAACCTAGAGCTGCTCCGCATCTCCCTGCTGCTCATC  
CAGTCGTGGCTGGAGCCCGTGAGTTCCTCAGGAGTGTCTTCGCCAACAGCCTGGTGTACGGCGCCTTCGACAGCAACG  
TCTATGACCTCTAAAGGACCTAGAGGAAGGCATCCAACGCTGATGGGGGTGAGGGTGGCGCCAGGGGTCCCAAATCC  
TGGAGCCCCACTGACTTTGAGAGACTGTGTAGAGAAACACTGGCTGCCCTCTTTTAGCAGTCAGGCCCTGACCCAAG  
AGAACTCACCTTATTCTTCATTTCCCTCGTGAATCTCCAGGCCTTTCTCTACTGAAGGGGAGGGAGGAAAATGAA  
TGAATGAGAAAGGGAGGGAACAGTACCCAAGCGTTGGCTCTCCTTCTCCTTCTACTTTCAGAGGCTGGAAGATG  
GCAGCCCCGGACTGGGCAGATCTTAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACAACTCACACAACGATGACGCACTACT  
CAAGAACTACGGCTGCTACTGCTCAGGAAGGACATGGACAAGGTCGAGACATTCCTGCGCATCGTGCAGTGCCGC  
TCTGTGGAGGGCAGCTGTGGCTTCTAG

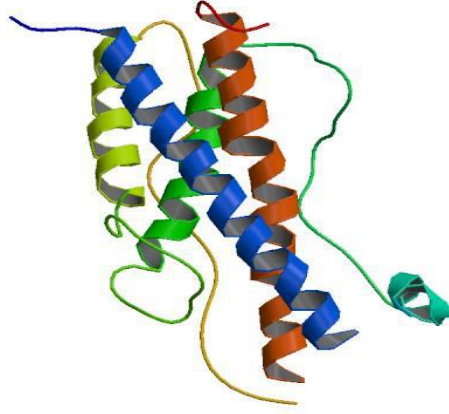
Şekil 4. BH-N genomik dizisi, eksonlar: altı çizili bold, intronlar: italik

Yukarıda ekson ve intron dizisi verilen BH'nun genomik dizisi üzerinden alternatif splicing ile 4 izoform üretilmektedir. Tüm eksonları içeren 22 kDa büyüklüğe sahip olan BH 191 amino asitten oluşmaktadır [17]. Hipofiz bezinde farklılaşmış somatotrop hücreleri tarafından sentez edilen BH sekonder yapısında iki disülfid bağı ile sistein amino asitlerinin bağ kurması ile yapısal şeklini almaktadır (Şekil 5) [18].



Şekil 5. İnsan büyüme hormonu amino asit dizisi [19].

Plasenta tarafından salgılanan büyüme hormonu ile hipofizden salgılanan BH 13 farklı amino asit dizilimi görülmektedir. Ayrıca plasentadan salınan büyüme hormonu, gebeliğin yarısında hipofizden salınan BH'nin yerini alarak daha fazla laktojen etki yaratılmasına sebep olmaktadır [20].

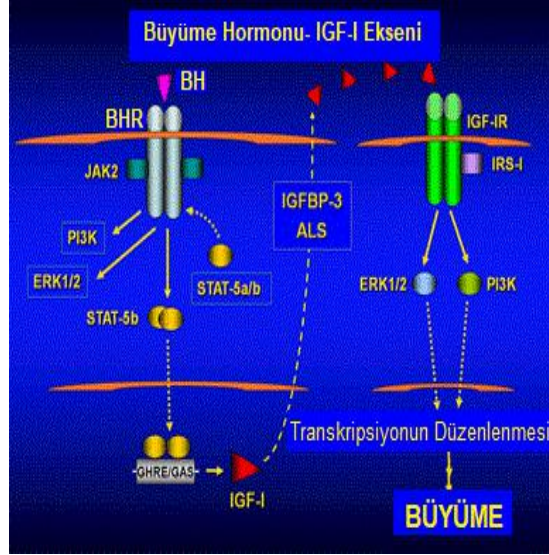


Şekil 6. İnsan büyüme hormonu üç boyutlu yapısı  
(<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00052>)

### 2.2.1. Büyüme Hormonu Sinyali

Büyüme hormonu molekülünün hücre membranındaki ardışık iki BHR molekülüne bağlanmasıyla dimerizasyon gerçekleşmektedir. Dimerizasyonun meydana gelmesiyle JAK-2 aktifleşmektedir. JAK-2'nin aktifleşmesi ile hem kendisini hem de tirozin kinaz aktivitesi olmayan BHR'yi fosforilemektedir [21]. Böylece BH sinyal iletimi, çeşitli yollar üzerinden devam etmekte ve bu yolların en iyi tanımlanmış olanları; STAT, (sinyal iletici ve transkripsiyonu başlatan), PI3 kinaz (fosfatidil inozitol 3-OH kinaz) ve MAPK yolları olarak gösterilmektedir (Şekil 6). Bu yollarda ortak amacı ise BH'nin etkilerini göstermesini sağlayan genlerin aktifleştirilmesi olarak bilinmektedir.

IGF-I'in yapımını uyarmak BH'nin en önemli görevi olarak gösterilmektedir. BH'nin birçok dokuda BHR'ye bağlanması sonucu IGF-I gen transkripsiyonu başlamasını takiben IGF-I'in salınımı artmaktadır. IGF-I dolaşımında, yapımı yine BH kontrolünde olan IGFBP3'e (İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 3) bağlı olarak etki etmektedir. IGFBP3, IGF-I ve ALS'ye (asite hassas alt birim) bağlanarak bir yapı oluşturmaktadır [22].



Şekil 7. Büyüme hormonu sinyal yolağı [23].

Trombosit türevli büyüme faktörü, transforme edici büyüme faktörü- $\beta$ , bazik fibroblast büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü ve vasküler endotelial büyüme faktörü gibi çoğunlukla iyileşme sürecinde yer alan büyüme faktörleri bilinmektedir [24]. Ön hipofiz bezinden salgılanan bir anabolik peptid olan büyüme hormonu, özellikle iskelet kası ve kemiğinin büyümesi için doku yenilenmesini ve hücre çoğalmasını destekleyebilmektedir. Büyüme hormonu aynı zamanda farklı kültür hücrelerinde kollajen salınımını da artırabilmektedir. Hücre zarı üzerindeki büyüme hormonu reseptörü ile bağlanma yoluyla, büyüme hormonunun hareketi doğrudan tirozin kinazın aktivasyonu tarafından veya dolaylı olarak insülin benzeri büyüme faktörü indüksiyonu ile aracılık edilmektedir. BH'nun farklı hücrelerin migrasyonu ve adezyon etkileri olduğu da tespit edilmiştir. Taub ve ark. kemokinetik etki yoluyla, büyüme hormonunun aktive edilmiş insan T hücrelerinin migrasyonunu önemli ölçüde indükleyebildiğini göstermiştir. Lee ve ark. ise IGF-1 yoluyla büyüme hormonunun keratinosit migrasyonunu ve fibroblast çoğalmasını aktive edebileceğini tespit etmiştir [25]. Büyüme hormonu, insanlarda ve diğer hayvanlarda kondrositlerin ve osteoblastların büyümesini, hücre çoğalmasını ve yenilenmesini uyaran bir peptid hormon olarak bilinmektedir. Hedef hücreler üzerindeki yüzey reseptörü ile bağlandıktan sonra büyüme hormonu, JAK-STAT sinyal yolunu harekete geçirmekte ve farklı dokular üzerinde büyüme uyarıcı bir etki yarattığı bilinen insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) üretimini yapabilmektedir [26].

### 2.3. AKROMEGALİ HASTALIĞI

Akromegali, hipofiz bezinin ön lobundan adenomuna bağlı fazla miktarda BH salgılanması ile açığa çıkan kronik bir hastalıktır [27]. Yüksek morbidite ve artmış mortalite riski ve ekstremitelerin anormal büyümesi ile sonuçlanan BH hipersekresyonu ile karakterize bir hastalık olarak gösterilmektedir. BH salgılanması esas olarak BHRH, BH salgılayan peptid (BHRP, örneğin ghrelin) ile upregüle edilmekte ve somatostatin tarafından inhibe edilmektedir. BH'nin karaciğerde yer alan GH-reseptörlerine bağlanması, insüline benzer büyüme faktörü-1 (IGF-1) sentezine ve dolaşımında salgılanmaya neden olmaktadır. BH salgılanması üzerine negatif geri besleme, IGF-1 ve BH'nin kendisi tarafından sağlanmaktadır [28].

Akromegali hem BH hem de IGF-1, glukoz homeostazisi etkileyen ara metabolizmada rol oynamaktadır. Kronik BH fazlalığı yağ dokusu ve kastaki glikoz alımını azaltmak, insülin duyarlılığını bozmakta, glukoneogenezi arttırmakta ve pankreatik hücre fonksiyonlarını değiştirmektedir. Böylece Akromegali hastalarında glukoz metabolizması değişiklikleri çok sık rastlanan bir komplikasyon olarak bilinmektedir. Sporadik BH salgılayan hipofiz tümörü ile ilişkili patogeneze sahip Akromegali hastalarının çoğunda kronik bir BH ve bunun sonucu olarak dolaşımdaki IGF-1 artmaktadır. Akromegali, metabolik, solunumsal, kardiyovasküler, neoplastik ve kas iskelet sistemi komplikasyonları dahil olmak üzere ciddi başka hastalıklar ile ilişkili olup, hastaların yaşam kalitesi ve mortalite riskini önemli ölçüde etkileyen bir hastalık olarak bilinmektedir [29]. Ayrıca özellikle kardiyovasküler komplikasyonlar sebebiyle mortalite ve morbidite artışı ile ilişkili olan akromegalide yüksek IGF-1 ile kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalık, hipertansiyon ve hipoadrenalizme sebep olabilmektedir [30]. Bu hipofiz bozukluğu, BH ve IGF-1'in kronik organların yanında yumuşak dokuların genişlemesi ile karakterize olduğu bilinmektedir [31].

Akromegali'nin kesin prevalansı oldukça açık olmamakla birlikte, tahmin edilen insidans yılda milyonda üç ile dört vaka olup akromegali insidansı cinsiyet, ırk ve etnik kökene göre değişmektedir. İspanya'da yapılan epidemiyolojik çalışmalar akromegalinin kadınlarda baskın olduğunu bildirmiştir. Akromegalinin en yaygın nedeni, iyi huylu bir tümör veya adenoma hipofiz somatotrop hücrelerinden

kaynaklanan ve aşırı BH salgılayan varlığıdır. Bu aşırı BH salgılanması hipofiz bezi, kas, karaciğer, böbrek ve gastrointestinal sistem tarafından üretilen IGF-1'in sürekli yükselmesine yol açmaktadır. Akromegali'nin klinik belirtileri BH ve IGF-1 seviyeleri, farklı doku ve organların BH ve IGF-1 düzeylerinin yükselmesine, tanıda gecikmelere, yaş ve tümör büyüklüğüne kadar çeşitli etkenlere bağlı olarak geliştiği gösterilmiştir. Akromegalide yüksek IGF-1 düzeyi, bazı kanserlerin, özellikle de tiroid kanseri ve kolon kanseri riskinin artması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [32].

## 2.4. İZOLE BÜYÜME HORMON EKSİKLİĞİ SENDROMU

Büyüme bozuklukları ve boy kısalığı yaygın bir klinik sorun olarak gösterilmiştir. Çoğu durumda sporadik olduğu ve çevresel veya gelişimsel anomalilerden kaynaklanmasına rağmen BH eksikliği, BH duyarsızlığı (Laron sendromu) ve BH'nin düşük biyoaktivitesi (Kowarski sendromu) dahil olmak üzere genetik nedenlerden kaynaklandığına dair tahmini sıklık aralığı; 10,000 canlı doğumda 4'ten 1'e (1- 4) olduğu gösterilmiştir. Gen, karşılıklı halkalarla ayrılmış dört anti-paralel  $\alpha$ -heliks dizilimi ile karakterize edilen bir protein olarak hipofiz bezinde eksprese edilmektedir. Tek bir BH molekülü esas olarak sarmal 1 ve 2 arasındaki uzun uzatılmış halkadan ve esas olarak heliks 1 üzerinde bulunan alan 2'den oluşan iki BH reseptör (BHR) bağlama bölgesi ile yüksek afinite bölgesi içermektedir. Biyoaktif BH ile ilişkili kısa boy, klinik olarak normal veya hafif yükselmiş BH sekresyonu, patolojik olarak düşük IGF-I seviyeleri ve BH replasman tedavisinde normal yakalama büyümesi ile karakterize olduğu bildirilmiştir [33]. Biyolojik olarak inaktif BH kaynaklı IGF-I miktarında düşüş ile ilişkili olarak kısa boylu endokrinopati fenotipinde sendrom varlığı ilk olarak Kowarski ve ark. tarafından ifade edilmiştir. Serum hBH izoformlarının heterojenliği üç ana mekanizmaya dayanmaktadır: alternatif mRNA ekleme, intravasküler agregasyon ve metabolik dönüşüm olarak bildirilmiştir.

BH-1 geninin mutasyonları biyolojik olarak inaktif hBH sendromu çocuklarda ana genetik bozukluk olmadığı tespit edilmiştir. hBH'nin posttranslasyonel olarak işlenmesi, normal dönüşüm ürününün biyolojik etkinliğini azalttığı bildirilmiştir [34]. Büyüme hormonu eksikliği (BHE), çocukluk çağında görülen en belirgin göstergesi kısa boyluluk olan etiyoloji, patogenez, tanı yaşı ve büyüme geriliği nedenleri açısından nadir görülen endokrin bir bozukluk olarak ifade edilmiştir. Çocuklarda büyümenin sürdürülmesi, çok sayıda genetik, hormonal, çevresel ve beslenme

faktörleri tarafından düzenlenen karmaşık bir süreç olmaktadır. Çocuklukta uzunlamasına kemik büyümesini düzenleyen önemli sistemik hormonlar; BH ve IGF-I, tiroid hormonu (T<sub>3</sub> ve T<sub>4</sub>), glukokortikoidler ve ergenlikte cinsiyet steroidleri (androjen ve östrojenlerin)'dir. Bununla birlikte, postnatal kemik büyümesinin en önemli düzenleyicileri arasında BH ve IGF-I belirtilmiştir.

BH ve IGF-I, uzunlamasına kemik büyümesinin güçlü stimülatörleri olup, çocukluk ve/veya yetişkinlik döneminde hipofiz adenomu, gigantizme veya akromegaliye yol açan aşırı BH sekresyonuna neden olmaktadır. Rutherford ve ark., izole BHE için tedavi edilen ergenlerde 12 ay boyunca r-hBH durdurulduğunda, vücut yağı ve kas büyüklüğünün arttığını, bütünlüğünün ve kuvvetinin azaldığını göstermiştir [35]. IGF-1 ve IGF-1 reseptör gen delesyonları ve nokta mutasyonları gibi BH-IGF eksenindeki genetik anormallikler, doğumda küçük boyut ve postnatal büyüme geriliği ile ilişkili bulunmuştur [36].

#### **2.4.1. İBHE sendromunda tespit edilen BH gen mutasyonları**

BH-N geninde ortaya çıkan mutasyonlar sonucu oluşan mutant BH proteinlerinin BH sinyaline ket vurduğu bilinmektedir. Böylelikle postnatal büyüme geriliğine neden olarak İzole Büyüme Hormonu Eksikliği (İBHE) sendromuna yol açtığı bilinmektedir. Bu zamana kadar dünya çapında İBHE sendromuna sahip olan çocuklarda pek çok BH gen mutasyonu tanımlanmıştır. Tanımlanan bu mutasyonlara göre İBHE sendromu Tip IA, IB, II, III adı verilen dört ana tipe sınıflandırılmıştır [37].

İBHE Tip IA sendromlu çocuklarda BH-1 geninde meydana gelen 6.7 kb delesyon varlığı Avustralya, Brezilya, İsveç, Türk kökenli İBHE çocuklarda tespit edilmiştir. Ayrıca BH geninde 7.6 kb delesyon İtalyan, İran-Irak kökenli ve Türk kökenli çocuklarda tespit edilmiştir. BH gen kümesindeki genlerin ekson, ekson intron dizisinin yüksek homoloji göstermesi mayoz esnasında homolog bölgeler arasında rekombinasyon esnasında eşit olmayan gen bölgesi değişimi sonucu ortaya çıktığı tespit edilmiştir.

İBHE tip IB resesif olarak görülen bir rahatsızlık olmakla birlikte, Suudi arap kökenli İBHE çocuklarda meydana gelmesi ile bu zamana kadar 4. intronun ilk bazı olan guaninin sitozine dönüşümü (456+IG>C) ve guaninin timine dönüşümü (456+IG>T) ile 4. intronu beşinci nükleotiti olan guaninin sitozine dönüşümü tespit edilmiştir. İBHE tip IB hastalarında BHSBHR geninde çeşitli mutasyonlar görülmesi ile bu

mutasyonların reseptörü inaktif hale getirmesi ve hastalarda Sindh Dwarfizm adı verilen karakteristik fenotipe yol açtığı tespit edilmiştir [38].

İBHE tip II, otozomal dominant bir özellik olarak doğuştan konjenital BH eksikliğidir. BH-1 genin 3. intron'unda splise hata mutasyonları sonucu mRNA üzerinde çerçeve kayması mutasyonları veya ekson 3 içinde küçük delesyonlar ile İBHE tip 2 sendromu ortaya çıkmaktadır. Ekson 3. delesyona bağlı olarak BH proteininde 32 ile 71. amino asitleri kaybı ile 17.5 kDa büyüklüğünde mutant BH proteini üretilmektedir. BH proteininde Del32-71 olarak anlatım sağlayan transgenik İBHE sendromlu farelerde büyüme hormonu eksikliğine bağlı kısa boyluluk ve makrofaj invazyonu ile geniş çaplı hipofiz bezi hasarı gösterilmiştir [39]. İBHE tip III'ün ise X'e bağlı BH geninde herhangi bir mutasyon belirlenmediği ve fenotipe neden olan kesin bir mekanizma açıklanamadığı bildirilmiştir.

Ayrıca ülkemizde yapılan İBHE sendromlu çocuklar üzerinde yapılan BH gen mutasyon taramasına göre BH-N geninin daha önceden tespit edilen 2. eksonunda TGG-TAG dönüşümü sonucu Triptofanın dur (W-7X) kodonuna dönüştüğü, 748 kodonda A>G sonucu Asparjinin Aspartik Asite (N47D), Treoninin Alanine (T24A), 2. eksonunda alanin kodlayan GCT kodunun Serin amino asidin kodlayan TCT dönüşmesi sonucu BH proteininde A13S mutasyonları tespit edilmiştir. Ayrıca ilk defa literatürde geçen BH-N geninin 5. eksonunda TTC kodunun delesyonu sonucu BH proteini  $\Delta F166$  novel mutasyon tespit edilmiştir [40].

**Tablo 1. Büyüme hormonu mutasyonları**

Mikro delesyonlar		
Eksiklik tipi	Delesyon	Kodon
IA	TGcCTG	-10
II	CGGggatggggagacctgtaGT	5'IVS-3 del+28-45
BH-1 gen bölgesinde tek-baz çift değişimi		
Eksiklik tipi	Mutasyon	Kodon nükleotid
IA	TGG->TAG Trp->stop	-7
II	R183H	G6664A
mRNA eklenmesini etkileyen tek-baz çift değişimi		
Eksiklik tipi	5'IVS-4	Ekson 3
IB	GT->CT	hayır
IB	GT->TT	hayır

Aminoasit değişimi	Nükleotit değişimi	Gen bölgesi
Yanlış anlam mutasyonu		
T-24A	69A →G	Ekson 1
A13S	177G→T	Ekson 2
E33G	238A→G	Ekson 3
N47D	279A →G	Ekson 3
Anlamsız mutasyon		
W-7X	122G →A	Ekson 2
Delesyon mutasyonları		
F166d	Delesyon 636-638	Ekson 5
-	Delesyon +83C	İntron 1

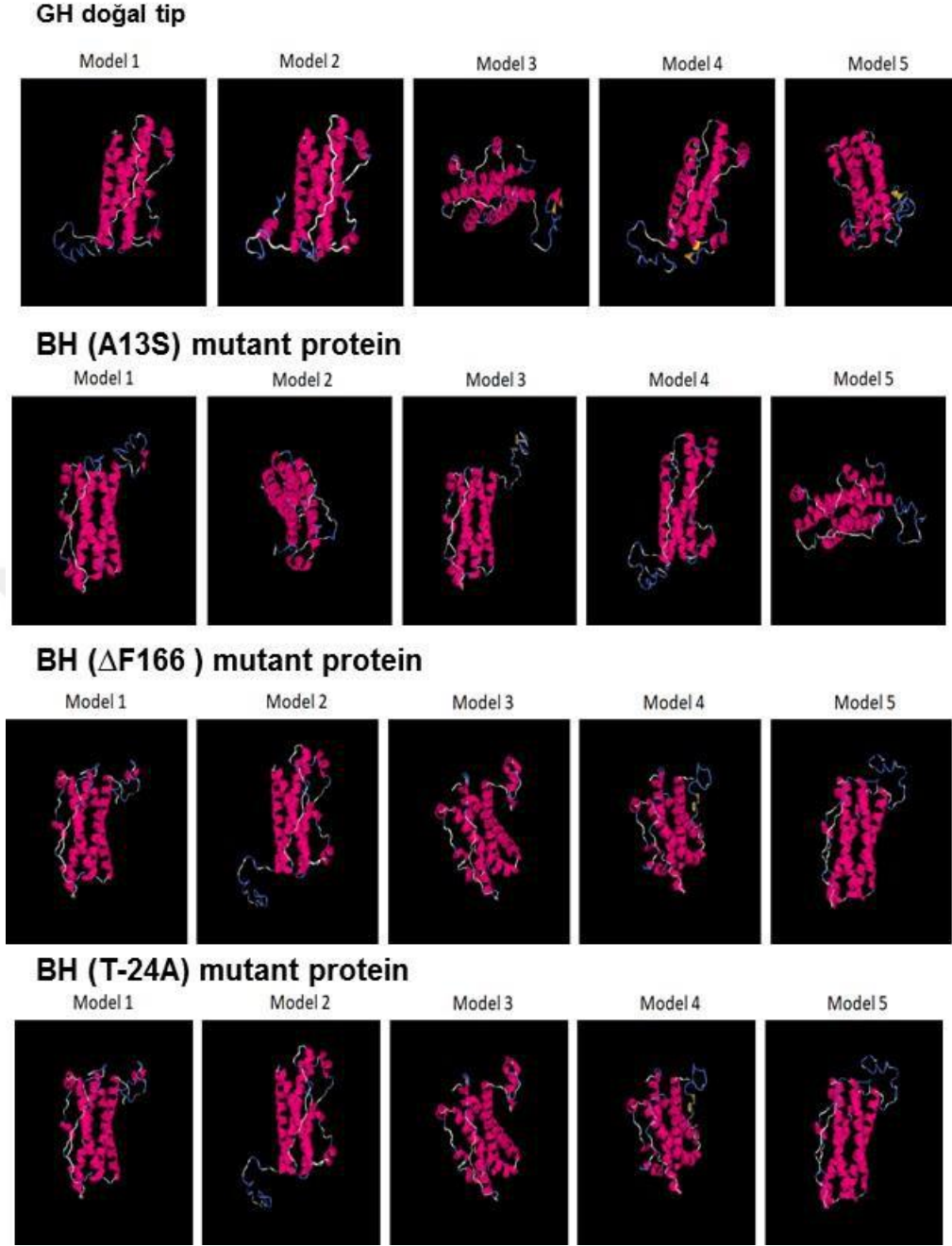
**2.4.2. BH gen mutasyonlarının BH proteinin biyolojik fonksiyonu üzerine etkisi**

İBHE sendromlu çocuklarda tespit edilen BH gen mutasyonlarının BH biyolojik fonksiyonu üzerine etkisi irdelenmiş, BH sinyali üzerine ket vurma potansiyeline göre mutant BH proteinlerin biyolojik fonksiyon kaybı ortaya konulmaktadır. Bu mutasyonlarda yirmi dört yeni BH-1 geni mutasyonundan on üç yanlış anlam mutasyonu, sinyalin tahlil edilmesiyle karakterize edilmiştir, *in vitro* ekspresyon varyantlarının transdüksiyon aktivitesi; altı mutasyon (T271I, K41R, N47D, S71F, S108R ve T175A) JAK / STAT yolunu aktive etmek için azaltılmış bir sonuca varılmıştır. Moleküler modelleme de K41R ve T175A mutasyonları, BH reseptörü bağlanmasını tehlikeye atabileceğini öne sürmüştür. R16C, K41R, S71F, E74K, Q91L,



S108C ve fonksiyonel bir polimorfizm olan V110I mutasyonu taşıyan farelerde BH proteinin anlatımının ve salgısının azalmış olduğunu göstermiştir. Bir başka çalışmaya göre; BH geninin promotör bölgesinde mutasyon ile on bir promotör varyantı için reportir denemesi sonucuna göre ekson 3 promotör bölgesinin BH1 proteinini anlamlı derecede azaltılmış olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle toplamda 15 yeni BH1 gen mutasyonunun olası fenotipik öneme sahip olduğu düşünülmüştür [41]. BH1 geninde heterozigot yanlış anlam mutasyonu BH geninin 59.pozisyonunda prolinin lösine dönüşümü ile görülen bir hastada biyoinaktif BH sendromu özellikleri ile meydana gelmesi kısmi BHE'ye neden olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada BH geninde görülen BH-P59S'nin doğal tip BH ile karşılaştırıldığında JAK2/STAT5 yolağı aktivasyonunda BH varyantları arasında sinerjik bir etkileşimin olmadığı tespit edilmiştir [42]. Ailesel kısa boyluluk görülen 74 çocukta yapılan bir başka çalışmada iki yeni mutasyon keşfedilmiştir. İlki Ile179Met dönüşümü diğeri ise -360A->G promotörü varyantı olarak tespit edilmiştir. Moleküler modelleme çalışmalarında, Ile179Met dönüşümünün BH geninde Trp169'u içeren BH reseptör döngüsü arasında oluşan etkileşimleri bozabileceğini dolayısıyla sinyal iletimini etkilediği söz konusu olmuştur. Yapılan bu çalışma ile Ile179Met varyantının STAT 5'e yanıt olarak lusiferaz raportör genini aktive etmedeki rolü ve STAT-5 ve ERK'nin fosforilasyonunu indüklemesi bu çalışmada araştırılmıştır [43]. Gecikmiş pubertal gelişimi ve büyüme geriliği olan bir hastada ise, BH geninde R77C (arjininin-sisteine dönüşümü) olan heterozigot bir yanlış anlam mutasyonu tespit edilmiştir. BH-R77C'de, serum IGF-I seviyeleri düşük olsa da, her zaman kısa boyluluk ile ilişkili olmadığı belirtilmiştir [33].

Literatürdeki bu bilgiler ışığında laboratuvarımızda hali hazırda tez danışmanının doktora tezinde klonlamış olduğu doğal tip BH geni ve A13S, T24A, ΔF166 mutasyonlarını taşıyan mutant BH geni içeren pcDNA3.1 plazmitlerinin varlığı neden ile İBHE sendromlu çocuklarda BH sinyaline ket vurma potansiyelinde olmaları nedeni ile büyüme, gelişme üzerine ket vurmalarının HEK293 hücre modellerinde irdelenmesi tez hipotezini ortaya koymuştur. Bu kapsamda seçili BH gen (A13S, T24A, ΔF166) mutasyonlarının iTasser programı aracılı 3B yapısı çizilmiştir (Şekil 8).

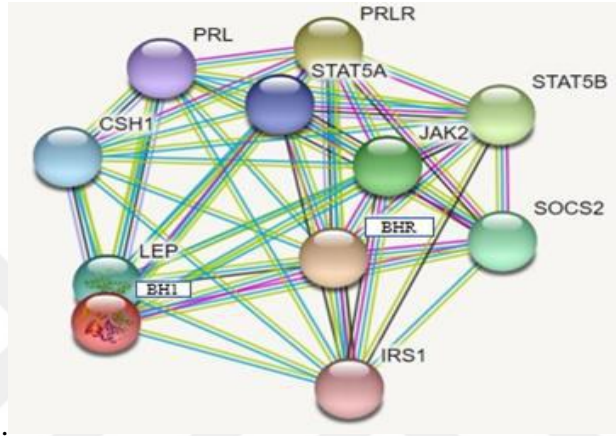


Şekil 8. Doğal tip, A13S, T24A,  $\Delta$ F166 BH mutant proteinlerin sekonder yapısını gösteren modeller (<https://zhanglab.ccmh.med.umich.edu/I-TASSER/>)

## 2.5. JAK/STAT SİNYAL YOLAĞI

Tirozin-protein kinaz JAK-2 hücre gelişimi, büyümesi, farklılaşması veya histon modifikasyonları gibi işlemlerde rol oynamaktadır. Hem doğal hem de uyarlanabilir bağışıklıkta gerekli sinyal olaylarına aracılık etmektedir. Sitoplazmada, örneğin büyüme hormonu (BH), prolaktin (PRLR'ye), leptin (leptin reseptör), eritropoietin (EPOR), trombopoietin (THPO) olarak tip I reseptörleri ile ilişkili sinyal iletiminde önemli bir rol oynamakta ya da tip IFN-alfa, IFN-beta, IFN-gama ve çoklu

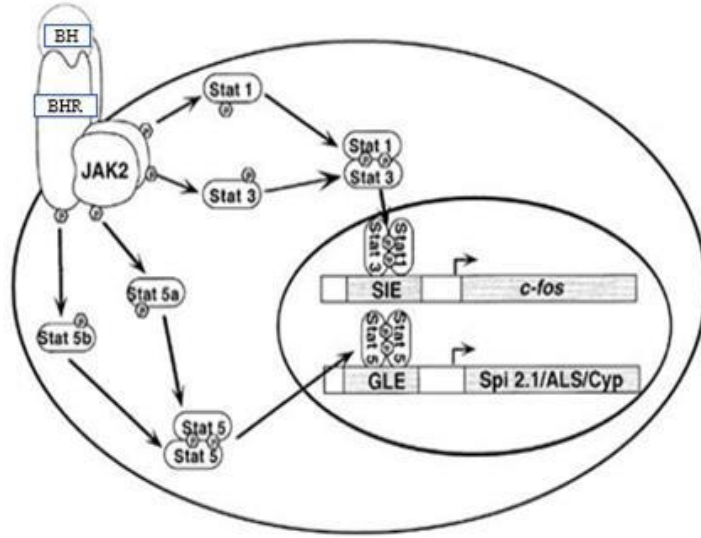
interlökinler içeren tip II reseptörlerinin iletilmesinde rol almaktadır (Şekil 9). BH'nun hücre membranında lokalize olan BHR'ye bağlanması reseptörle ilgili JAK-2 aktivasyonunu sağlar [44]. JAK-2, kendisi ve BHR aracılığıyla tirozin bölgelerinden fosforile edilmektedir. STAT proteinleri SH-2 domainine sahip proteinler olup reseptörüne bir ligandın bağlanması STAT proteinlerinin bir araya gelmesine neden olmaktadır ve SH-2 domainleri ile etkileşime geçmesi ile bu süreç STAT proteinlerinin fosforilasyonu ile sonuçlanmaktadır.



**Şekil 9. Büyüme hormonunun protein yapısı**

BH düzenlenmesinde STAT transkripsiyonu etkili bir rol oynamakta olup, STAT proteinlerinin BH tarafından aktivasyon mekanizması, JAK'ın BHR fosforilasyonunu takiben kendi otofosforilasyonu sonucu BH elemanlarının pSTAT dimerleri tarafından nükleer lokalizasyonuna bağlı olarak gerçekleştiği gösterilmiştir. Birçok büyüme faktörü ve sitokinler tarafından yönetilen sinyalleri JAK ve STAT'lerin ilettiği gösterilmiştir. STAT protein ailesi; STAT1, 2, 3, 4, 5 (5a ve 5b) ve 6 olarak tespit edilmiştir. STAT1, STAT3 ve STAT5, JAK-2 üzerinden aktive olan STAT'lardır. Fosforilasyon ile aktive olan STAT proteinleri homodimer veya heterodimerler oluşturarak nükleusa göç edip, transkripsiyon faktörü olarak görev almaktadır [45]. JAK/STAT sinyal yolağının regülasyonu SOCS (Sitokin Sinyalini Baskılayıcı) proteinleri tarafından gerçekleşmektedir (Şekil 10). Hücre sağkalımına bağlı genler ve hücre döngüsü için kritik bir transkripsiyon aktivatörü olarak STAT3 görev almaktadır. Bazı SOCS proteinleri sitokinler tarafından indüklenmektedir ve negatif feedback mekanizması ile STAT proteinlerini inhibe ettiği etmektedir [1]. Yapılan

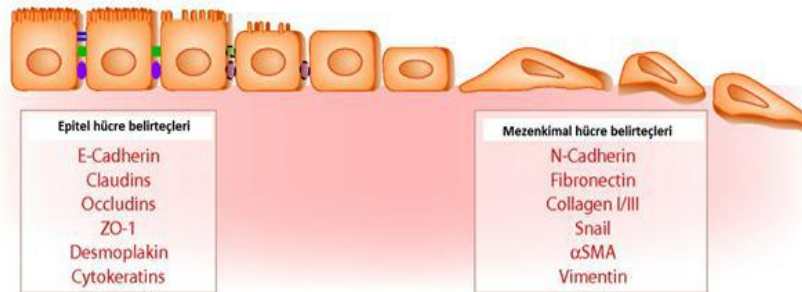
birçok çalışma, JAK-2 / STAT3 yolunun aktivasyonunun, farklı kanser hücrelerinde EMT'nin ilerlemesine katkıda bulunduğunu göstermiştir.



Şekil 10. GH/GHR/JAK-STAT sinyal yolağı [1].

## 2.6. Epitel Mezenkimal Geçiş (EMT)

Epitel mezenkimal geçiş (EMT), epitel hücrelerinin epitel özelliklerini birçok biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler sonucu kaybederek mezenkimal özellikler kazanmalarına neden olan biyolojik bir süreçtir. Bu yüzden EMT, embriyogenez ve yetişkinlikte hücre çeşitliliği mekanizması olarak bilinmektedir [46]. Mezenkimal hücre profiline sahip olan hücreler ise epitel hücre profiline dönüşmektedirler. Epitel hücre belirteçleri E-kaderin, desmoplakin, kludinin, okludinin, laminin ve tip IV kollajen olarak bilinmektedir. Mezenkimal hücre belirteçleri ise N-kaderin, vimentin, snail, integrin, fibronectin ve tip I/III kollajen olarak bilinmektedir (Şekil 11) [47].



Şekil 11. Epidermal Mezenkimal geçiş belirteçleri [48].

EMT'nin ve mezenkimal epitelyal geçişin (MET) gelişim, yara iyileşmesi, rejenerasyonu ve kanser metastazı başlatılması sırasında doku bütünlüğünün yeniden yapılanmasında çok önemli rol oynadığına dair birçok kanıt bulunmaktadır. EMT sırasında metaloproteazlar aktive edilerek hücre dışı matris bileşenlerini ve membran tabanını parçalayarak hücre göçünü kolaylaştırmaktadır. Ayrıca literatürde pek çok çalışmaya göre kodlama yapmayan mikroRNA'ların, EMT belirteçlerinin çevirisini düzenleyerek EMT'de rol oynadığı belirtilmiştir [49]. Spesifik transkripsiyon faktörlerinin, kanser hücrelerinin ve sinyalleşme yollarının aktivasyonu ile invazyon etki oluşturarak fenotip kazanması için EMT'nin önemli olduğu kabul edilmiştir. EMT uygulamasının önemli düzenleyicileri olarak, SNAI ailesine ait transkripsiyon faktörleri olan Snail ve Slug ayrıca Twist1 / 2 gösterilmiştir. N-kaderin, vimentin gibi mezenkimal hücrelerde anlatımı olan genlerin transkripsiyonunu teşvik etmektedir. Buna ters olarak, E-kaderin, okludinler ve claudinler epitel markırlarının anlatımını baskılamaktadırlar [50]. Ayrıca EMT ve tümör metastazının indükleyicileri arasında SNAİL, Slug, ZEB1 ve ZEB2, Twist de dahil olmak üzere birçok transkripsiyon faktörü öne sürülmüştür. EMT ve MET'de görev alan miRNA'lar arasında miR-9, miR-27, miR-30a, miR-194, miR-200 ailesi olarak bildirilmiştir [51].

**Tablo 2. EMT/MET'de yer alan miRNA'lar [51].**

miRNA	EMT'ye etkisi	Hedef
miR-9	Uyarıcı	CDH1
miR-27	Uyarıcı	APC
miR-29a	Uyarıcı	TTP
miR-30a	Baskılayıcı	Snail
miR-103/107	Uyarıcı	DICER1
miR-194	Baskılayıcı	BMI1
miR-200 ailesi	Baskılayıcı	ZEB1/ZEB2, Sec23a
miR-204	Baskılayıcı	TGFβR2, SNAİL2
miR-661	Uyarıcı	StarD10, Nectin-1

**Tablo 3. Tümör invazyon ve metastazında rol oynayan miRNA'lar [51].**

MiRNA	İnvazyon ve metastazdaki rolü	Kanser türü	Hedef
miR-7	Baskılayıcı	Meme, glioblastoma	Pak1, EGFR
miR-10a	Uyarıcı	Pankreas	HOXB1, HOXB3
miR-16	Baskılayıcı	Prostat	CDK1,CDK2
miR-17-92	Uyarıcı	Meme, kolorektal	CTGF, Tsp1
miR-21	Uyarıcı	Mide, akciğer, meme,pankreas	PTEN, RHOB, TPM1,NF1B
miR-22	Baskılayıcı	Meme	CDK6,SP1
miR-126	Baskılayıcı	Akciğer, meme	VEGF, CRK
miR-194	Baskılayıcı	Karaciğer	HBEGF,CDH2
miR-214	Uyarıcı	Melanoma	TFAP2C
miR-335	Baskılayıcı	Mide, meme	SOX4, TNC, SP1, BCL2L2
miR-520c	Uyarıcı	Meme	CD44
miR-146a/b	Baskılayıcı	Pankreas, prostat, mide	NFKB1, EGFR, ROCK1

Yukarıda ifade edilen EMT ile ilişki miRNA ve hedef aldıkları EMT markırları dışında EMT ile indüklemesini uyarıcı ve BH ilişkili miRNA varlığında literatürde gösterilmiştir. Plazmit aracılı BH anlatımı indüklenmiş T47D, MDA-MB-453 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde BH bağlı hücre proliferasyonunun, miR96-183-182 anlatım profili artmasına neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca miR96-182-183 mimics verilmesi ile proliferasyonun indüklendiği ve hedef miRNA özgü anti-miRNA ile proliferasyonun baskılandığı gösterilmiştir. Otokrin BH anlatımının artırılmasının EMT yolağını, MMP2, MMP9 ve Snail molekülleri hedef alarak indüklediği gösterilmiştir [52]. BH ayrıca MMP'ler, c-myc, Bcl-2 ve CHOP dahil olmak üzere

metastazla ilişkili genlerin transkripsiyonunu arttırabilmektedir. EMT'nin epitelyal malign tümörlerin invazyon ve metastazlarına katkıda bulunduğu düşünülmüştür [53].

## 2.7. microRNA (miRNA)

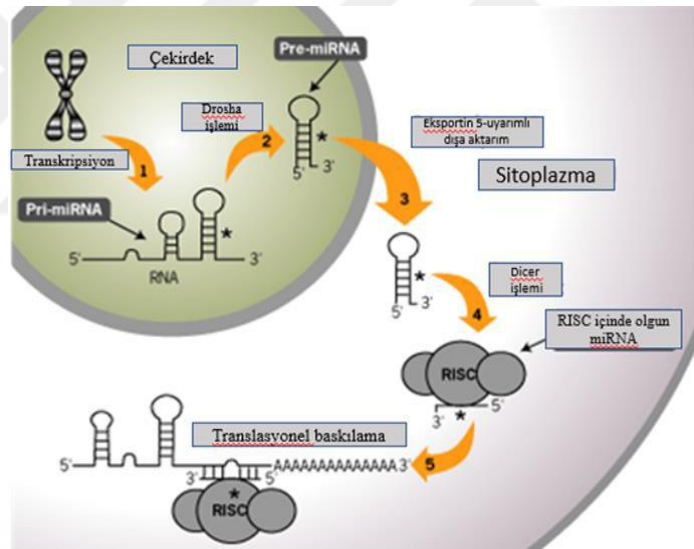
1993 yılında Lee ve çalışma arkadaşları tarafından ilk mikroRNA Victor Ambros laboratuvarında yuvarlak solucan olan *Caenorhabditis elegans*'ta lin-4 olarak adlandırdıkları genin hiçbir protein kodlamamasına karşın 22 nükleotid uzunluğunda küçük bir RNA transkribe etmesiyle ilgili bir çalışma bildirilmiştir. Daha sonra 2000 yılında Reinhart ve arkadaşları tarafından yine *C.elegans*'da 22 nükleotid uzunluğunda, let-7 olarak adlandırılan, canlının gelişim zamanlamasını düzenleyen farklı bir mikroRNA'nın varlığı tespit edilmiştir. Daha sonraki yıllarda let-4 ve let-7'ye benzeyen birçok küçük RNA molekülü, hemen hemen bütün çok hücreli organizmalarda keşfedilip miRNA olarak isimlendirilmiştir.

MikroRNA'lar veya miRNA'lar translasyonel olarak gen ekspresyonunu kontrol eden, 3'-çevrilmemiş bölgelerdeki (3'-UTR'ler) hedef mRNA'ların bölünmesini transkripsiyonel olarak düzenleyen, endojen, son keşfedilen küçük, 21-24 nükleotidden oluşan, kodlamayan RNA'ların bir sınıfı olarak ifade edilmektedir [54]. Birçok çalışma miRNA'ların apoptoz, hücre farklılaşması, proliferasyon, invazyon ve metastaz dahil olmak üzere çeşitli organizmalarda rol alan düzenleyici mekanizmalarda önemli işlevlere sahip olduğu bildirilmiştir [55]. Birkaç doğal kodlamayan RNA'nın miRNA'ları baz eşleştirme yolu ile inhibe ettiği gösterilmiştir. Her mRNA'nın çoklu miRNA'lar tarafından düzenlenebileceği, birden fazla hedef mRNA'nın ekspresyonunu tek bir miRNA'nın kontrol edebildiği bildirilmiştir.

MikroRNA'ların farklılaşma, gelişim ve farklı fizyolojik fonksiyonlarda önemli rol aldığı belirtilmesine yanında, düzensiz miRNA anlatım profillerinin farklı patolojik olaylar ile ilişkilendirilmiştir. MikroRNA biyogenezinin farklı fizyolojik süreçlerde ve hastalıklarda epigenetik etkisinin moleküler düzeyde anlaşılmasının potansiyel önemi bulunmaktadır. miRNA profilleri belirli bir kanserin farklı alt tiplerini, ayrıca spesifik onkojenik anormallikleri ayırt edebilmektedir. Dolayısıyla sadece normal ve kanserli dokuları ayırt etmekle birlikte aynı zamanda orjinli dokularıda tanımlayabilmektedir. Her miRNA ortalama 100-200 hedef geni düzenleyebilmektedir. Gen ekspresyon profili, farklı kanserlerin alt tiplerinde etkinliğini göstermiştir. Ekspresyon değişiklikleri farklı kanser alt tiplerinde gözlemlenen gen olasılıkları hakkında bilgi

sağlayabildiğinden miRNA profilleri daha bilgilendirici ve daha iyi bir ayırım sağlayabilmiştir. Son zamanlarda miRNA'ların bu özellikleri ve vücut sıvılarında varlıklarının gösterilmesi miRNA'ların kanser, nörodejeneratif hastalıklar gibi pek çok hastalık için teşhise yönelik bir belirteç olarak kullanılabileceği yönündedir.

MikroRNA'ların biyogenezi, RNA polimeraz II tarafından çekirdekte transkripsiyon ile başlamaktadır. Hairpin yapısında olgun miRNA dizisini içeren uzun miRNA (pri-miRNA)'dan oluşmaktadır. Hairpin yapısı Drosha (RNAaz III enzimi) ve kofaktörü DiGeorge kritik sendrom bölgesi 8 (DGCR8)'den oluşan mikroprosesör aracılığıyla kesilmektedir. Oluşan prekürsör miRNA (pre-miRNA) nükleustan Exportin-5 ile sitoplazmaya taşınmakta ve diğer RNAaz III enzimi olan Dicer tarafından 21-24 nükleotid uzunluğundaki dubleks miRNA'ya kesilmektedir. Olgun diziye kesilecek olan iplik miRNA, indüklenmiş susturma kompleksinde (RISC) Argonaute'a yüklenmiştir (Şekil 12) [56].

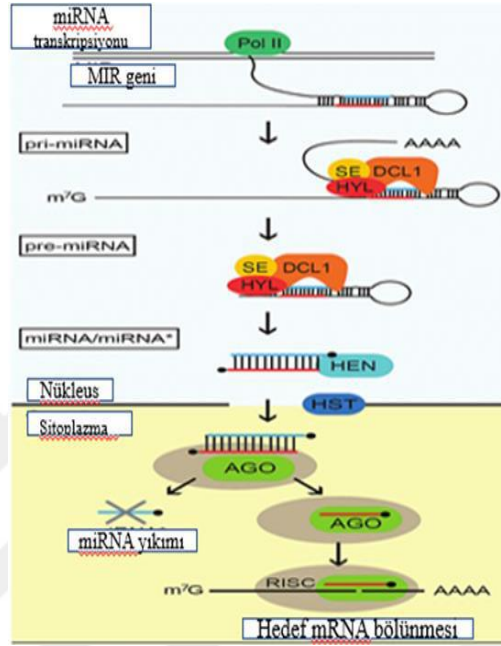


Şekil 12. miRNA moleküllerinin biyogenezi ve taşınımı [57].

MikroRNA'nın 2-8 nükleotidlik çekirdek dizisi hedef mRNA ile tam olarak eşlendiğinde mRNA'nın destabilizasyonu sağlanmaktadır. Fakat tam olarak eşlenmediği zaman translasyonel baskılanmaya sebep olmadığı bilinmektedir. MikroRNA, hedef mRNA'nın 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgesi (untranslated region-UTR) ya da hedef mRNA'nın ORF (open reading frame) bölgesine bağlanmaktadır. Bu bağlanma şekli mikroRNA kompleksinin mRNA'ya komplementer olma durumuna göre değişiklik göstermektedir. 3'UTR bölgesine bağlanma tam olmayan, kusurlu, eksik komplementerliği içermekte ve translasyonun



baskılanması ile sonuçlanmaktadır. ORF bölgesi içine bağlanma ise kusursuz, tam komplementerliği göstermektedir. Daha sonra Argonaute2 (Ago2) tarafından mRNA'nın yıkımı ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca, mikroRNA'ların her birinin birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebileceği ve mRNA'ların her birinin de birden fazla mikroRNA tarafından hedeflenebildiği bilinmektedir (Şekil 13).



Şekil 13. Hedef mRNA yıkımı [58].

### 2.7.1. BH salgılanması üzerine etkisi olan miRNA'lar

Bazı miRNA'ların endokrin ile ilişkili fonksiyonlarla düzenlendiği gösterilmektedir. Kromozom 19 üzerinde yer alan miRNA-27a'nın (miR-27a), kansinlarda inhibitin hedefleyerek onkojenik bir işlevi olduğu gösterilmiştir. miR-27a mitojen aktif protein kinaz kinaz 4'ün (MAP2K4) hedeflenmesi yoluyla, insan osteosarkom hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu teşvik etmiştir. Bununla birlikte, sınırlı çalışmalar miR-27a'nın meme kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileriyle ilgili olup, hiçbiri spesifik mekanizmadan bahsetmemektedir. miR27-a belirli proinflamatuvar sitokinlerin üretimini etkilemektedir [59]. Antineoplastik bir faktör olarak miRNA-27a, glioma hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve invazyon yeteneğini etkilemek için Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağını inhibe etmiştir. miR-27a çeşitli hastalıklarda hücre farklılaşmasını düzenlemede rol almaktadır. Çalışmalar miR-27a'nın miyofibroblast, embriyonik kök hücre (ESC), adiposit, osteoblast,

myoblast, meme kanseri hücreleri ve eritroid gibi çeşitli hücrelerde kritik bir farklılaşma düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir [60]. Glutasyon metabolizmasında, üre döngüsü ve poliamin biyosentezinde miRNA 27a'nın önemli olduğu bildirilmiştir. Cüce fare karaciğerindeki poliamin sentezinin miR-27a yoluyla transkripsiyon sonrası baskılandığı gösterilmiştir. Ayrıca miR27a'nın ekspresyonu, BH eksikliği olan farelerde artmış ve ODC seviyesi azalmıştır. Literatür bilgisi kapsamında BH tedavisi ile kişilerin serumlarında miR-2861, miR-663, miR-3152, miR-3185 anlatımlarının azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca miR-145 anlatımının GH salınımı yapan hipofiz adenoma hücrelerinin normal hipofize kıyasla anlatımında azalma olduğu ve miRNA'nın cluster analizlerine göre fos, myc, cyclin D2, MAPK, insülin substrat-1 genlerinin anlatımı üzerinde de etkisi olduğu gösterilmiştir. miR-16, miR-129-5p, miR-142-3p ve miR-202 miRNA'larının miRNA tarafından BH bağlandığı BHR'nin anlatımının engellendiğine ilişkin miRNA'lar olduğu tespit edilmiştir. BH tedavisi sırasında BHE sendromlu hastaların kas hücrelerinde miR-29a anlatımının irdelenmesi hedeflenmiştir [61].

## **2.8. POLİAMİN**

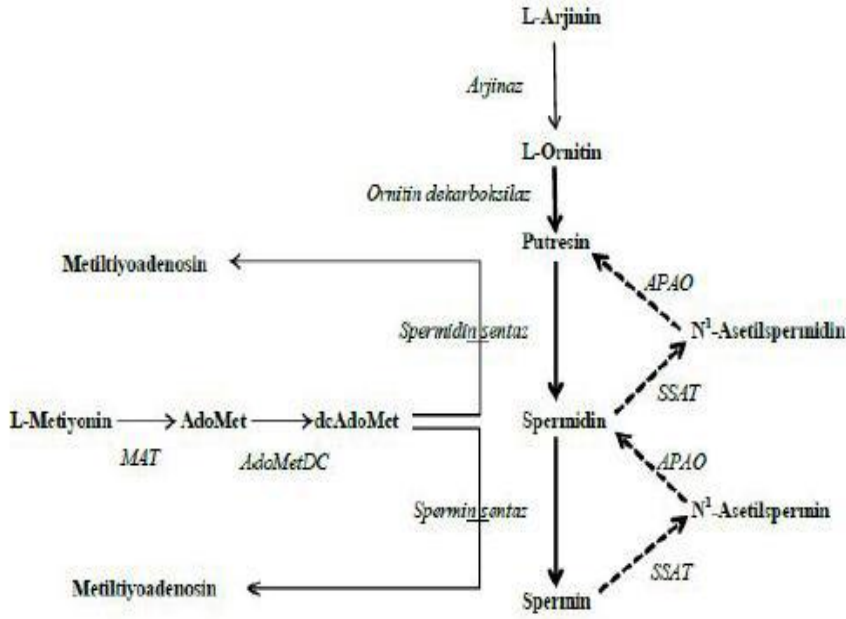
Poliaminler küçük organik polikatyonik moleküller olup normal ökaryotik hücrelerde büyüme ve gelişimde görev almaktadır. Bakterilerde, ökaryotlarda ve arkeada bulunan çeşitli poliaminlerin fizyolojik pH'da pozitif yüklü olmaları ortak özelliklerindedir [62]. Poliaminler putresin, spermidin ve sperminden oluşmaktadırlar, kation olduklarından dolayı DNA, fosfolipitler, spesifik protein türleri, ATP ve özellikle RNA ile etkileşime girmektedirler [63]. Poliamin konsantrasyonu hücresel transport mekanizması ile regüle edilmekle birlikte poliaminler intestinal flora ve katabolik reaksiyonlar üzerinden diyet ile alınabilir veya hücreden dışarı atılabilmektedir [64]. Yüksek düzeyde intraselüler poliamin konsantrasyonu çeşitli kanser türleriyle olduğu gibi meme kanseri ile de ilişkilendirilmektedir. Poliamin sentez veya katabolik reaksiyonlarında görevli enzimlerin düzeyi bu aşamada önem teşkil etmektedir. Memelilerde poliaminler direkt olarak hücre büyümesine, farklılaşmasına ve hücre sağ kalım, hücre döngüsü gibi pek çok hücresel fonksiyon üzerinde etkisi bilinmektedir. PA'lerin fonksiyonel özellikleri PA'lerin yapısından kaynaklı negatif yüklü makromoleküllerle geri dönüşümlü olarak iyonik interaksiyonuna dayanmaktadır. Nükleik asitlerle interaksiyonunda kromatin konformasyonu ve gen anlatımı üzerine;

proteinler ve membran fosfolipidlerle interaksiyonunda ise iyon kanallarının regülasyonu ve membran bütünlüğünün stabilizasyonu üzerine etki etmektedir.

Poliamin biyosentezinde görevli iki önemli enzim bulunmaktadır. Put sentezinde görevli ornitin dekarboksilaz (ODC), A-adenozil-L-metionin (AdoMet) dekarboksilasyonu ile dekarboksile S-adenozil-L-metionin (DcAdoMet) sentezinde görevli S-adenozil-L-metionin dekarboksilaz (AdoMetDc) enzimidir [65]. Poliamin katabolizmasında görevli önemli enzimler ise spermidin/spermin N-asetil transferaz (SSAT), poliamin oksidaz (PAO) ve spermin oksidaz (SMO)'dır.

### **2.8.1. Poliamin Anabolizması**

Mitokondriyal arjinaz enzimi arjininden ornitin sentezini katalizlemektedir (Şekil 14). Memeli hücrelerindeki üç önemli poliamin sentezi ornitinden başlayarak gerçekleşmektedir. Ornitin dekarboksilaz (ODC) enzimi aracılığıyla gerçekleşen ornitinden putresin sentezi ilk aşama olup, ornitin dekarboksilasyona ODC enzimi yardımıyla uğramaktadır. Bu aşamayı “S-adenozilmetiyonin”in (SAM), SAM dekarboksilaz etkisiyle “dekarboksile S-adenozilmetiyonin”e (DAM) dönüşümü takip etmektedir. DAM, spermidin sentaz aracılığıyla putresini spermidine dönüştürmektedir. İkinci DAM eklenmesiyle, spermin sentaz spermidinden spermin oluşturmaktadır. Bu şekilde, putresinden spermidin ve spermidinden spermin sentezi gerçekleşmektedir. ODC enziminin regülasyonu antizim (AZ) olarak adlandırılan enzim tarafından gerçekleştirilmektedir. AZ, ODC ile direkt etkileşime girerek inhibisyonunu sağlamaktadır. AZ seviyeleri artan hücre içi poliamin konsantrasyonları ile artmaktadır. Bunun yanı sıra AZ enzimi de antizim inhibitörü (AZI) tarafından regüle edilmektedir [65]. AZI, ODC/AZ heterodimerleri oluşturarak enzimatik olarak aktif ODC homodimerlerini bozmaktadır. AZ'nin bilinen fonksiyonu ve ODC döngüsündeki rolü ile etkileşime girmesi, poliamin konsantrasyonlarındaki değişimlere cevap vermesine neden olmaktadır. Bu yüzden ODC seviyelerini kontrol etmek için OAZ1 varlığının gerekli olduğu sonucuna varılmıştır. Poliaminler OAZ1 ile mRNA'nın translasyonu sırasında ribozomal çerçeve kaymasını indüklemiştir [66].



**Şekil 14. Poliamin metabolizması.---katabolizma; biyosentez. dcAdoMet: dekarboksile S-adenosil-L-metiyonin; AdoMet: S-adenosil-L-metiyonin; MTA: Metilthyoadenosin; AdoMetDC:S Adenosil-L-metiyonin dekarboksilaz; MAT: Metiyoninadenosil transferaz; SSAT: Spermidin/spermin asetiltransferaz; APAO: Asetilpoliamin oksidaz [67].**

## 2.8.2. Poliamin Katabolizması

Spermidin ve sperminin yıkım reaksiyonları spermidin/spermin asetiltransferaz (SSAT) enzimi aracılığıyla gerçekleşmekte ve N-asetil-spermidin ile N-asetil-spermin meydana gelmektedir. Bunların daha ileri katabolik reaksiyonu hidrojen peroksit ve asetoamidopropanol oluşmasıyla poliamin oksidaz enzimi reaksiyonu sonucu putresin ve spermidinin açığa çıkması ile sonlanmaktadır. SSAT ve poliamin oksidaz (PAO) katabolik reaksiyonlarda önemli rol alan enzimlerdir. SSAT konsantrasyonunun tümörlü dokuda arttığı, PAO konsantrasyonunun ise azaldığı tespit edilmiştir. Poliaminler, PAO enzimi ile yüksek oranda apoptozu uyarıcı olarak bilinen hidrojen peroksit açığa çıkarılmaktadır. Dolayısıyla, PAO aktivitesi azaldığında tümör hücrelerinde apoptoz azalmıştır. Bundan faydalanılarak PAO aktivitesini uyarıcı ilaçların geliştirilme çalışmaları sürdürülmektedir. Hücrede poliamin seviyesi anabolizma (sentez), katabolizma (yıkım) ve aktarımın birlikte düzenlenmesiyle gerçekleştirilmiştir. SSAT spermine asetil grubu transfer ederek N-asetilspermini oluşturmaktadır. N-asetilsperminin PAO enzimi tarafından oksidasyonu gerçekleştirilmekte ve spermidin oluşturulmaktadır. Sperminden spermidin oluşumu SMO enzimi tarafından direkt olarak katalizlenebilmektedir. Spermidin SSAT enzimi

tarafından asetil grubu transfer edilmekte ve N-asetilspermidin meydana gelmektedir. PAO enzimi tarafından oksidasyonu gerçekleştirilerek putresin oluşturulmaktadır. N-asetilspermin ve N-asetilspermidin ile putresin direkt olarak membran transportırlar aracılığı ile hücreden atılabilmektedir. Tüm bu reaksiyonlar süresince PAO enziminin aktivite gösterdiği her oksidasyon basamağında ortaya hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) çıkışı gerçekleşmektedir. Aşırı  $H_2O_2$  çıkışı reaktif oksijen türlerini (ROS) arttırmakta ve kanser oluşumunu tetiklemektedir. Meme kanseri hastalarında yapılan çalışmalarda SMO, SSAT ve PAO enzim aktivitelerinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Özellikle kanser hücrelerinde katabolik enzimler tetiklenerek  $H_2O_2$  düzeyinin artışı ile apoptotik hücre ölümünün indüklenmesi hedeflenmektedir [68].



## **BÖLÜM III. MATERYAL VE METOT**

### **3.1. KULLANILAN MATERYALLER**

#### **3.1.1. Kullanılan Cihazlar**

Kullanılan cihazlar Ekler bölümünde Tablo 1’de sunulmuştur.

#### **3.1.2. Hücre Kültürü Donanımları**

Hücre kültüründe kullanılan donanımlar Ekler bölümünde Tablo 2’de sunulmuştur.

#### **3.1.3. Kullanılan Kimyasallar**

Çalışma sürecinde kullanılan kimyasal maddeler Ekler bölümünde Tablo 3’te sunulmuştur.

#### **3.1.4. Kullanılan Tamponlar**

##### **10X TBS**

87,6 gr NaCl, 12,11gr Tris-Baz 800 ml distile su ile çözündürülür. pH: 8 e ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml ‘e tamamlanır. Hazırlanan 10X TBS kullanılmak için; 500 µl 10X TBS, üzerine 500 ml hacimde olacak şekilde distile su eklenerek 1X TBS’e dönüştürülür.

##### **1X TBS-Tween**

1X TBS-Tween; 500 ml 10X TBS ve 500 µl Tween-20, 500 ml hacimde olacak şekilde üzerine distile su eklenerek hazırlanır.

##### **10X PBS**

80 gr NaCl, 2 gr KCl, 14.4 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.4 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 800 ml distile su ile çözündürülür. pH: 7,4 e ayarlandıktan sonra distile su ile 1000 ml ‘e tamamlanır. Hazırlanan 10X PBS kullanılmak için; 500 µl 10X PBS, üzerine 500 ml hacimde olacak şekilde distile su eklenerek 1X PBS’e dönüştürülür.

##### **Besiyeri Hazırlanması**

450 ml negatif besiyeri içerisine 50 ml FBS ve 5 ml Penisilin-Streptomisin (10,000 U/ml) eklenir. 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek 50 ml’lik falkonlara süzülür.

### **Protein Standardı (Bovine Serum Albumin = BSA)**

0,015 gr Albumin 10 ml distile suda çözdürülüp 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek süzülür.

### **Bradford Reagent**

100 mg Comassie Brilliant Blue (6-250) 50 ml %95 etanol de çözdürülür. 100 ml %85 Fosforik asit eklenir hepsi 1 litreye tamamlanır. Filter kağıdı ile süzülür.

### **Hücre Lizis Tamponu (CLB)**

100 µl Proteinaz inhibitörü 10 ml CLB içerisinde karıştırılır.

### **Harsh Strip Buffer**

200 ml %10'luk SDS, 125 ml Tris-HCl (pH=6,8), 8 ml β-merkaptan etanol üzerine 675 ml distile su eklenerek karıştırılır ve 1 litreye tamamlanır.

### **Mild Strip Buffer**

15 gr glisin, 1 gr SDS, 10 ml Tween-20 eklenerek 800 ml distile suda çözdürülür. pH 2,2'ye ayarlandıktan sonra distile suyla 1 litreye tamamlanır.

### **%10 Amonyum persulfat tamponu (APS)**

100 mg Ammonium persulfate 1 ml distile suda çözdürülür.

### **Kumarik asit (CA)**

0,15 gr P-Coumaric asit 10 ml DMSO'da çözdürülür.

### **Luminol**

0,44 gr Luminol 10 ml DMSO'da çözdürülür.

### **Yürütme tamponu**

30,3gr Tris-baz, 114 gr Glisin ve 1 gr SDS tartılarak 1000 ml distile su içinde çözdürülür. pH: 8.3 e ayarlanır. Hazırlanan 10X yürütme tamponu, 100 ml 10X yürütme tamponu ve 900 ml distile suyla 1000ml e tamamlanarak 1X'e dönüştürülür ve jel yürütmesi sırasında kullanılır.

### **Transfer Tamponu**

33,3 gr Tris-base ve 144 gr Glisin tartılarak 1000 ml distile su içinde çözdürülür. pH: 8.3 e ayarlanır. Hazırlanan 10X transfer tamponu, 100 ml 10X transfer tamponu, 150 ml

metanol ve 750 ml distile suyla 1000 ml e tamamlanarak 1X'e dönüştürülür ve jelin transferi sırasında kullanılır.

### **Yürütme Jelinin Hazırlanması**

Proteinleri ağırlıklarına göre ayırmak için %12' lik SDS poliakrilamid jelde yürütüldü. Jel içeriği Ekler bölümünde Tablo 4'te sunulmuştur.

### **Hücre Dondurma Medyasının Hazırlanması**

9 ml FBS ve 1 ml dimetilsülfoksit (DMSO) karıştırılır ve hücre kültürü ile uyumlu olan 0,22 µM por çapındaki filtrelerden geçirilerek dondurma medyası hazırlanmıştır. Dondurma medyasıyla hücreler uzun süreli sıvı azot tankları içinde saklanabilir.

### **LB Agar**

20 gr LB agar 1 litre suda çözündürülür ve otoklavlanır.

## **3.2. YÖNTEMLER**

### **3.2.1. Hücre Kültürü**

HEK293 hücreleri %10 sıgır fetus serumu ve 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotiği içeren MEM besiyeri içerisinde %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C etüvde inkübe edilmiştir. Hazırlanmış olan besiyeri 0,22 µM por çapındaki hücre kültürü ile uyumlu filtrelerden geçirilerek steril hale getirilip, besiyeri 50 ml'lik falkon tüplerde +4°C'de saklanmıştır.

Hücreler 25 ve 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü petrilerinde büyütülmüştür. Protein ve poliamin izolasyonu için 60 mm'lik, RNA izolasyonu ve hücre akış sitometresi için 6 kuyucuklu, floresan mikroskobu çalışmaları için 12 kuyucuklu hücre kültürü petrilerine ekimler gerçekleştirilmiştir. Hücreler belirlenen sürelerde hücre kültürü petrilerine yapışmaları için %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C etüvde inkübe edilmiştir.

Uygulanacak deneyler doğrultusunda hücre ekimleri veya petri kabı içerisindeki hücrelerin yoğunluğunun artması sonucunda hücre pasajlama işlemi için öncelikle ortamdan besiyeri uzaklaştırılmıştır. 75 mm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü petrisi 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandıktan sonra PBS uzaklaştırılır. Petri kabı içerisine 2 ml tripsin-EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) (%0,25) eklenerek CO<sub>2</sub> içeren etüvde 3 dakika boyunca bekletilmiştir. İnkübasyon sonunda hücrelerin zarar görmemesi için petri kabına 2 ml MEM besiyeri eklenerek tripsinin aktivitesi durdurulmuş ve hücreler santrifüj tüpüne alınmıştır. 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj işleminden sonra süpernatant



atılmış, hücrelerin üzerine 1ml taze besiyeri eklenmiştir. İyice pipetaj yapıp homojen bir hale gelen hücre süspansiyonu hücre sayımına hazırlanmış bulunmaktadır.

Hazırlanan hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak Neubauer hemositometresinin kanalına aktarılmış ve üzeri lamel ile kapatılmıştır. Hemositometre de 25 karede sayılan hücre sayısı, 1 ml'deki hücre sayısının bulunabilmesi için  $10^4$  ile çarpılmıştır.  $1,5 \times 10^6$  hücre, 75 cm<sup>2</sup>'lik petri kaplarına ekilerek hücrelerin pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.2. Hücre Dondurma**

Hücre dondurma işlemi için santrifüj işleminin tamamlanmasına kadar pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası atılan süpernatanttan sonra pellete 1 ml dondurma medyası (freezing medya) eklenip iyice pipetaj yapılmıştır. Elde edilen homojen süspansiyon etiketlenen kriyo tüplere eklenerek -80°C'de izopropanolde bekletilmiştir. Ardından hücre stokları sıvı azot tankına alınmıştır.

### **3.2.3. Stabil Hücre Hattı Eldesi**

Doğal tip ve A13S, ΔF166, T24A mutasyonları taşıyan BH geni içeren pcDNA3.1 vektörlerini içere plazmit -80 C stokları LB besiyerinde büyütülmüş ve seçilen kolonilerden plazmit izole edilmesini takiben, klonlama primerleri ile PCR yapılmıştır. 1.6 kb BH inserti içerdiği gösterilen plazmitler lipozomal ajan aracılı HEK293 hücrelerine verilmiş, 48 saat inkübasyonu takiben hücrelere neomisin ile 10-12 gün antibiyotik seçilimi yapılarak pozitif klonlar seçilmiş, sıvı azot stokları yapılarak saklanmıştır.

### **3.2.4. Plazmit İzolasyonu**

Plazmit izolasyonu QIAGEN'in QIAprep Spin Miniprep Kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bakteriden elde edilen pellete 250 µl Buffer P1 eklendikten sonra pipetaj yapıp yeni bir mikrofüj tüpüne aktarılmıştır. 250 µl Buffer P2 eklenerek eppendorf 4-6 kez alt-üst edilerek karıştırılmıştır. 350 µl Buffer N3 eklenerek eppendorf 4-6 kez alt-üst ederek karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 10 dakika 13.000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant QIAprep spin kolonuna pipet yardımıyla aktarılmıştır. 30-60 saniye 13.000 rpm'de santrifüj yapıp, alt tarafta kalan faz atılmıştır. QIAprep spin kolonuna 0,5 ml Buffer PB ile 30-60 saniye 13.000 rpm'de santrifüj yapılarak alt tarafta kalan faz atılmıştır. QIAprep spin kolonuna 0,75 ml Buffer PE ile 30-60 saniye

13.000 rpm'de santrifüj yapılarak alt tarafta kalan faz atılmıştır. Yıkama solüsyonundan iyice arındırmak için 1 dakika tekrar santrifüj yapılmıştır ve DNA'nın elde edilmesi için QIAprep spin kolonu yeni bir 1,5 ml'lik eppendorfa alınmıştır. QIAprep spin kolonunun tam ortasına 20-50 µl Buffer EB ya da su eklenip 1 dakika oda sıcaklığında bekledikten sonra 1 dakika 13.000 rpm'de santrifüj yapılmıştır ve bir gece +4°C'de çözünmesi için tutulmuştur. İzole edilen plazmit DNA'nın, UV-spektrofotometresinde konsantrasyonu ve saflığı ölçülmüştür. %0,8'lik agaroz jele 1, 2 µg izole edilen plazmitler yüklenmiştir.

### **3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Retriksiyon Enzim Kesimi**

Doğal tip ve mutant BH (A13S, ΔF166, T24A) geni içeren pcDNA3.1 plazmitleri kalıp olarak kullanılarak BH geni için kullanılan klonlama primerleri ile PZR gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri her bir mutasyon bölgesindeki kesim enzimi doğal tip BH gen dizisi ile kıyaslamalı olarak retriksiyon enzim kesimine tabi tutulmuştur.

### **3.2.6. Transfeksiyon**

Hücreler 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisi içerisine  $10 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin bir gece boyunca hücre kültürü petrisine yapışmaları beklenmiştir. İki ayrı mikrofüj tüpü içerisine 100 µl hacimde negatif MEM (FBS içermeyen) konulmuştur. Transfeksiyon oranı 1:3 ve 1:6 olacak şekilde GH-pcDNA3.1 plazmiti lipozomal ajan olan FuGENE transfeksiyon ajanı kullanılmıştır. İki ayrı mikrofüj tüpüne hazırlanan plazmit ve transfeksiyon ajanı 5 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında iki mikrofüj tüpü birleştirilerek 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda bir gece önceden ekimi gerçekleştirilmiş olan hücreler üzerine hazırlanan süspansiyon damla damla olacak şekilde verilmiştir. Transfeksiyondan sonraki inkübasyon süresi 24 ve 48 saat olarak gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben 10-12 gün boyunca artan konsantrasyonlarda (0-1000 ng/ml) Neomisin uygulaması gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.7. Total RNA İzolasyonu**

RNA izolasyonu Trizol yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. BH ve 18S rRNA genlerinin transkripsiyonel anlatımlarının irdelenmesi için doğal tip BH ve BH T-24A, A13S ve ΔF166 HEK293 hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine  $3 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekilmiştir. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklendikten sonra direkt total RNA Trizol ajanı ile gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler kazıyıcı

yardımıyla kaldırılarak, hücre pelletine 1 ml trizol ajanı eklenip pipetaj yapılmıştır. 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 1 ml trizol ajanı için 200 µl kloroform eklenerek eppendorf alt üst edilmiştir. Örnekler 12.000 g +4°C'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Üst sıvı faz yeni 1.5'luk eppendorfa alınarak üzerine 500 µl izopropanol eklenip tüp alt-üst edildikten sonra oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiştir. Örnekler 12.000 xg +4 °C'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra üst faz atılıp üzerine 1 ml %75 etanol eklenmiştir. Örnekler 7500xg +4°C'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant atılıp tüpler 5-10 dakika kurumaya bırakılmıştır. 20-50 µl RNase free water eklenip 55-60°C'de 10-15 dakika inkübe edilmiştir. İzole edilen RNA'lar %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendikten sonra iScript cDNA sentez kiti kullanılarak cDNA'ya çevrilmiştir.

### **3.2.8. GH Eliza**

HEK293, BH+, T-24A, A13S ve ΔF166 hücre hatlarında GH salınımını belirlemek amacıyla ELİZA tekniği (ab190811-Growth Hormone (GH) Human SimpleStep ELIZA kit, Abcam) kullanılmıştır. HEK293, BH+, T-24A, A13S ve ΔF166 hücreleri  $7 \times 10^5$  hücre olacak şekilde 60 mm'lik hücre kültürü petrisine ekim işlemi yapılmıştır. Bir gece boyunca hücrelerin yapışması beklenmiştir. 24 saat inkübasyondan sonra besiyerleri alınarak ultrasantrifüj tüpünden (Amicon 10K Ultra-15 Centrifugal Filter Units) geçirildikten sonra elde edilen 200 µl hacminde örnek kullanılmıştır. GH antikoru immobilize edilmiş 96 kuyucuklu petri kabı içerisine sırasıyla 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9 pg/mL olacak şekilde standartlar ve 50 µl örnek eklendikten sonra 50 µl antikor kokteyl eklenerek 400 rpm'de oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 3 kez yıkama tamponu solüsyonuyla her bir kuyu yıkanmıştır. Yıkama sonrasında her bir kuyuya 100 µl TMB substrat solüsyonu eklenmiştir ve 10 dakika karanlıkta 400 rpm'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda substrat solüsyonu üzerine STOP solüsyonu eklendikten sonra 1 dakika boyunca 400 rpm'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 450 nm OD değerleri ölçülmüştür. Böylece konsantrasyonu bilinen standart değerlerinin absorbans değerleriyle birlikte konsantrasyon/absorbans grafiği oluşturulmuştur. Bu grafiğin eğim eşitliği kullanılarak absorbans değerleri bilinen örneklerin konsantrasyonları hesaplanmıştır.

### 3.2.9. İmmunofloresan

HEK293, BH+, T-24A, A13S ve  $\Delta$ F166 hücreleri 35 mm'lik petrilere  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelerin medyası atılmıştır ve 3 kere 1xPBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Hücrelerin üzerine 1 ml soğuk metanol eklenip 10 dakika inkübe edilmiştir. Metanol atılıp kurumaya bırakılmıştır. Hücrelere 3 kere 1xPBS ile yıkama işlemi uygulanmıştır. 1 ml Triton X-100 solüsyonu eklenip 10 dakika bekletilmiş ve tekrardan 3 kere 1xPBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerden 1xPBS uzaklaştırılıp 3 kere 500  $\mu$ l PBB solüsyonu ile yıkama işlemi yapılmıştır. PBB solüsyonu uzaklaştırılıp 1 ml block solüsyonu ile oda sıcaklığında 10-15 rpm'de çalkalayıcıda 45-60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 3 kere 500  $\mu$ l PBB solüsyonu ile yıkama işlemi yapılmıştır. Hazırlanan primer petrinin üzerini kaplayacak şekilde eklenip petrinin üzeri gergin bir şekilde ıslak filtre kağıdı ile kapatılıp üzeri folyo ile kaplanmıştır ve  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10-15 rpm çalkalayıcıda gece boyu inkübe edilmiştir. 3 kere 500  $\mu$ l PBB solüsyonu ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan sekonder petrinin üzerini kaplayacak şekilde eklenip petrinin üzeri gergin bir şekilde ıslak filtre kağıdı ile kapatılıp üzeri folyo ile kaplanmıştır ve  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10-15 rpm çalkalayıcıda 60-90 dakika inkübe edilmiştir. 3 kere 500  $\mu$ l PBB solüsyonu ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. PBB solüsyonu içerisine DAPI hazırlanıp petrideki hücrelere uygulanarak 10-15 rpm çalkalayıcıda 15 dakika inkübe edildikten sonra floresan mikroskopunda çekim işlemleri yapılmıştır. Çekim bitişi sonrası petri içerisine 1 ml PBS solüsyonu eklenip üzeri gergin bir şekilde ıslak filtre kağıdı ile kapatılıp üzeri folyo ile kaplanmıştır ve  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de kullanım ihtiyacına kadar depolanmıştır.

### 3.2.10. pGL-STAT5 Plazmit Aracılı Lusiferaz Deneyi

HEK293, BH+, T-24A, A13S ve  $\Delta$ F166 hücreleri BH protein anlatımının biyolojik aktivitesinin belirlenmesi için STAT-5 bağlanma bölgesi içeren lusiferaz pGL plazmiti (Danışman hocanın doktora tezinde kullanılmıştır) Fugene HD lipozomal ajan yardımı ile 1:3 oranında transfekte edilmiştir. 48 saat transfeksiyonu takiben hücreler luciferase Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega; E1910) kitindeki 1X hücre özütleme tamponu ile muamele edilmiştir. Luminol ajan ile muamele edilen hücreler Fluoro/LuminoScan cihazı yardımı ile luminometrik ölçüm gerçekleştirilmiştir. BH anlatımı yapmayan HEK293 hücrelerine kıyasla doğal tip (BH+) ve T-24A, A13S,

$\Delta$ F166 hücrelerindeki lusiferaz ışınması bağıl olarak hesaplanmış ve grafik çizilerek kıyaslamalı BH biyolojik aktivitesi üzerinde mutasyonların etkisi irdelenmiştir.

### **3.2.11. MTT Hücre Canlılığının Belirlenmesi**

HEK293, BH+, T-24A, A13S ve  $\Delta$ F166 hücreleri 96 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda  $1 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve 24 saat boyunca hücrelerin yapışması için inkübe edilmiştir. Her kuyucuğa 10  $\mu$ l MTT ayıracı eklenerek hücreler 4 saat boyunca etüvde bekletilmiştir. MTT (Metiltiazol difeniltetrazolyum bromür) eklenmiş olan besiyeri çekildikten sonra her kuyucuğa 100  $\mu$ l olacak şekilde DMSO eklenmiştir. Karanlıkta 5 dakika bekletilmiştir. Mikroplaka ELIZA okuyucuda, ikili dalga boyunda 570 nm ve 655 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır.

### **3.2.12. Hücre Sağ Kalım Analizi**

HEK293, BH+, T-24A, A13S ve  $\Delta$ F166 hücrelerinde sağkalım analizi yapılmıştır. 6 kuyucuklu petrinin her kuyucuğunda  $5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve hücrelerin yapışması için 37°C de bir gece inkübe edilmiştir. Hücreler 24, 48 ve 72 saat sonunda tripsin ile toplanarak 2000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj ile çöktürülmüştür. Elde edilen hücre süspansiyonundan 50  $\mu$ l alınarak ve 50  $\mu$ l Tripan mavisi boyası ile karıştırılarak hemositometre yardımı ile hücre sayımı yapılmıştır.

### **3.2.13. Floresans Boyamalar**

#### **3.2.13.1. MitoTracker Boyama**

HEK293, BH+, T-24A, A13S ve  $\Delta$ F166 hücrelerinin zamana bağlı BH anlatım profiline göre hücre canlılığı ve hücre büyümesi üzerine etkisinin belirlenmesi için mitotracker boyaması gerçekleştirilmiştir. 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisine  $50 \times 10^3$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24-48 saat inkübasyonu sonrası her bir kuyucuğa 100 nM mitoTracker (ana stok: 1 mM) 15 dakika boyunca uygulanarak floresan mikroskopunda yeşil filtre ile görüntüler çekilmiştir.

#### **3.2.13.2. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama**

HEK293, BH+, T-24A, A13S ve  $\Delta$ F166 hücrelerinde apoptotik hücre ölümü üzerine etkisini belirlemek amacıyla DAPI boyama gerçekleştirilmiştir. İnkübasyonu takiben her bir kuyucuğa 1  $\mu$ l/ml DAPI boyası 15 dakika uygulanmıştır.

### 3.2.13.3. 3,3' Diheksiloksakarbosiyenin İyodür (DiOC6) Boyama

HEK293, BH+, T-24A, A13S ve ΔF166 hücre canlılığı üzerine etkisini belirlemek amacıyla DiOC6 boyama gerçekleştirilmiştir. 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisine  $50 \times 10^3$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 1 nM DiOC6 (ana stok: 4 mM) 15 dakika boyunca uygulanarak floresan mikroskopunda mavi filtre ile çekilerek canlı hücreler belirlenmiştir.

### 3.2.13.4. Revers Transkriptaz PZR (RT-PZR) Analizleri

cDNA'ların spektral analizleri yapıldıktan sonra aşağıdaki genlere ait primerler ve 18S rRNA PZR primerleri ile ExPrime Taq Polimeraz kullanılarak PZR gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra transluminatörde BH mRNA profilleri görüntülenmiştir. RT-PZR analizi için kullanılan primerlerin dizileri ve optimum bağlanma sıcaklıkları Tablo 5'de verilmiştir.

**Tablo 4:** RT-PCR'da kullanılan primerlerin optimum bağlanma sıcaklıkları. Forward: F, Reverse: R

Primer	Primer Dizileri	Bağlanma Sıcaklığı (°C)
MMP-9	F:GCGGAGATTGGGAACCAGCTGTA R:GACGCGCCTGTGTACACCCACA	65
MMP-2	F: GGCTGGTCAGTGGCTTGGGGTA R: AGATCTTCTTCTTCAAGGACCGTT	51
TIMP-1	F: ACCATGGCCCCCTTTGAGCCCCTG R: TCAGGCTATCTGGGACCGCAGGGA	65
VEGF	F: ATTGGAGCCTTGCCTTGCTG R: CACGTCTGCGGATCTTGTAC	65
ODC	F: GCTCTTCCCCGTGTTACTCC R: GGCAATCCGCAAACCAACTT	55
GH	F:CCGACACCCTCCAACAGGGA R:CCTTGTCCATGTCCCTTCCTG	65
18S	F: CTACCACATCCAAGGAAGGCA R: TTTTTCGTCACCTACCTCCCG	55

### **3.2.14. Yarı Yumuşak Agar Yöntemi**

HEK293, BH+, T-24A, A13S ve  $\Delta$ F166 hücrelerinde 3 boyutlu ortam içerisinde koloni oluşumu üzerine etkisini belirlemek amacıyla yarı yumuşak agar tekniği kullanılmıştır. 6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine %0,5'lik agar ve %20 FBS içeren besiyeri 1:1 oranda hazırlanarak dökülmüştür. Agar donduktan sonra  $3 \times 10^4$  hücre, % 0,3'lük agar ve medya ile alt agarın üzerine ekim yapılmıştır. 10-15 gün inkübasyon sonrasında koloni çapları ışık mikroskobu ve DiOC6 boyama ile belirlenmiştir.

### **3.2.15. Koloni Oluşumunun Kristal Viyole ile Gösterilmesi**

6 kuyucuklu hücre kültürü petrisine  $5 \times 10^3$  hücre olacak şekilde doğal tip BH ile mutant BH (T-24A, A13S ve  $\Delta$ F166) stabil anlatımı yapan HEK23 hücreleri ekilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir kuyucukta bulunan besiyeri normal besiyeri ile değiştirilmiştir. Hücreler 10-15 gün boyunca büyümeye bırakıldıktan sonra 1X PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. 3 ml %100 metanol, 1 ml asetik asit ile 5 dakika inkübe edilmiştir. Kristal viole yüzeyi saracak miktarda eklenip 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 20 dakika sonunda distile su ile yıkanarak boya uzaklaştırılmıştır.

### **3.2.16. miRNA İzolasyonu ve qRT-PZR**

miRNA izolasyonu QIAGEN'in miRNeasy Mini Kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Doğal tip BH ile mutant BH (T-24A, A13S ve  $\Delta$ F166) anlatımı yapan HEK293 hücreleri 60 mm'lik petrilere  $1 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücreler 1X PBS ile kazıma işlemi yapıp petriden toplanarak 2 dakika 13200 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirilerek çöktürülmüştür. Bu işlem petrideki tüm hücreler toplanıp çöktürülene kadar tekrarlanmıştır. Çöken hücrelere 700  $\mu$ l QIAzol Lizis reagent eklenip pipetaj yapılarak hücreler homojenize hale getirilmiştir. Oda sıcaklığında (15-25°C) 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 140  $\mu$ l kloroform eklenerek 15 saniye tüpler alt üst edilerek faz oluşumu sağlanmıştır ve 2- 3 dakika oda sıcaklığında (15-25°C) inkübe edilmiştir. 15 dakika 12000xg 4 °C'de santrifüj edilerek üst faz yeni 1,5 ml'lik eppendorfa alınmıştır. Üst faz üzerine 525  $\mu$ l %100 etanol eklenerek pipetaj yapılmıştır. RNeasy Mini 2 ml'lik tüplere alınarak 8000xg 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Alt faz atılarak RNeasy mini tüplerin içerisine 700  $\mu$ l RWT solüsyonu eklenerek 15 saniye 8000xg'de santrifüj edilmiştir. Alt faz dökülerek

tüplere 500 µl RPE solüsyonu eklenmiştir ve 15 saniye 8000xg'de santrifüj edilmiştir. Bu adım tekrarlanarak tüpler 8000xg 2 dakika santrifüj edilmiştir. RNeasy mini tüpler yeni 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılmıştır. 30 µl RNase-free water eklenerek 8000xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. İzole edilen miRNA'ların konsantrasyonu nanodropta ölçülmüş ve Qiagen RT-PZR kit aracılığı ile U6 RNA universal primer ile qRT-PZR gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.17. miRNA cDNA Dönüştürülmesi**

miRNA'lar miScript II RT Kiti kullanılarak cDNA'ya çevrilmiştir.

### **3.2.18. Protein İzolasyonu**

Doğal tip BH ile mutant BH (T-24A, A13S ve ΔF166) anlatımı yapan HEK293 hücreleri 60 mm' lik petrilere  $1 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücreler 1X PBS ile kazıma işlemi yapılarak petriden toplanarak 2 dakika 13200 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirilerek çöktürülmüştür. Bu işlem petrideki tüm hücreler toplanıp çöktürülene kadar tekrarlanmıştır. Santrifüj ile çökmesi sağlanan hücrelere lizis tamponu ilave edilmiştir. Örneklerin oda sıcaklığında çalkalayıcıda 15 dakika boyunca inkübasyonu gerçekleştirildikten sonra 15 dk 16000 rpm' de +4 °C' de santrifüj yapılmış, üst faz yeni eppendorf tüpüne alınarak -80 °C' de muhafaza edilmiştir.

### **3.2.19. Bradford Protein Miktar Tayini**

İzole edilen proteinlerin miktarı Bradford yöntemi ile belirlenmiştir. 1,5 µg/ml konsantrasyona sahip Bovine Serum Albumin (BSA), artan miktarlarda kullanılarak standart eğri oluşturulmuştur. 96 kuyucuklu petrilere kullanılarak her örnekten 1 µl konulmuş, üzerine 200 µl Bradford solüsyonu ilave edilmiş ve 5 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Örnekler mikropilaya okuyucuda 595 nm' de okunmuştur. Çıkan absorbans değerleri kullanarak protein konsantrasyonları belirlenmiştir.



### **3.2.20. İmmunoblotlama Yöntemi**

#### **Proteinlerin Hazırlanması ve SDS-PAGE'de Yürütülmesi**

İmmunoblotlama yöntemi için 50 µg protein ile Laemli tamponu (5X) 1:4 oranda karıştırılarak 95°C'de 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. %4 yükleme ve %12-%15'lik ayırma SDS-PAGE hazırlanarak, sistemde ilk kuyuda protein belirteci olacak şekilde proteinler jele yüklenmiştir. Jel yürütme tamponu içerisinde yaklaşık 3 saat boyunca 70-80 V'de yürütülmüştür.

#### **Membrana Transfer ve Bloklama**

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra yükleme jeli kesilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır. Ayırma jeli büyüklüğünde poliviniliden florid (PVDF) membran metanol ile aktif hale getirildikten sonra jelin altına koyulmuştur. Membranın altına ve jelin üstüne transfer tamponu ile ıslatılmış filtre kağıtları olacak şekilde hazırlanan bu sistem transfer kasetine yerleştirilmiştir. 2,5 miliamper, 25 voltta transferler gerçekleştirilmiştir. Büyük kilodalton proteinler 5-9 dakika arası, küçük kilodalton proteinler ise 2,5-4 dakika arasında olacak şekilde transferler yapılmıştır. Transfer işlemi sonunda membranlar %5'lik yağsız süt (%0,1 Tween20 içeren 1X TBS) içerisinde 2 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilerek bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir.

#### **Primer ve Sekonder Antikor İşaretlemeleri ve Bantların Görüntülenmesi**

Süt tozu içerisinde alınan membranlar, 1X TBS-Tween ile 5 dakika olmak üzere 3 kez yıkandıktan sonra, primer antikorlarla gece boyu +4°C sıcaklıkta bekletilmişlerdir. Birincil antikorlar %5'lik yağsız süt tozu (%0,1 Tween20 içeren 1X TBS) içinde aşağıda belirlenen dilüsyonlarda uygulanmışlardır: β-aktin, STAT1, STAT3, STAT5 (Try694), N-kaderin, E-kaderin, Snail, Slug, Vimentin, Bcl-2, β-katenin, c-Jun, p-c-Jun, c-Myc, JNK, p-JNK, GAPDH (CST, poliklonal anti tavşan). Her bir antikor super block T-20 çözeltisi ile (Pierce) 1:250-1:1000 aralığında çalışılmıştır. HRP-konjuge sekonder antikorlar 1:3000 aralığında çalışılmıştır (CST).

Primer antikorların uygulanmasını takiben membranlar 10'ar dakika boyunca oda sıcaklığında 3 kez TBS-Tween ile yıkanmıştır. Yıkama sonunda, membranlar anti-tavşan ve anti-fare ikincil antikorlar (1:3000) ile gece boyu +4°C sıcaklıkta bekletilmiştir. İkincil antikor uygulamasının ardından, 10'ar dakikalık 3 TBS-Tween ve 5 dakikalık TBS yıkaması sonrasında, örnekler kemiluminisans tampon (A ve B çözeltilerinin 1:1 karışımı) ile 2 dakika muamele edilmiştir. Membranlar

kemiluminisans tamponu ile bekletildikten sonra, transluminatör aletinde görüntülenmiştir.

### **3.2.21. Poliamin Miktarlarının Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Tayini**

Doğal tip BH ile mutant BH (T-24A, A13S ve  $\Delta$ F166) anlatımı yapan HEK293 hücreleri 60 mm' lik petrilere  $1 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelerin medyası atılarak 2 kez 1xPBS ile yıkama yapıp hücrelerin örneğe uygun santrifüj yapılarak çöktürülmesi ile hücre pelleti elde edilmiştir. Pelletin üzerine 1 ml 1xPBS koyularak homojenizasyon gerçekleştirilmiştir. 100  $\mu$ l TCA (trikloroasetik asit) eklenip tüp alt-üst edilmiştir. 13200 rpm'de 20 dakika santrifüj gerçekleştirilmiştir. Üst faz yeni eppendorfa alınarak 500  $\mu$ l'si cam tüplere aktarılmıştır. Her örneğin üzerine 1 ml 2M NaOH çözeltisi eklendikten sonra örneği dağıtmadan üst kısmına 10  $\mu$ l Benzoil klorid eklenmiştir. Tamamen şeffaf olana kadar 3-5 dakika vorteks ile karıştırılması takiben 20-30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Örneklerin üzerine 2 ml 5 M NaCl eklendikten sonra 2 ml dietileter eklenmiştir. Örnekler yeterince karışana kadar 1-2 dakika vortekslendikten sonra üst faz 1 ml olacak şekilde HPLC tüplerine aktarılmıştır. Oda ısısında gece boyu çeker ocakta dietileterin uçması için bırakılmıştır ve örneklerin üzerlerine 200  $\mu$ l %60 metanol eklenerek HPLC cihazında yürütülmüştür.

### **3.2.22. Anti-miR-27a Transfeksiyonu**

HEK293, BH+, T-24A, A13S ve  $\Delta$ F166 hücreleri 60 mm' lik petrilere  $1 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin bir gece boyunca yapışması beklendikten sonra hiperfect ajanı ile 50 nM anti-miR27a ve miRNA mimic transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.23. İstatistiksel Analiz**

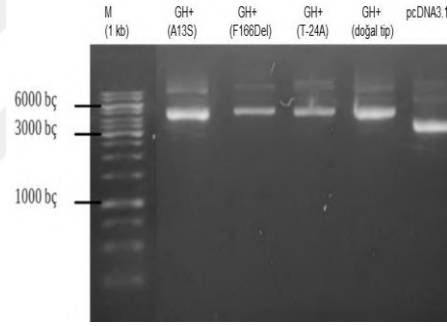
Tüm tez boyunca gerçekleştirilen MTT hücre canlılık testi, asılı damla modeli analizi, HPLC ile PA analizi, qRT-PCR ile miRNA profil belirleme gibi deneylerden elde edilen sayısal veriler GraphPad Prism 6 kullanılarak grafik haline dönüştürülmüş ve istatistiksel olarak analizleri bu program sayesinde gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analiz olarak İki yönlü ANOVA Bonforreni testi kullanılarak analiz sonuçları gerçekleştirilmiş ve istatistiksel olarak anlamlılık değeri olarak "p değeri" kullanılmıştır. p değerleri sırasıyla \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  olarak

verilmiştir. MTT hücre canlılığı analizi üç kez, asılı damla modeli ve yarı akışkan agar deneyi ise iki kez tekrarlanan deney ortalamasına göre belirlenmiştir. Tüm immünoablota sonuçları en az iki kez tekrarlanmış ve bant yoğunluklarını hesaplamak için Image J programı uygulanmıştır.



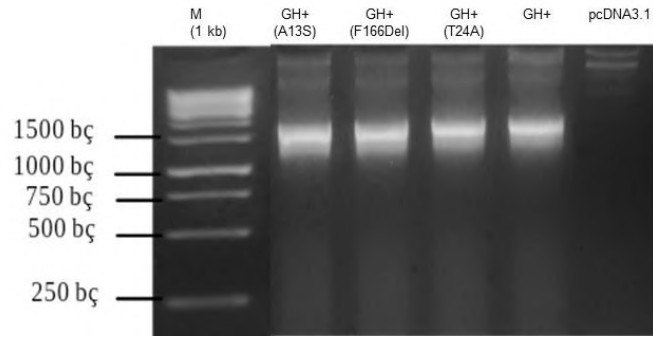
## BÖLÜM IV. SONUÇLAR

İBHE sendromlu çocuklarda tespit edilen BH genindeki mutasyonlardan A13S,  $\Delta$ F166 ve T24A amino asit dönüşümlerini içeren BH geni insert edilmiş pcDNA3.1 plazmitleri (Danışmanın Doktora tezi esnasında klonlanmıştır) içeren *E.coli* HB101 transformantları -80 C'den açılmış, 5 ml LB ortamında büyütülmüş ve alkali lizis ile plazmit izole edilmiştir. 5428 bç büyüklüğündeki boş pcDNA3.1 plazmit ve 1.5 kb uzunluğundaki doğal tip BH ile mutant BH (T-24A, A13S ve  $\Delta$ F166) geni içeren plazmitler 6955 bç uzunluğunda olarak %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Böylece -80 C açılan bakterilerden izole edilen boş vektör ve doğal tip BH ile mutant BH (T-24A, A13S ve  $\Delta$ F166) geni içeren pcDNA3.1 plazmitlerinin BH gen insert uzunluğuna bağlı olarak varlıkları gösterilmiştir (Şekil 15).



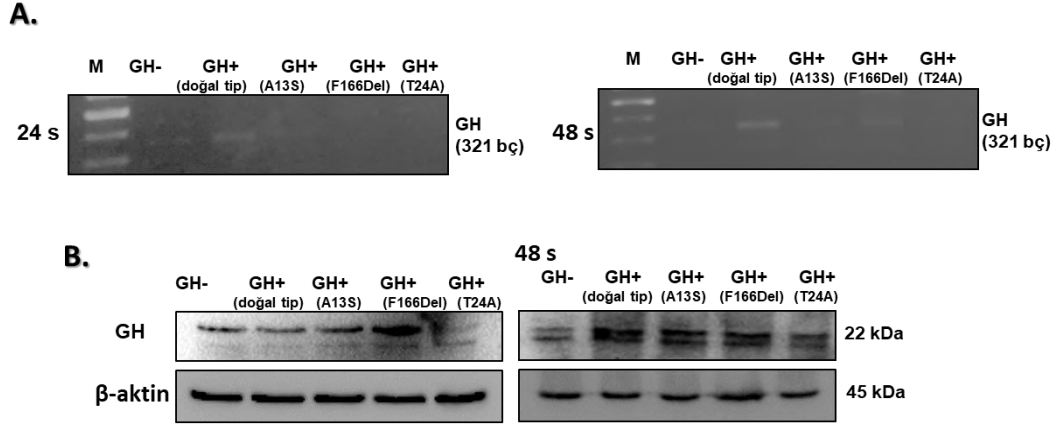
Şekil 15. BH A13S,  $\Delta$ F166, T24A ve doğal tip GH geni içeren pcDNA3.1 plazmitleri ile pcDNA3.1 boş vektörün agaroz jelde görüntülenmesi.

Doğal tip BH ile mutant BH (T-24A, A13S ve  $\Delta$ F166) geni içeren pcDNA3.1 plazmitlerinin BH gen inserti girdiği agaroz jelde uzunluğa bağlı gösterilmesini takiben, BH gen klonlama primerler ile PZR gerçekleştirilmiştir. PZR örnekleri %2'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra görüntülenmiştir. Agaroz jel görüntüsüne göre doğal tip BH ile mutant BH (T-24A, A13S ve  $\Delta$ F166) geni içeren pcDNA3.1 plazmitlerinde 1.6 kb BH gen insertinin olduğu gösterilmiştir. Negatif kontrol olarak ön görülen pcDNA3.1 plazmitinde BH gen inserti olmadığı için herhangi bant profiline rastlanılmamıştır (Şekil 16).



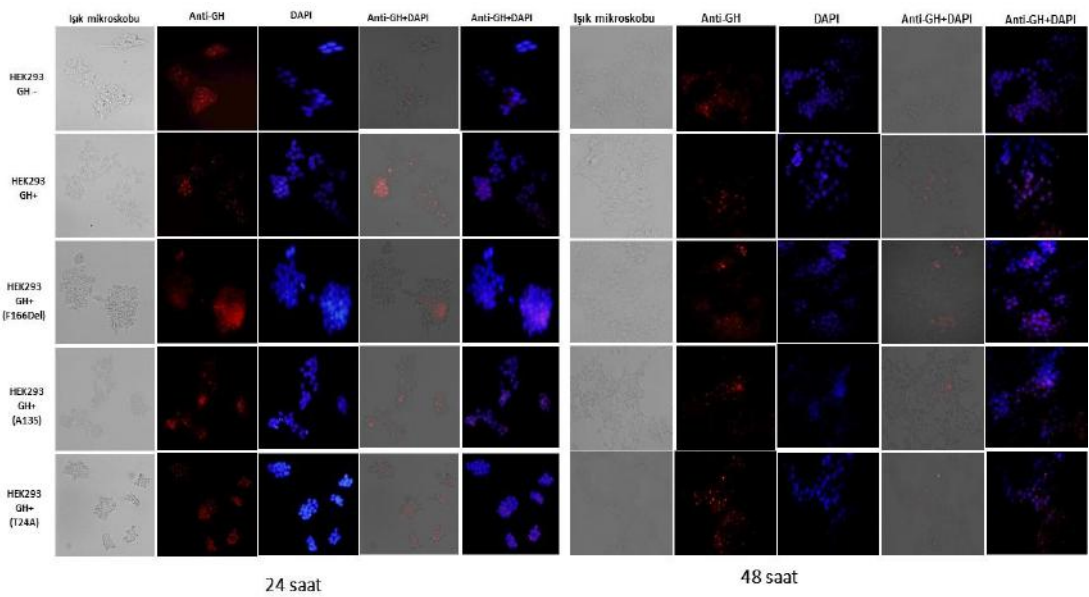
**Şekil 16. BH genin BH A13S,  $\Delta$ F166, T24A ve doğal tip BH geni içeren pcDNA3.1 plazmitlerindeki PCR sonucu.**

Yukarıda BH gen insert aldığı gösterilen plazmitler HEK293 hücrelerine lipozomal ajan aracılı transfekte edilmiş, neomisin ile 10-12 gün seçilimi takiben pozitif klonlar seçilmiştir. Seçilen klonlarda BH anlatımının transkripsiyonel ve translasyonel profilinin irdelenmesi için BH genine özgü primerler ve primer antikor kullanılarak sırası ile qRT-PZR ve immünoblotlama tekniği gerçekleştirilmiştir. PZR sonuçlarına göre hem mutant hem de doğal tip BH anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde BH mRNA anlatımının olduğu anlatımının olduğu tespit edilmiştir. Bu etkinin özellikle 48 saat zaman zarfında doğal tip BH anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde daha belirgin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca A13S,  $\Delta$ F166 ve T-24A BH stabil anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde BH mRNA anlatımlarının doğal tip BH sentez yapan hücrelere ile kıyaslandığında daha düşük transkripsiyonel anlatımının olduğu gösterilmiştir. RT-PCR takiben immunoblotlama ile BH translasyonel anlatımının en belirgin olarak 48 saat içinde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Ayrıca doğal tip BH kıyasla A13S, F166 Del ve T24A daha düşük BH anlatımı yaptığı 48 saat hücre protein lizatlarında gösterilmiştir. Özellikle T24A mutant BH anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde BH anlatımının diğer mutantlara kıyasla en düşük olduğu gösterilmiştir. HEK293 GH-hücrelerinde ise çok düşükte olsa 48 saat protein lizatlarında GH anlatımı varlığı immunoblotlama ile tespit edilse de bunun antikorun (GH antibody (C-3): SC-166696 santa cruz) bağlanma etkinliği ile ilişkili olduğu ve diğer BH gen ailesi üyelerinde özgü olması kaynaklı olabileceği düşünülmüştür (Şekil 17).



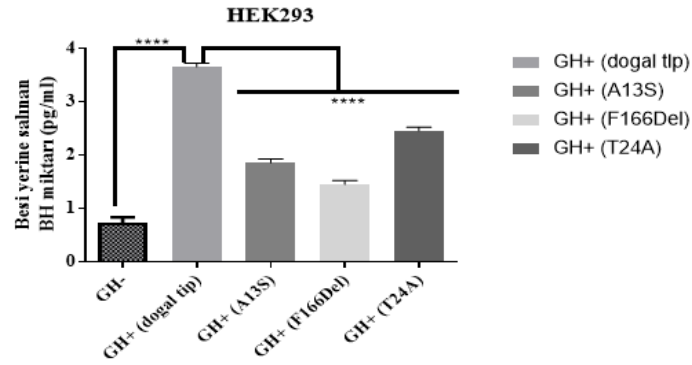
**Şekil 17. A. HEK293 BH-, BH+ doğal tip,  $\Delta$ F166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında BH anlatımının RT-PZR ile gösterilmesi. B. HEK293 BH-, BH+ doğal tip,  $\Delta$ F166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında BH anlatımının immünoblotlama yöntemi ile gösterilmesi.**

BH doğal tip ve mutant A13S,  $\Delta$ F166, T-24A BH stabil olarak anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde zamana bağlı (24-48 saat) olarak BH anlatım profili immunofloresans (IF) deneyi ile gerçekleştirilmiştir. HEK293 BH- hücelere kıyasla doğal tip BH anlatımının varlığı BH özgü antikor ile IF deneyi ile hem 24 hem de 48 saat için gerçekleştirilmiştir. Mutasyonlar kıyaslandığında ise  $\Delta$ F166 mutant BH olan HEK293 hücrelerinde diğer mutasyonlara ve doğal tip BH kıyasla IF işaretlemenin düşük olduğu gösterilmiştir. Ancak T-24A mutasyonu taşıyan HEK293 hücrelerinde zamana bağlı olarak BH anlatımının arttığı gösterilmiştir (Şekil 18).



**Şekil 18. HEK293 BH-, BH+ doğal tip,  $\Delta$ F166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında 24-48 saat içinde BH anlatımının immunofloresan ile gösterilmesi.**

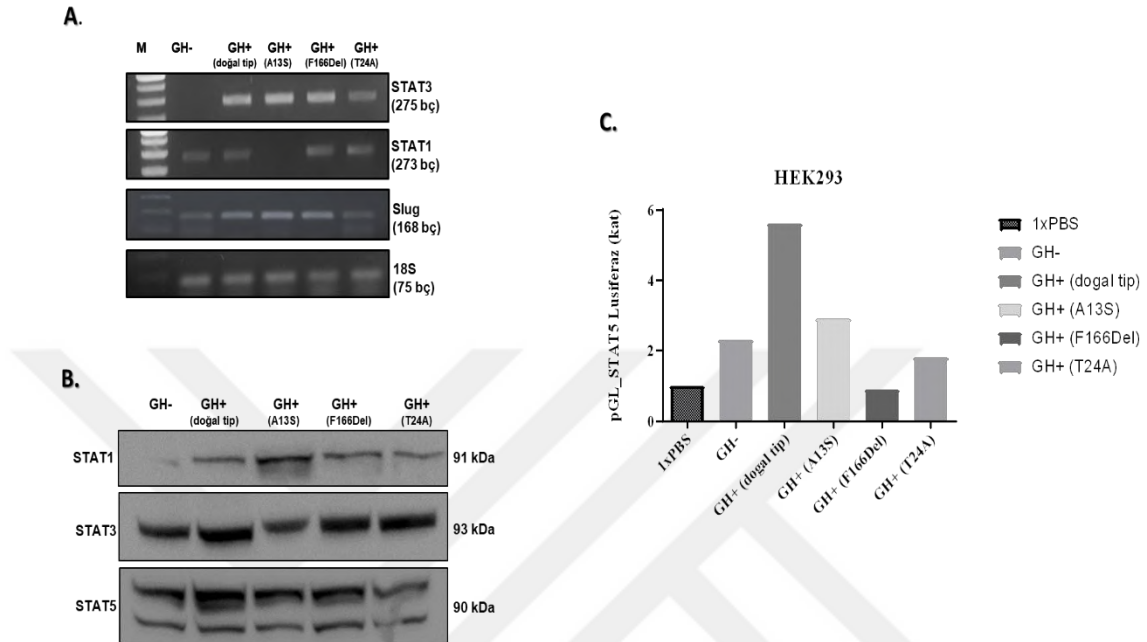
Hücre için transkripsiyonel ve translasyonel BH anlatım profillerinin belirlenmesini takiben doğal tip BH<sup>+</sup> ve mutant BH (A13S, ΔF166 ve T-24A) anlatımı yapan HEK293 hücrelerinin besi yerine salgıladığı BH miktarı BH ELIZA kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ELIZA sonucuna göre doğal tip BH<sup>+</sup> HEK293 hücrelerinin besi yerine 48 saat içinde 3.6 pg/ml BH salgıladığı tespit edilmiştir. Ayrıca A13S, ΔF166 ve T-24A BH stabil anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde 48 saat içinde hücrelerin besi yerine salgıladığı BH miktarı sırası ile 1.8, 1.5 ve 2.4 pg/ml olarak tespit edilmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan HEK293 BH<sup>-</sup> hücrelerinde besi yerine salınan BH miktarı 48 saatte 0.4 pg/ml olarak BH ELIZA ile tespit edilmiştir (Şekil 19).



**Şekil 19. HEK293 BH<sup>-</sup>, BH<sup>+</sup> doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında besiyerine salınan BH miktarının ELIZA yöntemi ile gösterilmesi (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.001$ ).**

Besi yerine BH salgılandığı tespit edilmesini takiben hücrelerde JAK/STAT sinyalinin aktif olduğunun gösterilmesi için pGL-STAT5 plazmit aracılı lusiferaz deneyi ile STAT1, STAT3, 5 immunoblotlama gerçekleştirilmiştir. Lusiferaz deneyine göre besi yerine salınan BH'nun biyolojik olarak aktif olduğu STAT5 bağlanma bölgesi olan lusiferaz reportörü transfeksiyonu kaynaklı olarak luminimetrik ölçüm ile tespit edilmiştir. HEK293 hücrelerinde STAT5 bağlanma profili 2.3 kat, doğal tip BH anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde ise 5.6 kat olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca STAT-5 biyolojik aktivitesinin A13S, ΔF166, T-24A BH mutant protein anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde STAT-5 aktivitesi 2.9, 0.9 ve 1.8 kat olarak sırasıyla gösterilmiştir. Negatif kontrol olarak hücre lizatlarının çözündüğü 1XPBS tercih edilmiştir ve bunun lusiferaz ışımaya oranı 1 kat olduğu gösterilmiştir. İmmunoblotlama ile STAT1, 3, 5 anlatım profillerinin BH<sup>-</sup> olan HEK293 ve mutant BH eksprese eden HEK293 hücrelerine kıyasla en fazla doğal tip BH anlatımı yapan HEK293

hücrelerinin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca mutasyonlar kendi aralarında irdelendiği zaman A13S HEK293 hücrelerinde STAT3 anlatımının  $\Delta$ F166 ve T24A kıyasla çok daha düşük olduğu tespit edilmiştir. STAT5 anlatım profili ise en düşük olarak T24A BH mutant HEK293 hücrelerinde olduğu gösterilmiştir (Şekil 20).

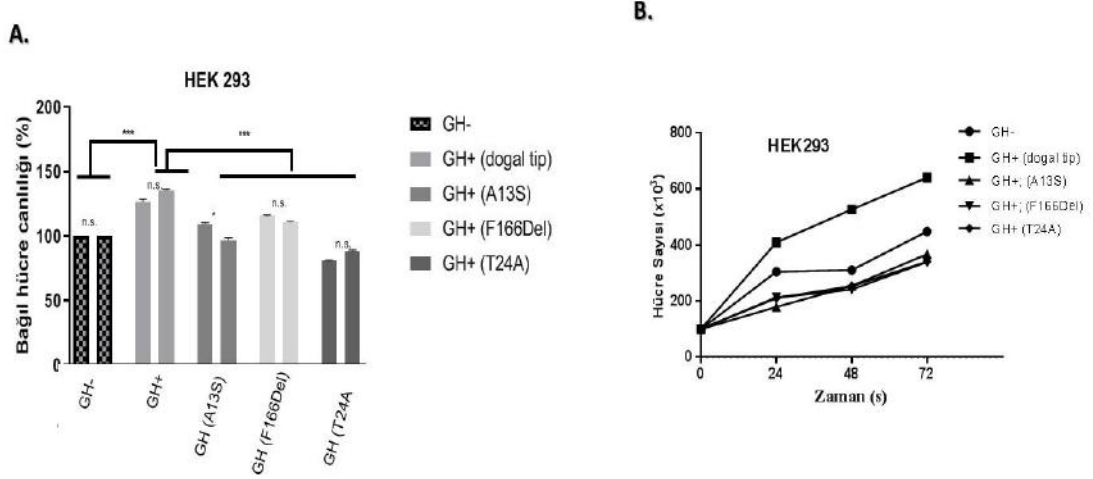


**Şekil 20. A. STAT3, 1, Slug anlatımının RT-PCR, B. İmmunoblotlama ile gösterilmesi, C. pGL\_STAT5 plazmi aracılı lusiferaz deneyi ile STAT5 biyolojik aktivite profilinin HEK293 BH-, BH+ doğal tip,  $\Delta$ F166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında gösterilmesi (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.001$ ).**

Zamana bağlı BH anlatımının HEK293 hücrelerinde hücre canlılığı, bölünmesi üzerine etkisi MTT hücre canlılık deneyi ve tripan mavisi boyaması ile gösterilmiştir. MTT sonucuna bakıldığında HEK293 doğal tip hücreler BH anlatımından yoksun HEK293 hücrelerine kıyasla 24 saat zaman zarfında hücre canlılığında %18 artış olduğu tespit edilmiştir. Doğal tip BH ile A13S,  $\Delta$ F166 ve T-24A mutant BH sinyali olan HEK293 hücreleri kıyaslandığında hücre canlılığında mutant HEK293 hücrelerinin hücre proliferasyonuna bağlı BH- sinyalinden yoksun HEK293 hücreler gibi davrandığı tespit edilmiştir. HEK293 doğal tip hücreler BH anlatımından yoksun HEK293 hücrelerine kıyasla 48 saat zaman zarfında hücre canlılığında %22 artış olduğu tespit edilmiştir. Aynı etki doğal tip BH ile A13S,  $\Delta$ F166 ve T-24A mutant BH sinyali olan HEK293 hücreleri kıyaslandığında da hücre canlılığında mutant HEK293 hücrelerinin BH- sinyalinden yoksun HEK293 hücreler gibi davranıldığı tespit edilmiştir (Şekil 21A). Aktif BH sinyalinin hücre bölünmesi üzerine etkisinin gösterilmesi için tripan mavisi boyaması tekniği uygulanmıştır. Bu tekniğe göre aktif

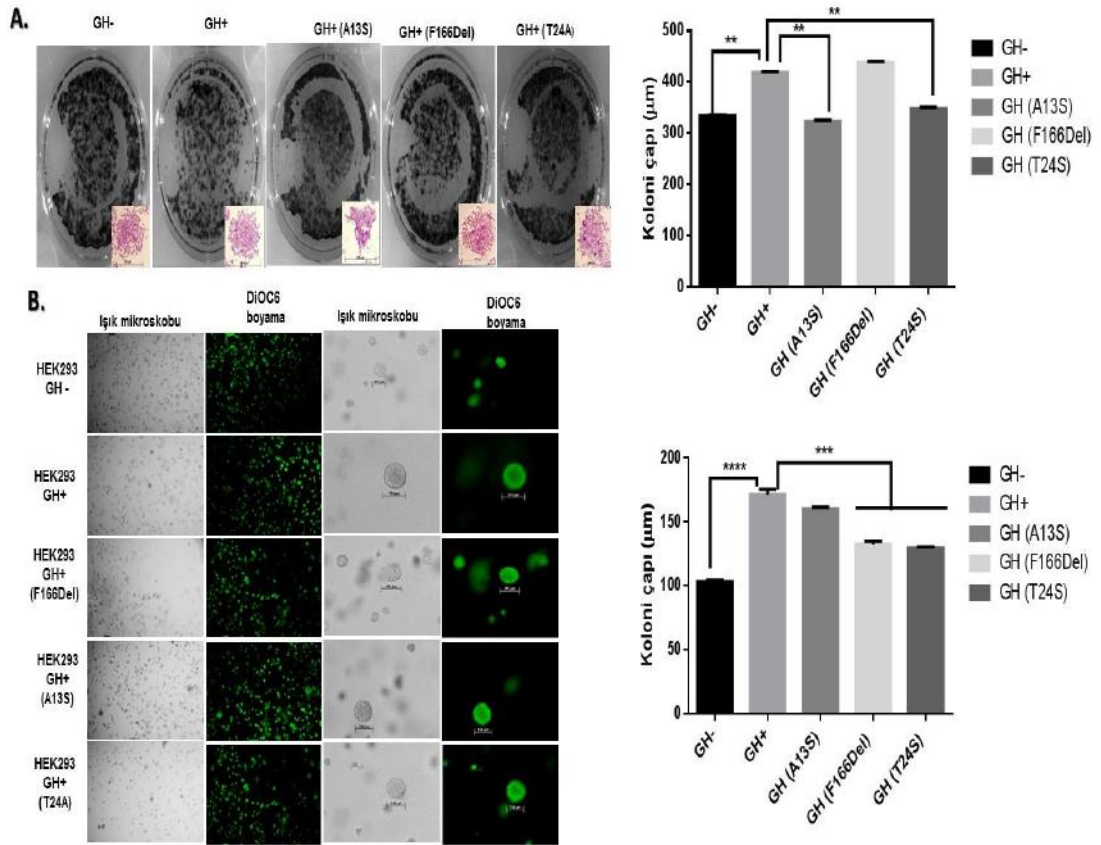


BH sinyalinin (doğal tip BH HEK293 hücrelerinde) BH- yoksun HEK293 hücrelerine kıyasla zamana bağlı olarak belirgin bir şekilde hücre bölünmesini tetiklediği tespit edilmiştir. BH sinyalinin hücre büyümesi üzerine indükleyici etkisi belirgin olarak 24 saat sonrası olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca aktif BH sinyali ile A13S, ΔF166, T24A BH stabil anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde hücre proliferasyonunun doğal tip BH sinyaline kıyasla daha az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 21B).



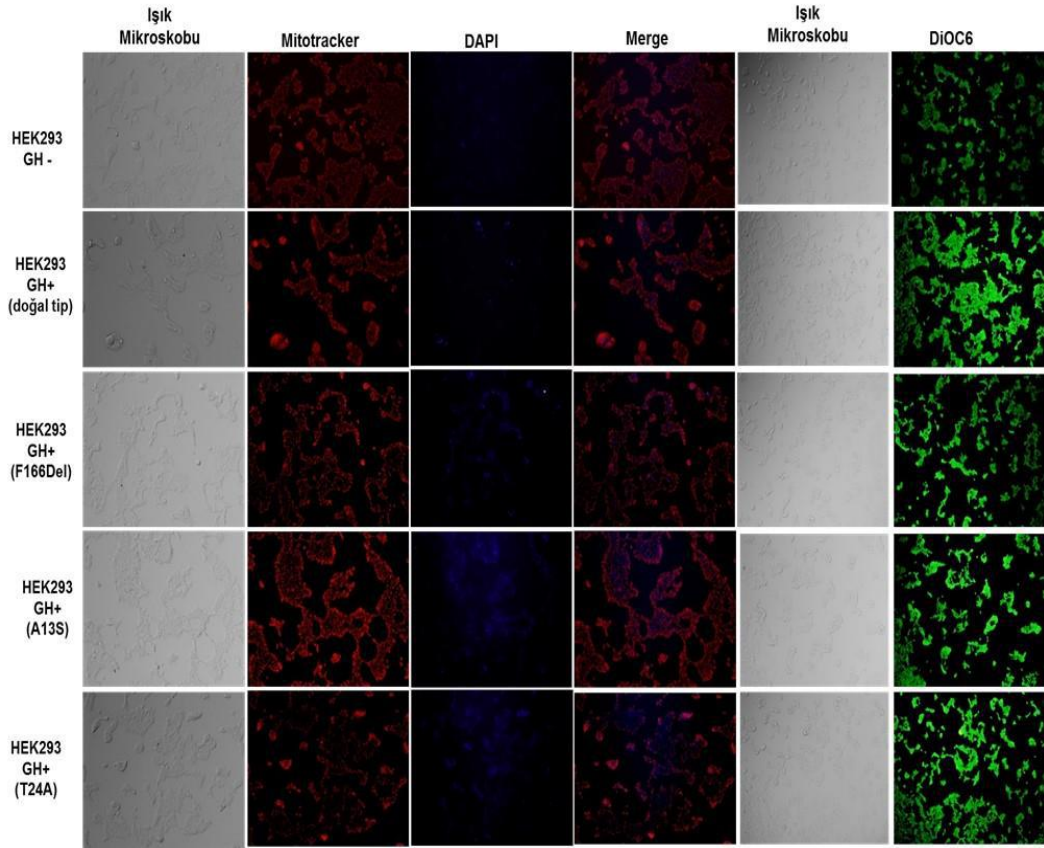
**Şekil 21. Doğal tip, A13S, ΔF166, T24A BH stabil anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde A. Zamana bağlı hücre canlılığının MTT testi ile gösterilmesi, B. Büyüme eğrisinin tripan mavisi boyaması ile gösterilmesi (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).**

Aktif BH sinyalinin, BH olmayan hücelere kıyasla koloni oluşumu üzerine etkisi hem yarı akışkan agar yöntemi hem de kristal viole koloni oluşum deneyi ile gösterilmiştir. Kristal viole koloni oluşumu sonucuna göre; doğal tip BH anlatımı yapan hücrelerde BH sinyali yoksun hücelere kıyasla koloni çapının 418  $\mu\text{m}$  çıktığı tespit edilmiştir. Ayrıca A13S, ΔF166, T-24A mutant BH anlatımı yapan hücrelerin koloni çapları ise sırası ile 325,437,345  $\mu\text{m}$  olarak BH sinyali olmayan hücelere yakın olarak tespit edilmiştir (Şekil 22A). Yarı akışkan agar deneyine göre; BH'dan yoksun HEK293 hücrelerinde koloni çapının 101  $\mu\text{M}$  olduğu, aktif BH sinyali olan HEK293 hücrelerinde ise koloni çapının 174  $\mu\text{M}$ 'a arttığı tespit edilmiştir. ΔF166, A13S, T-24A mutant BH sinyali olan HEK293 hücrelerinde ise koloni çapları sırasıyla 151  $\mu\text{M}$ , 134  $\mu\text{M}$  ve 138  $\mu\text{M}$  olarak gösterilmiştir. Bu iki deney sonucuna göre, doğal tip BH sinyalinin hücrelerde hücre bölünmesi, proliferasyon yanında koloni çapını indüklediği HEK293 hücrelerinde gösterilmiştir. Ayrıca ΔF166, A13S, T-24A mutasyonlarının BH sinyaline ket vurarak koloni oluşumu üzerinde doğal tip BH sinyaline kıyasla daha az indüklediği gösterilmiştir (Şekil 22B).



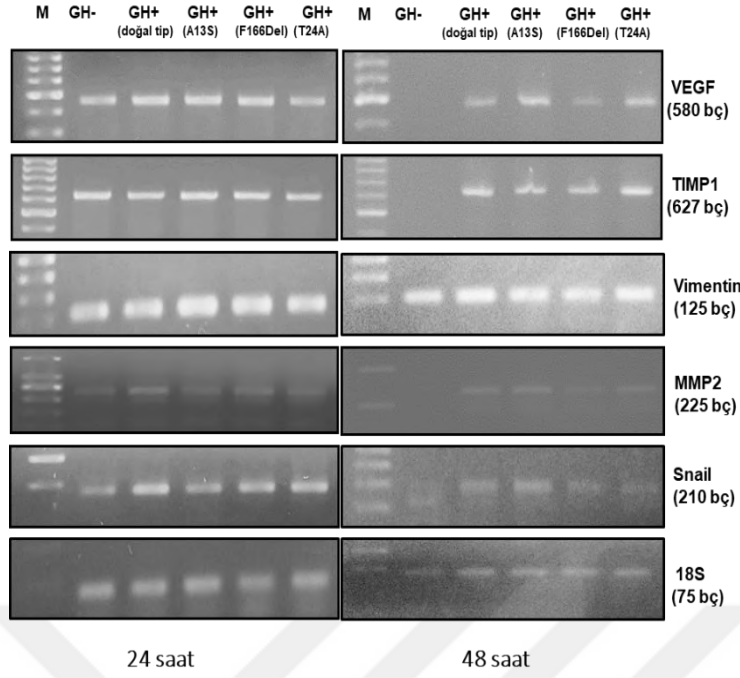
**Şekil 22. A. HEK293 BH-, BH+ doğal tip,  $\Delta$ F166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında A. Koloni oluşumunun kristal viyole ile gösterilmesi, B. Yarı yumuşak agar yöntemi ile koloni çaplarının gösterilmesi (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.001$ ).**

BH doğal tip ve mutant A13S,  $\Delta$ F166, T-24A BH stabil olarak anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde aktif BH sinyalinin zamana bağlı olarak hücre canlılığı ve mitokondriyel membran potansiyeli (MMP) üzerine tetikleyici etkisini gösterebilmek için DiOC6 ve mitotracker floresan boyamaları gerçekleştirilmiş ve DAPI ile çekirdekler işaretlenmiştir. Sonuçlara göre otokrin BH salınımı yapan HEK293 hücreleri, BH sinyalinden yoksun HEK293 hücrelerine kıyasla hücre canlılığı ve MMP potansiyelinin belirgin olarak arttığı gösterilmiştir. Ayrıca otokrin biyolojik olarak aktif BH sinyaline sahip hücelere kıyasla A13S,  $\Delta$ F166, T-24A mutant BH sinyal anlatımı olan HEK293 hücrelerinin MMP potansiyelinin otokrin BH sinyali kaynaklı proliferasyon indükleyici etkisine bağlı olarak daha az hücre sayısı kaynaklı etkinliğinin azaldığı gösterilmiştir (Şekil 23).



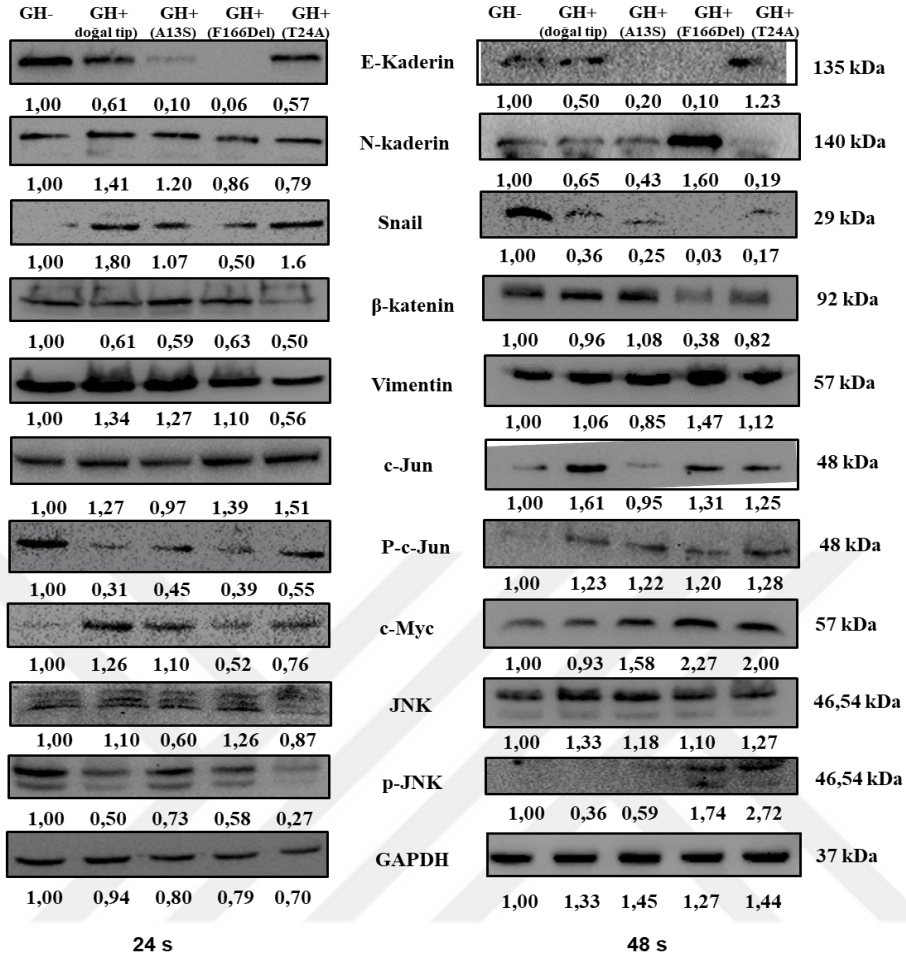
**Şekil 23. HEK293 BH-, BH+ doğal tip,  $\Delta$ F166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında hücre canlılığı ve mitokondri membran potansiyeli üzerine mutasyonların etkisinin 48 saat zaman zarfında Mitotracker/DAPI ve DiOC6 boyaması ile gösterilmesi.**

Literatürdeki bilgiler ışığında EMT hücre invazyon-metastatik profilinde rol aldığı bilinmesi nedeni ile aktif BH sinyalinin ve A13S,  $\Delta$ F166 ve T-24A mutant BH sinyali olan hücrelerdeki EMT markırların profili RT-PZR deneyi ile gerçekleştirilmiştir. RT-PZR sonuçlarına göre 24 saat zaman zarfında doğal tip BH sinyaline sahip olan HEK293 hücreleri ile BH sinyaline sahip olmayan HEK293 hücreleri kıyaslandığında Vimentin, VEGF, Snail, Slug, MMP2 anlatımının arttığı, TIMP1 anlatımının ise azaldığı gösterilmiştir. Bu etkinin 48 saat zaman zarfında da devam ettiği daha belirgin olarak tespit edilmiştir. Doğal tip BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerine kıyasla A13S,  $\Delta$ F166 ve T-24A mutant BH sinyali olan HEK293 hücrelerinde ise VEGF, Vimentin ve Snail anlatımının düşük olduğu, ket vurucu etkinin  $\Delta$ F166 mutasyonuna sahip HEK293 hücrelerinde olduğu tespit edilmiş ve bu etkinin özellikle 48 saatte daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 24).



**Şekil 24. HEK293 BH-, BH+ doğal tip,  $\Delta$ F166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında VEGF, TIMP1, Vimentin, MMP2, Snail, 18S, STAT-1, STAT-3, Slug genlerinin 24 saat (sol), 48 saat (sağ) RT-PZR ait agaroz jel görüntüleri (M:100 bç)**

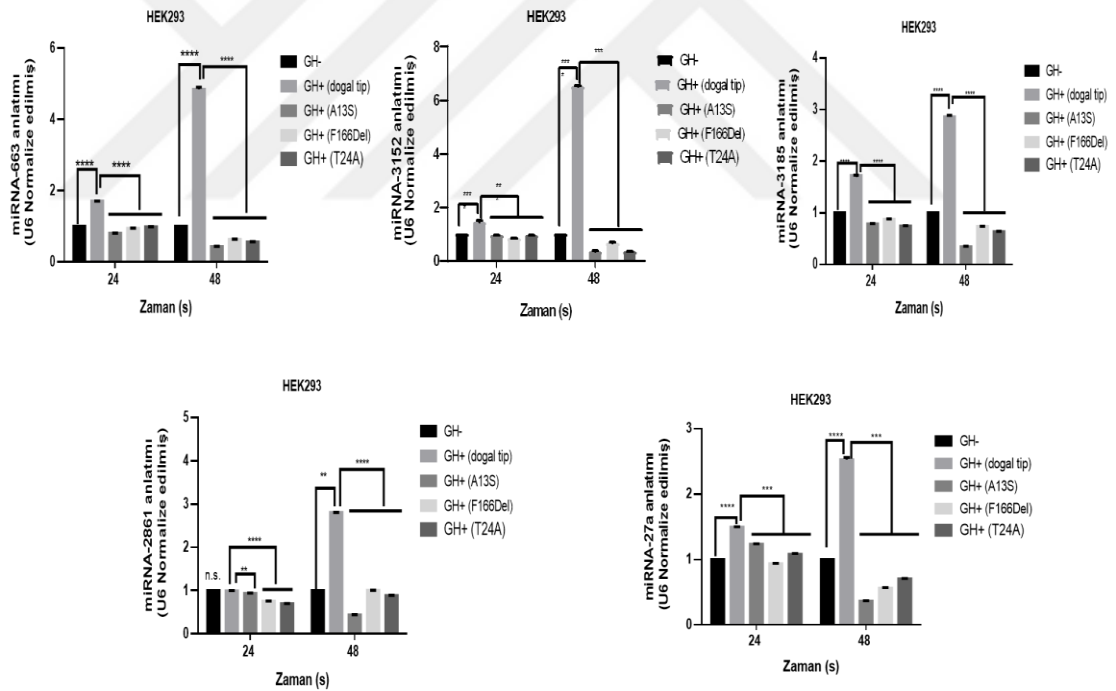
BH sinyal değişikliğine bağlı olarak EMT markır proteinlerin anlatım profilleri ve BH sinyali aşağı hedef moleküllerinin anlatım profilleri 24 ve 48 saat zaman zarfında immunoblotlama deneyi ile irdelenmiştir. Doğal tip BH+ sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde BH- sinyalinden yoksun HEK293 hücrelerine kıyasla N-kaderin, Snail, Vimentin anlatımının arttığı, E-kaderin anlatımının azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca otokrin BH sinyalinin BH sinyali aşağı yolak elemanları olan c-jun, c-myc, JNK anlatımının arttığı ve bu etkinin 48 saatte daha belirgin olduğu tespit edilmiştir. Doğal tip BH ile A13S,  $\Delta$ F166 ve T-24A mutant BH sinyali olan HEK293 hücreleri kıyaslandığında mutant HEK293 hücrelerinde E-kaderin anlatımının azalıp N-kaderin anlatımına döndüğü gösterilse de EMT markırlarından Vimentin ve Snail anlatımının da daha az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 25).



**Şekil 25. HEK293 BH-, BH+ doğal tip,  $\Delta$ F166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında E-kaderin, N-kaderin, Snail, Slug,  $\beta$ -katenin, Vimentin, c-Myc, c-Jun, JNK anlatım profillerine ait immunoblotlama sonucu.**

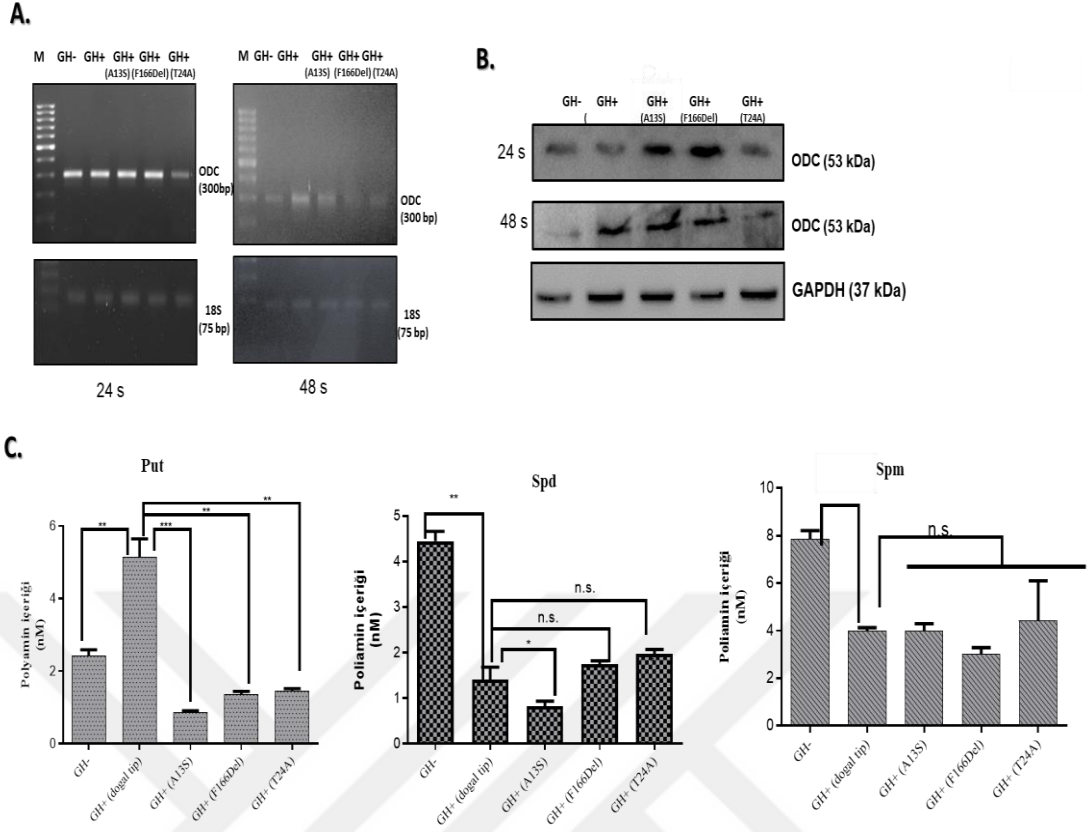
Plazmit aracılı BH doğal tip, mutant ( $\Delta$ F166, A13S ve T-24A) BH anlatımına bağlı BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde biyolojik olarak aktif BH sinyalinin varlığının gösterilmesini takiben artmış BH varlığında anlatım profili literatürde değişiklik gösteren miRNA-663, miRNA-3152, miRNA-3185, miRNA-2861 ve miRNA-27a anlatımlarının zamana bağlı anlatım profili qRT-PZR ile irdelenmiştir. Otokrin BH sinyalinin miRNA-663 anlatımının 24 saat zaman zarfında 2 kat arttırdığı, 48 saat içinde 5 kat arttığı tespit edilmiştir. Doğal tip BH ile A13S,  $\Delta$ F166 ve T-24A mutant BH sinyali kıyaslandığında hem 24 hem de 48 saatte miRNA-663 anlatımının yaklaşık 1.5 katta kaldığı gösterilmiştir. miRNA-3152 anlatımına bakıldığında otokrin BH sinyalinin 24 saat içinde 1.7 kat artması ile 48 zaman zarfında miRNA-3152 anlatımının 7.2 kat arttığı gözlemlenmiştir. Doğal tip BH ile A13S,  $\Delta$ F166 ve T-24A mutant BH sinyali kıyaslandığında mutant BH sinyali olan HEK293 hücrelerinde

miRNA-3152 anlatımının düştüğü gösterilmiştir. miRNA-3185 anlatımı incelendiğinde otokrin BH sinyalinin 24 saat zaman zarfında 2 kat artması ile 48 saat zaman zarfında ise miRNA-3185 anlatımının 3 kata kadar çıktığı tespit edilmiştir. Doğal tip BH ile A13S, ΔF166 ve T-24A mutant BH sinyali kıyaslandığında mutant BH sinyali olan HEK293 hücrelerinde miRNA-3185 anlatımının düştüğü tespit edilmiştir. miRNA-2861 anlatımı incelendiğinde otokrin BH sinyalinin 24 saat zaman zarfında anlatımda etkisi olmadığı fakat 48 saat zaman zarfında anlatımın yaklaşık 3 kat arttığı tespit edilmiştir. Doğal tip BH ile A13S, ΔF166 ve T-24A mutant BH sinyali kıyaslandığında mutant BH sinyali olan HEK293 hücrelerinde miRNA-2861 anlatımının düştüğü gösterilmiştir. miRNA-27a anlatımı incelendiğinde ise otokrin BH sinyalinin 24 saat zaman zarfında 2 kat artması ile 48 saat zaman zarfında ise miRNA-27a anlatımının yaklaşık 3 kata kadar çıktığı tespit edilmiştir. miRNA-27a anlatımının ayrıca A13S, ΔF166 ve T-24A mutant BH sinyali olan HEK293 hücrelerinde doğal tip BH sinyaline kıyasla düşük olduğu tespit edilmiştir (Şekil 26).



Şekil 26. HEK293 BH-, BH+ doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A BH sinyali olan HEK293 hücrelerinde zamana bağlı olarak miRNA-663, miRNA-3152, miRNA-3185, miRNA-2861, miRNA-27a anlatım profillerinin qRT-PZR ile gösterilmesi (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

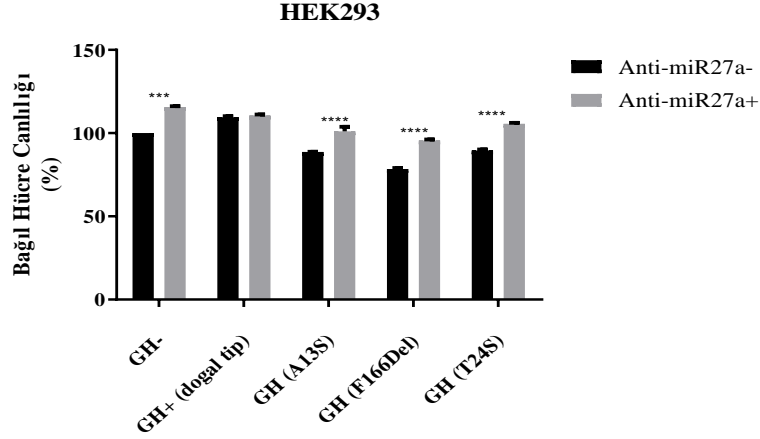
Literatürde Bates et al tarafından yapılan, PA ile ODC geni üzerine etki ederek BH sinyali eksikliğinde anlatım profili arttan miR27a'nın üzerinden, bu tez çalışmasında ODC anlatım profili, PA seviyesi irdelenmiştir. RT-PZR sonucuna göre BH sinyali indüklenen HEK293 hücreleri ile BH- sinyalinden yoksun HEK293 hücreleri kıyaslandığında BH sinyali indüklenen HEK293 hücrelerinde ODC anlatımının 24 saat zaman zarfında transkripsiyonel ve translasyonel olarak arttığı tespit edilmiştir. Aynı etkinin 48 saat zaman zarfında da devam ettiği gösterilmiştir. Doğal tip BH ile A13S, ΔF166 ve T-24A mutant BH sinyali olan HEK293 hücreleri kıyaslandığında mutant HEK293 hücrelerinde ODC anlatımının az olduğu gösterilmiştir. HPLC sonuçlarına göre otokrin BH anlatımının intrasellüler PA miktarı üzerinde sadece spermidin miktarında artış olduğu tespit edilmiştir. A13S BH+ sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde doğal tip BH+ salınımı yapan HEK293 hücrelerine kıyasla putresin ve spermin miktarında azalış, spermidin miktarında ise herhangi bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. ΔF166 BH+ sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde de doğal tip BH+ salınımı yapan HEK293 hücrelerine kıyasla putresin ve spermin miktarında azalış, spermidin miktarında ise artış olduğu tespit edilmiştir. T-24A BH+ sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde ise doğal tip BH+ salınımı yapan HEK293 hücrelerine kıyasla putresin miktarında azalış, spermidin ve spermin miktarında ise artış olduğu tespit edilmiştir. HPLC sonuçlarına göre otokrin BH anlatımının, hücre içi spermidin seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir (Şekil 27).



**Şekil 27. HEK293 BH-, BH+ doğal tip,  $\Delta$ F166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında A. Zamana bağlı ODC anlatım profillerine ait RT-PZR sonucu, B. ODC anlatımının immunoblotlama sonucu, C. PA miktarının HPLC ile gösterilmesi (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).**

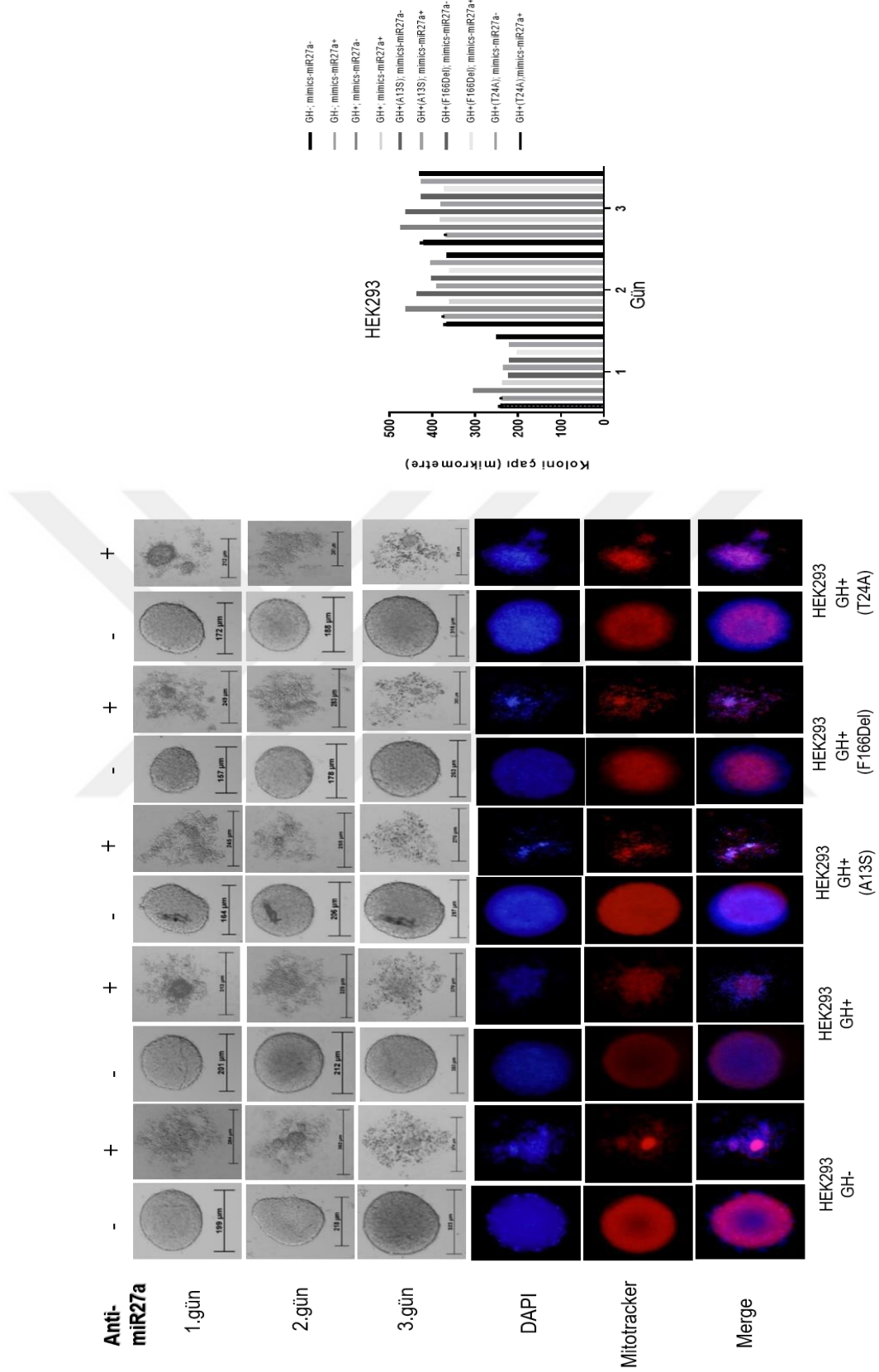
miR27a'nın ODC üzerinden PA metabolizması ve BH sinyaline bağlı hücre bölünme ve proliferasyonu üzerine etkinin irdelenmesi için ODC ile antagonist olarak çalışan miR27a'ya özgü anti-miR transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. miR27a özgü anti-miR uygulaması ile BH- sinyalinden yoksun ve BH- paralel cevap gösteren  $\Delta$ F166, A13S ve T-24A mutant BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde hücre canlılığını anti-miR uygulanmayanlara kıyasla %20, %18, %22 arttırdığı tespit edilmiştir. Ancak biyolojik olarak aktif BH sinyalinin anti-miR uygulamasından MTT hücre canlılık testine göre istatistiksel olarak belirgin farklılık yaratacak şekilde etkilemediği tespit edilmiştir (Şekil 28).





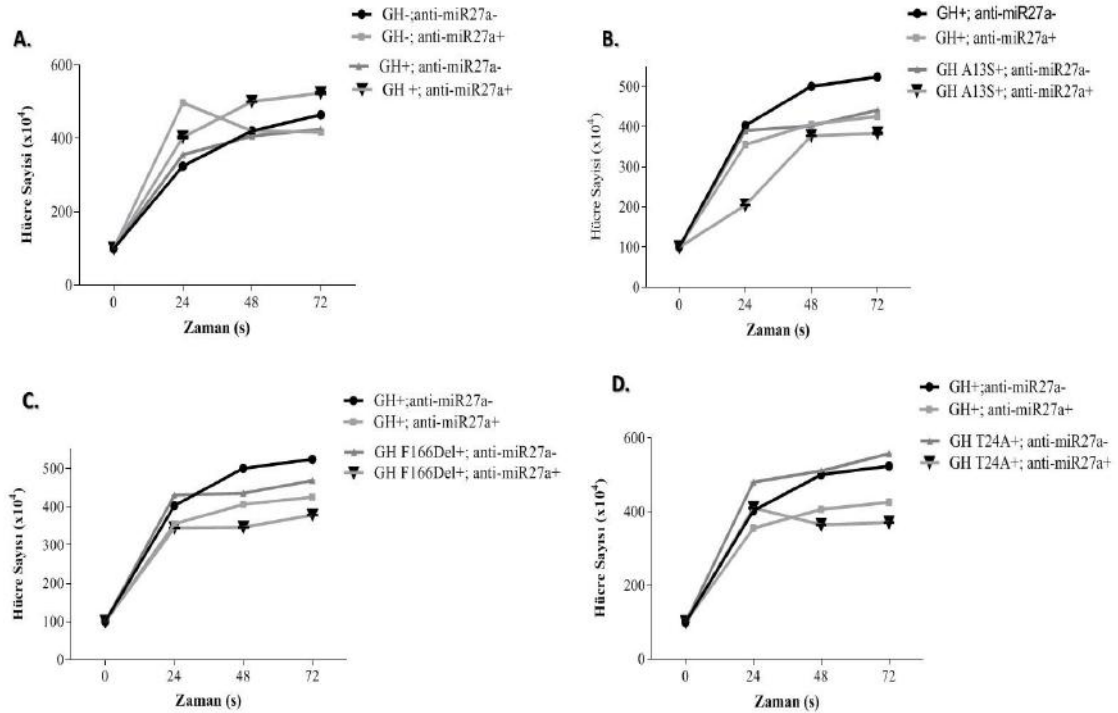
**Şekil 28. Doğal tip, A13S, ΔF166, T24A BH stabil anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde bağıl hücre canlılığının 48 saat (sağ) boyunca anti-miR27a uygulanmasının ardından MTT testi ile gösterilmesi (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.001$ ).**

miR27a'ya özgü anti-miRNA transfeksiyonunu takiben BH- sinyalinden yoksun, BH+ doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A BH sinyali olan HEK293 hücrelerinde koloni çaplarının belirlenmesi amacıyla asılı damla modeli deneyi gerçekleştirilmiştir. Asılı damla modeline göre BH- sinyalinden yoksun HEK293 hücrelerinde koloni çapları 3 gün boyunca sırasıyla 199, 218 ve 323 μM gösterilirken anti-miR27a uygulanması ile koloni çapları sırasıyla 284, 362 ve 374 μM'a arttığı tespit edilmiştir. BH+ doğal tip HEK293 hücrelerinde koloni çapları 3 gün boyunca sırasıyla 201, 212 ve 353 μM gösterilirken anti-miR27a uygulanması ile koloni çapları sırasıyla 313, 329 ve 370 μM'a arttığı tespit edilmiştir. BH+ A13S mutant HEK293 hücrelerinde koloni çapları 3 gün boyunca sırasıyla 164, 206 ve 297 μM gösterilirken anti-miR27a uygulanması ile koloni çapları sırasıyla 245, 255 ve 276 μM'a arttığı tespit edilmiştir. BH+ ΔF166 mutant HEK293 hücrelerinde koloni çapları 3 gün boyunca sırasıyla 157, 278 ve 263 μM gösterilirken anti-miR27a uygulanması ile koloni çapları sırasıyla 249, 283 ve 383 μM'a arttığı tespit edilmiştir. BH+ T-24A mutant HEK293 hücrelerinde koloni çapları 3 gün boyunca sırasıyla 172, 188 ve 316 μM gösterilirken anti-miR27a uygulanması ile koloni çapları sırasıyla 212, 241 ve 370 μM'a arttığı tespit edilmiştir (Şekil 32). Böylece anti-miR uygulaması ile inhibe edilen miR27a'nın hücre canlılığı üzerine indükleyici etkisine bağlı olarak koloni oluşumunun tetiklendiği koloni çapının artması ile tespit edilmiştir (Şekil 29).



Şekil 29. Doğal tip, A13S,  $\Delta$ F166, T24A BH stabil anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde koloni oluşumunun anti-miR27a uygulanmasının ardından zamana bağlı olarak asılı damla modeli ile gösterilmesi ( $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$ ).

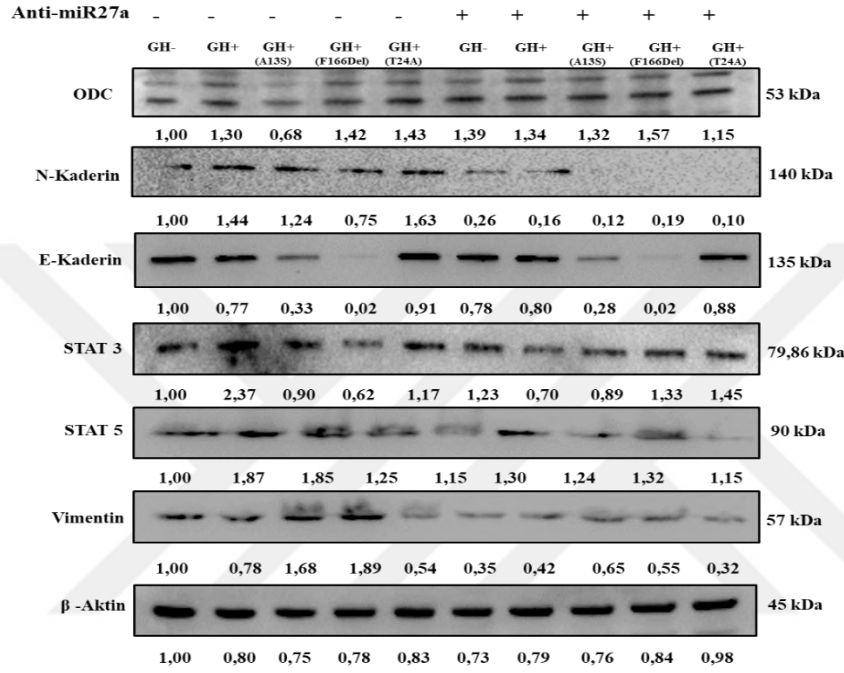
Anti-miR uygulamasının miR27a baskılayarak hücre canlılığını ve koloni oluşumunu indüklemesinin gösterilmesini takiben hücrelerde tripan mavisi ile hücre bölünmesi üzerine anti-miR27a'nın etki incelenmiştir. Tripan mavisi büyüme eğrisine göre anti-miR27a uygulanan HEK293 hücrelerinde özellikle doğal tip BH sinyaline sahip hücre tiplerinin BH yoksun olan hek293 hücrelerine kıyasla hücre bölünmesinde zamana bağlı artışın varlığı tespit edilmiştir. Eş zamanlı olarak gerçekleştirilen A13S, ΔF166, T24A BH mutasyonu taşıyan HEK293 hücrelerinde doğal tip BH kıyasla anti-miR27a uygulamasının etkisinin düşük olması ile beraber zamana bağlı her bir mutasyon üretim ve salgısı yapan HEK293 hücrelerinde hücre bölünmesini indüklediği gösterilmiştir (Şekil 30).



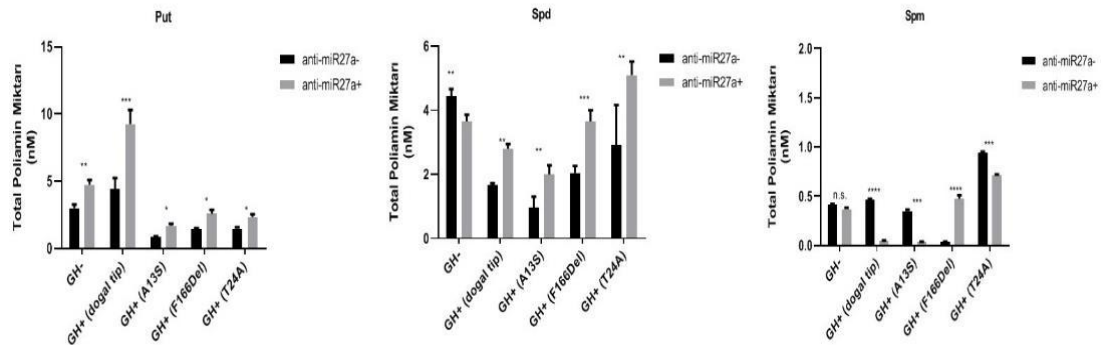
**Şekil 30. HEK293 BH-, BH+ doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarının anti-miR27a uygulanmasının ardından zamana göre büyüme eğrisinin tripan mavisi boyaması ile gösterilmesi (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.001$ ).**

Anti-miR27a transfeksiyonunun doğal tip BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde anti-miR27a uygulanmayanlara kıyasla ODC gen anlatımında artışın görüldüğü tespit edilmiştir. Ayrıca A13S, ΔF166, T24A BH mutasyonu taşıyan BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde ise ODC anlatımının A13S ve T24A mutasyonları üzerinde belirgin artışın varlığı gösterilmiştir (Şekil 31A). ODC anlatımının olası sonucu olarak

ifade edebileceğimiz üzere PA seviyeleri incelendiğinde, put ve Spd miktarlarının anti-miR27a uygulanan doğal tip BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde anti-miR uygulanmayanlara kıyasla belirgin olarak arttığı tespit edilmiştir. BH mutasyonuna bağlı anti-miR uygulamasının PA miktarı üzerine etkisi irdelendiğinde ODC anlatım profili ile benzer şekilde, put ve spd miktarının istatistiksel olarak anlamlı artışı varlığı HPLC ile tespit edilmiştir (Şekil 31B).

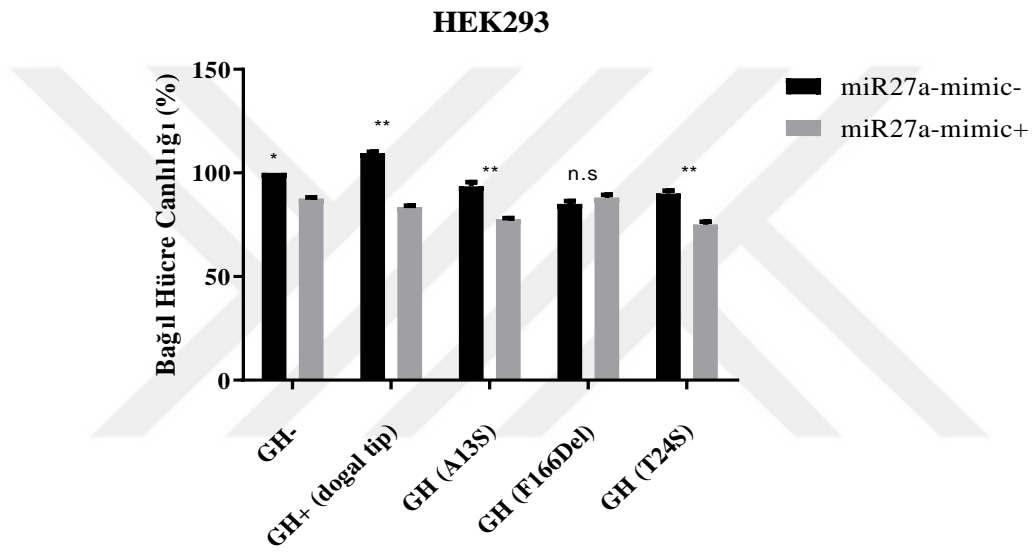


B.



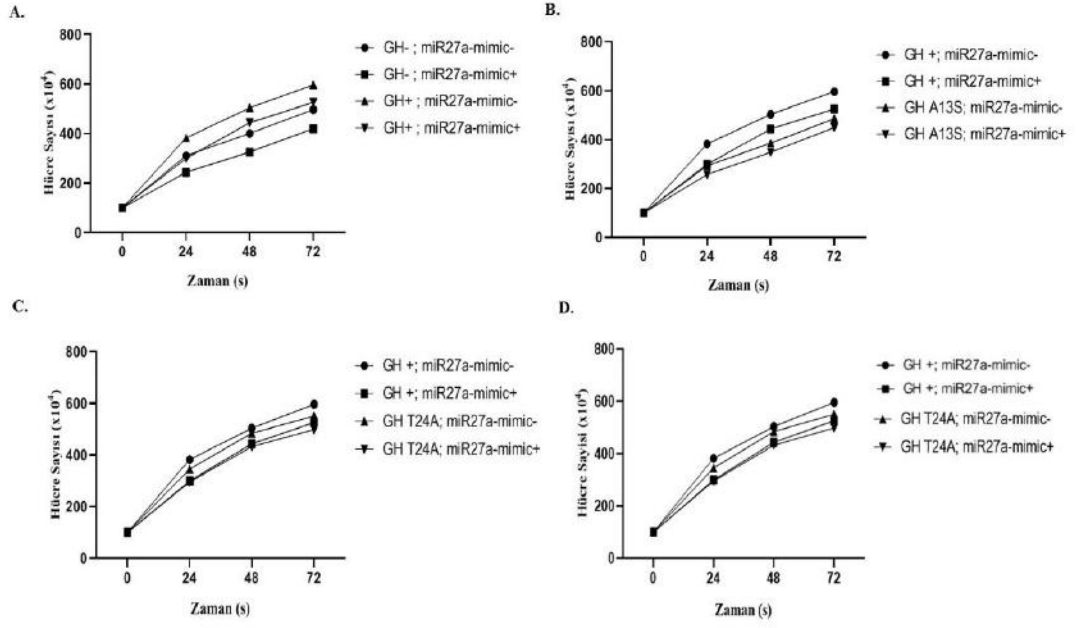
Şekil 31. A. HEK293 BH-, BH+ doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında anti-miR27a uygulanmasının ardından ODC, E-kaderin, N-kaderin, Vimentin, STAT3, 5 anlatım profiline ait immunoblotlama sonucu, B. Total poliamin miktarının HPLC yöntemi ile gösterilmesi (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

miR27a'nın ODC üzerinden PA metabolizması ve BH sinyaline bağlı hücre bölünme ve proliferasyonu üzerine etkinin irdelenmesi için ODC ile antagonist olarak çalışan miR27a taklit eden mimics transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. miR27a özgü mimics uygulaması ile BH- sinyalinden yoksun ve BH- paralel cevap gösteren  $\Delta F166$ , A13S ve T-24A mutant BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde hücre canlılığını mimics uygulanmayanlara kıyasla %16, %3, %15 arttırdığı tespit edilmiştir. Anti-miR27a uygulamasının aksine mimics uygulamasının biyolojik olarak aktif BH sinyalinin mimics uygulaması ile belirgin olarak hücre canlılığına istatistiksel olarak ket vurduğu MTT hücre canlılık testi ile tespit edilmiştir (Şekil 32).



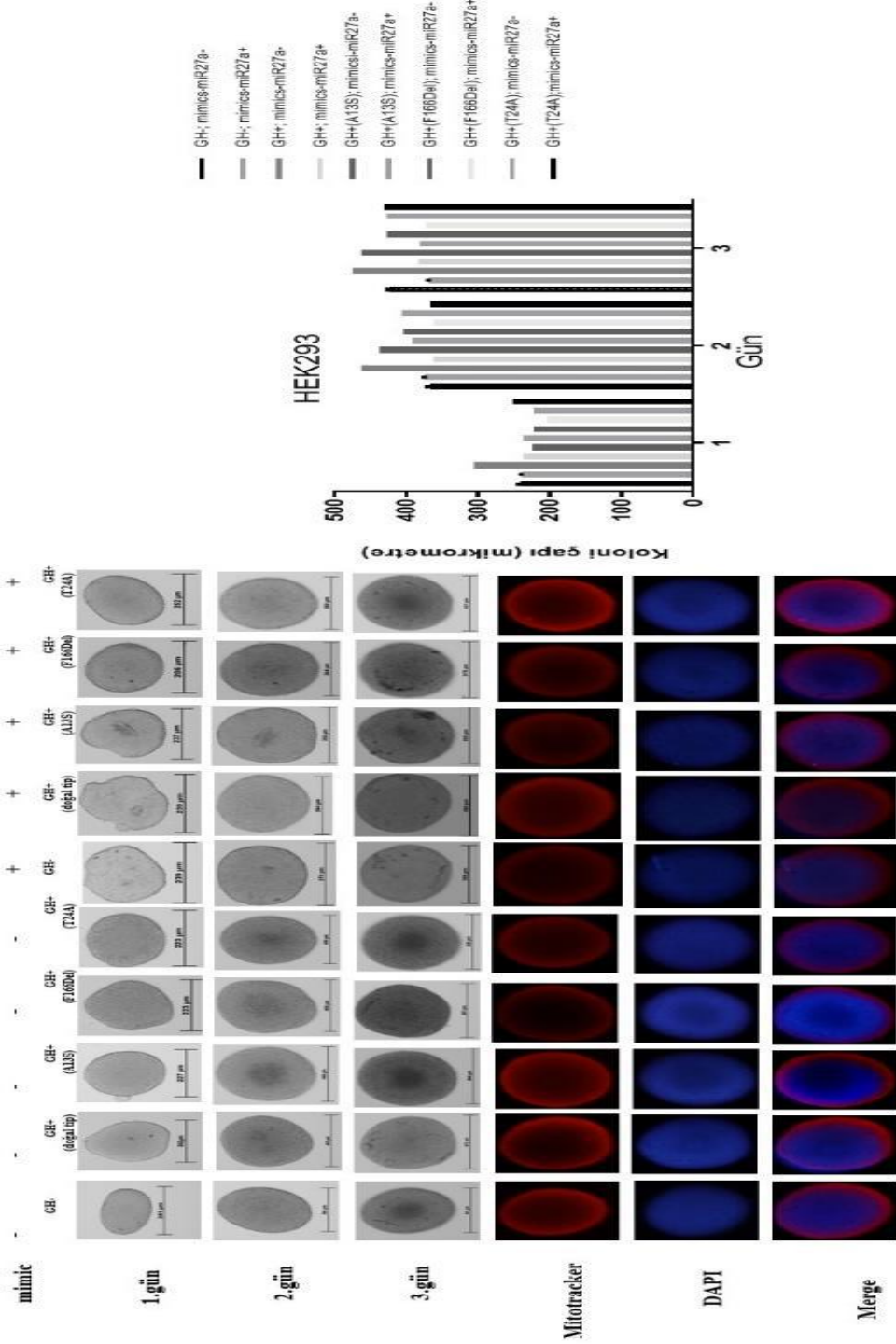
**Şekil 32. Doğal tip, A13S,  $\Delta F166$ , T24A BH stabil anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde bağıl hücre canlılığının 48 saat sağ boyunca mimics-mir27a uygulanmasının ardından MTT testi ile gösterilmesi (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).**

Anti-miR uygulamasının miR27a baskılayarak hücre canlılığını ve koloni oluşumunu indüklemesinin gösterilmesini takiben, miR27a'nın etkisini göstermek için mimics uygulaması ile miR27a taklit edilerek hücre bölünmesi tripan mavisi ile incelenmiştir. Tripan mavisi büyüme eğrisine göre mimics miR27a uygulanan HEK293 hücrelerinde özellikle doğal tip BH sinyaline sahip hücre tiplerinin BH yoksun olan HEK293 hücrelerine kıyasla hücre bölünmesinde zamana bağlı düşme tespit edilmiştir. Eş zamanlı olarak gerçekleştirilen A13S,  $\Delta F166$ , T24A BH mutasyonu taşıyan HEK293 hücrelerinde doğal tip BH kıyasla mimics miR27a uygulamasının etkisinin doğal tip BH sinyali yapan HEK293 hücrelerine kıyasla daha düşük olarak zamana bağlı hücre bölünmesine ket vurduğu gösterilmiştir (Şekil 33).



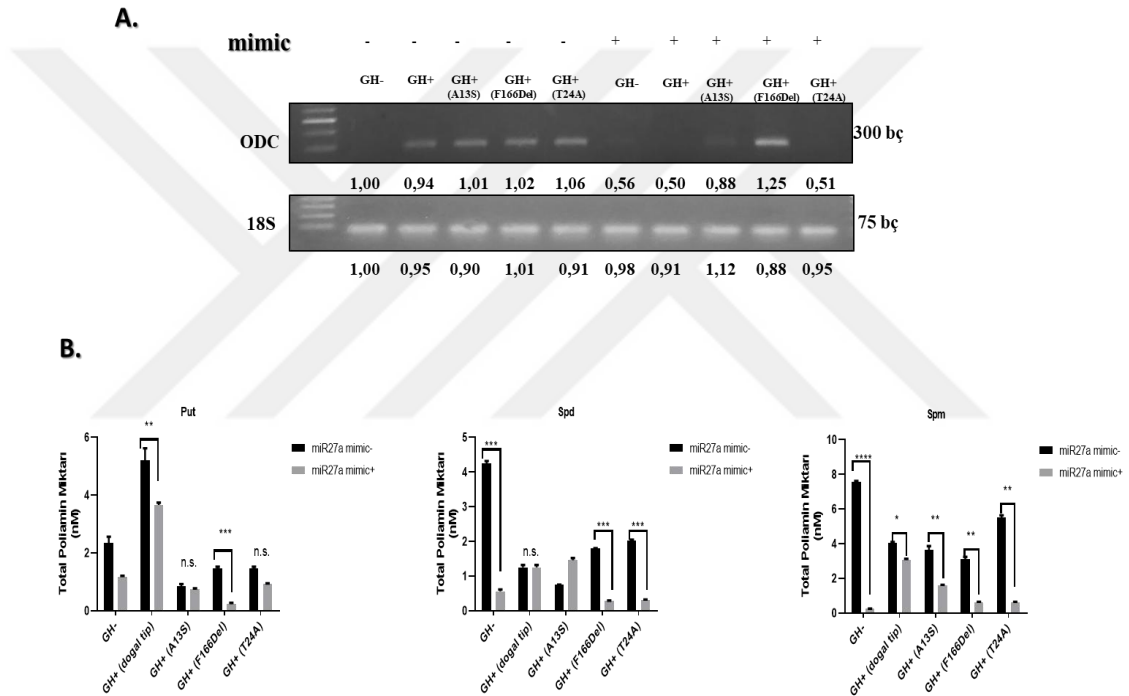
**Şekil 33. HEK293 BH-, BH+ doğal tip,  $\Delta$ F166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarının mimics-miR27a uygulanmasının ardından zamana göre büyüme eğrisinin tripan mavisi boyaması ile gösterilmesi (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.001$ ).**

miR27a'ya özgü mimics-miR27a transfeksiyonunu takiben BH sinyalinden yoksun, BH+ doğal tip,  $\Delta$ F166, A13S ve T-24A BH sinyali olan HEK293 hücrelerinde koloni çaplarının belirlenmesi amacıyla asılı damla modeli deneyi gerçekleştirilmiştir. Asılı damla modeline göre BH sinyalinden yoksun HEK293 hücrelerinde koloni çapları 3 gün boyunca sırasıyla 241, 366 ve 421  $\mu$ M gösterilirken mimics miR27a uygulanması ile koloni çapları sırasıyla 239, 374 ve 368  $\mu$ M'a düştüğü tespit edilmiştir. BH+ doğal tip HEK293 hücrelerinde koloni çapları 3 gün boyunca sırasıyla 302, 461 ve 473  $\mu$ M gösterilirken mimics miR27a uygulanması ile koloni çapları sırasıyla 239, 364 ve 386  $\mu$ M'a düştüğü tespit edilmiştir. BH+ A13S mutant HEK293 hücrelerinde koloni çapları 3 gün boyunca sırasıyla 227, 440 ve 464  $\mu$ M gösterilirken mimics miR27a uygulanması ile koloni çapları sırasıyla, 237, 393 ve 382  $\mu$ M'a düştüğü tespit edilmiştir. BH+  $\Delta$ F166 mutant HEK293 hücrelerinde koloni çapları 3 gün boyunca sırasıyla 223, 406 ve 428  $\mu$ M gösterilirken anti-miR27a uygulanması ile koloni çapları sırasıyla 206, 364 ve 375  $\mu$ M'a düştüğü tespit edilmiştir. BH+ T-24A mutant HEK293 hücrelerinde koloni çapları 3 gün boyunca sırasıyla 223, 406 ve 428  $\mu$ M gösterilirken mimics-miR27a uygulanması ile koloni çapları sırasıyla 252, 369 ve 431  $\mu$ M'a arttığı tespit edilmiştir (Şekil 37). Böylece mimics-miR uygulaması ile inhibe edilen miR27a'nın hücre canlılığı üzerine indükleyici etkisine bağlı olarak koloni oluşumunun tetiklendiği koloni çapının artması ile tespit edilmiştir (Şekil 34).



Şekil 34. Doğal tip, A13S,  $\Delta$ F166, T24A BH stabil anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde koloni oluşumunun mimics-mir27a uygulanmasının ardından zamana bağlı olarak aşılı damla modeli ile gösterilmesi ( $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ,  $****p<0.001$ ).

Mimics-miR27a transfeksiyonunun doğal tip BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde mimics-miR27a uygulanmayanlara kıyasla ODC gen anlatımında düşüş olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca A13S, ΔF166, T24A BH mutasyonu taşıyan BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde ise ODC anlatımının A13S ve T24A mutasyonları üzerinde belirgin azalışın varlığı gösterilmiştir (Şekil 35A). ODC anlatımının olası sonucu olarak ifade edebileceğimiz üzere PA seviyelerine HPLC yöntemi ile bakıldığında, put ve spm miktarlarının mimics-miR27a uygulanan doğal tip BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde mimics-miR uygulanmayanlara kıyasla belirgin olarak azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 35B).



**Şekil 35. A. HEK293 BH-, BH+ doğal tip, ΔF166, A13S ve T-24A stabil hücre hatlarında mimics-miR27a uygulanmasının ardından ODC anlatım profiline ait immunoblotlama sonucu, B. Total poliamin miktarının HPLC yöntemi ile gösterilmesi (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.001$ ).**



## BÖLÜM V. TARTIŞMA

Büyüme Hormonu Serbest Bırakma Hormonu (BHSBH) ve somatostadin tarafından salınımı kontrol edilen BH, hipofiz bezinin ön lobundaki hücrelerden salınan postnatal büyüme, protein, karbonhidrat ve yağ metabolizmaları üzerinde önemli rollere sahip peptit hormondur. Yaşa bağlı serum seviyesinde azalma görülen BH uyku [69], stres, egzersiz ve travma gibi durumlarda yükselirken, hamilelikte düşerek yerini BH-V bırakmaktadır [70]. Hipofizden salınan BH'nin ilk hedefi karaciğerde IGF-I sentezini uyararak kemik ve kas dokusu üzerinde gelişimi etkilemektir. Ayrıca BH'nin kas ve kemiklerde lokal IGF-I sentezini uyararak gelişim üzerinde direkt etkisi olduğu gösterilmektedir [71]. BH biyolojik fonksiyonlarını yalnız BH'nin bağlandığı reseptör olan BHR bağlandıktan sonra reseptörün intraselüler kısımlarının fosforilasyonu ve STAT-1 ile STAT-3, STAT-5 [72] aktive ederek hedef genlerin (IGF-1, c-fos, c-jun, cyp 2/3, jun-B) ekspresyonu ile gerçekleştirilmektedir [73]. Bazı durumlarda hem çocuklarda hem de erişkinlerde BH az veya biyolojik olarak inaktif BH salgılanmaktadır. Böyle durumda çocuklarda ve erişkinlerde BHE sendromu ortaya çıkmaktadır [74]. Çocuklarda boyca geriliğe, erişkinlerde sosyal izolasyon, uyku düzensizliği, kardiyovasküler mortalite ve mobiliteye neden olan BHE, BH verilmesi ile tedavi edilmektedir. Ayrıca BH, genetik kaynaklı büyüme geriliği görülen PWS, Noonan, TS sendromları, spida bifa, son dönem böbrek yetmezliği gibi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır.

BH başta uzun kemiklerin gelişimi ile birlikte protein, yağ ve karbonhidrat metabolizması üzerindeki etkilerinin bilinmesi ile beraber vücutta birçok metabolizma ile ilişkisi gösterilmiştir. Sinir sistemi, immun sistem gibi pek çok sistem ile ilişkisinin olması BH'nin esas fonksiyonel bir hormon olduğunun yanında periferik anlatımının önemini ortaya koymaktadır [75]. BH proteini, insanın 17. kromozomunda konumlanan BH-N geni üzerinden anlatımı olan BH'nun farklı etnik kökene sahip kişilerde bebeklik, çocukluk veya erişkin dönemde genlerinde pek çok mutasyon varlığı tespit edilmiştir [45]. BH-N genindeki delesyon, insersiyon, nokta mutasyonları ile İzole Büyüme Hormonu Eksikliği (İBHE) sendromu mutasyon tipine göre I, II, III ayrılmış ve rekombinant BH verilerek mutasyona bağlı biyolojik olarak inaktif BH etkisi yerini alarak tedavi stratejileri geliştirilmiştir [18]. 1950-1960 yıllarında BH tedavisi için kullanılan BH kadvraların hipofiz bezinden izole edilen preparatlardan elde edilmiştir [76] ama zaman içerisinde bu şekilde tedavi edilen kişilerde CJH gelişiminin

görülmesi ve ayrıca BHE görülen kişilerin ölmesi sonucu kadavral kaynaklı BH'nin tedavi amaçlı kullanılması engellenmiştir [77]. Bu zaman sürecinde balık, ördek, kurbağa, koyun, maymun, insan [78] gibi çeşitli canlılarda BH geninin klonlanması ile BH-N geninin nükleotit ve BH proteininin amino asit dizisinin belirlenmesi söz konusu olmuştur. Klonlanan iBH-N geni mayalar, bakteriler, böcek, bitki ve memeli hücrelerinde eksprese edilmiş ve transgenik hayvanların süt ve idrarlarında üretilmiştir [79] [80].

BH'nin vücutta az salgılanmasına bağlı olarak gelişim bozukluğu olduğu durumda BHE sendromunda sadece BH-N geninde mutasyonlardan kaynaklanan farklı etnik kökene sahip İBHE çocuklarının BH-N geninde mutasyonların tespit edilmesi ile belirlenmiştir. BH-N gen mutasyonlarına göre İBHE; Tip IA, Tip IB, Tip II ve Tip III [81] [82] olarak tespit edilmiştir. İBHE Tip IA çocuklarda bu zamana kadar 45, 7.6, 7.0, 6.7 kb büyük delesyonlar ile sinyal peptidindeki amino asit kodlarının dur kodonuna dönüşüm sonucu BH proteininin sentez edilmediği mutasyonlar [83], İBHE Tip IB intron 4 tek nükleotit değişim mutasyonları sonucu splise atlama mutasyonları ile BHSBHR geninde çeşitli mutasyonlar tespit edilmiştir [84]. İBHE Tip II ise hem intron 3 tek nükleotit değişikliği sonucu ekson 3 atlanması hem de BH proteininde amino asit değişikliğine neden olan nokta mutasyonlar tespit edilmiştir. BHE Tip II olan çocuklarda intron 3 atlanmasına neden olan splise hata mutasyonları yanında yanlış anlam mutasyon varlıkları belirtilmiştir. BH-N geninin 4.eksonunda 307C>T dönüşümü sonucu BH proteininde arjinin sisteine (R103C) dönüşümü tespit edilirken ayrıca 406G>T dönüşümü BH proteininin 136. amino asidi olan valinin fenilalanine (V136F) [85], 413A>G dönüşümü ile BH proteininin 138. amino asidi olan aspartik asidin glisine (D138G) dönüşümü de tespit edilmiştir. Ayrıca BH-N geninin 5. eksonunda guaninin adenine dönüşümü sonucu BH-N proteinin 183. aminoasidi arjinin histidin amino asidine (R183H) dönüşümü ve bu mutasyonlardan başka T-24A, E33G, N47D mutasyonları da tespit edilmiştir. Bu zamana kadar literatürde T-24A, N47D, W7X, S71F gibi mutasyonların JAK/STAT sinyali üzerine etkisi lusiferaz deneyi ile sadece irdelenmiştir. Ancak Ülkemiz İBHE sendromlu çocuklarda tespit edilen ΔF166 BH mutasyonunun biyolojik aktivitesi JAK/STAT sinyali üzerinden ortaya konulmamıştır. Bu bilgiler ışığında A13S, ΔF166, T24A BH mutasyonlarının doğal tip BH sinyaline kıyasla biyolojik aktivitesinin, EMT dönüşümü ve PA anabolizması üzerine etkisinin irdelenmesi için HEK293 *in vitro* hücre modeli aracılı ortaya konuşması bu tezin amacını oluşturmuştur. Bu amaç kapsamında bu tez ile

pozitif kontrol olarak doğal tip BH anlatımı yapan HEK293 stabil hücre hattı ve biyolojik aktivitesi irdelenmek istenen A13S, ΔF166, T24A BH mutasyonlarını içeren HEK293 hücreleri kıyaslanarak BH transkripsiyonel, translasyonel, besi yerine salınım profilleri ile STAT biyolojik aktiviteleri irdelenmiştir. Tez sonuçları göstermektedir ki, doğal tip hücrelerde BH sentezi hem transkripsiyonel hem de translasyonel açıdan gerçekleştirilek STAT5 biyolojik aktivitesini lusiferaz deneyi ile gösterilmiştir. BH kendi reseptörü olan BHR ile bağlanmasını takiben, intrasellüler reseptör otofosforilasyonunu takiben JAK2 aktivasyonuna bağlı STAT moleküllerinin fosforile olması BH sinyalinin esas sinyal iletim basamağı olarak bilinmektedir. Fosforile olan STAT1/3 ve/veya STAT5 dimerlerinin nuklear lokalizasyonu sonucu BH sinyalinin aşağıda yolak elemanları olan c-myc, c-fos, cjun gibi onkogenik gen anlatımlarının arttığı bilinmektedir [86]. BH sinyalinin esas biyolojik aktivitesinde rol alan STAT moleküllerinin hedef olması nedeni ile STAT1, 3, 5 anlatım profili A13S, ΔF166, T24A mutant BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde transkripsiyonel ve translasyonel varlığı belirlense de bu etkinin doğal tip BH proteinine kıyasla daha düşük olması A13S, ΔF166, T24A mutasyonlarının BH sinyali üzerine ket vurucu etkisi ilk defa bu tez kapsamında gösterilmiştir. Eş zamanlı olarak lusiferaz deneyi ile STAT5 aktivasyonun doğal tip BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde A13S, ΔF166, T24A mutant BH kıyasla belirgin STAT5 biyolojik aktivitesinin düştüğü gösterilmiştir. İBHE sendromlu çocuklarda tespit edilen BH gen mutasyonlarının mutant BH biyolojik aktivitesi üzerine çalışmalar irdelendiğinde, R77C mutant BH ile doğal tip BH arasında STAT-5 aktivitesi üzerine belirgin olarak ket vurma profili mutasyon kaynaklı lusiferaz deneyi ile tespit edilememiştir [87]. Bu tez kapsamında irdelenen T24A mutasyonun BH proteinin sinyal peptidinde Treonin Alenine dönüşümü sonucu BH üretimi ve BH'nin BHR bağlanmasını etkilemediği böcek hücrelerine transfekte edilen T24A mutasyonu içeren BH geninin hücrelerde BHR bağlanma ve JAK/STAT sinyal yolağını etkilemediği tespit edilmiştir. Ancak N47D yanlış anlam mutasyonun fare hipofiz bezinden BH salınımını düşürdüğü ve BH eksprese eden böcek hücrelerinde doğal tip BH kıyasla %50 civarında STAT5 aktivasyonunu düşürdüğü gösterilmiştir [88]. Sonuç olarak BH gen mutasyonlarının her birinini BH sinyali üzerinde farklı ket vurucu etkisi sadece STAT5 biyolojik aktivitesi irdelenerek farklı olarak tespit edilmiştir.

BH esas aldığı sinyal yollarından biri olan JAK/STAT sinyalinin BH biyolojik aktivitesini gerçekleştirmede önemli olduğu, JAK-2 tarafından fosforile olan BHR'nin intraselüler bölgesindeki tirozin amino asitlerine bağlanan STAT molekülleri JAK-2 tarafından fosforile edildiği ve iki STAT-5 molekülünün STAT-5 dimerleri oluşturup STAT-5: STAT-5 dimerinin çekirdeğe giriş yaptıktan sonra BH biyolojik etkisini göstereceği BH cevap genlerini aktive ettiği tespit edilmiştir [89]. BH'nin hedef genleri arasında IGF-I ve Serin Proteaz İnhibitör (Spi 2.1), Cyp 2/3, c-fos, c-jun, jun-B ve c-myc gibi proto-onkogenlerde bulunmaktadır. Bu bilgi ışığında STAT5 aktivitesini takiben doğal tip ve A13S, ΔF166, T24A mutant BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde BH aşağıda yolak elemanlarının anlatım profili zamana bağlı olarak irdelenmiştir. Doğal tip BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde c-jun ve c-myc anlatımlarının BH yoksun HEK293 hücrelerine kıyasla belirgin olarak arttığı gösterilmiştir. Ancak hem c-jun hem de c-myc anlatımının A13S mutant BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde doğal tip BH kıyasla düştüğü görülürken, ΔF166, T24A mutasyonu taşıyan hücrelerde ise sadece c-myc anlatımı üzerinde ket vurucu etki tespit edilebilmiştir. 24 saat zaman zarfında elde edilen bu sonuçlar 48 saat sonunda ΔF166, T24A mutasyonları için c-jun anlatımı üzerinde ket vurucu etkinin 24 saate kıyasla daha belirgin olduğu gösterilmiştir. Böylece A13S, ΔF166, T24A mutasyonlarının zamana bağlı BH sinyali üzerinde c-fos ve c-myc anlatımı üzerinden etkin ket vurma potansiyeli ilk defa bu tez kaspamında ortaya konulmuştur.

Postnatal büyüme üzerinde etkisi ortaya konan peptid hormon olan BH'nun, amino asit, karbonhidrat, yağ metabolizması üzerinde biyolojik aktivitesi olması ve hipofiz bezi dışında periferik BHR anlatım durumu kaynaklı BH'nin kemik proliferasyon, gelişimi, büyüme üzerine etkisi *in vitro* ve *in vivo*'da gösterilmiştir [90] [91]. Bu çalışmalar istinaden A13S, ΔF166 ve T24A mutasyonlarının BH sinyali kaynaklı hücre büyümesi, bölünmesi üzerine etkisi tez kapsamında modellenmeye çalışılmıştır. Otokrin BH sinyali indüklenen MDA-MB-231, MDA-MB-453 ve MCF-7 meme kanseri hücrelerinde c-jun, c-fos gibi onkogenlerin anlatımının artmasına bağlı olarak parental hücrelere kıyasla hücre bölünme, proliferasyon, koloni çaplarında artış tespit edilmiştir [92]. Laboratuvarımızda gerçekleştirilen bir başka çalışma kapsamında T47D meme kanseri hücrelerinde plazmit aracılı üretilmesi tetiklenen BH proteinin hücre çoğalması, invazyon-metastazı indüklediği EMT ile ilişkili olarak gösterilmiştir. Literatürdeki bilgiler ışığında biyolojik olarak aktif BH sinyalinin BH salgısı olmayan hücrelere kıyasla bölünme üzerine indükleyici etkisi olduğu ve zamana bağlı olarak

meme kanseri dışında ilk defa HEK293 hücrelerinde gösterilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan bu sistem ile A13S,  $\Delta$ F166, T24A mutant BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde hücre bölünmesinin doğal tipe göre daha az etki ettiği, HEK293 hücrelerinde koloni çapını biyolojik olarak aktif BH sinyaline kıyasla bu etkinin azaldığı tez çalışmasında tespit edilmiştir. Bu etkinin VEGF anlatımı üzerinde T24A BH mutant sinyalinde zamana bağlı olarak doğal tipe kıyasla baskılandığı belirlenirken, 48 saat sonunda  $\Delta$ F166 mutasyonunda BH mutasyonuna bağlı ket vurucu etki gösterilebilmiştir. Literatürdeki bilgiler ile paralellik gösterdiği üzere doğal tip BH sinyalinin HEK293 hücrelerinde hücre bölünmesi, koloni oluşumunu indüklemesine karşın A13S,  $\Delta$ F166, T24A mutasyonlarının BH sinyaline ket vurucu etkisi özellikle 48 saat zaman zarfında daha kesin olarak belirlenmiştir.

Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), hücre-hücre ve hücre-hücre dışı matriks (ECM) etkileşimlerinin, hücre iskeleti, hareket kabiliyeti kazandırmak için yeniden düzenlenmesi olarak tanımlanmıştır. Aktin hücre iskeleti, komşu hücreler arasında doğrudan kimyasal etkileşimlere ve ara filament hücre iskeletine bağlı desmozomlara ve integrinlerin ve diğer moleküllerin aracılık ettiği hücre-ECM etkileşimlerinde kaderin bazlı bağlar rol almaktadır [93]. Mezankimal hücreler, yeni bileşenleri sentezleyerek ve organize ederek ve ECM'yi matriks degrade edici metalloproteinazlar (MMP'ler) üretmek için yeniden modüle edilerek ECM'ye katkıda bulunmaktadır. Mezenkimal hücreler, heptosit (HGF), epidermal (EGF) ve fibroblast (FGF) ailelerinin büyüme faktörleri ve transforme edici büyüme faktörü  $\beta$  (TGF $\beta$ ) de dahil olmak üzere epitelyal hücreler üzerinde etkili olan sinyal verici proteinlerin bol kaynakları olarak bilinmektedir [94]. EMT, apoptotik ajanlara karşı artan direnç sağlayarak tümör ilerlemesinde de rol oynamakta ve merkezi tümörün malignitesini arttıran destekleyici dokular üretmektedir. EMT'nin kontrolünde birçok sinyal yolunun ima edilmesi açık bir şekilde tespit edilmiştir [95]. Ayrıca Snail, Slug ve ETS ailesinin transkripsiyon faktörleri ile transkripsiyon faktörü SIP-1, EMT hedef genlerinin regülasyonunda doğrudan rol oynamaktadır [96]. Plazmit aracılı insan BH ekspresyonu kazandırılan HEK293 hücrelerinde hücre proliferasyonu, canlılık, onkojenite, EMT dönüşümünü indüklediği meme, prostat ve kolon kanseri hücrelerinde *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiştir. Ayrıca BH anlatımı kazandırılmasının kolon kanseri hücrelerinde ERK1/2 aktive ederek, fibronektin mezenşimal markırı anlatımını arttırdığı, epitel markır olan E-kaderin anlatımını baskıladığı zenograft fare modellerinde gösterilmiştir [92] [97]. Otokrin BH sinyaline

sahip MCF-7 meme kanseri hücrelerinin BH sinyali eksik olanlara kıyasla hücre farklılaşması, proliferasyonu, apoptoz ve metastaz ile ilgili genlerin ekspresyonunu modüle eden transkripsiyon faktörü NF- $\kappa$ B p65'i arttırdığı ve E-kaderinin azaldığı gösterilmiştir [98]. Bununla paralel şekilde otokrin BH sinyalinin MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde invazyon-metastatik profili Slug, Snail, Vimentin, N-kaderin anlatımını arttırarak, E-kaderin anlatımını baskılayarak gerçekleştirdiği ifade edilmiştir [99]. Literatürdeki bu bilgiler ile benzer şekilde otokrin BH sinyali yaratılan HEK293 hücrelerinde E-kaderin anlatımının azaldığı, N-kaderin, Snail ve vimentin anlatımının arttığı belirlenerek yaptığımız çalışma kapsamında yarattığımız BH *in vitro* modelinde biyolojik olarak aktif BH sinyalinin yaratıldığı belirlenmiştir. Ayrıca literatürde ilk defa A13S mutant BH sahip hücrelerin doğal tip BH sahip hücrelere kıyasla Snail anlatımının daha düşük olduğu, N-Kaderin ve vimentin anlatımlarının doğal tipe kıyasla daha düşük olduğu ilk defa bu çalışmada tespit edilmiştir. Ancak  $\Delta$ F166 mutant BH ise A13S kıyasla vimentin, Snail anlatımının daha düşük olduğu ve Slug anlatımının tamamen ortadan kaybolduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak A13S,  $\Delta$ F166, T24A mutasyonlarının doğal tip BH kıyasla hücre proliferasyonu, bölünme üzerine indükleyici etkisinin düşük olmasının EMT sinyali anahtar molekülleri üzerinde zamana bağlı olarak farklı anlatım profili sergilemesi ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir.

Hücre büyümesi ve farklılaşmasının önemli düzenleyicileri olan PA'lar, DNA, RNA ve protein sentezinden sorumlu olarak bilinmektedir. Poliaminleri enerjiye bağımlı taşıma yoluyla ve yüksek düzeyde düzenlenmiş ornitin dekarboksilazın (ODC) katalize ettiği bilinmektedir. ODC'nin inaktivasyonu esas olarak, ODC'ye bağlanan, 20-25 kDa poliamin ile indüklenen bir protein olan antiyyme (AZ) tarafından etkisiz hale getirilir, 26S proteazomun bozunması için hedef oluşturmaktadır [100]. Poliamin biyosentezinden sorumlu enzim olan ODC'nin pozitif düzenleyicisi olan c-myc yanında EMT sürecinde esas role sahip olan matriks metalloproteinaz (MMP1, MMP2), TGF- $\beta$ 1 ve kollajen tip I mRNA'nın transkripsiyonunu etkilediği gösterilmiştir [101]. Otokrin BH kazandırılmış meme kanseri (MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453) hücrelerinde parental hücrelere kıyasla ODC anlatımının indüklendiği ve PA miktarının arttığı gösterilmiştir. Bu süreçte NF- $\kappa$ B sinyaline bağlı Snail, Slug anlatımının artarak EMT (MMP-2, MMP-9, vimentin anlatımında artış) tetiklediği tespit edilmiştir [92]. Ayrıca farelere BH yanında, prolaktin verilerek ODC aktivitesinin zamana bağlı olarak arttığı tespit edilmesi ile BH'nin büyümeyi

indüklenme esnasında büyüme üzerinde rolü olan PA sentezinden sorumlu ODC enziminin aktivitesini indükleyerek gerçekleştirdiği ifade edilmiştir [102]. Yaptığımız tez çalışması ile otokrin BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerinde ODC anlatımının zamana bağlı olarak parental HEK293 hücrelerine kıyasla arttığı, ODC anlatımındaki artışa bağlı olarak hücre içi PA miktarının (Put) arttığı gösterilmiştir. Ancak 24 saat zarfında ODC anlatımı yüksek olan A13S,  $\Delta$ F166 mutasyonu taşıyan HEK293 hücrelerinde ODC anlatım profili 48 saat içinde doğal tipe kıyasla düştüğü özellikle  $\Delta$ F166 ve T24A mutasyonlarının belirgin bir şekilde ODC anlatımını BH yoksun hücrelere benzer şekilde olduğu tespit edilmiştir. ODC anlatım profili ile paralel olarak put seviyesinin doğal tip BH anlatımı yapan HEK293 hücrelerine kıyasla  $\Delta$ F166, T24A mutasyonlarında ciddi düşüşün varlığı tespit edilmiştir.

19-25 nükleotitden oluşan, endojen, küçük, tek zincirli, kodlamayan RNA'lar olan mikroRNA (miRNA)'lar, post-transkripsiyonel açıdan hedef genleri mRNA'larının 3'-UTR bölgelerine bağlanarak susturdukları belirlenmiştir [103]. İnsanda 1800 yakın miRNA varlığı tespit edilmiş ve 1990 yılında tespit edilen küçük RNA molekülleri geniş çapta biyolojik ve patolojik olaylarda görev almakta oldukları belirlenmiştir [104]. RNA yapısına sahip olmalarına rağmen miRNA molekülleri RNA gibi degradasyona hassas olmadıkları ve hücre dışı sistemlerde serumda düşük/yüksek pH, yüksek sıcaklık, çoklu dondurma/çözme durumlarında stabil oldukları tespit edilmiştir. Serum miRNA varlıkları üzerine iki hipotez öne sürülmektedir; miRNA hücre ve dokulardan salınmakta veya biyolojik sıvılardaki hücrelerin hücresel aktivitelerine bağlı üretilerek dolaşıma katıldığı ifade edilmektedir [105]. Saptanabilirliği ve günümüzde sıklıkla kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılabilmesi yönünden sirküler miRNA'ların sistemik hastalıkların teşhisinde güçlü bir biyomarkır ve aynı zamanda terapilerde potansiyel hedef olarak kullanılması öngörülmektedir. Birçok transkripsiyon faktörü Twist, ZEB1, ZEB2, Snail ve Slug olmak üzere EMT ve tümör metastazının indükleyicileri olarak bildirilmiştir. Literatür kapsamında miR-205 ve miR-200 ailesi (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 ve miR-429), yeni epitel markerleri ve baskılayıcıları olarak tanımlanmıştır [51].

miRNA'ların hücre büyümesi, proliferasyonu, apoptoz, immün sistem ve hücre farklılaşması mekanizmaların düzenlenmesinde hedef aldıkları genlerin anlatımlarını etkilemeleri nedeniyle önem arz ettikleri ve biyolojik sıvılarda varlıkları nedeni ile pek çok metabolik hastalık teşhisinde biyomarkır olma durumu üzerinde çalışılmıştır. miRNA anlatım durumlarının obezite [106], Alzheimer [107] şizofreni ve kanser

[108] gibi pek çok hastalık için hedef genlerin anlatımı üzerinden etki ederek hastalık patogenezi üzerindeki etkileri gösterilmektedir [108]. Transkriptomik çalışmalardan elde edilen veriler miRNA hedeflerinin pek çok metabolizma hastalığının teşhisine olanak sağlayacak markır olarak ön görülmesi söz konusudur. Bu hedef doğrultusunda BH ile ilişkili miRNA anlatımları üzerine pek çok *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar mevcuttur. rBH tedavisi uygulanan kişilerin serumlarında yapılan miRNA array çalışmalarına göre 1063 miRNA anlatımında artış, 360 miRNA anlatımında azalma tespit edilmiştir. Bunların arasından en belirgin olanları IGF-I sinyali üzerinden yağ metabolizması, iskelet gelişimi ile ilişkili olan [İnsülin sinyali (PTEN), Kollajen ve kollajen matürasyon (COL3A1, SPARC), Miyokinler (SPARC), (FSTL1)] genlerin anlatımını baskılayan miR-29a anlatımında azalma gösterilmiştir [109]. Özellikle BH ile ilişkili serum miRNA anlatım durumu incelemeleri için referans olarak gösterilen Kelly, B.N. 2013 yılında yapılan çalışmaya göre rBH (1-10 µg/kg/gün) tedavisi uygulanan kişilerin serumlarında normal kişilere kıyasla miRNA Array yöntemi ile miR-2861, miR-663, miR-3152, miR-3185, anlatımlarında BH tedavisi uygulananlarda azaldığı gösterilmiştir [110]. Ancak bu tez ile HEK293 hücrelerinde miR-2861, miR-663, miR-3152, miR-3185 anlatım profillerinin zamana bağlı olarak biyolojik aktif BH sinyali ile istatistiksel olarak anlamlı olarak anlatımlarının artış göstermesi tespit edilmiştir. Biyolojik olan BH sinyaline ket vurma potansiyeli bulunan A13S, ΔF166, T24A mutant BH'ların anlatımının ise BH sinyali yoksun hücreler ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Literatüre ters düşen bu sonucun *in vitro* ile *in vivo* arasındaki fark kaynaklı olabileceği, ayrıca insanlara uygulana rBH miktarının tez kapsamında oluşturulan model sisteme kıyasla daha yüksek olmasına bağlı olabileceği kaynaklı olabilir. Ayrıca BH yüksek anlatım yapan hipofiz adenoma hücrelerinde miRNA anlatım durumları irdelenmiş, miR-145 anlatımının BH salınımı yapan hipofiz adenoma hücrelerinin normal hipofize kıyasla anlatımında belirgin azalma olduğu, bu miRNA'nın cluster analizlerine göre MAPK, cyclin D2, myc, kras, fos, İnsülin reseptör substrat-1 genlerinin anlatımı üzerinde de etkisi olduğu tespit edilmiştir. Hipofiz adenoma hücrelerinde yeni olarak miR-769-5p, miR-885-5p, miR-886-5p, miR-890 tespit edilmiştir [61]. Ayrıca miRNA tarafından BH bağlandığı BHR'nin anlatımının engellendiğine dair gösterilen miRNA'ların miR-129-5p, miR-142-3p, miR-202 ve miR-16 olduğu gösterilmiştir [111]. Otokrin/parakrin BH anlatımı kazandırılan MCF-7 ve T47D meme kanseri hücrelerinde hücre büyüme ve farklılaşmanın Epitel Mezenşimal Transizyon (EMT) indüklemesi yanında BHR,



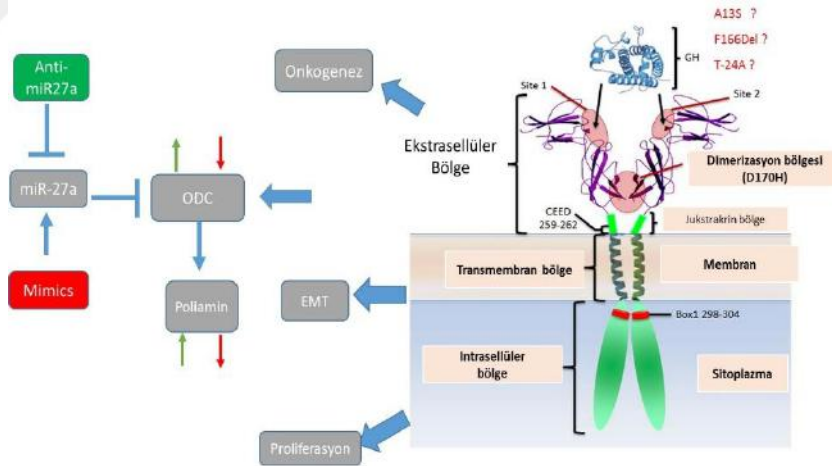
STAT-3, STAT-5 hedef alan miRNA'lerden, miR-96, miR-182, miR-183 anlatımının belirgin olarak tespit edilmiştir [112]. miRNA'ların BH sentez ve salınımı üzerine etkisinin ortaya konulması için sporcularda doping durumunun irdelenebilmesi için serum miRNA anlatım düzeylerinin rBH alınmasına bağlı anlatımında arttığı tespit edilen serum miRNA teşhis amaçlı kullanılması ön görülmüştür [113]. Prop1 geninde nokta mutasyonuna bağlı olarak hipofiz gelişiminden eksik olan (BH, prolaktin ve tirotropin eksikliği olan) Ames çüce farelerin karaciğerlerinde yapılan qRT-PZR Array analizine göre miRNA-27a'nın belirgin olarak anlatımı artan 10 miRNA arasında olduğu tespit edilmiştir [114]. Bu çalışmaya göre *in vitro* reporter deneyleri ve hücre içi ekspresyon analizlerine göre anlatımında artış görülen miRNA-27a ile olası ön görülen hedef genlerden PA biyosentezinden sorumlu ODC geninin anlatımında azalma görülmüştür [110]. miR-27a anlatımının azalması ile makrofajların aşırı inflamatuvar yanıtı sınırlandırdığı önemli bir negatif feedback mekanizması olarak çalıştığını göstermektedir. miR-27a'nın TLR2 veya TLR4 ile aktive edilen makrofajlarda azaldığı, makrofajların TLR2/4 stimülasyonu ile aktivasyonunu azalttığı ve artan IL-10 ekspresyonu ile çakıştığı gösterilmiştir. IL-10'un azalmış ekspresyonu nedeniyle, miR-27a'nın artması, TLR4 ile aktive edilmiş makrofajlarda IL-10'a bağlı STAT-3 fosforilasyonunu azaltmıştır [115]. Literatür bilgisi ışığında MDA-MB-231 hücrelerinde miR-27a'nın onkogenik aktivitesi, kısmen *ZBTB10G* ve Myt-1'in (miyelin transkripsiyon faktör-1) baskılanmasından kaynaklandığı bildirilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde CDK-2/siklin B inhibitörü Myt-1'i baskıladığını ve böylece G2/M'de hücreleri durdurarak kanser hücresi bölünmesini bloke eden bir geni baskılayarak meme kanseri hücre çoğalmasını kolaylaştırdığı gözlemlenmiştir. Varsayılan bir SP (spesifik protein) baskılayıcı olan çinko parmağı *ZBTB10G* genini düzenlediği öne sürülen miR-27a nedeniyle olabileceği öngörülmüştür.

miR-27a'nın varsayılan spesifik protein baskılayıcı *ZBTB10*'u bastırdığını gösteren yeni bir çalışma, miR-27a'nın SP proteinlerinin aşırı ekspresyonunda rol oynayabileceğini öne sürmüştür [116]. Bu bilgiler doğrultusunda yaptığımız çalışma ile BH salgısı üzerinde negatif regülatör olarak ifade edilen miR-2861, miR-663, miR-3152, miR-3185 yanında miR27a anlatım profillerinin biyolojik olarak aktif BH salınımı yapan HEK293 hücreleri ile A13S, ΔF166 ve T-24A BH mutant sinyale sahip HEK293 hücrelerinde anlatım profilleri irdelenmiştir. Bu tez ile literatürde BH ile miktarının düştüğü tespit edilen miR-2861, miR-663, miR-3152, miR-3185

profillerinin HEK293 *in vitro* model sisteminde artış gösterdiği tespit edilmesi literatür ile ters düşmüştür. Bu sonucun nedeni insan serum seviyesinde likit biyopsi için veya BH doping tespit için markır olarak ifade edilen miR-2861, miR-663, miR-3152, miR-3185 miRNA anlatımlarının (Kelly, B. et. al. 2013) bu tez ile yaratılan *in vitro* HEK293 hücre modelinde hücrel miRNA havuzunun konuşmasında farklılık yaşanmış olabileceği, belki BH sinyalinin miR-2861, miR-663, miR-3152, miR-3185 üzerinde inhibitif etti göstermesi söz konusu olabilir. Cüce farelerdeki (BH sinyali yoksun) ODC anlatımının düşmesine bağlı, PA seviyesinin azaldığı gösterilen literatürdeki bu çalışmaya göre miR-27a anlatımının arttığı gösterilmiştir [117]. *In vivo* BH fare modellerinde yapılan çalışma ile BH eksikliği olan cüce farelerde miR-27a anlatımının yüksek olduğu ODC anlatımının düşük olduğu, anti-miR27a uygulaması yapıldığında ise ODC anlatımının arttığı gösterilmiştir [114]. Bu bakış açısına göre ODC ile BH sinyali arasındaki etkileşimin moleküler mekanizmasının irdelenmesi ve A13S, F166Del, T24A mutasyonlarının farklı BH sinyaline bağlı olarak sistemdeki rolünün irdelenmesi ve mekanizmasının açıklığa kavuşturulması amacı ile miR-27a özgü anti-miRNA, mimics transfeksiyonunu takiben HEK293 hücrelerinde hücre bölünme, proliferasyon, koloni çap profili irdelenmiştir. Anti-miR27a transfeksiyonu ile inhibe olan miR27a'nın hücre proliferasyon ve bölünmeyi arttırdığı, ODC anlatımını indükleyerek PA miktarını yükselttiği bu tez kapsamında ilk defa gösterilmiştir. Ayrıca ΔF166 mutant BH anlatımı yapan HEK293 hücrelerinde A13S ve T-24A mutant BH anlatımı yapan HEK293 hücrelerine kıyasla koloni oluşumunun daha fazla indüklendiği tespit edilmiştir. Literatürde yaptığımız bu çalışma ile biyolojik olarak aktif BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerine anti-miR27a uygulanması ile ODC anlatımının arttığı, bu etkisini özellikle ΔF166 mutasyonuna sahip HEK293 hücrelerinde gösterdiği görülmüştür. Böylece BH sinyalinin aktif olarak varlığı durumunda indüklenen hücre proliferasyonunun ODC inhibitörü olarak literatürde ifade edilen miR27a inhibe edildiği durumda ODC seviyesinin artışına bağlı PA miktarının hücre proliferasyon, bölünmeyi indüklediği ve bu etkinin BH gen mutasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu bakış açısına ters olarak moleküler mekanizmanın aydınlatılabilmesi için miR-27a hedef alan mimic ile miR27a'nın taklit edilmesi durumunda anti-miR uygulamasının tersi olarak bu tez kapsamında hücre bölünme, proliferasyon, koloni çapının düştüğü tespit edilmiştir. Ayrıca eş zamanlı olarak ODC anlatımının baskılanmasına bağlı PA miktarının

azaldığında HEK293 BH+, A13S, F166Del, T24A mutant BH sinyalinde ilk defa bu tez kapsamında gösterilmiştir.

Sonuç olarak BH sinyalinin hücrelerde proliferasyon, bölünme, koloni oluşumunu EMT üzerinde etki ederek HEK293 hücrelerinde gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca BH sinyali ile paralel olarak ODC anlatımının BH sinyalinin aşağı yolak elemanı olan c-myc üzerinden indükleyerek PA miktarını arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca literatürde bu süreçteki rolü modellenmemiş BH A13S, F166Del, T24A mutasyona sahip BH sinyalinin ise doğal tip BH kıyasla daha az oranda EMT sinyalini indüklediği, PA anabolizması üzerine etki ettiği gösterilmiştir. Ayrıca ODC ile BH sinyali arasında konuşmada rol alabileceği düşünülen miR27a'nın moleküler mekanizmasının aydınlatılması için anti-miR ve mimics uygulaması ile HEK293 doğal tip, A13S, F166Del, T24A mutant BH sinyaline sahip HEK293 hücrelerde hücre proliferasyon, bölünme ve koloni çapının miR27a'nın ODC üzerindeki inhibitif etkisinin ortadan kaldırılması ve/veya indüklenmesi durumunda PA miktarının hücreler arası farklılaşma ve sağ kalım sürecinde önemi ilk defa ortaya konulmuştur. Tez kapsamında elde edilen sonuçların özetlendiği şematik şekil aşağıda verilmiştir (Şekil 36).



Şekil 36. Tez sonuçlarının şematik açıklaması.

Bu tez kapsamında elde edilen *in vitro* verilerin *in vivo* fare modellerinde irdelenmesi ile BH sinyalinin çok anlatımının olduğu Akromegali hastalığı veya BH gen mutasyonuna bağlı olarak İBHE sendromu maruz çocuklarda postnatal gelişmeye ket vurmanın PA metabolizması ve miRNA anlatım profillerine göre irdelenmesi ile teşhis veya tedaviye yönelik girişimler söz konusu olabilecektir. Ayrıca ilerde gerçekleştirilmesi hedeflenen *in vivo* çalışmalar ile mutant BH proteinin akromegali

gibi durumlarda doğal tip BH ile yarışcıl olarak BHR bağlanma yapmasını takiben inhibitif sinyal etkisi ile terapötik potansiyeli, mutant protein ilaç katagorisinde umut vaadedici sonuçlara ulaşma potansiyeline sahiptir.



## KAYNAKLAR

- [1] J. Herrington, L. S. Smit, J. Schwartz, and C. Carter-Su, "The role of STAT proteins in growth hormone signaling," *Oncogene*. 2000.
- [2] S. KURTOĞLU, M. A. AKIN, and L. AKIN, "Büyüme Hormonunun Metabolik ve Yaşam Kalitesine Etkileri.," *J. Pediatr. Dis. / Çocuk Hast. Derg.*, 2013.
- [3] S. Blüher, J. Kratzsch, and W. Kiess, "Insulin-like growth factor I, growth hormone and insulin in white adipose tissue," *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005.
- [4] A. Vijayakumar, S. Yakar, and D. LeRoith, "The intricate role of growth hormone in metabolism," *Frontiers in Endocrinology*. 2011.
- [5] C. Soendergaard, J. A. Young, and J. J. Kopchick, "Growth hormone resistance- Special focus on inflammatory bowel disease," *International Journal of Molecular Sciences*. 2017.
- [6] A. K. Rines, K. Sharabi, C. D. J. Tavares, and P. Puigserver, "Targeting hepatic glucose metabolism in the treatment of type 2 diabetes," *Nature Reviews Drug Discovery*. 2016.
- [7] Z. Fu, E. R. Gilbert, and D. Liu, "Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes.," *Curr. Diabetes Rev.*, 2013.
- [8] R. Wolff, "Glucosamine and chondroitin sulfate association increases tibial epiphyseal growth plate proliferation and bone formation in ovariectomized rats," *Clinics*, 2015.
- [9] H. E. Bergan-Roller and M. A. Sheridan, "The growth hormone signaling system: Insights into coordinating the anabolic and catabolic actions of growth hormone," *General and Comparative Endocrinology*. 2018.
- [10] A. Oride, H. Kanasaki, and S. Kyo, "Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in modulating hypothalamic-pituitary system," *Reproductive Medicine and Biology*. 2018.
- [11] H. M. Goodman and H. M. Goodman, "Chapter 2 – Pituitary Gland," in *Basic Medical Endocrinology*, 2009.
- [12] L. E. Fridlyand, N. A. Tamarina, A. V. Schally, and L. H. Philipson, "Growth hormone-releasing hormone in diabetes," *Frontiers in Endocrinology*. 2016.

- [13] C. T. Lim and B. Khoo, *Normal Physiology of ACTH and GH Release in the Hypothalamus and Anterior Pituitary in Man*. 2000.
- [14] N. Khatib, S. Gaidhane, A. M. Gaidhane, P. Simkhada, D. Gode, and Q. S. Zahiruddin, "Ghrelin: Ghrelin as a regulatory peptide in growth hormone secretion," *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014.
- [15] P. A. Cattini, X. Yang, Y. Jin, and K. A. Detillieux, "Regulation of the human growth hormone gene family: Possible role for Pit-1 in early stages of pituitary-specific expression and repression," in *Neuroendocrinology*, 2006.
- [16] A. Velegrakis, M. Sfakiotaki, and S. Sifakis, "Human placental growth hormone in normal and abnormal fetal growth," *Biomed. Reports*, 2017.
- [17] N. J. Lanning and C. Carter-Su, "Recent advances in growth hormone signaling," *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2006.
- [18] R. K. Chawla, J. S. Parks, and D. Rudman, "Structural Variants of Human Growth Hormone: Biochemical, Genetic, and Clinical Aspects," *Annu. Rev. Med.*, 2003.
- [19] C. S. Reh and M. E. Geffner, "Somatotropin in the treatment of growth hormone deficiency and Turner syndrome in pediatric patients: A review," *Clinical Pharmacology: Advances and Applications*. 2010.
- [20] M. C. Lacroix, J. Guibourdenche, J. L. Frendo, F. Muller, and D. Evain-Brion, "Human placental growth hormone - A review," *Placenta*, 2002.
- [21] C. Carter-Su, L. Rui, and J. Herrington, "Role of the tyrosine kinase JAK2 in signal transduction by growth hormone," in *Pediatric Nephrology*, 2000.
- [22] D. R. Clemmons, "Metabolic Actions of IGF-I in Normal Physiology and Diabetes," *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 2012.
- [23] M. O. Savage, V. Hwa, A. David, R. G. Rosenfeld, and L. A. Metherell, "Genetic defects in the growth hormone-IGF-I axis causing growth hormone insensitivity and impaired linear growth," *Frontiers in Endocrinology*. 2011.
- [24] F. Zhang *et al.*, "Effect of vascular endothelial growth factor on rat achilles tendon healing," *Plast. Reconstr. Surg.*, 2003.
- [25] C. H. Chang, W. C. Tsai, Y. H. Hsu, and J. H. S. Pang, "Pentadecapeptide bpc 157 enhances the growth hormone receptor expression in tendon fibroblasts," *Molecules*, 2014.
- [26] R. C. Lindsey and S. Mohan, "Skeletal effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I therapy," *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2016.

- [27] J. Ayuk and M. C. Sheppard, "Growth hormone and its disorders," *Postgraduate Medical Journal*. 2006.
- [28] M. J. van Esdonk *et al.*, "How are growth hormone and insulin-like growth factor-1 reported as markers for drug effectiveness in clinical acromegaly research? A comprehensive methodologic review," *Pituitary*. 2018.
- [29] F. Ferrau, A. Albani, A. Ciresi, C. Giordano, and S. Cannavò, "Diabetes secondary to acromegaly: Physiopathology, clinical features and effects of treatment," *Frontiers in Endocrinology*. 2018.
- [30] R. M. Paragliola and R. Salvatori, "Novel somatostatin receptor ligands therapies for acromegaly," *Frontiers in Endocrinology*. 2018.
- [31] M. D. Sharma, A. V. Nguyen, S. Brown, and R. J. Robbins, "Cardiovascular Disease in Acromegaly," *Methodist DeBakey Cardiovasc. J.*, 2017.
- [32] S. Aldallal, "Acromegaly: A challenging condition to diagnose," *International Journal of General Medicine*. 2018.
- [33] V. Petkovic *et al.*, "Evaluation of the biological activity of a Growth Hormone (GH) mutant (R77C) and its impact on GH responsiveness and stature," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2007.
- [34] G. Binder, M. R. Benz, M. Elmlinger, C. D. Pflaum, C. J. Strasburger, and M. B. Ranke, "Reduced human growth hormone (hGH) bioactivity without a defect of the GH-1 gene in three patients with rhGH responsive growth failure," *Clin. Endocrinol. (Oxf)*., 1999.
- [35] S. Stagi, P. Scalini, G. Farello, and A. Verrotti, "Possible effects of an early diagnosis and treatment in patients with growth hormone deficiency: The state of art," *Italian Journal of Pediatrics*. 2017.
- [36] A. Deodati and S. Cianfarani, "The Rationale for Growth Hormone Therapy in Children with Short Stature," *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*. 2017.
- [37] P. E. Mullis, "Genetics of isolated growth hormone deficiency," *JCRPE Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*. 2010.
- [38] H. G. Maheshwari, B. L. Silverman, J. Dupuis, and G. Baumann, "Phenotype and genetic analysis of a syndrome caused by an inactivating mutation in the growth hormone-releasing hormone receptor: Dwarfism of Sindh," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1998.
- [39] D. Ariyasu, H. Yoshida, and Y. Hasegawa, "Endoplasmic reticulum (Er) stress

- and endocrine disorders,” *International Journal of Molecular Sciences*. 2017.
- [40] A. Coker, E. Cetinkaya, B. Dundar, Z. Siklar, A. Buyukgebiz, and A. Arman, “Characterization of GH-1 mutations in children with isolated growth hormone deficiency in the Turkish population,” *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, 2009.
- [41] D. S. Millar *et al.*, “Novel mutations of the growth hormone 1 (GH1) gene disclosed by modulation of the clinical selection criteria for individuals with short stature,” *Hum. Mutat.*, 2003.
- [42] V. Petkovic *et al.*, “Short stature in two siblings heterozygous for a novel bioinactive GH mutant (GH-P59S) suggesting that the mutant also affects secretion of the wild-type GH,” *Eur. J. Endocrinol.*, 2013.
- [43] M. D. Lewis *et al.*, “A novel dysfunctional growth hormone variant (Ile179Met) exhibits a decreased ability to activate the extracellular signal-regulated kinase pathway,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2004.
- [44] A. Besson *et al.*, “Short stature caused by a biologically inactive mutant growth hormone (GH-C53S),” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2005.
- [45] Y. Han *et al.*, “Participation of JAK and STAT proteins in growth hormone-induced signaling,” *J. Biol. Chem.*, 1996.
- [46] M. K. Wendt, T. M. Allington, and W. P. Schiemann, “Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF- $\beta$ ,” *Future Oncology*. 2009.
- [47] S. Lamouille, D. Subramanyam, R. Billelooch, and R. Derynck, “Regulation of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions by micromas,” *Current Opinion in Cell Biology*. 2013.
- [48] L. S. Aroeira *et al.*, “Epithelial to Mesenchymal Transition and Peritoneal Membrane Failure in Peritoneal Dialysis Patients: Pathologic Significance and Potential Therapeutic Interventions,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2007.
- [49] W. Zhang *et al.*, “Autocrine/paracrine human growth hormone-stimulated microRNA 96-182-183 cluster promotes epithelial-mesenchymal transition and invasion in breast cancer,” *J. Biol. Chem.*, 2015.
- [50] B. Colella, F. Faienza, and S. Di Bartolomeo, “EMT Regulation by Autophagy: A New Perspective in Glioblastoma Biology,” *Cancers (Basel)*., 2019.
- [51] J. Zhang and L. Ma, “MicroRNA control of epithelial-mesenchymal transition and metastasis,” *Cancer Metastasis Rev.*, 2012.
- [52] A. Coker-Gurkan, D. Bulut, R. Genc, E. D. Arisan, P. Obakan-Yerlikaya, and N. Palavan-Unsal, “Curcumin prevented human autocrine growth hormone



- (GH) signaling mediated NF- $\kappa$ B activation and miR-183-96-182 cluster stimulated epithelial mesenchymal transition in T47D breast cancer cells,” *Molecular Biology Reports*, 2018.
- [53] A. L. Brittain, R. Basu, Y. Qian, and J. J. Kopchick, “Growth hormone and the epithelial-To-mesenchymal transition,” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2017.
- [54] Z. Zhang, S. Florez, A. Gutierrez-Hartmann, J. F. Martin, and B. A. Amendt, “MicroRNAs regulate pituitary development, and microRNA 26b specifically targets lymphoid enhancer factor 1 (Lef-1), which modulates pituitary transcription factor 1 (Pit-1) expression,” *J. Biol. Chem.*, 2010.
- [55] Y. Liu *et al.*, “Synthetic miRNA-Mowers Targeting miR-183-96-182 Cluster or miR-210 Inhibit Growth and Migration and Induce Apoptosis in Bladder Cancer Cells,” *PLoS One*, 2012.
- [56] R. H. Wang, L. Y. He, and S. H. Zhou, “The role of gene sculptor microRNAs in human precancerous lesions,” *OncoTargets and Therapy*. 2018.
- [57] J. Mak, “RNA interference: More than a research tool in the vertebrates’ adaptive immunity,” *Retrovirology*. 2005.
- [58] J. Winter, S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, and S. Diederichs, “Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation,” *Nature Cell Biology*. 2009.
- [59] A. B. Gilicze *et al.*, “Myeloid-Derived microRNAs, miR-223, miR27a, and miR-652, Are Dominant Players in Myeloid Regulation,” *Biomed Res. Int.*, 2014.
- [60] S. Chen, Y.-Y. Sun, Z.-X. Zhang, Y.-H. Li, Z.-M. Xu, and W.-N. Fu, “Transcriptional suppression of microRNA-27a contributes to laryngeal cancer differentiation via GSK-3 $\beta$ -involved Wnt/ $\beta$ -catenin pathway,” *Oncotarget*, 2017.
- [61] A. Galimov *et al.*, “Growth hormone replacement therapy regulates microRNA-29a and targets involved in insulin resistance,” *J. Mol. Med.*, 2015.
- [62] A. J. Michael, “Polyamines in eukaryotes, bacteria, and archaea,” *Journal of Biological Chemistry*. 2016.
- [63] K. Igarashi and K. Kashiwagi, “The functional role of polyamines in eukaryotic cells,” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2019.
- [64] R. Amendola, M. Cervelli, E. Fratini, F. Polticelli, D. Sallustio, and P.

- Mariottini, "Spermine Metabolism and Anticancer Therapy," *Curr. Cancer Drug Targets*, 2009.
- [65] Q. Zhu, L. Jin, R. A. Casero, N. E. Davidson, and Y. Huang, "Role of ornithine decarboxylase in regulation of estrogen receptor alpha expression and growth in human breast cancer cells," *Breast Cancer Res. Treat.*, 2012.
- [66] R. Palanimurugan, H. Scheel, K. Hofmann, and R. J. Dohmen, "Polyamines regulate their synthesis by inducing expression and blocking degradation of ODC antizyme," *EMBO J.*, 2004.
- [67] S. Coni, L. Di Magno, S. M. Serrao, Y. Kanamori, E. Agostinelli, and G. Canettieri, "Polyamine Metabolism as a Therapeutic Target in Hedgehog-Driven Basal Cell Carcinoma and Medulloblastoma," *Cells*, 2019.
- [68] M. Cervelli, S. Pietropaoli, F. Signore, R. Amendola, and P. Mariottini, "Polyamines metabolism and breast cancer: state of the art and perspectives," *Breast Cancer Research and Treatment*. 2014.
- [69] Y. Takahashi, D. M. Kipnis, and W. H. Daughaday, "Growth hormone secretion during sleep.," *J. Clin. Invest.*, 1968.
- [70] R. YANAI and H. NAGASAWA, "Synthesis and Release of Prolactin and GH in vitro from the Anterior Pituitaries of Virgin or Pregnant Mice," *Endocrinol. Jpn.*, 2011.
- [71] M. D. Crew, S. R. Spindler, R. L. Walford, and A. Koizumi, "Age-related decrease of growth hormone and prolactin gene expression in the mouse pituitary," *Endocrinology*, 1987.
- [72] B. C. Xu, X. Wang, C. J. Darus, and J. J. Kopchick, "Growth hormone promotes the association of transcription factor STAT5 with the growth hormone receptor," *J. Biol. Chem.*, 1996.
- [73] S. Eleswarapu, Z. Gu, and H. Jiang, "Growth hormone regulation of insulin-like growth factor-I gene expression may be mediated by multiple distal signal transducer and activator of transcription 5 binding sites," *Endocrinology*, 2008.
- [74] S. M. Shalet, A. Toogood, A. Rahim, and B. M. D. Brennan, "The diagnosis of growth hormone deficiency in children and adults," *Endocrine Reviews*. 1998.
- [75] H. HIRT *et al.*, "The Human Growth Hormone Gene Locus: Structure, Evolution, and Allelic Variations," *DNA*, 2009.
- [76] P. H. HENNEMAN, A. P. FORBES, M. MOLDAWER, E. F. DEMPSEY, and E. L. CARROLL, "Effects of human growth hormone in man.," *J. Clin. Invest.*,

1960.

- [77] J. E. Fradkin *et al.*, “Creutzfeldt-Jakob Disease in Pituitary Growth Hormone Recipients in the United States,” *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, 1991.
- [78] W. G. Roskam and F. Rougeon, “Molecular cloning and nucleotide sequence of the human growth hormone structural gene,” *Nucleic Acids Res.*, 1979.
- [79] K. Glasbrenner, “Technology spurt resolves growth hormone problem, ends shortage,” *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, 2003.
- [80] J. M. Limonta *et al.*, “Transgenic rabbits as bioreactors for the production of human growth hormone,” *J. Biotechnol.*, 1995.
- [81] R. Illig, “Growth hormone antibodies in patients treated with different preparations of human growth hormone (HGH),” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1970.
- [82] D. M. Stewart, L. Tian, L. D. Notarangelo, and D. L. Nelson, “X-linked hypogammaglobulinemia and isolated growth hormone deficiency: An update,” *Immunologic Research*. 2008.
- [83] J. A. Phillips, B. L. Hjelle, P. H. Seeburg, and M. Zachmann, “Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency.,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2006.
- [84] M. P. Wajnrajch, J. M. Gertner, M. D. Harbison, S. C. Chua, and R. L. Leibel, “Nonsense mutation in the human growth hormone-releasing hormone receptor causes growth failure analogous to the little (lit) mouse,” *Nat. Genet.*, 1996.
- [85] Y. Takahashi, H. Kaji, Y. Okimura, K. Goji, H. Abe, and K. Chihara, “Short Stature Caused by a Mutant Growth Hormone,” *N. Engl. J. Med.*, 2002.
- [86] H. Cheon, J. Yang, and G. R. Stark, “The Functions of Signal Transducers and Activators of Transcriptions 1 and 3 as Cytokine-Inducible Proteins,” *J. Interf. Cytokine Res.*, 2010.
- [87] V. Petkovic *et al.*, “GH mutant (R77C) in a pedigree presenting with the delay of growth and pubertal development: Structural analysis of the mutant and evaluation of the biological activity,” *Eur. J. Endocrinol.*, 2007.
- [88] M. D.S. *et al.*, “Novel mutations of the growth hormone 1 (GH1) gene disclosed by modulation of the clinical selection criteria for individuals with short stature,” *Hum. Mutat.*, 2003.
- [89] C. Carter-Su, A. P. King, L. S. Argetsinger, L. S. Smit, J. Vanderkuur, and G. S. Campbell, “Signalling pathway of GH,” *Endocr. J.*, 1996.
- [90] M. Kassem, W. Blum, J. Ristelli, L. Mosekilde, and E. F. Eriksen, “Growth

- hormone stimulates proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells in vitro,” *Calcif. Tissue Int.*, 1993.
- [91] M. Ernst and E. R. Froesch, “Growth hormone dependent stimulation of osteoblast-like cells in serum-free cultures via local synthesis of insulin-like growth factor I,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988.
- [92] A. Coker-Gurkan *et al.*, “Curcumin inhibits autocrine growth hormone-mediated invasion and metastasis by targeting NF- $\kappa$ B signaling and polyamine metabolism in breast cancer cells,” *Amino Acids*, 2018.
- [93] C. Yeaman, K. K. Grindstaff, M. D. H. Hansen, and W. J. Nelson, “Cell polarity: Versatile scaffolds keep things in place,” *Current Biology*. 1999.
- [94] M. Iwano, D. Plieth, T. M. Danoff, C. Xue, H. Okada, and E. G. Neilson, “Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis,” *J. Clin. Invest.*, 2002.
- [95] B. Boyer, A. M. Vallés, and N. Edme, “Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions,” *Biochem. Pharmacol.*, 2000.
- [96] E. Batlle *et al.*, “The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells,” *Nat. Cell Biol.*, 2000.
- [97] J.-J. Wang *et al.*, “Autocrine hGH stimulates oncogenicity, epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like behavior in human colorectal carcinoma,” *Oncotarget*, 2017.
- [98] S. Baskari *et al.*, “Influence of autocrine growth hormone on NF- $\kappa$ B activation leading to epithelial–mesenchymal transition of mammary carcinoma,” *Tumor Biol.*, 2017.
- [99] S. J. Serrano-Gomez, M. Maziveyi, and S. K. Alahari, “Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications,” *Molecular Cancer*. 2016.
- [100] A. Gritli-Linde, J. Nilsson, M. Bohlooly-Y, O. Heby, and A. Linde, “Nuclear translocation of antizyme and expression of ornithine decarboxylase and antizyme are developmentally regulated,” *Dev. Dyn.*, 2001.
- [101] G. Stabellini *et al.*, “ Depletion of Polyamines and Increase of Transforming Growth Factor- $\beta$  1 , c-myc, Collagen-Type I, Matrix Metalloproteinase-1, and Metalloproteinase-2 mRNA in Primary Human Gingival Fibroblasts ,” *J. Periodontol.*, 2005.
- [102] T. W. Hurley, C. M. Kuhn, S. M. Schanberg, and S. Handwerger, “Differential

- effects of placental lactogen, growth hormone and prolactin on rat liver ornithine decarboxylase activity in the perinatal period,” *Life Sci.*, 1980.
- [103] M. R. Fabian, N. Sonenberg, and W. Filipowicz, “Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs,” *Annu. Rev. Biochem.*, 2010.
- [104] C. C. Pritchard *et al.*, “Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies - Supplemental Tables , Figures , Methods , and References,” *Cancer Prev. Res. (Phila.)*, 2012.
- [105] A. Turchinovich, L. Weiz, and B. Burwinkel, “Extracellular miRNAs: The mystery of their origin and function,” *Trends Biochem. Sci.*, 2012.
- [106] S. D. Jordan *et al.*, “Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism,” *Nat. Cell Biol.*, 2011.
- [107] P. Gupta, S. Bhattacharjee, A. R. Sharma, G. Sharma, S.-S. Lee, and C. Chakraborty, “miRNAs in Alzheimer Disease - A Therapeutic Perspective,” *Curr. Alzheimer Res.*, 2017.
- [108] K. Bettens *et al.*, “APP and BACE1 miRNA genetic variability has no major role in risk for Alzheimer disease,” *Hum. Mutat.*, 2009.
- [109] R. G. Schipper, L. C. Penning, and A. A. J. Verhofstad, “Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: Effectors or protectors?,” *Semin. Cancer Biol.*, 2000.
- [110] B. N. Kelly *et al.*, “Circulating microRNA as a biomarker of human growth hormone administration to patients,” *Drug Test. Anal.*, 2014.
- [111] A. Manni, C. Wright, B. Badger, L. Demers, and M. Bartholomew, “Polyamines and Autocrine Control of N-Nitrosomethylurea-induced Rat Mammary Tumor Growth in Vitro by Progesterone,” *Cancer Res.*, 1988.
- [112] S. Wang, M. H. Yang, X. Y. Wang, J. Lin, and Y. Q. Ding, “Increased expression of miRNA-182 in colorectal carcinoma: An independent and tissue-specific prognostic factor,” *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2014.
- [113] A. Gritli-Linde, U. Björkman, I. Holm, J. Törnell, and A. Linde, “Effects of chronically elevated growth hormone levels on polyamine metabolism in elderly transgenic mice,” *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1997.
- [114] D. J. Bates *et al.*, “MicroRNA regulation in Ames dwarf mouse liver may contribute to delayed aging,” *Aging Cell*, 2010.
- [115] N. Xie *et al.*, “miR-27a Regulates Inflammatory Response of Macrophages by

Targeting IL-10,” *J. Immunol.*, 2014.

- [116] S. U. Mertens-Talcott, S. Chintharlapalli, X. Li, and S. Safe, “The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells,” *Cancer Res.*, 2007.
- [117] T. Liu, H. Tang, Y. Lang, M. Liu, and X. Li, “MicroRNA-27a functions as an oncogene in gastric adenocarcinoma by targeting prohibitin,” *Cancer Lett.*, 2009.
- [118] C. T. Moseley, M. D. Orenstein, and J. A. Phillips, “GH gene deletions and IGHD type IA,” *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2002.



## EKLER

**Tablo 5. Kullanılan cihazların listesi**

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
UV-Transluminatör	GelDOC	BioRad
Santrifüj	5417R	Eppendorf
Santrifüj (Büyük)	5810R	Eppendorf
Spin mini spin plus	SN0708	LabNet
Yatay elektroforez sistemi	Gel XL ultra V-2	BioRad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Mikropipet (0,5µl-10µl)	EH52836	Thermo
Mikropipet (20µl-200µl)	EH46925	Thermo
Mikropipet (200µl-1000µl)	T27274	Thermo
Otoklav	OTO32	Nüve
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab
Distile Su Cihazı	TANKPE030	Millipore Direct Q- 5UV
pH Metre	A111	Thermo
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Buzdolabı ( No frost )	4263TMB	Arçelik
Vorteks	SA8	Stuart
Dry heat sterilizer	FN120	Nüve
Spektrofotometre	Ultraspec 2100 pro	Biosciences
Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Laminar Flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
Inverted Mikroskop	Model: XDS-1B	SOIF
İnkübatör	Heracell	Thermo
Floraslan Mikroskobu	Model: 1X71	Olympus
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature Freezer, U725 innova	New Brunswick Scientific

Elektroforez Aletleri		BioRad
Facs Flow Cihazı	AC6531180147	BD ACUR C6
HPLC Cihazı	120 Infinity Series	Afilent Technologies
PVDF Membran	88518	Thermo

**Tablo 6. Hücre kültürü donanımları**

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
75cm <sup>2</sup> hücre büyütme kapları	90076	TPP
25cm <sup>2</sup> hücre büyütme kapları	90026	TPP
100mm hücre büyütme kapları	93100	TPP
60mm hücre büyütme kapları	93060	TPP
Steril pipetler (5ml)	94005	TPP
Steril pipetler (10ml)	94010	TPP
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	99722	TPP
Enjektör seti	21G Yeşil uç iğneli	ASTRAJECT
Tripsin-EDTA	25200-056	Gibco
Penisilin/Streptomisin	15140-122	Gibco
Fetal Bovine Serum	10500-064	Gibco
DMEM Medium	41966-029	Gibco
HEK293 hücreleri		ATCC
MEM Medium	11875093	Gibco
HEK293 hücreleri		ATCC
Etüv	Heracell 1150	Thermo
Hemastometre	-	Neubauer
Laminar flow	12469,2	Thermo
Pipet Uçları	-	CAPP



**Tablo 7. Kullanılan kimyasalların listesi**

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Etanol	CAS 64-17-5	ALKO MED
Saf Etanol	32221	SIGMA-ALDRICH
Metanol	24229	SIGMA-ALDRICH
İzopropanol	K44518295 321	MERCK
2-merkaptetanol	S4805940 517	MERCK
Akrilamid / Bis-Akrilamid 30% çözelti	A9099	SIGMA-ALDRICH
Amonyum persülfat	A2941	Applichem
Coomassie Blue Belirteci	A3480	Applichem
DMSO	K46505343 517	MERCK
DMSO	D2650	SIGMA-ALDRICH
EDTA	A2937	Applichem
DiOC6 Boya	2129966	Fluka
DCFH-DA Boya	C6827	Invitrogen
4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride	D1306	Thermo Scientific
PI Boya	P4170-100MG	SIGMA-ALDRICH
Fetal Bovine Serum (FBS)	P290310	Pan Biotech
Laemli Tamponu	S3401-1V	SIGMA
p-Coumaric Asid	C9008-1G	SIGMA-ALDRICH
Luminol	A2185	Applichem
MTT Solüsyonu	M2128-5G	SIGMA-ALDRICH
Phosphate buffered saline (PBS)	BE17-51-5F	LONZA
Sığır Serum Albumin (PSA)	A2153-10G	SIGMA-ALDRICH

SDS (Sodyum dedosil sülfat)	UN1888	Applichem
Protein İzolasyonu Tamponu	78501	Thermo
Page Ruller Plus Prestained Protein Ladder	26619	Fermentas
Agaroz	A9539	SIGMA-ALDRICH
Tris Baz	648310	CALBIOCHEM
Asetik Asid	27225	SIGMA-ALDRICH
Ethidium Bromide	E1510	SIGMA-ALDRICH
Tris-HCl	648317	CALBIOCHEM
1 kb Marker	SM1163	Fermentas
6X yükleme Tamponu	R0631	Fermentas
Amonyum Asetat	1,110115,1000	MERCK
Fenol Kloroform	A2279,0250	Applichem
Curcumin	C1386-10G	SIGMA-ALDRICH
Sodyum Klorür	A2941	Applichem
Tween 20	S6740684 348	MERCK
TEMED	A1148,0100	Applichem
Yağsız Süt Tozu	SC-2325	Santa Cruz Biotechnology
Glisin	3570	CALBIOCHEM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Hidrojen peroksi	K39218400838	MERCK
ExPrime Taq PCR Kiti	G-4000	Genet Bio
Trizol	10296010	Thermo
Tripure	11 667 165 001	Roche
Rnase Free Water	42480093	QIAGEN
iScript cDNA Sentez Kiti	1708891	Bio Rad
Human BH ELISA	GR180572-1	Abcam
Millipore Falcon Centrifugal Filters	4FC901024	MERCK

Neomisin	G8168	SIGMA-ALDRICH
Invasion Chamber	354483	BD Bioscience
Super Block T20 Blocking Buffer	37536	Thermo
FuGENE® 6 Transfection Reagent	E2692	Promega
Ponceau Read Belirteci	A1405	Applichem
Hidroklorik Asit	K43804717 239	MERCK
Kloroform	UN1888	Applichem
Kristal Viyole	FN1048735	MERCK
Acridine Orange	A1398,0025	Applichem

**Tablo 8. ECL solüsyon içeriği**

A çözeltisi	B çözeltisi
9 ml distile su	9 ml distile su
1 ml 1M Tris HCl (pH:8,5)	1 ml 1M Tris HCl (pH:8,5)
75 µl Kumarik asit	15 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
150 µl Luminol	

**Tablo 9. %12'lik SDS-PAGE Jel içeriği**

	Alt Jel	Üst Jel
Distile su	3,4 ml	3,075 ml
Tris-HCl	2,5ml (1,5M,pH: 8,8)	1,125ml (0,5M, pH: 6,8)
% 10 SDS	0,1 ml	0,05ml
Akrilamid/Bis-Akrilamid	4 ml	0,67 ml
Amonyum Persulfat (APS)	0,05 ml	0,025ml
TEMED	0,005ml	0,005ml
TOPLAM	10,005 ml	5,05ml

# ÖZGEÇMİŞ



**KADRIYE KOYUNCU**

## KİŞİSEL BİLGİLER

**Cinsiyet** : Bayan  
**Uyruğu** : T.C.  
**T.C. Kimlik No** : 43879963076  
**Doğum Yeri** : Şanlıurfa  
**Doğum Tarihi** : 27/08/1994  
**Medeni Durum** : Bekar

## İLETİŞİM BİLGİLERİ

**Adres Bilgileri** : Cömertkent Sit. M Blok Daire 35 Güngören / İSTANBUL  
**Ev Tel** : (212) 482 81 74  
**Cep Tel** : (531) 228 71 50  
**E-posta** : kadriyekoyuncu18@gmail.com

## EĞİTİM BİLGİLERİ

2017 – 2019	İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü – Lisansüstü
2012 - 2016	Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü -Lisans
2009 - 2012	Osman Ülkümen Lisesi

## STAJ DENEYİMİ

10/07/2014 - 08/08/2014	Bakırköy Laboratuvar ve Görüntüleme Merkezi – Biyokimya, Mikrobiyoloji, Hematoloji
15/06/2015 - 31/07/2015	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı – Moleküler Genetik Laboratuvarı

## LABORATUVAR DENEYİMİ

Cihazlar: Mikroskop, Santrifüj cihazları, PZR cihazları  
(Hücre Kültürü, RealTime PZR - qRT PZR, Transfection, İmmunoblotlama)

## ULUSAL VE ULUSLARARASI PROJELER

Büyüme Hormonu Genindeki A13S, F166 Delesyon Mutasyonlarının Hücre Büyüme ve Farklılaşması Üzerine Etkisinde Büyüme Hormonu ve Ornitin Dekarboksilaz Gen Anlatımları ile İlişkili miRNA Profillerinin Rolünün HEK293 Hücre Hattında Gösterilmesi (TÜBİTAK 1002 Projesi, Proje no: 216Z104, 2017-2018, Bursiyer)

**KURS / SERTİFİKA BİLGİSİ**

29/03/2014 – 28/06/2014 İSMEK	İngilizce Seviye A2 Programı
30/03/2013 Yeditepe Üniversitesi	1. Genetik ve Biyomühendislik Günleri'nin Genetik Oturumuna Katılım
11/11/2013 - 12/11/2013 İstanbul Üniversitesi	5. DETAE GÜNLERİ; Deneysel Araştırmalar ve Kliniğe Yansımaları'na Katılım
14/12/2013 Haliç Üniversitesi	1.Tüp Bebek Paneli
29/12/2013 Haliç Üniversitesi	Kas Hastalıkları Sorunları ve Çözümleri Sempozyumu
19/04/2014 Haliç Üniversitesi	1. Onkoloji Sempozyumu
21/02/2015 – 22/02/2015 Yeditepe Üniversitesi	3. Genetik ve Biyomühendislik Günleri
07/03/2015 Haliç Üniversitesi	1. Adli Bilimler Sempozyumu
19/03/2016 İstanbul Üniversitesi	IV. Cerrahpaşa Bilim Günleri
09/04/2016 ABGEDER (Adli Biyoloji - Adli Genetik ve Gen Hukuku Derneği)	Adli Genetik ve Hukuki Boyutu Sempozyumu
22/10/2016 İstanbul Üniversitesi	Kök Hücre'ye Giriş Sempozyumu

**YABANCI DİL BİLGİSİ**

İngilizce (British Time)	Okuma, yazma, konuşma: Orta seviyede (İntermediate)
--------------------------	---

**REFERANSLAR**

Prof. Dr.Ajda Çoker GÜRKAN- İstanbul Kültür Üniversitesi Öğretim Üyesi (0212) 498 4565  
Prof. Dr. Emel BOZKAYA - Haliç Üniversitesi Öğretim Üyesi – (543) 283 53 94  
Prof. Dr. M. Burcu Irmak YAZICIOĞLU - Haliç Üniversitesi Öğretim Üyesi– (212) 444 25 42  
Yrd. Doç. Dr. M. Baki YOKEŞ - Öğretim Üyesi– (212) 444 25 42