

**T.C.**  
**GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PİRÜVAT DEHİDROGENAZ ENZİM KOMPLEKSİ**  
**AKTİVİTESİNİN VE EKSPRESYONUNUN KANSER**  
**HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ**

**ŞABAN KALAY**  
**DOKTORA TEZİ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**

**GEBZE**  
**2017**

**T.C.  
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PİRÜVAT DEHİDROGENAZ ENZİM  
KOMPLEKSİ AKTİVİTESİNİN VE  
EKSPRESYONUNUN KANSER  
HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ**

**ŞABAN KALAY  
DOKTORA TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANI  
DOÇ. DR. ASUMAN DEMİROĞLU ZERGEROĞLU**

**GEBZE  
2017**

**T.R.**  
**GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY**  
**GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

**INVESTIGATION OF ACTIVITY AND  
EXPRESSION OF PYRUVATE  
DEHYDROGENASE COMPLEX IN CANCER  
CELLS**

**ŞABAN KALAY**

**A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF  
DOCTOR OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**

THESIS SUPERVISOR  
ASSOC. PROF. DR. ASUMAN DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

**GEBZE**

**2017**



GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 29/06/2017 tarih ve 2017/35 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 19/07/2017 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Şaban Kalay 'ın tez çalışması KİMYA Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. ASUMAN DEMİROĞLU ZERGEROĞLU

ÜYE

: Prof. Dr. AZİZ TANRISEVEN

ÜYE

: Prof. Dr. GÖNÜL YENİLMEZ ÇİFTÇİ

ÜYE

: Prof. Dr. BARBAROS NALBANTOĞLU

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. NAGHAN ERSOY TUNALI

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun

19/06/2017 tarih ve 2017/35 sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

Doç. Dr. Arif Çağdaş AYDINOĞLU  
Gebze Teknik Üniversitesi

## ÖZET

Hücrelerde pirüvat dehidrogenaz enzim kompleksi (PDC)'nin regülasyonunu sağlayan ve bilinen hücreye özgü iki pirüvat dehidrogenaz fosfataz (PDP) ve dört pirüvat dehidrogenaz kinaz (PDK) izoenzimi bulunmaktadır. PDK, PDC'yi fosforlayarak inaktive ederken, PDP'nin rolü fosforu kaldırarak PDC'yi aktif hale getirmektir. Hipoksik şartlarda, hipoksia-indüklenebilen faktör-1 (HIF1)'in, glikolitik enzimlerin ve PDK1'in ekspresyonlarını artırdığı belirtilmiştir. PDK ekspresyonunun artması PDC aktivitesini düşürmekte ve bu durum mitokondride gerçekleşen oksidatif fosforilasyonunu yavaşlatmakta ve aynı zamanda da serbest radikal türleri (ROS)'nin oluşumunu azaltmaktadır. HIF-1 mekanizması, kanser hücrelerinde aktif görev oynayarak hücrelerin apoptosize uğramasını engellemektedir. Ayrıca, kanser hücrelerinde HIF1-indüklemeli PDK1 ekspresyonu bloke edildiğinde, hücrelerde ROS oluşumunun arttığı ve buna bağlı olarak hücre ölümünün gerçekleştiği belirtilmiştir. Bu veriler doğrultusunda, PDK aktivitesini inhibe ederek PDC aktivitesinin artırılabilirliği ve böylece kanserli hücrenin oksidatif fosforilasyona yönlendirilerek apoptosize uğratılabilirliği görüşü ileri sürülmüştür. Bu çalışmamızda, ilk olarak PDC ile PDK ve PDP izoenzimlerinin aktivitelerini, üç farklı meme kanseri hücre hattında incelenmiştir. Takibinde aynı hücrelerde PDP, PDK gen ve protein ifadelerindeki değişimler incelenmiştir. Aktivite ölçümleri hipoksik stabilizasyondan dolayı endojen PDP'lerin fonksiyonlarını yitirdiğini gösterilmiştir. PDP, PDK gen ve protein ifadelerindeki değişimler ise aktivite ölçümleri ile uyumlu bulunmuştur. İlaveten alfa-ketoglutarat dehidrogenaz ( $\alpha$ -KGDC) enzimin ve suksinat dehidrogenaz (SDH) enziminin aktiviteleri de izlenmiştir. Hipoksik şartlarda, normoksik şartlar ile karşılaştırıldığında bu aktivitelerin yaklaşık 2.5 kat azaldığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmalara ilaveten böbrek kanseri (ACHN) ve insan göbeği damar endotel hücreleri (human umbilical vein endothelial cells, (HUVEC) hücrelerinde, PDK inhibitörü dikloroasetik asit (DCA)'in proliferasyon, apoptoz ve metabolit değişimlerine etkileri de incelenmiştir. DCA'nın böbrek kanseri üzerinde seçicilik göstererek apoptozu uyarmasıyla TCA çevriminin yeniden tetiklendiği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Pirüvat dehidrogenaz, enzim aktivitesi, kanser, dikloroasetat, hücre döngüsü, LC-MS/MS.

## SUMMARY

The activity of PDC is regulated by two phosphatase (PDP) and four kinase (PDK) isoenzymes. PDK phosphorylates and inhibits PDC, whereas PDP removes the phosphate group(s) restoring its activity. Under hypoxic conditions, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) stimulates glycolysis by inducing transcription of glycolytic enzymes and suppresses oxidative phosphorylation and thus formation of reactive oxygen species (ROS) in mitochondria by upregulating PDK1 expression. In normal cells, under hypoxic conditions (e.g. exercising muscle) this mechanism protects cells from apoptosis. HIF-1 also plays similar role (i.e. upregulates transcription of glycolytic enzymes and PDK1) in cancer cells and therefore protects these cells from ROS-induced apoptosis. It has been known that when HIF-1-induced PDK1 expression is blocked, production of ROS leads to apoptosis. Besides, forced PDK1 expression in hypoxic HIF-1 null cells increases ATP levels, attenuates hypoxic ROS generation, and rescues these cells from hypoxia-induced apoptosis. Based on these results, it has been suggested that by blocking PDK1 activity, which results in increased PDC activity and thus increased oxidative phosphorylation as well as ROS generation, apoptosis can be induced in hypoxic cancer cells. In this thesis, we aim to investigate the activities of PDC and its regulatory enzymes, as well as the expression levels of PDK and PDP isoenzymes in three different breast cancer. Also, the activities of TCA cycle enzymes  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase and succinate dehydrogenase (SDH) was measured. In hypoxic conditions, all of these activities decreased by ~2.5 fold compared to normoxic conditions. Finally, the effects of PDK inhibitor dichloroacetic acid (DCA) on proliferation, apoptosis and metabolite changes in renal cancer cells and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) cells was examined. DCA selectively induced apoptosis in cancer cells which may be accomplished by triggering the TCA cycle.

**Key Words:** Pyruvate dehydrogenase, enzyme activity, cancer, dichloroacetate, cell cycle, LCMS/MS.

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimde bu çalışmanın oluşmasının yolunu açan danışmanım Doç. Dr. Asuman Demiroğlu ZERGEROĞLU ve Doç. Dr. Ali TÜRKAN'a ayrıca Prof. Dr. Duran ÜSTEK'e,

Bütün çalışmam boyunca yanımda olan, her türlü fedakârlığı göstererek beni motive eden sevgili eşim Betül KALAY'a,

Göstermiş olduğu desteklerinden ve katkılarından dolayı Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Nanobiyoteknoloji Laboratuvarları'ndan Prof. Dr. Mustafa ÇULHA, Mine Altunbek ve Hande Duru Köktaş'a, Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümün'den Ayşegül DOĞAN, Selami DEMİRCİ ve Ayca Zeynep İLTER'e,

Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Sekreteri Hamide ÇETİNER, kıymetli eşi ve ailesine,

Ođlum Mehmet Kayra ve 43 günlük kızım Asel Duru'ya burada teşekkürlerin en büyüklerini sunmayı bir borç bilirim.

# İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	1
2. PİRÜVAT DEHİDROGENAZ MULTİENZİM KOMPLEKSİ, YAPI VE FONKSİYONU	3
2.1. PDC Kompleksi ve Kanseri	7
3. PDK İNHİBİTÖRÜ DİKLOROASETİK ASİT	10
4. KANSER HÜCRELERİ METABOLİZMALARI	12
4.1. Kanseri Hücrelerinde Karbonhidrat Metabolizması	12
4.2. Kanseri Hücrelerinde Protein ve Yağ Metabolizması	15
4.3. Meme Kanseri	17
5. GEREÇ VE YÖNTEMLER	18
5.1. Rekombinant pGEX-6P-NAT Geninin Klonlanması ve Saflaştırılması	18
5.1.1. Staphylococcus saprophyticus NAT Geninin PCR ile Çoğaltılması	18
5.1.2. Restriksiyon Endonükleaz Kesimi	19
5.1.3. Ligasyon ve Transformasyon	20
5.1.4. Rekombinant pGEX-6P-NAT'ın Ekspresyonu ve Saflaştırılması	20
5.2. İnsan PDP1c Klonlanması, Aşırı İfade Edilmesi, Substratın Hazırlanması ve Aktivite Ölçümü	21
5.2.1. PDP1c Klonlanması	21



5.2.2. İnsan PDP1c'nin Aşırı İfade Edilmesi	22
5.2.2.1. Hücrelerin Lizisi	22
5.2.3. PDP1c Substratının Hazırlanması	22
5.2.3.1. PDC'nin Sığır Kalbinden Kısmen Saflaştırılması	23
5.2.3.2. Mitokondrinin Parçalanması	24
5.2.3.3. PEG-6000 Çöktürülmesi	24
5.2.3.4. PDC'nin Fosfatlanması	24
5.2.4. İnaktif PDC ile PDP1c Aktivitesi Ölçümü	25
5.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	25
5.3.1. Meme Kanseri Hücre Kültürleri	25
5.3.2. Renal ve HUVEC Hücre Kültürleri	26
5.3.3. Hücre Stoklanması ve Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi	26
5.4. Kanser Hücrelerinden Mitokondrilerin Eldesi ve Enzim Aktivite Ölçümleri	26
5.4.1. Kanser Hücrelerinden Mitokondri Eldesi	27
5.4.2. Enzim Aktivite Ölçümleri	27
5.4.2.1. PDC ve $\alpha$ -KGDC Aktivite Tayini	27
5.4.2.2. PDC Reaktivasyonu	28
5.4.2.3. SDH Aktivite Tayini	29
5.4.2.4. Diğer Mitokondriyel Enzimlerin Aktivitelerinin Ölçülmesi	29
5.4.2.5. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivitesi	29
5.5. Gen İfadesi	30
5.5.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	30
5.5.2. Kantitatif PCR ile mRNA Seviyelerinin Analizi	30
5.5.3. PDP1 ve PDP2 Genlerinin Sybergreen (SYBR) ile Çoğaltılması	31
5.6. Protein Analizleri	32
5.6.1. Hücrelerin Parçalanması (Lizis)	32
5.6.2. Protein Miktar Tayini	32
5.6.3. Western Blot	33
5.7. DCA'nın Renal Hücreler Üzerine Etkisinin İncelenmesi	34
5.7.1. DCA'nın Hazırlanması ve Kullanılan Dozlar	34

5.7.2. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi	35
5.7.3. Akım Sitometrisi Analizleri	35
5.7.4. Kanser Hücrelerinin Metabolit Analizleri	36
5.7.4.1. LC-MS/MS Analizi için Metabolit Ekstraksiyonu	36
5.7.4.2. LC-MS/MS Analiz Koşulları	36
6. SONUÇLAR ve TARTIŞMA	37
6.1. Enzim Aktiviteleri	37
6.1.1. Staphylococcus saprophyticus Arilamin N-Asetiltransferaz (NAT) Geninin Klonlanarak İfadesi ve Saflaştırılması	37
6.1.2. PDP1c Klonlama, Aşırı İfadeleme, Saflaştırma ve Aktivite Ölçümü Çalışmaları	39
6.1.3. Normoksik ve Hipoksik Şartlarda Büyütülen Meme Kanseri Hücre Hatlarında Enzim Aktivite Ölçümleri	42
6.1.4. Normoksik ve Hipoksik Şartlarda Meme Kanseri Hücrelerinde PDC Regülatör Enzimlerinin Protein Analizleri	52
6.1.5. Normoksik ve Hipoksik Şartlarda Meme Kanseri Hücrelerinde PDC Regülatör Enzimleri mRNA Seviyeleri	53
6.1.6. Meme Kanseri Hücrelerinde Aktivite Ölçümlerinde Metabolit Seviyelerinin LC-MS/MS ile İncelenmesi	54
6.1.7. Meme Kanseri Hücreleri Çalışmaları Genel Değerlendirilmesi	55
6.2. PDC İnhibitörü DCA'nın Kanser Hücreleri Üzerindeki Etkisi	56
6.2.1. DCA'nın Böbrek Kanseri Hücre Hattı Canlılığı, Döngüsü ve Ölüm Mekanizması Üzerine Etkisi	57
6.2.2. DCA'nın ACHN Hücrelerinde Metabolit Seviyelerine Etkilerinin İncelenmesi	61
6.2.3. ACHN Hücrelerinde LDH, PDC, KGDC ve SDH Aktivitelerinin Ölçülmesi	64
6.2.4. ACHN Hücre Hattı Çalışmalarının Genel Değerlendirilmesi	65
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	78
EKLER	79

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
ACN	: Asetonitril
BSA	: Bovine serum albümin
CoA	: Koenzim A
CoK	: Kolin kinaz
DCA	: Dikloroasetik asit
DCIP	: Diklorofenol indofenol
DI	: Deiyonize
DMEM	: Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DTT	: Ditiyoeritritol
E1	: Pirüvat dehidrogenaz alt ünite
E2	: Dihidrolipoil transasetilaz
E3	: Dihidrolipoil dehidrogenaz
E3BP	: E3'ün bağlandığı protein
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EGTA	: Etilenglikoltetraasetik asit
ER	: Östrojen reseptörü
ESI	: Elektro sprej iyonizasyon
FBS	: Fetal bovine serum
FGD	: 2-(18)-fluoro-2-deoxy-D-glucose
GABA	: Gama amino bütirik asit
GST	: Glutasyon-S-transferaz
HER2	: Epidermal büyüme faktörü reseptör 2
HIF-1	: Hipoksia indüklenebilen faktör-1
IDH	: İzositrat dehidrogenaz
IPTG	: İzopropil-β-D-tiyogalaktozid
LDH	: Laktat dehidrogenaz
LDH	: Laktat dehidrogenaz
M1PK	: Pirüvat kinaz izoform-1

MeOH	: Metanol
MRM	: Çoklu reaksiyon görüntüleme
NAD	: Nikotinamin adenin dinükleotid
NADH	: Nikotinamin adenin dinükleotid reduced
NAT	: N-asetil aspartat
OD	: Optik yoğunluk
ON	: Gece boyu
PBS	: Tuzlu fosfat tampon
PDC	: Pirüvat dehidrogenaz enzim kompleksi
PDK	: Pirüvat dehidrogenaz kinaz
PDP	: Pirüvat dehidrogenaz fosfataz
PDP1 <sub>c</sub>	: Pirüvat dehidrogenaz fosfataz katalitik alt ünite
PDP1 <sub>r</sub>	: Pirüvat dehidrogenaz fosfataz regülatör alt ünite
PEG	: Polietilenglikol
PET	: Pozitron emisyon tomografi
PK	: Pirüvat kinaz
PMSF	: Fenilmetilsülfonilflorür
PR	: Progesteron reseptörü
PTA	: Fosfotransasetilaz
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SDH	: Süksinat dehidrogenaz
TPP	: Tiamin pirofosfat
UHPLC	: Ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
$\alpha$ -KGDC	: $\alpha$ -Ketogluterat dehidrogenaz

# ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: Mitokondri alt bölümleri ve bu bölümlerdeki bazı fonksiyonlar.	3
2.2: Pirüvat dehidrogenaz multienzim kompleksi yapısı.	4
2.3: PDC katalizli pirüvatın asetil-CoA'ya dönüşümü her bir enzimatik reaksiyon basamakları.	5
2.4: PDC katalizli pirüvatın asetil-CoA'ya dönüşümü enzimatik reaksiyonunun mekanizması.	6
2.5: PDC'nin, PDK ve PDP enzimlerinin katalizlediği fosforilizasyon/defosforilizasyon döngüsüyle regülasyonu.	7
2.6: Hipoksik şartlarda, HIF-1'in regüle ettiği enzimler ve metabolik etkiler.	8
2.7: HIF-1 $\alpha$ proteininin düşük oksijenli ortamlarda parçalanması ve normal oksijen seviyesinde aktivitesini göstermesi	9
3.1: Dikloroasetat kimyasal yapısı.	10
3.2: Normal ve kanser hücreleri metabolizmaları, aerobik glikoliz.	13
3.3: Kanser metabolizmasında PKM2 pirüvat kinaz izoformu daha baskındır.	14
3.4: Kanser hücrelerinde merkez karbon metabolizmasındaki önemli değişimler.	16
5.1: <i>Staphylococcus saprophyticus</i> : SSP2292, tahmini arylamine N-acetyltransferase (780 nt) upstream 30, downstream 30 gen dizilimi.	18
5.2: Kanser hücrelerinde PDC intrinsik fosfatazın reaktivasyonu neticesinde PDC <sub>toplam</sub> aktivitesinin ve rekombinant fosfataz kullanılarak PDC <sub>t</sub> + PDP1 <sub>c</sub> enzim aktivitelerinin ölçülmesi.	28
6.1: Kanser hücrelerinde PDC intrinsik fosfatazın reaktivasyonu neticesinde PDC <sub>toplam</sub> aktivitesinin ve rekombinant fosfataz kullanılarak PDC <sub>t</sub> + PDP1 <sub>c</sub> enzim aktivitelerinin ölçülmesi.	38
6.2: pGEX-6P-NAT'ın <i>E.coli</i> BL21'de overekspresyonu SDS-page jeli.	39
6.3: pet28a'ya klonlanan PDP1 <sub>c</sub> ile KEGG gen bankasından alınan PDP1 <sub>c</sub> 'nin dizi analizlerinin karşılaştırılması.	40
6.4: PDP1 <sub>c</sub> saflaştırılması SDS-page jel görüntüleri.	41

6.5:	İnaktif sığır kalp mitokondri PDC kullanılarak PDP1c aktivitesinin ölçülmesi.	42
6.6:	MCF-7 kanser hücreleri mitokondriyel özütünde SDH aktivite ölçümleri.	43
6.7:	NAD (A) ve NADH (B) standartlarının MS dedektörü ile tayin edilmesi.	44
6.8:	NADH (A ve B) ve NAD (C) moleküllerinin kromatografik olarak birbirlerinden ayrılması.	44
6.9:	LDH katalizli pirüvatın laktata dönüşüm reaksiyonu.	45
6.10:	MCF-7 sitosolik ekstraktı kullanılarak LDH aktivitesi ölçülmesi zaman ile metabolit konsantrasyonlarının değişimleri.	45
6.11:	T47D sitosolik ekstraktı kullanılarak LDH aktivitesi ölçülmesi zaman ile metabolit konsantrasyonlarının değişimleri.	46
6.12:	MDA-MB-231 sitosolik ekstraktı kullanılarak LDH aktivitesi ölçülmesi zaman ile metabolit konsantrasyonlarının değişimleri.	47
6.13:	DCA'nın LDH aktivitesine etkisinin incelenmesi.	47
6.14:	Fosfotrans asetilaz ve rotenon varlığında PDC aktivitelerinin ölçülmesi.	48
6.15:	Normoksik şartlarda büyütülmüş MCF-7 (A), T47D (B) ve MDA-MB-231 (C) hücrelerinden elde edilen mitokondri özütündeki gerçek pirüvat dehidrogenaz (PDCa), toplam pirüvat dehidrogenaz (PDCt) alfa-ketogluterat dehidrogenaz (a-KGDC), süksinat dehidrogenaz (SDH) ve izositrat dehidrogenaz (IDH) aktivitelerinin ölçülmesi.	50
6.16:	Hipoksik şartlarda büyütülmüş MCF-7 (A), T47D (B) ve MDA-MB-213 (C) hücrelerinden elde edilen mitokondri özütlerinde PDCa, PDCt, a-KGDC ve SDH aktivitelerinin ölçülmesi.	51
6.17:	Meme kanseri hücre hatlarında PDC regülatör enzimlerinin western-blot analizleri.	52
6.18:	Meme kanseri hücre hatlarında PDC regülatör enzimlerinin rt-PCR analizleri.	54
6.19:	Meme kanseri hücrelerinde LC-MS/MS kromatogramları.	55

6.20:	12.5-50 mM DCA'nın ACHN (A) ve HUVEC (B) hücre hattında 24, 48 ve 72.saatlerde hücre canlılığına etkilerinin incelenmesi.	58
6.21:	DCA'nın ACHN hücrelerinde hücresel döngülere etkisinin incelenmesi	58
6.22:	DCA'nın HUVEC hücrelerinde hücresel döngülere etkisinin incelenmesi.	59
6.23:	DCA'nın ACHN hücrelerinde sebep olduğu hücresel ölümün Annexin-V/PI boyama ile incelenmesi.	60
6.24:	DCA'nın HUVEC hücrelerinde sebep olduğu hücresel ölümün Annexin-V/PI boyama ile incelenmesi.	60
6.25:	LC-MS/MS kalibrasyon eğrileri.	62
6.26:	DCA ile muamele edilen ACHN hücrelerinde metabolit seviyelerinin LC-MS/MS analizi karşılaştırması.	63
6.27:	DCA uygulamalarının HUVEC hücreleri organik asit metabolizmalarına etkilerinin LC-MS/MS ile incelenmesi.	64

# TABLolar DİZİNİ

<b><u>Tablo No:</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1: Bir adet PDC multi enzim kompleksindeki alt üniteler ve sayıları.	4
3.1: DCA'nın bazı hücreseL metabolitlere etkileri. GABA: Gama amino butirik asit.	11
5.1: NAT'ın pGEX-6P-1'e aktarılması ligasyon şartları.	20
5.2: Meme kanseri hücre hatlarında LDH aktivitelerinin LC-MS/MS ile incelenmesi deney planı.	30
5.3: Gerçek-zamanlı PCR deneylerinde kullanılan primer ve proplar.	32
6.1: LC-MS/MS analizleri min. ve max. deteksiyon limitleri ve metabolit MRM geçişleri.	61
6.2: ACHN hücrelerinde hesaplanan LDH spesifik aktiviteleri.	65



# 1. GİRİŞ

## 1.1. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Kanser hücreleri hızlı büyümeleri için gereken enerjiyi çoğunlukla glikoliz yoluyla elde etmektedirler. Ancak, glikoliz yolunu kullanırken aynı zamanda mitokondrideki trikarboksilik asit döngüsü (TCA) döngüsüne asetil-CoA sağlayan ve şeker metabolizmasında kilit rol oynayan pirüvat dehidrogenaz multi enzim kompleksi (PDC)'nin aktivitesinin de baskılanması gerekmektedir, aksi takdirde hücre glikoliz sonucu oluşan pirüvat laktat üretimi yerine TCA döngüsüne ve oksidatif fosforilizasyona yönlendirilecektir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, PDC aktivitesinin baskılanması işleminin pirüvat dehidrogenaz kinaz (PDK) tarafından gerçekleştirildiğine işaret etmektedir. PDC aktivitesinin fosforilzasyon/defosforilzasyon döngüsüyle kontrol edildiği göz önünde bulundurulduğunda, kinaz izoenzimlerinin yanında pirüvat dehidrogenaz fosfataz (PDP) izoenzimlerinin aktiviteleri de önem taşımaktadır.

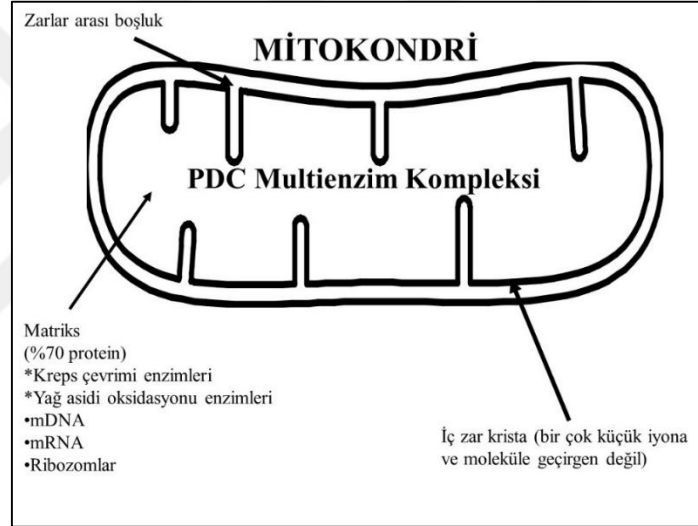
Bu tez kanser hücre metabolizması konusunun aydınlatılması kapsamında PDC aktivitesinin ve ekspresyonunun kanser hücrelerinde detaylı olarak incelenmesi amacıyla yapılmıştır. Tez çalışmanın ilk kısmında hücre modeli olarak MCF-7, T47D ve MDA-MB-231 meme kanseri hatları seçilmiştir. Çalışmada öncelikle üç farklı PDC aktivitesi; gerçek PDC aktivitesi ( $PDC_a$ ), toplam PDC aktivitesi ( $PDC_t$ ) ve  $PDC_t$  + Pirüvat dehidrogenaz fosfataz katalitik alt ünite 1 ( $PDP1_c$ ) aktivitesi, incelenmiştir.  $PDC_a$ , kanser hücreleri mitokondri özütlerinde bir inhibisyon veya aktivasyon yapmadan ölçülen PDC aktivitesidir.  $PDC_t$ , PDP'lerin aktive, PDK'lerin inhibe edilmesinin ardından ölçülen PDC aktivitesidir.  $PDC_t + PDP1_c$  ise  $PDC_t$  oramına rekombinant  $PDP1_c$  ilavesi, sonrasında ölçülen PDC aktivitesidir. Bu aktivitelerin incelenmesi için de normoksik ve hipoksik şartlarda kültüre edilen kanser hücrelerinden, mitokondriler izole edilmiş ve aşağıda bahsedilecek enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Tez çalışmasının ilk kısımlarında  $PDC_t + PDP1_c$  aktivitesinin ölçülebilmesi için  $PDP1_c$  klonlama çalışmaları bulunmaktadır.  $PDP1_c$ 'nin substratı PDC'dir. Bu nedenle klonlanan  $PDP1_c$ 'nin aktivitesinin ölçülebilmesi için yeni kesilmiş bir sığırın kalbinden PDC izole edilerek kullanılmıştır. Farklı PDC aktivitelerinin

ölçümü sonrası meme kanseri hücrelerinin mitokondri ve/veya sitosolik özütlerinde  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenaz ( $\alpha$ -KGDC), süksinat dehidrogenaz (SDH), izositrat dehidrogenaz (IDH), laktat dehidrogenaz (LDH) enzimlerin aktiviteleri de ölçülerek daha detaylı olarak karşılaştırılmıştır. Aktivite ölçümleri tamamlandıktan sonra normoksik ve hipoksik şartlarda inkübe edilmiş kanser hücrelerinde, PDP1-2 ve PDK1-4 izoenzimlerinin mRNA ve protein seviyeleri karşılaştırılmıştır.

Dikloro asetat (DCA), spesifik olarak kanser hücrelerini oksidatif fosforilasyona yönlendirmek için kullanılan PDK inhibitörü ve bir kemoterapik ajandır. Bu tez çalışmasının ikinci kısmında, DCA'nın renal (ACHN) ve damar endothelial hücre (HUVEC) hücre canlılığı, hücre döngüsü ve apoptoz üzerine olan etkileri incelenmiştir. İlâveten hücrelerdeki metabolik değişimler analiz edilmiştir. Çalışmada aktivite ölçümlerinde UV-vis spektrofotometre ve/veya mikroplate okuyucu, protein analizlerinde SDS PAGE / western blotlama, gen analizlerinde gerçek zamanlı PCR, metabolit analizlerinde LC-MS/MS kullanılmıştır.

## 2. PİRÜVAT DEHİDROGENAZ MULTİENZİM KOMPLEKSİ, YAPI VE FONKSİYONU

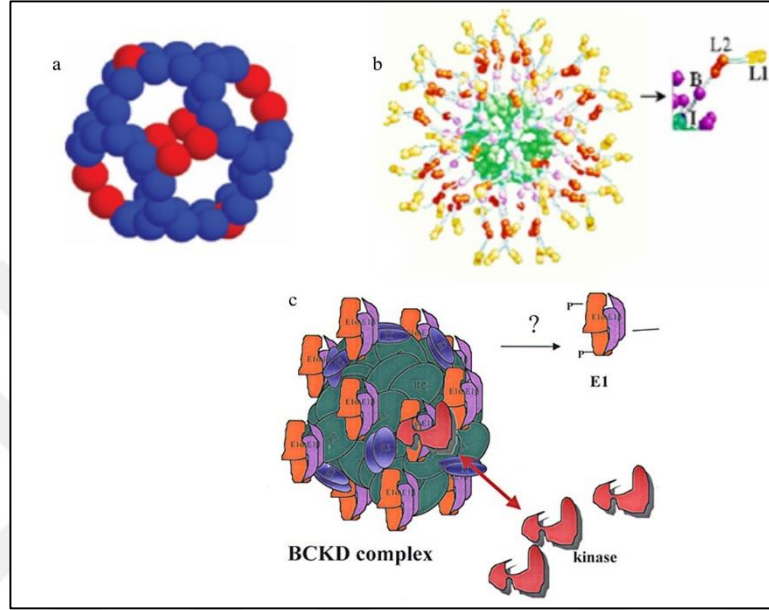
Mitokondri ATP üretimini sağladığından dolayı yaygın olarak hücrenin enerji üretim merkezi olarak bilinmektedir. Mitokondriler büyük eksenini ~ 1.5 µm küçük eksenini ~ 0.5 µm elipsoid şeklinde, hacimleri 0.8 µm<sup>3</sup> olan çift zarlı organellerdir. Bir hücredeki mitokondri sayısı 10-100 arasındadır. Hücrelerin içerdikleri mitokondri sayıları, enerji gereksinimlerine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Örneğin bir kalp hücresinde enerji gereksinimi en fazladır, 800 dolayında mitokondri bulunur ve bu kalp hücrelerinin %20'sini kaplamaktadır [1]. PDC kompleksi bir çok fonksiyonu olan mitokondride matriks içerisinde yer almaktadır (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1: Mitokondri alt bölümleri ve bu bölümlerdeki bazı fonksiyonlar. PDC (multienzim) kompleksi mitokondrinin matriksine yerleşmektedir.

PDC üç enzimin farklı sayılarda kovalent olmayan bağlarla oluşturduğu bir multienzim kompleksidir [2-3, 4]. Bu enzimler pirüvat dehidrogenaz (E1) (EC 1.2.4.1), dihidrolipoil transasetilaz (E2) (EC 2.3.1.12), dihidrolipoil dehidrogenaz (E3) (EC 1.6.4.3) olarak isimlendirilmiştir. Memelilerdeki PDC, aynı zamanda, E3'ün bağlandığı proteini (E3BP) ve regülasyonu sağlayan PDK ve PDP enzimlerini de içermektedir [5, 6-8]. 48 tane E2 ve 12 tane E3BP bir araya gelerek, Şekil 2.2: A'da gösterilen ikozahedral pentadodekahedron yapıyı oluşturmaktadır [9]; E1 ve E3 ise, sırasıyla, E2 ve E3BP'nin yüzeyinde bulunan domainlere bağlanmaktadır [9]. E2, iki tane lipoil kofaktörü içeren domainlere (lipodomain) sahiptir (Şekil 2.2: B). Bu

lipodomainler, ayrıca, PDK ve PDP enzimlerinin de bağlandığı bölge olarak tanımlanmaktadır [9]. PDC multi enzim kompleksinin molekül ağırlığı 2.5-9.5 milyon dalton aralığında değişmektedir [10]. Tablo 2.1’de devasa büyüklükteki bu bir adet PDC’nin içerdiği E1, E2, E3 ve diğer bileşenlerin yaklaşık olarak sayıları gösterilmektedir [11,12].

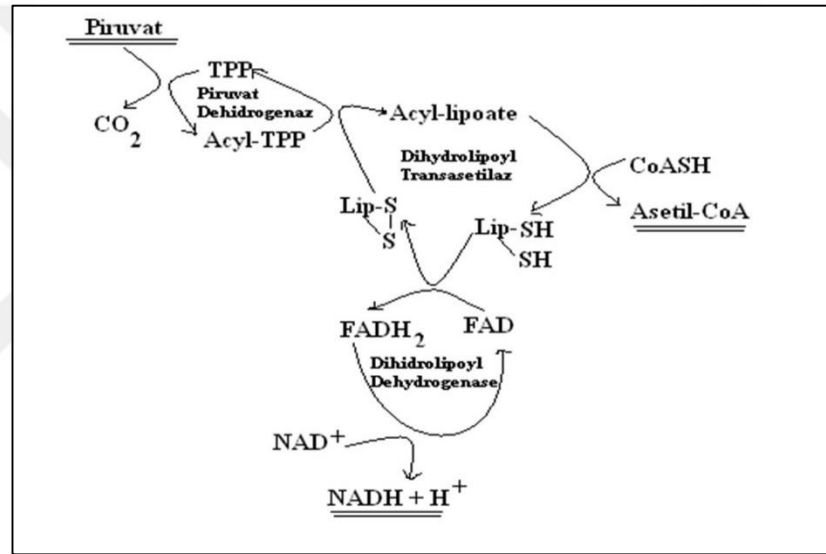


Şekil 2.2: Pirüvat dehidrogenaz multienzim kompleksi yapısı. a) 48 Dihidrolipoil transasetilaz (E2) ve 12 dihidrolipoil dehidrogenaz bağlandığı proteini (E3BP)’nin oluşturduğu ‘icosahedral dodecahedron’ yapı; b) E2’nin çekirdek yapı yüzeyinde bulunan lipodomain 1 ve 2 (L1 ve L2), ve pirüvat dehidrogenaz (E1) komponentinin bağlandığı domain model yapısı gösterilmektedir. Yine PDC’nin içinde bulunduğu dallı zincir α-ketoasit dehidrogenaz kompleksinin farklı bir model yapısı gösterilmiştir c).

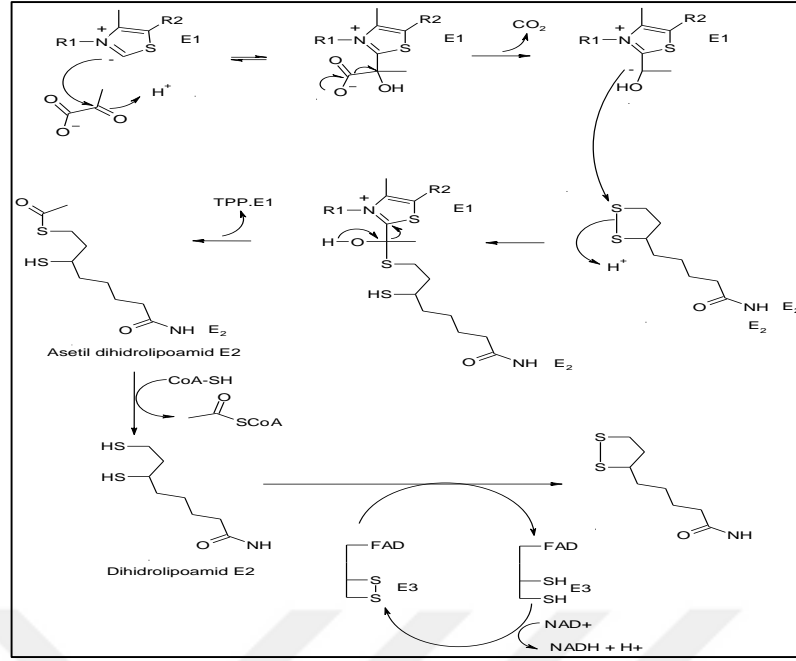
Tablo 2.1. Bir adet pirüvat dehidrogenaz multi enzim kompleksindeki alt üniteler ve sayıları.

Subunit	Mw (toplam)	sayı	Mw subunit	1 molekül kompleksteki sayı	TOPLAM MW
E1 tetramer	154 000			30	154 000x30=4 620 000
E1-a		2	41 000		
E1-b		2	36 000		
E2 core			52 000	60	52 000x60= 3 120 000
E3 dimer	110 000			6	110 000x6=660 000
E3		2	55 000		
E3BP			50 000	6	50 000x6=300 000
Kinaz	100 000	1	48 000		100 0000
			45 000		
Fosfataz	150 000	1	97 0000		150 000
		1	50 000		
Kompleks Toplam					8 950 000

PDC katalizli pirüvatın asetil Co-A dönüşümü yukarıda E1, E2 ve E3 olarak bahsedilen üç enzimin katalizini gerektirmektedir. Enzimatik kataliz basamaklarında önce pirüvat, pirüvat dehidrogenazın (dekarboksilaz olarakta isimlendirilebilmektedir) koenzimi olan TPP'nin reaktif karbonuna bağlı hidroksi-etil ürününü oluşturmak üzere dekarboksile olmaktadır. Hidroksietil ara ürünü dihidrolipoyltransasetilaza kovalent olarak bağlı bulunan lipoik asidin disülfid şekline aktarılarak oksitlenir. Lipoik asidin yan zincirine tiyoester olarak bağlanan asetil grubu CoA'ya aktarılır. Lipoik asidin sülfhidril şekli FAD bağımlı dihidrolipoyl dehidrojenaz ile okside edilerek okside lipoik asidin tekrar üretilmesine neden olur. İndirgenmiş flavoprotein dihidrolipoyldehidrojenaz ile tekrar FAD'ye oksitlenir (Şekil 2.3 ve 2.4).



Şekil 2.3: PDC katalizli pirüvatın asetil-CoA'ya dönüşümü her bir enzimatik reaksiyon basamakları.

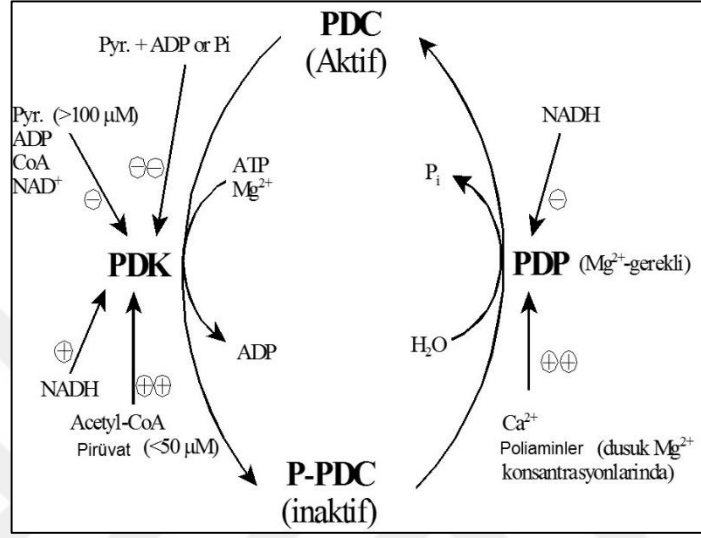


Şekil 2.4: PDC katalizli pirüvatın asetil-CoA'ya dönüşümü enzimatik reaksiyonunun mekanizması.

PDC aktivitesi ürün inhibisyonu, nükleotidlerin inhibisyonu ve kovalent modifikasyon olmak üzere üç farklı şekilde düzenlenmektedir. Pirüvat oksidasyonunun ürünleri olan NADH ve asetil CoA'nın yüksek konsantrasyonları da PDC'yi inhibe eder (ürün inhibisyonu). Bu etki yüksek  $\text{NAD}^+$  ve CoA konsantrasyonlarında kalkmaktadır. PDC kompleksindeki E1 bileşeni GTP ile inhibe olmaktadır ve bu GTP inhibisyonu AMP ile ortadan kalkarak PDC tekrar aktif hale getirir. Pirüvat dehidrojenaz bileşeni üzerindeki bazı serin amino asitleri ATP ile fosfatlandığı zaman kompleks aktivitesini tamamen kaybeder. Şekil 2.5'de belirtildiği gibi PDC fosforilasyon/defosforilasyon döngüsüyle kovalent olarak regüle olmaktadır [6-8]. PDC kinazlar (PDK1-4) ATP varlığında PDC'yi fosfatlayarak inaktive ederken PDC fosfatazlar (PDP1-2) bu fosfatı hidroliz ederek PDC'yi yeniden aktive ederler [6-8]. NADH ve asetil CoA, PDK'i aktive ederek PDC'nin inhibisyonunu sağlar, bu etki CoA ve  $\text{NAD}^+$  tarafından ortadan kaldırılır [6-8].

İnsanda PDP'nin PDP1 ve PDP2 olmak üzere iki ayrı izoformu olduğu bilinmektedir [13]. PDP1 (veya PPM2c olarak isimlendirilir) insanda kas, böbrek ve beyin gibi  $\text{Ca}^{+2}$  duyarlı dokularda dominant izoformdur [14]. PDP1 regülatör (PDP1<sub>r</sub>, 96 kDa) ve katalitik (PDP1<sub>c</sub>, 52.6 kDa) olmak üzere iki alt üniteden oluşmaktadır [15]. Katalitik alt ünite enzimatik katalizden sorumludur, regülatör alt ünite  $\text{Ca}^{+2}$  bağlanma bölgesi içerir. Enerji gereksinimi sırasında, sitoplazmada ve daha sonra mitokondride

$Ca^{+2}$  konsantrasyonu artar ve bu da PDP'nin, E2 bileşenine bağlanmasını tetikler ve sonrasında PDP1c  $Mg^{+2}$  gereken bir reaksiyon ile defosforilasyon reaksiyonunu katalizleyerek PDC'yi aktive eder [16]. Poliaminlerden özellikle spermin düşük  $Mg^{+2}$  konsantrasyonlarında, PDP'nin  $Mg^{+2}$ 'a olan ilgisini artırarak PDC'nin aktivasyonunu sağladığı belirtilmiştir [17].



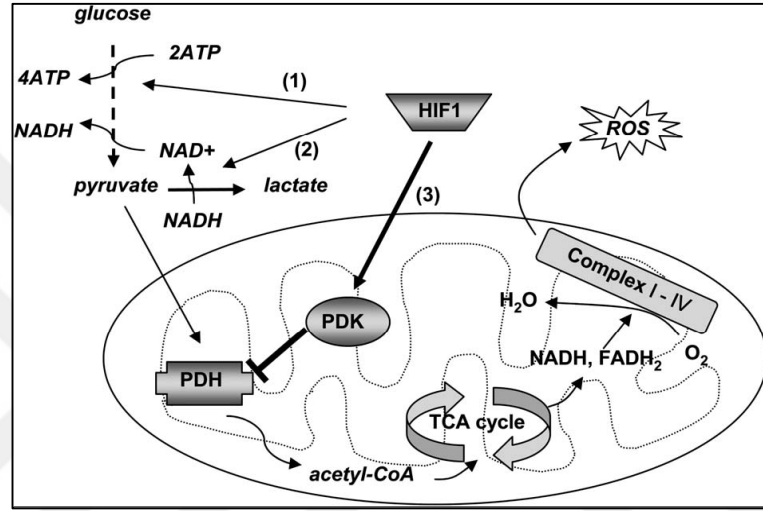
Şekil 2.5: PDC'nin, PDK ve PDP enzimlerinin katalizlediği fosforilasyon/defosforilasyon döngüsüyle regülasyonu.

İnsanda hücre spesifik dört farklı izoformu bilinen PDK (PDK1, PDK2, PDK3 ve PDK4) enzimleri serin kinaz ailesi üyesidirler. PDC multienzim kompleksinin E1α alt ünitesini fosfatlamaktadırlar. PDK1 yaklaşık molekül ağırlıkları 48 kDa ve 45 kDa olan sırasıyla α ve β alt ünitelerini içermektedir. Kinaz aktivitesinin gerçekleştiği yer α alt ünitedir. İnsan PDK1'in yaklaşık molekül ağırlığının 48 kDa olduğu bildirilmiştir.

## 2.1. PDC Kompleksi ve Kanser

Kanser hücrelerinde, yeteri kadar pirüvat olmasına rağmen PDC aktivitesinin düşük olduğu belirtilmiştir [18-19]. Oksijen seviyesinin düşük olduğu durumlarda HIF-1 (hipoksia indüklenebilen faktör-1), PDK1'in ekspresyonlarını artırdığı gösterilmiştir [20, 21]. Böylece HIF-1, PDC üzerinden TCA döngüsünü yavaşlatmakta ve böylece düşük oksijen seviyelerinde daha fazla üretilen reaktif oksijen türleri (ROS)'nin oluşumunu da azaltmaktadır (Şekil 2.6). Hipoksik şartlarda HIF-1, paralel olarak glikoliz yolunu hızlandırarak PDC üzerinden ilerleyen mekanizma ile normal

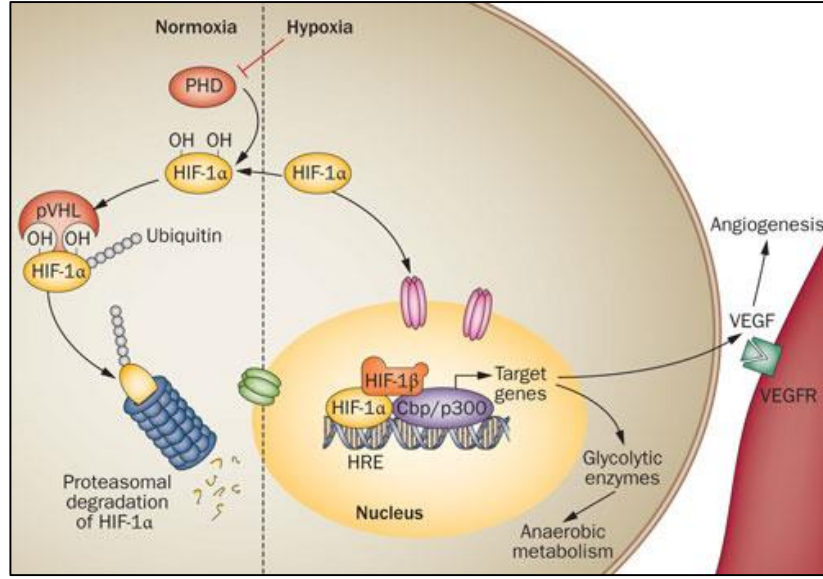
hücrelerde ROS kaynaklı hücre ölümünü engellemektedir [21]. HIF-1 mekanizmasının kanser hücrelerinde de etkili olduğu ve PDK1 ekspresyonunu artırarak ROS-kaynaklı apoptosizi önlediği belirtilmiştir [20,21]. HIF-1 indüklemeli PDK1 ekspresyonu bloke edildiği zaman, ROS miktarı artışıyla hücre apoptosize gitmektedir [20]. Bu veriler doğrultusunda, kinaz aktivitesi inhibe edilerek PDC aktivitesinin artırılabilceği ve böylece kanserli hücrenin oksidatif fosforilizasyona yönlendirilerek apoptosize uğratılabileceği görüşü ileri sürülmüştür [20, 21].



Şekil 2.6: Hipoksik şartlarda, HIF-1'in regüle ettiği enzimler ve metabolik etkiler. HIF-1 glikolizde görevli enzimleri (1) ve laktat dehidrogenazı (2) stimüle etmekte ve aynı zamanda mitokondrideki PDK1'i (3) indüklemektedir. PDK1, TCA döngüsüne Asetil-CoA sağlayan PDC'nin aktivitesini inhibe etmektedir; sonuç olarak da oksidatif fosforilizasyon yavaşlamaktadır. Oksidatif fosforilizasyonun yavaşlaması da reaktif oksijen türleri (ROS)'nin oluşumunu da düşürmektedir. Böylece, hipoksik şartlarda HIF-1 ROS oluşumunu dengede tutmaktadır. Aksi takdirde, ROS-indüklemeli apoptosiz meydana gelebilmektedir. Bu şekil 20 numaralı kaynaktan telif hakkı izini alınarak (copyright, 2006 Elsevier) kullanılmıştır.

Hipoksi durumunda aktif olan HIF-1 $\alpha$  oksijenli ortamda parçalanmaktadır. Parçalanma pirol hidroksilaz katalizli hidroksillenme, ubiquitin proteini bağlanması ve sonuçta proteazomal degradasyon şeklinde olmaktadır (Şekil 2.7) [22]. Oksijenli ortamda prolin hidroksilaz aktivite artışına bağlı olarak HIF-1 $\alpha$ 'nın parçalandığı belirtilmiştir [23].

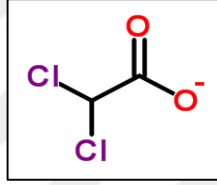




Şekil 2.7: HIF-1 $\alpha$  proteininin düşük oksijenli ortamlarda parçalanması ve normal oksijen seviyesinde aktivitesini göstermesi. Bu şekil kaynak 22'nin izni ile (telif hakkı, copyright, 2012) ile kullanılmıştır.

### 3. PDK İNHİBİTÖRÜ DİKLOROASETİK ASİT

Dikloroasetik asit (DCA) ağızdan alınan laktik asidosizin ve mitokondri hastalıklarının tedavisinde kullanılan sentetik bir kimyasaldır (Şekil 3.1). DCA spesifik bir PDK inhibitörüdür. Kanser hücrelerinde glikoz metabolizmasını glikolizden, glikoz oksidasyonuna kaydırarak solid tümörlerdeki aerobik glikolizi engellemektedir [24]. DCA sitokrom-C çıkışı ve mitokondrideki apoptoz indükleyen faktörlerin salınmasıyla kanser hücrelerinde apoptosize neden olmaktadır. Son yapılan çalışmalar DCA'nın beyin, endometriyal, prostat ve küçük hücreli dışı akciğer kanserinde apoptosizi uyardığını göstermiştir [24-31].



Şekil 3.1: Dikloroasetat kimyasal yapısı.

PDK,  $Mg^{+2}$  bağımlı bir reaksiyon ile ATP kullanıp PDC'yi fosfatlayarak inaktive etmektedir (Şekil 2.5). DCA, PDK'ye ATP bağlanmasını engelleyerek inhibisyona sebep olmaktadır. PDK'ler dimerik olarak aktivite göstermektedir ve PDK'ye DCA bağlıken bu dimerik etkileşim engellenmektedir [6-9].

DCA uygulamaları kanser hücreleri metabolizmalarında değişikliklere sebep olabilmektedir (Tablo 2.3). MCF-7, glioblastoma, insan beyin sıtması, LVCaP-LN3 [24-31] gibi kanser hücrelerinde DCA uygulamalarında laktat konsantrasyonlarının düştüğü belirtilmiştir (Tablo 2.3). Örneğin Madhok ve arkadaşları HB2 ve LoVo hücre hatlarında 10, 20 ve 50 mM DCA kullandıklarında laktat konsantrasyonlarının %10, %30 ve %85 oranlarında azaldığını belirtmişlerdir. Aynı çalışmada bu düşüşün PDC kompleksinin E1 $\alpha$  alt ünitesinin fosfatlanması ile ilgili olduğunu göstermiş ve bunların da apoptosis ve G2 hücre baskılanması ile ilgili olduğunu belirtmişlerdir [24]. Başka bir çalışmada meme kanseri hücrelerinde laktat konsantrasyonunun düştüğü Lefort ve ark. ve Robey ve ark. tarafından belirtilmiştir [26, 32]. MDA-MB-231 hücrelerinde 20 mM DCA uygulanması hücre canlılığını %19 düşürmüş, 20 mM'dan daha yüksek DCA konsantrasyonları ise laktat konsantrasyonlarını %29 düşürmüştür [32].

Tablo 3.1: DCA'nın bazı hücrel metabolitlere etkileri. GABA: Gama amino butirik asit.

Hücre tipi	DCA Kons.	Artan	Azalan	Etkilenmeyen	Kaynk.
MCF-7	10 mM DCA	pirüvat	glikoz, aseton, alanin, glisin, glutamin		26
Glioblastoma	0 mM	~ 2 nmol $\alpha$ -KG			25
	0.5 mM	~ 2.8 nmol $\alpha$ -KG			
	5 mM	~ 3.5 nmol $\alpha$ -KG			
HCM	60 mg/kg		laktat, alanin	glutamat, aspartat, GABA	27
Sıçan	300 mg/kg	3-hidroksibütirat, asetoasetat	glikoz, insülin, laktat, pirüvat, glikoz 6-posfat., sitrat, malat, alanin, glutamat, glutamin		28
İnsan (kan)			laktat, pirüvat, alanin		29
İnsan (beyin)		kolin/kreatin, NAA/kreatin	laktat/kreatin		
İnsan (basal ganglia)		kolin/kreatin, NAA/kreatin	laktat/kreatin		
İnsan Beyin	100 mg/kg	glikoz (41%)	laktat (35%)	ATP, kreatinfosfat, glikojen	30
Sıçan (kan)	100 mg/kg	glikoz		laktat	
LNCaP-LN3	50 mM		laktat/kolin, laktat/kreatin, laktat/alanin		31

## 4. KANSER HÜCRELERİ METABOLİZMALARI

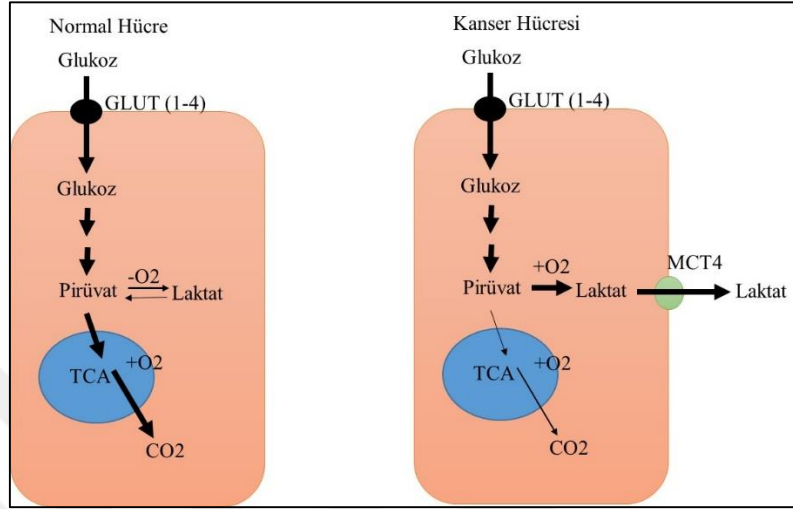
Kanserde enerji üretimi ve enerji harcanması arasındaki denge enerji harcanması lehinedir. Bu sebeple kansere bağlı ölümlerin genelinde aşırı kilo kaybı görülmektedir. Kanser hücrelerinin metabolizmaları normal hücrelerden oldukça farklıdır. Temelde kanser hücreleri çoğalmak için daha fazla aerobik glikoliz, yağ asidi sentezi ve glutaminolizis bağımlı olarak bu yolları enerji harcanması lehinde kullanırlar [33].

Kanser hücrelerinin enerji gereksinimlerini hızlı bir şekilde sağlamak için glikoliz yolunu kullandığı, 1930'larda Alman bilim adamı Otto Warburg tarafından bildirilmiştir [34, 35]. Warburg, aerobik (oksijenli) glikolizin kanser hücrelerinin hepsinde olduğunu ve bu durumun kanserin nedeni olduğu teorisini ileri sürmüştür [34]. Warburg'un ileri sürdüğü bu teori, zamanla glikoliz yolunu kullanmayan tümörlerin bulunmasıyla kabul görmez olmuştur. Son yıllarda moleküler biyoloji tekniklerinin hızlı gelişmesiyle kansere neden olan pek çok gen bulunmuştur. Ancak, 1990'ların ortalarında kanser hücrelerinin glikoz analogu kullanılarak pozitron emisyon tomografisi (PET) ile görüntülenmesi Warburg Teorisi'ni tekrar gündeme getirmiştir. Günümüzdeki modern görüş ise kanserin genetik bir hastalık olduğu ve bunun sonucunda Warburg etkisinin oluştuğudur. Örneğin, Hwang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar, kanser hücrelerinde mutasyona uğrayan *p53* geninin Warburg etkisini tetiklediğini göstermektedir [36].

### 4.1. Kanser Hücrelerinde Karbonhidrat Metabolizması

Kanser teşhisinde ve tedavisinde karbonhidrat metabolizması oldukça önem taşımaktadır. Yukarıda bahsedilen PET görüntüleme sisteminde glikoz alımı hastaya glikoz analogu 2-(18F)-fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) verilmesiyle görüntülenmektedir. Kanser hücreleri normal hücreler ile kıyaslandığında kan glikozunu 5-10 kat daha fazla alarak kullanmaktadır [37]. Bu nedenle kanser vakalarının çoğunda hipoglisemi, yani düşük kan şekeri seviyeleri görülmektedir. Kanserde tümör baskılayıcı gen *p53*'ün kanser hücresi yüzeyindeki glikoz taşıyıcıları (GLUT1, GLUT3 ve GLUT4) üzerindeki inhibitör etkisi kalktığından, glikoz

taşıyıcıları aktive olmaktadır ve hücre içine daha fazla glikoz girmektedir [38]. HIF-1 $\alpha$ 'da ayrıca glikoz taşıyıcılarının miktarını arttırmaktadır. HIF-1 $\alpha$ , Warburg etkisiyle aerobik glikolize sebep olarak kanser hücrelerinde bol miktarda laktat oluşumuna sebep olmakta ve asidoz meydana getirmektedir (Şekil 3.2.).



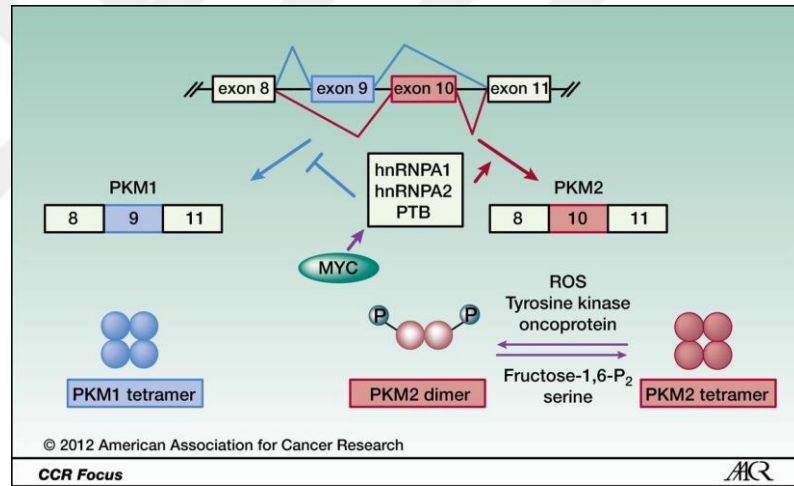
Şekil 3.2: Normal ve kanser hücreleri metabolizmaları, aerobik glikoliz. Normal metabolizmaya sahip hücrelerde glikoz kalın oklar ile gösterilen yolu kullanıp CO<sub>2</sub>'ye oksitlenmektedir. Kanser hücrelerinde ortamda oksijen olsa bile glikoz özellikle laktata çevrilmektedir.

Laktatlar cori çevrimine girmek için karaciğere taşınmakta ve burada glikoneogenez ile glikoza çevrilerek tekrar kana karışmaktadır. Kanser vakalarında cori çevrimi aktivitesi %20'den %50'ye çıkar [39]. 1 mol glikoz sentezleyebilmek için 6 ATP ve 2 NADH harcanırken, 1 mol glikozdan anaerobik glikoliz ile 2 ATP elde edilir. Bu da Cori çevrimindeki anormal artışın vücut için ayrı bir enerji kaybı olduğu anlamına gelmektedir.

Glikozu TCA çevriminde tam olarak metabolize edemeyen kanser hücreleri, TCA döngüsü için alternatifler bulmaya çalışır. Kanser hücreleri glutaminoliz yolu ile glutaminden glutamat (glutaminaz katalizli) ve glutamattan  $\alpha$ -ketoglutarat (glutamat dehidrogenaz katalizli) sentezleyerek TCA çevrimini doldurmaya çalışır [40]. Bir NMR çalışmasında hücre kültüründeki glioblastoma hücrelerine izotop işaretli glutamin ve glikoz verilmiş, kanser hücrelerinde anaplerotik karbon kaynağının glutamin olduğu bulunmuştur [41]. Glutamin birçok kanser hücresinde mitokondri için primer substrattır. Mitokondriyal membran potansiyelinin devamı için gereklidir. Glutaminaz inhibitörlerinin birçok kanseri baskıladığı gösterilmiştir ve günümüzde

kanser tedavisinde kullanılmaktadır [42, 43].

Kanser hücreleri karbonhidrat metabolizmalarındaki önemli diğer farklılık glikolitik yoldaki üç allosterik, hız belirleyici, enzimlerin regülasyonunun bozulması ve buna bağlı glikoliz hızındaki anormal artıştır. Bu enzimler glikoz-6-fosfataz, früktoz-1,6-difosfataz ve fosfoenolpirüvat karboksilazdır. Kanserde glikolizdeki diğer önemli enzim ise pirüvat kinazdır. Pirüvat kinaz fosfoenolpirüvatın pirüvata dönüşümünü katalizler ve normal hücrelerde M1PK izoformu baskındır [44]. Kanser hücrelerinde ise M2PK izoformu daha aktiftir. M2 izoformunun aktivitesi aktif bölgeki tirozinin fosfatlanmasından dolayı M1'den oldukça düşüktür (Şekil 3.3). Bu durum pirüvatın laktata dönüşümünü hızlandırmaktadır. Pirüvat kinazın embriyonik izoformu tümörlerde sıklıkla ortaya çıkmakta, adipositler hariç yetişkin dokularda rastlanmamaktadır [45, 46].



Şekil 3.3: Kanser metabolizmasında PKM2 pirüvat kinaz izoformu daha baskındır. PKM1 myc onkogeni ile baskılanmakta, PKM2 tetrameri fosfatlanmakta ve düşük aktiviteli PKM2 dimerine dönüşmektedir. Bu şekil 44 numaralı kaynaktan, telif hakkı izini ile (copyright 2012) kullanılmıştır.

Kanser hücreleri artmış glikolitik metabolizmaları dolayısıyla laktik asit ve karbonik asit üretirler, bunlar ve çevreleri, tümörün invazyon'u kolaylaştırır [47]. Ayrıca antikanser bağışıklık efektörlerini baskılamakta kullanılır. Tümör hücreleri tarafından üretilen laktat, tümör olmayan hücreler tarafından monokarboksilat taşıyıcıları MCT-1ve MCT-2 yoluyla içeri alınır ve yeniden pirüvata çevrilerek bu hücrelerin kanserleşmesinde rol oynar (Şekil 3.4).

Kanser hücreleri diğer mikroçevre ve kemoterapötik ajanlara karşı, antioksidan savunma sağlayan NADPH meydana getirmek için glikozu pentoz fosfat yolu ile metabolize edebilir [46] (Şekil 3.3). NADPH ayrıca yağ asidi sentezine de katkıda bulunabilir. Pentoz fosfat yolunun okside olmayan parçası transketolaz reaksiyonları tarafından kontrol edilir, transketolaz izoform-1, birçok kanser vakasında aşırı ifade edilmektedir [48].

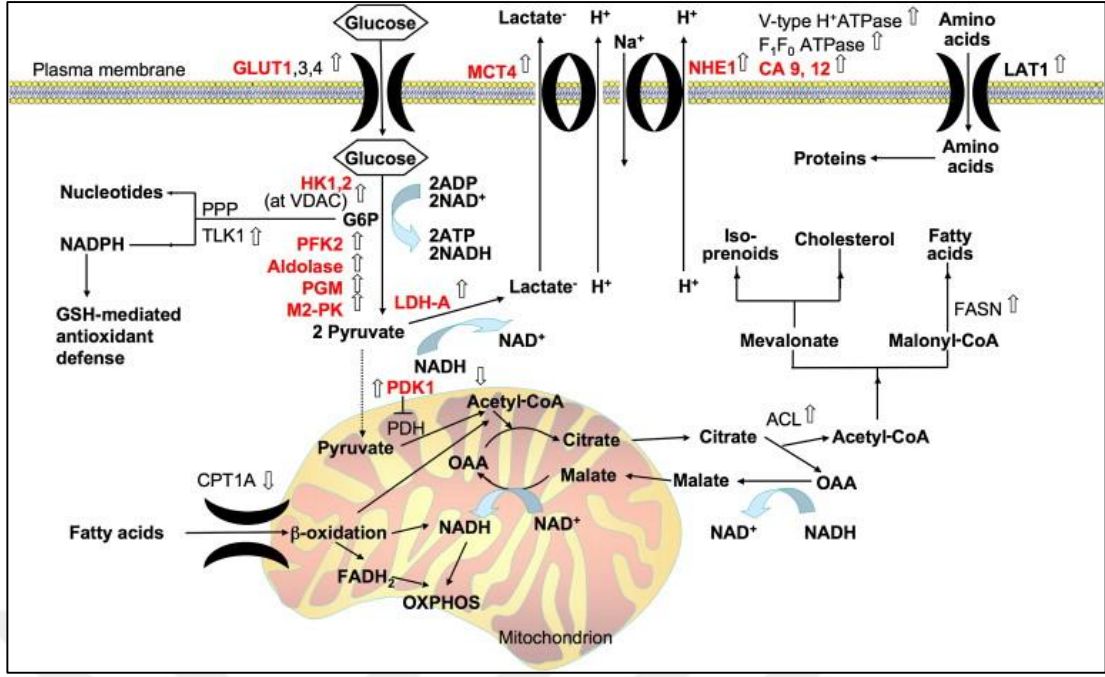
Kanser hücrelerinde pirüvat TCA çevrimine girebilir. Bu yol ile üretilen asetil-CoA ise mitokondriyal matriksten dışarı verilerek yağ asitlerinin, kolesterolün ve izoprenoidlerin sentezi için kullanılabilir. Asetil CoA, malonil-CoA ve NADPH'tan uzun zincirli yağ asitleri sentezleyen yağ asidi sentaz, birçok kanser vakasında aktive edilmektedir [49, 50]. Benzer şekilde fosforilkolini meydana getiren kolin kinaz (ChoK), kanser vakalarında sıklıkla ortaya çıkar [50] (Şekil 3.4).

Kanser hücrelerinde bozuk TCA çevrimi içerisinde, sitrat, trikarboksilat transportörü vasıtasıyla stoplazmaya taşınır, stoplazmada ATP-sitrat liyaz (ACL) ile okzaloasetat ve asetil-CoA'ya çevrilir. Okzaloasetat malata indirgenir ve mitokondriye geri döner ve mitokondriyel okzaloasetata çevrilir. Mitokondriyel okzaloasetat ise NADH üretilirken TCA çevrimini baskılamaktadır. Mitokondriyel okzaloasetat çevrimi tamamlamak için asetil-CoA ile reaksiyona girer (Şekil 3.4).

Kanser hücrelerinde mitokondrinin işlevsel olmamasının en önemli nedenlerinden diğeri ise oluşan ROS'ların akonitaz, kompleks I ve kompleks III'ü inhibe etmesidir.

## **4.2. Kanser Hücrelerinde Protein ve Yağ Metabolizması**

Proteinlerin diğer biyokimyasal moleküllerden en önemli farkı azot ihtiva etmeleridir. Kanser hücreleri azotu proteinlerden aldığı için kanserde kaslar giderek zayıflamaktadır. Bunun altında yatan mekanizma ise plazma insülin seviyelerinin azalması sonucu iskelet kasında üç ana proteolitik yoldan birinin aktive edilmesidir. Bunlar; lizozomal sistem, kalsiyumla aktifleşen sitozolik sistem (kalpain 1 ve 2 sistemlerini içerir) ve ATP bağımlı ubikuitin proteolitik sistemdir [52].



Şekil 3.4: Kanser hücrelerinde merkez karbon metabolizmasındaki önemli değişimler. Yukarı yönlendirilmiş oklar kanser bağlantılı enzimlerin aktivasyonunu, aşağı yönlendirilmiş oklar ise inhibisyonunu göstermektedir. HIF-1 aktivasyonu kırmızı ile gösterilen değişikliklere neden olmaktadır. CA9 ve CA12; karbonik anhidraz 9 ve karbonik anhidraz 12'yi göstermektedir. CTP karnitin palmitoiltransferaz, GLUT glikoz taşıyıcısı, GSH glutatyon, IDO idolamin 2,3-dioksijenaz, HK heksokinaz, OXPHOS oksidatif fosforilasyon, LAT1 L-tipi aminoasit taşıyıcısı 1, LDHA laktat dehidrogenaz izoform A, MCT monokarboksilat taşıyıcısı, PFK fosfofruktokinaz, PI3K fosfaditilinositol 3-kinaz, PGM fosfoglisetatmutaz, PKM2 piruvat kinaz izoform M2, PPP pentoz fosfat yolu, SCO2 sitokrom c oksidaz 2, TLK transketolaz, VDAC voltaja bağımlı anyon kanalını ifade etmektedir. Şekil 50 numaralı kaynağın izni ile (telif hakkı, copyright, 2008 Elsevier) kullanılmıştır.

Açlık, yetersiz besin alımının uzaması kanser durumunda plazmada serbest yağ asitlerinin konsantrasyonunun artmasına sebep olur. Bunun sebebi de lipid metabolize edici faktörün adipoz dokuyu katabolize etmesi ve yağ asidi ve gliserol oluşumunu sağlamasıdır. Kanserde etkili olan makrofajlardan salınan TNF- $\alpha$ 'nın lipoprotein lipazı inhibe ettiği ve yağ depolanmasını engellediği gösterilmiştir [53]. Bu süreçte oluşan gliseroller glukoneogenezde kullanılırken serbest yağ asitleri ATP sentezlemek için kullanılır. Ayrıca tümör varlığında, kanser hücreleri membranındaki LDL reseptör ekspresyonu arttığı için LDL-kolesterol seviyeleri azalmaktadır [54].



### 4.3. Meme Kanseri

Meme kanseri, memenin kötü huylu tümörüdür. Hastalık genel olarak kadınlarda görülse de erkeklerin de yakalanma ihtimali vardır. Meme kanseri yüzbinde 40.7 ile kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Bunu yüzbinde 16.2 ile tiroid, 13.2 ile kolorektal, 8.6 ile uterus, 8.2 ile akciğer ve 7.7 ile mide ve 77.4 ile diğer kanser türleri izlemektedir [55-57]. Meme kanseri kaynaklandıkları yerle sınırlı (non-invaziv) ya da meme stromasını tamamen kaplayan (invaziv) olarak sınıflandırılırlar. *In situ* meme kanserleri kanal veya lobülde oluşurken invaziv meme kanserlerinin çoğunluğu (>%95) duktal adenokarsinom, bez epitelinin kanserleridir [58]. Meme kanseri, tümör hücrelerinin farklılaşması ve histopatolojik olarak evre ve derecesine göre sınıflandırılmaktadır. Evre, tümör boyutu, bölgesel lenf nodu tutulumu ve uzak metastaza göre belirlenir [59]. Meme kanserinin tedavisi kanser aşamasına göre belirlenir [60]. Tedavi genellikle tanıya göre menopoz öncesi sonrası ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER2)'nin ekspresyonuna ve östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) pozitif veya negatif oluşuna göre yapılmaktadır. Tedavi seçenekleri evreye, hormon reseptörü bulunmasına ve tümörün diğer özelliklerine göre değişir. Meme kanserinin tedavisi cerrahi, radyoterapi, sistematik adjuvan tedavisi (kemoterapi, tamoksifen ve aromataz inhibitörleri) şeklindedir [61].

## 5. GEREÇ VE YÖNTEMLER

PDC aktivitesi arilamin asetil transferaz1 (NAT1) ikinci enzimi kullanılarak ölçülebilmektedir [62]. NAT bu sebeple klonlanmış ve saflaştırılmıştır.

### 5.1. Rekombinant pGEX-6P-NAT Geninin Klonlanması ve Saflaştırılması

NAT geni *Staphylococcus saprophyticus*'dan klonlandıktan sonra, ligasyon, transformasyon, ekspresyon ve saflaştırılmaları yapılmıştır. Transformasyonda *E.coli* Top10, ekspresyonda *E.coli* BL21 (DE3) kullanılmıştır.

#### 5.1.1. *Staphylococcus saprophyticus* NAT Geninin PCR ile Çoğaltılması

NAT, ORF (open reading frame)'in amplifikasyonunda kullanılan genomik DNA *Staphylococcus saprophyticus*' a aittir. 3615680 erişim numarası (NCBI gen ID) ile gen bankasında bulunan *Staphylococcus saprophyticus* tahmini NAT geni dizisi (Şekil 5.1.) göz önünde bulundurularak *Bam*HI ve *Xho*I kesim bölgeleri içeren ileri ve geri primerleri dizayn edilmiştir.

```
...5' AGTATTTTAAATTTAAAAAGGGTGAAGACATGACCGATTTTAAACCATTAGAAGATT  
ACTTAAATATTAATACAGAAAATTATCGTGACAATGATTTAACAACAATAAATCATTATA  
TATATCAATATGTTATTAATGTACCTTTTGAAAATATCAATGTGCAAAAATAAACAACCGA  
TTGCTTTAGACGATGAGGCGATGATTTATAAAAATTGTTTCAGAGCACAGAGGTGGTTATT  
GTTACGAACAGAATCGTTTGTCCATAGTTGGATAACGTCCAAAGGGTTTGATGCTTATA  
TGATATCAGCAACAATCAATACGGGTAATGGGTGGGCCATGGCCGGTTCTCATATGGCAT  
TAATTGTACAAATAAATCAAGAAAAATTTAGTGGATGTGGGTTATGCCGATGTACCTA  
AACAAGCGATGCCATTAATAAATGAAACGGAAGTGATTGAGGATGTGAATGGAAAAATTT  
CAAGCGTCGTGGATTGATACGCAAACGATTGATATGAGCAAATATAAAGATGAGGCTTG  
GGAAATTCAATATCGCGCGATTGACAAAGCGCAAGCAATCATGGATTTTCGATGAAGCGA  
TTCATTTAATCAGTATGATGCGCATTCTATATTTGTAAAAAAATTAATTGTTAGTAAAGC  
AAAGTTGTATGGACGCGTAACATTATCTAATAATCATTTAACGATTACGGATCATGGTGA  
AAAAGAAAAAATTCCTGTAACACAAAGTAATTATCAGACACTATTAAGCATATTTTG  
GTATAGAAAATATAAAATTACGACCTTTTGAATAAATCTTTGTTGTTGCGGTTAATTTG  
AACG-3'...
```

Şekil 5.1: *Staphylococcus saprophyticus*: SSP2292, tahmini arylamine N-acetyltransferase (780 nt) upstream 30, downstream 30 gen dizilimi.

Bu gen dizilimi göz önüne alınarak dizayn edilen *Bam*HI içeren ileri ve *Xho*I içeren geri primerler aşağıda verilmiştir.

İleri..... F-5'-AAGGGTGGATCCATGACCGATTTTAAAC-3' (altı çizili bölge *Bam*HI kesim bölgesidir).

Geri.....R-5'-GCCGCACTCGAGTTATTCAAAAGGTCGT-3' (altı çizili bölge *Xho*I kesim bölgesidir)

Amplifikasyon 25 µl toplam hacimde yapılmıştır. 2 µl template DNA (önceden tarafımızdan klonlanmış bir konstrakt olan NAT-pET-22b), 1 µM 5' ve 1 µM 3' primerler, 1 ünite Taq master mix (Taq polimeraz, her bir dNTP'den 200 µM, 1 mM MgCl<sub>2</sub> içerir) kullanılmıştır. Örnek DNA termal cycler'a yerleştirilip 94°C (30 s), 50°C (30 s), 68°C (60 s) 5 döngü, bu döngünün ardından primerlerin bağlanma sıcaklığı 57°C (30 s)'ye yükseltip 25 döngü yapılmıştır. Son döngü basamağından sonra reaksiyon 68°C'de 5 dk bekletilip sonlandırılmıştır. PCR ürünü etidyum bromür (0.5 µg/ml) içeren % 1'lik agaroz jelde görüntülenmiş ve ardından jelden DNA saflaştırma kiti (RTA Laboratuvarları, Jel/PZR Saflaştırma Kiti) kullanılıp saflaştırılmıştır.

### 5.1.2. Restriksiyon Endonükleaz Kesimi

pGEX-6P-1'in *Bam*HI ve *Xho*I restriksiyon endonükleazlar ile yapılan ikili enzim kesiminde Tango tampon (Fermentas) kullanılmıştır. 2 µl pGEX-6P-1'in önce 2 µl *Xho*I ile (20 unit), 2 µl *Bam*HI tampon (10X)'da, 45 dk, 37°C'de kesilmiştir. Daha sonra reaksiyon ortamına 1.5 µl *Bam*HI ilave edilerek ve 40 dk inkübe edilmiştir. pGEX-6P-1'in *Bam*HI ve *Xho*I kesim ürünü (vektör) (~ 4980 bp) etidyum bromür (0.5 µg/ml) içeren % 1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. Agaroz jelden DNA saflaştırma kiti (RTA Laboratuvarları) ile saflaştırılmıştır (tüm restriksiyon enzimi kesim reaksiyonlarındaki sıcaklık 37°C dir). Benzer *Bam*HI ve *Xho*I ikili enzim kesimi, *Staphylococcus saprophyticus*'dan PCR ile çoğaltılan NAT'a da yapılmıştır. Özetle 20 µl PCR ürünü, 2 µl *Bam*HI, 2 µl *Xho*I, restriksiyon endonükleazları ile 3 µl Tango tampon ortamında ikili enzim kesimi gerçekleştirilmiştir. Bu 27 µl'lik PCR ürünü (insert) kesim reaksiyonu etidyum bromür (0.5 µg/ml) içeren % 1'lik agaroz jelde görüntülenmiş ve ardından jelden DNA saflaştırma kiti ile saflaştırılmıştır. Vektör ve insert'ün 5'er µl'si etidyum bromür (0.5 µg/ml) içeren % 1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

### 5.1.3. Ligasyon ve Transformasyon

Dört ayrı vektör/insert oranında 16 saatlik ligasyon reaksiyonları kurulmuştur (Tablo 5.1).

Tablo 5.1: NAT'ın pGEX-6P-1'e aktarılması ligasyon şartları.

	Vektör (pGEX-6P-1- <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I-kesim, 20 ng/μl), μl	İnsert (NAT- <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I-kesim, 5 ng/μl), μl	T4 DNA ligaz, μl	T4 DNA ligaz tampon (10X), μl	Steril DI su, μl
Reak.1	5	3.5	2	2	7.5
Reak. 2	5	0	2	2	11
Reak. 3	4	4	2	2	8
Reak. 4	4	8	2	2	4

Ligasyon reaksiyonları 16°C'de gece boyu sürdürülmüştür (18 saat). Bir gün sonra kompetan *E.coli* Top 10 hücrelerine (50 μl son hacimde) transformasyon yapılmıştır. Transformasyonda her bir ligasyon reaksiyonundan 8 μl kullanılmıştır. 42°C'de 60 sn şoklamadan ardından reaksiyonlar üzerine 200'er μl LB (Luria-Broth) ilave edilmiştir. 37 °C'de 1 saat 230 rpm'de ön büyütme yapıldı ve reaksiyonların tamamı (258 μl) 100 μg/ml amfisilin içeren dört adet LB gara ekilmiştir. Bir gece 37°C'de inkübasyon sonrası seçilen tek *E.coli* Top 10 kolonileri küçük kültürde (5 ml amfisilinli LB'de) gece boyu büyütülmüştür. Saflaştırılan pGEX-6P-1-NAT plazmiti *Bam*HI ve *Xho*I ikili enzim kesimi ile doğrulanmıştır.

### 5.1.4. Rekombinant pGEX-6P-NAT'ın Ekspresyonu ve Saflaştırılması

Amfisilinli agardan seçilen tek, pGEX-6P-1-NAT içeren *E.coli* Top 10 kolonisi 5 ml amfisilinli (100 μg/ml) LB'de bir gece büyütülmüştür. RTA kiti (Plazmid DNA İzolasyon Kiti) ile plazmit saflaştırması yapılmıştır. 3 μl plazmit, kompatent *E.coli* BL21 (DE3) ekspresyon konakçısına transforme edilmiştir. Ertesi gün *E.coli* BL21 (DE3) tek koloni ön kültür oluşturmak üzere amfisilin içeren 5 ml LB'ye ekilerek 37°C, 180 rpm'de bir gece inkübe edilmiştir. Gecelik kültürün ardından 1:250 seyreltme oranında 500 ml LB'ye (100 μg/ml amfisilin) inoküle edilmiştir. Hücreler 37°C'de OD<sub>600</sub> 1-1.2 olana dek büyütülmüştür. 1 mM IPTG ile indüklemeye yapıldıktan sonra hücreler aynı şartlarda 5 saat daha büyütülmüştür. Bu esnada çeşitli zamanlarda

büyüme ortamından örnekler alınmış ve SDS-page ile indüklenme takip edilmiştir. Hücre kültürü 8000 rpm, 4°C, 10 dk santrifügasyon ile çöktürülmüştür. 500 ml kültürden elde edilen 8 gr bakteriyel ıslak pellet -75°C’de dondurulmuştur.

Protein saflaştırılması yapmak üzere -75°C’den, 4 gr bakteriyel ıslak pellet alınmış ve 40 ml lizis tamponunda (lysis tampon: 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTT içeren PBS. PBS: 137 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, ve 2.7 mM KCl, pH 7.4) pipetlenmiştir. 20 mg lizozim ilave edilerek oda sıcaklığında viskoz bir yapı oluşana kadar yaklaşık 10-15 dakika ara-ara karıştırılarak bekletilmiştir. 10 kez 30 sn sonikasyonun ardından 30 sn beklenmiştir, mikrotip prob kullanılıp % 50 güç çıkışında sonikasyon yapılmıştır. Hücre lizatı 8000 rpm, 4°C, 20 dk santrifüj edilmiş ve üst kısım PBS ile dengelenen GST kolona (17 mm iç çap x 10 mm) yüklenmiştir (4°C). GST kolon ile etkileşmeyen proteinlerin kolondan uzaklaştırılması için 5X kolon hacminde yıkama tampon (%1 Triton X-100, 150 mM NaCl içeren PBS) kullanılmıştır. GST-NAT olarak ekspresyonu olmuş füzyon proteini elüsyon tampon (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 15 mM indirgenmiş glutatton, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT ve protease inhibitör kokteyl içermektedir) ile toplanmıştır.

## **5.2. İnsan PDP1<sub>c</sub> Klonlanması, Aşırı İfade Edilmesi, Substratın Hazırlanması ve Aktivite Ölçümü**

İnsan PDP1<sub>c</sub> meme kanseri hücrelerindeki PDC<sub>t</sub> aktivitelerinin ölçümlerinde kullanıldığı için klonlandıktan sonra saflaştırılmıştır.

### **5.2.1. PDP1<sub>c</sub> Klonlanması**

İnsan PDP1<sub>c</sub> geni template olarak troid dokusundan elde edilen cDNA ileri primer 5’-CGT TTT CAT ATG GCT TCC ACA CCA CAG AAA-3’ (altı çizili bölge *Nde*I kesim bölgesi) ve geri primer 5’-TTG AAC CTC GAG TCA CTA TTC TTG GTT TTG ATA CGC-3’ (altı çizik bölge *Xho*I kesim bölgesi) kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. PCR reaksiyon karışımı: 50 µl toplam hacimde 0.2 mM dNTP karışımı, 10 pmol primer (ileri ve geri) 100 ng cDNA template, 1 µl Turbo DNA polimeraz (Stratagene, 2.5 U/µl), 5 µl polimeraz tampon çözeltisi içermektedir. PCR protokolü ise 2 dk 94°C’de (1 döngü), 30 sn. 94°C, 30 sn 50°C’de, 20 sn ve 72°C’de 10 sn (35

döngü) yapılmıştır. Amplifikasyonun ardından “erime eğrisi” analizi için uygulanan program 95°C’de 0 saniye, 65°C’de 10 saniye ve 95°C’de 0 saniye (1 döngü) olarak ayarlanmıştır. PCR reaksiyonu için negatif kontrol olarak cDNA yerine su kullanılmıştır.

## 5.2.2. İnsan PDP1<sub>c</sub>’nin Aşırı İfade Edilmesi

5 mL’lik iki küçük gecelik pet28a-PDP1<sub>c</sub>-BL21-DE3 kültürü (30 µg/ml kanamisin), 500 ml’lik iki büyük kültüre aşılacaktır. Hücreler 37°C, 190 rpm’de OD<sub>600</sub> 1-1.5 olana kadar büyütülmüş, 0.3 mM IPTG ile indüklenmiş, inkübatör sıcaklığı 29°C’ye düşürülmüş ve hücreler 29°C’de 6 saat daha büyütülmüştür. Overekspresyonu gözlemek için SDS-page’de kullanılmak üzere indükleme öncesinde ve sonrasında belli zamanlarda 1’er mL örnekler çekilmiş (1, 2, 3 ve 6 saat) ve çöktürülmüştür (9.500 rpm, 5 dk). Daha sonra tüm hücre çöktürülerek (9.500 rpm, 5 dk) protein izolasyonunda kullanılmak için -80°C’de muhafaza edilmiştir.

### 5.2.2.1. Hücrelerin Lizisi

*E. Coli* BL21 DE3 pET28a- PDP1<sub>c</sub> hücresi (9 g), 40 ml, 40 mM tris tampon, 50 mM NaCl, %1 triton x-100, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 20 mg lizozim, pH 7.4 içerisinde çözülmüştür. Cam çubuk ile buz üzerinde karıştırılmıştır. Buz banyosunda 27 kez % 57 güç, 20 sn, %60 cycle’da sonike edilerek ve çöktürülmüştür (10.000 rpm’de, 30 dk, 4°C).

### 5.2.3. PDP1<sub>c</sub> Substratının Hazırlanması

Yukarıda belirtildiği gibi PDP1 fosfatlanmış PDC molekülündeki fosfat gruplarını hidroliz ederek PDC’yi tekrar aktive eder. Bu sebeple fosfatlanmış PDC hazırlanması gerekmektedir. PDC saflaştırmak için bilinen yaygın kaynak taze sığır kalbidir. PDC aşağıda belirtilen prosedüre göre sığır kalbinden izole edilmiş ve fosfatlanmıştır.

### 5.2.3.1 PDC'nin Sığır Kalbinden Kısmen Saflaştırılması

Öncelikle mitokondri izolasyonunda kullanılan tüm tamponlar ve çözeltiler DI (milipor ultra pure) su ile, önem arzeden aktivite çözeltileri steril DI su ile hazırlanmıştır. DI su ile hazırlanan sükroz tampon ve fosfat tampon 0.22 µm çaplı selüloz asetat membran ile filtre edilmiştir. Tüm saflaştırma aşamaları ve diğer çalışmalar buz üzerinde yapılmıştır. Tüm tamponlar buzdolabında ya da buz üzerinde soğutulmuştur.

Yeni kesilmiş bir sığırdan alınan kalp içerisinde kan kalmayacak şekilde yıkanmıştır. Yağ tabakası, dış zarı, kıkırdak kısımları içermeyen kırmızı et kısmı kuşbaşı şeklinde kesilmiştir. Buz üzerinde muhafaza edilmiştir. Tefal kıyma makinesi ile kıyım (0.44 g) haline getirilmiştir. Kıyım fosfat tampon pH 6.5 ile bir kez yıkanmıştır. Ardından iki kat peynir torbası ile süzülüş, sıkılarak kan tamamıyla uzaklaştırılmış ve 0.44 g sükroz tampon (sükroz tampon = 171.15 g sükroz, 400 µL 0.5 M EDTA, 20 ml 1 M fosfat tampon,  $K_xPO_4$ , pH 8 son hacim 2 L) ilave edilmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra ortamın pH'sı, 5 M KOH ile 7.6 yapılmıştır. Buz üzerinde +4°C'de bir gece bekletilmiştir. İkinci gün % 10 luk asetik asit ile pH 6.8 yapılmıştır. Kalp kıyması çözeltisi 500 ml'lik behere alınmıştır. İkea homojenizatör ile 24.800/dk hızda 20 dk homojenizasyon yapılmıştır. Tüm homojenata pH kontrolü yapılmıştır (pH 6.8). Falkon tüplerinde 45-50 ml hacimlerde 2000 rpm'de 13 dk +4°C'de santrifüj yapılmıştır. Üst kısım süzüntü buz üzerinde olacak şekilde 6-8 kat peynir torbası ile süzülüş, 8000 rpm, +4°C ve 20 dk santrifüj edilmiş böylece mitokondri çöktürülmüştür. Mitokondri eşit hacimde 0.014 M β-merkaptetanol'de çözülmüş (β-merkaptetanol taze olmalıdır) ve düşük hızda homojenize edilmiştir. 9000 rpm'de 30 dk +4°C'de santrifügasyon yapılmış ve üst kısım atılmıştır. Çöken mitokondri 20 mM fosfat tampon pH 6.5 ile eşit hacimde homojenize edilmiş. İnhibitörlü fosfat tampondan (50 ml, 20 mM fosfat tampon pH 6.5'e 50 µL 1mg/ml aprotinin, 50 µL 1mg/ml leupeptin, 5 µL 1 M benzamidin ilave edildi) 10'ar ml koyulmuştur. Homojenize edilmiş, sıvı azotta dondurulmuş ve -80°C'de depolanmıştır.

### 5.2.3.2. Mitokondrinin Parçalanması

Mitokondri içeren falkon tüp  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılmış ve vücut sıcaklığında sürekli karıştırılarak eritilmiştir. 50 ml ekstraksiyon çözeltisi (30 mM MOPS tampon pH 7.4 içerisinde, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, %3 triton X-100, % 0.2 BSA, 1 mM PMSF, 1 adet proteaz inhibitör kokteyl tablet) eklenerek buz banyosunda 600 rpm'de 3 saat bekletilmiştir. 10.000 rpm, 15 dk santrifügasyon yapılarak çöktürülmüş ve çöken kısım atılmıştır.

### 5.2.3.3. PEG-6000 Çöktürülmesi

PEG-6000 çöktürmesi son PEG miktarı %5 olacak şekilde buz üzerinde yapılmıştır. Reaksiyon 500 rpm'de 30 dk karıştırılmış ve ardından 10 K, 15'  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifügasyonu ile çökebilir proteinler çöktürülmüştür. Çöken kısım, 10 ml tampon'da (30 mM MOPS tampon pH içerisinde, 2 mM EDTA, 5 mM DTT, %3 triton X-100, % 0.2 BSA, 1 mM PMSF, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin) bir pipet ile ileri-geri yapılarak çözülmüştür. Buz üzerinde  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün pipet ile ileri-geri yapılarak karıştırılmıştır. Santrifüj yapıp çözünmeyen kısım çöktürülmüş ve atılmış ve PDC elde edilmiştir.

### 5.2.3.4. PDC'nin Fosfatlanması

Laboratuvarımızda sığır kalbinden PEG-6000 çöktürmesi ile elde edilen PDC'nin 1 ml'si, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  ve 6 mM ATP ile 45 dk  $30^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. 45 dk süre dolduğunda fosforile PDC buz üzerinde 25 dk bekletilmiştir. Bu substratın 5  $\mu\text{l}$ 'si kullanılıp PDC aktivitesine bakılmış ve başlangıç aktivitesinin 20 kat azaldığı görülmüştür. Fosfo-PDC (1 ml) 400 ml, 10 mM MOPS, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA'ya karşı 1 saat diyaliz edilmiştir ( $+4^{\circ}\text{C}$ ). Diyaliz çözeltisi değiştirilip (400 ml) gece boyu hafif karıştırılarak diyalize devam edilmiştir ( $+4^{\circ}\text{C}$ ). Ertesi gün diyaliz tampon 400 ml taze tampon ile değiştirilmiş ve bu tamponda 4 saatte bir değişim yapılarak 8 saat boyunca diyalize devam edilmiştir. Bu sürenin ardından aktivite ölçümü tekrar edilmiş, başlangıç aktivitesinin 40-45 kat düştüğü, yani PDC'nin



tamamen inaktif hale geldiği (PDC<sub>i</sub>) görülmüştür. PDC<sub>i</sub>, 100 µl fraksiyonlara ayrılmış PDP1<sub>c</sub> aktivite ölçümlerinde gerektiğinde kullanılmak üzere -80°C’de depolanmıştır.

#### **5.2.4. İnaktif PDC ile PDP1<sub>c</sub> Aktivitesi Ölçümü**

PDC<sub>i</sub>, PDP1<sub>c</sub> aktivitesinin ölçülmesi için substrat olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada 29 µl substrat (inaktive PDC), 0.4 µl 100 mM CaCl<sub>2</sub> (son derişim 1.3 mM), 0.6 µl, 1 M MgCl<sub>2</sub> (son derişim 20 mM), 3 µl, 10 mM EGTA (son derişim 1 mM), 10 µl konsantre PDP1<sub>c</sub>, ilaveleri yapılmıştır. Reaksiyon karışımı hafif vortekslenerek 30°C’lik su banyosuna koyulmuştur. 15 dk sonra 15 µl örnek çekilerek PDC aktivitesine bakılmıştır.

Kontrol çalışmasında, 29 µl substrat, 0.4 µl 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.6 µl 1 M MgCl<sub>2</sub>, 3 µl 10 mM EGTA, ilaveleri yapılmış, reaksiyon karışımı hafif vortekslenmiş ve 30°C’lik su banyosuna koyulmuştur. 15 dk sonra 10 µl örnek çekilerek PDC aktivitesine bakılmış fakat her hangi bir aktivite görülmemiştir.

### **5.3. Hücre Kültürü Çalışmaları**

Bu çalışmada MCF-7, T47D, MDA-MB-231 meme kanseri, ACHN böbrek adenokarsinoma ve HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) hücreleri kullanılmıştır.

#### **5.3.1. Meme Kanseri Hücre Kültürleri**

Çalışmamızda MCF-7, T47D ve MDA-MB 231 olmak üzere üç farklı hücre hattı kullanılmıştır. MCF-7, insan adenokarsinomu kaynaklıdır, östrojen pozitifdir ve yayılma eğilimi yoktur (invaziv değildir). T47D, duktal karsinoma kaynaklıdır, östrojen ve progesteron pozitifdir ayrıca invazif değildir. MDA-MB-231 ise insan adenokarsinomu kaynaklıdır, östrojen negatiftir ve invaziv bir hücre soyudur [63].

MCF-7, T47D ve MDA-MB-231 hücreleri DMEM F:12 medyumda büyütülmüştür. Bu mediumlar %10 FBS, %9.2 NaHCO<sub>3</sub> ve 100 U/L penicillin/streptomycin, %1 non-essential aminoasitler ve %1 glutamin içermektedir. Normoksik şartlarda inkübatör 37°C’de, %21 oksijen, %5 CO<sub>2</sub>’e ayarlanmıştır. Alt

kültürleme yapılırken aderent hücreler 1xtripsin-EDTA yardımıyla flasklardan ayrılarak santrifüjlendikten (1.000 rpm, 5 dk) sonra yeni medyum eklenerek 225 cm<sup>2</sup> lik yeni kültür kaplarına ekildi. Son aşamada her bir hücre flasklardan kazıyarak alınmıştır. Islak hücreler (2-5x10<sup>7</sup> adet, ~140 mg ıslak hücre) enzim aktivite ölçümlerinde kullanılmak üzere -80°C’de muhafaza edilmiştir.

### **5.3.2. Renal ve HUVEC Hücre Kültürleri**

Böbrek adenokarsinoma hücre hattı (ACHN), 100 unit/mL streptomisin, 100 µg/mL penisilin ve %10 FBS içeren DMEM içerisinde, 5% CO<sub>2</sub> ve 37°C’de T75 flasklarda kültüre edilmiştir. DCA muamelesi için hücreler altı-kuyucuklu plakaya transfer edilmiştir ve aynı şartlarda büyütülmüştür. Ardından hücreler taze FBS’siz medium içerisinde 24 saat inkübe edilmişlerdir. Sonrasında DCA içeren DMEM + %10 FBS mediumlar ile DCA muamelesi gerçekleştirilmiştir. Hücreler üç kez buz soğukluğunda %0.9 NaCl ile yıkanmış ve ardından metabolitler ekstrakte edilmiştir.

### **5.3.3. Hücre Stoklanması ve Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi**

Tripsinlenen hücreler santrifüj edilmiş (1.000 rpm, 5 dk), besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra %10 DMSO içeren serum ile süspanse edilmiş 1.5 ml’lik kriyo tüplere alınarak ve -80°C’de bir gece bırakıldıktan sonra sıvı azot tankına aktarılmıştır. Kullanılmak istenildiğinde ise sıvı azotta depolanan hücreler 37°C’de hızlı şekilde çözülmüş daha sonra ilgili besiyeri ilave edilerek santrifüj edilmiştir (1.000 rpm, 5 dakika) ve sıvı kısım uzaklaştırılarak oluşan pellet medyum ile tekrar süspanse edilmiş flasklara alınmıştır.

## **5.4. Kanser Hücrelerinden Mitokondrilerin Eldesi ve Enzim Aktivite Ölçümleri**

Hücreler belirtilen şekilde büyütülmelerinin ardından mitokondrileri izole edilerek aktivite ölçümleri için kullanılmıştır.

### 5.4.1. Kanser Hücrelerinden Mitokondri Eldesi

Kanser hücrelerinden mitokondri izolasyonunda literatürdeki mevcut metodlar kullanılmıştır [64]. Kısaca, yaklaşık  $4 \times 10^7$  adet kanser hücresi, soğuk 3 ml mannitol tamponda (10 mM HEPES, 210 mM mannitol, 70 mM sükröz, % 0.1 BSA, 0.2 mM EDTA, 50 µl proteaz inhibitör kokteyl (1 tablet + 600 µl DI H<sub>2</sub>O stokdan), 125 mM KCl, pH 7.4) pipetlenerek çözülmüştür. Motor destekli Potter el-Vehjem homojenizatörü ile hücre membranları mekanik olarak parçalanmıştır. 1000 rpm, 4°C, 10 dk santrifügasyon yapılmıştır. Süpernatant pipet yardımıyla dikkatlice alınmış (süpernatant rengi bulanık) ve mitokondri zengin fraksiyon 14.000 rpm, 15 dk santrifügasyon ile çöktürülmüştür. Bu fraksiyon 150-250 µl lysis tamponda (30 mM MOPS tampon pH 7.4 içerisinde, 2 mM EDTA, 2-5 mM DTT, %3 Triton X-100, % 0.2 BSA, 125 mM KCl, 1 mM PMSF, 1 adet proteaz inhibitör kokteyl tablet, son hacim 50 ml) pipetlenmiştir. Buz üzerinde ara ara pipetlenerek mitokondrinin çözünmesi sağlanmıştır. Çözünmeyen partiküller 14.000 rpm, 5 dk, 4°C'de santrifüj yapılarak çöktürülmüştür. Elde edilen berrak süpernatanda (mitokondri özütü) PDC, α-KGDC ve SDH aktivite ölçümleri aşağıda belirtilen şekilde yapılmıştır.

### 5.4.2. Enzim Aktivite Ölçümleri

Elde edilen mitokondriler belirtilen şekilde parçalandıktan sonra enzim aktivite ölçümleri yapılmıştır.

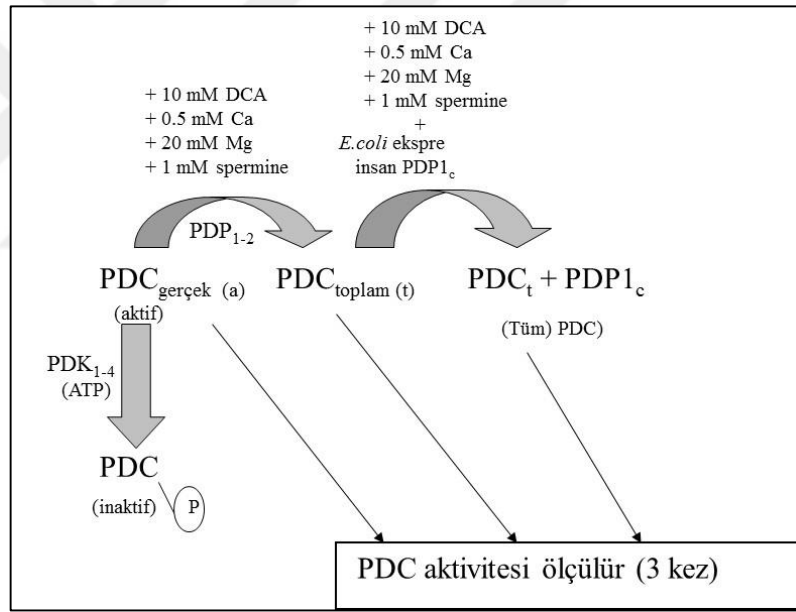
#### 5.4.2.1. PDC ve α-KGDC Aktivite Tayini

PDC ve α-KGDC aktiviteleri NAD→NADH dönüşümünün 340 nm'de mikroplate okuyucu (Molecular Device)'dan değerlendirilmiştir. Aktivite ölçümleri 100 µl son hacimde gerçekleştirilmiştir; 70 mM K<sub>x</sub>PO<sub>4</sub> tampon, pH 7.8, 2 mM NAD<sup>+</sup>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.127 mM CoA, 0.217 mM TPP, 3.44 mM cystein, 10 µM rotenon, 2 mM pirüvat (PDC aktivitesinde) veya 2 mM α-ketoglutarat (α-KGDC aktivitesinde) kullanılmıştır. NAD<sup>+</sup> ve CoA içeren çözeltiler taze olarak hazırlanmıştır. Aktivite µmol NADH/dk/mg mitokondrial protein olarak hesaplanmıştır. Bir unite (U) dakika

oluşan  $\mu\text{mol}$  NADH miktarını ifade etmektedir. Tüm aktivite ölçümleri  $30 \pm 0.4^\circ\text{C}$  sıcaklık dengesi sağlandıktan sonra yapılmıştır. Tüm tampon ve stok çözeltiler otoklavlanmış deiyonize su ile hazırlanmışlardır.

### 5.4.2.2. PDC Reaktivasyonu

Kanser hücrelerinden elde edilen mitokondriyel özütler  $2.5 \text{ mM CaCl}_2$ ,  $20 \text{ mM MgCl}_2$ ,  $10 \text{ mM DCA}$ ,  $1 \text{ mM spermine}$ ,  $4 \mu\text{l}$  rekombinant  $\text{PDP1}_c$  içeren ortamda,  $30.0^\circ\text{C}$  sıcaklıkta reaktif edilmiştir.  $5 \text{ dk}$  ve  $10 \text{ dk}$  sonra reaktivasyon ortamından  $10 \mu\text{l}$  örnekler çekilerek 2.4.1. kısmında belirtilen şekilde PDC aktivitesi ölçülmüştür. Kontrol deneylerinde  $\text{PDP1}_c$  yerine  $3 \mu\text{l}$  DI su kullanılmıştır.  $\text{PDC}_a$ ,  $\text{PDC}_t$  ve  $\text{PDC}_t + \text{PDP1}_c$  durumlarında aktivite ölçüm koşulları Şekil 5.2’de özetlenmiştir.



Şekil 5.2: Kanser hücrelerinde PDC intrinsik fosfatazın reaktivasyonu neticesinde  $\text{PDC}_{\text{toplam}}$  aktivitesinin ve rekombinant fosfataz kullanılarak  $\text{PDC}_t + \text{PDP1}_c$  enzim aktivitelerinin ölçülmesi.

### 5.4.2.3. SDH Aktivite Tayini

50 mM  $K_xPO_4$  tampon, pH 7.4, 2 mM KCN, 50  $\mu$ M DCIP,  $\pm$ 10 mM malonate içeren reaksiyon ortamı 30°C sıcaklık dengesi kuruluncaya kadar plate okuyucuda bekletilmiştir. 3-4  $\mu$ l mitokondriyel özüt ilave edilmiştir. DCIP konsantrasyonu sabitlendiğinde 20 mM Na-süksinat ilavesi yapılarak 600 nm’de abzorbanı değişimi takip edilmiştir. Aktivite mg protein başına dakikada indirgenen DCIP nmölü olarak ifade edilmiştir (DCIP için 600 nm’de milimolar extinction sabiti 19.1  $mM^{-1} cm^{-1}$ ).

### 5.4.2.4. Diğer Mitokondriyel Enzimlerin Aktivitelerinin Ölçülmesi

IDH aktivitesini ölçmek için 10  $\mu$ M rotenon, 25 mM okzamat, 1 mM  $NAD^+$ , 5 mM  $MgSO_4$  içeren 25 mM MOPS pH 7.5 tampon kullanılmıştır. Aktiviteler 30 °C sabit sıcaklıkta ölçülmüştür. Enzimatik reaksiyonlar 10  $\mu$ l DL-izositrat (100 mM stok) ilaveleri ile başlatılmıştır. Zaman ile NADH oluşumu 340 nm’de mikroplate okuyucu (Molecular Device) ile takip edilmiştir.

### 5.4.2.5. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivitesi

LDH aktivitesi 340 nm’de NADH abzorbanının azalması ile takip edilmiştir. Kontrolde LDH inhibitörü okzamat kullanılmıştır. Bu deneylerde; 20  $\mu$ l pirüvat (100 mM stok), 8  $\mu$ l NADH (18 mM stok), +/- 20  $\mu$ L, okzamat (625 mM stok), 5  $\mu$ l ACHN enzim kaynağı, 447  $\mu$ L,  $K_xPO_4$  tampon (10 mM, pH 7.8 stok) kullanılmıştır.

LDH aktivitesinin LC-MS/MS ile de takip edilebilmesi için ayrıca bir metot geliştirilmiştir. Bu metotta NAD ve NADH molekülleri kromatografik olarak birbirinden ayrıştırılmış, MS dedektörü ile tayin edilmiştir. Meme kanseri hücreleri stoplazmik ekstraktları kullanılarak LDH aktivitesi ölçülmüş ve LC-MS/MS ile Tablo 5.2’de verilen deney planına göre takip edilmiştir.

Tablo 5.2: Meme kanseri hücre hatlarında LDH aktivitelerinin LC-MS/MS ile incelenmesinde kullanılan deney planı.

	Eklenen Miktar ( $\mu$ l)					
	Tampon, K <sub>x</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7.8	Pyruvate 20 mM	NADH 18 mM	Okzamat 625 mM	Enzim, kaynağı	Toplam hacim
Aktivite kontrol (Ticari LDH aktivitesi), -okzamat	940	100	20	0	10	1070
MCF-7, -okzamat	940	100	20	0	50	1110
MCF-7, +okzamat	900	100	20	40	50	1110
T47-D, -okzamat	840	100	20	0	150	1110
T47-D, +okzamat	800	100	20	40	150	1110
MDA-MB-231, -okzamat	940	100	20	0	50	1110
MDA-MB-231, +okzamat	900	100	20	40	50	1110

## 5.5. Gen İfadesi

Gen ifadesi ölçümleri gerçekzamanlı PCR yöntemi kullanılmıştır. Bu analizde meme kanseri hücre hatlarındaki PDK1-4 ve PDP1-2 seviyeleri belirlenmiştir.

### 5.5.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Kültüre edilen kanser hücrelerinden Magna Pure otomatik RNA izolasyon sistemi (Roche) ve kiti (MagNa Pure Compact RNA Isolation Kit) kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmıştır. 20  $\mu$ l hacimde 1  $\mu$ g total RNA, son konsantrasyonları 5  $\mu$ g/ml random primer, 1xRT-tampon, 0.5 mM dNTP karışımı, 10 mM DTT, 2 U/ $\mu$ l M-MLV reverse transkriptaz enzimi olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. PCR koşulları 70°C'de 10 dk, 37°C'de 1 saat, ve 99°C'de 5 dk olarak uygulanarak örneklerden cDNA elde edilmiştir.

### 5.5.2. Kantitatif PCR ile mRNA Seviyelerinin Analizi

Kantitasyon için gerçek zamanlı (real-time) kantitatif PCR (lightCycler480, Roche Diagnostics GmbH, Germany) kullanılmıştır. PCR reaksiyonu için Probe

Master mix (Roche, Mannheim, Germany), 2 µl cDNA örneği ve her bir gen için Tablo 5.3.'de verilen primer (10 pmol) ve probler kullanılmıştır. Örnekteki RNA miktarının kalite ve miktarının normalizasyonu için kontrol geni olarak aktin geni kullanılmıştır. PCR koşulları 95°C'de 1 dk (1 döngü) ön denatürasyondan sonra 95°C'de 10 saniye, 57°C'de 20 saniye ve 72°C'de 10 saniye (35 döngü) yapılmıştır. Amplifikasyon sonucunda beklenen PDK1, PDK2, PDK3, PDK4, PDP1 ve PDP2 ürünlerinin büyüklükleri sırasıyla 1419, 1413, 1454, 1590, 131 ve 128 nt'dir. Ayrıca amplifikasyonun ardından "erime eğrisi" analizi için uygulanan program 95°C'de 0 saniye, 65°C'de 10 saniye ve 95°C'de 0 saniye (1 döngü) olarak ayarlanmıştır. PCR reaksiyonu için negatif kontrol olarak cDNA yerine su kullanılmıştır. Standartlar için seri dilüsyonlar hazırlanarak, her dilüsyon çift olarak kullanılmıştır. Sonuçlar  $\Delta\Delta C_t$  yöntemine göre değerlendirilmiştir.

### **5.5.3. PDP1 ve PDP2 Genlerinin Sybergreen (SYBR) ile Çoğaltılması**

Her iki gen SYBR premis Ex Taq (Takara) enzim ve tamponları kullanılarak, LightCycler 2.0 kapiller sistemi ile çalışılmıştır. PCR reaksiyonu; 5 µl SYBR Ex Taq 2x tampon, 1 µl Ex Taq, 1 µl 5 pmol primer, 2 µl cDNA örneği ve 1 µl su ile PRC mix. hazırlanmıştır. PCR koşulları 95°C'de 10 saniye (1 döngü) ön denatürasyondan sonra 95°C'de 5 saniye, 58°C'de 10 saniye ve 72°C'de 5 saniye (35 döngü) yapılmıştır. Amplifikasyonun ardından "erime eğrisi" analizi için uygulanan program 95°C'de 0 saniye, 65°C'de 10 saniye ve 95°C'de 0 saniye (1 döngü) olarak ayarlanmıştır. PCR reaksiyonu için negatif kontrol olarak cDNA yerine su kullanılmıştır. Standartlar için seri dilüsyonlar hazırlanarak, her dilüsyon çift olarak kullanılmıştır. İnsan beta-2 microglobulin geni "dış eği" oluşumunda ve internal kontrol için kullanılmıştır. Bu genlerde prob kullanılmadığından sonuçlar "erime eğrisi" yöntemi ile doğrulanmıştır. Sonuçlar semi-kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

Primer ve probler ProbeFinder (versiyon 2.45) (Roche) kullanılarak dizayn edilmiştir. Primerler IDT firmasından ve probler ise Roche firmasından temin edilmiştir. Kullanılan primer ve probler Tablo 5.3.'de gösterilmektedir.

Tablo 5.3: Gerçek-zamanlı PCR deneylerinde kullanılan primer ve probalar.

Gen	İleri Primer (5'-3')	Geri Primer (5'-3')	Probe
PDK1	gctgggtaatgaggatttgact	aagtctgtcaatttctctcaaagg	Roche Universal Probe #10
PDK2	agctgggtgcagagctggta	tcctgtccaggaactccat	Roche Universal Probe #79
PDK3	tgtgtgaacagtattaccctggtagc	gttgtctggcgctttgg	Roche Universal Probe #11
PDK4	tgcaattggttaaagctggt	catctgggctggcctttctcatgg	Roche Universal Probe #31
PDP1	gggcactgctaccattc	acaattggatgctcttacta	Roche Universal Probe #59
PDP2	tgtgcaaagcctacagacaca	ggctgagttgcaagtgaaaa	Roche Universal Probe #6

Actin (kontrol); ACTB kontrol (Roche) primer ve prob içermektedir.

## 5.6. Protein Analizleri

Proteinlerin analizleri için western blot tekniği kullanılmıştır. PDK1-4 proteinleri toplam seviyeleri ve PDP1-2 proteinlerinin fonksiyonları ele alınmıştır.

### 5.6.1. Hücrelerin Parçalanması (Lizis)

Yaklaşık  $3 \times 10^6$  adet hücre RIPA tampon (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 mM EGTA, % 1 NP-40, % 1 sodyum deoksikolat, 2.5 mM sodium pyrofosfat, 1 mM  $\beta$ -gliserofosfat, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM PMSF, proteaz inhibitör kokteyl) içerisinde pipetlendikten sonra buz banyosu içerisinde 3 sn sonikasyon uygulaması yapılmıştır. Protein konsantrasyonları Bradford assay ile belirlendikten sonra hücre ekstraktları -80°C'de saklanmıştır.

### 5.6.2. Protein Miktar Tayini

Protein konsantrasyonları tayinlerinde standart olarak BSA kullanılmıştır. Western-Blot çalışmalarında protein konsantrasyonları ticari kit (Protein Assay Dye, Bio-Rad) yardımıyla belirlenmiştir. Enzimatik aktivite ölçümlerinde toplam protein miktarları Pierce tarafından patentlenen bicinchoninic asit (BCA) metodu ile belirlenmiştir [65]. 96 kuyucuklu mikro plakaya bilinen miktarlarda örnekler ve her bir örneğin üzerine 200  $\mu$ l BCA kimyasalı koyulmuştur. Mikro plaka 55°C'de yaklaşık



20 dk bekletilmiş ve 595 nm abzorbanları kaydedilmiştir. Tüm ölçümlerde 1 mg/ml konsantrasyonunda BSA standart protein olarak kullanılmıştır.

### 5.6.3. Western Blot

Western blot analizlerinde Rabbit PDP1 (381-395) poliklonal antibadi (Sigma M5198) (1:5000), rabbit PDP2 (376-388) poliklonal antibadi (Sigma D9569) (1:5000), rabbit PDK1 monoklonal antibadi (Cell Signaling C47H1) (1:1000), rabbit poliklonal  $\beta$ -aktin antibadi (Sigma A2103) (1:2000), HRP bağılı anti-rabbit sekonder antibadi (1:3000) (Sigma A0545), mause monoklonal- $\beta$ -tübülin antibadi (Sigma T4626) (1:2000) ve HRP bağılı anti-mause sekonder antibadi (1:3000) Sigma (A4416) burada belirtilen dilüsyon oranlarında kullanılmıştır.

Western blot ile transfer öncesinde protein örnekleri %10'luk mini jeller'de yürütülmüştür. SDS-page jeli ilk etapta 70 volt ile 15 dk ardından 90 volt ile yürütülmüştür. Bio-Rad Mini Trans-Blot Cell sistemi ile proteinler nitroselüloz membrana aktarılmıştır. Jel boyu kadar nitroselüloz membran kesilip soğuk transfer tamponda (25 mM tris, 192 mM glisin, % 20 metanol, pH 8.3) 10 dk dengelenmiştir. Süngerler ve filtre kağıtları da soğuk transfer tamponda dengelenmiştir. Jel sandviçi hava kabarcıkları oluşumundan kaçınarak hazırlanmıştır.

Hazırlanan kaset jel kısmı katot elektrot tarafına, membran ise anot elektrot tarafına gelecek şekilde blotting aparata yerleştirilmiştir. Aparatın kendi buz kalıbı koyulmuş ve aparat buz ile sarılmıştır. 150 mA, 1.5 saat uygulanarak proteinlerin nitroselüloz membrana transferi gerçekleştirilmiştir. Protein transferi renkli marker'ın membranda görünmesi ile doğrulanmıştır. Membran bir kez TBS-tween (100 mM Tris, % 9 NaCl, % 0.5 Tween-20, pH 7.4) ile yıkanmıştır. Ardından 1 saat TBS-tween'de %5 yağsız süt tozu (her bir membran parçası için 2 ml kullanıldı) içerisinde oda sıcaklığında hafif çalkalanarak bloklanmıştır. Bloklamadan sonra süt tozu değiştirilmiş ve aşağıda belirtilen dilüsyon oranında primer antibadi eklenmiştir. 4°C'de gece boyu hafif çalkalamaya bırakılmıştır. Ertesi gün membran 3 kez 5'er dk TBS-Tween ile yıkanmıştır (2 ml). 20 dk TBS-tween'de %5 yağsız süt tozu ile muamele edilmiştir. Süt tozu değiştirilmiş ve her bir çalışmada belirtilen oranlarda sekonder antibadi eklenmiştir. 3 saat hafif çalkalanarak oda sıcaklığında muamele edilmiştir. 3 kez 5'er dk TBS-Tween ile yıkanmıştır. 15 dk PBS'de bekletilmiştir. İmmun belirlemede Amersham ECL Advance kiti kullanılmıştır. Bu kitte eşit miktarda

A (350 µl) ve B (350 µl) çözeltileri karıştırılmıştır. Karışım membran üzerine 3 dk boyunca pipetlenmiş, karışım dökülmüştür. Membran poşet dosya arasına alınmıştır. Karanlıkta hızlıca görüntüleme cihazına transfer edilmiştir. Görüntüleme aşağıda belirtilen şekilde chemiluminescence olarak Bio-Rad Molecular Imager ChemiDoc XRS+ cihazı ile yapılmıştır.

Kuyulara eşit miktarda protein yüklendiğinden emin olmak için  $\alpha$ -tübülün ile loading kontrol yapılmıştır. Membran üzerini kaplıyacak kadar stripping tampon (100 ml için 0.987 g tris-HCl, pH 6.7, 2 g SDS, 700 µl  $\beta$ -merkaptetanol) içerisinde 50°C'de 1.5 saat inkübe edilmiştir. Bol TBS-tween ile 15'er dakika 2 kez yıkanmıştır. TBS-tween'de %5 süt tozu içerisinde O/N blokinge bırakılmıştır. Ertesi gün süt tozu taze 10 ml süt tozu ile değiştirilmiş ve 1 µl rabbit  $\alpha$ -tübülün primer antibadi eklenmiştir. İşleme yukarıda bahsedilen şekilde devam edilmiştir. 2 saat 30 rpm'de oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Böylece primer antibadi bağlandıktan sonra süt tozu çözeltisi dökülmüştür.

## **5.7. DCA'nın Renal Hücreler Üzerine Etkisinin İncelenmesi**

DCA'nın renal hücreler ve HUVEC hücre canlılığına etkileri WST-1 yöntemi, apoptoza etkisi Annexin V-FITC yöntemi, hücre döngülerine etkisi Annexin/PI çalışmaları ve metabolizmaya etkisi de LC-MS/MS çalışmaları ile gerçekleştirilmiştir.

### **5.7.1. DCA'nın Hazırlanması ve Kullanılan Dozlar**

Sodyum dikloroasetat otoklavlanmış deiyonize suda çözülmüş ve 500 mM son konsantrasyonda taze olarak hazırlanmıştır. Bu stok çözelti -20°C'de muhafaza edilmiş ve 10 gün içerisinde, renal hücre kültürü çalışmalarında 25 mM ve 50 mM son konsantrasyonlarında kullanılmıştır.

## 5.7.2. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Hücre canlılığı mitokondriyel aktivitenin WST-1 (Roche, Swiss) yöntemiyle tespit edilmesi sonucunda belirlenmiştir. Mediumlar 96 well-plate'den çekilmiş, hücreler 24 saat serum free medium ile inkübe edilmiştir. Sonrasında hücreler 10 mM ve 20 mM DCA içeren complete mediumlarda 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonlarının ardından hücreler 100 µl PBS ile yıkanmıştır. %10 WST-1 içeren 50 µl mediumda, çözeltileri ilave edilmiş, 5% CO<sub>2</sub> 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Oluşan formazan mediumu abzorbanası 450 nm'de plate reader (KC Junior software) ile ölçülmüştür. DCA uygulanmamış hücrelerin canlılığı %100 olarak kabul edilmiş (kontrol) ve diğer datalar buna göre normalize edilmiştir.

## 5.7.3. Akım Sitometrisi Analizleri

Hücreler T75 flaskta DMEM mediumda 5% CO<sub>2</sub> ve 37°C inkübe edilmiştir. Hücreler % 80 confluence'e ulaştınca, 3 x 10<sup>5</sup> hücre 6 kuyucuklu petriye transfer edilmiştir. Mediumda gece boyunca inkübasyonun ardından besi yeri serumsuz medyumla değiştirilerek 24 saat daha inkübasyon yapılmıştır. Sonrasında hücreler 25 mM ve 50 mM DCA içeren complete mediumlarda 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonlarının ardından hücreler 2 kez PBS ile yıkanmış ve Annexin V-FITC Apoptoz kit (Biovision, USA)'de yeniden çözülmüştür. Sonrasında örnekler BD FACS Calibur akım sitometresi (BD Bioscience, USA) ile analiz edilmiştir.

Hücre döngüsü çalışmalarında hücreler aynı şekilde büyütülmüş, 25 mM ve 50 mM DCA uygulanmış (24, 48 ve 72 saat) hücreler 2 kez PBS ile yıkanmış, ve 500 µl boyama (staining) çözeltisinde (PBS içerisinde, 40 µg/ml RNase A, 33 µg/ml PI, %0,2 NP-40) 10 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmişlerdir. Sonrasında 100 µL PBS içinde 1 µg Annexin V FITC ve 10 µl PI ile 15 dakika muamele edilmiş ve hemen flow cytometry ile LSR II flow cytometer (BD Bioscience, USA) analiz edilip, FlowJo software kullanılarak analiz edilmiştir.

## 5.7.4. Kanser Hücrelerinin Metabolit Analizleri

25 mM ve 50 mM DCA'ya 24, 48 ve 72 saat maruz kalan renal kanser hücrelerindeki metabolit seviyeleri LC-MS/MS ile incelenmiştir. Paralel olarak HUVEC kontrol hücreleriyle de aynı şekilde metabolit analizleri gerçekleştirilmiştir.

### 5.7.4.1. LC-MS/MS Analizi için Metabolit Ekstraksiyonu

ACHN hücreleri 3 kez 2 ml soğuk %0.9'luk NaCl ile yıkanmıştır. 2 mL NaCl içerisinde kazıyarak toplanmış, kalan hücrelerde 2 mL NaCl ile 15 mL'lik falkon tüpe alınmıştır. 1500 rpm, 10 dk santrifüj ile çöktürülmüştür. Hücrelerin üzerine 1 mL -80 soğukluğunda ACN:MeOH:H<sub>2</sub>O:Formik asit (40:40:19:1, v/v) ilave edilmiştir ve vortekslenmiştir. Hücreler 3500 rpm, 10 dk santrifüj ile çöktürülmüştür, ekstrakt analiz edilmiştir.

### 5.7.4.2. LC-MS/MS Analiz Koşulları

Agilent 1290 Infinity binary pompa, yüksek performanslı autosampler, termostatlı kolon içeren UHPLC sistemi kullanılmıştır. UHPLC sistemi Agilent jet stream elektrosprey iyonizasyon kaynağı içeren Agilent 6460 triple quadrupole LC/MS sistemine bağlanmıştır. Data analizinde MassHunter programı kullanılmıştır. LC akış hızı 0.6 mL/min, kolon sıcaklığı: 20 °C, enjeksiyon hacmi: 5 µL. LC-MS/MS (Agilent 6460 QQQ) sistemi MRM (multiple reaction monitoring) modda kullanılmıştır ve organik asit analizleri için optimize edilen MS parametreleri; ESI, jet stream iyonizasyon, gaz sıcaklığı: 150 °C, gas akışı: 10 L/min, kılıf gaz sıcaklığı: 350 °C, kılıf gaz akışı: 10 L/min, nebulizer: 40 psi, kapiller voltajı: 2000 V.

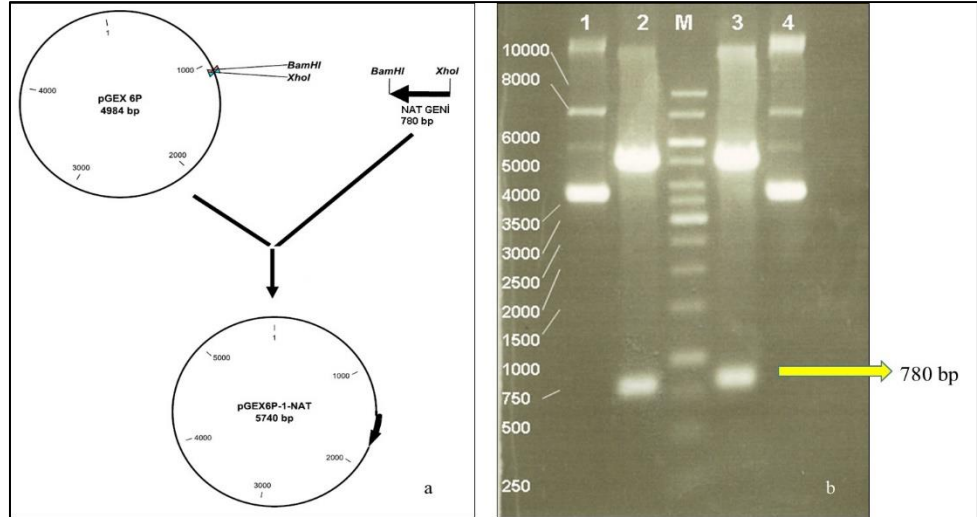
## 6. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

### 6.1. Enzim Aktiviteleri

PDC glikoliz ve TCA çevrimini birbirine bağlayan enerji metabolizmasında önemli rol üstlenen bir multi enzim kompleksidir. Kansere hücrelerinde PDC ve diğer mitokondriyal enzimlerin aktivitesinin ölçülmesi ve metabolomik çalışmalarını kansere hücrelerinde metabolizmanın incelenmesi ve enzimatik katalizdeki problemleri anlamamızı sağlamaktadır. PDC katalizli reaksiyonlarda NAD<sup>+</sup> ve pirüvat kullanılarak NADH ve asetil-CoA üretilmektedir ve aktivite ölçümü bu metabolitlerin takibiyle yapılmaktadır (Şekil 2.3 ve 2.4). Asetil-CoA miktarıyla PDC aktivitesi ölçülebilmek için arilamin asetiltransferaz (NAT) [66, 67], fosfotransasetilaz (PTA) [68], sitrat sentaz [68, 69] gibi ikinci bir enzim de kullanılması gerekmektedir. Burada kullanılan ikinci enzimin görevi asetil-CoA'daki asetil grubunu kromofor bir moleküle transfer etmektedir. Bu nedenle NAT geni, PDC aktivitelerinin ölçülmesi amacıyla klonlanmış ve saflaştırılmıştır.

#### 6.1.1. *Staphylococcus saprophyticus* Arilamin N-Asetiltransferaz (NAT) Geninin Klonlanarak İfadesi ve Saflaştırılması

Gerçekleştirilen klonlamada pGEX-6P-1 vektörü *Bam*HI ve *Xho*I ile kesilerek 780 bp'lik *Staphylococcus saprophyticus* NAT geni eklenmiştir (Şekil 6.1.A). Klonlamanın kontrolü konstrakt (pGEX-6P-1-NAT) plazmit saflaştırıldıktan sonra yapılan *Bam*HI ve *Xho*I ikili enzim kesimi ile doğrulanmıştır. Enzimatik kesim için iki farklı koloninin plazmitleri kullanılarak koloni kontrolü de yapılmıştır; birinci koloni (2. kuyu) ve ikinci koloni (3. kuyu). Şekil 6. 1. B'de görüldüğü gibi her iki kolonide de pGEX-6P-1 plazmitine giren NAT genine ait 780 bp'de bir bant ve pGEX-6P-1'e ait ~ 5000 bp'de bir bant görülmektedir.



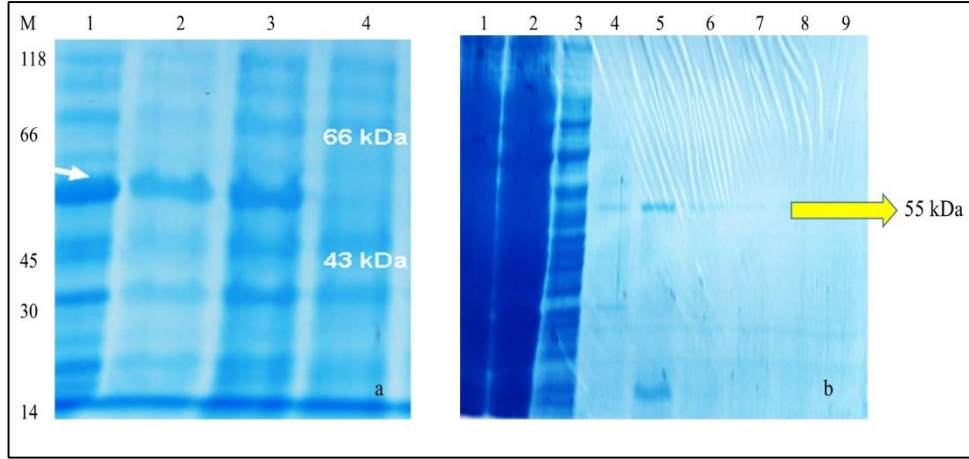
Şekil 6.1: pGEX-6P-1-NAT konstraktı oluşum diyagramı a). pGEX-6P-NAT'ın *Bam*HI ve *Xho*I ikili restriksiyon enzim kesimi b). *E.coli* Top10 hücrelerinden pGEX-6P-1-NAT plazmiti saflaştırılmış, saflaştırılan pGEX-6P-1-NAT plazmitin 6 µl'si 1. kuyuya yüklenmiştir. 2. Kuyuda ikili kesim ürünü görülmektedir. Aynı işlem koloni 2 plazmitine (3. kuyu) de uygulanmış ve ikili enzimatik kesim yapılmıştır (4. kuyu). *Bam*HI ve *Xho*I ikili enzim kesiminde 500 bp'de NAT geni görülmüştür. M: marker.

*E. coli* Top10'den alınan pGEX-6P-1-NAT plazmiti *E. Coli* BL21 (DE3) ekspresyon hücrelerine transfer edilerek 1 mM IPTG ile indükleme yapılmıştır. Aşırı ifade edilmenin takibinde Şekil 6.2'de görüldüğü gibi yaklaşık 55 kDa'da NAT proteini tespit edilmiştir.

Islak bakteriyel pellet Bölüm 5.1.4'de anlatıldığı gibi çöktürülerek GST-seferoz kolona yüklenmiştir. Kolonla etkileşimin ardından proteinler elüsyon tampon ile toplanmıştır. Şekil 6.2. B'de (5. Sırada) ~ 50-55 kDa'da saflaştırılan NAT görülmektedir.

Daha önce belirtildiği gibi NAT proteini PDC aktivite ölçümleri için klonlanmıştır ve aşağıda gösterilen reaksiyonda benzen sülfonik asit (AABS) yardımıyla ölçülecektir. Fakat AABS temin edilemediği için kullanılamamıştır. Farklı kromofor gruplar içeren substratlar denenmiş fakat PDC aktivitesi NAT yöntemi ile ölçülemediği için. Bu neden ile PDC aktiviteleri 340 nm'de NADH abzorbanısındaki artışın takip edilmesi ile ölçülmüştür.





Şekil 6.2: pGEX-6P-NAT'ın *E.coli* BL21'de overekspresyonu SDS-page jeli (a). İndükleme öncesi 4.kuyu, indükleme sonrasındaki 60 dk 3.kuyu, 150 dk 2.kuyu, 240 dk 1.kuyu ya yüklenmiştir. GST-NAT'ın afinite saflaştırılması (b). 1. kuyu membranı parçalanmış tüm hücre proteinleri, 2. kuyu GST kolona bağlanmayan proteinler, 3. kuyu triton X-100 tampon yıkaması 4.; 5.; 6.; 7.; 8: ve 9: sırasıyla 10 mM glutatyon yıkaması.

### 6.1.2. PDP1<sub>c</sub> Klonlama, Aşırı İfadeleme, Saflaştırma ve Aktivite Ölçümü Çalışmaları

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsünden Prof. Dr. Duran Üstek tarafından izole edilen pirüvat dehidrogenaz fosfataz 1 katalitik alt ünite (PDP1<sub>c</sub>) klonlanarak ifadesi ve saflaştırılması yapılmıştır.

PDP1<sub>c</sub> dizi analizi sonuçları Şekil 6.3'de gösterilmektedir. Dizi analizlerinin karşılaştırılmasında CLC dizi görüntüleme (sequence viewer) ve CLUSTAL W(1.81) çoklu dizi hizalama (multiple sequence alignment) programları kullanılmıştır. KEGG veri bankasından alınan, bilinen dizi analizi (PPM2C) ile karşılaştırıldığında iki aminoasidin farklı olduğu tespit edilmiştir. PPM2C'de 167. amino asit asparagin (N) iken, PDP1<sub>c</sub>'de bu amino asit serin (S), PPM2C'de 431. amino asit lysin (K) iken, PDP1<sub>c</sub>'de bu amino asit glutamik asittir (E). S167N mutasyonu ile küçük bir hidroksil yan grubu, daha büyük bir amit yan grubuna dönüşmüştür. K431E mutasyonu ile da fizyolojik pH'da pozitif yüklü bir aminoasit olan K, negatif yüklü bir amino asit olan E'ye dönüşmüştür. Bu mutasyonların PDP1 yapı ve fonksiyonu üzerinde etkileri olabileceği düşünülmele birlikte bu tez çalışılmasında herhangi bir mutasyon ve yapı fonksiyon çalışması hedeflenmediğinden mutasyon dikkate alınmamıştır. İlaveten S167N ve K431E mutasyonlarının cDNA kaynağından olabileceği düşünülmektedir.

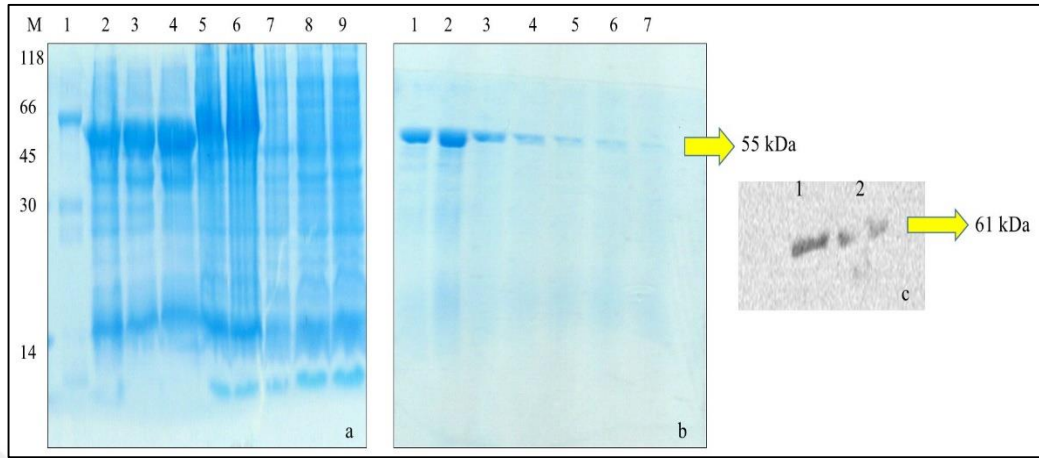
PPM2C	MCVCPGPRRIGIPVRSSSLPLFSDAMPAPTQLFFPLIRNCELSRIYGTACYCHHKHLCCS
pet28a-PPM2C	-----
PPM2C	SSYIPQSQLRYTPHPAYATFCRPKESWWQYTQGRRYASTPQKFYLTTPQVNSILKANEYS
pet28a-PPM2C	-----ASTPQKFYLTTPQVNSILKANEYS
*****	
PPM2C	FKVPEFDGKNVSSILGFDSNQLPANAPIEDRRSAATCLQTRGMLLGVFDGHAGCACSQAV
pet28a-PPM2C	FKVPEFDGKNVSSILGFDSNQLPANAPIEDRRSAATCLQTRGMLLGVFDGHAGCACSQAV
*****	
PPM2C	SERLFYYIAVSLLPHETLLEIENAVESGRALLPILQWHKHPNDYFSKEASKLYFNLSLRTY
pet28a-PPM2C	SERLFYYIAVSLLPHETLLEIENAVESGRALLPILQWHKHPNDYFSKEASKLYFNLSLRTY
*****	
*	
PPM2C	WQELIDLNTGESTDIDVKEALINAFKRLDNDISLEAQVGDPNISFLNYLVLRVAFSGATAC
pet28a-PPM2C	WQELIDLNTGESTDIDVKEALISAFKRLDNDISLEAQVGDPNISFLNYLVLRVAFSGATAC
*****	
PPM2C	VAHVDGVDLHVANTGDSRAMLGVQEEDGSWSAVTLSNDHNAQNERELERLKLHHPKSEAK
pet28a-PPM2C	VAHVDGVDLHVANTGDSRAMLGVQEEDGSWSAVTLSNDHNAQNERELERLKLHHPKSEAK
*****	
PPM2C	SVVKQDRLLGLLMPFRAFQDVKFKWSIDLQKRVIESGPDQLNDNEYTKFIPPNYHTPPYL
pet28a-PPM2C	SVVKQDRLLGLLMPFRAFQDVKFKWSIDLQKRVIESGPDQLNDNEYTKFIPPNYHTPPYL
*****	
PPM2C	TAEPEVTYHRLRPQDKFLVLATDGLWETMHRQDVVRIVGEYLTGMHHQQPIAVGGYKVTL
pet28a-PPM2C	TAEPEVTYHRLRPQDKFLVLATDGLWETMHRQDVVRIVGEYLTGMHHQQPIAVGGYKVTL
*****	
*	
PPM2C	GQMHGLLTERRTKMSSVFEDQNAATHLIRHAVGNNEFGTVDHERLSKMLSLPEELARMYR
pet28a-PPM2C	GQMHGLLTERRTKMSSVFEDQNAATHLIRHAVGNNEFGTVDHERLS <u>EM</u> LSLPEELARMYR
*****	
PPM2C	DDITIIVVQFNESHVVGAYQNRE
pet28a-PPM2C	DDITIIVVQFNESHVVGAYQNRE

Şekil 6.3: pet28a'ya klonlanan PDP1<sub>c</sub> ile KEGG gen bankasından alınan PDP1<sub>c</sub>'nin dizi analizlerinin karşılaştırılması. Bu karşılaştırma ile görülen mutasyonlar serin (S) 167 asparajin (N), lysin (K) 431 glutamik asit (E).

İnsan PDP1<sub>c</sub> geni içeren pET28a(+) vektörü daha sonra *E.coli* BL21 (DE3, pLys)'a transfer edilmiş, 0.3 mM IPTG ile indüklenerek PDP1<sub>c</sub> ekspresyonu sağlanmıştır. His-tag dahil PDP1<sub>c</sub>'nin teorik molekül ağırlığı 55 kDa'dur. Şekil 6.4'de IPTG ile indükleme neticesinde PDP1<sub>c</sub> ekspresyon seviyeleri görülmektedir. Bu sonuçlara göre indükleme öncesinde herhangi bir ekspresyon yok iken indükleme



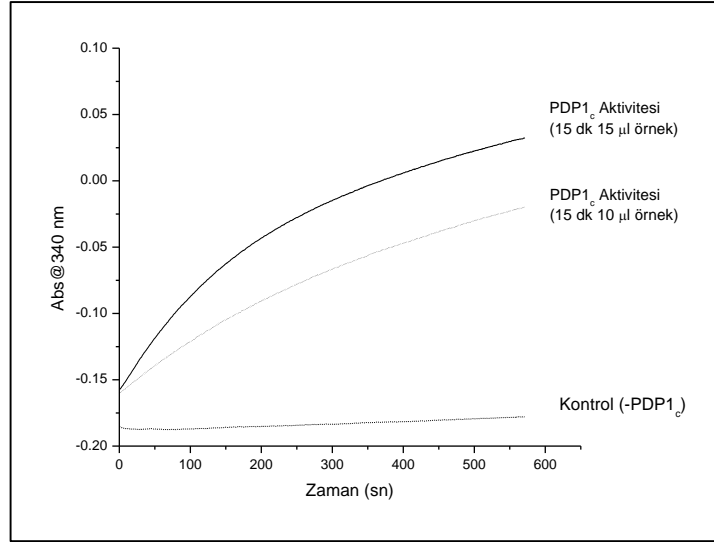
sonrası PDP1<sub>c</sub> overekspresyonunun gerçekleştiği yaklaşık ~55 kDa'daki protein bandı ile görülmüştür (Şekil 6.4. A, sıra, 2-4).



Şekil 6.4: PDP1<sub>c</sub> saflaştırılması SDS-page jel görüntüleri. a) 1. Kuyu marker, 2. Kuyu 2 µl çökelti, 3. Kuyu 4 µl çökelti, 4. Kuyu 6 µl çökelti, 5. Kuyu 4 µl tüm hücre, 6. Kuyu 6 µl tüm hücre, 7. Kuyu 2 µl hücre lizati (süpernatan), 8. Kuyu 4 µl hücre lizati, 9. Kuyu 6 µl hücre lizati. Ni-NTA kolon saflaştırılması b). 1-7. Kuyu saflaştırma fraksiyonları. PDP1<sub>c</sub> Western blot analizi c). Görüntülemeye Amersham ECL advance kit kullanılmıştır. Rabbit anti-PPM2C (381-395) (Sigma M5198) primer antiadileri (1:5000) ve HRP bağlı anti-rabbit sekonder antiadı (1:5000) kullanılmıştır. ~2 µg (sıra 1) ve ~18 µg (sıra 2) yüklenmiştir.

pet28a-PDP1<sub>c</sub>-BL21-DE3 hücreleri sonikasyon ile parçalanmış ve PDP1<sub>c</sub> proteini Ni-NTA kolon ile saflaştırılmaya çalışılmıştır. Şekil 6.4.B'de sonikasyon sonrası örneklerin SDS-PAGE ile analiz sonuçları görülmektedir. Saflaştırma sonuçlarımız PDP1<sub>c</sub>'ni soluble olmadığını göstermiş PDP1<sub>c</sub>'nin çoğunlukla inklüzyon cisimciklerine gitmekte olduğunu desteklemiştir. PDP1<sub>c</sub> proteini ayrıca kontrol amaçlı olarak rabbit anti-PPM2C (381-395) poliklonal antikor kullanılıp Western blot analizi ilede görüntülenmiştir (Şekil 6.4.C).

Western blot analizinden sonra PDP1<sub>c</sub> enzim aktivitesi ölçüm çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Aktivite ölçümlerinde sığır kalbinden 5.2.3.1 kısımda belirtildiği üzere izole edilerek hazırlanmış olan inaktive PDC kullanılmıştır. Kontrol ölçümlerinde bir aktivite görülmezken 10 µl ve 15 µl PDP1<sub>c</sub> aktivitelinde yüksek aktivite ölçülmektedir (Şekil 6.5). Enzimatik aktivite protein konsantrasyonuna bağlı olarak artmıştır.



Şekil 6.5: İnaktif sığır kalp mitokondri PDC kullanılarak PDP1<sub>c</sub> aktivitesinin ölçülmesi.

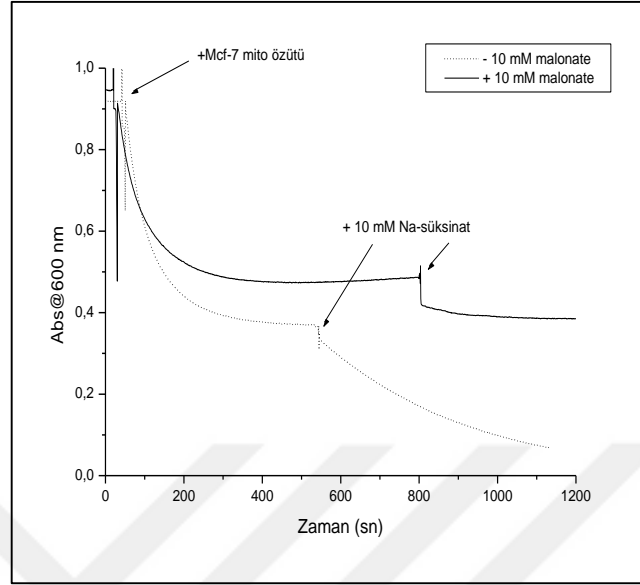
Şekil 6.5’de progres eğride PDP1c aktivitesi gösterilmektedir. PDP1c aktivitesi gerçekleştiği için PCD<sub>i</sub>→aktif PDC’ye dönüşerek daha yüksek PDC aktivitesi görmemizi sağlamıştır. cDNA kaynağından *E.coli*’de klonlanıp saflaştırılan PCP1c meme kanseri hücrelerinde PDC<sub>t</sub> + PDP1c aktivite ölçümlerinde kullanılmıştır.

### 6.1.3. Normoksik ve Hipoksik Şartlarda Büyütülen Meme Kanseri Hücre Hatlarında Enzim Aktivite Ölçümleri

Normoksik ve hipoksik şartlarda büyütülen meme kanseri hücrelerinden mitokondri izolasyonu sonrasında, mitokondriyel ve stoplazmik enzim ve/veya enzim kompleksleri olan SDH, LDH, PDC<sub>a</sub>, PDC<sub>t</sub>, PDC<sub>t</sub>+PDP1<sub>c</sub>, α-KGDC, ve IDH aktiviteleri ölçülmüştür. PTA ve PDP1c ise PDC aktivite ölçümlerinde yardımcı enzim olarak kullanılmıştır.

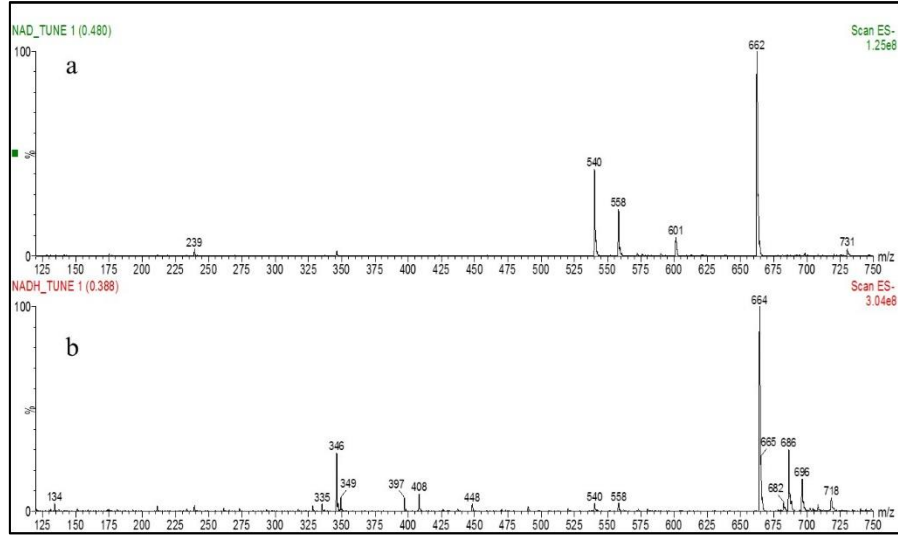
Meme kanser hücreleri mitokondriyelerinde SDH aktivite ölçümlerinde önce nonspesifik aktivitelerin gerçekleşmesi beklenmiştir (Şekil 6.6). Burada ilk 500 sn’de mitokondriyel ekstraktın DCIP’i indirgediği görülmüştür. SDH aktivitesi bu indirgemenin ardından sadece 10 mM Na-süksinat koyulup takip edilmiştir. SDH aktivitesi ayrıca kompetitif inhibitör malonat kullanılarak ölçülmüştür. Şekil 6.6’da -10 mM malonat çizgisi takip edildiğinde meme kanseri hücresi mitokondri kaynağından DCIP molekülüne elektron transferi olduğu, ilk 500 sn’de DCIP’i

indirgediği görülecektir. Bu nonspesifik bir aktivitedir. SDH aktiviteleri bunun ardından 10 µl Na-süksinat ilaveleri ile başlatılmıştır.

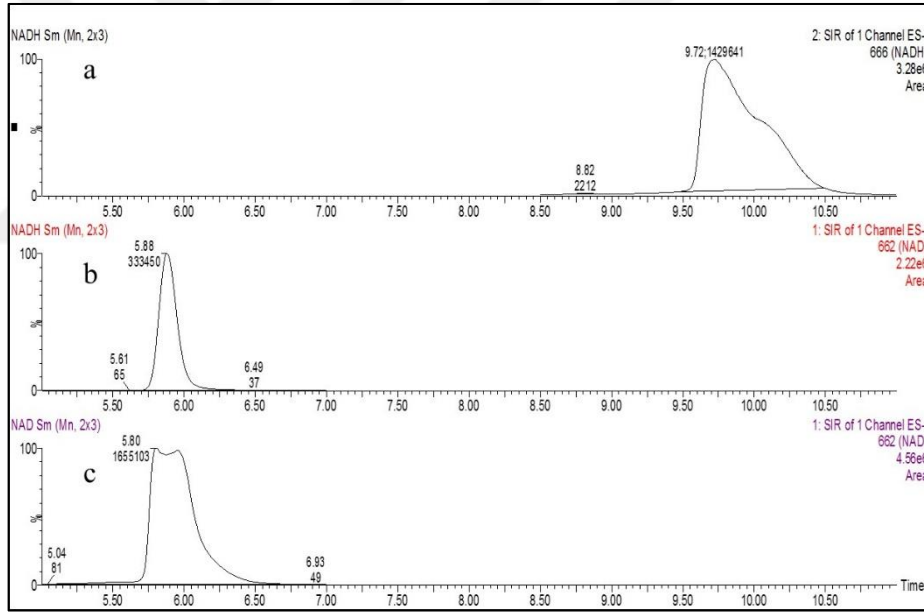


Şekil 6.6: MCF-7 kanser hücreleri mitokondriyel özütünde SDH aktivite ölçümleri.

MCF-7 hücrelerinde mitokondri elde edildikten sonra kalan süpernatanda LDH aktivitesi spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Meme kanseri hücreleri stoplazmalarında ~11000 mU/mg, ticari tavşan kası LDH enziminde 120 mU/mg LDH spesifik aktivitesi ölçülmüştür. Bu meme kanserinde ticari LDH'dan bile yüksek bir LDH spesifik aktivitesi olduğunu göstermiştir. Ayrıca meme kanseri hücrelerinde LDH spesifik aktivitesi LC-MS/MS ile incelenmeye çalışılmıştır. Böylelikle aktivitede rol alan dört molekülün zamanla değişimleri takip edilerek detaylı inceleme yapılmıştır. LC-MS/MS çalışmalarına geçmeden önce NAD ve NADH molekülleri MS dedektörü ile karakterize edilmiş (Şekil 6.7), %89 H<sub>2</sub>O : %10 asetonitril : %1 formik asit ile kromatografik olarak birbirinden ayrıştırılmıştır (Şekil 6.8). LC-MS/MS çalışmalarına göre NAD alıkonma süresi 5.9 dk, NADH alıkonma süresi ise 9.7 dk'dır.



Şekil 6.7: NAD (a) ve NADH (b) standartlarının MS dedektörü ile tayin edilmesi (tuning çalışması). NAD<sup>+</sup>, [M+H]: 662 m/z, NADH, [M+H]: 664 m/z'de görülmüştür.

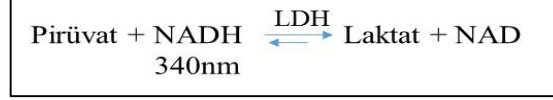


Şekil 6.8: NADH (a), NADH (b) ve NAD (c) moleküllerinin kromatografik olarak birbirlerinden ayrılması.

NAD ve NADH molekülleri LC-MS/MS ile belirlendikten sonra meme kanseri sitosolik ekstraktları kullanılarak yapılan aktivite ölçümlerinin deney planı 5.4.2.5 kısmında verilmiştir.

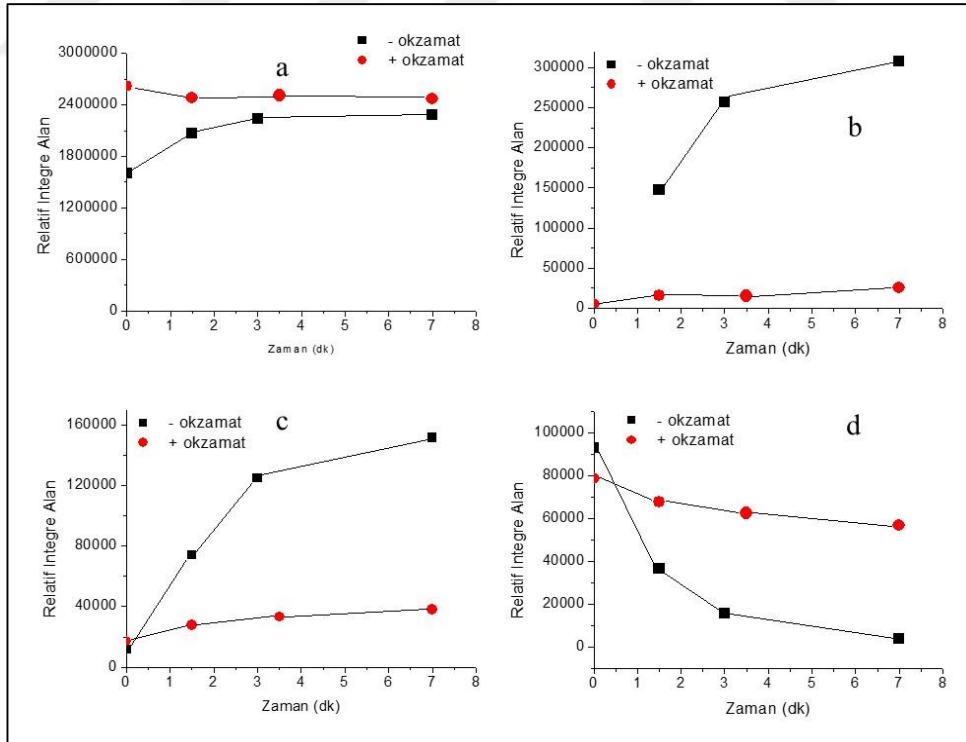
MCF-7, T47D ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında LDH aktivitesi ölçülürken pirüvat, laktat, NAD ve NADH miktarlarındaki değişim zamanla incelenmiştir. Bu aktiviteler LDH inhibitörü okzamat varlığında ve yokluğunda

incelenmiştir. Daha önce bahsedildiği gibi LDH kataliziyle aşağıdaki reaksiyon (Şekil 6.9) gereği pirüvat ve NADH miktarlarının giderek azalması paralelinde laktat ve NAD miktarlarının ise artması beklenmektedir.



Şekil 6.9: LDH katalizli pirüvatın laktata dönüşüm reaksiyonu.

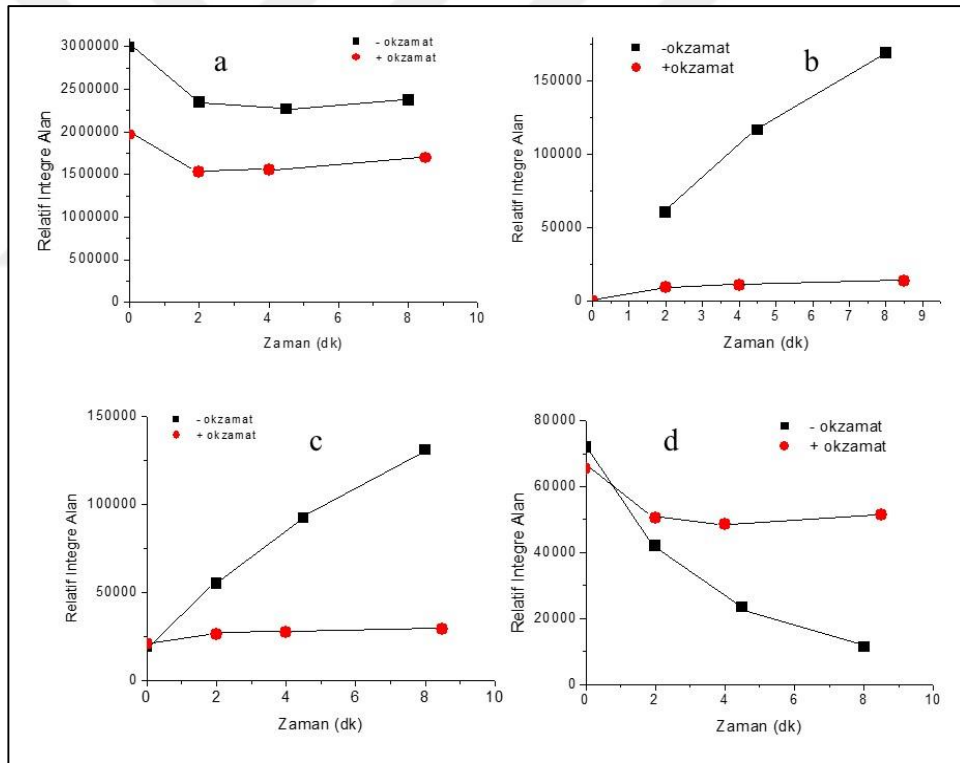
MCF-7 meme kanseri hücrelerinde aktivite ölçümünde zamanla azalması beklenen pirüvat konsantrasyonu artış eğilimindedir (Şekil 6.10.A -okzamat). T47 ve MDA-MB-231 hücrelerinde ise pirüvat miktarı aktivite ölçerken azalma eğilimindedir. Bu çalışma farklı meme kanseri hücrelerinde pirüvatın dahil olduğu farklı metabolizmalar olabileceğine işaret etmiştir. MCF-7 hücrelerinde +okzamat durumunda LDH aktivitesinin durması laktat ve NAD oluşmaması beklenmekte iken zamanla NAD oluşumu gözlenmektedir (Şekil 6.10.C. +okzamat).



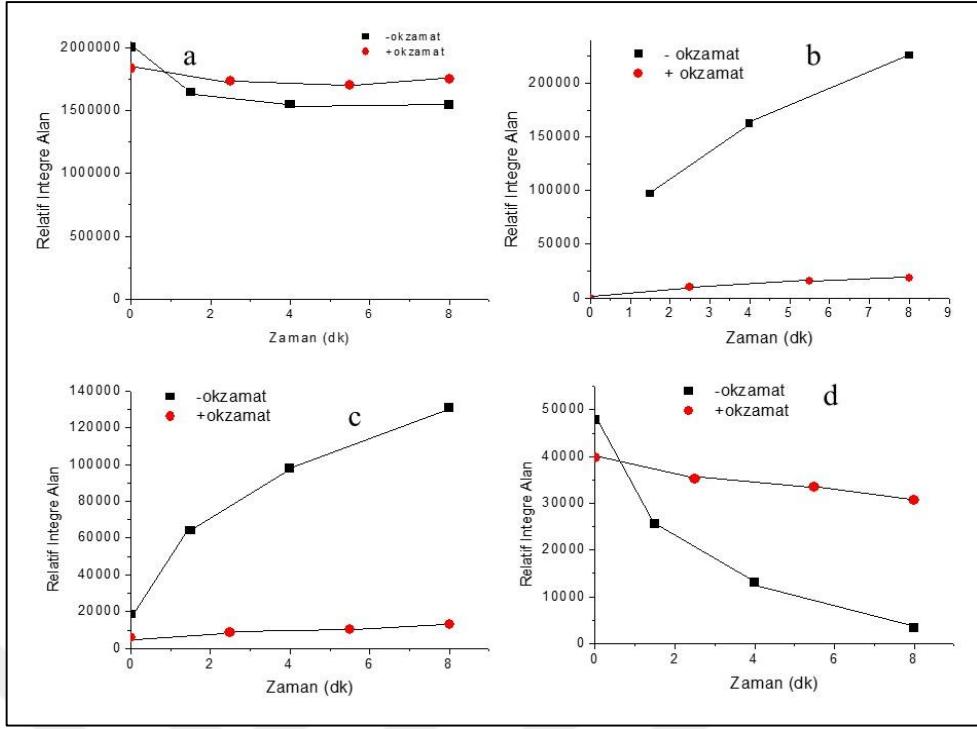
Şekil 6.10: MCF-7 sitosolik ekstraktı kullanılarak LDH aktivitesi ölçülmesi zaman ile metabolit konsantrasyonlarının değişimleri. a) pirüvat, b) laktat, c) NAD, d) NADH.

T47D meme kanseri hücrelerinde LDH aktivitesi ölçerken pirüvat miktarı azalmaktadır (Şekil 6.11). Okzamat kullanılmasının bu azalmayı engellemediği gözlemlenmektedir. Buradada reaksiyon okzamat ile inhibe edilse de bir miktar NADH kullanıldığı belirlenmiştir (Şekil 6.11.D, +okzamat).

MDA-MB-231 hücrelerinde okzamat kullanılması pirüvatın ve NADH'in kullanımını engelleyememiştir (Şekil 6.12). Sonuç olarak T47-D ve MDA-MB-231 hücrelerinde zamana bağlı olarak pirüvat konsantrasyonu düşerken MCF-7 hücrelerinde beklenenin tersine bir sonuç gözlenmiştir. Bu pirüvat ve NADH'in dahil olduğu farklı bir metabolizmaya işaret edebilir. İlâveten tüm hücrelerde NADH miktarının LDH aktivitesinden bağımsız olarak azalması kanser hücrelerinde diğer NADH dehidrogenaz enzim aktivitelerine işaret etmektedir.

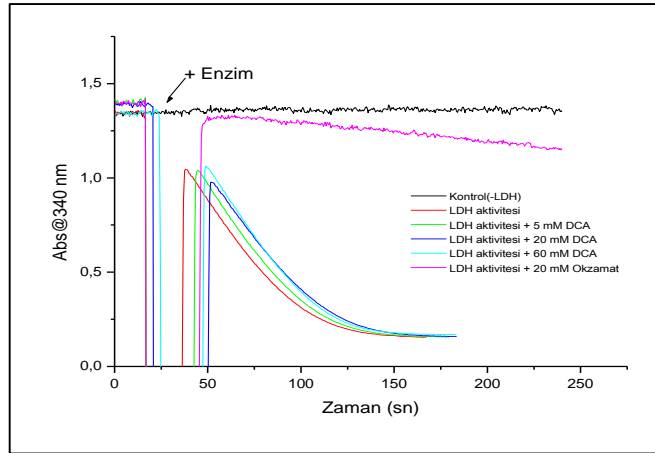


Şekil 6.11: T47D sitosolik ekstraktı kullanılarak LDH aktivitesi ölçülmesi zaman ile metabolit konsantrasyonlarının değişimleri. a) pirüvat, b) laktat, c) NAD, d) NADH.



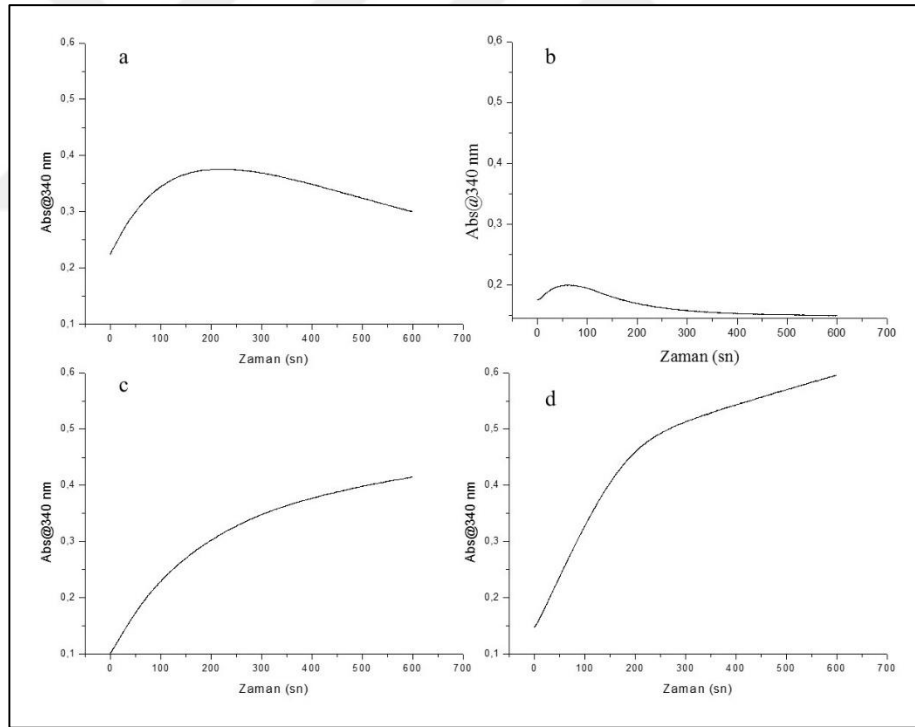
Şekil 6. 12: MDA-MB-231 sitosolik ekstraktı kullanılarak LDH aktivitesi ölçülmesi zaman ile metabolit konsantrasyonlarının değişimleri. a) pirüvat, b) laktat, c) NAD, d) NADH.

Diğer taraftan DCA'nın LDH aktivitesini etkileyip etkilemediği de ticari rabbit LDH enzimi kullanılarak çalışılmıştır (Şekil 6.13). Bu çalışma 5 mM, 20 mM ve 60 mM DCA'nın LDH aktivitesini inhibe etmediğini göstermiştir. Fakat LDH aktivitesini, LDH inhibitörü okzamat (20 mM) kullanıldığında bariz bir şekilde düştüğü belirlenmiştir (Şekil 6.13).



Şekil 6.13: DCA'nın LDH aktivitesine etkisinin incelenmesi. LDH aktivitesi 340 nm'de NADH abzorbansının düşüşünden takip edilmiştir. 5-60 mM DCA, LDH aktivitesini etkilememiştir.

Bunu izleyen çalışmada MCF-7, T47D ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında PDC aktiviteleri, oluşan NADH abzorbansları 340 nm’de takip edilerek, ölçülmüştür. Hücre hatlarından mitokondriler izole edilmiş ve bunlar kullanılarak gerçekleştirilen ön çalışmalarda PDC aktivitelerinin oldukça düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 6.14.A). Kanser hücre hattı ekstraktı ile PDC aktivitesi ölçtükten sonra, sıgır kalbinden izole edilmiş olan PDC enzimi ilave edilerek PDC aktivitesi ölçülmüştür. Sonuçlar NADH’in başka bir enzim tarafından kullanıldığına işaret etmektedir (Şekil 6.14.B). Ön çalışmalar PDC aktivite ölçümlerinde destekleyici ikinci bir enzimin kullanılmasını gerektirdiğini düşündürmüştür. PDC aktivite ölçümlerinde PTA ikinci enzim olarak kullanılmıştır. PTA, Asetil-CoA + PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> ↔ CoA + Asetil-PO<sub>4</sub><sup>-2</sup> reaksiyonunu katalizler ve böylelikle asetil-CoA rejenerasyonuna yardımcı olur. PTA kullanarak gerçekleştirilen sıgır kalp mitokondri PDC aktivite ölçümlerinde NADH miktarları doygunluğa ulaşmamış ve sürekli arttığı belirlenmiştir (Şekil 6.14).



Şekil 6.14: Fosfotrans asetilaz ve rotenon varlığında PDC aktivitelerinin ölçülmesi. a) kontrol. T47D kanser hücreleri ekstraktlarında PDC aktivitesi ölçülmesi. b) T47D kanser hücrelerinde PDC aktivitesi ölçüldükten sonra kalp-mito PDC ilave edilmesi. c) PTA varlığında PDC aktivitesinin ölçülmesi. d) PTA ve rotenon varlığında PDC aktivitesinin ölçülmesi.



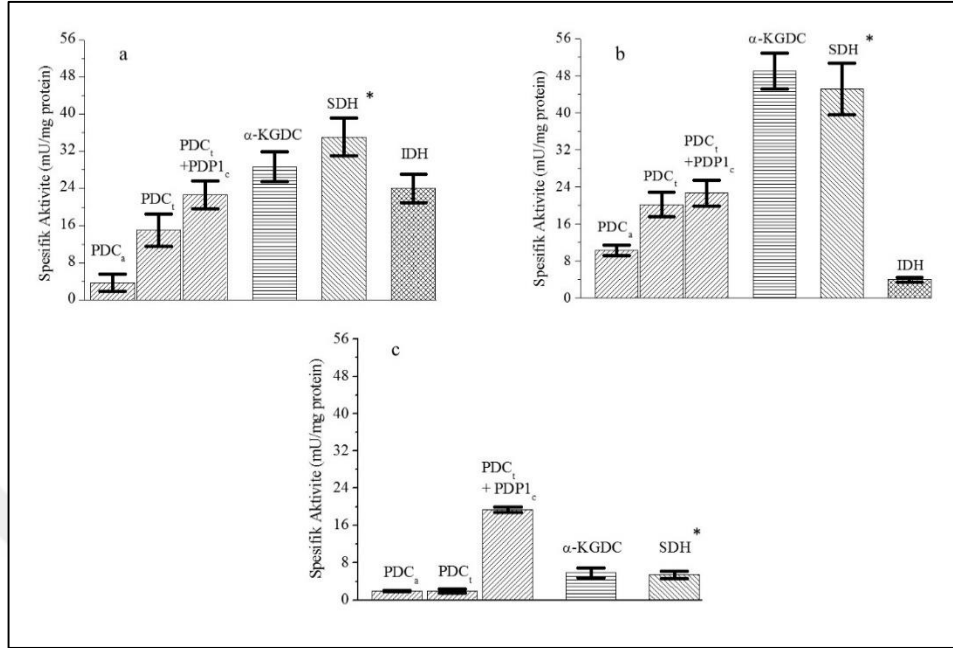
Diğer taraftan ETS inhibitörü rotenon kullanılması'da PDC aktivitelerinin artmasını sağlamıştır (Şekil 6.14:C). PDC aktivite ölçümlerinde PTA ve rotenonun birlikte kullanılması başlangıç reaksiyon hızlarının artmasını sağlamıştır (Şekil 6.14.D).

Bunu takip eden çalışmada meme kanseri hücrelerinde mitokondriyel enzimlerin aktiviteleri ölçülmüştür (Şekil 6.15 ve 6.16). Gerçek PDC aktivitesi ( $PDC_a$ ) ölçülen aktiviteyi,  $PDC_t$  ise aynı örneğin 0.5 mM  $CaCl_2$ , 20 mM  $MgCl_2$ , 1 mM spermine ve 10 mM DCA varlığında ölçülen aktiviteyi göstermektedir.  $PDC_t + PDP1c$  aktivitesi ise toplam PDC aktivitesine ilaveten rekombinant  $PDP1c$  varlığında 10 dk, 30°C'de inkübe edildikten sonra ölçülen PDC aktivitesini göstermektedir. Sonuçlar ölçüm belirsizliğine göre analiz edilmiştir. ANOVA: Tek Etken Analizi (F ölçütü) kabul kriterleri içerisinde. Değişkenler üzerinden hesaplanan tek yön varyasyonda p değeri  $<0,05$  olduğundan denemeler geçerli görünmektedir. MCF-7 hücrelerinde PDC spesifik aktivitesinin  $3.75 \pm 1.87$  mU/mg olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6.15. A). Düşük konsantrasyonda (1-2 mg/ml) protein içeren MCF-7 hücreleri mitokondrileri kullanılarak gerçekleştirilen bazı çalışmalarda hiçbir PDC aktivitesi görülmemiştir. Ancak 9.8 mg/ml ve 14 mg/ml gibi yüksek protein miktarlarında aktivite belirlenebilmiştir.

1 mM spermin kullanıldığında MCF-7 meme kanseri hücrelerinde spesifik aktivite artmaktadır. Bu da MCF-7'de  $PDP2$ 'nin de etkin olduğunu desteklemektedir [70]. Ayrıca rekombinant  $PDP1c$  kullanılmadan  $15.05 \pm 2.46$  mU/mg, 3 µl rekombinant  $PDP1c$  kullanıldığında  $22.7 \pm 3.02$  mU/mg toplam PDC aktivitesi elde edilmiştir. Toplam PDC aktivite ölçümü çalışmaları MCF-7 kanser hücrelerinde endojen fosfataz miktarlarının yüksek olduğunu göstermiştir. MCF-7 hücrelerinde hipoksik ortam çalışmalarında PDC aktivite ölçümlerinde bir farklılık görülmemiştir. PDC kompleksinde, 10 mM DCA, 0.5 mM  $Ca^{+2}$ , 20 mM  $Mg^{+2}$ , 1 mM spermine ile aktivasyon gözlenmemektedir (Şekil 6.15. A)

İzleyen çalışmada MCF-7 hücrelerinde diğer TCA çevrimi enzimlerin aktiviteleri ölçülmüştür. MCF-7 kanser hücrelerinde  $28.62 \pm 3.17$  mU/mg KGDC spesifik aktivitesi belirlenmiştir. MCF-7 mitokondriyel özütte  $35.11 \pm 2.14$  mU/mg SDH spesifik aktivitesi bulunmuştur (Şekil 6.15.A). Hipoksik ortamda büyütülen MCF-7'de  $\alpha$ -KGDC ve SDH aktiviteleri sırasıyla  $18.52 \pm 0.25$  mU/mg ve  $13.98 \pm 0.51$  mU/mg, bulunmuştur (Şekil 6.16. A). Buna göre meme kanseri hücrelerinde, normosik

şartlar ile karşılaştırıldıklarında hipoksik şartlarda, TCA çevrimi enzimlerinin aktivitelerinde 2-2.5 kat azalma görülmektedir.

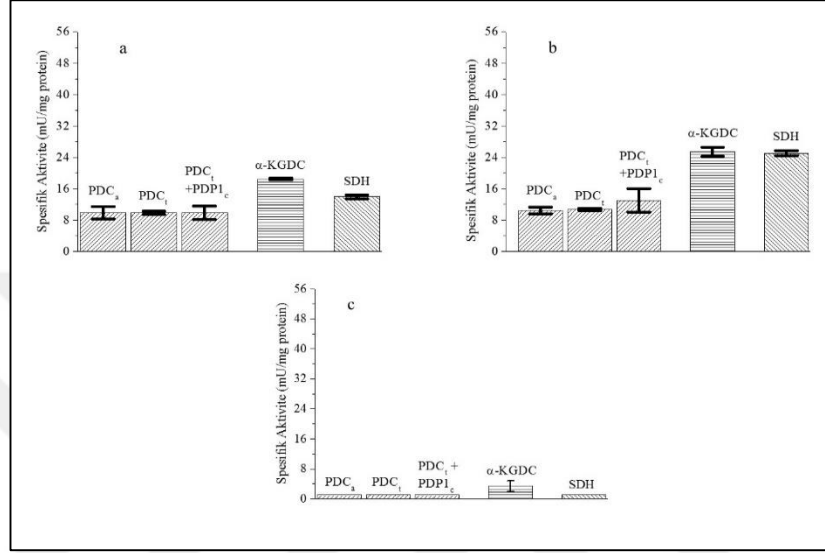


Şekil 6.15: Normoksik şartlarda büyütmüş MCF-7 a), T47D b) ve MDA-MB-231 c) hücrelerinden elde edilen mitokondri özütündeki gerçek pirüvat dehidrogenaz (PDC<sub>a</sub>), toplam pirüvat dehidrogenaz (PDC<sub>t</sub>) alfa-ketoglutarat dehidrogenaz (α-KGDC), süksinat dehidrogenaz (SDH) ve izositrat dehidrogenaz (IDH) aktivitelerinin ölçülmesi. Her bir hücre hattından beş farklı örnek ve her bir enzim aktivitesi için üçer kez ölçüm yapılmış, ortalamaları ± standart sapmaları verilmiştir. \*ANOVA tek etken analizi p<0,05.

T47-D meme kanseri hücrelerinde  $10.31 \pm 1.12$  mU/mg gerçek,  $20.12 \pm 2.16$  toplam PDC spesifik aktivitesi bulunmuştur (Şekil 6.15.). Gerçekleştirilen 4 farklı denemeye göre T47-D kanser hücrelerinde gerçek PDC spesifik aktivitesi MCF-7 hücrelerinden daha fazla bulunmuştur. Bu durumun hücre hatlarının farklılığından kaynaklanabildiği düşünülmektedir. T47-D kanser hücrelerinde reaktivasyon PDC aktivitesini ~ 2 kat arttırmıştır. Tüm denemelerde protein konsantrasyonu düşüğe olsa ( $1.7$  mg/ml,  $4.4$  mg/ml gibi) reaktivasyon olduğu görülmüştür. İlave PDP1<sub>c</sub> ise azda olsa bir aktive artışı sağlamıştır. Hipoksik şartlarda ise MCF-7 hücrelerinde görülmüş olan endojen fosfataz kaynaklı bir reaktivasyon görülmemiştir.

T47-D kanser hücrelerinde  $49.1 \pm 3.8$  mU/mg ve  $45.08 \pm 5.1$  SDH spesifik aktivitesi olduğu bulunmuştur (Şekil 6.15.B). MCF-7 ile karşılaştırıldığında daha yüksek KGDC ve SDH spesifik aktivitesi elde edilmiştir. Bu sonuçlar mitokondriyel

TCA çevriminin T47D hücrelerinde daha işlevsel olduğunu desteklemektedir. T47D meme kanseri hücreleri hipoksik ortamlarda büyütüldüklerinde  $\alpha$ -KGDC ve SDH aktiviteleri sırasıyla  $25.43 \pm 1.18$  mU/mg ve  $25.08 \pm 0.67$  mU/mg olmaktadır (Şekil 6.16.B). Hipoksik şartlarda TCA çevrimi enzimlerinin aktiviteleri ~2.5 kat düşmektedir.



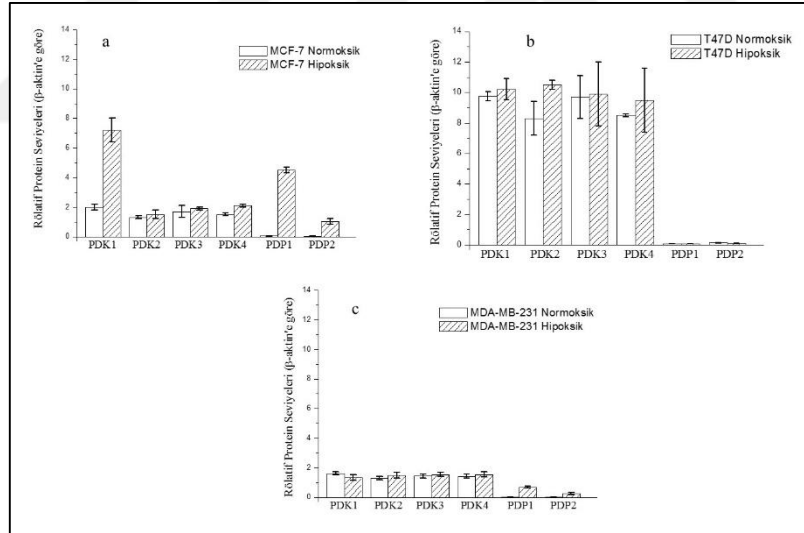
Şekil 6.16: Hipoksik şartlarda büyütülmüş MCF-7 a), T47D b) ve MDA-MB-213 c) hücrelerinden elde edilen mitokondri özütlerinde PDC<sub>a</sub>, PDC<sub>t</sub>,  $\alpha$ -KGDC ve SDH aktivitelerinin ölçülmesi.

Yapılan çalışmalar neticesinde normoksik şartlarda MDA MB-231 hücrelerinde MCF-7 ve T47D ile karşılaştırıldığında PDC aktivite durumlarının diğerlerinden daha az olduğu görülmüştür (Şekil 6.15.D). Diğer taraftan TCA çevrimi enzimlerinin aktiviteleri de MCF-7 ve T47D ile karşılaştırıldığında oldukça düşüktür. PDC<sub>a</sub>, PDC<sub>t</sub>, PDC<sub>t</sub> + PDP1<sub>c</sub>,  $\alpha$ -KGDC ve SDH spesifik aktiviteleri sırasıyla  $1.90 \pm 0.2$  mU/mg,  $1.95 \pm 0.23$  mU/mg,  $19.45 \pm 0.85$  mU/mg,  $5.86 \pm 1.05$  mU/mg ve  $5.46 \pm 0.95$  mU/mg bulunmuştur (Şekil 6.16). MDA-MB-231 hücre hatlarında mitokondriyel enzimlerin aktiviteleri de oldukça azalmaktadır. PDC<sub>a</sub>, PDC<sub>t</sub>, PDC<sub>t</sub> + PDP1<sub>c</sub>,  $\alpha$ -KGDC ve SDH spesifik aktiviteleri sırasıyla  $0.65 \pm 0.05$ ,  $0.73 \pm 0.08$ ,  $0.66 \pm 0.09$ ,  $3.41 \pm 0.45$  ve  $0.77 \pm 0.13$  mU/mg'dır.

Sonuçlar hipoksik şartlarda durumunda tüm meme kanseri hücrelerinde enerji metabolizmasının değiştiğini TCA çevrimi enzim aktivitelerinin düştüğünü göstermiştir. Bu durumun HIF-1 indüklemeli PDK1 inhibisyonları ile olduğu düşüncesini desteklemektedir.

### 6.1.4. Normoksik ve Hipoksik Şartlarda Meme Kanseri Hücrelerinde PDC Regülatör Enzimlerinin Protein Analizleri

Burada normoksik ve hipoksik ortamda yetiştirilmiş MCF-7, T47D ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarında PDK1-4, PDP1 ve PDP2 protein seviyeleride incelenmiştir. Protein analizlerinden ilk beklenen sonuç hipoksik şartlarda PDK seviyelerinin yüksek olmasıdır [71]. Hipoksik şartlarda MCF-7 hücrelerinde protein analizinde PDK1 seviyelerinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 6.17.A). Bu sonuç PDC<sub>a</sub> aktivite ölçümü sonuçlarımızı desteklemektedir. Hipoksik şartlarda yetişen MCF-7 hücrelerinde herhangi bir endojen PDP1 ve PDP2 aktivitesinden dolayı PDC<sub>t</sub> ve PDC<sub>t</sub> + PDP1<sub>c</sub> aktivitelerinde bir artış görülmediği bölüm 6.1.3’de belirtilmiştir (Şekil 6.16). MCF-7 hücrelerinde normoksik şartlarda 22.7±3.0 mU/mg bulunan PDC<sub>t</sub> + PDP1<sub>c</sub> aktivitesi, hipoksik şartlarda oldukça düşerek 9.89±1.77 mU/mg olarak bulunmuştur (Şekil 6.15.A).



Şekil 6.17: Meme kanseri hücre hatlarında PDC regülatör enzimlerinin western-blot analizleri.

Buna göre MCF-7’de hipoksik düzenlemede PDK1 önemli rol oynamaktadır. MDA-MB-231 hücrelerinde hipoksik şartlarda da normoksiada olduğu gibi PDK1 seviyesinin yüksek olduğu görülmüştür. Bundan dolayı MDA-MB-231 hücrelerinde hipoksia’da ve normoksia’da PDC<sub>a</sub> aktivitesinin ölçülemediği düşünülmektedir. Hipoksik ortamda PDK2-4 protein seviyeleride PDP1-2 protein seviyelerinden

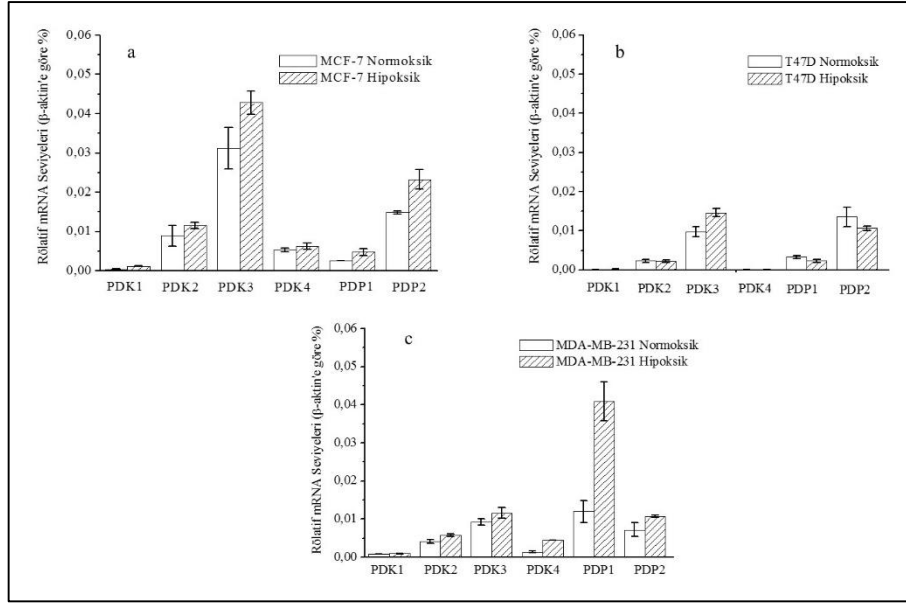
yüksektir (Şekil 6.17). Buda yine her iki durumda düşük PDC aktivitelerine işaret etmektedir. T47D hücrelerinde normoksik ve hipoksik şartlarda PDK1-4 seviyeleri, diğer meme kanseri hücrelerine göre oldukça yüksektir (Şekil 6.17.B). Protein analizi sonuçları meme kanseri hücrelerinde PDK1-4 ve PDP1-2 protein seviyelerinin farklılığını göstermiştir.

### **6.1.5. Normoksik ve Hipoksik Şartlarda Meme Kanseri Hücrelerinde PDC Regülatör Enzimleri mRNA Seviyeleri**

Enzim aktivite ve protein analizleri tamamlandıktan sonra MCF-7, T47D ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde PDC regülatör enzimlerinin mRNA seviyeleri belirlenmiştir. En düşük mRNA seviyesi PDK1'de (normoksik veya hipoksik) en yüksek mRNA seviyesi PDK3'de görülmüştür.

PDP1-2 izoenzimlerinin ve PDK1-4 izoenzimlerinin ekspresyonlarının karşılaştırıldığı bir çalışma mevcut değildir, fakat birçok çalışmada hipoksik şartlarda PDK1 izoenziminin ekspresyonunun arttığı belirtilmektedir [20, 21]. Bu çalışmada MCF-7, T47D ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde PDK1-4 izoenzimlerinin ekspresyon seviyeleri hipoksik durumlarda normoksik durumlardan daha yüksek bulunmuştur (Şekil 6. 18). Hipoksik şartlarda yetişmiş meme kanseri hücrelerinde PDCt aktivite ölçüm çalışmaları sonucunda hipoksik şartlardaki PDK1-4 mRNA seviyeleri ile uyumludur.

Hipoksik ortamda PDC regülatör enzim mRNA seviyelerinden en yüksek MCF-7 hücrelerindeki PDK3 mRNA seviyesi olmuştur ( $0.043 \pm 0.003$ ). Literatürde PDK3 izoenzimi ile ilgili bulguya rastlanmamıştır sadece PDK1 mRNA seviyelerinin yüksek olduğu belirtilmiştir [71]. Bundan dolayı PDK3 seviyelerinin tespiti yeni bir çalışmadır. Özellikle hipoksik ortamlarda büyütülmüş MCF-7 hücrelerindeki PDP2 ve hipoksik ortamlarda büyütülmüş MDA-MB-231 hücrelerindeki PDP1 dikkat çekmektedir ve bunlar normoksik koşullarla karşılaştırıldıklarında artmıştır. Bunların hipoksik ortamlardaki hücrelerin PDC aktivite ölçümleri sırasında herhangi bir aktivite artışına sebep olmadığı görülmüştür. Diğer taraftan MCF-7 hücrelerinde spermin varlığındaki reaktivasyon sonrasında PDC aktivite ölçümleri PDP2 mRNA ekspresyonunun yüksek olduğuna işaret etmekte idi. MCF-7 meme kanseri hücrelerinde PDP-2'nin mRNA seviyeleri ise bu sonucu destekler niteliktedir.

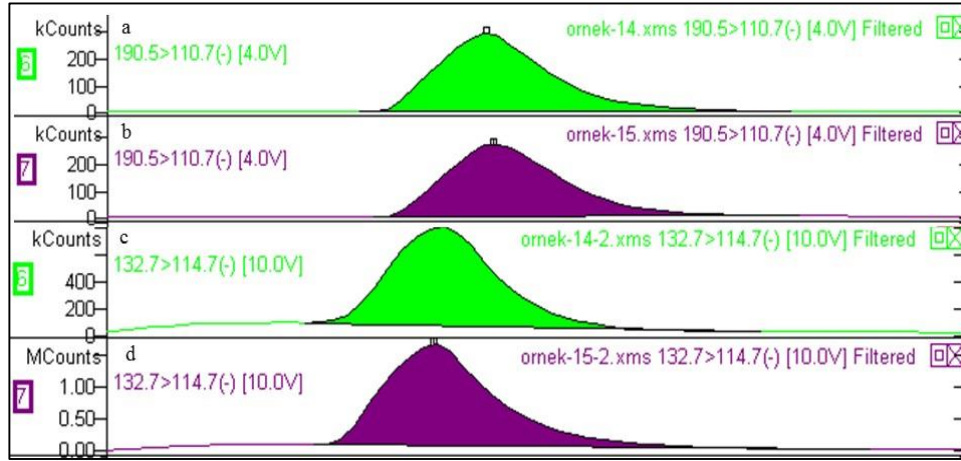


Şekil 6.18: Meme kanseri hücre hatlarında PDC regülatör enzimlerinin rt-PCR analizleri.

Protein analizlerine göre MCF-7’de hipoksik düzenlemede PDK1 önemli rol oynamaktadır [71]. Fakat burada yaptığımız rt-PCR çalışmasında MCF-7’de PDK3’ün rol oynadığına işaret etmektedir (Şekil 6.18.A).

### 6.1.6. Meme Kanseri Hücrelerinde Aktivite Ölçümlerinde Metabolit Seviyelerinin LC-MS/MS ile İncelenmesi

Bu kısımda, pirüvat (86.8→86.8), laktat (88.7→43.0), izositrat (190.5→110.7), okzaloasetat (130.7→87), malat (132.7→114.7), malonat (102.8→59.0) ve β-hidroksi bütürat, metilmalonat, 3-hidroksipropiyonat gibi metabolizmadaki diğer önemli organik asitler analiz edilmiştir. LC-MS/MS sonuçlarından elde edilen en önemli bulgu ise tüm kanser hücre hatlarında okzamat ve PTA varlığındaki PDC aktivite ölçümleri tamamlandığında izositrat birikiminin gözlenmesidir. TCA çevriminde izositrat birikmesi mitokondride bu metabolit ile ilişkili izositrat dehidrogenaz enzim aktivitesini düşündürmektedir. Meme kanseri hücrelerinde IDH aktivitelerinin düşük olması (Şekil 6.19.A ve B) LC-MS/MS sonuçlarını doğrulamaktadır. Literatürde de IDH mutasyonunu işaret eden glioma, akut miyolenid lökemi ve T-cell lenfoma gibi kanser hücreleri çalışmaları bulunmaktadır [72]. Sonuç olarak çalışmalarımız MCF-7 ve T47D meme kanseri hücrelerinde IDH enzim fonksiyonunun olmadığına işaret etmektedir.



Şekil 6.19: Meme kanseri hücrelerinde LC-MS/MS kromatogramları. a) MCF-7 izositrates (190.5→110.7), b) T47D izositrates (190.5→110.7), c) MCF-7 malates (132.7→114.7) ve d) T47D malates (132.7→114.7).

Çalışılan kanser hücre hatlarında birikerek dikkat çeken ikinci metabolit ise malattır (Şekil 6.19. C ve D). Malat mitokondride malat dehidrogenaz (MDH) katalizli bir reaksiyon ile oksaloasetata çevrilmiştir. Mitokondride malatın kullanılmaması ise MDH fonksiyonunda bozulmuş olabileceğine işaret etmektedir [50, 53, 54].

### 6.1.7. Meme Kanseri Hücreleri Çalışmaları Genel Değerlendirilmesi

Kanser hücrelerinde yüksek LDH aktivitesi ve düşük PDC aktivitelerinin görülmesi [26, 32] çoğu kanser hücresi için spesifik olup Warburg etkisinin sonucunda gözlemlenmektedir [34, 35]. Bundan dolayı kanser hücrelerinde enzim aktivitelerinin ölçülmesi ve metabolit analizlerinin gerçekleştirilmesi kanser hücrelerinin enerji metabolizmalarının anlaşılması ve kansere karşı müdahalede önemli bilgilere ulaşmamızı sağlamaktadır. Burada MCF-7, T47D ve MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinin normoksik ve hipoksik şartlarda enerji metabolizmasında kilit öneme sahip LDH, üç farklı PDC aktivite durumu,  $\alpha$ -KGDC, SDH ve IDH aktiviteleri ölçülmüştür.

LDH pirüvati laktata çeviren glikolitik bir enzimdir. Bundan dolayı yüksek LDH aktivitesi ve laktat oluşması yüksek glikolitik aktiviteye işaret etmektedir [46, 47]. Çalışmamızda tüm meme kanseri hücrelerinde yüksek LDH aktivitesi ölçülmüştür. İlaveten LC-MS/MS metodu ile meme kanseri hücrelerinde LDH enzim

aktivitelerinde farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Bu da farklı meme kanseri hücrelerinde LDH reaksiyon mekanizmalarının farklı olabileceğine işaret etmiştir. Son yapılan çalışmalarda da meme kanseri hücreleri LDH aktivitesi kinetik olarak incelenmiş kanser hücresinden izole edilen LDH enzimi kullanılıp hesaplanan Michaelis-Menten parametrelerinin farklı olduğu ve LDH reaksiyonunun ters yönü olan laktat + NAD<sup>+</sup> yönünün tetiklenebilmesinin önemine işaret edilmiştir [73]. Kanser hücrelerinde LDH mekanizmalarının tam olarak anlaşılması LDH reaksiyonunun her iki yönünü ele alan daha ileri kinetik çalışmalar gerektirmektedir.

Meme kanseri hücrelerinde normoksik ve hipoksik şartlarda PDC multi enzim kompleksi aktivite ölçümleri sonucunda hipoksik şartlarda endojen PDP aktivitesi olmadığı göstermiştir. İlâveten tüm meme kanseri hücrelerinde normoksik ile karşılaştırıldığında hipoksik şartlarda TCA çevrimi enzimlerinden  $\alpha$ -KGDC ve SDH aktivitelerinin 2-2.5 kat azaldığı belirlenmiştir. PDC kompleksi, hipoksik şartlarda HIF-1'in tetiklediği PDK-1 ile inaktive olmaktadır ve HIF-1 mekanizmasının TCA çevrimini yavaşlattığı belirtilmiştir [20,21]. Bu da normoksikle karşılaştırıldığında hipoksik şartlarda  $\alpha$ -KGDC ve SDH aktivitelerinin düşmesinin sebebi olabilir. Sindirim sistemi tümörleri, böbrek kanseri, tiroid tümörleri, nöroblastoma durumlarında da SDH aktivitelerinin düşük olduğu rapor edilmiştir [74].

Meme kanseri hücrelerinde LC-MS/MS ile pirüvat, laktat, izositrat, malat, okzaloasetat, malonat,  $\beta$ -hidroksi bütirat gibi metabolizmadaki önemli metabolitler kantitatif olarak belirlenmişlerdir. Sadece yüksek seviyede izositrat ve malat olduğu görülmüştür. Ayrıca IDH aktivite ölçümlerimiz, aktivitenin düşük olduğunu göstererek izositrat birikmesinin olabileceğini desteklemiştir. Mitokondriyel malatın miktarının yüksek çıkması ise ATP sitrat liyaz katalizinin görev aldığı, yağ asidi, kolesterol ve isoprenoid sentezine işaret etmektedir [50]. Bu sonuçlar meme kanseri hücrelerinde glutamin ve  $\alpha$ -ketoglutarat üzerinden anaplerozun TCA çevriminde işlevselliğin sürdürülmesinde önemli rol oynayabileceğini göstermiştir.

## **6.2. PDC İnhibitörü DCA'nın Kanser Hücreleri Üzerindeki Etkisi**

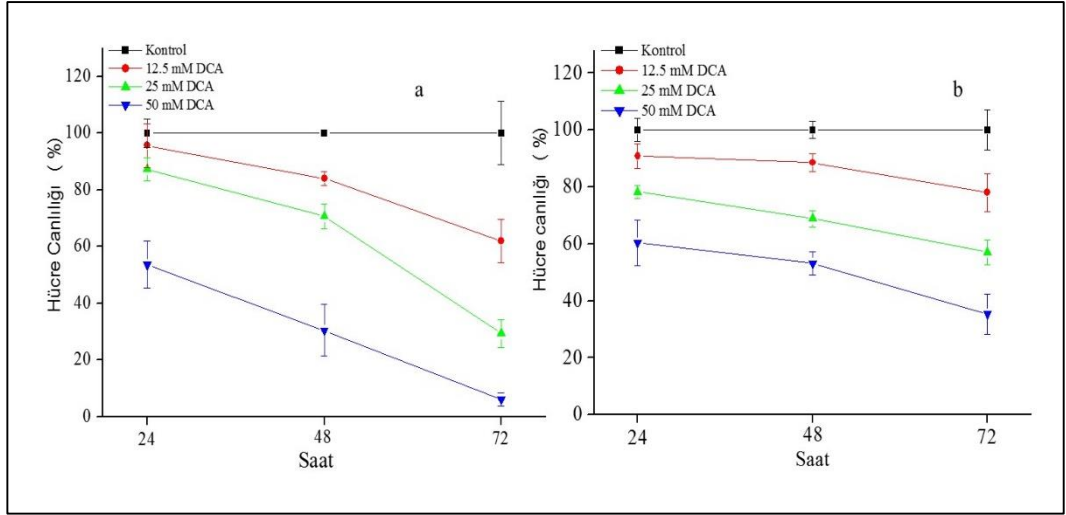
Şimdiye kadar yaptığımız çalışmalarımızda MCF-7, T47D ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatları normoksik ve hipoksik şartlarda yetiştirilmiş ve bu hücrelerin mitokondriyel ekstraktlarında enzimatik aktivite ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca bu hücre



ekstraktları kullanılarak PDK1, PDP1 ve diğer regülatör enzimlerin mRNA ve protein ekspresyonu seviyeleri incelenmiştir. Tüm çalışmalarımızda DCA varlığında ve yokluğunda PDC aktive ölçüm çalışmaları gerçekleştirilerek DCA'nın PDC enzim kompleksi fonksiyonlarına etkileri detaylı incelenmiştir. Literatürde DCA'nın diğer kanser hücreleri metabolizmalarına etkilerine dair sınırlı bilgi bulunduğundan bundan sonraki çalışmalar farklı kanser hücre hatları ile gerçekleştirilmiştir.

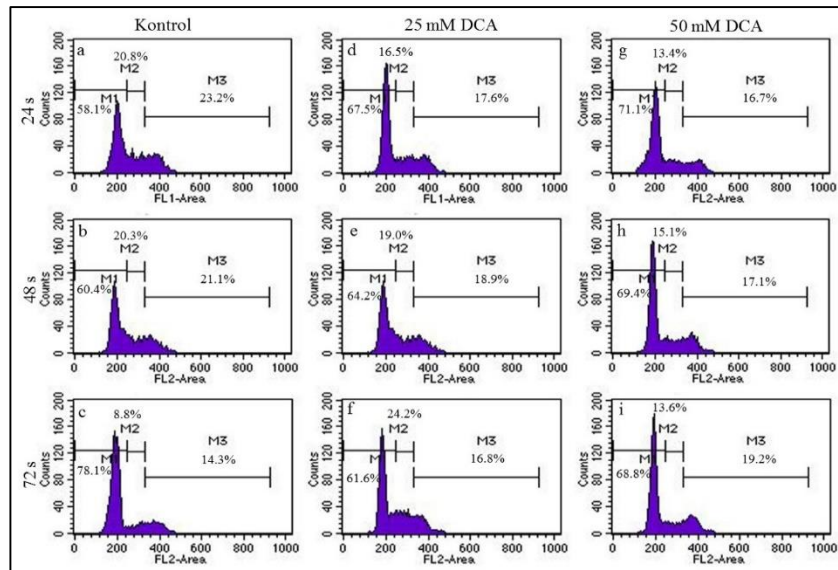
### **6.2.1. DCA'nın Böbrek Kanseri Hücre Hattı Canlılığı, Döngüsü ve Ölüm Mekanizması Üzerine Etkisi**

Böbrek kanseri hücre hattı olan ACHN (renal adenocarcinoma human) ve kontrol hücresi olarak HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) hatları seçilerek DCA'nın hücrelerin canlılığı, döngüsü, ölüm mekanizmaları ve metabolitlerine olan etkileri incelenmiştir. Hücreler 12.5, 25 ve 50 mM DCA ile 24, 48 ve 72 saat muamele edilerek hücre canlılığına etkileri incelenmiştir. 24 saat sonra kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında hücre canlılığında DCA konsantrasyonuna bağlı olarak %10-50 oranında azalma gözlenmiştir (Şekil 6.20.A). Hücre canlılığındaki düşüş 48 ve 72 saatlerde daha belirgindir. Sadece 50 mM DCA'da hücre canlılığındaki düşüş lineerdir. Bu nedenle bundan sonraki deneylerde 25 mM ve 50 mM DCA konsantrasyonları kullanılmıştır. İlavenen DCA'nın kanser olmayan hücre hatlarındaki canlılığa etkileri paralelinde HUVEC hücreleri ile gerçekleştirilmiştir. HUVEC hücre canlılığında da doza ve zamana bağlı bir düşüş görülmektedir (Şekil 6.20.B). 72 saat, 50 mM DCA uygulanmış HUVEC hücrelerinde canlılık  $35.3 \pm 4.5$ 'e düşmektedir. DCA HUVEC hücreleri ile karşılaştırıldığında, ACHN hücreleri üzerinde %29.3 daha etkilidir.

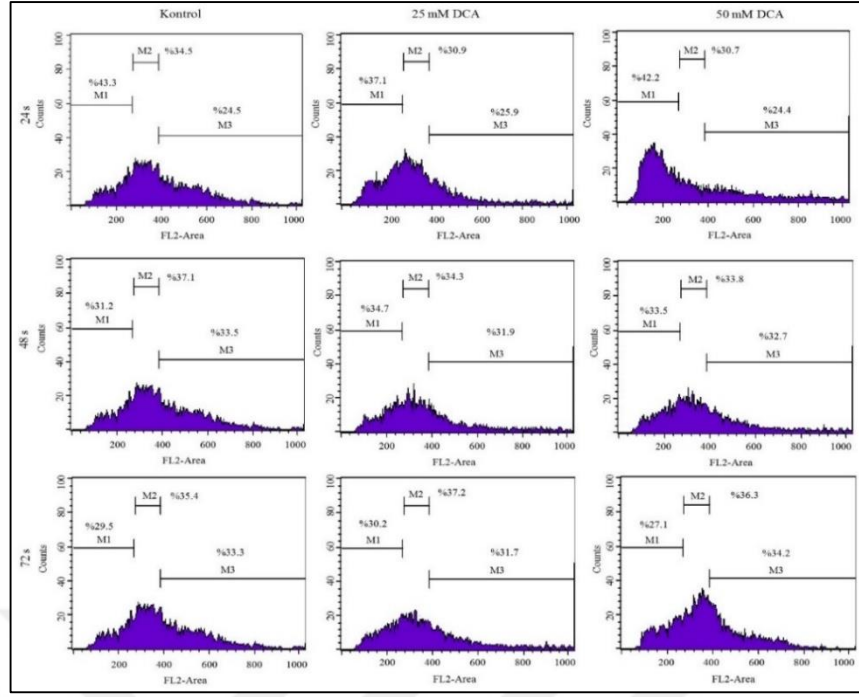


Şekil 6.20: 12.5-50 mM DCA'nın ACHN a) ve HUVEC b) hücre hattında 24, 48 ve 72.saatlerde hücre canlılığına etkilerinin incelenmesi.

ACHN hücrelerindeki bu canlılık düşüşünün hücre döngüsü ile bağlantısının araştırmak amaçlı olarak hücreler 25, 50 mM DCA ile 24, 48 ve 72 saat muamele edilerek incelenmiştir (Şekil 6.21). DNA miktarı akım sitometre analizde PI boyaması sonrası görüntülenmiştir. DCA uygulanması ACHN hücrelerinde, hücre döngüsü profillerinde değişikliğe sebep olmuştur. 50 mM DCA uygulandığında kontrol hücreleri (%58.1) ile kıyaslandığında, oldukça fazla ACHN hücresi (%71.1) G1 fazında birikmektedir. HUVEC kontrol hücrelerinde ise bu etki kısa süreli ve anlamlı bulunmamıştır (Şekil 6.22).

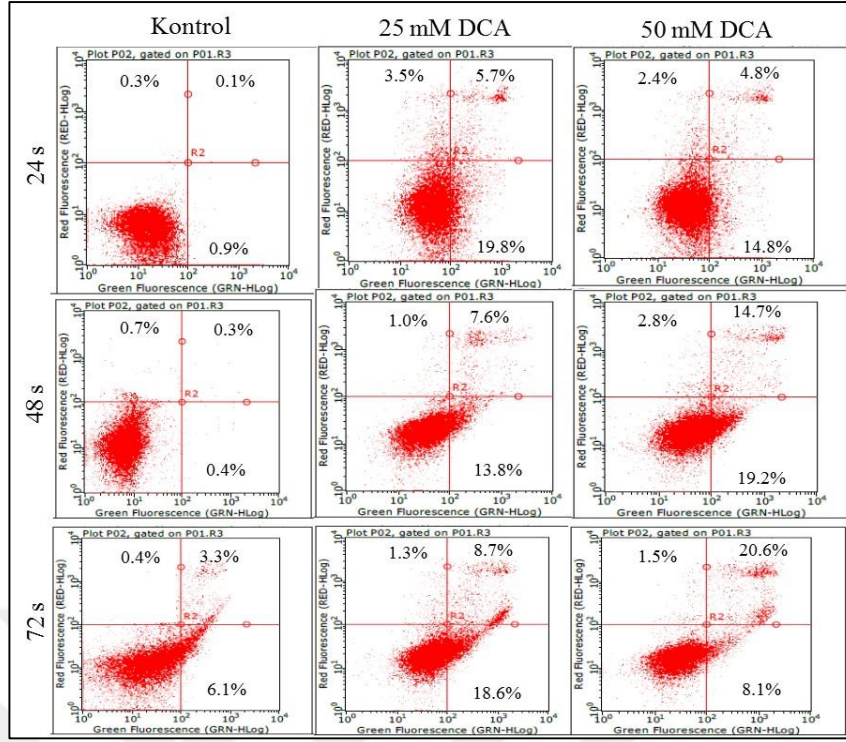


Şekil 6.21: DCA'nın ACHN hücrelerinde hücresel döngüye etkisinin incelenmesi

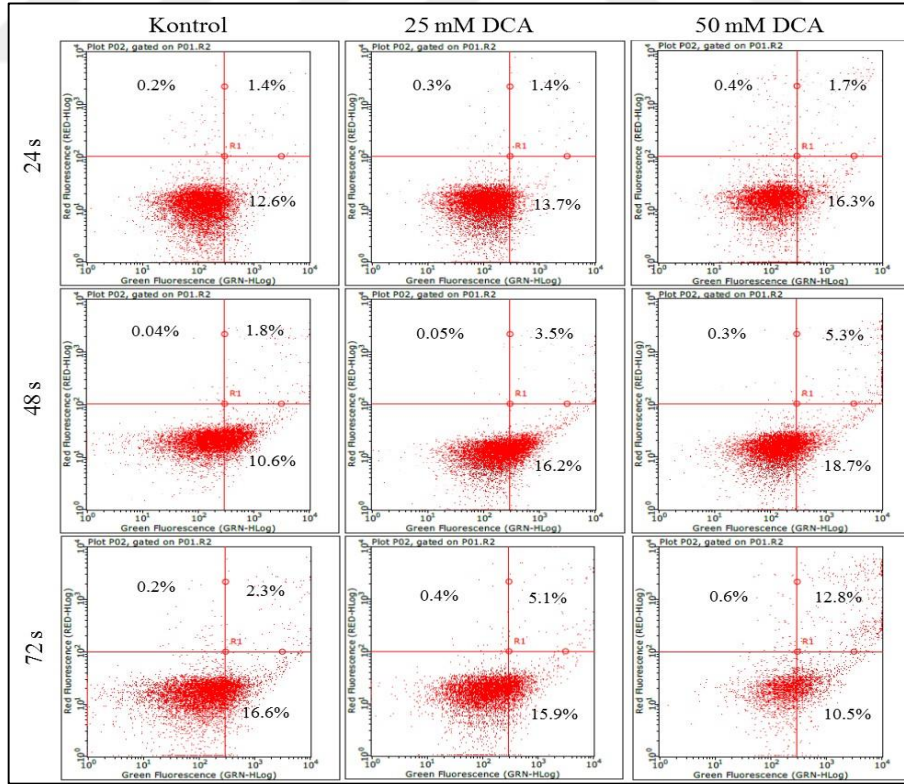


Şekil 6.22: DCA'nın HUVEC hücrelerinde hücresel döngülere etkisinin incelenmesi

ACHN hücrelerinde DCA'nın apoptozu tetikleyip tetiklemediği 0-72 saatlerde Annexin-V/PI boyaması yapılarak incelenmiştir (Şekil 6.23). Şekilde görüldüğü gibi Annexin-V pozitif hücreler erken (alt sağ), ve geç (üst sağ) apoptotik olarak görüntülenmişlerdir. 24 saat içinde, 25 mM ve üzerinde DCA uygulanan hücreler DCA uygulanmayanla karşılaştırıldıklarında, %25.5 oranında erken %19 oranında geç apoptoz gitmektedir. Toplam apoptotik hücre oranları 48 saat, 25 mM dozu için %21, 50 mM dozu için %33.9, 72 saat, 25 mM dozu için %27.3, 50 mM dozu için %28.7'dir. HUVEC hücreleriyle yapılan çalışma sonucunda 72 saatte 25 mM ve 50 mM DCA uygulamalarında %21 ve %23.3 oranında apoptotik hücre belirlenmiştir (Şekil 6.24). Bu sonuçlar 72 saatte HUVEC hücrelerinde apoptotik hücre sayısının ACHN'den daha düşük olduğunu göstermektedir.



Şekil 6.23: DCA'nın ACHN hücrelerinde sebep olduğu hüresel ölümün Annexin-V/PI boyama ile incelenmesi.



Şekil 6.24: DCA'nın HUVEC hücrelerinde sebep olduğu hüresel ölümün Annexin-V/PI boyama ile incelenmesi.

## 6.2.2. DCA'nın ACHN Hücrelerinde Metabolit Seviyelerine Etkilerinin İncelenmesi

DCA uygulamalarının ACHN hücrelerinde metabolit değişimlerine olan etkileri hücre ekstraktları, LC-MS/MS metodu ile analiz edilerek belirlenmiştir. 42 organik asitten sadece dördü olan laktat, sitrat, N-asetil aspartat (NAA) ve 5-oksoprolin (pyroglutamik asit) kantitatif olarak analiz edilmiştir (Şekil 6.25). Diğerleri deteksiyon limiti altında kalmıştır (Tablo 6.1).

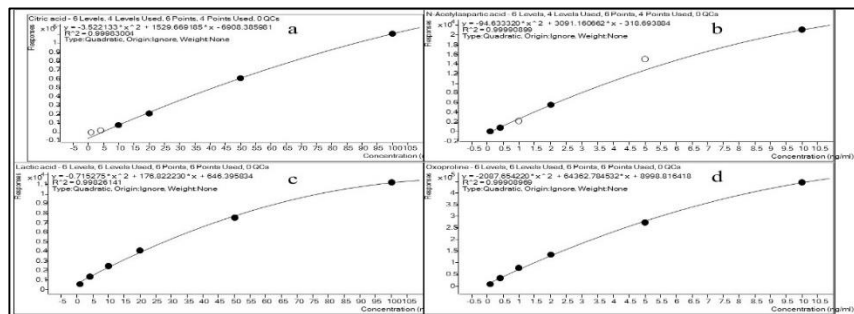
Tablo 6.1: LC-MS/MS analizleri min. ve max. deteksiyon limitleri ve metabolit MRM geçişleri.

Analiz edilen organik asit	MRM kütle geçişi	Response levels	Beklenen konsant. (ppm)	Doğruluk (%)
Sitrik asit	191.0→86.9	310-110783	1-100	97.06-103.74
N-Asetil aspartik asit	173.9→87.9	91-21129	0.1-10	95.72-100.43
Laktik asit	89.0→43.1 89.0→45.0*	594-11210	1-100	96.75-102.68
5-Oksoprolin	130.0→84.0	8979-444873	0.1-10	97.65-104.88
Glikolik asit	74.9→47.1	104-5692	1-100	95.08-109.24
Malik asit	132.9→114.9 132.9→70.9*	237-38884	0.1-10	98.87-104.14
Malonik asit	103.0→59.0	367-46216	0.1-10	98.65-102.36
α-ketoglutarat	145.0→100.9 145→56.9*	747-34113	1-100	97.64-106.86
Orotik asit	155.0→111.0	1291-67723	0.1-10	96.14-101.40
Fumarik asit	114.9→71.0	74-1360	0.1-10	93.29-103.86
2-OH Glutarik asit	146.9→129.0 146.9→85.0*	6943-489891	1-100	97.47-105.39
3-Hydroxy propanoik asit	89.0→58.9	115-1026	1-100	95.34-103.66
3-OH-2metil bütanoik asit	117.0→73.0	862-36942	0.1-10	96.51-105.7
Methylmalonik asit	116.9→72.9 116.9→55.0*	7708-430859	1-100	97.57-102.08
Suksinik asit	116.9→72.9 116.9→98.9*	489-55897	0.1-10	95.69-107.22
2-OH-butirik asit	102.9→57.0 102.9→44.9*	99-1938	0.1-10	96.84-105.61
3-OH-3-metil glutarik asit	160.9→99.0 160.9→57.0*	2555-273076	1-100	97.33-102.91
3-hidroksibütirik asit	103.1→59.1	137-7196		96.11-100.43
3-hidroksi izobütirat	103.0→73.0	913-84289	1-100	96.29-101.63
Homogentisik asit	166.9→122.9 166.9→107.8*	1103-145587	0.1-10	96.22-101.52
Etilmalonik asit	130.9→86.9 130.9→68.9*	1388-51240	0.1-10	96.46-103.52
Glutararik asit	131.0→86.9 131.0→112.8*	3848-167476	1-100	96.35-104.85
2-Oxadipik asit	158.9→114.9 158.9→59.0*	195-3855	0.1-10	98.98-105.40

Tablo 6.1: Devamı

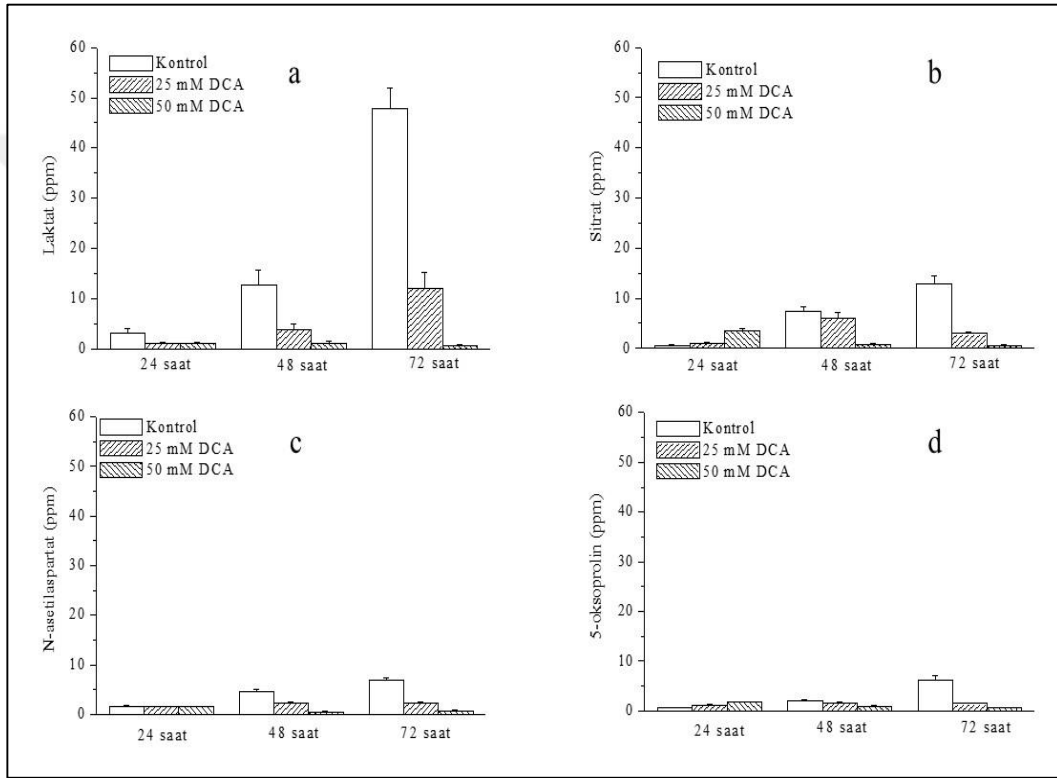
3-Hidroksi izovalerik asit	116.9→58.9	165-18441	0.1-10	95.43-107.29
3-OH-pentanoik asit	117.0→58.9 117.0→40.9*	115-10681	0.1-10	95.03-103.5
p-OH-fenil laktik asit	180.9→162.9 180.9→134.9*	90-19534	0.1-10	98.15-106.15
N-asetil-L-tirozin	222.0→179.9 222.0→119.0*	185-22661	0.1-10	95.60-102.03
3-Metilglutakonik asit	142.9→98.9 142.9→55.0*	210-56850	0.1-10	93.64-102.35
2-Hidroksi izovalerik asit	117.0→71.0 117.0→44.9*	336-30156	0.1-10	98.79-102.31
Tigilil glisin	156.0→111.9 156.0→95.8*	54-5531	0.1-10	94.08-107.15
3-Metilkrotonilglisin	156.0→74.0	252-15991	0.1-10	97.52-104.67
3-Metilglutarik asit	144.9→100.9 144.9→126.8*	256-24053	0.1-10	98.23-104.14
Adipik asit	145.0→127.0 145.0→81.0*	246-11042	0.1-10	97.21-105.06
N-izovaleril glisin	158.0→73.9 158.0→114.0*	268-33816	0.1-10	98.06-105.19
Suberilglisin	230.0→74.0 230.0→111.0*	129-27521	0.1-10	97.99-104.14
2-OH-fenilasetik asit	150.9→107.0	2941-245878	0.1-10	96.26-102.08
4-OH-fenilasetik asit	151.0→106.8 151.0→78.7*	1003-91217	1-100	98.11-104.1
3-Fenil laktik asit	165.0→146.9 165.0→103.0*	346-41882	0.1-10	96.91-105.44
N-(3-fenil propiyonil) glisin	208.0→105.0 208.0→76.0*	3897-564909	0.1-10	97.62-102.35
Hekzanoil glisin	172.0→73.9 172.0→128*	171-14949	0.1-10	97.12-104.73
Suberik asit	173.1→111.1 173.1→82.9*	1445-46894	0.1-10	95.49-107.12
Sebakik asit	201.0→139.0 201.0→183.1*	484-38629	0.1-10	96.51-103.71

\* kualifikasyonda kullanılan düşük alanlı kütle geçişlerini göstermektedir.



Şekil 6.25: LC-MS/MS kalibrasyon eğrileri. Sitrik asit a), NAA (b), laktik asit c) ve 5-oksoprolin (d). Kuadrik eşitlikler ve R<sup>2</sup> değerleri grafiklerde verilmiştir. Korelasyona uymayan datalar içi boş daireler ile gösterilmiştir ve kalibrasyonlara dahil edilmemiştir.

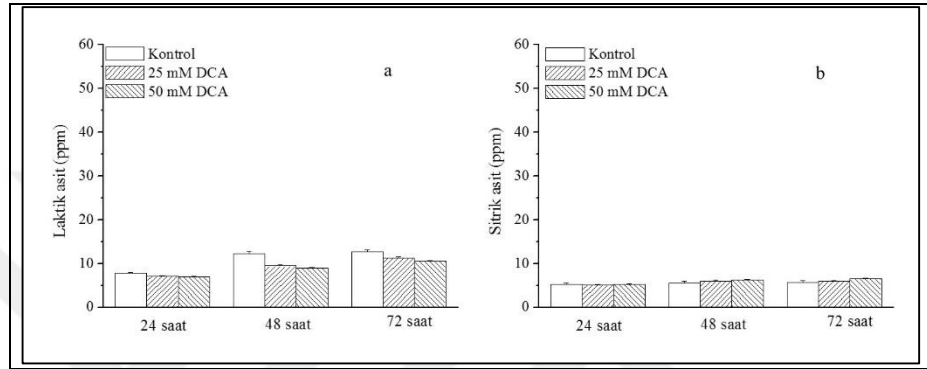
Şekil 6.26'da, kontrol ve DCA uygulanmış hücrelerde, 24, 48 ve 72 saatlerde, organik asit seviyelerindeki değişimler görülmektedir. Beklenildiği gibi en çok bulunan metabolit laktattır ve laktat seviyesi 48 ve 72 saat kontrol hücrelerinde yüksek oranda artmakta ve DCA uygulanması ile bu artış belirgin şekilde düşmektedir. Sitrat ACHN hücrelerinde en yüksek seviyede detek edilen ikinci metabolittir. Kontrol ACHN hücrelerinde de sitrat seviyeleri 48 ve 72. Saatlerde artış göstermektedir. DCA uygulamaları sırasında 24 saatte sitrat seviyelerinde artış gözlenirken 48 ve 72 saat DCA uygulamalarında sitrat seviyelerinin düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 6.26. B).



Şekil 6.26: DCA ile muamele edilen ACHN hücrelerinde metabolit seviyelerinin LC-MS/MS analizi karşılaştırması. a) Laktat, b) Sitrat, c) N-asetil aspartat, d) 5-oksoprolin.

Sinir sistemi spesifik metabolit olan N-asetil aspartat NAA'da ACHN hücrelerinde biriken bir diğer metabolittir. DCA uygulanması NAA seviyelerinde önemli oranda düşüşe neden olmuştur (Şekil 6.26.C). İlâveten  $\gamma$ -glutamil çevriminde hücre içi bir metabolit olan 5-oksoprolin, ACHN hücrelerinde en çok üretilen metabolitlerden biridir. DCA uygulamasının 24 saatte 5-oksoprolin seviyelerinde artışa sebep olduğu görülsede 48 ve 72 saatlerde azalma belirlenmiştir (Şekil 6.26 D).

*In vivo* şartlarda ilaçlar kanser hücrelerine ulaşmadan önce HUVEC hücrelerinden difüz olarak ulaşmaktadır bu sebeple sağlıklı hücre türü olarak HUVEC hücreleri seçilmiştir. DCA'nın HUVEC hücre hattı metabolizmalarına etkileri de LC-MS/MS ile incelenmiştir. Bu hücrelerde sadece laktik ve sitrik asit tespit edilmiştir (Şekil 6. 27). 25 mM ve 50 mM DCA uygulamalarında laktat az miktarda azalırken sitratin arttığı gözlemlenmiştir. HUVEC hücrelerinde diğer metabolitler tespit edilememiştir.



Şekil 6.27: DCA uygulamalarının HUVEC hücreleri organik asit metabolizmalarına etkilerinin LC-MS/MS ile incelenmesi. Laktat a), Sitrata b)

### 6.2.3. ACHN Hücrelerinde LDH, PDC, KGDC ve SDH Aktivitelerinin Ölçülmesi

0-50 mM DCA uygulanmış olan ACHN hücreleri enzim kaynaklarında LDH aktiviteleri ölçülmüş ve spesifik aktiviteleri hesaplanmıştır (Tablo 6.2). Aktiviteler UV-vis spektrofotometre kullanılarak 340 nm aborbansının düşmesi ile takip edilmiştir. NADH düşüşlerinden başlangıç reaksiyon hızları hesaplanırken yapılan tüm lineer fitlerde  $R^2$  en az 0.99930'dur. Ayrıca aktivite ölçümü için kontrol deneyleri yapılmıştır. Burada artan DCA konsantrasyonlarında PDC aktivitelerinin paralel olarak, beklenen şekilde arttığı görülmektedir. Böylece pirüvat daha fazla asetil-CoA'ya çevilmektedir ve laktat miktarı düşmektedir. Sonuç olarak bu LDH aktivite ölçüm çalışmaları, LC-MS/MS çalışmalarında gözlemlenmiş olan, artan DCA varlığındaki laktat miktarındaki azalmanın, PDC enzimatik aktivitesindeki artıştan kaynaklandığı hususunu desteklemektedir.



Tablo 6.2: ACHN hücrelerinde hesaplanan LDH spesifik aktiviteleri\*.

	Başlangıç Reaksiyon Hızı	Ort.baş.re ak.hızı ( $\Delta\text{abs.sn}^{-1}$ )	STD. Sapma	Prot. Mik. mg/mL	Enj. Hacm, $\mu\text{l}$	Spes. Aktiv. ( $\Delta\text{abs.sn}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ )	Spes. Aktiv. STD sapma ( $\Delta\text{abs.sn}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ )
Kontrol, 0 mM DCA, ACHN	8,52E-04	8,74E-04	3,10E-05	1,14	5	0,1533**	0,0054
	8,96E-04						
25 mM DCA, ACHN	7,93E-04	8,23E-04	4,29E-05	1,28	5	0,1286	0,0067
	8,53E-04						
50 mM DCA, ACHN	6,31E-04	6,37E-04	8,77E-06	1,12	5	0,1137	0,0016
	6,43E-04						

\* Spesifik aktivite değerleri ortalama başlangıç reaksiyon hızının protein miktarı (ml cinsinden) ve enjeksiyon hacmine bölünmesi ile hesaplanmıştır.

\*\*Örnek hesaplama:  $8.74 \times 10^{-4} (\Delta\text{abs.sn}^{-1}) / 1.14 (\text{mg/ml}) / 0.005 (\text{ml}) = 0.1533 \Delta\text{abs.sn}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ .

ACHN hücreleri enzim kaynaklarında (10  $\mu\text{l}$  enzim kaynağı kullanılmıştır) PDC, KGDC ve SDH aktiviteleri ölçülmüş fakat bir aktivite gözlenememiştir.

## 6.2.4 ACHN Hücre Hattı Çalışmalarının Genel Değerlendirilmesi

Kanser hücreleri metabolizmalarının glikolizden oksidatif fosforilasyona yönlendirilmesi amacıyla DCA gibi PDK inhibitörlerinin ticari ilaçlarla kullanımı yeni tedavi stratejilerinden biridir [75]. Bununla beraber, DCA'nın sadece kanser hücrelerinde seçici olan toksik etkisinin olduğu da belirtilmektedir [76-78]. Bu çalışmada DCA'nın böbrek adenokarsinoma hücrelerinde (ACHN) etkileri incelenmiştir. DCA bu hücrelerde hücre canlılığını azaltarak hücreleri apoptoza yönlendirmiştir. Bu bulgular DCA ile ilgili çalışmalarında desteklemektedir [75, 77, 79-81]. İlaveten hücre döngüsü analizleri DCA uygulamasının ardından hücrelerin G1/G0 fazında toplandığı ve S fazındaki hücre sayısının 24 saat içinde azaldığını göstermektedir. Literatürde DCA'nın diğer hücre hatlarında G1, G2 fazlarında baskılama yapabileceğini veya hiçbir baskılamaya sebep olmadığını belirten sonuçlar bulunmaktadır [76, 79, 82, 83-86]. Literatür bulguları ve bu çalışmadaki sonuçlar DCA'nın tutuklanmaya neden olan mekanizmasının kanser hücre tipine, fizyolojik durumuna ve/veya kanser hücresinin mutasyonlarına bağlı olabileceğini göstermektedir.

DCA'nın apoptotic etkisi endometrin, akciğer, meme, merkezi sinir sistemi, kalınbağırsak, kan, omurilik, melanoma, baş ve boyun kanseri hücrelerinde gösterilmiştir [75, 78-83, 87, 88]. Bu çalışmada DCA ACHN hücrelerinde apoptoza neden olmaktadır. DCA'nın mitokondriyal bağımlı apoptoza karşı olan rezistansın üstesinden geldiği bilinmektedir [82]. İlaveten DCA'nın kanser hücrelerinde bazı popülasyonlarda tedaviye direnç gösterirken bazılarında uzun süreli uygulandığında etki gösterdiği belirlenmiştir [77].

LC-MS/MS çalışmaları ACHN hücrelerinde yüksek miktarlarda laktat, sitrat, NAA ve 5-oksoprolin varlığını göstermiştir. DCA'nın PDK aktivitesini inhibe etmesi, böylece PDC'yi aktive etmesi gerektiği için, glikoliz yoluyla üretilen pirüvatın laktata çevrilmesi yerine, asetil-CoA üretiminde kullanılması beklenmektedir. Gerçektende DCA uygulamasından sonra laktat seviyelerinin ciddi olarak düştüğünün görülmesi (Şekil 6.26.A) PDK inhibisyonu ile PDC reaktivasyonunu doğrulamıştır. Normoksik şartlarda glikoz alımının hızlanması ve laktat birikmesi (aerobik glikoliz), kanser hücrelerinin genel bir özelliğidir. Laktatın tümör hücrelerine sağladığı başlıca avantajlar arasında immünolojik kaçışın desteklenmesi, metastas ve damar oluşumuna katkıda bulunması ve proteazlar için uygun bir ortam sunmasıdır [47]. Bunların yanında laktat aerobik glikolizde apoptosize dirençte rol oynamaktadır [89]. DCA ile laktat seviyesinin düşürülmesi kanser hücrelerinde laktatın tetiklediği bu tip proseslerin engellenmesinde önemli ölçüde katkıda bulunmuştur.

DCA ile PDC reaktivasyonu 24 saat içerisinde sitrat seviyelerinin artmasını sağlaması pirüvatın TCA çevrimine yönlendiğini göstermektedir (Şekil 6.26.B). Prolifere olan kanser hücreleri yüksek miktarda lipid ve sterol sentezlediklerinden yüksek sitrata gereksinim duymaktadırlar [90]. Glutaminolysis hızlı büyüyen kanser hücrelerinde sitratın ana kaynağıdır [90]. Glutaminolizde kanda yüksek oranda bulunan glutamin (Gln) kanser hücresi tarafından direk alınarak, glutaminazın kataliziyle glutamata (Glu) çevrilir. Glu  $\alpha$ -ketoglutarata çevrilip TCA çevrimine girer. Glikoz kaynaklı pirüvatın TCA'ya yönlenmesi ile TCA çevrimi ara-ürünleri oxaloasetat, süksinat, fumarat ve  $\alpha$ -ketoglutaratın seviyelerinin clear cell karsinoma hücrelerinde arttığı belirtilmiştir [91]. LC-MS/MS metodu deteksiyon limiti dahilinde (Tablo 6.2.) adı geçen metabolitlerin tespit edilmemesi bunların ACHN hücrelerinde belirgin bir şekilde birikmediğine işaret etmektedir. DCA uygulamalarında sitrat seviyelerinin azalması ACHN hücreleri metabolizmalarının ciddi etkilendiğini göstermiştir. İlaveten bu durum DCA'nın kolesterol sentezinin

hızını kontrol eden enzim hidrosimetilglutaril koenzim A redüktazın nonkompetitif inhibitörü olmasındanda kaynaklanabileceğini düşündürmektedir [92].

5-oksoprolin ve NAA kontrol ACHN hücreleri analizlerinde oldukça yüksek seviyelerde belirlenmektedir (Şekil 6.26. C ve D). 5-oksoprolin,  $\gamma$ -glutamil çevriminin ara-ürünüdür ve 5-oksoprolinaz ve glutasyon sentaz enzimlerindeki defeklerden dolayı birikebilmektedir [93]. Çeşitli tümör hücrelerinde görülen yüksek miktardaki 5-oksoprolin ve glutasyon kemoterapiye daha dayanıklı neoplastik doku oluşumuna yol açmaktadır [94]. NAA ise beyinde en fazla bulunan 2. metabolit olarak bilinmektedir, oligodendrosit miyelinasyonunda ve protein/histon asetilasyonunda kaynak olarak veya nörotransmitter N-asetilaspartilglutamat sentezinde öncül olarak kullanılmaktadır [95-97]. NAA, mitokondride, asetil CoA ve aspartik asitten (Asp) N-asetiltransferaz katalizli bir reaksiyonla sentezlenmektedir. Zand ve ark, yumurtalık kanseri hastalarında, tümöral NAA ve onun biyosentetik enzimi NAT8L'nin yüksek olduğunu belirtmiştir [98]. siRNA ile NAT8L geninin susturulması tümör gelişimi ve hayatta kalımını ciddi derecede azaltmaktadır [98]. Melanoma, meme, bağırsak ve rahim kanserlerinde NAT8L gen ekspresyonunun yüksek olduğu rapor edilmiştir. Aynı zamanda yüksek NAT8L ekspresyonu adipoz dokularda, nötral lipitlere glikoz alımının ciddi olarak uyarılmaktadır ve sitrata ilave olarak NAT8L kaynaklı NAA'nın da hızlı büyüyen kanser hücreleri lipid sentezinde sitosolik asetil-CoA kaynağı olarak kullanılabilirliğini göstermektedir. Kanser hücrelerinde glikoliz ve TCA çevrimi bozuk olduğundan asetil-CoA'nın temel kaynağı mitokondriyel yağ asitleri  $\beta$ -oksidasyonudur. Mitokondriye yağ asidi girişi inhibe edildiğinde hematopoietic hücre hatları (LyD9 ve WEHI-231)'nda apoptozisin tetiklendiği gösterilmiştir [99]. Diğer taraftan de novo aspartat sentezi için karbon anaplerotik Gln'den sağlanmaktadır [100]. Aspartat,  $\alpha$ -ketoglutarattan oksidatif yollar ile sentezlenebilmektedir [101, 102]. Yukarıda bahsedildiği gibi  $\alpha$ -ketoglutarat Gln kaynaklıdır. Asp proliferasyon için esansiyeldir ve de novo pürin sentezinde IMP AMP dönüşümünde kullanılmaktadır. Asp ayrıca de novo pürin sentezinde karbon iskeleti sağlamakta hemde amino asit olarak proteinlerde yer almaktadır [100]. Öyle görünüyorki NAA, lipid sentezinde asetil grubu sağlamanın yanı sıra, ayrıca sitosoldeki bahsedilen proste Asp'de sağlamaktadır. Aspartatın asetilasyonu mitokondriden çıkmasına olanak sağlayabilmesinin yanısıra TCA çevrimi metabolitlerinin yenilenmesinde glutamin katkısını hızlandırabilir. Bu çalışma DCA varlığında NAA seviyelerinin 24 saatte

azaldığını göstermektedir. PDC, DCA ile aktive olduğunda  $\beta$ -oksidasyonu ve glutaminolysisin ve NAA sentezinin baskılandığı görülmektedir.

LC-MS/MS sonuçlarına göre ACHN hücreleri ile karşılaştırıldığında HUVEC hücrelerinde sadece laktik ve sitrik asitler belirlenebilmiştir. Laktat ve sitrat enerji metabolizması için önemlidir. HUVEC hücrelerinde NAA ve oksoprolinin belirlenememesi bu metabolitlerin kanser hücreleri için önemine işaret etmektedir.

Sonuç olarak çalışmalarımız DCA'nın böbrek adeno karsinoma hücre hatlarında etkili ve seçici olarak apoptozu uyardığını; bu etkiyi ise PDC multienzim kompleksini aktive edip pirüvatı TCA çevrimine yönlendirerek yaptığını ve böylece oksidatif fosforilasyon ve mitokondriyel ROS üretimini arttırdığını düşündürmektedir. Sonra yapılacak çalışmada LDH inhibisyonunun etkilerinin incelenmesi planlanmaktadır. Tahminen bu durum TCA'ya pirüvat akışını hızlandıracaktır.

## KAYNAKLAR

- [1] Lukyanenko V., Chikando A., Lederer W. J., (2009), "Mitochondria in cardiomyocyte Ca<sup>2+</sup> signaling", *Int J Biochem Cell Biol.*, 41(10), 1957–1971.
- [2] Hiromasa Y., Fujisawa T., Aso Y., Roche T. E., (2004), "Organization of the cores of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex formed by E2 and E2 plus the E3-binding protein and their capacities to bind the E1 and E3 components", *J. Biol. Chem.*, 279, 6921-6933.
- [3] Milne J. L., Shi D., Rosenthal P. B., Sunshine J. S., Domingo G. J., Wu X., Brooks B. R., Perham R. N., Henderson R., Subramaniam S., (2002), "Molecular architecture and mechanism of an icosahedral pyruvate dehydrogenase complex: a multifunctional catalytic machine", *J. EMBO Journal*, 21, 5587-5598.
- [4] Behal R. H., Buxton D. B., Robertson J. G., Olson M. S., (1993), "Regulation of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex", *Annu. Rev. Nutr.*, 13, 497-5.
- [5] Reed L. J., Hackert M. L., (1990), "Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases", *J. Biol. Chem.*, 265, 8971-8974.
- [6] Roche T. E., Baker J., Yan X., Hiromasa Y., Gong X., Peng T., Dong J., Turkan A., Kasten S. A., (2001), "Distinct regulatory properties of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase", *Prog. Nucleic Acids Res., Mol. Biol.*, 70, 33-75.
- [7] Patel M. S., Nemeria N. S., Furey W., Jordan F., (2014), "The Pyruvate Dehydrogenase Complexes: Structure-based Function and Regulation", *The Journal of Biological Chemistry*, 289 (24), 16615-16623.
- [8] Roche T. E., Hiromasa Y., Turkan A., Gong X., Peng T., Yan X., Kasten S. A., Bao H., Dong J., (2003), "Essential roles of lipoyl domains in the activated function and control of pyruvate dehydrogenase kinases and phosphatase isoform 1", *Eur. J. Biochem.*, 1050-1056.
- [9] Yu X., Hiromasa Y., Tsen H., Stoops J. K., Roche T. E., Zhou Z. H., (2008), "Structures of the human pyruvate dehydrogenase complex cores: a highly conserved catalytic center with flexible N-terminal domains", *Structure*, 16, 104-114.
- [10] Vogel O., Hoehn B., Henning U., (1972), "Molecular Structure of the Pyruvate Dehydrogenase Complex from *Escherichia coli* K-12", *Proc Natl Acad Sci USA.*, 69(6), 1615–1619.
- [11] Holness M. J., Sugden M. C., (2003), "Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation", *Biochem Soc Trans.*, 31,(6), 1143-51.
- [12] Danner D. J., Doering C. B., (1998), "Human mutations affecting branched chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase", *Frontiers in Bioscience*, 3, 517-524.

- [13] Vassilyev D. G., (2007), “Crystal structure of pyruvate dehydrogenase phosphatase 1 and its functional implications and Jindrich Symersky”, *J Mol Biol.*, 13; 370(3), 417–426.
- [14] Huang B., Gudi R., Wu P., Harris R. A., Hamilton, J., Popov, K. M., (1998), “Isoenzymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase. DNA-derived amino acid sequences, expression, and regulation”, *J Biol Chem*, 273, 17680–17688.
- [15] Teague W. M., Pettit F. H., Wu T. L., Silberman S. R., Reed L. J., (1982), “Purification and properties of pyruvate dehydrogenase phosphatase from bovine heart and kidney”, *Biochemistry*, 21, 5585–5592.
- [16] Denton R. M., Randle P. J., Martin B. R., (1972) “Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase”, *Biochem J*, 128, 161–163.
- [17] Yan J., Lawson J. E., Reed L. J., (1996), “Role of the regulatory subunit of bovine pyruvate dehydrogenase phosphatase”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 4953-4956.
- [18] Lazo P. A., Sols A., (1980), “Pyruvate dehydrogenase complex of ascites tumour”, *Biochem J.*, 190, 705-710.
- [19] Eboli M. L., Pasquini A., (1994), “Transformation linked decrease of pyruvate dehydrogenase complex in human epidermis”, *Cancer Lett.*, 85, 239–243.
- [20] Kim J. -W., Tchernyshyov I., Semenza G. L., Dang C. V., (2006), “HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia”, *Cell Metabol.*, 3, 177-185.
- [21] Papandreou I., Cairns R. A., Fontana L., Lim A. L., Denko N. C., (2006) “HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption”, *Cell Metabol.*, 3, 187-197.
- [22] Maes C., Carmeliet G., Schipani E., (2012), “Hypoxia-driven pathways in bone development, regeneration and disease”, *Nature Reviews Rheumatology* 8, 358-366.
- [23] Chan D. A., Sutphin P. D., Yen S. E., Giaccia A. J., (2005), “Coordinate regulation of the oxygen-dependent degradation domains of hypoxia-inducible factor 1 alpha”, *Mol Cell Biol.*, 25(15), 6415-26.
- [24] Madhok B. M., Yeluri S., Perry S. L., Hughes T. A., Jayne D. G., (2010), “Dichloroacetate induces apoptosis and cell-cycle arrest in colorectal cancer cells” *British Journal of Cancer*, 102, 1746–1752.
- [25] Michelakis E. D., Sutendra G., Dromparis P., Webster L., Haromy A., Niven E., Maguire C., Gammer T. -L., Mackey J. R., Fulton D., Abdulkarim B., McMurtry M. S., Petruk K. C., (2010), “Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate”, *Sci Transl Med*, 2:31ra34.

- [26] Lefort N., Brown A., Lloyd V., Ouellette R., Touaibia M., Culf A. S., Cuperlovic-Culf M., (2014), "1H NMR metabolomics analysis of the effect of dichloroacetate and allopurinol on breast cancer. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 93, 77–85.
- [27] Rae C., Maitland A., Bubb W. A., Hunt N. H., (2000), "Dichloroacetate (DCA) reduces brain lactate but increases brain glutamine in experimental cerebral malaria: a 1H-NMR study", *Redox Report*, 5, 141-143.
- [28] Blackshear P. J., Holloway P. A. H., Albert K., George M. M., (1974), "The metabolic effects of sodium dichloroacetate in the starved rat", *Biochem J*, 142, 279–286.
- [29] DeStefano, N., Matthews P. M., Ford B., Genge A., Karpati G., Arnold D. L., (1995), "Short-term dichloroacetate treatment improves indices of cerebral metabolism in patients with mitochondrial disorders", *Neurology*, 45, 1193-8.
- [30] Miller A. L., Hatch J. P., Prihoda T. J., (1990), "Dichloroacetate increases glucose use and decreases lactate in developing rat brain. *Metabolic Brain Disease*", 5, 195-204.
- [31] Kailavasan M., Rehman I., Reynolds S., Bucur A., Tozer G., Paley M., (2014), "NMR-based evaluation of the metabolic profile and response to dichloroacetate of human prostate cancer cells", *NMR in Biomedicine*, 27, 610–616.
- [32] Robey I. F., Martin N. K., (2011), "Bicarbonate and dichloroacetate: Evaluating pH altering therapies in a mouse model for metastatic breast cancer", *BMC Cancer*, 11, 235-245.
- [33] Call J. A., Eckhardt S. G., Camidge D. R., (2008), "Targeted manipulation of apoptosis in cancer treatment", *Lancet Oncol*, 9(10), 1002-1011.
- [34] Warburg O., (1956), "On respiratory impairment in cancer cells", *Science*, 124, 269-270.
- [35] Mankoff D. A., Eary J. F., Link J. M., Muzi M., Rajendran J. G., Spence A. M., Krohn K. A., (2007), "Tumor-specific positron emission tomography imaging in patients: (18F) fluorodeoxyglucose and beyond", *Clin Cancer Res*, 13(12), 3460-3469.
- [36] Matoba S., Kang J. G., Patino W. D., Wragg A., Boehm M., Gavrilova O., Hurley P. J., Bunz F., Hwang P. M., (2006), "p53 regulates mitochondrial respiration", *Science*, 312, 1650-1653.
- [37] Hamanaka R. B., Chandel N. S., (2012), "Targeting glucose metabolism for cancer therapy", *J Exp Med*, 209, 211-5.
- [38] Fabiana Schwartzberg-Bar Y., Armoni M., Karnieli E., (2004), "The Tumor Suppressor p53 Down-Regulates Glucose Transporters GLUT1 and GLUT4 Gene Expression" *Cancer Research*, 64, 2627–2633.

- [39] Tijerina A. J., (2004), "The biochemical basis of metabolism in cancer cachexia" *Dimens Crit Care Nurs*, 23(6), 237-43.
- [40] Yin C., Qie S., Sang N., (2012), "Carbon source metabolism and its regulation in cancer cells", *Crit Rev in Eukaryot Gene Expr*, 22(1), 17-35.
- [41] DeBerardinis R. J., Mancuso A., Daikhin E., Nissim I., Yudkoff M., Wehrli S., Thompson C. B., (2007), "Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis", *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(49), 19345-50.
- [42] Aledo J. C., Segura J. A., Medina M. A., Alonso F. J., Nunez de Castro I., Marquez J., (1994), "Phosphate-activated glutaminase expression during tumor development", *FEBS letters*, 341(1), 39-42.
- [43] Lobo, C., Ruiz-Bellido, M. A., Aledo, J. C., Marquez, J., Nunez De Castro, I., Alonso, F. J., (2000), "Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumourigenicity of tumour cells", *Biochem J*, 348, 257-61.
- [44] Tamada M., Suematsu M., Saya H., (2012), "Pyruvate Kinase M2: Multiple Faces for Conferring Benefits on Cancer Cells", *Clin Cancer Res*, 18, 5554-556.
- [45] Christofk H. R., Vander Heiden M. G., Harris M. H., Ramanathan A., Gerszten R. E., Wei R., Cantley L. C., (2008), "The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth", *Nature*, 452, 230-233.
- [46] Gatenby R. A., Gillies R. J., (2004), "Why do cancers have high aerobic glycolysis?", *Nat Rev Cancer*, 4(11), 891-899.
- [47] Gillies R. J., Robey I., Gatenby R. A., (2008), "Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers", *J Nucl Med*, 49, 24-42.
- [48] Földi M., Stickeler E., Bau L., Kretz O., Watermann D., Gitsch G., Kayser G., Zur Hausen A., Coy J. F., (2007), "Transketolase protein TKTL1 overexpression: A potential biomarker and therapeutic target in breast cancer", *Oncol Rep*, 17(4), 841-845.
- [49] Wang H. Q., Altomare D. A., Skele K. L., Poulikakos P. I., Kuhajda F. P., Di Cristofano A., Testa J. R., (2005), "Positive feedback regulation between AKT 55 activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells", *Oncogene*, 24(22), 3574-3582.
- [50] Kroemer G., Pouyssegur J., (2008), "Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel", *Cancer Cell*, 13, 472-482.
- [51] Glunde K., Bhujwala Z. M., (2007), "Choline kinase alpha in cancer prognosis and treatment", *Lancet Oncol*, 8(10), 855-857.



- [52] Tisdale M. J., (2008), "Catabolic mediators of cancer cachexia", *Curr Opin Support Palliat Care*, 2(4), 256-61.
- [53] Tisdale M. J., (1999) "Wasting in cancer", *Journal Nutr.*, 129, 243-246.
- [54] Moschetta A., (2011), "Nuclear receptor LXR as a novel therapeutic antitumoral target in glioblastoma", *Cancer Discov.*, 1(5), 381-382.
- [55] Jemal A., Bray F., Center M. M., Ferlay J., Ward E., Forman D., (2011), "Global cancer statistics", *CA Cancer J Clin*, 61(2), 69-90.
- [56] Shao T., Klein P., Grossbard M. L., (2012), "Vitamin D and breast cancer", *Oncologist*, 17(1), 36-45.
- [57] Singletary S. E., Connolly J. L., (2006), "Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual", *CA Cancer J Clin*, 56(1), 37-47.
- [58] Bland K. I., Menck H. R., Scott-Conner C. E., Morrow M., Winchester D. J., Winchester D. P., (1998), "The National Cancer Data Base 10-year survey of breast carcinoma treatment at hospitals in the United States", *Cancer*, 83(6), 1262-1273.
- [59] Veronesi U., Boyle P., Goldhirsch A., Orecchia R., Viale G., (2005), "Breast cancer", *Lancet.*, 365, 1727-1741.
- [60] Bland K. I., Menck H. R., Scott-Conner C. E., Morrow M., Winchester D. J., Winchester D. P., (1998), "The National Cancer Data Base 10-year survey of breast carcinoma treatment at hospitals in the United States", *Cancer*, 83(6), 1262-1273.
- [61] Soule H. D., Vazquez J., Long A., Albert S., Brennan M., (1973), "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma", *J Natl Cancer Inst*, 51(5), 1409-1416.
- [62] Reding H. K., Blass J. P., Gibson G. E., (1982), "Studies on the pyruvate dehydrogenase complex in brain with the arylamine acetyltransferase-coupled assay", *Journal of Neurochemistry*, 38, 1627-1636.
- [63] Holliday D. L., Speirs V., (2011) "Choosing the right cell line for breast cancer research" *Breast Cancer Res.*, 13(4), 215-222.
- [64] Frezza C., Cipolat S., Scorrano L., (2007), "Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts", 2, 287-295.
- [65] Smith P. K., Khron R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., (1985), "Measurement of protein using bicinchoninic acid", *Anal Biochem*, 150, 76-85.

- [66] Scriba P., Holzer H., (1961), "Gewinnung von  $\alpha$ -Hydroxyethyl-2-thiaminpyrophosphat mit pyruvatoxydase aus Schweineherzmuskel" *Biochem. Z.*, 334, 473-486.
- [67] Cooper R. H., Randle P. J., Denton R. M., (1974), "Regulation of heart muscle pyruvate dehydrogenase kinase", *Biochem. J.*, 143, 625-641.
- [68] Korkes S., Del Campillo A., Gunsalus I. C., Ochoa S., (1951), "Enzymatic synthesis of citric acid. IV. Pyruvate as acetyl donor", *J. Biol. Chem.*, 193, 721-735.
- [69] Szutowicz A., Eysiak W., (1980), "Regional and subcellular distribution of ATP-citrate lyase and other enzymes of acetyl-CoA metabolism in rat brain", *J. Neurochem.*, 35, 775-785.
- [70] Pezzato E., Battaglia V., Brunati A. M., Agostinelli E., Toninello A., (2009), "Ca<sup>2+</sup>-independent effects of spermine on pyruvate dehydrogenase complex activity in energized rat liver mitochondria incubated in the absence of exogenous Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>", *Amino Acids*, 36, 449-456.
- [71] Wigfield S. M., Winter S. C., Giatromanolaki A., Taylor J., Koukourakis M. L., Harris A. L., (2008), "PDK-1 regulates lactate production in hypoxia and is associated with poor prognosis in head and neck squamous cancer", *British Journal of Cancer* 98, 1975-1984.
- [72] Chou W. C., Lei W. C., Ko B. S., Hou H. A., Chen C. Y., Tang J. L., Yao M., Tsay W., Wu S. J., Huang S. Y., Hsu S. C., Chen Y. C., Chang Y. C., Kuo K. T., Lee F. Y., Liu M. C., Liu C. W., Tseng M. H., Huang C. F., Tien H. F., (2011), "The prognostic impact and stability of Isocitrate dehydrogenase 2 mutation in adult patients with acute myeloid leukemia", *Leukemia*, 25(2), 246-53.
- [73] Talaiezhadeh A., Shahriari A., Tabandeh M. R., Fathizadeh P., Mansouri S., (2015), "Kinetic characterization of lactate dehydrogenase in normal and malignant human breast tissues", *Cancer Cell Int.*, 15: 19-28.
- [74] Bardella C., Pollard P. J., Tomlinson I., (2011), "SDH mutations in cancer," *Biochimica et Biophysica Acta*, 1807, 1432-1443.
- [75] Roh J. L., Park J. Y., Kim E. H., Jang H. J., Kwon M., (2016), "Activation of mitochondrial oxidation by PDK2 inhibition reverses cisplatin resistance in head and neck cancer", *Cancer Lett.*, 371, 20-29.
- [76] Alkarakooly Z., Kilaparty S. P., Al-Anbaky Q. A., Khan M. S., Ali N., (2014), "Dichloroacetic Acid (DCA)-Induced Cytotoxicity in Human Breast Cancer Cells Accompanies Changes in Mitochondrial Membrane Permeability and Production of Reactive Oxygen Species", *Journal of Cancer Therapy*, 5, 1234-1248.
- [77] Washington J. T., Quintyne N. J., (2012), "Dichloroacetate induces different rates of cell death in cancer and noncancer cell lines in vitro", *Tumori*, 98, 142-51.

- [78] Haugrud A. B., Zhuang Y., Coppock J. D., Miskimins W. K., (2014), "Dichloroacetate enhances apoptotic cell death via oxidative damage and attenuates lactate production in metformin-treated breast cancer cells", *Breast Cancer Res Treat*, 7, 539-50.
- [79] Sanchez W. Y., McGee S. L., Connor T., Mottram B., Wilkinson A., Whitehead J. P., Vuckovic S., Catley L., (2013), "Dichloroacetate inhibits aerobic glycolysis in multiple myeloma cells and increases sensitivity to bortezomib", *Br J Cancer*, 108, 1624-33.
- [80] Populo H., Caldas R., Lopes J. M., Pardal J., Maximo V., Soares P., (2015), "Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase supports dichloroacetate as a candidate for cutaneous melanoma therapy", *Expert Opin Ther Targets*, 19, 733-45.
- [81] Voltan R., Rimondi E., Melloni E., Gilli P., Bertolasi V., Casciano F., Rigolin G. M., Zauli G., Secchiero P., (2016), "Metformin combined with sodium dichloroacetate promotes B leukemic cell death by suppressing anti-apoptotic protein Mcl-1", *Oncotarget*, 3, 18965-77.
- [82] Cao W., Yacoub S., Shiveric K. T., Namiki K., Sakai Y., Porvasnik S., Urbanek C., Rosser C. J., (2008), "Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation", *Prostate*, 68, 1223-1231.
- [83] Wong J. Y., Huggins G. S., Debidia M., Munshi N. C., De Vivo I., (2008), "Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells", *Gynecol Oncol* 109, 394-402.
- [84] Garon E. B., Christofk H. R., Hosmer W., Britten C. D., Bahng A., Crabtree M. J., Hong C. S., Kamranpour N., Pitts S., Kabbinavar F., Patel C., von Euw W., Black A., Michelakis E. D., Dubinett S. M., Slamon D. J., (2014), "Dichloroacetate should be considered with platinum-based chemotherapy in hypoxic tumors rather than as a single agent in advanced non-small cell lung cancer", *J Cancer Res Clin Oncol.*, 140, 443-52.
- [85] Shen H., Decollogne S., Dilda P. J., Hau E., Chung S. A., Luk P. P., Hogg P. J., McDonald K. L., (2015), "Dual-targeting of aberrant glucose metabolism in glioblastoma", *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 34-45.
- [86] Delaney L. M., Ho N., Morrison J., Fraisas N. R., Mosser D. D., Coomber B. L., (2015), "Dichloroacetate affects proliferation but not survival of human colorectal cancer cells", *Apoptosis*, 20, 63-74.
- [87] Sun R. C., Fadia M., Dahlstrom J. E., Parish C. R., Board P. G., Blackburn A. C., (2010), "Reversal of the glycolytic phenotype by dichloroacetate inhibits metastatic breast cancer cell growth in vitro and in vivo", *Breast Cancer Res Treat*, 120, 253-260.

- [88] Stander X. X., Stander B. A., Joubert A. M., (2011), “In vitro effects of an in silico-modelled 17 $\beta$ -estradiol derivative in combination with dichloroacetic acid on MCF-7 and MCF-12A cells”, *Cell Prolif.*, 44(6), 567-81.
- [89] Michelakis E. D., Webster L., Mackey J. R., (2008), “Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer”, *Br J Cancer*, 99:989–94.
- [90] Icard P., Poulain L., Lincet H., (2012), “Understanding the central role of citrate in the metabolism of cancer cells”, *Biochim Biophys Acta*, 1825, 111–6.
- [91] Kinnaird A., Dromparis P., Saleme B., Gurtu V., Watson K., Paulin R., Zervopoulos S., Stenson T., Sutendra G., Pink D. B., Carmine-Simmen K., Moore R., Lewis J. D., Michelakis E. D., (2016), “Metabolic modulation of clear-cell renal cell carcinoma with dichloroacetate, an inhibitor of pyruvate dehydrogenase kinase”, *Eur Urol*, 69, 734–44.
- [92] Stacpoole P. W., Harwood H. J., Varnado C. E., (1983), “Regulation of rat liver hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase by a new class of noncompetitive inhibitors”, *J Clin Invest*, 72, 1575–85.
- [93] Emmett M., (2014), “Acetaminophen toxicity and 5-oxoproline (pyroglutamic acid): a tale of two cycles, one an ATP-depleting futile cycle and the other a useful cycle”, *Clin J Am Soc Nephrol*, 9, 191–200.
- [94] Traverso N., Ricciarelli R., Nitti M., Marengo B., Furfaro A. L., Pronzato M. A., Marinari U. M., Domenicotti C., (2013), “Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance”, *Oxid Med Cell Longev*, 2013:972913-23.
- [95] Fong M. Y., McDunn J., Kakar S. S., (2011), “Identification of metabolites in the normal ovary and their transformation in primary and metastatic ovarian cancer”, *PLoS One*, e19963.
- [96] Long P. M., Moffett J. R., Namboodiri A. M., Viapiano M. S., Lawler S. E., Jaworski D. M., (2013), “N-acetylaspartate (NAA) and N-acetylaspartylglutamate (NAAG) promote growth and inhibit differentiation of glioma stem-like cells”, *J Biol Chem*, 288, 26188–200.
- [97] Zand B., Previs R. A., Zacharias N. M., Rupaimoole R., Mitamura T., Nagaraja A. S., Guindani M., Dalton H. J., Yang L., Baddour J., Achreja A., Hu W., Pecot C. V., Ivan C., Wu S. Y., McCullough C. R., Gharpure K. M., Shoshan E., Pradeep S., Mangala L. S., Rodriguez-Aguayo C., Wang Y., Nick A. M., Davies M. A., Armaiz-Pena G., Liu J., Lutgendorf S. K., Baggerly K. A., Eli M. B., Lopez-Berestein G., Nagrath D., Bhattacharya P. K., Sood A. K., (2016), “Role of increased N-acetylaspartate levels in cancer”, *JNCI J Natl Cancer Inst*, 108, djv426.
- [98] Pessentheiner A. R., Pelzmann H. J., Walenta E., Schweiger M., Groschner L. N., Graier W. F., Kolb D., Uno K., Miyazaki T., Nitta A., Rieder D., Prokesch A., Bogner-Strauss J. G., (2013), “NAT8L (N-acetyltransferase 8-Like) accelerates

lipid turnover and increases energy expenditure in brown adipocytes”, J Biol Chem, 288, 36040–51.

- [99] Paumen M. B., Ishida Y., Muramatsu M., Yamamoto M., Honjo T., (1997), “Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate induced apoptosis”, J Biol Chem, 272, 3324–9.
- [100] Sullivan L. B., Gui D. Y., Hosios A. M., Bush L. N., Freinkman E., Vander Heiden M. G., (2015), “Supporting aspartate biosynthesis is an essential function of respiration in proliferating cells”, Cell, 162:552–63.
- [101] Wise D. R., Ward P. S., Shay J. E., Cross J. R., Gruber J. J., Sachdeva U. M., Platt J. M., DeMatteo R. G., Simon M. C., Thompson C. B., (2011), “Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase dependent carboxylation of alpha-ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability”, Proc Natl Acad Sci USA, 108, 19611–6.
- [102] Metallo C. M., Gameiro P. A., Bell E. L., Mattaini K. R., Yang J., Hiller K., Jewell C. M., Johnson Z. R., Irvine D. J., Guarente L., Kelleher J. K., Vander Heiden M. G., (2012), “Iliopoulos O, Stephanopoulos G. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia”, Nature 2012, 481:380–4.

## ÖZGEÇMİŞ

Şaban KALAY 1980 yılında Bafra'da doğdu. 2002 yılında başladığı Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Bölümü, yüksek lisans programını 2006 yılında başarıyla tamamlayarak aynı yıl doktora eğitimine Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında başladı. 2010 yılından bu yana Yeditepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümünde Uzman olarak çalışmaktadır.



## EKLER

### Ek A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar ve Bildiriler

Kalay Ş., Türkan A., Zergeroğlu A. D., Üstek D., Azaklı H., (2010), “SPC111 ve SPC212 Malignant Mezotelioma Hücrelerinde PDC,  $\alpha$ -KGDC, SDH ve IDH Aktivitelerinin İncelenmesi.” Ulusal Biyokimya Kongresi, Cilt: 35, Eskişehir/Türkiye, 27-30 Ekim (Poster Bildiri, Ödül Kazanılmıştır).

Türkan A., Kalay Ş., Zergeroğlu A. D., Üstek D., (2010), “Kanser Enerji Metabolizması: Meme Kanseri Hücrelerinde PDC,  $\alpha$ -KGDC, IDH ve SDH Aktivitelerinin İncelenmesi.” Ulusal Biyokimya Kongresi, Cilt: 35, Eskişehir/Türkiye, 27-30 Ekim (Sözlü Bildiri).

Kalay S, Doğan A., Türkan A, Zergeroğlu A. D., (2017) “Dichloroacetate Exerts Anti-cancer Activity on Human Renal Cell Carcinoma Cells” Turkish Journal of Biochemistry, 43.

### Ek B: Tez Kapsamı Haricinde Yapılan Yayınlar ve Bildiriler

Culha M., Keseroğlu K., Sonay A. Y., Keskin S., Kalay Ş., (2011), “Winning against contact-line pinning”, VII Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, İstanbul/Türkiye, 29 Haziran (Sözlü Bildiri).

Altunbek M., Kalay Ş., Çulha M., (2011), “Evaluation of Current Viability Assays for Toxicity Assessment of Gold and Silver Nanoparticles”, VII Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı. İstanbul/Türkiye, 27 Haziran-1 Temmuz (Poster Bildiri).

Türkan A., Özdemir I., Erdoğan D., Kalay Ş., (2011) “Cloning, expression and characterisation of a lipase from thermophilic bacterium *Geobacillus kaustophilus* and its immobilization studies”, European Biotechnology Congress, Abstract Book, p.83. İstanbul/Türkiye, 28 Eylül-1 Ekim (Poster Bildiri).

Kalay Ş., Blanched C., Sayın İ., Culha M., (2012), “Positively Charged Peptide Modified Gold Nanoparticles form 3D Networks in Suspension”, VIII Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, Ankara/Türkiye, 25-29 Haziran (Poster Bildiri).

Kalay Ş., Yılmaz Z., Çulha M., (2013), “Development of Novel Boron Nitride Nanotube Synthesis Method”, Porous and Powder Materials Symposium and Exhibition, İzmir/Türkiye, 3-6 Eylül, (Proceeding Book), 164-167.

Kalay Ş., Yılmaz Z., Çulha M., (2013), “Synthesis of Boron Nitride Using Boron Oxide”, IX Nanobilim ve Nanoteknoloji Konferansı, Erzurum/Türkiye, 24-28 Haziran.

Kalay Ş., Yılmaz Z., Culha M., (2013), “Direct Synthesis of Boron Nitride Nanotubes from Colemanite”, Beilstein J. Nanotechnol., 4, 843-851.

Kalay Ş., Blanchet C., Culha M., (2014), “Linear assembly and 3D networks of peptide modified gold nanoparticles”, Turk. J. Chem., 686-700.

Kalay Ş., Yılmaz Z., Şen Ö., Emanet M., Kazanç E., (2014), “Boron Nitride Nanotube Synthesis Methods and Their Mechanisms” Boron Nitride Nanotubes Workshop, Nanotr10 Nanotechnology Conference, İstanbul/Türkiye, 17-21 Haziran (Sözlü Bildiri).

Yılmaz Z., Kalay Ş., Şen Ö., Emanet M., Kazanç E., (2014) “Carbohydrate Modification of Boron Nitride Nanotubes ” Boron Nitride Nanotubes Workshop, Nanotr10 Nanotechnology Conference, İstanbul/Türkiye, 17-21 Haziran (Sözlü Bildiri).

Şen Ö., Yılmaz Z., Kalay Ş., Emanet M., Kazanç E., (2014), “The Cellular Uptake of Boron Nitride Nanotubes ” Boron Nitride Nanotubes Workshop, Nanotr10 Nanotechnology Conference, İstanbul/Türkiye, 17-21 Haziran (Sözlü Bildiri).

Emanet M., Yılmaz Z., Kalay Ş., Şen Ö., Kazanç E., (2014), “Cytotoxicity and Genotoxicity of Boron Nitride Nanotubes” Boron Nitride Nanotubes Workshop, Nanotr10 Nanotechnology Conference, İstanbul/Türkiye, 17-21 Haziran (Sözlü Bildiri).

Kalay Ş., Yılmaz Z., Sen O., Emanet M., Kazanç E., Culha M., (2015), “Synthesis of boron nitride nanotubes and their applications”, Review Article, Beilstein J. Nanotechnol. 6, 84–102.

Demirci S., Kaya M. S., Doğan A., Kalay Ş., Altın N. Ö., Yarat A., Akyüz S. H., Şahin F., (2015)“Antibacterial and cytotoxic properties of boron-containing dental composite” Turkish Journal of Biology 39, 417-426.

Kalay Ş., Stetsyshyn Y., Lobaz V., Harhay K., Ohar H., Çulha M., (2016), “Water-dispersed thermo-responsive boron nitride nanotubes: synthesis and properties” Nanotechnology, 22, 1-8.

Yılmaz Z., Şahin F., Çulha M., Yılmaz B., Hasöksüz H., Kaya G., Demir İ., Kalaycı S., Kalay Ş., Yılmaz Ş., (2016), “Biyosidal Ürün Analizi için Örnek bir Proses Akış Sistemi”, Biyosidal Kongresi, Antalya/Türkiye, 22-25 Kasım (Poster Bildiri).