



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARKLI KANSER HÜCRE HATLARINDA
GLUKOZ, GLUTAMİN VE KOLESTEROL
KISITLAMALARINA DUYARLILIĞIN
ARAŞTIRILMASI**

Burcu YÜCEL

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

TRABZON-2015



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARKLI KANSER HÜCRE HATLARINDA
GLUKOZ, GLUTAMİN VE KOLESTEROL
KISITLAMALARINA DUYARLILIĞIN
ARAŞTIRILMASI**

Burcu YÜCEL

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

TRABZON-2015

ONAY

Bu Tez Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Ersan KALAY

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

.....

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Burcu YÜCEL' in hazırladığı “FARKLI KANSER HÜCRE HATLARINDA GLUKOZ, GLUTAMİN VE KOLESTEROL KISITLAMALARINA DUYARLILIĞIN ARAŞTIRILMASI” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU

Prof. Dr. Ersan KALAY

Prof. Dr. Ahmet ALVER

Prof. Dr. Ali İrfan GÜZEL

Prof. Dr. Nurten KARA

Tarih:29/09/2015

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun .../.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

.../.../...

Burcu YÜCEL

İthaf

Doktora tezimi, her zaman yanımda olan ve aldığım kararlarda beni maddi manevi destekleyen çok değerli aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının oluşturulmasına ve tamamlanmasına çok değerli fikirleriyle destek veren sayın hocam Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ersan KALAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam süresince engin bilgi ve tecrübelerinden sürekli istifade ettiğim, desteğini esirgemeyen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Figen CELEP EYÜPOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Sayın Prof. Dr. David SABATINI'ye Whitehead Enstitüsündeki laboratuvarında tezimin deneysel çalışmalarını yapmama olanak sağladığı için teşekkür ederim. Sabatini Laboratuvarında deneysel çalışmalarına danışmanlık veren ve akademik gelişimime katkı sağlayan Dr. Kıvanç BİRSOY'a teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından ve desteklerinden dolayı Sabatini Lab üyelerine teşekkür ederim.

Tez yazım aşamasındaki desteklerinden dolayı Yrd. Doç. Dr. Bayram TORAMAN ve Yrd. Doç. Dr. Tuba DİNÇER'e teşekkür ederim. Biyoinformatik analizlerde ki yardımlarından dolayı Serbülent ÜNSAL'a çok teşekkür ederim. Çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Ceren SÜMER, Arş. Gör. Gülden YORGANCIOĞLU, Arş. Gör. Ceren SARI, Arş. Gör. Asiye B. BOZ ve Y. Lisans öğrencisi İdris ER'e, sevgili arkadaşlarım Adem YILDIRIM ve Pelin KÜÇÜK'e katkılarından dolayı teşekkür ederim. Ayrıca, Fatmagül YENİSEY ve Tülay KÖSEAHMET'e desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Tez yazım aşamasında ki desteklerinden dolayı Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından sevgili arkadaşım Gülşen ULUÇAM'a teşekkür ederim.

Doktora eğitimimdeki yadsınamaz katkılarından dolayı eski danışmanım Prof. Dr. Fahri UÇAR'a, bölümümüz emekli öğretim üyesi Prof. Dr. Ahmet KARAGÜZEL'e ve Hematoloji Bilim Dalından Prof. Dr. Mehmet SÖNMEZ'e teşekkür ederim.

Maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen annem ve babam Ayşe-Mehmet YÜCEL'e ve kardeşim Burak YÜCEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamı destekleyen YÖK Doktora Araştırma Burs programına ve KTÜ Rektörlüğüne teşekkür ederim.

Arş. Gör. Burcu YÜCEL

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
İTHAF	
TEŞEKKÜR	v
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiii
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Kanser	5
4.2. Kanser Genetiği	5
4.2.1. Onkogenler	6
4.2.1.1. MYC Onkogeni	6
4.3. Glukoz Metabolizması	7
4.3.1. Glukoz Taşıyıcılar	7
4.3.2. Glikoliz	8
4.3.3. Sitrik Asit Döngüsü	8
4.3.4. Oksidatif Fosforilasyon	9
4.3.4.1. Elektron Taşıma Sistemi	10
4.4. Kanser Metabolizması	11
4.4.1. Aerobik Glikoliz ‘Warburg Etkisi’	11
4.5. AMPK (Adenozin Monofosfat Aktif Protein Kinaz) Sinyal Yolağı	12
4.6. Biguanidler	13
4.7. Glutamin Metabolizması	14
4.7.1. Glutamin Metabolizmasının Tümör Hücre Gelişimindeki Rolü	15
4.7.2. Glutamin Sentetaz	17
4.7.3. Glutaminaz (GLS) İnhibisyonu ve BPTES	18

4.8. Kolesterol	18
4.8.1. Kolesterol Metabolizması	19
4.8.1.1. Kolesterol Biyosentezi	19
4.8.1.2. Kolesterolün Reseptör Aracılı Hücre İçerisine Alınması	19
4.8.1.3. Kolesterol Metabolizmasının Regülasyonu	22
4.8.2. Kolesterol ve Kanser	23
4.9. Nutrostat	24
5. GEREÇ ve YÖNTEM	25
5.1. Gereç	25
5.1.1. Kimyasallar	25
5.1.2. Kitler	26
5.1.3. Cihazlar	26
5.1.4. Sarf Malzemeleri	27
5.1.5. Solüsyonlar	27
5.1.5.1. Genomik DNA İzolasyonu Solüsyonları	27
5.1.5.2. Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları	28
5.1.5.3. Western Blot Solüsyonları	29
5.2. Yöntem	30
5.2.1. Whitehead Enstitüsü Sabatini Laboratuvarında Yapılan Deneyler	30
5.2.1.1. Hücre Kültürü	30
5.2.1.2. Hücre Sayımı	30
5.2.1.3. Hücre Canlılık Deneyi: ATP seviyesinin ölçülmesi	31
5.2.1.4. Nutrostat Kurulumu	32
5.2.1.5. Barkodlu Hücrelerin Çoğaltılması	33
5.2.1.6. Kültürlerdeki Barkodlu Hücrelerin Çoğalma Oranlarının Tespit Edilmesi	35
5.2.1.7. Western Blot	36
5.2.1.8. Real-Time PCR	39
5.2.1.9. Klonlama	42
5.2.1.10. MiniPrep Kit ile Plazmid İzolasyonu	45
5.2.1.11. Büyük Hacimli Bakteri Süspansiyonlarından Plazmid İzolasyonu	46
5.2.1.12. Transfeksiyon	47
5.2.2. KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yapılan Deneyler	48

5.2.2.1. <i>In Silico</i> Analizler	48
5.2.3. İstatistik Analizler	50
6. BULGULAR	51
6.1. Kanser Hücrelerinin Besin Duyarlılıkları	51
6.1.1. Kanser Hücrelerinin Glukoz Besin Duyarlılığı	53
6.1.1.1. Düşük Glukoz ve Düşük Glutaminli Ortamda Hücre Çoğalması	53
6.1.2. Kanser Hücrelerinin Glutamin Besin Duyarlılığı	53
6.1.2.1. Hücrelerin Glutamin Duyarlılığı ile İlişkili Olabilecek Gen Ekspresyonları	53
6.1.2.2. Glutamin Bağımlılığının <i>MYC</i> Onkogeni ile İlişkisi	55
6.1.2.3. Glutamin Metabolizmasında Rol Alan Genlerin Ekspresyonun Belirlenmesi	56
6.1.2.4. Glutamin Sentetaz İnhibisyonu	57
6.1.2.5. Glutaminaz Enziminin BPTES ile İnhibisyonu	57
6.1.3. Kanser Hücrelerinin Kolesterol Açlığına Duyarlılığı	59
6.1.3.1. Kolesterol Biyosentezinde Rol Alan Genlerin Ekspresyon Seviyeleri	59
6.1.3.2. Kolesterol Biyosentezi Regülasyonunun Kontrolü	61
6.1.3.3. Kolesterol Yokluğuna Duyarlı Hücelere Lanosterol İlavesi	62
6.1.3.4. Kolesterol Biyosentezi Genleri Overekspresyonları	63
6.1.4. Hücrelerin Besin Duyarlılığında Genetik Varyasyonların Rolü	66
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	81
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	92
9. KAYNAKLAR	94
10. EKLER	106
10.1. Ek 1 İzin Belgesi	106
11. ÖZGEÇMİŞ	107

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Çalışmada kullanılan kimyasallar	25
Tablo 2. Çalışmada kullanılan ticari kitler	26
Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar	26
Tablo 4. Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri	27
Tablo 5. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının listesi	31
Tablo 6. Düşük glukozlu RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması	33
Tablo 7. Düşük glutaminli RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması	34
Tablo 8. qRT-PCR deneylerinde kullanılan primerlerin listesi	41
Tablo 9. Klonlama çalışmalarında kullanılan primerlerin listesi	42
Tablo 10. Klonlama çalışmalarında kullanılan vektör ve kesim enzimlerinin listesi	44
Tablo 11. Glutamin duyarlılığı ile pozitif korele bulunan genler	54
Tablo 12. Glutamin duyarlılığı ile negatif korele bulunan genler	54
Tablo 13. Kolesterol yokluğuna duyarlı hücrelerde genetik varyasyonların dağılımı	68
Tablo 14. LRP gen ailesine ait genlerde bulunan varyasyonların tüm hücre hatlarında dağılımı	70
Tablo 15. Hücrelerde LRP genlerinde görülen genetik varyasyonlar	70
Tablo 16. LRP genlerinde görülen genetik değişimlerin protein üzerindeki yerleşimi	71
Tablo 17. LRP genlerinde görülen varyasyonların protein fonksiyonuna tahmini etkileri	72
Tablo 18. Glukoz kısıtlamasına duyarlı ve dirençli hücrelerde analizler sonucu belirlenen genetik değişimlerin dağılımı	74
Tablo 19. Glukoz kısıtlaması deneylerinde kullanılan hücrelerde tespit edilen genetik varyasyonlar	74
Tablo 20. Glutamin kısıtlamasına duyarlı ve dirençli bulunan hücrelerde analizler sonucu belirlenen genetik değişimlerin dağılımı	75
Tablo 21. Glutamin kısıtlaması deneylerindeki hücrelerde belirlenen genetik varyasyonlar	75
Tablo 22. Glukoz duyarlılığı için bulunan yanlış anlamlı değişimlerin protein fonksiyonuna tahmini etkileri	76

Tablo 23. Glutamin duyarlılığı için bulunan yanlış anlamalı değişimlerin protein fonksiyonuna tahmini etkileri.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. Glikoliz reaksiyonları	9
Şekil 2. Sitrik Asit Döngüsü	10
Şekil 3. Elektron Taşıma Sistemi	10
Şekil 4. Tümör mikroçevresi	11
Şekil 5. Aerobik glikoliz ve oksidatif fosforilasyon	12
Şekil 6. AMPK sinyal yolağı aktivasyonu	13
Şekil 7. Glutamin metabolizması	15
Şekil 8. Kolesterol biyosentezi	20
Şekil 9. Kolesterol metabolizması	21
Şekil 10. Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ailesi	22
Şekil 11. Kolesterol biyosentezinin regülasyonu	23
Şekil 12. Nutrostatın şematik kurulumu	24
Şekil 13. Barkodlu hücre karışım deneyleri	52
Şekil 14. Düşük glukoz ve düşük glutaminli ortamda hücrelerin çoğalması	53
Şekil 15. Glutamin duyarlılığı ile <i>MYC</i> onkogen ekspresyonu arasındaki ilişkinin araştırılması	55
Şekil 16. Glutamin metabolizmasında rol alan genlerin ekspresyon seviyeleri ile korelasyon hesaplanması	56
Şekil 17. MSO' nun glutamin kısıtlamasına dirençli hücrelerde etkisi	57
Şekil 18. BPTES' in hücre hatlarında denenmesi	58
Şekil 19. BPTES' in oksidatif fosforilasyona etkisi	59
Şekil 20. Kolesterol biyosentezinde rol alan genlerin ekspresyon seviyeleri	60
Şekil 21. LDL içeren ve içermeyen ortamda kolesterol metabolizmasında görevli genlerin ekspresyonlarının qRT-PCR analizi	61
Şekil 22. Kolesterol duyarlılığında hücrelere lanosterol ve skualen ilavesinin etkisi	62
Şekil 23. <i>HSD17B7</i> overekspresyonu	63
Şekil 24. <i>SQLE</i> overekspresyonu	64
Şekil 25. <i>SQLE</i> ve <i>DHCR24</i> genlerinin birlikte overeksprese ettirilmesi	65
Şekil 26. <i>CYP51A1</i> overekspresyonu	65

Şekil 27.	<i>LRP1</i> geninde görülen p.I1644V varyasyonunun korunmuşluk oranı	73
Şekil 28.	<i>SORLI</i> geninde görülen p.V320M varyasyonunun korunmuşluk oranı	73

KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

ADP	Adenozin difosfat
AMP	Adenozin monofosfat
AMPK	AMP aktif protein kinaz
ATP	Adenozin trifosfat
BSA	Sığır Serum Albumin
BPTES	Bis-2-(5-fenilasetoamido-1,3,4-tiyadiyazol-2-yl)etil sülfid
CCLC	Kanser hücre hattı ansiklopedisi
c-MYC	Hücrel MYC protoonkogeni
CYP51A1	Lanosterol 14 alfa demetilaz
DHCR7	7 dehidrokolesterol redüktaz
DHCR24	24 dehidrokolesterol redüktaz
ETS	Elektron taşıma sistemi
FDG-PET	Fludeoksi glukoz pozitron emisyon tomografisi
GFAT	Glutamin fruktoz 6 fosfat amidotransferaz
GSH	Glutatyon
GLS	Glutaminaz enzimi
GLUL	Glutamin sentetaz
GLUD	Glutamat dehidrojenaz
GLUT	Glukoz taşıyıcı
¹H	Hidrojen atomu kimyasal simgesi
HSD17B7	17 beta hidroksisteroid dehidrojenaz
HMG CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A
IDOL	Miyozin düzenleyici protein hafif zinciri ilişkili protein
KEGG	Kyoto gen ve genom ansiklopedisi
LIPA	Kolesterol esteraz
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LDLR	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü
LRP	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ailesi
NADH	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NIH	Amerikan Sağlık Enstitüsü
PCSK9	Proprotein konvertaz subtilisin/keksin tip 9

PMXS	pMXs retroviral vektör
SIFT	Scale-invariant feature transform algoritması
SQLE	Skualen epoksidaz
SMART	Basit modüler yapısal araştırma aracı
SP1	Sipesifiti protein 1
SREBP	Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein
TCA	Trikarboksilik asit döngüsü

1. ÖZET

Farklı Kanser Hücre Hatlarında Glukoz, Glutamin ve Kolesterol Kısıtlamalarına Duyarlılığın Araştırılması

Kanser metabolizması son yıllarda yeni anti-kanser tedavilerin geliştirilebilmesi adına önemli bir araştırma konusu olmuştur. Kanser hücrelerinin hızla çoğalan hücreler olmaları besin ihtiyaçlarını artırmaktadır. Glukoz, glutamin ve kolesterol metabolizmaları kanser gelişiminde ve tümör büyümesinde önemli rol oynamaktadır.

Çalışmamızın temelini oluşturan ön veriler, YÖK Doktora araştırma bursu kapsamında 1 yıl süre ile görevlendirildiğim Amerika Birleşik Devletlerinde bulunan Whitehead Enstitüsünde, Dr. Kıvanç BİRİSOY'un danışmanlığında yaptığım çalışmalardan 29 farklı hücre hattının glukoz, glutamin ve kolesterol besin kısıtlamalarına duyarlılıklarının araştırılmasından elde edilmiştir. Bu çalışmalarımız kapsamında hücreler besin kısıtlamalarına gösterdikleri dirence göre duyarlı veya dirençli olarak sınıflandırılmıştır.

Bu tez çalışmasının amacı ise yurt dışında yaptığım çalışmalarla besin duyarlılıkları test edilen kanser hücre hatlarının, besin eksikliğine karşı gösterdikleri direncin moleküler mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlayabilecek genetik varyasyonların *in silico* analizler kullanılarak belirlenmesi ve elde edilen bu verilerin literatür eşliğinde tartışılmasıdır.

Çalışmalarımız sonucunda, *SS18LI* gen mutasyonlarının kanser hücrelerinin glukoz duyarlılığında, *LRPI* gen mutasyonlarının ise kanser hücrelerinin kolesterole olan bağımlılıklarında rolü olabileceğine dair bulgular elde ettik. Glutamin kısıtlaması için duyarlı veya dirençli bulunan hücreler arasında farklı genetik değişimler tespit edilemedi.

LRPI ve *SS18LI* gen mutasyonlarının hücre metabolizmasındaki rolleri ileri çalışmalarla doğrulanmalıdır. Bu nedenle bulgularımız gen mutasyonlarının kanser hücre metabolizmasındaki etkilerini araştırmak adına yapacağımız ileri ki çalışmalara destek olacak niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Kanser hücresi, metabolizma, glukoz, glutamin, kolesterol

2. SUMMARY

Exploiting the Sensitivity of Different Cancer Cell Lines to Glucose, Glutamine and Cholesterol Limitations

Cancer metabolism has become an important research topic to develop new anti-cancer therapies. Cancer cells have an increased nutrient demand, as they are highly proliferative cells. Glucose, glutamine and cholesterol metabolisms are important for cancer progression and tumor growth.

Preliminary data which will be basis of our study were performed under the supervision of Dr. Kİvanç BİRİSOY in the Whitehead Institute, Massachusetts, USA by myself with a grant from the Turkish Council of Higher Education. In these studies metabolic liabilities of cancer cells due to glucose, glutamine and cholesterol limitations using cell mixing experiment were determined. Cell lines were classified as sensitive, moderate and resistant.

In this thesis study, it is aimed to obtain data to shed light on molecular mechanisms that play role in the nutrient sensitivity of cancer cells in our department. For this purpose, publicly available web based data will be used for computational analysis of mutations that our cancer cell lines have. Thus, it is aimed to provide data to our future projects.

Our results showed that *SS18LI* mutations could play a role in the sensitivity of cancer cells to glucose limitation while, *LRPI* mutations could be related to sensitivity to cholesterol depletion. Any related gene mutation was not identified for sensitivity of cell lines to glutamin limitation.

The role of *LRPI* ve *SS18LI* mutations in cancer metabolism should be identified by conducting further experiments. Therefore, our results will lead us for studying the role of mutations in cancer cell metabolim and support us for grant applications.

Key Words: Cancer cell, metabolism, glucose, glutamine and cholesterol

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, normal büyüme ve farklılaşmayı sağlayan mekanizmalardaki kontrolün kaybolması sonucu değişime uğramış bir hücrenin kontrolsüz çoğalması sonucu gelişen bir hastalıktır (1). En sık ölüm nedenleri arasında kanser kalp krizinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (2). Kanserli hücreler sahip oldukları genetik mutasyonlar nedeniyle hücre döngüsü kontrol mekanizmalarına yakalanmazlar ve apoptozdan kurtularak kontrolsüz biçimde çoğalırlar (3). Bu nedenle kanser hücrelerin genetik bir hastalığı olarak da tanımlanır.

Çoğalan hücreler metabolizmalarında önemli problemlerle karşılaşır. Çünkü her bir hücre döngüsü sonunda iki yavru hücre oluşur ve bunun için gereken toplam biyokütle (protein, lipid ve nükleik asit) miktarı iki kattır. Bu durum çoğalma uyarısı alan ve buna yanıt veren hücre için metabolik yük oluşturmaktadır (4). Hücreler artmış biyoenerji ihtiyaçlarını karşılamak için daha fazla besin kullanırlar (5). Elde edilen metabolitler ise biyosentez yollarına yönlendirilirler. Hücre çoğalmasını uyaran sinyaller aynı zamanda hücrenin metabolik aktivitesini yeniden düzenlemesini de sağlar (6).

Ara metabolizma hücredeki temel yapı taşları olan monosakkaritlerin, amino asitlerin, nükleotidlerin ve benzerlerinin büyük moleküllere (makromolekül) dönüştürüldüğü metabolik yollardır. Son yıllarda çoğalan hücrelerde ara metabolizma önemli bir çalışma konusu olmuştur. Yapılan çalışmalarda tümör hücreleri gibi hızla çoğalan hücrelerde glikolizin ve laktat üretiminin, ayrıca lipid ve diğer makromoleküllerin biyosentezinin arttığı gösterilmiştir (5). Tümör hücreleri bu özellikleri ile farklılaşmış ve hücre döngüsünün G₀ fazında bekleyen hücrelere göre farklı bir metabolizmaya sahiptirler.

Kanser hücrelerinde artmış glikoliz ilk olarak Nobel ödüllü Alman araştırmacı Otto Warburg tarafından tanımlanmıştır. Warburg 'aerobik glikoliz' olarak da tanımlanan bu hipotezinde kanser hücrelerinin daha efektif enerji üretiminin olduğu oksidatif fosforilasyon yerine, oksijen varlığında da glikolizi (glikozun laktata yıkılması olayı) tercih ettiğini göstermiştir (7). Ayrıca kanserlerin hücrelerdeki hasarlı mitokondriyal fonksiyon nedeniyle meydana geldiğini öne sürmüştür (8). Her ne kadar bu önerisi

bütün kanserler için doğrulanamasa da kanser hücrelerinin aerobik glikoliz yaptığı tekrar tekrar yapılan çalışmalarla yıllar içerisinde doğrulanmıştır (9).

Kanser hücreleri ile ‘normal’ hücreler arasındaki bu metabolik farklılıklar kanserde yeni yaklaşımların sağlanması açısından daha detaylı araştırılmaya başlanmıştır. Tümör görüntüleme bu metabolik farklılıktan yararlanılmaktadır. Kanser hastalarında hastalığın evrelendirilmesinde kullanılan ¹⁸FDG-PET ve ¹H manyetik rezonans görüntüleme yöntemleri kanser hücrelerinin artmış glukoz alımı ve laktat üretimi esasına dayalıdır (10, 11).

Genetik mutasyonlar sonucu hızlı çalışan glukoz metabolizmasının kanser gelişiminde ve tümör büyümesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (12, 13). Glukoza ek olarak kanser hücreleri tarafından en çok kullanılan ikinci besin glutamindir (14). Glutamin metabolizması da anti-kanser tedaviler için çalışma konusu olmuştur (14).

Kanser hücrelerinin çoğalması için ihtiyaç duyduğu bir diğer önemli besin kolesteroldür (15). Kolesterol özellikle ökaryotik membranlardaki fonksiyonu nedeniyle kanser gelişiminde önemli bir role sahiptir (16). Çoğalan hücrelerde yeni membranların yapılabilmesi, hücre sinyal ileti sisteminin aktif bir şekilde devam edebilmesi endojen kolesterol sentezine ve dışarıdan lipid partiküllerinin alınmasına ihtiyaç vardır (17).

Tez çalışmamızın temelini oluşturan ön veriler, YÖK Doktora araştırma bursu kapsamında 1 yıl süre ile üniversitemiz tarafından görevlendirildiğim Amerika Birleşik Devletleri’ nin Massachusetts Eyaletinde bulunan Whitehead Enstitüsünde, Dr. Kıvanç Birsoy’un danışmanlığında yaptığım çalışmalardan 29 farklı hücrenin glukoz, glutamin ve kolesterol besin kısıtlamalarına duyarlılıklarının araştırılmasından elde edilmiştir. Bu çalışmalarımızın sonucunda hücreler, glukoz, glutamin ve kolesterol besin kısıtlamalarına gösterdikleri dirence göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak sınıflandırıldı.

Bu tez çalışmasının amacı; yurt dışında yaptığım çalışmalar ile besin duyarlılıkları test edilen kanser hücre hatlarının besin eksikliğine karşı gösterdikleri direncin moleküler mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlayabilecek genetik varyasyonların *in silico* analizler kullanılarak belirlenmesi ve elde edilen verilerin literatür eşliğinde tartışılmasını oluşturmaktadır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile karakterize, somatik hücrelerin genetik hastalığıdır (3). Günümüzde kalp krizinden sonra ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır (2). Kanser hücre hastalığı olmasına karşın klinik olarak çoğunlukla tümör yani hücresel bir kitle ya da şişlik olarak görülür (1). Normal hücrelere göre tümör hücreleri sınırsız çoğalma yeteneğine sahiptirler. Ancak, hızlı ve kontrolsüz hücre bölünmesi tek başına kanser gelişiminin artması ile ilişkilendirilememektedir (18). İnvaziv olmayan hücrelerin oluşturduğu tümörler **benign** (iyi huylu) olarak adlandırılırlar ve mevcut kitlenin kaldırılması çoğunlukla tedavi için yeterlidir. **Malign** tümörler ise hücrelerin kendilerini çevreleyen dokuya geçip invaze olup başka dokularda da metastaz olarak adlandırılan tümörleri oluşturması olarak adlandırılırlar (19).

Tek bir hücre tümör oluşturabilmek için çeşitli aşamalardan geçer (3). Somatik mutasyonlar kanser gelişimi olarak bilinen karsinogenezde en önemli faktörlerden biridir (18). DNA mutasyonlarına yol açtığı bilinen çevresel ajanlar karsinojenler olarak adlandırılırlar ve iki sınıfa ayrılırlar; (1) Kimyasal Karsinojenler nükleotid dizisinde değişikliklere neden olurlar, (2) Radyasyon örneğin X-ray gibi ışınlar kromozom kırıklarına ve translokasyonlara neden olurken, UV ışınları DNA' da timin dimerlerinin oluşmasına neden olur (1, 20).

4.2. Kanser Genetiği

Kanser, protoonkogenler, tümör baskılayıcı genler, DNA tamir genleri ve apoptozu düzenleyen genlerdeki defektler sonucu gelişen bir patolojidir. Normal büyüme ve farklılaşmayı destekleyen genler olan protoonkogenler fonksiyon kazanımı mutasyonları ile onkojenik aktivite kazanırlar (21). Tümör baskılayıcı genler normalde hücre bölünmesini baskılayan proteinleri kodlayan genlerdir. Fonksiyon kaybına neden olan mutasyonları ile aktivasyonlarını yitirirler. Her iki sınıftaki genlerde meydana gelen mutasyonlar karsinogenezde hücre çoğalmasını ve yaşamasını arttırarak tümör büyümesini sağlar (22).

4.2.1. Onkogenler

Proto-onkogenler anormal eksprese olarak ya da mutant hale gelerek onkogenik aktivite kazanırlar (23). Onkogenlerin büyük çoğunluğu büyüme faktörlerinden gelen uyarılara bağlı olarak hücre çoğalmasını ve sağ kalımını düzenleyen sinyal ileti yollarının birer üyesi olarak görev yaparlar. Ayrıca tirozin kinaz aktivesi gösteren reseptörleri kodlarlar, protein kinaz aktivasyonuna neden olurlar (20, 24). En bilinen onkogen *MYC*, c-*MYC* transkripsiyon faktörünü kodlayan proto-onkogen olup 8q24'de lokalizedir (25).

4.2.1.1. MYC Onkogeni

MYC, hücrelerin ekstraselüler matrikse bağlanması ya da ortamdaki besin ve büyüme faktörlerinin seviyelerine yanıt gibi pek çok hücrel sinyal ileti yolağının alt basamaklarında bulunmaktadır (26). *MYC* geni kanserlerde sıklıkla mutasyona uğramıştır (27). *MYC*' in tümörögenezdeki rolü transgenik farelerde çeşitli dokularda genin ektopik ekspresyonu sonucu tümör oluşturulmasıyla gösterilmiştir (28). *MYC* ekspresyonunun lenfoid dokularda hiperplazi ve lenfoma oluşturduğu gösterilmiş, neredeyse bütün çalışmalarda benzer şekilde daimi ya da uyarılabilir *MYC* ekspresyonunun deriden karaciğere bütün dokularda neoplastik transformasyona neden olduğu bildirilmiştir (26).

Kanserdeki *MYC* ekspresyonunun, transkripsiyonel yanıt ağını normal endojen *MYC* ekspresyonuna kıyasla farklı bir şekilde uyardığı varsayılmaktadır çünkü normalde ekspresyon feedback mekanizmalarla kontrollü olmaktadır (29). Bu bağlamda kontrolsüz *MYC* ekspresyonu, kanser hücrelerinin büyüme faktörü ya da besin azlığı ile uyarılan hücre ölümüne karşı yatkınlık kazanmasını sağlarken, normal hücrelerin hücre döngüsünün G1 fazında kalmalarını sağlar (30). Ayrıca *MYC* transkripsiyonel programı, *MYC* aktivasyonuna eşlik eden tümör baskılayıcı genlerin mutasyonlarına bağlı olarak da değişmektedir (29).

Memeli hücrelerinde büyüme faktörü reseptör sinyal sistemleri yeterli besinlerin varlığında bir takım genlerin ekspresyonunu uyarabilir (31). Bu genlerin ekspresyonu; 1) gerekli besinlerin hücre içerisine alınması, 2) adozin trifosfat (ATP) ve diğer nükleotid trifosfat (NTP)'lerin üretimi, 3) makromolekül sentezi için gerekli yapıtaşlarının sentezlenmesi, 4) protein sentezi ve makromolekül sentezinin uyarılması,

5) gerekli organellerin biyogenezi, 6) hücre döngü sisteminin düzenlenmesi ve hücre büyüme ve çoğalmasının uyarılması, 7) kök hücre kompartmanlarından hücre spesifik farklılaşmanın düzenlenmesinden sorumludurlar (29). MYC farklı genlerin ekspresyonlarını büyüyen hücrelerin gerekli komponentlerinin ihtiyaç miktarına göre düzenlemektedir (29). Yani hücre büyümesi arttıkça metabolizma da up-regüle edilmektedir. Bu özellikleri ile MYC hücrelerde transkripsiyonun global regülatörüdür (26).

4.3. Glukoz Metabolizması

Barsaklardan emilen ve hücrede kullanılan başlıca besin olan glukoz özellikle beynin en önemli enerji kaynağıdır. Hücreye enerji sağlanmasına yönelik olaylar glikoliz ve sitrik asit döngüsünde gerçekleşir. Glikoliz tepkimeleri ile glukoz üç karbonlu piruvata çevrilmektedir. Çeşitli metabolik olaylara katılmasına ek olarak piruvattan oksidatif dekarboksilasyon ile asetil-CoA elde edilmektedir. Asetil-CoA sitrik asit döngüsüne katılarak karbondioksit ve su oluşturmaktadır. Glukozun dışında amino asit ve lipit metabolizmaları sırasında da asetil-CoA oluşmaktadır (20, 32).

4.3.1. Glukoz Taşıyıcılar

Memeli hücrelerinde glukoz pasif taşıyıcılar olan GLUT (glukoz taşıyıcı) olarak adlandırılan bir sınıf taşıyıcılar ile hücre içerisine alınırlar (33). Memeli hücrelerinin birçoğunda glukoz konsantrasyonu ekstraselüler ortamdan düşük olduğundan glukoz hücrelere pasif transport ile girmektedir (20).

Glut ailesinin oniki üyesi bulunmaktadır. Dokuların pek çoğunda insülinin bağımsız olarak gerçekleşen glukoz taşınmasında GLUT1 ve GLUT3 görev almaktadır. GLUT1 ise daha çok eritrositlerde ve kan-beyin bariyerinde bulunan endotel hücrelerde bulunur. Ayrıca bütün hücrelerde solunumun sağlanması için düşük seviyede bazal glukoz alımından sorumludurlar. Artmış glukoz konsantrasyonlarında membrandaki GLUT1 seviyesi azaltılır, tam tersi glukozun az olduğu durumlarda da seviyesi arttırılır. GLUT2 çift yönlü taşıyıcıdır. Glukozun her iki yönde taşınmasını sağlar. Çoğunlukla, böbrek tübüler hücrelerinde, ince barsak epitel hücrelerinde, karaciğer ve pankreas beta hücrelerinde eksprese olur. Düşük afiniteli bir izoformdur. GLUT3 nöronlarda ve plesantada fazlaca bulunur. Yüksek afiniteli bir izoform olup, glukozun kat kat düşük olduğu durumlarda taşınmasını sağlar. İskelet kası ve adipositlerde taşıyıcı olarak

GLUT4 kullanılmaktadır ve insülin bağımlı glukoz taşınmasından sorumludur (32, 34, 35).

4.3.2. Glikoliz

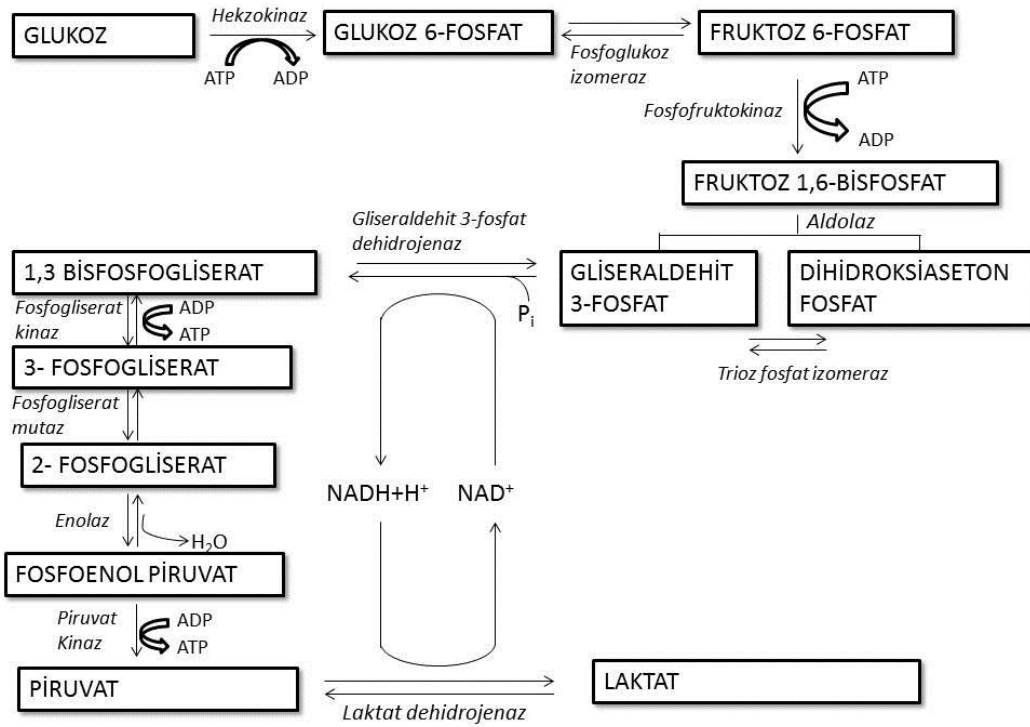
Birbirini izleyen ve enzimler tarafından katalizlenen on basamaklı glikoliz reaksiyonları sonunda glukoz piruvata çevrilmektedir (Şekil 1). Glikoliz enzimleri sitozolde bulunurlar. Bir glukoz molekülünün iki molekül piruvata çevrilmesi sırasında iki ADP molekülü, iki ATP' ye dönüştürülür (32).

Oksijensiz koşullarda piruvat laktat dehidrojenaz ile laktata çevrilmekte ve NAD^+ elde edilmektedir. Elde edilen NAD^+ , gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz tepkimesinde kullanılarak glikolizin devamı sağlanır (36). Oksijenin bulunduğu durumlarda ise piruvat sitrik asit döngüsünde CO_2 ve suya oksitlenir (37).

4.3.3. Sitrik Asit Döngüsü

Oksijenli ortamda glukozun CO_2 ve suya oksitlenmesiyle asetil- CoA oluşmaktadır. Birçok besin maddesinin katabolizmasının son aşamasında asetil-CoA molekülleri döngü şeklindeki tepkimeler dizisiyle tamamen oksitlenir ve bu reaksiyonlar dizisi sitrik asit ya da trikarboksilik asit (TCA) döngüsü olarak bilinmektedir (Şekil 2). Piruvat, yağ asitleri ve bazı amino asitlerden elde edilen asetil-CoA sekiz tepkimeden oluşan sitrik asit döngüsünde oksitlenir (20, 32).

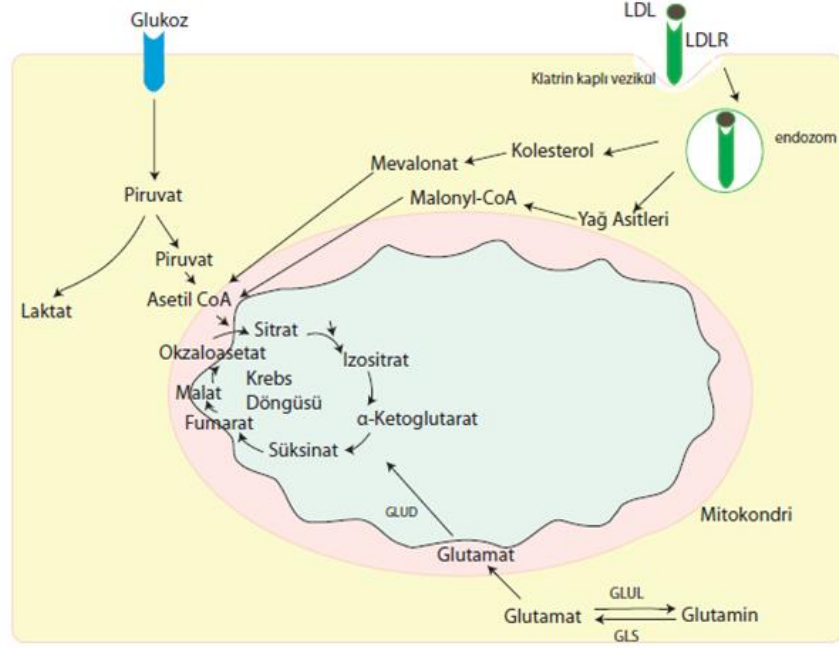
Bir glukoz molekülünden glikoliz, sitrik asit döngüsü ve oksidatif fosforilasyon sonrasında 38 ATP üretilmektedir. Ancak net ATP üretimi, glikolizde üretilen iki NADH molekülünün mitokondriye transferi sırasında 2 ATP molekülü harcanması nedeniyle 36 ATP dir (20, 36).



Şekil 1. Glikoliz reaksiyonları (Onat'dan, 37).

4.3.4. Oksidatif Fosforilasyon

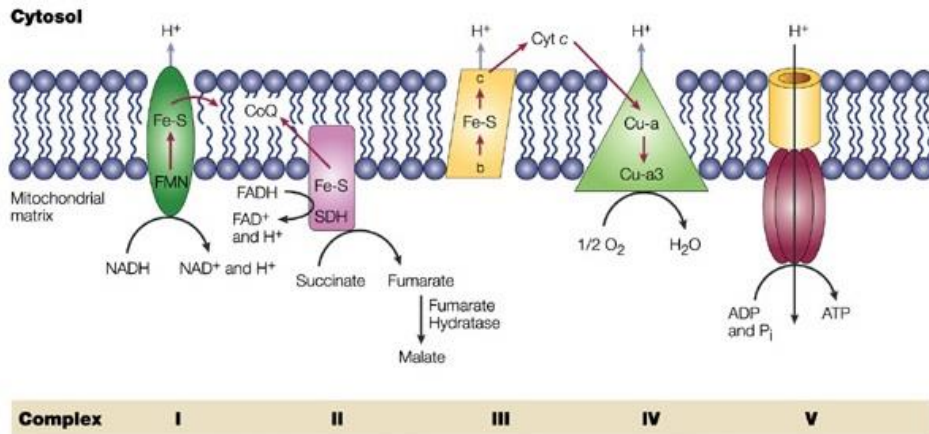
Karbohidratların, yağların ve diğer besinlerin oksidasyonu ile TCA döngüsünden elde edilen enerji, yüksek enerjili elektronlar olarak NAD^+ ve FAD 'a aktarılır. NAD^+ ve FAD , NADH ve FADH_2 'ye indirgenir (20). Bu yüksek enerjili elektronların transferi mitokondri iç membranında yer alan elektron taşıma sistemi (ETS) adı verilen sistemde olur. ETS'de bu yüksek enerji $\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$ dönüşümünde kullanılır. Bu nedenle bu reaksiyonlar zinciri **oksidatif fosforilasyon** olarak adlandırılır. Oksidatif fosforilasyon ile ETS'de ATP üretimi kemiosmotik bir süreç olup ilk olarak 1961 yılında tanımlanmış ve daha sonraki çalışmalarla da desteklenerek doğruluğu kanıtlanmış olup araştırmacıları Nobel ödülü kazanmıştır (20, 32, 38).



Şekil 2. Sitrik Asit Döngüsü.

4.3.4.1. Elektron Taşıma Sistemi

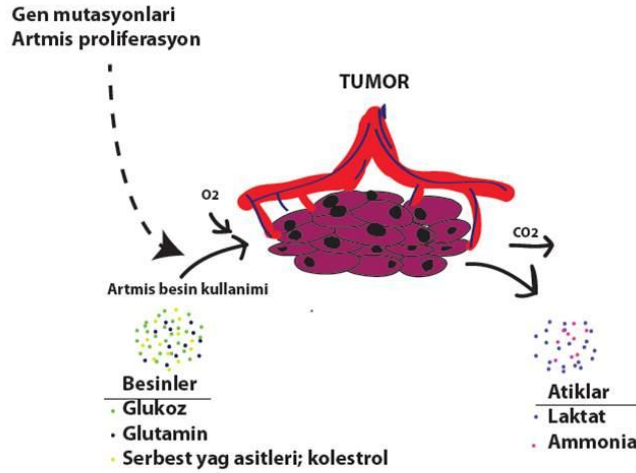
Glikoliz, TCA döngüsü, beta oksidasyon gibi katabolik biyokimyasal reaksiyonlar indirgenmiş koenzim NADH üretirler. Bu koenzimler yüksek transfer potansiyeline sahip elektronlar içerirler yani oksidasyon ile birlikte yüksek miktarda enerji salarlar. Bu enerji salınımı reaksiyonun kontrolünün sağlanabilmesi için, elektronlar NADH' den ayrılarak bir seri enzimatik reaksiyonlarla oksijene transfer olurlar ve her bir aşamada bir miktar enerji salınır (Şekil 3). Bu enzim setleri kompleks 1, 2, 3, ve 4 olarak adlandırılır ve mitokondri iç membranında yer alırlar (20, 32).



Şekil 3. Elektron Taşıma Sistemi (Eng'den, 39)

4.4. Kanser Metabolizması

Çok hücreli canlılarda organizmanın yaşaması besin miktarının hücre bölünmesi için gereken miktarın altında olması durumlarında anormal hücre bölünmelerinin önüne geçmek adına geliştirilen kontrol mekanizmalarına bağlıdır (4, 6). Normalde memeli hücreleri büyüme faktörleri ile bir uyarı olmadan çevrelerinden besin almazlar ve böylece kontrolsüz hücre bölünmesi engellenmiş olur (37). Ancak kanser hücreleri çeşitli genetik mutasyonlar ve reseptör aracılı sinyal yollarının modifikasyonları ile bu büyüme faktörlerine olan bağılılığı aşarlar (40). Sinyal yollarındaki değişimlerle besinlerin alımı ve metabolize edilmesini sağlayan sistemler daimi olarak aktive edilerek hem hücre yaşamasına hem de çoğalmasına katkı sağlar (Şekil 4). Onkojenik mutasyonların hücre büyümesi ve çoğalması için gereken besinlerin özellikle glukozun alınmasına neden olabildiği gösterilmiştir (36). Bu bilgi de Otto Warburg'un 1924 yılında yaptığı, kanser hücrelerinin normal hücrelere göre glukozu farklı metabolize ettiğini gösterdiği çalışmaya yeniden ilgi çekmiştir (41).

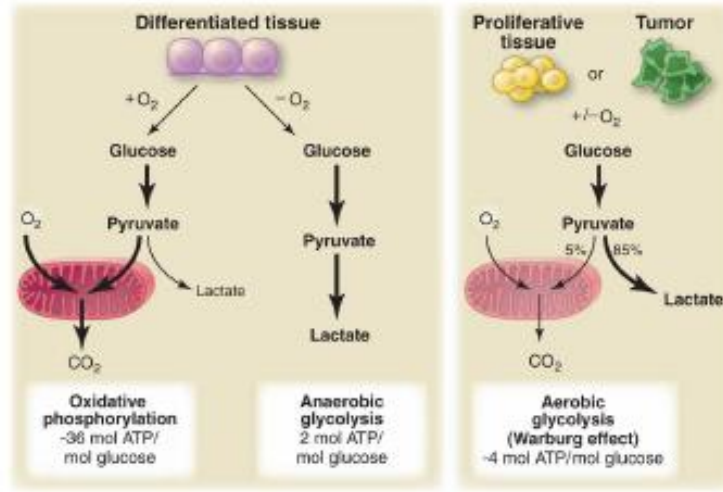


Şekil 4. Tümör mikroçevresi.

4.4.1. Aerobik Glikoliz 'Warburg Etkisi'

Metabolik yollara ilişkin bilgiler genellikle farklılaşmış dokulardaki çoğalamayan hücrelerde yapılan çalışmalarla elde edilmiştir (36). Oksijen varlığında çoğu farklılaşmış hücre glukozu piruvatın oksidasyonu ile mitokondriyal trikarboksilik asit döngüsünde (TCA) karbondioksite (CO₂) yıkar. Bu reaksiyon sırasında, ATP

üretimini maksimuma çıkarmak için oksidatif fosforilasyona katılan NADH [nikotinamid adenin dinükleotidin (NAD^+), indirgenmiş hali] üretilir (32, 36). Farklılaşmış hücreler sadece anaerobik koşullarda çok miktarda laktat üretir. Buna karşılık çoğu kanser hücresi oksijen varlığından bağımsız olarak fazla miktarda laktat üretir ve bu metabolizma ‘**aerobik glikoliz**’ olarak adlandırılır (Şekil 5) (42). Warburg kanser hücrelerinin glikolitik metabolizmayı mitokondriyal bir defekt sonucu oksijenli solunum yapamamaları nedeniyle kullandığını önermiştir (8). Ancak daha sonra yapılan çalışmalar çoğu kanser hücresinde mitokondriyal defekt olmadığını ancak yine de aerobik glikoliz yapıldığını göstermiştir (43, 44).



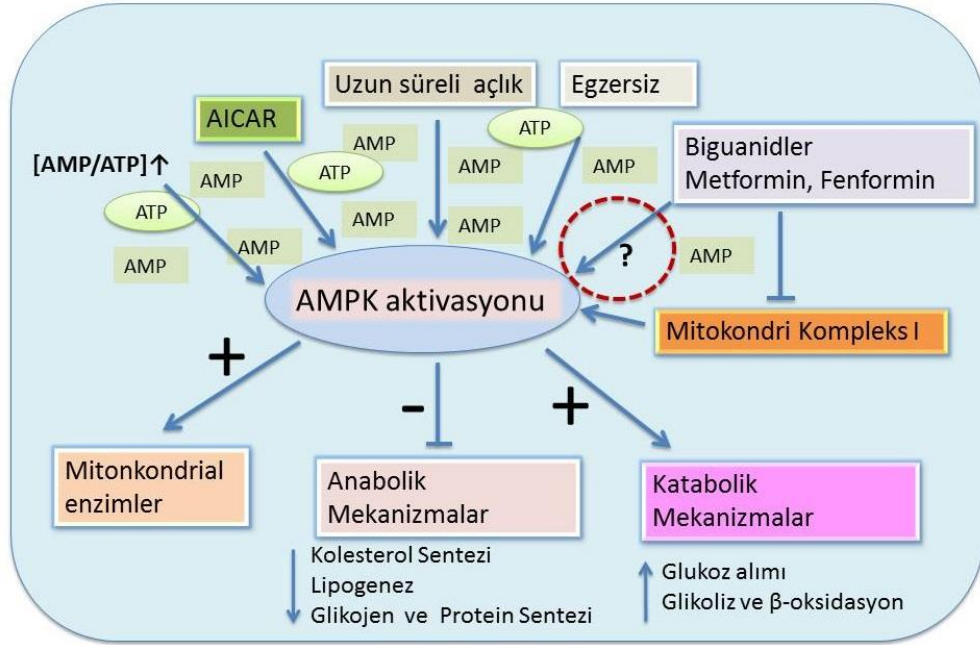
Şekil 5. Aerobik glikoliz ve oksidatif fosforilasyon (Van der Heiden' den, 36).

4.5. AMPK (Adenozin Monofosfat Aktif Protein Kinaz) Sinyal Yoluğu

AMPK sinyal ileti yoluğu hücrelerde enerji duyarlı bir yoldur ve hücrenin enerji ihtiyacı arttığı durumlarda aktive olmaktadır. Bu yoluğun aktive olduğunu gösteren markır ise AMPK proteininin fosforillenmesidir (45).

AMPK ilk olarak kritik metabolik enzimler Asetil-CoA Karboksilaz (ACC) ve 3-hidroksi-3 metilglutaril koenzim (HMG-CoA Redüktaz) için upstream kinaz olarak tanımlanmıştır (46). Hücre içerisinde AMP oranı arttığında, AMPK yoluğu aktivasyonu yağ asidi sentezi ve sterol sentezini inhibe etmektedir. Ayrıca pek çok dokuda glukoz alımını artırmaktadır. Hücrede enerji gerektiren anabolik reaksiyonlar baskılanırken, enerji üretilen katabolik reaksiyonlar (örneğin glikoliz) artırılır (Şekil 4) (36, 37).

Pek çok farklı hücresel stres AMPK aktivasyonuna neden olabilmektedir (Şekil 6). Besin yetersizliği, uzun süreli egzersiz ve pek çok farmakolojik ajan, örneğin; tip II diyabet tedavisinde kullanılan biguanidler AMP/ATP oranını arttırarak AMPK aktivasyonuna neden olmaktadır (45, 47, 48).



Şekil 6. AMPK sinyal yolağı aktivasyonu.

4.6. Biguanidler

Biguanidler antihiperlipidemik olarak Tip II Diyabet ya da pre-diyabet tedavisinde kullanılan ilaçların genel adıdır (49). Metformin, Fenformin ve Buformin bu grup ilaçlara örnek olarak verilebilir (45).

Biguanidlerin çalışma mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen yapılan çalışmalarda Metforminin *in vivo* insülin konsantrasyonu seviyesini azalttığı, hücre içine glukoz alımını arttırdığı ve glukoneogenezi arttırdığı gösterilmiştir (50). Metformin ve fenformin aynı zamanda mitokondride oksijenli solunumda kompleks 1'i inhibe ederek hücre içi ATP seviyesini düşürerek AMPK yolağını uyarılmaktadır (37, 45). Bu özelliklerinden dolayı biguanidler anti kanser tedaviler için ilaç olarak düşünülmektedirler (36, 45). Biguanidlerin kanser büyüme ve gelişmesini inhibe ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (51). İlaçların anti kanser etkileri Warburg etkisini bozmaları, kanser hücrelerinin karakteristiği olan sitozolik glikolizi piruvatın normal

oksidasyonuna çevirerek mitokondriye yönlendirmeleri nedeniyle olabileceği önerilmektedir (36, 37, 45).

4.7. Glutamin Metabolizması

Glutamin koşullu esansiyel aminoasitlerdendir. İnsanlarda kanda 500-900 $\mu\text{mol/L}$ bulunur (32).

Glutaminoliz, glutaminin glutamat, aspartat, CO_2 , piruvat, laktat, alanin ve sitrata yıkıldığı biyokimyasal reaksiyonlar serisidir. Glutaminoliz kısmen sitrik asit döngüsü ve malat aspartat mekiğindeki reaksiyon aşamalarına katılır. Glutamin glutaminaz enzimi ile glutamat ve amonyuma yıkılır. Glutamat ya salınır ya da glutamat dehidrojenaz ile α -ketoglutarata metabolize edilir. α -ketoglutarat sitrik asit döngüsünde α -ketoglutarat dehidrojenaz ile suksinata yıkılır. Glutaminoliz çoğunlukla mitokondride olur ancak glutaminin glutamata yıkılması gibi bazı reaksiyonları sitozolde olur (14, 32).

Glutaminoliz çoğunlukla adipositler, lenfositler, kolonositler gibi çoğalan hücrelerde ve özellikle tümör hücrelerinde olur (52). Glikolize ek olarak tümör hücrelerinde glutaminoliz diğer önemli enerji kaynağıdır. Tümör hücrelerinde enerji üretiminin yanı sıra hücre büyümesi ve transformasyonu için de gereklidir (53, 54).

Warburg'un tümör hücrelerinde aerobik glikoliz ile ilgili gözlemleri metabolizma araştırmalarının daha çok glukoz metabolizması üzerine yoğunlaşmasına neden olmuştur. Ancak 1950'li yıllardan sonra kanser araştırmacıları glutaminin tümör çevresi için önemini keşfetmişlerdir (14). Glutaminin tümör hücre metabolizması için önemi glukoz ile paylaştığı ortak karakteristik özelliklerden gelmektedir. Her iki besinde çoğalan tümör hücrelerinin iki önemli ihtiyacı; ATP üretimi ve makromolekül sentezi için gerekli yapıtaşlarının sentezini karşılamaktadır. Son yıllarda, onkogenlerin glukozda olduğu gibi glutamin metabolizmasında da etkileri olduğu gösterilmiş ve kanser hücrelerinin genetik yapılarının hücre yaşaması için glutamine bağımlılıklarını etkiledikleri belirtilmiştir (29). Ayrıca, yapılan çalışmalarda glutaminin hücre yaşaması ve büyümesi dışında kendisinin ve metabolizma ürünlerinin hücre sinyal yolları ile ilişkisi gösterilmiştir (55).

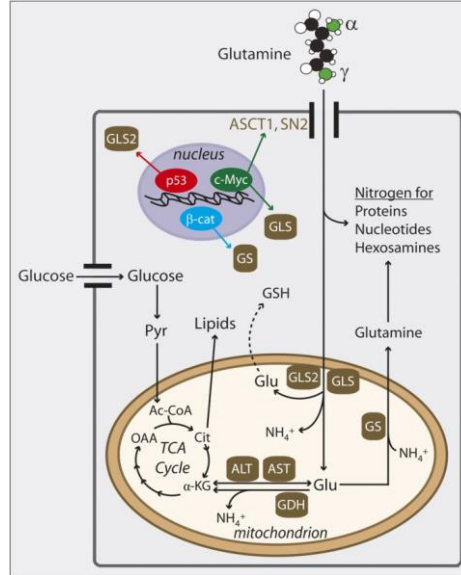
4.7.1. Glutamin Metabolizmasının Tümör Hücre Gelişimindeki Rolü

Glutamin esansiyel olmayan amino asitler arasında sayılmaktadır ve primer fonksiyonu azotu kaslarda depo etmek ve organlar arasında transfer etmektir. Kastaki amino asitlerin % 4'ünü, plazmada ise serbest amino asitlerin % 20'sini glutamin oluşturmaktadır (32).

Pek çok dokuda glutamin hücreler tarafından sentezlenmektedir ancak hızlı büyüme (ergenlik, vücut geliştirme, vb.) ya da hastalık durumlarında glutamin ihtiyacı artar. Bu durumlarda esansiyel hale gelir, bu nedenle 'şartlı' esansiyel amino asit olarak da tanımlanır (14). Çoğalan hücreler genellikle glutamine karşı bir açlık gösterirler (53). Bu durum tümör hücreleri için glutaminin bir besin olarak ve diğer metabolik olaylar için ara molekül olması nedeniyle önemini göstermektedir (Şekil 7).

Glutaminin tümör hücre büyümesinde önemli görevleri vardır. Bunlardan bazıları;

1. Nükleotid Biyosentezi: Glutamin hem pürin hem de primidinlerin de novo sentezi için gereklidir (14). Bu nedenle hücre çoğalması sırasında nükleotid üretiminde gereklidir. Glutamindeki azotun nükleotid biyosentezi için önemini gösteren en önemli bulgu bazı transforme hücrelerin düşük glutaminli ortamda S fazında gecikme göstermeleridir (56).



Şekil 7. Glutamin metabolizması (Deberardinis' den, 14). Kısaltmalar: GLS1 ve GLS2; glutaminaz enzimleri, GS; glutamin sentetaz, GDH; glutamat dehidrojenez, AST; aspartat aminotransferaz, ALT; alanin amino transferaz.

2. Hekzozamin Biyosentezi ve Glikozilasyon reaksiyonları: Hekzozamin oluşumunda hız belirleyici aşama glutamin: fruktoz 6 fosfat amidotransferaz (GFAT) tarafından katalizlenir. GFAT glutamin amido grubunu fruktoz 6 fosfata transfer ederek

O-bağlı ve N-bağlı glikozilasyon reaksiyonları için prekürsör olan glukozamin 6 fosfatı oluşturur. Bu reaksiyonlar sinyal iletimi, sekresyon ve diğer işlemlerde gerekli olan protein ve lipidlerin modifikasyonları için gereklidir. Dolayısıyla glukozamin 6 fosfat üretiminin bozulmasının hücre büyümesini inhibe ederek ve hücre sinyal sistemini bozacağı öngörülmektedir (14). GFAT aktivitesinin *in vitro* baskılanması ile meme kanseri hücrelerinde glutaminaz aktivitesi düşürülmüştür. Bu durumun O- bağli glikolizasyonu bozduğunu ve transkripsiyon faktör spesifiti protein 1 (SP1)'in glikozilasyon durumunu değiştirdiğini ve transkripsiyonel aktivitesini artırdığını göstermiştir (57).

3. Esansiyel Olmayan Amino Asitler: Tümör hücreleri yüksek glutaminaz aktivitelerinden dolayı hızlıca glutaminden glutamat üretirler. Glutamat havuzunun büyük çoğunluğunu glutaminin α (amino) azotu taşır. Bu azot daha sonra transaminazlar aktivitesi ile amino asit havuzundaki çeşitli esansiyel olmayan amino asitlere dağıtılır. Bu enzim amino gruplarının glutamat ile alanin ya da aspartat arasında geri dönüşümlü transferini katalizler. Alanin protein sentezinde kullanılır, ayrıca glikolizden arta kalan karbonun uzaklaştırılması için tümör hücreleri tarafından sekrete edilir. Aspartat ise hücre içerisinde kalır, protein ve nükleotid sentezine katılır, malat-aspartat mekiği aracılığı ile elektron transfer reaksiyonlarında yer alır. Aspartat mitokondri dışına çıkar, aspartat aminotransferaz ile okzaloasetata (OAA) dönüştürülür. OAA, NADH' den aldığı elektronlar ile malata indirgenir. Malat mitokondriye girer, ETS'de kompleks 1'e elektronlarını transfer eder. Dolayısıyla bu sistem hem mitokondri de hem de sitozolde ATP üretimine aracılık eder (14, 32, 37).

4. Glutasyon (GSH): Glutasyon yaklaşık 5mM konsantrasyonda tiyol içeren en önemli endojen antioksidandır (14) GSH, glutamat, sistein ve glisinden oluşan tripeptid yapıdadır ve oluşumu glutamine bağlıdır (32). Oksidatif stresin çeşitli kaynaklarında redoks tamponu olarak çalışır. Tümörlerde belirli bir seviyede GSH sağlanması hücre yaşaması için önemlidir çünkü hızlı metabolizma, DNA hasarlayıcı ajanlar ve

enflamasyon gibi nedenlerle meydana gelen oksidatif hasara hücrelerin karşı koymasını sağlar (58).

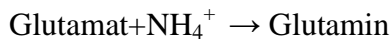
5. Solunum Substratı: Glutaminin karbon iskeletinin mitokondride oksidasyonu glutamin için ana metabolik olaydır ve çoğalan hücreler için primer enerji kaynağıdır (55). Bu olay glutaminin glutaminaz ile glutamata, daha sonra glutamat dehidrojenaz ile α -ketoglutarata yıkılmasını gerektirmektedir. Ancak bazı durumlarda glutamat oluşumuna daha çok ihtiyaç vardır, örneğin, nükleotid ya da hekzoamin biyosentezi gibi. Bu nedenle çoğalan hücrelerde ihtiyaca göre glutamin metabolizması düzenlenmektedir (4). Özellikle biyosentetik yollara ihtiyacın arttığı çoğalan hücrelerde glutamin α -ketoglutarat aracılığıyla solunum substratı olarak sitrik asit döngüsüne katılır (14).

6. Redüksiyon (İndirgenme) Tepkimeleri: Glutaminin piruvata dönüşmesinin en önemli yararlarından biri de NADP^+ nin NADPH 'a indirgenmesidir. NADPH , lipid sentezi, nükleotid biyosentezi ve GSH'ın indirgenmiş olarak kalmasında elektron donörü olarak kullanılır. Bu nedenle özellikle çoğalan hücreler oldukça fazla NADPH üretmelidirler (59).

7. Amonyum Üretimi: Glutaminaz aktivitesi toksik bir metabolit olan serbest amonyum üretmektedir. Örneğin *in vitro* koşullarda glioblastoma hücrelerinin ekstraselüler ortama saldıkları amonyum miktarı besiyerinden tükettikleri glutamin miktarının %75'ini oluşturmaktadır (14). Bu durum glutaminin büyük oranda mitokondride glutaminaz ile metabolize olduğunu göstermektedir. Amonyum sekresyonunun bloklanması net glutamin tüketimini baskılayabilir ya da intraselüler amonyum miktarının toksik seviyelere ulaşmasına neden olabilir. Her iki durumda da hücre büyümesi ve yaşaması etkilenmektedir (60).

4.7.2. Glutamin Sentetaz

Glutamin sentetaz ya da diğer adıyla glutamat-amonyum ligaz (GLUL) enzimi ile glutamattan glutamin oluşturulmaktadır (32). Pek çok tümör hücresinde artmış GLUL mRNA ekspresyonu ve artmış GLUL enzim aktivitesi vardır (61). Glutamin sentezi enerji gerektiren bir olaydır ve amonyum da gereklidir (32).



4.7.3. Glutaminaz (GLS) İnhibisyonu ve BPTES

GLS inhibisyonunun terapötik potansiyeli bilinmesine rağmen bu konuda çok fazla araştırma yapılamamıştır. Bunun önemli nedenlerinden biri GLS, hücre metabolizmasında kritik rol oynamaktadır ve inhibisyonu istenmeyen fizyolojik sonuçlar doğurmaktadır (55). Yapılan çalışmalarda GLS knockout farelerin doğumdan sonra hemen ölmeleri de bunu doğrulamaktadır. Ancak, GLS için heterozigot fareler ise yaşamlarını devam ettirirken bazı dokularında glutamat seviyelerinde önemli bir düşüş görülmüştür (62). İkinci neden ise etkin ve seçici GLS inhibitörlerinin olmayışıdır (63). Konvansiyonel GLS inhibitörü 1, diğer adıyla 6-diazo-5-okzo-L-norlösin (DON), GLS'in fizyolojik rolünü çalışmak için iyi bir araç olarak kullanılmasına karşın kendisinin kimyasal reaktivitesi ile kombine biçimde seçici olmayışı ve etkinliğinin az olması terapötik GLS inhibisyonu olarak kullanımına engel olmaktadır (64).

BPTES (bis-2-(5-fenilasetamido-1,2,4-tiyadiazol-2-yl) etil sülfid) diğer GLS inhibitörlerinden yapısal olarak ayrılmaktadır (65). Diğer inhibitörlere göre önemli avantajları bulunmaktadır. DON'un aksine BPTES kovalent bağ oluşturabilecek herhangi bir reaktif kimyasal grup içermez dolayısıyla toksisiteye yol açmaz. Ayrıca BPTES glutamin ya da glutamat ile yapısal bir benzerlik taşımaz. Bu da glutamin ya da glutamati substrat olarak kullanan diğer enzim, transporter ya da reseptörler ile etkileşime girerek toksikolojik risk oluşturmasını minimuma indirir. Örneğin DON'un aksine BPTES GLS2 ve γ -glutamil transpeptidazdan ziyade GLS'yi inhibe eder (65, 66).

Kendine has biyokimyasal karakteristiklerinden ötürü BPTES GLS'in fizyolojik rolünün anlaşılmasında ve GLS inhibisyonunun terapötik etkinliğinin araştırılmasında son yıllarda oldukça ilgi çekmiştir (14, 67). BPTES' in oldukça hidrofobik olmasından ötürü suda çözünürlüğü 1 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Bu kötü çözünürlük onun farmakolojik bir prob olarak kullanılmasına ve daha fazla yapısal modifikasyonların yapılabilmesine engel olmaktadır (65).

4.8. Kolesterol

Kolesterol 27 karbonlu bir steroid olup 386 Da molekül ağırlığındadır. 3. karbonunda -OH grubu, 5. ve 6. karbonlar arası çift bağ ve 17. karbonunda sekiz

karbonlu bir yan zincir bulunmaktadır. Kolesterolün suda çözünürlüğü üç boyutlu yapısından ötürü oldukça azdır (5 µmol/L) (32).

Kolesterol steroid hormonların biyosentezi için başlangıç molekülüdür. Yağda çözülebilen, düşük molekül ağırlıklı bu steroid hormonlar çeşitli ve önemli birçok fizyolojik olayda rol oynamaktadır (32).

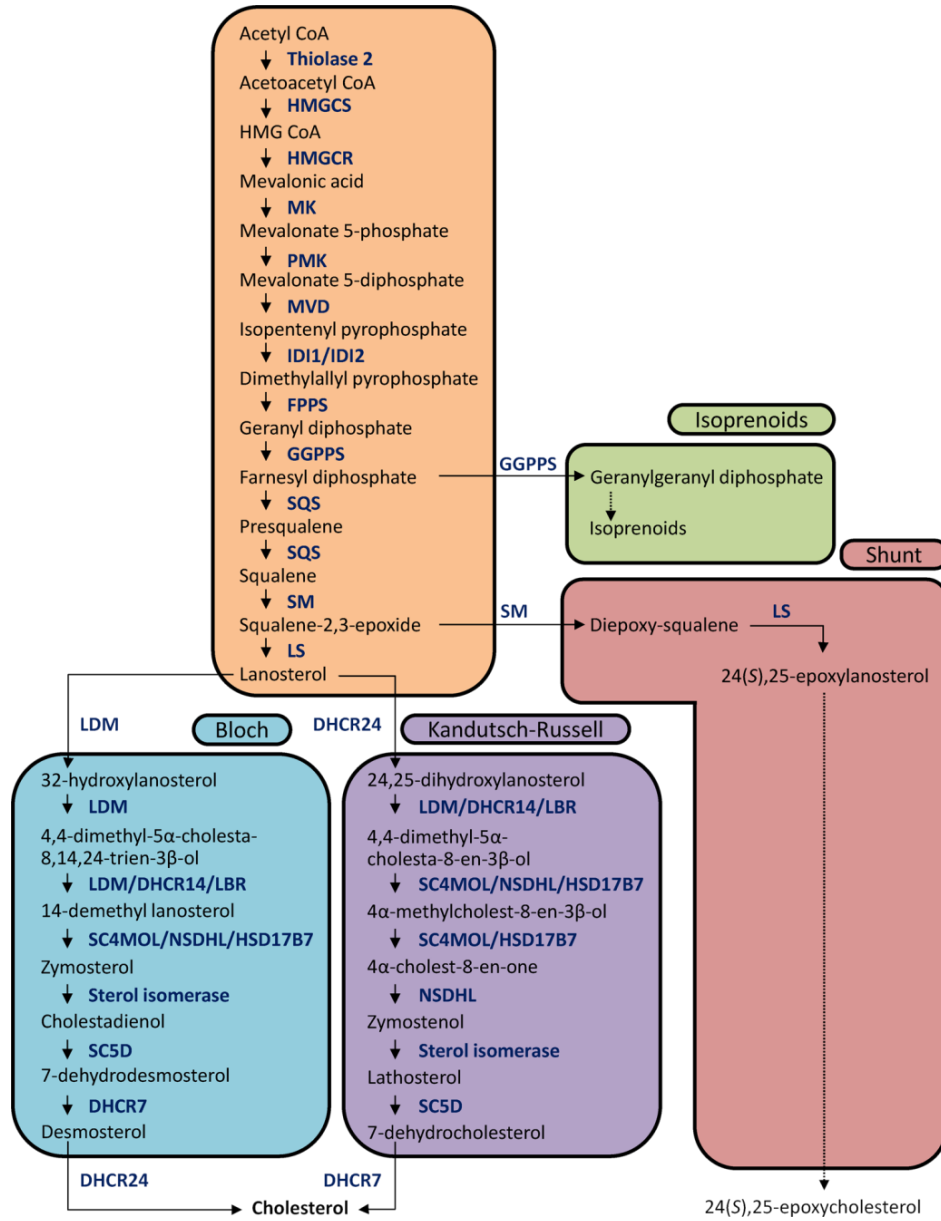
4.8.1. Kolesterol Metabolizması

4.8.1.1. Kolesterol Biyosentezi

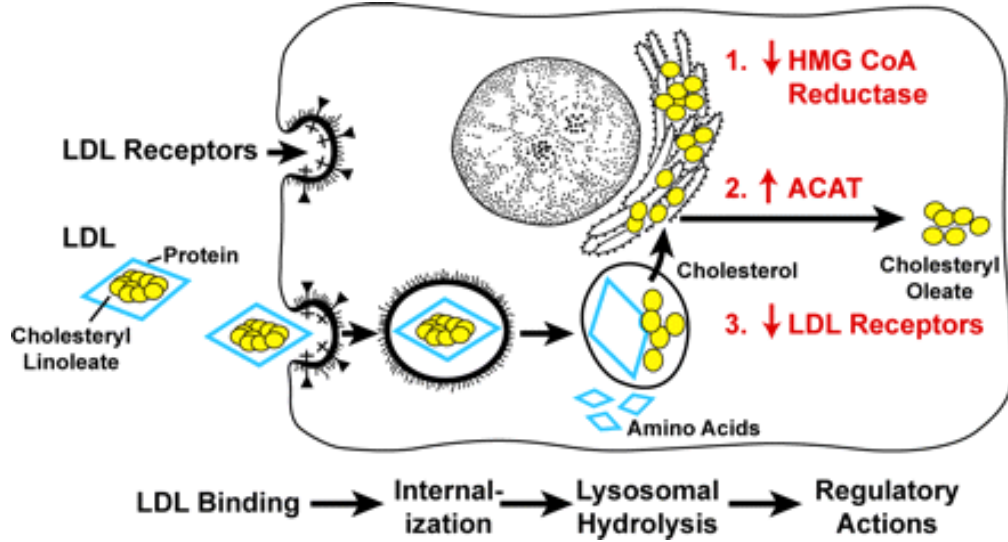
Kolesterol biyosentezi asetil CoA'nın bir seri kompleks enzimatik reaksiyonlar aracılığıyla dönüşümüdür. Ana basamaklardan birisi üç molekül asetil CoA'nın yoğunlaşması ile mevalonat oluşmasıdır. Bu basamak HMG-CoA redüktaz enzimi aracılığı ile olmaktadır. Mevalonat 30 karbonlu lineer bir yapıya sahip skualene dönüştürülür, skualen ise lanosterole dönüştürülür. Lanosterolden 3 karbonun uzaklaştırılması ile kolesterol oluşturulur. Şekil 8'de kolesterol sentezi ve rol alan enzimler verilmiştir (32, 68, 69).

4.8.1.2. Kolesterolün Reseptör Aracılı Hücre İçerisine Alınması

Dışarıdan alınan kolesterolün % 75'i LDL'den kaynaklanmaktadır. 1 mol LDL yapısında yaklaşık 1500 molekül kolesterol bulunmaktadır (32). LDL hücre içerisine LDL reseptör (LDLR) aracılı endositoz ile alınmaktadır. LDLR hücre membranında özel bir protein olan kltrin kaplı çukurcuklarda bulunur. Kltrin kaplı çukurcuklar ile birlikte LDLR hücre içerisine alınır ve endozom haline gelir. Endozomlarda asidifikasyon ile LDL molekülleri reseptörden ayrılarak lizozomlara gönderilir (Şekil 9). Lizozomlarda lipoprotein partikülleri parçalanır ve kolesterol hücre için salınır (70, 71).



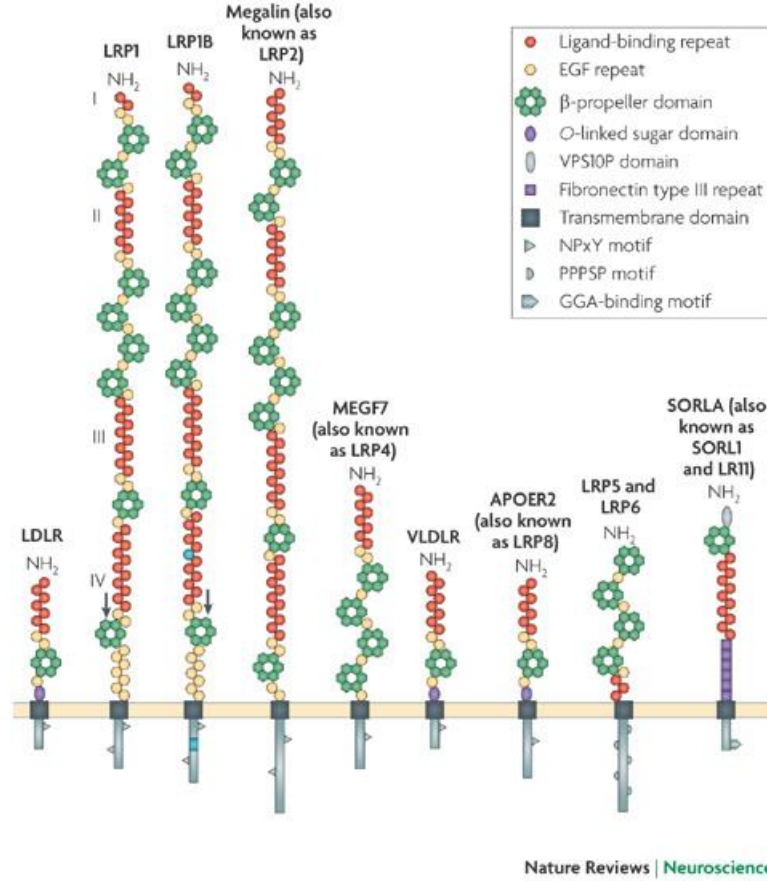
Şekil 8. Kolesterol biyosentezi (Sharpe'den, 69).



Şekil 9. Kolesterol metabolizması (Goldstein'den, 72). Kısaltmalar: ACAT; Asetil CoA transferaz.

LDLR, LDL partiküllerinin hücre içerisine alınmasından sorumlu reseptör yapılarıdır. LDLR kendisine yapısal olarak oldukça benzer dokuz üyelik transmembran protein ailesinin kurucu üyesidir; LRP1, LRP1b, megalin/LRP2, LDLR, VLDLR, MEGF7/LRP4, LRP8/Apolipoprotein E reseptör 2, LRP5/6 ve SORL1 (73). Bu proteinler evrimsel olarak korunmuştur ve lipoproteinlerin hücre içerisine alınması, kolesterol sentezinin regülasyonu, sinyal iletimi, sinapsların regülasyonu ve vitamin homeostazı gibi çok sayıda fizyolojik olayda rol alırlar (74). Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör-ilişkili proteinler olarak adlandırılan LRP'lerin glikolipid-bağlı reseptörler, G-protein bağlı receptorler ve iyon kanalları ile ilişkili oldukları gösterilmiştir (75).

LRP' ler yapısal olarak ortak bölgelere sahiptirler (Şekil 10). Hepsinde tek bir transmembran bölgesi ve oldukça kısa sitoplazmik bölgeleri vardır. Ekstrasellüler bölgeleri uzunluk olarak farklılıklar göstermesine rağmen ortak üç karakteristik bölge içerir; ligand bağlama tekrar bölgeleri (kompleman tip tekrarlar), Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) tekrarları ve YWTD-içeren domain. LRP5/6 ve SORL1 atipik yapısal bölgelerinden dolayı ailenin uzak üyeleri olarak kabul edilmektedirler (74, 76).



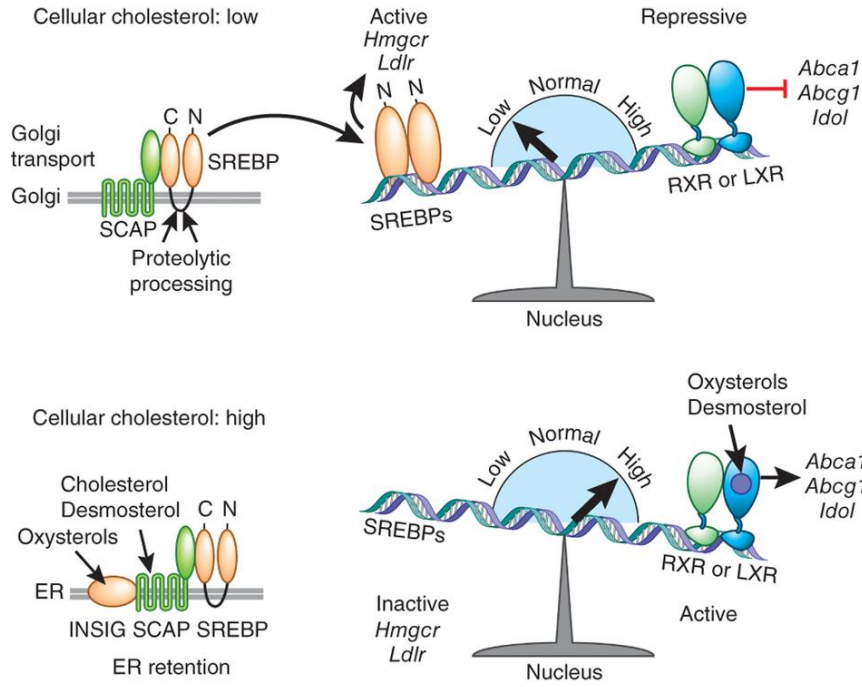
Şekil 10. Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ailesi (Bu'dan, 76).

4.8.1.3. Kolesterol Metabolizmasının Regülasyonu

LDLR' in endositozla hücre içerisine alınması hücre içi düşük sterol seviyelerinde artmaktadır. LDLR endositozunun düzenlenmesi proprotein konvertaz subtilisin/keksin tip 9 (PCSK9) tarafından sağlanmaktadır (77). PCSK9 serin endoproteaz olup LDLR' in ekstraselüler domainine bağlanır ve internalizasyonunu uyarır (78). *LDLR* gen transkripsiyonu endoplazmik retikulum membranlarındaki kolesterol konsantrasyonu değişikliğine göre düzenlenir (79). Kolesterolün azlığında SREBP yarıklanma aktive edici protein (SCAP) aracılı SREBP (sterol yanıt elementi bağlayıcı protein) transkripsiyon faktörlerin indüklenmesine neden olarak *LDLR* transkripsiyonunun artırılır (70).

Hücre içi kolesterol konsantrasyonunun artması sterol duyarlı nükleer reseptörler $LXR\alpha$ ve $LXR\beta$ aktivasyonuna neden olur. Aktif LXR 'lar retinoid X reseptörleri (RXR) ile heterodimer oluşturur. Kolesterol taşıyıcı proteinlerin, örneğin ATP- bağlayıcı kaset

(ABC) taşıyıcıları (ABCA1 ve ABCG1), ADP- ribozilasyon faktör benzeri 7 (ARL7) ve apolipoprotein E ekspresyonları artırılır. LXR ayrıca LDL kolesterol alımını bir E3 ubiquitin ligaz olan uyarılabilir LDLR parçalayıcı (IDOL) ekspresyonuna neden olarak azaltmaktadır (Şekil 11). IDOL, LDLR alımını ve yıkımını klatriin bağımsız olarak yapmaktadır (70, 71, 77, 79, 80).



Şekil 11. Kolesterol biyosentezinin regülasyonu (Spann'dan, 81).

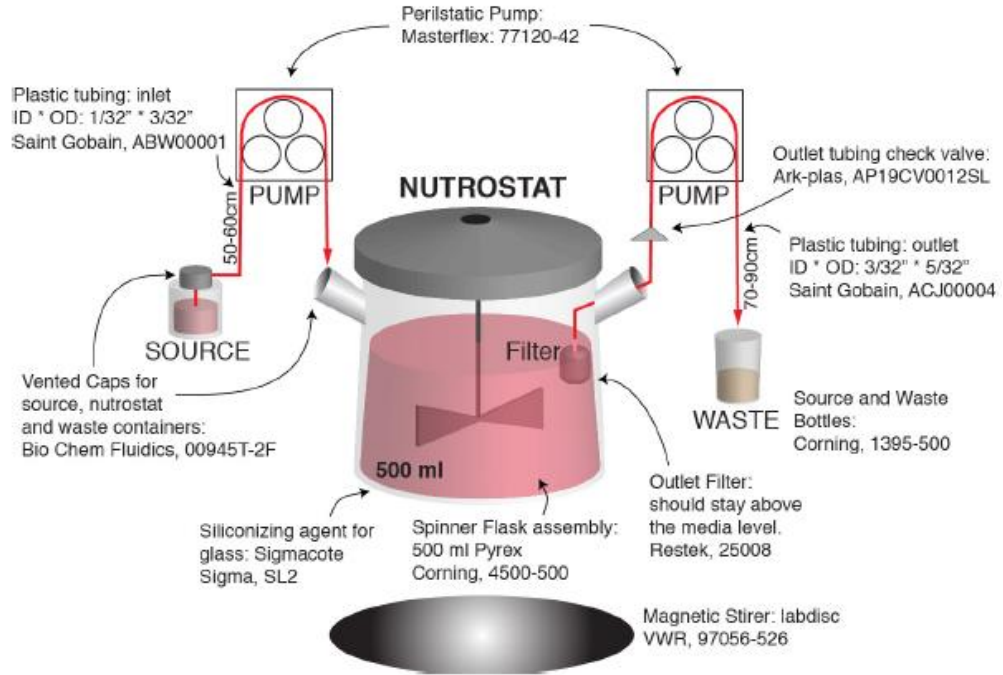
4.8.2. Kolesterol ve Kanser

Kolesterol ve kanser arasındaki ilişki ilk olarak yaklaşık yüz yıl önce John Holden Webb tarafından canlı hücrelerde kolesterol kristalleri birikimi nedeniyle kanser oluştuğunu öne sürmesiyle gösterilmiştir (15). O zamandan beri kolesterol metabolizmasının tümör gelişimindeki rolü araştırılmaktadır. Hücre membranının kolesterol yapısı hücre bölünmesi için metabolik bir gereksinimdir ve çoğalan hücrelerde artmış kolesterol alımı olduğu gösterilmiştir (82). Kanser hücreleri hücre içi kolesterol devamlılığını sağlamak için çeşitli mekanizmalar adapte etmiştir. Bunlardan ilki endojen kolesterol ve yağ asidi sentezinin artırılmasıdır. Bu olay SREBP ile düzenlenmektedir (78). Diğer mekanizmalar ise LDL alımının artırılması ya da prostat kanserinde olduğu gibi taşıyıcı aracılı kolesterol taşınmasının azaltılmasıdır (82, 83). Kolesterol metabolizmasının regülasyonundaki bozuklukların kanser hücre

büyümesinin ve onkojenik sinyal iletiminin baskılanmasında etkili bir araç olduğu düşünülmektedir. Çünkü lipid yığınları adı verilen kolesterolce zengin membran mikrodomanleri ile kolesterol kanserde sinyal iletiminde önemli bir rol oynamaktadır. (15-17, 68, 79, 82).

4.9. Nutrostat

Kemostat taze besiyerinin sürekli eklendiği, kültürdeki besiyerinin ise uzaklaştırıldığı statik kimyasal çevre sağlayan bioreaktör olarak adlandırılan üç boyutlu hücre kültür ortamlarıdır (84). Nutrostat ise pompa ve manyetik karıştırıcı sistemlerle birlikte dizayn edilip kurulmuş bir çeşit kemostatdır (Şekil 12). Kültür hacmi, oksijen konsantrasyonu, besin ve atıkların konsantrasyonu, pH gibi kültür parametreleri bu ortamda sabit tutulur. Kültüre eklenen besiyerinin miktarı ayarlanarak içerisinde büyüyen hücrelerin büyüme hızı kontrol edilebilmektedir. Bu sistem özellikle besin kısıtlaması çalışmalarında kullanılır, bu sayede istenilen besin miktarının sistem içerisinde hep aynı seviyede kalması sağlanır (85). Kemostatlarda büyüme hızı tek bir besin için kısıtlama yapılarak tespit edilebilir ve ilgilenilen besinin metabolizma ve çoğalma üzerinde etkisi çalışabilmektedir.



Şekil 12. Nutrostatın şematik kurulumu (Birsoy'dan, 86).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Kimyasallar

Tablo 1. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Ürün	Marka	Ürün Kodu
CAPS	Sigma	C2632-1KG
Agaroz, Ultrapure	Life Tech	16500-500
Coomassie Blue, Simply Blue, SafeStain	Life Tech	LC6065-3,5L
Bovin Serum Albumin	Sigma	A9647-100G
Dubleco's PBS (w/o Mg ⁺² /Ca ⁺²)	Gibco	14040
Etanol (C ₂ H ₅ O)	Sigma	32205-2,5L
Ethylenediaminetetraasetic asit (EDTA)	AmericanBio	AB00500-05000
Hidroklorik asit (HCl)	Sigma	H1758
İzopropanol (C ₃ H ₈ O)	Sigma	59300
Metanol	Sigma	32213-2,5ML
Nonyl phenoksipoliethoksiletanol (NP40)	Sigma	74385
Western Blotting- Stripping Buffer	Thermo Sci.	21059
Süt tozu	LabScientific	M-0842-2KG
Sodyum Klorür (NaCl)	American Bio	AB01915-10000
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma	71729-1KG
Tris Baz	Fisher	BP152-10
Sodyum Hidroksit (NaOH)	American Bio	AB01915-10000
Tris-HCl	American Bio	AB02005-05000
Triton X-100	Sigma	T8787
Tween 20	Sigma	P1379-500ML
FuGENE transfeksiyon ajanı	Promega	E2691
Fetal Bovin Serum	Sigma	F4135-500ML
Penisilin/Streptomisin	Sigma	P4333-100ML
L-glutamin	US Biologicals	G7120
RPMI 1640 w/L-glutamin	Gibco	31800-089
RPMI 1640 w/o L-glutamin, glukoz	US Biologicals	R9011
Novex® 10 % Tris-Glycine Mini Protein Gels, 1.5 mm, 15 well	Life Technologies	EC60785BOX
Novex® 12 % Tris-Glycine Mini Protein Gels, 1.5 mm, 15 well	Life Tech	EC60085BOX
Novex® 8 % Tris-Glycine Mini Protein Gels, 1.5 mm, 15 well	Life Tech	EC60185BOX
Platinum® Pfx DNA Polimeraz	Invitrogen	11708-013
SuperScript® III Reverse Transkriptaz	Invitrogen	12574026
SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Bio	4309155
RNaseOUT™ Recombinant Ribonükleaz Inhibitor	Invitrogen	10777-019
CellTiter GLO Hücre canlılık Testi	Promega	G7573
Antikor SQLE, rabbit	ProteinTech	12544-1-AP
Antikor Aktin, goat	Santa Cruz	sc1616

5.1.2. Kitler

Tablo 2. Çalışmada kullanılan ticari kitler

Ürün	Marka	Ürün Kodu
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Sci.	23227
Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Sci.	32132
RNeasy Plus Mini Kit (250)	Qiagen	74136
QIAquick Gel Extraction Kit (50)	Qiagen	28704
QIAprep Spin Miniprep Kit (50)	Qiagen	27104
QIAGEN Plasmid Maxi Kit (100)	Qiagen	12165
QIAquick PCR Purification Kit (50)	Qiagen	28104

5.1.3. Cihazlar

Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka
Otomatik Film Makinesi	Konica Minolta SRX-201A, USA
Santrifüj Allegra X-12R	Beckman Coulter, USA
Santrifüj 5424R	Eppendorf, USA
Santrifüj Avanti® J-E	Beckman Coulter, USA
Elektroforez Güç Kaynağı	BioRad, USA
Xcell SureLock™ Mini-Cell Elektroforez Sistemi	İnvitrogen, USA
Thermalcycler	MJ Research, USA
Thermalcycler	Eppendorf, USA
Çalkalayıcı	VWR, USA
Vorteks Genie-2	VWR, USA
Owl™ VEP-2 Mini Tank Electroblotting System	ThermoScientific, USA
pH Metre	Beckman Coulter, USA
Tartı	Mettler Toledo, USA
Magnetik Karıştırıcı	VWR, USA
Orbital Çalkalayıcı	VWR, USA
Dolap (+ 4)	VWR, USA
Dondurucu (- 20)	VWR, USA
Dondurucu (- 80)	ThermoScientific, USA
SpectraMax M5 Plate Reader	Molecular Devices, USA
Bioanalizör 2950	YSI, USA
Real-Time PCR, 7900HT	Applied Biosystems, USA
LabDisc S41Stir plate	VWR, USA
C/L Rotor	MasterFlex, USA
İnkübatör	ThermoScientific, USA
Laminer Kabin, Steril Gard III Advance	The Baker Company, USA
İnvert Mikroskop Axiovert 40CFL	Zeiss, USA
Z2 coulter particle and size analyzer	Beckman Coulter, USA
Su banyosu	VWR, USA

Tablo 3. Çalışmada kullanılan cihazlar (devam)

Cihaz	Marka
Isıtıcı Blok	VWR, USA
Jel görüntüleme sistemi	UVP, USA
UV transillüminatör	UVP, USA
Nanodrop	ThermoScientific, USA

5.1.4. Sarf Malzemeleri

Tablo 4. Çalışmada kullanılan sarf malzemeleri

Malzeme	Şirket
CL-Xposure Film	ThermoScientific, USA.
Nitroselüloz Membran- 0,45	Millipore, USA
Petri Kapları	Greiner, USA
Falkon Tüpler	Greiner, USA
Mikropipet Uçları	Axygen, USA
Filtreli mikropipet uçları	USA Scientific, USA
Mikro Santrifüj Tüpleri	Axygen, USA
Whatmann Kağıtları	BioRad, USA
Doku kültür flaskları	Corning, USA
Well Plate (6, 12, 24, 96' lık)	Greiner, USA
Serolojik Pipetler (5, 10, 25 mL)	Corning, USA

5.1.5. Solüsyonlar

5.1.5.1. Genomik DNA İzolasyonu Solüsyonları

a) 1 M Tris-HCl pH 8.0 (500 mL)

78.8 g Tris HCl

Hazırlanışı:

78.8 g Tris HCl 400 mL deiyonize suda çözüldü, pH 8.0'e ayarlanarak toplam hacim deiyonize su ile 500 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

b) %10 (w/v) Sodyum Dodesil Sulfat (SDS) (500 mL)

50 g SDS

Hazırlanışı:

50 g SDS 500 mL deiyonize suda çözülerek oda sıcaklığında saklandı.

c) 2 M Sodyum Klorür (NaCl) (500 mL)

58.44 g NaCl

Hazırlanışı:

58.44 g NaCl 300 mL deiyonize suda çözüldü, deiyonize su ile 500 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

c) 0.5 M EDTA pH 8.0 (500 mL)

93.06 g EDTA

Hazırlanışı:

93.06 g EDTA.Na₂.2H₂O 400 mL deiyonize suda çözüldü, pH 8.0'e ayarlandı. Son hacim 500 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

d) Lizis Buffer (200 ml)

<u>Solüsyonlar</u>	<u>Miktar</u>	<u>Final Konsantrasyon</u>
1 M Tris HCl	20 mL	100 mM
% 10 SDS	16 mL	% 0.8
0.5 M EDTA	2 mL	5 mM
2 M NaCl	40 mL	40 mM

Hazırlanışı:

Solüsyonlar yukarıda verilen hacimlerde karıştırıldı. 122 mL deiyonize su ile son hacim 200 mL'ye tamamlandı.

5.1.5.2 Agaroz Jel Elektroforezi Solüsyonları

a) 50X TAE Elektroforez Tamponu (pH 8.5)

2420 g Tris Baz
571 mL Glasiyel Asetik Asit
1000 mL 0.5M (186g) EDTA
dH₂O ile 10 L' ye tamamlandı.

Hazırlanışı:

Tris baz magnetik karıştırıcıda yaklaşık 6 L dH₂O içerisinde çözüldü. EDTA ve asetik asit eklendi. pH 8.5'e ayarlandıktan sonra dH₂O ile 10 L'ye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

b) 10X Orange G DNA Yükleme Tamponu

Hazırlanışı:

20 g Sukroz 40 mL dH₂O içerisinde çözüldü. 100 mg Orange G sukroz karışımına ilave edildi. İyice çözüldükten sonra son hacim dH₂O ile 10 mL'ye tamamlandı.

5.1.5.3. Western Blot Solüsyonları

a) % 10 NP40 (200 mL)

Hazırlanışı:

20 mL NP40 200ml dH₂O içerisinde 42 °C su banyosunda çözüldü.

b) 0,5 M HEPES (500 mL, pH 7.4)

59.575 g HEPES

Hazırlanışı:

59.575 g HEPES 350 mL dH₂O içerisinde çözüldü. pH 7.4'e ayarlandı. Son hacim dH₂O ile 500 mL'ye tamamlandı.

c) Protein İzolasyonu Lizis Solüsyonu (500 mL)

		<u>Final Konsantrasyon</u>
HEPES (0.5 M)	50 mL	50mM
2M NaCl	75 mL	150 mM
% 10 NP40	50 mL	% 1
% 10 SDS	5 mL	% 0.1
0,5 M EDTA	2 mL	2 mM

d) 10X SDS; Jel Yürütme Solüsyonu (10 L)

Tris baz 300 g
Glisin 1440 g
SDS 100 g

Hazırlanışı:

Tris baz, glisin ve SDS 8 L su içerisinde çözüldü. Son hacim 10 L'ye tamamlandı.

e) 10X TBS-T; Transfer Buffer (20 L, pH 7.6)

1.37 M NaCl
200 mM Tris
1% Tween

Hazırlanışı:

1601.26 g NaCl, 501,2 g Tris HCl, 99.09 g Tris Baz ve 200 mL Tween 18 L dH₂O' da çözüldü. pH 7.6'ya ayarlandı. Son hacim 20 L'ye tamamlandı.

f) %5 Süt Tozu ya da BSA' lı TBS-T; Bloklama Solüsyonu

5 g BSA ya da Süt tozu

Hazırlanışı:

5 g BSA veya süt tozu 100 mL 1X TBS-T içerisinde çözüldü, 4 °C'de saklandı Fosforile antikorlar için BSA ile diğerleri için süt tozu ile hazırlanan solüsyon kullanıldı.

5.2. Yöntem

5.2.1. Whitehead Enstitüsü Sabatini Laboratuvarında Yapılan Deneyler

5.2.1.1. Hücre Kültürü

Çalışma boyunca kullanılan tüm hücre hatlarının listesi tablo 5'de verilmiştir. Bütün hücre hatları %10 FBS (Sigma, ABD), %1 penisilin/streptomisin (Sigma, ABD) ve 2mM Glutamine (US Biological, ABD) içeren RPMI 1640 (Gibco, ABD) besiyerinde, %5 CO₂'li ortamda kültüre edilmiştir.

5.2.1.2. Hücre Sayımı

Deney gruplarında hücrelerin proliferasyonunu görmek için hücreler Beckman Coulter Z2 particle counter (Beckman Coulter, ABD) hücre sayım cihazında sayıldı. Sayım için 500 µL hücre süspansiyonu iyice pipetlenerek 9.5 mL cihazın dilüsyon solüsyonu olan ISOTON II diluent (Beckman Coulter, ABD) içerisinde accuvette küvetlerinde (Beckman Coulter, ABD) karıştırıldı. 8-30 µm aralığında sayım yapıldı. Alınan partikül sayısından mililitredeki hücre sayısı aşağıdaki gibi hesaplandı:

Hücre sayısı (mL)= Sayılan partikül sayısı× 40 [20 dilüsyon katsayısı×2 (cihaz 500 µL de ölçüm yaptığından)]

Tablo 5. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının listesi

Hücre Hattı	Kanser /Normal Hücre Tipi
COLO 201	Kolon
COLO 205	Kolon
D283 Med	Medulloblastoma
Daudi	Lenfoma
DU4475	Meme
HL-60	Lösemi
HuT 78	Lenfoma
Niko	İmmortalize B lenfosit
Lao30202	İmmortalize B lenfosit
Jurkat	Lenfoma
KBM-7	Lösemi
KMS-12-BM	Multiple Myeloma
KMS-26	Multiple Myeloma
KMS-27	Multiple Myeloma
MC116	Lenfoma
NCI-H2171	Küçük Hücreli Akciğer CA
NCI-H524	Küçük Hücreli Akciğer CA
NCI-H716	Kolon
NCI-H82	Küçük Hücreli Akciğer CA
NCI-H889	Küçük Hücreli Akciğer CA
NCI-H929	Multiple Myeloma
Raji	Lenfoma
RPMI 8226	Multiple Myeloma
SNU-1	Mide
SNU-16	Mide
SNU-5	Mide
U266B1	Multiple Myeloma
U-937	Lenfoma
CAL62	Tiroid
SUP-M2	Lenfoma
MOLT16	Lösemi

5.2.1.3. Hücre Canlılık Deneyi: ATP seviyesinin ölçülmesi

Hücre canlılık deneyinde CellTiter GLO Luminescent Reagent (Promega, ABD) kit kullanıldı. Deneye bağlı olarak 5000-25000 hücre/mL hücre süspansiyonu deneye uygun besiyeri içerisinde hazırlandı. 100 µL hücre süspansiyonu çok kanallı pipet yardımıyla beyaz opak duvarlı 96 kuyucuklu platelere ekildi. Kontrol grubu hariç diğer hücrelerin üzerlerine çalışılan kimyasalı (BPTES, LDL, kolesterol, lanosterol, skualen,

MSO) 2X konsantrasyonda içeren besiyerinden 100 µL konuldu. Plateler deneye göre 4-6 gün süreyle 37°C'de, %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Deney süresi sonunda plateler inkübatörden alınarak üzerlerine 40 µL CellTiter Glo solüsyonu multichannel pipet yardımıyla ilave edildi. Plate çalkalayıcıda 3 dk oda ısısında 300 rpm'de çalkalandı. 5dk oda ısısında bekletildikten sonra lüminasans değerleri optik okuyuda okutuldu. Her bir hücre hattı için her bir deney grubu üç kere çalışıldı. Microsoft Office Excel programında üçlü kontrol grubunun ortalamaları alınarak diğer grupların lüminasans değerleri bu değere bölünerek, rölatif canlılık değerleri hesaplandı ve grafikleri GraphPad Prism version6 (GraphPAD software inc, ABD) grafik programında çizildi.

5.2.1.4. Nutrostat Kurulumu

Nutrostatın kurulumunda kullanılan ekipmanlar: peristaltik pompalar tübüller ile birlikte (Masterflex, ürün no. 77120-42), 500 mL spinner flasks (Corning, ürün no. 4500-500), 9-pozisyonlu karıştırıcı plate (Bellco Glass, ürün no. 7785-D9005) ya da LABDISC magnetic karıştırıcı (VWR no. 97056-526), Tygon tubing [(Saint GobainPerformance Plastics, üretici no. ACJ00004 (çıkış, 3/3299 3 5/3299) ve ABW00001 (giriş, 1/329933/3299)], çıkış filtresi (Restek, katalog no. 25008), kaynak besiyeri ve atık şişesi için delikli kapaklar (BioChemFluidics, katalog no. 00945T-2F), ve geri sıvı kaçışını önlemek için çıkış tübül sistemi kontrol valvi (Ark-plas, catalogue no. AP19CV0012SL). Spinner flasklar kullanmadan önce yıkanıp otoklavlandı. Çıkış filtresi kullanmadan önce hem ileri hem de geri yönde filtreden % 70 ethanol, sonrasında ise 500 mL steril PBS veya dH₂O geçirilerek temizlendi. Plastik tübül sistemi deneyden önce kuruldu. Tübüller 50-60 cm'lik parçalar halinde kesilerek besiyeri kaynağı ve atık şişesi kapaklarından geçirilerek kapaklar içi su dolu şişelere takıldı. Tübül ve şişelerden oluşan sistem 121 °C'de 30 dk otoklavlandı. Tübüller inkübatör içerisine yerleştirilen peristaltik pompalara bağlandı ve kapak sistemleri besiyeri ve atık şişelerine takıldı. Tübül sistemlerin uçları aşağıdaki ölçülerde şişelere yerleştirilmiş oldu:

- Besiyeri şişesinde: en alt.
- Spinner flaskta giriş tübülü: kapaktan 3 cm aşağıda (besiyeri seviyesinin üzerinde);

- Spinner flaskta atık çıkışı: Ucunda filtre ile besiyeri seviyesinin hemen üzerinde tutuldu böylece besiyerinin daima 500 mL’de kalması sağlandı.
- Atık şişesi: Kapaktan 2 cm aşağıda.

Peristaltik pompanın akış hızı deneysel olarak günlük 100 mL olması için besiyeri bağlanmadan önce PBS geçirilerek ayarlandı. Benzer şekilde atık pompasının akış hızı da günlük 100 mL çekecek şekilde ayarlanarak spinner flaskta besiyeri artışının önüne geçilmiştir.

5.2.1.5. Barkodlu Hücrelerin Çoğaltılması

Her biri üç farklı barkod ile ayrı ayrı enfekte edilmiş olan 29 farklı hücre hattı deneylerden bir ay önce çoğaltılmaya başlandı. Deney ortamına her bir hücre hattının 3 farklı barkodlu halinden eşit sayıda karıştırıldı. Böylece her bir hücre hattının çoğalması tek bir deneyde üç kez ölçülmüş oldu.

a) Düşük Glukozlu Ortamda Hücrelerin Çoğaltılması: 29 farklı kanser hücre hattından eşit sayıda karıştırıldı, bu karışımdan 5×10^6 hücre süspansiyonu nutrostatlara ekilerek ayrı ayrı düşük glukozlu (1mM) ve normal glukozlu (10 mM) 500 mL besiyerinde (Tablo 6) 2 hafta süreyle çoğaltıldı. Deneyin başlangıcında ilk hücre karışımından 1×10^6 hücre başlangıç örneği olarak ayrıldı deney sonuna kadar $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ derin dondurucuda saklandı.

Tablo 6. Düşük glukozlu RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması

Düşük glukozlu besiyeri	Normal Glukozlu Besiyeri
RPMI 1640 besiyeri (glukoz ve glutamin içermeyen)	RPMI 1640 besiyeri (glukoz ve glutamin içermeyen)
% 10 FBS	% 10 FBS
% 1 pen/strep	% 1 pen/strep
2 mM Glutamin	2 mM Glutamin
1 mM Glukoz (1M stok solüsyon)	10 mM Glukoz (1M stok solüsyon)

b) Düşük Glutaminli Ortamda Barkodlu Hücrelerin Çoğaltılması: Yukarıda tarif edilen barkodlu 29 farklı kanser hücre hattından eşit sayıda karıştırıldı, toplamda 5×10^6 hücre süspansiyonu nutrostat içerisinde ayrı ayrı düşük glutamin (50 μM) ve kontrol için normal glutamin (2 mM) içeren 500 mL besiyerinde (Tablo 7) 2 hafta süreyle

çoğaltıldı. 1×10^6 hücre başlangıç örneği olarak ayrılarak deney sonuna kadar $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ derin dondurucuda saklandı. Kültürler dört günde bir pasajlandı.

Tablo 7. Düşük glutaminli RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması

Düşük glutaminli besiyeri	Normal Glutaminli Besiyeri
RPMI 1640 besiyeri (glukoz ve glutamin içermeyen)	RPMI 1640 besiyeri (glukoz ve glutamin içermeyen)
%10 FBS (50 μM Glutamin içerir)	%10 FBS
%1 pen/strep	%1 pen/strep
—	2 mM Glutamin
10 mM Glukoz (1M stok solüsyon)	10 mM Glukoz (1M stok solüsyon)

c) Kolesterol İçermeyen Ortamda Barkodlu Hücrelerin Çoğaltılması: 29 adet barkodlu hücre hattı kolesterol ve hiçbir lipoproteini içermeyen, lipoprotein deficient serum (LPDS) kullanılarak hazırlanan RPMI besiyeri (% 9 LPDS, %1 pen/strep, % 1 L-glutamin, 10 mM Glukoz) içerisinde 8 gün süreyle büyütüldü. İlk hücre karışımından 1×10^6 hücre başlangıç örneği olarak ayrılarak deney sonuna kadar $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ derin dondurucuda saklandı. Kontrol grubu ise LPDS ile hazırlanan besiyeri içerisine LDL (1:250) ilave edilerek çoğaltıldı. Hücrelerin temel kolesterol kaynağı FBS içerisinde bulunan lipoprotein partikülleridir. En çok kolesterol içeren lipoprotein partikülü ise Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (LDL)' dir. Bu nedenle LPDS ile hazırlanan kontrol grubuna LDL ilavesi yapıldı.

Spinner flasklardaki kültürlerden besiyeri pipet yardımıyla günlük olarak çekildi (2-3 mL) ve tüketilen glukoz ve glutamin miktarları YSI 2950 Biyoanalizer cihazında ölçüldü. Kültürlerdeki hücre sayısı alınan örneklerde Beckman Coulter Z2 Coulter Particle and Size Analyser cihazında sayıldı. 4. Günün sonunda glukoz ve glutamin kültürleri pasajlandı ve flasklara yeniden 5×10^6 hücre ekildi. Toplanan hücreler $80 \text{ }^\circ\text{C}$ derin dondurucuda DNA izolasyonu için saklandı. 14 günlük deney süresince flasklar toplamda 3 kez pasajlandı ve DNA için örnek ayrıldı. Böylece deneyin 3 farklı kontrol noktası oldu. Kolesterol içermeyen ortamda çoğaltılan hücreler ise yalnızca bir kez pasajlandı. Bu deney için iki farklı kontrol noktası oldu.

5.2.1.6. Kùltùrlerdeki Barkodlu Hùcrelerin ođalma Oranlarının Tespit Edilmesi

Her bir deneyin sonucunda flasklardaki hùcrelerin 2/3'ùnden ve ilk başlangıçta ayrılan (başlangıç hùcreleri –time zero òrneklere), derin dondurucuda saklanan hùcrelerden genomik DNA izolasyonu yapıldı.

a) Genomik DNA izolasyonu:

- -80 °C'de saklanan hùcre pelletleri 37 °C su banyosunda çòzdürüldü.
- Üzerlerine 200 µg/mL final konsantrasyonda proteinaz K solüsyonu içeren Lizis Buffer' dan 1 mL konuldu. 37 °C'de bir gece inkùbe edildi.
- İnkübasyon sonrası lizatların üzerlerine eşit hacimde isopropanol eklendi ve kuvvetlice çalkalandı.
- Mikropipet ucu yardımıyla DNA eppendorfa alındı ve üzerine 750 µL %70 ethanol eklendi, tüp yavaşça çalkalandı. DNA mikropipet ucu yardımıyla içerisinde 500 µL Tris (pH 7.4- 7.8) olan eppendorfa alındı. 37 °C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. DNA òrneklere inkübasyon sonrası iyice çòzöldükten sonra 25-27G iğneden 5 kez geçirilerek homojenize edildi.

b) Barkodlu Bòlgelerin PCR ile oğaltılması: Elde edilen DNA òrneklere bilinen barkod bòlgeleri PCR ile çòğaltılarak yeni nesil sekans analizi için hizmet alımına gönderildi. Maliyeti azaltmak adına bütün deney grupları (düşük glukoz, düşük glutamin, LDL içermeyen ve kontrol grupları) PCR sonrası tek bir tüpte toplandı ve hizmet alımına bir òrnek olarak gönderildi. Òrneklere sekans sonucunda ayırt edebilmek için PCR yaparken ayrıca reverse primer ile 5 baz dizilik barkod eklendi. Yeni nesil dizileme yöntemi barkodları diziler ve aynı zamanda o diziden kaç tane bulunduğunu da gösterir. Bu durumda her bir barkodun sayısı, her bir hùcre hattının ortamda ne kadar bulunduğunu gösterdi. PCR ile gruplara yapılan barkodlar ile de grupların ayrımı yapılmış oldu (kontroller ve düşük glukoz, düşük glutamin, LDL içermeyen).

<u>PCR Karışımı</u>	<u>1X</u>
DNA 200 ng/μL	15 μL
3' Primer (barkodlu, her bir örnek için ayrı)(100 μM)	0.5 μL
10X PCR Buffer	10 μL
dNTP karışımı	8 μL
Taq Polimeraz	0.75 μL
5' Primer	0.5 μL
dH ₂ O	<u>65.25 μL</u>
	100 μL

PCR Koşulları

Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	2 dk	} 32 döngü
Denatürasyon	94 °C	30 sn	
Bağlanma	66 °C	30 sn	
Sentez	72 °C	40 sn	
Son Sentez	72 °C	5 dk	
Bekleme	4 °C	∞	

c) Yeni Nesil Dizileme Sonuçlarının Analizi

Barkod sayılarından hücrelerin rölatif çoğalma miktarları Microsoft Office Excel programında aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı, grafikler GraphPad Prism V6 programında çizildi. Jurkat hücre hattının sonuçları çoğalma oranının hesaplanmasında kontrol olarak kullanıldı.

$$\text{Rölatif çoğalma} = 2^{93 / (\log_2 FC_{\text{hücre hattı}} - \log_2 FC_{\text{Jurkat}} + PD_{\text{Jurkat}})}$$

FC; Fold Change

PD; Population Doubling

5.2.1.7. Western Blot

Retroviral gen ekspresyon sistemleri kullanılarak eksprese ettirilen proteinlerin ekspresyonları western blot yöntemi ile kontrol edildi.

1. Hücre Hatlarından Protein İzolasyonu: 10 mL lizis solüsyonu içerisine 1 tablet PhosStop (Roche, USA) ve 1 tablet complete EDTA-free proteaz inhibitör kokteyl tableti eklendi. Solüsyon soğuk odada (+ 4 °C) falkon çeviriciye konuldu ve tabletler tamamen çözülünceye kadar beklendi. Hücre lizisi süspansiyon ve adheren hücreler için aşağıda verilen protokollere göre gerçekleştirildi.

Süspansiyon Hücreler (Hec1B, Del, Snu1, SUDHL, SUPM2, K299 ve U937 hücre hatları): Hücreler 15 mL falkona toplandı. 3000 rpm' de 2 dk + 4 °C'de santrifüj edildi. Pellet buzda soğutulmuş 500 µL PBS ile resüspanse edilip eppendorf tüplere alındı. Tekrar 3000 rpm'de 2 dk + 4 °C'de santrifüj edildi. PBS pelleti bozmadan ortamdan uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine 200 µL (100000-300000 hücre için) lizis solüsyonu eklenip birkaç kez pipetlendi. 5- 10 dk buzda lizis için bekletildi.

Adheren Hücreler (CAL62 hücre hattı): Hücreler deney için 6 kuyucuklu platelere ekildi. Deney sonucunda kuyucuklu-plateler buz üzerine alındı. Besiyerleri uzaklaştırıldı ve üzerlerine soğuk PBS konuldu. PBS uzaklaştırıldı. Ortamda hiç PBS kalması dikkat edildi. 250 µL lizis solüsyonu eklendi ve 5-10 dk buzda bekletildi. Kuyucuklar 1000 µL mikropipet ucunun arka kısmı ile kazındı ve lizatlar eppendorflara alındı. Toplanan hücre lizatları 12000 rpm'de 4 dk +4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant yeni bir eppendorfa alındı. Lizis süresince hücrelerin daima buzda kalması sağlandı.

2. *Protein Konsantrasyonlarının Ölçülmesi:* Protein konsantrasyonları Bicinchoninic Acid (BCA) Assay kit (Pierce BCA kit, ThermoScientific, USA) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol uygulanarak ölçüldü. BCA solüsyonu örnek sayısına göre gereken miktarda Reagent A ile Reagent B'nin 50:1 oranında karıştırılması ile elde edildi (2 mL için; 2 mL Reagent A, 40 µL Reagent B). Kit ile birlikte gelen 2 mg/mL albüminden sırasıyla 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 ve 0 (blank) µg/mL dilüsyonlar hazırlandı. 96 kuyucuklu platelere konsantrasyonu belirlenecek lizatlardan ve albumin dilüsyonlarından 20 µL dağıtıldı. Üzerlerine 200 µL BCA solüsyonu konuldu. Plate 37 °C'de 15-30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plate-reader' da absorbanslar ölçüldü. Albumin seri dilüsyonlarının sonuçları ile standart eğrisi çizildi. Eğriden elde edilen denklem kullanılarak örneklerin protein konsantrasyonları hesaplandı. Western Blotlama için örneklerin konsantrasyonları 1000 µg/mL'ye son hacim 160 µL olacak şekilde ayarlandı. Üzerlerine 4X protein yükleme tamponundan son hacim 1X 40 µL eklendi.

3. *Sodyum Dodesil Sülfat– Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS- PAGE):* SDS-PAGE jel elektrofrezisi için ticari olarak satılan hazır jellerden (Invitrogen Novex Gel Cassette, %8, %10 ya da %12, Tris-Glycine) Ndi1 için %12'lik SQLE için %10'luk jel

kullanıldı. Jel kasetleri poşetlerinden çıkartıldı ve dH₂O ile yıkandı. Kasetlerin altındaki beyaz koruma bantları çıkartıldı. Tarakların olduğu üst kısım dH₂O ile tekrar yıkandıktan sonra taraklar dikkatlice çıkartıldı. Kasetler yürütme tankının içerisine yerleştirildi ve tank 1X SDS solüsyonu ile dolduruldu. İlk kuyucuğa 7 µL protein ladder yüklendi. Sırayla diğer kuyucuklara 20 µL protein örnekleri yüklendi. Örnekler 120 voltta 1,5 saat yürütüldü.

4. Blotlama (Islak Transfer)

Örneklerin yürüdüğü jel kaset dikkatlice kırılarak çıkartıldı ve kenarlarındaki fazlalıklar kesildi. Bir kaba hazırlanan transfer solüsyonundan döküldü. İki adet whatman kağıdı, iki adet sünger ve tutucu kaset bu solüsyonun içerisinde ıslatıldı. Aynı anda 0.45 mikron pore çapına sahip PDVF membran etanol içerisinde 2 dk tutularak aktive edildi. Membranın yönünün transfer sonrası tespit edilebilmesi için bir köşesi tükenmez kalem ile işaretlendi. Tutucu kaset içerisine sırayla en alta bir sünger üzerine whatman kağıdı, jel, membran, whatman kağıdı ve sünger yerleştirildi, arada hiç hava kabarcığı kalmamasına özen gösterildi. Tutucu kasedin üst kapağı kapatıldı ve bir klips ile kapakların bir arada tutulması sağlandı. Jel (-) yönde kalacak şekilde transfer tankına yerleştirildi. Tankın içerisi transfer buffer ile dolduruldu ve 45 voltta 120 dk transfer yapıldı.

5. Membranın Bloklanması ve Proteinin İmmüno kimyasal Görüntülenmesi:

Transfer sonrası membran 45 dk %5 yağsız süt tozu/1X TBS-T solüsyonu içerisinde çalkalayıcı üzerinde bloklandı. Bloklanan membran vakumlu poşete konuldu, içerisine birincil antikor solüsyonu (SQLE- rabbit, ACTIN-goat, Ndi1-mouse) döküldü ve kenarı poşet kapatıcı ile içerisinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı. Membran +4 °C’de bir gece çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası poşet bir kenardan kesilerek membran bir penset yardımıyla çıkartıldı, 1X TBS-T solüsyonunda üç kez 10’ar dk yıkandı. Son yıkamadan sonra membran vakumlu poşete konuldu, içerisine ikincil antikor solüsyonu (anti-rabbit, anti-goat veya anti-mouse) döküldü ve kenarı poşet kapatıcı ile dikkatlice kapatıldı. Oda ısısında çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. Birincil antikor solüsyonları SQLE için 1:1000, Ndi1 için 1:10000 oranında kullanıldı, ikincil antikor solüsyonları ise 1:2000 dilüsyonda kullanıldı.

Sekonder antikor ile inkübasyondan sonra membran vakumlu poşetten çıkartıldı ve bir kaba alınarak çalkalayıcı üzerinde 1X TBS-T solüsyonu ile üç kez 10 dk yıkandı. Proteinlerin kemilüminasan görüntülenebilmesi için membran 1 dk hazırlanan ECL solüsyonu (Pierce ECL, ThermoScientific, USA) ile muamele edildi. Membran üzerindeki fazla ECL solüsyonu bir kenarından peçeteye değdirilerek X-Ray görüntüleme kasetine yerleştirildi. Karanlık odada membranın üzerine gelecek şekilde X-Ray film yerleştirildi ve membranın filme ışması sağlandı. Işıma için 10, 15, 30, 60, 120 sn bekletildi. Filmler, Film Developer (Konica Minolta SRX-201A, USA)' da tab ettirildi. Sonuca göre daha uzun ışma için kasete yeniden film konuldu

5.2.1.8. Real-Time PCR

Kolesterol metabolizmasında rol alan *LDLR*, *SQLE*, *HSD17B7*, *HMG coA*, *DHCR7*, *DHCR24* ve *LIPA* gen ekspresyonları kolesterol yokluğuna duyarlı ve dirençli bir grup hücre hattında Real-Time PCR ile kontrol edildi. Gen ekspresyonları RPL0' ya göre normalize edildi.

1. *RNA İzolasyonu:* H524, Raji, U937, SNU-1, U266B1, Daudi, H2171, Molt16, H82, H716, K299, SUPM2, Del, KMS26 ve SUDHL hücre hatlarından RNA izolasyonu Qiagen RNAeasy MiniPlus kit kullanılarak kitin önerdiği protokole göre yapıldı.

- Hücreler toplandı, 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Besiyeri uzaklaştırıldı. Pellet PBS (w/o Mg^{+2} , Ca^{+2}) süspanse edildi. Hücreler 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve PBS tamamen uzaklaştırıldı.
- Pelletin üzerine 350 μ L RLT lizis buffer ve 350 μ L RNase-free %70 Etanol konuldu. Yavaşça birkaç kez pipetleyerek pellet çözüldü.
- Süspansiyon kit ile birlikte verilen altında toplama tüpleri bulunan kolonlara transfer edildi. 13000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi.
- Kolonlar yeni toplama tüplerine transfer edildi. Üzerlerine 700 μ L RW1 wash buffer eklendi. 13000 rpm'de 15 sn santrifüj edildi.
- Toplama tüplerindeki sıvılar dökülerek uzaklaştırıldı. Kolonların üzerine 700 μ L ikinci wash buffer RPE konuldu ve 120 sn 13000 rpm'de santrifüj edildi.

- Kolonlar yeni toplama tüplerine transfer edildi ve 60 sn 13000 rpm’de tekrar santrifüj edildi.
- Kolonlar RNase free eppendorf tüplere transfer edildi ve üzerlerine 50 µL RNAaz free su konuldu.
- 13000 rpm’de 120 sn santrifüj edildi. İçerisinde RNA bulunan eppendorflar buz üzerine alındı ve konsantrasyonları nanodrop cihazında ölçüldü. RNA’lar cDNA yapmak için reverse transkriptaz reaksiyonu için kullanıldıktan sonra -80 °C derin dondurucu da saklandı.

2. *cDNA Sentezi*: RNA örneklerinden cDNA sentezi Superscript III revers transkriptaz enzimi (Invitrogen, USA) kullanılarak, enzimi üreten firmanın önerdiği protokolde gerçekleştirildi.

Oligo dT Karışımı

	<u>1X</u>
Oligo dT	1 µL
dNTP	1 µL
RNA (200-300 ng/µl final konsantrasyonu olacak şekilde)	7 µL
dH ₂ O	4 µL

Oligo dT karışımı 65 °C’de 5 dk inkübe edildi ve inkübasyon sonrası reaksiyon buza kaldırıldı.

RT karışımı

	<u>1X</u>
5X Buffer	4 µL
DTT	1 µL
RNase OUT	1 µL
Enzim	1 µL

RT karışımından 7 µL oligo dT reaksiyonlarının içerisine konuldu. Tüm bu işlemler süresince karışımların buz üzerinde kalmasına dikkat edildi.

RT reaksiyonu

50 °C	60 dk
70 °C	15 dk
+ 4 °C	∞

Elde edilen cDNA’ lar +4 °C’de muhafaza edildi.

3. *Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR)*: qRT-PCR reaksiyonu ABI SYBR Green (Applied Biosystems, USA) kullanılarak ABI 7900HT (Applied Biosystems) Real Time PCR cihazında gerçekleştirildi. Kontrol için housekeeping gen olarak 50S ribozomal

subunit proteini kodlayan RPL0 ekspresyonu bakıldı. Çalışmada kullanılan primerlerin listesi tablo 8’de verildi.

<u>qRT-PCR karışımı</u>	<u>1X</u>
cDNA (1:8 dilue; total hacimde yaklaşık 20 ng)	3 µL
SYBR Green (ABI)	12.5 µL
Primer (10 µM)	0.5 µL
dH ₂ O	9 µL

RT-PCR için uygun 96 kuyucuklu plate kullanıldı. Örnekler dağıtıldıktan sonra plate’ in üzerine şeffaf yapışkanlı optik kapak yapıştırıldı. Plate cihaza yüklendi ve qRT-PCR için aşağıdaki program kullanıldı.

DNA Polimeraz aktivasyonu	95 °C	20 sn	} 40 döngü
Denatürasyon	95 °C	1 sn	
Bağlanma/Uzama	60 °C	20 sn	

qRT-PCR sonucunda $\Delta\Delta C_t$ metoduyla C_t (Threshold Cycle) değerleri kullanılarak rölatif gen ekspresyon seviyeleri RPL0’ya kıyaslanarak hesaplandı.

Tablo 8. qRT-PCR deneylerinde kullanılan primerlerin listesi

Gen	Primer Yön	Primer Dizi
SQLE	Forward	tccttgctcaggctctttatg
	Reverse	agggtaggagacaatacagaaag
HSD17B7	Forward	gaccttttgagtgtggctttg
	Reverse	acggaggcagaattccatag
HMGCOR	Forward	acagatactgggaatgcagag
	Reverse	ctgtcggcgaatagatacacc
LDLR	Forward	ttcactccatctcaagcatcg
	Reverse	actgaaaatggcttcggtgatg
DHCR7	Forward	atcaacctgccttcgcag
	Reverse	tggcagatgtcaatgtcttc
DHCR24	Forward	gtgaaacactttgaagccagg
	Reverse	agccatcaaacatctcccag
CYP51A1	Forward	gatggatactttcccactgtga
	Reverse	tctctcgaatgcctttgtgg
CYP51A	Forward	tgtgggtcattctcaaggc
	Reverse	catagggctagtacagaaggc
RPL0	Forward	cctctttcccttcggtgtg
	Reverse	aatcttggcatcagggacac

5.2.1.9. Klonlama

SQLE, CYP51A1, DHCR24 ve HSD17B7 cDNA' ları hücre hatlarından izole edilen RNA örnekleri kullanılarak 5.2.6.2'de tarif edildiği şekilde elde edildi. Ndi1 cDNA' sı maya genomik DNA'sı kullanılarak elde edildi. cDNA'lar tablo 9'da verilen primer çiftleri ile 5' ve 3' uçlara enzim kesim bölgeleri eklenerek PCR ile çoğaltıldı. PCR reaksiyonları Platinum Pfx DNA Taq polimeraz ile gerçekleştirildi.

<u>PCR Karışımı</u>	<u>1X</u>
DNA (100-200 ng)	1 µL
10X Buffer	5 µL
dNTP (10 mM)	1,5 µL
Primer Forward	1 µL
Primer Reverse	1 µL
MgSO ₄ (50 mM)	1 µL
<i>Pfx Taq</i> Polimeraz	1 µL
Enhancer Buffer	2.5 µL
<u>dH₂O</u>	<u>36.5 µL</u>
	50 µL

PCR koşulları

Başlangıç Denatürasyonu	94 °C	5 dk	} 35 döngü
Denatürasyon	94 °C	15 sn	
Bağlanma	55 °C	30 sn	
Sentez	68 °C	2 dk	
Son Sentez	68 °C	5 dk	
Bekleme	4 °C	∞	

Tablo 9. Klonlama çalışmalarında kullanılan primerlerin listesi

<u>cDNA</u>	<u>Primer</u>	
Ndi1	Forward	atgaattccatcacatcatcgaattac
	Reverse	atctcgagaaaaggcatgtaatttcattctataat
SQLE	Forward	atgaattcgccaccatgtggacttttctggcattgccact
	Reverse	atctcgagttaatgaaccataacttcatttctgagtaaattagagg
HSD17B7	Forward	atggatccgccaccatgcgaaagtggtttgatcaccgg
	Reverse	atgcggccgcttataggcatgagccactgagcctgg
CYP51A1	Forward	atgcggccgcgccaccatggcggcgccggctgg
	Reverse	atgcggccgctcattttgatcttcgtttgtaacggataac
DHCR24	Forward	atgcggccgcgccaccatggagcccgcctgtcg
	Reverse	atgcggccgctcagtgctggcggcctt

PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelde 100 voltta yürütüldü. PCR bantları UV transillüminatör altında görüntülenerek kesildi ve ependorf tüplere transfer edildi. PCR ürünlerinin jelden temizlenmesi QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, 28704) kullanılarak yapıldı.

- Kesilen jel parçasının üzerine 350 µL Buffer QG eklendi.
- 55 °C'de ısıtıcı blok üzerinde 10 dk inkübe edildi. Ara ara tüp hafifçe çalkalanarak jelin tamamen homojen olarak çözünmesi sağlandı.
- İnkübasyon sonrasında süspansiyon kit ile birlikte gelen PCR purification kolona transfer edildi.
- Kolon 12000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı atık uzaklaştırıldı.
- Kolona 700 µL yıkamak için Buffer PE konuldu. Kolon 12000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi.
- Yıkama bufferda bulunan etanolü tamamen uzaklaştırmak için kolon temiz bir tüpe alınarak 12000 rpm'de 30 sn boş santrifüj edildi.
- Kolon 1,5 mL'lik ependorf tüpe alındı. PCR ürününün elüsyonu için üzerine 30 µL EB buffer koyuldu. 1dk oda ısısında inkübe edildi.
- 12000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Ependorfta biriken PCR ürününün konsantrasyonu nanodrop cihazında ölçüldü.

Ekspresyon vektörleri olarak retroviral pMXs-IRES-blasticidin ve pMXs-IRES-puromycin plazmidleri kullanıldı. Kullanılan kesim enzimleri ve bufferlar tablo 10.'da verildi.

Restriksiyon Karışımı

DNA (plazmid ya da PCR ürünü)	1 µg
Enzim 1	1 µL
Enzim 2 (kullanılacak ise)	1 µL
Buffer	5 µL
dH2O	50 µL' ye tamamlanır.

Karışım 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. Kesilen ürünler ligasyondan önce QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Katalog No:28104) ile temizlendi. Buffer QG yerine 250 µl buffer PB koyuldu. Karışım birkaç kez pipetlenerek kit ile birlikte gelen

kolonlara transfer edildi. Takip eden aşamalar PCR ürünlerinin jelden ekstraksiyonunda tarif edildiği şekilde yapıldı.

Tek enzim ile kesilen vektör ve cDNA'lar ligasyon reaksiyonu öncesinde self-ligasyonu (vektörün insert olmadan kesilen uçlarının birbirine yapışması) önlemek adına Antartik Fosfataz (AP) (NEB, M0289S) ile muamele edildi. Bunun için kesilen DNA içerisine 1/10 oranında AP buffer ve 1 µL AP enzim konuldu. 37 °C'de 15 dk inkübe edildi. 70 °C ısıtıcı blok üzerinde 5 dk inkübe edilerek enzim inaktivasyonu yapıldı.

Tablo 10. Klonlama çalışmalarında kullanılan vektör ve kesim enzimlerinin listesi

Insert	Vektör	Restriksiyon Enzimi (NEB)	Buffer (NEB)
Ndi1	pMXs-IRES-blasticidin	EcoRI/XhoI	EcoRI
SQLI	pMXs-IRES-blasticidin	BamHI/NotI	Buffer 3.1
HSD17B7	pMXs-IRES-blasticidin	BamHI/NotI	Buffer 3.1
CYP51A1	pMXs-IRES-puromycin	NotI	CutSmart
DHCR24	pMXs-IRES-puromycin	NotI	CutSmart

Restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra temizlenen vektör ve klonlanacak cDNA ligasyon reaksiyonuna alındı. Self ligasyonun kontrolü için boş vektör DNA insert olmadan ligasyon reaksiyonuna alındı ve transformasyonda kullanıldı.

Ligasyon Karışımı

	<u>Boş Vektör</u>	<u>Vektör+ İnsert</u>
Vektör	1 birim (*)	1 birim (*)
İnsert	—	3 birim (*)
Buffer	7.5 µL	7.5 µL
T4 quick ligase	1 µL	1 µL
dH ₂ O	15 µL' ye tamamlandı	15 µL' ye tamamlandı.

(*):İnsert vektöre göre daha küçük yapıda olduğundan son konsantrasyonlarının birbirine eş olması için insertden 3 kat fazla miktarda konuldu. Örneğin hem vektör hem de insertin konsantrasyonları 30 ng/µL ise vektörden 1 µL kullanıldıysa insert edilen

cDNA' dan 3 µL kullanıldı. Reaksiyonlarda son konsantrasyonlar; vektör yaklaşık 30-50 ng, insert ise 80-100 ng oldu.

Ligasyon reaksiyonları oda ısısında 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda reaksiyonlar hemen buza kaldırıldı.

Ligasyon ürünleri kimyasal olarak kompetan hale getirilmiş ampisilin dirençli DH5α suşuna transforme edildi. Büyük konsantrasyonda bakteri üretileceği zaman ise ticari olarak satılan STL3 (OneShot STBL3, Invitrogen, C7373-03) suşları transformasyon için kullanıldı.

- -80 °C'de alikot olarak saklanan 30 µL kompetan hücre buz üzerinde çözüldü.
- 0,5 µL ligasyon ürünü (plazmid) 30 µL kompetan hücre içerisine konuldu.
- 42 °C'de 30 sn inkübe edilerek ısı şoku yapıldı. Tüp tekrar buza konuldu.
- Buz üzerinde 1-2 dk bekletildikten sonra içerisine 300 µL SOC besiyeri ilave edildi.
- Çalkalayıcı üzerinde 37 °C'de 1 saat inkübe edildi (recovery aşaması)
- İnkübasyon sonrası 50 µL bakteri ampisilin içeren LB-Agar plate'lere ekildi.
- Platelere 37 °C' de bir gece inkübe edildi.

STBL3 suşu da aynı protokol ile transforme edildi. Sadece recovery aşaması ve ekim sonrası inkübasyon 37 °C yerine 32 °C'de gerçekleştirildi.

Ertesi gün plataler kontrol edildi. İçerisinde insert olan vektör ile boş vektörün oluşturduğu koloniler kontrol edildi. Boş vektör ekilen plate de hiç koloni olmadığı ya da insert& vektör ligasyonu ekilen plate göre en az 10 kat az koloni olduğu durumlarda klonlama başarılı sayıldı. En az üç koloni seçilerek miniprep kit kullanarak plazmid izolasyonu yapıldı. Klonlamanın doğruluğu için plazmid ürünü DNA dizi analizine gönderildi.

5.2.1.10. MiniPrep Kit ile Plazmid İzolasyonu

a) Tek Koloni Süspansiyonu Hazırlanması: Petrilere tek koloniler 200 µL pipet ucu ile alınarak 1:1000 ampisilin içeren 4 mL SOC besiyerine alındı. Tüpler 37 °C'ye 250 rpm'de çalkalayıcı da bir gece bırakıldı.

b) Plazmid İzolasyonu: Tek koloni süspansiyonlarından plazmid izolasyonu QiaPrep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Katalog No: 27106) kullanılarak, aşağıdaki protokole göre yapıldı.

- 1.5 mL bakteri süspansiyonu eppendorf tüpe alındı. 12000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi.
- Supernatant atıldı. Pellet üzerine içerisine önceden RNase ilave edilmiş olan 250 µL Buffer P1 ilave edildi. İyi vortekslenerek pellet resüspanse edildi.
- 250 µL Buffer P2 ilave edildi ve tüp yaklaşık 6 kez aşağı yukarı çevrilerek karıştırıldı.
- 350 µL Buffer N3 ilave edildi ve tüp 6 kez aşağı yukarı çevrilerek karıştırıldı.
- 12000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Supernatant kit ile birlikte gelen kolonlara transfer edildi. Kolonlar 12000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi.
- Toplama tüpünde biriken atık döküldü. Kolona yıkama amaçlı 700 µL PE Buffer (EtOH içerir) konuldu.
- 12000 rpm'de 30 sn santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken atık döküldü. Kolon yeni bir toplama tüpüne transfer edildi.
- Kolonun kuruması için 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolon 1,5 mL eppendorf tüpüne transfer edildi. Üzerine 50 µL Elüsyon Buffer ya da dH₂O konuldu. 1 dk bekletildi. 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolon atıldı, eppendorfta birikin plazmid konsantrasyonu nanodropta ölçüldü.

5.2.1.11. Büyük Hacimli Bakteri Süspansiyonlarından Plazmid İzolasyonu

Yüksek miktarda plazmid (vektörler, viral plazmidler) izolasyonu için 150-200 mL kültürde büyütülen tek kolonilerden plazmid izolasyonu Plazmid Maxi Kit (Qiagen, Katalog No: 12165) kullanılarak, aşağıdaki protokole göre yapıldı.

- Bakteri süspansiyonu 3500 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pelletler izolasyon aynı gün yapılmadıysa -20 °C'de saklandı.
- Pellet 4 mL P1 Buffer ile resüspanse edildi. İyi vortekslenerek homojen karışım elde edildi.

- 4 mL Buffer P2 ilave edildi ve santrifüj tüpü 8 kez aşağı yukarı ters çevrildi, lizatın iyice viskoz hale geldiği görüldü. Lizatlar oda sıcaklığında 3 dk inkübe edildi.
- Lizata 4 mL Buffer S3 ilave edildi ve santrifüj tüpü 6 kez aşağı yukarı ters çevrildi ve lizat hiç bekletilmeden bir sonraki aşamaya geçildi.
- Lizat QIAfilter kartuşa transfer edildi ve 10 dk oda ısısında inkübe edildi.
- İnkübasyon sırasında kitle birlikte gelen spin kolonlar vakum manifolda yerleştirildi.
- Kit ile birlikte gelen piston inkübasyon sonrasında QIAfilter kartuşun içerisine yerleştirildi ve lizat yeni bir tüpe filtrelendi.
- Temiz lizata 2 mL Buffer BB eklendi ve tüp 6 kez aşağı yukarı ters çevrildi.
- Lizat ucunda hacmi genişletmeye yarayan uzantı ekli spin kolona transfer edildi.
- Vakum kaynağı çalıştırılarak süspansiyonun spin kolondan geçmesi sağlandı. Vakum kaynağı kapatıldı. Spin kolondaki uzantı atıldı.
- Spin kolon kit ile birlikte gelen 2 mL'lik toplama tüpüne transfer edildi. 0.7 mL Buffer ETR ilave edildi. 10000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı. 0.7 mL Buffer PE konularak kolon yıkandı. 10000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Toplama tüpünde biriken sıvı atıldı. Kolondan yıkama bufferını tamamen uzaklaştırmak için kolon tekrar 10000 g'de 1 dk santrifüj edildi.

Spin kolon 1,5 mL eppendorf tüpüne transfer edildi. DNA'nın elüsyonu için 200 µL Buffer EB konuldu ve kolon 1 dk oda ısısında bekletildi. Kolon 10000 g'de 1 dk santrifüj edildi. DNA konsantrasyonu nanodrop cihazında ölçüldü.

5.2.1.12. Transfeksiyon

pMXs retroviral ekspresyon vektörüne klonanan genler hücre hatlarına viral transfeksiyon yöntemi ile aktarıldı. Bu amaçla ilk olarak aşağıdaki yöntem ile virüs üretimi gerçekleştirildi.

a) Virüs Üretimi: Virüs üretimi için 293T hücreleri 6 well plate'e %20 FBS içeren DMEM içerisine ekildi (3×10^5 hücre/well), bir gece 37 °C, %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Virüs üretimi (6 well plate'in her bir kuyucuğu için);

- 1,5 µg pHCMV-AmphoEnv (Amphotropic Murine leukemia virus envelope gene) plazmidi
- 1,5 µg pMXs-insert plazmid (negatif kontrol için ise sadece boş vektör)
- 9 µL Fugene (Promega, E2691) Transfeksiyon solüsyonu,

FBS içermeyen 100 µL DMEM besiyeri içerisinde karıştırıldı. Karışımlar oda ısısında 30 dk inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası karışımlar 293T hücreleri ekili olan well'lere eklendi. Hücreler virüs üretimi için bir gece 37 °C, %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Ertesi gün besiyeri taze besiyeri ile değiştirildi ve hücreler tekrar inkübatöre kaldırıldı. Enfeksiyonun ikinci günü besiyeri toplandı ve 0,45 µM'lik enjektör filtresinden süzüldü. Toplanan virüsler -80 °C' derin dondurucuya kaldırıldı.

b) Hücre hatlarının virüslerle transfeksiyonu: Virüs ile enfekte edilecek hücreler bir gece önceden 6 well plate' lere 2 mL besiyeri içerisinde ekildi (2x10⁵ hücre/well). Enfeksiyon için besiyerine önce 2 µL Polybrene (8 mg/mL stok solüsyon) eklendi. Her bir kuyucuğa istenilen virüsten 1 mL eklendikten sonra plate bir peçeteye sarıldı ve 1 saat 2200 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası plate 37 °C'ye kaldırıldı. Bir gece inkübe edildikten sonra stabil transfeksiyon için antibiyotik seçilimi yapıldı. Bunun için hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve içerisinde kullanılan vektöre göre ya 1:2000 puromisin (2 mg/mL stok solüsyon) ya da 1:1000 blastomisin (10 mg/mL stok solüsyon) içeren besiyeri konuldu. Hücreler antibiyotikli besiyeri ile 3 gün inkübe edildiler. Bu sürede boş vektör ile enfekte eden hücrelerin öldüğü görüldü. Eksojen ekspresyon yaptırılan hücrelerden antibiyotikli besiyeri uzaklaştırıldı ve taze besiyeri eklendi. Ekspresyonun gerçekleşip gerçekleşmediği western blot ile doğrulandı.

5.2.2. KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yapılan Deneyler

5.2.2.1. *In Silico* Analizler

28 farklı kanser hücre hattının glukoz, glutamin ve kolesterol besini için duyarlılıkları tespit edildikten sonra bu besinlerin azlığında ya da yokluğunda hücre metabolizmalarındaki değişikliklerin genetik alt yapısını anlayabilmek için hücrelerdeki mutasyonların belirlenmesi amaçlandı. Hücre hatlarının sahip oldukları mutasyonlar yeni nesil dizileme yöntemi ile farklı organizasyonlar (İngiltere'de Sanger Institute, A.B.D'de Broad Institute, Memorial Sloan Kettering Cancer Center ve NIH) tarafından

yapılmış olup, veriler halka açık veri tabanlarında bulunmaktadır. Hücrelerimizdeki mutasyonların araştırılması için CCLE (87) veri tabanı kullanıldı. Her bir gende görülen farklı değişimlerin duyarlı veya dirençli bulunan hücrelerdeki dağılımı analiz edildi. İleri analizler hücrelerin besin duyarlılığında rolü olabilecek genetik değişimlerin tespit edilebilmesi amacıyla Microsoft Office Excel programında tablo oluşturularak yapıldı. Her bir besin için hücrelerdeki mutasyon dağılımı yapılırken duyarlı hücrelerde bulunan farklı değişimlerin tespit edilebilmesi amacıyla aşağıdaki yönergeden yararlanıldı:

1. Sadece duyarlı hücrelerde görülen mutasyonlar tabloya dahil edildi.
2. Sadece dirençli grupta görülen mutasyonlar tabloya dahil edilmedi.
3. Sadece orta duyarlı grupta yer alan hücrelerde görülen mutasyonlar tabloya dahil edilmedi.
4. Orta ve/veya dirençli gruptaki hücrelerde bulunan aynı genin farklı mutasyonları gösterilmedi, tabloda yalnızca o gen için duyarlı hücrelerdeki mutasyonlar verildi.
5. Bir hücre hattında aynı gen üzerinde birden fazla değişiklik olması durumunda değişikliklerden yalnızca biri orta grupta ve/veya dirençli grupta yer alan hücrelerde bulursa dahi varyasyon listeden çıkartılmadı.

Tablonun oluşturulmasıyla ortaya çıkan genler fonksiyonlarına göre sınıflandırıldı, mutasyonların glukoz, glutamin ve kolesterol metabolizmasına dair yollarda rolü olup olmadığı araştırıldı. Bu yollarda rolü olduğu düşünülen genler için ayrı bir tablo oluşturuldu. Bu tabloda ise duyarlı, orta duyarlı ve dirençli grupta var olan mutasyonlarda gösterildi.

İlgili besin için duyarlılıkta rolü olabileceğini düşündüğümüz genlerde görülen yanlış anlamlı (missense) değişimlerin protein fonksiyonuna etkisi web tabanlı SIFT/Provean (88, 89) programında analiz edildi. Alignment analizleri web tabanlı Clustal Omega (90) programında yapılarak değişim gözlenen dizilerin türler arasındaki korunmuşluk oranları kontrol edildi. Hem duyarlı hem de dirençli hücrelerde patolojik olabilecek mutasyonlar görüldüğünde bu genler değerlendirme dışında tutuldu. Dirençli hücrelerde tahmine yer bırakmayan patolojik mutasyonlar (anlamsız, çerçeve kayması) görüldüğünde bu genler de değerlendirme dışında tutuldu.

5.2.3. İstatistik Analizler

Hücre karışım deneyleri ve qRT-PCR deneyleri iki bağımsız deneyle tekrarlandı. Geri kalan tüm deneyler üç kez tekrar edildi. Hücre canlılık deneylerinde her bir grup en az tripliket olarak çalışıldı. Analizler ve grafikler GraphPad PrismV6 programında yapıldı. Korelasyon analizleri Microsoft Office Excel programında hesaplandı. R^2 değeri 0.5 ve üzeri olanlar pozitif ilişkili kabul edildi.

6. BULGULAR

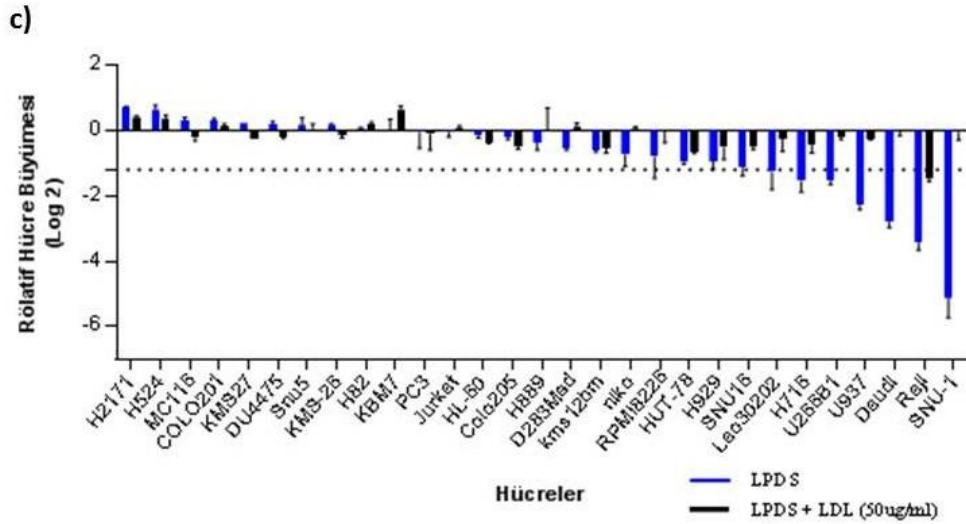
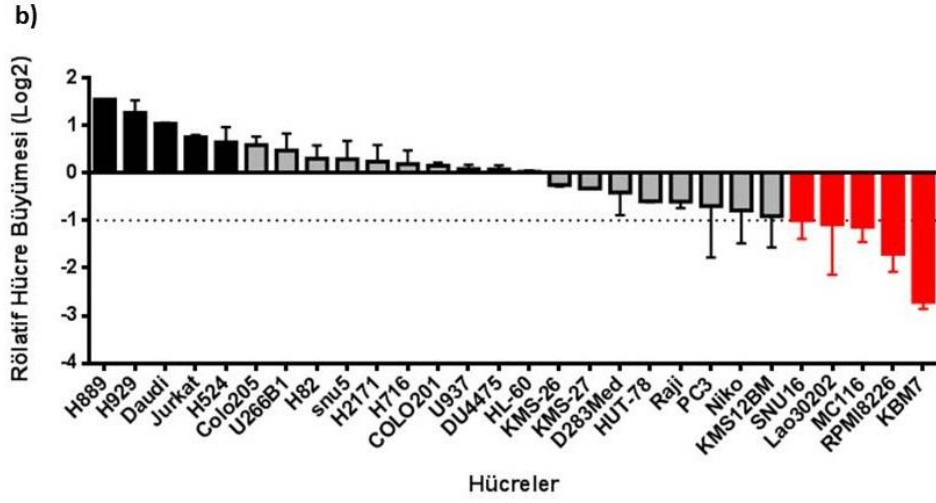
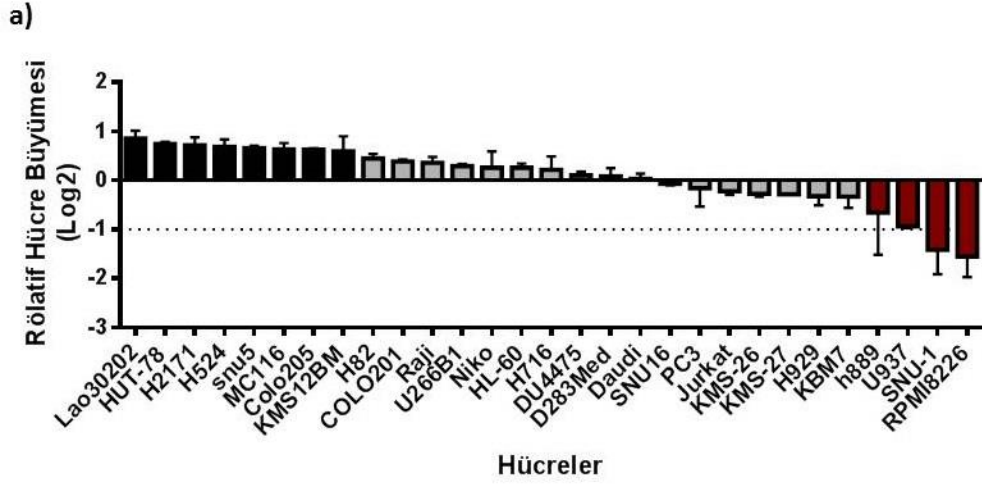
6.1. Kanser Hücrelerinin Besin Duyarlılıkları

Çalışmaya alınan 28 adet farklı kanser hücre hattının glukoz ve glutamin kısıtlamaları ile kolesterol besin yokluğuna duyarlılıkları barkodlu hücre karışım deneyleri ile belirlendi. Deney sonunda yeni nesil genom dizileme yöntemiyle elde edilen barkod sayılarından her bir hücre hattının ilgili deney grubunda ne kadar çoğaldığı kontrol grubuna oranlanarak Microsoft Excel programında rölatif çoğalma oranı hesaplandı ve grafikleri GraphPad Prism V6 programında çizildi.

Düşük (1 mM) glukozlu ortamda hücrelerin büyük çoğunluğunun çoğalabildikleri buna karşın H889, U937, SNU-1 ve RPMI 8226 hücre hatlarının çoğalamadıkları görüldü (Şekil 12a). Bu sonuç, bu hücrelerin yaşamaları ve çoğalabilmeleri için glukoz besinine ihtiyaç duyduklarını ve glukoz kısıtlamasına duyarlı olduklarını gösterdi.

Düşük glutaminli ortamda (50 μ M konsantrasyon) yapılan glutamin kısıtlaması deneylerinde ise SNU-16, Lao30202, MC116, RPMI 8226 ve KBM-7 hücrelerinin çoğalamadıkları görüldü (Şekil 12b). Bu hücreler glutamin kısıtlaması için duyarlı olarak tespit edildi.

Çalışmamızda kolesterolün kanser hücre çoğalmasında önemli bir besin olup olmadığını anlamak için barkodlu hücreler LDL içermeyen serumla hazırlanan besiyerinde çoğaltıldılar. Kontrol için aynı serum ile yapılan besiyeri içerisine 1:500 oranında LDL ilavesi yapıldı. SNU-1, Raji, Daudi, U937 ve U266 hücre hatlarının kolesterol yokluğuna duyarlı oldukları tespit edildi (Şekil 12c).



Şekil 13. Barkodlu hücre karışım deneyleri. Deneylerin sonucunda hücrelerin a) glukoz, b) glutamin kısıtlamaları ve c) kolesterol yokluğunda çoğalma grafikleri.

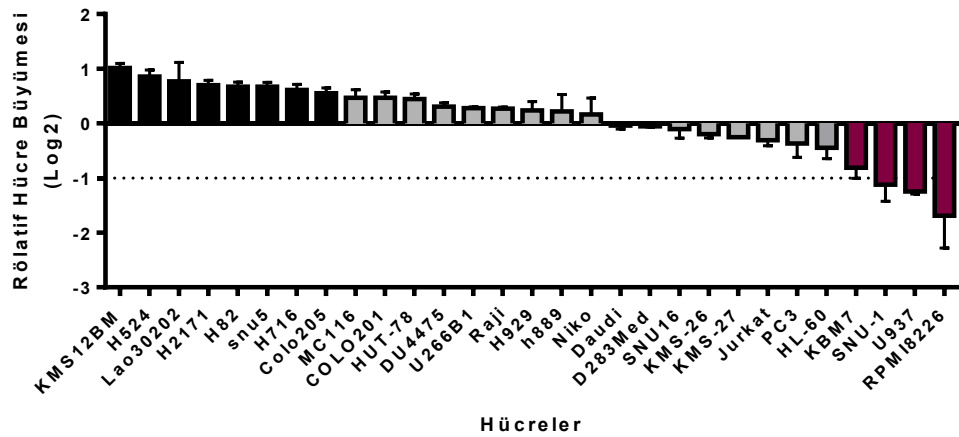
6.1.1. Kanser Hücrelerinin Glukoz Besin Duyarlılığı

6.1.1.1. Düşük Glukoz ve Düşük Glutaminli Ortamda Hücre Çoğalması

Düşük glukozlu ortamda yapılan hücre karışım deneyi düşük glukoz ve düşük glutaminli ortamda da gerçekleştirildi. Deney sonunda, düşük glukozlu ortamda çoğalan hücrelerin aynı zamanda düşük glukoz ve düşük glutaminli ortamda da çoğalmaya devam ettikleri bulundu (Şekil 13). Bu sonuçlar, bu hücrelerin glukozun az olduğu ortamda glutamine bağımlı olmadıklarını düşündürdü.

6.1.2. Kanser Hücrelerinin Glutamin Besin Duyarlılığı

Kanser hücre hatlarının glukoz bağımlılığında rolü olabilecek moleküler mekanizmaları araştırmak için çalışmada kullanılan hücre hatlarının gen ekspresyon profilleri CCLE veri tabanından elde edildi. Ekspresyon seviyesindeki değişiklikler ile glutamin duyarlılığında rolü olabilecek genler tespit edildi.



Şekil 14. Düşük glukoz ve düşük glutaminli ortamda hücrelerin çoğalması.

6.1.2.1. Hücrelerin Glutamin Duyarlılığı ile İlişkili Olabilecek Gen Ekspresyonları

Kanser hücrelerinin glutamin besin kısıtlamasına karşı duyarlılığında rolü olabilecek genler korelasyon hesaplamasıyla bulundu. Çalışmamızdaki hücre hatlarının gen ekspresyon profilleri CCLE veri tabanından çıkarılarak deney sonuçları ile korelasyonu Microsoft Office Excel programında hesaplandı. Glutamin duyarlılığı ile pozitif korele bulunan ilk 20 gen (Tablo 11) ve negatif korele bulunan 20 gen (Tablo 12) listesi çıkarıldı. Pozitif korelasyon gösteren genlerden en dikkat çekici olanları

ATP6V1B2 (ATPaz, H⁺ transportu, Lizozomal 56/58kDA, V1 alt ünite B2), *ABAT* (4-Aminobütirat Aminotferaz), ve *MECP2* (metil CpG bağlayıcı protein)'dir. Negatif korele bulunan genlerin çoğunluğu transkripsiyon faktörleri oluşturmaktadır. Glutamin ve glukoz metabolizmalarında rol alan *GPD1* (Gliserol-3-fosfat dehidrojenaz 1), *PDHA2* (Piruvat dehidrojenaz (Lipoamid) Alfa 2) ve *IMPDH1* (Inozin 5'-monofosfat dehidrojenaz 1) genleri de negatif korele bulundu.

Tablo 11. Glutamin duyarlılığı ile pozitif korele bulunan genler

Gen	Fonksiyon	R değeri
<i>GPR133</i>	Sinyal ileti	0,73023
<i>KLHL29</i>	Transkripsiyon	0,64118
<i>ATP6V1B2</i>	Oksidatif fosforilasyon	0,62652
<i>ABAT</i>	Glutamin metabolizması	0,6219
<i>CSMD2</i>	Plazma membran	0,61554
<i>PYDC1</i>	Plazma membran	0,61478
<i>CLN8</i>	Glutamin, lipid ve kolesterol metabolizması	0,5991
<i>YPEL5</i>	Hücre döngüsü	0,59226
<i>RIMS2</i>	Membran ekzositoz	0,58829
<i>LOC100507448</i>	Tanımlanmamış	0,58677
<i>ZMYM5</i>	Transkripsiyon	0,58294
<i>MECP2</i>	DNA metilasyonu	0,58283
<i>DENR</i>	Translasyon	0,58033
<i>MAFB</i>	Transkripsiyon faktör	0,57883
<i>LOC100506691</i>	Tanımlanmamış	0,57749
<i>CNOT7</i>	Ekzonukleaz	0,57608
<i>VBP1</i>	Protein katlanması	0,57434
<i>ZSCAN18</i>	Transkripsiyon	0,57239
<i>ZMYM2</i>	Transkripsiyon	0,57076
<i>C5orf54</i>	Tanımlanmamış	0,56165

Tablo 12. Glutamin duyarlılığı ile negatif korele bulunan genler

Gen	Fonksiyon	R değeri
<i>TTC27</i>	Bilinmiyor	-0,5981
<i>EIF5B</i>	Translasyon	-0,601
<i>GPD1</i>	Glikoliz	-0,6038
<i>MITF</i>	Transkripsiyon Faktör	-0,6039
<i>PDHA2</i>	Krebs döngüsü	-0,6079
<i>IMPDH1</i>	Guanin nükleotid sentezi	-0,6094
<i>UTF1</i>	Transkripsiyon Faktör	-0,6132
<i>SCN2B</i>	Transport	-0,6211
<i>C16orf89</i>	Bilinmiyor	-0,6243
<i>TFAP2B</i>	Transkripsiyon Faktör	-0,6352

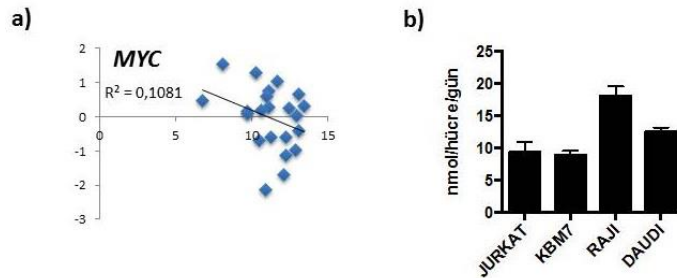
Tablo 12. Glutamin duyarlılığı ile negative korele bulunan genler (devam)

<i>TEX13A</i>	Transkripsiyon Faktör	-0,6478
<i>C10orf53</i>	Bilinmiyor	-0,6488
<i>AMMECR1</i>	Alport Sendromu ilişkili gen	-0,6504
<i>GAST</i>	Sinyal ileti	-0,6539
<i>LOC647323</i>	Bilinmiyor	-0,6573
<i>SIGLEC9</i>	Hücre adhezyon	-0,6599
<i>KCNA6</i>	Transport	-0,6612
<i>FOXH1</i>	Transkripsiyon Faktör	-0,6836
LOC388948	Bilinmiyor	-0,7003
<i>CCDC19</i>	Hücre Sil Oluşumu	-0,8072

6.1.2.2. Glutamin Bağımlılığının *MYC* Onkogeni ile İlişkisi

Düşük glutaminli ortamda çoğalamayan hücrelerde *MYC*'in rolü olup olmadığı araştırıldı. Nutrostat'da kullanılan 28 hücre hattındaki *MYC* ekspresyon seviyeleri CCLE veritabanından alınarak Microsoft Office Excel Programında grafik olarak çizildi. Aynı programda korelasyon hesaplaması yapıldı. Elimizdeki hücre hatlarının neredeyse tamamının *MYC* eksprese eden hücreler olduğu bulundu. Duyarlı ve dirençli hücreler arasında *MYC* ekspresyonu ile hücrelerin glutamin besin kısıtlamasına duyarlılıkları arasında bir ilişki tespit edilemedi ($R^2=0.108$) (Şekil 14a).

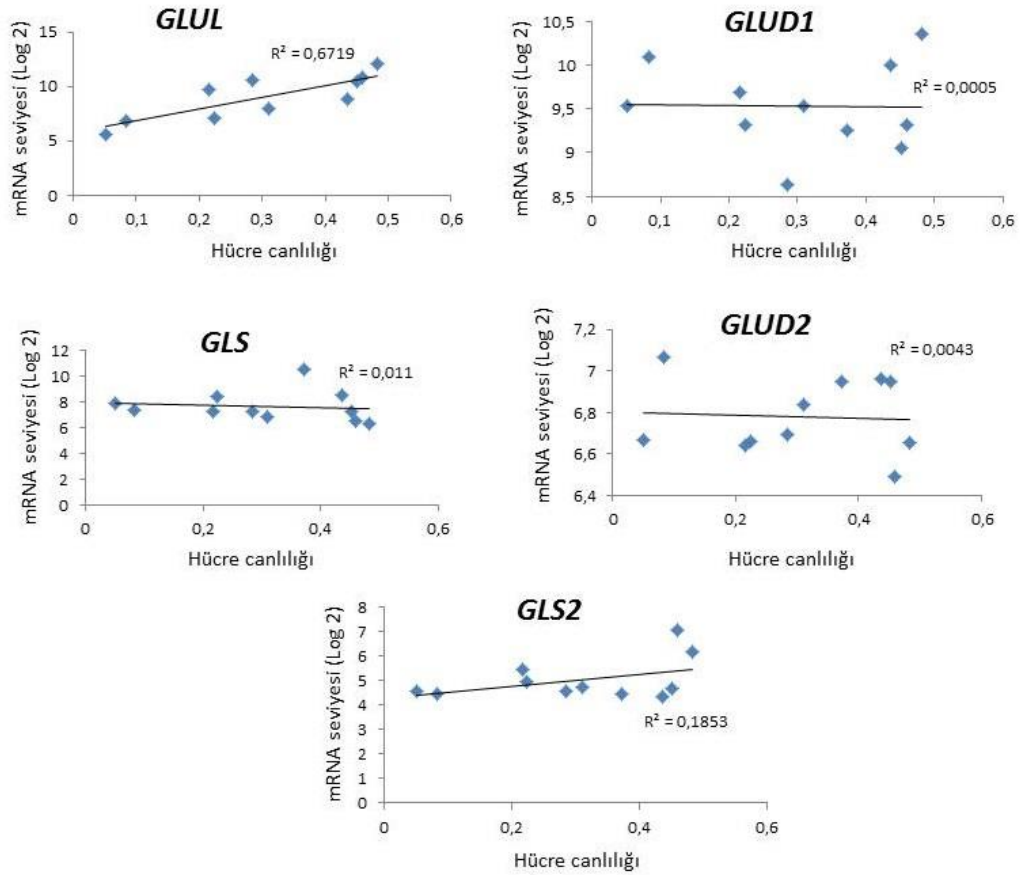
Hücrelerin glutamin tüketimlerinde *MYC* pozitifliğinin etkisini görmek amacıyla hücrelerin günlük glutamin kullanımları hesaplandı. *MYC* onkogen aktivasyonu olduğu bilinen Burkitt Lenfoma hücre hatları olan Raji ve Daudi hücrelerinin lösemi hücre hatları olan Jurkat ve KBM7 hücre hatlarına kıyasla daha fazla glutamin tükettikleri bulundu (Şekil 14b).



Şekil 15. Glutamin duyarlılığı ile *MYC* onkogen ekspresyonu arasındaki ilişkinin araştırılması. a) hücrelerin *MYC* ekspresyonları ile korelasyon hesaplaması, b) hücrelerin günlük glutamin tüketimleri.

6.1.2.3. Glutamin Metabolizmasında Rol Alan Genlerin Ekspresyonun Belirlenmesi

Glutamin metabolizmasında rol alan glutaminaz (*GLS*, *GLS2*), glutamat dehidrojenaz (*GLUD1*, *GLUD2*) ve glutamin sentetaz (*GLUL*) gen ekspresyonlarının 11 adet aynı zamanda barkod deneylerinde kullanılan hücre hatlarımızdaki ekspresyon seviyeleri CCLE veri tabanından kontrol edilerek, korelasyon hesaplaması Microsoft Office Excel programında yapıldı. *GLUL* gen ekspresyonu ile hücrelerin glutamin besin kısıtlaması arasında pozitif korelasyon bulundu ($R^2=0.67$). Bu da bize *GLUL*'in hücrelerin glutamin besin azlığına dirençli olmalarında rolü olabileceğini düşündürdü (Şekil 15).

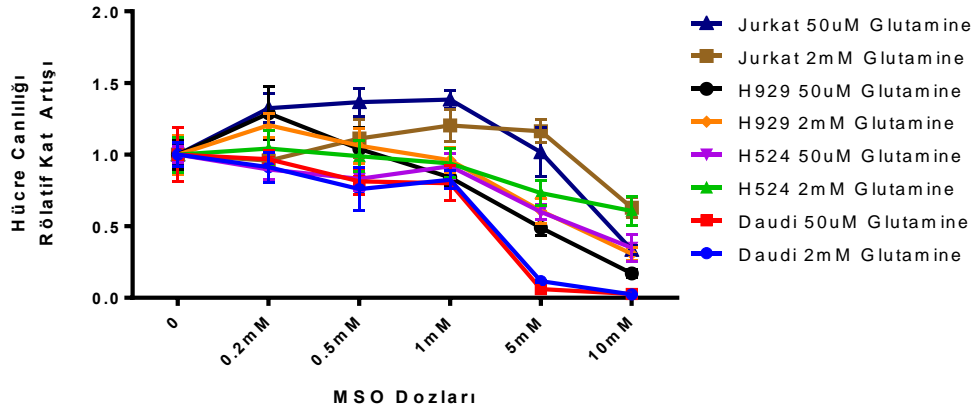


Şekil 16. Glutamin metabolizmasında rol alan genlerin ekspresyon seviyeleri ile korelasyon hesaplanması. *GLUL*, *GLUD1*, *GLS*, *GLUD2*, ve *GLS2* gen ekspresyon seviyeleri CCLE veri tabanından belirlendi. Hücrelerin glutamin duyarlılıklarındaki etkisini belirlemek için her bir gen ekspresyonu ile korelasyon hesaplandı.

6.1.2.4. Glutamin Sentetaz İnhibisyonu

GLUL ekspresyonunun glutamin besini kısıtlamasında gerçekten önemli olup olmadığını anlamak için glutamin sentetaz inhibitörü olan Metiyonin Sülfoksamin (MSO) kullanıldı. Dirençli bulunan hücrelerden Jurkat, H524, H929 ve Daudi hücre hatları 0, 0.2, 0.5, 1, 5 ve 10 mM konsantrasyonlarda MSO ile 4 gün süreyle muamele edildiler. İlaç muamelesi hem düşük hem de yüksek glutaminli ortamda yapıldı. 4 günün sonunda hücre canlılıkları Cell TiterGlo Assay kullanılarak kontrol edildi.

MSO 5 mM konsantrasyonda Daudi hücrelerini öldürürken, diğer hücreler üzerinde beklenen etkiyi sağlamadı. İlaç etkisinin düşük ve yüksek glutaminli ortamda farklı etkide bulunmadığı görüldü (Şekil 17).

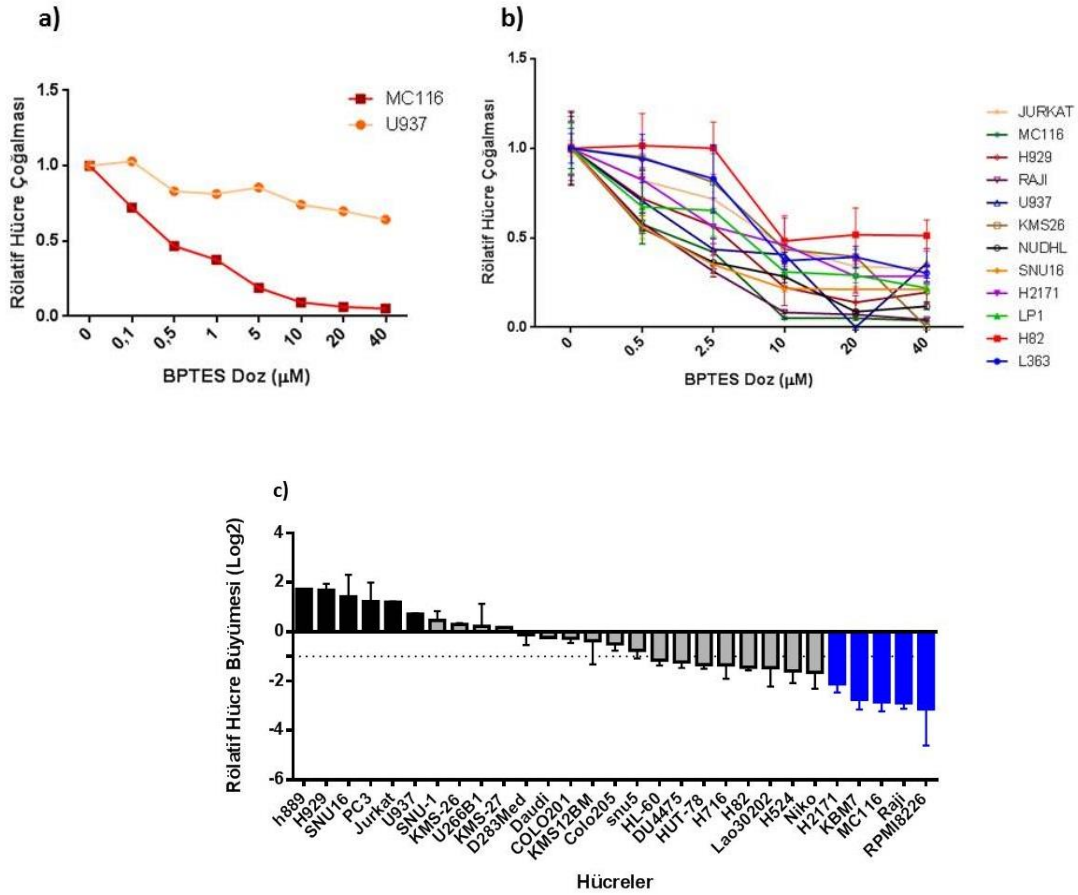


Şekil 17. MSO' nun glutamin kısıtlamasına dirençli hücrelerde etkisi.

6.1.2.5. Glutaminaz Enziminin BPTES ile İnhibisyonu

Glutaminin hücrelerdeki önemini daha iyi anlayabilmek için glutamin besin kısıtlamasına ek olarak hücrelerin glutamin yıkımları engellendi. Bu amaçla hücreler glutaminaz inhibitörü olan BPTES ile muamele edildi. İlk olarak MC116 ve U937 hücre hatlarını 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20 ve 40 µM konsantrasyonlarda BPTES ile muamele edildi. U937 hücre hattı MC116'ya göre BPTES'e daha dirençli bulundu (Şekil 17a.). Benzer şekilde U937 glutamin kısıtlamasında dirençli, MC116 ise duyarlı olarak bulunmuştu (Şekil 12b). Daha sonra rastgele seçilen 12 adet hücre hattı BPTES ile muamele edildi. NUDHL, Snu-16, MC116, ve Raji hücre hatları BPTES'e duyarlı oldukları görüldü (Şekil 17b). Daha fazla hücre hattında BPTES'i denemek için

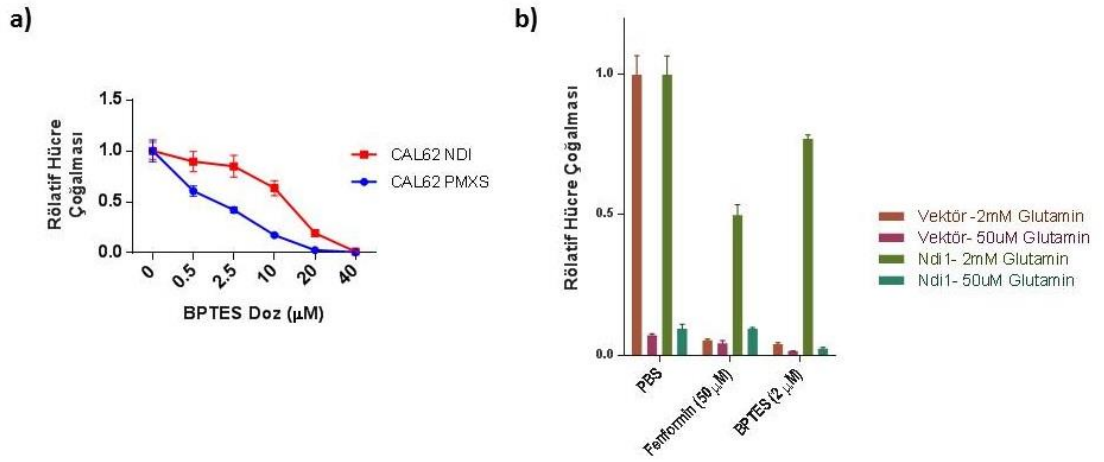
barkodlu hücre miksi deneyi kuruldu. Barkodlu 28 farklı hücre hattı aynı flask içinde 2 hafta süreyle 2 μ M BPTES ile muamele edildi. Kontrol grubu ise BPTES içermeyen normal RPMI besiyeri içerisinde çoğaltıldı. 2 hafta sonunda DNA izolasyonu yapılarak ilaç muamele yapılan ve yapılmayan örnekler yeni nesil DNA dizi analizine gönderildi. Sonuçlar Microsoft Office Excel programında analiz edilerek grafikler ise GraphPad Prism V6 programında çizildi. 2 μ M BPTES ile muamele sonunda çoğalamayan hücrelerin (Niko, H2171, KBM7, MC116, Raji ve RPMI 8226) glutamin besin kısıtlamasında da duyarlı bulunan hücreler olduğu görüldü (Şekil 17c).



Şekil 18. BPTES' in hücre hatlarında denenmesi. a) Glutamine duyarlı (MC116) ve dirençli (U937) hücre hatlarında BPTES denemesi, b) 12 farklı hücre hatında BPTES doz denemesi, c) BPTES ile barkodlu hücre deneyi.

Glutaminoliz inhibisyonunun oksidatif fosforilasyona etkisini görmek amacıyla Ndi1 eksprese eden ve etmeyen CAL62 hücreleri 0, 0.5, 2.5, 10, 20 ve 40 μ M BPTES ile 5 gün boyunca muamele edildiler. Hücre canlılıkları ölçüldüğünde Ndi1 eksprese eden hücrelerin BPTES'e karşı daha dirençli oldukları görüldü (Şekil 18a). BPTES'in

aynı zamanda oksidatif fosforilasyonu inhibe eden bir ilaç olup olmadığını doğrulamak için aynı deney BPTES' e ilaveten oksidatif fosforilasyon inhibitörü olduğu bilinen fenformin ile tekrarlandı. Ndi1 eksprese eden hücreler beklenildiği gibi fenformine karşı daha dirençli bulundu. Aynı şekilde Ndi1 eksprese eden hücreler BPTES' e karşı dirençli bulundular (Şekil 18b). Ndi1 ekspresyonunun fenformin ve BPTES muamelelerine aynı sonucu vermesi BPTES' in oksidatif fosforilasyonu hedef alan bir ilaç olduğunu düşündürdü.



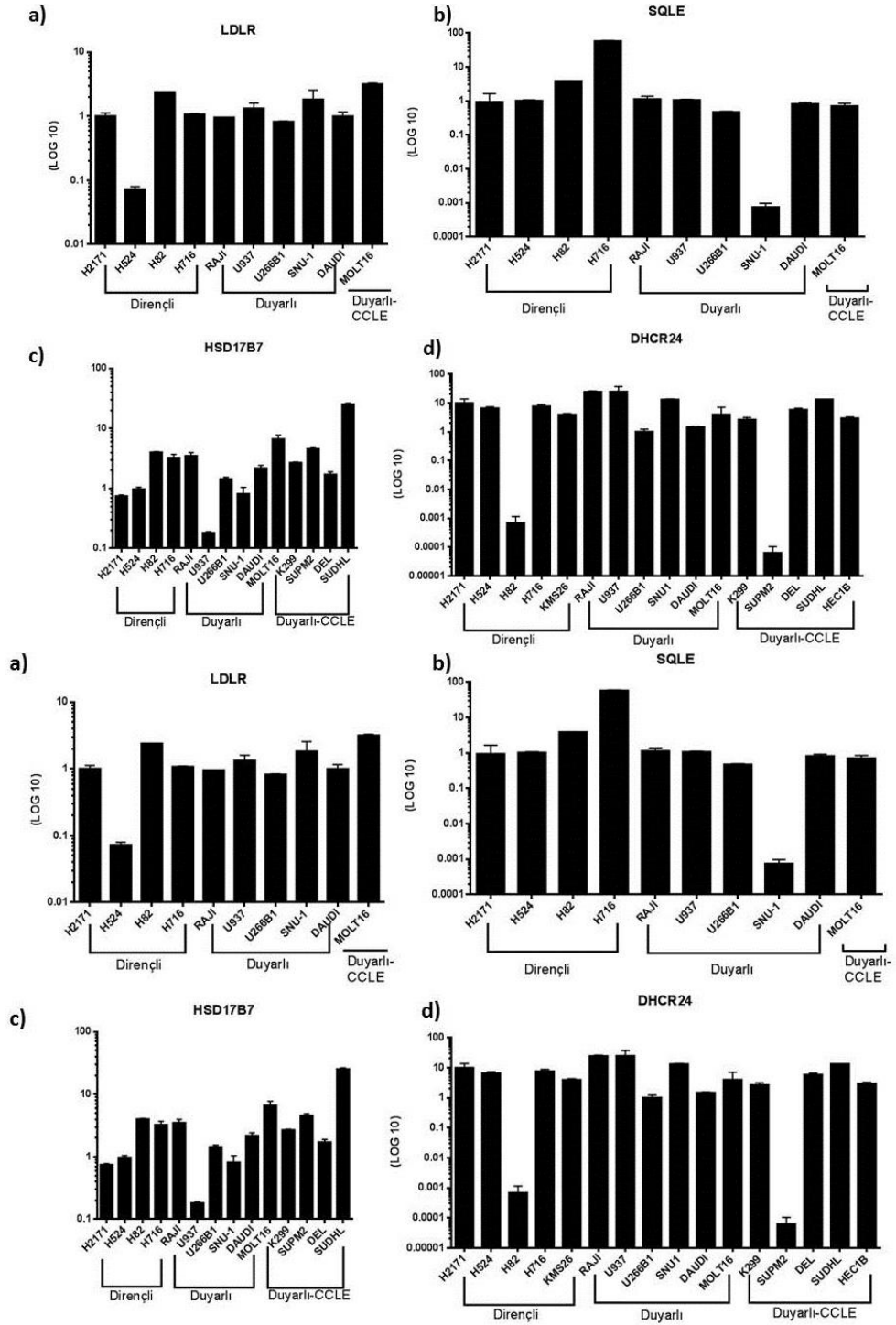
Şekil 19. BPTES' in oksidatif fosforilasyona etkisi. a) Ndi1 eksprese eden ve etmeyen CAL62 hücre hattında BPTES etkisi, b) BPTES ve oksidatif fosforilasyon inhibitörü olduğu bilinen Fenforminin karşılaştırılması.

6.1.3. Kanser Hücrelerinin Kolesterol Açlığına Duyarlılığı

6.1.3.1. Kolesterol Biyosentezinde Rol Alan Genlerin Ekspresyon Seviyeleri

CCLE veri tabanında yer alan yaklaşık bin adet hücre hattında kolesterol biyosentezinde rol aldığı bilinen genlerin (Şekil 8) ekspresyonları veri tabanında kontrol edildi. Bu analizlerde *HSD17B7*, *SQLE*, *CYP51A1*, *DHCR24*, *DHCR7* ve *LIPA* gen ekspresyonları düşük olan hücreler tespit edildi. Bu hücreler içerisinde barkodlu hücre karışım deneyimizde kullandığımız hücrelerin dışında labotaruarda bulunan hücrelerden SUDHL, SUPM2, Del, K299 ve Hec1B hücre hatlarında da gen ekspresyonları düşük bulundu. Gen ekspresyonları tüm bu hücre hatlarında (barkod deneyinde kullanılan ve CCLE'den tespit edilenler) kantitatif Real-Time PCR yöntemiyle kontrol edildi (Şekil 20). Bazı genlerin ekspresyonlarının düşük bulunması duyarlı hücrelerde kolesterol

biyosentezinin defektif olabileceğini ve bu nedenle de dışarıdan kolesterole ihtiyaç duyduklarını düşündürdü.

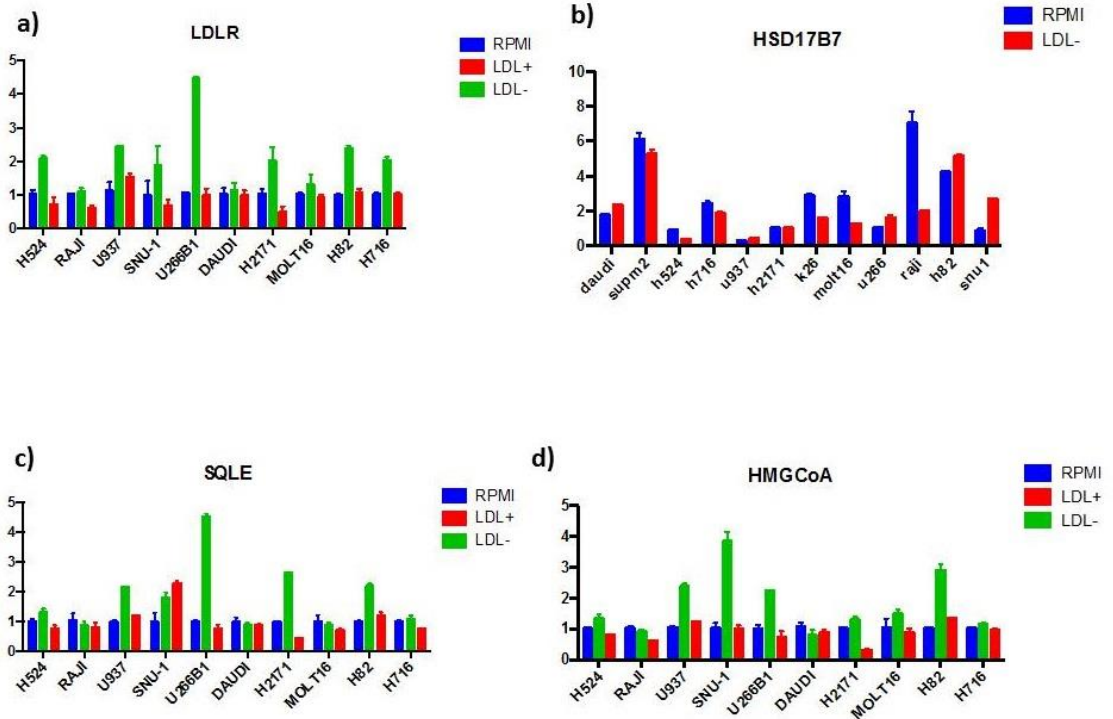


Şekil 20. Kolesterol biyosentezinde rol alan genlerin ekspresyon seviyeleri. Ekspresyonlar kolesterol içeren normal RPMI besiyerinde büyütülen hücrelerden elde edilen RNA'lar kullanılarak qRT-PCR yöntemi ile belirlendi. CCLE: Cancer Cell Line Encyclopedia veritabanından belirlenen hücre hatları.

6.1.3.2. Kolesterol Biyosentezi Regülasyonunun Kontrolü

Hücrelerde kolesterol biyosentezi genlerinin kolesterol olmayan ortamda artırılıp artırılmadığının diğer bir ifadeyle gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde bir sorun olup olmadığını kontrol etmek amacıyla kolesterol içermeyen ortamda duyarlı ve dirençli hücrelerde *LDLR*, *SQLE*, *HMG-CoA* ve *HSD17B7* gen ekspresyonları kantitatif Real-Time PCR ile analiz edildi (Şekil 19).

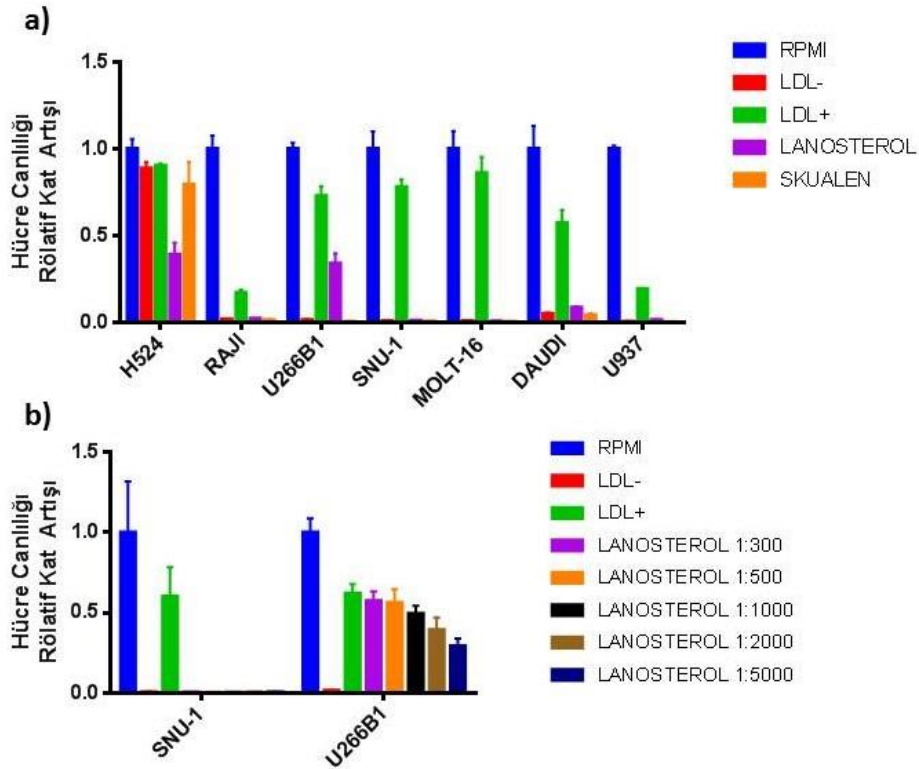
Duyarlı ve dirençli hücrelerden seçilen bir grup hücrede yapılan deneyde çoğu hücrede LDL içermeyen ortamda *LDLR* ekspresyonunun arttığı, ancak Raji ve H716 hücre hatlarında *LDLR* ekspresyonunun artmadığı tespit edildi. Benzer şekilde hücrelerin çoğunun *SQLE*, *HMG-CoA* ve *HSD17B7* ekspresyonlarını kolesterol olmadığı durumlarda arttırdıkları görüldü. Ancak SNU-1, MOLT16, H716, ve H524 hücre hatlarının *SQLE*'yi arttıramadıkları, MOLT16, H716 ve Raji hücrelerinin ise *HMG-CoA* ekspresyonunun kolesterolsüz ortamda artmadığı belirlendi. H524, H716, KMS26 ve yine Raji hücrelerinde ise *HSD17B7*'nin regüle edilemediği görüldü



Şekil 21. LDL içeren ve içermeyen ortamda kolesterol metabolizmasında görevli genlerin ekspresyonlarının qRT-PCR analizi a) *LDLR*, b) *HSD17B7*, c) *SQLE* ve d) *HMG-CoA* gen ekspresyon değişimleri.

6.1.3.3. Kolesterol Yokluğuna Duyarlı Hücrelere Lanosterol İlavesi

Kolesterol açlığına duyarlı ve kolesterol biyosentezinin defektif olabileceği düşünülen hücrelere kolesterol biyosentezi ara basamak ürünleri lanosterol ve skualen ilave ederek kolesterol biyosentezine devam edip edemedikleri kontrol edildi. Bu amaçla kolesterol açlığına dirençli H524 (kontrol için) ve kolesterol açlığına duyarlı Raji, U266B1, SNU-1, MOLT-16, Daudi ve U937 hücre hatlarına skualen ve lanosterol ilaveleri yapıldı. Sadece U266B1 hücre hattının lanosterol ilavesiyle kolesterolsüz ortamda yaşayabildiği tespit edildi (Şekil 22a). SQLE ekspresyonu düşük olan SNU-1 hücrelerinin lanosterol ve skualen ilavesiyle kolesterol içermeyen ortamda yaşayamaması nedeniyle farklı dozlar denendi. Kontrol amaçlı lanosterol ilavesiyle fenotipi düzelen U266B1 hücreleri SNU-1 hücreleri ile birlikte deneyde kullanıldı. Farklı dozlarda lanosterol ilave edilmesiyle U266B1 hücreleri yaşamaya devam ederken SNU-1 hücrelerinin çoğaldıkları tespit edildi (Şekil 22b).

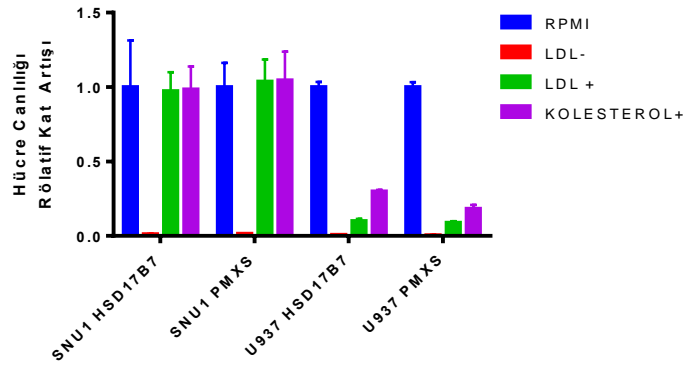


Şekil 22. Kolesterol duyarlılığında hücrelere lanosterol ve skualen ilavesinin etkisi. a) Hücrelere kolesterol biyosentezi ara basamak ürünleri lanosterol ve skualen ilavesi, b) farklı lanosterol dozlarının denenmesi.

6.1.3.4. Kolesterol Biyosentezi Genleri Overekspresyonları

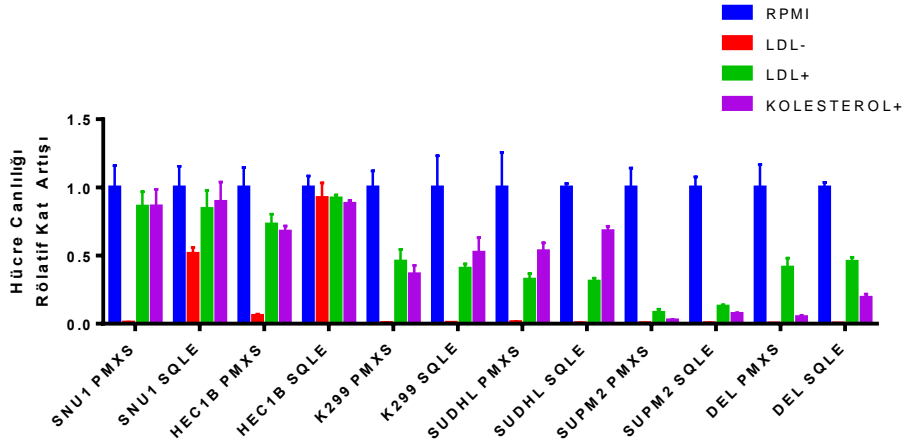
Kolesterole duyarlı ve kolesterol biyosentezinde rol alan genlerden ekspresyonları düşük olduğu tespit edilen genler hücrelerde overeksprese ettirildi.

HSD17B7 Geninin Overekspresyonu: Kolesterol açlığına duyarlı olarak bulunan ve *HSD17B7* geninin ekspresyonunun düşük olduğu tespit edilen U937 hücreleri *HSD17B7* cDNA'sı taşıyan viral vektörlerle transfekte edildi ve kolesterol duyarlılık deneyi kuruldu. *HSD17B7* eksprese ettirilen U937 hücreleri de kolesterol açlığına duyarlı olarak bulundular (Şekil 22).

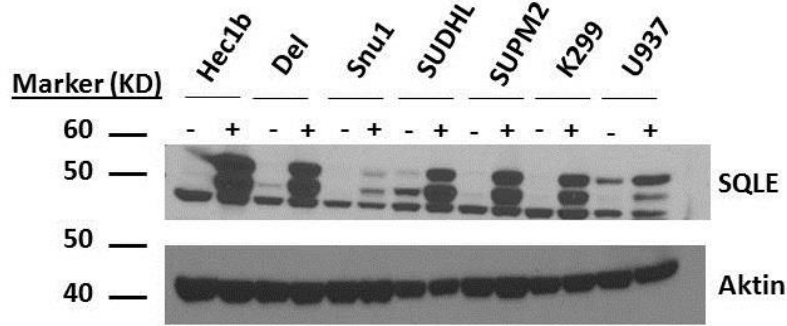


Şekil 23. *HSD17B7* overekspresyonu. *HSD17B7* ekspresyonu düşük bulunan hücrelerde overekspresyon ile kolesterol duyarlılığının değişip değişmediği araştırıldı.

SQLE Geninin Overekspresyonu: Kolesterol yokluğuna duyarlı bulunan hücrelerde *SQLE* gen ekspresyonu düşük olan Hec1b, Del, SNU-1, SUDHL, SUPM2 ve K299 hücrelerinde viral enfeksiyona ile *SQLE* geni overeksprese ettirildi. Hücrelerin kolesterolsüz ortamda çoğalıp çoğalamadıkları hücre canlılık testi ile kontrol edildi. SNU-1 ve Hec1b hücre hatlarının *SQLE* overekspresyonu ile kolesterolsüz ortama dirençli hale geldikleri görüldü (Şekil 23). Ekspresyonun çalışıp çalışmadığı Western Blot ile kontrol edildi (Resim 1). Bu durum SNU-1 ve Hec1b hücre hatlarının *SQLE* ekspresyonunun düşük olması nedeniyle kolesterol biyosentezini gerçekleştiremeyip, dışarıdan kolesterole ihtiyaç duyduklarını gösterdi.

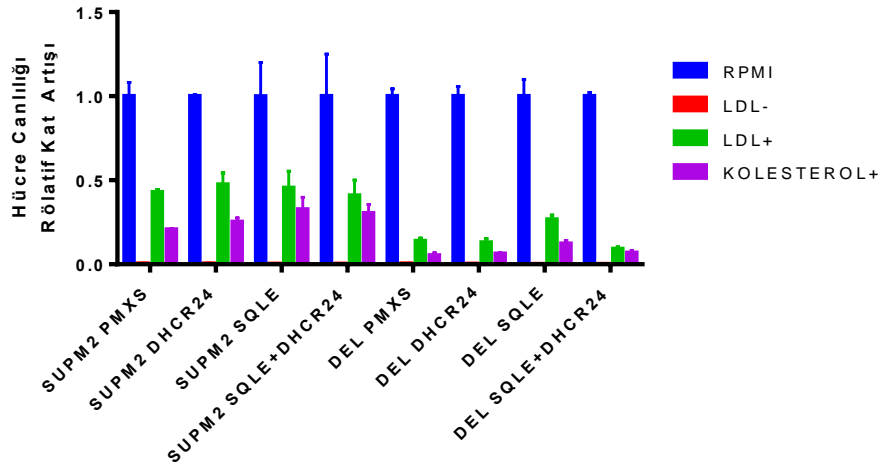


Şekil 24. *SQLE* overekspresyonu. *SQLE* overekspresyonu ile hücrelerin kolesterol duyarlılığının değişip değişmediği belirlendi.



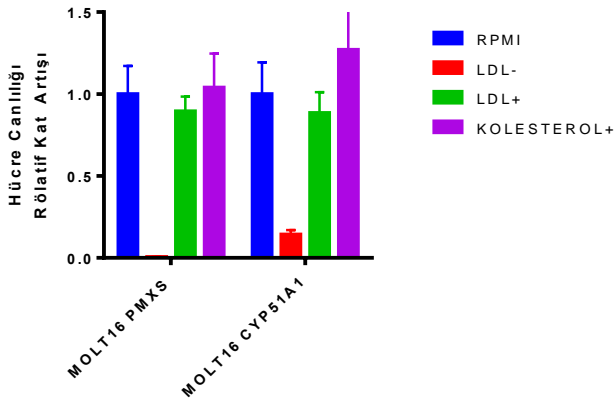
Resim 1. *SQLE* overekspresyonunun western blot ile doğrulanması.

DHCR24 ve *SQLE* Genlerinin Birlikte Eksprese Ettirilmesi: *SQLE* gen ekspresyonu düşük bulunup, *SQLE* overeksprese ettirilen DEL, SUPM2, SUDHL, K299 hücre hatları kolesterol yokluğuna yine duyarlı bulundu. Real-Time PCR sonuçları yeniden analiz edildiğinde SUPM2 ve DEL hücre hatlarında *SQLE* genine ilaveten kolesterol biyosentezi genlerinden *DHCR24* geninin de ekspresyonunun düşük olduğu tespit edildi. Daha önce *SQLE* overeksprese ettirilen bu hücrelere *DHCR24* da aynı retroviral sistemle eksprese ettirildi. Kontrol amacıyla, bu hücre hatlarında *DHCR24* tek başına eksprese ettirildi. Ancak bu iki geni eksprese eden veya yalnızca *DHCR24* eksprese eden hücrelerde de kolesterol yokluğuna duyarlılıkta bir değişim gerçekleşmedi (Şekil 24).



Şekil 25. *SQLE* ve *DHCR24* genlerinin birlikte overeksprese ettirilmesi

CYP51A1 Geninin Overekspresyonu: Kolesterolle duyarlı olarak bulunan MOLT16 hücre hattında ise *CYP51A1* geni ekspresyonunun oldukça düşük olduğu bulundu ve bu hücelere de *CYP51A1* geni aynı retroviral sistemle overeksprese ettirildi. *CYP51A1* geni overeksprese eden hücreler kolesterolsüz ortamda eksprese etmeyen hücelere göre daha iyi çoğaldılar. Böylece MOLT16 hücreleri içinde *CYP51A1* gen ekspresyonunun düşük olması nedeniyle hücrelerde kolesterol biyosentezinin tamamlanamadığı bulundu (Şekil 25).



Şekil 26. *CYP51A1* overekspresyonu. MOLT16 hücre hattında *CYP51A1* overekspresyonunun kolesterol duyarlılığına etkisi araştırıldı.

6.1.4. Hücrelerin Besin Duyarlılığında Genetik Varyasyonların Rolü

Kullanılan hücre hatlarının besinlere olan duyarlılıklarında sahip oldukları genetik varyasyonların rolünü araştırmayı amaçladık. Bu amaçla çalışmalarda kullanılan hücre hatlarının genom dizileme sonuçlarına CCLE veritabanından ulaşıldı ve hücre hatlarında mutasyonların dağılımı belirlendi. Sadece duyarlı hücrelerde görülen farklı varyasyonları tespit edebilmek amacıyla yöntem bölümünde belirtilen yönerge izlenerek bir tablo oluşturuldu (Tablo 13). Belirlenen genlerin bilinen fonksiyonları KEGG ve Uniprot veritabanlarından kontrol edildi. Kolesterol metabolizması ile ilişkilendirilen Lipoprotein reseptör ilişkili protein (LRP) ailesine ait *LRP1*, *LRP2*, *LRP1B* ve *SORL1* genlerinde varyasyonlar tespit edildi. Bu genler ayrı bir tabloda bir araya getirilerek dirençli ve orta duyarlılıktaki hücrelerde görülen varyasyonları da kontrol edildi (Tablo 14). Varyasyonlar cDNA ve protein düzeyinde tespit edildi hücrelerdeki dağılımları kontrol edildi (Tablo 15). LRP proteinlerinin oldukça büyük yapıda reseptörler olmaları SMART analizi sonucu varyasyonların protein üzerindeki yerlerini şekil olarak sunmamıza engel teşkil etmiştir. Bu nedenle varyasyonların protein üzerindeki pozisyonları belirlenerek tablo olarak verilmiştir (Tablo 16). Varyasyonların protein fonksiyonuna tahmini zararlı etkisi olup olmadığı SIFT ve Provean ‘prediction’ analizleri (Tablo 17) ve alignment analizi ile belirlendi (Şekil 26 ve 27). Şekillerde korunmuşluğu yüksek olan bölgelerde bulunan ve patolojik tahmin edilen baz değişimleri verilmiştir.

Aynı analizler glukoz ve glutamin duyarlılıkları için de yapıldı. Glukoz ve glutamin kısıtlamalarına duyarlı bulunan hücre hatlarında glukoz veya glutamin metabolizmasında rol alan proteinleri kodlayan genlerde varyasyonlar tespit edilemedi (Tablo 18 ve 19). Bulunan varyasyonların orta duyarlı ve dirençli hücrelerdeki dağılımları da cDNA ve protein düzeyinde belirlendi (Tablo 20 ve 21). Varyasyonların protein fonksiyonlarına tahmini etkileri tespit edildi (Tablo 22 ve 23).

Glukoz kısıtlamasına duyarlı bulunan RPMI 8226, SNU-1 ve KMS26 hücre hatlarında *SS18L1* (*CREST*, Sinovial Sarcoma Translocation Gene on Chromose 18-Like 1) geninde varyasyonlar tespit edildi. Varyasyonların genin 3’ UTR bölgesinde olduğu, RPMI 8226 ve SNU-1 hücre hatlarında korunmuş bölgede oldukları belirlendi.

Glutamin kısıtlamasına duyarlı bulunan hücrelerde varyasyon tespit edilen *PCDH15* geninde orta duyarlı H2171 hücre hattında frameshift mutasyon olduğu, *DOCK3* geninde ise yine orta duyarlı bulunan DU4475 hücre hattında nonsense mutasyon olduğu bulundu. Bu nedenle bu iki gen değerlendirme dışı tutuldu. Glutamin kısıtlamasına duyarlı bulunan Raji hücre hattında *PMS1* geninde yanlış anlamlı mutasyon tespit edildi. 498. amino asidin stop kodonuna dönüştüğü ve protein sentezinin tamamlanamadığı belirlendi.

Tablo 13. Kolesterol yokluğuna duyarlı hücrelerde genetik varyasyonların dağılımı

	duyarlı										orta					dirençli									
	SNU1	U266B1	U937	Daudi	Raji	Hec1B	Molt16	Supm2	Del	Karpas299	PC3	COLO205	NCIH889	kms12bm	rpmi8226	hut78	NCIH929	NCIH2171	NCIH524	mc116	kms27	DU4475	SNU5	kms26	NCIH82
RB1																									
PKHD1																									
DAPK1																									
INHBA																									
LIFR																									
PDCD11																									
EHBP1																									
MYH11																									
PI4KA																									
KSR1																									
TGFB2																									
MYH1																									
ARFGEF1																									
MYO3B																									
MAP4K4																									
JARID2																									
TTK																									
PLK2																									
CEP110																									

Tablo 13. Kolesterol yokluğuna duyarlı hücrelerde genetik varyasyonların dağılımı
(devam)

	duyarlı										orta					dirençli									
	SNU1	U266B1	U937	Daudi	Raji	Hec1B	Molt16	Supm2	Del	Karpas299	PC3	COLO205	NCIH889	kms12bm	rpmi8226	hut78	NCIH929	NCIH2171	NCIH524	mc116	kms27	DU4475	SNU5	kms26	NCIH82
PCM1																									
NUP98																									
MGC42105																									
ZBTB16																									
KDM5A																									
LRP1B																									
LRP2																									
CREBBP																									
DLC1																									
NOTCH4																									
NPAT																									
CARD10																									
CSF1R																									
EPHA4																									
TG																									
RPTOR																									
CAMKV																									
MCF2																									
PCDH15																									
BRAF																									
LRP1																									
SORL1																									

Not: Aynı gendeki farklı genetik varyasyonları simgelemek için farklı renkler kullanılmıştır. Bir satırda kullanılan aynı renkler, o gende farklı hücrelerde bulunan aynı mutasyonları göstermektedir. Örneğin SORL1 geninde yan yana iki tane sarı renk SNU-1 ve U266B1 hücre hatlarında aynı mutasyonun varlığını göstermektedir. Farklı satırlardaki sarı renkler ise farklı mutasyonları temsil etmektedir.

Tablo 14. LRP gen ailesine ait genlerde bulunan varyasyonların tüm hücre hatlarında dağılımı

	duyarlı										orta					dirençli									
	SNU1	U266B1	U937	Daudi	Raji	Hec1B	Molt16	Supm2	Del	Karpas299	PC3	COLO205	NCIH889	kms12bm	rpmi8226	hut78	NCIH929	NCIH2171	NCIH524	mcl16	kms27	DU4475	SNU5	kms26	NCIH82
LRP1																									
SORL1																									
LRP1B																									
LRP2																									

Not: Aynı gendeki farklı genetik varyasyonları simgelemek için farklı renkler kullanılmıştır.

Tablo 15. Hücrelerde LRP genlerinde görülen genetik varyasyonlar

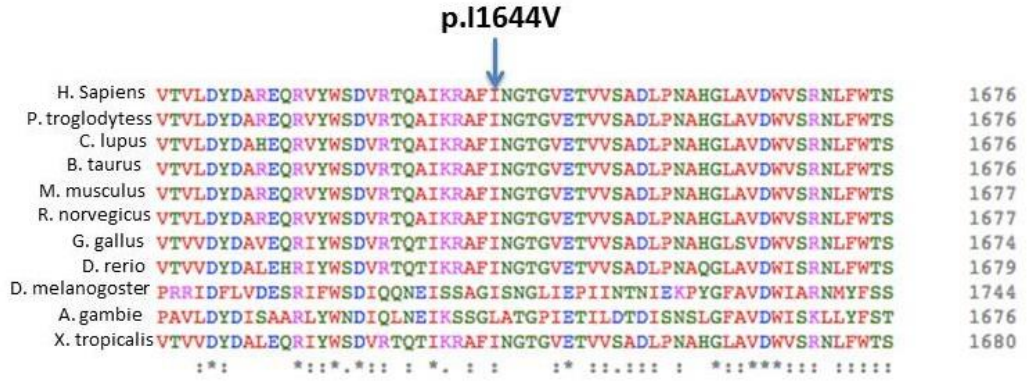
Gen	Hücre Hattı	Kolesterol Direnci	Protein Değişimi	cDNA Değişimi	SNP ID
LRP1	Hec1B	Duyarlı	p.R2509*	c.7525C>T	-
	Hec1B	Duyarlı	p.R3851Q	c.11552G>A	-
	Snu1	Duyarlı	p.L320P	c.959T>C	-
	U266B1	Duyarlı	p.I1644V	c.4930A>G	-
	KMS27	Dirençli	p.A2128G	c.6383C>G	-
LRP1B	Daudi	Duyarlı	p.N3485D	c.10453T>C	-
	Daudi	Duyarlı	p.K1567N	c.4728G>C	-
	DEL	Duyarlı	p.S3591Y	c.10772G>T	-
	Hec1B	Duyarlı	p.N4135fsX14	c.12405delT	-
	Hec1B	Duyarlı	p.R2430W	c.7288G>A	-
	H889	Orta	p.S2767R	c.8301G>C	-
	MC116	Dirençli	p.C516W	c.1546G>C	-
	DEL	Duyarlı	p.V1948M	c.5842C>T	rs41268689
LRP2	Hec1B	Duyarlı	p.W2475C	c.4725C>A	-
	Hec1B	Duyarlı	p.V887I	c.2659C>T	-
	Snu1	Duyarlı	p.Y3332C	c.9995T>C	-
	Snu1	Duyarlı	p.A156P	c.466C>G	-
	H889	Orta	splice site	c.1565-1T>A	-
	Hec1B	Duyarlı	p.A394V	c.1180G>A	-
	SORL1	Snu1	Duyarlı	p.P1578fsX13	c.4734insA
SORL1	Snu1	Duyarlı	3'UTR del	c.*122_123del	-
	U266B1	Duyarlı	3'UTR del	c.*122del	-
	H929	Orta	p.M335V	c.1003A>G	-
	Hec1B	Duyarlı	p.V520M	c.1558G>A	-

Tablo 16. LRP genlerinde görülen genetik değişimlerin protein üzerindeki yerleşimi

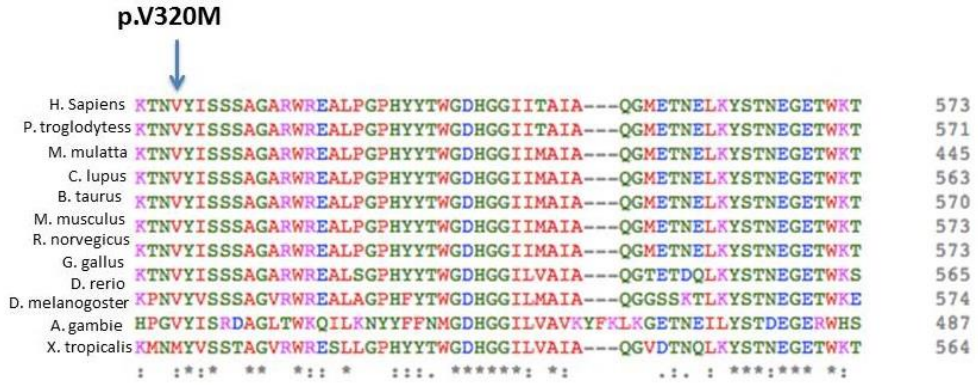
Gen	Hücre Hattı	Protein Değişimi	Varyasyonun protein üzerindeki lokalizasyonu	
LRP1	Hec1B	p.R2509*	Ekstraselüler	Domain; EGF-like 3
	Hec1B	p.R3851Q	Ekstraselüler	Domain; EGF-like 15
	Snu1	p.L320P	Ekstraselüler	Repeat;LDL receptor class B 1
	U266B1	p.I1644V	Ekstraselüler	Repeat;LDL receptor class B 13
	KMS27	p.A2128G	Ekstraselüler	Repeat;LDL receptor class B 20
LRP1B	Daudi	p.N3485D	Ekstraselüler	Domain; LDL receptor class A 24
	Daudi	p.K1567N	Ekstraselüler	Domain; EGF like 7
	DEL	p.S3591Y	Ekstraselüler	Unknown region
	Hec1B	p.N4135fsX14	Ekstraselüler	Unknown region
	Hec1B	p.R2430W	Ekstraselüler	Repeat;LDL receptor class B 25
	H889	p.S2767R	Ekstraselüler	Domain; LDL receptor class A 17
LRP2	MC116	p.C516W	Ekstraselüler	Domain; EGF like 3
	DEL	p.V1948M	Ekstraselüler	Repeat; LDL receptor class B 18
	Hec1B	p.W2475C	Ekstraselüler	Repeat; LDL receptor class B 25
	Hec1B	p.V887I	Ekstraselüler	Repeat; LDL receptor class B 9
	Snu1	p.Y3332C	Ekstraselüler	Repeat; LDL receptor class B 31
	Snu1	p.A156P	Ekstraselüler	Domain; LDL receptor class A4
SORL1	H889	splice site	Ekstraselüler	
	Hec1B	p.A394V	Ekstraselüler	Unknown region
	Snu1	p.P1578fsX13	Ekstraselüler	Domain; Fibronectin type III 1
	Snu1	3'UTR del	Ekstraselüler	
	U266B1	3'UTR del	Ekstraselüler	
	H929	p.M335V	Ekstraselüler	Domain; Vps10
	Hec1B	p.V520M	Ekstraselüler	Domain; Vps10

Tablo 17. LRP genlerinde görülen varyasyonların protein fonksiyonuna tahmini etkileri. Yanlış anlamlı değişimlerin protein fonksiyonuna tahmini etkileri SIFT ve Provean analizleri ile araştırıldı. Zararlı olabilecek varyasyonlar belirlendi.

Hücre Hattı	Protein	INPUT	PROTEIN ID	Provean		SIFT	
				SCORE (cutoff=-2.5)	PREDICTION	SCORE (cutoff=0.05)	PREDICTION
HEC1B	LRP1	c.7525C>T	ENSP00000451622	0	Nötral	0	Zararlı
HEC1B		c.11552G>A	ENSP00000243077	0,37	Nötral	0,546	Tolere edilebilir
SNU-1		c.959T>C	ENSP00000243077	-1,34	Nötral	0,298	Tolere edilebilir
SNU-1		c.959T>C	ENSP00000451737	-2	Nötral	0,085	Tolere edilebilir
U266B1		c.4930A>G	ENSP00000243077	-0,55	Nötral	0,012	Zararlı
KMS27		c.6383C>G	ENSP00000243077	-2,27	Nötral	0,221	Tolere edilebilir
DAUDI	LRP1B	c.10453T>C	ENSP00000374135	-0,89	Nötral	0,277	Tolere edilebilir
DAUDI		c.10453T>C	ENSP00000440718	-0,89	Nötral	0,279	Tolere edilebilir
DAUDI		c.4728G>C	ENSP00000374135	-2,1	Nötral	0,024	Zararlı
DAUDI		c.4728G>C	ENSP00000413239	-1,84	Nötral	0,041	Zararlı
DAUDI		c.4728G>C	ENSP00000440718	-2,1	Nötral	0,024	Zararlı
DEL		c.10772G>T	ENSP00000374135	-0,43	Nötral	1	Tolere edilebilir
DEL		c.10772G>T	ENSP00000440718	-0,43	Nötral	1	Tolere edilebilir
HEC1B		c.7288G>A	ENSP00000374135	-5,98	Zararlı	0	Zararlı
HEC1B		c.7288G>A	ENSP00000440718	-5,98	Zararlı	0	Zararlı
H889		c.8301G>C	ENSP00000374135	-1,13	Nötral	0,737	Tolere edilebilir
H889		c.8301G>C	ENSP00000440718	-1,13	Nötral	0,737	Tolere edilebilir
MC116		c.1546G>C	ENSP00000374135	-8,34	Zararlı	0,001	Zararlı
MC116		c.1546G>C	ENSP00000440718	-8,34	Zararlı	0,001	Zararlı
DEL	LRP2	c.5842C>T	ENSP00000263816	-1,21	Nötral	0,213	Tolere edilebilir
HEC1B		c.4725C>A	ENSP00000263816	-12	Zararlı	0,001	Zararlı
HEC1B		c.2659C>T	ENSP00000263816	-0,51	Nötral	0,073	Tolere edilebilir
HEC1B		c.2659C>T	ENSP00000409813	-0,48	Nötral	0,096	Tolere edilebilir
SNU1		c.9995T>C	ENSP00000263816	-2,91	Zararlı	0,136	Tolere edilebilir
SNU1		c.9995T>C	ENSP00000438157	-3,98	Zararlı	0,079	Tolere edilebilir
SNU1		c.466C>G	ENSP00000263816	-1,28	Nötral	0,332	Tolere edilebilir
SNU1		c.466C>G	ENSP00000409813	-2	Nötral	0,165	Tolere edilebilir
HEC1B		c.1180G>A	ENSP00000263816	-0,85	Nötral	1	Tolere edilebilir
HEC1B		c.1180G>A	ENSP00000409813	-1,06	Nötral	0,366	Tolere edilebilir
H929	SORL1	c.1003A>G	ENSP00000260197	-1,28	Nötral	0,078	Tolere edilebilir
HEC1B		c.1558G>A	ENSP00000260197	-1,48	Nötral	0,051	Tolere edilebilir



Şekil 27. *LRP1* geninde görülen p.I1644V varyasyonunun korunmuşluk oranı. Sol tarafta analize dahil edilen canlı türleri, sağ tarafta ise satır başlarındaki baz pozisyonları verildi. Varyasyon şeklin üstünde ok ile işaretlendi. Analiz Clustal Omega programında yapıldı.



Şekil 28. *SORL1* geninde görülen p.V320M varyasyonunun korunmuşluk oranı. Sol tarafta analize dahil edilen canlı türleri, sağ tarafta ise satır başlarındaki baz pozisyonları verildi. Varyasyon şeklin üstünde ok ile işaretlendi. Analiz Clustal Omega programında yapıldı.

Tablo 18. Glukoz kısıtlamasına duyarlı ve dirençli hücrelerde analizler sonucu belirlenen genetik değişimlerin dağılımı

	Duyarlı					Orta					Dirençli										
	RPMI8226	Snu-1	U937	NCIH889	NCIH929	KMS27	KMS26	U266B1	NCIH716	DU4475	Daudi	PC3	HUT78	NCIH2171	NCIH524	MC116	Snu5	Colo-205	KMS12BM	NCIH82	Raji
DAPK1	FS																				
BLM		FS																			
NOTCH4																					
FOXP1																					
SS18L1																					
CHD9		FS																			
ATM																					
PREX2																					

Kısaltmalar: FS; Frameshift mutasyon.

Tablo 19. Glukoz kısıtlaması deneylerinde kullanılan hücrelerde tespit edilen genetik varyasyonlar

Gen	Hücre Hattı	Glukoz Direnci	Protein Değişimi	cDNA Değişimi	SNP ID
DAPK1	NCIH524	Dirençli	p.H657P	c.1970A>C	
	COLO205	Dirençli	p.H272Y	c.814C>T	
	COLO205	Dirençli	p.R454C	c.1360C>T	
	COLO205	Dirençli	p.R1063C	c.3187C>T	
	KMS12BM	Dirençli	p.G445A	c.1334G>A	
	RPMI8226	Duyarlı	p.Q317fsX11	NM_004938.1:c.957delA	
BLM	SNU1	Duyarlı	p.G512fsX17	c.1536fsX21	
	U266B1	Orta	p.D906N	c.2716G>A	
	SNU5	Dirençli	p.N1141S	c.3422A>G	
	KMS12BM	Dirençli	p.H886N	c.2656C>A	
	HUT78	Dirençli	p.V721T	c.2161-2162GT>AC	
FOXP1	KMS27	Duyarlı		c.*56insT	rs11433724
	DAUDI	Orta		c.*56insT	rs11433724
	SNU1	Duyarlı	p.R525Q	c.1573C>T	
	SNU5	Dirençli		NM_001244814.3:c.187G>C	
CHD9	RPMI8226	Duyarlı		c.*56insT	rs11433724
	KMS27	Duyarlı	p.S1442N	c.4325G>A	
	RAJI	Dirençli	p.V1849F	c.5545G>T	
ATM	NCIH929	Duyarlı	p.2164_2165SS>S	c.6492-6493delTTC	
	SNU1	Duyarlı	p.H758fsX16	c.2274delT	
	KMS26	Duyarlı	p.S1232P	c.3694T>C	
	KMS27	Duyarlı	p.I490T	c.1469T>C	
ATM	KMS27	Duyarlı	p.A2635P	c.7903G>C	rs66503349
	NCIH524	Dirençli	p.R337C	c.1009C>T	

Tablo 19. Glukoz kısıtlaması deneylerinde kullanılan hücrelerde tespit edilen genetik varyasyonlar (devam)

Gen	Hücre Hattı	Glukoz Direnci	Protein Değişimi	cDNA Değişimi	SNP ID
ATM	NCIH929	Duyarlı	p.E347K	c.1039G>A	
	SNU1	Duyarlı	p.V1153fsX11	c.3457insT	rs12788418
PREX2	MC116	Dirençli	p.Q1234H	c.3702G>T	
	NCIH889	Duyarlı	p.I877V	c.2629A>G	
SS18L1	RAJI	Dirençli	p.F44Y	c.131T>A	
	SNU5	Dirençli		c.*100_101delTT	rs35559659
	RPMI8226	Duyarlı		c.*104G>A	
	KMS26	Duyarlı		c.*159G>A	
	SNU1	Duyarlı		c.*232G>A	

Tablo 20. Glutamin kısıtlamasına duyarlı ve dirençli bulunan hücrelerde analizler sonucu belirlenen genetik değişimlerin dağılımı

	Duyarlı					Orta					Dirençli								
	RPMI 8226	MC116	KMS12BM	PC3	RAJI	H2171	U937	DU4475	KMS26	KMS27	HUT78	NCIH889	NCIH929	DAUDI	NCIH524	COLO205	U266B1	NCIH82	SNU5
PMS1																			
PAXIP1																			
UNC13C																			
MLL3																			
PCDH15																			
DOCK3																			

Kısaltmalar: FS; Frameshift, NS; Nonsense mutasyon

Tablo 21. Glutamin kısıtlaması deneylerindeki hücrelerde belirlenen genetik varyasyonlar

Gen	Hücre Hattı	Glutamin Direnci	Protein Değişimi	cDNA Değişimi	SNP ID
MLL3	DU4475	Orta	p.D553N	c.1657C>T	
	HUT78	Orta	p.F4170I	c.12508A>T	
	KMS26	Orta	p.K3889Q	c.11665T>G	
	RAJI	Duyarlı	p.R1229M	c.3685C>A	
UNC13C	U937	Orta	p.G924D	c.2771G>A	rs147997234
	RAJI	Duyarlı	p.R152S	c.454C>A	
	SNU5	Dirençli	p.R834Q	c.2501G>A	
PAXIP1	DU4475	Orta	p.R182Q	c.545G>A	
	DAUDI	Dirençli	p.R184H	c.551C>T	
	MC116	Duyarlı	p.L523M	c.1557G>T	
	NCIH2171	Orta	p.Q349H	c.1047C>A	
PMS1	RAJI	Duyarlı	p.Q487L	c.1460T>A	
	RAJI	Duyarlı	p.W498*	c.1493G>A	

Tablo 22. Glukoz duyarlılığı için bulunan yanlış anlamlı değişimlerin protein fonksiyonuna tahmini etkileri. Değişimlerin protein fonksiyonuna tahmini etkileri SIFT ve Provean analizleri ile araştırıldı. Zararlı olabilecek varyasyonlar belirlendi.

Hücre Hattı	Protein	INPUT	PROTEIN_ID	Provean		SIFT	
				Skor	Tahmin (cutoff=-2.5)	Skor	Tahmin (cutoff=0.05)
H524	DAPK1	c.1970A>C	ENSP00000350785	-2.24	Nötral	0.125	Tolere edilir
		c.1970A>C	ENSP00000386135	-2.24	Nötral	0.125	Tolere edilir
		c.1970A>C	ENSP00000417076	-2.24	Nötral	0.125	Tolere edilir
		c.1970A>C	ENSP00000418885	-2.24	Nötral	0.119	Tolere edilir
		c.1970A>C	ENSP00000419026	-2.21	Nötral	0.123	Tolere edilir
COLO205	DAPK1	c.814C>T	ENSP00000350785	-4.67	Zararlı	0.000	Zararlı
		c.814C>T	ENSP00000386135	-4.67	Zararlı	0.000	Zararlı
		c.814C>T	ENSP00000417076	-4.67	Zararlı	0.000	Zararlı
		c.814C>T	ENSP00000418885	-4.67	Zararlı	0.000	Zararlı
		c.814C>T	ENSP00000419026	-4.87	Zararlı	0.000	Zararlı
COLO205	DAPK1	c.1360C>T	ENSP00000350785	-4.28	Zararlı	0.001	Zararlı
		c.1360C>T	ENSP00000386135	-4.28	Zararlı	0.001	Zararlı
		c.1360C>T	ENSP00000417076	-4.28	Zararlı	0.001	Zararlı
		c.1360C>T	ENSP00000418885	-4.28	Zararlı	0.000	Zararlı
		c.1360C>T	ENSP00000419026	-4.02	Zararlı	0.001	Zararlı
COLO205	DAPK1	c.3187C>T	ENSP00000350785	-1.20	Nötral	0.207	Tolere edilir
		c.3187C>T	ENSP00000386135	-1.20	Nötral	0.207	Tolere edilir
		c.3187C>T	ENSP00000417076	-1.20	Nötral	0.207	Tolere edilir
		c.3187C>T	ENSP00000418885	-1.20	Nötral	0.214	Tolere edilir
		c.3187C>T	ENSP00000419026	-1.47	Nötral	0.183	Tolere edilir
KMS12B M	DAPK1	c.1334G>A	ENSP00000350785	-2.79	Zararlı	0.013	Zararlı
		c.1334G>A	ENSP00000386135	-2.79	Zararlı	0.013	Zararlı
		c.1334G>A	ENSP00000417076	-2.79	Zararlı	0.013	Zararlı
		c.1334G>A	ENSP00000418885	-2.79	Zararlı	0.011	Zararlı
		c.1334G>A	ENSP00000419026	-2.60	Zararlı	0.015	Zararlı
U266B1	BLM	c.2716G>A	ENSP00000347232	-2.36	Nötral	0.096	Tolere edilir
		c.2716G>A	ENSP00000439075	-2.07	Nötral	0.349	Tolere edilir
		c.2716G>A	ENSP00000442330	-2.29	Nötral	0.069	Tolere edilir
		c.2716G>A	ENSP00000454158	-2.52	Zararlı	0.052	Tolere edilir
SNU5	BLM	c.3422A>G	ENSP00000347232	-3.30	Zararlı	0.008	Zararlı

Tablo 22. Glukoz duyarlılığı için bulunan yanlış anlamlı değişimlerin protein fonksiyonuna tahmini etkileri (devam)

Hücre Hattı	Protein	INPUT	PROTEIN_ID	Provean		SIFT	
				Skor	Tahmin (cutoff=-2.5)	Skor	Tahmin (cutoff=0.05)
KMS12BM	BLM	c.3422A>G	ENSP00000439075	-3.21	Zararlı	0.014	Zararlı
		c.3422A>G	ENSP00000442330	-3.30	Zararlı	0.010	Zararlı
		c.2656C>A	ENSP00000347232	-4.44	Zararlı	0.077	Tolere edilir
		c.2656C>A	ENSP00000439075	-4.45	Zararlı	0.235	Tolere edilir
		c.2656C>A	ENSP00000442330	-4.57	Zararlı	0.177	Tolere edilir
HUT78	BLM	c.2656C>A	ENSP00000454158	-4.51	Zararlı	0.026	Zararlı
		c.2161-2162GT>AC	ENSP00000347232	-2.50	Zararlı	0.023	Zararlı
		c.2161-2162GT>AC	ENSP00000442330	-2.63	Zararlı	0.043	Zararlı
SNU-1	FOXP1	c.2161-2162GT>AC	ENSP00000454158	-2.63	Zararlı	0.142	Tolere edilir
		c.1573C>T	ENSP00000318902	-3.24	Zararlı	0.001	Zararlı
		c.1573C>T	ENSP00000333560	-3.35	Zararlı	0.001	Zararlı
		c.1573C>T	ENSP00000351025	-3.33	Zararlı	0.001	Zararlı
		c.1573C>T	ENSP00000417857	-3.32	Zararlı	0.001	Zararlı
		c.1573C>T	ENSP00000418102	-3.24	Zararlı	0.001	Zararlı
		c.1573C>T	ENSP00000418225	-3.32	Zararlı	0.001	Zararlı
		c.1573C>T	ENSP00000418524	-3.24	Zararlı	0.001	Zararlı
KMS27	CHD9	c.1573C>T	ENSP00000419393	-3.24	Zararlı	0.001	Zararlı
		c.1573C>T	ENSP00000420736	-3.35	Zararlı	0.001	Zararlı
		c.4325G>A	ENSP00000219084	-0.94	Nötral	0.675	Tolere edilir
		c.4325G>A	ENSP00000381522	-0.97	Nötral	0.561	Tolere edilir
		c.4325G>A	ENSP00000396345	-0.97	Nötral	0.575	Tolere edilir
RAJI	CHD9	c.4325G>A	ENSP00000455307	-0.97	Nötral	0.573	Tolere edilir
		c.4325G>A	ENSP00000457355	-0.99	Nötral	0.613	Tolere edilir
		c.5545G>T	ENSP00000219084	-3.67	Zararlı	0.001	Zararlı
		c.5545G>T	ENSP00000381522	-3.85	Zararlı	0.001	Zararlı
		c.5545G>T	ENSP00000388729	-3.61	Zararlı	0.003	Zararlı
		c.5545G>T	ENSP00000396345	-3.85	Zararlı	0.001	Zararlı
KMS26	ATM	c.5545G>T	ENSP00000455307	-3.85	Zararlı	0.001	Zararlı
		c.5545G>T	ENSP00000457466	-3.85	Zararlı	0.001	Zararlı
		c.3694T>C	ENSP00000278616	-2.07	Nötral	0.188	Tolere edilir
		c.3694T>C	ENSP00000388058	-2.07	Nötral	0.188	Tolere edilir
		c.3694T>C	ENSP00000435747	-1.88	Nötral	0.192	Tolere edilir

Tablo 22. Glukoz duyarlılığı için bulunan yanlış anlamlı değişimlerin protein fonksiyonuna tahmini etkileri (devam)

Hücre Hattı	Protein	INPUT	PROTEIN_ID	Provean		SIFT	
				Skor	Tahmin (cutoff=-2.5)	Skor	Tahmin (cutoff=0.05)
KMS27	ATM	c.1469T>C	ENSP00000278616	-1.47	Nötral	0.185	Tolere edilir
		c.1469T>C	ENSP00000388058	-1.47	Nötral	0.185	Tolere edilir
		c.1469T>C	ENSP00000435747	-1.94	Nötral	0.111	Tolere edilir
KMS27	ATM	c.7903G>C	ENSP00000278616	-1.42	Nötral	0.036	Zararlı
		c.7903G>C	ENSP00000388058	-1.42	Nötral	0.036	Zararlı
H524	ATM	c.1009C>T	ENSP00000278616	-3.78	Zararlı	0.000	Zararlı
		c.1009C>T	ENSP00000388058	-3.78	Zararlı	0.000	Zararlı
		c.1009C>T	ENSP00000435747	-4.97	Zararlı	0.000	Zararlı
H929	ATM	c.1039G>A	ENSP00000278616	-1.71	Nötral	0.010	Zararlı
		c.1039G>A	ENSP00000388058	-1.71	Nötral	0.010	Zararlı
		c.1039G>A	ENSP00000435747	-2.62	Zararlı	0.008	Zararlı
MC116	PREX2	c.3702G>T	ENSP00000288368	-1.34	Nötral	0.071	Tolere edilir
H889	PREX2	c.2629A>G	ENSP00000288368	-0.18	Nötral	0.389	Tolere edilir
		c.2629A>G	ENSP00000379789	-0.18	Nötral	0.608	Tolere edilir
RAJI	PREX2	c.131T>A	ENSP00000288368	-1.32	Nötral	0.181	Tolere edilir
		c.131T>A	ENSP00000379789	-1.32	Nötral	0.391	Tolere edilir

Tablo 23. Glutamin duyarlılığı için bulunan yanlış anlamalı değişimlerin protein fonksiyonuna tahmini etkileri. Değişimlerin protein fonksiyonuna tahmini etkileri SIFT ve Provean analizleri ile araştırıldı. Zararlı olabilecek varyasyonlar belirlendi.

Hücre Hattı	Protein	INPUT	PROTEIN_ID	Provean		SIFT	
				Skor	Tahmin (cutoff=-2.5)	Skor	Tahmin (cutoff=0.05)
DU4475	MLL3	c.1657C>T	ENSP00000262189	-1,92	Nötral	0,031	Zararlı
		c.1657C>T	ENSP00000347325	-1,89	Nötral	0,03	Zararlı
		c.1657C>T	ENSP00000453752	-1,85	Nötral	0,036	Zararlı
HUT78	MLL3	c.12508A>T	ENSP00000262189	-3,66	Zararlı	0,015	Zararlı
		c.12508A>T	ENSP00000347325	-3,66	Zararlı	0,016	Zararlı
		c.12508A>T	ENSP00000353218	-4,06	Zararlı	0,025	Zararlı
		c.12508A>T	ENSP00000410411	-3,94	Zararlı	0,06	Tolere edilir
KMS26	MLL3	c.11665T>G	ENSP00000262189	-2,24	Nötral	0,25	Tolere edilir
		c.11665T>G	ENSP00000347325	-3,31	Zararlı	0,004	Zararlı
		c.11665T>G	ENSP00000353218	-3,3	Zararlı	0,016	Zararlı
		c.11665T>G	ENSP00000410411	-3,17	Zararlı	0,065	Tolere edilir
RAJI	MLL3	c.3685C>A	ENSP00000262189	-3,48	Zararlı	0,002	Zararlı
		c.3685C>A	ENSP00000347325	-3,35	Zararlı	0,002	Zararlı
RAJI	UNC13C	c.454C>A	ENSP00000260323	-0,22	Nötral	0	Zararlı
		c.454C>A	ENSP00000438156	-0,22	Nötral	0	Zararlı
		c.454C>A	ENSP00000442569	-0,22	Nötral	0	Zararlı
SNU5	UNC13C	c.2501G>A	ENSP00000260323	-0,05	Nötral	0	Zararlı
		c.2501G>A	ENSP00000438156	-0,08	Nötral	0	Zararlı
		c.2501G>A	ENSP00000442569	-0,05	Nötral	0	Zararlı
DU4475	UNC13C	c.545G>A	ENSP00000260323	-0,13	Nötral	0,002	Zararlı
		c.545G>A	ENSP00000438156	-0,13	Nötral	0,002	Zararlı
		c.545G>A	ENSP00000442569	-0,13	Nötral	0,002	Zararlı
DAUDI	PAXIP1	c.551C>T	ENSP00000319149	-3,32	Zararlı	0,002	Zararlı
		c.551C>T	ENSP00000349606	-2,45	Nötral	0,003	Zararlı
		c.551C>T	ENSP00000380376	-3,28	Zararlı	0,002	Zararlı
		c.551C>T	ENSP00000384048	-3,28	Zararlı	0,002	Zararlı
		c.551C>T	ENSP00000389849	-3,82	Zararlı	0,004	Zararlı
MC116	PAXIP1	c.1557G>T	ENSP00000319149	-0,18	Nötral	0,348	Tolere edilir
		c.1557G>T	ENSP00000380376	-0,18	Nötral	0,331	Tolere edilir
		c.1557G>T	ENSP00000384048	-0,18	Nötral	0,331	Tolere edilir

Tablo 23. Glutamin duyarlılığı için bulunan yanlış anlamlı değişimlerin protein fonksiyonuna tahmini etkileri.

Hücre Hattı	Protein	INPUT	PROTEIN_ID	Provean		SIFT	
				Skor	Tahmin (cutoff=-2.5)	Skor	Tahmin (cutoff=0.05)
H2171	PAXIP1	c.1047C>A	ENSP00000319149	-3	Zararlı	0,007	Zararlı
		c.1047C>A	ENSP00000349606	-3,05	Zararlı	0,007	Zararlı
		c.1047C>A	ENSP00000380376	-3	Zararlı	0,013	Zararlı
		c.1047C>A	ENSP00000384048	-3	Zararlı	0,013	Zararlı
RAJI	PAXIP1	c.1460T>A	ENSP00000319149	-1,57	Nötral	0	Zararlı
		c.1460T>A	ENSP00000380376	-1,57	Nötral	0	Zararlı
		c.1460T>A	ENSP00000384048	-1,57	Nötral	0	Zararlı

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Son yıllarda yapılan kanser araştırmalarında kanser hücrelerinin karakteristiği olan önemli fenotiplerin ortaya çıkması sağlanmıştır (18). Onkogenlerin taşıdıkları mutasyonlar ile hücre içi sinyal sistemlerini değiştirdikleri gösterilmiştir (91). Yeni nesil dizileme verileri tümör gelişimine neden olan mutasyonların sanılandan daha fazla sayıda ve heterojen olduğunu göstermiştir (22). Bu çalışmalarla binlerce nokta mutasyonları, translokasyonlar, amplifikasyonlar ve delesyonların kanser gelişiminde rolü olduğu ve mutasyon dağılımının histopatolojik olarak aynı olan tümörlerde bile farklılık gösterebildiği anlaşılmıştır (92). Detaylı biyoinformatik analizler ile kanserde ‘yürütücü’ mutasyonların çok sayıda temel sinyal yolağını etkileyerek tümör gelişiminden sorumlu olduğu gösterilmiştir (23). Hücrelerin büyüme ve yaşaması için tümör hücre metabolizmasının adaptasyonunda da pek çok onkojenik sinyal yolağı rol aldığı, ayrıca bazı metabolik değişikliklerin malign transformasyon için zorunlu olduğu görülmüştür (93).

Farklı moleküler mekanizmalar bölünen hücrelerin üç temel ihtiyacına yanıt vermek adına hücre metabolizmasının adaptasyonunu sağlarlar. Bu ihtiyaçlar; enerji durumunun korunabilmesi için hızlıca ATP retilmesi, artmış makromolekül biyosentezi ve hücreyel redoks dengesinin korunmasıdır (37). Bu ihtiyaçların karşılanabilmesi için kanser hücreleri dört büyük sınıf makromolekül; karbohidratlar, proteinler, lipidler ve nükleik asitlerin metabolizmalarında değişiklik yaparlar. Kanser hücrelerinde bu tür adaptasyonlar glukoz, glutamin gibi besinlerin ve oksijenin oldukça kısıtlı olduğu, oldukça stresli ve dinamik bir mikroçevrede gerçekleşmektedir (12). Kanserde metabolik kısıtlamaların doğası ve önemi hücre kültürü koşullarında gerek besinlerin gerekse oksijenin daima bol miktarda bulunması nedeniyle anlaşılamamaktadır. Bu nedenle kontrollü besin kısıtlaması deneyleri oldukça önem taşımaktadır (13).

Nutrostat sistemi besin kısıtlama çalışmaları için dizayn edilmiş özellikle kanser metabolizması araştırmalarında kullanılabilcek etkin bir araçtır (86). Sisteme besin ilavesi ve kullanılan besin artıklarının sistemden uzaklaştırılması ile kültür ortamında istenilen besinin seviyesi sabit tutulabilmektedir. Ayrıca bu sistem hücrelerin her gün monitörize edilmesine olanak sağlamaktadır. Kanser metabolizması çalışmalarında

karşılaşılan bir başka güçlük ise aynı anda çok sayıda farklı kanser hücre hattının kullanıldığı deneylerin kurulamamasıdır. DNA'sına transfeksiyon yöntemi ile 7 bp'lik barkod ilave edilen hücrelerin kullanıldığı barkodlu hücre karışım deneyi aynı anda çok fazla sayıda hücrenin çalışabilmesine olanak sağlamaktadır. İstenilen ortamda aynı anda büyütülen çok sayıda hücrenin ortamdaki çoğalma oranları ise taşıdıkları barkodların yeni nesil dizileme yöntemleri ile tespit edilmesiyle hesaplanarak göreceli olarak bulunmaktadır.

Çalışmamızın sonucunda, düşük (1 mM) glukozlu ortamda yapılan barkodlu hücre çoğalması deneylerinde birçok hücrenin çoğalamadığı tespit edildi. Daha önce yaptığımız çalışmada düşük glukoz oranı 0.75 mM olarak tutulmuştu (86). Her iki çalışmada da pek çok hücrenin dirençli olduğu görülürken, 1 mM'da dirençli bulunan bazı hücrelerin ise glukoz miktarı 0.75 mM'e düşürüldüğünde çoğalamadıkları yani duyarlı grupta yer aldıkları görüldü. Bu durum bu hücrelerin çoğalabilmesi için ortamdaki glukoz miktarı için bir eşik değer olduğunu, glukoz miktarının bu eşik değerinin altına düştüğünde hücrelerin çoğalamadıklarını düşündürdü.

Tümör hücrelerinde görülen, en iyi karakterize edilmiş metabolik fenotip Warburg etkisidir (7). Bu etki ATP üretiminin normal oksijen konsantrasyonlarında bile glikoliz ile sağlanmasıdır. Glikoliz ile ATP üretimi oksidatif fosforilasyona kıyasla daha hızlı olmasına karşın kullanılan her bir glukoz molekülü başına üretilen ATP miktarı oldukça azdır. Bu durumda glikoliz yapan tümör hücrelerinin enerji ihtiyaçlarını karşılamak için oldukça fazla glukoz alımı yapmaktadırlar (9, 36, 42).

Çoğalan tümör hücrelerine glikolitik metabolizmanın getirdiği seçici avantaj tam olarak bilinmemektedir (9, 93). Yapılan ilk çalışmalarda mitokondri fonksiyonunda defekt olan hücrelerde oksidatif fosforilasyonla yapılamayan ATP üretiminin karşılanabilmesi için glikolizin zorunlu bir adaptasyon olduğu yönünde görüş bildirilmekteydi (8). Ancak daha sonraki çalışmalarla anlaşılmıştır ki tümör hücrelerinde mitokondriyal defektler oldukça ender olmaktadır ve tümörlerin kullandığı oksijen miktarı neredeyse normal dokularla aynıdır (43, 44). Aerobik glikoliz için bir diğer açıklama ise glikoliz ile ATP üretiminin oksidatif fosforilasyondan daha fazla oranda olması, dolayısıyla ortamda glukoz miktarının limitsiz olmasıyla bu durumun hücreler için avantaj sağlayabileceğidir. Ancak ortamdaki glukoz miktarı çoğu solid

tümörlerde sınırsız değildir. Alternatif olarak ise glikoliz metabolizmasının tümör gelişiminde hipoksik şartların olduğu erken dönem avasküler fazda oluşmaya başladığı ve böylece oksijen olmayan durumlarda da ATP üretilmesinin sağlandığı önerilmiştir (4, 9, 36, 93).

Tümör hücrelerinde mitokondrilerde fonksiyon bozukluğunun yanında kompleks 1 alt ünitelerinde mitokondriyel DNA mutasyonları da bildirilmiştir (86, 94, 95). Bazal oksijen tüketimleri de (OCR) oldukça düşük bulunan mitokondriyel DNA mutasyonlarına sahip kanser hücre hatlarında NADH' den ubiquitin'e proton translokasyonu olmadan elektron transferi yapan maya (*Saccharomyces cerevisiae*) *Ndi1* proteini eksprese ettirildiğinde bu hücrelerde OCR seviyelerinin düzeldiği gösterilmiştir (86, 96). Aynı hücreler düşük glukozlu ortamda çoğalamazlarken, *Ndi1* eksprese ettirildiklerinde düşük glukozlu ortamda daha iyi çoğalabilmişlerdir. Aynı zamanda oksidatif fosforilasyon inhibitörü olduğu bilinen anti-diabetik ilaç olan fenformin ile muamele edildiklerinde düşük glukozda da duyarlı bulunan bu hücrelerin öldükleri ancak *Ndi1* ekspresyonu ile yaşamaya devam ettikleri gösterilmiştir. Bu veriler hücrelerin düşük glukozlu ortamda gösterdikleri duyarlılıkta mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun rolü olduğunu göstermiştir. Kısaca düşük glukozda duyarlı bulunan kanser hücrelerinde oksidatif fosforilasyon defektifdir ve bu hücreler biguanidlere daha duyarlıdır (86).

Hücre içi düşük ATP konsantrasyonlarında hücrelerde enerji duyarlı sinyal yolağı AMPK' nin aktive olduğu bilinmektedir. Fenformin ve metformin gibi biguanidler olarak bilinen anti-diabetik ilaçların da kompleks 1 inhibisyonu ile hücre içi ATP seviyesini düşürerek bu yolağı aktive ettiği gösterilmiştir (45). Bu özelliğinden dolayı biguanidlerin anti-kanser tedavilerde kullanılıp kullanılmayacağına dair çalışmalar yapılmaktadır (12).

Glutamin insan vücudunda en çok bulunan amino asittir ve hücreler tarafından çeşitli şekillerde kullanılır; ATP üretimi için Krebs döngüsünde okside olur, nükleotid sentezi için azot kaynağıdır, glutatyon için öncü moleküldür ve en önemli enzimatik olmayan hücresel anti-oksidandır (14, 55). Ancak glutaminin hücre canlılığı için neden önemli olduğu, diğer bir ifadeyle glutamin azlığında hücrelerin neden öldüğü henüz tama olarak aydınlatılamamıştır. Glutamin hücreler tarafından da yapılabilmektedir

(32). Bu durumda eksojen glutaminin hücreler için zorunlu olmadığı da düşünülebilir. Ayrıca kullanılan glutaminin çok az bir kısmı makromolekül biyosentezi için kullanılırken geri kalanı laktat gibi diğer moleküllere metabolize edilir ve hücreler tarafından salınır (14). Bu gözlemler glutamin metabolizmasının kanser hücrelerinin hızlı çoğalma ve artmış ATP ihtiyacını karşılamaktan ziyade kanser hücrelerinin yaşaması için henüz tanımlanamamış yollarda görevli olabileceğini düşündürmektedir (52, 53, 55, 59).

Çalışmamızda bazı kanser hücrelerinin glutamin azlığını önemsemediği bazılarının ise yaşamaları için glutamine ihtiyaç duyduğu gözlemlendi. Halka açık veri tabanı CCLE'den hücrelerin ekspresyon profilleri çıkarılarak korelasyon hesaplaması ile ekspresyon seviyeleri glutamin duyarlılığı ile ilişkili olabilecek genler tespit edildi. Ekspresyon analizlerinde dirençli hücrelerde *ABAT* (4-aminobiturat transaminaz) gen ekspresyonu yüksek bulundu. Bu genin kodladığı transaminaz enzimi TCA' da ara ürün olan 2-okzoglutarat' tan L-glutamat sentezini katalizlemektedir (97). Bu nedenle de dirençli bulduğumuz hücreler ekzojen glutamine daha az ihtiyaç duyuyor olabilirler. Ekspresyon analizlerinde pozitif korele bulduğumuz bir diğer önemli gen ise *MECP2* (metil CpG bağlayıcı protein 2)'dir. *MECP2*, glutamin taşıyıcıları *SNAT1* ve *SNAT2*'nin transkripsiyonel supresörüdür ve *MECP2* gen mutasyonları Rett sendromu ile ilişkilendirilmiştir (98).

Ekspresyon analizlerinde negatif ilişkili bulduğumuz genler arasında *GPD1* (gliserol-3-fosfat dehidrojenaz 1) ve *PDHA2* (Piruvat Dehidrojenaz (Lipoamid) Alfa 2) yer almaktadır. *GPD1* ETS için elektron kaynağıdır, NADH'lerin NAD^+ ya dönüşümünde rol alır. *PDHA2* ise piruvatın asetil coA'ya dönüşümünde rol alır (32). Korelasyon analizlerinde bu genlerin negatif ilişkili bulunması, genlerin baskılandığında da glutamin duyarlılığında bir değişiklik yaratmayacağını düşündürdü. Ayrıca bulgularımız, glutamin duyarlılığında oksidatif fosforilasyon ve TCA enzim genlerinin ekspresyonlarındaki artış ya da azalmanın rolü olmadığını göstermiştir.

Yapılan bir çalışmada glutaminin glukozdan bağımsız olarak tek başına TCA döngüsünü desteklediği gösterilmiş, bu olayda ATP sitrat liyaz, malik enzim, piruvat dehidrojenaz ve/veya piruvat karboksilaz'ın birlikte aktivasyonunun rol aldığı belirtilmiştir (99). Ancak korelasyon hesaplamalarında piruvat dehidrojenazın ilişkili

bulunmaması bize glutamin duyarlılığının tek nedeni olarak TCA' nın olamayacağını düşündürmüştür.

Glutaminin hücreler için neden önemli olabileceğine dair bir diğer önemli bulgu ise 'indirgeyici karboksilasyon' dur. İki farklı grup tarafından yapılan tanımlamada oksijen azlığında ya da mitokondriyel defektlerde glutaminin TCA' ya katılmak yerine *IDH1* (izositrat dehidrojenaz 1) ve *IDH2* enzimleri aracılığı ile lipid oluşumuna katkı sağladığı gösterilmiştir (100, 101).

Son zamanlarda onkogenlerin kanser hücrelerinin besin tüketimlerinde ve bağımlılıklarında etkisi olduğu gösterilmiştir (102). Fakat pek çok çalışmada bulgular sadece bir ya da iki örnek hücre hattında gösterilmiş olup, bu sonuçları gerçek hasta popülasyonuna yorumlamak uygun değildir. Örneğin tek bir glioma hücre hattının kullanıldığı çalışmada glutamin bağımlılığı *MYC* onkogeni ile ilişkilendirilirken, çok sayıda glioma hatları kullanılarak yapılan çalışmalarda ise glutamin bağımlılığından bahsedilmemiştir (30). Çalışmamızda 28 farklı hücre hattının glutamin bağımlılıklarını tespit ettikten sonra, *MYC* onkogeninin rolünü araştırmak için hücrelerimizdeki ekspresyon seviyelerini CCLÉ veri tabanından kontrol ederek ve korelasyon hesapladık. Hücrelerin glutamin bağımlılıkları *MYC* onkogen aktivasyonu ile ilişkili bulunmadı. Benzer şekilde 46 farklı meme kanseri hücre hattı kullanılarak yapılan çalışmada da glutamin bağımlılığı *MYC* ile ilişkili bulunmamıştır (103).

Hücrelerin endojen glutamin üretimlerinin glutamin bağımlılığındaki rolünü araştırmak amacıyla glutamin metabolizmasında rol alan *GLS1*, *GLS2*, *GLUL*, *GLUD1* ve *GLUD2* gen ekspresyon seviyeleri yine CCLÉ veri tabanından kontrol edildi. Sadece *GLUL* gen ekspresyonu glutamin bağımlılığı ile korele bulundu. *GLUL*, L-glutamat' tan glutamin sentezini yapan glutamin sentetaz genini kodlamaktadır (14). Konjenital glutamin yetersizliği olan hastalarda *GLUL* gen mutasyonları bildirilmiş ve bu hastalarda serum glutamin miktarlarının düşük olduğu rapor edilmiştir (104). Glutamin azlığına dirençli bulduğumuz hücrelerde *GLUL* ile endojen glutamin üretimi yapıldığı bu nedenle de dışarıdan glutamine ihtiyaç duyulmadığını düşündürdü. Bunu test etmek için, *GLUL*'u inhibe edip hücrelerin fenotipindeki değişikliği kontrol etmeyi amaçladık. Bu amaçla da glutamin kısıtlamasına dirençli bulduğumuz hücreleri *GLUL* inhibitörü olarak bilinen metil sulfoksamin (MSO) ile muamele ettik (105). Ancak MSO çok etkili

bir ilaç olmadığı için oldukça yüksek konsantrasyonlarda (mM) kullanmamıza rağmen sadece Daudi hücrelerini öldürürken diğer hücelere etki göstermedi. Az sayıda hücre hattı kullanılarak yapılan çalışmada *GLUL*, meme kanseri hücrelerinde glutamin bağımlılığı için genetik bir markır olarak önerilmiştir (61). Ancak çok daha fazla sayıda hücre hattı kullanılarak yapılan çalışmada ise glutamin bağımlılığı ile *GLUL* arasında bir korelasyon bulunamamıştır (103). Dolayısıyla hücrelerin glutamin bağımlılığının endojen glutamin üretimi ile ilişkili olmadığı düşünülmüştür.

Bazı kanser hücrelerinin çoğalabilmesi için glutamine bağımlı olmaları bu hücrelerde glutamin metabolizmasının anti-kanser tedaviler için hedef olabileceğini düşündürmüştür (54, 57, 63, 65). Bu amaçla glutaminaz inhibitörü olan BPTES kullanarak bu hücrelerin glutamin kullanımları inhibe edildiğinde glutaminin az bulunduğu ortamdaki gibi çoğalıp çoğalmayacakları kontrol edildi. Hücreler 2 μ M BPTES ile muamele edildi. Sonuçların glutamin duyarlılık sonuçları ile karşılaştırıldığında benzer oldukları görüldü. BPTES hücrelerin glutamin kullanımlarını inhibe ettiğinden, glutamine dirençli ve duyarlı hücreler benzer şekilde BPTES için de duyarlı ve dirençli olarak bulundular. Bu da bize BPTES'in glutamin metabolizmasını hedef alan, glutamin kısıtlamasına duyarlı kanser hücrelerini öldürmede kullanılabilecek iyi bir ilaç olabileceğini düşündürdü. Yapılan *in vitro* çalışmalarda da BPTES'in sadece aerobik koşullarda değil, aynı zamanda hipoksik koşullarda da glutamin metabolizmasını blokladığı, tümör hücre büyümesini inhibe ettiği ayrıca, hayvan deneylerinde de tümör xenografklarını küçülttüğü gösterilmiştir (65, 66).

BPTES'in yani glutaminolizin inhibisyonunun oksidatif fosforilasyon üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla *Ndil* eksprese eden ve etmeyen CAL62 hücreleri BPTES ile muamele edildi. *Ndil* eksprese eden yani oksidatif fosforilasyonu aktif çalışan hücrelerin BPTES'e dirençli olduğu görüldü. Benzer hücreler oksidatif fosforilasyon inhibitörü olan fenformine karşı da dirençli bulunmuşlardı. Bu veriyi test etmek adına hücreleri hem fenformin hem de BPTES ile ayrı ayrı muamele ettiğimizde ilaçların aynı etkiyi gösterdikleri görüldü. Bu durum bize BPTES'in de fenformin gibi oksidatif fosforilasyon inhibitörü olabileceğini düşündürdü. Ancak literatürde BPTES'in bu yönde bir etkisi olabileceğine dair bir bulgu bulunmamaktadır.

Tümör hücrelerinde kolesterol birikimi çok uzun yıllar önce gösterildiğinden beri araştırmacılar, kolesterolün hücre fonksiyonlarını araştırmaktadırlar (83). Kolesterol hücre membranının yapısal bütünlüğünün korunmasında rol almaktadır (20). Ayrıca, plazma membranında yer alan lipid yığınlarının daimi bileşeni ve yine plazma membranında yer alan hücre sinyal iletiminde rol alan mikrodomanların yapısında yer almaktadır (16). Hücre içi sinyal iletiminde ve hücresel transportta rolü olmasından ötürü, kolesterol hücre büyümesi için hammadde kaynaklarından biri olarak da sayılabilmektedir (77).

Kolesterolün karsinogenez, tümör büyümesi ve kemoterapiye dirençte rol alan hücre çoğalması, migrasyon ve sinyal iletimi gibi hücre olaylarında rol aldığı *in vitro* kanser hücre hatlarından, kanser doku profillerinden ve hayvan modellerinden elde edilen verilerle gösterilmiştir (17, 106, 107). Kolesterolün kanser gelişimine katkısı olduğunun gösterilmesi pek çok araştırmacının ilgisini kolesterol metabolizmasının manipülasyonunun anti-kanser tedaviler için hedef olup olamayacağı konusuna çekmiştir (15). Statinler kan kolesterolünü düşürücü ilaçlar olup, HMG CoA redüktaz enzimini inhibe ederek kolesterol sentezinin inhibisyonunu sağlarlar (108). Pek çok kanser hücre hattında da anti-tümör etkisi çalışılmıştır (15). Lovastatin, simvastatin gibi statinlerin kolon kanseri hücre hatlarında, tümör xenograflarında apoptozu indüklediği, farelerde kolit ilişkili kolon kanserini hafiflettiği gösterilmiştir (83, 109). Ayrıca KLL hücre hattı olan MEC-2 hücrelerinde lovastatinin fludarabin ile birlikte kullanıldığında hücrelerin kemoterapiye olan duyarlılığının arttığı gösterilmiştir (110).

Çalışmamızda kolesterol yokluğunda çoğalamayan hücreler belirlenmesi üzerine kanser hücrelerinde kolesterol duyarlılığını aydınlatarak kolesterol metabolizmasının tedaviler için hedef oluşturma potansiyelini araştırmak istedik. Bu amaçla öncelikle kolesterol metabolizmasının düzenlenmesinde duyarlı hücrelerde düzgün çalışıp çalışmadığı kontrol edildi. Goldstein & Brown hipotezine göre hücreler kolesterol olmayan ortamda ya da hücre içi kolesterol miktarı azaldığında, kolesterol biyosentezi genleri ve *LDLR* gen ekspresyonlarını arttırmaktadır (82). Böylece dışarıdan alabileceği kolesterol miktarını en üst düzeye çıkarırken, hücre içi endojen kolesterol sentezini de arttırmaktadır (77).

LDL içeren ve içermeyen besiyerinde çoğaltılan hücrelerde *LDLR* ve kolesterol biyosentezinde rol alan *SQLE*, *HMG-CoA* ve *HSD17B7* gen ekspresyonlarının değişimi qRT-PCR ile kontrol edildi. Beklenildiği gibi hücrelerde kolesterol içermeyen ortamda bu genlerin ekspresyonlarının arttığı görüldü. Ancak Raji hücrelerinde *LDLR* ve diğer gen ekspresyonlarının kolesterolsüz ortamda artmadığı görüldü. Literatüre baktığımızda Raji hücrelerinde kolesterolsüz ortamda ve statin ile muamele edildiklerinde çoğalamadıkları ilk olarak Goldstein ve Brown tarafından gösterilmiştir (111). Çalışmada hücrelerin eksojen kolesterole bağımlı olduklarından bahsedilmesine karşın kolesterol biyosentezi regülasyonunun bozuk olması ya da başka bir neden gösterilmemiştir.

Kolesterol biyosentezinin düzenlenmesinde bozukluk olup olmadığını daha iyi anlamak için hücrelerimizdeki *LDLR* gen ekspresyonu ile kolesterol biyosentezinde rol alan genlerin normal koşullardaki ekspresyon seviyeleri kontrol edildi. *SQLE*, *DHCR24*, *CYP51A1* gen ekspresyonları düşük bulunan hücreler tespit edildi. Hücrelerin endojen kolesterol biyosentezini gerçekleştirememelerinden dolayı dışarıdan kolesterole bağımlı olabilecekleri yani kolesterol okzotrofisine sahip olabilecekleri düşünüldü. Bunu doğrulamak için ilk olarak, hücrelere kolesterolsüz ortamda kolesterol metabolitleri olan skualen veya lanosterol ilavesi yapıldı. Bu şartlarda sadece *SQLE* ekspresyonu düşük olan hücrelerden U266B1 hücre hattının yaşayabildiği bu durumun ilave edilen skualen ve lanosterolün dozu ile ilgili olmadığı görüldü. Kolon kanseri fare modellerinde lanosterol veya skualenin kolon kanseri öncüsü olan preneoplastik lezyonların oluşmasını önlediği gösterilmiştir (112, 113). Ancak literatürde kolesterol metabolitlerinin kanser hücre çoğalmasına ya da *in vivo* tümör büyümesine etkisine dair bir bulguya rastlanılmadı.

İkinci aşamada ise ekspresyonları düşük bulunan genler hücrelerde eksprese ettirildi. SNU-1 mide kanseri ve Hec1B endometrium kanseri hücre hatlarında *SQLE* ekspresyonu ile hücrelerin kolesterolsüz ortamda yaşayabilir hale geldikleri belirlendi. Molt-16 lösemi hücre hattı ise *CYP51A1* eksprese ettirildiğinde kolesterol yokluğuna dirençli bulundu. Sonuçta bu hücre hatlarında kolesterol biyosentezinin yapılamadığını ve bu nedenle dışarıdan gelecek kolesterole bağımlı oldukları düşünüldü. Ancak diğer hücre hatlarındaki defektler aydınlatılmadı. Kanser tedavisinde kolesterol

metabolizmasının hedef olabileceği düşünülerek elde edilen bulguların ileri çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızın göz alıcı sorularından bir diğeri ise besin duyarlılığının kanserlerin köken aldığı doku ile ilişkili olup olmadığıydı. Gerek glukoz ve glutamin, gerek de kolesterol için barkodlu hücre karışım deney sonuçlarımızda hücrelerin köken aldıkları dokuların dağılımına baktığımızda hücrelerin besin duyarlılıklarının köken aldıkları dokuyla ilişkili olmadığını gördük. Çünkü örneğin bazı hematopoetik kökenli kanser hücre hatları ilgili besin kısıtlamasına ya da yokluğuna duyarlı bulunurken, diğer hematopoetik kanser hücre hatlarının dirençli bulunduğu görüldü. Bu durum, hematopoetik kökenli kanserler ilgili besin için duyarlıdır ya da dirençlidir önermesini yapmamıza engel teşkil etmektedir. Benzer şekilde gen ekspresyonlarının da kanser hücre hatlarında doku spesifik olmadığını gördük. Örneğin, SQLE ekspresyonu Hec1B endometrium kanseri hücre hattında düşük bulunurken diğer endometrium kanseri hücre hatlarını CCLE veri tabanından kontrol edildiğinde SQLE ekspresyonu yüksek bulunanlar görüldü. Bu bulgular aslında kanserin ne kadar kompleks ve heterojen bir hastalık olduğunun göstergesidir (18). Aynı dokunun kanserleri klinik olarak farklı seyredebilmektedir (3). Ayrıca aynı dokudan köken alan kanserlerde farklı ‘yürütücü’ onkojenik mutasyonlar da görülebilmektedir (114).

Kanser hücrelerinde onkogen ekspresyonlarının metabolik değişimlerini nasıl etkilediği ve bu değişimlerin farklı tümör tiplerinde farklı olduğuna dair çok sayıda çalışma mevcuttur (37). Bu çalışmalar sınırlı sayıda hücre hattında yapılan *in vitro* çalışmalardır. Farklı onkojenik aktivasyonların tümör metabolizmasına etkisi fare modellerinde de gösterilmiştir. *MET* onkojenik mutasyona sahip karaciğer tümörü fare modelleri ile *MYC* mutasyonuna sahip karaciğer tümör fare modellerinde glukoz ve glutamin metabolizmalarının farklı oldukları gösterilmiştir (115). Yapılan çalışmada *MYC* veya *MET* yürütücü mutasyonuna sahip tümör örneklerinde glukoz ve glutamin kullanımlarının farklı oldukları gösterilmiş, her iki metabolizma için kritik enzimlerin ekspresyonlarının tümörlerde farklı oldukları gösterilmiştir. Tümör hücrelerinin sahip oldukları yürütücü mutasyonla birlikte köken aldıkları dokunun da hücrelerin metabolik fenotipinde etkili olduğu gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada tek başına yürütücü mutasyonların metabolizmadaki ilgili enzimlerin ekspresyonlarına bir etkisi olmadığı gösterilmiştir (115). Bu bulgular yürütücü mutasyonlara ek olarak hücrelerdeki diğer

genetik ve epigenetik değişimlerin de metabolizma üzerinde etkili olabileceğini düşündürmüştür (93).

Hücrelerin besin duyarlılıklarında sahip oldukları genetik değişimlerin rolünü araştırmak için deneylerimizde kullandığımız hücre hatlarındaki mutasyonlar halka açık COSMIC ve CCLE veritabanlarından kontrol edildi. Öncelikle hücrelerimizde onkogenik aktiviteye sahip olabilecek mutasyonlar ve füzyon proteini oluşturan kimerik gen mutasyonlarının varlığı araştırıldı. SQLE ekspresyonunu düşük bulduğumuz SUDHL1, SUPM2, DEL ve K299 hücre hatlarında *NPM1-ALK* füzyon geni olduğu belirlendi. *NPM1-ALK* füzyonu (nüklefosmin1) geni 5. Kromozom üzerinde yer alır ve 2. Kromozomda yer alan ve reseptör tirozin kinaz olan *ALK* (Anaplastik lenfoma kinaz)'nın traslokasyonu ile oluşur ve oluşan füzyon gen sürekli aktif bir tirozin kinaz proteini kodlar (116). *NPM1-ALK* füzyonu çeşitli tip lösemi ve lenfomalarda görülür, ayrıca daha az sıklıkla da olsa akciğer ve meme kanserlerinde de rapor edilmiştir (117). *NPM1-ALK*'ın kanser gelişiminde tümör baskılayıcı olarak rol aldığı ve *STAT3*'ü aktifleyerek DNA metiltransferazlara bağlanıp DNA'yı metilleyerek gen susturulmasını sağladığı gösterilmiştir (118). Bu durum *NPM1-ALK* pozitif bulduğumuz kolesterole duyarlı hücrelerde kolesterol biyosentezi genlerinin ekspresyonlarının düşük bulunmasının da epigenetik olabileceğini düşündürmüştür.

Hücrelerin besin duyarlılıklarında sahip oldukları genetik varyasyonların rolünü araştırmak amacıyla kullandığımız hücre hatlarının genom dizilime verilerine CCLE veritabanından ulaşıldı. Her bir hücre hattının sahip olduğu genetik varyasyonlar veritabanından alındı ve varyasyonların hücre hatlarındaki dağılımları kontrol edildi. Kolesterol besin yokluğuna duyarlı bulunan hücre hatlarında LRP ailesine ait *LRP1*, *LRP1B*, *LRP2* ve *SORL1* genlerinde varyasyonlar olduğu belirlendi. Bu genlerdeki varyasyonlar diğer hücre hatlarında da kontrol edildi. *LRP1B*'nin varyasyonlarının dirençli hücre hatlarında da bulunduğu görüldü. Varyasyonların protein üzerindeki 'tahmini' etkisine baktığımızda dirençli hücrelerimizde de patolojik olabilecek varyasyonların olduğu belirlendi. *LRP1B*'nin aslında tümör supresör bir gen olarak işlev gördüğü ve sıklıkla da tümörlerde mutant olduğu belirtilmiştir (75, 119). Orta duyarlı ve dirençli hücrelerimizde de *LRP1B*'de varyasyonlar görüldüğü için bu gen değerlendirme dışında tutuldu. Benzer şekilde *LRP2* geninde de patolojik olabilecek varyasyonlar

dirençli bulunan hücrelerde bulundu. Bu nedenle *LRP2*'de değerlendirme dışında tutuldu.

SORLI ve *LRP1* genlerinin kolesterol metabolizmasındaki rolleri ve kanser gelişimi ile ilişkilerine dair veri sağlamak amacıyla literatür tarandı. *SORLI*'ın hücre etkileşimlerinde ve Alzhemier hastalığında görülen amiloid plakların oluşumunda rolü olduğu öne sürülmüştür (76). Kolesterol metabolizmasındaki rolüne dair en fazla bulgu *LRP1* geni için bulunmaktadır (75). Kanser hücrelerinde hücre içerisinde kolesterol birikimi gösterilmiştir (83). *LRP1*'ın hücrelerde kolesterolü dışarı pompalayan transport proteini olan *ABCA1* gen ekspresyonunu baskıladığı bu nedenle de kolesterol birikiminde rolü olduğu gösterilmiştir (120). Ayrıca hücre içi kolesterol birikiminde ve yağ asidi sentezinde *LRP1*'ın MAPK/ERK ile Wnt sinyal yollarını uyardığı bilinmektedir (121). *LRP1*'ın MAPK/ERK aktivasyonu ile kanser hücrelerinin invazyon yeteneği kazanmasında da rolü olduğu gösterilmiştir (122). Bu veriler ile birlikte bulgularımızı değerlendirdiğimizde *LRP1*'ın kanser hücrelerinde kolesterol yokluğuna olan duyarlılıkta rolü olabileceğini düşünmekteyiz.

Glukoz ve glutamin besin kısıtlamalarına karşı kanser hücre hatlarının duyarlılıklarında sahip oldukları genetik varyasyonların dağılımına baktığımızda her iki metabolizmada rol olan genlerde değişimler görülemedi. Glukoz kısıtlamasına duyarlı bulunan hücrelerden RPMI 8226, KMS26 ve SNU-1 hücre hatlarında *SS18LI* (*CREST*) geninde 3' UTR bölgesinde varyasyonlar tespit edildi. RPMI 8226 ve SNU-1 hücrelerinde görülen varyasyonların korunmuş bölgelerde oldukları belirlendi. Literatürde *SS18LI* varyasyonlarının Amiyotrofik lateral skleroz (ALS) hastalığı ile ilişkilendirildiği görüldü. Fare çalışmalarında hipoksik durumlarda *Crest*'in Creb/Hif1- α kompleksine katılarak *Glut3* ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (123). Bu veriler ile birlikte bulgularımızın gelecek çalışmalarla desteklenmesi gerekliliği düşünülmüştür. Glutamin kısıtlaması için bulunan genlerden *PCDH15* ve *DOCK3*'de orta duyarlı bulunan hücre hatlarında patolojik mutasyonların (çerçeve kayması ve anlamsız mutasyon, sırasıyla) bulunması onları değerlendirme dışında tutmamıza neden oldu. Tespit edilen diğer genler *PMS1*, *PAXIP1*, *UNC13C* ve *MLL3* literatür taramalarında glutamin metabolizması ile direkt ilişkili bulunmamışlardır.

8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuçlarımız hücre hatlarında, glukoz ve glutamin besin kısıtlamaları ile kolesterol açlığına olan duyarlılığın açıklanmasında tek bir mekanizmanın olamayacağını göstermiştir. Bununla birlikte, bulgularımızın pek çok tümör için örnek teşkil edeceğini düşünmekteyiz. Yapılan çalışmalar sonucunda aşağıdaki sonuç ve önerilere varılmıştır.

1. Glukoz besini için duyarlı bulunan hücrelerde *SS18L1* gen mutasyonları belirlendi. Bu açıdan ileride yapılacak çalışmalarla;
 - a. Bu gen mutasyonlarının glukoz duyarlılığında rolünü aydınlatmak için dirençli hücrelerimizde *SS18L1* geni siRNA ya da CRISPR/Cas9 gen düzenleme yöntemi ile susturularak glukoz azlığına olan direncin değişip değişmediği gösterilmelidir.
 - b. *SS18L1* geninin glukoz metabolizmasındaki rolünü gösteren fare çalışmaları insan hücre hatlarında da doğrulanmalıdır.
2. Glutamin kısıtlamasına duyarlı kanser hücre hatları tespit edildi. Glutamin kullanımını inhibe eden ilaç BPTES'in bu hücre hatlarını öldürdüğü belirlendi. Ayrıca BPTES'in oksidatif fosforilasyon inhibitörü olabileceği görüldü. Yapılacak çalışmalarla;
 - a. BPTES ile ilgili bu bulgularımız hücrelerde oksijen tüketiminin belirlenmesi, ROS seviyelerinin ölçülmesi gibi yöntemler ile doğrulanmalıdır.
 - b. Glutaminin hücreler için önemini göstermek adına kütle spektrofotometresi ile işaretli glutaminin duyarlı ve dirençli hücrelerde hangi makromoleküllerin yapısına katıldığı belirlenmelidir.
 - c. Ekspresyon analizlerinde tespit edilen *ABAT4* ve *MECP2* genleri dirençli hücrelerde siRNA ya da CRISPR/Cas9 gen düzenleme yöntemi ile susturularak glutamin kısıtlamasına olan direncin değişip değişmediği gösterilmelidir.
3. Bazı kanser hücre hatlarının kolesterole bağımlı oldukları belirlendi. Bu bağımlılıkta hücrelerin endojen kolesterol üretimi yapamadıkları düşük *SQLE* ve *CYP51A1* gen ekspresyonları ile gösterildi. Genlerin overekspresyonları hücreleri kolesterol yokluğuna dirençli hale getirdi.
4. Kolesterol bağımlılığında rolü olabilecek genetik varyasyonlar tespit edildi. Bu varyasyonların metabolizmadaki rolünü aydınlatmak için;

- a. *LRP1* ve *SORL1* gen mutasyonlarının kolesterol bağımlılığında rolü olup olmadığı siRNA ya da CRISPR/Cas9 gen düzenleme yöntemleri ile gösterilmelidir. LRP1 mutasyonu bulunan farklı hücreler elde edilip kolesterol bağımlılıkları araştırılmalıdır.
- b. *SQLE* ekspresyonu düşük bulunan hücrelerde *NPM1-ALK* füzyon geni tesipt edildi. *NPM1-ALK*'ın *SQLE* ekspresyonu ile ilişkili olup olmadığı immunopresipitasyon yöntemi ile doğrulanmalıdır.

9. KAYNAKLAR

1. Knowles M, Selby P (2005). Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. 4. Oxford University Press, United States.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2013). Cancer statistics, 2013. CA: A Cancer Journal for Clinicians 63: 11-30.
3. Greaves M, Maley CC (2012). Clonal evolution in cancer. Nature 481: 306-313.
4. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB (2008). The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. Cell Metab 7: 11-20.
5. Bauer DE, Harris MH, Plas DR, Lum JJ, Hammerman PS, Rathmell JC, Riley JL, Thompson CB (2004). Cytokine stimulation of aerobic glycolysis in hematopoietic cells exceeds proliferative demand. The FASEB journal 18: 1303-1305.
6. Hsu PP, Sabatini DM (2008). Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. Cell 134: 703-707.
7. Warburg O (1956). On the origin of cancer cells. Science 123: 309-314.
8. Warburg O (1956). On respiratory impairment in cancer cells. Science 124: 269-270.
9. Gatenby RA, Gillies RJ (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? Nat Rev Cancer 4: 891-899.
10. Gambhir SS (2002). Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. Nat Rev Cancer 2: 683-693.
11. Czernin J, Phelps ME (2002). POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY SCANNING: Current and Future Applications. Annual Review of Medicine 53: 89-112.
12. Birsoy K, Sabatini DM, Possemato R (2012). Untuning the tumor metabolic machine: Targeting cancer metabolism: a bedside lesson. Nat Med 18: 1022-1023.
13. Kroemer G, Pouyssegur J (2008). Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. Cancer cell 13: 472-482.
14. DeBerardinis RJ, Cheng T (2010). Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. Oncogene 29: 313-324.

15. Brown AJ (2007). CHOLESTEROL, STATINS AND CANCER. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 34: 135-141.
16. Simons K, Ikonen E (2000). How Cells Handle Cholesterol. *Science* 290: 1721-1726.
17. Gabitova L, Gorin A, Astsaturov I (2014). Molecular Pathways: Sterols and Receptor Signaling in Cancer. *Clinical Cancer Research* 20: 28-34.
18. Hanahan D, Weinberg RA (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144: 646-674.
19. Robbins SL, Kumar V, Abbas AK, Aster JC (2012). Robbins basic pathology. Elsevier Health Sciences.
20. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008). *Molecular Biology of the Cell*. 5. Garland Science, United States.
21. Knudson AG (2002). Cancer genetics. *American Journal of Medical Genetics* 111: 96-102.
22. Wong KM, Hudson TJ, McPherson JD (2011). Unraveling the genetics of cancer: genome sequencing and beyond. *Annual review of genomics and human genetics* 12: 407-430.
23. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA (2009). The cancer genome. *Nature* 458: 719-724.
24. Weinberg R (2013). *The biology of cancer*. Garland Science.
25. Dang CV (2012). MYC on the Path to Cancer. *Cell* 149: 22-35.
26. Eilers M, Eisenman RN (2008). Myc's broad reach. *Genes Dev* 22: 2755-2766.
27. Hecht JL, Aster JC (2000). Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 18: 3707-3721.
28. Eischen CM, Weber JD, Roussel MF, Sherr CJ, Cleveland JL (1999). Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev* 13: 2658-2669.
29. Dang CV (2013). MYC, Metabolism, Cell Growth, and Tumorigenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3.
30. Yuneva M, Zamboni N, Oefner P, Sachidanandam R, Lazebnik Y (2007). Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *The Journal of Cell Biology* 178: 93-105.

31. Le A, Dang CV (2013). Studying Myc's Role in Metabolism Regulation. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1012: 213-219.
32. Onat T, Emerk K, Sözmen EY (2002). *İnsan Biyokimyası*. Türkiye: Palme Yayıncılık.
33. Joost HG, Thorens B (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Molecular Membrane Biology* 18: 247-256.
34. Thorens B (1996). Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 270: G541-G553.
35. Cloherty EK, Sultzman LA, Zottola RJ, Carruthers A (1995). Net sugar transport is a multistep process. Evidence for cytosolic sugar binding sites in erythrocytes. *Biochemistry* 34: 15395-15406.
36. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324: 1029-1033.
37. Cantor JR, Sabatini DM (2012). Cancer Cell Metabolism: One Hallmark, Many Faces. *Cancer Discov* 2(10):881-98.
38. Mitchell P, Moyle J (1967). Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* 213: 137-139.
39. Eng C, Kiuru M, Fernandez MJ, Aaltonen LA (2003). A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. *Nat Rev Cancer* 3: 193-202.
40. Duvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, Triantafellow E, Ma Q, Gorski R, Cleaver S, Vander Heiden MG, MacKeigan JP, Finan PM, Clish CB, Murphy LO, Manning BD (2010). Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell* 39: 171-183.
41. Kim JW, Dang CV (2006). Cancer's Molecular Sweet Tooth and the Warburg Effect. *Cancer Research* 66: 8927-8930.
42. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 11: 325-337.

43. Fantin VR, St-Pierre J, Leder P (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer cell* 9: 425-434.
44. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS Journal* 274: 1393-1418.
45. Mihaylova MM, Shaw RJ (2011). The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway coordinates cell growth, autophagy, & metabolism. *Nat Cell Biol* 13: 1016-1023.
46. Zang M, Zuccollo A, Hou X, Nagata D, Walsh K, Herscovitz H, Brecher P, Ruderman NB, Cohen RA (2004). AMP-activated Protein Kinase Is Required for the Lipid-lowering Effect of Metformin in Insulin-resistant Human HepG2 Cells. *Journal of Biological Chemistry* 279: 47898-47905.
47. Hardie DG (2007). AMP-Activated Protein Kinase as a Drug Target. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 47: 185-210.
48. Oakhill JS, Steel R, Chen ZP, Scott JW, Ling N, Tam S, Kemp BE (2011). AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science* 332: 1433-1435.
49. Dykens JA, Jamieson J, Marroquin L, Nadanaciva S, Billis PA, Will Y (2008). Biguanide-induced mitochondrial dysfunction yields increased lactate production and cytotoxicity of aerobically-poised HepG2 cells and human hepatocytes in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 233: 203-210.
50. Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, Inzucchi SE, Schumann WC, Petersen KF, Landau BR, Shulman GI (2000). Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes* 49: 2063-2069.
51. Pollak MN (2012). Investigating Metformin for Cancer Prevention and Treatment: The End of the Beginning. *Cancer Discov* 2: 778-790.
52. McKeehan WL (1982). Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation. *Cell biology international reports* 6: 635-650.
53. Turowski GA, Rashid Z, Hong F, Madri JA, Basson MD (1994). Glutamine Modulates Phenotype and Stimulates Proliferation in Human Colon Cancer Cell Lines. *Cancer Research* 54: 5974-5980.

54. Lobo C, Ruiz-Bellido MA, Aledo JC, Márquez J, Núñez De Castro I, Alonso FJ (2000). Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumorigenicity of tumour cells. *Biochemical Journal* 348: 257-261.
55. DeBerardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, Thompson CB (2008). Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev* 18: 54-61.
56. Gaglio D, Soldati C, Vanoni M, Alberghina L, Chiaradonna F (2009). Glutamine Deprivation Induces Abortive S-Phase Rescued by Deoxyribonucleotides in K-Ras Transformed Fibroblasts. *PLoS ONE* 4: e4715.
57. Donadio AC, Lobo C, Tosina M, de la Rosa V, Martín-Rufián M, Campos-Sandoval JA, Matés JM, Márquez J, Alonso FJ, Segura JA (2008). Antisense glutaminase inhibition modifies the O-GlcNAc pattern and flux through the hexosamine pathway in breast cancer cells. *J Cell Biochem* 103: 800-811.
58. Estrela JM, Ortega A, Obrador E (2006). Glutathione in Cancer Biology and Therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 43: 143-181.
59. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, Thompson CB (2007). Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 19345-19350.
60. Weiner ID, Hamm LL (2007). Molecular Mechanisms of Renal Ammonia Transport. *Annual Review of Physiology* 69: 317-340.
61. Kung H-N, Marks JR, Chi J-T (2011). Glutamine Synthetase Is a Genetic Determinant of Cell Type-Specific Glutamine Independence in Breast Epithelia. *PLoS Genet* 7: e1002229.
62. Masson J, Darmon M, Conjard A, Chuhma N, Ropert N, Thoby-Brisson M, Foutz AS, Parrot S, Miller GM, Jorisch R, Polan J, Hamon M, Hen R, Rayport S (2006). Mice Lacking Brain/Kidney Phosphate-Activated Glutaminase Have Impaired Glutamatergic Synaptic Transmission, Altered Breathing, Disorganized Goal-Directed Behavior and Die Shortly after Birth. *The Journal of Neuroscience* 26: 4660-4671.
63. Erickson JW, Cerione RA (2010). Glutaminase: A Hot Spot For Regulation Of Cancer Cell Metabolism? *Oncotarget* 1(8):734-740.

64. Shapiro RA, Clark VM, Curthoys NP (1979). Inactivation of rat renal phosphate-dependent glutaminase with 6-diazo-5-oxo-L-norleucine. Evidence for interaction at the glutamine binding site. *Journal of Biological Chemistry* 254: 2835-2838.
65. Shukla K, Ferraris DV, Thomas AG, Stathis M, Duvall B, Delahanty G, Alt J, Rais R, Rojas C, Gao P (2012). Design, synthesis, and pharmacological evaluation of bis-2-(5-phenylacetamido-1, 2, 4-thiadiazol-2-yl) ethyl sulfide 3 (BPTES) analogs as glutaminase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* 55: 10551-10563.
66. Robinson M, Mcbryant S, Tsukamoto T, Rojas C, Ferraris D, Hamilton S, Hansen J, Curthoys N (2007). Novel mechanism of inhibition of rat kidney-type glutaminase by bis-2-(5-phenylacetamido-1, 2, 4-thiadiazol-2-yl) ethyl sulfide (BPTES). *Biochem. J* 406: 407-414.
67. Le A, Lane AN, Hamaker M, Bose S, Gouw A, Barbi J, Tsukamoto T, Rojas CJ, Slusher BS, Zhang H, Zimmerman LJ, Liebler DC, Slebos JC, Lorkiewicz PK, Higashi RM, Fan TWM, Dang CV (2012). Glucose-Independent Glutamine Metabolism via TCA Cycling for Proliferation and Survival in B Cells. *Cell Metab* 15: 110-121.
68. Hanukoglu I (1992). Steroidogenic enzymes: Structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43: 779-804.
69. Sharpe LJ, Brown AJ (2013). Controlling Cholesterol Synthesis beyond 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reductase (HMGCR). *Journal of Biological Chemistry* 288: 18707-18715.
70. Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Azhar S (2010). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & Metabolism* 7: 47.
71. Ikonen E (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 125 - 138.
72. Goldstein JL, Brown MS (2009). The LDL Receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29: 431-438.
73. Willnow TE, Nykjaer A, Herz J (1999). Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins. *Nat Cell Biol* 1: E157.

74. Nykjaer A, Willnow TE (2002). The low-density lipoprotein receptor gene family: a cellular Swiss army knife? *Trends in Cell Biology* 12: 273-280.
75. Emonard H, Th  ret L, Bennasroune AH, Dedieu S (2014). Regulation of LRP-1 expression: Make the point. *Pathologie Biologie* 62: 84-90.
76. Bu G (2009). Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurosci* 10: 333-344.
77. Chang TY, Chang C, Ohgami N, Yamauchi Y (2006). Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 129-157.
78. Weber LW, Boll M, Stampfl A (2004). Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins. *World Journal of Gastroenterology* 10: 3081-3087.
79. Fakheri RJ, Javitt NB (2011). Autoregulation of cholesterol synthesis: Physiologic and pathophysiologic consequences. *Steroids* 76: 211-215.
80. Smith B, Land H (2012). Anti-cancer activity of the cholesterol exporter ABCA1 gene. *Cell reports* 2: 580-590.
81. Spann NJ, Glass CK (2013). Sterols and oxysterols in immune cell function. *Nat Immunol* 14: 893-900.
82. Gorin A, Gabitova L, Astsaturov I (2012). Regulation of cholesterol biosynthesis and cancer signaling. *Curr Opin Pharmacol* 12: 710-716.
83. Krycer JR, Brown AJ (2013). Cholesterol accumulation in prostate cancer: A classic observation from a modern perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1835: 219-229.
84. Novick A, Szilard L (1950). Description of the Chemostat. *Science* 112: 715-716.
85. James TW (1961). Continuous Culture of Microorganisms. *Annual Review of Microbiology* 15: 27-46.
86. Birsoy K, Possemato R, Lorbeer FK, Bayraktar EC, Thiru P, Yucel B, Wang T, Chen WW, Clish CB, Sabatini DM (2014). Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. *Nature* 508: 108-112.
87. Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, Wilson CJ, Lehar J, Kryukov GV, Sonkin D, Reddy A, Liu M, Murray L, Berger MF, Monahan JE, Morais P, Meltzer J, Korejwa A, Jane-Valbuena J, Mapa FA, Thibault J, Bric-Furlong E, Raman P, Shipway A, Engels IH, Cheng J, Yu GK,

- Yu J, Aspesi P, de Silva M, Jagtap K, Jones MD, Wang L, Hatton C, Palescandolo E, Gupta S, Mahan S, Sougnez C, Onofrio RC, Liefeld T, MacConaill L, Winckler W, Reich M, Li N, Mesirov JP, Gabriel SB, Getz G, Ardlie K, Chan V, Myer VE, Weber BL, Porter J, Warmuth M, Finan P, Harris JL, Meyerson M, Golub TR, Morrissey MP, Sellers WR, Schlegel R, Garraway LA (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483: 603-307.
88. Kumar P, Henikoff S, Ng PC (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protocols* 4: 1073-1081.
 89. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP (2012). Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE* 7: e46688.
 90. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* [Online].doi: 10.1038/msb.2011.75
 91. Garraway LA, Lander ES (2013). Lessons from the cancer genome. *Cell* 153: 17-37.
 92. Mitelman F, Johansson B, Mertens F (2007). The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nature Reviews Cancer* 7: 233-245.
 93. Cairns RA, Harris IS, Mak TW (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 11: 85-95.
 94. Jones JB, Song JJ, Hempen PM, Parmigiani G, Hruban RH, Kern SE (2001). Detection of Mitochondrial DNA Mutations in Pancreatic Cancer Offers a “Mass”-ive Advantage over Detection of Nuclear DNA Mutations. *Cancer Research* 61: 1299-1304.
 95. Larman TC, DePalma SR, Hadjipanayis AG, Protopopov A, Zhang J, Gabriel SB, Chin L, Seidman CE, Kucherlapati R, Seidman J (2012). Spectrum of somatic mitochondrial mutations in five cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 14087-14091.
 96. Seo BB, Matsuno-Yagi A, Yagi T (1999). Modulation of oxidative phosphorylation of human kidney 293 cells by transfection with the internal

- rotenone-insensitive NADH–quinone oxidoreductase (NDI1) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1412: 56-65.
97. De Biase D, Barra D, Simmaco M, John RA, Bossa F (1995). Primary Structure and Tissue Distribution of Human 4-Aminobutyrate Aminotransferase. *European Journal of Biochemistry* 227: 476-480.
 98. Okabe Y, Takahashi T, Mitsumasu C, Kosai K-i, Tanaka E, Matsuishi T (2012). Alterations of Gene Expression and Glutamate Clearance in Astrocytes Derived from an MeCP2-Null Mouse Model of Rett Syndrome. *PLoS ONE* 7: e35354.
 99. Le A, Lane AN, Hamaker M, Bose S, Gouw A, Barbi J, Tsukamoto T, Rojas CJ, Slusher BS, Zhang H, Zimmerman LJ, Liebler DC, Slebos RJC, Lorkiewicz PK, Higashi RM, Fan TWM, Dang CV (2012). Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B-cells. *Cell Metab* 15: 110-121.
 100. Mullen AR, Wheaton WW, Jin ES, Chen P-H, Sullivan LB, Cheng T, Yang Y, Linehan WM, Chandel NS, DeBerardinis RJ (2012). Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature* 481: 385-388.
 101. Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, Mattaini KR, Yang J, Hiller K, Jewell CM, Johnson ZR, Irvine DJ, Guarente L, Kelleher JK, Vander Heiden MG, Iliopoulos O, Stephanopoulos G (2012). Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature* 481: 380-384.
 102. Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang X-Y, Pfeiffer HK, Nissim I, Daikhin E, Yudkoff M, McMahon SB, Thompson CB (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 18782-18787.
 103. Timmerman LA, Holton T, Yuneva M, Louie RJ, Padró M, Daemen A, Hu M, Chan DA, Ethier SP, van t Veer LJ, Polyak K, McCormick F, Gray JW (2013). Glutamine Sensitivity Analysis Identifies the xCT Antiporter as a Common Triple-Negative Breast Tumor Therapeutic Target. *Cancer cell* 24: 450-465.
 104. Häberle J, Görg B, Rutsch F, Schmidt E, Toutain A, Benoist J-F, Gelot A, Suc AL, Höhne W, Schliess F, Häussinger D, Koch HG (2005). Congenital Glutamine

- Deficiency with Glutamine Synthetase Mutations. *New England Journal of Medicine* 353: 1926-1933.
105. Ronzio RA, Rowe WB, Meister A (1969). Mechanism of inhibition of glutamine synthetase by methionine sulfoximine. *Biochemistry* 8: 1066-1075.
 106. Guo D, Reinitz F, Youssef M, Hong C, Nathanson D, Akhavan D, Kuga D, Amzajerdi AN, Soto H, Zhu S, Babic I, Tanaka K, Dang J, Iwanami A, Gini B, DeJesus J, Lisiero DD, Huang TT, Prins RM, Wen PY, Robins HI, Prados MD, DeAngelis LM, Mellinohoff IK, Mehta MP, James CD, Chakravarti A, Cloughesy TF, Tontonoz P, Mischel PS (2011). An LXR Agonist Promotes Glioblastoma Cell Death through Inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-Dependent Pathway. *Cancer Discov* 1: 442-456.
 107. Zhuang L, Kim J, Adam RM, Solomon KR, Freeman MR (2005). Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *The Journal of Clinical Investigation* 115: 959-968.
 108. Malenda A, Skrobanska A, Issat T, Winiarska M, Bil J, Oleszczak B, Sinski M, Firczuk M, Bujnicki JM, Chlebowska J, Staruch AD, Glodkowska-Mrowka E, Kunikowska J, Krolicki L, Szablewski L, Gaciong Z, Koziak K, Jakobisiak M, Golab J, Nowis DA (2012). Statins Impair Glucose Uptake in Tumor Cells. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 14: 311-323.
 109. Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD, Almog R, Bonner JD, Rennert HS, Low M, Greenson JK, Rennert G (2005). Statins and the risk of colorectal cancer. *New England Journal of Medicine* 352: 2184-2192.
 110. Benakanakere I, Johnson T, Sleightholm R, Villeda V, Arya M, Bobba R, Freter C, Huang C (2014). Targeting cholesterol synthesis increases chemoimmunosensitivity in chronic lymphocytic leukemia cells. *Exp Hematol Oncol* 3: 24-24.
 111. Goldstein JL, Helgeson JA, Brown MS (1979). Inhibition of cholesterol synthesis with compactin renders growth of cultured cells dependent on the low density lipoprotein receptor. *Journal of Biological Chemistry* 254: 5403-5409.
 112. Rao CV, Newmark HL, Reddy BS (2002). Chemopreventive effect of farnesol and lanosterol on colon carcinogenesis. *Cancer Detection and Prevention* 26: 419-425.

113. Rao CV, Newmark HL, Reddy BS (1998). Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. *Carcinogenesis* 19: 287-290.
114. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW (2013). Cancer genome landscapes. *Science* 339: 1546-1558.
115. Yuneva MO, Fan TWM, Allen TD, Higashi RM, Ferraris DV, Tsukamoto T, Matés JM, Alonso FJ, Wang C, Seo Y, Chen X, Bishop JM (2012). The Metabolic Profile of Tumors Depends on Both the Responsible Genetic Lesion and Tissue Type. *Cell Metab* 15: 157-170.
116. Pearson JD, Lee JKH, Bacani JTC, Lai R, Ingham RJ (2012). NPM-ALK: The Prototypic Member of a Family of Oncogenic Fusion Tyrosine Kinases. *Journal of Signal Transduction* 2012: 14.
117. Drexler H, Gignac S, Von Wasielewski R, Werner M, Dirks W (2000). Pathobiology of NPM-ALK and variant fusion genes in anaplastic large cell lymphoma and other lymphomas. *Leukemia* 14: 1533-1559.
118. Zhang Q, Wang HY, Liu X, Wasik MA (2007). STAT5A is epigenetically silenced by the tyrosine kinase NPM1-ALK and acts as a tumor suppressor by reciprocally inhibiting NPM1-ALK expression. *Nature Medicine* 13: 1341-1348.
119. Sonoda I, Imoto I, Inoue J, Shibata T, Shimada Y, Chin K, Imamura M, Amagasa T, Gray JW, Hirohashi S, Inazawa J (2004). Frequent Silencing of Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1B (LRP1B) Expression by Genetic and Epigenetic Mechanisms in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Research* 64: 3741-3747.
120. Zhou L, Choi HY, Li W-P, Xu F, Herz J (2009). LRP1 Controls cPLA₂ Phosphorylation, ABCA1 Expression and Cellular Cholesterol Export. *PLoS ONE* 4: e6853.
121. Terrand J, Bruban V, Zhou L, Gong W, El Asmar Z, May P, Zurhove K, Haffner P, Philippe C, Woldt E, Matz RL, Gracia C, Metzger D, Auwerx J, Herz J, Boucher P (2009). LRP1 Controls Intracellular Cholesterol Storage and Fatty Acid Synthesis through Modulation of Wnt Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 284: 381-388.

122. Langlois B, Perrot G, Schneider C, Henriot P, Emonard H, Martiny L, Dedieu S (2010). LRP-1 Promotes Cancer Cell Invasion by Supporting ERK and Inhibiting JNK Signaling Pathways. PLoS ONE 5: e11584.
123. Thamocharan S, Raychaudhuri N, Tomi M, Shin BC, Devaskar SU (2013). Hypoxic adaptation engages the CBP/CREST-induced coactivator complex of Creb-HIF-1 α in transactivating murine neuroblastic glucose transporter. E583-E598.

10. EKLER

10.1. Ek 1 İzin Belgesi



WHITEHEAD INSTITUTE

David M. Sabatini, M.D., Ph.D.
Member, Whitehead Institute
Professor of Biology, MIT
Investigator, Howard Hughes Medical Institute
Senior Associate Member, Broad Institute
Member, Koch Institute for Cancer Research at MIT

Nine Cambridge Center
Cambridge, Massachusetts 02142
617-258-6407 / fax 617-452-3566
sabatini@wi.mit.edu

5 March 2015

To Whom It May Concern:

Ms Burcu Yucel worked in my lab as a visiting scholar between April 2013 and April 2014. In this period, Burcu generated an impressive amount of work that resulted in her being a co-author on an article we published in Nature. Burcu was mentored by one of my postdoctoral fellows, Dr. Kivanc Birsoy. Burcu, like many other visiting students, can use the results that she obtained in my laboratory for her graduate thesis.

Sincerely,

David M. Sabatini, M.D./Ph.D.
677-258-6407 (phone)
617-258-5213 (fax)
sabatini@wi.mit.edu

11. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : YÜCEL, Burcu
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 07/05/1984, Şişli
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0462 377 7957
E-Posta : byucel@ktu.edu.tr
Yazışma adresi : KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD 61080 TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Ad	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	: KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD	Halen
Yüksek Lisans	: University of Nottingham	2008
Lisans	: İstanbul Üniversitesi	2006
Lise	: Şişli Nişantaşı Nuri Akın Lisesi	2002

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre(Yıl-Yıl)
1. Araştırma görevlisi	KTÜ SABE Tıbbi Biyoloji AD	2009-halen

YABANCI DİL

İngilizce (YDS: 80)

YAYINLAR

1. Chen WW, Birsoy K, Mihaylova MM, Snitkin H, Stasinski I, **Yucel B**, Bayraktar EC, Carette JE, Clish CB, Brummelkamp TR, Sabatini DD, Sabatini DM. Inhibition of ATP1F1 ameliorates severe mitochondrial respiratory chain dysfunction in mammalian cells. Cell Rep. 2014 Apr 10;7(1):27-34.
2. Birsoy K, Possemato R, Lorbeer FK, Bayraktar EC, Thiru P, **Yucel B**, Wang T, Chen WW, Clish CB, Sabatini DM. Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. Nature. 2014 Apr 3;508(7494):108-12.

3. Sonmez M, Kazaz N, **Yucel B**, Topbas M, Ucar F. C950T and C1181G osteoprotegerin gene polymorphisms in myeloma bone disease. *Hematology*. 2014 Jun;19(4):213-6.
4. Uçar F, Karkucak M, Alemdaroğlu E, Capkin E, **Yucel B**, Sönmez M, Tosun M, Karaca A. HLA-DRB1 allele distribution and its relation to rheumatoid arthritis in eastern Black Sea Turkish population. *Rheumatol Int*. 2012 Apr;32(4):1003-7.
5. Uçar F, Çapkin E, Karkucak M, **Yucel B**, Sönmez M, Alver A, Kaklikkaya N, Tosun M, Alemdaroğlu E, Solak M. Associations of HLA-DRB1 alleles with anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis in northern east part of Turkey. *Int J Rheum Dis*. 2012 Dec;15(6):538-45.
6. Uçar F, Sönmez M, Erkut N, Balcı M, **Yucel B**, Yılmaz M, Erduran E, Ovalı E. Relation of HLA-A, -B, DRB1 alleles and haplotypes in patients with acute leukemia: a case control study. *Arch Med Res*. 2011 May;42(4):305-10.
7. Uçar F, Celik S, **Yucel B**, Sönmez M, Celep F, Erkut N. MTHFR C677T polymorphism and its relationship to myocardial infarction in the Eastern Black Sea region of Turkey. *Arch Med Res*. 2011 Nov;42(8):709-12.

BİLDİRİLER

1. **Yucel B**, Birsoy K, Sabatini DM, Eyupoğlu FC. Farklı kanser hücre hatlarında glukoz kısıtlamalarına duyarlılığın araştırılması. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Fethiye, Türkiye. 27-30 Ekim 2015.
2. **Yucel B**, Sönmez M. Lösemi hücre hatlarında ilaç direncinin azaltılmasında kaffeik asit fenil ester (CAPE) kullanımı. 41. Ulusal Hematoloji Kongresi, Antalya, Türkiye 21-24 Ekim 2015.
3. Sonmez M, Kazaz N, **Yucel B**, Topbas M, Ucar F. C950T and C1181G osteoprotegerin gene polymorphisms in myeloma bone disease. 55. American Society of Hematology Congress, New Orleans, LA, USA. 7-10 Aralık 2013.
4. Uçar F, Çapkin E, Karkucak M, **Yucel B**, Sönmez M, Alver A, Kaklikkaya N, Tosun M, Alemdaroğlu E, Solak M. Associations of HLA-DRB1 alleles with ACPA positive and negative Rheumatoid Arthritis in Turkish population. 12. National Medical Genetics Congress, Istanbul, Turkey. 1-5 Aralık 2010.