

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PİRÜVAT KİNAZ İZOENZİM M2 AKTİVİTESİ ÜZERİNDE BAZI POLİFENOL
BİLEŞİKLERİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mert Oktay BAYKAN

KİMYA ANABİLİM DALI

**ÇANKIRI
2017**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Mert Oktay BAYKAN tarafından hazırlanan “**Pirüvat Kinaz İzoenzim M2 Aktivitesi Üzerinde Bazı Polifenol Bileşiklerin Etkilerinin Araştırılması**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ / DOKTORA TEZİ**) olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd. Doc. Dr. Şevki ADEM

Jüri Üyeleri :

Başkan: Yrd. Doc. Dr. Müslüm KUZU

Üye: Doc. Dr. Volkan EYÜPOĞLU

Üye: Yrd. Doc. Dr. Şevki ADEM

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Doç. Dr. Tamer KEÇELİ

Enstitü Müdürü

.../.../2017

Kontrol edilmiştir.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğine göre hazırlamış olduğum “**Pirüvat Kinaz İzoenzim M2 Aktivitesi Üzerinde Bazı Polifenol Bileşiklerin Etkilerinin Araştırılması**” konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğine ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (25/08/2017).

Mert Oktay BAYKAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PİRUVAT KİNAZ İZOENZİM M2 AKTİVİTESİ ÜZERİNDE BAZI POLİFENOL BİLEŞİKLERİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mert Oktay BAYKAN

Çankırı Karatekin Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Şevki ADEM

Hızla gelişmekte olan tümör ve cenin gibi dokuların metabolik düzenleri normal hücrelerden farklıdır. Bu iki hücre tipleri arasındaki en önemli fark, beslenme ve enerji ihtiyacı farkıdır. Bu iki hücre tipleri arasındaki en önemli fark, beslenme ve enerji ihtiyacı farkı olup, kanserli hücrenin hızlı gelişen bir yapıya sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Kanserli hücrelerin hızlı gelişen yapısı için artan enerji gereksinimi glikolizi hızlandırmaktadır. Glikolizin hızlanması ile birlikte glikolitik enzimlerin bir veya daha fazla izoformlarının kanserli hücrelerdeki ekspresyon durumu veya aktivitesi değişmektedir. Tümör hücrelerindeki enzimatik mutasyonlar kanser tedavisi için potansiyel hedef olması seçenektir. PKM2 izoenziminin glikolitik yolunda anahtar görevi görmesi ve kanserli hücrelerde aşırı sentezlendiği tespit edilmiştir. Glikolizin ATP üretmek veya biyosentetik blokların üretimine yönlendirilmesinde temel belirleyici enzim PKM2'dir. PKM2'nin glikolizde aldığı bu görev kanser tedavisinde kilit bir nokta oluşturmaktadır. Kemoterapötik ajan veya hücrede oluşan kemoterapötik direnci yenmek için PKM2 inhibitör kombine kemoterapötik ajan olarak kullanılabilir. Bu enzimin inhibitör tespit edilmesi bu sebepten önemlidir.

Yapılan bu çalışma ile birlikte 17 fenolik bileşimin PKM2 enzim aktivitesindeki etkisi araştırıldı. Enzim aktivitesi üzerinde inhibe etkisi oluşturan bileşiklerin inhibisyon gücü IC₅₀ ve K_i değerlerinin hesaplanması ile tespit edildi. Laktat dehidrogenaz kullanılarak 340 nm de absorbans düşüşü ile NADH' ın NAD⁺ ya dönüşümü takip edilerek enzim aktivitesi ölçüldü.

2017,40 sayfa

Anahtar Kelimeler: Pirüvat Kinaz M2, İnhibitör, Kanser



ABSTRACT

M.S. Thesis

INVESTIGATION OF EFFECTS OF SOME POLYPHENOL COMPOUNDS ON PYRUVATE KINASE ISOENZYME M2 ACTIVITY

Mert Oktay BAYKAN

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisors: Assoc. Yrd. Doç. Dr. Şevki ADEM

Metabolic regulation in rapidly growing tissues such as fetal tissues and tumours is different from that in most adult tissues. One of the most prominent distinctions between healthy and cancerous tissues is the differing energetic and nutritional needs associated with the rapid proliferative nature of cancer cells. In cancer cells glycolysis frequently is increased for generation of ATP to meet their energy needs. Also one or more isoforms of glycolytic enzymes have altered expression patterns or activities in cancer cells. It is option that enzymatic mutation in the tumor cells could be used as a potential target for cancer chemotherapy. In the cancer cells are characterized by an over expression of the pyruvat kinase isoenzyme type M2 (PKM2) which plays a key role in the glycolytic pathway. PKM2 is a master switch orienting glycolysis to ATP synthesis or to the production of biosynthetic blocks. For this reason it is an important target for anticancer treatments. PKM2 inhibitors and activators can be used as chemotherapeutic drug or combining chemotherapeutic drug to overcome drug resistance. As such, the discovery of new inhibitors/activators for his enzyme is very significant.

In this study was investigated the effects on PKM2 enzyme activity of 17 phenolic compounds. Inhibition strength of compounds were identified by calculating IC₅₀ and Ki values for substances that showed inhibition effects on this enzyme activity. IC₅₀ values were calculated for substances that show activation effects. Enzyme activity was assayed by converting from NADH to NAD⁺ using lactate dehydrogenase(LDH) resulting in a decrease in absorbance at 340 nm.

2017, 40 page

Key Words: Pyruvat kinase M2 inhibitor, activator, cancer

TEŞEKKÜR

Derslerimden tezimin yazılmasına kadar benimle ilk günden itibaren çok ilgilenen, bana yol gösteren, değerli bilgilerini benimle paylaşan, desteğini hiç esirgemeyen, sayın danışman hocam Yrd. Doç.Dr. Şevki ADEM'e; yüksek lisans öğrenimim boyunca benimle değerli bilgilerini paylaşan ve bana yol gösteren Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine, uzmanlarına ve araştırma görevlilerine;

Hayatımın en önemli kişileri olan, benden maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her koşulda benim yanımda olan, bana sonsuz sevgilerini ve desteklerini sunan arkadaşım Ceren ALPARSLAN'a, bununla birlikte eğitim hayatım boyunca dualarıyla yanımda olan ve bu yaşa gelene kadar her konuda yanımda olan annem Humma BAYKAN, babam Mahmut BAYKAN'a, kardeşim Pelin ÇİLELİ ve eşi Engin ÇİLELİ'ye ve adını burada sayamadığım katkısı olan herkese; şükranlarımı sunarım.

Ayrıca 15 Temmuz 2017 gecesi vatanımıza düzenlenen hain darbe girişimini canları pahasına savunma vazifesini üstlenen ve bu uğurda topraklarımız için canlarını veren şehitlerimize Allah'tan rağmen ve yakınlarına sabır dileklerimi sunarım.

Bu çalışma, Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (Proje No: 2014L04) desteklenmiştir.

Mert Oktay BAYKAN
Çankırı, Ağustos 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1. Kanser ve Glikoliz	5
2.2.Pirüvat Kinaz M2 (PKM2)	7
2.3. Kanser ve PKM2.....	10
2.4. Fenolik Bileşikler	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	18
3.1. Materyal	18
3.2. Yöntem	19
4. BULGULAR	23
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	32
KAYNAKLAR	34
ÖZGEÇMİŞ.....	39

SİMGELER DİZİNİ

ATP	Adenozintrifosfat
ADP	Adenozindifosfat
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	Ribo Nükleik Asit
PKM2	Pirüvat Kinaz M2 Enzimi
PEP	Fosfo Enol Pirüvat
FDP	Fruktoz difosfat
LDH	Laktat Dehidrogenaz
KCl	Potasyum Klorür
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
DMSO	Di Metil Sülfoksit
IC ₅₀	Enzim aktivitesini %50 azaltan inhibitör konsantrasyonu
K _i	İnhibisyon sabiti

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Enzimlerin inhibisyonu ve inhibisyon türleri -----	2
Şekil 2.1 Kanserli hücrelerde glikolizde görev yapan enzimlerin enerji metabolizması dışında hücredeki fonksiyonları (Ganapathy-Kanniappan and Geschwind, 2013)-----	6
Şekil 2.2 Piruvat kinaz enzimi 2 farklı gen tarafından kodlanmakta ve siplazing mekanizması ile dört farklı izoenzime sahiptir (Chaneton and Gottlieb 2012) -----	9
Şekil 2.3 PKM2 nin yapısı-----	10
Şekil 2.4 PK-M2'nin inhibitor/aktivatörlerinin metabolik etkisi -----	11
Şekil 2.5 Flavonoidlerin genel yapısı -----	14
Şekil 3.1 PKM2 aktivitesinin laktat dehidrogenaz aktivitesi ile birleştirilmiş aktivite tayini prensibi -----	20
Şekil 4.1 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine 5,7-bis(benzyloxy) 2-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)-2H-chromene bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği -----	25
Şekil 4.2 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine (2R,3S)-3,5,7-tris(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)chromane bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği -----	25
Şekil 4.3 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine (E)-(3,5-bis(benzyloxy)-2-(3-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)allyl)phenoxy)(tert-butyl)dimethylsilane bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği -----	26
Şekil 4.4. İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine (E)-3,5-bis(benzyloxy)-2-(3-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)allyl)phenol bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği -----	26
Şekil 4.5 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine 3-(2-((tert-butyl)dimethylsilyl)oxy)phenyl)-1-phenylpropane-1,2-diol bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği ---	27
Şekil 4.6 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine (E)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(2,4,6-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği--	27
Şekil 4.7 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine 3-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)propane-1,2-diol bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği -----	28
Şekil 4.8 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine tert-butyl(2-cinnamylphenoxy)dimethylsilane bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği-----	28
Şekil 4.9 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine Bisdemetoxycurcumin bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği-----	29
Şekil 4.10 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine Demetoxycurcumin bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği-----	29
Şekil 4.11 İnsan Rekombinant PKM2 enziminde Bisdemethoxycurcumin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği -----	30
Şekil 4.12 İnsan Rekombinant PKM2 enziminde Demetoxycurcumin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği -----	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Enzim inhibitörü olarak kullanılan bazı ilaçlar ve inhibisyon türleri -----	3
Çizelge 2.1 PKM2 enzim aktivitesi üzerinde etkisi araştırılan bileşiklerin adları ve yapıları -----	15
Çizelge 3.1 Piruvat kinaz M2 enzim aktivitesi için kuvvet içeriği-----	20
Çizelge 4.1 Bazı flavon bileşiklerin PKM2 enzim aktivitesi üzerindeki etkisi -----	23
Çizelge 4.2 Fenolik maddelerin PKM2 enzimi üzerine K_i çalışma sonuçları -----	30



1. GİRİŞ

Canlı varlıklar dışarıdan aldıkları besin maddelerini, kendi metabolik proseslerine uygun hale getirmek için bir seri kimyasal reaksiyonlar gerçekleştirirler. Enzimler protein yapısında olup, bu kimyasal reaksiyonların çoğunu katalizleyen biyomoleküllerdir. Katalizleme görevi gören enzimler katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve substratlarına karşı spesifiktirler. Bu biyolojik katalizörler tek bir kimyasal reaksiyonu ya da aynı tip benzer reaksiyonları katalize ederler (Nelson, 2005). Normal şartlarda çok uzun süren kimyasal reaksiyonların çok kısa sürede oluşmasını sağlarlar. Genellikle canlı, doku ve hücrenin ihtiyacına göre özelleşmiş yapıya sahiptirler (Edip ve Keha, 2011).

Biyokimya alanındaki araştırmalar içerisinde enzim çalışmaları önemli bir yer tutmaktadır. Yapılan enzim çalışmaları başta saflaştırılması ve inhibitörlerinin araştırılması olup, yanı sıra endüstriyel ve medikal alanlarda da araştırmalar yapılmaktadır. Enzimler bir çok hastalığın teşhisi için, inhibitör ve aktivatörleri ise ilaç olarak kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar sonrasında enzimlerinin hastalıkların tedavisinde önemli yer tuttuğu bilinmekte ve ilaç sektöründe uygulanmaktadır. Mevcut ilaçların yarıya yakını enzim inhibitörü olması ve yeni tedavi stratejilerinde enzimlerin önemli bir yer tutması nedeniyle bu çalışmalar ilgiyle takip edilmektedir (Copeland, 2013).

Enzimlerin in vivo ve in vitro aktivitelerinin inhibitörlerle aktivitelerinin azaltılması veya durdurulması inhibisyon olarak tanımlanmaktadır. Bu maddeler, çoğunlukla küçük molekül yapılı bileşikler ya da iyonlardır. Enzim inhibisyonu biyolojik sistemlerde başlıca bir kontrol mekanizması oluşturduğu için önem teşkil eder. Birçok kimyasal madde, ilaç ve zehirli bileşikler de etkilerini bu yolla göstermektedirler (Edip ve Keha, 2011).

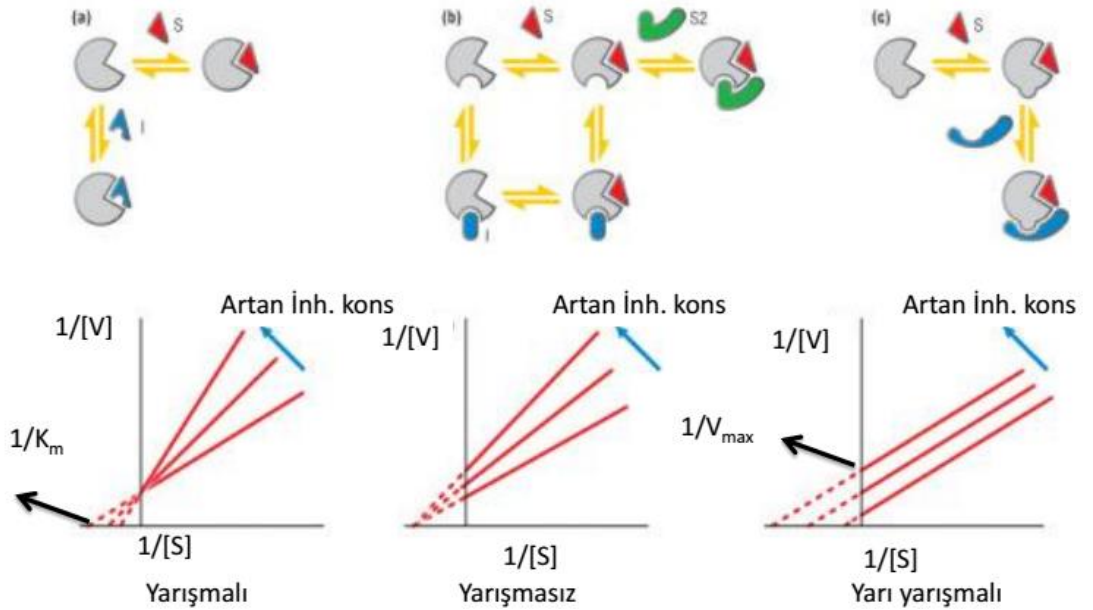
İnhibisyon, dönüşümsüz inhibisyon ve dönüşümlü inhibisyon olmak üzere ikiye ayrılır. İnhibitörün enzime kovalent bağ ile bağlanmasıyla veya zor ayrılan bir yapı oluşturmasıyla meydana gelen inhibisyon dönüşümsüz olarak adlandırılırken inhibitörün

enzimle dengeli etkileşimleri sonucu oluşan inhibisyona dönüşümlü inhibisyon denir. Dönüşümlü inhibisyon yarışmalı, yarışmasız ve yarı yarışmalı olmak üzere üçe ayrılır (Şekil.1.1).

Yarışmalı inhibisyonda, enzimin aynı aktif bölgesine bağlanmak için inhibitör ile substrat yarışırken, inhibisyon etkisi, substrat konsantrasyona bağlıdır. Substrat konsantrasyonu arttıkça inhibisyon etkisi azalmaktadır. Yarışmalı inhibisyonda K_M değeri artar V_{max} değeri ise değişmez.

Yarışmasız inhibisyonda, enzimin farklı bölgelerine bağlanan inhibitör ile substrat arasında herhangi bir yarış söz konusu değildir, birbirlerinden bağımsız olarak bağlanırlar. Bu inhibisyonda V_{max} azalırken K_M değeri değişmez.

Yarı yarışmalı inhibisyonda ise, ES (enzim-substrat) kompleksine bağlanan inhibitör kompleks bir yapı oluşturur. Bu inhibisyonda V_{max} ve K_M azalır. İnhibitör etkilerini genel olarak yarışmalı ve yarışmasız olarak kesin sınırlarla birbirinden ayırmak mümkün değildir. Genel olarak karışık inhibisyon gözlenmektedir (Edip Keha, 2011).



Şekil 1.1 Enzimlerin inhibisyonu ve inhibisyon türleri

Enzimlerin başka bir inhibisyon şekli de allosterik inhibisyonudur. Bu inhibisyonda, inhibitörler enzimin aktif bölgesine değil de başka bir kısma bağlanırlar ve üç boyutlu yapıyı değiştirerek enzim aktivitesine etki ederler (Edip ve Keha, 2011).

Enzimlerin ilaç tasarımlarında önemli hedeflerinden biri olması biyokimyasal reaksiyonlarda göstermiş oldukları rollerden kaynaklanmaktadır. **Çizelge 1.1**'de gösterildiği gibi, piyasada kullanılan ilaçların yaklaşık olarak %47 lik kısmı enzim inhibitörlerinden oluştuğu gibi yeni ilaç tasarımlarında farklı enzimler zamanla ortaya çıkmakta ve bu oran %53 lere varmaktadır (Hopkins and Groom, 2002; Terstappen and Reggiani, 2001). Yapılan çalışmalarla birlikte yeni inhibitör ve aktivatörlerin bulunması, inhibisyon türlerinin ve etki potansiyellerinin belirlenmesi son derece önemlidir.

Çizelge 1.1 Enzim inhibitörü olarak kullanılan bazı ilaçlar ve inhibisyon türleri (Smith and Simons, 2004)

İlacın adı	Hedef enzim	İnhibisyon Türü	Hastalık
Asetazolamid	Karbonik anhidraz	Yarışmalı	Glaucoma
Metotreksat	Dihidroflat redüktaz	Yarışmalı (Folik asit)	Kanser
Lovastatin, pravastatin	HMG-CoA redüktaz	Yarışmalı	Kolesterol
Etoposit	Topoizomeraz II	Yarışmasız	Kanser
Takrin	Asetilkolinesteraz	Yarışmasız	Alzheimer
Trazodon	Adenozin deaminaz	Yarışmasız	Depresyon
Kamptotesin	Topoizomeraz I	Yarı yarışmalı	Kanser
Metotreksat	Dihidroflat redüktaz	Yarı yarışmalı (NADPH)	Kanser, Bakteriyel enfeksiyon
Valproik asit	UDP- glukuronozil transferazlar	Yarı yarışmalı	Ksenobiyotik metabolizması

Milyonlarca insanın hayatını etkileyene ve her geçen gün daha fazla insanda görülmeye başlanan kanser metabolik bir rahatsızlıktır. Kanserın yenilebilmesi için dünyanın her bölgesinde sayısız araştırmalar yapılmaktadır. Yapılan araştırmalar ile hastalığın tedavisi için farklı metodolojiler bulunmaya çalışılmaktadır. Normal hücrelerden farklı metabolik

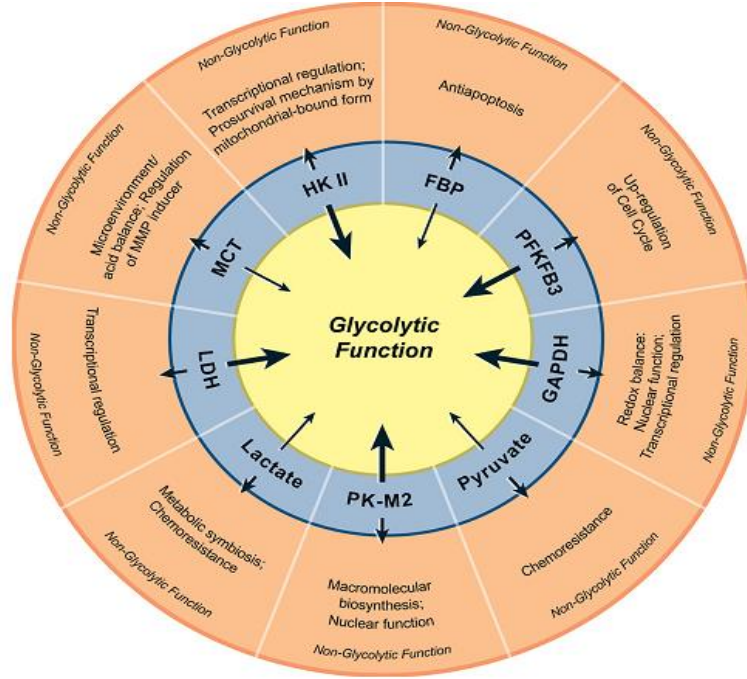
işlevlere sahip olan kanser hücrelerinin tedavisinde bu farklılığın hedef olarak kullanılabilmesi literatürde belirtilmiştir. Kanser hücrelerinin “Warburg etkisi” olarak bilinen diğer dokulardan farklı olarak aşırı glikoz tüketimi yaklaşık olarak doksan yıldır bilinmekte ve bu farklılık teşhis amaçlı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Warburg, 1956). Fakat bu metabolik yolun inhibisyonu, diğer dokular üzerinde toksik etkiye neden olacağı düşünüldüğü için tedavi amaçlı hedef olarak seçilememiştir. Bununla beraber, son on yılda yapılan birçok yayında moleküler biyolojide yapılan çalışmaların da etkisiyle diğer dokulardan farklı olarak enzim ekspresyonunda önemli farklılıkları olduğu ifade edilmiştir. Bu farklılık, kanser hücreleri için tedavide spesifik bir hedef olabileceği literatürde ifade edilmiştir. Bu enzimleri inhibe ederek uygulanacak kanser tedavileri, diğer dokular üzerindeki toksik ve olumsuz etkileri en aza indirecektir. Bu farklı enzimlerin kanser tedavisinde hedef seçilebileceği literatürde belirtilmiş ve bu enzimlerin inhibitörleri kullanılarak klinik çalışmalar başlatılmıştır (Gatenby and Gillies, 2007; Porporato *et al.*, 2011; Scatena *et al.*, 2008).

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Kanser ve Glikoliz

Kanser hücre fizyolojisinde birçok değişime neden olan kompleks bir hastalıktır. Bu hücrelerde metabolizma yeni duruma uygun ihtiyaçları karşılamak için yeniden düzenlenir (Hainaut and Plymoth, 2012). Normal olmayan hücre büyümesi hastalığın biyolojik son noktasıdır. Bu hücrelerde altı temel değişim meydana gelmektedir. Bunlar, büyüme sinyalleri kendi kendine yeterlilik, büyüme baskılayıcılara karşı duyarsızlaşma, programlanmış hücre ölümü kaçırma, sınırsız replikatif potansiyeli, sürekli vasküler beslenmesi, doku işgali ve metastaz şeklinde sıralanmaktadır (Hanahan and Weinberg, 2000).

Kanser hücrelerindeki metabolik değişimden bahsedildiğinde ilk akla gelen Otto Warburg'dur (Warburg, 1956). Bu araştırmacı yaptığı çalışmalarla kanserli hücrelerdeki glikoz tüketiminin normal hücrelere göre 10 – 15 kat daha fazla olduğunu tespit etmiştir. Alınan glikoz, hücrenin enerji kaynağı olarak kullanılmakla beraber aynı zamanda glikoliz metabolizmasının ara metabolitleri yoluyla biyomoleküllerin sentezi için karbon kaynağı olarak da kullanılmaktadır. Kanserli hücrelerde olan bu farklılık, hücre içi ve hücre dışı metabolit miktarında diğer dokulara oranla bazı maddelerin aşırı bulunmasına neden olmaktadır. Bu maddeler kanser teşhisinde kullanılmaktadır (Munoz-Pinedo *et al.*, 2012). Ayrıca bazı biyokimyasal prosesleri etkilemektedir. Laktik asit üretiminin Laktik asit üretiminin aşırı olması neticesinde kanserli hücrelerin çevrelerinde hipoksi meydana gelmektedir. Hipoksinin meydana gelmesiyle birlikte oksidatif fosforilasyon enzimlerin transkripsiyonu baskılanmakta glikoliz enzimlerinin transkripsiyonu ise aktive edilmektedir. Ayrıca, laktat ve piruvat gibi oluşan ara metabolitler kanser tedavisi sürecinde ilaçlara karşı hücrede direnç oluşmaktadır. Kanserli hücrelerde glikolizin enerji üretimi dışında metabolik etkileri aşağıda verilmiştir.



Şekil 2.1 Kanserli hücrelerde glikolizde görev yapan enzimlerin enerji metabolizması dışında hücredeki fonksiyonları (Ganapathy-Kanniappan and Geschwind, 2013)

Metabolik işleyişi normal hücrelere göre farklı olan kanseri hücreler, glikoliz enzimlerinin metabolik ihtiyacını karşılayabilmesi için enzimlerin aşırı sentezlenmesine sebep olmuştur. Enzimlerin aşırı sentezlenmesine karşın bu enzimlerin inhibe ederek kanserli hücrelerin tedavisinde kullanılabileceği düşünülmüştür.

Glikoliz yolunun bazı izoenzimlerinin kanserli dokularda fazla sentezlendiği bilinmektedir. Aşırı sentezlenen bu enzimlerin inhibe edilerek kanser tedavisinde başarı sağlanabileceği literatürde belirtilmiş ve bu amaçla gerekli çalışmalara başlanmıştır.

Glikoliz yolunun inhibisyonu;

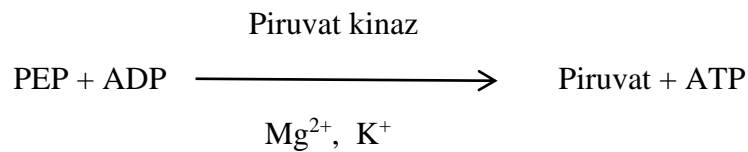
- Glikoliz yolunun hızını yavaşlatarak hücre içi ATP seviyesini azaltacağı
- Glikoz tüketim miktarı azalacağından hücrede otofajiyi tetikleyeceği
- Pentoz fosfat yolunu etkileyerek hücre içi NADPH ve riboz 5 – fosfat miktarını azaltacağı, bununla da hücrenin oksidatif strese karşı mücadelesini zayıflatacağı, DNA ve RNA sentez hızının düşeceği,

- Glikoliz hızını azaltması nedeniyle hücrenin biyokimyasal dengesini bozacağı,
- Piruvat ve laktat gibi kemoterapötik ajanlara karşı hücrenin direnç oluşturmasını sağlayan maddelerin miktarlarının azalmasına neden olacağı
- Laktat oluşumunun azalması ile hücrenin etrafında oluşan asidik ortamın değişeceği belirtilmiştir.

Bu nedenlerden dolayı, bu enzimin inhibitörlerinin potansiyel antikanser ajan olarak, kemoterapötik direnci yenmek için kombine kemoterapötik ajan olarak kullanılabileceği bilinmektedir (Ben Sahra *et al.*, 2010; Wolf *et al.*, 2011).

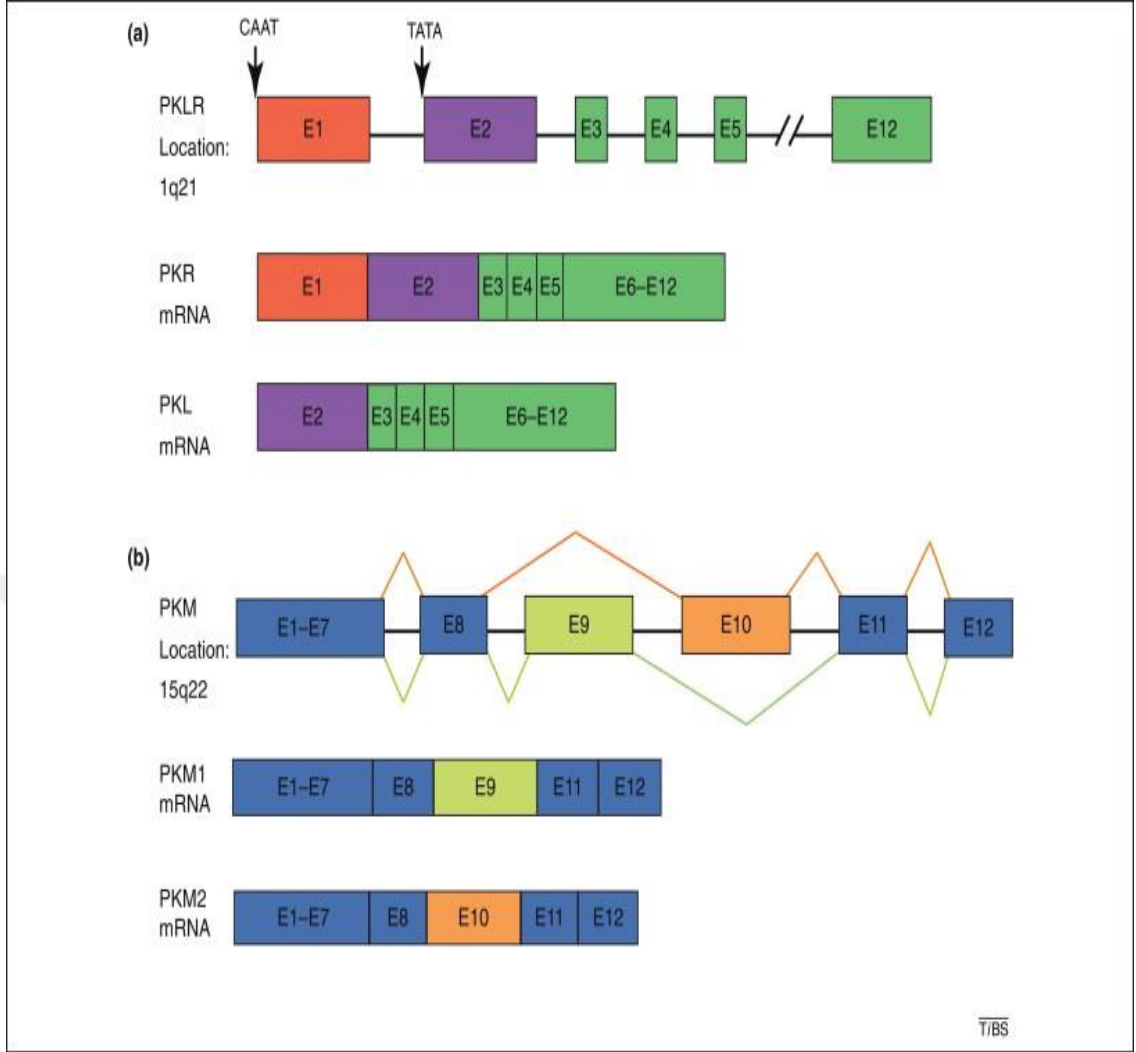
2.2. Piruvat Kinaz M2 (PKM2)

Glikolizde ikinci adenozin trifosfatın (ATP) sentezlendiği tepkime piruvat kinaz tarafından katalizlenir. Piruvat kinaz glikolitik yolun bu son basamağında fosfoenol piruvattan (PEP) adenozin difosfata (ADP) bir fosforil grubunun transferini katalizleyerek ATP ve piruvatı oluşturur. Tepkime negatif serbest enerjiye sahip olması nedeniyle fizyolojik koşullarda geri dönüşümsüzdür. Piruvat kinaz, glikoliz yolunun kontrolünü sağlayan üç enzimden birisidir (Noguchi *et al.*, 1987).



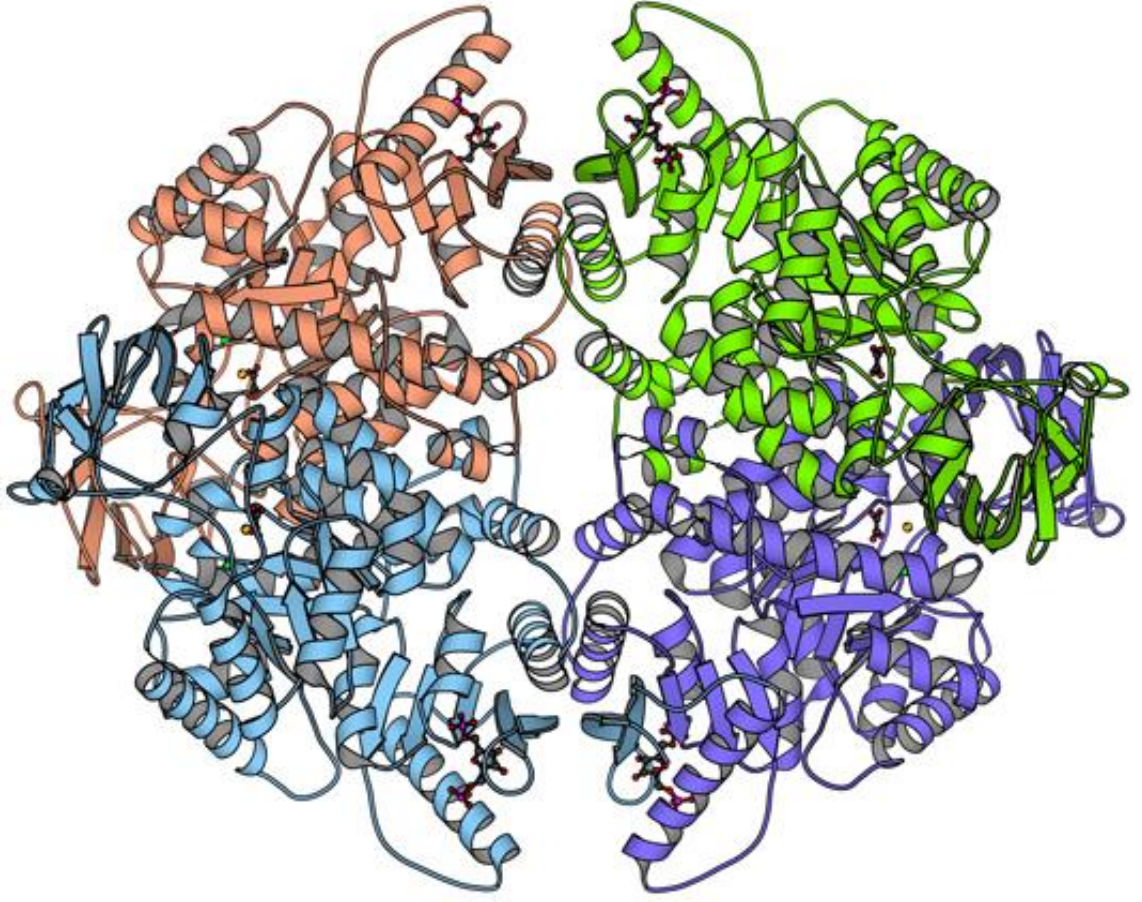
Genel olarak piruvat kinaz, yaklaşık olarak 200 – 250 kDa ağırlığında olan 4 monomeren oluşmaktadır. Her bir monomer yaklaşık 500 aminoasitten meydana gelmiş tetramerik yapıya sahiptir (Jurica *et al.*, 1998; Rigden *et al.*, 1999; Valentini *et al.*, 2002). Bu monomerler üç majör domain ve bunlara ek olarak küçük N-terminal domain içermektedir. Piruvat kinaz enziminin domainlerinin kombinasyonu ve alt ünitelerinin rotasyonu, aktif bölgede geometrinin değişimine neden olmaktadır (Valentini *et al.*, 2002). Bu rotasyon piruvat kinaz enziminin aktif R formunu veya aktif olmayan T formunu oluşturur. Piruvat kinaz enziminin aktif olmayan T formundan, aktif R formuna geçişindeki değişiklikler substratın enzime bağlanmasını sağlar (Mattevi *et al.*, 1996; Valentini *et al.*, 2002).

Kinetik özellikleri, elektrik mobiliteleri, aminoasit içerikleri ve çeşitli dokulardaki dağılımına göre insan piruvat kinazı L ve M tipi olmak üzere iki farklı gen tarafından kodlanan ve splicing mekanizmaları ile farklılaşan 4 farklı izoenzime (M1, M2, L ve R) sahiptir (Eigenbrodt *et al.*, 1992). M tipi M1 ve M2 izoenzimleri, L tipi ise L ve R izoenzimlerini içermektedir. R tip piruvat kinaz olgun eritrositlerde, L tip piruvat kinaz karaciğer ve böbrek gibi glukoneojenik dokularda bulunmaktadır. R ve L tip piruvat kinaz FDP tarafından aktive edilmekte ve substratı olan PEP' e karşı allosterik bir davranış göstermektedir. M1 tip piruvat kinaz yetişkin iskelet kasında bulunan tek izoenzim olup kalp kası ve beyinin ana izoenzimidir. M1 tip piruvat kinazın kinetik ve düzenleyici özellikleri diğer 3 tipten farklı olup PEP' e karşı Michaelis-Menten kinetiği göstermekte ve FDP tarafından aktive olmamaktadır. M2 tip piruvat kinaz fetus ve tümör dokularının majör izoenzimi olup en fazla erişkin dokularda bulunur (Mazurek *et al.*, 2000). PEP' e karşı sigmoidal kinetik özellik göstermekte olan M2 tip piruvat kinaz, FDP tarafından da aktive olmaktadır. M2 izoenzimi elektroforetik ve immünolojik olarak M1 izoenzimine, kinetik olarak da L izoenzime benzemektedir.



Şekil 2.2 Piruvat kinaz enzimi 2 farklı gen tarafından kodlanmakta ve siplazing mekanizması ile dört farklı izoenzime sahiptir (Chaneton and Gottlieb 2012)

M2 Tipi Piruvat Kinaz M2 tipi piruvat kinaz enzimi, yetişkin dokularında geniş bir dağılıma sahiptir. Akciğer, böbrek, yağ dokusu gibi yetişkin dokularında, fetal dokularda, lökosit, plateletlerde ve birçok tümöral dokuda mevcut kompleks tip piruvat kinaz olarak kabul edilmektedir. M2 tipi piruvat kinaz eş moleküler ağırlıklı ve benzer yapıda dört alt birimden oluşmuştur (Şekil 2.3) (Chiavarina *et al.*, 2011; Christofk *et al.*, 2008).



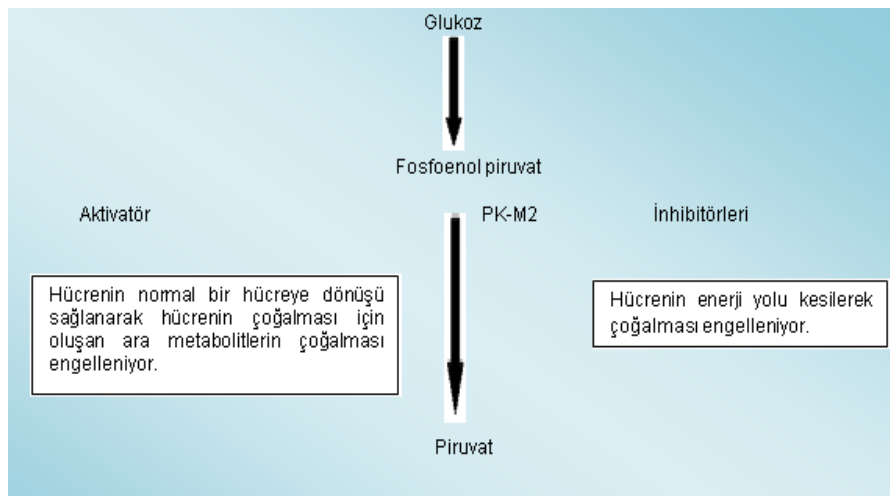
Şekil 2.3 PKM2 nin yapısı (<http://www.ebi.ac.uk/s4/summary/molecular/structure;jsessionid=E2BA3B9C046789D4E91F87B84265C220?ref=4fxj&term=PKM2&classification=9606>, 2017)

2.3. Kanser ve PKM2

Glikoliz kanserli hücrelerde gerçekleştirilirken bazı izoenzimlerin daha fazla sentezlendiği bilinmekte, inhibitör kullanılarak bu durumu engellenerek kanserde başarı sağlanabileceği bilinmektedir. Kanser tedavisinde kullanılmak üzere bilinen inhibitör etkisi ortaya konmak üzere klinik çalışmalar başlatılmıştır. Bu enzimlerden bir tanesi de kanserli dokularda aşırı eksprese olan piruvat kinaz M2 olarak bilinmektedir. Enzimin bu izoformu fosfotirozin peptitlerine bağlanabilen tek piruvat kinaz olduğu için birçok kanser türü için hem teşhis de hem de tedavi sürecini takipte dokuya spesifik olmayan marker olarak kullanılmaktadır (Harris *et al.*, 2012; Mazurek *et al.*, 2011). Hücre içerisine alınan glukozun enerji ihtiyacı için mi yoksa hücreye gerekli diğer metabolitlere mi dönüşeceği PKM2 enzimi tarafından belirlenmektedir. PKM2 enzim farklı formlarda

aktivitesi ile diğer izoenzimlerinden ayrılmaktadır. PKM2 enzimi dimerik formda neredeyse inaktif iken tetramerik formda ise yüksek aktiviteye ulaşır. Aktif forma dönüşümünü fruktoz 1,6-bis fosfat aktive ederken, onkoproteinler tarafından inaktif halde tutulmaktadır. Hücre içinde fruktoz 1,6-bis fosfat seviyesi arttığında dimerik formdan yüksek aktiviteye sahip tetramerik forma dönüşerek glukozun piruvata dönüşümünü tamamlar. Hücre içi F1,6-P düştüğünde dimerik forma dönüş sağlanır ve glikoliz enerji için değil biyosentez arabileşikler için çalışır (Cortes-Cros *et al.*, 2013)

İlginç bir şekilde, literatürde bu enzimin hem inhibitörlerinin hem de aktivatörlerinin, kemoterapötik amaçlı kullanılabilmesi belirtilmiştir (Cortes-Cros *et al.*, 2013; Harris *et al.*, 2012; Mazurek *et al.*, 2011). PKM2 enziminin aktivatörleri kanser hücrelerinin normal hücreler gibi metabolik bir yapıya kavuşmasını sağlayarak hücrelerin çoğalma hızlarının düşüreceği belirtilmiştir. İnhibitörlerinin ise kanserli dokudaki glikolizi durdurarak hücrede enerji eksikliği oluşturarak hücre çoğalmasını durduracağı ifade edilmiştir. Çünkü hücrelerin temel enerji kaynağı glikolizdir. PKM2 enziminin inhibitörleri kullanılarak Faz II seviyesinde klinik çalışmalar yapılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Bu çalışmalardan sonra PKM2 enzimi için spesifik inhibitor belirlenmesi amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Bu amaçla bir anti kanser ilacı olarak kullanılmak üzere PKM2 enziminin hem aktivatörleri hem de inhibitörleri için yapılmış çalışmalar vardır. Her iki tür çalışmalar için de literatürde olumlu sonuçlar rapor edilmiştir (Boxer *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011; Vander Heiden, 2011).



Şekil 2.4 PK-M2'nin inhibitor/aktivatörlerinin metabolik etkisi

Kanserli dokular laktat ve pirüvat gibi metabolitleri kanser tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı direnç sağlamak amacıyla kullandığı belirtilmiştir. Ayrıca laktatın hücre dışına taşınımı ile hücrede hipoksi etkisi, oluşturmakta ve bu hücre içi birçok metabolik prosesi etkilemektedir. Bu etki sebebiyle, oksidatif fosforilasyon enzimlerinin transkripsiyonu baskılanmakta, hücrede oksijen miktarı oldukça düşmektedir. Kanser tedavisinde bu enzim bu sebeplerle önem kazanmaktadır.

2.4. Fenolik Bileşikler

Benzen halkası içeren organik maddeler fenolik bileşikler olarak adlandırılmakta olup bitkiler aleminde bulunan ikincil metabolitlerdir. Kimyasal açıdan flavonoid olmayanlar (hidroksisinnamik, hidroksibenzoik asit ve türevleri, fenolik alkoller) ve flavonoidler (antosiyantinler, flavon-3-monomerleri ve polimerleri, flavonoller proantosiyanidinler) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Benzoik asitlerin esterleşmesi sonucu oluşan hidrolize olabilen tanenler ve proantosiyanidinler (kondense tanenler), tanenler kategorisinde değerlendirilebilir (Mushtaq and Wani, 2013).

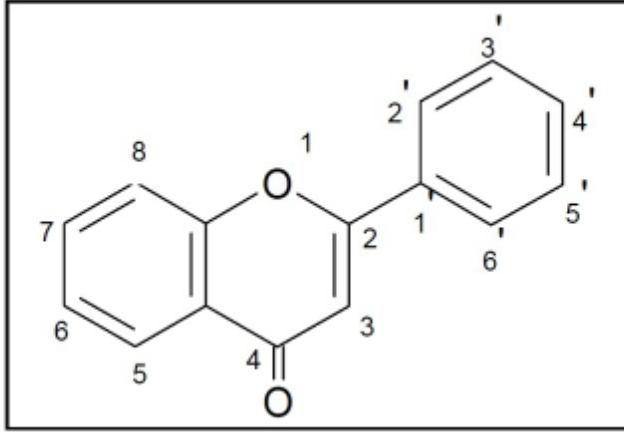
Fenolik bileşikler bitkilerde fazla miktarda bulunan, meyve çiçeklere renklerini veren, çevresel stres faktörlerine karşı bitkilere koruma sağlayan, bitkilerdeki sekonder metabolitlerin ana sınıfını oluşturan, benzen halkasına hidroksil bağlı kimyasal bileşiklerdir. Fenolik bileşikler yıllardır geleneksel olarak tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Ayrıca antioksidan, antikanser ve antiinflamatuvar gibi farklı biyolojik etkilerinden dolayı önemli bileşiklerdir (Kris-Etherton *et al.*, 2002; Middleton Jr *et al.*, 2000; Nigam, 2009).

Bu bileşiklerin biyolojik aktiviteleri ile ilgili birçok çalışma yapılmaktadır. Bu bileşikler kendi içinde gruplara ayrılmakla beraber fenolik asitler ve flavonoidler en büyük grubunu oluşturmaktadır. Flavonoidler geniş bir spektrumda biyolojik aktivite gösteren bitki fenollerinin en büyük grubunu içermektedir. Bu bileşikler birçok alanda kullanılmaktadır. Sözü edilen bileşikler insan sağlığına faydalı olabileceği gibi birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde de kullanılabileceği literatürde belirtilmiştir. Birçok deneysel ve

epidemolojik çalışmada çeşitli dejeneratif hastalıklara karşı fenolik asitlerin koruması rapor edilmiştir (Dykes and Rooney, 2007)

Bitkiler aleminde çok geniş bir yayılım alanına sahip olan fenolik bileşikler, sekonder metabolitler olarak da tanınırlar (Burns *et al.*, 2001). Fenolik bileşikler, en az bir hidroksil grubu (OH) ve bunun fonksiyonel gruplarını içeren aromatik halkalı bileşiklerdir. En basit fenolik bileşik bir tane hidroksil grubu içeren benzendir ve fenol olarak adlandırılmaktadır. Birden fazla hidroksil kökü içeren fenolik maddeler ise polifenoller olarak bilinirler. Tüm fenolik bileşikler, basit fenollerdeki benzen halkasına farklı radikal grupların bağlanması ile oluşmuşlardır (Tsao, 2010). Fenolik bileşikler genel olarak basit fenoller ve polifenoller olmak üzere iki grup altında toplanmaktadır. Basit fenoller bir veya birkaç fenol grubu içeren aromatik bir çekirdekte oluşmaktadır. Doğada en çok rastlanılan basit fenollere resornikol ile arbut ve *Ericaceae* yapraklarında bulunan arbutin örnek olarak verilebilir. Asma ise polifenollerce zengin bir bitki türü olup, asmada bulunan polifenoller çok genel bir sınıflandırma şekli olarak fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere 2 grup altında toplanmaktadır (Shi *et al.*, 2003).

Flavonoidler (flavon türevleri) yapısında C6-C3-C6 (difenilpropan) formunda iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşur ve 15 karbon atomu içerirler. Antosiyanidinler, flavonlar, flavonoller, kateşin ve lökoantosiyanidinler ile protoantosiyanidinler olmak üzere 5 alt grupta incelenirler. Flavonoidlerin yapısındaki OH grupları, reaktif özelliklerinden dolayı kolaylıkla glikozitlenir (Nigam, 2009).



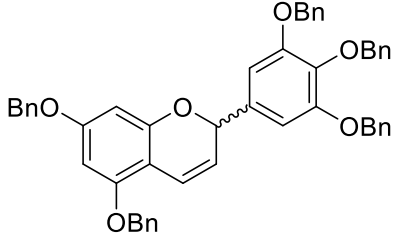
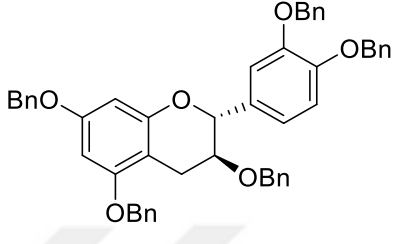
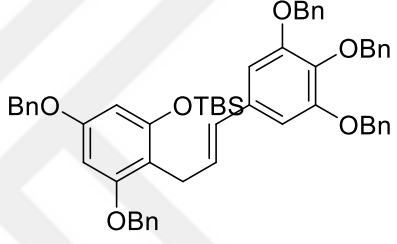
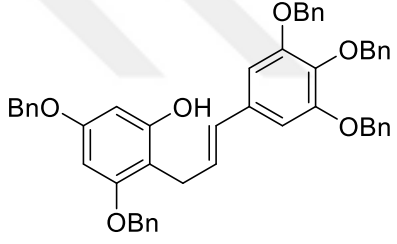
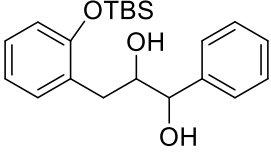
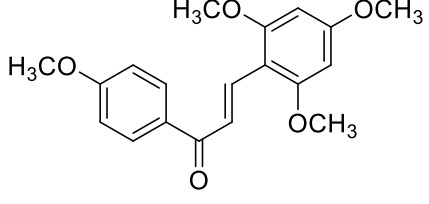
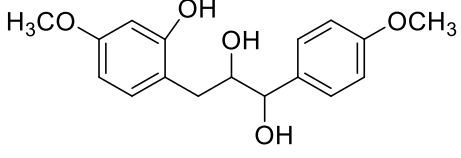
Şekil 2.5 Flavonoidlerin genel yapısı

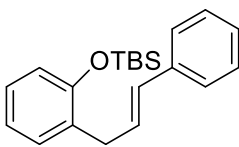
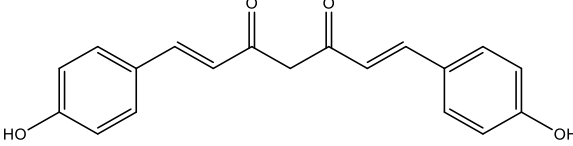
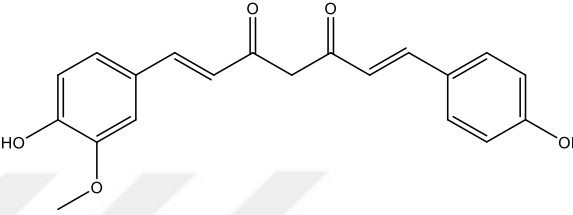
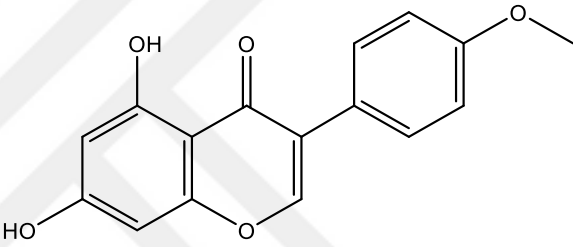
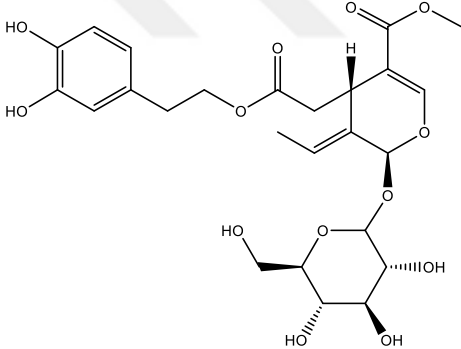
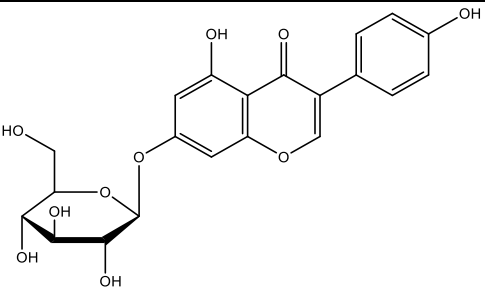
Flavonoidler, çeşitli bitkiler tarafından yüksek miktarda üretilen iyi bilinen fitokimyasallardır (bitkilerde bulunan biyolojik olarak aktif çeşitli bileşiklerdir). Flavonoidlerin gözlenen *in vitro* biyolojik etkileri şunlardır: serbest radikal yakalama, enzimatik aktivitenin düzenlenmesi, hücresel proliferasyonun inhibisyonu, antibiyotik, antialerjik, anti-ülser ve antiinflammatuvar etki. Flavonoidlerin koruyucu aktiviteleri onların yapısal özelliklerine bağlıdır (Singh *et al.*, 2014a) Doğal flavonoidlerle kanser terapisinin yeni yaklaşımı, tedavinin kalitesini geliştirmek ve kanser ve anti kanser ilaçlara karşı maksimum koruma sağlamak için araştırılmaktadır (Chahar *et al.*, 2011)

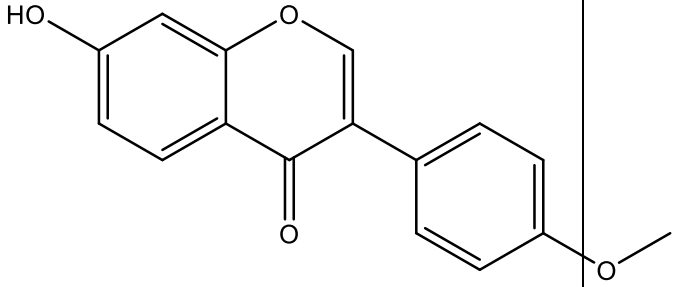
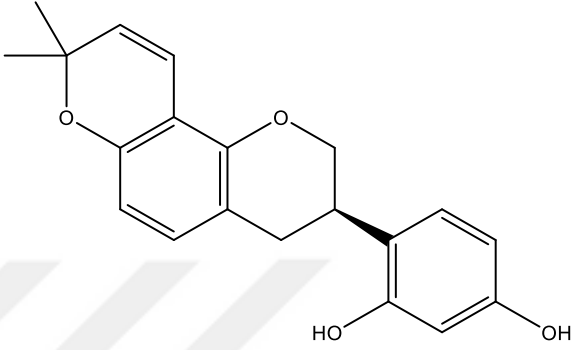
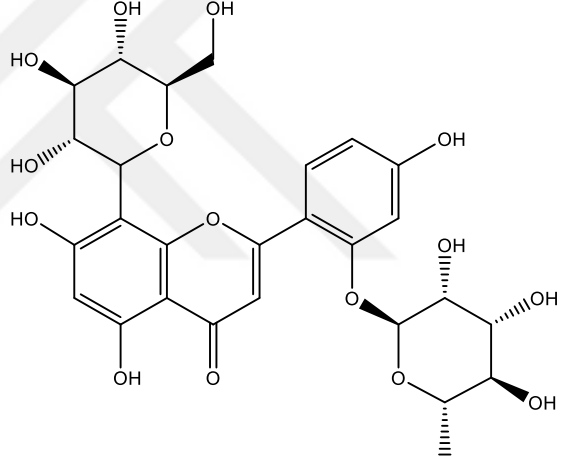
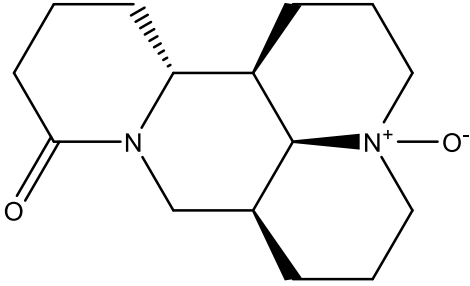
Flovonoid bileşikler çeşitli biyoaktiviteye sahiptir (Chahar *et al.*, 2011). Bunlardan bazıları;

- Antioksidan etkisi: oksijen radikallerinin inaktivasyonu
- Elektrofilik bağlanması
- Koruyucu enzim indüksiyonu: (GT, GST)
- Apoptoz hızı artışı
- Hücre çoğalması inhibisyon
- Lipid peroksidasyonu inhibisyon
- Anjiyojenez inhibisyonu
- H-verici (örn. GSH-peroksidazlar)
- DNA oksidasyon inhibisyonu

Çizelge 2.1 PKM2 enzim aktivitesi üzerinde etkisi araştırılan bileşiklerin adları ve yapıları

<p>1. 5,7-bis(benzyloxy) 2-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)-2H-chromene</p>	
<p>2. (2R,3S)-3,5,7-tris(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)chromane</p>	
<p>3. (E)-(3,5-bis(benzyloxy)-2-(3-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)allyl)phenoxy)(tert-butyl)dimethylsilane</p>	
<p>4. (E)-3,5-bis(benzyloxy)-2-(3-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)allyl)phenol</p>	
<p>5. 3-(2-((tert-butyl)dimethylsilyloxy)phenyl)-1-phenylpropane-1,2-diol</p>	
<p>6. (E)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(2,4,6-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one</p>	
<p>7. 3-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)propane-1,2-diol</p>	

<p>8. tert-butyl(2-cinnamylphenoxy) dimethylsilane</p>	 <p>The structure shows a cinnamyl group (3-phenylprop-2-en-1-yl) attached to a phenoxy group (2-phenoxyphenyl), which is further substituted with a tert-butyl dimethylsilyl ether (OTBS) group.</p>
<p>9. Bisdemethoxycurcumin</p>	 <p>The structure shows a central heptane-2,5-dione core with two trans-3-(4-hydroxyphenyl)acryloyl groups attached to the 3 and 6 positions.</p>
<p>10. Demethoxycurcumin</p>	 <p>The structure shows a central heptane-2,5-dione core with two trans-3-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)acryloyl groups attached to the 3 and 6 positions.</p>
<p>11. Biochanin a</p>	 <p>The structure shows a flavone core with a 4-hydroxyphenyl group at the 7-position and a 4-methoxyphenyl group at the 3-position.</p>
<p>12. Oleuropein</p>	 <p>The structure shows a complex polyphenolic glycoside. It features a central flavanone core with a 3,4-dihydroxyphenyl group at the 7-position, a 4-methoxyphenyl group at the 3-position, and a 3-(3,4-dihydroxyphenyl)propyl ester group at the 2-position. The 2-position is also linked to a glucose moiety via an ether bond.</p>
<p>13. Genistin</p>	 <p>The structure shows a flavone core with a 4-hydroxyphenyl group at the 7-position and a 4-methoxyphenyl group at the 3-position. The 3-position is linked to a glucose moiety via an ether bond.</p>

14. Formononetin	
15. Glabridin	
16. Vitexin 2-o-rhamnoside	
17. Oxymatrine	

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Kullanılan Maddeler:

- B – nikotinamid adenin dinükleotit
- Adenozin 5 – difosfat sodyum
- Fosfoenol piruvat
- D – fruktoz 1,6 bifosfat trisodyum oktahidrat
- L – laktik dehidrogenaz
- Piruvat kinaz M2
- Potasyum klorür
- Magnezyum klorür
- Tris-HCl
- Çizelge 2.10' da verilen fenolik maddeler

Yararlanılan Alet ve Cihazlar:

- Spektrofotometre
- Otomatik pipet
- pH metre
- Kuvars küvetler

Kullanılan çözelti ve kimyasalların hazırlanışı:

1. pH7.5 250 μ M tris tamponu: 1,96 gr tris tartılıp 55 ml su içerisinde çözüldü ve pH ayarlandı.
2. ADP: 6,4 mg tartılarak ve 1,25 ml tampon içerisinde çözülür
3. NADH: 3,55 mg tartılarak ve 1,25 ml tampon içerisinde çözülür.
4. PEP: 3,92 mg tartılarak ve 1,25 ml tampon içerisinde çözülür

5. Enzim çözeltisi ve fruktoz 1,6 bisfosfat : 0,5 mg tartılarak, 500 μ L su içerisinde çözülür. Daha sonra üzerine 125 μ l piruvat kinaz M2 enzimi eklenir ve 1 ml hacime tamamlanır.
6. LDH: 50 μ L LDH alınır ve toplam hacim 1,25 ml' ye tamamlanır.
7. KCl ve MgCl₂: 0,745 gr KCl ve 0,095 gr MgCl tuzları tartılır ve toplam hacim saf su ile 5 ml' ye tamamlanır.
8. Fenolik bileşikler: 1 mg/ml DMSO olacak şekilde çözünüp su ile 10 kat seyreltilerek stok çözeltiler hazırlandı.

3.2. Yöntem

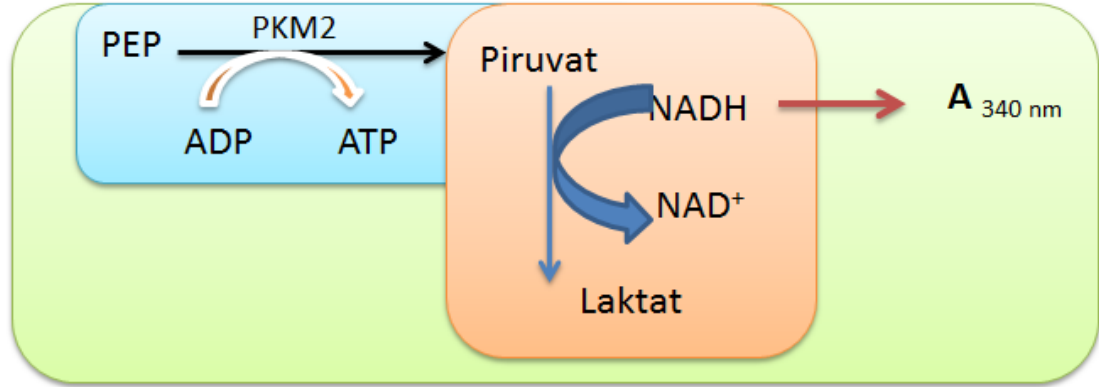
Enzim aktivite ölçümü

Piruvat kinaz M2 aktivitesi katalizlediği reaksiyonun ürünlerinin ölçülmesi ile belirlenir. Oluşan laktat miktarı laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesine bağlı olarak Beutler metoduna göre ve ATP miktarı da lusiferaz enzim aktivitesine bağlı olarak iki şekilde ölçülebilmektedir (Beutler, 1971; Christofk *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2010).

Çalışmada enzimin aktivitesi, oda sıcaklığında ortamda bulunan NADH miktarının aşırı Laktat dehidrogenaz mevcudiyetinde azalması ile hesaplandı ve aktivite sonuçları 340 nm'de spektrofotometrik olarak takip edildi. Aktivite ölçümleri 1 ml'lik küvetlerde yapıldı. Küvet içeriği **çizelge 3.1**'de verilmiştir. Absorbans düşüşü 3 dakika takip edildi ve bir dakikalık ortalama düşüş hesaplamada kullanıldı. Enzim ünitesi, enzim ünitesi/ml olarak hesaplanmıştır.

Enzim aktivitesinin daha iyi sonuçlanabilmesi için yapılan ön hazırlıklarda her bir maddenin ayrı ayrı pipetlenmesi durumunda 20 dakika gibi uzun bekleme süreleri sonunda spektrofotometrede enzim katılmadan absorbans değişimi sabitleniyordu. Bekleme süresini kısaltmak için çeşitli kombinasyon çalışmaları sonucunda ADP, NADH, PEP, LDH ve MgCl₂-KCl çözeltileri çalışma öncesi birleştirildi. Bu yöntem ile

yapılan ön çalışmalarda olumlu sonuçlar alındığı için bu protokolle inhibisyon çalışmaları yapıldı. Aktivite ölçümünde gerçekleşen reaksiyonlar aşağıdaki gibidir.



Şekil 3.1 PKM2 aktivitesinin laktat dehidrogenaz aktivitesi ile birleştirilmiş aktivite tayini prensibi (Arslan, 2015)

Çizelge 3.1 Piruvat kinaz M2 enzim aktivitesi için küvet içeriği

Stok çözeltiler	Kontrol küveti (μl)	Numune küveti (μl)
200 mM Tris. HCl (pH=7,5)	200	200
100 mM MgCl_2 , 200 mM KCl, 40 mM PEP, 3,6 mM NADH, LDH (24 IU), 20 mM ADP, 20 mM Tris.HCl (pH=7,5)	275	275
20 mM FBP	25	-
Su	500	500
2 dakika inkübasyon		
Enzim örneği (20 mM FBP)	-	25
Toplam	1000	1000

Piruvat kinaz M2 enzimi için enzim ünitesi hesaplamalarında aşağıdaki formül kullanılacaktır. Formülde yer alan simgeler aşağıda açıklanmıştır.

$$E\ddot{U}/ml = \frac{\Delta OD \times V_T}{6,22 \times V_E} \times S_F$$

E \ddot{U} /ml : 1 ml'deki enzim ünitesi

ΔOD : Bir dakikadaki absorbans değişimi

6,22 : Ekstinksiyon katsayısı

V_T : Ölçümün yapıldığı toplam küvet hacmi

V_E : Ölçümün yapıldığı küvete ilave edilen enzim numunesinin hacmi

S_F : Seyreltme faktörü (seyreltilen örnek için kullanılır)

Enzim aktivitesi üzerine çalışılacak bileşiklerin in vitro etkilerinin belirlenmesi

Bileşiklerin, enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini tespit etmek amacıyla küvet ortamına farklı konsantrasyonlarda inhibitörler katılarak aktivite değerleri okundu. Öncelikli olarak bileşikler 1 mg/ml olacak şekilde DMSO'da çözüldü. DMSO %3 oranının üstünde olursa aktiviteye neden olduğu için çalışmalarda küvet içi miktarının bu oranı aşmamasına dikkat edildi. Ayrıca bileşiklerin sulu ortamda çözünme problemi nedeniyle düşük konsantrasyonlarda çalışıldı. İnhibisyon etkileri, mümkün olan en yüksek konsantrasyonlarda ön denemelerle belirlendi. IC₅₀ değerlerin belirlenmesi için % aktivite-[I] inhibitör konsantrasyonu grafiği çizmek amacıyla, 5 farklı inhibitör konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. Her bir ölçüm 3 kez tekrarlandı. Üç değerin ortalaması alınarak hesaplama yapıldı.

Bu maddelerden yüksek inhibisyon etkisi gösterenlerin K_i değerlerini belirlemek amacıyla enzimlerin aktivitesini yarıya düşüren madde konsantrasyonu ile bu değerin altında ve üstünde iki sabit inhibitör konsantrasyonlarında uygun substratın beş konsantrasyonu ile aktivite ölçümleri yapıldı. Bu substrat konsantrasyonları ön denemelerle belirlendi. Elde edilen değerlerle her bir inhibitör için Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Bu grafiklerden inhibisyon türü, grafik denkleminde inhibisyon türüne göre aşağıdaki formüllere göre K_i sabitleri belirlendi.

Yarışmasız İnhibisyon

$$K_i = \frac{V_{\max}^i}{V_{\max} - V_{\max}^i} [I]$$

Yarışmalı inhibisyon

$$K_i = \frac{K_M}{K_M - K_M^i} [I]$$

Yapılan tüm matamatiksel hesaplamalar ve grafik çizimleri için Microsoft Office Excel 2013 programı kullanıldı.



4. BULGULAR

Bu tez kapsamında 17 fenolik bileşiğin PKM2 enzim aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi araştırıldı. Yapılan çalışmada bileşiklerin IC₅₀ değerleri çizilen grafiklerdeki eğimlerden hesaplanmıştır. Ki değerlerinin belirlenmesi ve inhibisyon türlerinin tespiti amacıyla Lineweaver-Burk grafikleri çizildi.

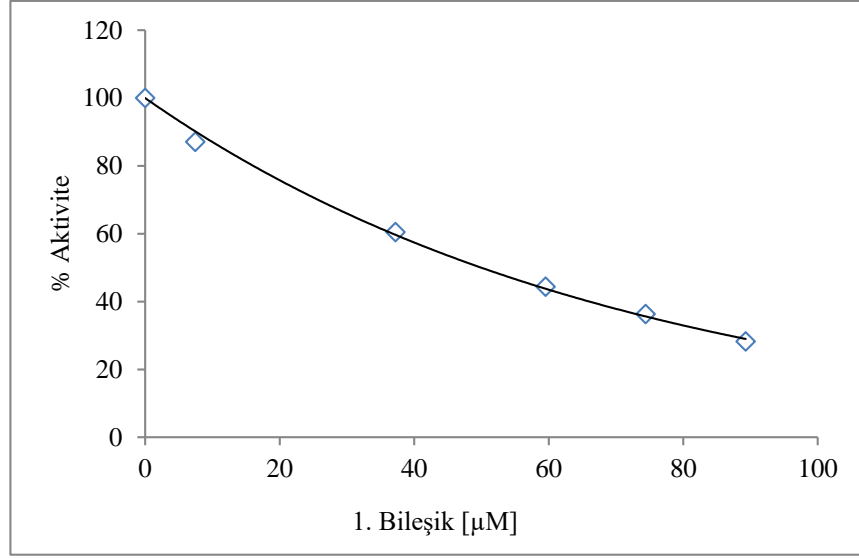
Araştırmadan elde edilen IC₅₀ değerlerine ait sonuçlar **Çizelge 4.1**'de verilmiştir. Bu tabloda görüldüğü gibi 10 bileşik enzim üzerinde inhibisyon etkisi göstermiş, 7 bileşik ise hiç bir etki göstermemiştir. Bu tablodaki verilere göre 5,7-bis(benzyloxy) 2-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)-2H-chromene, (2R,3S)-3,5,7-tris(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl) chromane, (E)-(3,5-bis(benzyloxy)-2-(3-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)allyl) phenoxy)(tert-butyl)dimethylsilane, (E)-3,5-bis(benzyloxy)-2-(3-(3,4,5-tris(benzyloxy) phenyl)allyl) phenol, 3-(2-((tert-butyl)dimethylsilyl)oxy)phenyl)-1-phenylpropane-1,2-diol, (E)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(2,4,6-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one, 3-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)propane-1,2-diol, tert-butyl(2-cinnamylphenoxy) dimethylsilane, bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin enzim aktivitesini sırasıyla inhibe eden bileşiklerdir. Bu bileşiklere dair çizilen % aktivite-[I] grafikleri **Şekil 4.1-10** aşağıda verilmiştir. Özellikle ilk iki bileşik enzim aktivitesini 58 µM altında inhibe etmiştir.

5,7-bis(benzyloxy) 2-(3,4,5- tris(benzyloxy)phenyl)-2H-chromene ve (2R,3S)-3,5,7-tris(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)chromane bileşikleri 0-100 µM aralığında IC₅₀ değerleri ile enzimi orta düzeyde inhibe etmiştir. Çalışmada kullanılan diğer tüm flavon bileşikleri enzimi düşük düzeyde inhibe etmiştir.

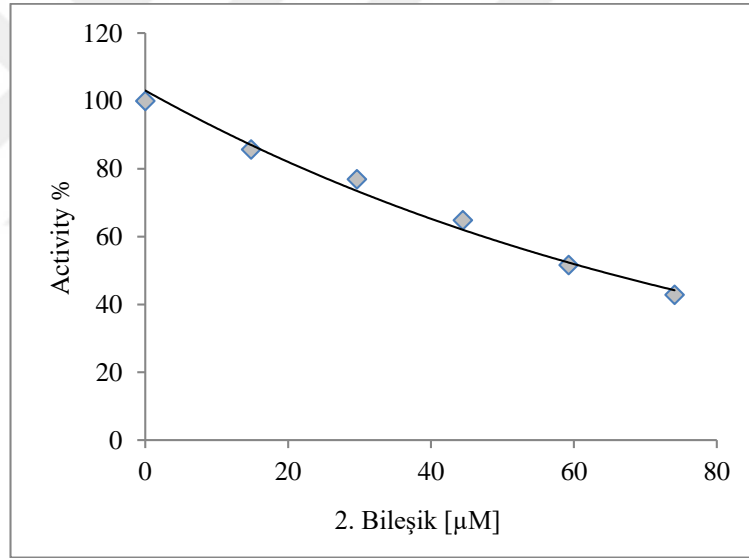
Çizelge 4.1 Bazı flavon bileşiklerin PKM2 enzim aktivitesi üzerindeki etkisi

No	Bileşik	IC ₅₀	Etkisi
1.	5,7-bis(benzyloxy) 2-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)-2H-chromene	45 µM	İnhibisyon

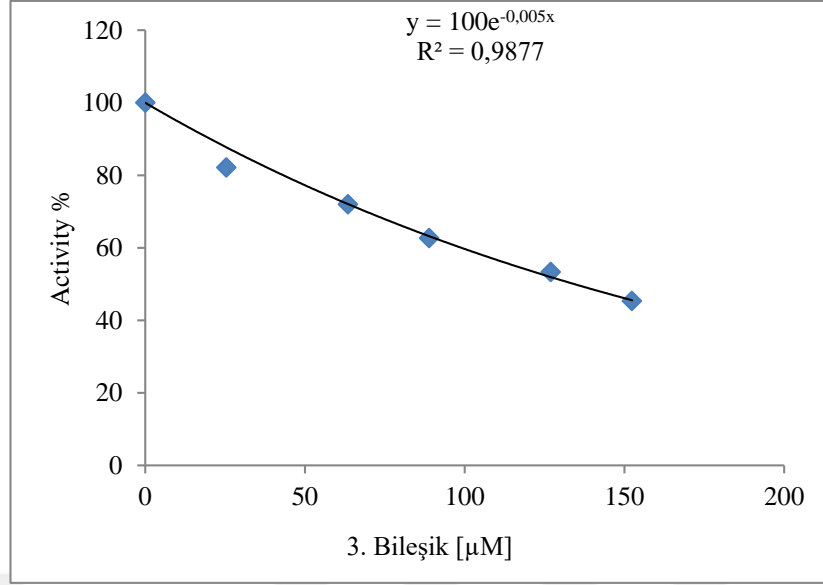
2.	(2R,3S)-3,5,7-tris(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)chromane	58 μ M	İnhibisyon
3.	(E)-(3,5-bis(benzyloxy)-2-(3-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)allyl)phenoxy)(tert-butyl)dimethylsilane	134 μ M	İnhibisyon
4.	(E)-3,5-bis(benzyloxy)-2-(3-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)allyl)phenol	145 μ M	İnhibisyon
5.	3-(2-((tert-butyl)dimethylsilyloxy)phenyl)-1-phenylpropane-1,2-diol	145 μ M	İnhibisyon
6.	(E)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(2,4,6-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one	163 μ M	İnhibisyon
7.	3-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)propane-1,2-diol	295 μ M	İnhibisyon
8.	tert-butyl(2-cinnamylphenoxy)dimethylsilane	3.5 mM	İnhibisyon
9.	Bisdemethoxycurcumin	160 μ M	İnhibisyon
10.	Demethoxycurcumin	215 μ M	İnhibisyon
11.	Biochanin a		Etkisiz
12.	Oleuropein		Etkisiz
13.	Genistin		Etkisiz
14.	Formononetin		Etkisiz
15.	Glabridin		Etkisiz
16.	Vitexin 2-o-rhamnoside		Etkisiz
17.	Oxymatrine		Etkisiz



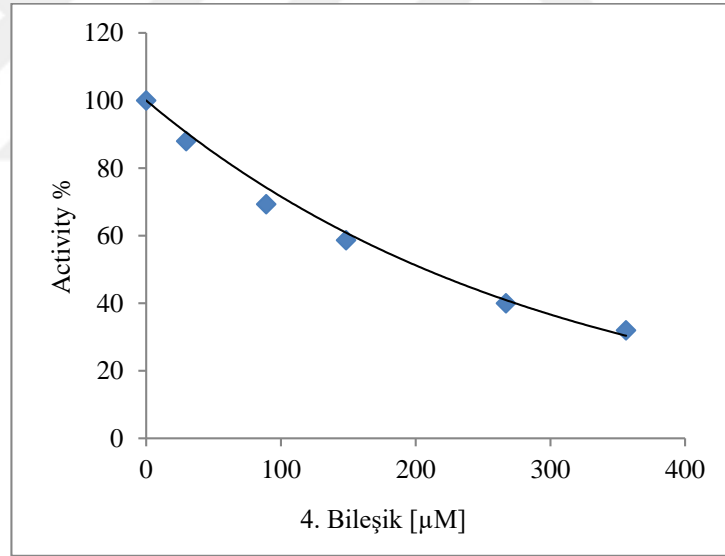
Şekil 4.1 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine 5,7-bis(benzyloxy) 2-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)-2H-chromene bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği



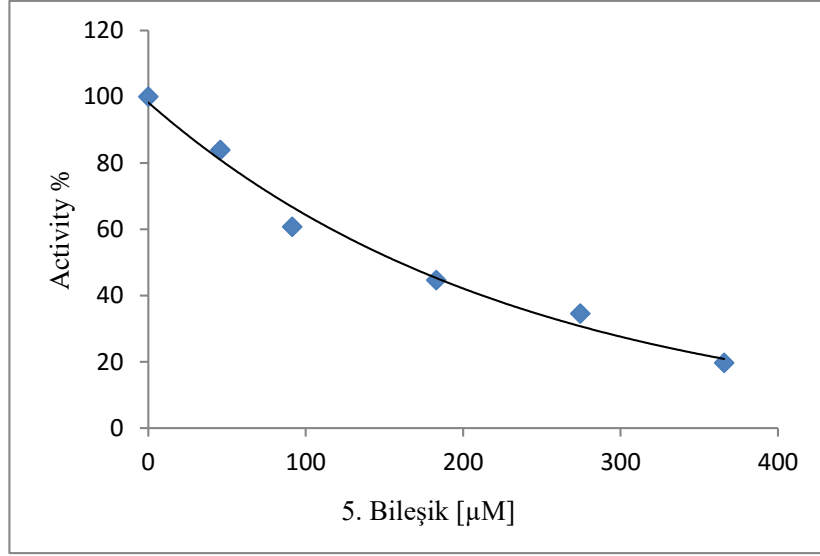
Şekil 4.2 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine (2R,3S)-3,5,7-tris(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)chromane bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği



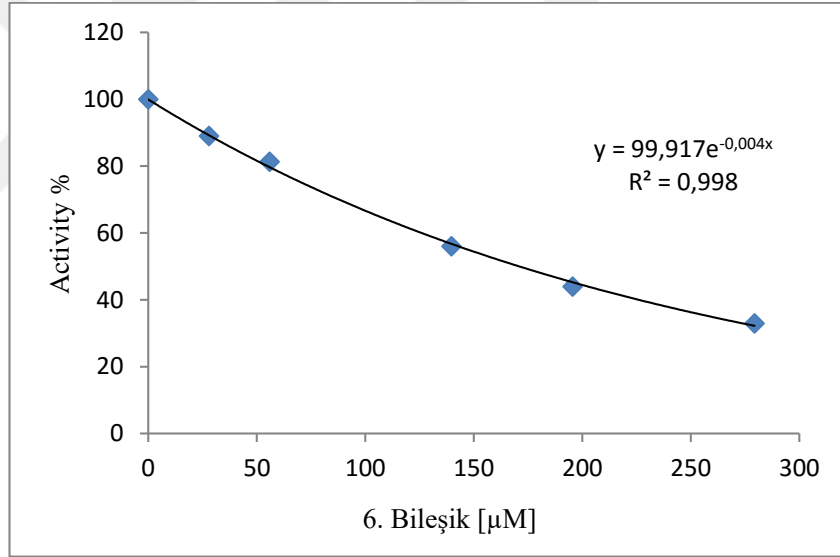
Şekil 4.3 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine (E)-3,5-bis(benzyloxy)-2-(3-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)allyl)phenoxy)(tert-butyl)dimethylsilane bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği



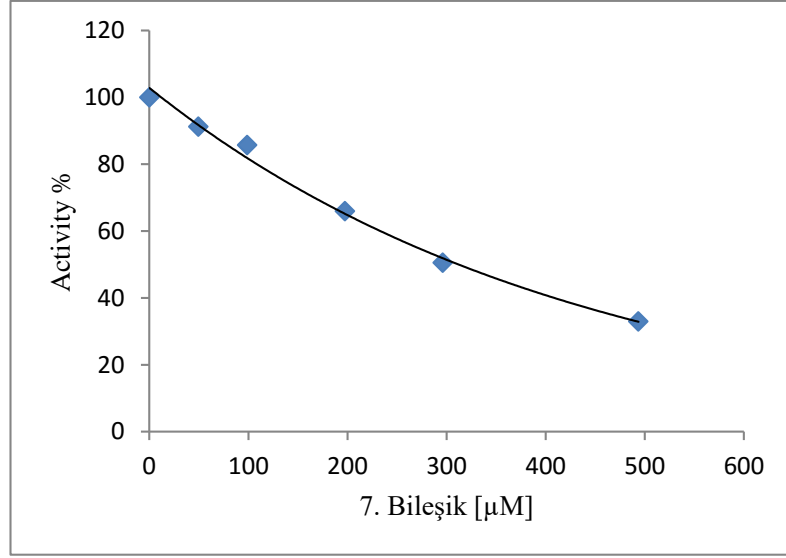
Şekil 4.4. İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine (E)-3,5-bis(benzyloxy)-2-(3-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)allyl)phenol bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği



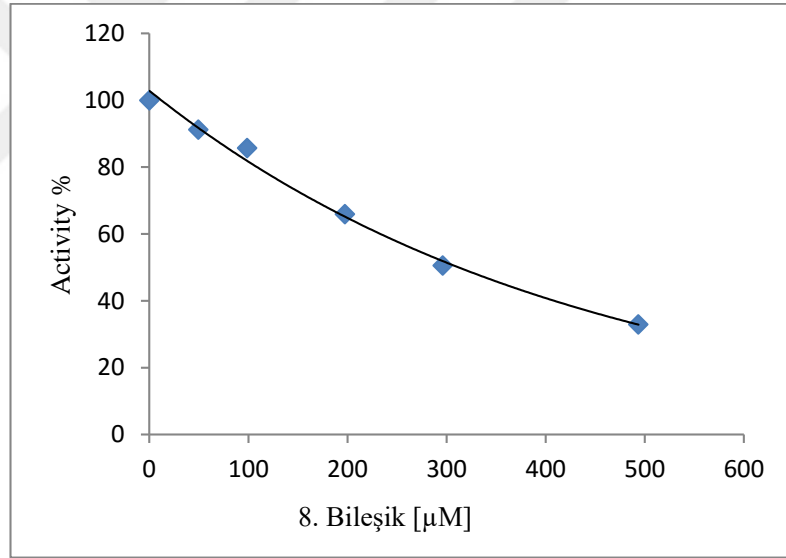
Şekil 4.5 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine 3-(2-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)-1-phenylpropane-1,2-diol bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği



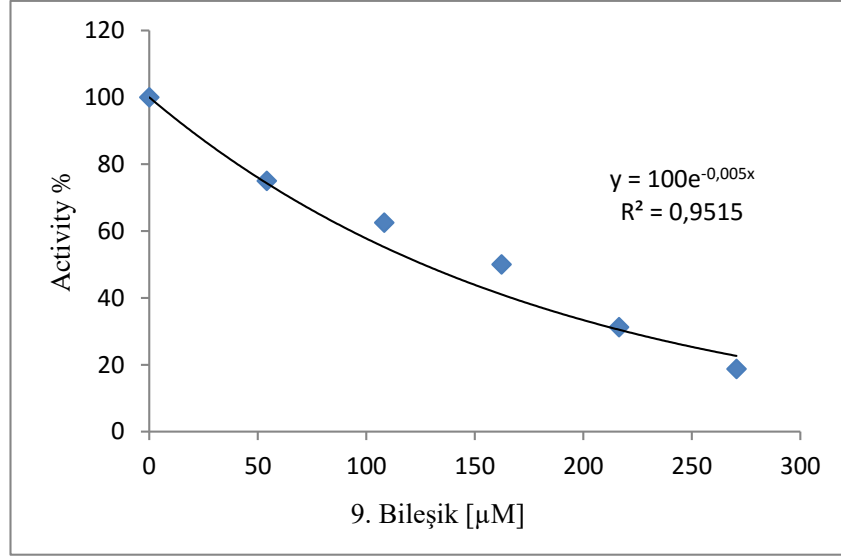
Şekil 4.6 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine (E)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(2,4,6-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği



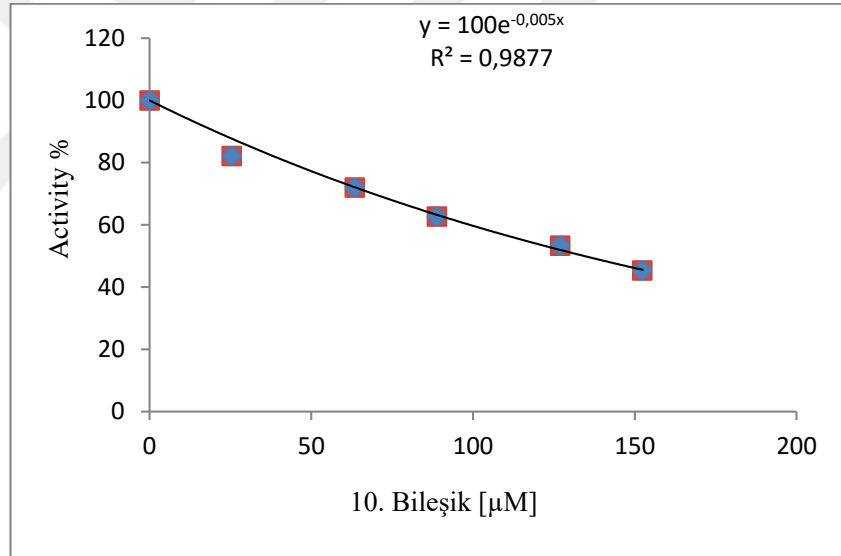
Şekil 4.7 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine 3-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)propane-1,2-diol bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği



Şekil 4.8 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine tert-butyl(2-cinnamylphenoxy)dimethylsilane bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği



Şekil 4.9 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine Bisdemetoxycurcumin bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği



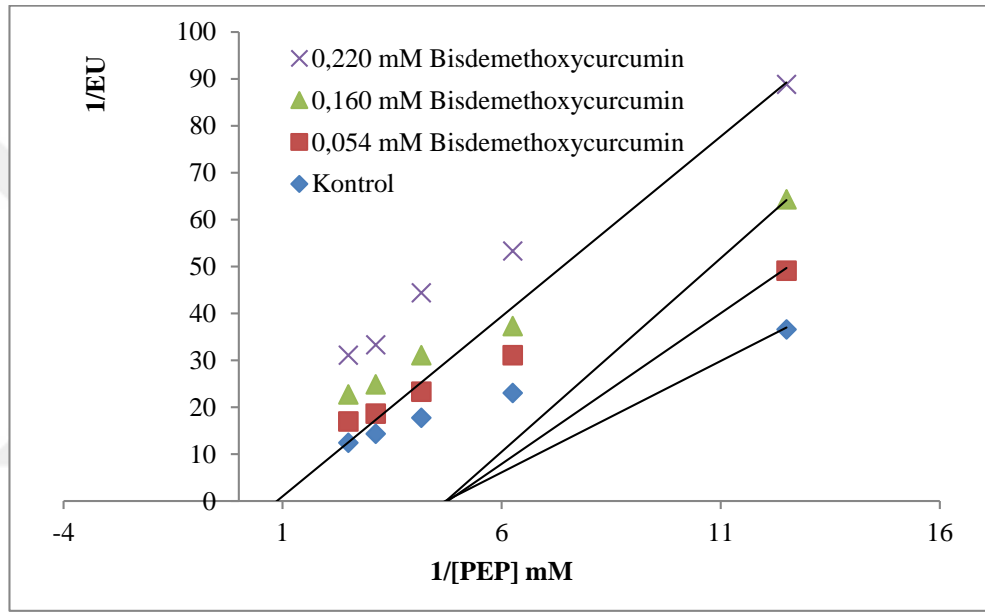
Şekil 4.10 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine Demetoxycurcumin bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği

İnhibisyon etkisi gösteren demetoxycurcumin ve bisdemetoxycurcumin gibi bileşiklerin PKM2 enzim aktivitesi üzerinde PEP bağlanma bölgesini nasıl etkilediği araştırılmıştır. Çalışmalardan elde edilen grafiklerden (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12) bağlanmayı nasıl etkilediği anlaşılmıştır. Grafiklerden anlaşıldığı gibi demetoxycurcumin $150 \pm 31 \mu\text{M}$ K_i değeri ile enzimin PEP bağlanmasını yarışmalı olarak inhibe ederken,

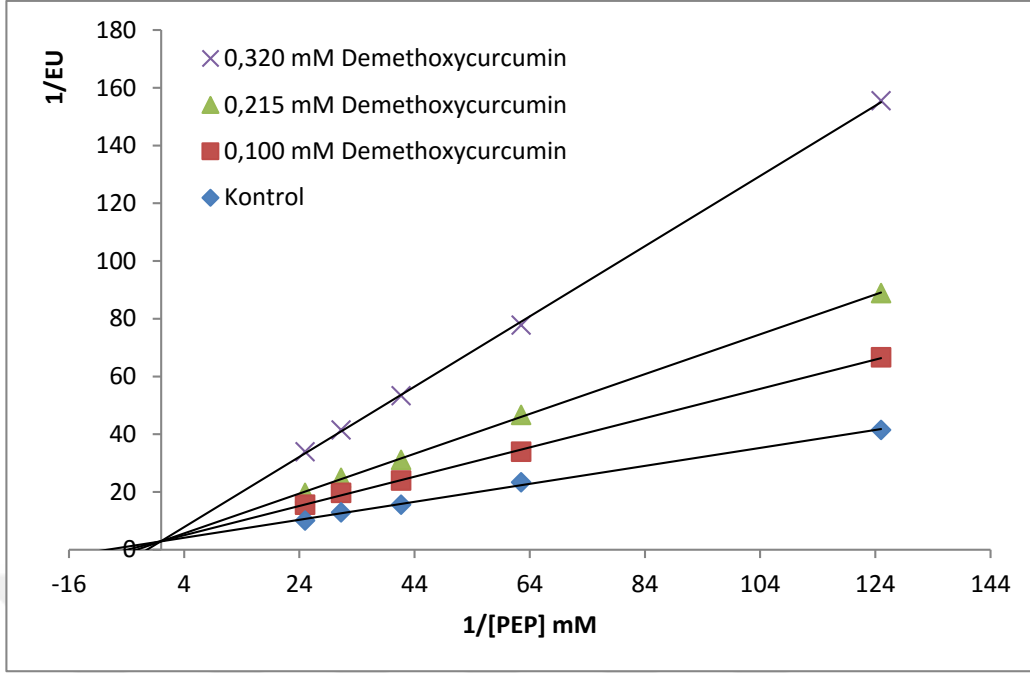
bisdemethoxycurcumin $330 \pm 85 \mu\text{M}$ K_i değeri ile yarışmasız olarak inhibisyon etkisi gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.2 Fenolik maddelerin PKM2 enzimi üzerine K_i çalışma sonuçları

Etkin madde	Ortalama K_i (μM)	İnhibisyon türü
Demethoxycurcumin	150 ± 31	Yarışmalı
Bisdemethoxycurcumin	330 ± 85	Yarışmasız



Şekil 4.11 İnsan Rekombinant PKM2 enziminde Bisdemethoxycurcumin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



Şekil 4.12 İnsan Rekombinant PKM2 enziminde Demethoxycurcumin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Normal dokulara göre kanserli dokularda çok daha fazla glikoz tüketimi görülmektedir. Hücre içerisinde ihtiyaç duyulan glikoz miktarına göre düzenleme yapılmaktadır. Hücre içerisinde ihtiyaç duyulan veya hücrenin çoğalması için gerekli olan enerji glikoliz yolunun kontrol edilmesiyle sağlanmaktadır. M2 izoenzimi bu kontrol mekanizmasının kilit rolünü üstlenmektedir. Dolayısıyla bu enzimin inhibe veya aktive edilmesi durumunda kanserli dokunun metabolik dengesi değişebilecektir (Harris *et al.*, 2012). Bu nedenle PKM2 enziminin inhibisyonunun kanserli dokuların tedavisinde önemli bir adım olduğu düşünülebilir.

Flavonoidlerin biyoaktivitesi yüksek olması nedeniyle onların kanserli hücreler üzerinde birçok etkisi olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (Chahar *et al.*, 2011). Flavonoidlerin enzim aktivitelerini etkilemeleri ve kanser hücreleri üzerine inhibe edici etki göstermeleri bu kimyasal bileşik grubunun tez çalışmalarında tercih edilmesinde etkili olmuştur.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında bazı fenolik bileşiklerin PKM2 enzimi üzerine olan inhibisyon etkisi *in-vitro* olarak çalışılmıştır. Yukarıdaki bulgularda görüldüğü üzere **Şekil 4.1-4.10** arasında da görüleceği gibi 2 farklı bileşik için IC₅₀ değerleri 58 µM'nin altında etki göstermiştir. Bu bileşiklerin inhibisyon etkisi büyükten küçüğe doğru 5,7-bis(benzyloxy) 2-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)-2H-chromene ve (2R,3S)-3,5,7-tris(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)chromane şeklindedir. Shikinon bu enzimin potansiyel inhibitörü olarak değerlendirilmekte olup IC₅₀ değeri 0,3 µM olarak tespit edilmiştir. Çalışılan bileşiklerden 5,7-bis(benzyloxy) 2-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)-2H-chromene için bulunan 0,45 µM IC₅₀ değeri bu değere en yakın olanı olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde gerekli modifikasyonlar gerçekleştirildiğinde 5,7-bis(benzyloxy) 2-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)-2H-chromene'nin potansiyel PKM2 inhibitörü olarak kullanılabilmesi sonucuna ulaşılabilir.

Sonuç olarak tez çalışmasında bazı fenolik bileşiklerin PKM2 enzim aktivitesi üzerinde etkisi deneme yanılma yöntemiyle laboratuvar şartlarında küvet içi ortamda araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar;

- 5,7-bis(benzyloxy) 2-(3,4,5- tris(benzyloxy)phenyl)-2H-chromene ve (2R,3S)-3,5,7-tris(benzyloxy)-2-(3,4-bis(benzyloxy)phenyl)chromane orta düzeyde inhibisyon etkisi göstermiştir (IC₅₀ değeri <100 µM).
- (E)-(3,5-bis(benzyloxy)-2-(3-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)allyl)phenoxy)(tert-butyl) dimethylsilane, (E)-3,5-bis(benzyloxy)-2-(3-(3,4,5-tris(benzyloxy)phenyl)allyl)phenol, 3-(2-((tert-butyl)dimethylsilyloxy)phenyl)-1-phenylpropane-1,2-diol, (E)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(2,4,6-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one, 3-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-1-(4-methoxyphenyl)propane-1,2-diol, tert-butyl(2-cinnamylphenoxy)dimethylsilane, bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin düşük düzeyde inhibisyon etkisi göstermiştir (IC₅₀ değeri >100 µM).
- Biochanin , oleuropein, Genistin, formononetin, glabridin, vitexin 2-o-rhamnoside, oxymatrine inhibisyon etkisi göstermemiştir.

Öneriler;

- Bu bileşiklerin PKM2 enzim aktivitesini hücre ortamında ne kadar etki gösterdiği hücre kültür ortamında test edilebilir.
- Etkin bileşiklerin farklı analogları sentezlenerek veya doğal kaynaklardan izole edilip enzim aktivitesi ölçülerek, hücre kültür ortamı testleri yapılabilir.
- PKM2 farklı kontrol bölgeleri olan bir enzim olduğundan, bu bileşiklerin enzim aktivitesini nasıl etkilediği üzerine bilgisayar modelleme temelinde araştırmalar yapılabilir.

KAYNAKLAR

- Ben Sahra, I. Laurent, K. Giuliano, S. Larbret, F. Ponzio, G. Gounon, P. Le Marchand-Brustel, Y. Giorgetti-Peraldi, S. Cormont, M. Bertolotto, C. Deckert, M. Auberger, P. Tanti, J.F. Bost, F. 2010. Targeting Cancer Cell Metabolism: The Combination of Metformin and 2-Deoxyglucose Induces p53-Dependent Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Cancer research*, 70, 2465-2475.
- Beutler, E. 1971. Red cell metabolism manual of biochemical methods. Academic Press, London.
- Boxer, M.B. Jiang, J.-k. Vander Heiden, M.G. Shen, M. Skoumbourdis, A.P. Southall, N. Veith, H. Leister, W. Austin, C.P. Park, H.W. 2009. Evaluation of substituted N, N'-diarylsulfonamides as activators of the tumor cell specific M2 isoform of pyruvate kinase. *Journal of medicinal chemistry*, 53, 1048-1055.
- Burns, J. Gardner, P.T. Matthews, D. Duthie, G.G. Lean, M.E.J. Crozier, A. 2001. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5797-5808.
- Chahar, M.K. Sharma, N. Dobhal, M.P. Joshi, Y.C. 2011. Flavonoids: A versatile source of anticancer drugs. *Pharmacognosy Reviews*, 5, 1-12.
- Chaneton, B. and E. Gottlieb, 2012. "Rocking cell metabolism: Revised functions of the key glycolytic regulator PKM2 in cancer." *Trends in Biochemical Sciences*, 37(8): 309-316.
- Chan, D.A. Sutphin, P.D. Nguyen, P. Turcotte, S. Lai, E.W. Banh, A. Reynolds, G.E. Chi, J.T. Wu, J. Solow-Cordero, D.E. Bonnet, M. Flanagan, J.U. Bouley, D.M. Graves, E.E. Denny, W.A. Hay, M.P. Giaccia, A.J. 2011. Targeting GLUT1 and the Warburg effect in renal cell carcinoma by chemical synthetic lethality. *Science Translational Medicine*, 3.
- Chen, J. Xie, J. Jiang, Z. Wang, B. Wang, Y. Hu, X. 2011. Shikonin and its analogs inhibit cancer cell glycolysis by targeting tumor pyruvate kinase-M2. *Oncogene*, 30, 4297-4306.
- Chiavarina, B. Whitaker-Menezes, D. Martinez-Outschoorn, U.E. Witkiewicz, A.K. Birbe, R. Howell, A. Pestell, R.G. Smith, J. Daniel, R. Sotgia, F. Lisanti, M.P. 2011. Pyruvate kinase expression (PKM1 and PKM2) in cancer-associated

- fibroblasts drives stromal nutrient production and tumor growth. *Cancer biology & therapy*, 12, 1101-1113.
- Christofk, H.R. Vander Heiden, M.G. Harris, M.H. Ramanathan, A. Gerszten, R.E. Wei, R. Fleming, M.D. Schreiber, S.L. Cantley, L.C. 2008. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*, 452, 230-233.
- Copeland, R.A. 2013. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists. John Wiley & Sons.
- Cortes-Cros, M. Hemmerlin, C. Ferretti, S. Zhang, J. Gounarides, J.S. Yin, H. Muller, A. Haberkorn, A. Chene, P. Sellers, W.R. Hofmann, F. 2013. M2 isoform of pyruvate kinase is dispensable for tumor maintenance and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110, 489-494.
- Dykes, L. Rooney, L.W. 2007. Phenolic compounds in cereal grains and their health benefits. *Cereal Foods World*, 52, 105-111.
- Edip Keha, İ.K. 2011. *Biyokimya. Aktif yayın Evi*, Erzurum.
- Eigenbrodt, E. Reinacher, M. Scheefers-Borchel, U. Scheefers, H. Friis, R. 1992. Double role for pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells. *Critical reviews in oncogenesis*, 3, 91-115.
- Ganapathy-Kanniappan, S. Geschwind, J.F.H. 2013. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: Progress and prospects. *Molecular cancer*, 12.
- Gatenby, R.A. Gillies, R.J. 2007. Glycolysis in cancer: a potential target for therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39, 1358-1366.
- Hainaut, P. Plymoth, A. 2012. Cancer as a metabolic disease. *Current opinion in oncology*, 24, 56-57.
- Hanahan, D. Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Harris, I. McCracken, S. Mak, T.W. 2012. PKM2: a gatekeeper between growth and survival. *Cell research*, 22, 447-449.
- Hopkins, A.L. Groom, C.R. 2002. The druggable genome. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1, 727-730.
- Jiang, J.K. Boxer, M.B. Vander Heiden, M.G. Shen, M. Skoumbourdis, A.P. Southall, N. Veith, H. Leister, W. Austin, C.P. Park, H.W. Inglesse, J. Cantley, L.C. Auld,

- D.S. Thomas, C.J. 2010. Evaluation of thieno[3,2-b]pyrrole[3,2-d]pyridazinones as activators of the tumor cell specific M2 isoform of pyruvate kinase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20, 3387-3393.
- Jurica, M.S. Mesecar, A. Heath, P.J. Shi, W. Nowak, T. Stoddard, B.L. 1998. The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure*, 6, 195-210.
- Kris-Etherton, P.M. Hecker, K.D. Bonanome, A. Coval, S.M. Binkoski, A.E. Hilpert, K.F. Griel, A.E. Etherton, T.D. 2002. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, 113, 71S-88S.
- Mattevi, A. Rizzi, M. Bolognesi, M. 1996. New structures of allosteric proteins revealing remarkable conformational changes. *Current Opinion in Structural Biology*, 6, 824-829.
- Mazurek, S. Grimm, H. Oehmke, M. Weisse, G. Teigelkamp, S. Eigenbrodt, E. 2000. Tumor M2-PK and glutaminolytic enzymes in the metabolic shift of tumor cells. *Anticancer Research*, 20, 5151-5154.
- Mazurek, S. Hugo, F. Zwerschke, W. 2011. PKM2 (pyruvate kinase isoenzyme type M2). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*.
- Melstrom, L.G. Salabat, M.R. Ding, X.Z. Milam, B.M. Strouch, M. Pelling, J.C. Bentrem, D.J. 2008. Apigenin inhibits the GLUT-1 glucose transporter and the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway in human pancreatic cancer cells. *Pancreas*, 37, 426-431.
- Middleton Jr, E. Kandaswami, C. Theoharides, T.C. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52, 673-751.
- Munoz-Pinedo, C. El Mjiyad, N. Ricci, J.E. 2012. Cancer metabolism: current perspectives and future directions. *Cell death & disease*, 3, e248.
- Mushtaq, M. Wani, S.M. 2013. Polyphenols and human health- A review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4, B338-B360.
- Nelson, D. 2005. *Cox MM Lehninger principles of biochemistry*. New York: WH Freeman and Company.

- Nigam, P.S. 2009. Production of bioactive secondary metabolites, *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Springer, pp. 129-145.
- Noguchi, T. Yamada, K. Inoue, H. Matsuda, T. Tanaka, T. 1987. The L- and R-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters. *Journal of Biological Chemistry*, 262, 14366-14371.
- Porporato, P.E. Dhup, S. Dadhich, R.K. Copetti, T. Sonveaux, P. 2011. Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: A comprehensive review. *Frontiers in pharmacology*, AUG.
- Rigden, D.J. Phillips, S.E.V. Michels, P.A.M. Fothergill-Gilmore, L.A. 1999. The structure of pyruvate kinase from *Leishmania mexicana* reveals details of the allosteric transition and unusual effector specificity. *Journal of Molecular Biology*, 291, 615-635.
- Scatena, R. Bottoni, P. Pontoglio, A. Mastrototaro, L. Giardina, B. 2008. Glycolytic enzyme inhibitors in cancer treatment. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 17, 1533-1545.
- Shi, J. Yu, J. Pohorly, J.E. Kakuda, Y. 2003. Polyphenolics in Grape Seeds - Biochemistry and Functionality. *Journal of Medicinal Food*, 6, 291-299.
- Singh, M. Kaur, M. Silakari, O. 2014a. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84, 206-239.
- Singh, M. Kaur, M. Silakari, O. 2014b. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84, 206-239.
- Terstappen, G.C. Reggiani, A. 2001. In silico research in drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22, 23-26.
- Tsao, R. 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2, 1231-1246.
- Valentini, G. Chiarelli, L.R. Fortin, R. Dolzan, M. Galizzi, A. Abraham, D.J. Wang, C. Bianchi, P. Zanella, A. Mattevi, A. 2002. Structure and function of human erythrocyte pyruvate kinase: Molecular basis of nonspherocytic hemolytic anemia. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 23807-23814.
- Vander Heiden, M.G. 2011. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nature reviews. Drug discovery*, 10, 671-684.
- Warburg, O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science*, 123, 309-314.

- Wolf, A. Agnihotri, S., Micallef, J., Mukherjee, J., Sabha, N., Cairns, R., Hawkins, C., Guha, A., 2011. Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. *The Journal of experimental medicine*, 208, 313-326.
- Xu, RH. Pelicano, H. Zhou, Y. Carew, J.S. Feng, L. Bhalla, K.N. Keating, M.J. Huang, P. 2005. Inhibition of glycolysis in cancer cells: A novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer research*, 65, 613-621.
- Yamagata, K. Miyashita, A. Matsufuji, H. Chino, M. 2010. Dietary flavonoid apigenin inhibits high glucose and tumor necrosis factor α -induced adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 21, 116-124.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Mert Oktay BAYKAN
Doğum Yeri :Beyoğlu/İSTANBUL
Doğum Tarihi :27/02/1988
Medeni Hali :Bekar
Yabancı Dili :İngilizce
Adres :Kutlu Mah. 466/2 Sok. No:31/13 Akdere/Mamak/ANKARA
Tel :0 545 201 35 40
E-posta :oktaybaykan@yandex.com.tr
Eğitim Durumu(Kurum ve Yıl)
Lise :Kocatepe Mimar Kemal Lisesi-2005
Lisans :Kırıkkale Üniversitesi Fen-Eğitim Fakültesi Biyoloji Bölümü-
2009
Yüksek Lisans :Karatekin Üniversitesi Kimya Anabilimdalı Biyokimya Bölümü
Çalıştığı Kurum/Kurumlar
-Migros Ticaret A.Ş. 2011-2013
-Ekoiz Çevre Ve Sosyal Planlama Araştırma Eğitim ve Danışmanlık Tic. Ltd. Şti. 2013
-Turunç Peyzaj Tasarım Planlama Uygulama Proje İnşaat Organizasyon ve Danışmanlık
Hizmetleri Ltd. Şti. 2013-2015
-Ekoiz Çevre Ve Sosyal Planlama Araştırma Eğitim ve Danışmanlık Tic. Ltd. Şti. 2015-
2016
-Ekogen Halksağlığı Çevre Danışmanlık Eğitim ve İlaç Sanayi Tic. Ltd. Şti. 2016-2017