

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**PIRÜVAT KİNAZ İZOENZİM M2 AKTİVİTESİ ÜZERİNDE BAZI FLAVON  
BİLEŞİKLERİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Erdem ARSLAN**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ÇANKIRI  
2015**

**Her hakkı saklıdır**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### PİRUVAT KİNAZ İZOENZİM M2 AKTİVİTESİ ÜZERİNDE BAZI FLAVON BİLEŞİKLERİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Erdem ARSLAN

Çankırı Karatekin Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Şevki ADEM

Tümör ve cenin gibi hızla gelişmekte olan dokulardaki metabolik düzen normal hücrelerden farklıdır. Sağlıklı ve kanserli dokular arasındaki en önemli fark, kanserli hücrelerin çok hızlı gelişen doğaları gereği beslenme ve enerji ihtiyacı farklılığıdır. Kanserli hücrelerde glikoliz hızı artan enerji ihtiyacını karşılamak için genellikle artmaktadır. Aynı zamanda glikolitik enzimlerin bir veya birden fazla izoformlarının kanserli hücrelerde ekspresyon durumu ya da aktivitesi değişmektedir. Tümör hücrelerindeki enzimatik mutasyonlar kanser tedavisi için potansiyel hedef olması seçenektir. Kanserli hücrelerde glikolitik yolunda anahtar bir rol oynayan PKM2 izoenziminin aşırı sentezlendiği karakterize edilmiştir. PKM2 glikolizin ATP üretmek ya da biyosentetik blokların üretimine yönlendirilmesinde temel belirleyici bir enzimdir. Bu nedenle kanser tedavisi için önemli bir hedeftir. PKM2 inhibitör ya da aktivatörleri kemoterapötik ajan ya da hücrede oluşan kemoterapötik direnci yenmek için kombine kemoterapötik ajan olarak kullanılabilir. Bu yüzden bu enzimin inhibitör/aktivatörlerinin belirlenmesi çok önemlidir.

Bu çalışmada 16 doğal fenolik bileşiğin PKM2 enzim aktivitesi üzerinde etkisi araştırıldı. Enzim aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerin inhibisyon gücü  $IC_{50}$  ve  $K_i$  değerlerinin hesaplanması ile belirlendi. Enzim aktivitesi laktat dehidrogenaz kullanılarak 340 nm de absorban düşüşü ile NADH' ın  $NAD^+$  ya dönüşümü takip edilerek ölçüldü.

**2015,56 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Flavon, Pirüvat Kinaz M2, İnhibitör, Aktivatör, Kanser

## ABSTRACT

M.S. Thesis

### INVESTIGATION OF EFFECTS OF SOME FLAVONE COMPOUNDS ON PYRUVATE KINASE ISOENZYME M2 ACTIVITY

Erdem ARSLAN

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 12 natural phenolic compounds. Inhibition strength of compounds were identified by calculating  $IC_{50}$  and  $K_i$  values for substances that showed inhibition effects on this enzyme activity.  $IC_{50}$  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.

**2015, 56 page**

**Key Words:** Flavone, 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 eşim Betül ARSLAN ve bizimle olduğundan beri hayatımıza renk katan kızım Elif Zeynep ARSLAN'a, bununla birlikte eğitim hayatım boyunca dualarıyla yanımda olan ve bu yaşa gelene kadar her konuda yanımda olan annem Şerife ARSLAN, babam Ali Osman ARSLAN'a. kardeşim Ersan ARSLAN ve ablam Ebru ARSLAN'a ve adını burada sayamadığım katkısı olan herkese; şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma, Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (Proje No: 2013-10) ve kısmen TÜBİTAK tarafından (Proje No: 112T781) desteklenmiştir.

Erdem ARSLAN

Çankırı, Mayıs 2015

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER DİZİNİ .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	viii
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
2.4.1 Flavonlar .....	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1.Materyal .....	21
3.2. Yöntem .....	22
4. BULGULAR .....	26
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	40
KAYNAKLAR .....	43

## 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 <sub>2</sub>	Magnezyum Klorür
DMSO	Di Metil Sülfoksit
IC <sub>50</sub>	Enzim aktivitesini %50 azaltan inhibitör konsantrasyonu
AC <sub>50</sub>	Enzim aktivitesini %50 artıran aktivatör konsantrasyonu
K <sub>i</sub>	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.....	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.....	12
Şekil 2.5 Flavonoidlerin genel yapısı.....	14
Şekil 2.6 Çeşitli flavonlar ve etkileri.(Singh et al., 2014b).....	15
Şekil 2.7 Flavonların kanser aktivitesi ile ilgili aktif kısımları.....	16
Şekil 2.8 Flavonun temel iskeleti.....	17
Şekil 3.1 PKM2 aktivitesinin laktat dehidrogenaz aktivitesi ile birleştirilmiş aktivite tayini prensibi.....	23
Şekil 4.1 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine apigenin bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği.....	28
Şekil 4.2 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine flavone bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği.....	28
Şekil 4.3 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine 3-hydroxyflavone bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği.....	29
Şekil 4.4 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine 5-hydroxyflavone bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği.....	29
Şekil 4.5 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine 6-hydroxyflavone bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği.....	30
Şekil 4.6 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine 7-hydroxyflavone bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği.....	30
Şekil 4.7 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine tangeretin bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği.....	31
Şekil 4.8 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine wogonin bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği.....	31
Şekil 4.9 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine scutellarin bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği.....	32
Şekil 4.10 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine chrysin bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği.....	32
Şekil 4.11 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine diosmin bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği.....	33
Şekil 4.12 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine diosmetin bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği.....	33
Şekil 4.13 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine baicalin bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği.....	34
Şekil 4.14 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine baicalein bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği.....	34
Şekil 4.15 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine luteolin bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği.....	35

Şekil 4.16	İnsan Rekombinant PKM2 enziminde 7-hidroksiflavone için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	36
Şekil 4.17	İnsan Rekombinant PKM2 enziminde 6-hidroksiflavone için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	36
Şekil 4.18	İnsan Rekombinant PKM2 enziminde 5-hidroksiflavon için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	37
Şekil 4.19	İnsan Rekombinant PKM2 enziminde 3-hidroksiflavon için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	37
Şekil 4.20	İnsan Rekombinant PKM2 enziminde flavone için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	38
Şekil 4.21	İnsan Rekombinant PKM2 enziminde wogonin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	38
Şekil 4.22	İnsan Rekombinant PKM2 enziminde 6-hidroksiflavon için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.....	39



## 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.....	18
Çizelge 3.1 Piruvat kinaz M2 enzim aktivitesi için küvet içeriği.....	23
Çizelge 4.1 Bazı flavon bileşiklerin PKM2 enzim aktivitesi üzerindeki etkisi .....	27

## 1.GİRİŞ

Canlı varlıklar dışarıdan aldıkları besin maddelerini, bir seri kimyasal reaksiyonlarla kendi metabolik proseslerine uygun hale dönüştürürler. Enzimler, bu metabolik proseslerde oluşan kimyasal reaksiyonların büyük çoğunluğunu katalizleyen genellikle protein yapısında biyomoleküllerdir. Bu moleküller, katalizledikleri reaksiyon tiplerine ve ürüne dönüştürdükleri substratlara karşı son derece spesifik davranırlar. 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).

Enzim çalışmaları biyokimya alanındaki araştırmalarda önemli bir yer tutmaktadır. Enzimlerin saflaştırılması ve inhibitörlerinin araştırılmasının yanı sıra enzimler endüstri ve medikal alanda da enzimlerle ilgili birçok çalışma yapılmaktadır. Bu makro molekülleri bazen çeşitli hastalıkların teşhisi için kullanılırken bazen de inhibitör veya aktivatörleri ilaç olarak kullanılmaktadır. Mevcut ilaçların yarıya yakını enzim inhibitörü olması ve yeni tedavi stratejilerinde enzimlerin önemli bir yer tutması nedeniyle bu çalışmalar ilgiyle takip edilmektedir (Copeland, 2013).

İnhibisyon, inhibitör denenen maddeler tarafından enzimlerin *in vivo* ve *in vitro* aktivitelerinin azaltılması ya da tamamen yok edilmesi olarak tanımlanmaktadır. Bu maddeler, çoğunlukla küçük molekül yapıli 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)

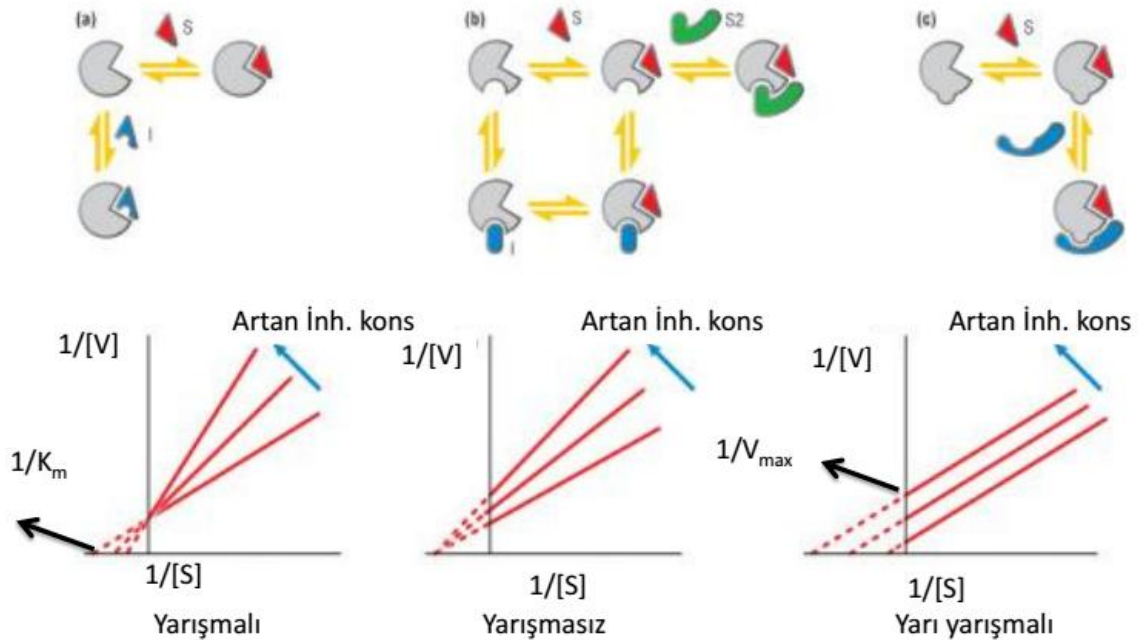
İnhibisyon, dönüşümsüz inhibisyon ve dönüşümlü inhibisyon olmak üzere ikiye ayrılır. Dönüşümsüz inhibisyonunda inhibitör enzime ya kovalent olarak bağlanır ya da zor ayrılabilen bir kompleks meydana gelir.

Dönüşümlü inhibisyonda enzim-inhibitör etkileşimleri bir denge halindedir. Bu inhibisyon yarışmalı, yarışmasız veya yarı yarışmalı olarak üçe ayrılır (Şekil.1.1).

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

Yarışmasız inhibisyonda, inhibitör ile substrat enzimin farklı bölgelerine bağlandığından genelde inhibisyon etkisi substrat konsantrasyonundan bağımsız haldedir. Bu inhibisyonda  $V_{max}$  azalırken  $K_M$  değeri değişmez.

Yarı yarışmalı inhibisyonda ise, inhibitör ES (enzim-substrat) kompleksine bağlanır. 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).

Enzimler biyokimyasal reaksiyonlarda oynadıkları önemli rollerden dolayı ilaç tasarımında önemli hedeflerden biridir. Tablo da 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). Bu nedenle yeni inhibitör ve aktivatörlerin bulunması ve bunların inhibisyon türlerinin ve etki potansiyellerinin belirlenmesi önemlidir.

**Çizelge 1.1** Enzim inhibitörü olarak kullanılan bazı ilaçlar ve inhibisyon türleri

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

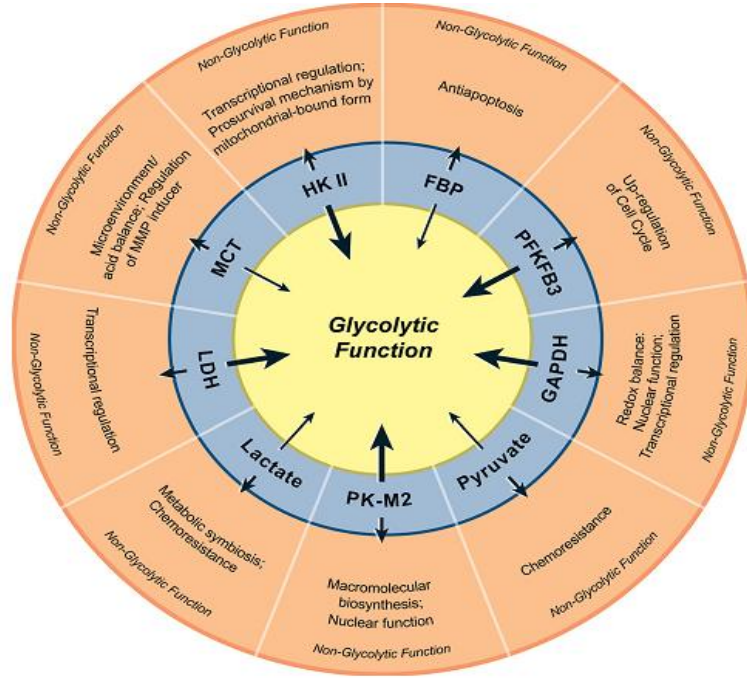
Kanser milyonlarca insanın hayatını tehdit eden ve gnbeğn hızla artan metabolik bir hastalıktır. Bu hastalığın tedavisi için sayısız araştırmalar yapılmaktadır. Bu araştırmalarda, hastalıkla mücadele için yeni ve özel stratejiler belirlenmeye çalışılmaktadır. Kanser hücrelerinin diğer hücrelerden farklı olan metabolik işleyişinin kanser tedavisinde hedef olarak seçilebileceği 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 indirgeyecektir. 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 kanserli hücrelerin normal hücrelere oranla yaklaşık olarak 10 – 15 kat daha fazla glikoz tükettiğini fark 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 bu metabolitler hücrede bazı biyokimyasal prosesleri etkilemektedir. Aşırı laktik asit üretimi kanserli hücrelerin etrafında hipoksiye neden olmaktadır.. Bu etki ile hücrelerde oksidatif fosforilasyon enzimlerin transkripsiyonu baskılanmakta glikoliz enzimlerinin transkripsiyonu ise aktive edilmektedir. Ayrıca, oluşan laktat ve piruvat gibi ara metabolitler yoluyla 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)

Kanserli dokuların diğer dokulardan farklı olan metabolik işleyişi, glikoliz enzimlerinde de bu metabolik ihtiyacı karşılayacak şekilde bazı enzimlerin aşırı sentezlenmesine neden olmuştur. Enzim kompozisyonundaki bu değişim o enzimleri inhibe ederek kanserli hücrelerin tedavi edilebileceği yaklaşımını ortaya çıkarmıştır.

Kanserli dokularda glikoliz yolunun bazı izoenzimleri aşırı sentezlediği bilinmektedir. Bu enzimlerin inhibitörleri kullanılarak kanser tedavisinde başarılı olunabileceği literatürde belirtilmiş ve bu amaçla klinik çalışmalar başlatılmıştır.

Glikoliz yolunun inhibisyonu;

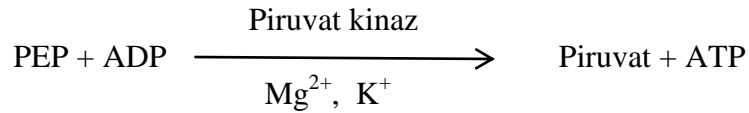
- Glikoliz yolunun hızını yavaşlatarak hücre içi ATP seviyesini azaltacağı
- Glikoz tüketim miktarı azalacağından hücrede otofajiyi tetikleyeceği

- 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 kullanılabilirliği bilinmektedir (Ben Sahra *et al.*, 2010; Wolf *et al.*, 2011)

## 2.2.Piruvat Kinaz M2 (PKM2)

Glikolizde ikinci adenosin trifosfatın (ATP) sentezlendiği tepkime piruvat kinaz tarafından katalizlenir. Piruvat kinaz glikolitik yolun bu son basamağında fosfoenol piruvattan (PEP) adenosin 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).

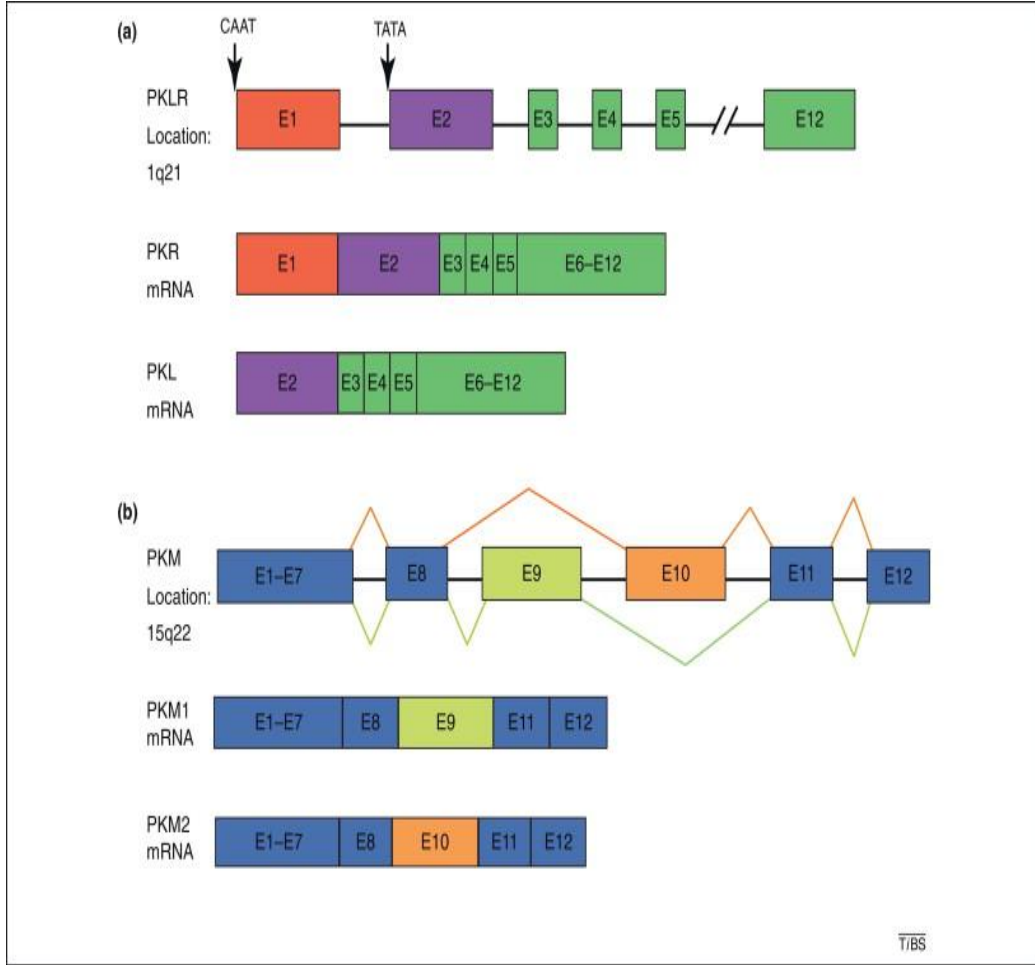


Genel olarak piruvat kinaz, yaklaşık olarak 200 – 250 kDa ağırlığında olan 4 monomerden oluşmaktadır. Her bir monomer yaklaşık 500 aminoasitten meydana gelmiş tetramerik yapıya sahiptir (Jurica *et al.*, 1998; Rigden *et al.*, 1999; Valentini *et al.*, 2002). Bu monomerler üç majör domain ve bunlara ek olarak küçük N-terminal domain içermektedir. Piruvat kinaz enziminin domainlerinin kombinasyonu ve alt ünitelerinin rotasyonu, aktif bölgede geometrinin değişimine neden



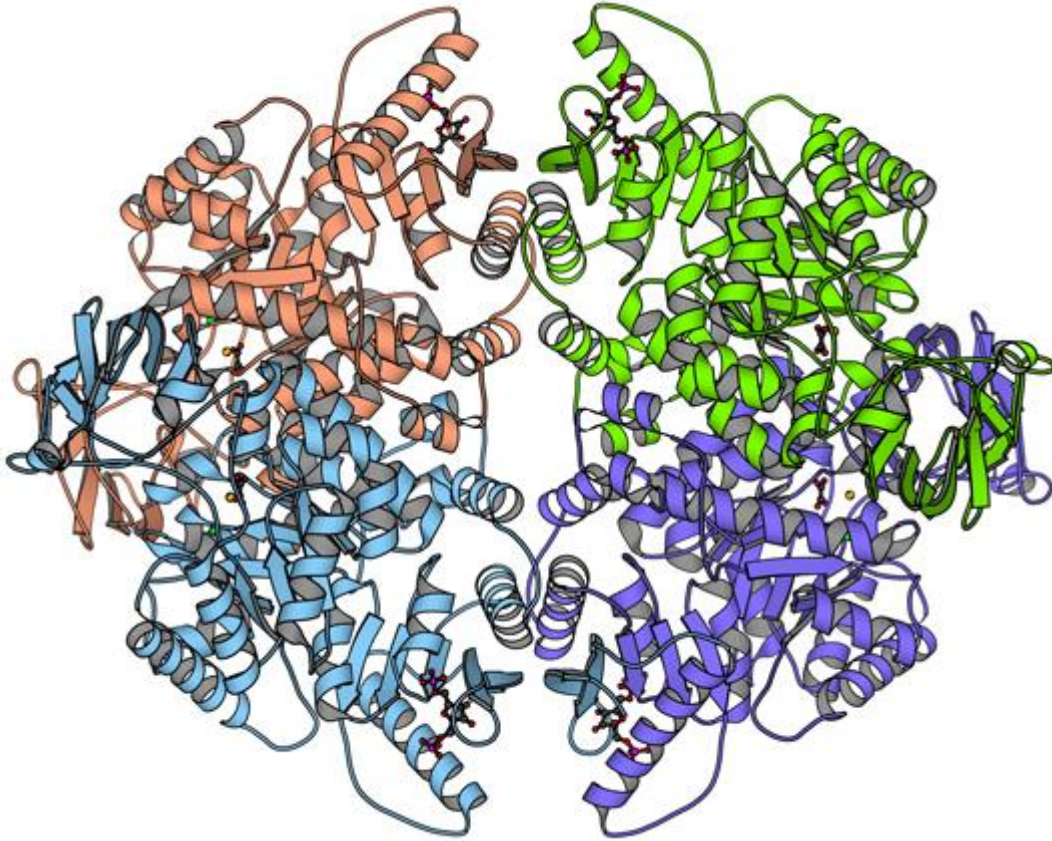
olmaktadır(Valentini *et al.*, 2002). Bu rotasyon piruvat kinaz enziminin aktif R formunu veya aktif olmayan T formunu oluşturur. Piruvat kinaz enziminin aktif olmayan T formundan, aktif R formuna geçişindeki değişiklikler substratın enzime bağlanmasını sağlar(Mattevi *et al.*, 1996; Valentini *et al.*, 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). M2 tip piruvat kinaz PEP' e karşı sigmoidal kinetik özellik göstermekte olup 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).



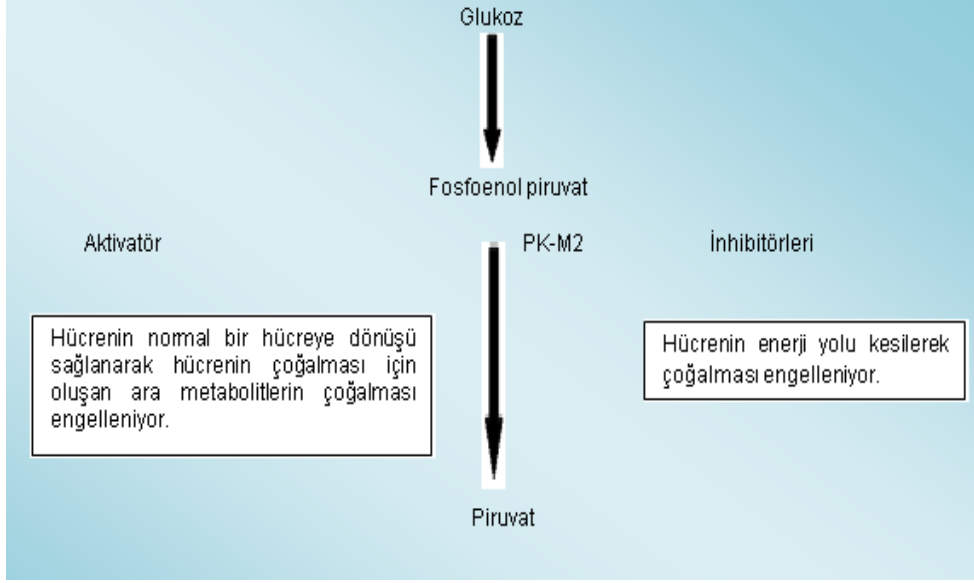
**Şekil 2.3** PKM2 nin yapısı

### **2.3. Kanser ve PKM2**

Kanserli dokularda glikoliz yolunda bazı izoenzimlerinin aşırı sentezlendiği bilinmektedir. Bu enzimlerin inhibitörleri kullanılarak kanser tedavisinde başarılı olunabileceği literatürde belirtilmiş ve bu konuda 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). PKM2 enzimi için kanserli hücrelerde glikoliz yolunu anahtar enzimi denilmektedir. Hücre içine alınan glukoz enerji ihtiyacı için mi yoksa hücre için gerekli diğer metabolitlere mi dönüşeceği PKM2 enzim aktivitesi ile belirlenmektedir. PKM2 enzim diğer izoenzimlerden farklı olarak dimerik formda neredeyse inaktif iken tetramerik formda ise yüksek aktiviteye sahiptir. 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 kullanılabileceği 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 hızların 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 inhibitör/aktivatörlerinin metabolik etkisi

Kanserli dokuların laktat ve pirüvat gibi metabolitler aracılığıyla kanser tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı direnç sağladığı ifade edilmiştir. Ayrıca laktatın hücre dışına taşınımı ile hücrede hipoksi etkisi, oluşturmakta ve bu hücre içi birçok metabolik prosesi etkilemektedir. Mesela bu etkiden dolayı, oksidatif fosforilasyon enzimlerinin transkripsiyonu baskılanmakta, hücrede oksijen kıtlığı oluşmaktadır. Bu nedenlerle de bu enzimin inhibisyonu kanser tedavisi için önem arz etmektedir.

#### 2.4. Fenolik Bileşikler

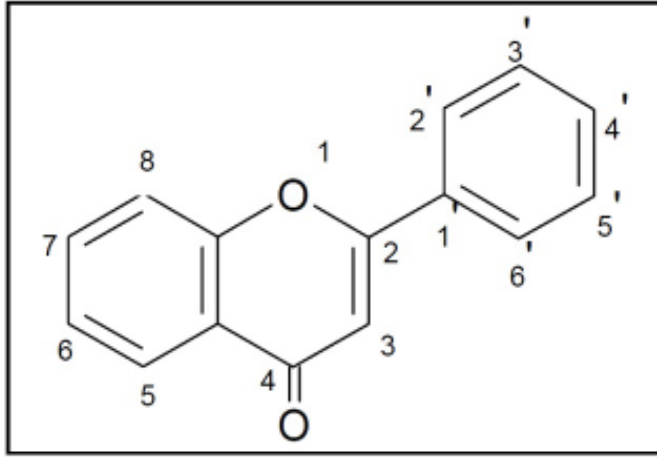
Benzen halkası içeren organik maddeler fenolik bileşikler olarak adlandırılmakta olup bitkiler aleminde bulunan ikincil metabolitlerdir. Kimyasal açıdan flavonoid olmayanlar (hidroksisinnamik, hidroksibenzoik asit ve türevleri, fenolik alkoller) ve flavonoidler (antosiyantinler, flavon-3-monomerleri 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 antienflamatuar 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 çekirdekten oluşmaktadırlar. 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 toplanmaktadırlar (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, antiallerjik, 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)

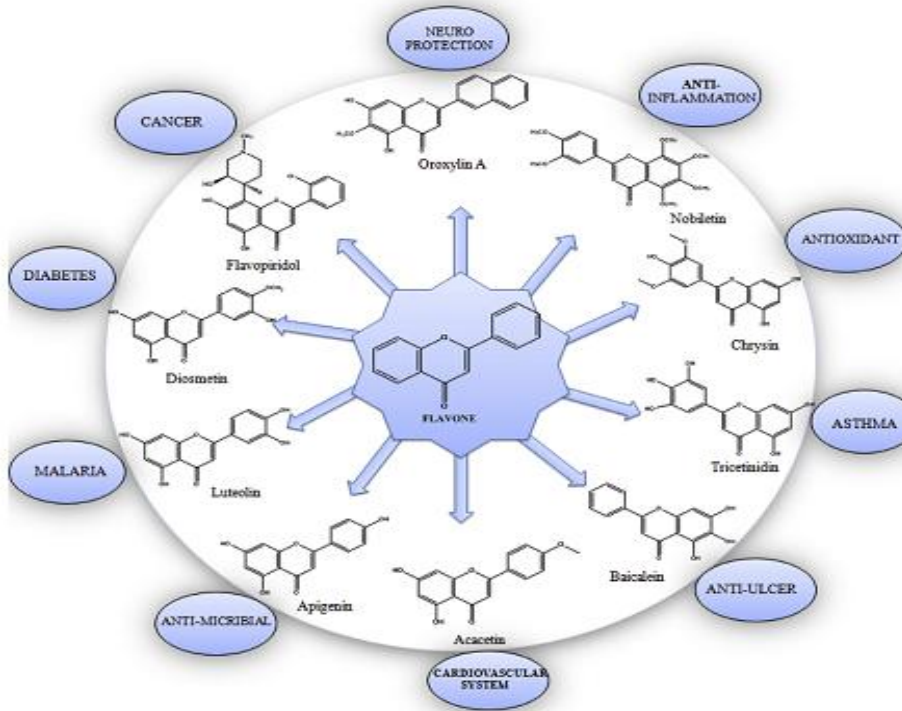
Flovonoid bileşikler çeşitli biyoaktiviteye sahiptir (Chahar *et al.*, 2011). Bunlardan bazıları;

- Antioksidan etkisi: oksijen radikallerinin inaktivasyonu
- Elektrofilik bağlanması
- Koruyucu enzim indüksiyonu: (GT, GST)
- Apoptoz hızı artışı

- Hücre çoğalması inhibisyon
- Lipid peroksidasyonu inhibisyon
- Anjiyogenez inhibisyonu
- H-verici (örn. GSH-peroksidazlar)
- DNA oksidasyon inhibisyonu

### 2.4.1 Flavonlar

Flavonlar bitki ve meyve gibi günlük besin kaynaklarımızda bulunur. Genellikle yan etkileri az olup birçok olumlu etileri vardır. Farmakolojik araştırmalarda önemli yer tutan bu sınıfın Şekil 2.7.'de gösterildiği gibi antioksidan, antiproliferatif, antitümör, antimikrobiyal, östrojenik, asetilkolinesteraz, antienflamatuvar etkileri rapor edilmiştir.

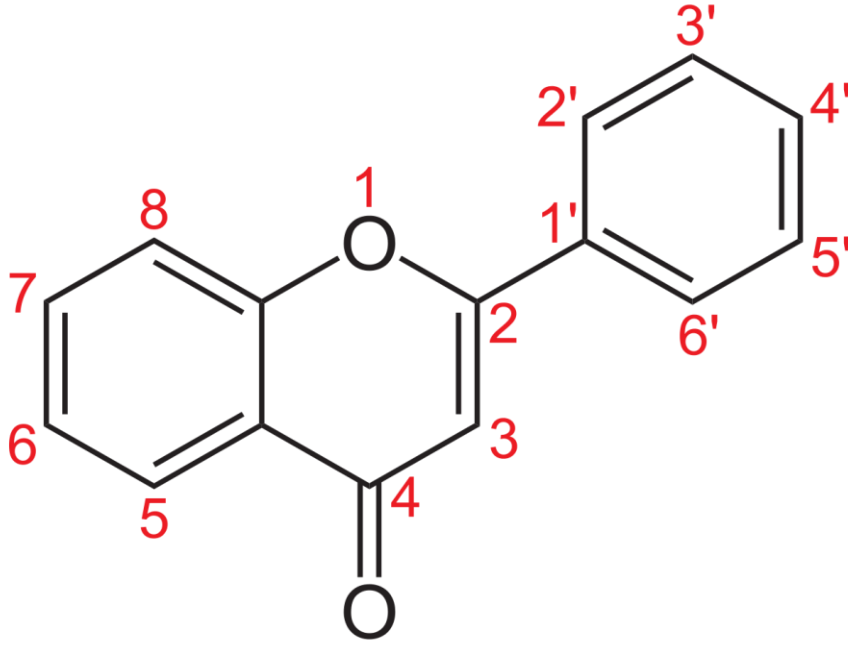


Şekil 2.6 Çeşitli flavonlar ve etkileri (Singh et al., 2014b)

Kanser araştırmalarında diğer flavonoid bileşikler gibi flavonlarda kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda apigeninin meme, sindirim sistemi, cilt ve prostat kanserlerine



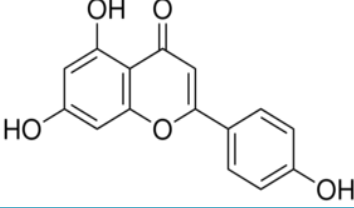
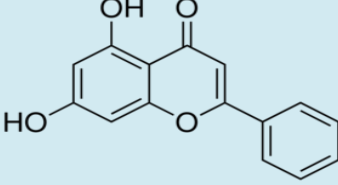
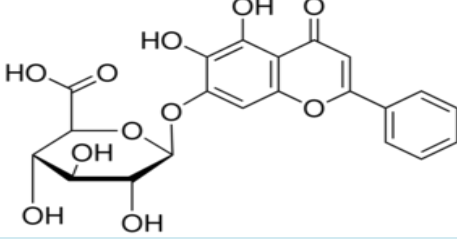
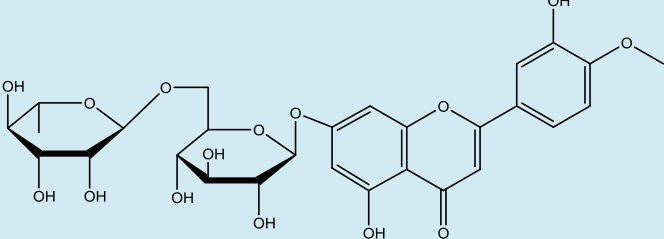
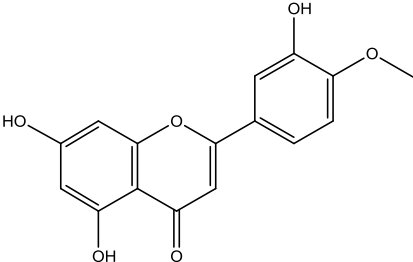
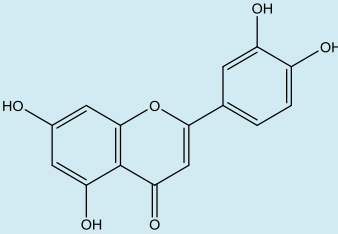




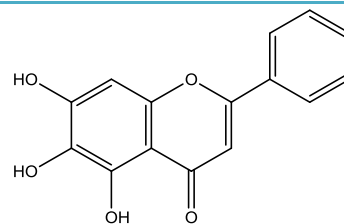
**Şekil 2.8** Flavonun temel iskeleti

Piruvat kinaz gibi kontrol noktası enzimlerinde substrat ve koenzim bağlanma bölgeleri, allosterik kontrol noktaları ve kovalent modifikasyona gibi birden çok aktif bölgesi mevcut olup etkin biyoaktif bileşiklerden etkilenme ihtimalleri yüksektir. Bu nedenle bu bileşiklerin PKM2 enzim aktivitesi üzerinde etkili olacağı düşünülmektedir.

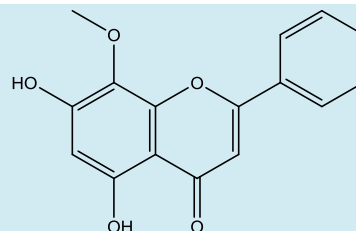
**Çizelge 2.1** PKM2 enzim aktivitesi üzerinde etkisi araştırılan bileşiklerin adları ve yapıları

1. Apigenin	
2. Chrysin	
3. Baicalin	
4. Diosmin	
5. Diosmetin	
6. Luteolin	

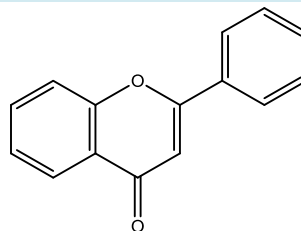
7. Baicalein



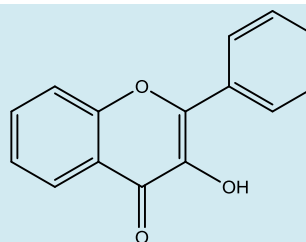
8. Wogonin



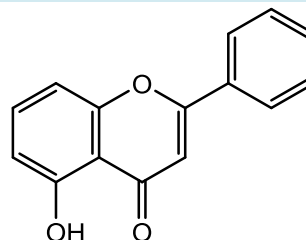
9. Flavone



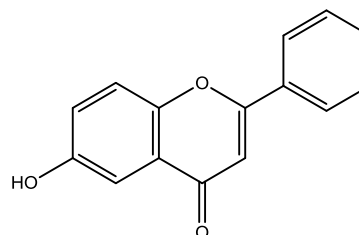
10. 3-hydroxyflavone



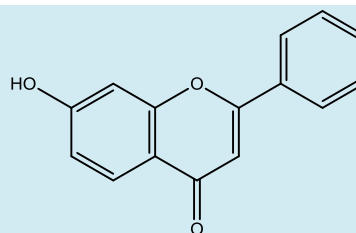
11. 5-hydroxyflavone



12. 6-hydroxyflavone

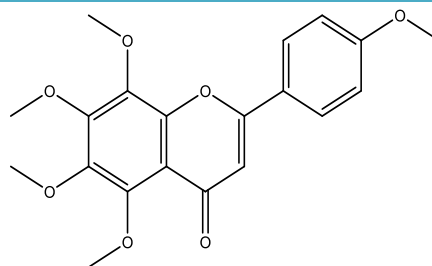


13. 7-hydroxyflavone

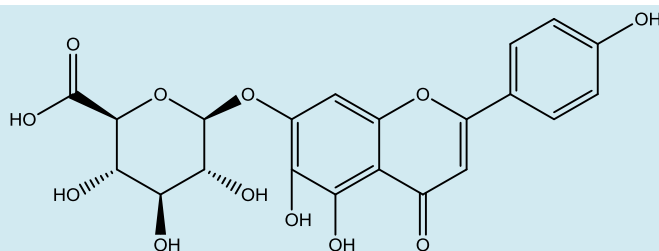


---

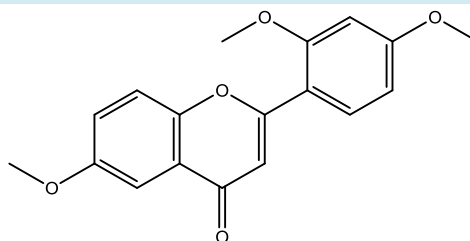
14. Tangeretin



15. Scutellarin



16. 6, 2', 4'-  
trimethoxyflavone



### 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  $\mu$ 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  $\mu$ L su içerisinde çözülür. Daha sonra üzerine 125  $\mu$ l piruvat kinaz M2 enzimi eklenir ve 1 ml hacime tamamlanır.
6. LDH: 50  $\mu$ L LDH alınır ve toplam hacim 1,25 ml' ye tamamlanır.

7. KCl ve MgCl<sub>2</sub>: 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.

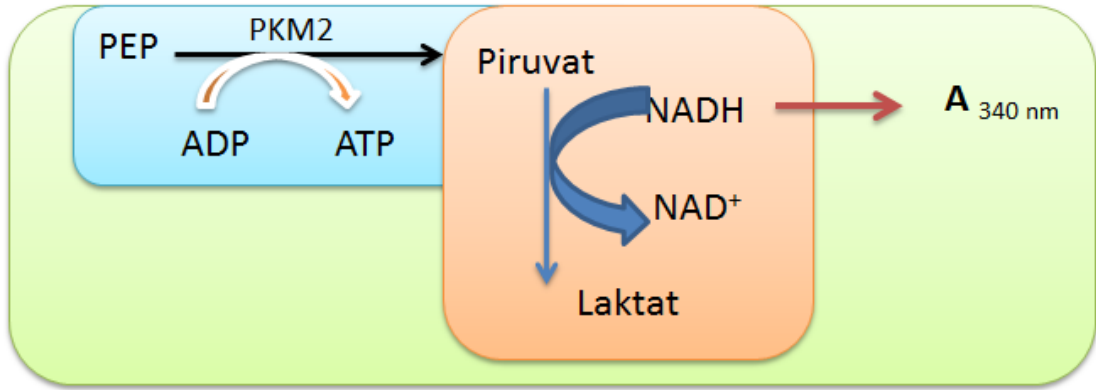
### 3.2. Yöntem

#### 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, ortamdaki NADH miktarının aşırı Laktat dehidrogenaz varlığında azalması ile hesaplandı. Aktivite ölçümleri oda sıcaklığında 340 nm'de spektrofotometrik olarak takip edildi. Aktivite ölçümleri 1 ml'lik küvetlerde yapıldı. Küvet içeriği çizelge 2.10.'da 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 ölçülmesi için yapılan ön çalışmalarda her bir maddenin ayrı ayrı pipetlenmesi durumunda 20 dakika gibi uzun bekleme süreleri sonunda spektrofotometrede enzim katılmadan absorbans değişimi sabitleniyordu. Bekleme süresini azaltmak için çeşitli kombinasyon çalışmaları sonucunda ADP, NADH, PEP, LDH ve MgCl<sub>2</sub>-KCl çözeltileri çalışma öncesi birleştirildi. Bu yöntem ile yapılan ön denemelerde 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

**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 <sub>2</sub> , 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

$\Delta OD$  : 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 belirlemek 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. IC<sub>50</sub> 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<sub>i</sub> 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<sub>i</sub> 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 2010 programı kullanıldı.

#### 4. BULGULAR

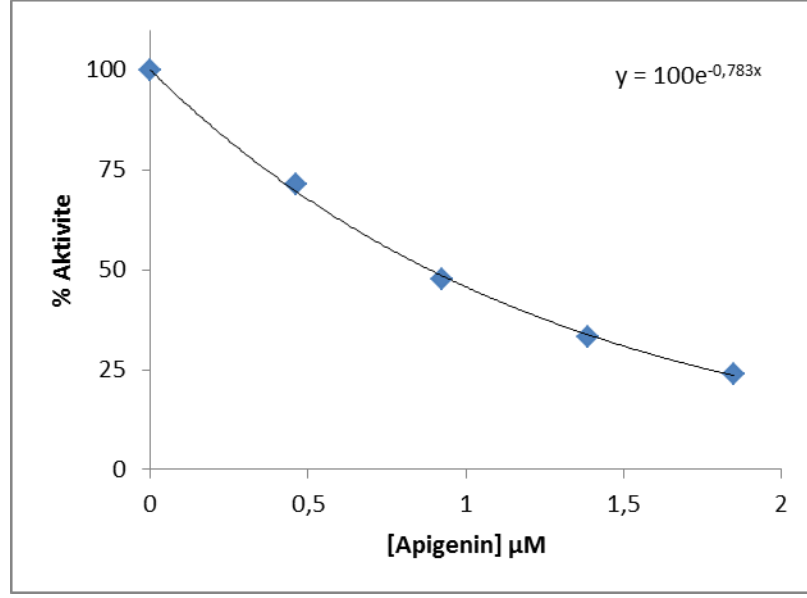
Bu tez kapsamında 16 fenolik bileşğin PKM2 enzim aktivitesi üzerinde inhibitör etkisi araştırıldı. Yapılan çalışmada bileşiklerin  $IC_{50}$  ve  $AC_{50}$  değerleri çizilen grafiklerdeki eğimlerden hesaplanmıştır.  $K_i$  değerlerinin belirlenmesi ve inhibisyon türlerinin tespiti amacıyla Lineweaver-Burk grafikleri çizildi.

Araştırmadan elde edilen  $IC_{50}$  ve  $AC_{50}$  değerlerine ait sonuçlar Çizelge4.1.'de verilmiştir. Bu tabloda görüldüğü gibi 9 bileşik enzim üzerinde inhibisyon etkisi göstermiş, 7 bileşik ise aktivatör etkisi göstermiştir. Bu tablodaki verilere göre apigenin, 6-hydroxyflavone, 5-hydroxyflavone, 3-hydroxyflavone, wogonin, flavone, 7-hydroxyflavone, chrysin ve diosmin enzim aktivitesini sırasıyla en çok inhibe eden bileşiklerdir. Bu bileşiklere dair çizilen % aktivite-[I] grafikleri Şekil 4.1-11 aşağıda verilmiştir. Özellikle ilk beş bileşik enzim aktivitesini 5  $\mu$ M altında inhibe etmiştir. Chrysin ve diosmin zayıf inhibisyon etkisi göstermiştir.

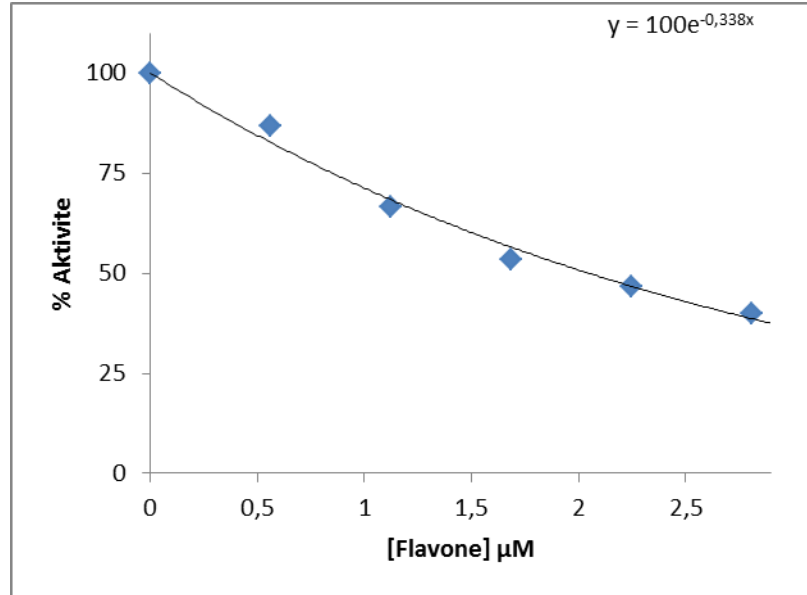
Tangeritin ve Scutellarin hydrate enzim aktivitesini 0,955 ve 1,44  $\mu$ M  $AC_{50}$  değeri ile aktive etmişlerdir. Çizilen % aktivite-[A] grafikleri Şekil 4.12. ve Şekil4.13. olarak aşağıda verilmiştir. Diosmetin, baicalin, baicalein ve luteolin 10-71  $\mu$ M aralığında  $AC_{50}$  değerleri ile enzimi orta düzeyde aktive etmişlerdir. 6, 2', 4'-trimethoxyflavone çok yüksek konsantrasyonda enzimi aktive etmiştir.

**Çizelge 4.1** Bazı flavon bileşiklerin PKM2 enzim aktivitesi üzerindeki etkisi

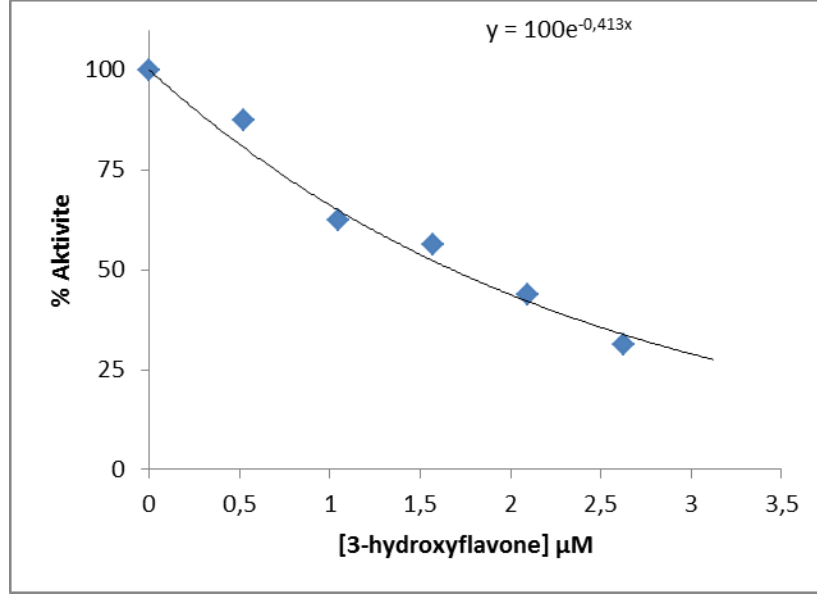
No	Bileşik	IC <sub>50</sub> /AC <sub>50</sub> µM	Etkisi	İnhibisyon tipi	K <sub>i</sub> sabiti µM
1.	Apigenin	0.990	İnhibisyon	Non competitive	3.53
2.	6-Hydroxyflavone	1.245	İnhibisyon	Non competitive	4.59
3.	5-Hydroxyflavone	1.394	İnhibisyon	Non competitive	4.84
4.	3-Hydroxyflavone	1.755	İnhibisyon	Non competitive	4.84
5.	Wogonin	2.0116	İnhibisyon	Non competitive	4.43
6.	Flavone	2.0800	İnhibisyon	Non competitive	5.67
7.	7-Hydroxyflavone	4.620	İnhibisyon	Non competitive	4.84
8.	Chrysin	23.200	İnhibisyon	Non competitive	
9.	Diosmin	254.80	İnhibisyon	Non competitive	
10.	Tangeritin	0.957	Aktivasyon	Competitive	
11.	Scutellarin hydrate	1.462	Aktivasyon	Competitive	
12.	Diosmetin	10.000	Aktivasyon	Competitive	
13.	Baicalin	29.400	Aktivasyon	Competitive	
14.	Baicalein	38.400	Aktivasyon	Competitive	
15.	Luteolin	71.700	Aktivasyon	Competitive	
16.	6, 2', 4'- trimethoxyflavone	124.564	Aktivasyon	Competitive	



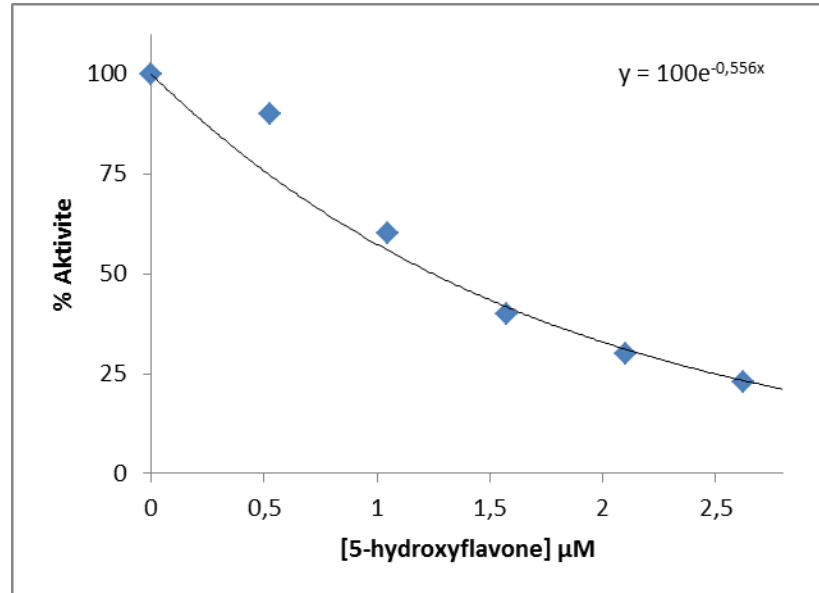
**Şekil 4.1** İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine apigenin bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği



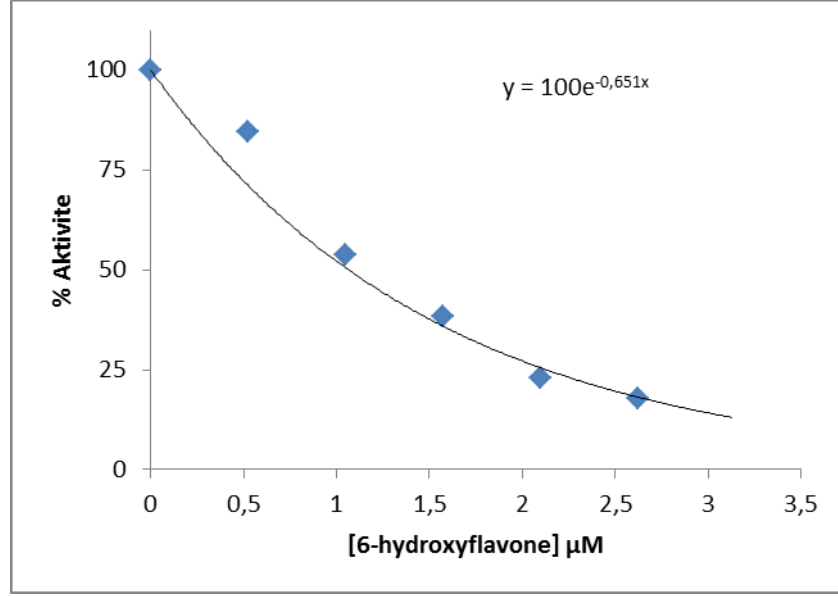
**Şekil 4.2** İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine flavone bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği



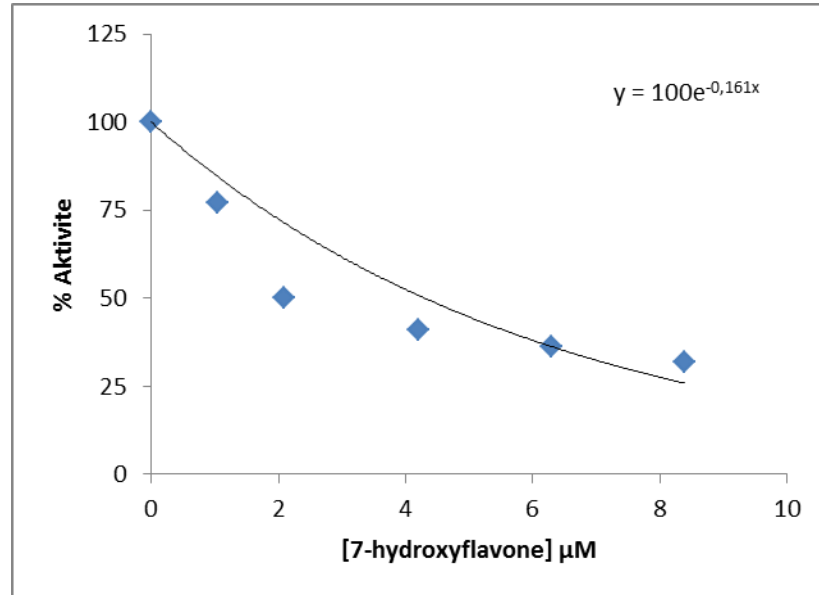
**Şekil 4.3** İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine 3-hydroxyflavone bileşğinin % aktivite-[I] grafiği



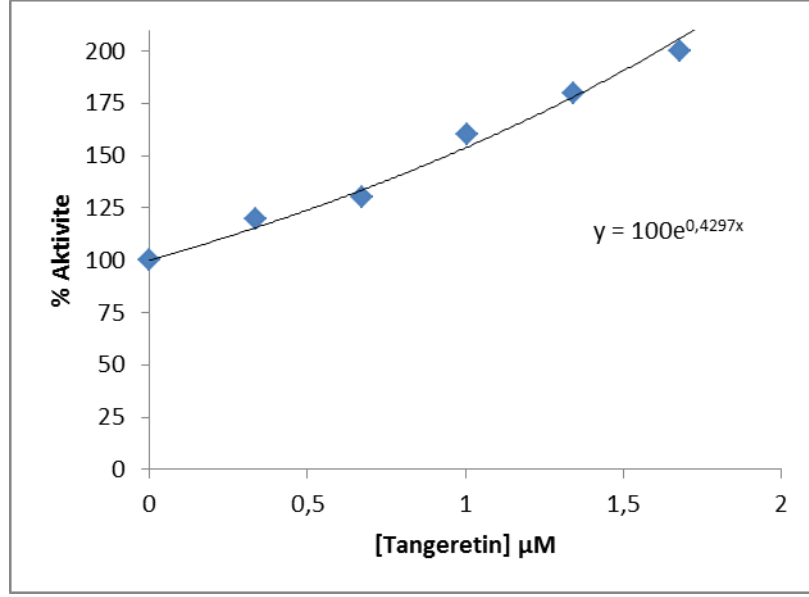
**Şekil 4.4** İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine 5-hydroxyflavone bileşğinin % aktivite-[I] grafiği



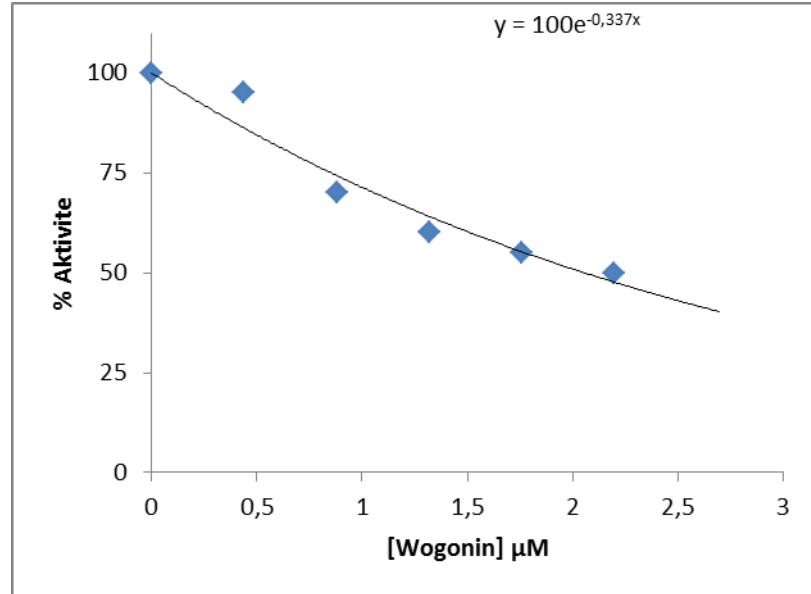
**Şekil 4.5** İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine 6-hydroxyflavone bileşiminin % aktivite-[I] grafiği



**Şekil 4.6** İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine 7-hydroxyflavone bileşiminin % aktivite-[I] grafiği

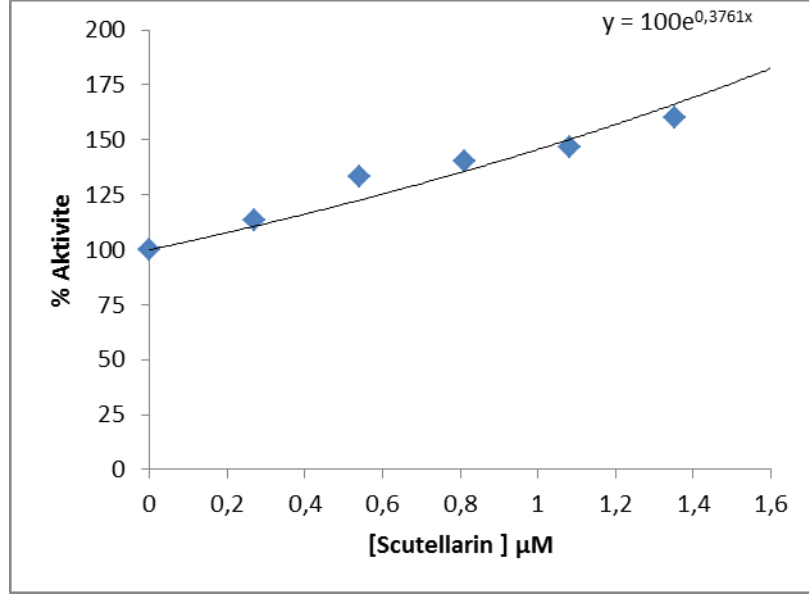


Şekil 4.7 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine tangeretin bileşiminin % aktivite-[I] grafiği

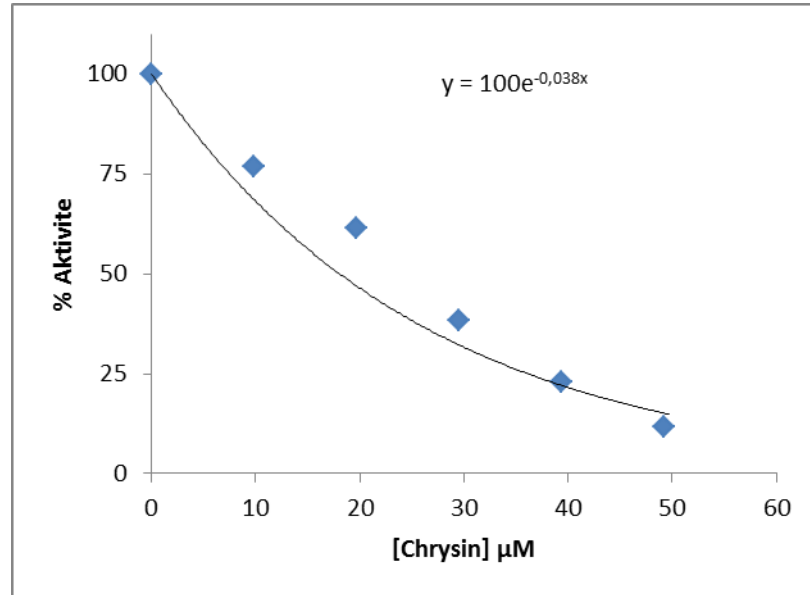


Şekil 4.8 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine wogonin bileşiminin % aktivite-[I] grafiği

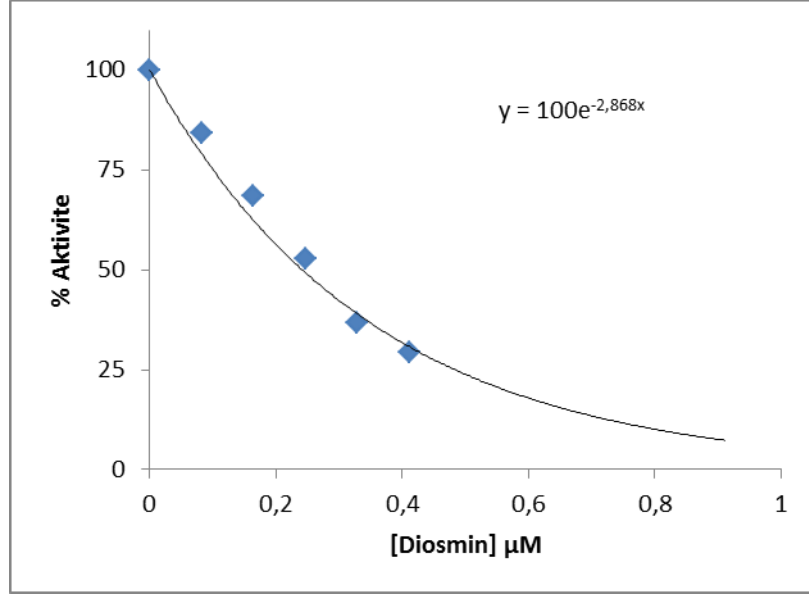




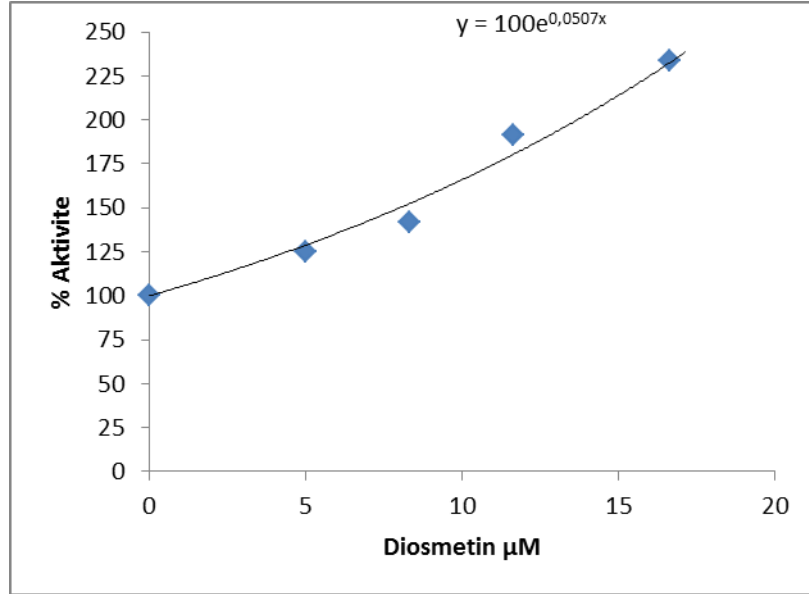
**Şekil 4.9** İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine scutellarin bileşiminin % aktivite-[I] grafiği



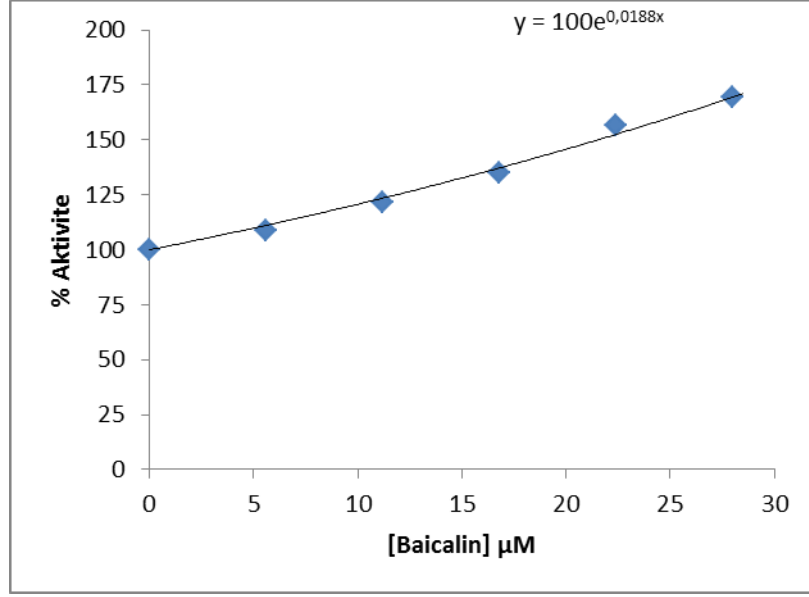
**Şekil 4.10** İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine chrysin bileşiminin % aktivite-[I] grafiği



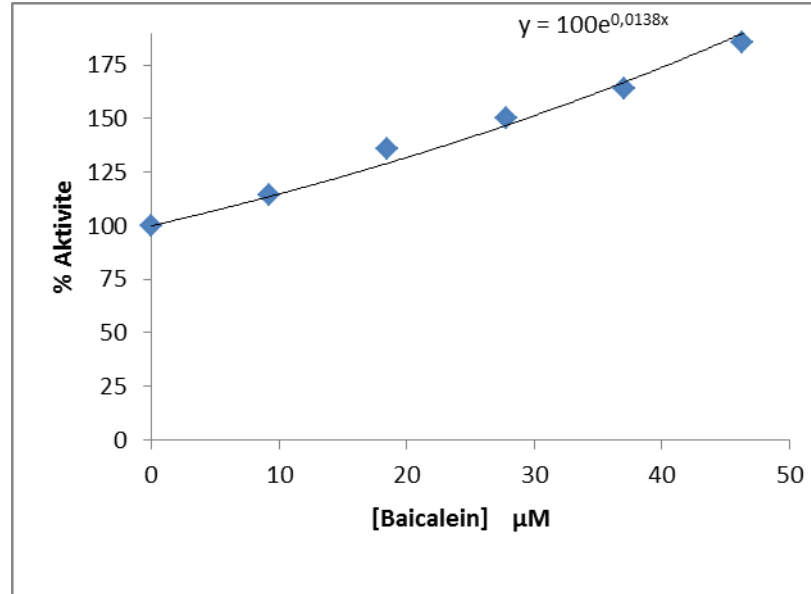
Şekil 4.11 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine diosmin bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği



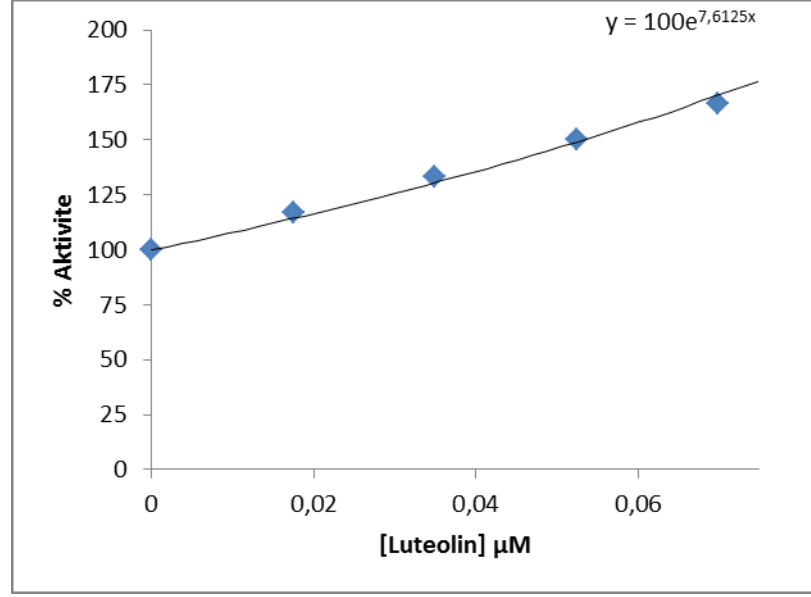
Şekil 4.12 İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine diosmetin bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği



**Şekil 4.13** İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine baicalin bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği

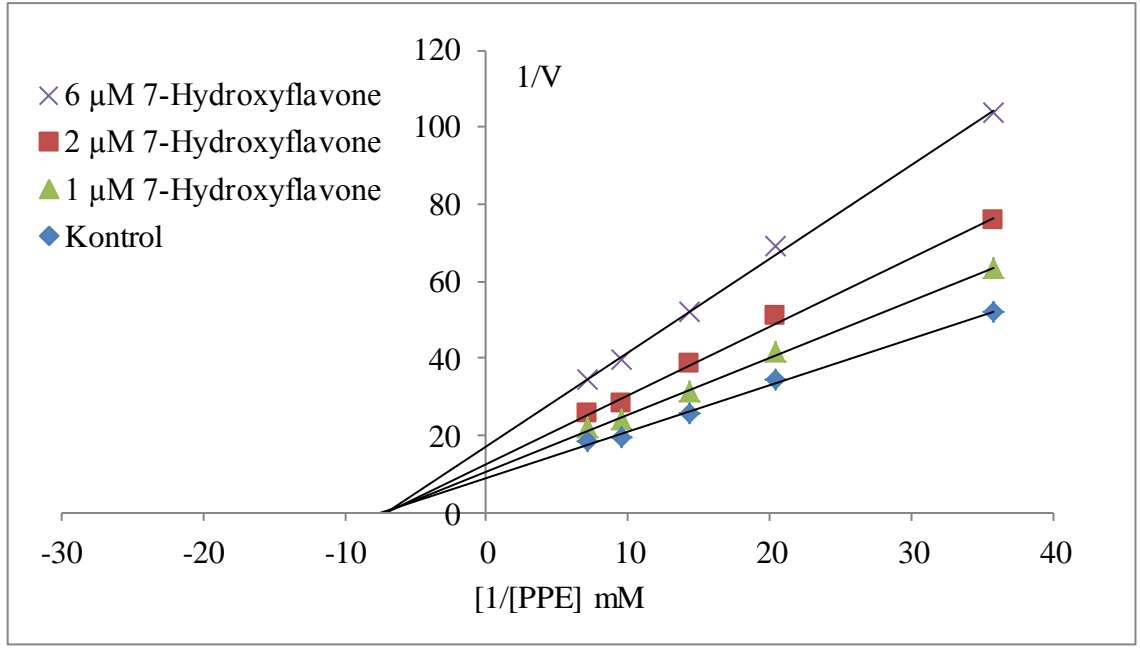


**Şekil 4.14** İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine baicalein bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği

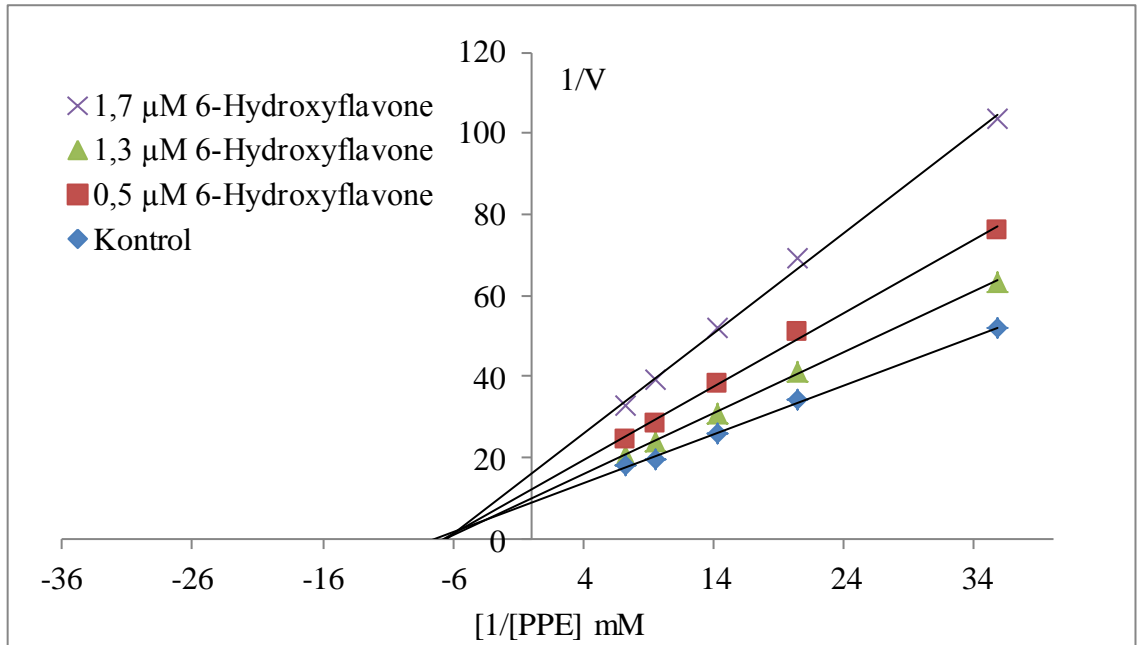


**Şekil 4.15** İnsan rekombinant PKM2 enzimi üzerine luteolin bileşiğinin % aktivite-[I] grafiği

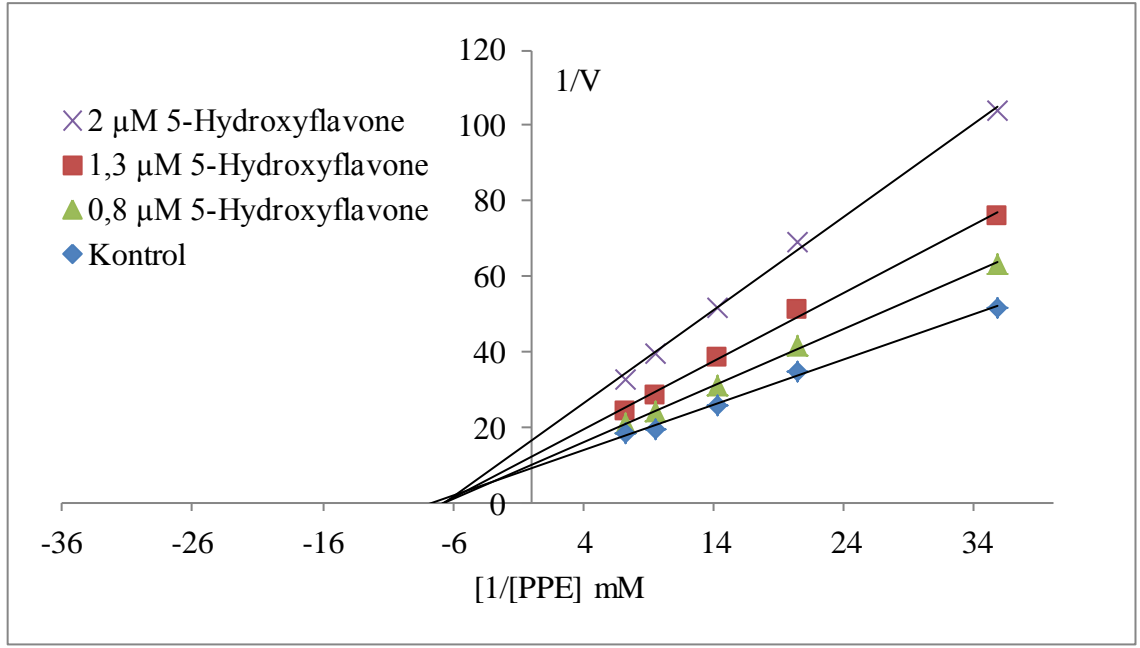
Yüksek inhibisyon etkisi gösteren apigenin, 6-hydroxyflavone, 5-hydroxyflavone, 3-hydroxyflavone, wogonin, flavone, 7-hydroxyflavone, chrysin ve diosmin gibi bileşiklerin PKM2 enzim aktivitesi üzerinde PEP bağlanma bölgesini nasıl etkilediği araştırılmıştır. Çalışmalardan elde edilen grafiklerden (Şekil 4.16. ve Şekil 4.22.) bağlanmayı nasıl etkilediği anlaşılmıştır. Bu bileşikler enzime PEP bağlanmasını yarı yarışmalı olarak inhibe ettiği tespit edilmiştir. Apigenin, 6-hydroxyflavone, 5-hydroxyflavone, 3-hydroxyflavone, wogonin, flavone, 7-hydroxyflavone, chrysin ve diosminin  $K_i$  değerleri sırayla 3.53, 4.59, 4.84, 4.84, 4.43, 5.67 ve 4.84  $\mu\text{M}$  olarak tespit edilmiştir.



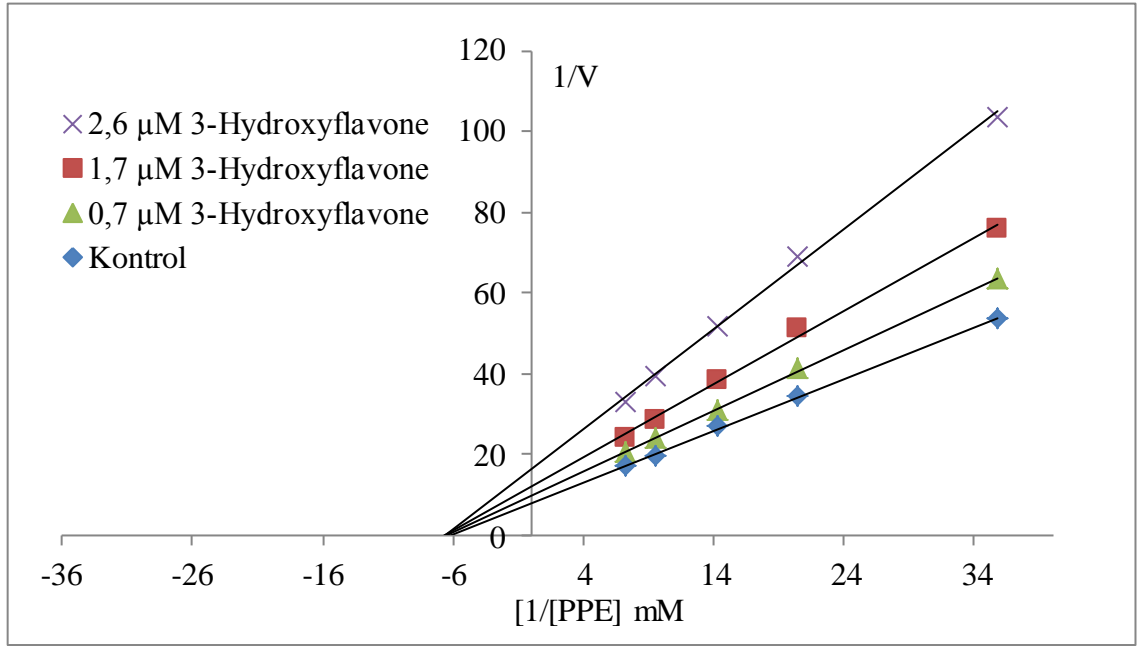
**Şekil 4.16** İnsan Rekombinant PKM2 enziminde 7-hidroksiflavone için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



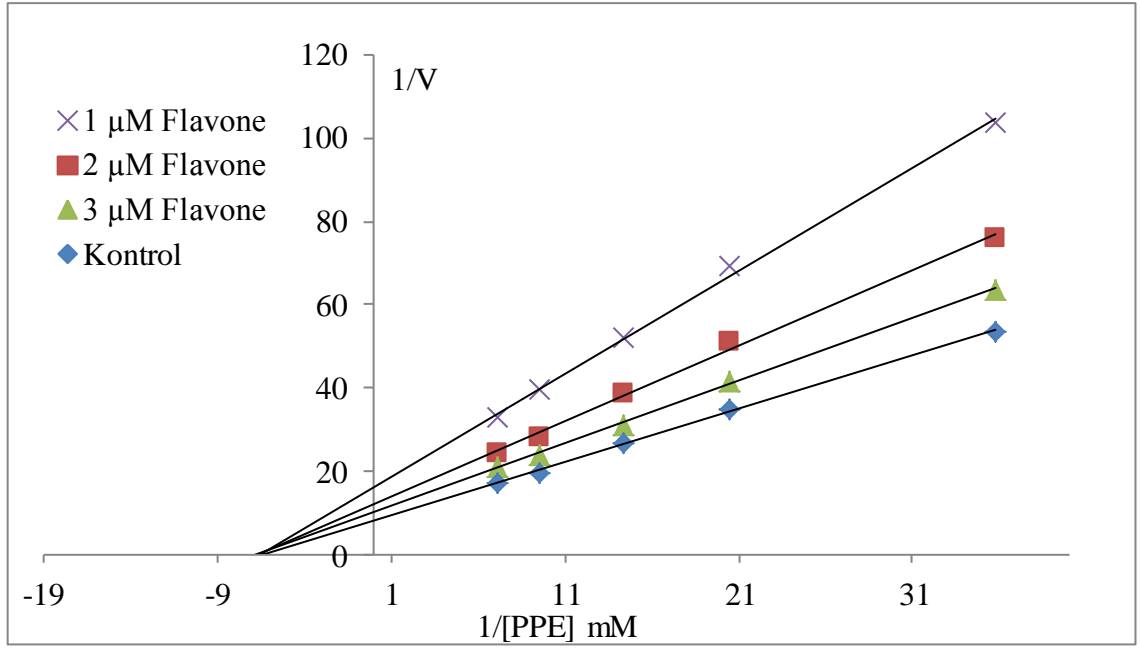
**Şekil 4.17** İnsan Rekombinant PKM2 enziminde 6-hidroksiflavone için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



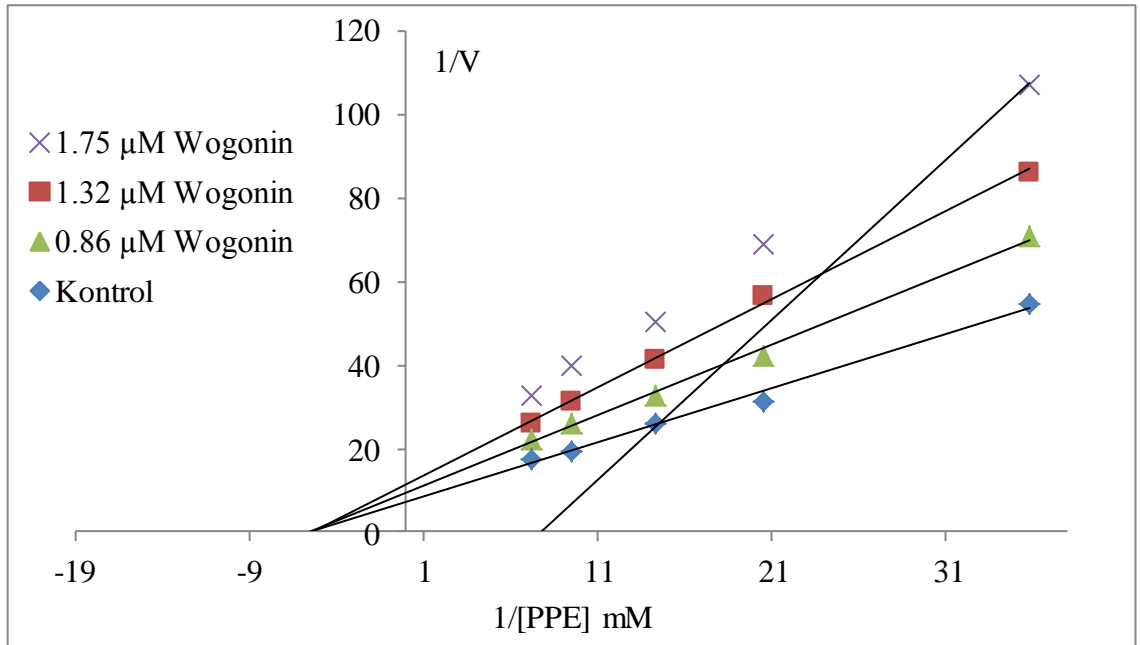
**Şekil 4.18** İnsan Rekombinant PKM2 enziminde 5-hidroksiflavon için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



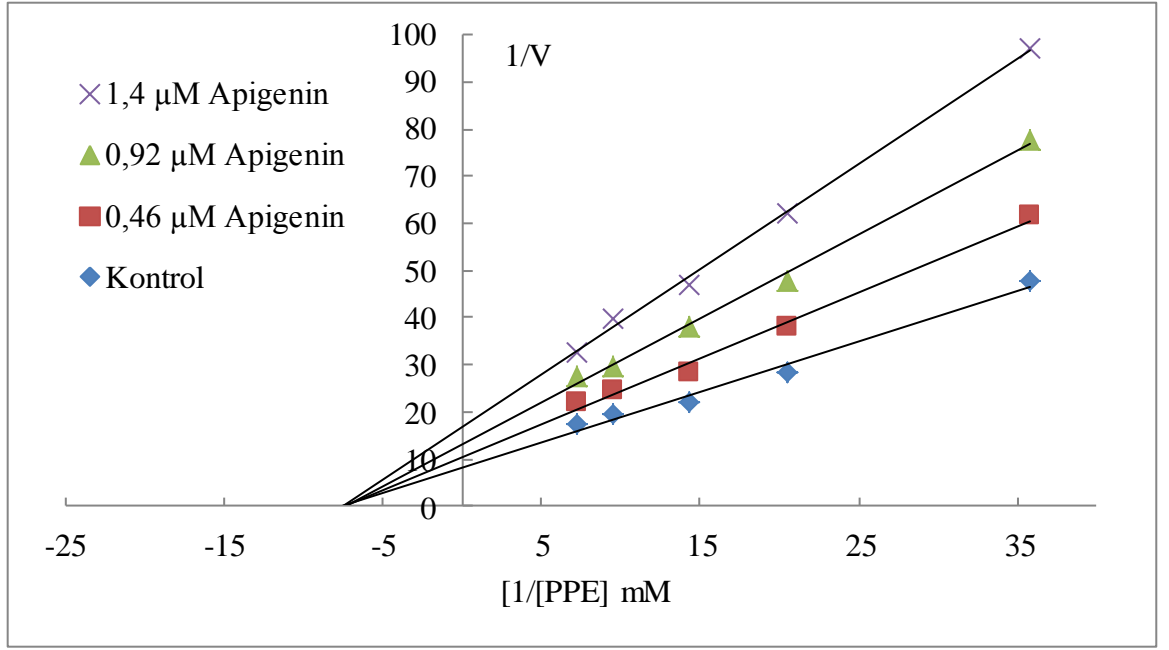
**Şekil 4.19** İnsan Rekombinant PKM2 enziminde 3-hidroksiflavon için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 4.20** İnsan Rekombinant PKM2 enziminde flavone için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 4.21** İnsan Rekombinant PKM2 enziminde wogonin için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



**Şekil 4.22** İnsan Rekombinant PKM2 enziminde 6-hidroksiflavon için 5 farklı substrat konsantrasyonunda çizilen Lineweaver-Burk grafiği



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanserli dokularda aşırı glikoz tüketimi görülmektedir. Glikoz tüketimi hücre içinde birçok metabolik ihtiyaca cevap verecek şekilde düzenlenmektedir. Hücrenin çoğalması ve enerji ihtiyacına göre glikoliz yolunun hızı kontrol edilmektedir. Bu kontrol mekanizmasında piruvat kinaz M2 izoenzimi kilit rol oynamaktadır. Bu enzimin inhibisyonu ya da aktivasyonu ile kanserli dokunun metabolik dengesi değişebilecektir (Harris *et al.*, 2012). Bu nedenle kanser tedavisinde bu enzim mükemmel bir hedeftir.

Flavonoidler biyoaktivitesi yüksek bileşiklerdir. Bu bileşiklerden birçoğunun kanserli hücreler üzerinde etkili olduğunu gösteren birçok çalışma yapılmıştır (Chahar *et al.*, 2011). Bu bileşiklerin enzim aktivitelerini etkileme potansiyellerinin yüksek olması ve kanser hücreleri üzerinde inhibisyon etkisi göstermesi nedeniyle çalışmada tercih edilmiştir.

Bu çalışmada bazı doğal bileşiklerin bu enzim üzerinde inhibisyon ve aktivasyon etkisi *in vitro* olarak araştırıldı. Doğal fenolik bileşiklerin kanserli hücreler üzerinde birçok olumlu etkisi rapor edilmiş fakat bunların etki mekanizmalarının PKM2 enzimi üzerinden olduğuna dair çalışmalar yapılmamıştır. Yukarıdaki şekillerde görüleceği gibi 7 farklı bileşik  $IC_{50}/AC_{50}$  değeri 5  $\mu M$  altında etki göstermiştir. Bu bileşiklerin inhibisyon etkisi büyükten küçüğe doğru apigenin, 6-hydroxyflavone, 5-hydroxyflavone, 3-hydroxyflavone, wogonin, flavone, 7-hydroxyflavone, chrysin ve diosmin şeklindedir. Shikinon bu enzimin potansiyel inhibitörü olarak değerlendirilmekte olup  $IC_{50}$  değeri 0,3  $\mu M$  olarak tespit edilmiştir. Çalışılan bileşiklerden apigenin için bulunan 0,95  $\mu M$   $IC_{50}$  değeri bu değere en yakın olmaktadır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde apigenin potansiyel PKM2 inhibitörü olabilir. Önceki çalışmalarda apigeninin kanserli dokularda bazı olumlu etkileri rapor edilmiştir (Melstrom *et al.*, 2008; Yamagata *et al.*, 2010). Örneğin, glikozun hücre içine en hızlı taşıyan ve kanserli hücrelerde önemli oranda sentezlenen, kanser tedavisinde hedef reseptörlerden olan GLUT-1'i inhibe etmektedir (Chan *et al.*, 2011). Yapılan

çalışmada düşük konsantrasyonda bu bileşiğin inhibisyon etkisi göstermesi önemlidir. Birden fazla hedefe etki eden bir bileşik olarak kanser tedavisinde kullanılma potansiyeli bulunmaktadır.

Bu enzimin hem inhibitörlerinin hem de aktivatörlerinin ilaç olarak kullanılabilmesi açısından aktivatörleri de inhibitörleri kadar önemlidir. Enzimin aktivatörleri ile yapılan hücre kültür çalışmalarında olumlu etkileri rapor edilmiştir(Xu *et al.*, 2005). Tangeritin ve Scutellarin hydrate sırasıyla AC<sub>50</sub> değeri 0,955 ve 1,44 µM aralığında aktivasyon etkisi göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre bu bileşikler potansiyel PKM2 aktivatörü olabilir. Aynı şekilde; grup farklılığından oluşan zıt etki, flavon türü bileşiklerden diosmetin ve diosmin aktivite üzerindeki etkilerinde de görülmektedir.

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

- Apigenin, 6-hydroxyflavone, 5-hydroxyflavone, 3-hydroxyflavone, wogonin, flavone ve 7-hydroxyflavone yüksek inhibisyon etkisi göstermiştir (IC<sub>50</sub> değeri <5 µM).
- Tangeritin ve Scutellarin hydrate yüksek aktivasyon etkisi göstermiştir (AC<sub>50</sub> value <5 µM)
- Diosmetin, baicalin, baicalein ve luteolin aktivasyon etkisi gösteren diğer bileşiklerdir (AC<sub>50</sub> değeri 10-100 µM arası). Vanilik asit yüksek konsantrasyonda aktivasyon etkisi göstermiştir.
- 6, 2', 4'-trimethoxyflavone 124,564 AC<sub>50</sub> değeri ile en az aktivasyon etkisi gösteren bileşik olarak belirlenmiştir.
- Chrysin ve diosmin, 23,20 ve 254,80 µM IC<sub>50</sub> değerleri ile orta düzeyde inhibisyon etkisi gösteren bileşiklerdir.

#### Öneriler;

- Bu bileşiklerin PKM2 enzim aktivitesini hücre ortamında ne kadar etkilediği hücre kültür ortamında test edilebilir.
- Etkin bileşiklerin farklı analogları sentezlenerek veya elüe edilerek, enzim aktivitesi ölçülerek, hücre kültür ortamında testleri yapılabilir.
- PKM2 farklı kontrol bölgeleri olan bir enzim olduğundan, bu bileşiklerin enzim aktivitesini nasıl etkilediği araştırılabilir.

## 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. Inglese, 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. Mesezar, 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, R.H. 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  $\alpha$ -induced adhesion molecule expression in human endothelial cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 21, 116-124.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Erdem ARSLAN  
Doğum Yeri :Keçiören/ANKARA  
Doğum Tarihi :24/11/1985  
Medeni Hali :Evli  
Yabancı Dili :İngilizce  
Adres :Yavuz Selim Mah. Çağdaş Cad. Oran Sitesi B Blok No:4  
Tel :05442519703  
E-posta :erdema85@gmail.com  
Eğitim Durumu(Kurum ve Yıl)  
Lise :Yahya Kemal Beyatlı Lisesi-2003  
Lisans :Gazi Üniversitesi Kastamonu Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi  
Öğretmenliği-2008  
Yüksek Lisans :Karatekin Üniversitesi Kimya Anabilimdalı Biyokimya Bölümü  
Çalıştığı Kurum/Kurumlar  
-Şehit Yahya Coşkuner İ.Ö.O. 2012  
-İsmail Hakkı Karadayı İ.Ö.O. 2013  
-MKE Tophane İ.Ö.O.2014  
-Toki Ortaokulu, Halen

### Yayınlar (SCI ve Diğerleri)

- 1- Erdem Arslan, Caglar Guler and Sevki Adem 2015. In vitro effects of some flavonoids and phenolic acids on human pyruvate kinase isoenzyme M2 J Enzyme Inhib Med Chem DOI: 10.3109/14756366.2015.1022173
- 2- Erdem Arslan and Sevki Adem 2015. In Vitro Effects of Some Flavones on Human Pyruvate Kinase Isoenzyme M2 Journal of Biochemical and Molecular Toxicology Volume 29, Issue 3, pages 109–113.
- 3- Erdem Arslan and Sevki Adem 2015. Investigation of the Effects of Some Drugs and Phenolic Compounds on Human Dihydrofolate Reductase Activity Journal of Biochemical and Molecular Toxicology Volume 29, Issue 3, pages 135–139.