

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİTRAT TRANSPORT PROTEİN İNHİBİSYONUNUN MEME KANSERİ HÜCRELERİ
ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Ali Burak ÖZKAYA

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hikmet Hakan AYDIN

İZMİR
(2015)

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİTRAT TRANSPORT PROTEİN İNHİBİSYONUNUN MEME KANSERİ HÜCRELERİ
ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Ali Burak ÖZKAYA

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hikmet Hakan AYDIN

İZMİR
(2015)

TEZ ONAY SAYFASI

Kurum Adı : Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Program : Biyokimya Doktora Programı

Tez Konusu : Sitrat transport protein inhibisyonunun meme kanseri hücreleri üzerine olan etkilerinin araştırılması

Danışman : Prof. Dr. Hikmet Hakan AYDIN

Tezi Hazırlayan : Ali Burak ÖZKAYA

Değerlendirme Kurulu Üyeleri :

Adı Soyadı :

Başkan(Danışman) : Prof. Dr. Hikmet Hakan AYDIN

Üye / İmza : Prof. Dr. Taner ONAT

Üye / İmza : Prof. Dr. Handan AK

Üye / İmza : Doç. Dr. Erbil KALMIŞ

Üye / İmza : Prof. Dr. Gülgün OKTAY

Tezin Kabul Edildiği Tarih : 20/02/2015

Önsöz

Şüphesiz bu tezin gerçekleşmesinde doğrudan ya da dolaylı olarak emeği geçen pek çok isim vardır. Ben bu kişiler arasından öncelikle; beni akademinin gerçek doğası hakkında bilinçlendiren ve bana kendimi bilimsel platformda ifade etme fırsat tanıyan saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Hikmet Hakan AYDIN'a; özverisi, anlayışlılığı ve kesintisiz desteği ile kendisini ikinci danışmanım olarak gördüğüm saygıdeğer hocam Prof. Dr. Handan AK'a; kendimi geliştirmem için elinden gelen çabayı gösteren ve kariyerim konusunda eşsiz tavsiyelerde bulunan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Ferhan SAĞIN'a ve dört yıllık doktora eğitimim boyunca beni destekleyen tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı hocalarına teşekkürlerimi sunmayı kendime borç bilirim.

Bu tez çalışmasının tüm kısımlarında emeği olan, karşılaştığımız her zorlukla birbirimizden destek alarak mücadele ettiğimiz değerli arkadaşım Sevcan ATAY'a, İhtiyaç duyduğumda düşünmeden yardımına koşan başta Ela HADDUR ve Öykü GÖNÜL olmak üzere tüm laboratuvar arkadaşlarıma, teorik ve pratik bilimsel birikimlerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen ve zor zamanlarımda desteklerini sürekli hissettiğim başta Fatma Gül ÇELENK, Didem KELEŞ, Taylan Kurtuluş ÖZTÜRK ve Caner GEYİK olmak üzere tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bana bilimsel yöntem ve analitik düşüncenin önemini ilk kez aşıl原因an, prensiplerin ve dürüstlüğün bireysel çıkarlardan önemli olduğunu öğreten ve bu tez çalışmasını kendisine adadığım sevgili babam rahmetli Abdullah ÖZKAYA başta olmak üzere, akademinin tüm zorluklarına rağmen benden desteklerini asla esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Laboratuvar olanaklarından özgürce yararlanabilmem için ellerinden geleni yapan AREL personeline ve bu projenin gerçekleştirilebilmesi için gerekli maddi desteği sağlayan TÜBİTAK ve Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak bu dört yıllık macerada beni hiç yalnız bırakmayan, hem bilimsel hem de sosyal desteğini benden esirgemeyen, bitmeyen sabrı ve anlayışı ile hayatımdaki her şeyi kolaylaştıran sevgili eşim Feriha ÖZKAYA'ya teşekkür ederim.

Özet

Sitrat transport protein inhibisyonunun meme kanseri hücreleri üzerine olan etkilerinin araştırılması

Çağımızın en önemli sağlık sorunlarından birisi olan kanserin karakteristik özelliklerinden birisi de hücresel metabolizmada meydana gelen değişikliklerdir. Bu değişiklikler arasında glikolitik hızda ve sentez yollarında artış ile yıkım yollarında yavaşlama yer almaktadır. Hücrenin yeni hücreler oluşturmak üzere gerekli metabolitleri sentezledikleri anabolik yollar arasında protein, nükleotid ve yağ asidi sentezi yer almaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar bu yolda yer alan ATP-sitrat liyaz (ACLY), asetil-KoA karboksilaz ve yağ asidi sentaz enzimlerinin kanser hücrelerinde yüksek aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bununla birlikte yağ asidi sentezinin gerçekleşmesinde kritik rol oynayan ve sitoplazmik asetil-KoA'nın kaynağı olan sitoplazmik sitratın mitokondriden taşınımında görev alan sitrat transport proteininin (CTP) kanserdeki rolü iyi bilinmemektedir. Bu çalışmada siRNA ve kimyasal inhibitör aracılığıyla inhibe edilen sitrat transport proteininin meme kanseri hücre hatlarında hücresel süreçlerdeki önemi incelenmiştir.

Kullanılan hücre hatlarından MCF-10A normal meme epitel hücrelerini, MCF-7 agresif olmayan meme kanserini ve MDA-MB-231 metastatik meme kanserini temsil etmektedir. Çalışmada hücreler siRNA ile muamele edildikten sonra inhibisyonun etkinliği western blot yöntemi ile gösterilmiş ve sitoplazmik sitrat düzeylerindeki değişim spektrofotometrik yöntemler kullanılarak incelenmiştir. Hücre canlılığı spektrofotometrik kristal viyole yöntemi ile; apoptoz, nekroz ve hücre yaşam döngüsünde meydana gelen değişiklikler ise akış sitometrik yöntemlerle belirlenmiştir. Otofaji hem akış sitometri hem de floresan mikroskopi yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Son olarak inhibisyonun sitoplazmik asetil-KoA monomerlerine ihtiyaç duyan epigenetik bir regülasyon mekanizması olan histon asetilasyonu üzerine etkileri spektrofotometrik yöntemler kullanılarak tespit edilmiştir. Denemelerde CTP ile birlikte ACLY da inhibe edilmiş ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Elde edilen sonuçlar bütün hücre hatlarında ilgili proteinlerin eksprese edildiğini ve siRNA kullanılarak ekspresyonun etkili bir şekilde susturulabildiğini göstermektedir. Kanser agresifliği ile bazal sitoplazmik sitrat düzeyleri arasında ilişki belirlenmiş ve sitoplazmik sitrat

düzeyleri CTP siRNA ile kısmen ve kimyasal inhibitör ile etkili bir şekilde inhibe edilmiştir. Canlılık verilerine göre CTP ve ACLY inhibisyonu normal hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerinde canlılığı inhibe etmektedir. Bu inhibisyon kimyasal inhibitör ile çok daha etkili bir biçimde gerçekleşmektedir. Hücrelerde canlılık inhibisyonunun nedenleri araştırılmış ama azalmayı açıklayabilecek düzeyde apoptoz, nekroz, hücre yaşam döngüsü değişikliği ya da otofaji belirlenememiştir. Son olarak inhibisyonun hücrelerde asetilenmiş histon düzeylerinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Bu azalma, diğer deney sonuçlarıyla uyumlu bir biçimde kimyasal inhibitör ile muamele edilen hücrelerde daha etkili bir biçimde gerçekleşmiştir.

Bu tez kapsamında elde edilen veriler CTP ve ACLY proteinlerinin canlılık ve histon asetilasyonu açısından önemli olduğu ve ilgili proteinlerin inhibisyonu ile bu süreçlere girişim yapılabildiğini göstermektedir. Kimyasal inhibisyonun RNA interferansa göre daha etkili olması, sitoplazmik sitrat kaynağı olarak ekstraselüler alandan geçiş yapan sitrat metabolitlerinin önemli olduğuna ve bu yolağın kimyasal inhibitörden etkilendiklerine işaret etmektedir. Bununla birlikte her iki proteinin inhibisyonunun da normal hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerinde etkili olması bu proteinlerin hedeflenmesinin kanser terapi stratejileri açısından avantajlı olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: ATP-sitrat liyaz; kanser metabolizması; sitoplazmik sitrat; sitrat transport protein; histon asetilasyonu; SLC25A1

Abstract

Investigating the effects of the inhibition of citrate transport protein on breast cancer cells

Cellular metabolic alterations in cancer cells are among the hallmarks of the cancer which is one of the most important medical problems of our age. Increased rate of glycolysis and synthesis pathways along with decreased rate of degradation pathways are among these alterations. Anabolic pathways required for cells to create novel cells are protein, nucleotide and fatty acid synthesis pathways.

Novel studies suggest that proteins playing a role in these pathways such as ATP-citrate lyase (ACLY), acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase have high activity in cancer cells. However the role of citrate transport protein (CTP) which enables transportation of citrate from mitochondria into the cytoplasm where it plays a critical role for fatty acid synthesis as a source for cytoplasmic acetyl-CoA, is rather unknown. In this study the importance of citrate transport protein for cellular processes is examined by its inhibition in breast cancer cell lines via siRNA or chemical inhibition.

Among the cell lines; MCF-10A represents normal epithelial cells, MCF-7 represents less-aggressive breast cancer and MDA-MB-231 represents metastatic breast cancer. After siRNA treatment the efficiency of the inhibition was demonstrated via western blotting and the alterations in cytoplasmic citrate levels were detected via spectrophotometry. Cell viability was assessed by spectrophotometric crystal violet assay while the alterations in apoptosis, necrosis and cell cycle regulation were evaluated via flow cytometry. Autophagy was assessed both by fluorescence microscopy and flow cytometry. Lastly the effects of the inhibition on acetylation of histones, an epigenetic regulation process which requires cytoplasmic acetyl-CoA, were detected spectrophotometrically. During the experiments ACLY was also inhibited along with CTP and the results were evaluated comparatively

Obtained results suggest the proteins of interest are expressed in all cell lines and siRNA treatment can effectively silence the proteins. An association between basal cytoplasmic citrate levels and the aggressiveness of the cancer was determined and these levels were reduced partially by siRNA treatment and effectively by chemical inhibition. According to the data obtained from viability experiments inhibition of CTP and ACLY inhibit cancer cell

viability without affecting normal cells. This inhibition is more evident in cells treated with chemical inhibitor. The reason of the inhibition of cell viability was also studied, however no alteration in apoptosis, necrosis, cell cycle or autophagy strong enough for to cause such inhibition was detected. Lastly inhibition was also detected to inhibit histone acetylation which was more prominent in cells treated with chemical inhibitor accordance with previous experiments.

Data obtained throughout this thesis demonstrates the importance of CTP and ACLY for cell viability and histone acetylation, and there processes can be interfered with by inhibiting those proteins. High potency of chemical inhibition compared to RNA interference suggest the importance of extracellular citrate as a source of cytoplasmic citrate and that this pathway is effected by chemical inhibition. However effectiveness of the inhibition of both protein on cancer cells without affecting normal cells demonstrates that targeting these proteins is advantageous for cancer therapy strategies.

Key Words: ATP-citrate lyase; cancer metabolism; cytoplasmic citrate; citrate transport protein; histone acetylation; SLC25A1

İçindekiler

Önsöz.....	i
Özet	ii
Abstract	iv
İçindekiler.....	vi
Tablolar Dizini	ix
Şekiller Dizini	x
Kısaltmalar Listesi.....	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Warburg Etkisi	3
2.2. Kanser Hücrelerinde Metabolik Yolaklar.....	5
2.2.1. Glikoliz.....	6
2.2.2. Pentoz Fosfat Yolu	7
2.2.3. Pirüvat'tan Asetil-KoA ve Laktat Eldesi.....	7
2.2.4. Sitrat Döngüsü, Glutaminoliz ve Elektron Transport Zinciri	9
2.2.5. Yağ Asidi Metabolizması	11
2.3. Kanserde Epigenetik Regülasyon.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1. Akış Şeması.....	13
3.2. Hücre Kültürü.....	14
3.2.1. Hücre Kültürü Gereçleri	14
3.2.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Cihazlar.....	14
3.2.3. Hücre Kültürü Yöntemleri.....	15
3.3. İnhibisyon Çalışmaları	17
3.3.1. İnhibisyon Çalışmaları Gereçleri.....	17
3.3.2. İnhibisyon Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar	17

3.3.3.	İnhibisyon Çalışmaları Yöntemleri	17
3.4.	Kristal Viyole İle Canlılık Tayini.....	20
3.4.1.	Canlılık Tayini Gereçleri.....	20
3.4.2.	Canlılık Tayininde Kullanılan Cihazlar.....	20
3.4.3.	Canlılık Tayini Yöntemi.....	21
3.5.	Western Blot ile Protein İnhibisyonunun Gösterilmesi	21
3.5.1.	Western Blot Gereçleri	22
3.5.2.	Western Blot İçin Kullanılan Cihazlar	23
3.5.3.	Western Blot Yöntemi.....	24
3.6.	Akış Sitometrik Yöntemler ile Hücresel Etkilerin Belirlenmesi	30
3.6.1.	Akış Sitometri Gereçleri.....	31
3.6.2.	Akış Sitometride Kullanılan Cihazlar.....	31
3.6.3.	Akış Sitometri Yöntemleri	31
3.7.	Otofajinin Mikroskopi ile Tayini.....	32
3.7.1.	Mikroskopi Gereçleri.....	32
3.7.2.	Mikroskopide Kullanılan Cihazlar	33
3.7.3.	Mikroskopi Yöntemi	33
3.8.	Sitoplazmik Sitrat Düzeylerinin Belirlenmesi.....	33
3.8.1.	Sitrat Tayini Gereçleri	34
3.8.2.	Sitrat Tayini İçin Kullanılan Cihazlar	34
3.8.3.	Sitrat Tayini Yöntemleri.....	34
8.8.	Histon Asetilasyonunun Belirlenmesi	35
3.8.1.	Histon Asetilasyonunun Belirlenmesinde Kullanılan Gereçler	35
3.8.2.	Histon Asetilasyonunun Belirlenmesinde Kullanılan Cihazlar	35
8.8.3.	Histon Asetilasyonu Tayin Yöntemi	35
3.9.	Verilerin Analizi.....	36
4.	BULGULAR	37
4.1.	CTP ve ACLY Proteinlerinin siRNA ile İnhibisyonu	37

4.2.	İnhibisyonun Canlılık Üzerine Etkileri	39
4.3.	İnhibisyonun Sitoplazmik Sitrat Düzeyleri Üzerine Etkileri.....	40
4.4.	İnhibisyonun Apoptoz ve Nekroz Üzerine Etkileri	42
4.5.	İnhibisyonun Hücre Yaşam Döngüsü Üzerine Etkileri	51
4.5.1.	MCF-7	51
4.5.2.	MDA-MB-231	54
4.5.3.	MCF-10A	57
4.6.	İnhibisyonun Otofaji Üzerine Etkileri	60
4.7.	İnhibisyonun Histon Asetilasyonu Üzerine Etkileri	66
5.	TARTIŞMA	67
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	73
7.	KAYNAKLAR.....	75

Tablolar Dizini

Tablo 1. Üst jelin hazırlanması	26
Tablo 2. Alt jelin hazırlanması	26
Tablo 3. Kristal viyole canlılık sonuçları. Değerler ilgili uygulamanın sonucu olan 72. Saatteki ortalama canlılık değerlerini ifade etmektedir.....	40
Tablo 4. CTP inhibisyonunun sitoplazmik sitrat düzeyleri üzerine etkisi.	40



Şekiller Dizini

Şekil 1. Kansere hücrelerinde metabolik yollar. Kırmızı oklar aktive olan, mavi oklar ise inhibe olan yolları temsil etmektedir. TCA: Trikarboksilik asit (sitrik asit ya da sitrat) çevrimi. ETZ: Elektron transport zinciri.	6
Şekil 2. Kansere hücrelerinde glukoz metabolizması. Kansere hücrelerinde, glukozun hücre içine alım hızı, GLUT adı verilen glukoz transport proteinlerinin ekspresyonu artırılarak yükseltilmektedir. Glukoz hücre içine alındıktan sonra kanserde ekspresyonu artan HK2 (heksokinaz) enzimiyle glukoz-6-fosfata dönüştürülür. Glikoliz reaksiyonlarındaki bu hızlanmanın aksine fosfoenolpirüvatın pirüvata dönüştüğü glikolizin son basamağında, pirüvat kinaz enziminin kansere hücrelerine özgü düşük aktiviteli M2 izoformunun ekspresyonu nedeniyle yavaşlama görülmektedir. Bu yavaşlama glikoliz ara metabolitlerinden amino asit ve gliserol gibi makro moleküllerin sentezlenmesini mümkün kılmaktadır. Kansere hücrelerinde pirüvat, asetil-KoA yerine laktata dönüştürülmektedir. Bekleneceği üzere (PDH) pirüvat dehidrogenaz kinaz enziminin aktivitesi düşük, (LDHA) laktat dehidrogenaz enziminin aktivitesi yüksektir. Oluşan yüksek miktarda laktatın hücre dışına atılabilmesi için gerekli olan (MCT4) laktat transport proteinlerinin de ekspresyonu kanserde artmaktadır.....	8
Şekil 3. Kansere hücrelerinde sitrat döngüsü ve lipid metabolizması. Kansere hücreleri sitrat döngüsünü enerji ihtiyaçlarını karşılanması yerine biyosentez avantajı elde etme amacıyla kullanmaktadır. Sitrat sentaz (CS) enziminin aktivitesiyle, asetil-KoA ve oksaloasetattan elde edilen sitrat, sitoplazmada ATP-sitrat liyaz (ACLY) enziminin aktivitesiyle tekrardan asetil-KoA ve oksaloasetata parçalanır. Bu şekilde sitoplazmaya taşınan asetil-koa, sitoplazmik enzimlerin (asetil-KoA karboksilaz-ACC, yağ asidi sentaz-FASN) yağ asidi sentezinde kullanılmaktadır. Kansere hücrelerinde β -oksidasyon baskılanmıştır. Sitoplazmik yağ asitlerini, okside olacakları mitokondriye taşıyan karnitin palmitoil transferaz (CPT1A) aktivitesi kansere hücrelerinde düşüktür. Asetil-koa'nın sitoplazmaya transportu dışında sitrat döngüsü, başta aspartik asit olmak üzere çeşitli amino asitlerin oksaloasetattan ya da glutaminden eldesi için de kullanılmaktadır. Glutamin sitrat döngüsüne α -ketoglutarat üzerinden katılmaktadır.	10
Şekil 4. Tez çalışmasının akış şeması.	13
ŞEKİL 5. MCF-7 hücrelerinde CTP ve ACLY siRNA'nın ilgili proteinlerin ekspresyonu üzerine etkileri.....	37
ŞEKİL 6. MDA-MB-231 hücrelerinde CTP ve ACLY siRNA'nın ilgili proteinlerin ekspresyonu üzerine etkileri.	38

Şekil 7. MCF-10A hücrelerinde CTP ve ACLY siRNA'nın ilgili proteinlerin ekspresyonu üzerine etkileri.	38
Şekil 8. Kristal viyole canlılık sonuçları. A) MCF-7, B) MDA-MB-231 ve C) MCF-10A hücreleri için. 72 saatlik siRNA muamelesinin sonucunda elde edilen canlılık değerleri tabloda sütun olarak, ilişkili standart sapma değerleri ise hata çubuğu olarak sunulmuştur. Hesaplamalar yapılırken uygulama yapılmamış örneklerin (NT) canlılığı %100 kabul edilmiş ve diğer canlılık verileri ona göre hesaplanmıştır. İstatistiksel analiz yapılırken; CTP ve ACLY KONTROL ile CNASB ise DMSO ile t testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$ düzeyinde anlamlılığı ifade etmektedir.	39
Şekil 9. CTP inhibisyonunun sitoplazmik sitrat düzeyleri üzerine etkisi. Sütunlar mg protein başına düşen nmol sitratı, hata çubukları ise hesaplanan standart hatayı göstermektedir. İstatistiksel analiz yapılırken; CTP siRNA, KONTROL siRNA uygulaması ile CNASB uygulaması ise NT (hiçbir şey uygulanmamış hücreler) ile t testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$ düzeyinde anlamlılığı ifade etmektedir.	41
Şekil 10. MCF-7 hücrelerinde siRNA uygulamasının apoptoz üzerine etkileri. A NT-siRNA uygulanmamış hücreler. B Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. C CTP siRNA uygulanmış hücreler. D ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelerin dağılımını göstermektedir. Her bir kırmızı nokta bir hücreyi göstermektedir. X eksen FITC, Y eksen propidiyum iyodür'e ait florasan sinyali göstermektedir. Sol alt kısım (Q3) canlı hücreleri, sağ alt ve üst kısım (Q2+Q4) apoptotik hücreleri ve sol üst kısım (Q3) nekrotik hücreleri ifade etmektedir. Alt paneller hücre dağılımının sayısal verilerini içermektedir.	43
Şekil 11. MCF-7 hücrelerinde siRNA uygulamasının apoptoz üzerine etkilerinin akış sitometrik yöntemler ile belirlenmesinin tekrar verileri. A NT-siRNA uygulanmamış hücreler. B Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. C CTP siRNA uygulanmış hücreler. D ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelerin dağılımını göstermektedir. Her bir kırmızı nokta bir hücreyi göstermektedir. X eksen FITC, Y eksen propidiyum iyodür'e ait florasan sinyali göstermektedir. Sol alt kısım (Q3) canlı hücreleri, sağ alt ve üst kısım (Q2+Q4) apoptotik hücreleri ve sol üst kısım (Q3) nekrotik hücreleri ifade etmektedir. Alt paneller hücre dağılımının sayısal verilerini içermektedir.	44
Şekil 12. MDA-MB-231 hücrelerinde siRNA uygulamasının apoptoz üzerine etkileri. A NT-siRNA uygulanmamış hücreler. B Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. C CTP siRNA uygulanmış hücreler. D ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelerin dağılımını göstermektedir. Her bir kırmızı nokta bir hücreyi göstermektedir. X eksen FITC, Y eksen propidiyum iyodür'e ait florasan sinyali	xi

göstermektedir. Sol alt kısım (Q3) canlı hücreleri, sağ alt ve üst kısım (Q2+Q4) apoptotik hücreleri ve sol üst kısım (Q3) nekrotik hücreleri ifade etmektedir. Alt paneller hücre dağılımının sayısal verilerini içermektedir.45

Şekil 13. MDA-MB-231 hücrelerinde siRNA uygulamasının apoptoz üzerine etkilerinin akış sitometrik yöntemler ile belirlenmesinin tekrar verileri. **A** NT-siRNA uygulanmamış hücreler. **B** Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. **C** CTP siRNA uygulanmış hücreler. **D** ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelerin dağılımını göstermektedir. Her bir kırmızı nokta bir hücreyi göstermektedir. X eksen FITC, Y eksen propidiyum iyodür'e ait florasan sinyali göstermektedir. Sol alt kısım (Q3) canlı hücreleri, sağ alt ve üst kısım (Q2+Q4) apoptotik hücreleri ve sol üst kısım (Q3) nekrotik hücreleri ifade etmektedir. Alt paneller hücre dağılımının sayısal verilerini içermektedir.46

Şekil 14. MCF-10A hücrelerinde siRNA uygulamasının apoptoz üzerine etkileri. **A** NT-siRNA uygulanmamış hücreler. **B** Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. **C** CTP siRNA uygulanmış hücreler. **D** ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelerin dağılımını göstermektedir. Her bir kırmızı nokta bir hücreyi göstermektedir. X eksen FITC, Y eksen propidiyum iyodür'e ait florasan sinyali göstermektedir. Sol alt kısım (Q3) canlı hücreleri, sağ alt ve üst kısım (Q2+Q4) apoptotik hücreleri ve sol üst kısım (Q3) nekrotik hücreleri ifade etmektedir. Alt paneller hücre dağılımının sayısal verilerini içermektedir.47

Şekil 15. MCF-10A hücrelerinde siRNA uygulamasının apoptoz üzerine etkilerinin akış sitometrik yöntemler ile belirlenmesinin tekrar verileri. **A** NT-siRNA uygulanmamış hücreler. **B** Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. **C** CTP siRNA uygulanmış hücreler. **D** ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelerin dağılımını göstermektedir. Her bir kırmızı nokta bir hücreyi göstermektedir. X eksen FITC, Y eksen propidiyum iyodür'e ait florasan sinyali göstermektedir. Sol alt kısım (Q3) canlı hücreleri, sağ alt ve üst kısım (Q2+Q4) apoptotik hücreleri ve sol üst kısım (Q3) nekrotik hücreleri ifade etmektedir. Alt paneller hücre dağılımının sayısal verilerini içermektedir.48

Şekil 16. CTP ve ACLY inhibisyonunun MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerindeki apoptotik (A) ve nekrotik (B) etkileri. Sütunlar ortalama hücre sayısını, hata çubukları ise standart harayı göstermektedir. T testi ile CTP ya da ACLY uygulamasının kontrol siRNA uygulamasının etkileri ile karşılaştırılmasının istatistiksel analiz sonuçlarına göre anlamlılık (*) $p<0,05$ ve (**) $p<0,01$ olarak gösterilmiştir.50

Şekil 17. MCF-7 hücrelerinde siRNA uygulamasının hücre yaşam döngüsü üzerine etkileri. **A** NT-siRNA uygulanmamış hücreler. **B** Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. **C** CTP siRNA uygulanmış hücreler. **D** ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelere ait pikleri göstermektedir. X eksenini propidyum iyodüre ait ve DNA miktarını gösteren florasana sinyali göstermektedir. Y eksenini ise hücre sayısını belirtmektedir. Alt paneller piklerdeki hücre sayısını ifade etmektedir.52

Şekil 18. MCF-7 hücrelerinde siRNA uygulamasının hücre yaşam döngüsü üzerine etkilerinin akış sitometrik yöntemler ile belirlenmesinin tekrar verileri. **A** NT-siRNA uygulanmamış hücreler. **B** Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. **C** CTP siRNA uygulanmış hücreler. **D** ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelere ait pikleri göstermektedir. X eksenini propidyum iyodüre ait ve DNA miktarını gösteren florasana sinyali göstermektedir. Y eksenini ise hücre sayısını belirtmektedir. Alt paneller piklerdeki hücre sayısını ifade etmektedir.53

Şekil 19. MCF-7 hücrelerinde siRNA uygulamasının hücre yaşam döngüsü üzerindeki etkilerinin şematik gösterimi. Sütunlar ortalama yüzde hücre değerlerini ve hata çubukları standart hata değerlerini ifade etmektedir.54

Şekil 20. MDA-MB-231 hücrelerinde siRNA uygulamasının hücre yaşam döngüsü üzerine etkileri. **A** NT-siRNA uygulanmamış hücreler. **B** Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. **C** CTP siRNA uygulanmış hücreler. **D** ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelere ait pikleri göstermektedir. X eksenini propidyum iyodüre ait ve DNA miktarını gösteren florasana sinyali göstermektedir. Y eksenini ise hücre sayısını belirtmektedir. Alt paneller piklerdeki hücre sayısını ifade etmektedir.55

Şekil 21. MDA-MB-231 hücrelerinde siRNA uygulamasının hücre yaşam döngüsü üzerine etkilerinin akış sitometrik yöntemler belirlenmesinin tekrar verileri. **A** NT-siRNA uygulanmamış hücreler. **B** Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. **C** CTP siRNA uygulanmış hücreler. **D** ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelere ait pikleri göstermektedir. X eksenini propidyum iyodüre ait ve DNA miktarını gösteren florasana sinyali göstermektedir. Y eksenini ise hücre sayısını belirtmektedir. Alt paneller piklerdeki hücre sayısını ifade etmektedir.56

Şekil 22. MDA-MB-231 hücrelerinde siRNA uygulamasının hücre yaşam döngüsü üzerindeki etkilerinin şematik gösterimi. Sütunlar ortalama yüzde hücre değerlerini ve hata çubukları standart hata değerlerini ifade etmektedir.57

Şekil 23. MCF10A hücrelerinde siRNA uygulamasının hücre yaşam döngüsü üzerine etkileri. **A** NT-siRNA uygulanmamış hücreler. **B** Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. **C** CTP siRNA uygulanmış hücreler. **D** ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelere ait pikleri göstermektedir. X eksenini propidyum iyodüre ait ve DNA miktarını

gösteren florasın sinyali göstermektedir. Y eksenini ise hücre sayısını belirtmektedir. Alt paneller piklerdeki hücre sayısını ifade etmektedir.58

Şekil 24. MCF10A hücrelerinde siRNA uygulamasının hücre yaşam döngüsü üzerine etkilerinin akış sitometrik yöntemler ile belirlenmesinin tekrar verileri. A NT-siRNA uygulanmamış hücreler. B Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. C CTP siRNA uygulanmış hücreler. D ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelere ait pikleri göstermektedir. X eksenini propidyum iyodüre ait ve DNA miktarını gösteren florasın sinyali göstermektedir. Y eksenini ise hücre sayısını belirtmektedir. Alt paneller piklerdeki hücre sayısını ifade etmektedir.59

Şekil 25. MCF10A hücrelerinde siRNA uygulamasının hücre yaşam döngüsü üzerindeki etkilerinin şematik gösterimi. Sütunlar ortalama yüzde hücre değerlerini ve hata çubukları standart hata değerlerini ifade etmektedir.60

Şekil 26. İnhibisyonun otofaji üzerine etkilerinin akridin oranj boyaması ile gösterilmesi. A) Hiçbir uygulama yapılmamış hücreler, B) Kontrol siRNA, C) CTP siRNA, D) ACLY siRNA ile 72 saat muamele edilmiş hücreler, E) DMSO ve F) Kimyasal CTP inhibitörü ile muamele edilmiş hücreler. Asidik veziküllerin boyut ve dağılımında değişim belirlenememiştir.62

Şekil 27. CTP inhibisyonunun otofaji üzerine etkileri. **A-C)** MCF-7 hücreleri. **A)** NT (siRNA uygulaması yapılmamış) hücreleri, **B)** Kontrol siRNA (uygulanmış) hücreler, **C)** CTP (siRNA uygulanmış) hücreler. **D-F)** MDA-MB-231 hücreleri. **D)** NT E) Kontrol **F)** CTP. **G-I)** MCF10A hücreleri. **G)** NT **H)** Kontrol, **I)** CTP. Alt panellerde otofajik olduğu düşünülen (10^3 üzerinde turuncu florasın sinyal veren hücreler) hücrelerin yüzdesi verilmiştir.63

Şekil 28. CTP inhibisyonunun otofaji üzerine etkilerinin akış sitometrik yöntemler ile belirlenmesinin tekrar verileri. A-C) MCF-7 hücreleri. A) NT (siRNA uygulaması yapılmamış) hücreleri, B) Kontrol siRNA (uygulanmış) hücreler, C) CTP (siRNA uygulanmış) hücreler. D-F) MDA-MB-231 hücreleri. D) NT E) Kontrol F) CTP. G-I) MCF10A hücreleri. G) NT H) Kontrol, I) CTP. Alt panellerde otofajik olduğu düşünülen (10^3 üzerinde turuncu florasın sinyal veren hücreler) hücrelerin yüzdesi verilmiştir.64

Şekil 29. CTP inhibisyonunun otofaji üzerine etkileri. Sütunlar ortalama yüzde hücre değerlerini ve hata çubukları standart hata değerlerini ifade etmektedir.65

Şekil 30. Histon asetilasyon sonuçları. 72 saatlik siRNA muamelesinin sonucunda elde edilen histon asetilasyon yüzde değerleri tabloda sütun olarak, ilişkili standart hata değerleri ise hata çubuğu olarak sunulmuştur. T testi ile CNASB uygulamasının, DMSO uygulamasının etkileri ile karşılaştırılmasının istatistiksel analiz sonuçlarına göre anlamlılık (**) $p < 0,01$ ve (***) $p \leq 0,001$ olarak gösterilmiştir.66

Kısaltmalar Listesi

Kısaltma	Açıklaması
ACLY	ATP-sitrat liyaz (<i>ATP-Citrate Lyase</i>)
CTP	Sitrat transport proteini (<i>Citrate Transport Protein-SLC25A1</i>)
ATP	Adenozin trifosfat
TCA	Trikarboksilat (<i>tricarboxylic acid</i>) ya da sitrat döngüsü
ETZ	Elektron transport zinciri
GLUT	Glukoz transport protein 1
HK2	Heksokinaz 2
PGM	Fosfogliseromutaz
PFK	Fosfofruktokinaz
PKM2	Pirüvat kinaz M2
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
TKL1	Transketolaz 1
PD	Pirüvat dehidrogenaz
LDH	Laktat dehidrogenaz
MCT4	Monokarboksilat transporter
FADH2	Flavin adenin dinükleotid H2
ASCT2	Aminoasit transporter 2
GLS	Glutaminaz
SCO2	Sitokrom c oksidaz 2
IDH2	İzositrat dehidrogenaz 2
SDH	Süksinat dehidrogenaz
FH	Fumarat hidrataz
ACC	Asetil-KoA karboksilaz
FASN	Yağ asidi sentaz
CNASB	4-kloro-3-3-nitrofenil-amino-sülfonil benzoik asit –CTP inhibitörü
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i>
PI	Propidiyum İyodür

1. GİRİŞ

Kanser genetik, immünolojik ve biyokimyasal temelleri olan, çok yönlü ve kompleks bir hastalıktır. Bugüne kadar yapılan sayısız çalışma kanser hücrelerini seçici olarak ortadan kaldıracak sinyal yolağı hedefleri, özellikle de onkogen ve tümör baskılayıcı genler üzerine yoğunlaşmıştır. Buna karşın bu hücreler klonal evolüsyon sayesinde büyüme yollarının inhibisyonunu alternatif sinyal yollarının devreye girmesiyle etkisiz hale getirilmektedir. Metabolik yollar ise sinyal yollarının aksine son derece spesifik ve sınırlı sayıda hız kısıtlayıcı enzim tarafından kontrol edilmektedir. Kanser metabolizmasının 2008 yılında Kroemer tarafından kanserin “Aşıl Tendonu” olarak ifade edilmesi (1) ve 2011 yılında Hanahan ve Weinberg tarafından kanserin karakteristik özellikleri arasına dâhil edilmesi (2) ile kanser tedavisinde metabolizmanın hedeflenmesi fikri yaygınlaşmıştır. Bu konuda yapılan çalışmalarda kullanılan yaklaşımlar çeşitlilik göstermektedir. Mikroarray ya da metabolomik gibi yöntemlerle kanserin biyokimyasal profilinin normal profile karşılaştırılması ile uygun hedeflerin belirlenmesini amaçlayan veri güdümlü çalışmalar ile birlikte, var olan biyokimyasal bilginin kullanımını ile kanser hücrelerinin mutlak gereksinim duymasının beklendiği enzim ya da transport proteinlerinin teorik olarak belirlenip oluşturulan hipotezin laboratuvar koşullarında test edilmesi ile gerçekleştirilen çalışmalar giderek yaygınlık kazanmaktadır. Metabolik yollar arasından yağ asidi sentezi özellikle ilgi çekmektedir. Yaygın kanı kanser hücrelerinin bölünerek yeni hücreler oluştururken ihtiyaç duydukları yağ asitlerini *de-novo* sentez ile elde ettikleri yönündedir. Bu fikir özellikle yağ asidi sentaz enziminin onkogenik potansiyelinin ortaya çıkması (3, 4) ve yağ asidinde hız kısıtlayıcı basamak olan ATP-sitrat liyaz (ACLY) enziminin inhibisyonunun kanser hücrelerinin büyümesini engellediğinin gösterilmesiyle (5) önem kazanmıştır. ACLY inhibisyonunun belirlenmiş etkilerinden birisi de hücrelerdeki histon asetilasyon düzeyini azaltmasıdır (6). Bu etkinin temelinde, histon asetilaz enzimlerinin asetilasyon sırasında substrat olarak, ancak sitoplazmik sitrat varlığında ve ACLY aktivitesi sonucunda elde edilebilecek, sitoplazmik asetil-KoA birimlerini kullanmasıdır. Araştırmacılar kanserde aktif olan asetilasyon sürecinin zarar görmesinin ACLY inhibisyonunun etkileri açısından önemli olduğuna inanmaktadır. Yağ asidi sentez yollarının da dâhil olduğu pek çok metabolik yolak araştırmacılara kanser hücrelerinin selektif yok edilmesi için olası yeni hedefler sunmaktadır. Bu tez de bu hedeflerden birinin potansiyelinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Hücrelerde yağ asidi sentezinin temel substratı olan asetil-KoA; beta oksidasyon, keton cisimlerinin yıkımı ya da amino asit katabolizması gibi pek çok yolak aracılığıyla mitokondride elde edilmektedir. Mitokondriyal sitrat transport proteini (*Citrate Transport Protein-CTP*), asetil-KoA'nın sitoplazmaya sitrat formunda taşınmasından sorumlu olan proteindir. Bu tez kapsamında, kanser hücrelerinin membran üretebilmek amacıyla yağ asidi ve kolesterol sentezine gereksinim duydukları fikrinden yola çıkılarak SCL25A1 olarak da bilinen mitokondriyal sitrat transport proteininin kanser hücrelerindeki rolü incelenmiştir.

Hipotezimiz, mitokondriden sitoplazmaya sitrat taşınımından sorumlu olan bu enzimin inhibisyonunun kanser hücrelerinde başta sağ kalım olmak üzere çeşitli hücresel süreçleri etkileyecek olmasıdır. Bu proteinin aktivitesinin ortadan kalkmasının sitoplazmik sitrat düzeylerinde düşüşe neden olması beklenmektedir. Bu durumun beklenen sonuçları arasında hücresel canlılık azalması, hücre yaşam döngüsünde değişiklikler meydana gelmesi, apoptoz ya da otofaji gibi fizyolojik stres-yanıt süreçlerinin aktifleşmesi ve histon asetilasyonunun azalması yer almaktadır. Tez kapsamında hipotezimiz, en yaygın kanserler arasında yer alan meme kanserinin *in vitro* modellerinde, yukarı bahsedilen tüm fizyolojik süreçler incelenerek test edilmiştir. CTP'nin inhibisyonunun etkilerinin daha iyi değerlendirilebilmesi amacıyla hücrelerde ACLY inhibisyonu da gerçekleştirilmiş ve sonuçlar karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Tüm protein inhibisyonları ilgili proteinlere spesifik siRNA'lar kullanılarak, RNA interferans tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Sitrat transport proteininin aktivitesi ayrıca kimyasal inhibitör kullanılarak da inhibe edilmiştir. Bu tercihin temel nedeni küçük molekül inhibitörlerin terapötik ajan olarak kullanım potansiyellerinin siRNA'lara göre yüksek olmasıdır. Proteinlerin inhibisyonunun etkileri kanser hücreleri dışında normal immortalize meme epitel hücre kültüründe de gerçekleştirilmiştir. Böylece sonuçlar incelenirken etkilerin kanser seçiciliği de değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışması TÜBİTAK 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamında (Proje No: 111-S-439) ve Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından (Proje No: 12-TIP-051) desteklenmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen veriler *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* (DOI: 10.2174/1871520615666141216150659) dergisinde "Targeting Mitochondrial Citrate Transport in Breast Cancer Cell Lines" başlığı ile yayınlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Dünya genelinde tüm ölümlerin %13'ünden, gelişmiş ülkelerde ise %25'inden sorumlu olan kanser çağımızın en önemli sağlık problemlerinden birisidir (7). Normal hücrenin kanser hücresine dönüşüm süreci, neoplastik transformasyon, hücreye proliferatif avantaj sağlayan “sürücü” mutasyonların birikmesi aracılığıyla gerçekleşen bir süreçtir. Bu klonal evölüsyon sürecinde başta DNA tamir mekanizmaları, hücre yaşam döngüsünün kontrol mekanizmaları, hücre ölüm ve sağ kalım sinyali ile ilgili mekanizmalar olmak üzere pek çok hücreyel sinyal etkilidir (8, 9). Kanser gelişiminde gerçekleşen sayısız nokta mutasyonu, translokasyon, amplifikasyon ve delesyon bu sinyalleri kontrol etmektedir (10, 11). Kanser hücrelerinin mutasyon profilleri o kadar çeşitli ve farklıdır ki, histolojik olarak birbirinden ayıramayacak kadar benzer kanser dokularında dahi genotipik ve fenotipik farklılıklar gözlenmektedir (12). Detaylı biyoinformatik analizler, neoplastik transformasyonda yüzlerce proteinin ve onlarca sinyal yolağının etkili olduğunu göstermektedir (2). Tüm bu sonuçlar sinyal yolağı odaklı terapi stratejilerinin ne denli uygulanabilir ve pratik olduğunu sorgulatmaktadır. Bunun yanı sıra son yıllarda yapılan çalışmalar kanser hücrelerinin metabolizmasının, kanserin kökeninden, aktive olan onkogenlerden ve baskılanan tümör süpresörlerden bağımsız olarak, ortak özellikler gösterdiğini ortaya koymaktadır (1, 12). Bunun da ötesinde metabolik adaptasyonun neoplastik transformasyon için mutlak bir gereklilik olduğu görülmektedir (13). Bu veriler ışığında kanser metabolizmasının kanserin önemli bir karakteristik özelliği olduğu söylenebilir.

2.1. Warburg Etkisi

Kanser hücrelerinin normal hücrelerden metabolik farklılıkları ile ilgili ilk çalışmaların 20'lerde gerçekleştirilmesine rağmen bu metabolik yolların karsinogenez ve kanser patogenezi için önemi uzun süre anlaşılamamıştır. Bunun beklide en önemli nedeni 20'yy'ın ortalarından itibaren kanser araştırmalarında temel odak noktasının DNA temelli genetik araştırmalar olmasıdır. Bu araştırmalar; özellikle de onkogenlerin, tümör süpresörlerin ve kanserde aktive olan sinyal yollarının keşfedilmesiyle RNA ve protein düzeyinde devam etmiştir. Kanser metabolizmasının yeniden araştırmalarda odak noktası haline gelmesi ise 21'yy'ın ilk yıllarını bulmaktadır.

Warburg Etkisi: Kanser metabolizmasından bahsetmek için öncelikle Otto Warburg'dan ve Warburg etkisinden bahsetmek gerekmektedir. Alman biyokimyager Otto Warburg ilk olarak 1923 yılında gerçekleştirdiği çalışmalarla kanser dokusunda glukoz tüketiminin ve laktat üretiminin normal dokuya kıyasla çok yüksek olduğunu keşfetmiştir. Warburg ayrıca bu durumun ortamın kısmi O₂ basıncından bağımsız olarak gerçekleştiğini belirlemiştir (14). Warburg'un aerobik glikoliz olarak adlandırdığı bu durum günümüzde Warburg etkisi olarak bilinmektedir. Warburg etkisinin temelinde hücrenin glukozu metabolize ederken oksidatif fosforilasyon yerine laktat fermentasyonunu tercih etmesi yer almaktadır. Bu tercihin nedeni ise halen tartışma konusudur. Warburg, kanserin mitokondriyal defektler sonucunda ortaya çıkmış olan bir hastalık olduğunu düşünmekteydi (15). Warburg'a göre kanser hücreleri mitokondrileri etkin çalışmadığı için oksidatif fosforilasyonu kullanamamaktaydı ve O₂ varlığında dahi laktat fermentasyonunu tercih etmekteydi. Buna karşın daha güncel çalışmalar Warburg'un bu teorisini çökertmiştir. Öncelikle kanserde mitokondri defektinin yaygın olmadığı bilinmektedir (16). Kanser hücreleri oksidatif fosforilasyon yapabilmektedir (12, 17) (ama tercih etmemektedir) ve hatta bazı transformasyon süreçleri mitokondri aktivitesine ihtiyaç duymaktadır (18). Kanser hücrelerinin aerobik glikolizi neden tercih ettiğini açıklamaya yönelik güncel teorileri ise üç başlık altında toplamak mümkün olacaktır (12):

1. Verim teorisi
2. Adaptasyon teorisi
3. Biyosentez teorisi

Verim teorisine göre kanser hücrelerinin laktat fermentasyonunu tercih etmesinin temel nedeni yüksek ATP üretim kapasitesidir. Oksidatif fosforilasyon, metabolitlerin mitokondriye transferini de içeren uzun bir süreçtir. Pek çok enzimin aktivitesi aracılığıyla gerçekleştirilir ve mitokondride membranlar arası bölgeye proton pompalanması aracılığıyla ATP elde edilir. Buna karşın laktat fermentasyonu çok daha kısa bir süreçtir, tamamı sitoplazmada gerçekleşmektedir ve bu süreçte görev alan enzimlerin turn-over'ları yüksektir. Her ne kadar birim glukoz başına elde edilen ATP oksidatif fosforilasyonda daha yüksek olsa da, glukozun sınırsız olduğu durumlarda birim zamanda elde edilen ATP laktat fermentasyonunda daha yüksektir. Bu teori kanser hücrelerinin aşırı glukoz tüketimini bu duruma bağlamaktadır.

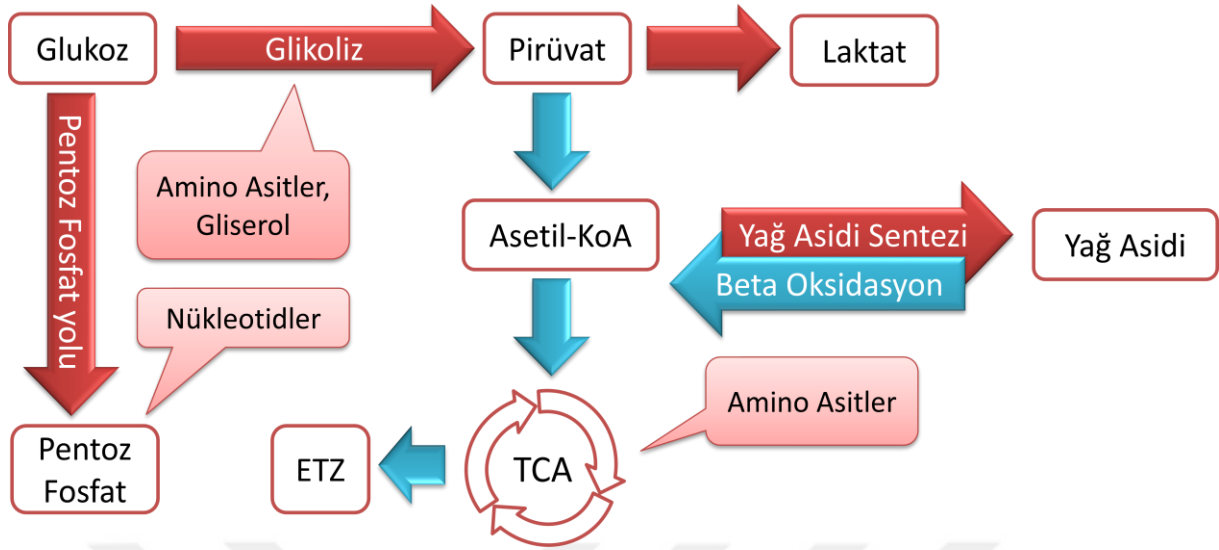
Karsinogenez sürecinde tümör büyüdükçe, tümörün çekirdeği yeterince O₂ alamaz ve hipoksik hale gelir. Tümör ile ilişkili hipoksi tümör büyüdükçe devam eder ve hücre içi

metabolik yolları etkiler. Adaptasyon teorisine göre kanser hücrelerinin metabolizması, karsinogenez sürecinde, hipoksik koşullara adapte olmaktadır. Bu adaptasyon, süreç devam ettikçe kalıcı hale gelmektedir ve belli bir noktadan sonra hücreler O₂ varlığında dahi oksidatif fosforilasyon yapamamaktadır.

Geçtiğimiz yıllarda ortaya atılan bir başka teori ise Warburg etkisine tamamen farklı bir noktadan bakmaktadır (12, 13). Buna göre kanser metabolizması anabolik bir metabolizmadır ve metabolik yollarındaki değişim ATP üretiminden çok biyosentez ile ilişkilidir. Kanser hücreleri yeni hücreler oluşturabilmek için enerji dışında karbohidrat, lipid, nükleik asit ve proteinler gibi makro moleküllere ihtiyaç duymaktadır. Glukoz makro moleküllerin sentezi için önemli bir karbon kaynağıdır. Biyosentez teorisine göre kanserde glikolitik süreç glikoliz ara metabolitlerinden bu makro moleküllerin sentezini mümkün kıldığı için aktiftir. Bu üç teorinin sadece birinin doğru olduğunu öne sürmek doğru olmayacaktır. Şüphesiz kanser hücrelerinin aerobik glikolizi tercih etmesinin birden fazla nedeni olabilir. Buna karşın son yıllarda yapılan çalışmalar kanser hücrelerinin aşırı tükettiği metabolitlerin biyosentez avantajı sağladığını ve çeşitli makro moleküllerin sentezinde kullanıldığını göstermektedir.

2.2. Kanser Hücrelerinde Metabolik Yollar

Ökaryotik hücrelerde temel metabolik süreçler; glikoliz, pentoz fosfat yolu, sitrat döngüsü ve elektron transport zinciri, beta oksidasyon ve yağ asidi sentezi olarak sınıflandırılabilir. Kanser hücrelerinde tüm bu süreçler normal hücrelerden farklı işlemektedir. Kanser metabolizması anabolik bir metabolizmadır ve hücrelerde protein, lipid ve nükleik asit sentez yolları aktiftken bu makro moleküllerin degradasyonunu gerçekleştiren yollar inaktiftir (19). Genel olarak kanser hücrelerinde glikoliz, pentoz fosfat yolu ve yağ asidi sentezi hızında artış görülürken sitrat döngüsü ve elektron transport zinciri ile beta oksidasyon hızlarında azalma görülmektedir (Şekil 1.).



Şekil 1. Kanser hücrelerinde metabolik yollar. Kırmızı oklar aktive olan, mavi oklar ise inhibe olan yolları temsil etmektedir. TCA: Trikarboksilik asit (sitrik asit ya da sitrat) çevrimi. ETZ: Elektron transport zinciri.

2.2.1. Glikoliz

Glikoliz hücrelerde glukoz monomerlerinden pirüvat ve ATP elde edilen bir süreçtir. Özellikle hipoksik koşullarda hücrenin temel enerji kaynağı, glikoliz sırasında gerçekleşen substrat düzeyinde fosforilasyon aracılığıyla elde edilen ATP'dir. Birim glukoz başına net 2 pirüvat ve 2 ATP elde edilir. Kanser hücrelerinin sağ kalımı için glukoz merkezi bir rol üstlenir. Glukoz kanser hücrelerinin hem temel enerji hem de karbon kaynağıdır (20). Kanser hücrelerinin glukoz metabolizmasındaki değişiklikler glukozun hücre içerisine alınmasıyla başlar. GLUT adı verilen ve kolaylaştırılmış difüzyon ile glukozun hücre içine alımını sağlayan proteinlerin ekspresyonu kanser hücrelerinde artmaktadır (21). Hücre içerisine alınan glukozun olası iki yıkım yolağı pentoz fosfat yolu ve glikolizdir. Her iki yolak için de glukozun öncelikle altıncı karbondan fosforile olması gerekmektedir. Bu reaksiyonu katalizleyen heksokinaz enziminin (HK2) ekspresyonu kanser hücrelerinde artmaktadır (22). Heksokinaz dışında glikolizin ara basamaklarında gerçekleşen reaksiyonları katalizleyen enzimlerden fosfoglisomerotaz (PGM) enziminin ekspresyonu (23) ve fosfofruktokinaz (PFK) enziminin aktivitesi (24, 25) kanser hücrelerinde artış göstermektedir. Kanser hücrelerinde glikoliz hızındaki bu artış, glikolizin son basamağına kadar devam eder. Glikolizin son

basamağında fosfoenolpirüvatın, pirüvata dönüşümünü katalizleyen pirüvat kinaz (PK) enzimi görev yapmaktadır. Kanser hücreleri PKM2 adı verilen pirüvat kinazın özel bir izoformunu eksprese etmektedir (26). Bu izoenzimin aktivitesi düşüktür (27). PKM2 glikoliz için bir fren sistemidir ve düşük aktivitesi glikoliz ara metabolitlerinin birikmesini mümkün kılar. Kanser hücresi bu ara metabolitlerden; serin, glisin ve sistein gibi aminoasitleri ve fosfolipid sentezinde görev alan gliserolü üretebilmektedir (27, 28). Bu biyosentez avantajı Warburg etkisinin temelini oluşturmaktadır. Glikoliz yolağında kanser sürecine özgü değişiklikler için ilgili şekilde gösterilmiştir (Şekil 2.).

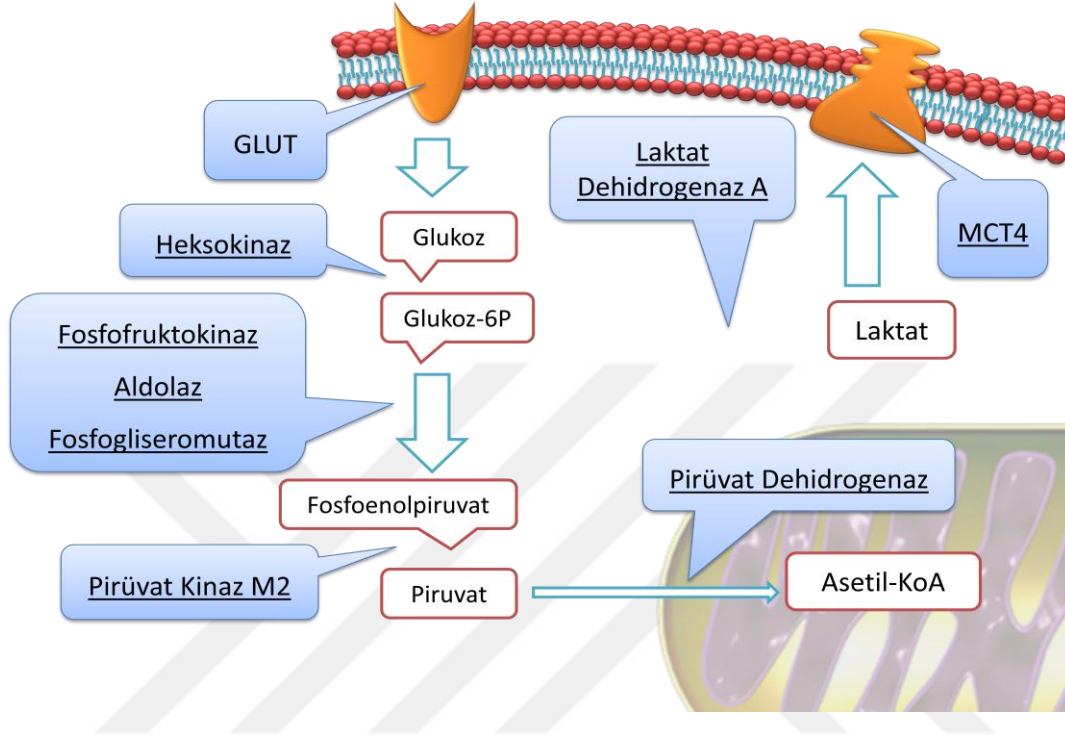
2.2.2. Pentoz Fosfat Yolu

Glukozun tüketildiği alternatif bir yol da, pentoz fosfat yoludur. Pentoz fosfat glukoz-6 fosfat moleküllerinden 5 karbonlu fosforile şekerlerin (pentoz fosfat) ve indirgenmiş NADPH koenzimlerinin elde edildiği metabolik bir yoldur. Kanser hücrelerinde pentoz fosfatın hızında artış görülmektedir (29). Bu artış hem glikolizde de görev alan HK2nin hem de sadece pentoz fosfat yolunda görev alan transketolaz (TKL1) proteininin ekspresyonunda artış ile görülmektedir (30, 31). Bu artışın iki temel nedeni vardır. Bunlardan ilki hücrenin hem yağ asidi sentezi gibi biyosentez süreçlerinde hem de kendisini oksidatif hasardan korumak için kullandığı anti oksidan sistemlerin rejenerasyonunda ihtiyaç duyduğu NADPH koenziminin üretilmesi, ikincisi ise DNA ve RNA'nın yapısındaki nükleotidlerin sentezi için gerekli olan pentoz fosfatların üretilmesidir (12).

2.2.3. Pirüvat'tan Asetil-KoA ve Laktat Eldesi

Glikoliz ile üretilen pirüvatın kullanılabileceği iki olası yoldan ilkinde pirüvat asetil-KoA'ya dönüştürülerek sitrat döngüsüne katılır, ikincisinde ise laktata dönüştürülerek hücreden uzaklaştırılır. Kanser hücrelerinde pirüvatın asetil-KoA'ya dönüşümünü katalizleyen pirüvat dehidrogenaz (PD) enziminin aktivitesi düşüktür (32). Bu enzimin aktivitesi post translasyonel olarak kontrol edilmektedir. Pirüvat dehidrogenaz kinaz (PDK) enzimi PD enzimini fosforilleyerek inhibe eder. Kanser hücrelerinde PDK ekspresyonu artmaktadır (33, 34). Böylece PD inhibe edilir ve pirüvatın asetil-KoA'ya dönüşümü baskılanır. Bunun yerine oluşan pirüvat sitoplazmada laktat dehidrogenaz (LDH) enziminin aktivitesiyle laktata çevrilir. Kanser hücrelerinde LDH aktivitesi artmaktadır (35, 36). Laktat, eğer hücre içerisinde birikirse toksik etki göstermektedir. Kanser hücreleri bunun üstesinden gelmek için laktat transport proteinlerinin (MCT4) ekspresyonunu arttırmaktadır (37).

Böylece laktat hücre içerisinde birikmeden ekstraselüler alana salınır. Laktat kanser hücreleri için önemli bir metabolittir. Gerçekleştirilen çalışmalarda laktatın ekstraselüler pH'ı düşürerek invazyonu artırıcı ve kanser hücrelerini bağışık sistemi hücrelerinden koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir (38, 39).

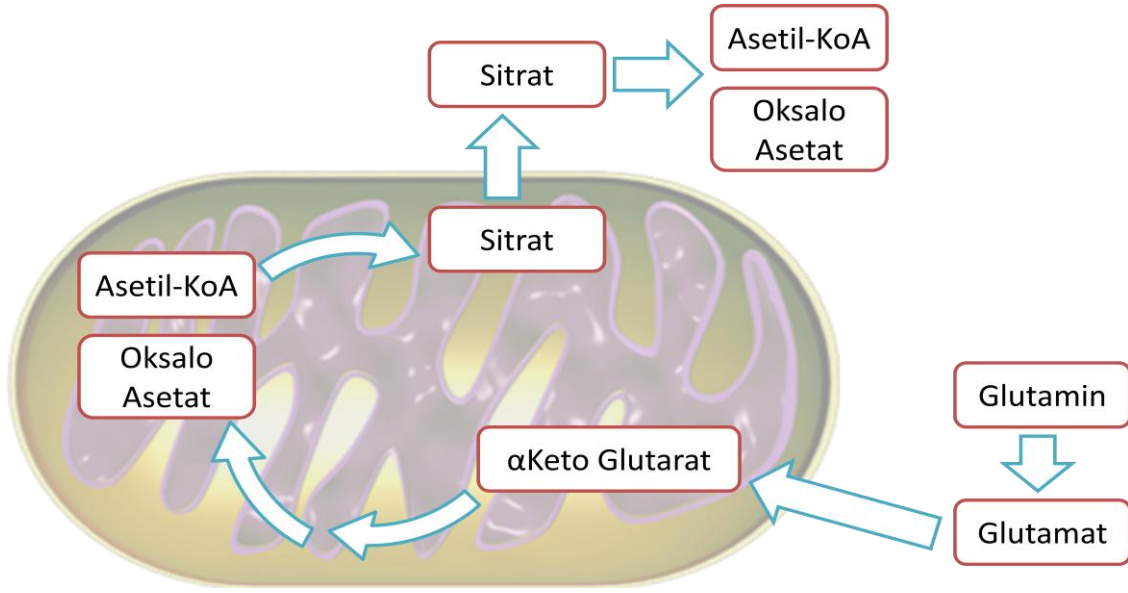


Şekil 2. Kanser hücrelerinde glukoz metabolizması. Kanser hücrelerinde, glukozun hücre içine alım hızı, GLUT adı verilen glukoz transport proteinlerinin ekspresyonu artırılarak yükseltilmektedir. Glukoz hücre içerisine alındıktan sonra kanserde ekspresyonu artan HK2 (heksokinaz) enzimiyle glukoz-6-fosfata dönüştürülür. Glikoliz reaksiyonlarındaki bu hızlanmanın aksine fosfoenolpirüvatın pirüvata dönüştüğü glikolizin son basamağında, pirüvat kinaz enziminin kanser hücrelerine özgü düşük aktiviteli M2 izoformunun ekspresyonu nedeniyle yavaşlama görülmektedir. Bu yavaşlama glikoliz ara metabolitlerinden amino asit ve gliserol gibi makro moleküllerin sentezlenmesini mümkün kılmaktadır. Kanser hücrelerinde pirüvat, asetil-KoA yerine laktata dönüştürülmektedir. Bekleneceği üzere (PDH) pirüvat dehidrogenaz kinaz enziminin aktivitesi düşük, (LDHA) laktat dehidrogenaz enziminin aktivitesi yüksektir. Oluşan yüksek miktarda laktatın hücre dışına atılabilmesi için gerekli olan (MCT4) laktat transport proteinlerinin de ekspresyonu kanserde artmaktadır.

2.2.4. Sitrat Döngüsü, Glutaminoliz ve Elektron Transport Zinciri

Tamamı mitokondride gerçekleşen sitrat döngüsü hücrel metabolizmada merkezi bir konumda yer almaktadır. Temel görevi glukozdan ya da yağ asitlerinden elde edilen asetil-KoA moleküllerinden enerji elde etmek olan sitrat döngüsü aynı zamanda hücrel amino asit havuzu ile anaplerotik reaksiyonlar aracılığıyla sürekli bir etkileşim halindedir. Sitrat döngüsü ardışık oksidatif dekarboksilasyon basamaklarıyla döngü başına iki karbon harcarken, iki NADH, bir FADH₂ ve bir ATP elde edilir. İndirgenmiş koenzimlerin elektron transport zincirine katılması da hesaba katıldığında, sitrat döngüsünden net olarak asetil-KoA molekülü başına 10 ATP elde edilir. Kanseri hücrelerinde ise sitrat döngüsü çok daha farklı bir amaçla kullanılmaktadır. Normal hücrelerdeki gibi kanseri hücrelerinde de sitrat döngüsü; asetil-KoA ve oksaloasetattan sitratın sentezlenmesiyle başlar. Normal hücrelerde oksidatif dekarboksilasyona uğrayan sitrat, kanseri hücrelerinde ise sentezlendikten hemen sonra mitokondriyi terk eder (Şekil 3.). Sitoplazmada sitrat, ATP-sitrat liyaz (ACL) aktivitesiyle yeniden asetil-KoA ve oksaloasetata parçalanır. Bu yolak hücrelerde sitoplazmik asetil-KoA elde edebilmenin en önemli yoludur (40). Pirüvatın asetil-KoA'ya dönüşümünü katalizleyen pirüvat dehidrogenaz enzimi mitokondriyal bir enzimdir ve asetil-KoA birimleri mitokondri membranından geçememektedir. Bu nedenle sitoplazmik asetil-KoA'nın elde edilebilmesi için mitokondriyal asetil-KoA'nın öncelikle sitrata dönüştürülmesi gerekmektedir. Sitoplazmik asetil-KoA hücre membranının temel bileşeni olan yağ asitleri ve kolesterolün sentezinde öncü moleküldür.

Kanseri hücrelerinde glukoz nasıl temel karbon kaynağı ise glutamin de temel azot kaynağıdır. Hem glutamin, hem de glutaminin glutaminaz katalizinde deaminasyonu sonucunda elde edilen glutamat, α -keto asitlerden amino asitlerinin sentezinde amino vericisi olarak görev yapabilmektedir. Kanserde hücre içine glutamin alımını sağlayan transport proteininin (ASCT2) (41) ve glutaminaz (GLS) (42) enziminin ekspresyonu artmaktadır. Glutamin her iki amino grubunu da verdikten sonra oluşan α -keto glutarat, sitrat döngüsünün ara basamakları sonucunda oksaloasetata dönüştürülebilmektedir. Oksaloasetattan aspartat, α -keto glutarattan ise glutamat geri dönüşümlü olarak üretilmektedir. Bu mekanizma hem hücrel amino asit havuzunun gereksinimlerini karşılamak hem de kanseri hücrelerinin sürekli ihtiyaç duyduğu bir diğer mako-molekül olan nükleik asit sentezi için önemlidir. DNA ve RNA'nın yapısına katılan nükleotidlerin temelini oluşturan pürin ve pirimidin moleküllerinin sentezi için aspartat ve glutamin amino asitlerine ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 3. Kanser hücrelerinde sitrat döngüsü ve lipid metabolizması. Kanser hücreleri sitrat döngüsünü enerji ihtiyaçlarını karşılanması yerine biyosentez avantajı elde etme amacıyla kullanmaktadır. Sitrata sentaz (CS) enziminin aktivitesiyle, asetil-KoA ve oksaloasetattan elde edilen sitrat, sitoplazmada ATP-sitrata liyaz (ACLY) enziminin aktivitesiyle tekrardan asetil-KoA ve oksaloasetata parçalanır. Bu şekilde sitoplazmaya taşınan asetil-koa, sitoplazmik enzimlerin (asetil-KoA karboksilaz-ACC, yağ asidi sentaz-FASN) yağ asidi sentezinde kullanılmaktadır. Kanser hücrelerinde β -oksidasyon baskılanmıştır. Sitoplazmik yağ asitlerini, okside olabilecekleri mitokondriye taşıyan karnitin palmitoil transferaz (CPT1A) aktivitesi kanser hücrelerinde düşüktür. Asetil-koa'nın sitoplazmaya transportu dışında sitrat döngüsü, başta aspartik asit olmak üzere çeşitli amino asitlerin oksaloasetattan ya da glutaminden eldesi için de kullanılmaktadır. Glutamin sitrat döngüsüne α ketoglutarat üzerinden katılmaktadır.

Kanser hücrelerinde sitrat döngüsünün temel amacı hücreye biyo-sentez avantajı sağlamaktır (13). Bu nedenle kanserde elektron transport zincirinin aktivitesinde düşüş gözlenmektedir. Bu düşüşün temelini sitokrom c oksidaz alt birimlerinden birisi olan SCO2 geninin ekspresyonunun azalması oluşturmaktadır (43). Bunun ötesinde, bazı kanserlerde, sitrat döngüsünün ara reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerden izositrat dehidrogenaz (IDH2) (44), süksinat dehidrogenaz (SDH) ve fumarat hidrataz (FH) (45) enzimlerinin mutant oldukları belirlenmiştir. Tüm bu veriler kanser hücrelerinin mitokondri metabolizmasını, kendi çıkarları doğrultusunda, biyo-sentez yönüne kaydırıldığını göstermektedir.

2.2.5. Yağ Asidi Metabolizması

Normal hücrelerde yağ asitleri hepatosit ve adipositlerde sentezlenmektedir. Diğer somatik hücrelerde lipid metabolizması daha çok katabolizma yönündedir. Yağ asitlerinin yıkımı, β -oksidasyon, normal hücreler için temel enerji kaynaklarından birisidir. Lipid metabolizmasının regülasyonunda kompartmanlama önemli bir yer tutar. Yağ asidi sentezi sitoplazmada gerçekleşirken, β -oksidasyon mitokondride gerçekleşir. Bu sayede β -oksidasyon sonucu yağ asitlerinden elde edilen mitokondriyal asetil-KoA sitrat döngüsüne katılarak hücreye enerji sağlarken, sitoplazmik asetil-KoA da yağ asidi sentezinde kullanılır. Kanseri hücreleri bölünerek yeni hücreler oluştururken, yeni hücrelerin membranlarının sentezlenebilmesi için sürekli olarak yağ asitlerine ihtiyaç duymaktadır. Yapılan çalışmalar kanserde, diğer metabolik yollarda olduğu gibi, lipid sentezinde de anabolik sistemin katabolik sisteme kıyasla daha aktif olduğunu göstermektedir (46). Kanseri sitrat döngüsünü sitoplazmik asetil-KoA üretmek için kullanmaktadır. Sitoplazmada sitrattan asetil-KoA üreten ACLY enziminin aktivitesinin kanseri hücrelerinde arttığı, hatta kanseri hücrelerinin sağ kalımının bu enzimin aktivitesine bağlı olduğu gösterilmiştir (5). Yağ asidi sentezinin diğer basamaklarını katalizleyen Asetil-KoA karboksilaz (ACC) (47, 48) ve yağ asidi sentaz (FASN) (4, 49) enzimlerinin de aktivitesi kanserde artmaktadır. Bazı araştırmacılar FASN enziminin aktivitesinin neoplastik transformasyon için mutlak gereklilik olduğunu ve bu nedenle bu proteinin potansiyel bir onkogen olduğunu savunmaktadır (3, 50).

Tüm bu veriler kanserde yağ asidi sentezinin ve sitoplazmik asetil-KoA düzeylerinin önemli olduğuna işaret etmektedir. Kanserde potansiyel öneme sahip proteinlerden birisi de SLC25A1 olarak da bilinen CTP proteinidir. CTP mitokondriyal sitratın sitoplazmaya taşınmasından sorumlu olan proteindir (51). Bu proteinin kanserdeki rolünü aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalar oldukça kısıtlı sayıdadır. 80'lerde yapılmış bir çalışma kanserde sitoplazmaya sitrat akışının arttığını ortaya koymuştur (52). Yakın zamanda yapılan iki çalışma da CTP'nin mitokondri homeostazı için gerekli olduğunu (51) ve p53 tarafından regüle edilen kanserde kötü prognozu işaret eden bir tümör belirteci olduğunu ortaya koymuştur (53). Bununla birlikte bu iki çalışma CTP'yi doğrudan hedefleyen yegane çalışmalardır ve proteinin kanseri ile ilişkili hücresel süreçlerdeki rolünün ayrıntılı bir şekilde araştırılması gerekmektedir.

2.3. Kanserde Epigenetik Regölasyon

Kansere özgü oluşum, gelişim, anjiyogenez, invazyon, metastaz ve direnç gibi tüm süreçlerde epigenetik mekanizmalar merkezi bir rol üstlenmektedir (54). Global histon asetilasyonu epigenetik regölasyonlar arasından öne çıkmaktadır. Bunun temel nedenleri histon asetilasyonunun, promotör metilasyonu ve promotör asetilasyonu gibi diğer epigenetik regölasyon mekanizmalarının aksine spesifik olmaması ve histon asetilasyonundaki artışın hücredeki genel protein sentezini arttırıcı etki göstermesidir (55). Diğer epigenetik regölasyonlar kanser hücreleri için avantaj ya da dezavantaj olabilecek farklı proteinlerin ekspresyonunu değiştirebileceği için, kanser için genellenecek bir değişimden bahsetmek mümkün değildir. Buna karşın asetilasyon kanser hücreleri için avantaj sağlayacak protein sentezinin artışına neden olduğundan, inhibisyonu kansere karşı bir tedavi stratejisi olarak kullanılabilir. Yapılan çalışmalar histon asetilasyonunun gerçekleşebilmesi için histon asetil transferaz enzimleri tarafından substrat olarak kullanılabilecek asetil-KoA birimlerine ihtiyaç olduğunu ve sitoplazmik asetil-KoA düzeyinin ACLY inhibisyonu ile azaltılmasının hem global histon asetilasyonunu hem de kanser hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini göstermektedir (6). Hücre içi asetil-KoA düzeyleri için belirleyici faktörlerden bir diğeri de sitoplazmaya ACLY enziminin substratı olan sitratı taşıyan CTP'nin aktivitesidir. CTP'nin histon asetilasyon düzeyleri üzerine etkisi bilinmemektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Akış Şeması

Tezde kullanılan hücre hatları (MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF10A) siRNA uygulamasının ardından western blot ile inhibisyonun gösterilmesi, sitoplazmadaki sitrat düzeyindeki değişimin belirlenmesi, akış sitometrik testlerle hücresel süreçlerdeki değişimlerin tespit edilmesi amacıyla toplanmıştır. Ayrıca hücrelerde doğrudan canlılık tayini ve histon asetilasyon testi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4). Deneylerin ayrıntıları ilgili başlıklar altında sunulmaktadır.



Şekil 4. Tez çalışmasının akış şeması.

3.2. Hücre Kültürü

Çalışma kapsamında sitrat transport proteininin inhibisyonu *in vitro* meme kanseri modellerinde (MCF-7 ve MDA-MB-231) gerçekleştirilmiştir. Ayrıca kontrol olarak immortalize meme epitel hücre hattı olan MCF10A kullanılmıştır. Hücrelerin idamesi ile ilgili tüm protokoller aşağıda sunulmaktadır.

3.2.1. Hücre Kültürü Gereçleri

Hücre Hatları

- MCF-7 : Meme adenokarsinom, adheran, ER(+) PR(+) Her2 (-)
- MDA-MB-231 : Meme adenokarsinom, adheran, ER (-) PR (-) Her2 (-)
- MCF-10A : İmmortalize meme epitel hücre hattı

Ortam

- DMEM (Lonza)
- RPMI (Lonza)
- FBS-fetal bovine serum (Lonza)
- TrypsinEDTA (Lonza)
- P/S-Penisilin/Streptomisin (Lonza)
- EGF-Epithelial Growth Factor (Cell Signaling)
- İnsulin (insan) (Sigma)

3.2.2. Hücre Kültüründe Kullanılan Cihazlar

- Laminar Flow Kabin (Thermo MSC.12 ve Thermo MSC.Advantage)
- İnkübatör (Thermo Forma Series II ve Thermo Steri-Cycle)
- Mikroskop (Olympus IX71)
- Isıtıcı (Stuart Orbital İnkübatör)
- Santrifüj (Eppendorf 5810R)

3.2.3. Hücre Kültürü Yöntemleri

3.2.3.1. Hücre Büyüme Ortamının Hazırlanması:

MCF-7 ve MDA-MB-231 için: %10 FBS, %1 P/S, RPMI içerisinde hazırlandı.

MCF10A için: %10 FBS, %1 P/S, DMEM içerisinde hazırlandı.

Son konsantrasyon 20 ng/ml olacak şekilde EGF (50 µg/ml stoktan) ilave edildi.

Son konsantrasyon 0,5 µg/ml olacak şekilde hidrokortizon (1 mg/ml stoktan) ilave edildi.

Son konsantrasyon 10 µg/ml olacak şekilde insülin (10 mg/ml stoktan) ilave edildi.

3.2.3.2. Hücre Dondurma(Saklama) Ortamının Hazırlanması: Taze hazırlanmış, ısıtılmadan kullanılmıştır.

% 45 FBS, % 45 Büyüme Ortamı, % 10 DMSO ile hazırlandı.

3.2.3.3. Hücrelerin Rutin Kontrolü:

Hücreler 25 ve 75 cm²lik flasklarda büyüme ortamı içerisinde büyütüldü. İnkübatörde 37 °C, % 5 kısmi CO₂ basıncı ve nemli ortam sağlandı. Nemlendirme için % 0,1'lik Bakır (II) Sülfat.5 hidrat çözeltisi kullanıldı. Hücreler hem çıplak gözle hem de mikroskopla günlük kontrol edildi, flasklardaki ortam rengindeki sarıya dönük değişim belirlendiğinde hücrelerin ortamı değiştirildi. Yoğunluğu %80'in üzerinde olan hücreler dondurularak saklanma veya denemelerde kullanılmak amacıyla pasajlandı.

Hücre Ortamının Değiştirilmesi:

Taze ortamdan 25 cm² flask için 3-5 mL, 75 cm² flask için 7-15 mL flaska ilave edildi.

Hücrelerin Toplanması:

Flaskın içindeki ortam uzaklaştırıldı. (Western blot, mitokondri izolasyonu ya da akış sitometri denemelerinde kullanılacak hücreler için ortam atılmayıp toplanmıştır).

Flaskın yüzeyi önceden ısıtılmış serumsuz ortam ya da PBS ile yıkandı (25 cm² flask için 2-3 mL, 75 cm² flask için 5-6 mL) ve yıkama çözeltisi uzaklaştırıldı. (Western blot, mitokondri izolasyonu ya da akış sitometri denemelerinde kullanılacak hücreler için PBS atılmayıp toplanmıştır).

Flaska önceden 37 °C’de ısıtılmış tripsin ilave edildi (25 cm² flask için 2-3 mL, 75 cm² flask için 4-6 mL). Tripsin ilave edilmiş flasklar inkübatörde 5 dakika bekletildi. Hücreler kalktığında tripsin, steril tüpe aktarıldı. Süspansiyonun üzerine tripsinle eşit miktarda büyüme ortamı ilave edilerek tripsin inhibe edildi. Hücreler tüpe aktarılarak 1200 RPM’de 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra, pellet istenen miktarda taze büyüme ortamı ile süspanse edilerek pasajlandı. Dondurulacak hücre örnekleri dondurma ortamıyla süspanse edildi. Pasajlama veya saklama amacı dışında ilgili denemelerde kullanılacak hücreler için lizis (Western blot/mitokondri-sitoplazma izolasyonu) ya da boyama (akış sitometri) gerçekleştirildi.

3.2.3.4. *Pasajlama:*

Toplanıp süspanse edilen hücreler, eğer siRNA uygulanacaksa sayılarak, sadece pasajlanacaksa sayılmadan belirlenen oranlarda seyreltilerek flasklara ekildi. Ekim sonrasında flaskların içindeki ortam miktarı, taze büyüme ortamıyla tamamlandı (siRNA denemesi yapılacaksa 25 cm² flaskda 3 mL, sadece pasajlanacaksa 75 cm² flask için 7-15 mL)

3.2.3.5. *Hücre Sayımı:*

Toplanıp süspanse edilen hücrelerden ≈10⁶’ar µL Neubauer laminin her iki tarafına yüklendi. Lamin üst ve alt taraflarındaki (her biri 16 küçük kareden oluşan) 4 kare (toplam 8 kare) sayıldı. Sayım değerlerinin ortalaması alındı. Mililitre başına düşen hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Mililitredeki hücre sayısı} = \text{Ortalama değer} \times \text{seyreltme faktörü} \times 10^4$$

**Tripan mavisinin oranı 1:1 olduğundan bu değer 2’dir.*

Sayılan hücreler denemelerde kullanılma amacıyla 96 kuyucuklu plaklara (10x10³ hücre/kuyucuk) ya da 25 cm² flasklara (200x10³ hücre/flask) ekildi. 96 kuyucuklu flasklarda toplam hacim 100 µL, 25 cm² flasklarda toplam hacim 3 mL’dir.

3.2.3.6. *Hücrelerin Dondurulması:*

Toplanan hücreler dondurma ortamı ile süspanse edildi. Süspansiyon cryo tüplere 1’er mL dağıtıldı. Tüpler -20 °C’de 1-2 saat bekletildikten sonra -80 °C’ye kaldırıldı.

3.2.3.7. Hücrelerin Çözülmesi:

-80 °C'den alınan cryo tüpteki örnek hızlı bir şekilde çözülmeaktadır.

Çözölmüş süspansiyon (1 mL) tüpe aktarıldı ve üzerine taze ve 37 °C'de ısıtılmış büyüme ortamından 4-5 mL ilave edildi. Örnek tüpü 1200 RPM'de 5 dk santrifüj edildi. Elde edilen pellet 5 mL büyüme ortamında süspansiyon edilerek 25 cm²'lik flaska ekildi.

3.3. İnhibisyon Çalışmaları

Hücrelerde hedef proteinlerin (ACLY ve CTP) inhibisyonu RNA interferans tekniğı ile ya da kimyasal CTP inhibitörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İnterferans tekniğinde mRNA spesifik siRNA'lar hücrelere uygun transfeksiyon ajanı ile aktarılmaktadır. Tipik bir transfeksiyonun etkileri RNA düzeyinde 24 saatte, protein düzeyinde ise 48-72 saatte belirlenebilmektedir. Çalışmamızda hücreler canlılık tayini için 96 kuyucuklu plaklarda, tüm diğer denemeler için 25 cm² flasklarda siRNA ile muamele edilmiştir.

3.3.1. İnhibisyon Çalışmaları Gereçleri

- ATP sitrat liyaz siRNA (Dharmacon/pool), (liyofilize 20 nmol stok)
- SLC25A1 (CTP) siRNA (Dharmacon/pool), (liyofilize 20 nmol stok)
- Kontrol siRNA (Dharmacon/pool), (liyofilize 20 nmol stok)
- Transfeksiyon Ajanı (Dharmafect1 ve Dharmafect4) (Dharmacon)
- DMEM ve RPMI bazal ortam (Lonza)
- Kimyasal CTP inhibitörü, 4-kloro-3-nitrofenil-amino-sülfonil benzoik asit (CNASB) (DMSO içerisinde çözöldü) (ChemBridge)

3.3.2. İnhibisyon Çalışmalarında Kullanılan Cihazlar

- Laminar Flow Kabin (Thermo MSC.12 ve Thermo MSC.Advantage)
- İnkübatör (Thermo Forma Series II ve Thermo Steri-Cycle)

3.3.3. İnhibisyon Çalışmaları Yöntemleri

3.3.3.1. siRNA Çözeltisinin Hazırlanması:

Liyofilize halde bulunan siRNAlar, steril, RNAz-DNAz içermeyen, ultra-saf su içerisinde çözöndü. 20 nmol siRNA 1 mL su içerisinde çözöldüğünden elde edilen çözeltinin konsantrasyonu 20 µM'dır.

3.3.3.2. *Serumsuz Ortamın Hazırlanması:*

DMEM ya da RPMI bazal ortam içerisine % 1 oranında antibiyotik (penisilin/streptomisin) ilave edilerek hazırlandı.

3.3.3.3. *Hücrelerin Hazırlanması:*

Hücreler, hücre kültürü protokolünde belirtildiği gibi 200×10^3 hücre/flask (2,8 mL) olacak şekilde 25 cm^2 flasklara veya 10×10^3 hücre/kuyucuk (100 μL) olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekildi.

3.3.3.4. *Transfeksiyon Karışımının Hazırlanması:*

25 cm^2 flask;

Hücelere verilecek siRNA transfeksiyon karışımı (toplam 200 μL) her biri 100er μL 'lik iki bileşenden oluşmaktadır. İlk bileşen serumsuz ortam içerisindeki siRNA çözeltisi ve ikincisi de serumsuz ortam içerisindeki transfeksiyon ajanıdır.

siRNA çözeltisi hazırlanırken, örnekler 3 mL'lik ortama aktarıldığında istenen siRNA konsantrasyonları olan 50 nM (MDA-MB-231 ve MCF10A için) ve 100 nM'a (MCF-7 için) ulaşacak şekilde hazırlandı (25 cm^2 flask için). Bu durumda her bir örnek için stoktan 7 μL (50 nM) ya da 15 μL (100 nM) alınarak serumsuz ortam ile 100 μL 'ye tamamlandı. Homojen dağılımın sağlanması için 5 dakika beklendi.

Transfeksiyon çözeltisi için ise Dharmacon'un önerileri doğrultusunda: MCF-7 ve MCF10A hücre hatlarında dharmafect 1, MDA-MB-231 hücre hattında ise dharmafect 4 ajanı tercih edildi. Transfeksiyon ajanının konsantrasyonu 10×10^3 hücre başına 0,2 μL 'dir. Bu durumda çalışma 25 cm^2 flasklarda 200×10^3 hücre ile gerçekleştirildiğinden transfeksiyon ajanından 4 μL alınarak serumsuz ortam ile 100 μL 'ye tamamlandı. Homojen dağılımın sağlanması için 5 dakika beklendi.

siRNA transfeksiyon karışımının iki bileşeni (siRNA çözeltisi ve transfeksiyon çözeltisi) karıştırılarak son karışım (200 μL) elde edildi. Lipozomların oluşması ve siRNA enkapsülasyonu için 30 dakika oda sıcaklığında beklendi.

96 kuyucuklu plak:

Hücrelerin üzerindeki ortam (100 μ L) atılıp yerine siRNA içeren ortam koyuldu. Bu nedenle siRNA transfeksiyon karışımını içeren 1 mL'lik ortam hazırlandı ve tekrar kuyucuklarına aktarıldı.

1 mL'lik ortamda 100 nM olacak şekilde (5 μ L siRNA) 20 μ L siRNA çözeltisi hazırlandı. Homojen dağılımın sağlanması için 5 dakika beklendi.

1 mL'lik ortam 10 kuyucuk için gerekli ortamı içermektedir (10x100 μ L). Kuyucuk başına ekilen hücre sayısı 10×10^3 olduğundan, kuyucuk başına 0,2 μ L transfeksiyon ajanına ihtiyaç duyulmaktadır. Toplam 10 kuyucukluk 1 mL'lik ortam için ise ihtiyaç duyulan transfeksiyon ajanı 2 μ L'dir. 2 μ L transfeksiyon ajanı serumsuz ortam ile 20 μ L'ye tamamlandıktan sonra homojen dağılımın sağlanması için 5 dakika beklendi.

siRNA transfeksiyon karışımının iki bileşeni (siRNA çözeltisi ve transfeksiyon çözeltisi) karıştırılarak son karışım (40 μ L) elde edildi. Lipozomların oluşması ve siRNA enkapsülasyonu için 30 dakika oda sıcaklığında beklendi. Beklemenin ardından transfeksiyona geçildi.

3.3.3.5. Transfeksiyon

25 cm² flask:

Hücrelerin ekiminden sonra yapışmaları için gece boyu beklendi. Beklemenin ardından 200 μ L siRNA transfeksiyon karışımı flaska aktarıldı. Kontrol flaskına siRNA transfeksiyon karışımı yerine 200 μ L serumsuz ortam ilave edildi.

96 kuyucuklu plak:

Hücrelerin ekiminden sonra yapışmaları için gece boyu beklendi. Beklemenin ardından kuyucuklardaki ortam alındı ve yerine 100'er μ L siRNA transfeksiyon karışımı eklendi. Her örnek en az altı tekrarlı çalışıldı.

3.3.3.6. *Kimyasal İnhibitörün Hazırlanması ve Hücrelere Uygulanması*

Chembridge firmasına sentezlettirilen 4-kloro-3-nitrofenil-amino-sülfonil benzoik asit, CTP'nin kimyasal, yarışmalı bir inhibitörüdür (56). Çalışmalarımızda kullanılmak üzere 100 mM derişimde DMSO içerisinde hazırlanmış ve hücrelere 1 mM düzeyinde (1:1000 DMSO) uygulanmıştır. Uygulamalarda kontrol olarak taşıyıcı (% 0,1 DMSO) ile muamele edilmiş hücreler kullanılmıştır.

3.4. **Kristal Viyole İle Canlılık Tayini**

Sitrat transport proteini (CTP) ve ATP-sitrat-liyaz (ACLY) proteinlerinin susturulması için gerçekleştirilen siRNA uygulamasının ardından inhibisyonun hücresel etkilerinin araştırılması için MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerinde kristal viyole yöntemiyle canlılık tayini gerçekleştirilmiştir. MTT temelli klasik canlılık tayini yöntemleri yerine bu yöntemin tercih edilmesinin temel nedeni; MTT temelli yöntemlerde canlılık ölçüm prensibinin, süksinat dehidrogenaz aktivitesi aracılığıyla mitokondriyal aktivitenin ölçülmesine dayanmasıdır (57). Tez kapsamında inhibe edilen her iki proteinin de mitokondri metabolizmasıyla doğrudan ilişkili olduğu düşünülerek MTT temelli yöntemlerin canlılık tayini için kullanılması tercih edilmemiştir.

Kristal viyole hücre zarından geçerek DNA'ya bağlanan ve 570 nm'de kuvvetli absorbans veren bir boyadır. Tez kapsamında, hedeflenen proteinlerin inhibisyonunun hücre canlılığına etkileri 96-kuyucuklu plaklarda gerçekleştirilen kolorimetrik kristal viyole canlılık tayini ile belirlenmiştir (58).

3.4.1. **Canlılık Tayini Gereçleri**

- Kristal Viyole Solusyonu (% 0,2 Sigma)
- % 1 SDS Çözeltisi (Bio-Rad)
- PBS (Lonza)

3.4.2. **Canlılık Tayininde Kullanılan Cihazlar**

- Spektrofotometre (Thermo Multiskan-ex)

3.4.3. Canlılık Tayini Yöntemi

Hücreler kuyucuk başına 10×10^3 hücre düşecek şekilde ekildikten ve gece boyu beklendikten sonra siRNA transfeksiyonu gerçekleştirildi. Transfeksiyon için hücreler 72 saat siRNA ile inkübe edildikten sonra kristal viyole canlılık tayinine geçildi. Bu amaçla kuyucuklar PBS ile yıkandıktan sonra kuyucuk başına 50 μ L % 0,2'lik kristal viyole solusyonu (% 2 etanol içerisinde) ilave edildi. Oda sıcaklığında gerçekleştirilen 10 dakikalık inkübasyon ile boyanan hücrelerdeki bağlanmamış boya saf su ile gerçekleştirilen ardışık yıkamalar ile uzaklaştırıldı. Yıkamaların ardından boyanın çözünür hale getirilebilmesi için kuyucuk başına 100 μ L % 1'lik SDS çözeltisi ilave edildi ve 570 nm'de gerçekleştirilen spektrofotometrik okuma ile absorbans değerleri belirlendi.

SiRNA uygulanmayan hücreler NT (*Non-Treated*), bilinen hiçbir mRNA'ya bağlanmayan kontrol siRNA uygulanmış örnekler Kontrol, CTP-siRNA uygulanmış örnekler CTP ve ACLY uygulanmış örnekler ACLY, DMSO (CNASB taşıyıcısı) uygulanmış örnekler DMSO ve son olarak kimyasal CTP inhibitörü uygulanmış örnekler CNASB olarak işaretlendi. NT hücrelerinin ortalama absorbans değeri % 100 canlılık değeri olarak kabul edilerek diğer örneklerdeki canlılık değerleri ilgili ortalama absorbans değerlerinden hesaplandı. Sonuçlar grafiğe geçirilirken ortalama veriler ve bu verilerden hesaplanan standart hata değerlerinden yararlanıldı.

3.5. Western Blot ile Protein İnhibisyonunun Gösterilmesi

Sitrat transport proteini (CTP) ve ATP-sitrat-liyaz (ACLY) proteinlerinin susturulması için gerçekleştirilen siRNA uygulamasının ardından protein düzeyindeki inhibisyonun gösterilebilmesi amacıyla hücrelerde western blot yöntemi kullanıldı. Western blot için hücreler toplandıktan sonra lizis (hücre membranının parçalanarak protein içeriğinin ortaya çıkartılması), protein tayini (jel elektroforezinde eşit miktarda protein yüklenmesi amacıyla protein konsantrasyonlarının belirlenmesi), SDS-PAGE (yüklenen proteinlerin poliakrilamid jelde molekül ağırlıklarına göre ayrılması), blot (jeldeki proteinlerin ıslak blotlama yöntemiyle PVDF membrana aktarılması) ve görüntüleme (spesifik antikorlar kullanılarak ECL temelli sistemde karanlık odada protein bantlarının filme aktarılması) aşamaları gerçekleştirildi.

3.5.1. Western Blot Gereçleri

Lizis

- Tris Baz (Sigma)
- NP40 (Sigma)
- SDS (Bio-Rad)
- Proteaz İnhibitör Kokteyli (Thermo)
- EDTA (Thermo)

Protein Tayini

- BCA Protein Assay Reagent (Bicinchoninic acid) (Thermo)
- Protein Standartları (BSA/Sigma)

Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması

- Tris Baz (Sigma)
- Tris HCL (Sigma)
- Akrlamid/Bis Akrlamid (Bio-Rad)
- TEMED (Bio-Rad)
- Amonyum Persülfat (Bio-Rad)
- İzopropanol (Sigma)
- *SDS-PAGE*
- Tris Baz (Sigma)
- Brom Fenol Mavisi (Bio-Rad)
- Glisin (Sigma)
- Laemmli Tamponu (Bio-Rad)
- Color Plus Prestained Protein Marker (NEB)
- SDS (Bio-Rad)
- β -merkapttoetanol (Sigma)
- Gliserol (AppliChem)

Western Blot

- Tris Baz (Sigma)
- Glisin (Sigma)
- Yağsız süt tozu (Bio-Rad Blotting-Grade Blocker)
- Metanol (MERK)
- Sodyum Klorür (NaCl) (Sigma)
- TWEEN-20 (Applichem A4974)
- Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo)
- Signal Fire ECL (Cell Signaling)
- CTP (SLC25A1) Primer Antikor (Rabbit/Santa Cruz)
- ACLY Primer Antikor (Rabbit/Cell Signaling)
- Beta-Aktin Primer Antikor (Mouse/Sigma)
- Rabbit Sekonder Antikor (Cell Signaling)
- Mouse Sekonder Antikor (Cell Signaling)

3.5.2. Western Blot İçin Kullanılan Cihazlar

Lizis

- pH metre (Sartorius PT-10)
- Karıştırıcı (Eppendorf Thermomixer)
- Santrifüj (Eppendorf 5810R)

Protein Tayini

- Orbital shaker (Stuart)
- Spektrofotometre (Thermo Multiskan-ex)
- *Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması*
- Isıtıcı (Stuart Orbital İnkübatör)
- pH metre (Sartorius PT-10)

SDS-PAGE

- PAGE Sistemi (Bio-Rad PowerPac Basic)

- Karıştırıcı (Eppendorf Thermomixer)
- pH metre (Sartorius PT-10)
- *Western Blot*
- pH metre (Sartorius PT-10)
- Güç kaynağı (Bio-Rad Power Pac Basic)
- Orbital Karıştırıcı (Stuart)
- Karıştırıcı (Eppendorf Thermomixer)
- Islak Blot Sistemi (Bio-Rad)

3.5.3. Western Blot Yöntemi

3.5.3.1. *Lizis*

RIPA Homojenizasyon Tamponunun Hazırlanması: 0,607 g Tris (50 mM) ve 0,877 g NaCl (150 mM) 80 ml saf suda çözüldü. Çözeltinin pH'ı 7,4'e ayarlandı. Çözeltiye 1 mL %10'luk SDS (%0,1) ve 1 mL NP40 (%1) ilave edildi. Tampon saf su ile 100 mL'ye tamamlandı ve 10 mL tüplere dağıtıldı.

siRNA uygulanan hücreler toplandıktan sonra her bir 25 cm² flask için 50 µL RIPA homojenizasyon tamponunda re-süspanse edildi. Tüpler karıştırıcıda, +4 °C'de 1400 RPM'de 20 dakika karıştırıldı ve 14000 RPM'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Lizatı içeren süpernatanda protein tayinine geçildi.

3.5.3.2. *Protein Tayini*

Protein Standartlarının Hazırlanması: 6 eppendorf tüpüne 1 µg/ µl konsantrasyonundaki protein stokundan konsantrasyonlar 0 µg/ µl -0,2 µg/ µl -0,4 µg/ µl -0,6 µg/ µl -0,8 µg/ µl -1 µg/ µl olacak şekilde protein standartları hazırlandı.

BCA Solüsyonunun Hazırlanması: BCA Protein Assay Reagent da bulunan bisinkoninik asitten %96, bakır-II sülfat solüsyonundan %4 olmak üzere falkon tüpünde BCA solüsyonu hazırlandı.

Protein Tayini: Analiz için 96 kuyucuklu plaklar kullanıldı. Hazırlanan protein standartları seyreltikten derişige doğru ve her biri 4 tekrarlı olacak şekilde kuyucuklara 25 µl eklendi. Örnekler 1:10 oranda her kuyucukta toplam hacim 25 µl olacak şekilde seyreltilip eklendi.

Hazırlanan BCA solüsyonundan her kuyucuğa 200 µl eklendi. Orbital shakerda 37 °C’de 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon işlemi tamamlandıktan sonra spektrofotometrede 562 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Okuma sonuçlarından yola çıkılarak standart grafiği çizildi ve örneklerdeki protein konsantrasyonları bu grafiğin eğiminden hesaplandı.

3.5.3.3. *Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması*

Jel Tamponlarının Hazırlanması:

Stacking Buffer (Üst Jel Tamponu) : 78,8 g Tris-HCl 900 mL saf suda çözöldü. Çözeltinin pH’ı 6,8’e ayarlanır ve saf su ile 1L’ye tamamlandı (0,5M).

Resolving Buffer (Alt Jel Tamponu) : 181,65g Tris-Baz 900 mL saf suda çözöldü. Çözeltinin pH’ı 8,8’e ayarlandı ve saf su ile 1L’ye tamamlandı (1,5M).

APS çözeltisi : 0,5 g amonyum persölfat 10 mL saf su içerisinde çözöldü (% 5).

Jellerin Hazırlanması:

Jel çözeltileri aşğıdaki tablolara göre (Tablo 1 ve 2) her denemeden önce (taze) hazırlandı. Önce alt-jel (resolving) ardından da üst jel (stacking) dököldü. Resolving Jel çözeltisi istenen yüzdede (10 ya da 12) hazırlandı ve jel başına 3,5 mL dököldü. Sıvının üzerine hava ile temasını kesecek miktarda izopropanol ilave edildi. Jelin oluşması için beklendi. Jel oluşuktan sonra izopropanol uzaklaştırıldı ve stacking jel çözeltisi (üst jel) hazırlandı ve sisteme dököldü. Taraklar yerleştirildi ve üst jelin oluşması için beklendi. Jeller oluşuktan sonra SDS-PAGE elektroforezine geçildi.

Tablo 1. Üst jelin hazırlanması

% Akrilamid	Üst Jel (Resolving)				
		1 jel	2 jel	3 jel	4 jel
% 10	H ₂ O, ml	2,05	4,1	6,15	8,2
	Tampon, ml	1,3	2,6	3,9	5,2
	% 30 Akrilamid, ml	1,65	3,3	4,95	6,6
	% 10 SDS, µl	50	100	150	200
	% 10 APS, µl	25	50	75	100
	TEMED, µl	7,5	15	22,5	30
% 12	H ₂ O, ml	1,72	3,44	5,16	6,88
	Buffer, ml	1,3	2,6	3,9	5,2
	% 30 Akrilamid, ml	1,98	3,96	5,94	7,92
	% 10 SDS, µl	50	100	150	200
	% 10 APS, µl	25	50	75	100
	TEMED, µl	7,5	15	22,5	30

Tablo 2. Alt jelin hazırlanması

Alt Jel (Stacking)				
	1 jel	2 jel	3 jel	4 jel
H ₂ O, ml	1,5	3	4	6
Tampon, ml	0,65	1,3	1,95	2,6
30% Akrilamid, µl	375	750	1125	1500
10% SDS, µl	25	50	75	100
10% APS, µl	12,5	25	37,5	50
TEMED, µl	2,5	5	7,5	10

3.5.3.4. SDS-PAGE

Tamponların Hazırlanması:

Tris Çözeltisinin (4X Laemmli Yükleme tamponu için) Hazırlanması: 3,64 g Tris-Baz (1,5 M) 15 mL saf suda çözüldü ve pH 6.8'e ayarlandı. Çözeltiye saf su eklenerek hacim 20 mL'ye tamamlandı.

%0, 1'lik Brom Fenol Mavisinin (4X Laemmli Yükleme tamponu için) Hazırlanması: 1 mg brom fenol mavisi 1 mL saf suda çözülerek 1 mL çözelti hazırlandı.

4X Laemmli Tamponunun Hazırlanması: 1,5 mL'lik tüpe 167 µL, 1,5 M tris çözeltisi (pH 6,8), 23 µL saf su, 400 µL gliserol, 200 µL %40'lık SDS, 200 µL β-merkaptoetanol, 10 µL %0,1'lik brom fenol mavisi eklenerek hazırlandı.

Yürütme/Transfer Stok Tamponun Hazırlanması (1L, 10X): 30 g Tris-baz (0,25 M), 144 g glisin 600ml saf suda çözüldü. Çözeltinin pH'ı 7,4'e ayarlandı. Çözelti 1L'ye saf su eklenerek tamamlandı.

Yürütme/Transfer Stok Tamponun Hazırlanması (1L, 5X): 30g Tris-baz (0,25 M), 144 g glisin 1500 ml saf suda çözüldü. Çözeltinin pH'ı 7,4'e ayarlandı. Çözelti 2L'ye saf su eklenerek tamamlandı.

Yürütme Tamponun Hazırlanması (1L, 1X): 100 mL stok 10X (veya 200 mL stok 5x) yürütme/transfer tamponu üzerine 900 mL saf su eklendi. Bu karışımın içine 1 mL %10'luk SDS eklenerek 1X yürütme transfer tamponu hazırlandı.

Yükleme:

BCA yöntemiyle örneklerde protein tayini yapıldıktan sonra jel kuyucuklarına eşit miktarda (30 µg) protein yüklemek amacıyla her bir örnekten alınması gereken hacim (µL), BCA protein tayini sonuçlarına göre hesaplandı. Tüm yüklemeler 30 µL aralığında gerçekleştirildi.

En büyük hacimden başlanarak su, 7,5 µL 4x laemmli tamponu ve örnek bir tüpte, son konsantrasyon 30 µg protein/30 µL çözelti olacak şekilde karıştırıldı. Hazırlanan karışım 95°C, 700 RPM'de 5 dk denatüre edildi. Önceden hazırlanmış olan jellerin bulunduğu camlar BioRad elektroforez tankına dikey olarak yerleştirildi ve camların arasında kalan bölge

yürütme tamponu ile dolduruldu. Tankın camların arasında kalmayan bölgesi ise, tank üzerinde belirtilen hizaya kadar yürütme tamponu ile dolduruldu. Jeldeki taraklar çıkarıldı. İlk kuyucuğa marker (10 µL), diğer kuyucuklara örnekler (30 µL) yüklendi.

Örnek yükleme sırası: Tüm hücre hatları için örnekler aynı sıra ile yüklendi

- Marker
- NT (72 saat müdahale edilmemiş kontrol hücreleri)
- Kontrol (Kontrol siRNA ile 72 saat muamele edilmiş hücreler)
- CTP 48 saat (CTP siRNA ile 48 saat muamele edilmiş hücreler)
- CTP 72 saat (CTP siRNA ile 72 saat muamele edilmiş hücreler)
- ACLY 48 saat (ACLY siRNA ile 48 saat muamele edilmiş hücreler)
- ACLY 72 saat (ACLY siRNA ile 72 saat muamele edilmiş hücreler)

Örneklerin Yürütülmesi:

Elektroforez sisteminin kapağı kapatıldı ve sistem güç kaynağına takıldı. Güç kaynağı 70 volta ayarlandı ve marker stacking jeli geçene kadar (~15-20 dakika) yürütüldü. Bu işlemten sonra yürütme işlemi 110 voltta, marker istenen hizaya ulaşana kadar, 1-1,5 saat devam ettirildi. Marker cam panelin sonuna yaklaştığında yürütme işlemi sonlandırıldı ve blotlamaya geçildi.

3.5.3.5. *Western Blot*

Çözeltilerin Hazırlanması

Transfer Tamponun Hazırlanması (1L): 200 ml metanol ve 100 ml stok 10x (veya 200 mL stok 5x) yürütme transfer tamponu saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

TBS Çözeltisinin Hazırlanması (1L, 10X): 24,2 g Tris-Baz (0,2 M) ve 80 g sodyum klorür (NaCl) 600 ml saf suda çözüldü ve çözeltinin pH'ı 7,4'e ayarlandı. Çözelti saf su eklenerek 1 L'ye tamamlandı.

TBST Çözeltisinin Hazırlanması (1L, 1X): Hazırlanan TBS stok solüsyonundan 100 ml alındı 1 ml Tween-20 ($\approx 0,1\%$) eklendi, saf su ile 1 L'ye tamamlandı.

Süt Tozu Çözeltisi (%5, 100 ml): 100 ml TBST çözeltisi içinde 5 g süt tozu çözülerek hazırlandı.

Primer Antikor Çözeltisi: Süt tozu çözeltisi (%5) içinde hem CTP hem de ACLY için 1:100 oranında primer antikor eklenerek çözelti hazırlandı. Beta aktin için seyreltme oranı olarak 1:3000 kullanıldı.

Primer Antikor Çözeltisi: Süt tozu çözeltisi (%5) içinde rabbit sekonder antikor 1:1000, mouse sekonder antikor 1:10000 seyreltme kullanılarak hazırlandı.

Proteinlerin Jelden Membrana Transferi

Polivinidil-florür membran (PVDF) uygun boyutta kesilerek önce % 100 metanol ile yaklaşık bir dakika doyuruldu. Metanolden alınan membran transfer çözeltisi içinde yaklaşık 5-10 dakika dengelendi. Yürütme işlemi tamamlanmış jeller yürütme düzeneğinden alınır. Transfer tamponu eklenen düz bir kabın içine bir adet filtre kâğıdı konuldu. Transfer tamponu içinde dengelenen membran alınarak watman kâğıdının üstüne konuldu. Jelin üzerine filtre kâğıdı konuldu. Membran pozitif, jel negatif kutba gelecek şekilde transfer düzeneği hazırlandı. Düzenek transfer tankına yerleştirildi. Tankın yüzeyini kaplayacak kadar transfer tamponu eklendi. Gece boyunca 120 mA +4 °C’de transfer işlemi gerçekleştirildi.

Bloklama ve Primer Antikor ile Muamele

Transferden sonra membran, süt tozu çözeltisi (%5) içine konuldu. Orbital karıştırıcıda, oda sıcaklığında 30 dakika-1 saat bloklama işlemi gerçekleştirildi. Membran 80 kDa çizgisinden kesildi. Üst kısım ACLY alt kısım ise CTP primer antikor çözeltisiyle gece boyu +4 °C’de muamele edildi. Primer antikorla muamele işlemi bittikten sonra membran TBST çözeltisi ile 3 kez 5’er dakikalık süreler ile yıkandı. Strip ile primer antikorun uzaklaştırılmasının ardından membranın alt kısmı primer beta-aktin antikoruna muamele edildi.

Sekonder Antikor ile Muamele

Membran ilgili sekonder antikor ile orbital karıştırıcıda, oda sıcaklığında 1 saat muamele edildi. Sekonder antikorla muamele işlemi bittikten sonra membran TBST çözeltisi ile 3 kez 5’er dakikalık süreler ile yıkandı.

Görüntüleme

Son yıkama işleminden sonra membran Signal Fire ECL çözeltisi (kemilüminesan substrat) ile 1 dakika muamele edildi. Karanlık odada membrana ait bantlar filme aktararak görüntüleme gerçekleştirildi. Bantlar değerlendirilirken beta-aktin'e ait bantlar yükleme kontrolü olarak değerlendirildi. 48. ve 72 saatteki protein inhibisyonunun etkinliği ilgili bantların kontrol siRNA uygulanmış ve hiçbir şey uygulanmamış (NT) örneklerle karşılaştırılmasıyla belirlendi.

Strip

Beta-aktin'in görüntülenebilmesi için öncelikle membranın alt kısmındaki CTP primer ve sekonder antikorunun uzaklaştırılması gerektiğinden, Restore Western Blot Stripping Buffer kullanılarak strip (bağlı antikorların uzaklaştırılması) işlemi gerçekleştirildi.

İlk olarak membran kemilüminesan substratlarından arındırılmak için TBST çözeltisi ile 3 kez 5'er dakikalık süreler ile oda sıcaklığında yıkandı. Membranın üstünü kaplayacak kadar Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo) eklendi. Hafif karıştırma ile oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Membran TBST çözeltisi ile 3 kez 5'er dakikalık süreler ile oda sıcaklığında yıkandı. Böylece, primer ve sekonder antikorlardan arındırılan membran yeni bir antikor ile muamele edilebilir hale getirildi.

3.6. Akış Sitometrik Yöntemler ile Hücresel Etkilerin Belirlenmesi

Hücrelerde siRNA uygulamasının ardından canlılık dışındaki hücresel etkiler akış sitometrik yöntemler ile belirlendi. Hücrelerde CTP ve ACLY inhibisyonunun apoptoz ve nekroz üzerine etkileri Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD) ile, hücre yaşam döngüsü üzerine etkileri BD Cycletes Plus Kit ile ve otofaji üzerine etkileri akridin oranj (Sigma) boyası kullanılarak belirlendi. Tüm hücre hatları için tüm denemelerde hücreler dört grup halinde incelendi:

1. 72 saatlik siRNA uygulanmayan kontrol hücreleri (NT)
2. 72 saatlik Kontrol siRNA uygulanan hücreler (Kontrol)
3. 72 saatlik CTP siRNA uygulanan hücreler (CTP)
4. 72 saatlik ACLY siRNA uygulanan hücreler (ACLY)

Hücre yaşam döngüsü denemesi dışındaki tüm denemeler için 200×10^3 hücre 25 cm^2 flaska ekildikten sonra gece boyu beklenmiş ve ardından siRNA transfeksiyonu gerçekleştirildi. Hücre yaşam döngüsü denemesi için ise siRNA transfeksiyonundan önce hücreler yaşam döngüsü senkronizasyonu için gece boyu serumsuz ortamda bekletildi.

3.6.1. Akış Sitometri Gereçleri

Apoptoz/Nekroz Tayini

- Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD)
- PBS

Hücre Yaşam Döngüsündeki Değişiklikler

- Cycletes Plus Kit (BD)

Otofaji Tayini

- Akridin Oranj (Sigma)
- PBS (Lonza)

3.6.2. Akış Sitometride Kullanılan Cihazlar

- FACS ARIA II Akış Sitometre (BD)
- Laminar Flow Kabin (Thermo/MS.C.12 ve Thermo MS.C.Advantage)
- İnkübatör (Thermo Forma Series II ve Thermo Steri-Cycle)

3.6.3. Akış Sitometri Yöntemleri

3.6.3.1. Apoptoz/Nekroz Tayini

Örnekler toplandıktan sonra PBS ile iki kez yıkandı. Hücre pelleti kitin içeriğindeki bağlama tamponundan (binding buffer 1x) $500 \mu\text{L}$ ile yeniden süspanse edildi. Süspansiyondan $100 \mu\text{L}$ alındı ve üzerine $5 \mu\text{L}$ FITC ile işaretlenmiş Annexin-V ve $5 \mu\text{L}$ propidyum iyodür çözeltisinden ilave edildi. Oda sıcaklığında boyama için 15 dakika beklendi. Örneklerin üzerine $400' \mu\text{L}$ bağlama tamponundan ilave edildi ve akış sitometrede analiz gerçekleştirildi.

3.6.3.2. *Hücre Yaşam Döngüsündeki Değişiklikler*

Örnekler toplandıktan sonra kitin içeriğindeki A solusyonundan 250 µL ile süspanse edildi. Süspansiyonun üzerine kitin içeriğindeki B solusyonundan 200 µL ilave edildi. 10 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra süspansiyonun üzerine C solusyonundan 200 µL ilave edildi ve akış sitometrede analiz gerçekleştirildi.

3.6.3.3. *Otofaji Tayini*

Örnekler toplandıktan sonra PBS ile iki kez yıkandı. Yıkamalardan sonra hücre pelleti % 0,1 100 µL akridin oranj çözeltisi ile süspanse edildi. Oda sıcaklığında boyama için 15 dakika beklendikten sonra hücreler 1200 RPM’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet 500 µL PBS içinde süspanse edildikten sonra akış sitometrede analiz gerçekleştirildi. Otofajinin belirlenebilmesi boyanın yalnızca asidik veziküllere bağlandığında verdiği turuncu emisyon takip edildi.

3.7. **Otofajinin Mikroskopi ile Tayini**

Akridin oranj, normal pH seviyesindeki hücresel kompartmanlarda yeşil ve asidik veziküllerde turuncu renkte ışıma yapan florasan bir boyadır. Mikroskopik görüntüleme ile otofajik değişimler takip edilebilir. CTP ve ACLY inhibisyonunun olası hücresel etkilerinden birisi de otofaji sürecinde görülebilecek değişikliklerdir. Bu değişikliklerin tespiti amacıyla 6-kuyucuklu plaklarda aşağıda listelenen uygulamalar yapılmış MCF-7 hücrelerinde, otofaji tayini akridin oranj boyaması ile gerçekleştirilmiştir.

1. 72 saatlik siRNA uygulanmayan kontrol hücreleri (NT)
2. 72 saatlik Kontrol siRNA uygulanan hücreler (Kontrol)
3. 72 saatlik CTP siRNA uygulanan hücreler (CTP)
4. 72 saatlik kimyasal CTP inhibitörü uygulanan hücreler (CNASB)

Her bir örnek için en az iki tekrar çalışılmıştır. Kuyucuk başına 40×10^3 hücre ekildikten sonra hücrelerin yapışması ve duplikasyon için gece boyu beklenmiş ve ardından inhibisyon uygulamalarına geçilmiştir.

3.7.1. **Mikroskopi Gereçleri**

- Akridin Oranj (Sigma)

- PBS (Lonza)

3.7.2. Mikroskopide Kullanılan Cihazlar

- İnkübatör (Thermo)
- Mikroskop (Olympus)

3.7.3. Mikroskopi Yöntemi

Hücreleri içeren kuyucukların üzerine 3 µl akridin oranj ilave edildi. Oda sıcaklığında, karanlıkta, 10 dakika beklendikten sonra kuyucuklar üç kez 2 şer ml PBS ile yıkandı. Yıkamaların ardından florasan mikroskopta görüntüleme gerçekleştirildi. Çalışmamızda otofajideki değişimlerin anlaşılabilmesi mikroskopi görüntülerinde için turuncu renkli lizozomların dağılımı ve boyutundaki değişimler değerlendirilmiştir.

3.8. Sitoplazmik Sitrat Düzeylerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada hedeflenen protein, sitrat transport proteini (CTP), mitokondriyal sitratın sitoplazmaya geçişini sağlamaktadır. Çalışma kapsamında proteinin inhibisyonu ile sitoplazmik sitrat düzeylerinin düşeceği öngörülmüştür. Bunun ispatlanabilmesi için öncelikle mitokondrinin sitoplazmadan ayrılması ve sitoplazmik ekstraktta sitrat tayininin gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Aşağıdaki örneklerde sitoplazmik sitrat düzeyleri belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır.

5. 72 saatlik siRNA uygulanmayan kontrol hücreleri (NT)
6. 72 saatlik Kontrol siRNA uygulanan hücreler (Kontrol)
7. 72 saatlik CTP siRNA uygulanan hücreler (CTP)
8. 72 saatlik kimyasal CTP inhibitörü uygulanan hücreler (CNASB)

Sitoplazmik sitrat düzeylerinin tayin edilebilecek düzeylere ulaşabilmesi için hücreler dört tane 25 cm² flaska (200x10³ hücre/flask) ekildikten sonra gece boyu beklenmiş ve ardından inhibisyon uygulamalarına gerçekleştirilmiştir.

3.8.1. Sitrat Tayini Gereçleri

Sitoplazmanın İzolasyonu

- Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (Pierce)

Sitrat Tayini

- Citrate Assay Kit (Sigma)

3.8.2. Sitrat Tayini İçin Kullanılan Cihazlar

Sitoplazmanın İzolasyonu

- Santrifüj 5810R (Eppendorf)

Sitrat Tayini

- Spektrofotometre (Multiskan-ex Thermo)

3.8.3. Sitrat Tayini Yöntemleri

8.7.3.4. Sitoplazmanın İzolasyonu

Hücreler toplandıktan sonra 800 µL A reaktifi ile süspanse edildi. Orta hızda vortekslenip buz üzerinde 2 dakika bekletildikten sonra B reaktifinden 10 µL üzerine eklendi ve yeniden vortekslenip buz üzerinde 5 dakika daha bekletildi. 800 µL C reaktifinden ilave edildi ve alt-üst yapılarak karıştırıldı. 700 g'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra sitoplazma ve intakt mitokondriyi içeren süpernatant başka bir tüpe aktarıldı ve 12000 g'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj edildi. Sitoplazmayı içeren süpernatant ile sitrat tayinine geçildi.

8.7.3.5. Sitrat Tayini

Sitrat tamponu, enzim karışımı, developer ve prob'dan oluşan reaksiyon karışımı üreticinin talimatlarına göre hazırlandı. 96 kuyucuklu plaklarda sitrat standartları (0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1 µM) ve örneklerin sitoplazma ekstraktları kuyucuk başına 50 µL ve en az iki tekrarlı olacak şekilde yüklendi. Reaksiyon karışımından 50şer µL tüm kuyucuklara yüklendi ve 570 nm'de okuma gerçekleştirildi. Sonuçlara göre çizilen standart grafiğinden tüm örneklerdeki sitrat düzeyleri belirlendi. Ayrıca deneme ile eş zamanlı olarak tüm örneklerde

protein tayini, ilgili kısımda bahsedildiği şekliyle, gerçekleştirildi ve sonuçlar protein miktarlarına göre düzeltilerek normalize edildi.

8.8. Histon Asetilasyonunun Belirlenmesi

Sitrat transport proteini (CTP) ve ATP-sitrat-liyaz (ACLY) proteinlerinin susturulması için gerçekleştirilen siRNA uygulamasının ardından inhibisyonun histon asetilasyonu üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla ticari histon asetilasyon kiti (Cylex) kullanıldı. Kitin prensibi asetilenmiş histon kalıntılarına spesifik, 450 nm’de abzorbanı verecek şekilde modifiye edilmiş antikorlar kullanılarak ELISA formatında global histon asetilasyonunun değerlendirilmesine dayanmaktadır.

3.8.1. Histon Asetilasyonunun Belirlenmesinde Kullanılan Gereçler

Cellular Histone Acetylation Assay Kit (Cylex)

Metanol (Sigma)

3.8.2. Histon Asetilasyonunun Belirlenmesinde Kullanılan Cihazlar

Spektrofotometre (Multiskan-ex Thermo)

8.8.3. Histon Asetilasyonu Tayin Yöntemi

Hücreler kuyucuk başına 10×10^3 hücre düşecek şekilde ekildikten ve gece boyu beklendikten sonra siRNA transfeksiyonu gerçekleştirildi. Hücreler 72 saat siRNA ile inkübe edildikten sonra histon asetilasyonunun belirlenmesine geçildi. Hücre ortamı uzaklaştırılarak, hücrelerin fiksasyonu için her bir kuyucuğa 150 μ L soğuk metanol ilave edildi. 10 dakika beklendikten sonra metanol uzaklaştırıldı ve her bir kuyucuğa kitin içeriğinde bulunan bloklama ajanından 200 μ L ilave edildi. 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirildi ve ardından bloklama ajanı uzaklaştırılarak, kitin içinde bulunan asetile histon antikorundan 50 μ L kuyucuk başına ilave edildi. 1 saat oda sıcaklığında beklendikten sonra kitin içinde bulunan yıkama solusyonu ile kuyucuklar üç kez yıkandı. İkincil antikor çözeltisinden 50 μ L kuyucuk başına ilave edildi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon gerçekleştirildi. Kuyucuklar yıkama solusyonu ile yeniden üç kez yıkandı ve kolorimetrik reaksiyonu sağlayan substrat çözeltisinden kuyucuk başına 50 μ L ilave edildi. Reaksiyonun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında 10 dakika beklendikten sonra reaksiyonu durdurmak için durdurma

solusyonundan kuyucuk başına 50 µL eklendi ve 450 nm’de okuma gerçekleştirildi. Sonuçlar değerlendirilirken siRNA uygulanmamış hücrelerdeki asetilasyon düzeyi %100 kabul edildi ve diğer örneklerdeki asetilasyon düzeyleri ona göre belirlendi.

3.9. Verilerin Analizi

Canlılık tayini, sitoplazmik sitrat düzeylerinin belirlenmesi, apoptotik-nekrotik etkilerin belirlenmesi, hücre yaşam döngüsündeki değişimlerin ve otofaji üzerine etkilerin belirlenmesi ile histon asetilasyon düzeylerinin belirlenmesine ait tüm grafikler GraphPad Prism 5 yazılımı ile çizilmiştir. Tüm denemelerde CTP ve/veya ACLY siRNA uygulanmış örnekler ile kontrol siRNA uygulanmış ve siRNA uygulanmamış örneklerin etkiler karşılaştırılırken sütun grafikler kullanılmış, deneme tekrarlarına ait standart hata verileri grafiklerde hata çubuğu olarak gösterilmiştir. Benzer şekilde kimyasal CTP inhibitörü olan CNASB uygulanmış örnekler ile bu maddenin içinde çözündüğü taşıyıcısı DMSO etkileri kıyaslanmıştır. Bütün karşılaştırmalar için istatistiksel anlamlılık, GraphPad Prism 5 yazılımında gerçekleştirilen t testi ile incelenmiştir. Test sonuçları değerlendirilirken 0,05’in altındaki p değerleri anlamlı kabul edilmiştir. Grafiklerde anlamlılık $p < 0,05$ için tek yıldız imi (*), $p < 0,01$ için çift yıldız imi (**) ve $p \leq 0,001$ için üçlü yıldız imi (***) ile ifade edilmiştir.

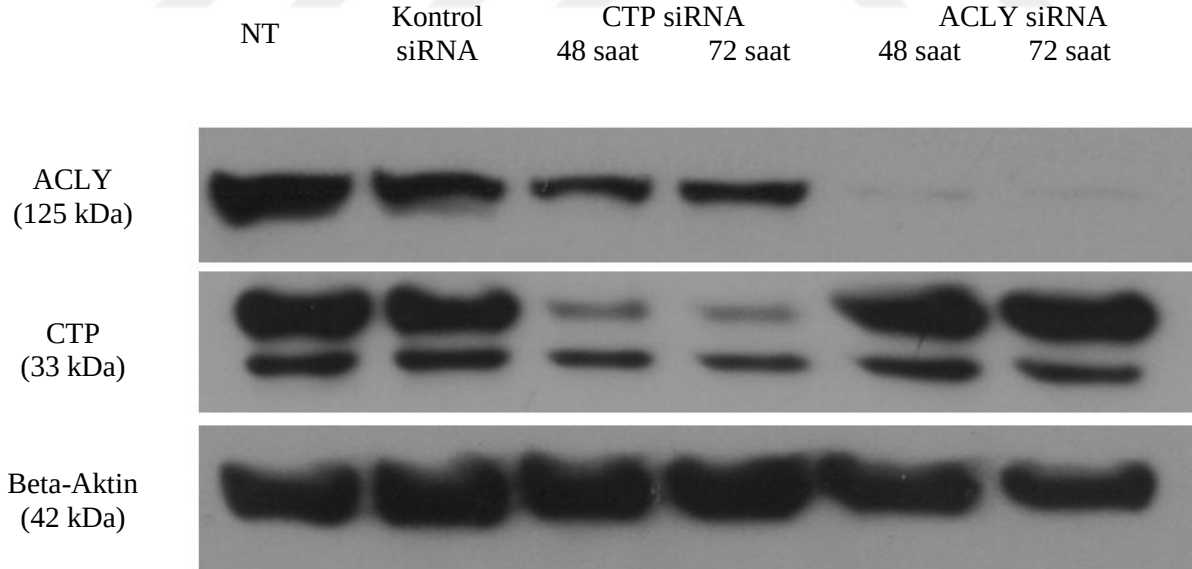
4. BULGULAR

4.1. CTP ve ACLY Proteinlerinin siRNA ile İnhibisyonu

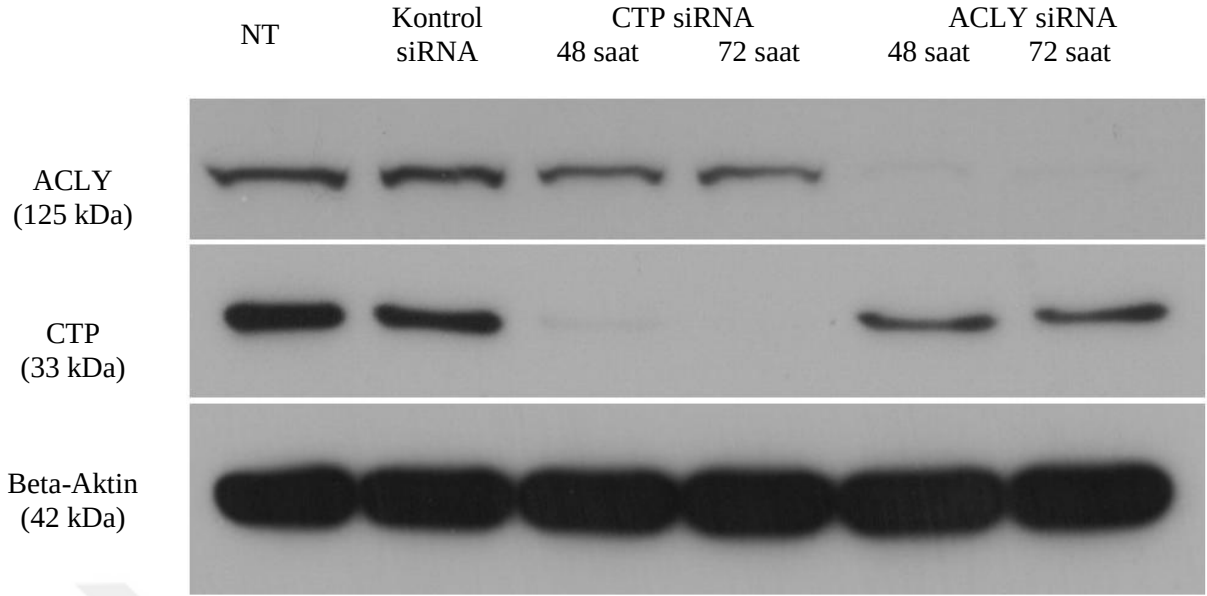
siRNA'nın inhibe edici etkilerinin belirlenebilmesi için;

- **NT** (siRNA ile muamele edilmemiş hücreler),
- **Kontrol siRNA** ile 72 saat muamele edilmiş hücreler,
- **CTP siRNA** ile 48 ve 72 saat muamele edilmiş hücreler ve
- **ACLY siRNA** ile 48 ve 72 saat muamele edilmiş hücrelerden elde edilen örneklerde

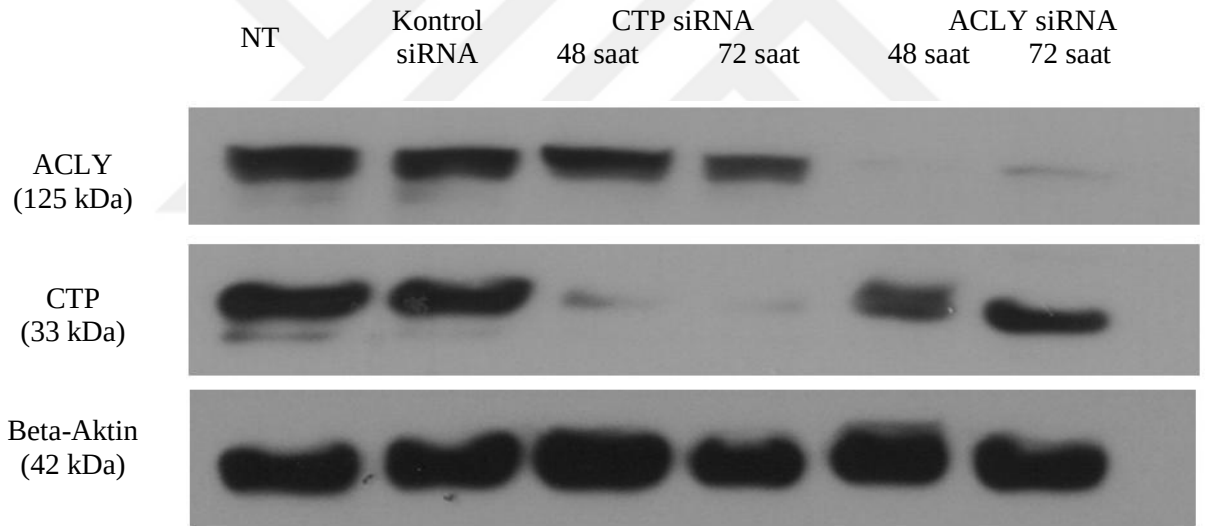
uygun antikorlar kullanılarak western blot analizi gerçekleştirildi. MCF-7 hücrelerinde siRNA etkisi ile gerçekleşen ekspresyon inhibisyonu şekil 5'te, MDA-MB-231 hücrelerinde gerçekleşen inhibisyon şekil 6'da, MCF10A hücrelerinde gerçekleşen inhibisyon şekil 7'de gösterilmektedir. Çalışmada kullanılan her iki siRNA da hem 48. hem de 72. saatte ilgili proteini etkili bir şekilde inhibe etmeyi başarmıştır. ACLY antikor (Cell Signaling) 125 kDa, CTP antikor (Santa Cruz) 30-38 kD, β -aktin antikor ise 42 kDa civarında bant vermektedir.



ŞEKİL 5. MCF-7 hücrelerinde CTP ve ACLY siRNA'nın ilgili proteinlerin ekspresyonu üzerine etkileri.



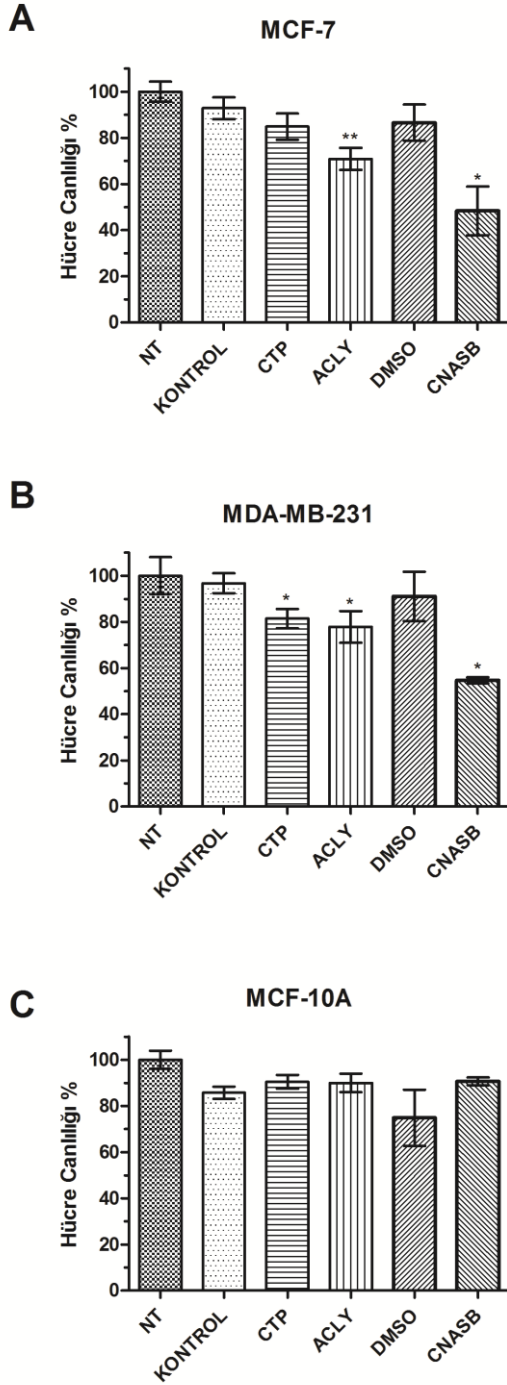
ŞEKİL 6. MDA-MB-231 hücrelerinde CTP ve ACLY siRNA'nın ilgili proteinlerin ekspresyonu üzerine etkileri.



Şekil 7. MCF-10A hücrelerinde CTP ve ACLY siRNA'nın ilgili proteinlerin ekspresyonu üzerine etkileri.

Elde edilen bulgular tüm hücre hatlarında her iki siRNA'nın da başarılı bir biçimde optimize edildiğini ve hedef proteinlerin 48. Saatten itibaren etkili bir şekilde susturulduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 5, 6 ve 7). Susturma etkisi 72. Saatte de devam etmiştir. Bu deney sonucundan yola çıkılarak siRNA'ların hücresel etkileri 72. Saatte incelenmiştir.

4.2. İnhibisyonun Canlılık Üzerine Etkileri



Kristal viyole yöntemi ile tespit edilen canlılık verileri aşağıdaki tablo (Tablo 3) ve grafikte sunulmuştur (Şekil 8). Canlılık testi sonuçlarına göre; CTP siRNA uygulaması MCF-7 hücrelerinde kontrol siRNA örneklerine göre % 7,97 canlılık inhibisyonuna ($p=0,295$), MDA-MB-231 hücrelerinde ise % 15,28 canlılık inhibisyonuna ($p=0,020$) neden olmaktadır. ACLY siRNA uygulaması ise CTP siRNA uygulamasına göre daha etkilidir. MCF-7 hücrelerinde kontrol hücrelerine göre % 21,90 canlılık inhibisyonu ($p=0,005$) görülmüşken, bu oran MDA-MB-231 hücrelerinde % 18,87 ($p=0,031$) olarak belirlenmiştir. Tüm hücrelerde kontrol siRNA düşük düzeyde bir inhibisyona neden olmuştur. Kimyasal CTP inhibitörü ise, taşıyıcı (DMSO) uygulamasına kıyasla MCF-7 hücrelerinde %38,27 ($p=0,043$), MDA-MB-231 hücrelerinde ise % 36,40 ($p=0,028$) düzeyinde canlılık inhibisyonuna neden olmuştur. Bu sonuçlar kimyasal CTP inhibitörünün siRNA uygulamasına kıyasla daha etkin bir canlılık inhibisyonu tetiklediğini göstermektedir.

Şekil 8. Kristal viyole canlılık sonuçları. A) MCF-7, B) MDA-MB-231 ve C) MCF-10A hücreleri için. 72 saatlik siRNA muamelesinin sonucunda elde edilen canlılık değerleri tabloda sütun olarak, ilişkili standart sapma değerleri ise hata çubuğu olarak sunulmuştur. Hesaplamalar yapılırken uygulama yapılmamış örneklerin (NT) canlılığı %100 kabul edilmiş ve diğer canlılık verileri ona göre hesaplanmıştır. İstatistiksel analiz yapılırken; CTP ve ACLY KONTROL ile CNASB ise DMSO ile t testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$ düzeyinde anlamlılığı ifade etmektedir.

Tablo 3. Kristal viyole canlılık sonuçları. Değerler ilgili uygulamanın sonucu olan 72. Saatteki ortalama canlılık değerlerini ifade etmektedir.

	CANLILIK					
	NT	KONTROL	CTP	ACLY	DMSO	CNASB
MCF-7	100,00	92,80	84,83	70,90	86,62	48,35
MDA-MB-231	100,00	96,74	81,46	77,87	91,05	54,65
MCF-10A	100,00	85,75	90,47	89,98	74,83	90,62

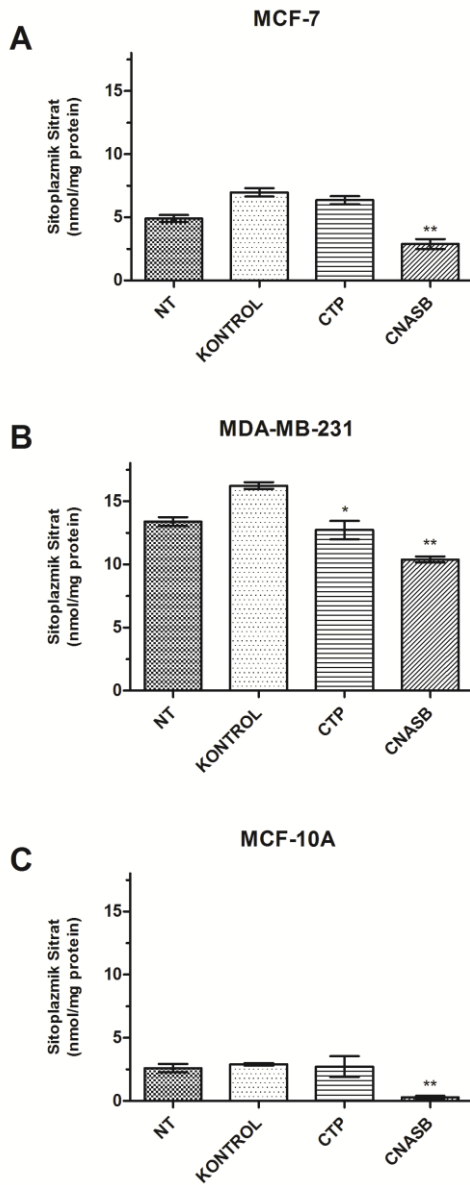
MCF-10A hücrelerinde ise ne siRNA uygulaması ne de kimyasal CTP inhibitörü ilgili kontrollere kıyasla hücresel canlılığı anlamlı ölçü azaltmıştır. Bu durumda inhibe edilen proteinlerin canlılıktaki rolünün kansere özgü olduğu söylenebilir.

4.3. İnhibisyonun Sitoplazmik Sitrat Düzeyleri Üzerine Etkileri

CTP proteininin temel aktivitesinin mitokondriden sitoplazmaya sitrat geçişini sağlamak olduğu göz önünde bulundurulduğunda, inhibisyonun etkinliği açısından sitoplazmik sitrat düzeylerindeki azalmanın proteinin ekspresyon düzeyindeki azalma kadar önemli olduğu açıktır. Bu nedenle 72 saatlik inhibisyon denemesinin sonucunda, sitoplazmik sitrat düzeyleri ölçülmüş ve sonuçlar aşağıdaki tablo (Tablo 4) ve grafikte (Şekil 9) sunulmuştur. Tabloda her bir örnek için ölçülen mg protein başına düşen sitoplazmik sitrat düzeylerine ait sayısal değerler, grafikte ise bu değerlerin şematik gösterimi sunulmaktadır.

Tablo 4. CTP inhibisyonunun sitoplazmik sitrat düzeyleri üzerine etkisi.

	Sitoplazmik Sitrat (nmol/mg protein)			
	NT	KONTROL	CTP	CNASB
MCF-7	4,89	6,97	6,35	2,89
MDA-MB-231	13,38	16,23	12,71	10,38
MCF-10A	2,61	2,91	2,72	0,30



Şekil 9. CTP inhibisyonunun sitoplazmik sitrat düzeyleri üzerine etkisi. Sütunlar mg protein başına düşen nmol sitratı, hata çubukları ise hesaplanan standart hatayı göstermektedir. İstatistiksel analiz yapılırken; CTP siRNA, KONTROL siRNA uygulaması ile CNASB uygulaması ise NT (hiçbir şey uygulanmamış hücreler) ile t testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$ düzeyinde anlamlılığı ifade etmektedir.

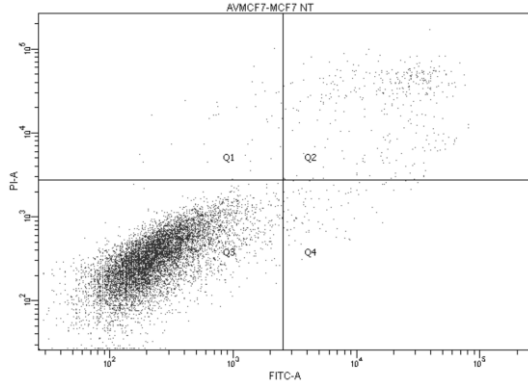
Elde edilen bulgulara göre hem MCF-7 ($p=0,207$) hem de MDA-MB-231 ($p=0,011$) hücre hatlarında CTP siRNA uygulanan örneklerdeki sitrat düzeyleri kontrol siRNA uygulanan örneklere göre düşüş göstermiştir. Bununla birlikte bu düşüş yalnızca MDA-MB-231 hücre hattında istatistiksel anlamlıdır. Kontrol siRNA uygulanan örneklerde ise NT örneklerine göre sitrat düzeylerinin yüksek olduğu görülmektedir. Bu yüksekliğin nedeninin lipozom temelli transfeksiyon sırasında hücre kültürü ortamında bulunan sitratın, siRNA ile birlikte hücre içine transfer edilmiş olması olabileceği düşünülmektedir. Bu preanalitik etkinin sonuçları etkilememesi amacıyla karşılaştırma yapılırken CTP siRNA örneklerinin kontrol siRNA örnekleri ile kıyaslanması önemlidir. MCF-10A hücrelerinde ise canlılık tayini sonuçları ile uyumlu bir şekilde sitrat düzeyleri de değişmemiştir (Şekil 9).

Kimyasal CTP inhibitörü (CNASB) tüm hücre hatlarında hücrelerinde sitrat düzeyini siRNA'dan daha etkili ve anlamlı bir biçimde azaltmayı başarmıştır (MCF-7 için $p=0,005$, MDA-MB-231 için $p=0,002$ ve MCF-10A için $p=0,002$).

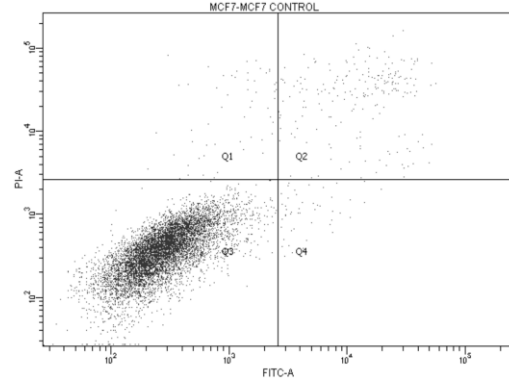
4.4. İnhibisyonun Apoptoz ve Nekroz Üzerine Etkileri

CTP ve ACLY inhibisyonunun canlılık üzerine etkileri belirlendikten sonra, bu inhibisyonların hücre ölümüne neden olup olmadığının anlaşılabilmesi amacıyla hücrelerde apoptotik ve nekrotik hücre yüzdelerindeki değişim incelenmiştir.

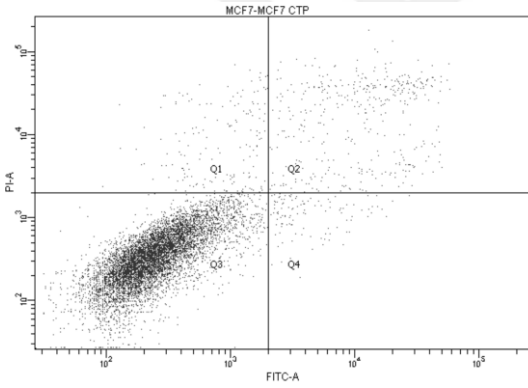
Bu amaç doğrultusunda hücreler 72 saat boyunca CTP ve ACLY siRNA ile muamele edildikten sonra akış sitometrik Annexin-V/PI analizi ile inhibisyonun apoptoz ve nekroz üzerine etkileri tayin edilmiştir. İnhibisyonun MCF-7 hücrelerine etkisini gösteren akış sitometri verileri şekil 10’da ve deney tekrarına ait veriler şekil 11’de sunulmuştur. MDA-MB-231 hücrelerine etkisini gösteren akış sitometri verileri şekil 12’de ve deney tekrarına ait verileri şekil 13’de sunulmuştur. MCF10A hücrelerine etkisini gösteren akış sitometri verileri şekil 14’de ve deney tekrarına ait veriler şekil 15’de sunulmuştur. Etkilere ait sayısal değerler şekil 16’da grafik halinde sunulmuştur.

A

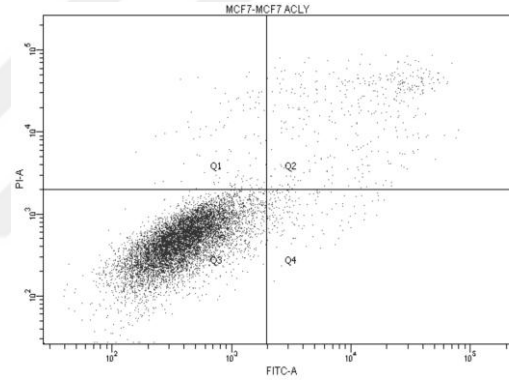
Tube: MCF7 NT			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	20,000	###	100.0
■ P1	9,725	48.6	48.6
☒ Q1	42	0.4	0.2
☒ Q2	350	3.6	1.8
☒ Q3	9,257	95.2	46.3
☒ Q4	76	0.8	0.4

B

Tube: MCF7 CONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	20,000	###	100.0
■ P1	8,616	43.1	43.1
☒ Q1	56	0.6	0.3
☒ Q2	207	2.4	1.0
☒ Q3	8,305	96.4	41.5
☒ Q4	48	0.6	0.2

C

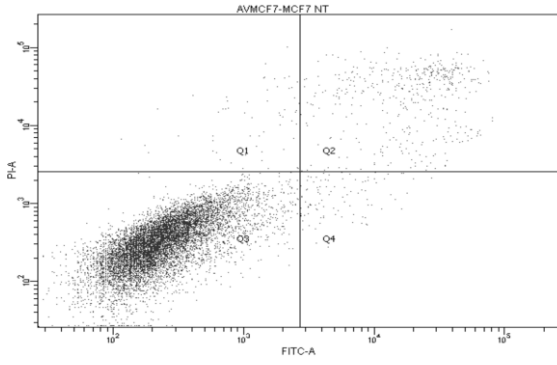
Tube: MCF7 CTP			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	20,000	###	100.0
■ P1	8,718	43.6	43.6
☒ Q1	165	1.9	0.8
☒ Q2	389	4.5	1.9
☒ Q3	8,047	92.3	40.2
☒ Q4	117	1.3	0.6

D

Tube: MCF7 ACLY			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	20,000	###	100.0
■ P1	9,508	47.5	47.5
☒ Q1	94	1.0	0.5
☒ Q2	384	4.0	1.9
☒ Q3	8,866	93.2	44.3
☒ Q4	164	1.7	0.8

Şekil 10. MCF-7 hücrelerinde siRNA uygulamasının apoptoz üzerine etkileri. **A** NT-siRNA uygulanmamış hücreler. **B** Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. **C** CTP siRNA uygulanmış hücreler. **D** ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelerin dağılımını göstermektedir. Her bir kırmızı nokta bir hücreyi göstermektedir. X eksenı FITC, Y eksenı propidiyum iyodür'e ait florasan sinyali göstermektedir. Sol alt kısım (Q3) canlı hücreleri, sağ alt ve üst kısım (Q2+Q4) apoptotik hücreleri ve sol üst kısım (Q3) nekrotik hücreleri ifade etmektedir. Alt paneller hücre dağılımının sayısal verilerini içermektedir.

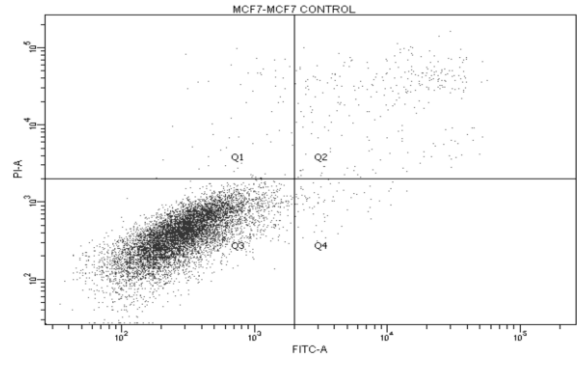
A



Tube: MCF7 NT

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	10,365	51.8	51.8
Q1	57	0.5	0.3
Q2	444	4.3	2.2
Q3	9,764	94.2	48.8
Q4	100	1.0	0.5

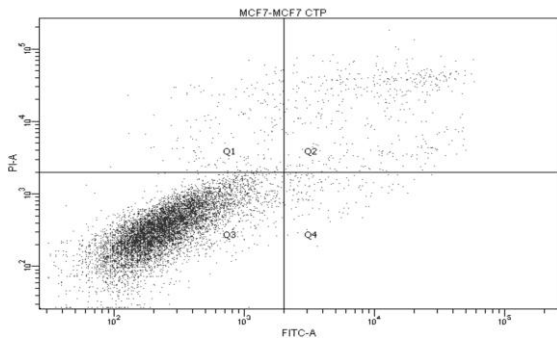
B



Tube: MCF7 CONTROL

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	9,445	47.2	47.2
Q1	58	0.6	0.3
Q2	281	3.0	1.4
Q3	9,031	95.6	45.2
Q4	75	0.8	0.4

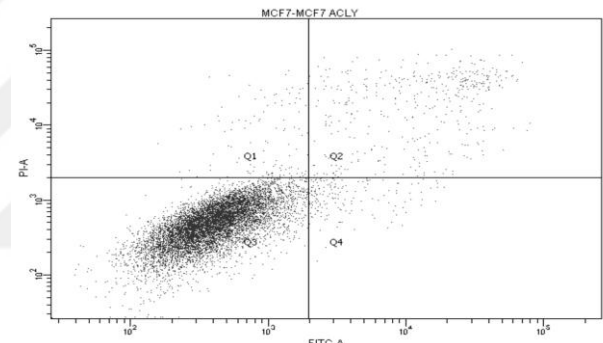
C



Tube: MCF7 CTP

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	9,076	45.4	45.4
Q1	181	2.0	0.9
Q2	420	4.6	2.1
Q3	8,348	92.0	41.7
Q4	127	1.4	0.6

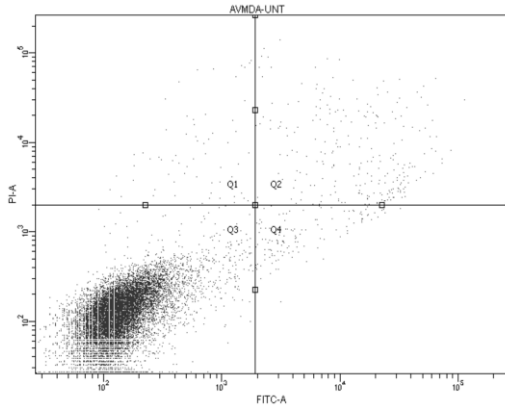
D



Tube: MCF7 ACLY

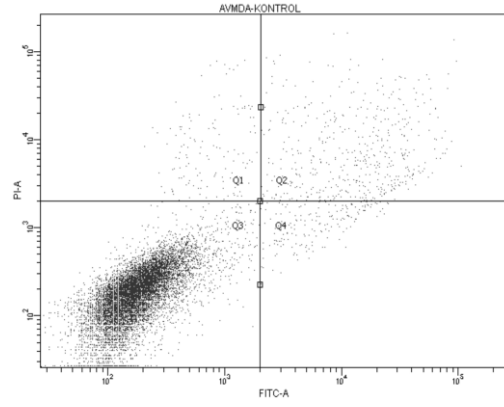
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	10,054	50.3	50.3
Q1	108	1.1	0.5
Q2	409	4.1	2.0
Q3	9,360	93.1	46.8
Q4	177	1.8	0.9

Şekil 11. MCF-7 hücrelerinde siRNA uygulamasının apoptoz üzerine etkilerinin akış sitometrik yöntemler ile belirlenmesinin tekrar verileri. A NT-siRNA uygulanmamış hücreler. B Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. C CTP siRNA uygulanmış hücreler. D ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelerin dağılımını göstermektedir. Her bir kırmızı nokta bir hücreyi göstermektedir. X eksenı FITC, Y eksenı propidıyım iyodür'e ait florasan sinyalı göstermektedir. Sol alt kısıım (Q3) canlı hücreleri, sağ alt ve üst kısıım (Q2+Q4) apoptotik hücreleri ve sol üst kısıım (Q3) nekrotik hücreleri ifade etmektedir. Alt paneller hücre dağılımının sayısal verilerini içermektedir.

A

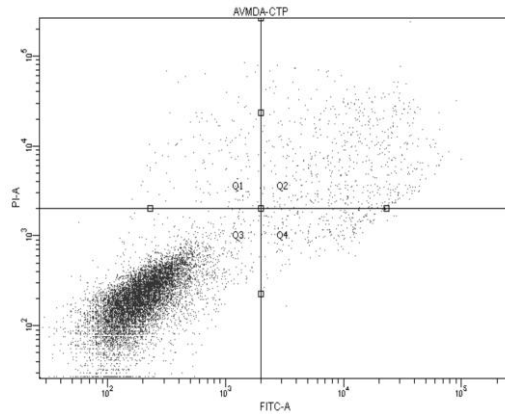
Tube: UNT

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	14,312	71.6	71.6
Q1	63	0.4	0.3
Q2	245	1.7	1.2
Q3	13,870	96.9	69.4
Q4	134	0.9	0.7

B

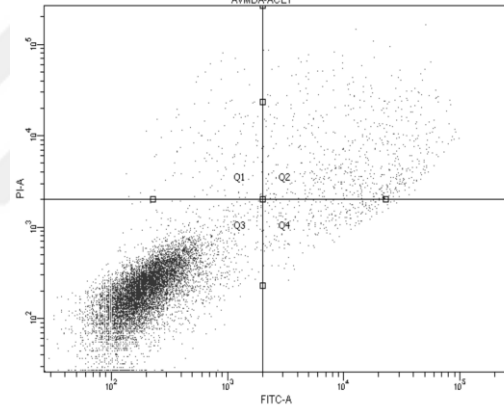
Tube: KONTROL

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	11,727	58.6	58.6
Q1	132	1.1	0.7
Q2	459	3.9	2.3
Q3	10,957	93.4	54.8
Q4	179	1.5	0.9

C

Tube: CTP

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	10,597	53.0	53.0
Q1	130	1.2	0.6
Q2	566	5.3	2.8
Q3	9,680	91.3	48.4
Q4	221	2.1	1.1

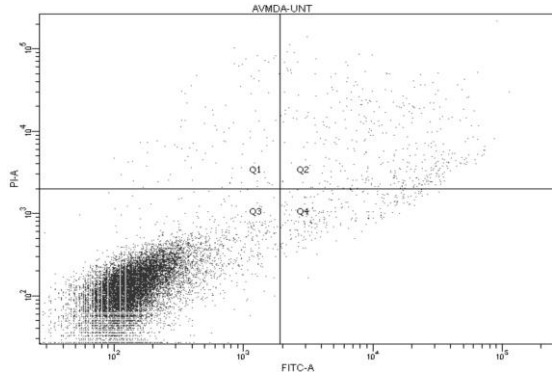
D

Tube: ACLY

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	10,655	53.3	53.3
Q1	119	1.1	0.6
Q2	615	5.8	3.1
Q3	9,687	90.9	48.4
Q4	234	2.2	1.2

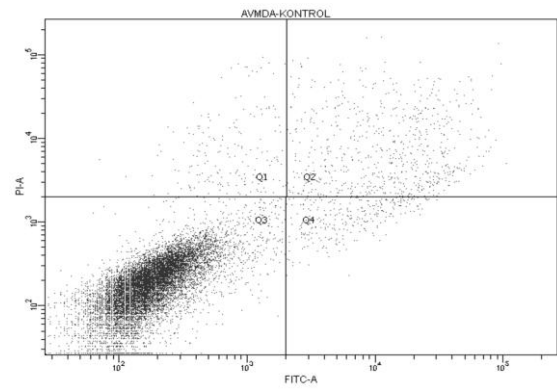
Şekil 12. MDA-MB-231 hücrelerinde siRNA uygulamasının apoptoz üzerine etkileri. **A** NT-siRNA uygulanmamış hücreler. **B** Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. **C** CTP siRNA uygulanmış hücreler. **D** ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelerin dağılımını göstermektedir. Her bir kırmızı nokta bir hücreyi göstermektedir. X eksenı FITC, Y eksenı propidiyum iyodür'e ait florasın sinyali göstermektedir. Sol alt kısım (Q3) canlı hücreleri, sağ alt ve üst kısım (Q2+Q4) apoptotik hücreleri ve sol üst kısım (Q3) nekrotik hücreleri ifade etmektedir. Alt paneller hücre dağılımının sayısal verilerini içermektedir.

A



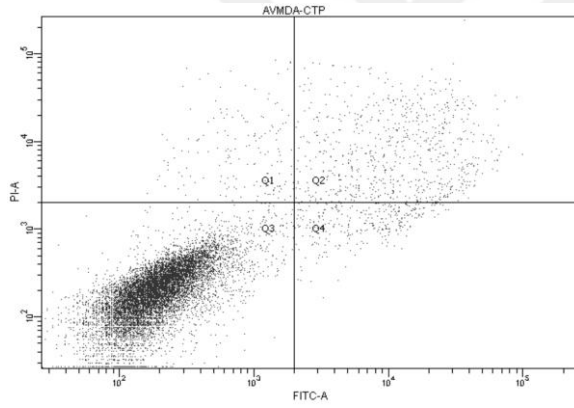
Tube: UNT			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	####	100.0
P1	15,912	79.6	79.6
Q1	97	0.6	0.5
Q2	395	2.5	2.0
Q3	15,192	95.5	76.0
Q4	228	1.4	1.1

B



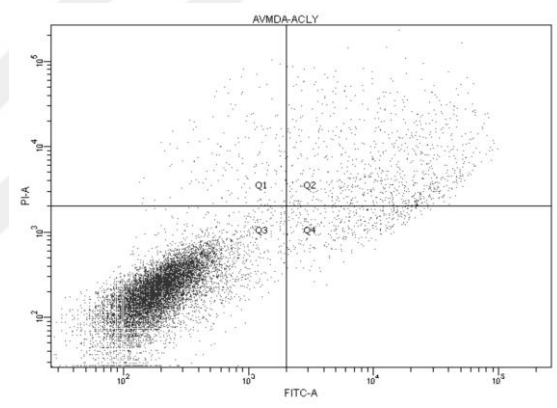
Tube: KONTROL			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	####	100.0
P1	13,593	68.0	68.0
Q1	181	1.3	0.9
Q2	663	4.9	3.3
Q3	12,461	91.7	62.3
Q4	288	2.1	1.4

C



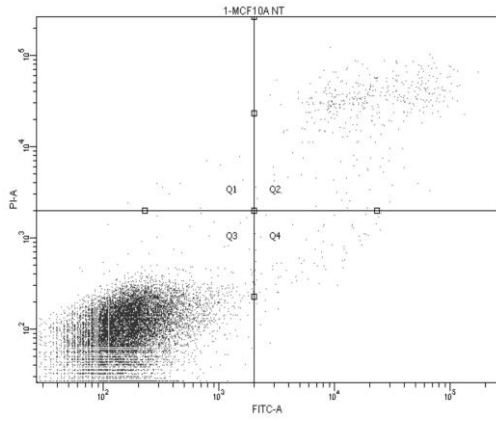
Tube: CTP			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	####	100.0
P1	12,077	60.4	60.4
Q1	163	1.3	0.8
Q2	711	5.9	3.6
Q3	10,891	90.2	54.5
Q4	312	2.6	1.6

D



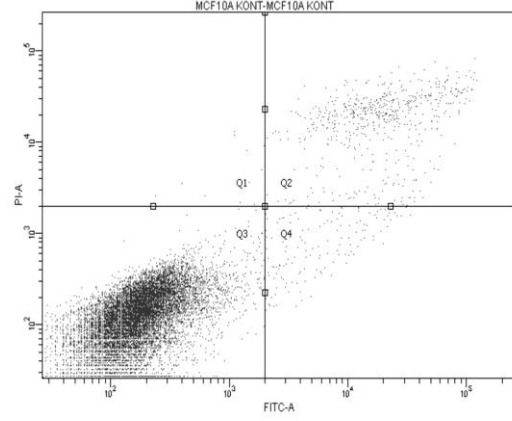
Tube: ACLY			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	####	100.0
P1	12,373	61.9	61.9
Q1	159	1.3	0.8
Q2	823	6.7	4.1
Q3	11,044	89.3	55.2
Q4	347	2.8	1.7

Şekil 13. MDA-MB-231 hücrelerinde siRNA uygulamasının apoptoz üzerine etkilerinin akış sitometrik yöntemler ile belirlenmesinin tekrar verileri. A NT-siRNA uygulanmamış hücreler. B Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. C CTP siRNA uygulanmış hücreler. D ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelerin dağılımını göstermektedir. Her bir kırmızı nokta bir hücreyi göstermektedir. X eksenı FITC, Y eksenı propidiyum iyodür'e ait florasan sinyali göstermektedir. Sol alt kısım (Q3) canlı hücreleri, sağ alt ve üst kısım (Q2+Q4) apoptotik hücreleri ve sol üst kısım (Q1) nekrotik hücreleri ifade etmektedir. Alt paneller hücre dağılımının sayısal verilerini içermektedir.

A

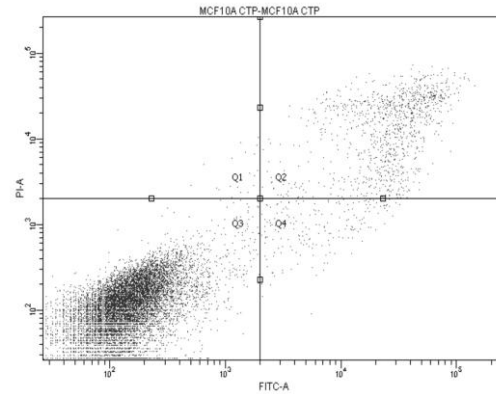
Tube: MCF10A NT

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	15,262	76.3	76.3
Q1	11	0.1	0.1
Q2	402	2.6	2.0
Q3	14,775	96.8	73.9
Q4	74	0.5	0.4

B

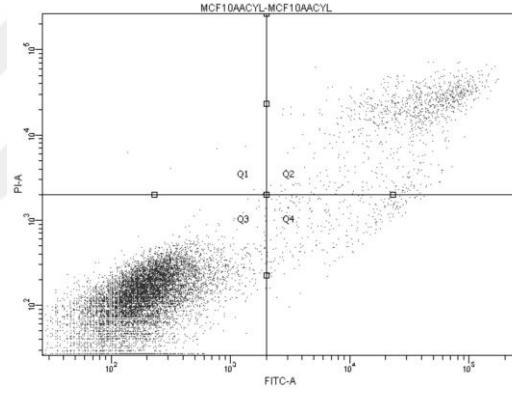
Tube: MCF10A KONT

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	15,333	76.7	76.7
Q1	10	0.1	0.0
Q2	571	3.7	2.9
Q3	14,606	95.3	73.0
Q4	146	1.0	0.7

C

Tube: MCF10A CTP

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	12,649	63.2	63.2
Q1	18	0.1	0.1
Q2	1,042	8.2	5.2
Q3	11,391	90.1	57.0
Q4	198	1.6	1.0

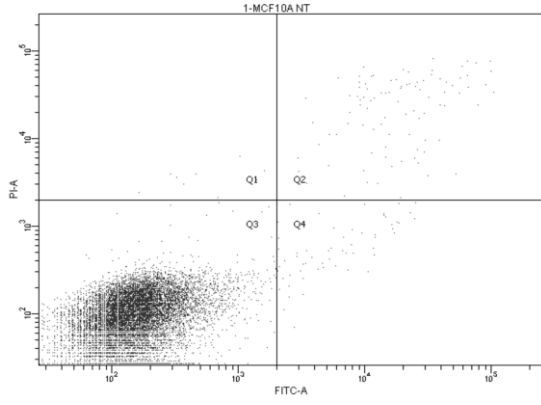
D

Tube: MCF10A ACLY

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	11,880	59.4	59.4
Q1	6	0.1	0.0
Q2	991	8.3	5.0
Q3	10,622	89.4	53.1
Q4	261	2.2	1.3

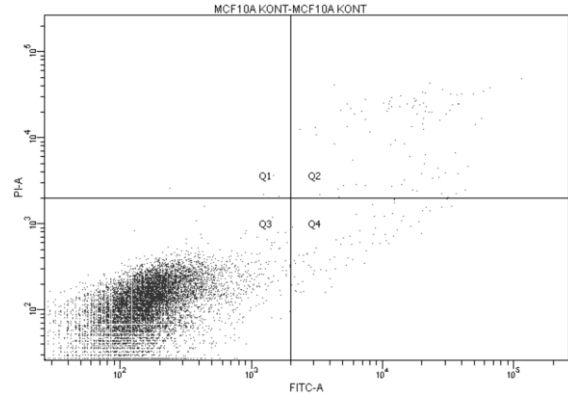
Şekil 14. MCF-10A hücrelerinde siRNA uygulamasının apoptoz üzerine etkileri. **A** NT-siRNA uygulanmamış hücreler. **B** Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. **C** CTP siRNA uygulanmış hücreler. **D** ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelerin dağılımını göstermektedir. Her bir kırmızı nokta bir hücreyi göstermektedir. X eksenı FITC, Y eksenı propidiyum iyodür'e ait florasan sinyali göstermektedir. Sol alt kısım (Q3) canlı hücreleri, sağ alt ve üst kısım (Q2+Q4) apoptotik hücreleri ve sol üst kısım (Q3) nekrotik hücreleri ifade etmektedir. Alt paneller hücre dağılımının sayısal verilerini içermektedir.

A



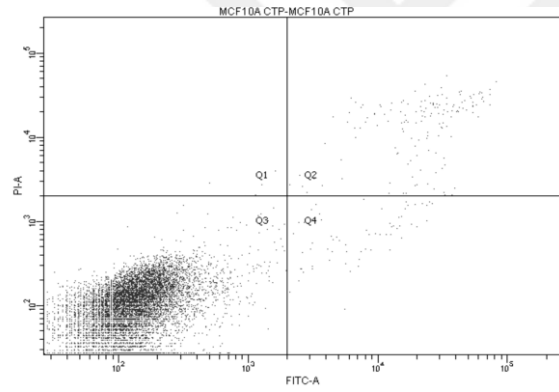
Tube: MCF10A NT			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	13,165	65.8	65.8
Q1	9	0.1	0.0
Q2	94	0.7	0.5
Q3	13,003	98.8	65.0
Q4	59	0.4	0.3

B



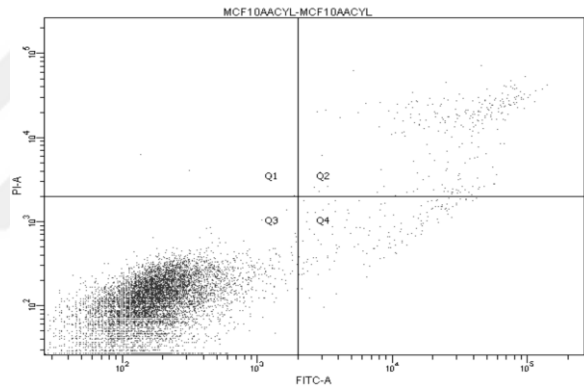
Tube: MCF10A KONT			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	11,626	58.1	58.1
Q1	4	0.0	0.0
Q2	87	0.7	0.4
Q3	11,460	98.6	57.3
Q4	75	0.6	0.4

C



Tube: MCF10A CTP			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	9,600	48.0	48.0
Q1	3	0.0	0.0
Q2	148	1.5	0.7
Q3	9,386	97.8	46.9
Q4	63	0.7	0.3

D



Tube: MCF10A ACLY			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	8,778	43.9	43.9
Q1	3	0.0	0.0
Q2	242	2.8	1.2
Q3	8,388	95.6	41.9
Q4	145	1.7	0.7

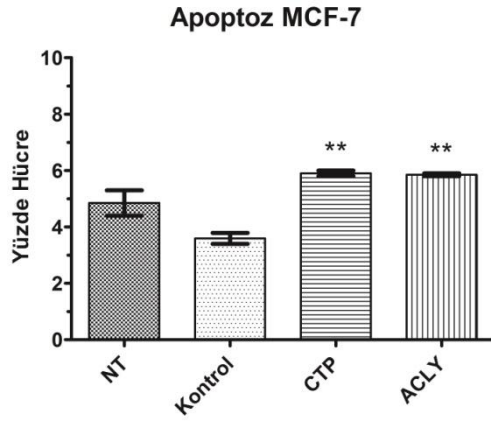
Şekil 15. MCF-10A hücrelerinde siRNA uygulamasının apoptoz üzerine etkilerinin akış sitometrik yöntemler ile belirlenmesinin tekrar verileri. A NT-siRNA uygulanmamış hücreler. B Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. C CTP siRNA uygulanmış hücreler. D ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelerin dağılımını göstermektedir. Her bir kırmızı nokta bir hücreyi göstermektedir. X eksenı FITC, Y eksenı propidiyum iyodür'e ait florasan sinyali göstermektedir. Sol alt kısım (Q3) canlı hücreleri, sağ alt ve üst kısım (Q2+Q4) apoptotik hücreleri ve sol üst kısım (Q3) nekrotik hücreleri ifade etmektedir. Alt paneller hücre dağılımının sayısal verilerini içermektedir.

Hücrelerde CTP ve ACLY düşük miktarda apoptozu tetiklemiştir (Şekil 16A.). Bu etki tüm hücre hatlarında benzerdir. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde ACLY inhibisyonu ile tetiklenen apoptotik etki, kontrol siRNA ile tetiklenen etkiye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksektir (MCF-7 hücreleri için $p<0,01$ ve MDA-MB-231 hücreleri için $p<0,05$). CTP inhibisyonu ile kontrol siRNA'ya kıyasla tetiklenen apoptoz ise sadece MCF-7 hücrelerinde istatistiksel anlamlı düzeydedir ($p<0,01$). Bununla birlikte hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücre hattında CTP ya da ACLY inhibisyonu ile tetiklenen apoptoz düşük düzeylerde kalmıştır ($<10\%$) ve ilgili siRNA uygulamalarının neden olduğu canlılık inhibisyonunun açıklanması açısından yetersizdir. MCF10A hücrelerinde ise iki siRNA uygulaması da kontrol siRNA'ya göre istatistiksel anlamlı bir apoptoz artışına neden olmamıştır.

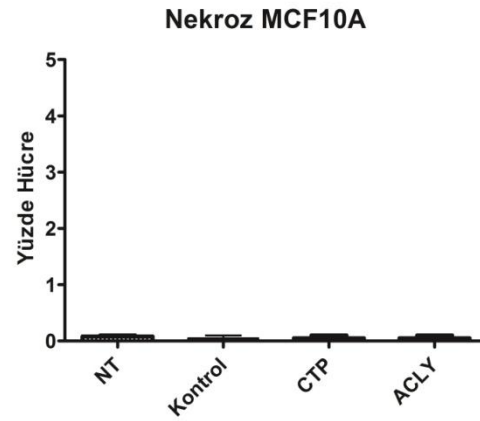
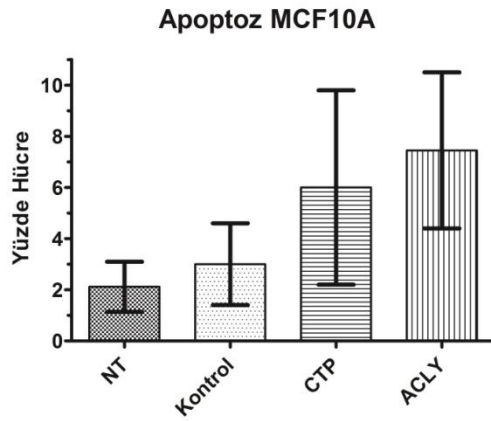
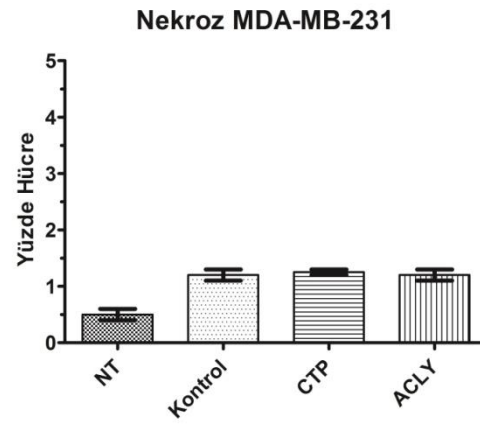
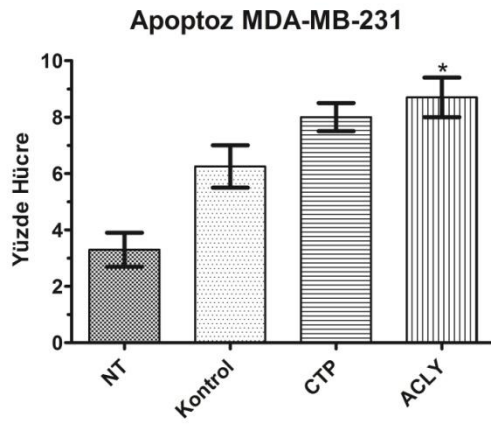
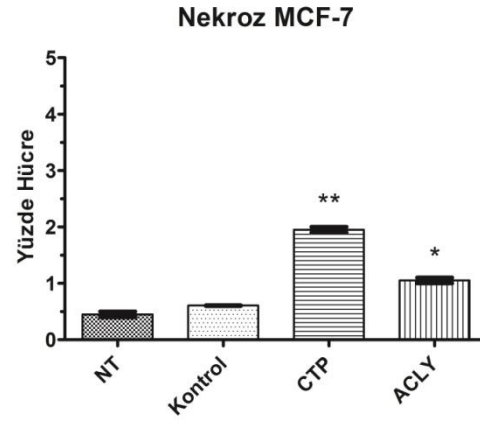
Ayrıca CTP ve ACLY uygulaması sonucunda tetiklenen apoptoz, canlılık inhibisyonunun aksine, kanser hücrelerine özgü değildir ve MCF10A hücrelerinde de benzer şekilde gerçekleşmiştir. Bu sonuç da CTP-ACLY inhibisyonunun hücre canlılığı üzerine etkilerinin tek başına apoptoz ile açıklanamayacağını göstermektedir.

Hücrelerde siRNAlar aracılığıyla tetiklenen nekroz da oldukça düşük düzeydedir ($<3\%$) (Şekil 16B.). Her ne kadar MCF-7 hücrelerinde kontrol siRNA uygulamasına göre CTP ve ACLY siRNA uygulamasında istatistiksel anlamlı bir nekroz artışı görülmüş olsa da bu etki de canlılık inhibisyonunu açıklama açısından yetersizdir.

A



B



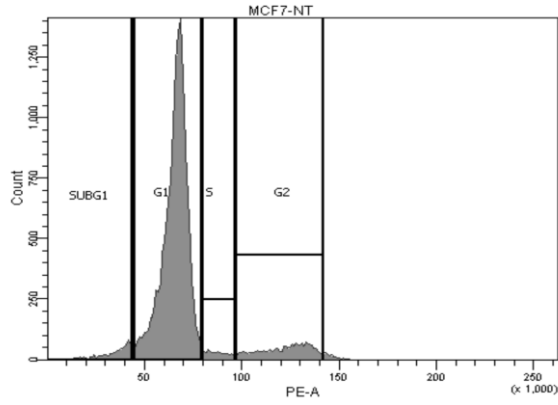
Şekil 16. CTP ve ACLY inhibisyonunun MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A hücrelerindeki apoptotik (A) ve nekrotik (B) etkileri. Sütunlar ortalama hücre sayısını, hata çubukları ise standart harayı göstermektedir. T testi ile CTP ya da ACLY uygulamasının kontrol siRNA uygulamasının etkileri ile karşılaştırılmasının istatistiksel analiz sonuçlarına göre anlamlılık (*) $p < 0,05$ ve (**) $p < 0,01$ olarak gösterilmiştir.

4.5. İnhibisyonun Hücre Yaşam Döngüsü Üzerine Etkileri

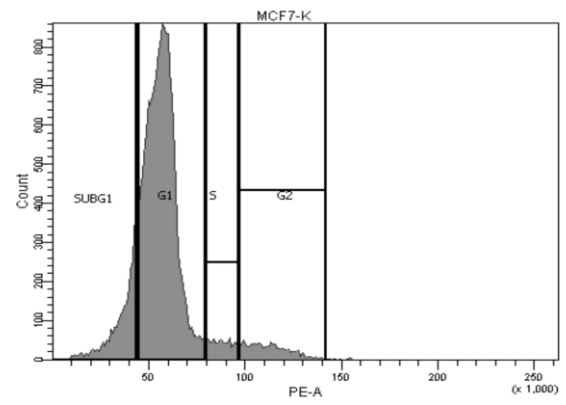
Hücreler 72 saat boyunca CTP ve ACLY siRNA ile muamele edildikten sonra akış sitometrik analiz ile inhibisyonun hücre yaşam döngüsü üzerine etkileri tayin edilmiştir. İnhibisyonun MCF-7 hücrelerine etkisini gösteren akış sitometri verileri şekil 17’de, tekrar verileri şekil 18’de ve verilerin sütun grafik şeklinde düzenlenmiş sunumu şekil 19’da verilmiştir. İnhibisyonun MDA-MB-231 hücrelerine etkisini gösteren akış sitometri verileri şekil 20’de, tekrar verileri şekil 21’de ve verilerin sütun grafik şeklinde düzenlenmiş sunumu şekil 22’de verilmiştir. MCF10A hücrelerine etkisini gösteren akış sitometri verileri şekil 23’de, tekrar verileri şekil 24’de verilerin sütun grafik şeklinde düzenlenmiş sunumu şekil 25’de verilmiştir. Tüm hücre hatlarında CTP ve ACLY siRNA uygulamasının yaşam döngüsüne etkileri kontrol siRNA’nın etkileri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel analiz t testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir fakat hücre yaşam döngüsü profilleri arasında anlamlı bir farklılık belirlenememiştir.

4.5.1. MCF-7

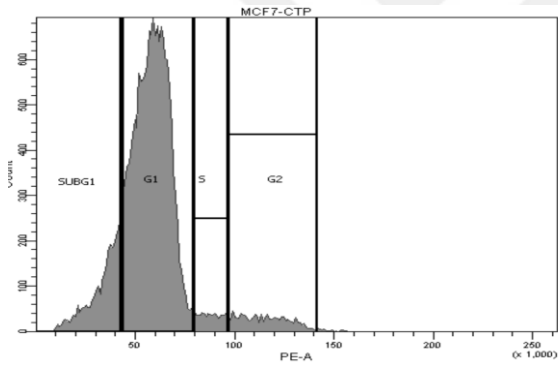
MCF-7 hücrelerinde, tüm siRNA uygulamalarında (kontrol siRNA dâhil) apoptotik SubG₁ fraksiyonunda artış görülürken, G₁ fraksiyonunda eşdeğer bir azalma belirlenmiştir (Şekil 19). Bu değişimler kontrol siRNA uygulanan grupta da benzer olduğundan CTP ve ACLY’nin spesifik fonksiyonundan bağımsız olduğu düşünülmektedir.

A

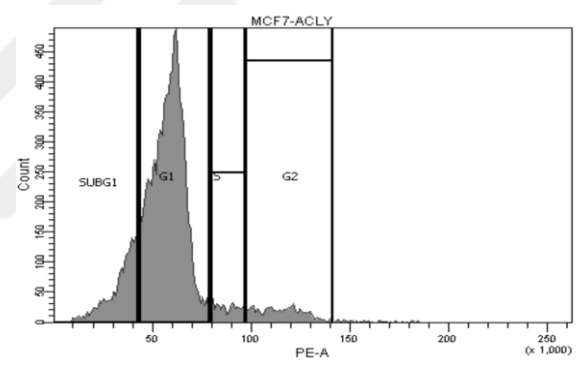
Tube: NT			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	20,000	###	100.0
■ P1	19,442	97.2	97.2
■ G1	16,163	83.1	80.8
■ S	455	2.3	2.3
■ G2	1,837	9.4	9.2
■ SUBG1	729	3.7	3.6

B

Tube: K			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	20,000	###	100.0
■ P1	19,430	97.2	97.2
■ G1	14,684	75.6	73.4
■ S	727	3.7	3.6
■ G2	1,063	5.5	5.3
■ SUBG1	2,554	13.1	12.8

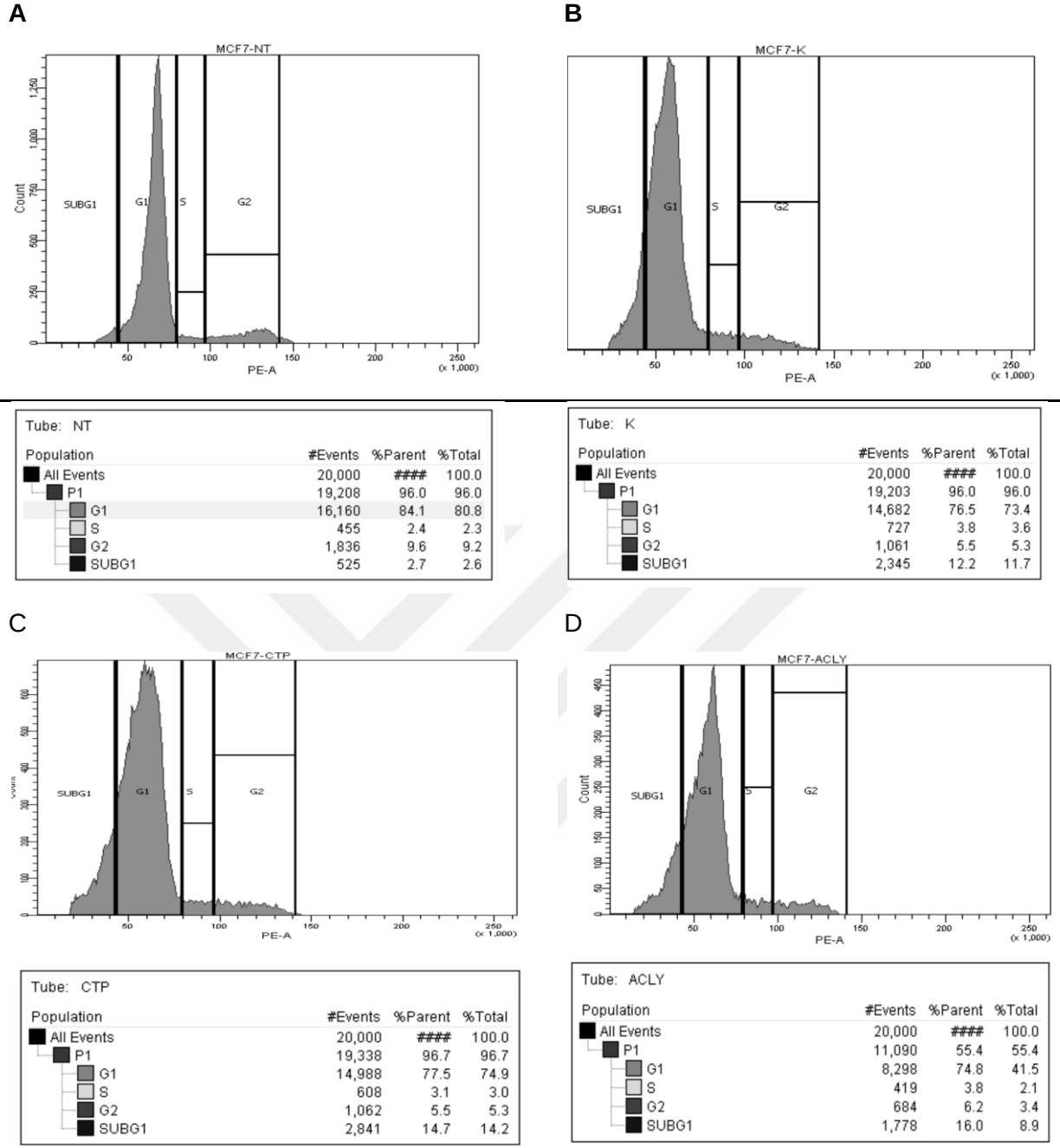
C

Tube: CTP			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	20,000	###	100.0
■ P1	19,537	97.7	97.7
■ G1	14,988	76.7	74.9
■ S	608	3.1	3.0
■ G2	1,070	5.5	5.4
■ SUBG1	3,011	15.4	15.1

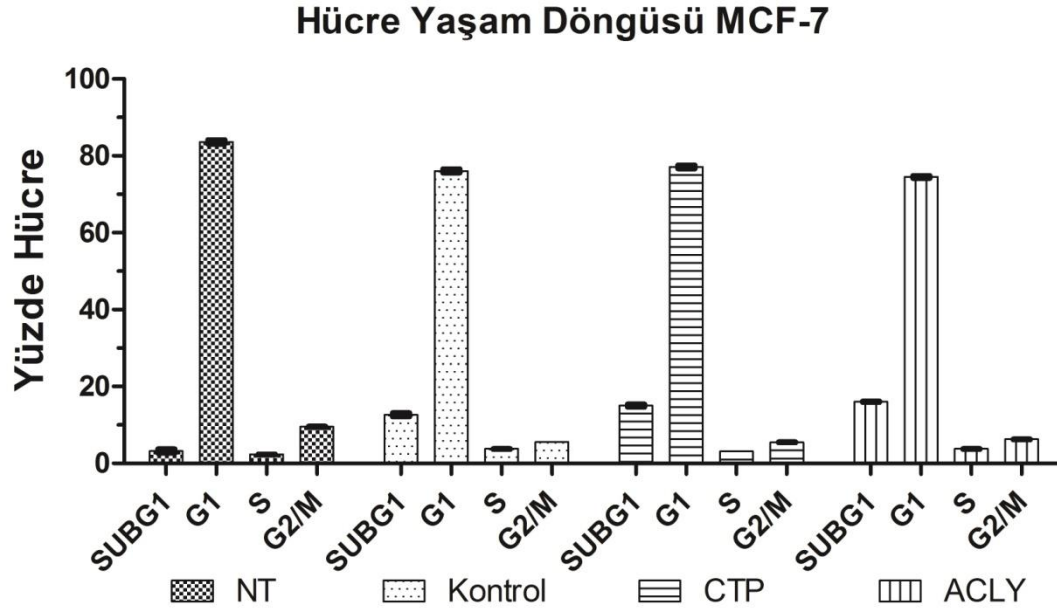
D

Tube: ACLY			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	20,000	###	100.0
■ P1	11,190	56.0	56.0
■ G1	8,298	74.2	41.5
■ S	419	3.7	2.1
■ G2	703	6.3	3.5
■ SUBG1	1,806	16.1	9.0

Şekil 17. MCF-7 hücrelerinde siRNA uygulamasının hücre yaşam döngüsü üzerine etkileri. **A** NT-siRNA uygulanmamış hücreler. **B** Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. **C** CTP siRNA uygulanmış hücreler. **D** ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelere ait pikleri göstermektedir. X eksenini propidyum iyodüre ait ve DNA miktarını gösteren florasan sinyali göstermektedir. Y eksenini ise hücre sayısını belirtmektedir. Alt paneller piklerdeki hücre sayısını ifade etmektedir.



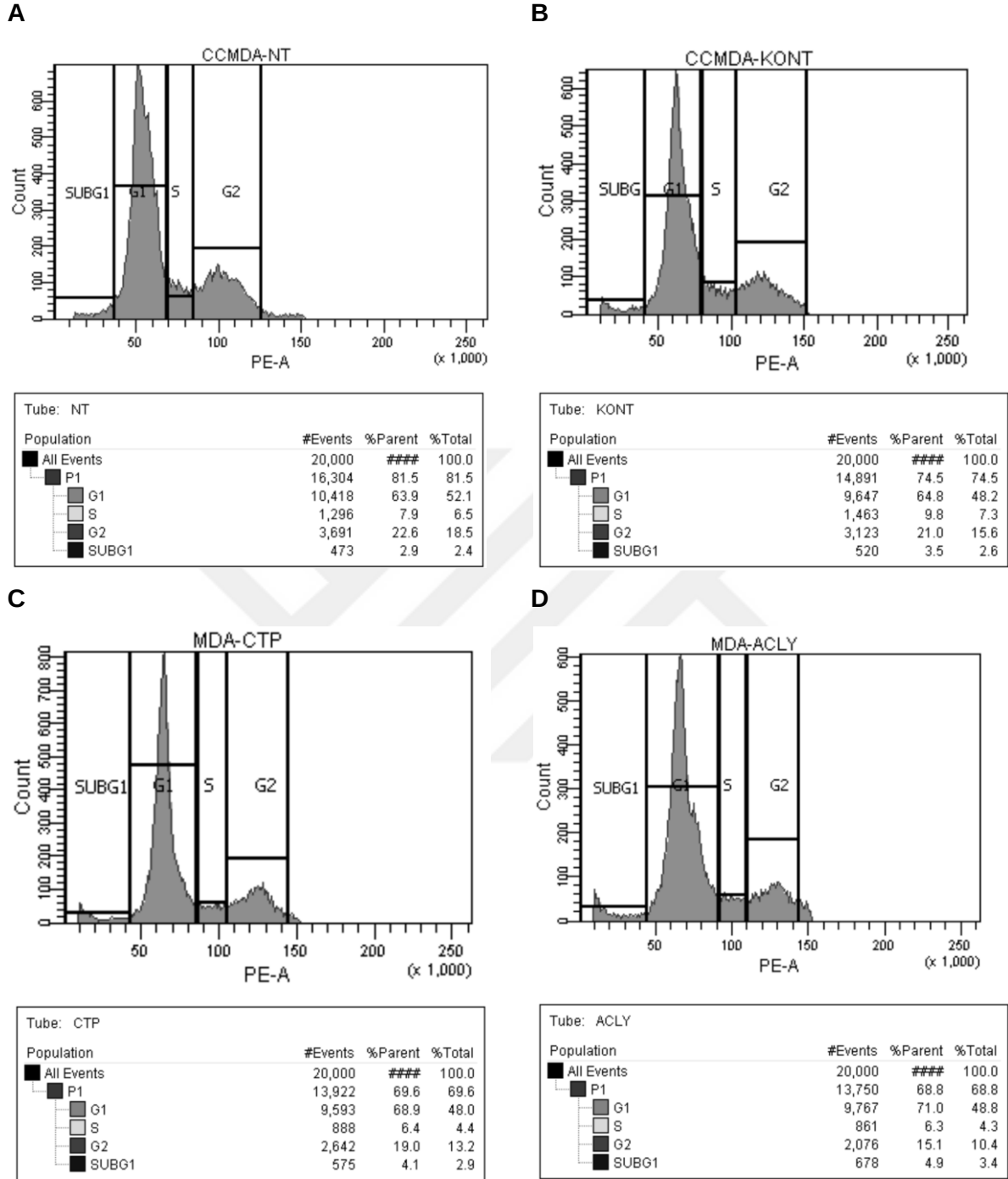
Şekil 18. MCF-7 hücrelerinde siRNA uygulamasının hücre yaşam döngüsü üzerine etkilerinin akış sitometrik yöntemler ile belirlenmesinin tekrar verileri. A NT-siRNA uygulanmamış hücreler. B Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. C CTP siRNA uygulanmış hücreler. D ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelere ait pikleri göstermektedir. X eksenı propidyum iyodüre ait ve DNA miktarını gösteren florasın sinyali göstermektedir. Y eksenı ise hücre sayısını belirtmektedir. Alt paneller piklerdeki hücre sayısını ifade etmektedir.



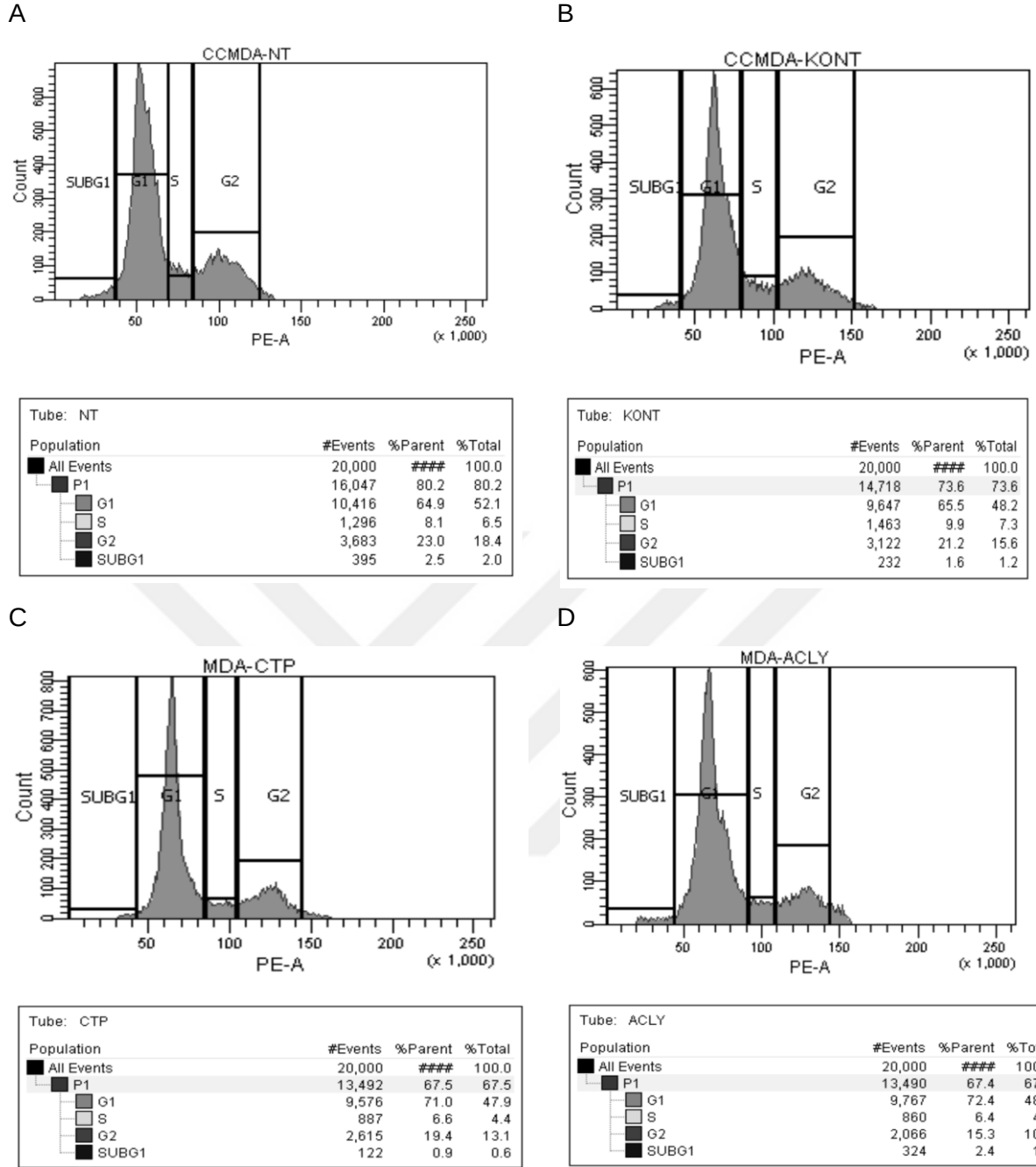
Şekil 19. MCF-7 hücrelerinde siRNA uygulamasının hücre yaşam döngüsü üzerindeki etkilerinin şematik gösterimi. Sütunlar ortalama yüzde hücre değerlerini ve hata çubukları standart hata değerlerini ifade etmektedir.

4.5.2. MDA-MB-231

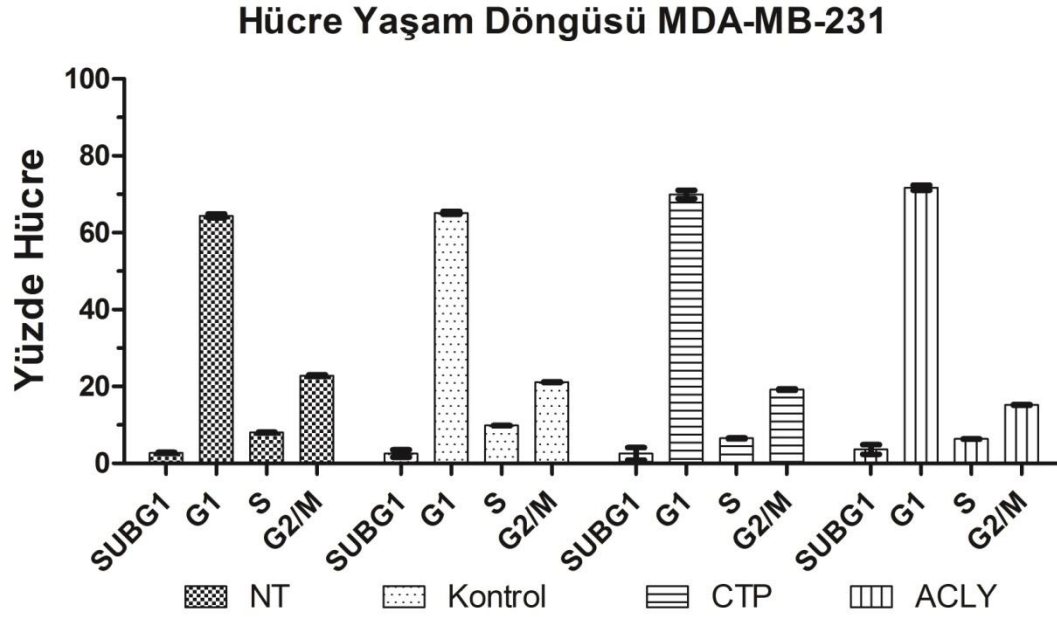
MDA-MB-231 hücrelerinde, CTP ve ACLY siRNA uygulamasında hem kontrol siRNA uygulamasına, hem de siRNA uygulanmamış örneklerle göre G₁ fraksiyonunda artış S fraksiyonunda azalma görülmüştür (Şekil 22). Bu değişim oldukça düşük ölçekte olduğundan siRNA'ların canlılık üzerine etkilerini açıklamakta yetersizdir.



Şekil 20. MDA-MB-231 hücrelerinde siRNA uygulamasının hücre yaşam döngüsü üzerine etkileri. **A** NT-siRNA uygulanmamış hücreler. **B** Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. **C** CTP siRNA uygulanmış hücreler. **D** ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelere ait pikleri göstermektedir. X eksenı propidyum iyodüre ait ve DNA miktarını gösteren florasan sinyali göstermektedir. Y eksenı ise hücre sayısını belirtmektedir. Alt paneller piklerdeki hücre sayısını ifade etmektedir.



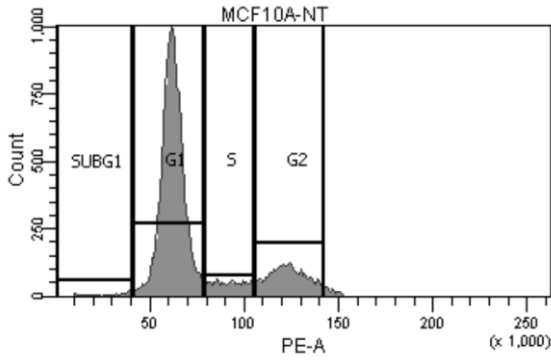
Şekil 21. MDA-MB-231 hücrelerinde siRNA uygulamasının hücre yaşam döngüsü üzerine etkilerinin akış sitometrik yöntemler belirlenmesinin tekrar verileri. A NT-siRNA uygulanmamış hücreler. B Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. C CTP siRNA uygulanmış hücreler. D ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelere ait pikleri göstermektedir. X eksenı propidyum iyodüre ait ve DNA miktarını gösteren florasan sinyali göstermektedir. Y eksenı ise hücre sayısını belirtmektedir. Alt paneller piklerdeki hücre sayısını ifade etmektedir.



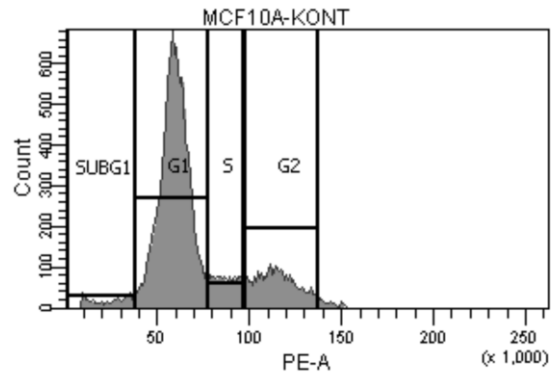
Şekil 22. MDA-MB-231 hücrelerinde siRNA uygulamasının hücre yaşam döngüsü üzerindeki etkilerinin şematik gösterimi. Sütunlar ortalama yüzde hücre değerlerini ve hata çubukları standart hata değerlerini ifade etmektedir.

4.5.3. MCF-10A

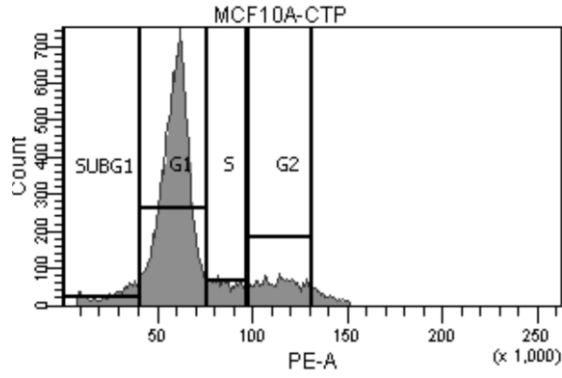
MCF-10A hücrelerinde, CTP ve ACLY siRNA uygulamasında hem kontrol siRNA uygulamasına hem de siRNA uygulanmamış örneklere göre G₂ fraksiyonunda azalma ve SubG₁ fraksiyonunda artış görülmüştür (Şekil 25). siRNA'ların MCF10A hücrelerinin canlılığı üzerine etkisiz olduğu düşünüldüğünde bu hafif değişimin siRNA'ların canlılık inhibe edici etkilerinden bağımsız olduğu düşünülmektedir.

A

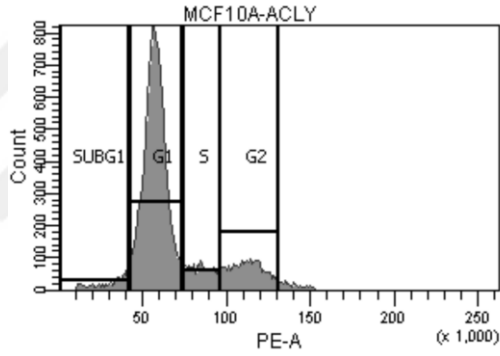
Tube: NT			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	17,018	85.1	85.1
G1	12,513	73.5	62.6
S	1,220	7.2	6.1
G2	2,777	16.3	13.9
SUBG1	172	1.0	0.9

B

Tube: KONT			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	16,122	80.6	80.6
G1	11,319	70.2	56.6
S	1,416	8.8	7.1
G2	2,581	16.0	12.9
SUBG1	555	3.4	2.8

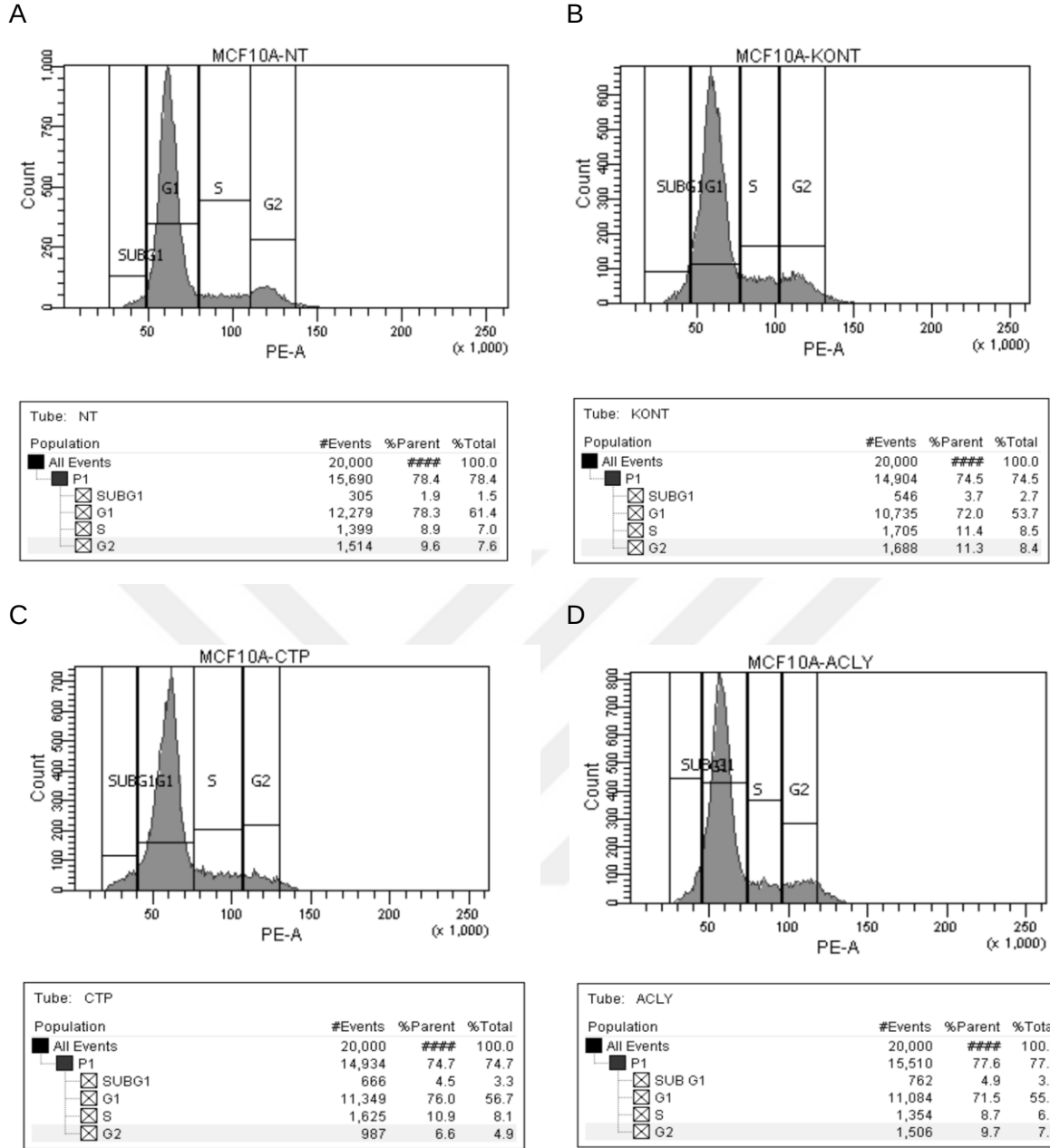
C

Tube: CTP			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	16,132	80.7	80.7
G1	11,312	70.1	56.6
S	1,201	7.4	6.0
G2	2,017	12.5	10.1
SUBG1	986	6.1	4.9

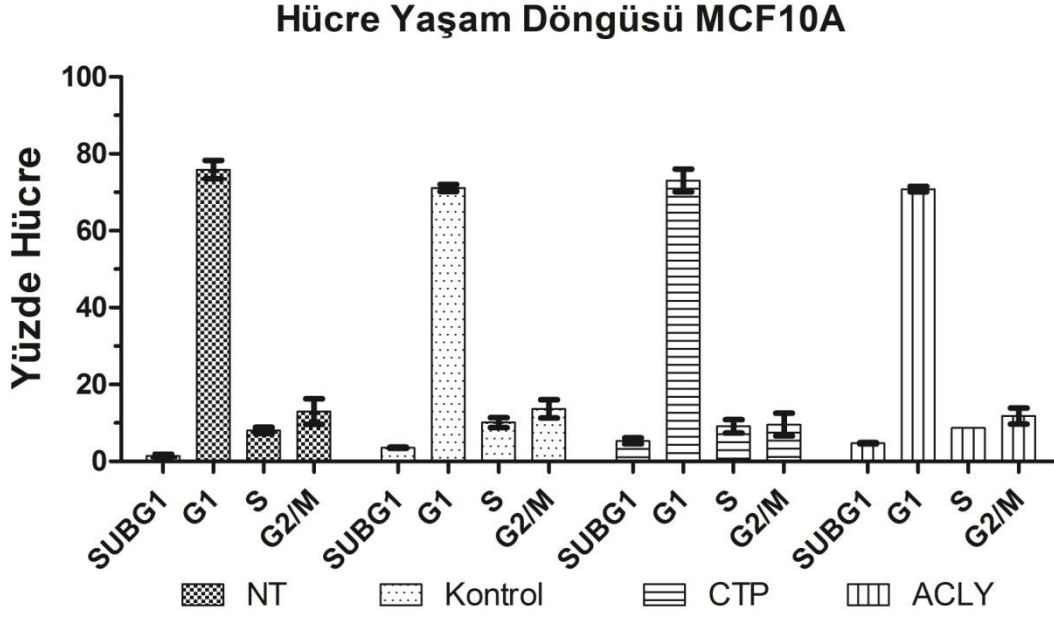
D

Tube: ACLY			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	20,000	###	100.0
P1	16,497	82.5	82.5
G1	11,570	70.1	57.8
S	1,432	8.7	7.2
G2	2,295	13.9	11.5
SUBG1	740	4.5	3.7

Şekil 23. MCF10A hücrelerinde siRNA uygulamasının hücre yaşam döngüsü üzerine etkileri. **A** NT-siRNA uygulanmamış hücreler. **B** Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. **C** CTP siRNA uygulanmış hücreler. **D** ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücrelere ait pikleri göstermektedir. X eksenini propidyum iyodüre ait ve DNA miktarını gösteren florasan sinyali göstermektedir. Y eksenine ise hücre sayısını belirtmektedir. Alt paneller piklerdeki hücre sayısını ifade etmektedir.



Şekil 24. MCF10A hücrelerinde siRNA uygulamasının hücre yaşam döngüsü üzerine etkilerinin akış sitometrik yöntemler ile belirlenmesinin tekrar verileri. A NT-siRNA uygulanmamış hücreler. B Kontrol siRNA uygulanmış hücreler. C CTP siRNA uygulanmış hücreler. D ACLY siRNA uygulanan hücreler. Üst paneller hücelere ait pikleri göstermektedir. X eksenini propidyum iyodüre ait ve DNA miktarını gösteren florasan sinyali göstermektedir. Y eksenini ise hücre sayısını belirtmektedir. Alt paneller piklerdeki hücre sayısını ifade etmektedir.



Şekil 25. MCF10A hücrelerinde siRNA uygulamasının hücre yaşam döngüsü üzerindeki etkilerinin şematik gösterimi. Sütunlar ortalama yüzde hücre değerlerini ve hata çubukları standart hata değerlerini ifade etmektedir.

4.6. İnhibisyonun Otofaji Üzerine Etkileri

HücreSEL fizyolojik süreçler arasında, hem hücre ölüm süreçleri ile hem de hücreSEL metabolizma ile doğrudan ilişkili olduğu için otofajinin CTP ve ACLY inhibisyonundan etkilenebileceği düşünülmektedir.

Hücrelerde inhibisyonun otofaji üzerine etkisi, otofagozom boyası olarak kullanılan akridin oranj ile tayin edilmiştir. Akridin oranj, normal pH seviyesindeki hücreSEL kompartmanlarda yeşil ve asidik veziküllerde turuncu renkte ışıma yapan florasan bir boyadır. Turuncu boyanan veziküllerin boyut ve dağılımı incelenerek otofajik süreçteki farklılıklar irdelenebilir. Ayrıca turuncu boyaya ait sinyalin akış sitometrik olarak takip edilmesiyle kantitasyon gerçekleştirilebilir.

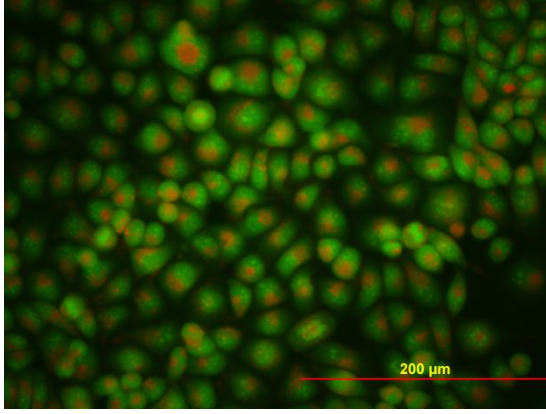
Mikroskopi çalışmalarında inhibisyonun otofaji üzerine herhangi bir etki gösterdiğini işaret eden bir bulguya rastlanmamıştır (Şekil 26). Asidik veziküllere ait turuncu boyanın dağılımı etkilere bağımsız olarak tüm örneklerde benzerdir.

Akış sitometri sonuçlarına göre hücrelerde akridin oranj'ın asidik veziküllere bağlanması sonucunda ortaya çıkan sinyale ait ikinci pik belirlenememiştir (Şekil 27 ve 28). Her ne kadar

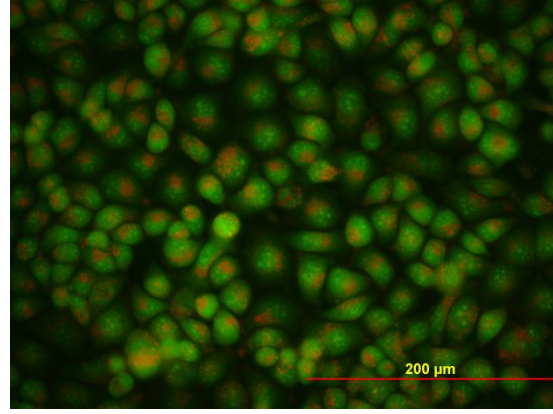
hücrelerde tetiklenen otofajiye ait bir sinyal belirlenmemiş olsa da, 10^3 değerinin üzerinde florasana ışık yapan hücreler sayılmış ve yüzde hücre cinsinden hesaplanan değerler grafiğe geçirilmiştir (Şekil 28). Elde edilen değerler istatistiksel anlamlılık açısından t testi ile değerlendirilmiş ve gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık belirlenmemiştir.



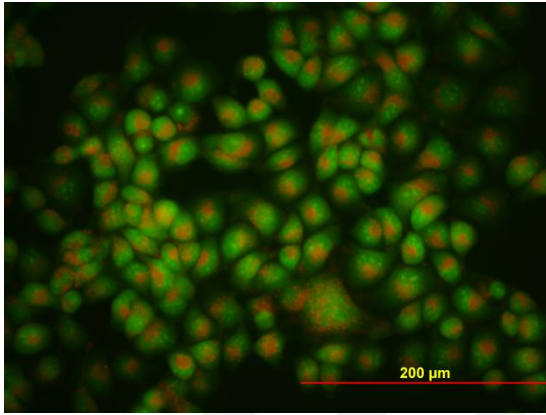
A NT



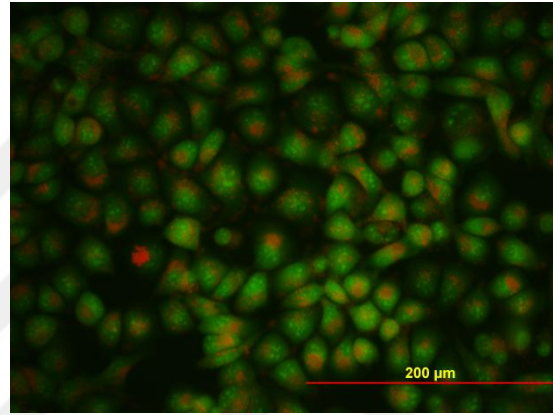
B KONTROL



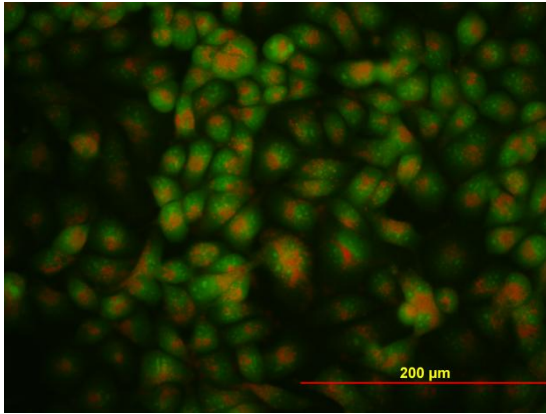
C CTP



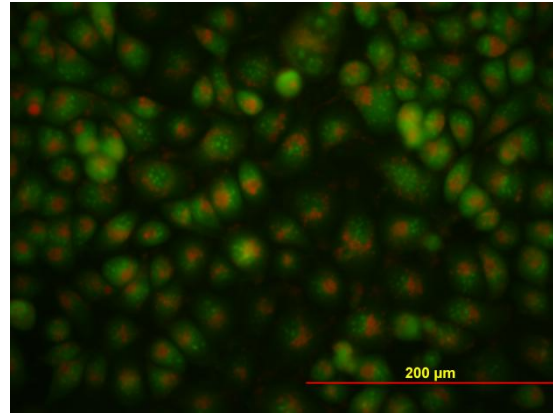
D ACLY



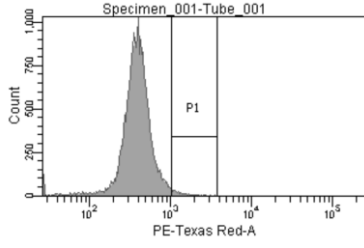
E DMSO



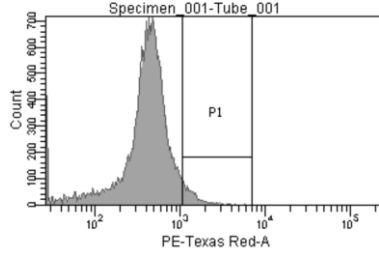
F CNASB



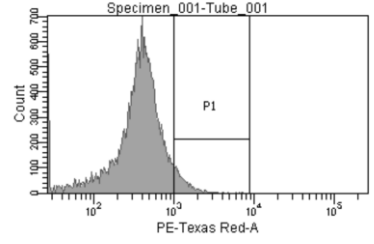
Şekil 26. İnhibisyonun otofaji üzerine etkilerinin akridin oranj boyaması ile gösterilmesi. A) Hiçbir uygulama yapılmamış hücreler, B) Kontrol siRNA, C) CTP siRNA, D) ACLY siRNA ile 72 saat muamele edilmiş hücreler, E) DMSO ve F) Kimyasal CTP inhibitörü ile muamele edilmiş hücreler. Asidik veziküllerin boyut ve dağılımında değişim belirlenememiştir.

A

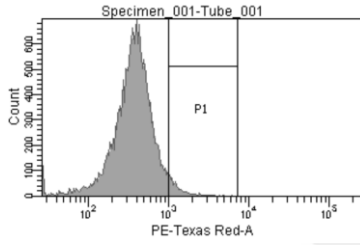
%1,1

B

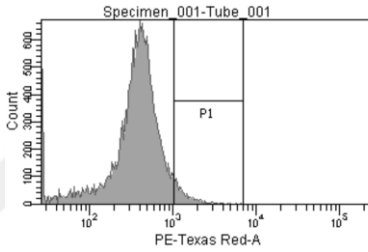
%3,9

C

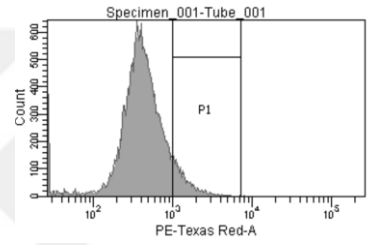
%5,5

D

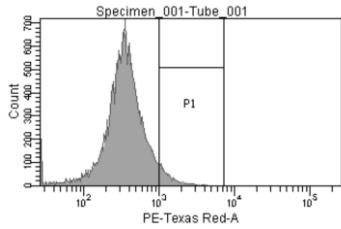
%3,5

E

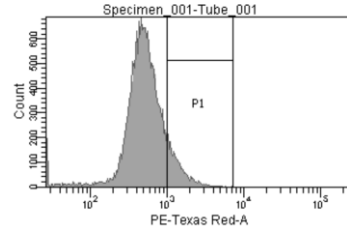
%4,3

F

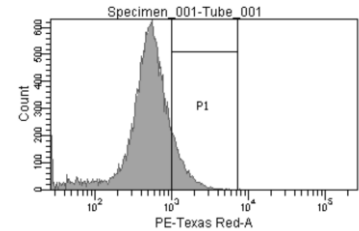
%6,7

G

%4,7

H

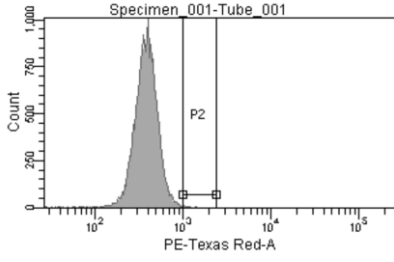
%11,7

I

%11,9

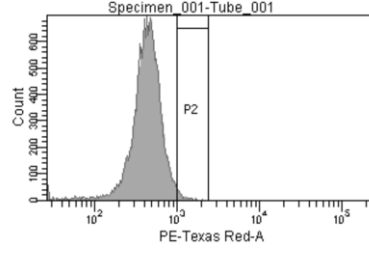
Şekil 27. CTP inhibisyonunun otofaji üzerine etkileri. **A-C)** MCF-7 hücreleri. **A)** NT (siRNA uygulaması yapılmamış) hücreleri, **B)** Kontrol siRNA (uygulanmış) hücreler, **C)** CTP (siRNA uygulanmış) hücreler. **D-F)** MDA-MB-231 hücreleri. **D)** NT **E)** Kontrol **F)** CTP. **G-I)** MCF10A hücreleri. **G)** NT **H)** Kontrol, **I)** CTP. Alt panellerde otofajik olduğu düşünülen (10^3 üzerinde turuncu floresan sinyal veren hücreler) hücrelerin yüzdesi verilmiştir.

A



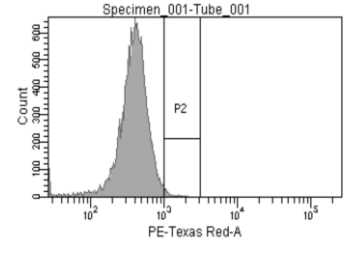
%0,1

B



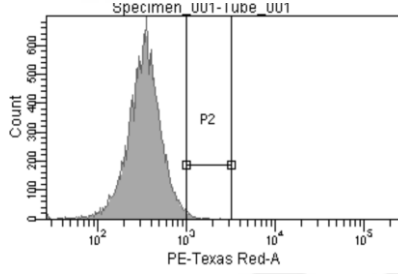
% 1,3

C



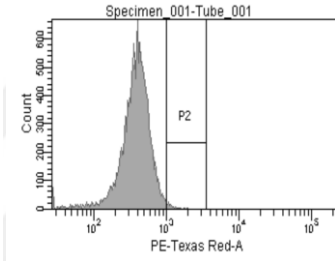
%0,9

D



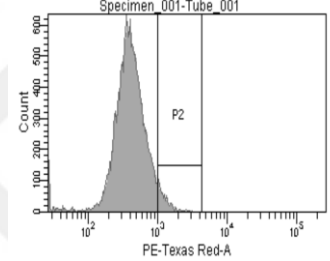
%0,8

E



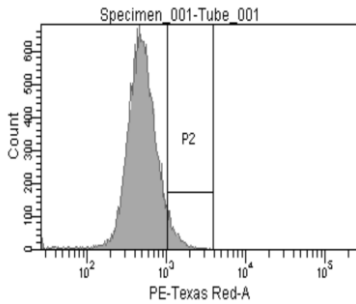
%0,9

F



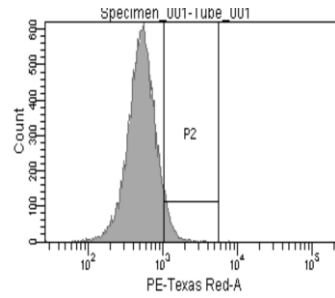
%4,4

G



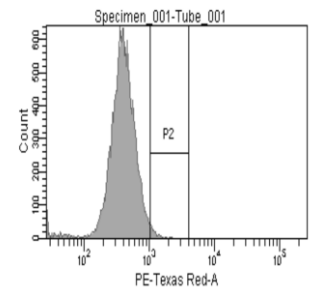
%5,2

H



%5,7

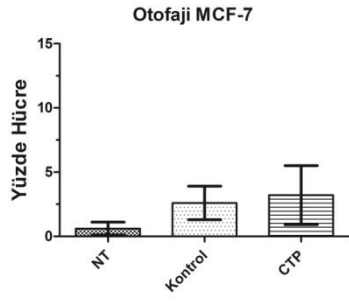
I



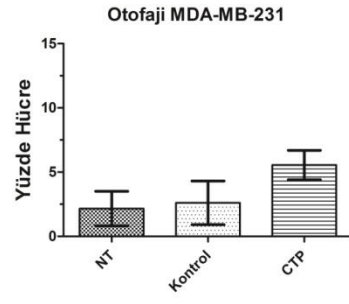
%1,4

Şekil 28. CTP inhibisyonunun otofaji üzerine etkilerinin akış sitometrik yöntemler ile belirlenmesinin tekrar verileri. A-C) MCF-7 hücreleri. A) NT (siRNA uygulaması yapılmamış) hücreleri, B) Kontrol siRNA (uygulanmış) hücreler, C) CTP (siRNA uygulanmış) hücreler. D-F) MDA-MB-231 hücreleri. D) NT E) Kontrol F) CTP. G-I) MCF10A hücreleri. G) NT H) Kontrol, I) CTP. Alt panellerde otofajik olduğu düşünülen (10^3 üzerinde turuncu florasan sinyal veren hücreler) hücrelerin yüzdesi verilmiştir.

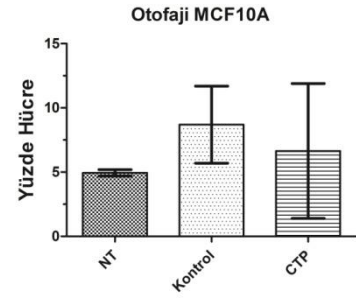
A



B



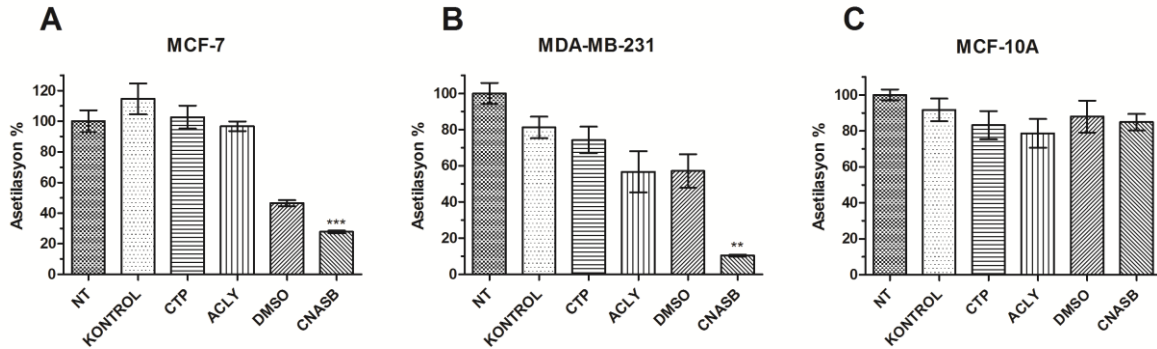
C



Şekil 29. CTP inhibisyonunun otofaji üzerine etkileri. Sütunlar ortalama yüzde hücre değerlerini ve hata çubukları standart hata değerlerini ifade etmektedir.

4.7. İnhibisyonun Histon Asetilasyonu Üzerine Etkileri

Ticari histon asetilasyon kiti ile belirlenen yüzde asetilasyon değerlerindeki CTP ve ACLY inhibisyonu nedeniyle meydana gelen değişiklikler aşağıdaki grafikte sunulmuştur (Şekil 30). Elde edilen sonuçlar hem CTP hem de ACLY'nin tüm hücre hatlarında histon asetilasyonunda azalmaya neden olduğunu göstermektedir. CTP inhibisyonu histon asetilasyonunu kontrol siRNA uygulanan hücrelere kıyasla; MCF-7 hücrelerinde %12,00, MDA-MB-231 hücrelerinde %6,95 ve MCF10A hücrelerinde %8,56 düzeyinde inhibe etmiştir. ACLY inhibisyonu ise MCF-7 hücrelerinde %17,87, MDA-MB-231 hücrelerinde %24,48 ve MCF10A hücrelerinde %13,12 düzeyinde histon asetilasyon inhibisyonuna neden olmuştur. Kimyasal inhibitör (CNASB) de taşıyıcısına (DMSO) kıyasla histon asetilasyonunu; MCF-7 hücrelerinde %18,76, MDA-MB-231 hücrelerinde %46,78 ve MCF-10A hücrelerinde %3,00 oranında inhibe etmiştir. Bu değişimlerden kimyasal inhibitörün MCF-7 (0,0074) ve MDA-MB-231 (0,0010) hücrelerinde tetiklediği değişimler istatistiksel açıdan anlamlıdır.



Şekil 30. Histon asetilasyon sonuçları. 72 saatlik siRNA muamelesinin sonucunda elde edilen histon asetilasyon yüzde değerleri tabloda sütun olarak, ilişkili standart hata değerleri ise hata çubuğu olarak sunulmuştur. T testi ile CNASB uygulamasının, DMSO uygulamasının etkileri ile karşılaştırılmasının istatistiksel analiz sonuçlarına göre anlamlılık (**) $p < 0,01$ ve (***) $p \leq 0,001$ olarak gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA

Kanser hücrelerindeki metabolik değişiklikler uzun süredir bilinmektedir. Bununla birlikte bu metabolik değişimlerin hücrelerin sağ kalımı için ne kadar önemli olduğu ve metabolik yolların kanserin tedavisi amacıyla hedeflenmesi fikri son yıllarda yaygınlaşmaya başlamıştır. Pek çok metabolik proteinin hedeflendiği çalışmalar arasında hekzokinaz inhibitörü ve glukoz homoloğu olan 2-deoksiglukoz (59) ile pirüvat dehidrogenaz inhibitörü ve pirüvat homoloğu olan 3-bromo-pirüvat (60) başarılı etkileriyle öne çıkmaktadır. Kanser metabolizmasında yağ asidi metabolizmasının hedeflenmesi de dikkat çeken hedefler arasındadır (46, 61). Özellikle 2005 yılında Thompson ve arkadaşlarının gerçekleştirdikleri çalışmada ATP-sitrat liyaz (ACLY) proteininin akciğer, over, prostat ve lösemi kanser hücrelerinin büyümesi için gerekli olduğunun *in vitro* ve *in vivo* koşullarda gösterilmesi, bu metabolik yolağın kanser araştırmaları açısından odak noktası haline gelmesini sağlamıştır (5, 40). ACLY, sitratın asetil-CoA ve okzaloasetata ayrıldığı tepkimeyi katalizlemektedir ve yağ asidi sentezinin hız kısıtlayıcı enzimidir. ACLY inhibisyonu aracılığı ile gerçekleşen büyüme inhibisyonunun mekanizması olarak yetersiz metabolit nedeniyle gerçekleşen hücre yaşam döngüsünde duraksama ve apoptoz önerilmektedir (62). Araştırmacılar kanser hücrelerinin sağ kalımı için sitoplazmik asetil-KoA'nın önemine dikkat çekmektedir (40, 62). Sitoplazmik asetil-KoA'nın kaynağını sitoplazmik sitrat oluşturmaktadır. Hücrelerde beta-oksidasyon, keton cisimlerinin ya da ketojenik amino asitlerin yıkımı ile mitokondride üretilen asetil-KoA sitoplazmaya sitrat formunda taşınır. Bu tezde sitratın sitoplazmaya taşınımından sorumlu olan sitrat transport proteininin (CTP) kanser hücreleri için önemi araştırılmıştır. Tezin hipotezi kanser hücrelerinin sağ kalımının sitoplazmik asetil-KoA düzeylerine ve dolayısıyla da CTP aktivitesine bağlı olduğu şeklinde oluşturulmuştur. Bu hipotezin test edilmesinde RNA interferans (siRNA) ve kimyasal temelli inhibiyan araç olarak kullanılmış; canlılık, apoptoz, hücre yaşam döngüsü, otofaji ve histon asetilasyonu süreçlerindeki değişiklikler incelenmiştir.

Bu tez ilk önerdiğinde konu ile ilgili; bazı kanserlerde mitokondriyal sitrat akışının daha fazla olduğunu gösteren ve 1982 yılında Kaplan ve çalışma arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş bir çalışma dışında yayımlanmış bir veri bulunmamaktaydı (52). Bununla birlikte projenin kabul edilmesinin ve ön çalışmaların başlamasının ardından Catalina-Rodriguez ve çalışma arkadaşları proteinin mitokondriyal homeostaz için gerekli olduğunu ve

inhibisyonunun normal hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerinde büyüme inhibisyonu tetiklediğini hücre kültürü ve zenograft modellerde göstermişlerdir (51). Bu çalışma kapsamında etkiler; küçük hücreli akciğer karsinoma hücre hattında *in vitro* ve *in vivo* koşullarda ve çeşitli hücre hatlarında yalnızca *in vitro* koşullarda CTP inhibisyonunun etkileri araştırılmıştır. Tartışmanın ilerleyen kısımlarında bu tez kapsamında elde edilen veriler bu çalışma verileriyle karşılaştırılacaktır.

Tez kapsamında proteinlerin RNA interferans aracılı inhibisyonları gerçekleştirilmiştir. Bu süreçte inhibisyonun protein düzeyindeki etkinliğinin incelenbilmesi amacıyla proteinlerin bazal ekspresyonları ve ekspresyon düzeylerindeki değişim western blot yöntemi ile incelenmiştir. Tüm hücre hatlarında (MCF-7, MDA-MB-231 ve MCF-10A) hem CTP hem de ACLY ekspresyonu belirlenmiş ve RNA interferans yöntemi ile bu ekspresyon 48 ve 72. saatlerde etkili bir şekilde susturulmuştur (Şekil 5, 6 ve 7). Catalina-Rodriguez çalışma grubunun verilerine göre MCF-10A hücrelerinde CTP ekspresyonu belirlenememiştir. Bu durum sitrat transport proteininin normal hücrelerde eksprese edilmediği-kanser hücrelerinde daha fazla eksprese edildiği şeklinde yorumlanmıştır (51). Bu sonuç araştırmacılar tarafından tercih edilen antikor ya da jelle yüklenen protein miktarının düşük olması nedeniyle gerçekleşmiş olabilir. Bizim çalışmamızda MCF-10A hücrelerinde CTP ekspresyonu siRNA aracılığıyla inhibe edilmiş ama bu inhibisyon hücre canlılığını etkilememiştir.

MCF-7 hücre hattında CTP antikoruna 30 kDa civarında fazladan bir bant vermiştir. Bu bant oldukça silik olmakla birlikte MCF-10A hücre hattında da görülmektedir. Bandın koyuluğunda CTP siRNA aracılı bir azalma görülmüş olması bağlanılan proteininin CTP'nin henüz bilinmeyen bir izoformu ya da post-translasyonel modifiye CTP olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 5 ve 7).

Western Blot sonuçlarına göre CTP inhibisyonu ACLY ekspresyonunda azalmaya neden olmuştur (Şekil 5, 6 ve 7). Bunun bir “*feed-forward*” inhibisyon mekanizması olabileceğini öngörmekteyiz. Buna göre: CTP inhibe edildiğinde sitoplazmaya geçen sitrat düzeyi azalmaktadır ve bu denklemlerle daha az ACLY ekspresyonuna ihtiyaç duyulmakta ve ACLY inhibisyonu da azalmaktadır. Şüphesiz bu olası mekanizmanın aydınlatılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Buna benzer bir veri literatürde bulunmamaktadır.

Şüphesiz CTP aktivitesinin inhibisyonunu gösteren tek parametre proteinin ekspresyonu değildir. Mitokondride üretilen sitratın sitoplazmaya geçişindeki azalma sonucunda

sitoplazmik sitrat düzeylerinin düşmesi CTP inhibisyonunun bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Elde ettiğimiz sonuçlar kanser hücre hatlarında (MCF-7 ve MDA-MB-231) CTP inhibisyonunun sitoplazmik sitrat düzeylerini kontrol siRNA'ya göre azalttığını göstermektedir (Şekil 9A ve 9B). Bununla birlikte azalmalar oldukça düşük düzeydedir ve sadece MDA-MB-231 hücre hattında anlamlıdır. Normal epitel meme hücrelerinde ise CTP inhibisyonu sitoplazmik sitrat düzeylerini etkilememiştir (Şekil 9C). Bu sonuç CTP aktivitesinin kanser hücreleri için normal hücrelere kıyasla daha önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

Ayrıca çalışma kapsamında kontrol siRNA uygulanan hücrelerde hiçbir şey uygulanmayan hücrelere kıyasla sitrat düzeylerinde artış görülmüştür (Şekil 9). Bu artışın olası nedeni RNA transfeksiyonu sırasında oluşan taşıyıcı lipozomların ekstraselüler sitratı hücre içine aktarmasıdır.

Sitrat tayini çalışması aynı zamanda hücrelerdeki bazal sitoplazmik sitrat düzeylerinin de belirlenmesini mümkün kılmıştır. Bazal düzeyler incelendiğinde normal hücrelerde sitrat düzeyinin en düşük olduğu ve kanserlere metastatik ileri evre meme kanserini temsil eden MDA-MB-231 hücrelerindeki sitrat düzeyinin daha iyi prognozlu meme kanserini temsil eden MCF-7 hücrelerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu veriler sitoplazmik sitrat düzeylerinin karsinogenez açısından önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

Hücre canlılığı herhangi bir etkenin normal fizyolojik süreç üzerine etkilerini irdeleyen çalışmalarda en sık incelenen parametredir. Tez çalışmasının sonuçlarına göre her iki proteinin de (CTP ve ACLY) inhibisyonu kanser hücrelerinde (MCF-7 ve MDA-MB231) büyüme inhibisyonuna neden olmaktadır (Şekil 8 ve Tablo 4). Bu veriler özellikle ACLY için literatürdeki çalışma sonuçları ile uyumludur. Aynı zamanda CTP ve ACLY siRNA uygulamaları normal epitel hücreleri temsil eden MCF-10A hücrelerinde büyüme inhibisyonuna neden olmamıştır. Bu sonuçlar da Catalina-Rodriguez ve Thompson çalışma gruplarının elde ettiği verilerle uyumludur (5, 51). CTP ve ACLY inhibisyonu normal hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerinde büyüme inhibisyonuna neden olmuştur. Ayrıca iki protein birbirleriyle kıyaslandığında ACLY aracılığıyla gerçekleşen büyüme inhibisyonu CTP aracılığıyla gerçekleşen büyüme inhibisyonundan daha etkilidir. Bu sonuçlar canlılık verilerinin sitoplazmik sitrat düzeyleri ile paralellik gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Çalışma kapsamında CTP ve ACLY inhibisyonu ile tetiklenen ve büyüme inhibisyonunu açıklayabilecek düzeyde apoptoz belirlenmemiştir (Şekil 16). Her ne kadar bazı uygulamalarda apoptotik hücre sayısındaki artış istatistiksel anlamlılığa ulaşsa da toplam apoptotik hücre yüzdesi %10'un altındadır ve bu da CTP/ACLY siRNA aracılığıyla gerçekleşen canlılık inhibisyonunu açıklamakta yetersizdir. Bu verilerle uyumlu bir biçimde Thompson grubunun sonuçları da ACLY inhibisyonunun apoptotik bir etkiye neden olmadığını göstermiştir (5). Buna karşın bazı diğer çalışmalarda ACLY inhibisyonu ile apoptozun tetiklenebildiği gösterilmiştir (62, 63). Bununla birlikte bu çalışmalar meme kanserinde gerçekleştirilmemiştir. ACLY inhibisyonunun apoptotik etkileri hücre hattına bağımlı olabilir. Catalina-Rodriguez çalışma grubu CTP proteininin kimyasal inhibisyonunun veya aktif olmayan mutant CTP ekspresyonunun apoptotik etkiye neden olduğunu göstermiştir (51). Bununla birlikte aynı çalışmada RNA interferans ile CTP inhibisyonu gerçekleştirilen örneklerdeki apoptoz düzeylerine ait bir veri bulunmamaktadır.

Benzer şekilde tez çalışmasında hücre yaşam döngüsünde de büyüme inhibisyonunu açıklayabilecek düzeyde bir değişim görülmemiştir (Şekil 19, 22 ve 25). Özellikle ACLY inhibisyonunun etki mekanizmasının açıklanmasında sıklıkla hücre yaşam döngüsündeki duraksamalar öne çıkmaktadır (62, 63). Bununla birlikte bu çalışmalar meme kanserinde gerçekleştirilmemiştir. Apoptozda olduğu gibi hücre yaşam döngüsünün regülasyonunda da ACLY inhibisyonuna verilen hücresel yanıt, hücre hattına göre değişiklik gösterebilir. Catalina-Rodriguez ve arkadaşlarının çalışmasında, CTP'nin inhibisyonunun akciğer kanseri hücrelerinde hücre yaşam döngüsü üzerine etkileri incelenmiş ve bir duraksama belirlenmemiştir (51).

Tez kapsamında elde edilen veriler CTP inhibisyonunun hücrelerde otofajik bir yanıtı neden olmadığını göstermekedir (Şekil 28 ve 29). CTP proteininin inhibisyonunun otofaji aracılığıyla mitokondri kaybına neden olduğu ve CTP inhibisyonunun anti-kanser etkilerinin bu mekanizmaya bağlı olduğu iddia edilmektedir (51). Hatta aynı çalışmada otofajinin CTP ile birlikte inhibisyonu mitokondriyal homeostazı geri getirmiştir. Çalışmamızda akrinin oranj yöntemi ile hücreler boyanarak florasan mikroskopta inceleme gerçekleştirilmiş ve aynı boya ile asidik vezikül birikimi akış sitometride belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre CTP inhibisyonu asidik veziküllerin mikroskopik görünümünde bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 26). Benzer şekilde akış sitometri verilerine göre otofajik hücre sayısında yeni bir pik oluşturacak düzeyde bir artış görülmemiştir (Şekil 27 ve 28). Bununla birlikte diğer

bulgulara olduğu gibi bu veri meme kanserinde ilk kez gösterilmiştir. Catalina-Rodriguez çalışma grubunun çalışması embrijyenik böbrek hücrelerinde gerçekleştirilmiştir (51) ve otofaji yanıtı da tıpkı apoptoz ve yaşam döngüsü yanıtları gibi hücre hattına bağımlı olabilir.

Çalışma kapsamında incelenen hücresel parametrelerden birisi de histon asetilasyonudur. Histon asetilasyonunun gerçekleşebilmesi için sitoplazmik asetil-CoA'ya, dolayısıyla da sitoplazmik sitrata ihtiyaç vardır. Elde edilen veriler her iki proteinin de (CTP ve ACLY) inhibisyonunun tüm hücrelerde (MCF-7, MDA-MB-231, MCF-10A) histon asetilasyonunda azalmaya neden olduğu göstermiştir (Şekil 30). Bu sonuç ACLY için Wellen ve arkadaşlarının elde ettiği veriler ile uyumludur (6). CTP proteinin ise histon asetilasyonu için önemli olduğu bu tez ile ilk kez gösterilmiştir. Ayrıca Wellen ve arkadaşları çalışmalarını glioblastoma ve kolon kanseri hücre hatlarında gerçekleştirilmiştir (6). Bu nedenle bu tez kapsamında meme kanseri hücre hatlarında ve immortalize meme epitel hücrelerinde ACLY'nin histon asetilasyonu açısından önemi ilk kez ortaya konduğu söylenebilir. Çalışmamızda elde edilen veriler ACLY inhibisyonunun CTP inhibisyonuna kıyasla histon asetilasyonunu daha fazla inhibe ettiğini göstermektedir. Bu histon asetilasyonu verilerinin hem canlılık hem de sitoplazmik sitrat düzeyleri ile paralel bir şekilde azaldığını göstermektedir.

Tez kapsamında CTP'nin inhibisyonu için kullanılan tekniklerden birisi de kimyasal inhibisyonudur. Bu amaçla 4-kloro-3-3-nitrofenil-amino-sülfonil benzoik asit (CNASB) kullanılmıştır. CNASB ilk kez Aluvila ve arkadaşları tarafından 2010 yılında geliştirilmiştir (56). Bu çalışma başladığında CNASB henüz hücre kültüründe test edilmemişti fakat Kolukula ve arkadaşları 2014'de CNASB'nin akciğer kanseri hücre hattında canlılık inhibisyonuna neden olduğunu göstermişlerdir (53). Bu tez çalışmasında elde edilen veriler de bu sonucu doğrulamaktadır. CNASB hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücrelerinde anlamlı düzeyde canlılık inhibisyonuna neden olmaktadır (Şekil 8 ve Tablo 3). Hatta bu etki CTP ve ACLY siRNA'nın etkilerinden fazladır. SiRNA denemelerine paralel şekilde CNASB da MCF-10A normal epitel hücrelerinde canlılık inhibisyonuna neden olmamıştır.

Benzer bir sonuç sitoplazmik sitrat düzeyleri tayin edilirken de elde edilmiştir. CNASB çalışılan tüm hücre hatlarında sitoplazmik sitrat düzeylerini etkili ve anlamlı bir biçimde düşürmeyi başarmıştır (Şekil 9 ve Tablo 4). Son olarak CNASB uygulaması MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde histon asetilasyonunun anlamlı düzeyde inhibisyona neden olmuştur.

Tüm bu denemelerde CNASB'ın CTP siRNA'dan daha etkili olduğu gösterilmiştir. CTP siRNA'nın daha spesifik olması nedeniyle ilk bakışta bu sonucun nedeninin kimyasalın CTP'den bağımsız etkilerinden kaynaklandığı iddia edilebilir. Buna karşın CNASB sitoplazmik sitrat düzeylerini başarılı bir biçimde düşürmüştür. Sitoplazmik sitrat düzeyleri ölçülürken protein miktarlarına göre düzeltme yapıldığı için bu düşük değerlerin nedeni azalmış hücre sayısı olamaz. Bizim bu konuda oluşturduğumuz hipotez şu şekildedir: CNASB CTP siRNA'dan daha etkidir çünkü CTP ile benzer homoloji gösteren ve plazma membranına lokalize sitrat taşıyıcılarını da inhibe etmektedir. Bu hipotez plazma membranında bulunan SLC13 ailesine üye sitrat taşıyıcı proteinlerin evrimsel kökenlerinin CTP (SLC15A1) proteini ile aynı olduğunun belirlenmesi ile desteklenmektedir (64). Ayrıca bu tez kapsamında bu hipotezi destekleyen çeşitli veriler elde edilmiştir. Öncelikle CNASB sitoplazmik sitrat düzeylerini CTP siRNA'ya kıyasla daha fazla azaltmaktadır. Teorik olarak sitoplazmik sitratın bir diğer kaynağı da ekstraselüler matriksde bulunan sitrat olabilir. Bu durumda CTP fonksiyonu es geçilerek SCL13 proteinleri aracılığıyla doğrudan sitoplazmik sitrat elde edilebilir ve CNASB bu yolağı inhibe ederek sitoplazmik sitratı düşürebilir. Son olarak histon asetilasyonunun inhibisyonunda da CNASB siRNA'lara kıyasla daha fazla etki göstermiştir (Şekil 30) ve bu veri de tartışamda bahsedilen diğer veriler ile uyumludur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu tez çalışmasında:

- Normal meme epitel hücre hattı (MCF-10A) ile meme kanseri hücre hattında CTP ve ACLY proteinlerinin ekspresyonları belirlenmiş ve bu ekspresyonlar ilgili siRNA'lar kullanılarak etkili bir biçimde susturulmuştur. Ayrıca hücrelerde CTP spesifik CNASB inhibitörü ile kimyasal inhibisyon gerçekleştirilmiştir.
- CTP'nin siRNA ile inhibisyonu sitoplazmik sitrat düzeylerinde kısmi bir düşüşe neden olurken kimyasal inhibitör çok daha etkili olmuştur. Bazal sitoplazmik sitrat düzeyleri karşılaştırılmış ve kanser agresifliği ile sitrat düzeyleri arasında ilişki olduğu belirlenmiştir.
- İnhibisyonların canlılık üzerine etkileri incelenmiş ve her iki siRNA'nın da yalnızca kanser hücre hatlarında canlılıkta azalmaya neden olduğu ve ACLY siRNA'nın daha etkili olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte CTP kimyasal inhibitörü siRNA'lara kıyasla daha etkili olmuştur.
- Canlılık inhibisyonlarının nedenlerine odaklandığında kayda değer ölçüde tetiklenen apoptoz, nekroz, hücre yaşam döngüsünde tutuklama ya da otofaji belirlenmemiştir.
- Hücrelerde inhibisyonların histon asetilasyonuna etkileri de incelenmiş ve sitoplazmik sitrat düzeyleri ile uyumlu bir biçimde CNASB'nin tüm siRNA'lardan, ACLY siRNA'nın ise CTP siRNA'dan daha etkili bir biçimde inhibisyona neden olduğu ortaya konmuştur.

Bu veriler ışığında sitoplazmik asetil-CoA'nın canlılık ve histon asetilasyonu açısından önemli olduğu ve bu metabolitin kaynağı olan sitoplazmik sitratın azaltılmasıyla bu süreçlere girişim yapılabileceği gösterilmiştir. Kimyasal inhibisyonun siRNA inhibisyonuna göre daha etkili olması, sitoplazmik sitrat kaynağı olarak ekstraselüler alandan SLC13 proteinleri aracılığıyla geçiş yapan sitrat metabolitlerinin önemli olduğuna ve bu proteinlerin kimyasal inhibitörden etkilendiklerine işaret etmektedir. Bu hipotezin kanıtlanabilmesi için SLC13 ailesine ait proteinlerin inhibisyonunun hücresel etkilerinin irdelenmesi gerekmektedir. Bununla birlikte CTP'nin hedeflenmesi ile tetiklenen sitoplazmik sitrat azalması, histon asetilasyonunun ve canlılığın inhibisyonu kısıtlı düzeylerde kalmıştır. Bu veriler açıkça ACLY'nin hedeflenmesinin bu süreçlere müdahale

etmek açısından daha avantajlı olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte her iki proteinin inhibisyonunun da normal hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerinde etkili olması bu proteinlerin hedeflenmesinin kanser terapi stratejileri açısından avantajlı olabileceğini göstermektedir. Bu tip çalışmalara devam edilmesi kanserde, kanser tipinden bağımsız ortak bir özellik olarak ortaya çıkan kanser metabolizmasının anlaşılması açısından önemlidir. Benzer hedeflerin keşfedilmesi ve etkili inhibitörler kullanılarak hedeflenmesi pek çok kanser türünde kullanılabilecek alternatif terapi yaklaşımlarının ortaya çıkmasına ön ayak olacaktır. Özellikle kısmi spesifiklik gösteren kimyasal inhibitörlerin aynı metabolitle ilişkili birden fazla yolağı inhibe edebilmesi, uygun yolaklar hedeflendiğinde kolaylıkla avantaja dönüştürülebilecek bir durumdur. Son olarak kanserin biyokimyasal temellerinin daha net bir şekilde tanımlanması bu yolak ve metabolitlerin kanser hücrelerindeki canlılık, apoptoz, nekroz, otofaji, hücre yaşam döngüsü ve epigenetik değişimler gibi diğer süreçlerle ilişkisinin daha iyi bir şekilde anlaşılmasını sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell*. 2008;13(6):472-82.
2. Hanahan D, Weinberg Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
3. Menendez JA, Decker JP, Lupu R. In support of fatty acid synthase (FAS) as a metabolic oncogene: Extracellular acidosis acts in an epigenetic fashion activating FAS gene expression in cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2005;94(1):1-4.
4. Menendez J, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(10):763-77.
5. Hatzivassiliou G, Zhao FP, Bauer DE, Andreadis C, Shaw AN, Dhanak D, et al. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell*. 2005;8(4):311-21.
6. Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. ATP-Citrate Lyase Links Cellular Metabolism to Histone Acetylation. *Science*. 2009;324(5930):1076-80.
7. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2011;61(2):69-90.
8. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012;481(7381):306-13.
9. Harris TJR, McCormick F. The molecular pathology of cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2010;7(5):251-65.
10. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458(7239):719-24.
11. Hudson TJ, Anderson W, Aretz A, Barker AD, Bell C, Bernabe RR, et al. International network of cancer genome projects. *Nature*. 2010;464(7291):993-8.
12. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*. 2011;11(2):85-95.
13. Heiden MGV, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-33.
14. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*. 2011;11(5):325-37.
15. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14.
16. Frezza C, Gottlieb E. Mitochondria in cancer: Not just innocent bystanders. *Seminars in Cancer Biology*. 2009;19(1):4-11.
17. Funes JM, Quintero M, Henderson S, Martinez D, Qureshi U, Westwood C, et al. Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(15):6223-8.

18. Fogal V, Richardson AD, Karmali PP, Scheffler IE, Smith JW, Ruoslahti E. Mitochondrial p32 Protein Is a Critical Regulator of Tumor Metabolism via Maintenance of Oxidative Phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*. 2010;30(6):1303-18.
19. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. *Cell*. 2008;134(5):703-7.
20. Shaw RJ. Glucose metabolism and cancer. *Current Opinion in Cell Biology*. 2006;18(6):598-608.
21. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *Journal of Cellular Physiology*. 2005;202(3):654-62.
22. Katabi MM, Chan HLB, Karp SE, Batist G. Hexokinase type II: a novel tumor-specific promoter for gene-targeted therapy differentially expressed and regulated in human cancer cells. *Human gene therapy*. 1999;10(2):155-64.
23. Durany N, Joseph J, Jimenez OM, Climent F, Fernandez PL, Rivera F, et al. Phosphoglycerate mutase, 2,3 bisphosphoglycerate phosphatase, creatine kinase and enolase activity and isoenzymes in breast carcinoma. *British Journal of Cancer*. 2000;82(1):20-7.
24. Vora S, Halper JP, Knowles DM. Alterations in the activity and isozymic profile of human phosphofructokinase during malignant transformation in vivo and in vitro: transformation-and progression-linked discriminants of malignancy. *Cancer research*. 1985;45(7):2993-3001.
25. El-Bacha T, de Freitas MS, Sola-Penna M. Cellular distribution of phosphofructokinase activity and implications to metabolic regulation in human breast cancer. *Molecular genetics and metabolism*. 2003;79(4):294-9.
26. Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Seminars in Cancer Biology*. 2005;15(4):300-8.
27. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*. 2008;452(7184):230-U74.
28. Wong N, De Melo J, Tang D. PKM2, a central point of regulation in cancer metabolism. *International journal of cell biology*. 2013;2013.
29. Boros LG, Lee PWN, Brandes JL, Cascante M, Muscarella P, Schirmer WJ, et al. Nonoxidative pentose phosphate pathways and their direct role in ribose synthesis in tumors: is cancer a disease of cellular glucose metabolism? *Medical Hypotheses*. 1998;50(1):55-9.
30. Langbein S, Zerilli M, zur Hausen A, Staiger W, Rensch-Boschert K, Lukan N, et al. Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted. *British Journal of Cancer*. 2006;94(4):578-85.
31. Ramos-Montoya A, Lee WNP, Bassilian S, Lim S, Trebukhina RV, Kazhyna MV, et al. Pentose phosphate cycle oxidative and nonoxidative balance: A new vulnerable target for overcoming drug resistance in cancer. *International Journal of Cancer*. 2006;119(12):2733-41.
32. McFate T, Mohyeldin A, Lu H, Thakar J, Henriques J, Halim ND, et al. Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(33):22700-8.

33. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Gatter KC, Harris AL, Tumor Angiogenesis Res G. Pyruvate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase kinase expression in non small cell lung cancer and tumor-associated stromal. *Neoplasia*. 2005;7(1):1-6.
34. Roche TE, Hiromasa Y. Pyruvate dehydrogenase kinase regulatory mechanisms and inhibition in treating diabetes, heart ischemia, and cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007;64(7-8):830-49.
35. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Tumor Angiogenesis Res G. Lactate dehydrogenase isoenzymes 1 and 5: Differential expression by neoplastic and stromal cells in non-small cell lung cancer and other epithelial malignant tumors. *Tumor Biology*. 2003;24(4):199-202.
36. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Bougioukas G, Didilis V, Gatter KC, et al. Lactate dehydrogenase-5 (LDH-5) overexpression in non-small-cell lung cancer tissues is linked to tumour hypoxia, angiogenic factor production and poor prognosis. *British Journal of Cancer*. 2003;89(5):877-85.
37. Gallagher SM, Castorino JJ, Wang D, Philp NJ. Monocarboxylate transporter 4 regulates maturation and trafficking of CD147 to the plasma membrane in the metastatic breast cancer cell line MDA-MB-231. *Cancer Research*. 2007;67(9):4182-9.
38. Chiche J, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2010;14(4):771-94.
39. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood*. 2007;109(9):3812-9.
40. Bauer DE, Hatzivassiliou G, Zhao FP, Andreadis C, Thompson CB. ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. *Oncogene*. 2005;24(41):6314-22.
41. Fuchs BC, Bode BP. Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: Partners in crime? *Seminars in Cancer Biology*. 2005;15(4):254-66.
42. Gao P, Tchernyshyov I, Chang T-C, Lee Y-S, Kita K, Ochi T, et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*. 2009;458(7239):762-5.
43. Matoba S, Kang J-G, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, et al. p53 Regulates Mitochondrial Respiration. *Science*. 2006;312(5780):1650-3.
44. Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2 Mutations in Cancer: Alterations at a Crossroads of Cellular Metabolism. *Journal of the National Cancer Institute*. 2010;102(13):932-41.
45. King A, Selak MAa, Gottlieb E. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene*. 2006;25(34):4675-82.
46. Mashima T, Seimiya H, Tsuruo T. De novo fatty-acid synthesis and related pathways as molecular targets for cancer therapy. *British Journal of Cancer*. 2009;100(9):1369-72.
47. Brusselmans K, De Schrijver E, Verhoeven G, Swinnen JV. RNA interference-mediated silencing of the Acetyl-CoA-Carboxylase-alpha gene induces growth inhibition and apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Research*. 2005;65(15):6719-25.
48. Chajes V, Cambot M, Moreau K, Lenoir GM, Joulin V. Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Research*. 2006;66(10):5287-94.

49. De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W, Verhoeven G, Swinnen JV. RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Research*. 2003;63(13):3799-804.
50. Baron A, Migita T, Tang D, Loda M. Fatty acid synthase: A metabolic oncogene in prostate cancer? *Journal of Cellular Biochemistry*. 2004;91(1):47-53.
51. Catalina-Rodriguez O, Kolukula VK, Tomita Y, Preet A, Palmieri F, Wellstein A, et al. The mitochondrial citrate transporter, CIC, is essential for mitochondrial homeostasis. *Oncotarget*. 2012;3(10):1220-35.
52. Kaplan RS, Morris HP, Coleman PS. Kinetic characteristics of citrate influx and efflux with mitochondria from morris hepatomas-3924a and morris hepatomas 16. *Cancer Research*. 1982;42(11):4399-407.
53. Kolukula VK, Sahu G, Wellstein A, Rodriguez OC, Preet A, Iacobazzi V, et al. SLC25A1, or CIC, is a novel transcriptional target of mutant p53 and a negative tumor prognostic marker. *Oncotarget*. 2014.
54. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature reviews genetics*. 2002;3(6):415-28.
55. Csordas A. On the biological role of histone acetylation. *Biochemical journal*. 1990;265(1):23.
56. Aluvila S, Sun J, Harrison DHT, Walters DE, Kaplan RS. Inhibitors of the mitochondrial citrate transport protein: Validation of the role of substrate binding residues and discovery of the first purely competitive inhibitor. *Molecular pharmacology*. 2010;77(1):26-34.
57. Morgan DML. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. *Polyamine Protocols*: Springer; 1998. p. 179-84.
58. Vega-Avila E, Pugsley MK, editors. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells 2011.
59. Zhao YH, Liu H, Riker AI, Fodstad O, Ledoux SP, Wilson GL, et al. Emerging Metabolic Targets in Cancer Therapy. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2011;16:1844-60.
60. Ko YH, Smith BL, Wang Y, Pomper MG, Rini DA, Torbenson MS, et al. Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;324(1):269-75.
61. Young CD, Anderson SM. Sugar and fat - that's where it's at: metabolic changes in tumors. *Breast Cancer Research*. 2008;10(1).
62. Migita T, Narita T, Nomura K, Miyagi E, Inazuka F, Matsuura M, et al. ATP Citrate Lyase: Activation and Therapeutic Implications in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer research*. 2008;68(20):8547-54.
63. Zaidi N, Royaux I, Swinnen JV, Smans K. ATP citrate lyase knockdown induces growth arrest and apoptosis through different cell-and environment-dependent mechanisms. *Molecular cancer therapeutics*. 2012;11(9):1925-35.
64. Pajor AM. Molecular properties of the SLC13 family of dicarboxylate and sulfate transporters. *Pflügers Archiv*. 2006;451(5):597-605.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı : Ali Burak Özkaya
Doğum Yeri ve Tarihi : 1984, Isparta
Adres : Mansuroğlu mah. 273/1 sok. No:36/4 Cemre apt. B blok
Daire: 11 Bayraklı / İzmir
Telefon : 05054564118
E-mail : aliburakozkaya@gmail.com,
aliburakozkaya@hotmail.com



EĞİTİM BİLGİLERİ ve İŞ DENEYİMİ

Lisans : Biyokimya (Biyoteknoloji Opsiyonu), Ege Üniversitesi, İzmir. 2002-2006.

Yüksek Lisans : Tıbbi Biyokimya, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir. 2006-2009.

Yüksek Lisans Tezi : **HCT116 Kolon Kanseri Hücre Hattında, Yeşil Çay Etken Maddesi Olan EGCG'nin Apoptoz Etki Mekanizmasının İncelenmesi.** Araştırmacı olarak çalıştığım bu proje TÜBİTAK Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı (1001- 108S088) tarafından desteklenmiştir.

Doktora : Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir. 2010-2015

Doktora Tezi : **Sitrat Transport Protein İnhibisyonunun Meme Kanseri Hücreleri Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması.** Bursiyer olarak çalıştığım bu proje TÜBİTAK Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı (1001- 111S439) tarafından desteklenmiştir.

Akademik Görevler ve İş Tecrübesi:

Tübitak Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Stajyer (Ağustos-Eylül 2005)

Dokuz Eylül Tıp Fakültesi (İzmir), Biyokimya Bölümü, Araştırma Görevlisi (Mart-Ekim 2009)

MD Anderson Kanseri Merkezi (Houston, USA), Deneysel Tedavi Bölümü, Araştırmacı (Kasım 2009-Haziran 2010)

Ulm Üniversitesi (Ulm, Almanya), Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Konuk Araştırmacı (30 Haziran-27 Ağustos 2011)

Onvivo Diyagnostik Ve Biyoteknoloji Ürünleri Ar-Ge San. Ve Tic. Ltd. Şti, Ar-Ge Sorumlusu (Mayıs-Aralık 2014)

Targemed Ar-Ge Medikal. San. Ve Tic. A. Ş, Ar-Ge Sorumlusu (Şubat 2015- Halen devam ediyor)

YAYINLAR

Targeting Mitochondrial Citrate Transport in Breast Cancer Cell Lines. Ozkaya AB, AK H, Atay S, Aydin HH. Anticancer Agents Med Chem. 2014 Dec 16. doi:10.2174/1871520615666141216150659

Increased expression of electron transport chain genes in uterine leiomyoma. Tuncal, Aydin HH, Askar N, Ozkaya AB, Ergenoglu AM, Yeniel AO, Akdemir A, Ak H. Ann Clin Lab Sci. 2014 Fall;44(4):466-8.

Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in the Turkish population. Guney O, Ak H, Atay S, Ozkaya AB, Aydin HH. Mitochondrion. 2014 May 2;17C:7-13. doi: 10.1016/j.mito.2014.04.013.

Overexpression of complement C5 in endometriosis. Aslan C, Ak H, Askar N, Ozkaya AB, Ergenoglu AM, Yeniel AO, Akdemir A, Aydin HH. Clin Biochem. 2013 Dec 5. pii: S0009-9120(13)00550-X. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.11.020.

Phenotype properties and status of corticosteroid resistance among patients with uncontrolled asthma. Cimrin AH, Akpınar B, Tertemiz KC, Omeroglu G, Alpaydin AO, Ellidokuz H, Ozkaya AB, Kocturk S. Allergol Immunopathol (Madr). 2013 Sep-Oct;41(5):304-9. doi: 10.1016/j.aller.2012.04.009.

Apoptotic Effect of (-)-Epigallocatechin-3-Gallate on HCT-116 Colon Carcinoma Cells. Özkaya AB, Akpınar B, Ateş H, Altun ZS, Koçtürk AS. Iubmb Life. 2009. 61:325-325.

LABORATUAR DENEYİMİ

- Memeli Hücre Kültürü
- Hücre Canlılık ve Proliferasyon Denemeleri (Triphan Blue, MTT, WST1, BRDU, Crystal Violet)
- Flow Sitometrik Analizler (Cell Cycle Analysis, Annexin-V-PI, Acridine Orange)
- Florasan Mikroskopi
- Protein Analiz Teknikleri (SDS-PAGE, Western Blot)
- DNA/RNA Analiz Teknikleri (Agaroz Jel Elektroforezi, Real-Time PCR, Microarray Veri Analizi)
- Telomeraz Aktivite Tayini (TRAPEZ)
- Spektrofotometrik yöntemler.
- Deney Hayvanları Uygulamaları (Zenograft ve Transgenik fare modelleri, ilaç uygulamaları, diseksiyon, organ-doku izolasyonu-homojenizasyonu)

YABANCI DİL SEVİYESİ

İleri derece İngilizce (TOEFL:106, ÜDS/YDS:88,7)

AKADEMİK SINAV DERECELERİ

GRE:790 (Sayısal), ALES:80,9 (Sayısal)

REFERANSLAR:

Prof. Dr. Hakan Aydın, hakan.aydin@ege.edu.tr (Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İZMİR, TÜRKİYE)

Dr. Md. Pavel Strnad, pstrnad@ukaachen.de (Klinik für Gastroenterologie, Stoffwechselerkrankungen und Internistische Intensivmedizin/ Uniklinik RWTH AACHEN, DEUTSCHLAND)

Md. PhD. Bülent Özpolat, bozpolat@mdanderson.org (MD Anderson Cancer Center, Department of Experimental Therapeutics, HOUSTON, TX, USA)