



**PİRÜVAT DEHİDROJENAZ ENZİM KOMPLEKSİNİN
EPİTELYAL MEZENKİMAL DÖNÜŞÜM İLE
İLİŞKİSİNİN *in vitro* ARAŞTIRILMASI**

Buse CEVATEMRE



**PİRÜVAT DEHİDROJENAZ ENZİM KOMPLEKSİNİN
EPİTELYAL MEZENKİMAL DÖNÜŞÜM İLE
İLİŞKİSİNİN *in vitro* ARAŞTIRILMASI**

Buse CEVATEMRE



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PİRÜVAT DEHİDROJENAZ ENZİM KOMPLEKSİNİN EPİTELYAL
MEZENKİMAL DÖNÜŞÜM ile İLİŞKİSİNİN *in vitro* ARAŞTIRILMASI**

BUSE CEVATEMRE

Dr. Öğr. Üyesi Egemen DERE

Prof. Dr. Engin ULUKAYA
İstinye Üniversitesi

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2018
Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Buse CEVATEMRE tarafından hazırlanan "Pirivat Dehidrojenaz Enzim Kompleksinin Epitelial Mezenkimal Dönüşüm ile İlişkisinin *in vitro* Araştırılması" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Egemen DERE

İkinci Danışman : Prof. Dr. Engin ULUKAYA, İstinye Üniversitesi

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Egemen DERE
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. İlhan YAYLIM
İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Elif İlkay ARMUTAK
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Arzu YILMAZTEPE ORAL
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

12.12.2015

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

06/07/2018

Buse CEVATEMRE

ÖZET

Doktora Tezi

PİRÜVAT DEHİDROJENAZ ENZİM KOMPLEKSİNİN EPİTELYAL MEZENKİMAL DÖNÜŞÜM ile İLİŞKİSİNİN *in vitro* ARAŞTIRILMASI

Buse CEVATEMRE

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Egemen DERE

İkinci Danışman: Prof. Dr. Engin ULUKAYA (İstinye Üniversitesi)

Mitokondri son yıllarda, metastatik kanser araştırmalarında çok fazla ilgi çekmektedir. Metastaz kapasitesi yüksek olan kanser hücrelerinin, enerji üretimi için mitokondriyal solunuma kıyasla glikolizi tercih ettiğini gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Bazı kanserlerde görülen bu değişimin sebebi olarak, mitokondri bekçisi olarak bilinen pirüvat dehidrojenaz enzim kompleksi (PDH) sorumlu tutulmaktadır. Epitelyal mezenkimal dönüşüm (EMD) süreci metastazın itici gücü olduğu ileri sürülmüştür. Bu tez çalışmasında, EMD ile kanser hücre metabolizması arasında bir bağlantının varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla, PDH'yı baskılamak için, A-549 hücrelerinde farmakolojik inhibitör Cpi-613 ve RNAi kullanılmıştır. Cpi-613'in antiproliferatif etkisi, xCELLigence sistemi, SRB ve ATP canlılık testleri ile belirlendi. Antiproliferatif dozlar kullanılarak hücrelerde, yara iyileşmesi, invazyon ve ilaç dirençliliği test edildi. Hücrelerde EMD fenotipini göstermek için, EMD ilişkili proteinlerin ifadesi, western blot yöntemi ile analiz edildi. Cpi-613 uyarılmış EMD sürecinin TGF- β sinyal iletimine bağımlı olup olmadığını test etmek için SB-431542 (TGF- β reseptör inhibitörü) kullanıldı. Sonuç olarak, hem PDH'nin Cpi-613 tarafından inhibisyonu hem de PDHA1 ifadesinin baskılanması, EMD sürecine karakteristik morfolojik değişiklikleri uyardığı bulundu. Ayrıca, hızlı bir yara iyileşmesi, artmış invaziv potansiyel ve kemodirenç varlığı gösterildi. Bunun yanı sıra, SB-431542 uygulamasının, EMD sürecini tersine çevirdiği gözlemlendi. CD133⁺ (kansere kök hücre belirteci) hücre oranı shPDHA1 hücrelerinde shKontrol hücrelerine kıyasla daha yüksek bulundu. Özetle, PDH inhibisyonunun ve/veya PDHA1 ifadesinin baskılanmasının EMD fenotipini uyardığı ve daha da önemlisi kemoterapötik ilaçlara direnç gelişimi ile sonuçlandığı gösterildi. Bulgular doğrultusunda, Cpi-613 veya PDH inhibitörlerinin antikanser terapide kullanılmasının tartışılmalı olduğu düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, epitelyal mezenkimal dönüşüm, ilaç dirençliliği, kanser hücre metabolizması, kanser kök hücre, pirüvat dehidrojenaz.

2018, xii + 128 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION of the RELATIONSHIP BETWEEN
PYRUVATE DEHYDROGENASE ENZYME COMPLEX and
EPITHELIAL MESENCHYMAL TRANSITION *in vitro*

Buse CEVATEMRE

Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Egemen DERE

Second Supervisor: Prof. Dr. Engin ULUKAYA (İstinye University)

Recently, mitochondria have attracted much attention in metastatic cancer research. There are several reports showing that highly metastatic cancer cells preferentially use glycolysis over mitochondrial respiration for energy production. Pyruvate dehydrogenase enzyme complex (PDH), the gatekeeper enzyme of mitochondria is shown to be responsible for this switch in some cancers. Epithelial mesenchymal transition (EMT), has been proposed to be a driving force of metastasis. In this study, the existence of a link between EMT and cancer cell metabolism has been investigated. To inhibit PDH activity, pharmacological (PDH inhibitor, Cpi-613) and RNAi (stable cell lines were established by lentivirus) were used in A-549 cells. The antiproliferative effect of Cpi-613 was investigated by xCELLigence System, SRB and ATP viability assays. Wound healing, invasion and drug sensitivity tests were applied at antiproliferative doses. To demonstrate the EMT phenotype in cells, the expression of EMT-related proteins were analyzed via western blotting. Furthermore, SB-431542 (TGF- β receptor inhibitor) was used to test whether Cpi-613 induced EMT depends on TGF- β signalling. As a result both the inhibition of PDH by Cpi-613 and the knockdown of PDHA1 induced morphological changes, which were characteristics of EMT. A more rapid wound healing, increased invasive potential and chemoresistance were also shown. SB-431542 treatment reversed the EMT phenotype. The proportion of CD133⁺ (a cancer stem cell marker) cells were also higher in shPDHA1 cells than those of shControl cells. In brief, knockdown of PDHA1 expression or inhibition of PDH activity induced the EMT phenotype and more importantly resulted in resistance to chemotherapeutic drugs. Therefore, the use of Cpi-613 or PDH blockers becomes debatable for use in anticancer therapy.

Keywords: Lung cancer, epithelial mesenchymal transition, drug resistance, cancer cell metabolism, cancer stem cell, pyruvate dehydrogenase.

2018, xii + 128 pages.

TEŞEKKÜR

Öncelikle, akılcılığın ve bilimin bu topraklarda yeşermesi için, demokratik, laik, sosyal hukuk devleti olan Türkiye Cumhuriyeti'ni kuran **Mustafa Kemal ATATÜRK**'e,

Doktora çalışmalarımda danışmanlığımı yapan, eğitimimin düzenli işleyişi için büyük özveri gösteren, her zaman anlayışla ve sabırla beni dinleyip tüm konu ve koşullarda desteğini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi **Egemen DERE**'ye,

Araştırma görevlisi olduğum Biyoloji bölümünde, tez süreci boyunca her türlü anlayışı göstererek bana destek olan **öğretim üyelerine**,

İstisnasız her deney sonucumda benimle aynı heyecanı ve ilgiyi gösterip, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan; mesleki ve manevi açıdan iyi bir bilim insanı olarak yetişmem adına buraya yazmakla asla sığdıramayacağım emekler harcayan; sayesinde tanıdığım onlarca bilim insanı ile kurduğum iletişim ve yaptığım çalışmalarla "ben" olmama ön ayak olan değerli danışman hocam Prof. Dr. **Engin ULUKAYA**'ya en içten minnet duygularıyla,

Deneyselerimde beni cesaretlendiren, çok keyif aldığım bilimsel sohbetlerimizden ve kritik eleştirilerinden esinlenerek deney yapma şevkimi arttıran; bu süreci bana hayalini kurduğum kapıları açarak kolaylaştıran ve muhtemelen önümüzdeki senelerde kendisini çok yakın mesafede bunaltacağım değerli hocam Doç. Dr. **Ceyda AÇILAN**'a,

Çalışmalarımda tecrübeleriyle bana yön gösteren ve laboratuvardaki her türlü imkanını güler yüzü ile esirgemeyen; malzemeye sıkışık olduğumda tereddüt etmeden kapılarını açıp paylaşımın erdemini bana unutturmayan kıymetli hocalarım Prof. Dr. **Abdullah YALÇIN** ve Doç. Dr. **Arzu YILMAZTEPE ORAL**'a,

Laboratuvar şartlarında gerekli düzenin sağlanmasında emeği geçen **meslektaşlarıma**,

Neticesinde hep kazançlı/tecrübeli çıktığım her türlü zorluğun mimarı **kişilere** ve bu zorluklar karşısında inancımı yenileyen ve moralimi yüksek tutan, sosyal hayatımı idame ettiren yakınımıdaki ve mesafeleri anlamsız kılan tüm **dostlarıma**,

Ömrümün ve 21 senelik eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyip hiçbir fedakârlıktan kaçınmayarak her zaman yanımda olup her türlü sıkışıklık ve yorgunluğuma koşan, bugüne gelmemde en büyük emeğin/sabrın sahibi annem **Sevilay CEVATEMRE** ve babam **Bülent CEVATEMRE**'ye, teyzem **Seval CEVATEMRE**'ye, ruhu güzel kardeşlerim **Berk** ve **Ege CEVATEMRE**'ye, amcam **Ahmet CEVATEMRE**'ye ve tüm aile fertlerime sonsuz şükranlarımı sunar,

Bu doktora tez çalışması; TÜBİTAK tarafından **115Z124** no.lu projesi ve Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından **DD(F)_2016/8** no.lu doktora BAP projesi ile desteklenmiş olup, katkılarından dolayı

Teşekkür ederim.

Buse CEVATEMRE

06/07/2018

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1. Warburg Etkisi.....	3
2.2. Warburg Etkisi Tarihçesi.....	5
2.3. Warburg Fenotipinin Moleküler Temeli.....	8
2.3.1. Heksokinaz ve Glikoliz.....	8
2.3.2. PI3K/AKT Sinyal İletimi ve Glikoliz.....	9
2.3.3. MYC Onkogeni.....	10
2.3.4. HIF Yolağı ve Glikoliz.....	11
2.3.5. P53 ve Glikoliz.....	13
2.4. Warburg Etkisi Karakteristikleri ve Kanser Hücresine Yararı.....	13
2.4.1. Artan Glukoz Alımı ve Akışı.....	13
2.4.2. Laktat Oluşumu ve Asidoz.....	15
2.4.3. Oksidatif Stres.....	19
2.5. Glukoz Oksidasyonunun PDH ve PDK Tarafından Kontrolü.....	20
2.6. Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm.....	22
2.7. EMD'nin Moleküler Bileşenleri.....	27
2.7.1. EMD Eftörleri.....	27
2.7.2. EMD'nin Merkezi Düzenleyicileri.....	29
2.7.3. EMD Uyanları.....	29
2.8. EMD ve KKH'leri.....	32
2.9. EMD ve Kemodirenç.....	35
2.10. Metabolik Deregölasyon ve EMD.....	37
2.11. Hipotez.....	39
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	40
3.1. Materyal.....	40
3.1.1. Kimyasal maddeler.....	40
3.1.2. Sarf malzemeler.....	42
3.1.3. Cihazlar.....	43
3.1.4. Kitler.....	44
3.2. Yöntem.....	44
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması.....	44
3.2.2. Hücre Kültürü.....	45
3.2.3. Sülfrodamin B (SRB) Canlılık Yöntemi.....	46
3.2.4. Adenozin Trifosfat (ATP) Canlılık Yöntemi.....	46
3.2.5. Büyüme Oranı Analizi.....	46
3.2.6. xCELLigence ile Gerçek Zamanlı Hücre Analizi.....	48
3.2.7. Hücre Döngüsü Analizi.....	48

3.2.8. Hücre Senkronizasyonu.....	49
3.2.9. Yara İyileşmesi.....	51
3.2.10. İnvazyon Testi.....	51
3.2.11. Phalloidin Boyama.....	51
3.2.12. Mitokondri Membran Potansiyeli'nin ($\Delta\Psi_m$) Belirlenmesi.....	52
3.2.13. Koloni Formasyonu.....	52
3.2.14. qRt-PCR.....	52
3.2.15. Western Blotlama.....	55
3.2.16. Çekirdek/Sitozol Fraksiyonlama.....	57
3.2.17. Yüzey Bağımsız Büyüme Analizi.....	58
3.2.18. PDHA1 İfadesi Baskılanmış Stabil Hücre Soylarının Eldesi.....	59
3.2.19. İstatistiksel Analiz.....	61
4. BULGULAR.....	62
4.1. Cpi-613'ün A-549 Hücrelerinin Büyüme Oranı Üzerine Etkisi.....	62
4.1.1. SRB Canlılık Testi Bulguları.....	62
4.1.2. ATP Canlılık Testi Bulguları.....	65
4.1.3. Gerçek Zamanlı Hücre Görüntüleme (xCELLigence) Sistemi Bulguları.....	70
4.2. Cpi-613'ün A-549 Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi.....	72
4.2.1. Cpi-613'ün Hücre Döngüsü Spesifikliği.....	73
4.3. Cpi-613'ün PDH Aktivitesi ile İlişkili Gen ve Protein İfadeleri Üzerine Etkisi.....	75
4.4. Cpi-613'ün EMD Belirteçleri Üzerine Etkisi.....	77
4.4.1. EMD-İlişkili Proteinlerin Analizi.....	77
4.4.2. TGF- β Sinyal İletiminin Rolü.....	78
4.4.3. Yara İyileşmesi Bulguları.....	79
4.4.4. İnvazyon Bulguları.....	80
4.4.5. Kemodirenç Bulguları.....	81
4.4.6. Phalloidin Boyama Bulguları.....	83
4.5. Cpi-613'ün Mitokondri Membran Potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) Üzerine Etkisi.....	84
4.6. A-549 Hücrelerinde PDHA1 İfadesinin Baskılanması.....	85
4.7. PDHA1 Baskılanmasının EMD Belirteçleri Üzerine Etkisi.....	87
4.7.1. EMD-İlişkili Proteinlerin Analizi.....	87
4.7.2. Phalloidin Boyama Bulguları.....	88
4.7.3. Koloni Formasyonu.....	89
4.7.4. CD133 Yüzey Belirteci İfadesi ve Yüzey Bağımsız Büyüme.....	90
4.7.5. Kemodirenç Bulguları.....	91
4.7.6. Yara İyileşmesi ve İnvazyon Bulguları.....	92
4.8. PDHA1 Baskılanmasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi.....	93
4.9. PDHA1 Baskılanmasının Yaşam Yolakları Üzerine Etkisi.....	94
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	95
KAYNAKLAR.....	103
ÖZGEÇMİŞ.....	126

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
μ	Mikro

Kısaltmalar

Kısaltmalar	Açıklama
Abl	Abelson mürin lösemi
AE	Anyon değiştirici 2, anion exchanger
AML	Akut myeloid lösemi
ANT	Adenin nükleotid translokaz
ATP	Adenozin Tri Fosfat
BAD	Bcl2 ilişkili ölüm promotoru, Bcl2 associated death promoter
BCA	Bikinkoninik asit testi, bicinchoninic acid assay
BMP	Kemik morfojenetik proteini, bone morphogenetic protein
BSA	Sığır serum albümin, bovine serum albumin
CEB	Sitozol ekstraksiyon tamponu, cytosol extraction buffer
COX	Sitokrom C oksidaz
COX2	Siklooksijenaz 2
CD	Farklılaşma kümesi, cluster of differentiation
Cdc42	Cell division control protein 42 homolog
cDNA	Komplementer DNA, complementary DNA
CTC	Dolaşımdaki tümör hücreleri, circulating tumor cells
DMSO	Dimetilsulfoksit
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktör reseptörü, epidermal growth factor receptor
EMD	Epitelyal mezenkimal dönüşüm
EMD-TF	Epitelyal mezenkimal dönüşüm transkripsiyon faktörleri
ERK	Ekstraselüler sinyal ile düzenlenen protein kinaz, extracellular signal regulated protein kinase
ESM	Ekstraselüler matriks
ETS	Elektron taşıma sistemi
FAK	Fokal adezyon kinaz
FBS	Fetal sığır serumu, fetal bovine serum
FDG	Florodeoksiglukoz
F26BP	Fruktoz 2,6 bifosfat
GI ₅₀	%50 büyüme inhibisyonu, 50% growth inhibition
GLUT	Glukoz taşıyıcıları, glucose transporters
Gsk3 β	Glikojen sentaz kinaz 3 beta
GTP	Guanozin Tri Fosfat
H3K9	Histon 3 lizin 9

HCl	Hidroklorik asit
HRE	Hipoksi duyarlı element, hypoxia response element
HIF	Hipoksi uyarılan faktör, hypoxia inducible factor
HK	Heksokinaz
HNSCC	Baş-boyun skuamoz hücreli karsinoma, head and neck squamous cell carcinoma
IKK- β	Nükleer faktör kapp β inhibitörü, inhibitor of nuclear factor kapp β
IL-8	İnterlökin-8
JAK	Janus kinaz
JNK	c-Jun N-terminal kinaz
KKH	Kanser kök hücre
MAPK	Mitojen ile aktifleşen protein kinaz, mitogen activated protein kinase
MED	Mezenkimal epitelyal dönüşüm
MCT	Monokarboksilat taşıyıcıları, monocarboxylate transporters
MMP	Matriks metalloproteinaz
mTOR	Memeli rapamisin hedefi, mammalian target of rapamycin
LC ₅₀	%50 letal konsantrasyon, 50% lethal concentration
LDH	Laktat dehidrojenaz
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
NEB	Nükleer ekstraksiyon tamponu, Nuclear extraction buffer
NSCLC	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, non-small cell lung cancer
NF- κ B	Nükleer faktör kapp β , nuclear factor kapp β
NHE1	Na ⁺ /H ⁺ değiştirici izoform1, Na ⁺ /H ⁺ exchanger isoform 1
O-GlcNAc	O-bağlı N-asetil-glukozamin
OXPPOS	Oksidatif fosforilasyon, oxidative phosphorylation
PI3K/AKT	Fosfoinositid 3 kinaz
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu, polymerase chain reaction
qPCR	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu, quantitative polymerase chain reaction
PEP	Fosfoenolpirüvat
PET	Pozitron emisyon tomografisi
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi, phosphate buffered saline
PDH	Pirüvat dehidrojenaz
PDHA1	Pirüvat dehidrojenaz E1 α
PDK	Pirüvat dehidrojenaz kinaz
PFK	Fosfofruktokinaz
PGM	Fosfogliserat mutaz
PKB	Protein kinaz B
PKM	Pirüvat kinaz
RNA	Ribonükleik asit
RNAi	Ribonükleik asit interferans
ROS	Reactive oxygen species

Ser/Thr	Serin/treonin
SCO	Sitokrom oksidaz
SDH	Süksinat dehidrojenaz
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi, sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
SMA	Düz kas aktin, smooth muscle actin
Sh	Kısa saç tokası, short hairpin
SLC	Solüt taşıyıcı, solute carrier
SRB	Sülforodamin
Stat	Sinyal iletilici ve transkripsiyon aktivatörü, signal transducer and activator of transcription
TBS-T	Tris tamponlu tuz çözeltisi, tris-buffered saline
TCA	Trikarboksilik asit, tricarboxylic acid
TGI	Total büyüme inhibisyonu, total growth inhibition
TIGAR	TP53 uyarılmış glikoliz ve apoptoz düzenleyicisi TP53 induced glycolysis and apoptosis regulator
TGF- β	Transforme edici büyüme faktörü beta, transforming growth factor beta
T β R	Transforme edici büyüme faktörü reseptörü, transforming growth factor receptor
TIC	Tümör başlatıcı hücre, tumor initiating cell
TNF α	Tümör nekroz faktörü α , tumor necrosis factor α
TP53	Tümör protein p53
UV-Vis	Ultraviyole görünür bölge, Ultraviolet-visible
VEGF	Vasküler endotelial büyüme faktörü, vascular endothelial growth factor
VHL	Von Hippel-Lindau
Zeb	Çinko parmak E-box bağlayıcı, zinc finger E-box binding
ZO1	Zonula okludens-1
$\Delta\Psi_m$	Mitokondri Membran Potansiyeli

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Hücresel düzeyde glukoz metabolizması. Aerobik (A) ve anaerobik (B) solunum.....	4
Şekil 2.2. Oksijen derişimine göre normal (A) ve kanser (B) hücrelerinde glukoz metabolizmasındaki farklılıklar.....	5
Şekil 2.3. Kanserın özellikleri.....	8
Şekil 2.4. Kanser hücreleri ilişkili asidik mikroçevrenin metastaz sürecine etkisi.....	19
Şekil 2.5. PDH aktivitesinin kontrolü.....	21
Şekil 2.6. EMD'nin sınıflandırılması.....	23
Şekil 2.7. EMD geçiren hücrelerde gözlenen değışiklikler.....	25
Şekil 2.8. EMD ve metastaz basamakları.....	26
Şekil 2.9. Kanser metastazında EMD'nin rolü.....	27
Şekil 2.10. EMD geçiren hücrelerin moleküler, fenotipik ve davranışsal geçişleri.....	29
Şekil 2.11. Kanonik ve non-kanonik TGF- β sinyal iletimi.....	32
Şekil 2.12. Tümör heterojenitesine dair modeller.....	33
Şekil 3.1. Büyüme oranı eğrisi. GI ₅₀ (50% growth inhibition), TGI (total growth inhibition), LC ₅₀ (50% lethal concentration).....	48
Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan senkronizasyon kimyasallarının etki ettikleri hücre döngüsü fazları (A) ve A-549 hücrelerine uygulama aşamalarının şematik gösterimi (B).....	50
Şekil 3.3. Çalışmada kullanılan plazmit vektörün genel yapısı (A) ve baz çifti (bç) aralıklarıyla lokasyonlar (B).....	59
Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan transfeksiyon protokolü.....	60
Şekil 4.1. A-549 hücrelerinde Cpi-613 uygulaması sonrası hücre canlılığının konsantrasyona (6,25-200 μ M) ve zamana (24, 48 ve 72 saat) bağılı olarak değışimi. *Aynı zaman periyodu içinde Cpi-613 uygulanmamış (0 μ M) hücrelere göre uygulanan konsantrasyonlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (***) $p < 0,0001$ ifade etmektedir.....	62
Şekil 4.2. 24 saat Cpi-613 uygulaması sonrası SRB ile boyanmış A-549 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (x10).....	63
Şekil 4.3. 48 saat Cpi-613 uygulaması sonrası SRB ile boyanmış A-549 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (x10).....	64
Şekil 4.4. 72 saat Cpi-613 uygulaması sonrası SRB ile boyanmış A-549 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (x10).....	65
Şekil 4.5. A-549 hücrelerinde Cpi-613 uygulaması sonrası hücre canlılığının konsantrasyona (6,25-200 μ M) ve zamana (24, 48 ve 72 saat) bağılı olarak değışimi. *Aynı zaman periyodu içinde Cpi-613 uygulanmamış (0 μ M) hücrelere göre uygulanan konsantrasyonlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (***) $p < 0,0001$ ifade etmektedir.....	66
Şekil 4.6. A-549 hücrelerinin 24 saat Cpi-613 uygulaması sonrası mikroskop görüntüleri (x10).....	67
Şekil 4.7. A-549 hücrelerinin 48 saat Cpi-613 uygulaması sonrası mikroskop görüntüleri (x10).....	68

Şekil 4.8. A-549 hücrelerinin 72 saat Cpi-613 uygulaması sonrası mikroskop görüntüleri (x10).....	69
Şekil 4.9. Cpi-613'ün A-549 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisinin 72 saat boyunca gerçek zamanlı doğrusal (A) ve sütun (B) grafiği şeklinde gösterimi.....	71
Şekil 4.10. Cpi-613 uygulanan A-549 hücrelerinin döngü analizi öncesi mikroskop görüntüleri (x10).....	72
Şekil 4.11. Cpi-613 uygulanan A-549 hücrelerinin döngü fazlarındaki (G ₀ /G ₁ , S ve G ₂ /M) dağılımı.....	73
Şekil 4.12. Senkronizasyon gerçekleştirilen A-549 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (x10) ve döngü fazlarındaki (G ₀ /G ₁ , S ve G ₂ /M) dağılımı.....	74
Şekil 4.13. Çeşitli döngü fazlarında senkronize edilen ve edilmeyen A-549 hücrelerinde 48 saat Cpi-613 (A) ve senkronizasyon kimyasallarının (B) uygulaması sonrası hücre canlılığının değişimi. Canlılık testi olarak ATP testi gerçekleştirildi. *0µM ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (**:p<0,001, ***:p<0,0001) ifade etmektedir.....	75
Şekil 4.14. Cpi-613 uygulanan A-549 hücrelerinde PDK mRNA ifade düzeyleri.....	76
Şekil 4.15. Cpi-613 uygulanan A-549 hücrelerinde PDHA1 ve p-PDHA1 proteinlerin ifade düzeylerinde değişimlerin 2 bağımsız deney sonuçları (A ve B). β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.....	77
Şekil 4.16. Cpi-613 uygulanan A-549 hücrelerinde EMD ilişkili proteinlerin ifade düzeylerinde değişimlerin 2 bağımsız deney sonuçları (A ve B). β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.....	77
Şekil 4.17. TGF-βR inhibitörü SB-431542 varlığı ve yokluğunda Cpi-613 uygulanmış A-549 hücrelerinde % canlılığın (A ve B) hücre fenotipinin (C, x10) ve vimentin ifadesinin (D) doza (6,25, 12,5 ve 25µM) bağlı 72 saat inkübasyon sonunda değişimi. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. *Cpi-613 ve SB-431542 eş zamanlı uygulaması ile tek başına Cpi-613 uygulaması karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (**:p<0,001, ***:p<0,0001) ifade etmektedir.....	78
Şekil 4.18. Cpi-613 uygulanan A-549 hücrelerinde migrasyon yeteneği.....	79
Şekil 4.19. Cpi-613 uygulanan A-549 hücrelerinde invazyon yeteneği (A) ve proliferasyon oranı (B). *0µM ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*:p<0,05) ifade etmektedir.....	80
Şekil 4.20. Cpi-613 varlığı (6,25µM, 12,5µM ve 25µM) ve yokluğunda (0µM) cisplatin (A) ve doksorubisin (B) uygulanmış A-549 hücrelerinde % canlılığın 48 saat inkübasyon sonunda değişimi. Canlılık testi olarak ATP testi kullanıldı *0µM ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (***:p<0,0001) ifade etmektedir.....	81
Şekil 4.21. Cpi-613 varlığı (6,25µM, 12,5µM ve 25µM) ve yokluğunda (0µM) cisplatin (A) ve doksorubisin (B) uygulanmış A-549 hücrelerinin 48 saat inkübasyon sonunda mikroskop görüntüleri (x10).....	82
Şekil 4.22. A-549 hücrelerinin 72 saat Cpi-613 uygulaması sonrası phalloidin boyama görüntüleri (x40). Sarı oklar boyanan membran uzantılarını göstermektedir.....	83
Şekil 4.23. A-549 hücrelerinin 72 saat Cpi-613 uygulaması sonrası JC-1 boyama görüntüleri (x40).....	84

Şekil 4.24. A-549 hücrelerinde PDHA1 ifadesinin baskılanma verimliliğinin mRNA (A) ve protein (B) düzeyinde gösterimi. *Aynı grup içinde shKontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (***: $p<0,0001$) ifade etmektedir.....	85
Şekil 4.25. shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (x10)...	86
Şekil 4.26. shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinde EMD ilişkili proteinlerin ifade düzeylerinde değişimler. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.....	87
Şekil 4.27. shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinde phalloidin boyama görüntüleri (x40).....	88
Şekil 4.28. shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinin koloni oluşturma yetenekleri...	89
Şekil 4.29. shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinde CD133 ⁺ altpopulasyonu gösteren akım sitometri histogramları.....	90
Şekil 4.30. shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinin yüzey bağımsız koşullarda büyümelerini gösteren mikroskop görüntüleri (x40).....	90
Şekil 4.31. shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinin paklitaksel, 5-florourasil, dosetaksel ile 48 saatlik ve pemetreksed ile 72 saatlik inkübasyon sonunda %canlılığın değişimi (A). shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinde kemodirenç ve kök hücre benzeri fenotip ilişkili proteinlerin ifade düzeylerinde değişimler (B). β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. *shKontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: $p<0,05$, **: $p<0,001$, ***: $p<0,0001$) ifade etmektedir.....	91
Şekil 4.32. shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinde migrasyon (A) ve invazyon (B) yeteneği. *shKontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: $p<0,05$) ifade etmektedir.....	92
Şekil 4.33. shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinde ikilenme oranının ATP yöntemi (A) ve gerçek zamanlı hücre görüntüleme sistemi kullanılarak (B) 72 saatlik gösterimi. *Aynı zaman dilimi içerisinde shKontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: $p<0,05$, ***: $p<0,0001$) ifade etmektedir.....	93
Şekil 4.34. shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinde SMAD (A), JNK/MAPK (B) ve PI3K/AKT/mTOR (C) sinyal iletimi ilişkili, GLUT-1 (D) proteinlerinin ifade düzeylerinde değişimler. Histon H3 ve α -Tubulin sırasıyla nükleus ve sitoplazma fraksiyonları için yükleme kontrolü olarak kullanıldı.....	94

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin listesi.....	40
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemelerin listesi.....	42
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan cihazların listesi.....	43
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan kitlerin listesi.....	43
Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan kemoterapötik ilaçlar.....	44
Çizelge 3.6. Çalışmada kullanılan senkronizasyon kimyasalları.....	49
Çizelge 3.7. PCR karışımı içerisinde yer alan bileşenler.....	54
Çizelge 3.8. PCR için termal çevrim koşulu.....	54
Çizelge 3.9. Çalışmada kullanılan primerler ve baz dizilişleri.....	55
Çizelge 4.1. A-549 hücrelerinde Cpi-613 uygulaması sonrası GI ₅₀ değerleri...	66
Çizelge 4.2. A-549 hücrelerinde Cpi-613 uygulaması sonrası TGI değerleri....	66
Çizelge 4.3. A-549 hücrelerinde Cpi-613 uygulaması sonrası LC ₅₀ değerleri...	66

1. GİRİŞ

Son yıllarda kanserin, mitokondri karakteristikleri (glukoz metabolizması ve apoptoz direnci gibi) ile yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir. Glukoz, tümör hücreleri dahil pek çok memeli hücresinin esas karbon kaynağıdır ve ATP oluşturmak üzere sitozolik glikoliz ve ardından oksijen bağımlı mitokondriyal metabolizma aracılığıyla metabolize edilmektedir. Normal şartlar altında sitozolik glikoliz sonucu meydana gelen pirüvatın TCA döngüsüne (mitokondriyal metabolizma) girişi, pirüvatın Asetil CoA'ya dönüşümünü (oksidatif dekarboksilasyon) gerektirir. Bu katalitik dönüşümü gerçekleştiren çoklu enzim kompleksi ise pirüvat dehidrojenaz (PDH) dir.

Metastaz kapasitesi yüksek olan kanser hücreleri, enerji üretimi için bol miktarda oksijen varlığında dahi öncelikli olarak sitozolik glikolizi (mitokondriyal solunuma kıyasla) tercih etmektedirler. Enerji üretimi amacıyla sitozolik glikolizin kullanımı ise tümörün gelişmesi için gerekli olan temel yapıtaşlarını daha hızlı sağlamaktadır. Ayrıca bu durum, apoptozun baskılanmasını ve dolayısıyla antikanser terapilere direncin artmasını sağlamaktadır. Kanser hücrelerinde görülen metabolik yolların bu şekilde yeniden düzenlenmesi, kanser hücrelerinin adaptasyonunu ve progresyonunu uyararak invazif ve metastatik bir fenotip kazanılmasını sağlamaktadır. Bu düzenlenmenin sonrasında glukoz alımı artmakta ve hızı artan glikoliz süreci ile kanser hücreleri laktat (son ürün) üretir ki bu ürün sayesinde invazyon ve metastaz için uygun bir çevre meydana gelmektedir. Bu fizyolojik değişiklikler neticesinde kanser progresyonu için uygun bir mikroçevre yaratılmaktadır. Sonuç olarak kemoterapötik ilaçlar dahil çeşitli stres koşullarına direncin artışı gerçekleşmektedir.

Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm (EMD), epitelyal karakterdeki bir hücrenin, motilitesi ve invazif kapasitesi artmış mezenkimal karakter edinmesi (ayrıca epitelyal belirteçlerin kaybı) ile karakterize edilen bir süreçtir. Kanser biyolojisinde henüz yeni bir konu olmakla beraber, tümör metastazında moleküler belirleyici olma potansiyeli taşıdığından, bu sürecin anlaşılması ve aydınlatılması büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda yapılan metastatik kanser araştırmaları ve ilişkili moleküler bilgiler artmış olmasına rağmen, PDH enzim aktivitesinin EMD süreci ile ilişkisini gösteren literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

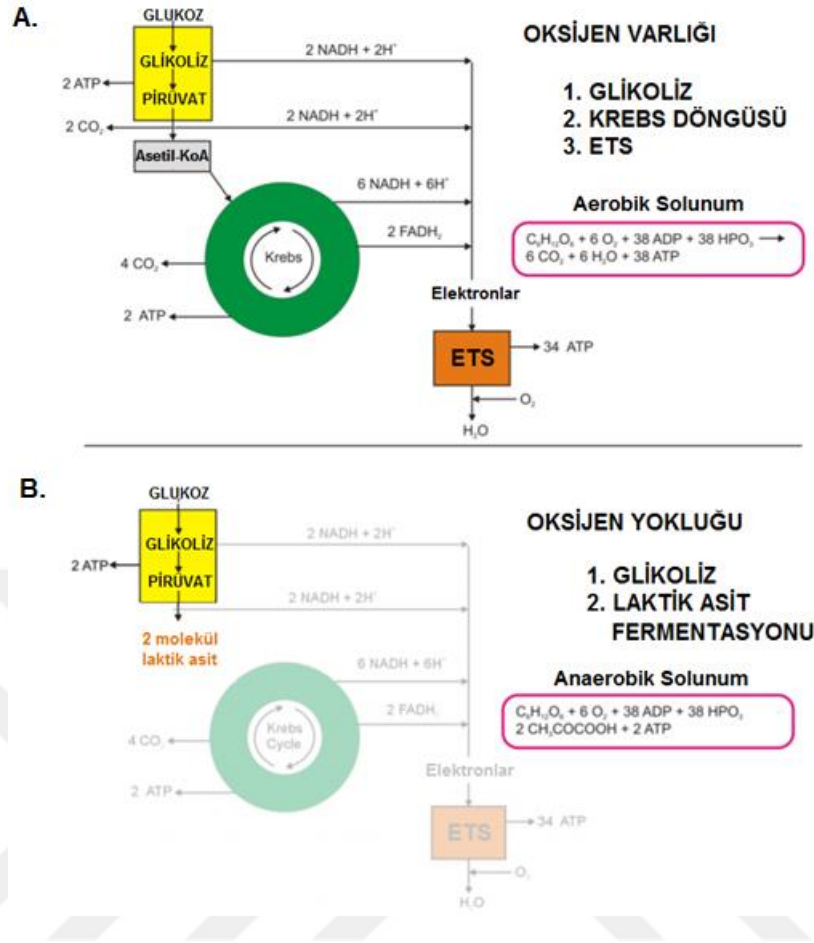
Kanserin son yıllarda metabolik bir hastalık olarak görüldüğü göz önüne alınırsa, mitokondriyal metabolizma ile ilişkili enzimlerin aktivitelerinin kanser progresyonu sürecine etkilerinin anlaşılması ve aydınlatılması insan sağlığını iyileştirebilecek yeni tedavi seçenekleri/yaklaşımları yaratabilir. Bu tez çalışmasının sonuçları, mitokondri- ilişkili metastaz ve buna dair moleküler mekanizmaların anlaşılmasına katkı; klinik açıdan büyük önem taşıyan prognostik ve/veya diagnostik belirteçlerin ve yeni terapötik hedeflerin keşfedilmesine ve kanser tedavisinde başarı oranını yükseltecek yeni anti- metastatik terapötik ajanların geliştirilmesine olanak sağlayabilir. Literatürde gözlenen eksiklikler doğrultusunda bu tez çalışmasında, enerji üretiminde (mitokondriyal metabolizmada) önemli bir enzim olan PDH aktivitesinin kanser metastazıyla ilişkilendirilen EMD süreci arasında bağlantılar araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

Hücrelerde metabolizma çalışmalarının kökeni 150 yıl öncesine, Louis Pasteur'ün çalışmalarına dayanmaktadır. Pasteur, ortamda yeterli oksijen bulunmadığı durumda hücrelerin yaşamlarını devam ettirmeleri için oksidatif fosforilasyondan glikolize geçiş yaptıklarını yani “fermentasyon”u tanımlamıştır. Bu fenotip sıklıkla “anaerobik glikoliz” veya “Pasteur etkisi” olarak bilinmektedir. Yaklaşık 70 yıl sonrasında Otto Warburg bu olguyu tümör dokularında çalışmış ve glikolizin, oksijen varlığında da gerçekleştiğini göstermiştir. Günümüzde bu metabolik fenotip “aerobik glikoliz” veya “Warburg etkisi” olarak bilinmektedir.

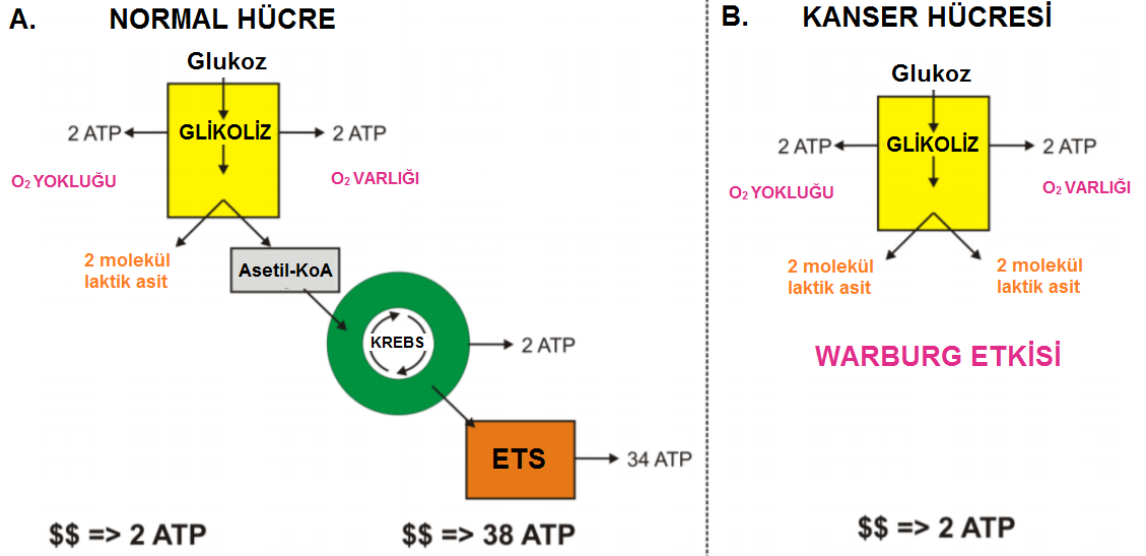
2.1. Warburg Etkisi

Hücre içerisinde yeterli oksijen varlığında bir glukoz molekülünün tam oksidasyonu yani oksidatif fosforilasyonu (OXPHOS) 38 ATP molekülü meydana getirmektedir. Bu hücresel solunumun ilk aşaması olan glikoliz sitoplazmada meydana gelir ve yalnızca 2 ATP ve 2 molekül pirüvat oluşumunu sağlar. Bu aşamadan sonra, hücre normoksik koşullarda ise, pirüvat asetil-KoA'ya dönüştürülür. Asetil-KoA ise, mitokondride gerçekleşen krebs ya da sitrik asit döngüsüne pirüvat dehidrojenaz (PDH) katalizi ile girer ve ardından mitokondri iç membranında elektron taşıma sistemi (ETS) tepkimeleri neticesinde 34 ATP üretilir. ETS içerisinde son aşama, O⁻ atomunun son sitokromdan (cyt *a*3) 2H⁺ atomu alarak, aerobik solunumun ara ürünlerinden biri olan bir molekül H₂O oluşturmasıdır. Buna karşın, hücre hipoksik koşullar altındaysa pirüvat asetil-KoA yerine laktik aside dönüştürülür. Bu süreç yalnızca 2 ATP molekülü meydana getirir ve bu sebeple enerjetik açıdan oldukça verimsizdir (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2).



Şekil 2.1. Hücresel düzeyde glukoz metabolizması. Aerobik (A) ve anaerobik (B) solunum (Devic 2016’den Türkçeleştirilerek alınmıştır)

Hücresel düzeyde oksijensiz kalma durumu, yoğun fiziksel aktivite sonucu oluşabilir. İlaveten bu durum oksijen derişimine bağılı olmaksızın kanserlerde görülmektedir. Yani glukozun laktik aside yıkımı ortamda mitokondriyal solunuma yetecek miktarda oksijen varlığında dahi gerçekleşmektedir. Bu metabolizmayı keşfeden Otto Warburg, süreci “aerobic glikoliz” olarak isimlendirmiştir. Aynı zamanda “Warburg etkisi” olarak ta bilinmektedir (Koppenol ve ark. 2011).



Şekil 2.2. Oksijen derişimine göre normal (A) ve kanser (B) hücrelerinde glukoz metabolizmasındaki farklılıklar (Devic 2016'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır)

Aerobik ve anaerobik glukoz metabolizmasındaki denkleme bakılacak olursa, hipoksik koşullar altında tüm hücrelerin (normal veya kanser farketmeksizin) 19 kat daha fazla glukoz alması gereklidir ki, bu sayede oksijenasyonu iyi olan hücrelerin metabolik düzeyine ulaşabilsinler. Tümör metabolizmasının bu özelliğinin keşfi ile 18(F)-Florodeoksiglukoz (2-floro-2-deoksiD-glukoz-FDG)-temelli PET görüntüleme sistemi klinik uygulamalarda kullanılmaktadır. Bu sistem sayesinde normal dokulara kıyasla primer ve metastatik kanserler normal kompartmana kıyasla daha fazla aldıkları işaretli glukoz analogu (FDG) sayesinde görüntülenebilmektedir. Hücre içi FDG, heksokinazlar (HK) tarafından FDG-6-fosfata fosforile edilir ve bu aşamadan sonra glikoliz sürecinde metabolize edilemez. Böylece, FDG-6-fosfat hücrede birikir ve radyoaktif izotop florin-18 bozunmadan önce hücrelerin görüntülenmesi sağlanır. Bu teknoloji, lenfoma, melanom, kolon, meme ve akciğer kanserleri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin tanı, evreleme ve izlenmesinde kullanılmaktadır. Hatta kanser hücreleri tarafından artan glukoz alımı kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (Lopez-Rios ve ark. 2007)

2.2. Warburg Etkisi Tarihçesi

1920'lerde Otto Warburg ve Cori, tümörlerin çevre dokulara kıyasla çok daha fazla glukoz aldığını ve alınan glukozun oksijen varlığında da fermente edilerek laktata dönüştüğünü gözlemlemişlerdir (Warburg ve ark. 1927, Cori ve Cori 1925). Bununla

birlikte solunumun tek başına tümör canlılığı için yeterli olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle, tümör hücrelerini öldürmek için hem glukozun hem de oksijenin elimine edilmesi gerekliliğini öne sürmüşlerdir. 1929'da Herbert Crabtree, Warburg'un çalışmalarını genişletmiş ve çeşitli tümör tiplerinde glikolizi ele almıştır. Crabtree, Warburg'un çalışmalarını doğrulamış ve bunun yanı sıra tümörlerde solunumun da yer aldığını fakat bunun değişken olduğunu keşfetmiştir. Gözlemediği varyasyonlar nedeniyle tümör dokularında karbohidrat metabolizmasını tek bir genelleme ile tanımlamanın zor olduğunu ifade etmiştir. Mitokondriyal solunumun, hücrelere glukoz verilmesiye inhibe olması "Crabtree Etkisi" olarak bilinmektedir. Buna göre mitokondri, artmış glikolizin "suçlu"su değil yalnızca masum "izleyici"sidir.

Warburg sonraki yıllarda, aerobik glikolizin nedeni olarak mitokondrinin işlevini kaybetmesini öne sürmüştür. Hatta bu durumu bir hipotez haline getirerek, kanserin primer sebebi olabileceğini önermiştir. 1970'lerde Racker, Warburg etkisine sebep olabilecek durumları teori haline getirmiştir. Bunlar arasında, hücre içi pH dengesizlikleri ve ATPaz aktivitesindeki bozukluklar yer almaktadır. Sonraki yıllarda Racker, Jeffrey Flier ve Morris Birnbaum, aerobik glikolizin, büyüme faktörü sinyal iletimleri ile kontrol edilebilir bir süreç olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu araştırmacıların gözlemleri Warburg'un kanser biyolojisindeki hipotezine yeni bir anlam kazandırdı. Hasar görmüş mitokondrinin bazı durumlarda Warburg etkisini tetiklediği gösterilmiş olsa da, Warburg metabolizması gösteren pek çok kanser hücresinin intakt mitokondriyal solunuma sahip olduğu hatta bazı kanser alttiplerinin mitokondriyal solunuma bağımlı olduğu belirtilmiştir. Son on yılda yapılan çalışmalar farklı tümör tiplerinde hatta aynı tümör içerisindeki altpopulasyonlarda farklı biyoenerjetik bozukluklar gösterilmiştir. Bu durum en erken 1967 yılında Weinhouse tarafından gözlenmişti. Çalışmasında, yavaş büyüyen hepatoma hücrelerinin oksidatif, daha hızlı proliferen olan hepatomaların glikolitik olduğunu belirtmiştir (Weinhouse 1967).

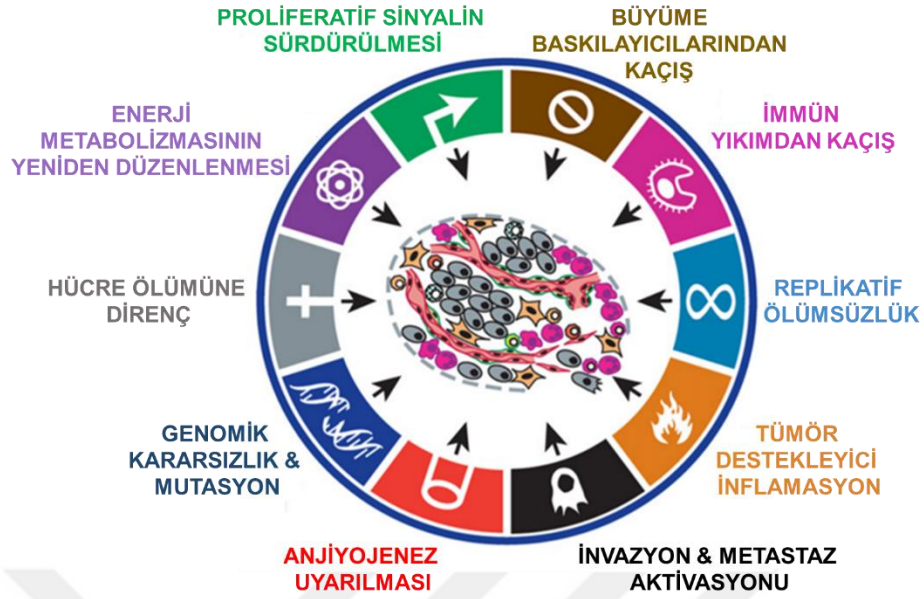
Aerobik glikoliz pek çok çalışma grubu tarafından sorgulanmış ve mitokondriyal işlevi yerinde olan pek çok hücre soyu rapor edilmiştir (Jose ve ark. 2011, Moreno-Sánchez ve ark. 2007, Martin ve ark. 1998). Tümör içerisinde oksidatif metabolizma ve glikoliz arasında dinamik bir etkileşim yani metabolik esneklik çok çeşitli kanserlerde gösterilmiştir (Obre ve Rossignol 2015). 2004 yılında, Zu ve Guppy çeşitli kanser ve hücre soylarında glikoliz kaynaklı ATP'nin, totalin %17'sine karşılık geldiğini rapor

etmişlerdir. Aslında bu durum hücre tipine oldukça bağımlıydı, nitekim fibrosarkomlarda %0,31 iken hepatomalarda %64 gözlenmiş; geri kalan ATP'nin mitokondriyal oksidatif fosforilasyondan kaynaklandığı gösterilmiştir (Zu ve Guppy 2004).

Son 10 sene içerisinde kanser ilişkili mutasyonların metabolizma üzerine kayda değer etkileri rapor edilmiştir. Krebs döngüsü enzimlerinden süksinat dehidrojenaz mutasyonları, feokromositom ve paragangliyoma neden olabilmektedir (Astuti ve ark. 2001, Baysal ve ark. 2000). Bir diğer enzim, izositrat dehidrojenaz1 mutasyonlarının da yetişkin glioblastoma vakalarıyla ilişkili olduğu ve tümör gelişimi için “gain of function” etkisi ile önemli rol üstlendiği gösterilmiştir (Dang ve ark. 2009, Yan ve ark. 2009).

Son 50 yıla bakıldığında mitokondrinin kanser enerji metabolizmasındaki rolü (suçlu veya izleyici) kesin şekilde tanımlanamamıştır. Yapılan çalışmalar ise kanser hücre ortamının ve mutasyonların metabolizmayı nasıl etkilediğini anlamanın, hastalarda kanser hücrelerinin büyümesini engellemek için uygun metabolik ilaç kombinasyonlarının seçilmesinde temel öneme sahip olacağını düşündürmektedir.

Warburg metabolik fenotipinin kanser hücrelerine proliferatif avantaj sağladığı son yıllarda aydınlatılmakta ve metastatik progresyondaki önemi ve yeri günümüzde yoğun bir araştırma konusudur. Bu çalışmaların etkisiyle, “enerji metabolizmasının yeniden programlanması” kanser özelliklerinden biri olarak kabul görmektedir (Şekil 2.3) (Hanahan ve Weinberg 2011).



Şekil 2.3. Kanser özellikleri (Hanahan ve Weinberg 2011'den Türkçeleştirilerek alınmıştır)

2.3. Warburg Fenotipinin Moleküler Temeli

Görüntüleme dışında, Warburg etkisini kontrol eden moleküler ağların belirlenmesi, kanserin önleme ve tedavisi için moleküler hedefleri ortaya çıkarmaktadır. Aerobik glikolizin kanser hücrelerinin fenotipik özelliklerini (hipoksik koşullar, metastatik eğilim ve apoptozdan kaçınma) koruyan çeşitli koordineli yolları içeren adaptif bir mekanizma olduğu günümüzde anlaşılmıştır. Birbirine bağlı birkaç sinyal iletimi ve disfonksiyonel mutasyonlar, kanser hücrelerinin glikolitik fenotipini sağladığını gösteren çalışmalar mevcuttur.

2.3.1. Heksokinaz ve Glikoliz

Warburg'un gözlemlerine dair açıklama arayan çeşitli grupların çalışmaları, Warburg etkisinin ilk kritik moleküler açıklamasını sağladı. Bu gruplar, karaciğer ve pankreatik hücrelerin karsinogenezinde erken bir metabolik olayı, HK II'nin artışını ve HK I'in HK IV ile ilişkili olarak downregülasyonunu göstermiştir (Rempel ve ark. 1994, Mathupala ve ark. 1997, Mayer ve ark. 1997, Pedersen ve ark. 2002). ATP varlığında HK II, hücre içindeki glukoz metabolizmasının hız sınırlayıcı ve kararlı adımını katalizler; bu ise glukozun glukoz-6-fosfata ATP-bağımlı fosforilasyonudur. Bu tepkime, yalnızca glukozun hücre içi akışında bir konsantrasyon gradyanı yaratmakla kalmaz, aynı zamanda hücre içi glukozun akıbetini de belirler. HK I ve II, spesifik voltaj bağımlı anyon

kanallarında (VDAC) mitokondri ile doğrudan etkileşim halindedir (Bustamante ve Pedersen 1977). VDAC'ler ve adenin nükleotid translokazlar (ANT) mitokondriyal matriks ve sitozolik bölmeler arasındaki adenin nükleotidlerini taşır. HK II'nin VDAC ile etkileşimi iki fonksiyona hizmet edebilir; birincisi, ATP'nin membranlar arası boşluktan sitozole aktarılmasını sağlayan VDAC'ın fonksiyonel rolünü inhibe edebilir ve ikincisi, VDAC ile BAX/BAK etkileşimini engelleyebilir ve bu sayede apoptozu inhibe edebilir. Böylece, hepatoma ve diğer kanserlerde artmış HK II seviyeleri, apoptotik direncin artmasına ve VDAC'de ATP birikmesine neden olabilir. Birikmiş ATP, HK II tarafından fosforile edilmek üzere kullanılabilir ve böylece hücre içi metabolizmaya glukoz kazandırabilir. Normal bir mitokondriyal fonksiyon, glikolitik son ürünü yani piruvatı, aerobik koşullar altında, TCA döngüsüne ve enerji üretimi için solunum zincirine bağlamalıdır. Fakat mitokondriyal genomda veya kanser hücrelerinde mitokondriyal solunumu olumsuz etkileyen sinyal yollarındaki bozukluklar, glikoliz tarafından üretilen piruvatın oksijen varlığında bile laktata dönüştürüleceğini göstermektedir (Dakubo 2010).

2.3.2. PI3K/AKT Sinyal İletimi ve Glikoliz

Çeşitli onkogen sinyal iletimleri kanser hücrelerinde düzensiz gözlenmekte ve bu yollar bozulmuş metabolizmayı, apoptozu ve kanser hücrelerinin birtakım diğer fenotipik özelliklerini kontrol eder. PI3K, bir 85 kDa düzenleyici alt birim ve bir 110 kDa katalitik alt birim olmak üzere iki fonksiyonel alt birime sahip; bir heterodimerik bir proteindir. PI3K sinyal yolağı, sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve Ras onkogeni gibi yaşamsal sinyaller tarafından aktive edilir. G-protein-bağlı reseptörler veya tirozin kinaz reseptörleri ile aktivasyon sonrası, 85 kDa alt birimi, bir Src-homoloji 2 (SH2) domaini vasıtasıyla reseptör üzerinde fosforile tirozin rezidüleri ile etkileşir. 110 kDa katalitik alt birim daha sonra bir fosfat grubunu membran fosfolipidlerine aktarır. Akabinde bu süreç fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfatın ikincil mesajcı oluşturmak üzere fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfata fosforilasyonunu içerir. Hücre içi ikinci mesajcı, daha sonra downstream sinyal iletimini tetikleyen protein kinaz B'yi (AKT/PKB) aktive eden 3-fosfoinositid bağımlı kinaz 1'i (PDK1) devreye sokar ve aktive eder. Protein kinaz B/AKT, bir viral onkogenin hücrel bir homologu olarak keşfedilen bir serin treonin kinazdır. Protein kinaz B, PI3K sinyal iletiminin downstream molekülü olup fosforilasyon ile aktive edilir. En sık görülen PKB/AKT aktivasyon şekli, tümör baskılayıcı PTEN'in fonksiyon

kayıdır. Tüm hücrelerde ifade edilen PTEN, fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfatı defosforile ederek fosfatidilinositol (4,5)-bisfosfata dönüştürür ve bu şekilde PI3K/AKT sinyal iletimini engeller. Heterozigot PTEN knockout fareler çok sayıda tümör geliştirmektedir. PTEN, insan kanserlerinin büyük bir çoğunluğunda mutasyona uğramış durumdadır ve bu nedenle, büyüme faktörü reseptör stimülasyonunun yokluğunda PI3K/AKT aktivasyonuna neden olur. Kanser hücrelerinde PKB/AKT'nin aktivasyonu, büyüme faktörü stimülasyonu veya PI3K yolunun amplifikasyonu ile dolaylı olarak meydana gelebilir. Fosforlanarak aktive edildikten sonra PKB/AKT, nukleusta CREB, E2F, NF-kB gibi hücre içi substratları ve sitozoldaki kaspaz 9, BAD ve GSK-3 β 'yi hedefler. PKB/AKT'nin pleiotropik fonksiyonları bulunmaktadır. Bu sinyal yolağı esas olarak hücre çoğalmasını ve yaşamı teşvik eder. Ayrıca glukoz alımını ve heksokinaz aktivitesini düzenler. Aynı zamanda mitokondriyal membran potansiyelinin korunmasını da düzenler. PKB/AKT yolağı, kanser hücrelerinin aerobik glikolize yönelimini çeşitli şekillerde uyarmaktadır. Birincisi, PKB/AKT sinyal iletimi glukoz taşıyıcılarının ifadesini uyararak kanser hücrelerinde glukoz alımını ve tüketimini artırır. İkincisi, aktive edilmiş PKB/AKT, HK II'nin ifadesini ve aktivitesini artırır. Çeşitli büyüme faktörleri, HK ile mitokondri arasındaki bağlantıyı PI3K/AKT/mTOR yolağını kullanarak desteklemektedir. Ayrıca, PKB/AKT sinyal iletimi, bir diğer glikolitik enzim olan fosfofruktokinaz ifadesini uyarır.

PKB/AKT sinyal iletimi, mitokondriyal solunum disfonksiyonu (örn., MtDNA mutasyonları) ile de aktive edilebilir. Mitokondriyal disfonksiyon nedeniyle azalan solunum, PTEN'i inaktive eder ve PKB/AKT aktivasyonuna yol açar. Mitokondriyal DNA azalması da PKB/AKT sinyal iletimini aktifleştirmiş, bununla birlikte artmış glikoliz ve invazyon, apoptoz/anoikisden kaçınma gözlenmiştir (Moro ve ark. 2009).

2.3.3. MYC Onkogeni ve Glikoliz

MYC transkripsiyon faktörü, hücrelerin büyümesini, çoğalmasını ve ölümünü kontrol eden çeşitli genlerin düzenlenmesini sağlar. MYC, partneri MAX ile bir kompleks oluşturur ve bu şekilde aktifleşmiş kompleks, hedef genlerin transkripsiyonunu uyarmak için E-box DNA motiflerine (kanonikal CACGTG, CATGTG) bağlanır. Çeşitli kanserlerde MYC'nin overekspresyonu gösterilmiştir. MYC glikolizi çeşitli şekillerde uyarmaktadır. MYC'nin aktivitesi, mtDNA'ya zarar verebilecek, solunum zinciri

aktivitesini bozabilecek ROS üretiminin artmasına neden olmakta ve bu şekilde aerobik glikolizi kolaylaştırmaktadır (Dakubo 2010).

MYC'nin overekspresyonu, birkaç glikolitik enzimin aktivasyonu ve ifadesini arttırarak glukoz metabolizmasını artırır (Osthus ve ark. 2000). HK II, gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz, enolaz 1, piruvat kinaz ve laktat dehidrojenaz, çeşitli kanserlerde yüksek seviyede ifade edildiği gösterilmiştir (Altenberg ve Greulich 2004, Mathupala ve ark. 2006). MYC'nin HK II, enolaz ve laktat dehidrojenaz A gibi glikolitik enzimleri kodlayan genlere bağlandığı gösterilmiştir (Kim ve Dang 2005). Laktat dehidrojenaz, piruvatı laktata dönüştürür ve bu tepkime glikolitik kanser hücrelerinde oldukça aktif bir metabolik yoldur. Laktat dehidrojenaz ifadesi doğrudan MYC gibi onkogenler ve dolaylı olarak HIF1 α 'nın aktivasyonu ile uyarılabilir.

2.3.4. HIF Yolağı ve Glikoliz

Kanser hücrelerinin büyümesi, farklı seviyelerdeki oksijen eksiklikleri ile ilişkilidir. Solid tümörler hızla büyüdüğü için, perifer hücreler damarlara erişebilir olduğundan yeterli oksijenasyona sahiplerdir. Fakat, tümörün iç kısımlarına doğru gidildikçe, azalan oksijen düzeylerine yani hipoksi hatta anoksiye maruz kalan hücreler bulunmaktadır. Azalan oksijenin nedeni temel olarak, vasküler beslenmeyi geride bırakan hızlı büyümeden kaynaklanan zayıf kalan kan desteğidir. Gerçekten de, 300 kadar kanser hücresi yetersiz damarlanmanın sonucu olarak hipoksiyi uyarabilir. Bu olumsuz koşullardan kurtulmanın mekanizmalarından bir tanesi, HIF'lerin uyarılması ve stabilizasyonudur ki tümöre bu şekilde yeni kan damarları kısmen geri kazandırılmaktadır.

İki aile üyesi, HIF α ve HIF β , heterodimer oluşturarak aktif hale gelir. HIF α ; HIF1 α , HIF2 α , ve HIF3 α olmak üzere üç alt birime sahiptir. HIF2 α , HIF1 α ile %48 homolog olup hipoksik koşullar altında benzer şekilde ifade ve stabilize edilir (Tian ve ark. 1997). Aksine, HIF3 α HIF'in baskın bir negatif düzenleyicisidir. HIF1 β ile transkripsiyonel olarak inaktif bir heterodimer oluşturmak üzere dimerize olur ve böylece HIF'lerin aktivitesini azaltır. HIF1 α ve HIF2 α 'nın her ikisi de işlevsel olarak aktiftir yani gen promotorlarında yer alan hipoksiye duyarlı elementler (HRE'ler: kanonik CCATG dizileri) ile etkileşime girebilirler. Bunun yanı sıra, HIF1 α 'nın tercihen glikolitik gen promotorlarında HRE'leri indüklediği gösterilmiştir (Hu ve ark. 2007).

Onkogen sinyal iletimi hemen hemen tüm kanserlerde görülen ortak bir özelliktir. Ras-MAPK yolağının aktivasyonu, çeşitli model sistemlerde HIF1 α düzeylerinin artmasına neden olmuştur (Sheta ve ark. 2001). Benzer şekilde, Src ifadesi, HIF1 α 'nın normoksik koşullarda birikmesi ile sonuçlanmıştır (Jiang ve ark. 1997) ve PKB/AKT'nin aktivasyonu, AKT/FRAP/mTOR yolu ile HIF1 α protein translyasyonunu arttırmıştır (Laughner ve ark., 2001, Plas ve Thompson 2005). MAPK/ERK1/2 reseptör tirozin kinaz sinyal iletimi de, HIF1 α 'yı fosforile ve aktive edebilmektedir.

TCA döngüsünün enzimlerinin son zamanlarda HIF1 α 'yı stabilize etmek için bir feedback mekanizması sağladıkları gösterilmiştir. Süksinat dehidrojenaz ve fumarat hidrataz genlerindeki mutasyonlar sırasıyla paraganglioma ve leyomyomlara neden olmaktadır. TCA döngüsündeki bu iki enzimin fonksiyonu, solunum zinciri için indirgeyici ekivalanların üretilmesi ile sonuçlanır. Aktivitelerinin kaybı, azalmış mitokondriyal solunuma ve durmuş TCA aktivitesine yol açarak süksinat ve/veya fumarat birikmesine yol açabilir. Bu durum da, psödohipoksiya olarak bilinen bir duruma neden olabilir. HIF1 α 'daki prolin kalıntılarının hidrosilasyonu sırasında, prolin hidrosilaz, α -ketoglutarat veya 2-oksoglutarat ve oksijeni süksinat ve karbondioksite dönüştürür (Kaelin 2006). Birikmiş süksinat veya fumarat sitozole sızarak HIF1 α prolin hidrosilazların aktivitesini inhibe edebilir. Fumarat hidrataz aktivitesini kaybetmiş tümörler, artmış HIF1 α (Pollard ve ark. 2005a, Pollard ve ark. 2005b) ve glikolitik enzimlerin (Vanharanta ve ark. 2005) ifadesi yanında yüksek seviyede vaskülerizedir. Tümörlerdeki süksinat dehidrojenaz mutasyonları, HIF yolağı aktivasyonuna neden olabilir; gen ifade profiline göre SDHB, SDHD veya VHL mutasyonlarına sahip feokromositomların psödo hipoksik HIF gen imza motifine sahip olduğu gösterilmiştir (Dahia ve ark. 2005). Ayrıca, piruvat ve laktatın HIF1 α 'yı stabilize ettiği gösterilmiştir (Lu ve ark. 2005).

HIF-1 ayrıca doğrudan PDK1'i kodlayan geni aktifleştirerek, TCA koruyucusu olarak bilinen PDH'ı baskılar. Hipoksik HIF-1 α null hücrelerinde, PDK1 ifadesi ATP seviyelerini artırır, hipoksik ROS oluşumunu azaltır ve bu hücreleri hipoksinin neden olduğu apoptozdan kurtarır. Bu çalışmalar, ATP üretimini devam ettirmek ve toksik ROS üretimini önlemek için glukoz metabolitlerinin mitokondriden glikolize geçişini sağlayan hipoksi-uyarılmış metabolik değişimi göstermektedir (Kim ve ark. 2006).

2.3.5. P53 ve Glikoliz

Genomik bütünlüğün korunması, hücre döngüsü tutulmasının ve apoptoz gibi bilinen işlevlerine ek olarak, pek çok çalışma p53'ün mitokondriyal solunum ve glikolizi düzenlediğini göstermektedir. Bensaad ve ark. TP53 ile uyarılan glikoliz ve apoptoz düzenleyici (TIGAR)'yi p53 hedef geni olarak tanımlamışlardır (Bensaad ve ark. 2006).

Yabani tip hücrelerde TIGAR ifadesi normaldir ve fruktoz-2,6-bisfosfat düzeyini düşürerek, glukoz-6-fosfatı pentoz fosfat yolağına yönlendirerek glikolizi baskılar. Pentoz fosfat yolağının aktivasyonu, NADPH düzeylerini artırır ve bu da ROS'u uzaklaştırmak için redükte glutatyon düzeylerini artırır. Bu nedenle, normal TIGAR ifade eden hücrelerde, ROS düzeylerinde genel bir azalma gözlenmektedir. Bu nedenle, p53'ün ve dolayısıyla TIGAR ifadesinin kaybı, pentoz fosfat yolunun zararına olacak şekilde artmış glikolize ve ayrıca artan ROS üretimine neden olmaktadır. Matoba ve ark. bir diğer p53 hedefi olarak sitokrom oksidaz 2 (SCO2) sentezini tanımlamıştır. SCO2'nin ifadesinin p53 seviyesini yansıttığı; sırasıyla p53+/+, p53+/-, p53-/- hücrelerindeki azalmasıyla belirlenmiştir. SCO, COX kompleksinin bütünlüğü için gereklidir. P53-/- hücrelerde SCO2'nin ifade ettirilmesi solunumu geri kazandırmış; SCO2'nin p53+/+ hücrelerde bozulması solunumun bozulmasına yol açmıştır. P53 kaybı, SCO2 ifadesinin kaybına, ayrıca düzgün olmayan bir COX bütünlüğüne ve neticede solunum kaybına neden olmaktadır. Solunum kaybı, hücreleri enerji üretimi için glikolize bağımlı olmaya zorladığı ve ayrıca glikoliz için bir amplifikasyon döngüsü oluşturması için PKB/AKT'yi aktive ettiği ifade edilmiştir (Matoba ve ark. 2006).

Fosfogliserat mutaz (PGM), 3-fosfogliseratın 2-fosfogliserata dönüşümünü katalize eden glikolitik bir enzimdir. PGM'nin aktivitesi, akciğer, kolon ve karaciğer kanserlerinde yüksek gözlenmiştir. Kondoh ve ark. p53'ün PGM ekspresyonunu baskıladığını göstermiştir. Bu nedenle, kanser hücrelerinde p53 kaybı, artmış PGM aktivitesine ve artmış glikolize yol açmaktadır (Kondoh ve ark. 2007).

2.4. Warburg Etkisi Karakteristikleri ve Kanser Hücrelerine Yararı

2.4.1. Artan Glukoz Alımı ve Akışı

Warburg, kanser hücrelerinde artmış glukoz alımını tanımlamış ve bu özellik kanser hücre metabolizmasının hatta kanser hücrelerini normal hücrelerden farklı kılan en temel

karakteristiği olarak kabul edilmiştir. Kanser hücreleri hücre dışı glukozu, glukoz taşıyıcıları (GLUTs) ile hücre içine alırlar. Glukozu hücre zarından pasif şekilde taşıyan GLUT izoformlarından bazılarının tümörlerde yüksek seviyede ifade edildiği gösterilmiştir. Bu taşıyıcıların glukoz taşıma kinetik özelliklerinde farklılıklar olmasına rağmen, glukozu pasif akışının akabinde fosforlayan heksokinaz enzimi sayesinde hücre içerisinde hapsedilir. Bu nedenle bir tümörün glukoz alımını arttırması için iki özellik ile “evril”mesi gerekir: membranda yer alan glukoz taşıyıcılarını arttırmalı veya glukoz taşıyıcı izoformlarını, glukoz afinitesi yüksek olan izoformlara dönüştürmelidir. Doğrular şekilde, tümörlerde glukoz taşıyıcılarının 10 kat kadar artmış olduğunu gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Şu ana kadar tanımlanmış 12 GLUT izoformlarından, GLUT3 ve GLUT4 izoformlarının glukoz afiniteleri en yüksek bulunmuştur. Bu izoformların ise çoğu insan kanserlerinde yüksek seviyede ifade edildiği gösterilmiştir. GLUT1 ifadesi normal dokularda görülmekte birlikte, tümörlerde de GLUT3 ve GLUT4 ile birlikte yüksek seviyede ifade edilmektedir.

Tümör baskılayıcı TP53 glukoz taşıyıcılarının ifadesini transkripsiyonel düzeyde baskılamak, mutant p53 GLUT-1’in sitoplazmik membranlara translokasyonunu uyarır. Glukozu, glukoz-6-fosfata dönüştüren heksokinaz-II ifadesi ise proto-onkogen olan c-Myc tarafından transkripsiyonel düzeyde arttırılır. Glikolitik akışın hem glukoz alımı hem glukozun glukoz-6-fosfata metabolik aktivasyonu ile arttığı gösterilse de, glukozun glikolize akışı fruktoz-6-fosfatın fruktoz-1,6-bifosfata fosfofruktokinaz-1 (PFK1) tarafından dönüştürülmesi ile kesin hale gelir. Bu kritik basamağın kontrolü ise fruktoz-2,6-bifosfat (F26BP) derişimi ile sağlanmaktadır. TP53, F26BP’yi degrade eden TIGAR’ı transkripsiyonel upregüle ederek glikolizi baskılamaktadır. Fosfogliserat mutaz (PGAM) 3-fosfogliserat’ı 2-fosfogliserata dönüştüren enzimdir. TP53, ubiquitin ligazı upregüle eder ve PGAM’ın poliubikitinlenerek proteozomal degradasyonunu sağlar. Glikolizin son basamağı pirüvat kinaz tarafından katalizlenir ve fosfoenolpirüvat (PEP) pirüvata dönüştürülür. 12 bilinen izoformundan PKM2 tümörijenite ile yakından ilişkilidir. PKM1-PKM2 dönüşümü post-transkripsiyonel seviyede mikroRNA’lar tarafından gerçekleştirilebilir. Son çalışmalar, PKM2’nin DNA hipometilasyonu ve c-Myc ile transkripsiyonel düzeyde upregüle edilebildiğini göstermiştir. Ortamda pirüvatın fazla miktarda bulunması ise, laktat dehidrojenaz (LDH) tarafından laktata dönüştürülmesi ile sonuçlanmaktadır. Meydana gelen laktat ise, proton-bağımlı monokarboksilat taşıyıcıları

(MCT) tarafından hücre dışına taşınır. c-Myc, LDHA ve MCT1 ifadelerini transkripsiyonel düzeyde upregüle ederek tümör-spesifik laktat mekiğine katkı sağlar.

Glukozun absorblanması ve metabolik yollarla yıkılmasının her dokuda ortak şekilde izlediği durumlar vardır. Glikoliz dışında bir diğeri glukozun, hücre içerisine alındığında glikojene çevrilmesidir. Bu yüzden, artmış glukoz alımı fazla miktarda glikojen sentezini uyarabilir. Nitekim pek çok çalışma göstermiştir ki, tümörlerde ciddi bir glikojen birikimi bulunmaktadır. Bu şekilde var olan bir glukoz deposu, kanser hücrelerine, mikroçevrelerinde yeterli damarlanma ve dolayısıyla O₂ veya glukoz olmadığı durumlarda büyüme avantajı sağlayabilir (Ferreira 2010). Glikojen sentezinde yer alan glikojen sentaz, GSK3 tarafından fosforile edilerek inaktif hale gelmektedir. GSK3 aktivitesi ise büyüme faktörleri ve insülin ile aktifleşen PI3K/Akt sinyal iletimi ile inhibe edilir. Bu açıdan bakıldığında GSK-3 tümör baskılayıcı olarak önemli role sahiptir ve kanser hücrelerinin metastatik potansiyelini etkilemektedir.

Pentoz fosfat yolu da glikolize paralel olarak glukoz metabolizmasında önemli rol oynamaktadır. NADPH ve riboz-5-fosfat, glukoz-6-fosfattan bir seri tepkime sonucunda meydana gelir. NADPH ve riboz-5-fosfat, glikolizin çok önemli ara ürünlerinden olup glikoliz ile ya da glukozun tam bir oksidasyonu ile elde edilemezler. NADPH, tümör hücrelerinde yağ asidi sentezinin devamlılığı için gerekmektedir (Lazo 1981). Ayrıca NADPH, toksik reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılmasında rol an hücre içi en önemli antioksidan olan glutatyonun (GSH) indirgenmiş halinin takviyesinde esas kofaktörüdür (Ahmad ve ark. 2005). Riboz-5-fosfat ise nükleik asit bazlarının prekürsörü olup biyosentezi hızlı proliferen olan hücrelerde sürekli bir ihtiyaçtır (Ramos-Montoya ve ark. 2006). Normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerinde glukoz akışının pentoz fosfat yolu üzerinden arttığı gösterilmiştir.

2.4.2. Laktat Oluşumu ve Asidoz

Glikolizin artan akışı, tümör hücrelerinin son ürün olan laktik asidi hızlı bir şekilde uzaklaştırmasını da gerektirmektedir. Bu süreç, laktik asidi tümör mikroçevresine atan monokarboksilat taşıyıcıları tarafından gerçekleştirilmektedir. Tanımlanan 14 MCT izoformundan ilk 4 MCT üyesinin (MCT1-4) laktatı plazma membranından taşıyabildiği gösterilmiştir. Bu izoformlardan MCT2 ve MCT4'ün laktat afinitesi en yüksek bulunurken, MCT1 normal dokularda da ifade edilmektedir. Glukoz taşıyıcılarında

olduğu gibi, MCT1 de MCT2 ve MCT4 gibi tümörlerde yüksek seviyede ifade edilmektedir.

Tümör mikroçevresinin, tümör içerisine kıyasla daha düşük pH'ya sahip olması yaygın bir durumdur. Bu durum fizyolojik koşullara oldukça zıttır nitekim hipoksik koşullar altında bile normal doku mikroçevresi, norma doku içerisine kıyasla yüksek pH'ya sahiptir. Tümörler, bu pH gradyanını tersine dönüştürerek çevre sağlıklı dokulara zarar vererek hem tümör yayılmasını hem de invazyonunu kolaylaştırabilir. Hücre dışına laktat başına eş miktarda proton veren laktat taşıyıcıları, glikoliz ile meydana gelen laktatın uzaklaştırılmasından sorumlu tek transmembran kanal (simport) olmasına rağmen bu duruma katkı sağlayan başka transmembran taşıyıcılar da tanımlanmıştır. Bunlar arasında, sodyum/proton değiştiricileri (NHE), klor/bikarbonat değiştiricileri, proton/klor ko-taşıyıcıları ve transmembran karbonik anhidrazlar yer almaktadır.

Laktik asit, insan T hücrelerinin metabolizma ve işlevini bozarak immunbaskılayıcı rol üstlenerek kanser hücrelerini immün sistemden korumaktadır. Çoğu terminal kanser hastalarının yoğun ağrı çektiği bilinmektedir. Bu durumun kanser hücreleri tarafından oluşturulan laktik asidin sinir hücrelerine verdiği zarardan kaynaklandığı düşünölmektedir (Gatenby ve Gillies 2004). Laktik asit ayrıca, bir glukozaminoglikan olan hyaluronan oluşumunu ve onun transmembran reseptörü olan CD44'ün ifadesini arttırmaktadır. Hyaluronan hücre yüzeyindeki CD44'e bağlandığında, hücre tutunmasını azaltarak malign progresyonu arttırmaktadır (Stern ve ark. 2002).

Tümör mikroçevresinin belirgin bir özelliği, hücrelerde son glikolitik metabolit olan laktattan ve hücre membranında bulunan bir dizi proton değiştiriciden kaynaklanan hücre dışı asidozdur. Pek çok çalışma, asidik mikroçevrenin kanser hücrelerine büyüme avantajı ve metastatik avantaj sağladığını ortaya çıkarmıştır. Kanser hücreleri normal hücrelere kıyasla daha yüksek bir glikolitik hıza sahip olduğundan, yüksek bir glukoz akışı, hücrelerin aşırı laktat üretmesi ile sonuçlanmaktadır (Mookerjee ve ark. 2015). Neticede, anormal glikolitik metabolizma, tümör hücreleri üzerinde artan bir asit yükü yaratmaktadır. Örneğin, HIF1 ve Myc, birlikte glukoz akışını ve laktat üretimini arttırmak için çeşitli glikolitik enzimlerin ifadesini transkripsiyonel olarak uyarabilir (Gordan ve ark., 2007, Semenza, 2010). Ayrıca, tümör hücreleri dışarısında asidin uzaklaştırılma

oranı düşüktür, bu şekilde düşük pH'ya sahip tümör mikroçevresi sağlanmış olur (Dhup ve ark. 2012, Spugnini ve ark. 2015).

Laktat hücre içinde üretilir ve glikoliz türevli bu laktat, yüksek seviyede glikolitik hücrelerde proton-bağlı monokarboksilat taşıyıcı 4 (MCT4) tarafından ESM'e atılmaktadır (Dimmer ve ark., 2000, Fox ve ark. 2000, Ullah ve ark. 2006). MCT4, ayrıca HIF1'in hedef genidir (Semenza 2010, Ullah ve ark. 2006). Tümör hücreleri genellikle hipoksik ortamlarda yer aldığından, hipoksi uyarılmış HIF1, ESM'ye hücre içi laktatı veren MCT4 ekspresyonunu transkripsiyonel olarak upregüle eder. Hücre dışı laktat biriktikçe, mikroçevre asidozu meydana gelir. Laktat taşıyıcısına ek olarak; sodyum-proton değiştirici 1 (NHE1, Na⁺/H⁺ antiporterların SLC9 gen ailesinin bir üyesi) (Donowitz ve ark. 2013, Lee ve ark. 2010), anyon değiştirici 2 (AE2, SLC4 gen ailesinin bir üyesi olan Na⁺ bağımsız klor-bikarbonat değiştiricilerinin SLC4 gen ailesinin bir üyesi) (Alper ve ark. 2002) ve sodyum bikarbonat taşıyıcı 1 gibi çoklu proton değiştiricileri de hücre dışı pH'yi azaltmak için ekstraselüler asidoz sürükleyicileri olarak işlev görür. Tümör hücre metastazının ilk evresi morfolojik değişimdir (EMD'nin başlangıç aşaması). Bu süreç esnasında, kanser hücreleri lamellipodia oluşturmak için uzar, bu bölgelerde pH düzenleyicilerinin tercihen ifade edildiği gösterilmiştir (Klein ve ark. 2000, Lagana ve ark. 2000). Bu fenomen kısmen, kanser hücresi metastazı için düşük pH'nın gerekli olabileceğini düşündürmektedir.

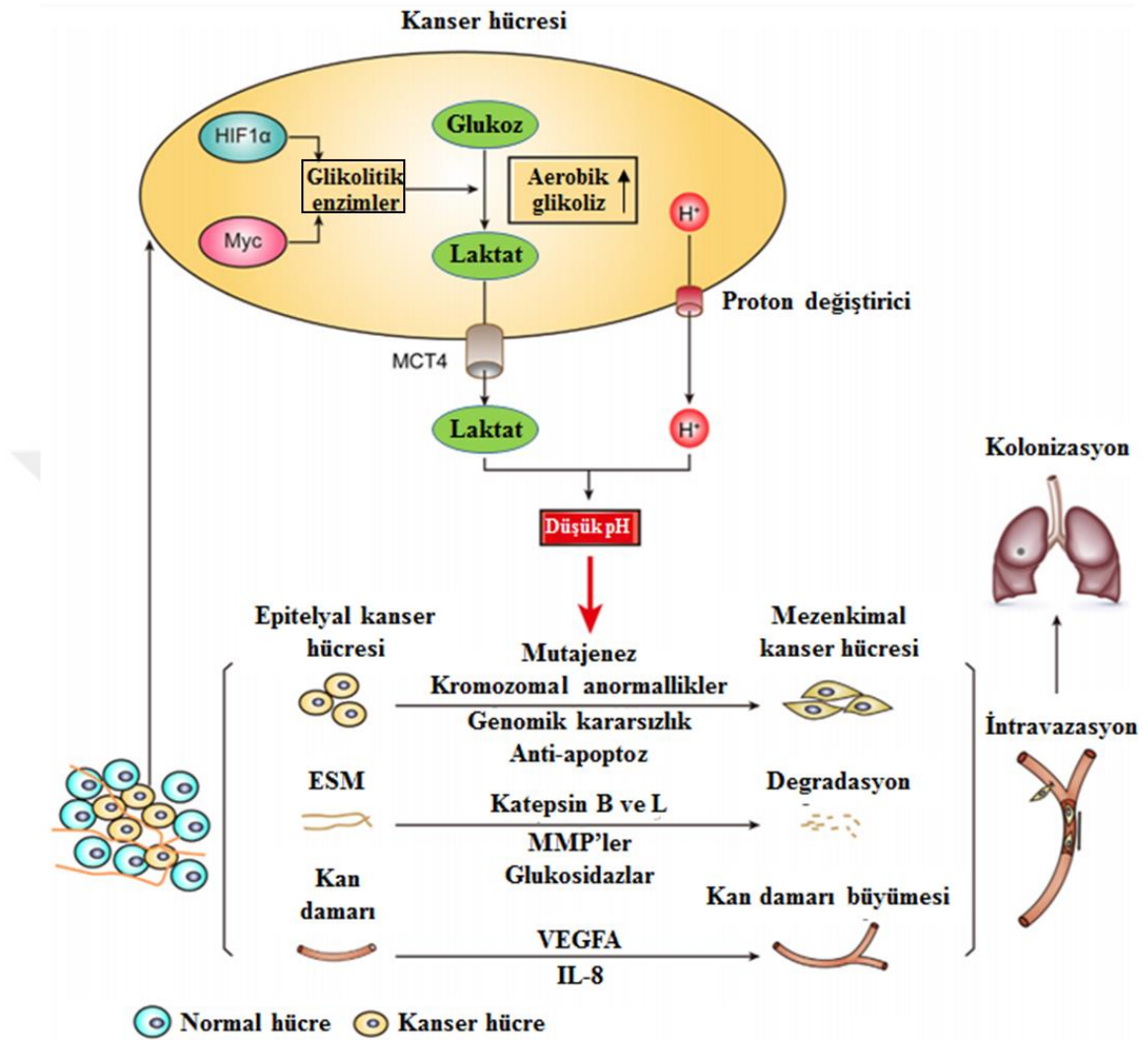
Solid tümörler sıklıkla asidik bir çevre geliştirir. Bu çevre, kanser hücrelerinin adapte olarak hayatta kaldığı, ancak normal hücrelerin kaybolduğu bir ortamdır. Yukarıda açıklandığı gibi, ekstraselüler asidoz, anormal kanser metabolizmasının bir sonucudur. İlginç şekilde, bu durumun tersi yönünde asit yükü, kanser progresyonunu ilerletecek bir dizi değişikliğe neden olabilmektedir. Düşük pH'nın, mutajenez, kromozomal anormallikler ve genom kararsızlığına destek olabileceği bulunmuştur (Yuan ve Glazer 1998, Yuan ve ark. 2000). Üstelik, düşük pH'nın, artan kaspaz aktivitesi (Park ve ark. 1999) veya p53'e bağlı yoldan (Williams ve ark. 1999) hücre apoptozunun uyarıldığı bildirilmiştir. Bu durum, apoptoza dirençli hücreleri geride bırakıp klon oluşumuna sebep olabilir (Huang ve Zong 2017). Ayrıca, ilaç direnci de düşük pH ile ilişkili olabilir (Wojtkowiak ve ark. 2011).

ESM, kanser hücrelerinin uzak bir bölgeye metastaz yapmasını engelleyen hayati öneme sahip bir histolojik engeldir. Bu nedenle, tümör hücresi invazyonu için ESM'in dönüştürülmesi ve yeniden modellenmesi gereklidir. Bu kapsamda, ESM bileşenleri, kanser invazyonunu kolaylaştırmak için dönüştürülür ve bozulmaya uğrar. Düşük pH kanser hücrelerini; katepsin B ve L (Buck ve ark. 1992, Maciewicz ve ark. 1990), matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) (Kato ve ark. 2005, Kato ve ark. 2007) ve glikosidazlar (Bourguignon ve ark. 2004) gibi sistein proteazlarını salgılamak için aktive eder. Tüm bu enzimler, ESM'de kollajenleri, lamininleri, fibronektinleri veya proteoglikanları parçalamak için işbirliği yaparlar; bu da, invazyon ve metastaz lehine kanser hücrelerini çevreleyen gevşek bir mikroçevre yaratır.

ESM degradasyonunun haricinde, düşük pH aynı zamanda anjiyojenez de uyarmaktadır. Yeni oluşturulmuş kan damarları tümöre doğru uzanabilir, böylece ayrılmış tümör hücrelerinin intravazasyon ve metastaz yapma şansını artırır. Bu süreç, esas olarak vasküler endotelial büyüme faktörünün VEGFA (Fukumura ve ark. 2001, Shi ve ark. 2001, Xu ve ark. 2002) ve interlökin 8'in (IL-8) aktivasyonu ve salınımı ile gerçekleşmektedir (Shi ve ark. 2000, Xu ve Fidler 2000). Ayrıca, ekstraselüler asit yükünün lenfosit aktivitesini ve proliferasyonunu baskıladığı, bu sayede tümör hücrelerinin immün sistemden kaçışlarını sağladığı gösterilmiştir (Bosticardo ve ark. 2001, Kellum ve ark. 2004, Lardner 2001). Hatta, kanser hücrelerinde asidik "priming" in nüde farelerin akciğerlerinde başarılı bir kolonizasyonu teşvik ettiği gösterilmiştir, bu da asidozun makroskobik metastaz sürecinde etkisi olduğunu düşündürmektedir (Riemann ve ark. 2014, Rofstad ve ark. 2006).

Meme kanserinde yapılan bir çalışmada, metastatik meme kanseri hücre soyunda MCT4 ve onun alt birimi CD147'nin ifadeleri, metastatik olmayan meme kanseri hücrelerinden daha yüksek bulunmuştur. CD147'nin baskılanması ise, MCT4 ifadesini ve membranda birikimini azaltmıştır. CD147 ve MCT4'ün birlikte baskılanması, meme kanseri hücrelerinin migrasyonunu engellemiştir (Gallagher ve ark. 2007). Akciğer kanserinde kullanılan MCT inhibitörleri, MCT1 ve MCT4'ün enzimatik aktivitelerini baskılamış; A110L hücrelerinde MCT1 ve MCT4 ifade düzeyleri etkilenmeksizin migrasyon ve invazyonları baskılanmıştır (Izumi ve ark. 2011). Bu çalışmalar, Warburg etkisinin düşük

pH'ya bağılı olarak metastazın ana kaynağı olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 2.4) (Huang ve Zong 2017).



Şekil 2.4. Kanser hücreleri ilişkili asidik mikroçevrenin metastaz sürecine etkisi (Huang ve Zong 2017'den Türkçeleştirilerek alınmıştır)

2.4.3. Oksidatif Stres

Hüresel oksidatif strese neden olan pek çok etken bulunmaktadır ve temelde, oksidan-antioksidan dengesinin bozulması neticesinde ROS'un artışından kaynaklanmaktadır. ROS çok çeşitli metabolik tepkimeler ile üretilebilir. Buna örnek olarak su moleküllerinin oluşturulduğu mitokondriyal solunum verilebilir. Moleküler oksijen (O_2) ETS'deki terminal elektron akseptörüdür ve son aşamada H_2O 'ya dönüştürülür. Bazı durumlarda, O_2 yalnızca bir elektron alır ve süperoksit anyonu meydana gelir. O_2 moleküllerinin %4-5'inin süperoksit anyonuna dönüştüğü tahmin edilmektedir (Spitz ve ark. 2000).

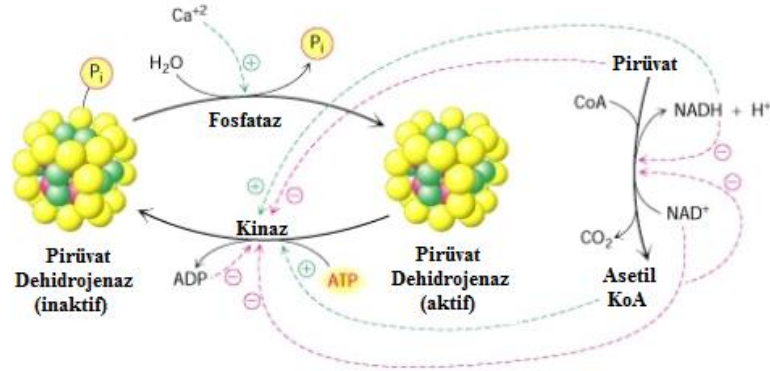
Süperoksitler, süperoksit dismutaz tarafından peroksitlere dönüştürülür. Pirüvatın, peroksitleri suya indirgeyerek ortamdaki temizlediği gösterilmiştir (Nath ve ark. 1995). Dolayısıyla, artmış glikoliz sayesinde meydana gelecek fazla pirüvat sayesinde oksidatif stres azaltılabilir.

Warburg fenotipi ile oksidatif stresin azaltılmasının 2 yolu daha bulunmaktadır (Kim ve ark. 2009). Mitokondrinin ROS oluşumunda temel kaynak olduğu düşünülürse, mitokondriyal disfonksiyon neticesinde oksidatif stres azalabilir (Orrenius 2007). Bir diğer yol ise, Warburg ilişkili antioksidan üretimidir. Kanser hücreleri hızlı şekilde bölünürken ve vücutta yayılım gösterirken, daha fazla enerjiye ve yapıtaşına ihtiyaç duymaktadır. Bunun için de, büyümelerinin devamlılığı için yüksek bir metabolik profile gereksinim duyar. Glukoz hücre içerisine alındığında, iki temel metabolik yolda kullanılır: glikoliz ve pentoz fosfat yolu. Pentoz fosfat yolunda glukoz ribuloza dönüştürülürken $NADP^+$ 'den $NADPH$ oluşur. $NADPH$, okside molekülleri indirgeyerek oksidatif stres azaltılır. $NADPH$ ayrıca, glutatyon disülfiti glutatyona indirgeyen glutatyon redüktazın kofaktörüdür. Glutatyon akabinde hiperoksitleri suya indirgeyerek hücre içerisinde oksidatif stresi azaltır (Spitz ve ark. 2000). Pentoz fosfat yolu ile üretilen $[NADPH]/[NADP^+]$ oranı hızlı bölünen kanser hücrelerinde genellikle yüksektir (Klein ve ark. 1990). Kanser hücreleri için oksidatif stresten korunmak oldukça önemlidir ve defektif bir mitokondriyal ETS, normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerini daha duyarlı hale getirmektedir. Örneğin yapılan bir çalışmada, normal hücreler etkilenmezken kanser hücreleri oksidatif strese duyarlı gözlenmiş ve glukozun ortamdaki uzaklaştırılması hücre ölümünü arttırmıştır (Ahmad ve ark. 2005). Ruckenstein ve ark.ları da Warburg etkisinin, oksidatif stres uyarılmış apoptozisin baskılayabildiğini göstermiştir. Çalışmalarında, Warburg etkisinin kanser oluşumuyla ilişkili olabileceğini de belirtmişlerdir (Ruckenstein ve ark. 2009).

2.5. Glukoz Oksidasyonunun PDH ve PDK Tarafından Kontrolü

Oksidatif metabolizmanın merkezinde çok alt birimli PDH kompleksi yer almaktadır. PDH, pirüvatın TCA döngüsüne girmesini sağlar. Bunu ise, pirüvatın asetil-KoA'ya oksidatif dekarboksilasyonunu katalizleyerek sağlar. Glikoliz ve TCA döngüsünü bağladığından glukoz metabolizmasında önemli bir düzenleyicidir. PDH; pirüvat dehidrojenaz (E1), dihidrolipoil transasetilaz (E2) ve dihidrolipoil dehidrojenaz (E3)

olmak üzere üç büyük alt üniteden oluşur. PDH aktivitesi çeşitli allosterik efektörler ve reversibl fosforilasyonla sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. PDH, son ürünü olan NADH'ın E2 ve E3 alt birimlerine bağlanmasıyla inhibe edilir. Fakat PDH, çoğu zaman ilişkili kinazları ve fosfatazlarının aktiviteleriyle kontrol edilmektedir (Linn ve ark. 1969). Memeli PDH enzim kompleksini kontrol eden dört adet kinaz (PDK1-4) bulunmaktadır. PDKlar, PDH işlevinin en önemli düzenleyicileri olarak görülmektedir ve enzim aktivitesini enzimin E1 (PDHA1) alt ünitesini fosforile edip inaktif duruma getirerek kontrol ederler (Şekil 2.5). PDH fosfatazları ise (PDP) bu durumu tersine çevirerek PDH aktivitesini arttırmırlar. İnsanlarda 4 farklı PDK (PDK1-4) bulunmakta ve dokularda farklı seviyelerde ifade edilirler (Patel ve Korotchkina 2001). PDK'lar çeşitli hormonal ve besinsel uyarılara yanıt verirler. Bunlar arasında hipoksi ve besin düzeyi yer almaktadır ve bu sayede glukoz metabolizmasını sıkı şekilde kontrol ederler (Kim ve ark. 2006, Papandreou ve ark. 2006)



Şekil 2.5. PDH aktivitesinin kontrolü (Berg ve ark 2002'den Türkçeleştirilerek alınmıştır)

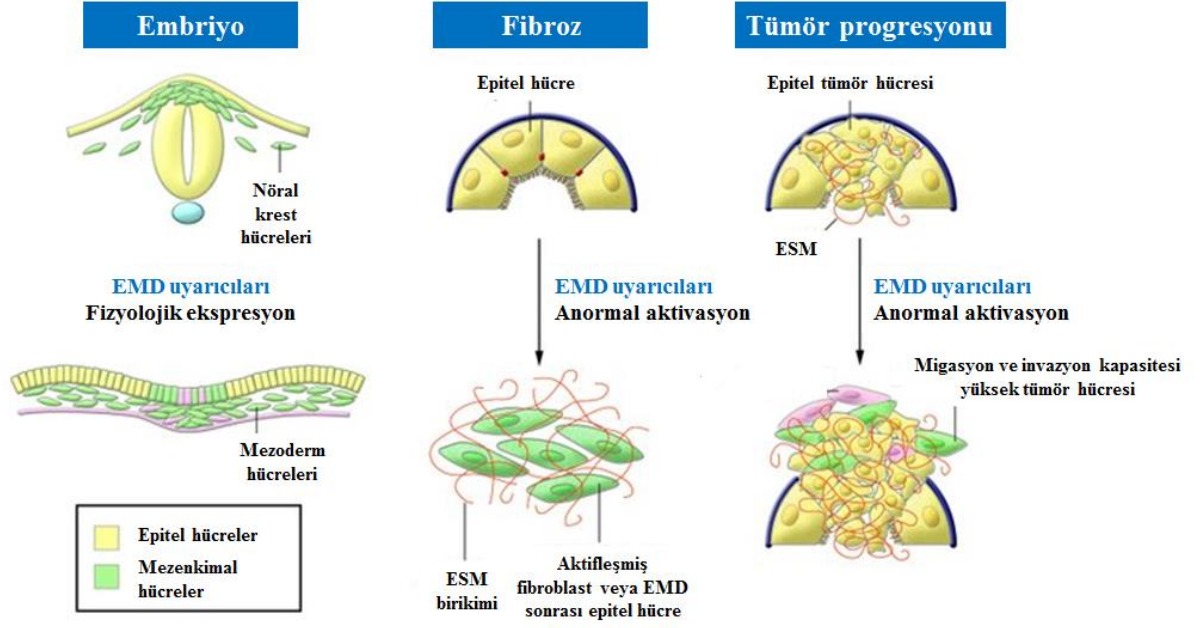
PDH enzim kompleksinin E1 (PDHA1) alt ünitesinde mutasyon bulunan hastalardan alınan fibroblastların kültürleri ile yapılan bir çalışmada, söz konusu hücrelerin sağlıklı gruptan alınan hücrelere kıyasla, yüksek miktarda glikolitik aktivite ve laktat üretimi gösterdikleri bulunmuştur (Simpson ve ark. 2006). Kim ve ark. ile Papandreou ve ark. HIF-1'in (hipoksik yanıtın düzenlenmesinden başlıca sorumlu transkripsiyon faktörü) PDK1'i upregüle ettiğini dolayısıyla PDH tarafından gerçekleştirilen karbon akışında bir azalma meydana geldiğini göstermişlerdir (Kim ve ark. 2006, Papandreou ve ark. 2006). Dahası PDK upregülasyonu, programlı hücre ölümüne artan bir direnç meydana getirmiştir. McFate ve ark. PDK1 upregülasyonunu baş ve boyun skuamöz hücreli

karsinoma hücrelerinin malign fenotipi için gerekli olduğunu göstermişlerdir. PDK1 overekspresyonu mitokondriyal metabolizma için karbon akışını azaltmış ve bunu doğrular şekilde, PDK1 knockdownu TCA sürecini arttırmıştır (McFate ve ark. 2008). Lu ve ark. benzer bulguları HIF1-bağımlı PDK3 upregülasyonu neticesinde göstermiştir. Bu çalışmada, tümör hücrelerinin, kemoterapötik ajanlar olan paklitaksel ve cisplatine gösterdikleri direnç PDK3 upregülasyonu ile artmış; PDK3 knockdownu ise hücreleri bu ajanlara hassas duruma getirmiştir. Ayrıca söz konusu ilaç direncini ise PDK1 ve PDK3'ün birlikte sağladığı gösterilmiştir (Lu ve ark. 2008). Benzer şekilde, PDK2'nin siRNA aracılı baskılanması neticesinde apoptoz artmıştır (Bonnet ve ark. 2007).

PDK'lar arasında PDK4, PDH aktivitesini kontrol eden esas enzim olup enerji kullanımında glukoz veya yağ asidi seçiminde önemli rol oynar (Kwon ve Harris 2004). PDK4 kalp, iskelet kası, karaciğer, pankreas ve böbrek gibi metabolik aktif dokularda yüksek seviyede ifade edilir ve metabolik stres koşullarında ifadesi selektif şekilde uyarılır. Açlık ve glukoz ihtiyacı PDK4 düzeylerini arttırmaktadır. Glukoz homeostazındaki rolü, PDK4 knockout fare çalışmasından anlaşılmıştır. Çalışmada, PDK4'ün besin algılama ve PDH aktivitesinin kontrolünde merkezi düzenleyici olduğu öne sürülmüştür (Jeoung ve ark. 2006) PDK4'ün tümörjenezdeki rolüne dair çalışmalar giderek artmaktadır. Örneğin bir tanesinde, PDK4 mTORC1'i aktive etmiş ve PDK4'ün overekspresyonu hücreleri mTOR inhibisyonuna duyarlı hale getirirken; baskılanması ise tümörjenez azaltmıştır (Leclerc ve ark. 2017). PDK4 ve diğer izoformların inhibitörü olan DCA, kanser hücrelerinde *HIF1A* ifadesini azaltmakta ve antiproliferatif apoptotik etkilere neden olmaktadır (Bonnet ve ark. 2007, Kumar ve ark. 2012). Önemli sayıda prelinik *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar DCA'nın insan kanserlerinde kullanımının yararlı olabileceğini düşündürmektedir (Michelakis ve ark. 2008).

2.6. Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm

Epitelyal mezenkimal dönüşüm (EMD), çok sayıda fizyolojik ve patofizyolojik durumlarda önemli rol oynamaktadır. Mekanizmalarına göre EMD sınıflandırılmıştır. Tip I EMD, embriyonik ve gelişimsel; Tip II EMD, fibrotik ve yara iyileşmesi; Tip III EMD, kanser progresyonu süreçleriyle ilişkilendirilmiştir (Şekil 2.6) (Kalluri 2009, Kalluri ve Weinberg 2009, Bonnomet ve ark. 2010, Thiery ve ark. 2009, Thompson ve ark. 2008, Chaffer ve ark. 2007).

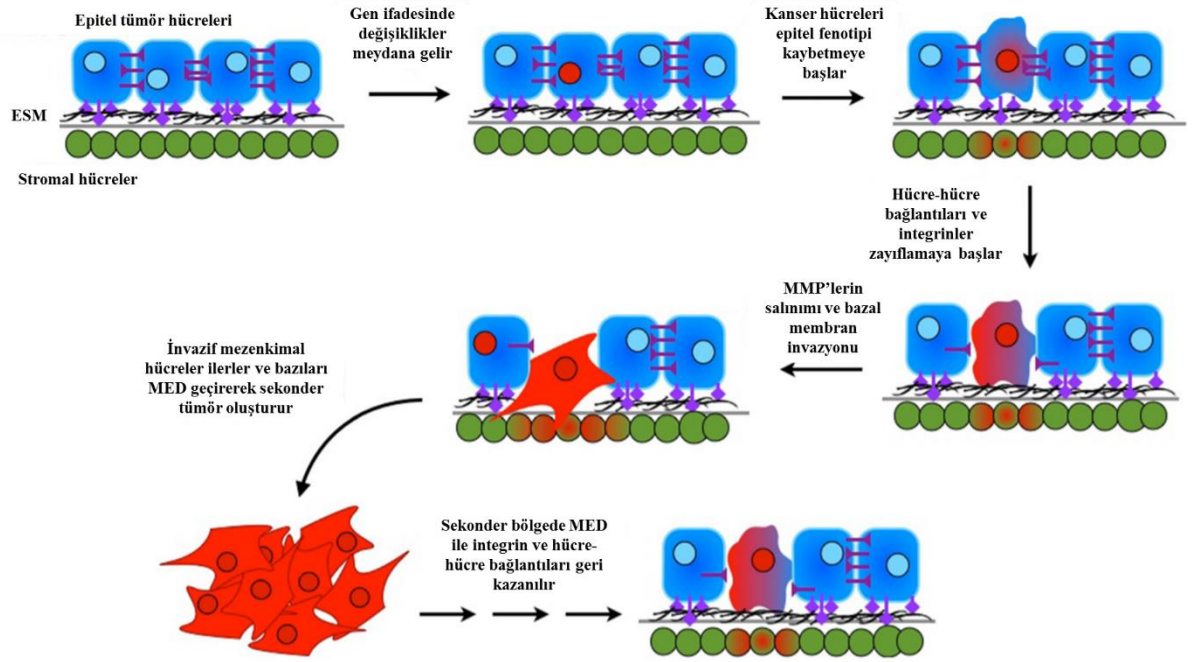


Şekil 2.6. EMD'nin sınıflandırılması (Kalluri ve Weinberg 2009'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır)

Tip I EMD (klasik EMD), embriyonik gelişim yanı sıra postnatal büyümede de gerçekleşmektedir. Ayrıca, epitelyal homeostazın sağlanmasında rol oynar. Bu süreç boyunca EMD basamakları spesifik olup günümüzde iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Normal epitelyal hücreler kübik olup birbirleri ile adherent ve sıkı bağlantılar sayesinde temas halindedir. Aynı zamanda integrinler aracılığıyla bazal membrana bağlıdırlar. Adherent bağlantılar sıklıkla E-kaderin, kateninler ve aktin ile sağlanırken kludin ve okludinler daha çok sıkı bağlantı molekülleridir. EMD uyarıcıları, adherent ve sıkı bağlantı bileşenlerinin ifadesini azaltır ve neticede hücrelerin apikobazal polariteleri zayıflayarak bazal membrandan ayrılmaları sağlanır (Townsend ve ark. 2008, Peinado ve ark. 2004). Bu süreç, sitoskelette değişiklikler de meydana getirir. Örneğin, periferel aktin elementler stres ipliklerine değişir ki bu iplikler sayesinde hücreler migrasyon yapabilirler (Christiansen ve Rajasekaran 2006, Yang ve Weinberg 2008). Tüm bu değişikliklere ilaveten proteaz aktivitesi kazanmış hücreler invazyon yapabilir duruma gelirler (Haraguchi ve ark. 2008). Bu süreç ile oluşan primer mezenkimal hücreler, daha sonra mezenkimal epitelyal dönüşüm (MED) süreci geçirerek sekonder epitelyumu meydana getirir (Chaffer ve ark. 2007). Embriyonik gelişim sırasında hücreler birkaç sefer EMD geçirir ve akabinde gerçekleşen MET ile birlikte hemen hemen tüm organlar bu döngü ile meydana gelir.

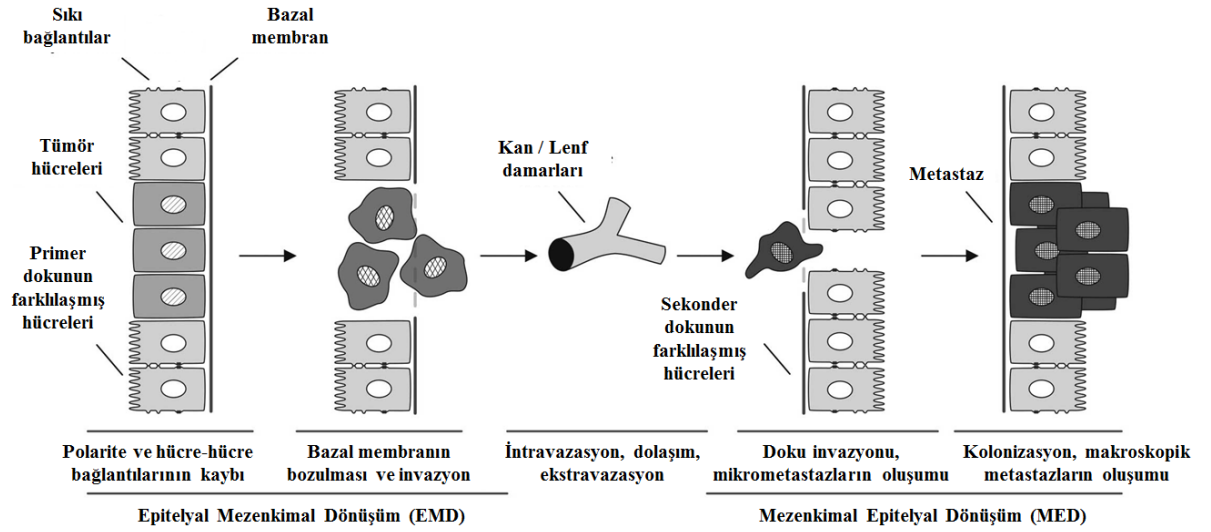
Tip II EMD (fibrotik EMD), hasar ile uyarılır ve yaralı dokuların yenilenmesi için genellikle fibroblastları oluşturur (Potenta ve ark. 2008, Kalluri ve ark. 2009, Zeisberg ve ark. 2007a, Zeisberg ve ark. 2007b). Fizyolojik koşullarda fibroblastlar ve immün hücreler sitokinler gibi inflamatuvar faktörler ve ESM proteinleri salarak hücreleri EMD'ye sürüklerler. İnflamasyon azaldığında bu süreç durdurulur. Patolojik koşullarda ise, kalıcı bir inflamasyon normal epitel hücrelerin devamlı EMD sürecine maruz kalmasına neden olarak fibroza ve organ (akciğer, karaciğer, böbrek) hasarına neden olabilir (Potenta ve ark. 2008, Kalluri 2009, Zeisberg ve ark. 2007a, Zeisberg ve ark. 2007b, Zeisberg ve ark. 2008, Kim ve ark. 2006).

Fibroza benzer şekilde, onkojenik süreç hücrelerin homeostazını bozarak Tip III EMD'yi uyarabilir. Onkojenik EMD, epitel hücrelerin, mezenkimal hücrelerin karakteristiği olan hareketli ve invazif fenotip kazanmasını sağlar ki bu özellikler metastatik kaskada önem taşımaktadır (Thiery 2002). Bu süreçte, epitel hücreleri polarite ve hücre-hücre bağlantılarını kaybeder ve ardından sitoskeletonleri yeniden şekillenir (Larue ve Bellacosa 2005). Ayrıca, matriksin yeniden şekillenmesini de sağlayarak tümör metastazına katkı sağlar (Gilles ve ark. 2005). Uygun bir bölgeye migrasyon gerçekleştiğinde, tümör hücreleri E-kaderin gibi diğer epitelyal belirteçleri yeniden ifade ederler (MED) (Şekil 2.7) (Peinado ve ark. 2007). Tip I EMD özelliklerinin çoğu onkojenik EMD sürecinde yer almaktadır. Fakat onkojenik EMD sürecinde bu özellikler daha düzensiz ve daha az koordine. EMD'nin tümör progresyonuna katkısı günümüzde yaygın şekilde kabul görmektedir (Şekil 2.7) (Condeelis ve Segall 2003, Brabletz ve ark. 2001, Trimboli ve ark 2008).



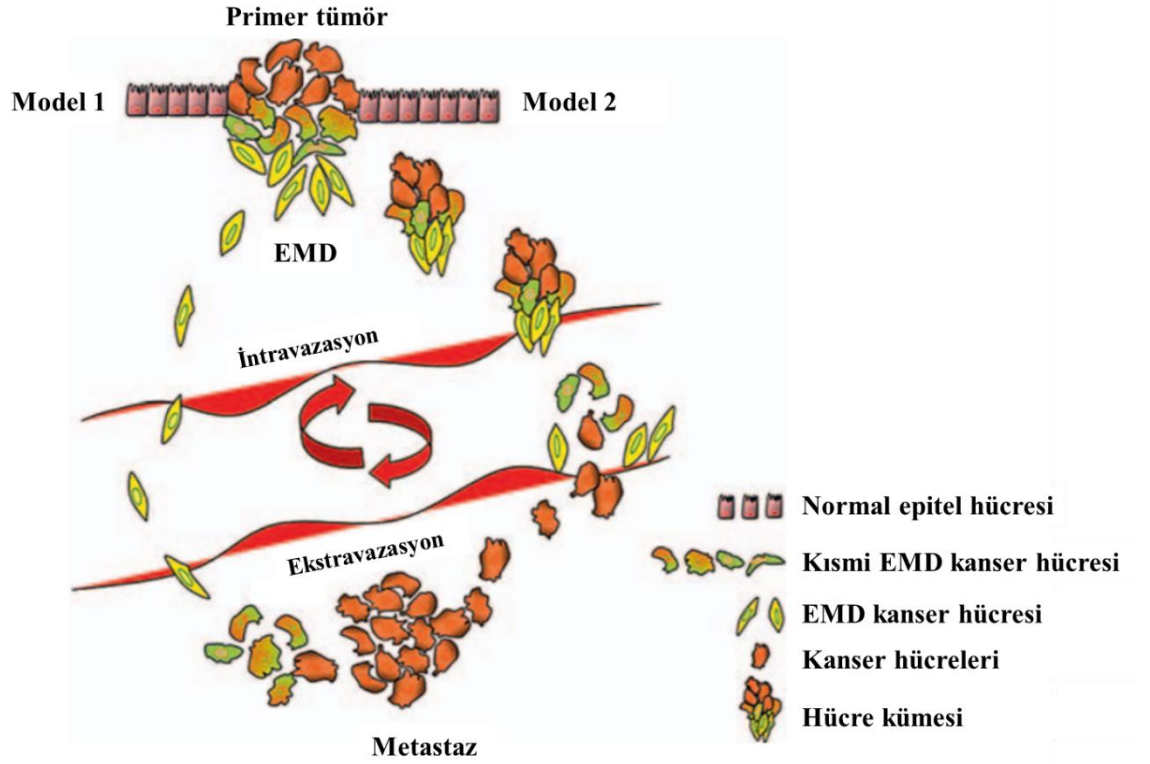
Şekil 2.7. EMD geçiren hücrelerde gözlenen değişiklikler (Heerboth ve ark. 2015'den Türkçeleştirilerek alınmıştır)

Kanser hastalarında temel ölüm nedeni, metastazlı seyreden tümör progresyonudur ve EMD bu süreçte önem taşımaktadır (Kalluri ve Weinberg 2009). Metastatik lezyonlar, sıklıkla çok yaygın ya da cerrahi müdahale ile alınamayacak kadar büyük olduklarından, klinik uygulamalarda aşılması güç durumlar yaratmaktadır. Bu nedenle metastaz sürecinin anlaşılması, tedavi iyileştirilmesi ve kanser hastalarının ölüm oranının azaltılmasında kilit öneme sahiptir. Metastaz için epitelyal kökenli tümör hücreleri şu özellikleri edinmelidir: (1) hücre-hücre bağlantılarını kaybetmeli, bazal membranı bozmalı ve tümör kitlesinden ayrılmalı, (2) çevre veya komşu dokuda invaze olmalı, kan ya da lenf damarlarına girmeli (intravazasyon) ve son olarak (3) uzak organlarda damarları terk edip (ekstravazasyon) sekonder tümörü oluşturmalıdır (Geiger ve Peeper 2009). EMD süreci geri dönüşümlü olup bu özellik merkezi öneme sahiptir. Bu geri dönüşüm sayesinde farklı organlara migrasyon tamamlandığında, mezenkimal hücreler MED geçirek bu bölgelerde makroskopik metastazları oluşturabilirler (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. EMD ve Metastaz basamakları (Kiesslich ve ark. 2013'den Türkçeleştirilerek alınmıştır)

EMD'nin kanser metastazındaki rolüne ilişkin 2 model öne sürülmüştür. Bir uyarandan sonra, kanser hücreleri EMD programını aktive eder ve fenotipik değişiklikler meydana gelir; bu da ya yüksek oranda invazif olan mezenkimal benzeri hücrelerin meydana getirdiği saf bir popülasyonu ya da "hibrit" fenotiplere sahip hücre kümelerini oluşturur. İlk modele göre, yukarıda da değinildiği üzere, tam bir EMD geçirdikten sonra, mezenkimal-benzeri kanser hücreleri tümör kitlesinden yayılır ve dolaşım sistemine ulaşır. Uzak bir organda ekstravaze olduktan sonra, MED geçirerek metastaz oluştururlar (Şekil 2.9, model 1) (Kalluri ve Weinberg 2009, Klymkowsky ve Savagner 2009). İkinci model yani kanserde kolektif göç modeli Tsuji ve ark. [55] tarafından tanımlanmıştır. Buna göre sadece EMD-geçirmiş ve EMD-geçirmemiş kanser hücreleri arasındaki işbirliği başarılı bir metastaz sürecini mümkün kılmaktadır. Invaziv bir fenotipe sahip EMD-geçirmiş olan kanser hücreleri lokal doku ve damarlara penetre olabilir ve matriksi degrade edebilir; ve bu sayede EMD-geçirmemiş kanser hücrelerine yol açarak intravazasyonlarını sağlar. EMD-geçirmemiş kanser hücreleri, sahip oldukları adhezif özellikler ile damar duvarlarına tutunabilir ve ekstravaze olarak metastaz oluşturabilirler (Şekil 2.9, model 2). (Tsuji ve ark. 2009)



Şekil 2.9. Kanser metastazında EMD'nin rolü (Książkiewicz ve ark. 2012'den Türkçeleştirilerek alınmıştır)

2.7. EMD'nin Moleküler Bileşenleri

EMD sırasında gerçekleşen morfolojik ve hüresel değişiklikler, çok sayıda moleküler sinyal yollarının ve düzenleyicilerin işbirliğini gerektirmektedir. EMD sürecindeki işlevlerine dayanarak bu moleküler bileşenleri üç grup altında kategorize edilebilir: EMD sürecini yürüten efektör moleküller (EMD efektörleri), EMD sürecini düzenleyen transkripsiyon faktörleri (EMD'nin merkezi düzenleyicileri) ve EMD sürecini aktifleştiren ekstraselüler sinyaller (EMD uyarıcıları) (Tsai ve Yang 2013).

2.7.1. EMD Efektörleri

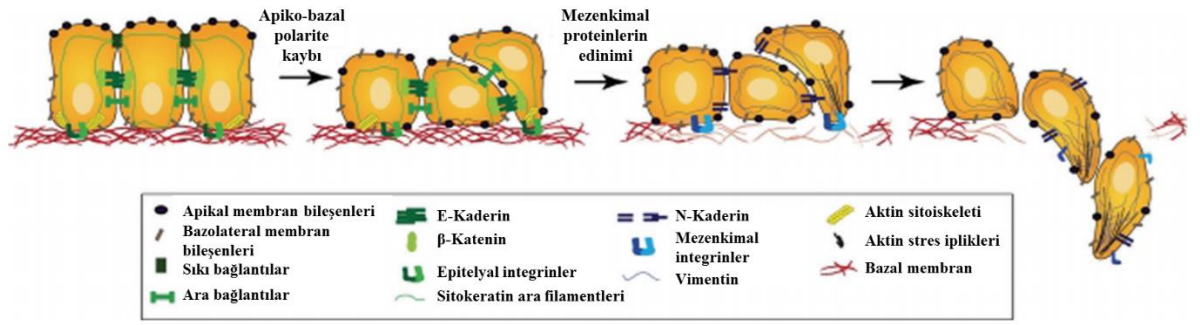
EMD efektör moleküllerinin çoğu, bir hücrenin epitelyal veya mezenkimal kimliğini belirleyen hücre içi yapısal proteinlerdir. EMD sürecinde bu moleküler bileşenler çeşitli seviyelerde düzenlenirler. EMD-uyarıcı genlerin ifadesi arttıkça hücre yüzeyi önemli ölçüde değişmektedir. Epitel fenotipin önemli bir belirteci ve koruyucusu olan E-kaderin, komşu hücrelerin birbirine bağlanmasını yani adheren bağlantıyı sağlayan bir transmembran proteindir. Bu bağlantı, E-kaderinin sitoplazmik kısmının aktin sitoiskeleti ile α -ve β -katenin aracılı etkileşimi ile sağlanır. EMD sırasında, E-kaderin'in

transkripsiyonel baskılanması (Batlle ve ark. 2000; Cano ve ark. 2000; Hajra ve ark. 2002), promotor metilasyonu (Graff ve ark. 1995, Kanai ve ark. 1997, Saito ve ark. 1998), protein fosforilasyonu ve yıkımı (Zhou ve ark. 2004, Bachelder ve ark. 2005, Lester ve ark. 2007) gösterilmiştir. Snail, Zeb ve Twist, E-kaderin promotorunda hipermetilasyon ve histon deasetilasyonu sağlayarak epigenetik susturmayı uyaran ve en iyi bilinen E-kaderin baskılayıcılarından (Herranz ve ark. 2008). EMD'nin ortaya çıkması için bu proteinin kaybının gerekli olduğu ve metastazı desteklediği belirtilmiştir (Onder ve ark. 2008)

Ayrıca, sitokeratinlerden zengin ara filamentlerin yerini vimentinin aldığı gösterilmiştir. Artan vimentin seviyeleri EMD sırasında tutarlı bir belirteç iken, sitokeratin alt tiplerinin “dönüşümü” değişken ve doku tipine özgü olma eğilimindedir (Tsai ve Yang 2013).

N-kaderin gibi epitelyal olmayan kaderinlerin, CD44 (Kuo ve ark. 2009) ve integrin $\beta 6$ (Bates ve ark. 2005) gibi hücre yüzey proteinlerinin de hücre migrasyonu için kritik olduğu gösterilmiştir. EMD sürecinde artış gösteren N-kaderin ve vimentin ifadeleri, mezenkimal fenotip belirteçleri olarak kabul edilmekte ve hücre migrasyonu için çok büyük önem taşımaktadır (Heerboth ve ark. 2015). Ekstraselüler bir protein olan fibronektin mezenkimal hücre migrasyonu için gerekli olup EMD uyarılması ile sıklıkla artış gösterir (Tsai ve Yang 2013). Bir diğer ESM molekülü, kollajen, dokulara mekanik destek sağlamaktadır. Normal ve malign meme epitel hücrelerinde, TGF- β 'nın MMP2 ve diğer kollajenazları upregüle ederek kollajen işlevini yönettiği gösterilmiştir. Neticesinde hücrelerin migrasyonu ve invazyonları artmıştır (Duivenvoorden ve ark. 1999, Kim ve ark. 2005, Kim ve ark. 2007).

α -SMA, kontraktif mikofilamentlerin ana bileşeni olup, fibroblast/mezenkimal hücrelerin, özellikle de miyofibroblastların saptanması için klasik bir belirteçtir. TGF- β 'nın, EMD sürecinde α -SMA ifadesini arttırdığı gösterilmiştir (Masszi ve ark. 2003). Ayrıca α -SMA ifadesi tümör invazyonunda artış ve düşük hasta sağkalım oranlarıyla ilişkilendirilmiştir (Yazhou ve ark. 2004). Ek olarak, EMD sürecinde aktin filamentleri, dramatik bir redistribüsyon göstererek stres liflerini/ipliklerini oluşturur. Bu iplikler floresan etiketli mantar toksini, phalloidin kullanılarak belirlenebilmektedir (Heldin ve ark. 2009). Tüm bu proteinler, tümörlerde EMD sürecini belirlemek için sıklıkla aranmaktadır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. EMD geçiren hücrelerin moleküler, fenotipik ve davranışsal geçişleri (Talbot ve ark. 2012'den Türkçeleştirilerek alınmıştır)

2.7.2. EMD'nin Merkezi Düzenleyicileri

EMD programının yürütülmesi, hücre adezyonu, mezenkimal farklılaşmayı, hücre migrasyonu ve invazyonunu düzenleyen birçok genin transkripsiyonel düzenlemesini içerir. Genel olarak, üç temel grup transkripsiyon düzenleyicisinin, çeşitli EMD süreçlerinde kritik olduğu gösterilmiş (EMD-TF) ve merkezi EMD düzenleyicileri olarak kabul edilmektedir (Tsai ve Yang 2013). Birinci grup, Snail1 ve Snail2'nin dahil olduğu Snail çinko parmak ailesi transkripsiyon faktörleridir. Snail1 ve Snail2, E-kaderin promotorunda E-kutulara doğrudan bağlanma kapasitesine sahip olup bu şekilde E-kaderin transkripsiyonunu baskılamaktadır (Batlle ve ark. 2000; Cano ve ark. 2000; Hajra ve ark. 2002).

İkinci grup, yine E-kaderin transkripsiyonunu baskılayabilen (Comijn ve ark. 2001, Eger ve ark. 2005), çinko parmak E-box bağlayıcı homeobox aile proteinleri Zeb1 ve Zeb2'dir. Snail ve Zeb transkripsiyon faktörleri ailesinin, klaudin ve ZO1 gibi diğer hücresel bağlantı proteinlerinin ifadelerini baskıladığı bilinmektedir (Ohkubo ve Ozawa 2004, Vandewalle ve ark. 2005).

Üçüncü grup, Twist1 (Yang ve ark. 2004) ve Twist2'nin (Fangve ark. 2011) dahil olduğu basic helix-loop-helix transkripsiyon faktörleri ailesidir. Bu faktörler, EMD'yi tek başlarına veya işbirliği içerisinde uyarırlar. Nitekim bir çalışmada, Twist1'in yanı sıra EMD uyarılmasında Snail2 gerekliliği gösterilmiştir (Casas ve ark. 2011).

2.7.3. EMD Uyarıcıları

Tümör progresyonu sırasında, kanser hücrelerinde EMD uyarılması, muhtemelen embriyonik morfojenizdeki önemli rollerinden dolayı, EMD-TF'lerinin genetik

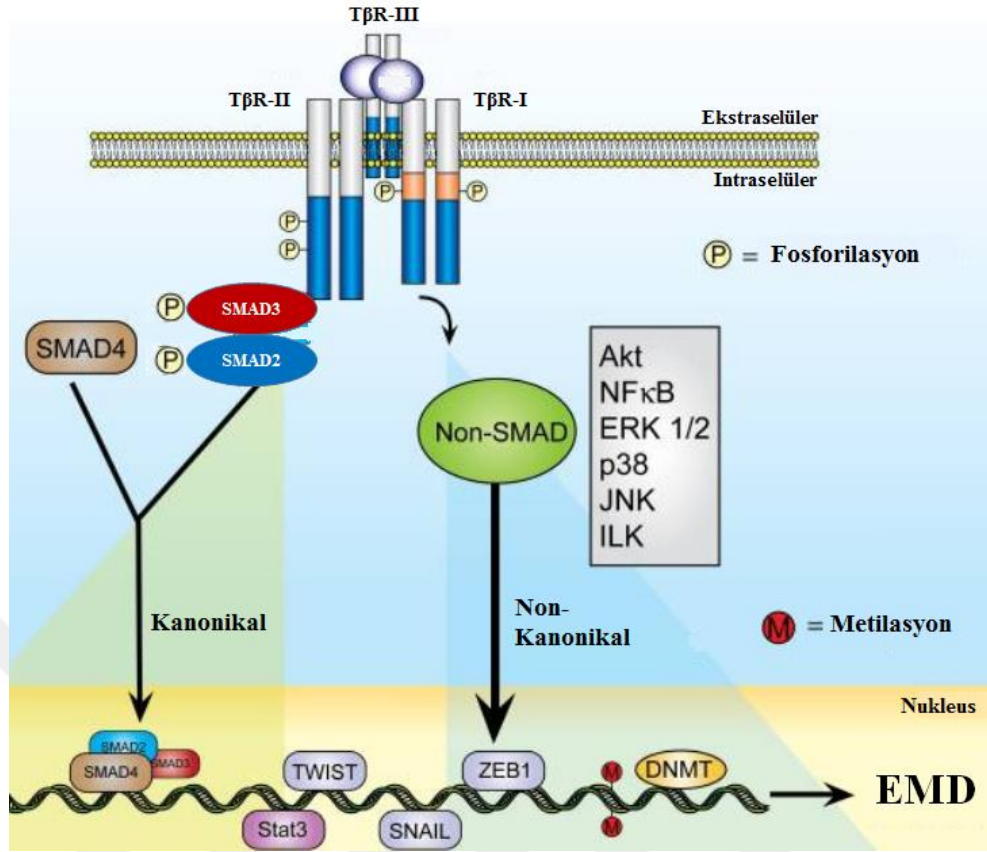
değişiklikleriyle ilişkilendirilmemiştir. Bunun yerine, tümör mikroçevresindeki ekstraselüler sinyallerin kombinasyonuna yanıt olarak EMD'nin uyarıldığı düşünülmektedir. Birçok EMD uyarıcı sinyal, hücre tipi veya doku tipine özgü olma eğilimindedir ve muhtemelen birden fazla sinyal yolağı arasındaki işbirliğini gerektirir. TGF- β , Wnt, Notch ve büyüme faktörü reseptörü sinyal iletimleri dahil olmak üzere tüm temel gelişimsel sinyal yolları EMT programı ile ilişkilendirilmiştir. Bunlar arasında, TGF- β yolağının EMD'nin primer uyarıcısı olduğu görülmektedir (Katsuno ve ark. 2013). Örneğin, TGF- β ve BMP'lerin Snail1/2, Zeb1/2 ve Twist1 EMD-TF'lerini uyardığı gösterilmiştir (Thiery ve ark. 2009, Eckert ve ark. 2011). Tümörlerdeki başlıca TGF- β kaynaklarından biri, tümör mikroçevresindeki stromal fibroblast hücreleridir (Hanahan ve Weinberg 2011).

TGF- β 'nin kanser hücrelerinde aktive ettiği ve davranışlarını düzenlediği genel mekanizmalar Şekil 2.11'de gösterilmiştir. TGF- β transmembran sinyal iletimi, TGF- β 'nin üç yüksek afiniteli reseptöre bağlanması ile başlar. Bunlar, TGF- β tip I (T β R-I), tip II (T β R-II) ve tip III (T β R-III veya betaglikan) olmak üzere tanımlanmıştır. Zaman ve yer fark etmeksizin T β R-III, hücre yüzeyinde en bol bulunan TGF- β reseptörüdür ve TGF- β 'yi sinyal iletimi reseptörleri olan T β R-I ve T β R-II'ye bağlayan ve veren bir aksesuar reseptörü olarak işlev görür. T β R-I ve T β R-II, sitoplazmik domainlerinde intrinsik Ser/Thr protein kinaz aktivitesine sahiptir (Galliher ve ark. 2006, Massague ve Gomis 2006, Feng ve Derynck 2005, Moustakas ve Heldin 2005, Shi ve Massague 2003). TGF- β 'nin T β R-II'ye bağlanması, T β R-I'in alımı ve aktivasyonunu mümkün kılarak, kanonik Smad2/3 bağımlı sinyal iletiminin uyarılmasına yol açar. Smad2/3, aktive edildikten sonra, Smad4 ile heterokompleks oluşturur ve TGF- β -yanıt veren genlerin ifadesini düzenledikleri hücre nükleusuna translokasyon yaparlar (Galliher ve ark. 2006, Massague ve Gomis 2006, Feng ve Derynck 2005, Moustakas ve Heldin 2005, Shi ve Massague 2003). TGF- β 'ye yanıt olarak sergilenen hücre yanıtlarındaki çeşitliliğinin, hücre tipine spesifik ifade edilen çeşitli Smad2/3 etkileşimli transkripsiyon faktörlerinden (AP-1 ve Forkhead aile üyeleri, Stat'lar, vb.) kaynaklanmaktadır (Galliher ve ark. 2006, Massague ve Gomis 2006, Feng ve Derynck 2005, Moustakas ve Heldin 2005, Shi ve Massague 2003).

Dahası, Smad2/3 sinyalinin kuvveti ve süresi çeşitli mekanizmalarla düzenlenmektedir; (1) Smad2/3'ün T β R-I tarafından fosforlanmasını sağlayan adaptör ve/veya bağlanma

proteinleri SARA (Tsukazaki ve ark. 1998), Hgs (Miura ve ark. 2000) ve Dab2'nin (Hocevar ve ark. 2001) ifadelerinin uyarılması ve (2) Smad2/3'ün fosforlanmasını önleyen (Hayashi ve ark. 1997, Nakao ve ark. 1997, Souchelnytskyi ve ark. 1998) ve TGF- β reseptörlerini degrade eden (Ebisawa ve ark. 2001, Kavsak ve ark. 2000) inhibitör Smad7 ifadesinin uyarılmasıdır. TGF- β tarafından Smad2/3'ün aktivasyonu, kanonik TGF- β sinyal iletimini ifade etmektedir.

Kanonik sinyal iletiminin yanı sıra, Şekil 2.11'de, TGF- β 'nin çeşitli nonkanonik sinyal iletim sistemlerine bağlanması gösterilmiştir; (1) MAP kinazlar ERK1/ERK2, p38 MAPK ve JNK; (2) büyüme ve yaşamsal kinazlar PI3K, AKT / PKB ve mTOR; ve (3) küçük GTP bağlayıcı proteinler Ras, RhoA, Rac1 ve Cdc42 (Bakin ve ark. 2002, Bakin ve ark. 2000, Bhowmick ve ark. 2001, Lamouille ve Derynck 2007, Perlman ve ark. 2001, Zavadil ve ark. 2001, Galliher ve Schiemann 2006, Galliher ve Schiemann 2007, Galliher ve Schiemann 2008). Ayrıca TGF- β tipik olarak normal epitelial hücrelerde NF- κ B aktivitesini baskımlarken (Azuma ve ark. 1999, Neil ve Schiemann 2008) malign hücrelerde aktifleştirmektedir (Neil ve Schiemann 2008, Arsura ve ark. 2003, Kim ve ark. 2000, Park ve ark. 2003, Rayet ve Gelinas 1999). Aynı zamanda, TGF- β 'nin FAK (Horowitz ve ark. 2007, Thannickal ve ark. 2003), Src (Galliher ve Schiemann 2006, Galliher ve Schiemann 2007, Galliher ve Schiemann 2008, Park ve ark. 2004) ve Abl (Wang ve ark. 2005, Wilkes ve Leof 2006) dahil olmak üzere çeşitli protein tirozin kinazları aktifleştirdiği gösterilmiştir. Neticesinde, mezenkimal veya dediferansiye epitelial hücrelerde kanonik olmayan TGF- β sinyal iletiminin amplifikasyonu gözlenmiştir.



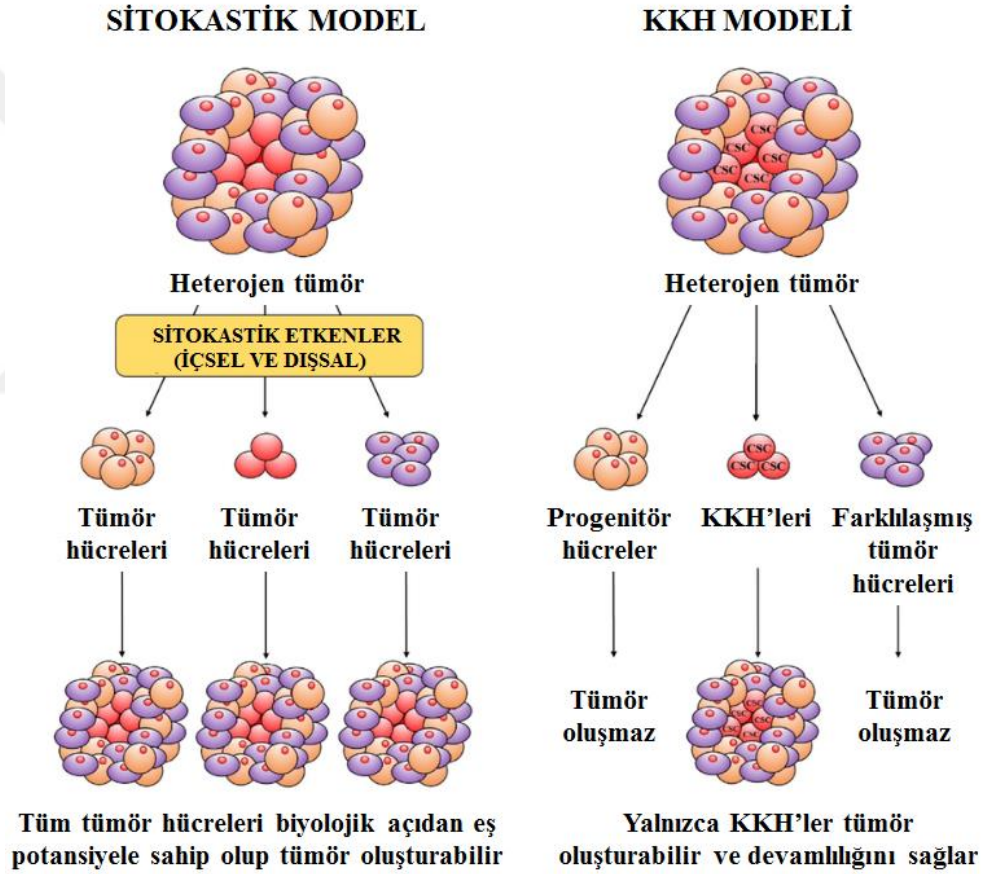
Şekil 2.11. Kanonik ve non-kanonik TGF- β sinyal iletimi (Wendt ve ark. 2009'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır)

Büyüme faktörü sinyallerine ek olarak, tümör mikroçevresindeki inflamatuvar sitokinler ve hipoksinin de EMD'yi desteklediği gösterilmiştir. İnflamatuvar sitokin TNF α , NF- κ B aktivasyonu yoluyla Snail1'i stabilize edebilmiş (Wu ve ark. 2009) ve IKK- β ve NF- κ B p65 aktivasyonu ile Twist1 ifadesini uyarılmıştır (Li ve ark. 2012). Tümör mikroçevresindeki sitokinler ayrıca Twist1 ekspresyonunu uyarmak için JAK kinazlar yoluyla Stat3'ü aktive edebilir (Lo ve ark. 2007, Cheng ve ark. 2008). HIF-1'in aracılık ettiği hipoksik yanıtlarda EMD, Twist1 ve Snail1'in ifadesini uyarılmasıyla gerçekleşmiştir (Yang ve ark. 2008, Mak ve ark. 2010). Bu çalışmalar tümör mikroçevresinden gelen sinyallerin EMD'nin aktive edilmesinde kritik bir rol oynadığını göstermektedir.

2.8. EMD ve KKH'leri

Son onbeş yılda metastaz sürecinin anlaşılması önemli ölçüde değişmiştir. Bu kapsamda, KKH'lerin (tümör başlatıcı hücreler, TIC) tümör progresyonundaki rolü, son yıllarda kanser araştırmalarında ön sıralarda yer almıştır (Nguyen ve ark. 2012). Tümör gelişim

modeli ve devamlılığına açıklama getiren sitokastik modelin karşısında “kanser kök hücre” hipotezi yükselmiştir (Wicha ve ark. 2006, Al-Hajj ve ark. 2003, Bonnet ve Dick 1997). Sitokastik model, tümör içerisindeki tüm kanser hücrelerinin eşit derecede malign olduğunu ve her bir hücrenin uygun koşullar altında primer tümörü yeniden oluşturma potansiyeline sahip olduğunu varsayar, ancak bunun olasılığı düşüktür (Bomken ve ark. 2010, Nowel 1976). Bu konseptte göre, tümör hücrelerinin heterojenitesi, tümör progresyonu sırasında genomik kararsızlığın ve mutasyonların birikmesi ile gelişir. Daha sonra, klonal seçim süreci ile tümör, metastatik özelliklere sahip hücrelerden zengin hale gelir (Şekil 2.12) (Kakarala ve Wicha 2008, Ward ve Dicks 2007).



Şekil 2.12. Tümör heterojenitesine dair modeller (Koren ve Fuchs 2016'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır)

KKH hipotezi, tümör içerisinde fonksiyonel heterojenitenin önceden varlığını ifade eder. Bu konseptte göre, ayrı bir popülasyon olan KKH'leri tümör oluşturabilir ve tümörün büyük kısmını oluşturan non-tumorigenik kanser hücrelerine farklılaşarak tümör devamlılığını sağlayabilir (Al-Hajj ve ark. 2003, Bonnet ve Dick 1997, Singh ve ark.

2004, Fang ve ark. 2005, Collins ve ark. 2005, Gibbs ve ark. 2005, Eramo ve ark. 2008). KKH'lerin varlığına dair kanıtlar ilk olarak Bonnet ve Dick tarafından (Bonnet ve Dick 1997) akut miyelojenöz lösemide bildirilmiştir ve daha sonra meme kanseri (Al-Hajj ve ark. 2003) ve diğer maligniteler için gösterilmiştir (Singh ve ark. 2004, Fang ve ark. 2005, Collins ve ark. 2005, Gibbs ve ark. 2005). KKH'ler normal kök hücreler ile olan benzerlikleri nedeniyle bu şekilde adlandırılmıştır. Benzer şekilde, KKH'ler *in vivo* kendini yenileme ve farklılaşma yeteneğine sahiptir. Progeni denilen sınırsız proliferasyon potansiyeli olan tümörjenik ve sınırlı proliferasyon potansiyeline sahip non tümörjenik hücreleri meydana getirirler. Bu şekilde, orijinal tümörde gözlemlenen hücre alt popülasyonlarını yeniden oluştururlar. KKH'ler genellikle, seri dilüsyon transplantasyon ile tümör oluşturma yetenekleri ile karakterize edilir. Tümör tipine bağlı olarak CD44^{yüksek}, CD24^{düşük} ve CD133^{yüksek} dahil olmak üzere çoklu hücre yüzey belirteçleri ifade ederler. Bir diğer KKH karakteristiği ise, yüzey bağımsız koşullar altında kürecik (sfer) şeklinde büyümeleridir (Velasco ve ark. 2012).

Adlarına rağmen, KKH'ler sadece buldukları dokunun normal kök hücrelerinden meydana gelmezler. Farklılaşmış progenitör hücrelerden de oluşabilirler (Li ve ark. 2003, Krivtsov ve ark. 2006). Alternatif olarak, KKH'ler kanser hücrelerinde EMD sürecinin uyarılması ile ortaya çıkabilir; bu sayede kanser hücreleri migrasyon, tümör yayılması gibi özellikleri elde edebilir (Hollier ve ark. 2009, Brabletz ve ark. 2005, Kai ve ark. 2010).

Birçok çalışma EMD aktivasyonunun, tümör başlatıcı özelliklere sahip KKH'leri oluşturabileceğini göstermiştir. Weinberg (Mani ve ark. 2008) ve Puisieux ekibi (Morel ve ark. 2008) tarafından yapılan çalışmalar, normal insan meme epitel hücrelerinde TGF- β , Snail1, Twist1 ve Zeb1 tarafından uyarılan EMD sürecinin, tümör başlatıcı özelliklere sahip KKH-benzeri fenotipi uyarabildiğini göstermiştir. Twist1'in CD24 ifadesini baskılayabildiği gösterilmiştir. Bu çalışma, bir EMD transkripsiyon faktörü ile KKH oluşumu arasında doğrudan bir bağlantı ortaya koymuştur (Vesuna ve ark. 2009). Bazal meme kanseri KKH-olmayan popülasyonların KKH'leri *de novo* oluşturabildiği ve bu KKH plastisitesinin Zeb1 promotörü ile kontrol edildiği gösterilmiştir (Chaffer ve ark. 2011). Bu deneysel sonuçlarla tutarlı olarak çok sayıda çalışma, insan kanserlerinde EMD'nin KKH fenotipini ortaya çıkardığına yönelik kanıtlar sağlamıştır. Meme kanserli

hastalarda, muhtemelen EMD geçirmiş olan plevral efüzyonlardaki disemine hücreler, CD44^{yüksek} ve CD24^{düşük} KKH benzeri popülasyon açısından zenginleştiği gösterilmiştir (Al-Hajj ve ark. 2003). Ek olarak, normal meme dokusundan veya meme kanserlerinden izole edilen kök hücrelerin, çeşitli EMD belirteçleri ifade ettikleri bulunmuştur. Klinik öneme sahip bir diğer çalışmada, tümör immün yanıtının EMD ilişkili CD44^{yüksek} ve CD24^{düşük} KKH'leri uyardığı gösterilmiştir (Santisteban ve ark. 2009).

2.9. EMD ve Kemodirenc

Kanser tedavisi genellikle iki ana ilaç direnci şekliyle ilişkilidir. Bunlar, *de novo* veya kazanılmış ilaç direncidir. Başlangıçta tedaviye dirençli hastalar intrinsik veya *de novo* ilaç direncini gösterir. Tedaviye başlangıçta yanıt veren hastalar ise genellikle kazanılmış ilaç direncinin bir sonucu olarak nüksle karşılaşır. EGFR-mutasyon pozitif olan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) için kullanılan Erlotinib/Tarceva gibi "hedefe yönelik terapötikler" in kullanımı, çeşitli ilaç direnci mekanizmalarının açığa çıkmasını sağlamıştır. EGFR inhibitörleri ile tedavi edilen NSCLC hastalarında kazanılmış ilaç direnci vakalarının yaklaşık %50-70'inde, EGFR'de T790M-'bekçisi' mutasyonları veya MET onkogeninin amplifikasyonunu içeren genetik değişiklikler gösterilmiştir (Engelman ve ark. 2007, Sharma ve ark. 2007). Geri kalan vakalardaki direncin açıklaması ise geri dönüşümlü epigenetik değişiklikler nedeniyle olduğu ifade edilmiştir (Singh ve Settleman 2010). Kazanılmış ilaç direnci sırasında ortaya çıkan epigenetik değişiklikler, tümörün farklılaşma durumundaki değişiklikleri yansıtır, bu da EMD'yi ve kök hücre benzeri özelliklere sahip kemorefraktör hücrelerin ortaya çıkmasını yansıtır (Voulgari ve Pintzas 2009).

EMD'yi kemodirence bağlayan ilk çalışmalarda biri 1996'da yapılmıştır. Çalışmada, en güçlü EMD uyarıcılarından biri olan TGF- β 'ye karşı spesifik antikörler kullanılmış ve alkilleyici bileşiklere dirençli tümörlerde ilaca karşı duyarlılığın geri kazandırıldığı gösterilmiştir (Teicher ve ark. 1996). Günümüze kadar elde edilen bulgular, altta yatan moleküler mekanizmalar kısmen bilirse de, EMD'nin kemodirenci desteklediğini göstermektedir (Du ve Shim 2016). Çeşitli prelinik modellerde ve spesifik terapötik ajanların kullanıldığı çalışmalarda, artmış EMD-TF ifade düzeylerinin düşük tedavi-yanıt oranı ile güçlü şekilde ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Du ve Shim 2016). Örneğin Snail1 ifadesi HNSCC'de cisplatin ve meme kanseri hücrelerinde 5-florourasil direnciyle

ilişkilendirilmiştir (Hsu ve ark. 2010, Zhang ve ark. 2012). Ayrıca, EMD geçiren hücreler, direnç mekanizmalarında aktif rol alan bazı spesifik ABC taşıyıcılarını overeksprese etmektedir (Fonseca ve ark. 2016). ABC taşıyıcılarının promotorları EMD-TF'lerinin bağlanması için çeşitli bölgeler içermektedir (Saxena ve ark. 2011). Bunlara ek olarak, c-MET ve EGFR tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavi edilen NSCLC hastalarında görülen direnç fenotipi, ZEB1 ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir (Della Corte ve ark. 2015, Rastogi ve ark. 2016). EGFR inhibitörleri ile tedavi edilen akciğer kanseri hücrelerinde EMD uyarılmış; epitelial ve mezenkimal fenotipler arasında duyarlılık farkı rapor edilmiştir (Yauch ve ark. 2005). Bir tümörün farklılaşma durumu *de novo* dirence katkı sağlayabilir. Örneğin, artmış E-kaderin ifadesi, EGFR kinaz inhibitörlerine karşı duyarlılıkla ilişkilendirilmiş; ilaca dirençli hücreler daha mezenkimal benzeri belirtilmiştir (Witta ve ark. 2006). Ürotelyal kanserler, yüzeysel ve kas-invazif olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Son derece zayıf prognoz ve yüksek mortalite oranları ile ilişkili olan ikinci grup, mezenkimal benzeri özellikler sergiler. Ayrıca bu tümörlerin, DNA hasarına bağlı apoptozdan hücreleri koruyan Zeb2/SIP1 eksprese ettiği gösterilmiştir (Sayan ve ark. 2009). Bazal alttip mezenkimal benzeri meme kanserleri de yüksek mortalite oranları ile ilişkilidir. Bununla birlikte, bazı çalışmalar mezenkimal benzeri kanserlerin neoadjuvan kemoterapiye başlangıçta epitelial luminal tümörlerden daha duyarlı olduğunu belirtmiştir (Carey ve ark. 2007, Liedtke ve ark. 2008, Paik ve ark. 2006, Yauch ve ark. 2005). Bununla birlikte, başlangıçtaki yanıtlarına rağmen, bazal kanserli hastalar en kötü prognozu gösterir ve bu da mezenkimal benzeri kanserlerin ilaç direnci geliştirmeye daha yatkın olduğunu düşündürmektedir.

CTC izolasyonu ve karakterizasyonu son zamanlarda klinik yanıtı değerlendirmek için ele alınmıştır (Alix-Panabieres ve ark. 2017). Bir hastanın kanındaki CTC varlığı AdnaTest kullanılarak ölçülebilir. Twist, Akt ve PI3K dahil toplam 12 EMD belirteci için tasarlanmış PCR temelli bir test olup 5 ml kan örneğinde 2 adet CTC belirleyebilecek hassasiyette olduğu rapor edilmiştir (Andreopoulou ve ark. 2012). Refrakter meme kanseri olan hastalar daha yüksek seviyelerde mezenkimal CTC'lere sahip olup (Yu ve ark., 2013), kemoterapi tedavisi sırasındaki CTC değişiklikleri ise progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalım ile anlamlı olarak ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmalar, tedaviye yanıtı öngörmek için hasta kaynaklı CTC'lerde EMD ile ilişkili belirteçlerin karakterizasyonunun klinik uygulamasını desteklemektedir (McInnes ve ark. 2015).

2.10. Metabolik Dereğulasyon ve EMD

Aerobik glikoliz, hızlı çoğalan kanser hücrelerinin üç temel ihtiyacını karşılamasını sağlar: (1) hızlı şekilde ATP eldesi (2) karbohidratların çeşitli biyosentetik yolları beslemesi ve (3) hücrel redoks homeostazı (Martinez-Outschoorn ve ark. 2017). Glukoz tüketimindeki net artışın doğrudan bir sonucu olarak, birçok kanser anormal laktik asit salımı ve asidik ekstraselüler pH sergiler (Payen ve ark. 2016). Yüksek düzeyde laktat, çeşitli insan kanserlerinin metastazları ile ilişkilidir (Walenta ve Mueller-Klieser 2004). Bu senaryoda, hipoksi, düşük pH ve glikoz kullanımı gibi birçok solid tümörün yerleşik özelliklerinin, EMD ve kanser yayılımına eşlik etmesi şaşırtıcı değildir. Bu nedenle, glikolitik yola müdahale etmek EMD'yi, akabindeki tümör progresyonunu engelleyebilir. Bu yaklaşım potansiyel bir antikanser stratejisi olarak görülmektedir (Morandi ve ark. 2017).

Birkaç glikolitik enzimin invadopodia yapıları ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu yapılar, plazma membranının çıkıntıları olup ECM yıkımı ve metastazında önemli bir role sahiptir (Attanasio ve ark. 2011). Ek olarak, glikolitik türevli ATP'nin, metastatik yayılım sırasında hücre sağkalımının ana kaynağı olduğu gösterilmiştir (Schafer ve ark. 2009, Danhier ve ark. 2013). Destekleyici şekilde TGF- β ile uyarılan EMD ile glikolitik dönüşüm ve mitokondriyal fonksiyonun baskılanması arasında sıkı bir korelasyon gösterilmiştir (Lee ve ark. 2015, Yang ve ark. 2015). Dong ve ark. meme kanserinde fruktoz-1,6-bisfosfataz kaybı ile birlikte E-kaderin kaybının, β -katenin sinyal iletimini ve EMD sürecini uyararak KKH benzeri özellikleri ve kanser hücresi yayılmasını desteklediğini göstermişlerdir (Dong ve ark. 2013). Bu duruma, glikoliz uyarılması, glukoz alımının artışı ve oksijen tüketiminin inhibisyonu eşlik etmiştir (Dong ve ark. 2013). Yine benzer bir çalışmada, meme kanseri hücrelerinde EMD uyarılmasıyla, glukoz taşıyıcıları, LDH, MCT'ler ve glikojen fosforilaz izoformlarının ifadesi paralel gözlenmiştir. Bu moleküller artmış aerobik glikolizin devamlılığında kilit öneme sahip bileşenler olarak görülmektedir (Kondaveeti ve ark. 2015). Mide kanserinde, malign ve kemo-dirençli bir fenotipin edinilmesi, EMD ve aerobik glikoliz ile ilişkilendirilmiştir (Qin ve ark. 2015). NSCLC hücrelerinde, GLUT3 ifade düzeyleri hem EMD belirteçleri (vimentin, Snail, Slug, ZEB1, ZEB2, Twist1) hem de glukoz alımı ile korele gözlenmiştir (Masin ve ark. 2014)

Laktatın metastatik sürecinde taşıdığı önemli role dair, TGF- β 2 ifadesini upregüle ettiğini (Baumann ve ark. 2009) bunun da, glioblastoma hücrelerinin mezenkimal pro-migratif fenotipini indüklediği ve MMP2 aktivasyonunu, ESM'in yeniden modellenmesini ve metastaz oluşumunu uyardığı gösterilmiştir (Wick ve ark. 2006). Laktat aynı zamanda *in vivo* TGF- β 1 üretimini de sağlamaktadır (Ahmed ve ark. 2004).

Meme KKH'lerinin artmış HKII ifadesi ve glikoliz gösterdiği bildirilmiş ve glikoliz inhibitörü 2-deoksiglukoz doza bağımlı şekilde EMD geçiren meme kanseri hücrelerini baskılamıştır (Lu ve ark. 2015, Bacci ve ark. 2016).

Glikolitik kaskada EMD ile ilişkilendirilen bir diğer enzim, fruktoz-1,6-bisfosfat gliseraldehid3-fosfat ve dihidroksiaseton fosfata dönüştüren aldolazdır. Aldolaz A izoenzimi çeşitli kanserlerde sıklıkla overekspresedir (Du ve ark., 2014, Chaerkady ve ark. 2008). Bu enzimin upregülasyonunun, E-kaderin ifadesini azaltarak ve aynı zamanda fibronektin ve vimentin ifade düzeylerini artırarak akciğer kanseri hücrelerinin migrasyonunu ve EMD'yi uyardığı bildirilmiştir (Du ve ark., 2014). Benzer şekilde Enolaz'ın overekspresyonunun, NSCLC hücrelerinde glikolizi, proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu arttırdığı, bunun da kısmen EMD genlerinin regülasyonu ile gerçekleştiği rapor edilmiştir (Fu ve ark., 2015). Nitekim aynı çalışmada, Enolaz'ın susturulması, Snail1 ve N-kaderin downregülasyonuna ve E-kaderin ifadesinin eşzamanlı artışına neden olarak EMD sürecini engellemiştir (Fu ve ark., 2015). Enolaz'ın migrasyon ve invazyonu uyardığı endometrial karsinomada da gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2015). Hamabe ve ark. EMD'nin, PKM2'nin nükleer translokasyonunu ve TGF β -uyarılmış faktör homeobox2 ile etkileşimini uyardığını göstermişlerdir. Bu etkileşim, histon H3K9 deasetilasyonunu ve daha sonra E-kaderin downregülasyonuna sebep olmuştur (Hamabe ve ark. 2014).

Pentoz fosfat yolunun invazyon sürecindeki rolü anlaşılmasına rağmen, EMD'ye katkısı hakkında çok az şey bilinmektedir. Bu kapsamda, 6-fosfoglukonat dehidrojenaz downregülasyonunun, akciğer kanseri hücrelerinin *in vitro* migrasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Chan ve ark. 2013). Transketolaz benzeri protein1 izoformunun yüksek ifadesi, çeşitli karsinomların invazyon ve metastazı ile pozitif korelasyon göstermiştir

(Langbein ve ark. 2006, Langbein ve ark. 2008, Krockenberger ve ark. 2007, Zerilli ve ark. 2008).

Son olarak, toplam glukoz metabolizmasının % 2-5'ini oluşturan ve glikolitik yolla yakından ilişkili olan heksosamin biyosentez yolu (Hanover ve ark. 2012), EMD ile korelasyon göstermektedir. Glikolitik yola giren glukoz, hücrelerde sinyal iletimi ve yapısal bir rolü olan O-bağlı N-asetil-glukozamin (O-GlcNAc) üretmek üzere yönlendirilebilir (Hanover ve ark. 2012). Serin 112'ye bir O-GlcNAc motifinin eklenmesinin, Snail1'in O-fosforilasyon aracılı degradasyonunu önlediği ve böylece stabilizasyonunu desteklediği gösterilmiştir. Bu çalışma, glukoz metabolizması ile EMD arasında doğrudan bir moleküler bağlantı sağlamıştır (Park ve ark. 2010).

2.11. Hipotez

Hedeflenmesi güç olan metastatik kanser hücrelerinin ortadan kaldırılması metastaz kaskadının daha iyi anlaşılması neticesinde mümkün görünmektedir. Fakat bu alanda netlik kazanmayan, aydınlatılması gereken pek çok moleküler bağlantı bulunmaktadır. Bu tez çalışmasında, enerji üretiminde kritik öneme sahip bir enzim olan PDH'ın, kanser metastazıyla ilişkilendirilen EMD süreci arasındaki bağlantıların araştırılması amaçlanmıştır. Tüm bu literatür bilgileri ışığında PDH enzim kompleksi baskılandığında, glikolitik metabolizmanın artışı, dolayısıyla metastatik kapasiteyle ilişkilendirilen EMD sürecinin varlığını keşfetmeyi beklemekteyiz.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal maddeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.1’de verildi.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin listesi.

Kimyasal Adı	Menş e
Cpi-613	9464-10, BioVision, ABD
SB431542	S4317, Sigma, ABD
Timidin	T-1895, Sigma, ABD
Afidikolin	A-0781, Sigma, ABD
Mimozin	M-0253, Sigma, ABD
Nokodazol	M-1404, Sigma, ABD
Kolkemid	12-004-1D, Biological Industries, ABD
Puromisin	540411, Sigma, ABD
Polibren	TR-1003-G, Merck, Almanya
Dokсорubisin Cisplatin Paklitaksel 5-Florourasil Dosetaksel Pemetreksed	Uludağ Üniversitesi Kemoterapi İlaç Hazırlama Merkezi’nden temin edildi.
DNaz/RNaz içermeyen su	W1001-10, Zymo Research, ABD
FBS	10270-106, Gibco, İngiltere
Penisilin-Streptomisin Solüsyonu	15140-122, Gibco, ABD
10X PBS	70011-036, Gibco, İngiltere
RPMI	21875-034, Gibco, İngiltere
DMEM	11965092, Thermo Fisher Scientific, ABD
B27 Supplement w/o vitamin A	12587010, Thermo Fisher Scientific, ABD
EGF	PHG0311, Thermo Fisher Scientific, ABD
FGFb	PHG0026, Thermo Fisher Scientific, ABD
%0,2 Heparin	07980, Stem Cell Technologies, Kanada
Primocin	ant-pm-1, InvivoGen, ABD
Lipofectamine™ 3000	L3000015, Thermo Fisher Scientific, ABD
Optimem	31985062, Thermo Fisher Scientific, ABD
Power SYBR Green PCR master mix	4367659, Applied Biosystems, ABD
%0,05 Trypsin-EDTA	25300-054, Gibco, İngiltere
DMSO	D8418, Sigma, ABD
%0,5 Tripan mavisi	03-102-1B, Biological Industries, ABD
Hoechst 33342	62249, Thermo Fisher Scientific, ABD
ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI	P36931, Thermo Fisher Scientific, ABD
BSA	9998, Cell Signaling Technology, ABD
Yağsız kuru süt	SKI400, BioShop, Kanada

4X NuPAGE LDS Sample Buffer	NP0007, Thermo Fisher Scientific, ABD
10X NuPAGE Sample Reducing Agent	NP0004, Thermo Fisher Scientific, ABD
NuPAGE Antioxidant	NP0005, Thermo Fisher Scientific, ABD
Tris bazı	TRS001, BioShop, Kanada
20X SDS Running Buffer	NP0002, Thermo Fisher Scientific, ABD
RIPA Lysis Buffer System	sc-24948, Santa Cruz, ABD
Protein standardı (MagicMark XP)	LC5602, Thermo Fisher Scientific, ABD
Luminata Forte Western HRP substrate	WBLUF0100, Merck, Almanya
TCA	T6399, Sigma, ABD
Sülforodamin B	sc-253615A, Santa Cruz, ABD
Matrigel® Basement Membrane Matrix	356234, Corning, ABD
Kristal viyole	C6158, Sigma, ABD
Formaldehit	28906, Thermo Fisher Scientific, ABD
NaCl	106404, Merck, Almanya
Tween® 20	822184, Merck, Almanya
β-merkaptöetanol	805740, Merck, Almanya
Etanol	100986, Merck, Almanya
Metanol	947.046.2500, ISOLAB, Almanya
DyLight™ 554 Phalloidin	13054, Cell Signaling Technology, ABD
Asetik asit	100063, Merck, Almanya
SDS	M3290, Genaxxon bioscience, Almanya
NaOH	106498, Merck, Almanya
HCl	30721, Sigma, ABD
PAX2 plazmit	Brian Clem hediyesidir,
pMD2.G plazmit	Louisville Üniversitesi, ABD
Anti-rabbit antikor	7074S, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-mouse antikor	7076P2, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-α-Tubulin antikor	2144S, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-β-Aktin antikor	4970S, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-Histon H3 antikor	9715S, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-Vimentin antikor	5741S, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-E-Kaderin antikor	3195S, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-Keratin 18 antikor	4548, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-N-kaderin antikor	13116, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-α-SMA antikor	14968S, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-SMAD2 antikor	3122, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-SMAD3 antikor	9513, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-SMAD4 antikor	38454, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-PCNA antikor	2586, Cell Signaling Technology, ABD

Anti-MRP1 antikor	72202S, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-MDR1 antikor	13978S, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-GLUT1 antikor	12939, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-p44/42 MAPK antikor	4695, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-p38 MAPK antikor	9212, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-AKT antikor	4691, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-PI3K antikor	3358, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-p-c-jun antikor	9164S, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-mTOR antikor	2983T, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-p-src antikor	6943T, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-Nfkb antikor	8242T, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-p70s6k antikor	2708S, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-OCT4 antikor	2750S, Cell Signaling Technology, ABD
Anti-PDHA1 antikor	ab67592, Abcam, ABD
Anti-p-PDHA1 antikor	ab92696, Abcam, ABD

3.1.2. Sarf malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan sarf maddeler Çizelge 3.2’de verildi.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan sarf malzemelerin listesi.

Sarf Malzeme Adı	Menşee
25 cm ² 'lik flask	IS/TCF-25V, Sunub, Şangay
75 cm ² 'lik flask	IS/TCF-75V, Sunub, Şangay
96 kuyulu pleyt	IS/TCP-96, Sunub, Şangay
24 kuyulu pleyt	IS/TCP-24, Sunub, Şangay
6 kuyulu pleyt	IS/TCP-6, Sunub, Şangay
Ultra-low attachment 96 kuyulu pleyt	CLS3474, Corning, ABD
96 kuyulu beyaz pleyt	3917, Corning, ABD
15 ml'lik steril santrifüj tüpleri	IS/CT-15, Sunub, Şangay
50 ml'lik steril santrifüj tüpleri	IS/CT-50, Sunub, Şangay
10 ml hacimli serolojik pipet	86.1254.001, Sarstedt, Almanya
25 ml hacimli serolojik pipet	86.1685.001, Sarstedt, Almanya
10 µl'lik pipet uçları	4130N00, SSIbio, ABD
200 µl'lik pipet uçları	4230N00, SSIbio, ABD
1000 µl'lik pipet uçları	4330N00, SSIbio, ABD
Scraper	LMCS-A101, LabSearch, ABD
Bijou	11399133, Thermo Fisher Scientific, ABD
Neubauer hemositometre	PM0640030, Marienfeld, Almanya

Kriyovial	72.379.992, Sarstedt, Almanya
2 ml'lik cam pastör pipetler	084.01.002, ISOLAB, Almanya
0,5 ml'lik santrifüj tüpleri	Z666521, Merck, Almanya
1,5 ml'lik santrifüj tüpleri	T6649, Merck, Almanya
iBlot™ Gel Transfer Stacks	IB301001, Thermo Fisher Scientific, ABD
NuPAGE™ Novex™ 4-12% Bis-Tris Protein Jel	NP0322BOX, Thermo Fisher Scientific, ABD
MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips	4323032, Applied Biosystems, ABD
MicroAmp® Fast 8-Tube Strip	4358293, Applied Biosystems, ABD
24-kuyulu pleyt uyumlu 8.0 µm pora sahip PET membran	BD-353097, Corning, ABD
8-kuyulu kollajen kaplı kültür lamı	BD- 354630, Corning, ABD

3.1.3. Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Çizelge 3.3'de verildi.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan cihazların listesi.

Cihaz Adı	Menş
Steril kabin	BioSafety Cabinet Telstar Bio II Advance, İspanya
CO ₂ inkübatörü	MCO-18AC-PE, Panasonic, İngiltere
Inverted mikroskop	Olympus CKX41, Japonya
Santrifüj	Rotina 35R, Almanya
Saf su cihazı	Direct-Q® 3 UV, Merck, Almanya
Hassas terazi	Shimadzu AUW220D, Japonya
Aspiratör	Rocker 300, Tayvan
Spektrofotometre (FLASHScan S12)	Analytik Jena, Almanya
Luminometre (FL×800 Mikroplate)	Biotek, ABD
Muse® cell analyzer	Merck, Almanya
Görüntüleme cihazı (Fusion FX-7)	Vilber Lourmat, Fransa
qRt-PCR sistemi (StepOne Plus)	Applied Biosystems, Singapur
Pleyt çalkalayıcı	Heidolph, Almanya
1-10, 100-200 ve 1000 µl'lik pipet seti	Axygen, Polonya
Pipet boy	Axygen, Polonya
Buharlı sterilizatör (Otoklav)	Nüve OT4060, Türkiye
Microspin, mini-santrifüf/vorteks	FV-2400, Biosan, Letonya
Manyetik mini-karıştırıcı	HI190M, Hanna Instruments, ABD
Isı bloğu	TDB120, Biosan, Letonya
Güç kaynağı 300 Plus 300V	Labnet, ABD
Mini santrifüj	Scan Speed, ABD
UV-Vis Spektrofotometre (Epoch)	Biotek, ABD

3.1.4. Kitler

Tez çalışmasında kullanılan kitler Çizelge 3.4’de verildi.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan kitlerin listesi.

Kit Adı	Menşe
Adenosine 5'-triphosphate (ATP) bioluminescent somatic cell assay kit	FLASC, Sigma, Almanya
Muse® Cell Cycle Assay Kit	MCH100106, Merck, Almanya
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	23227, Thermo Fisher Scientific, ABD
Nuclear/Cytosol Extraction Kit	K266-100, BioVision, ABD
JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit	10009172, Cayman Chemical, ABD
GeneJET RNA Purification Kit	K0732, Thermo Fisher Scientific, ABD
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4368814, Thermo Fisher Scientific, ABD
PDHA1 Human shRNA Plasmid Kit	TL310532, OriGene, ABD

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasalların Hazırlanması

Cpi-613 ve SB-431542’nin Hazırlanması

Cpi-613 (MA: 388.59 g/mol) ve SB-431542 (TGF- β reseptör inhibitörü; MA: 384,39 g/mol) için ana stoklar, sırasıyla, 100 mM ve 10 mM olacak şekilde DMSO içerisinde hazırlandı.

Kemoterapötik İlaçların Hazırlanması

Uludağ Üniversitesi Kemoterapi İlaç Hazırlama Merkezi’nden temin edilen kemoterapötik ilaçların konsantrasyonları ve besiyeri içerisinde hazırlanışları Çizelge 3.5’de belirtildi.

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan kemoterapötik ilaçlar.

Kemoterapötik İlaç İsmi	Ana Stok Konsantrasyonu	Kullanılan Konsantrasyon (μM)
Cisplatin	0,5 mg/ml	25,3
Doksorubisin	2 mg/ml	1,8
Dosetaksel	5 mg/ml	27,9
5-Florourasil	50 mg/ml	345,94
Pemetreksed	58,5 mM	2
Paklitaksel	6 mg/ml	7,9

3.2.2. Hücre Kültürü

Hücre Soylarının Stoktan Çıkartılması

Hücreleri çoğaltmak amacıyla kriyotüpler, -80°C'den alınarak sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. Çözünmüş hücre süspansiyonu; %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin ve L-glutamin içeren 5 ml besiyeri içeren 15 ml'lik santrifüj tüplere aktarıldı. Santrifüj tüp 1.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısım aspire edildi ve hücre peleti üzerine 1 ml besiyeri ilave edilerek hücrelerin süspansiyon hale gelmesi sağlandı. Süspansiyon üzerine 4 ml besiyeri daha ilave edildi ve tüm hacim 25 cm²'lik flaska aktarıldı. Ardından flask; 37°C ve %5 CO₂ koşullara sahip inkübatöre kaldırıldı.

Hücre Soylarının Pasajlanması ve Stoklanması

Hücre soyları, flask yüzeyini %80 oranında kapladıklarında, besiyerleri aspire edildi. Ardından, 75 cm²'lik flask içerisine 5 ml 1X PBS ilave edildi ve yıkama sağlandı. 1X PBS aspire edilerek, hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 1 ml %0,05 Tripsin-EDTA ilave edildi ve hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 5 dakika inkübe edildi. Süre sonunda, mikroskopla flask yüzeyinden kalktığı doğrulanan hücreler üzerine 10 ml besiyeri ilave edilerek 15ml'lik santrifüj tüp içerisine toplandı. 1.000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve elde edilen hücre peleti, 1 ml hücre besiyeri ile pipetaj yapılarak süspansiyon haline getirildikten sonra, 10 ml besiyeri içeren 75 cm²'lik flaslara aktarıldı. Flasklar, hücreler istenilen doluluğa gelene kadar çoğalmaları için 37°C'de, %5 CO₂ koşullarına sahip inkübatöre kaldırılarak pasaj işlemi gerçekleştirildi.

Hücre soylarının stoklanması için, santrifüj sonrası elde edilen hücre peleti, 1 ml dondurucu besiyeri (%10 DMSO, %10 FBS içeren DMEM) ile pipetaj yapılarak süspansiyon haline getirildikten sonra kriyovial tüplere aktarıldı. Hemen ardından, kriyovial tüpler, -80°C'ye kaldırılarak stoklama işlemi gerçekleştirildi.

Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

A-549 ve bu hücreden elde edilen sh-PDHA1 (PDHA1 ifadesi baskılanmış hücreler) ve sh-Kontrol (hedersiz plazmid içeren kontrol hücreler) monoklonal hücre soyları için kullanılan besiyeri ortamı için %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin, %1 L-glutamin içeren RPMI 1640 kullanıldı. sh-PDHA1 ve/veya sh-Kontrol monoklonal hücrelerin besiyerlerinde, seleksiyon antibiyotiği olarak 2 µg/ml Puromycin kullanıldı.

Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Hücreleri sayabilmek amacıyla, hücre süspansiyonundan 0,5 ml'lik tüpe 20 µl alındı ve üzerine eşit hacimde tripan mavisi konarak iyice karışması sağlandı. Bu karışımdan 10 µl alınarak thoma lamına koyuldu ve mikroskopta, iki alanda hücre sayımı yapıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml besiyerinde ne kadar hücre olduğu hesaplandı.

3.2.3. Sülforodamin B (SRB) Canlılık Yöntemi

Bu yöntemin prensibi hücre kültüründe büyütülen kanser (veya herhangi bir çeşit) hücrelerindeki protein içeriğinin ölçülmesi esasına dayanır. Bu çalışma kapsamında, hücreler $3,5 \times 10^3$ hücre/kuyu 96-kuyulu pleytlere ekildikten 24 saat sonra, ajanlar ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edildi. Süre sonunda, 96-kuyulu pleytin her bir kuyusuna (son hacim 200 µl iken) 50 µl %50'lik TCA (w/v) eklendi ve +4°C'de 1 saat fikse edildi. Sonrasında, 96-kuyulu pleyt 5 kez distile su ile yıkandı ve pleytin kuruması beklendi. Pleytin her kuyusuna 50 µl SRB (%1 asetik asit v/v içerisinde %0.4 olacak şekilde hazırlandı) boyası eklendi ve 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 96-kuyulu pleyt 5 kez %1 asetik asitle (v/v) ile yıkandı. Hücrelere bağlanan boyayı çözmek amacıyla 96-kuyulu pleytin her bir kuyusuna 100 µl, 10 mM Tris Bazı eklendi ve 562 nm'de okuma alındı.

3.2.4. Adenozin Trifosfat (ATP) Canlılık Yöntemi

Hücreler 5×10^3 hücre/kuyu 96-kuyulu pleytlere ekildikten 24 saat sonra, ajanlar ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edildi ve/veya edilmedi. Süre sonunda, hücre içi ATP moleküllerini dışarı çıkarmak amacıyla, kuyulara 50 µl "5X hücre lizis tamponu" pipetlendi ve 4-5 defa pipetaj yapıldı. Oda sıcaklığında 30 dakikalık bekleme süresi ardından, kuyu içerisindeki karışımdan 50 µl alınarak, beyaz renkli 96-kuyulu pleytlere aktarıldı. Aktarılan hacmin üzerine, 50 µl lusiferin-lusiferaz karışımı (Adenosine 5'-triphosphate bioluminescent somatic cell assay kit) pipetlendi ve biyoluminesans luminometre cihazında ölçüldü.

3.2.5. Büyüme Oranı Analizi

NCI (National Cancer Institute/Ulusal Kanser Enstitüsü)'nin *in vitro* sitotoksitesite tarama çalışmalarındaki yaklaşımı esas alınarak, Cpi-613'ün A-549 hücrelerinde büyüme oranı

üzerine etkisi SRB ve ATP canlılık testleri kullanılarak değerlendirildi. Bu yaklaşım kapsamında, canlılık testlerine göre sitotoksik, sitostatik veya antiproliferatif etkileri değerlendirmek üzere LC₅₀, TGI ve GI₅₀ parametreleri hesaplandı (Şekil 3.1). (Shoemaker 2006).

Bu amaçla, A-549 hücreleri 3,5x10³ hücre/kuyu 96-kuyulu pleytlere ekildikten 24 saat sonra, henüz Cpi-613 uygulanmamış hücrelerin absorbans (SRB) ve RLU (ATP) değerleri elde edildi (**Time zero, Tz**). Ardından, hücreler Cpi-613 ile muamele edilerek 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Her bir saat dilimi sonunda, Cpi-613 uygulanmış (**D**) ve/veya uygulanmamış (**C**) hücrelerin absorbans (SRB) ve RLU (ATP) değerleri elde edilerek % canlılık değerleri ve LC₅₀, TGI ve GI₅₀ parametreleri hesaplandı.

Tz: Başlangıçtaki hücre popülasyonundan (henüz tedavi almamış, 0 µM) elde edilen absorbans ve/veya RLU değerini ifade etmektedir.

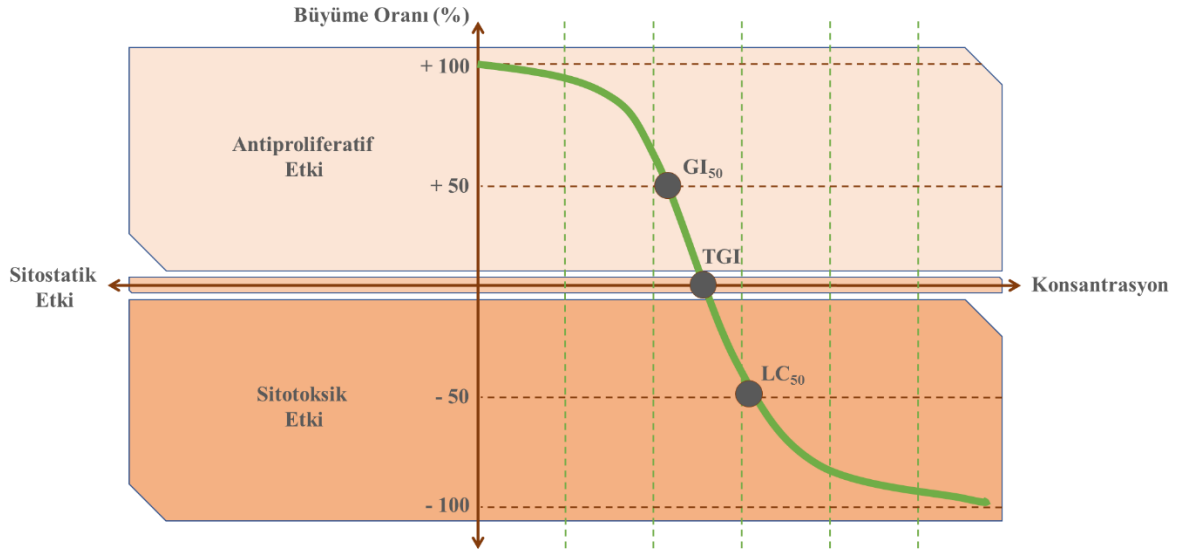
D: İnkübasyon süresi sonunda Cpi-613 uygulanmış hücrelerden elde edilen absorbans ve/veya RLU değerini ifade etmektedir.

C: İnkübasyon süresi sonunda Cpi-613 uygulanmamış hücrelerden elde edilen absorbans ve/veya RLU değerini ifade etmektedir.

LC₅₀ (50% lethal concentration): İlaç/ajan ile inkübasyon sonrasında, başlangıç hücre sayısını (Tz) %50 oranında azaltan (sitotoksik etki) konsantrasyonu ifade etmektedir (Şekil 3.1).

TGI (total growth inhibition): İlaç/ajan ile inkübasyon sonrasında, total büyüme inhibisyonuna (sitostatik etki) yol açan konsantrasyonu ifade etmektedir (Şekil 3.1).

GI₅₀ (50% growth inhibition): İlaç/ajan ile inkübasyon sonrasında, uygulama almamış hücrelerin (**C**) proliferasyonunu %50 oranında azaltan (antiproliferatif etki) konsantrasyonu ifade etmektedir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Büyüme oranı eğrisi. GI₅₀ (50% growth inhibition), TGI (total growth inhibition), LC₅₀ (50% lethal concentration).

3.2.6. xCELLigence ile Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

Bu sistem için özel olarak tasarlanmış 96-kuyulu E-pleyt kuyularına 100 µl besiyeri koyuldu ve 15 dakika 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben bazal ölçüm yapmak üzere E-pleyt, xCELLigence cihazına yerleştirildi. Bazal ölçüm sonrası hücreler, 100 µl besiyeri içerisinde 3.5×10^3 olacak şekilde ekildi ve E-pleyt cihaza yerleştirilerek, hücrelerin yapışması için 37°C'de %5'lik CO₂'li inkübatörde gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda, kuyulardan 100 µl uzaklaştırıldı ve Cpi-613 (6,25 – 200 µM) uygulaması gerçekleştirildi ve/veya yalnızca besiyeri ilavesi yapıldı (0 µM). Sonrasında E-pleyt, 37°C'de %5'lik CO₂'li inkübatörde xCELLigence cihazında 72 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.7. Hücre Döngüsü Analizi

Hücre döngüsü analizi "Muse® Cell Cycle Assay Kit" kullanılarak yapıldı. Bu amaçla, A-549 hücreleri 2×10^5 hücre/kuyu olacak şekilde 6-kuyulu pleytlere ekildikten 24 saat sonra, Cpi-613 ile 12, 24 ve 36 saat boyunca muamele edildi veya hücre senkronizasyonu gerçekleştirildi. Süre sonunda, hücreler üzerindeki besiyeri 15 ml santrifüj tüplere toplandı. Ardından, hücreler soğuk 1X PBS ile yıkandı ve tekrar aynı tüplere toplandı. Hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla, kuyu başına 0,5 ml %0,05 Trypsin-EDTA ilave edildi ve hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li ortamda 5 dakika inkübe edildi. Süre sonunda, mikroskopla pleyt yüzeyinden kalktığı doğrulanan hücreler üzerine 5 ml besiyeri ilave

edilerek aynı 15 ml'lik santrifüj tüplere toplandı ve +4°C'de 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant aspire edildi ve pelet üzerine 500 µl %70'lik etanol (PBS ile hazırlanan) eklenerek, içerik 1,5 ml'lik santrifüj tüplere aktarıldı, 5 saniye vorteks yapıldı ve -20°C'de 3 saat boyunca fikse edildi. Fiksasyon sonunda, hücre süspansiyonu +4°C'de 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, süpernatant aspire edildi. Etanolü uzaklaştırmak amacıyla, hücreler üzerine 500 µl 1X PBS eklendi ve 5 saniye vorteks sonrası tekrar 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, süpernatant aspire edildi ve µl'sinde 300 hücre olacak şekilde hücreler üzerine "Cell Cycle Reagent" pipetlendi, 5 saniye vorteks yapıldı ve hücreler oda sıcaklığında, karanlıkta 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, hücrelerin döngü fazlarındaki dağılımları, 5000 event ile Muse® cihazında değerlendirildi.

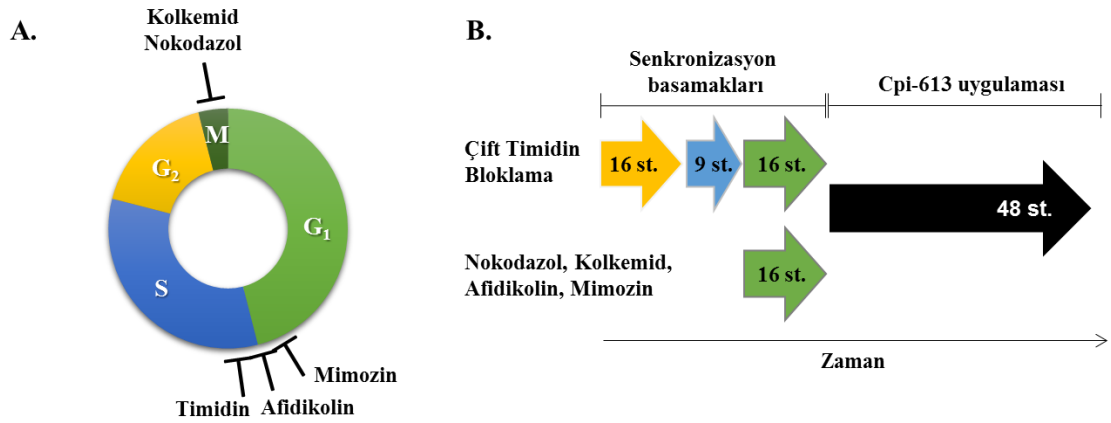
3.2.8. Hücre Senkronizasyonu

A-549 hücrelerini, belirli döngü fazlarında tutmak yani senkronlamak için Çizelge 3.6'da belirtilen kimyasallar ve konsantrasyonları kullanıldı.

Çizelge 3.6. Çalışmada kullanılan senkronizasyon kimyasalları.

Kimyasal Adı	Kullanılan Konsantrasyon	Etki Ettiği Döngü Fazı
Mimozin	0,5 mM	G ₁ (Szüts ve Krude, 2004)
Afidikolin	2 µg/ml	S (Xu ve ark. 2011)
Timidin	2 mM	S (Xu ve ark. 2011)
Nokodazol	40 ng/ml	M (Wang ve ark. 2002)
Kolkemid	40 ng/ml	M (Wang ve ark. 2002)

Hücreler 96-kuyulu pleytlere her kuyucukta 2×10^3 hücre ve 3 tekrarlı olacak şekilde ekildi. Ertesi gün hücreler senkronizasyon kimyasalları ile 16 saat boyunca inkübe edildi. Timidin için ikili bloklama yapıldı. Buna göre, 16 saat uygulamadan sonra hücreler üzerinden Timidin aspire edilerek uzaklaştırıldı ve taze besiyeri eklenerek 9 saat bekletildi. Ardından, hücreler Timidin ile yeniden 16 saat inkübe edildi (Şekil 3.2). İnkübasyonlar sonunda senkronizasyon kimyasalları kuyulardan uzaklaştırıldı ve senkronu bozmak amacıyla hücreler 50 µl FBS ile 1 defa yıkandı. Ardından hücreler, 50 µl PBS ile 2 defa yıkandı ve Cpi-613 ile 6 farklı konsantrasyonda 48 saat boyunca inkübe edildi. Süre sonunda, ATP canlılık testi gerçekleştirildi.



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan senkronizasyon kimyasallarının etki ettikleri hücre döngüsü fazları (A) ve A-549 hücrelerine uygulama aşamalarının şematik gösterimi (B).

Senkronizasyon kimyasallarının etkinliği ise “Muse® Cell Cycle Assay Kit” kullanılarak Muse® cihazında değerlendirildi. Bu amaçla, A-549 hücreleri $2,5 \times 10^4$ hücre/kuyu olacak şekilde 24-kuyulu pleytlere ekildi. Ertesi gün hücreler Şekil 3.2’de gösterildiği gibi senkronize edildi. Senkronizasyon kimyasalları ile inkübasyon sonunda, hücreler üzerindeki besiyeri 15 ml santrifüj tüplere toplandı. Ardından, hücreler soğuk 1X PBS ile yıkandı ve tekrar aynı tüplere toplandı. Hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla, kuyu başına 0,2 ml %0,05 Tripsin-EDTA ilave edildi ve hücreler 37°C’de, %5 CO₂’li ortamda 5 dakika inkübe edildi. Süre sonunda, mikroskopla pleyt yüzeyinden kalktığı doğrulanan hücreler üzerine 2 ml besiyeri ilave edilerek aynı 15 ml’lik santrifüj tüplere toplandı ve +4°C’de 300 g’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant aspire edildi ve pelet üzerine 500 µl %70’lik etanol (PBS ile hazırlanan) eklenerek, içerik 1,5 ml’lik santrifüj tüplere aktarıldı, 5 saniye vorteks yapıldı ve -20°C’de 3 saat boyunca fikse edildi. Fiksasyon sonunda, hücre süspansiyonu +4°C’de 300 g’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, süpernatant aspire edildi. Etanolü uzaklaştırmak amacıyla, hücreler üzerine 500 µl 1X PBS eklendi ve 5 saniye vorteks sonrası tekrar 300 g’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, süpernatant aspire edildi ve µl’inde 300 hücre olacak şekilde hücreler üzerine “Cell Cycle Reagent” pipetlendi, 5 saniye vorteks yapıldı ve hücreler oda sıcaklığında, karanlıkta 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, hücrelerin döngü fazlarındaki dağılımları, 5000 event ile Muse® cihazında değerlendirildi.

3.2.9. Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesi deneyi için, hücreler 24-kuyulu pleytlere (her kuyucukta $1,2 \times 10^5$ hücre) 2 tekrarlı olacak şekilde ekildi. Ertesi gün, %90 doluluk oranına sahip kuyularda, bir yatay ve bir dikey olmak üzere, 10 µl mikro pipet ucuyla yaralar oluşturulmuştur. Yara oluşturulurken yüzeyden kalkan hücreler, 1X PBS ile yıkanarak ortamdan uzaklaştırıldı ve hücrelerin besiyerleri Cpi-613 varlığı ve/veya yokluğunda tazelendi. Hemen ardından, yara oluşturulmuş hücrelerin 0. saat görüntüleri mikroskop altında elde edilerek, pleyt 37°C 'de %5'lik CO_2 'li inkübatöre kaldırıldı. Yara iyileşmesinin takibi, 12, 24 ve 30. saatlerde hücre görüntüleri alınarak yapıldı.

3.2.10. İnvazyon Testi

Hücrelerin invaziv özellikleri, 24-kuyulu pleyt uyumlu invazyon "chamber"lerinin (8.0 µm pora sahip PET membran içeren) kullanımı ile gösterildi. Hücre ekiminden bir gün önceden membranlar, 0,4 mg/ml Matrigel (gerekli dilüsyon serum içermeyen besiyeri ile yapıldı) ile kaplandı. Matrigel kaplama işlemi, soğuk koşullarda gerçekleştirildi ve 24-kuyulu pleyt matrigelin donması için, 37°C 'de %5'lik CO_2 'li inkübatöre kaldırıldı. Ertesi gün, matrigel membranın üst kısmına, hücreler $1,5 \times 10^5$ sayıda olacak şekilde 500 µl %1 FBS besiyeri içerisinde ekildi. "Chamber" dışına ise, 700 µl %10 FBS içeren RPMI besiyeri eklenerek, kemoatraktan olması sağlanmıştır. Hücreler, 24 saat 37°C 'de CO_2 'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Süre sonunda, membranın üst kısmında kalan invaze olamamış hücreler, kulak çubuğu pamuğu ile kazınarak uzaklaştırıldı ve ardından 1X 500 µl PBS ile yıkandı. Membranın alt kısmında bulunan invaziv hücreler ise, 1 ml soğuk metanol ile 15 dakika boyunca -20°C 'de fikse edildi. Metanolün uzaklaştırılması için, 3 defa 1X 500 µl PBS ile yıkama yapıldı ve ardından 400 µl %0,05 kristal viyole (metanol içerisinde hazırlanan) ile 20 dakika inkübe edilerek boyandı. Bağlanan boya %10 asetik asit ile çözdürüldü ve kuyu içerisindeki hacim 96-kuyulu pleyte aktarılarak spektrofotometrede okuma alındı.

3.2.11. Phalloidin Boyama

Hücreler, 8-kuyulu kollajen kaplı kültür lamalarına kuyu başı 1×10^4 olacak şekilde ekildi. Ertesi gün Cpi-613 uygulaması yapıldı ve/veya yapılmadı. Uygulama sonunda, kuyu içerikleri aspire edildi ve 3 defa 1X 700 µl PBS ile yıkama yapıldı ve hücreler %4 paraformaldehit (gerekli dilüsyon PBS ile yapıldı) ile 15 dakika oda sıcaklığında fikse

edildi. Süre sonunda hücreler, %3 BSA ve %0,1 TritonX100 içeren 1X PBS ile hazırlanan çözelti ile 1 saat oda sıcaklığında bloklandı ve permeabilize edildi. Süre sonunda, kuyu içerikleri aspire edildi ve 3 defa 1X 700 µl PBS ile yıkama yapıldı. Hücreler 1:200 oranında 1X PBS ile seyreltilmiş Phalloidin boyası ile 15 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, kuyu içerikleri aspire edildi ve 1 defa 1X 700 µl PBS ile yıkama yapıldı. Lam üzerine ince bir şerit halinde “ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI” pipetlenerek lamel kapatıldı ve ertesi gün floresan mikroskop kullanılarak görüntü alındı.

3.2.12. Mitokondri Membran Potansiyeli'nin ($\Delta\Psi_m$) Belirlenmesi

Mitokondri Membran Potansiyeli ($\Delta\Psi_m$), “JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit” kullanılarak belirlendi. Bu amaçla, A-549 hücreleri 96-kuyulu pleytlere her kuyucukta 5×10^3 hücre ve 2 tekrarlı olacak şekilde ekildi. Ertesi gün hücreler, 6,25-12,5-25 µM Cpi-613 ile 72 saat boyunca muamele edildi ve/veya edilmedi. Süre sonunda, JC-1 boyası 1:10 oranında kit içerisinde bulunan “cell based assay buffer” ile seyreltildi ve bu çözelti içerisinde Hoechst 33342 boyası 50 µg/ml olacak şekilde pipetlendi. Bu karışımdan, son hacmi 200 µl olan kuyulara 20 µl pipetlendi ve hücreler 37°C’de, %5 CO₂’li ortamda 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, floresan mikroskop kullanılarak hücre görüntüleri alındı.

3.2.13. Koloni Formasyonu

sh-PDHA1 ve sh-Kontrol monoklonal hücreler 6-kuyulu pleytlere her kuyucukta 1×10^3 hücre ve 2 tekrarlı olacak şekilde ekildi. Hücre besiyerleri, üç günde bir tazelandı ve 15 gün sonunda kuyulara 2 ml soğuk metanol eklenerek 15 dakika boyunca -20°C’de fikse edildi. Metanolün uzaklaştırılması için, 3 defa 1X 1000 µl PBS ile yıkama yapıldı ve ardından 1000 µl %0,05 kristal viyole (metanol içerisinde hazırlanan) ile 20 dakika inkübe edilerek boyandı. Süre sonunda, 3 defa 1X 1000 µl PBS ile yıkama yapıldı ve mikroskop altında hücre görüntüleri alındı.

3.2.14. qRt-PCR

RNA İzolasyonu ve Kontrolü

RNA izolasyonu, “GeneJET RNA Purification Kit” kullanılarak yapıldı. Hücreler (6-kuyulu pleyt ve/veya 25 cm²’lik flaskta bulunan) üzerindeki besiyeri 15 ml santrifüj tüplere toplandı. Hücreler, soğuk 1X PBS ile yıkandı ve tekrar aynı tüplere toplandı.

Ardından, hücreler üzerine 0,5 ml %0,05 Tripsin-EDTA ilave edildi ve hücreler 37°C’de, %5 CO₂’li ortamda 5 dakika inkübe edildi. Süre sonunda, mikroskopla pleyt ve/veya flask yüzeyinden kalktığı doğrulan hücreler üzerine 5 ml besiyeri ilave edilerek 15 ml’lik santrifüj tüp içerisine toplandı ve +4°C’de 250 g’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant aspire edildi ve pelet üzerine 600 µl “Lizis Tamponu” eklenerek 10 saniye vorteks yapıldı.

- Lizis Tamponu, 1 ml Lizis Tamponu’na 20 µl β-merkaptotanol eklenmesi ile hazırlanan karışımdır.

Süspansiyon üzerine 360 µl Etanol eklenerek pipetaj yapıldı. Bu karışımdan 700 µl birleştirilmiş tüplere (kit içerisinde yer alan filtre tüpler, koleksiyon tüpler ile birleştirildi) aktarıldı ve 12.000 g’de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre tüp ile koleksiyon tüpü ayrıldı, koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı ve filtre tüp ile koleksiyon tüpü tekrar birleştirildi. Filtreli tüp içerisinde, “Yıkama Tamponu 1”den 700 µl eklenerek 12.000 g’de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre tüp ile koleksiyon tüpü ayrıldı, koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı ve filtre tüp ile koleksiyon tüpü tekrar birleştirildi. Filtreli tüp içerisinde, “Yıkama Tamponu 2”den 600 µl eklenerek 12.000 g’de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre tüp ile koleksiyon tüpü ayrıldı, koleksiyon tüpündeki sıvı uzaklaştırıldı ve filtre tüp ile koleksiyon tüpü tekrar birleştirildi. Filtreli tüp içerisinde, “Yıkama Tamponu 2”den 250 µl eklenerek 12.000 g’de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında, koleksiyon tüpü uzaklaştırıldı ve filtreli tüpler, steril 1,5ml’lik tüpler ile birleştirilerek, filtrede tutulan RNA’nın eldesi için 70 µl su, filtreli tüpe pipetlendi ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Ardından tüpler, 12.000 g’de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında 1,5 ml’lik santrifüj tüplerde bulunan RNA çözeltilerinin konsantrasyonları ölçüldü.

RNA’ların konsantrasyonu ve kalitesi (260/280) UV-Vis spektrofotometre cihazı ile ölçüldü. Bu amaçla, RNA örneklerinden 2 µl alındı ve suya karşı kör alınan cihaz ile ölçümler yapıldı. RNA miktarları 100 ng/µl ile 500 ng/µl arasında bulundu.

cDNA Sentezi

Elde edilen RNA örnekleri, “High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” ile cDNA’ya çevrildi. Reaksiyon içeriği total hacim 20 µl olacak şekilde; 500 ng RNA miktarı (gerekli dilüsyon steril su ile sağlandı), 2 µl 10X “RT Buffer”, 0,8 µl 25X “dNTP

Mix”, 2 µl 10X “RT Random Primers”, 1 µl “MultiScribe™ Reverse Transcriptase” nükleaz olmayan tüplere aktarılarak hazırlandı. Reaksiyonun gerçekleşmesi için tüpler, 25°C’de 10 dakika, 37°C’de 120 dakika, 85°C’de 5 dakika boyunca inkübe edildi. Elde edilen cDNA örneği RNA analizlerinde kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.

Real-time PCR (qPCR)

Elde edilen cDNA örneklerinden, PDH enzim kompleksinin düzenlenmesi ile ilişkili genlerin ifadeleri araştırıldı. Her gen için total reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde, ilgili genlerin primerleri ve Power SYBR Green PCR master mix Çizelge 3.7’de gösterildiği üzere karıştırılarak bir PCR karışımı hazırlandı. Hazırlanan bu karışımdan 18,5 µl reaksiyon tüplere (strip) aktarıldı ve üzerlerine ilişkili cDNA örneklerinden 1,5 µl pipetlendi. Striplerin üst kısmı, uyumlu “cap”ler ile kapatıldı ve pleyt StepOne Plus cihazına yerleştirildi. Çevrim koşulu Çizelge 3.8’de gösterildiği gibi ayarlandı ve sonuçlar StepOne Plus v2.3 yazılımı ile değerlendirildi. Çalışmada kullanılan primerlerin baz dizilişleri Çizelge 3.9’da verildi.

Çizelge 3.7. PCR karışımı içerisinde yer alan bileşenler

Bileşen	20 µl karışım için	Konsantrasyon
Power SYBR Green Master Mix	10 µl	1x
Primer (Forward)	0,4 µl	200 nM
Primer (Reverse)	0,4 µl	200 nM
PCR-Grade Su	7,7 µl	-
Toplam Karışım	18,5 µl	-

Çizelge 3.8. PCR için termal çevrim koşulu

	Tutma	Döngü (x40)	
		Denatürasyon	Bağlanma/Uzama
Zaman	10 dakika	15 saniye	1 dakika
Sıcaklık (°C)	95	95	60

Çizelge 3.9. Çalışmada kullanılan primerler ve baz dizilişleri.

Primer Adı	Fonksiyon	Sekans (5'-3')
PDK1-F	Pyruvate dehydrogenase	CGTACTGGCTGTGGCTTCTC
PDK1-R	kinase, isozyme 1	CCAGTCTGACAGGCAACTCT
PDK2 -F	Pyruvate dehydrogenase	CAAGGACACCTACGGCGATG
PDK2 -R	kinase, isozyme 2	GCTGCCATCAAAGATGAGGGT
PDK3-F	Pyruvate dehydrogenase	CTTCGCAAACGTGCCCTATC
PDK3-R	kinase, isozyme 3	AGTAGCGCTCGATCTGCTTG
PDK4 -F	Pyruvate dehydrogenase	TGTGGTAGCAGTGGTCCAAG
PDK4 -R	kinase, isozyme 4	GTTCAACTGTTGCCCGCATT

3.2.15. Western Blotlama

Hücre Lizatlarının Elde Edilmesi

Hücreler (6-kuyulu pleyt ve/veya 25-75 cm²'lik flaskta bulunan) üzerindeki besiyeri 15 ml santrifüj tüplere toplandı. Kuyulara ve/veya flasklara, soğuk 1X PBS aktarıldı ve hücreler 1X PBS içerisinde scraper kullanılarak yüzeyden kaldırıldı. Kalkan hücreleri içeren 1X PBS, aynı 15 ml santrifüj tüplere toplanarak +4°C'de 1.000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant aspire edildi ve lizis işlemi için pelet, 70-100 µl RIPA tamponu ile süspanse edilerek tüm hacim 1.5 ml santrifüj tüplere aktarıldı ve buz üzerinde 30 dakika boyunca bekletildi. Bu süre boyunca her 10 dakikada bir, tüpler içerisindeki karışım pipetaj yapılarak karıştırıldı. Süre bitiminde tüpler, +4°C'de 13.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Proteinleri içeren süpernatant, 0,5 ml'lik santrifüj tüplere toplandı ve deney sonrası artan hacim, sonraki çalışmaya kadar -20°C'de saklandı.

- 1 ml RIPA tamponu içerisine; 10 µl 200 mM PMSF, 10 µl 100 mM sodyum ortovanadat, 20 µl proteaz inhibitör karışımı eklendi.

Protein Konsantrasyon Ölçümü

Protein konsantrasyon tayini için "Pierce™ BCA Protein Assay Kit" kullanıldı. Standart oluşturmak amacıyla BSA proteininin; 2-1,6-1,2-0,8-0,4-0,2 ve 0 mg/ml konsantrasyonları RIPA tamponu ile hazırlandı. Standartlar ve konsantrasyonu belirlenecek hücre lizatlarından 5 µl, 3 tekrarlı olarak 96-kuyulu pleyte pipetlendi. Ardından, kuyulara 195 µl "Çalışma Çözeltilisi" eklendi ve pleyt 37°C, %5'lik CO₂'li inkübatöre kaldırıldı. Renk şiddeti, 30 dakika sonunda 570 nm.'de spektrofotometre ile ölçüldü.

- Çalışma çözeltisi, kit içerisinde yer alan “BCA Reagent B” bileşeninin “BCA Reagent A” bileşeni ile 1:50 oranında hazırlanan karışımıdır.

SDS-PAGE

Protein miktarı 40 µg ve 4X “Sample Buffer” ve 10X “Sample Reducing Agent, 1X olacak şekilde 0,5 ml’lik santrifüj tüplere pipetlendi. Santrifüj tüpler, kısa süre çevrilerek, karışımın tüp dibine inmesi sağlandı. Protein denatürasyonu amacıyla, santrifüj tüpleri ısı bloğunda 95°C’de 7 dakika bekletildi. Bekleme süresinde, yükleme yapılacak 12-kuyulu jel elektroforez tankına yerleştirildikten sonra 20X “SDS Running Buffer” ultrasaf su ile 1X’e düşürülerek, tankın doluluk sınırına kadar eklendi. Jelde bulunan koruma sıvısı, pipet yardımıyla kuyular içerisinde al-ver yapılarak uzaklaştırıldı. İki jel arasında kalan kısma 500 µl antioksidan pipetlendi. Protein standardı ve örnekler, kuyulara pipet yardımıyla belirlenen miktarlarda yüklendi. Yükleme işlemi sonrasında, elektroforez tankı buzdolabına alındı ve 150V, değişken akımda 50 dakika elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Transferi

Transfer işlemi için iBlot™ jel transfer cihazına uygun “iBlot™ Transfer Stack” kullanıldı. Sırasıyla; bakır anot (+), jel, filtre kağıdı (ultra saf su ile ıslatılan), bakır katot (-) ve son olarak sünger yerleştirildi. Filtre kağıdı ve bakır katot yerleştirilmesi aşamalarında, hava kabarcığı oluşumunu engellemek amacıyla mini-silindir kullanıldı. Cihazın kapağı kapatılarak, transfer işlemi 7 dakikada gerçekleştirildi.

Bloklama ve Antikor İnkübasyonu

Transfer sonrası, membranlar 1X TBS-T içerisinde hazırlanan %5’lik yağsız kuru süt çözeltisi ile oda sıcaklığında 1 saat süre ile bloklandı. Süre sonunda, membranlar 3 defa 5 dakika boyunca 1X TBS-T ile yıkandı.

Primer antikorlar, 1X TBS-T ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda %5’lik BSA ve/veya %5’lik yağsız kuru süt çözeltisi içerisinde 1:1000 oranında seyreltildi ve membranlar, hazırlanan primer antikor içerisinde gece boyunca +4°C’de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda, membranlar 3 defa 5 dakika boyunca 1X TBS-T ile yıkandı. Ardından, “anti-rabbit” ve/veya “anti-mouse” sekonder antikorlar, 1X TBS-T ile hazırlanan %5’lik yağsız kuru süt çözeltisi içerisinde 1:2000 oranında

seyreltildi ve membranlar hazırlanan sekonder antikor içerisinde oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, membranlar 3 defa 5 dakika boyunca 1X TBS-T ile yıkandı.

- 10X TBS-T hazırlanışı: 24,23 g Tris bazı, 80,06 g NaCl tartıldı ve hacim ultrasaf su ile 800 ml'ye tamamlandı. pH 7,6'ya ayarlandı ve 10 ml Tween 20 eklenerek, hacim 1L'ye ultrasaf su ile tamamlandı. 1X TBS-T, 10X TBS-T'nin ultrasaf su ile seyreltilmesiyle hazırlandı.

Kemilüminesans Görüntüleme

Görüntüleme için, 1X “Luminata Forte Western HRP substrate” solüsyonu kullanıldı. Görüntüleme solüsyonu membranlar üzerine, yüzeylerini tam olarak kaplayacak şekilde 4 ml eklendi ve 1 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra, oluşan kemilüminesans sinyal, görüntüleme cihazı (Fusion FX-7) kullanılarak görüntülendi.

Antikorların Membrandan Uzaklaştırılması

Birincil ve ikincil antikorları membrandan uzaklaştırmak amacıyla “Stripping” tamponu kullanıldı.

- “Stripping” tamponu hazırlanışı: 0,76 g Tris base tartıldı ve 80 ml ultrasaf su ile çözünmesi sağlandı. pH 6,8'ya ayarlandı ve 2 g SDS çözeltiye eklendi. Son olarak, 0,7 ml β -merkaptolanol ilave edilerek hacim 100 ml'ye ultrasaf su ile tamamlandı.

Görüntüleme işleminden sonra, membranlar 3 defa 5 dakika boyunca 1X TBS-T ile yıkandı. Ardından, membranlar hazırlanan “stripping” tamponu içerisinde 50°C'de 30 dakika çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda, membranlar 4 defa 5 dakika boyunca 1X TBS-T ile yıkandı ve bloklama aşamasına geçildi.

3.2.16. Nükleus/Sitozol Fraksiyonlama








Hücrelerin çekirdek ekstraktını, sitoplazmik fraksiyondan ayırmak amacıyla “Nuclear/Cytosol Extraction Kit” kullanıldı. Elde edilen fraksiyonlar ile western blot analizi gerçekleştirilmiştir. Fraksiyonlama için, hücreler 75 cm² hücre kültür kaplarında %80 doluluk oranı elde edilinceye kadar kadar büyütüldü. Hücreleri kaldırmak amacıyla, 75 cm² flasklar öncelikle 5 ml 1X PBS ilave edilerek yıkandı. 1X PBS aspire edilerek uzaklaştırıldı ve 1 ml %0,05 Trypsin-EDTA solüsyonu eklenerek, hücreler 37°C'de, %5

CO₂'li ortamda 5 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda, mikroskopta kalktığı teyit edilen hücreler 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarılarak +4°C'de 600 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Bu aşamadan sonraki tüm adımlar buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine, 200 µl CEB-A karışımı (200 µl CEB-A + 0,2 µl DTT + 0,4 µl "proteaz inhibitör karışımı") eklendi ve hücreler ile karışması sağlanarak, toplam hacim 1,5 ml santrifüj tüplerine aktarıldı. 15 sn vorteks sonrası buz üzerinde 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda her bir tüpe "CEB-B" solüsyonundan 11 µl eklendi, 5 sn vorteks sonrası buz üzerinde 1 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda, 5 sn vorteks sonrası tüpler, +4°C'de 16.000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, tüplerde yer alan süpernatant, önceden soğutulmuş 0,5 ml santrifüj tüplerine aktarıldı ve sitozol fraksiyonu olarak etiketlendi. Tüpler içerisinde geride kalan pellet, 500 µl 1X PBS ile süspanse edildi ve +4°C'de 1.000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet üzerine, 100 µl "NEB" karışımı (100 µl NEB + 0,1 µl DTT + 0,2 µl "proteaz inhibitör karışımı") eklendi ve 15 sn vorteks sonrası buz üzerinde 40 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresince, her 10 dakikada bir 15 sn vorteks yapıldı. İnkübasyon sonunda tüpler, +4°C'de 16.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, tüplerde yer alan süpernatant, önceden soğutulmuş 0,5 ml santrifüj tüplerine aktarıldı ve çekirdek fraksiyonu olarak etiketlendi. Fraksiyonlar, western blot analizi yapmak üzere -80°C dolaba kaldırılarak saklandı.

3.2.17. Yüzey Bağımsız Büyüme Analizi

sh-PDHA1 ve sh-Kontrol monoklonal hücre soylarının, yüzey bağımsız büyümelerini gösterebilmek için; 1X L-glutamin, 1X B27 Supplement, 2 µg/ml Heparin, 20 ng/ml EGF, 10 ng/ml FGFb, %0,5 Primocin ve 2 µg/ml Puromycin içeren DMEM besiyeri kullanıldı. 96-kuyulu "ultralow attachment" pleytlere, kuyu başına 750 hücre 200 µl besiyeri içerisinde olacak şekilde ekildi ve pleyt 37°C'de %5'lik CO₂'li inkübatöre kaldırıldı. Kürecik (sfer) oluşumunun takibi, 1, 3 ve 5. günlerde görüntüleri alınarak yapıldı.

İnkübasyon sonunda, DNA-lipid karışımdan 250 µl kuyulara pipetlendi ve pleyt 37°C’de %5’lik CO₂’li inkübatöre kaldırıldı (Şekil 3.4). Ertesi gün, yaklaşık 16 saat sonrasında, kuyu içerikleri aspire edildi ve 2 ml taze besiyeri eklenerek pleyt 37°C’de %5’lik CO₂’li inkübatöre kaldırıldı.

	Zaman Akışı	İş Paketi	Transfeksiyon Ayrıntıları	
			Bileşen	6-kuyulu pleyt
0. Gün	1	 Transfeksiyon günü hücre yoğunluğu %70-90 olacak şekilde ekim yapıldı	HEK-293/T	8x10 ⁵
	2	 Lipofectamin™ 3000, Opti-MEM™ besiyeri içerisinde seyreltildi ve karıştırıldı	Opti-MEM™ Lipofectamin™ 3000	125 µl 7,5 µl
	3	 DNA karışımı Opti-MEM™ besiyeri içerisinde seyreltildi ve karışıma P3000™ pipetlendi	Opti-MEM™ DNA P3000™	125 µl 2,5 µg 5 µl
1. Gün	4	 DNA tüplerindeki içerik, Lipofectamin 3000™ tüplerine aktarıldı (1:1 oranında)	Seyreltilmiş DNA (P3000™ içeren) Seyreltilmiş Lipofectamin™ 3000	125 µl 125 µl
	5	 Tüpler 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı		
	6	 DNA-lipid karışımı HEK-293/T hücreleri üzerine yavaş bir şekilde pipetlendi	DNA-lipid karışımı DNA miktarı P3000™ Lipofectamin™ 3000	Her Bir Kuyuda 250 µl 2,5 µg 5 µl 7,5 µl
4. Gün	7	 HEK-293/T hücreleri GFP ifadesi için mikroskopta incelendi ve süpernatantları toplandı		

Şekil 3.4. Çalışmada kullanılan transfeksiyon protokolü (Lipofectamine™ 3000 Reagent protokolünden uyarlanmıştır)

72 saat sonra, lentiviral partikülleri içeren HEK-293/T süpernatantları 15 ml’lik santrifüj tüplere toplandı ve 2000 g’de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant yani lentiviral partiküller alikotlanarak -80°C’ye kaldırıldı (Şekil 3.5).

Lentiviral Transdüksiyon ve Antibiyotik Seleksiyonu

A-549 hücreleri 6-kuyulu pleytlere her kuyuda 1,25x10⁵ hücre olacak şekilde ekildi. Ertesi gün, 1,5 ml’lik santrifüj tüp içerisinde 500 µl besiyeri ile 500 µl alikotlanan lentivirüs toplam hacim 1 ml olacak şekilde karıştırıldı. Bu karışıma, polibren 12 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde pipetlendi ve kuyulara eklenerek A-549 hücrelerinin transdüksiyonu gerçekleştirildi. Ertesi gün, virüs tazelemek amacıyla süpernatant aspire edildi, 500 µl besiyeri ve 500 µl lentivirüs karışımı tekrar A-549 hücrelerine uygulandı. Bu işlem bir gün daha tekrar edildi (toplamda 72 saat süre ile A-549 hücreleri lentivirüsler ile inkübe edildi). A-549 hücrelerinin 72 saat transdüksiyonu sonunda, besiyerleri aspire

edildi, 1 ml 1X PBS ile 2 defa yıkandı. 2 µg/ml puromisin içeren besiyeri hücrelere uygulanarak 1 hafta boyunca antibiyotik seleksiyonu gerçekleştirildi (plazmid ile transfekte edilmemiş A-549 hücrelerinin bu süre içerisinde öldükleri gözlemlendi). 1 hafta sonunda poliklonal hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi ve PDHA1 mRNA düzeyindeki baskılanma kontrol edildi.

Monoklonal Hücre Soylarının Eldesi

PDHA1 baskılanması en etkin gözlenen poliklonal hücreler, 96-kuyulu pleytlere her kuyuda 0,99 hücre olacak şekilde 2 µg/ml puromisin içeren 200 µl besiyeri içerisinde ekildi. 3 günde bir kuyuların besiyerleri tazelendi. Yaklaşık 20 gün sonunda, 1 koloni içeren kuyulardan hücreleri toplamak amacıyla 96-kuyulu pleyt kuyularına 50 µl tripsin eklendi ve pleyt 37°C'de %5'lik CO₂'li inkübatöre kaldırıldı. Süre sonunda kalktığı gözlenen hücreler toplanarak, 500 µl besiyeri içeren 24-kuyulu pleyt kuyusuna pipetaj yapılarak aktarıldı. Kuyularda %80 doluluğa ulaşan hücreleri, 6-kuyulu pleytlere aktarmak amacıyla, 24-kuyulu pleyt kuyularına 200 µl tripsin eklendi ve pleyt 37°C'de %5'lik CO₂'li inkübatöre kaldırıldı. Süre sonunda kalktığı gözlenen hücreler toplanarak, 2 ml besiyeri içeren 6-kuyulu pleyt kuyusuna pipetaj yapılarak aktarıldı. Kuyularda %80 doluluğa ulaşan hücreleri, 25 cm²'lik flasklara aktarmak amacıyla 6-kuyulu pleyt kuyularına 500 µl tripsin eklendi ve pleyt 37°C'de %5'lik CO₂'li inkübatöre kaldırıldı. Süre sonunda kalktığı gözlenen hücreler toplanarak, 5 ml besiyeri içeren 25 cm²'lik flasklara aktarıldı. Sonrasında hücreler (sh-PDHA1 ve sh-Kontrol), yapılacak deneyin gerektirdiği hücre sayısına ulaşmaya kadar büyütüldü ve her aşamada yedekleme amacıyla dondurularak -80°C'ye kaldırıldı.

3.2.19. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Graph Pad programı aracılığı ANOVA testi ile değerlendirildi. En az 2 tekrarlı yapılan analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler p<0,05 değerine göre belirlendi.

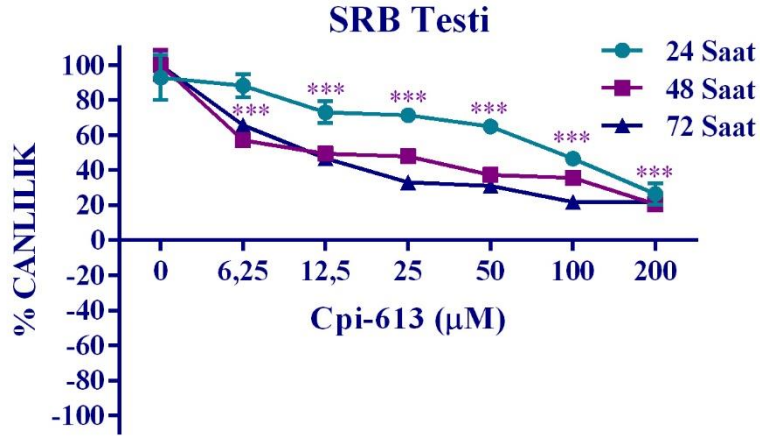
4. BULGULAR

4.1. Cpi-613'ün A-549 Hücrelerinin Büyüme Oranı Üzerine Etkisi

A-549 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (6,25-200 μ M) PDH inhibitörü Cpi-613 uygulandı.

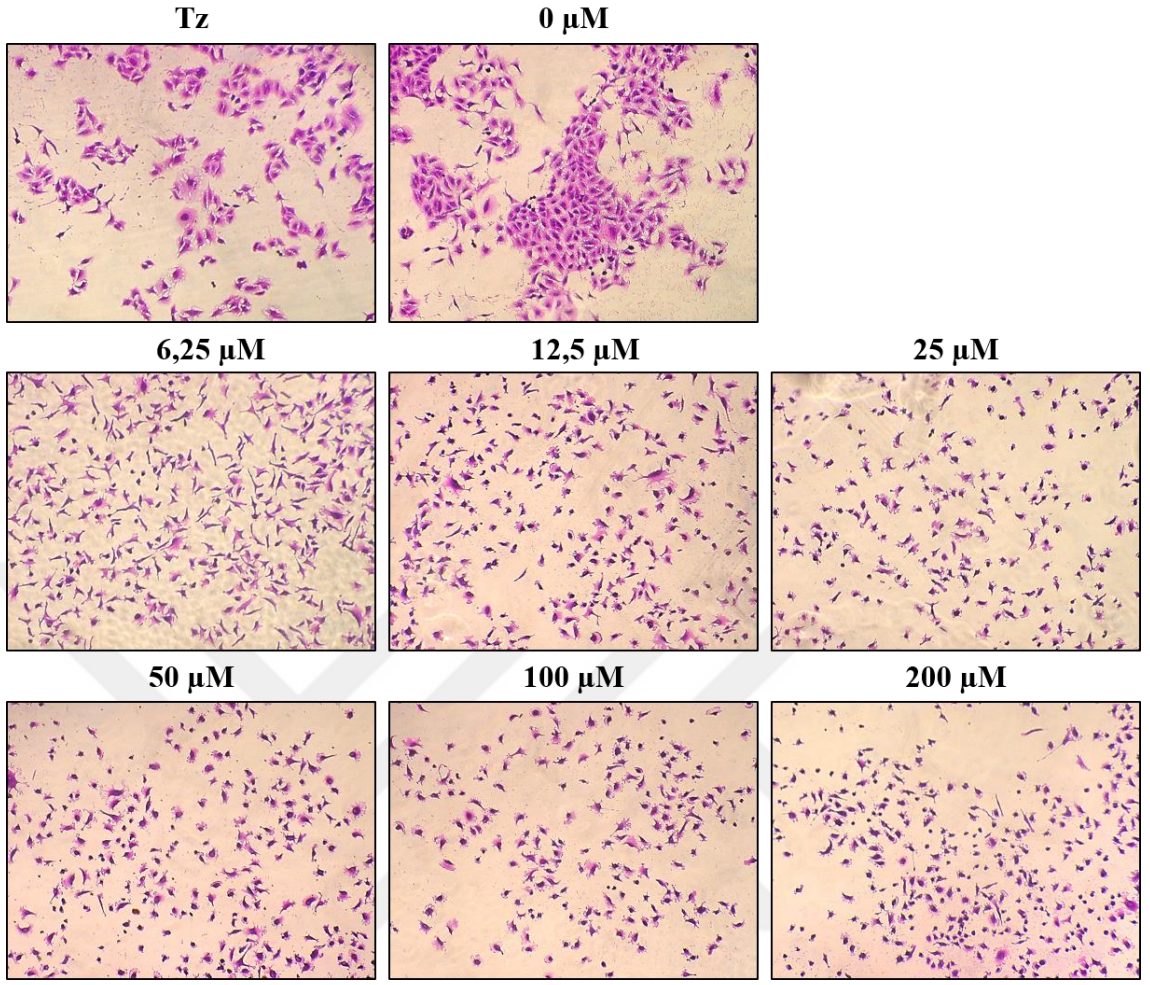
4.1.1. SRB Canlılık Testi Bulguları

24, 48 ve 72 saat süre ile Cpi-613 uygulamasını takiben A-549 hücre canlılığının konsantrasyon ve zamana bağlı olarak anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi ($p < 0,0001$) (Şekil 4.1). Cpi-613 uygulanan hücrelerin GI₅₀, TGI ve LC₅₀ değerleri Çizelge 4.1, Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te verilmiştir. SRB testi bulgularına göre, Cpi-613'ün uygulanan tüm konsantrasyonlarda antiproliferatif etki gösterdiği belirlendi (Şekil 4.1).

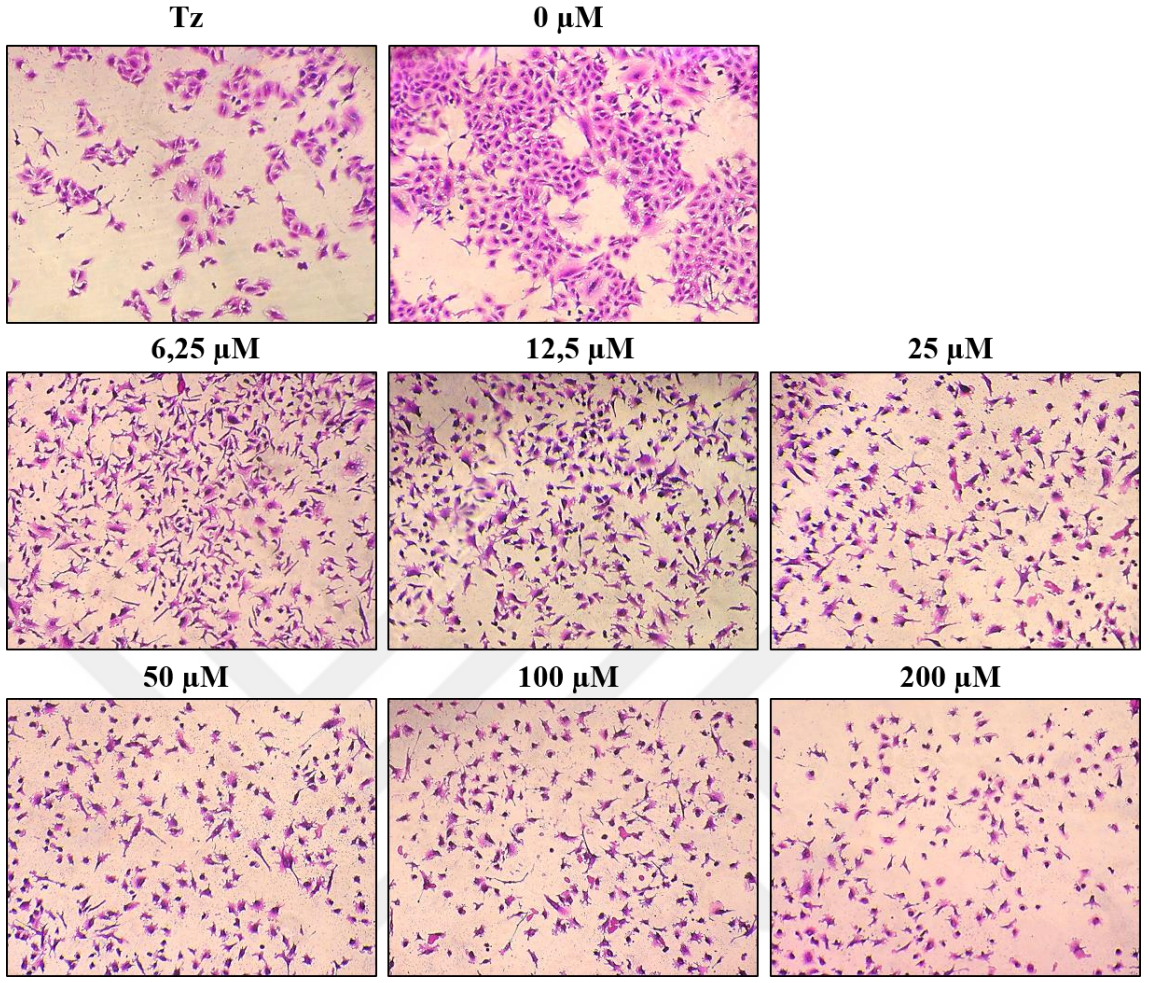


Şekil 4.1. A-549 hücrelerinde Cpi-613 uygulaması sonrası hücre canlılığının konsantrasyona (6,25-200 μ M) ve zamana (24, 48 ve 72 saat) bağlı olarak değişimi. *Aynı zaman periyodu içinde Cpi-613 uygulanmamış (0 μ M) hücrelere göre uygulanan konsantrasyonlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (***) ($p < 0,0001$) ifade etmektedir

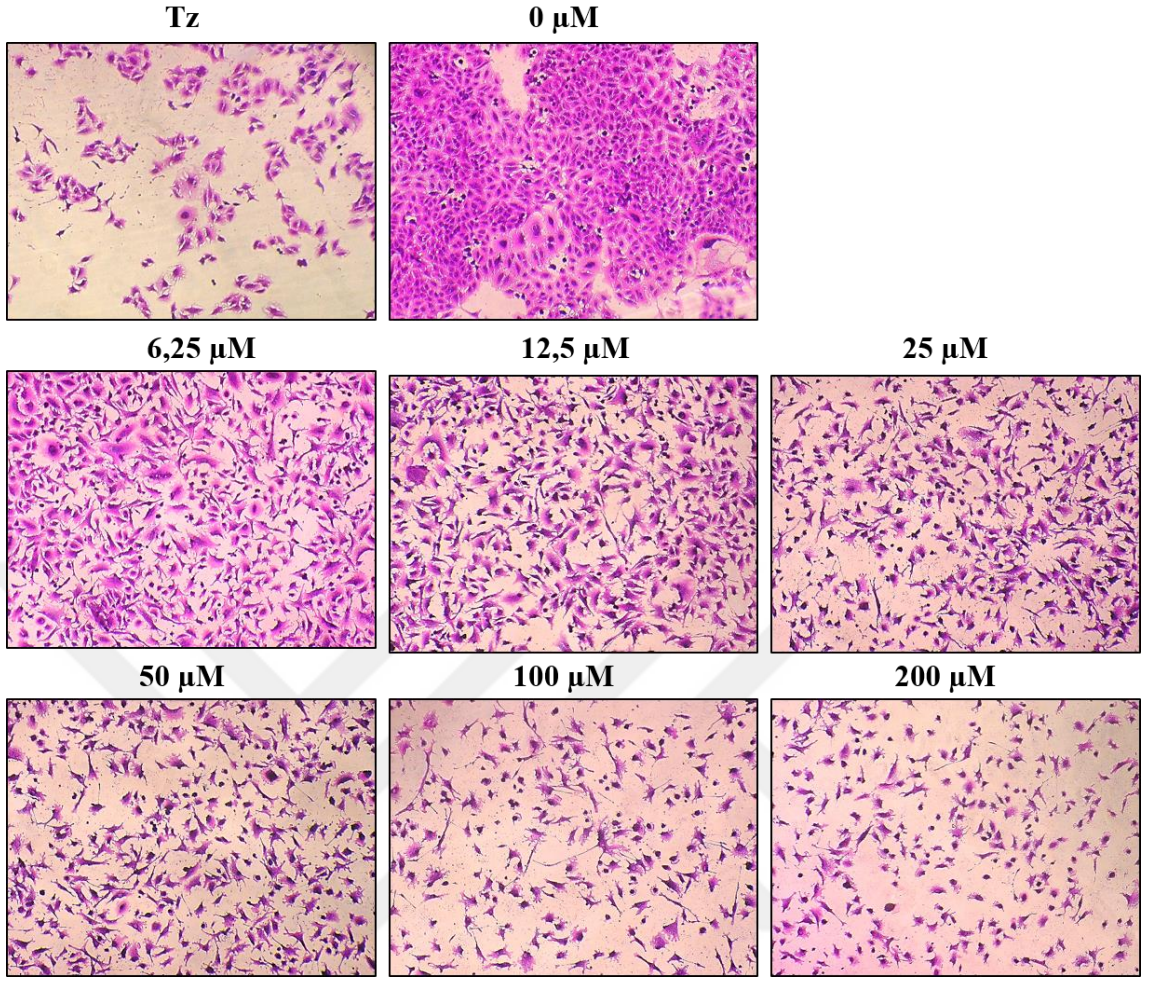
24, 48 ve 72 saat Cpi-613 uygulaması sonrası SRB ile boyanmış A-549 hücrelerinin mikroskop görüntüleri sırasıyla Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te gösterildi. İnkübasyon süreleri sonunda, hücre yoğunluğunun 0 μ M'a kıyasla konsantrasyona bağlı azaldığı bulundu. Buna rağmen en yüksek konsantrasyonda bile (200 μ M) hücre yoğunluğu Tz hücre yoğunluğundan daha az gözlenmedi.



Şekil 4.2. 24 saat Cpi-613 uygulaması sonrası SRB ile boyanmış A-549 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (x10)



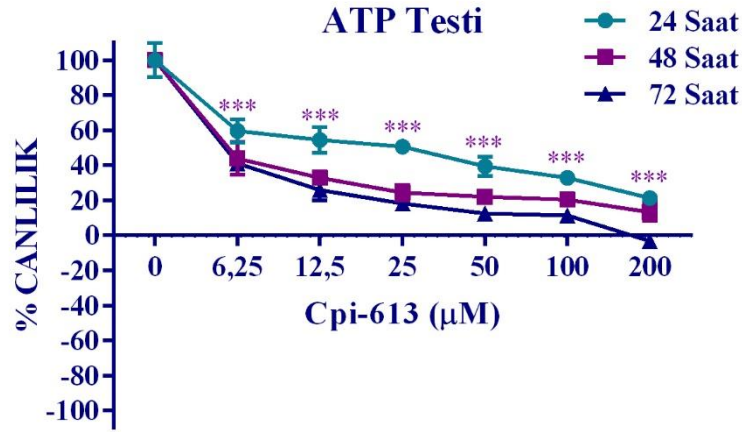
Şekil 4.3. 48 saat Cpi-613 uygulaması sonrası SRB ile boyanmış A-549 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (x10).



Şekil 4.4. 72 saat Cpi-613 uygulaması sonrası SRB ile boyanmış A-549 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (x10).

4.1.2. ATP Canlılık Testi Bulguları

24, 48 ve 72 saat süre ile Cpi-613 uygulamasını takiben A-549 hücre canlılığının konsantrasyona ve zamana bağlı olarak anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi ($p < 0,0001$) (Şekil 4.5). Cpi-613 uygulanan hücrelerin GI_{50} , TGI ve LC_{50} değerleri Çizelge 4.1, Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te verildi. ATP testi bulguları, SRB testi bulguları ile uyumlu olup, 24 ve 48. saatlerde Cpi-613'ün antiproliferatif etki gösterdiği gözlemlendi. 72 saatte ise, konsantrasyon arttıkça, özellikle 200 μ M konsantrasyonun sitostatik etki ile sonuçlandığı bulundu.



Şekil 4.5. A-549 hücrelerinde Cpi-613 uygulaması sonrası hücre canlılığının konsantrasyona (6,25-200 µM) ve zamana (24, 48 ve 72 saat) bağlı olarak değişimi. *Aynı zaman periyodu içinde Cpi-613 uygulanmamış (0 µM) hücrelere göre uygulanan konsantrasyonlar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (***: $p < 0,0001$) ifade etmektedir

Çizelge 4.1. A-549 hücrelerinde Cpi-613 uygulaması sonrası GI₅₀ değerleri.

Doz (µM)		GI ₅₀		
Süre		24.saat	48.saat	72.saat
Test	SRB	90,8±3,3	13,5±5,0	11,0±1,0
	ATP	23,9±11,5	4,9±2,1	5,0±0,6

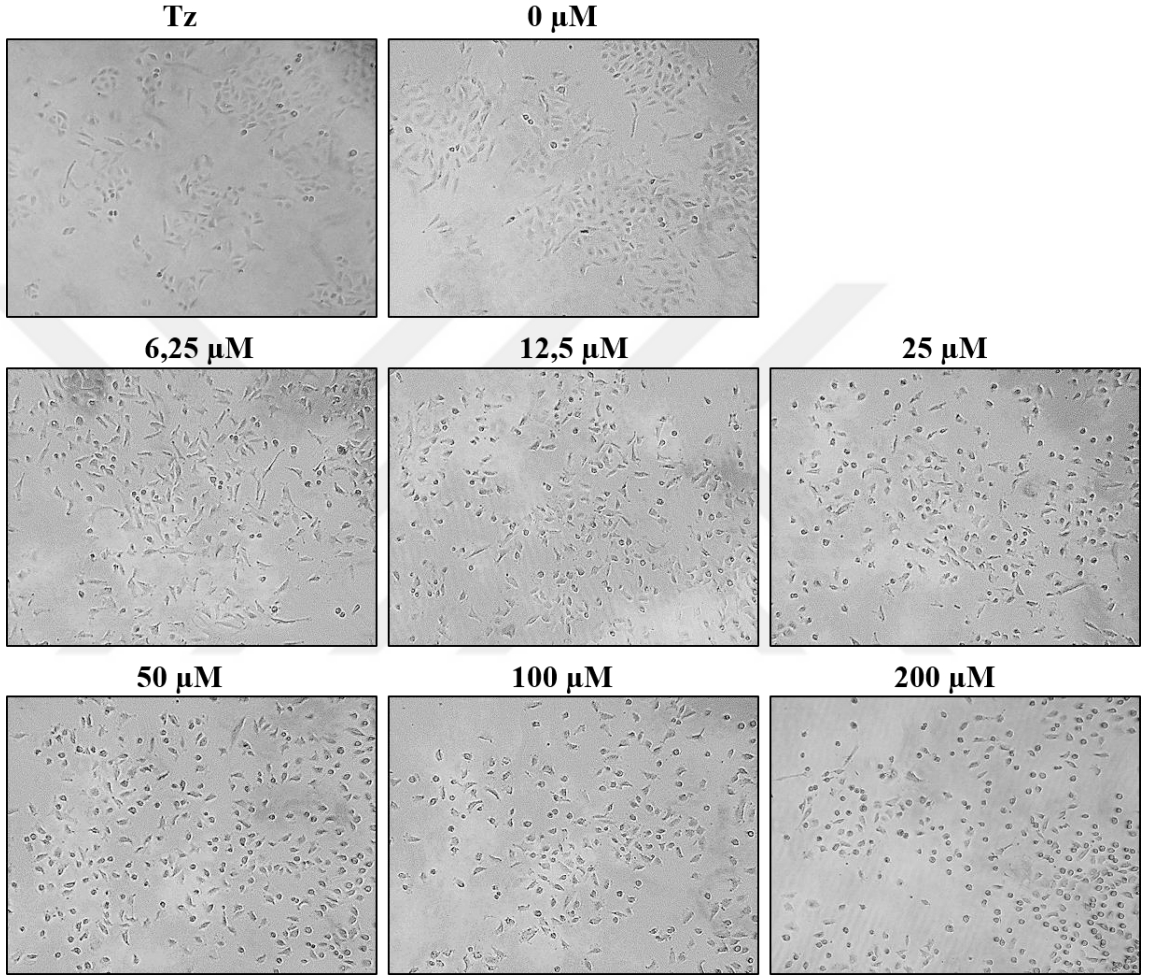
Çizelge 4.2. A-549 hücrelerinde Cpi-613 uygulaması sonrası TGI değerleri.

Doz (µM)		TGI		
Süre		24.saat	48.saat	72.saat
Test	SRB	>200	>200	>200
	ATP	>200	>200	176,8±15,4

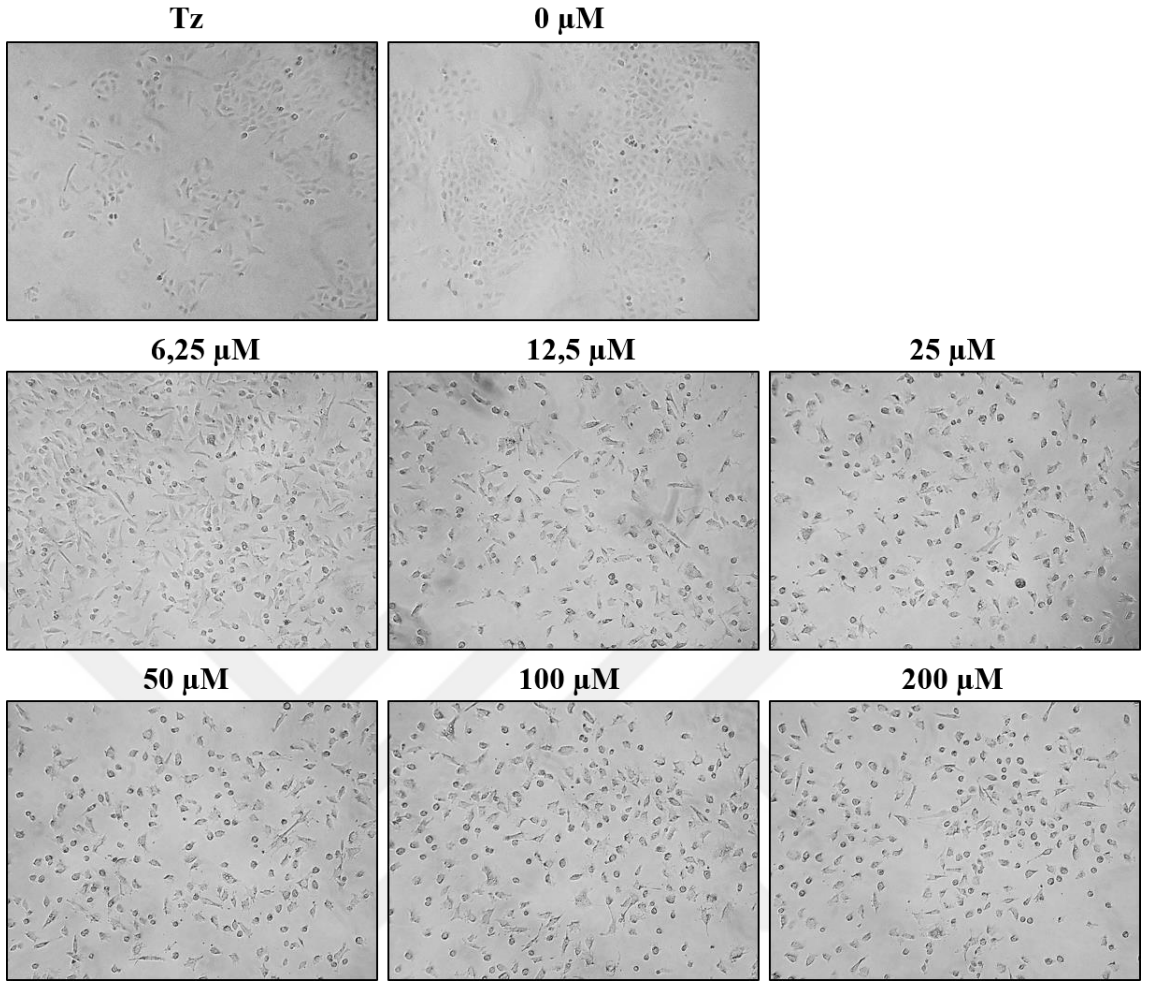
Çizelge 4.3. A-549 hücrelerinde Cpi-613 uygulaması sonrası LC₅₀ değerleri.

Doz (µM)		LC ₅₀		
Süre		24.saat	48.saat	72.saat
Test	SRB	>200	>200	>200
	ATP	>200	>200	>200

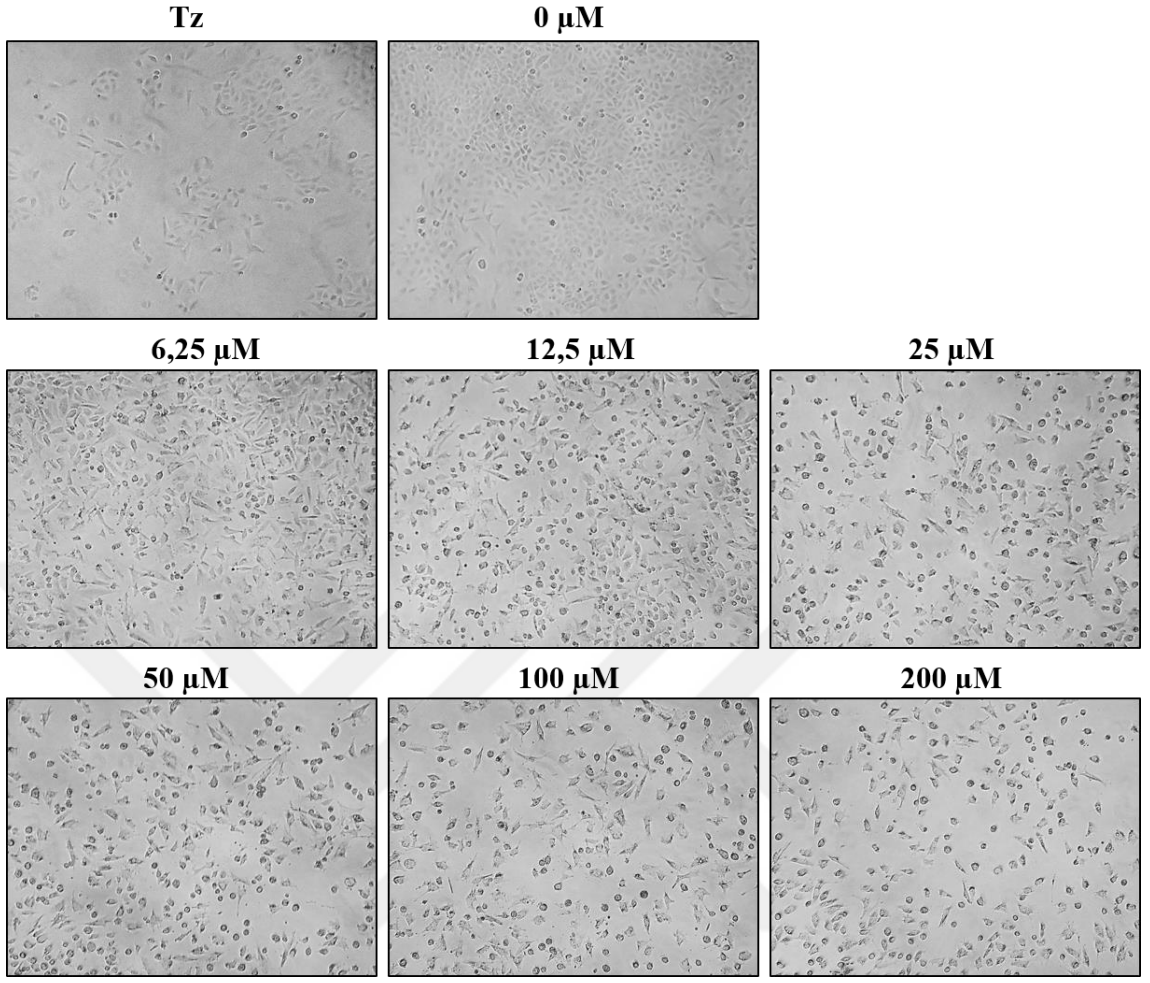
24, 48 ve 72 saat Cpi-613 uygulaması sonrası A-549 hücrelerinin mikroskop görüntüleri sırasıyla Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’te gösterildi. İnkübasyon süreleri sonunda, hücre yoğunluğunun $0\mu\text{M}$ ’a kıyasla konsantrasyona bağlı azaldığı bulundu. Buna rağmen en yüksek konsantrasyonda bile ($200\mu\text{M}$) hücre yoğunluğu Tz hücre yoğunluğundan daha az gözlenmedi.



Şekil 4.6. A-549 hücrelerinin 24 saat Cpi-613 uygulaması sonrası mikroskop görüntüleri (x10)



Şekil 4.7. A-549 hücrelerinin 48 saat Cpi-613 uygulaması sonrası mikroskop görüntüleri (x10).

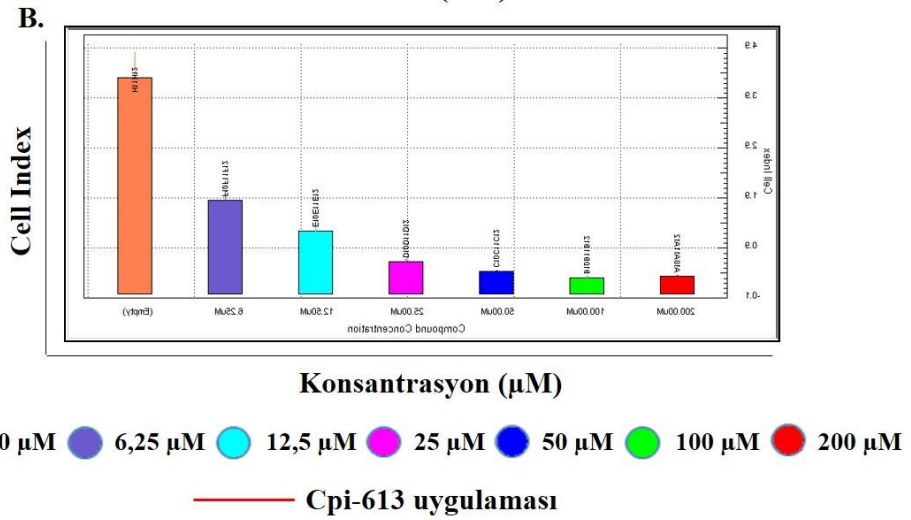
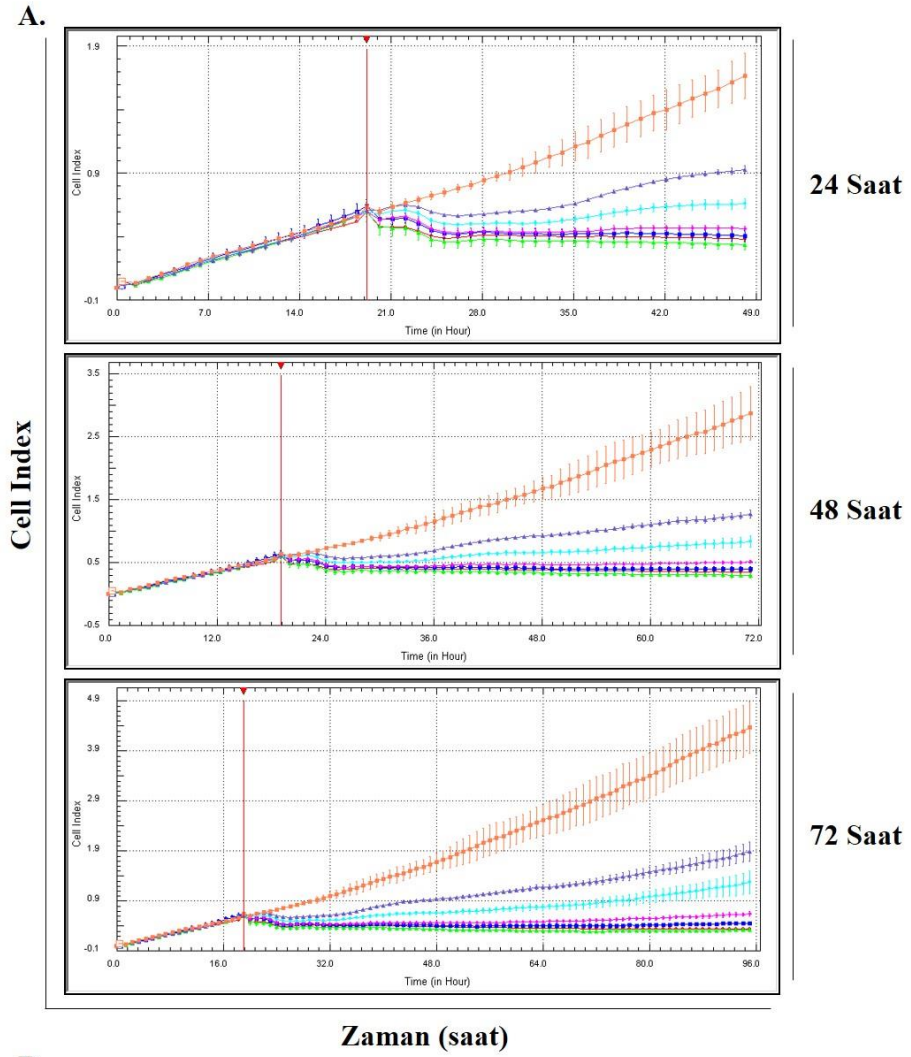


Şekil 4.8. A-549 hücrelerinin 72 saat Cpi-613 uygulaması sonrası mikroskop görüntüleri (x10).

4.1.3. Gerçek Zamanlı Hücre Görüntüleme (xCELLigence) Sistemi Bulguları

A-549 hücrelerinde Cpi-613 yanıtı xCELLigence sistemi ile gerçek zamanlı olarak izlendi (Şekil 4.9). Cpi-613 uygulanmayan hücrelerin ($0\mu\text{M}$, turuncu) empedanslarında inkübasyon süresi boyunca proliferasyon olmaları nedeniyle doğrusal bir artış gözlemlendi. $25\mu\text{M}$ - $200\mu\text{M}$ aralığında yer alan konsantrasyonların empedanslarında, Cpi-613 uygulama zamanına (ekimden 19 saat sonra) ait empedansa kıyasla herhangi bir artış/azalış gözlemlenmedi. Bu konsantrasyonlarda Cpi-613'ün sitostatik etkiye neden olduğu belirlendi. $6,25\mu\text{M}$ ve $12,5\mu\text{M}$ konsantrasyonlarına ait empedansların ise $0\mu\text{M}$ 'da gözlenen empedans artışının altında kaldığı dolayısıyla bu konsantrasyonlarda Cpi-613'ün antiproliferatif etkiye neden olduğu belirlendi.



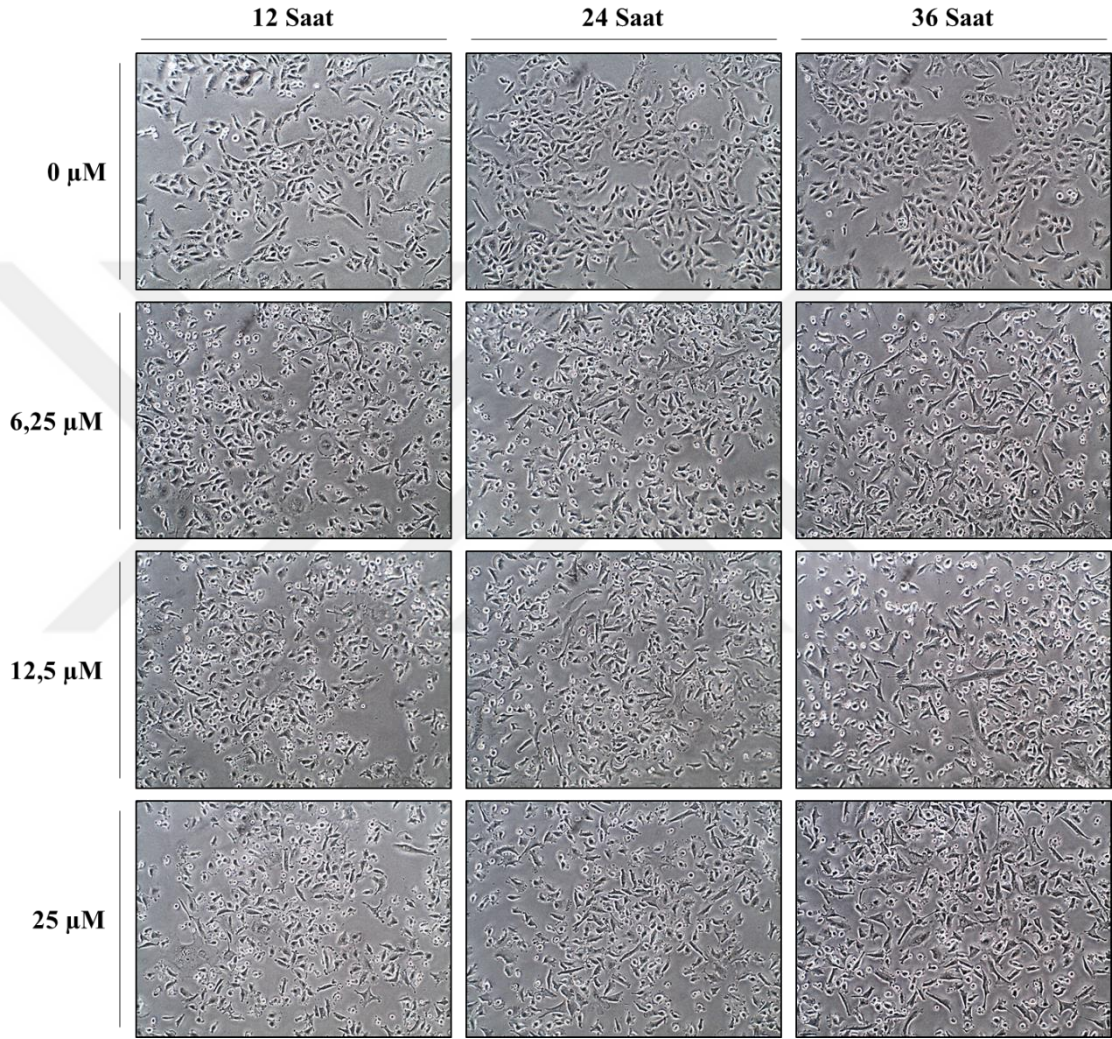


Şekil 4.9. Cpi-613'ün A-549 hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkisinin 72 saat boyunca gerçek zamanlı doğrusal (A) ve sütun (B) grafiği şeklinde gösterimi

Elde edilen sonuçlar dikkate alınarak ileri analizlerin 6,25 μ M, 12,5 μ M ve 25 μ M konsantrasyonları ile yapılmasına karar verildi.

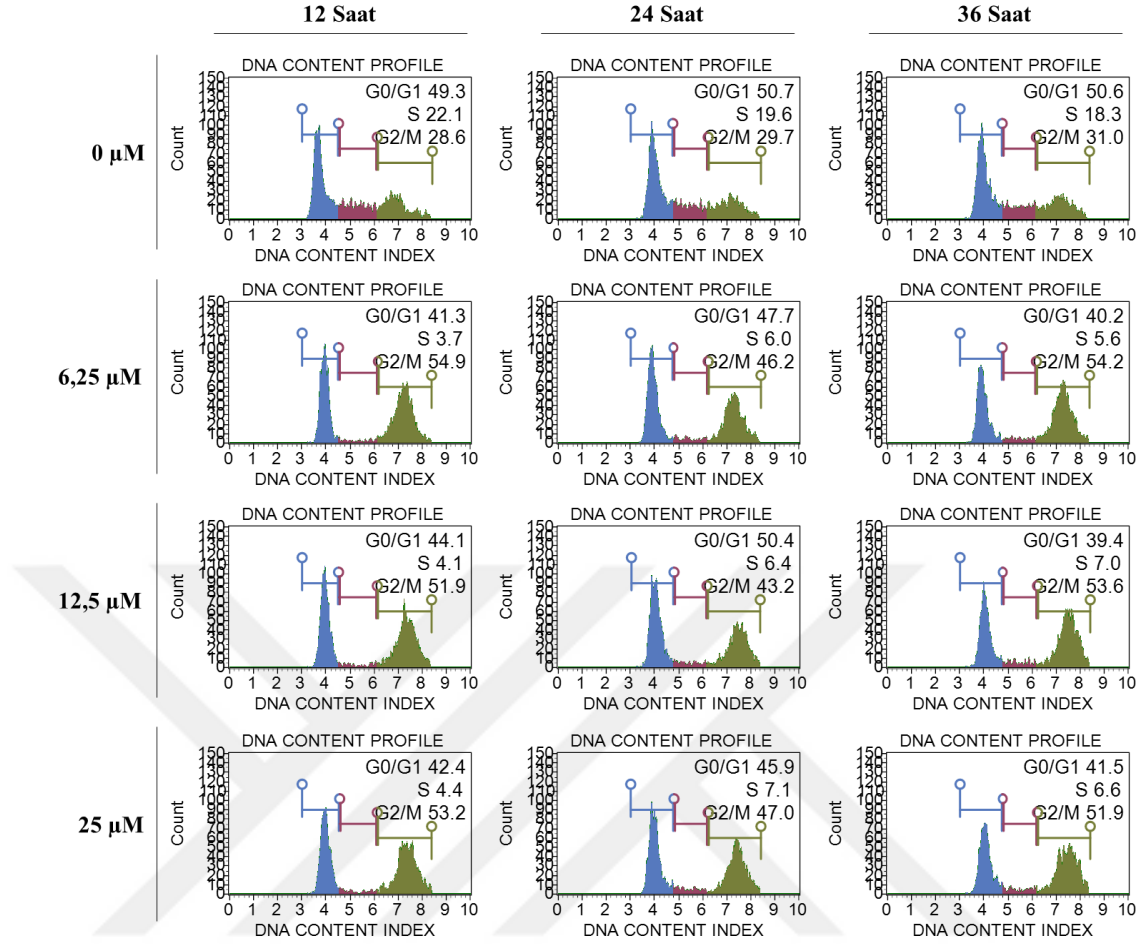
4.2. Cpi-613'ün A-549 Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi

Cpi-613 uygulanan A-549 hücrelerinin döngü analizi öncesi görüntüleri Şekil 4.10'da verildi.



Şekil 4.10. Cpi-613 uygulanan A-549 hücrelerinin döngü analizi öncesi mikroskop görüntüleri (x10)

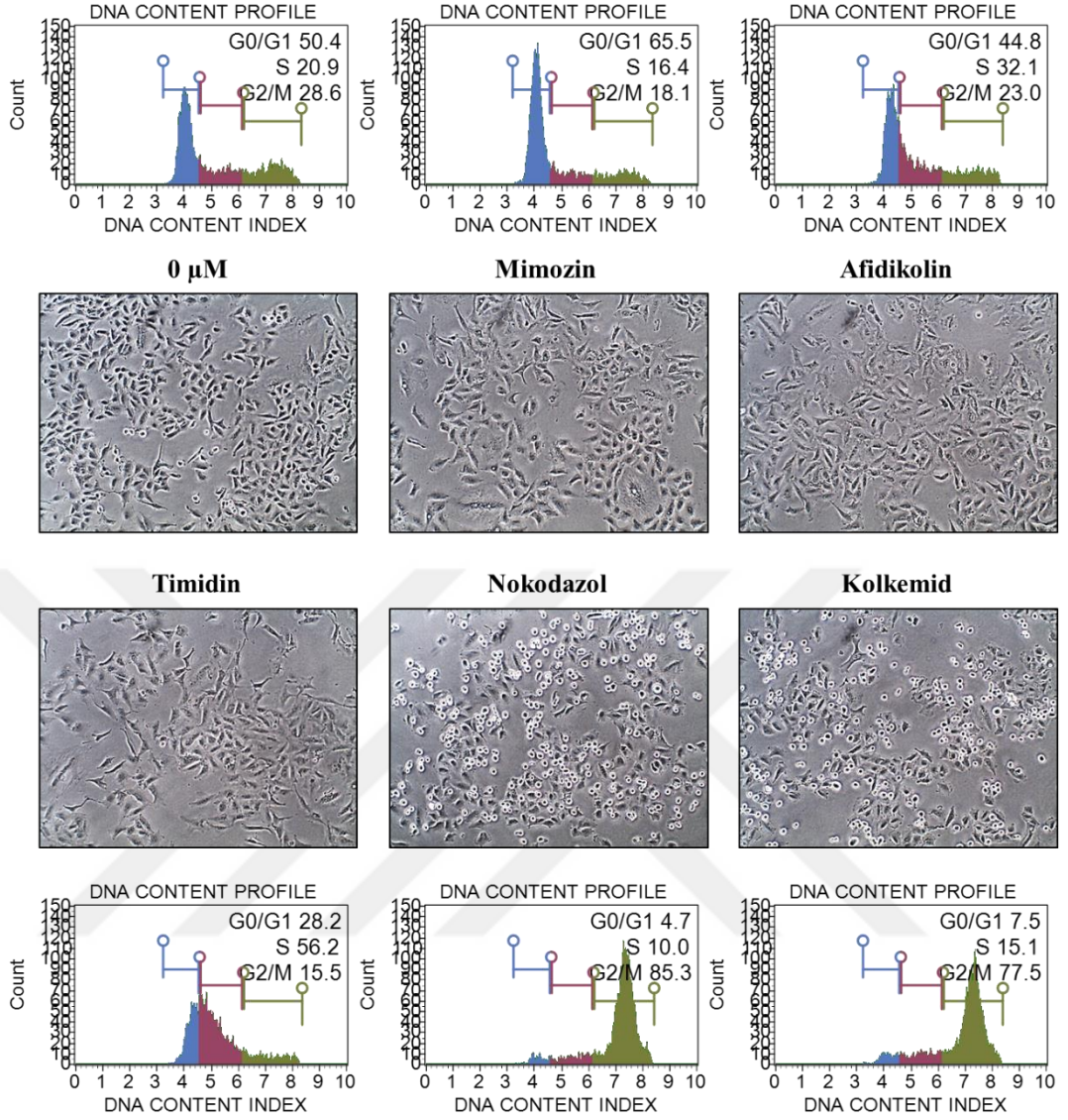
Hücre döngüsü analizine göre, A-549 hücrelerinin, 12, 24 ve 36 saat Cpi-613 uygulaması sonrasında zaman ve konsantrasyon bağılı olmaksızın G₂/M fazında biriktiği/tutulduğu belirlendi (Şekil 4.11).



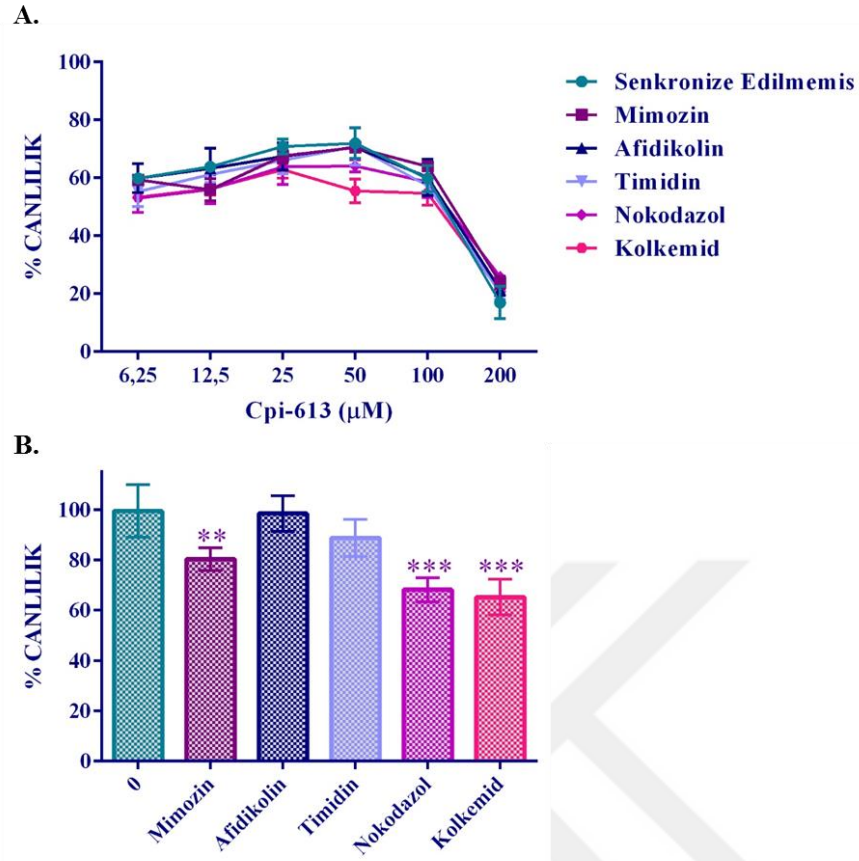
Şekil 4.11. Cpi-613 uygulanan A-549 hücrelerinin döngü fazlarındaki (G₀/G₁, S ve G₂/M) dağılımı

4.2.1. Cpi-613'ün Hücre Döngüsü Spesifikliği

Cpi-613'ün döngü fazlarına spesifik olup/olmadığını belirlemek için A-549 hücrelerinde senkronizasyon gerçekleştirildi. A-549 hücrelerinde, mimosin uygulaması G₀/G₁ fazında %15; afidikolin uygulaması S fazında %12; timidin uygulaması %36; nokodazol uygulaması G₂/M fazında %57; kolkemid uygulaması G₂/M fazında %49 oranında bir artışa neden oldu (Şekil 4.12). Senkronlanmamış hücreler ile kıyaslandığında senkronlanan hücrelerin Cpi-613 yanıtında herhangi bir fark gözlenmedi (Şekil 4.13). Dolayısıyla, Cpi-613'ün herhangi bir hücre döngü fazına spesifik olmadığı belirlendi.



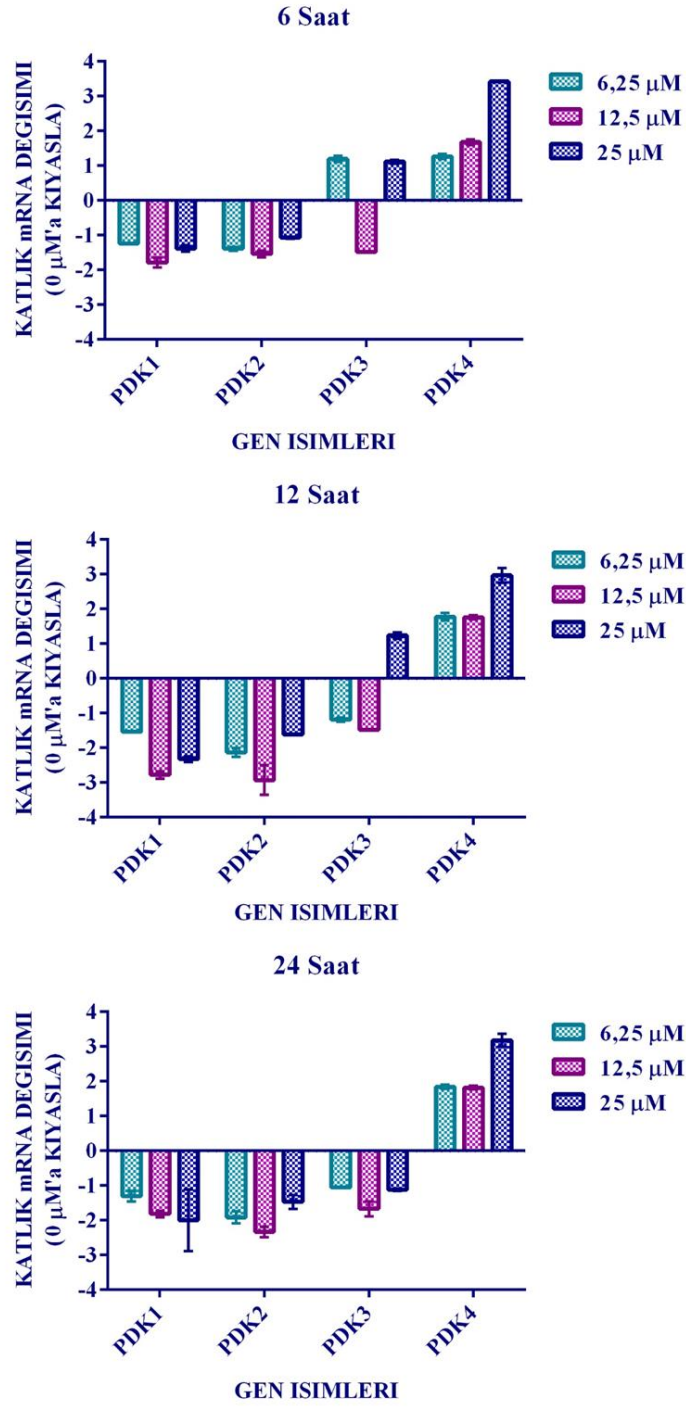
Şekil 4.12. Senkronizasyon gerçekleştirilen A-549 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (x10) ve döngü fazlarındaki (G₀/G₁, S ve G₂/M) dağılımı



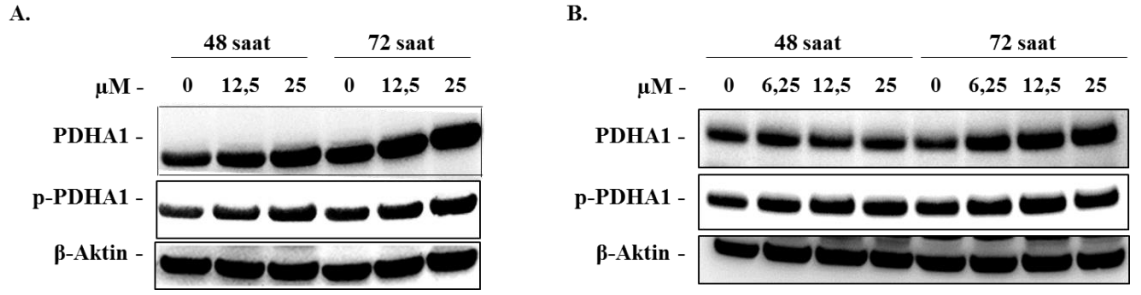
Şekil 4.13. Çeşitli döngü fazlarında senkronize edilen ve edilmeyen A-549 hücrelerinde 48 saat Cpi-613 (A) ve senkronizasyon kimyasallarının (B) uygulaması sonrası hücre canlılığının değişimi. Canlılık testi olarak ATP testi gerçekleştirildi. *0µM ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (**: $p < 0,001$, ***: $p < 0,0001$) ifade etmektedir

4.3. Cpi-613'ün PDH Aktivitesi ile İlişkili Gen ve Protein İfadeleri Üzerine Etkisi

A-549 hücrelerinde, Cpi-613 uygulamasının PDH ile ilişkili gen ve protein ifadeleri üzerine etkileri değerlendirildi. PDH enzim aktivitesi kontrolünü sağlayan kinazlardan (PDK1-4) PDK4 gen ifadesinde artış belirlendi (Şekil 4.14). Ayrıca p-PDHA1 protein ifadesinde de artış gözlemlendi (Şekil 4.15).



Şekil 4.14. Cpi-613 uygulanan A-549 hücrelerinde PDK mRNA ifade düzeyleri

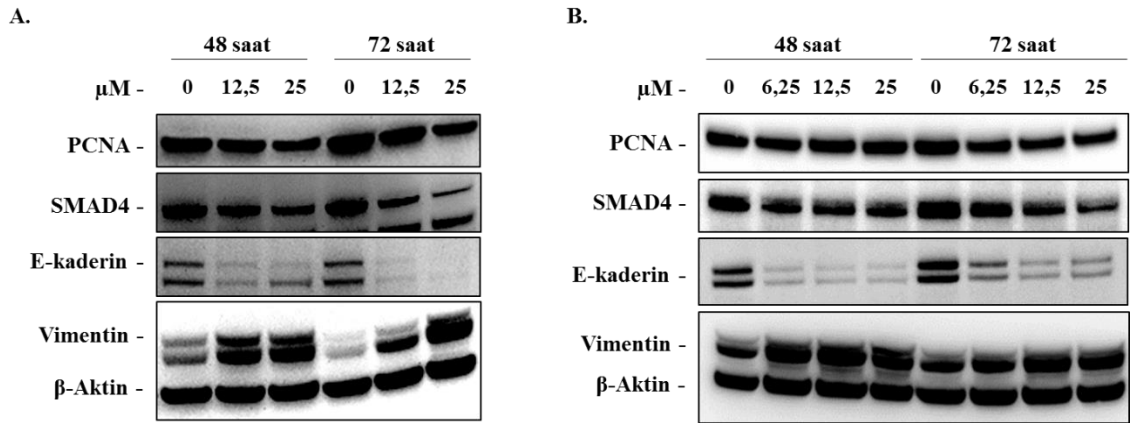


Şekil 4.15. Cpi-613 uygulanan A-549 hücrelerinde PDHA1 ve p-PDHA1 proteinlerin ifade düzeylerinde değişimlerin 2 bağımsız deney sonuçları (A ve B). β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı

4.4. Cpi-613'ün EMD Belirteçleri Üzerine Etkisi

4.4.1. EMD-İlişkili Proteinlerin Analizi

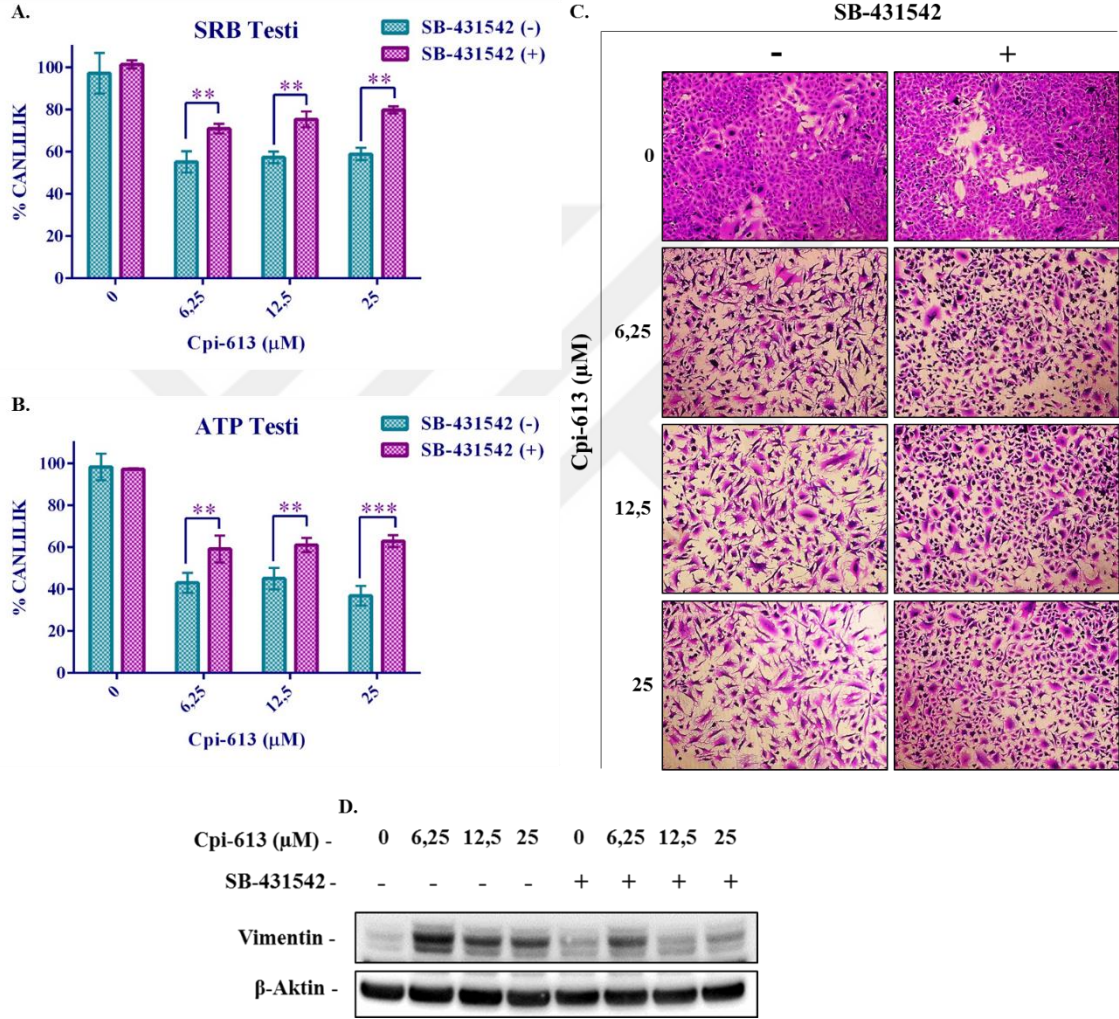
A-549 hücrelerinde Cpi-613 uygulaması sonucunda, mezenkimal bir belirteç olan vimentin protein ifadesinde artış belirlendi. Bununla birlikte, epitelyal bir belirteç olan E-kaderin protein ifadesinde azalma gözlemlendi. TGF-β sinyal iletiminde merkezi bir molekül olan smad4 protein ifadesinde de zamana ve doza bağlı bir azalma belirlendi. Cpi-613'ün antiproliferatif etkisi ile uyumlu şekilde proliferasyon belirteci olan PCNA protein ifadesinde azalma gözlemlendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Cpi-613 uygulanan A-549 hücrelerinde EMD ilişkili proteinlerin ifade düzeylerinde değişimlerin 2 bağımsız deney sonuçları (A ve B). β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı

4.4.2. TGF- β Sinyal İletiminin Rolü

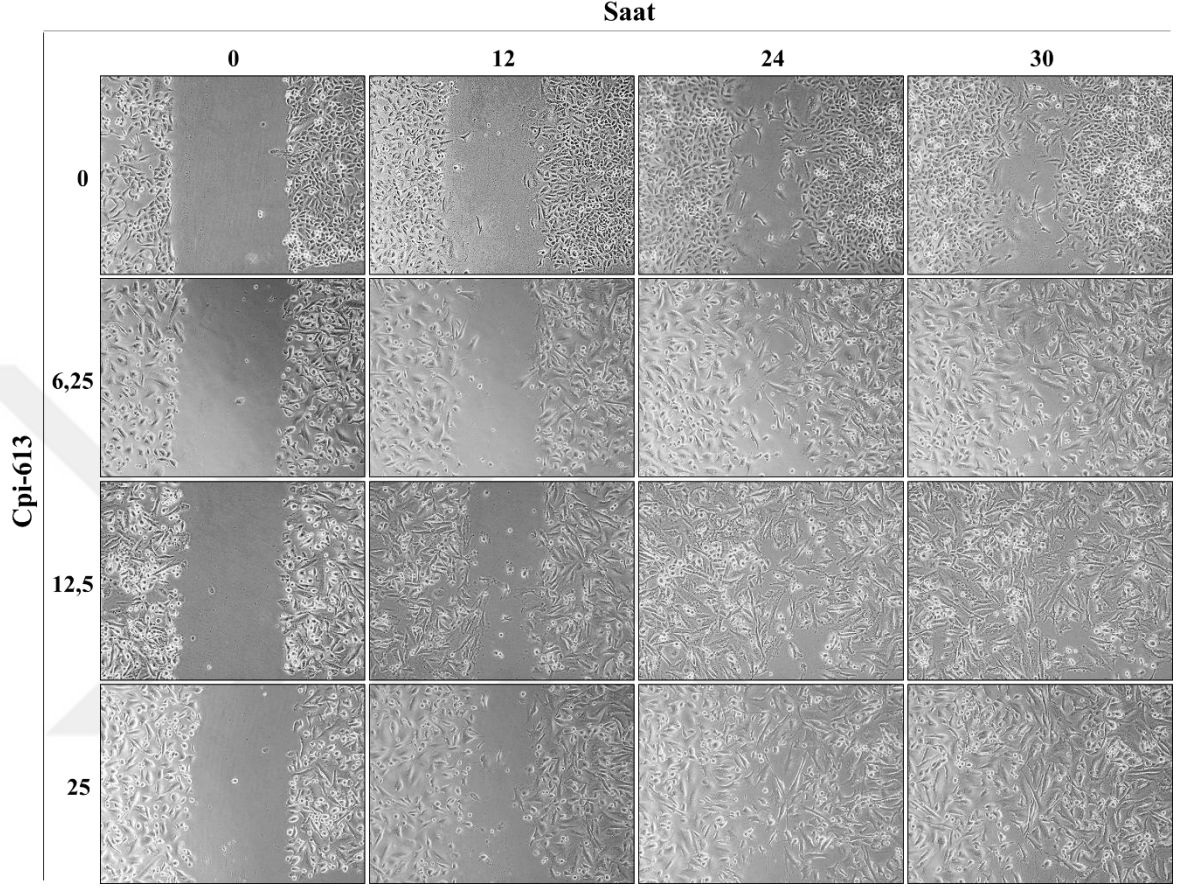
Cpi-613 uyarılmış EMD sürecinde TGF- β sinyal iletiminin rolünü araştırmak amacıyla, TGF- β R inhibitörü SB-431542 (2,5 μ M) kullanıldı. Cpi-613 ve SB-431542 eş zamanlı uygulandığında, tek başına Cpi-613 uygulamasına kıyasla %canlılıkların (Şekil 4.17A ve Şekil 4.17B), hücre fenotipinin (Şekil 4.17C) ve vimentin protein artışının (Şekil 4.17D) korunduğu gözlemlendi.



Şekil 4.17. TGF- β R inhibitörü SB-431542 varlığı ve yokluğunda Cpi-613 uygulanmış A-549 hücrelerinde % canlılığın (A ve B) hücre fenotipinin (C, x10) ve vimentin ifadesinin (D) doza (6,25, 12,5 ve 25 μ M) bağlı 72 saat inkübasyon sonunda değişimi. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. *Cpi-613 ve SB-431542 eş zamanlı uygulaması ile tek başına Cpi-613 uygulaması karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (**: $p<0,001$, ***: $p<0,0001$) ifade etmektedir

4.4.3. Yara İyileşmesi Bulguları

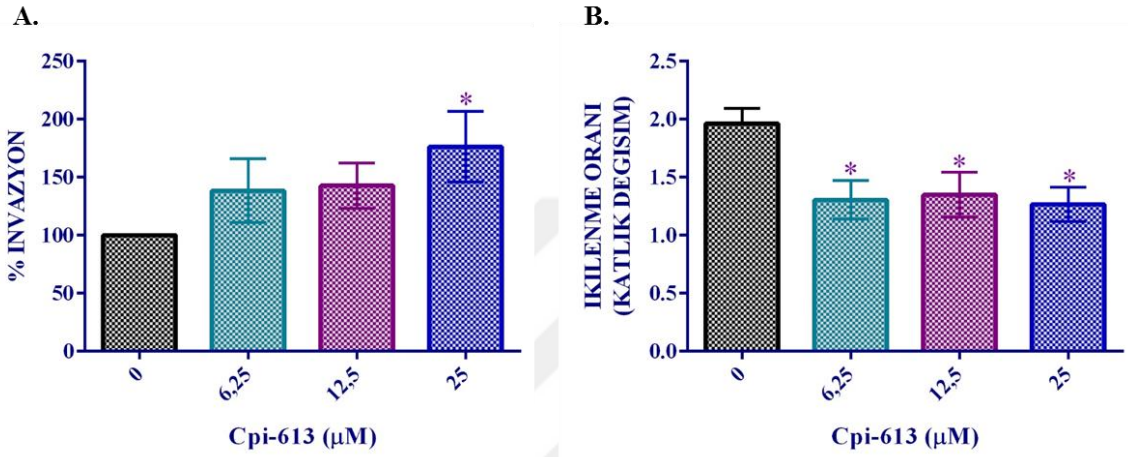
A-549 hücrelerinde Cpi-613 uygulaması sonucunda, yara iyileşmesinin Cpi-613 uygulanmamış hücelere (0 μ M'a) kıyasla daha hızlı olduğu gözlemlendi (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Cpi-613 uygulanan A-549 hücrelerinde migrasyon yeteneği

4.4.4. İnvazyon Bulguları

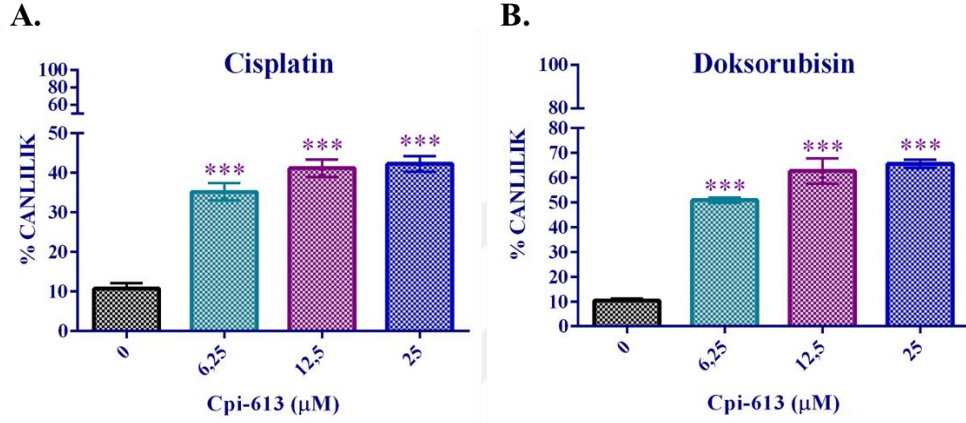
A-549 hücrelerinde 25µM Cpi-613 uygulaması sonucunda, invazyonun Cpi-613 uygulanmamış hücelere (0µM'a) kıyasla daha fazla olduğu gözlendi (Şekil 4.19A). 6,25µM ve 12,5µM konsantrasyonlarında da artış gözlenmesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı. İnvazyon sonuçları, Cpi-613 uygulanmış hücelerin proliferasyon oranlarına (Şekil 4.19B) göre normalize edildi.



Şekil 4.19. Cpi-613 uygulanan A-549 hücelerinde invazyon yeteneği (A) ve proliferasyon oranı (B). *0µM ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*:p<0,05) ifade etmektedir

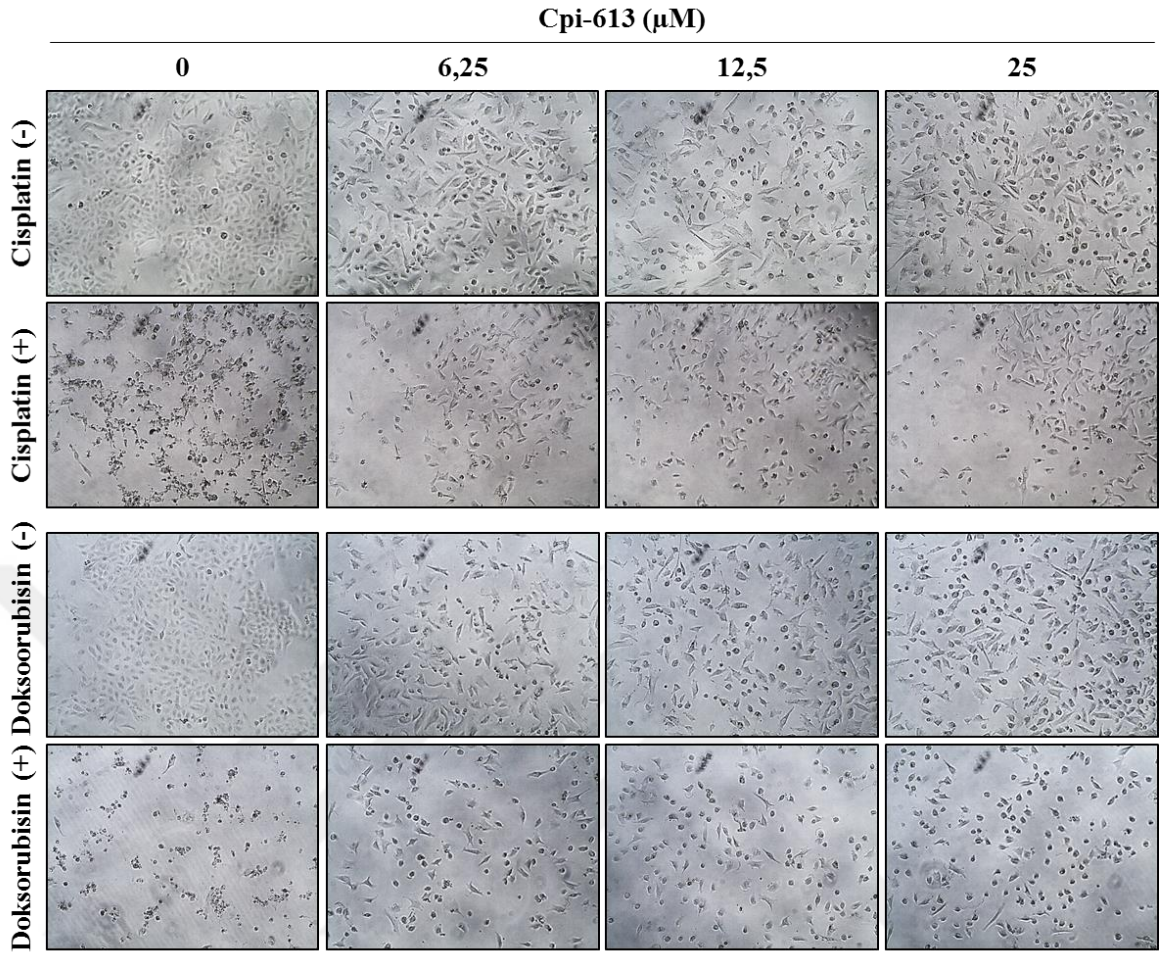
4.4.5. Kemodirenç Bulguları

A-549 hücrelerinin Cpi-613 ile 24 saat ön uygulama sonrasında cisplatin ($25,3\mu\text{M}$) ve doksorubisin ($1,8\mu\text{M}$) kemoterapötik ilaçları ile 48 saatlik inkübasyonu (ön uygulama alan hücrelerin inkübasyonları boyunca ortamdan Cpi-613 uzaklaştırılmadı) sonunda Cpi-613 uygulanmış hücrelerde %canlılık değerleri Cpi-613 uygulanmamış hücrelere ($0\mu\text{M}$) kıyasla yüksek gözlemlendi (Şekil 4.20A ve Şekil 4.20B).



Şekil 4.20. Cpi-613 varlığı ($6,25\mu\text{M}$, $12,5\mu\text{M}$ ve $25\mu\text{M}$) ve yokluğunda ($0\mu\text{M}$) cisplatin (A) ve doksorubisin (B) uygulanmış A-549 hücrelerinde %canlılığın 48 saat inkübasyon sonunda değişimi. Canlılık testi olarak ATP testi kullanıldı. * $0\mu\text{M}$ ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (***) $p < 0,0001$) ifade etmektedir

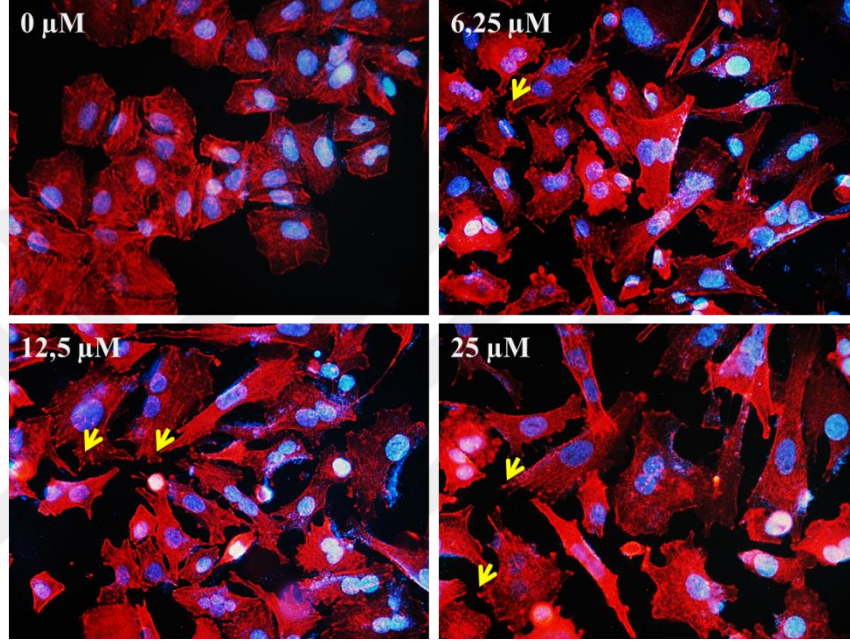
Kemoterapötik ilaçlarla inkübasyon sonunda, Cpi-613 uygulanmış hücrelerin yoğunluğunun, Cpi-613 uygulanmamış ($0\mu\text{M}$) hücrelere kıyasla daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Cpi-613 varlığı (6,25 μM , 12,5 μM ve 25 μM) ve yokluğunda (0 μM) cisplatin (A) ve doksorubisin (B) uygulanmış A-549 hücrelerinin 48 saat inkübasyon sonunda mikroskop görüntüleri (x10)

4.4.6. Phalloidin Boyama Bulguları

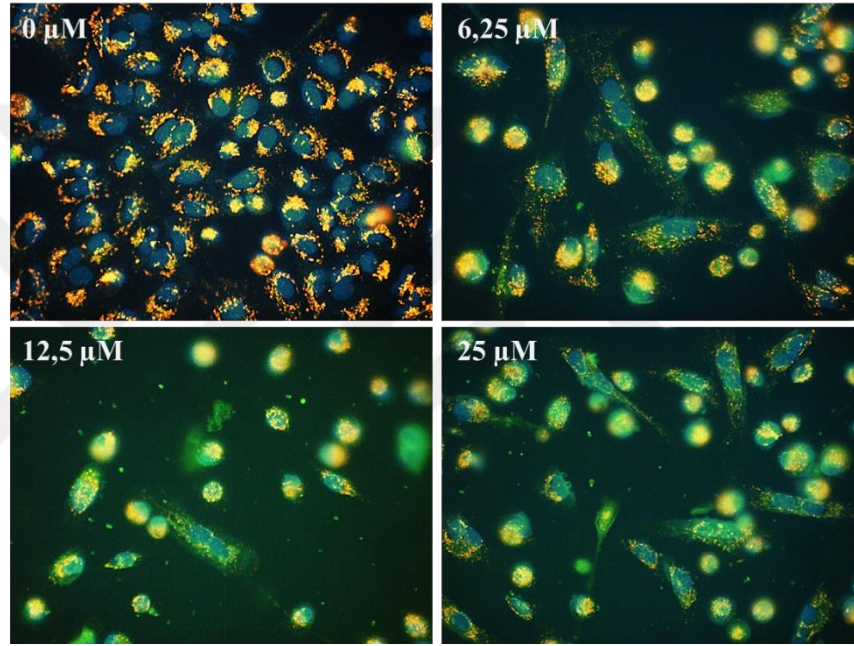
Cpi-613 uygulanmış hücrelerde EMD sürecinin bir diğer karakteristiği olan Aktin yeniden düzenlenmesi incelendi. 72 saat Cpi-613 uygulaması sonunda, Cpi-613 uygulanmamış (0 μ M) hücrelere kıyasla, daha uzun ve yoğun boyanan F-aktin stres iplikleri gözlemlendi (Şekil 4.22). Bunun yanı sıra, membran uzantılarında (protrüzyon) daha yoğun bir boyanma gözlemlendi (Şekil 4.22’de sarı oklar ile gösterildi).



Şekil 4.22. A-549 hücrelerinin 72 saat Cpi-613 uygulaması sonrası phalloidin boyama görüntüleri (x40). Sarı oklar boyanan membran uzantılarını göstermektedir

4.5. Cpi-613'ün Mitokondri Membran Potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) Üzerine Etkisi

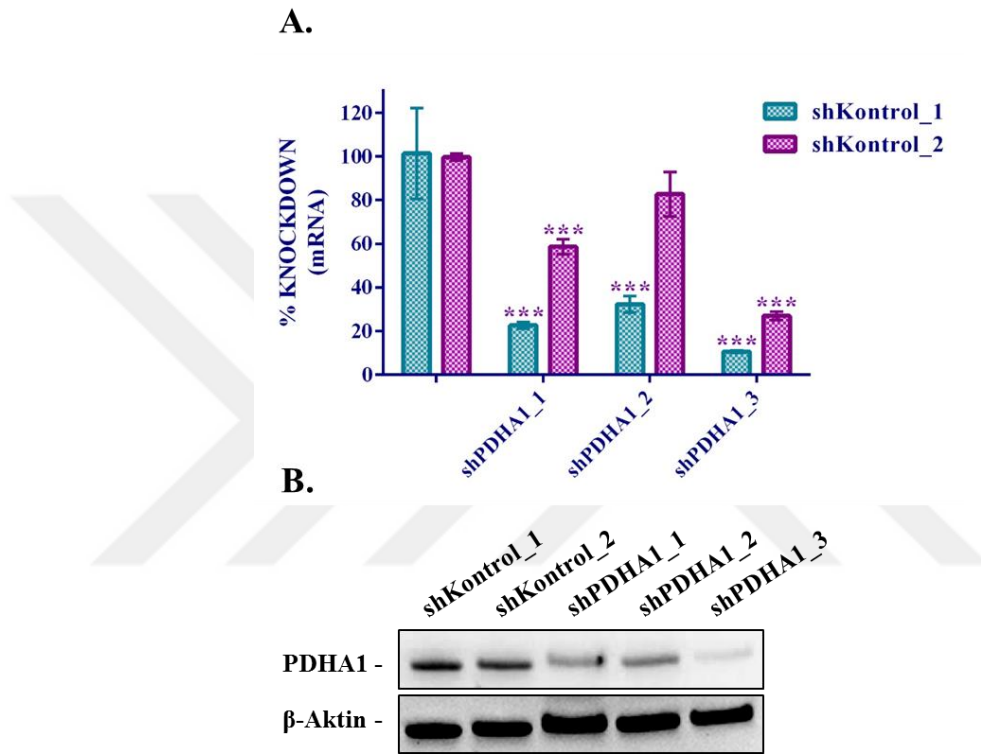
Mitokondri membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$), lipofilik-katyonik JC-1 boyası kullanılarak (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide) belirlendi. Sağlıklı hücrelerde yüksek $\Delta\Psi_m$ nedeniyle JC-1, J-agregatları olarak adlandırılan turuncu-kırmızı floresans veren kompleksler meydana getirir. Buna karşın düşük $\Delta\Psi_m$ profili gösteren hücrelerde JC-1, yeşil floresans veren monomerik hali ile kalır. 72 saat Cpi-613 uygulaması sonunda, Cpi-613 uygulanmamış ($0\mu\text{M}$) hücrelere kıyasla mitokondri membran potansiyelinin daha düşük olduğu belirlendi (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. A-549 hücrelerinin 72 saat Cpi-613 uygulaması sonrası JC-1 boyama görüntüleri (x40)

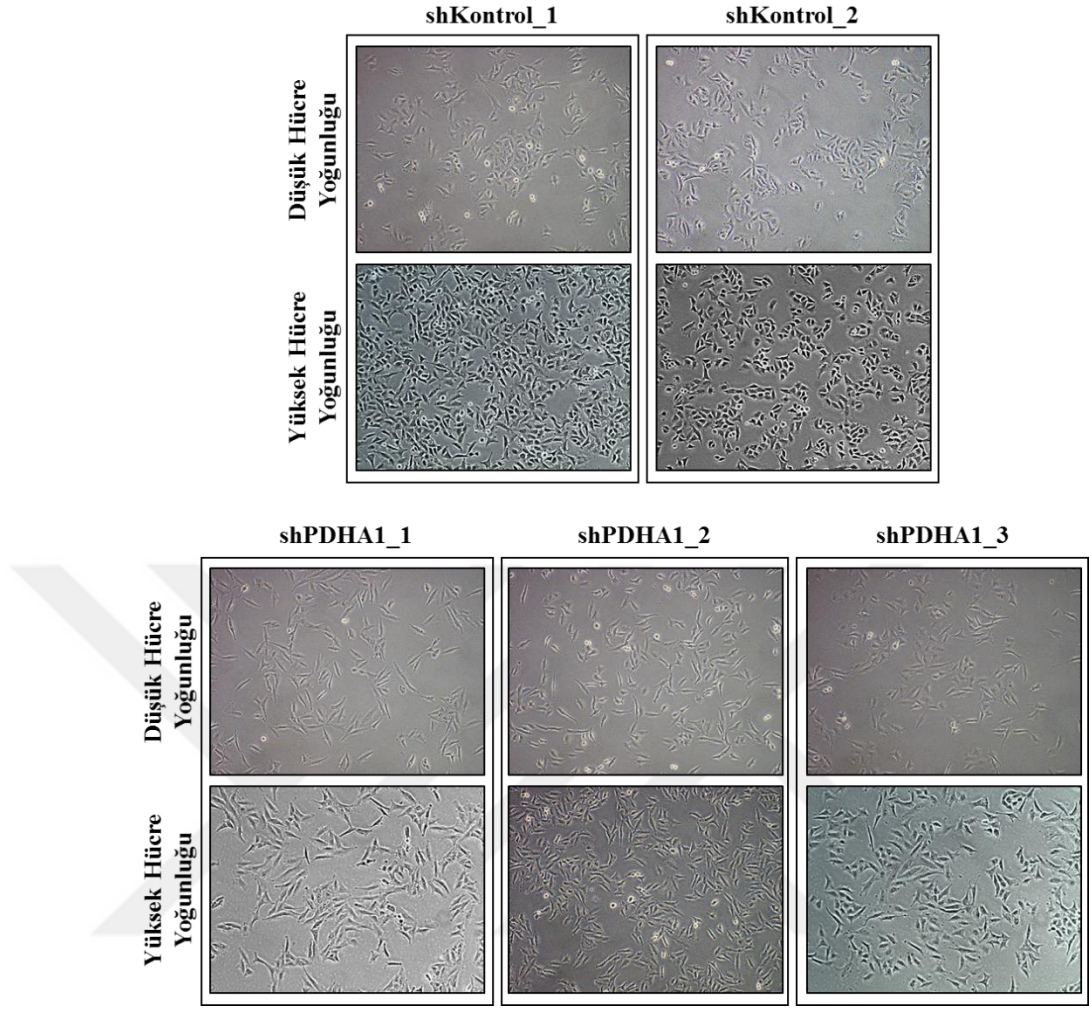
4.6. A-549 Hücrelerinde PDHA1 İfadesinin Baskılanması

Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında, PDHA1 ifadesinin baskılanması ile gerçekleşen değişimlerin tespit edilmesi amaçlandı. İki adet shKontrol ve en iyi baskılanma görülen üç adet shPDHA1 monoklonal hücre soyu seçildi. Hem mRNA hem protein düzeyinde baskılanma verimliliği Şekil 4.24'te gösterildi.



Şekil 4.24. A-549 hücrelerinde PDHA1 ifadesinin baskılanma verimliliğinin mRNA (**A**) ve protein (**B**) düzeyinde gösterimi. *Aynı grup içinde shKontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (***) $p < 0,0001$) ifade etmektedir

A-549 hücrelerinde PDHA1 baskılanması hücre morfolojisinde değişiklik meydana getirdi. shKontrol hücrelerinde hücre-hücre bağlantılarının daha fazla olduğu ve bu hücrelerin deneyler boyunca ada şeklinde büyüdükleri gözlemlendi. Buna karşın PDHA1'in baskılanması, hücre-hücre bağlantılarının zayıflamasına ve hücrelerin daha dağınık şekilde büyümesine neden oldu. Ayrıca hücre morfolojilerinin daha içsi olduğu gözlemlendi (Şekil 4.25).

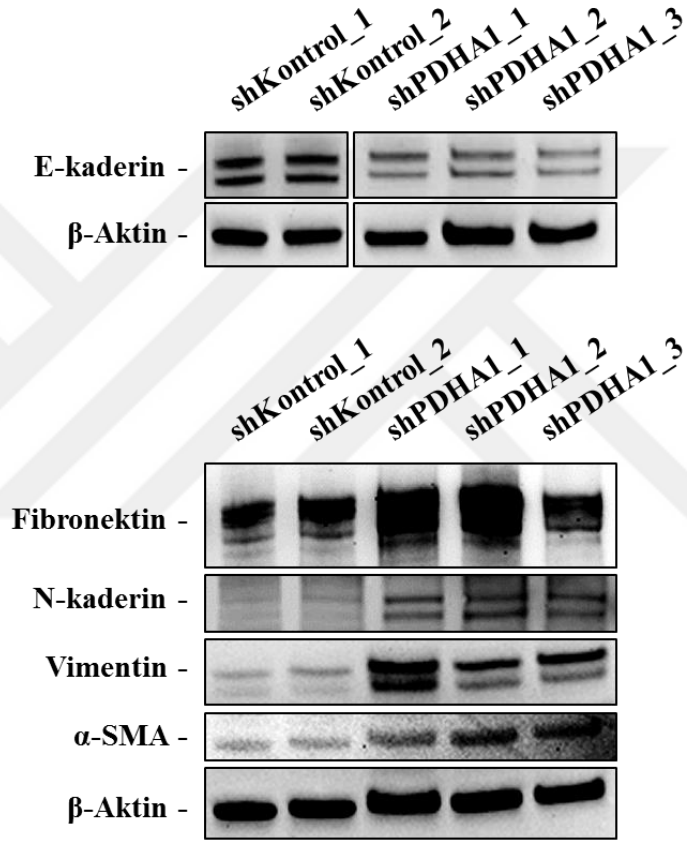


Şekil 4.25. shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinin mikroskop görüntüleri (x10)

4.7. PDHA1 Baskılanmasının EMD Belirteçleri Üzerine Etkisi

4.7.1. EMD-İlişkili Proteinlerin Analizi

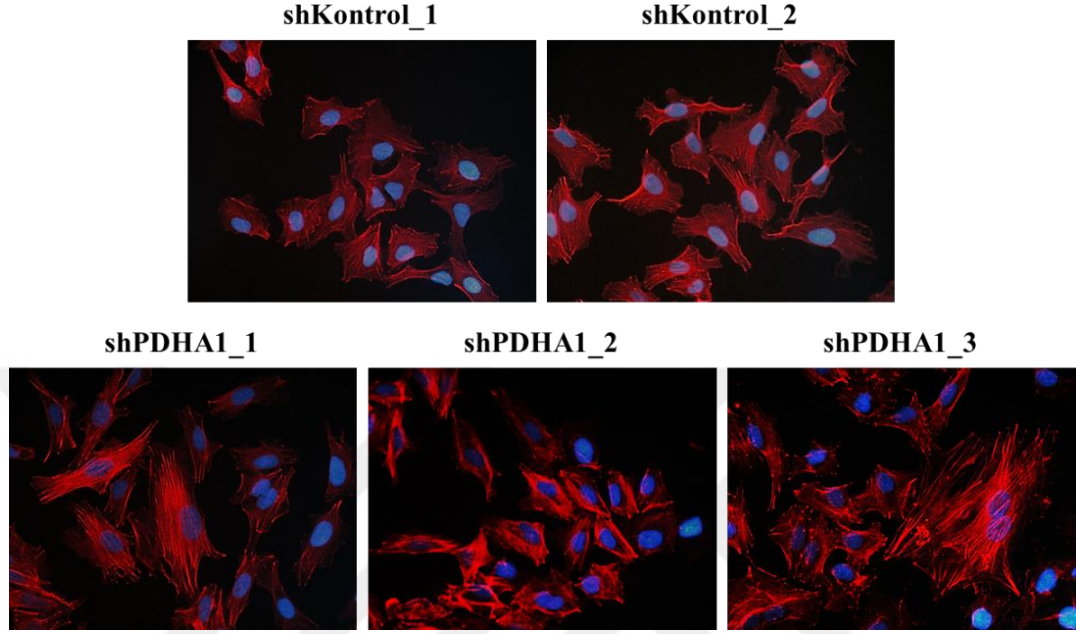
A-549 hücrelerinde PDHA1 baskılanması sonucunda, mezenkimal belirteçler fibronektin, n-kaderin, vimentin ve α -sma protein ifadelerinde artış belirlendi. Bununla birlikte, epitelyal bir belirteç olan e-kaderin protein ifadesinde azalma gözlemlendi (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinde EMD ilişkili proteinlerin ifade düzeylerinde değişimler. β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı

4.7.2. Phalloidin Boyama Bulguları

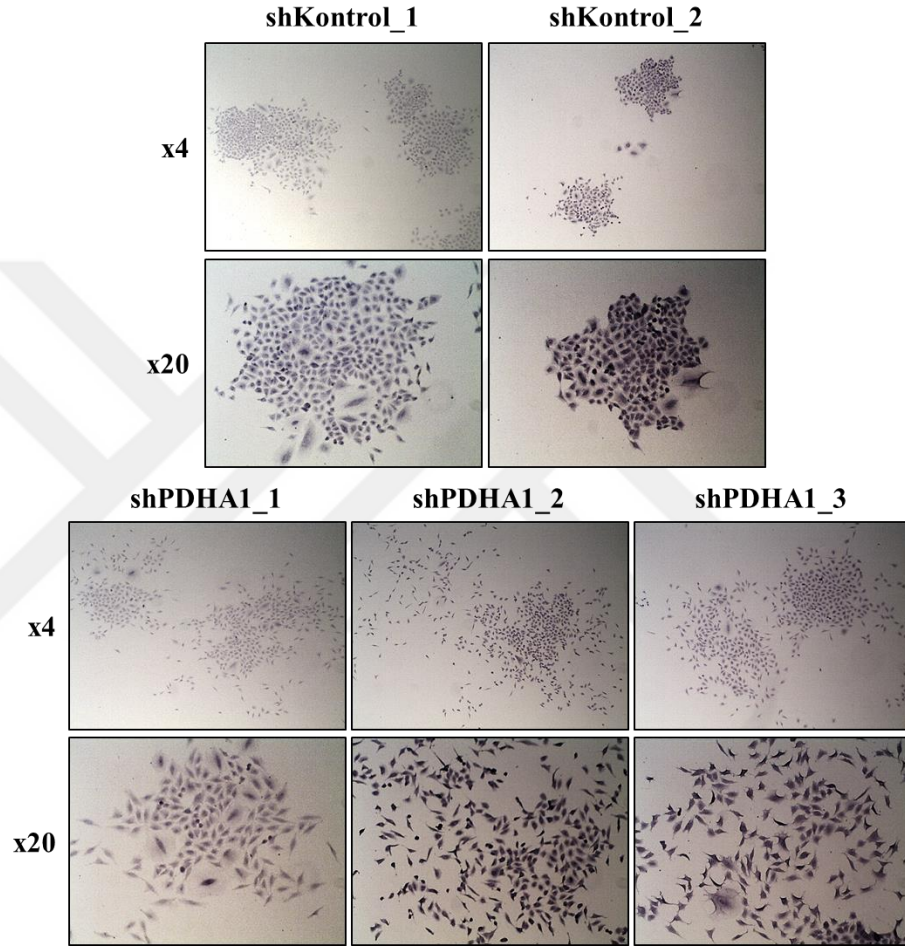
shPDHA1 hücrelerinde, shKontrol hücelere kıyasla, sitoplazma boyunca daha uzun ve yoğun boyanan F-aktin stres iplikleri gözlemlendi (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinde phalloidin boyama görüntüleri (x40)

4.7.3. Koloni Formasyonu

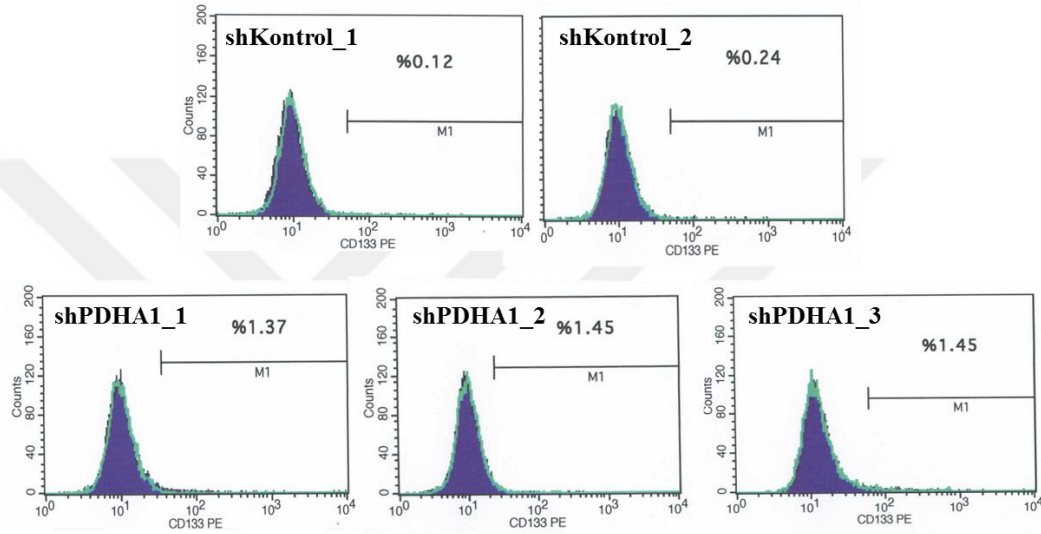
shPDHA1 hücrelerinin oluşturduğu kolonilerde, shKontrol hücelere kıyasla, hücre-hücre bağlantılarının daha zayıf olduğu ve koloniler arası hücrelerin daha fazla olduğu belirlendi. shKontrol hücrelerinin oluşturduğu koloniler daha kompakt ve morfolojileri daha az iğsi gözlemlendi (Şekil 4.28).



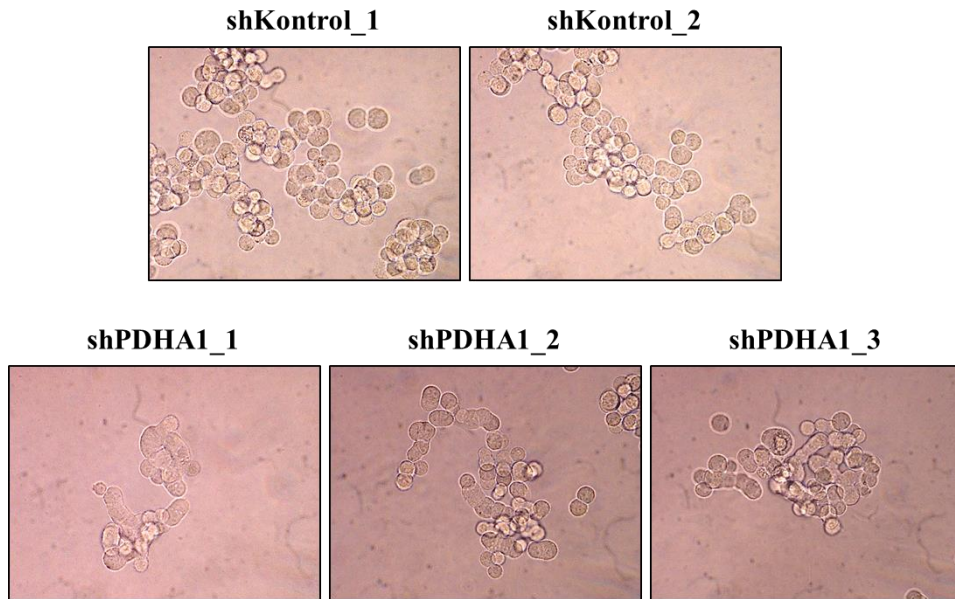
Şekil 4.28. shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinin koloni oluşturma yetenekleri

4.7.4. CD133 Yüzey Belirteci İfadesi ve Yüzey Bağımsız Büyüme

shPDHA1 hücrelerinde, akciğer kanseri kök hücrelerine özgü yüzey belirteçlerinden biri olan CD133⁺ hücre yüzdesinin shKontrol hücrelerine oranla yaklaşık 10 kat arttığı belirlendi (Şekil 4.29). Ayrıca shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinin serum içermeyen koşullar altında yüzey bağımsız büyüme yetenekleri değerlendirildi. Bu koşullar altında kültüre edilen shPDHA1 hücrelerinin 5-7 gün sonra düzgün sınırlı morfolojiye sahip yüzen koloniler oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 4.30).



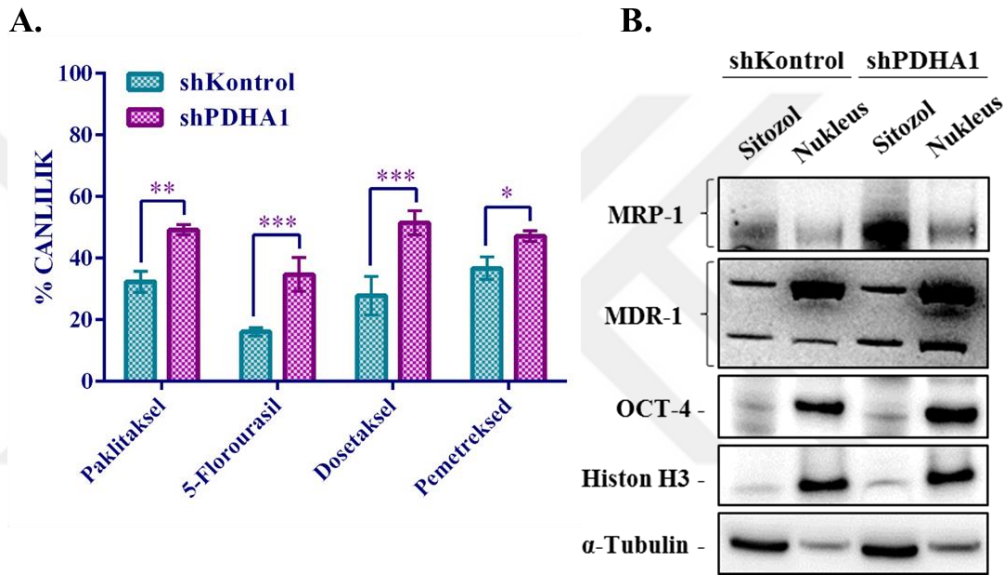
Şekil 4.29. shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinde CD133⁺ altpopulasyonu gösteren akım sitometri histogramları



Şekil 4.30. shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinin yüzey bağımsız koşullarda büyümelerini gösteren mikroskop görüntüleri (x40)

4.7.5. Kemodirenç Bulguları

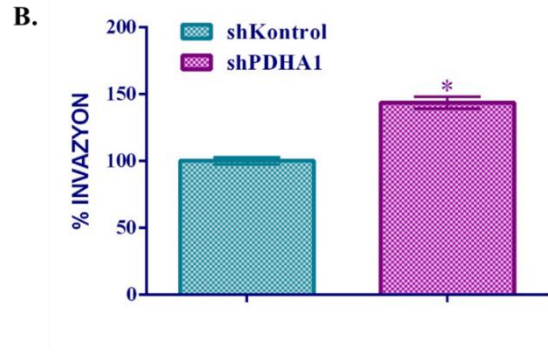
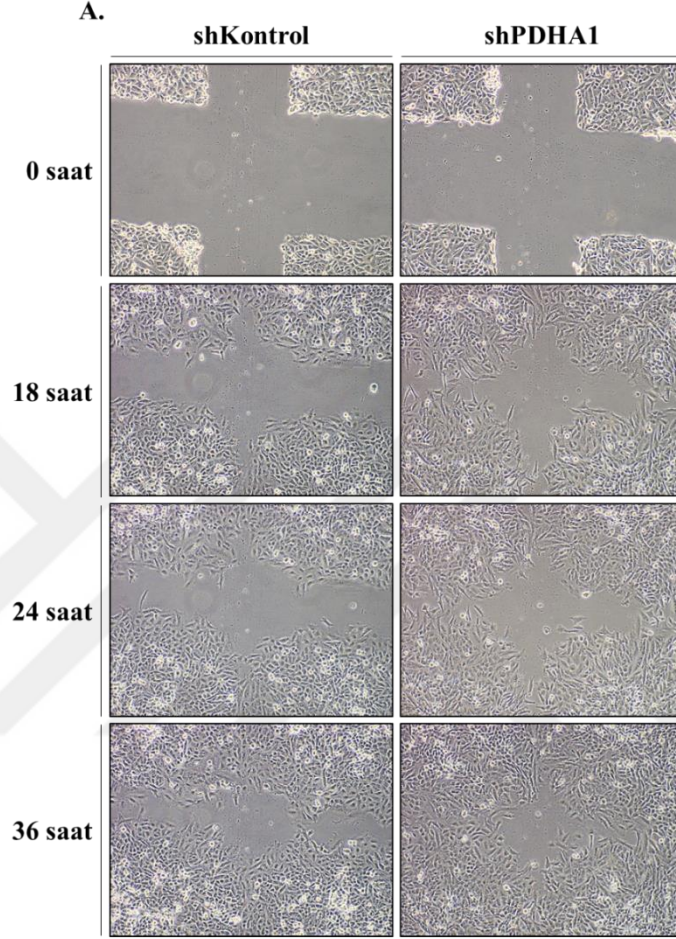
shPDHA1 hücrelerinin paklitaksel (7,9 μ M), 5-florourasil (345,94 μ M), dosetaksel (27,9 μ M) ilaçları ile 48 saatlik ve pemetreksed (2 μ M) kemoterapötik ilacı ile 72 saatlik inkübasyonu sonunda %canlılık değerleri shKontrol hücrelere kıyasla yüksek gözlemlendi (Şekil 4.31A). Çoklu ilaç direnci ile ilişkilendirilen MRP-1 ve MDR-1 protein ifadelerinin de shPDHA1 hücrelerde artmış olduğu belirlendi (Şekil 4.30B). Ayrıca kök hücre benzeri fenotipin sürdürülmesiyle ilişkili olarak Oct-4 protein ifadesi, shPDHA1 hücrelerde artmış bulundu (Şekil 4.31B).



Şekil 4.31. shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinin paklitaksel, 5-florourasil, dosetaksel ile 48 saatlik ve pemetreksed ile 72 saatlik inkübasyon sonunda %canlılığın değişimi (A). shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinde kemodirenç ve kök hücre benzeri fenotip ilişkili proteinlerin ifade düzeylerinde değişimler (B). β -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. *shKontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: $p<0,05$, **: $p<0,001$, ***: $p<0,0001$) ifade etmektedir

4.7.6. Yara İyileşmesi ve İnvazyon Bulguları

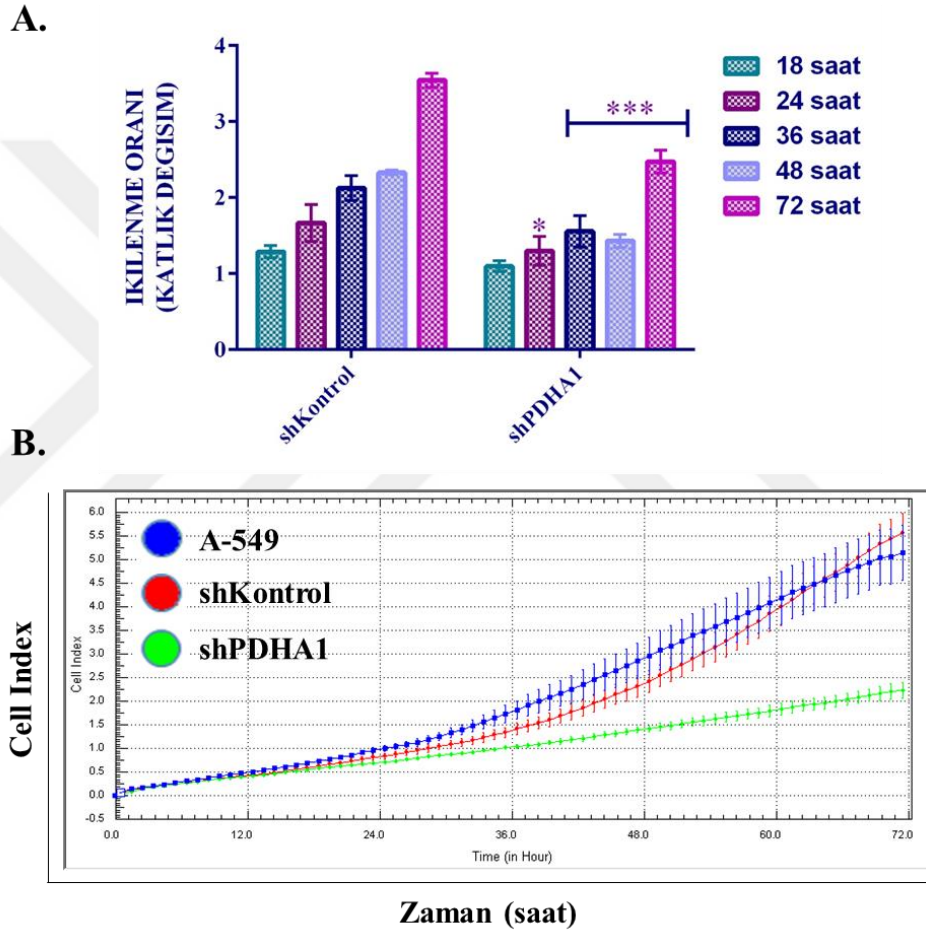
shPDHA1 hücrelerinde yara iyileşmesi ve invazyonun shKontrol hücrelerine kıyasla daha hızlı olduğu gözlemlendi (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinde migrasyon (**A**) ve invazyon (**B**) yeteneği. *shKontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: $p < 0,05$) ifade etmektedir

4.8. PDHA1 Baskılanmasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

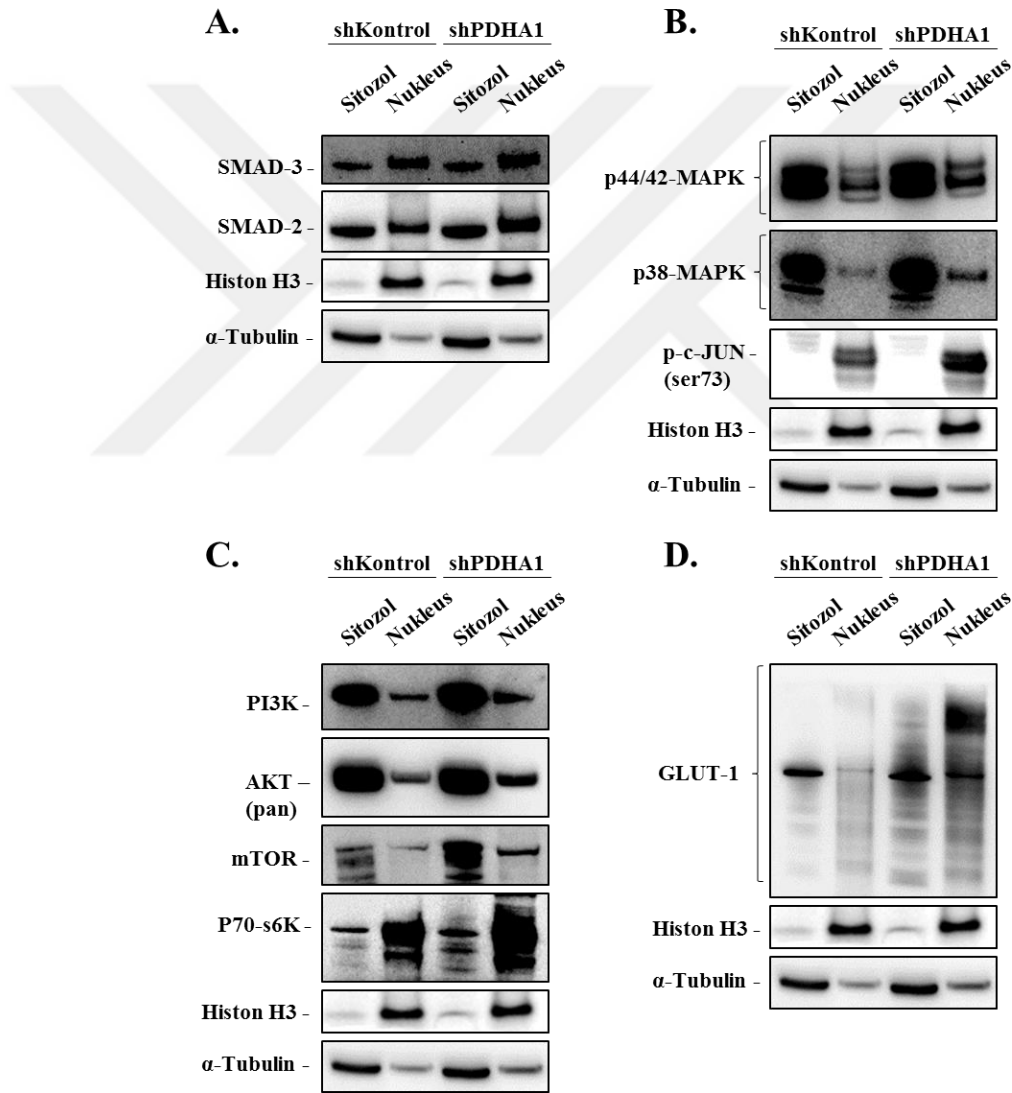
shPDHA1 hücrelerinin ikilenme oranının, shKontrol hücelere kıyasla birim zamanda daha az olduğu belirlendi. ATP yöntemi kullanılarak Tz ve Şekil 4.33'de belirtilen saatlerde alınan ölçümlere göre, shKontrol hücreleri 72 saat sonunda yaklaşık 3,5-4 katlık ikilenme oranına sahipken, shPDHA1 hücrelerinde bu oran 2,5-3 kat olarak belirlendi (Şekil 4.33A). Bu sonuçlar, gerçek zamanlı hücre görüntüleme sistemi ile de doğrulandı (Şekil 4.33B).



Şekil 4.33. shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinde ikilenme oranının ATP yöntemi (**A**) ve gerçek zamanlı hücre görüntüleme sistemi kullanılarak (**B**) 72 saatlik gösterimi. *Aynı zaman dilimi içerisinde shKontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı (*: $p < 0,05$, ***: $p < 0,0001$) ifade etmektedir

4.9. PDHA1 Baskılanmasının Yaşam Yolakları Üzerine Etkisi

TGF- β sinyal iletiminin önemli bileşenleri olan SMAD-2 ve SMAD-3 protein ifadeleri shPDHA1 hücrelerde, shKontrol hücrelerine göre artmış belirlendi (Şekil 4.34A). Benzer şekilde JNK/MAPK, PI3K/AKT/mTOR sinyal iletiminde yer alan proteinlerin ifadelerinin arttığı gözlemlendi (Şekil 4.34B ve Şekil 4.34C). Anaerobik glikolizinin düzenleyicilerinden biri olan GLUT-1 ifadesi de shPDHA1 hücrelerin hem sitozol hem nükleer fraksiyonunda yüksek bulundu (Şekil 4.34D).



Şekil 4.34. shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinde SMAD (A), JNK/MAPK (B) ve PI3K/AKT/mTOR (C) sinyal iletimi ilişkili, GLUT-1 (D) proteinlerinin ifade düzeylerinde değişimler. Histon H3 ve α -Tubulin sırasıyla nükleus ve sitoplazma fraksiyonları için yükleme kontrolü olarak kullanıldı

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Akciğer kanseri dünya çapında en yaygın ve ölümcül kanserlerden biri haline gelmiştir ve metastaz süreci, hastaların yüksek mortalite oranının ana sebebidir (Siegel ve ark 2016). Birincil bölgelerden ayrılma ve kanser hücrelerinin çevreleyen dokulara invazyonu; hücre-hücre adezyonunun kaybı ve motilite ile beraber invazif özelliklerin kazanılmasıyla başlayabilmektedir (Katsuno ve ark 2013). Geçtiğimiz on yıl boyunca, pek çok çalışma verileri EMD'nin birçok epitelyal kaynaklı kanserin invazyonuna ve metastazına katkıda bulunan kritik bir faktör olduğunu göstermiştir. Örneğin, EMD geçirmiş akciğer kanser hücrelerinin daha invazif olduğu ve migrasyon kapasitelerinin arttığı bildirilmiştir (Gu ve ark 2015, Wu ve ark 2016, Wang ve ark 2017).

Enerji üretimi için sitosolik glikoliz kullanımı, büyüyen tümörün biyokütleyi daha hızlı biriktirmesine ve apoptozunu baskılanmasına ve böylece antikanser tedavilere direncin artmasına olanak veren metabolik bir değişikliktir (Hsu ve Sabatini 2018, Vander Heiden ve ark 2009). Ek olarak, artan glikolitik aktivite, yüksek seviyelerde laktik asit üretimine yol açmaktadır. Neticede meydana gelen ekstraselüler mikroçevrenin asidifikasyonu, metallo- ve sistein proteinaz aktivitesinin ve sekresyonunun upregülasyonu yoluyla malign kanser hücrelerinin invazif davranışını arttırmaktadır (Vaupel ve ark 1989, Rozhin ve ark 1994, Martínez-Zaguilán ve ark 1996, Stubbs ve ark 2000). Bu metabolizmanın veya "Warburg etkisi"nin, kısmen solunum metabolizmasındaki bozukluklar veya disfonksiyonlar neticesinde meydana geldiği ve sonuçta ATP üretimi için glikolitik yolun hızlandığı önerilmiştir (Gatenby ve Gillies 2004, Dang ve ark 2009, Christofk ve ark 2008, Garber 2006). Tseng ve ark., bir TCA enzimi olan SDHB ifadesini hepatoselüler karsinom dokuları ve hücrelerinde incelemiş ve sıklıkla düşük gözlemlemişlerdir (Tseng ve ark 2018). Dahası, SDHB'nin azalan ifadesi, ileri tümör evresi ve az sağ kalım oranı ile ilişkilendirilmiştir. SDHB'nin baskılanması enerji metabolizmasını bozarak aerobik solunumdan glikolize değiştirmiş ve araştırmacılar bu durumu "Warburg etkisi" ile sonuçlandığını belirtmişlerdir. Bu duruma ek olarak, artmış hücre proliferasyonu ve motilite, buna karşın azalan $\Delta\psi_m$ rapor edilmiştir. SDHB overekspresyonu ise, metabolizmayı yine deregüle etmiş, hücre büyümesini ve migrasyonunu azaltmıştır. Fare xenograft modelinde, SDHB knockdown hücrelerin subkutanöz implantasyonu ve kuyruk damar enjeksiyonu, daha büyük tümör hacmi ve kanser metastazında artış ile sonuçlanmıştır (Tseng ve ark 2018). Benzer çalışma sitrat sentaz üzerine servikal kanser

hücrelerinde yapılmıştır. Lin ve ark. hücrelerde sitrat sentazı baskıladıklarında, EMD sürecinin bir karakteristiği olan morfolojik değişiklikler meydana geldiğini; hücre proliferasyonunda *in vitro* ve xenograft model kullanarak kanser metastazında artış göstermişlerdir (Lin ve ark 2012). Ayrıca, baskılama sonrasında solunum aktivitesinde bozukluklar ve ATP üretiminde azalma gözlenirken, glikolitik metabolizmada yoğun artış rapor etmişlerdir. Bu malign progresyonun EMD-ilişkili düzenleyicilerin aktivasyonuna; bozulmuş enerji metabolizmasının p53/TIGAR ve SCO2 yollarının deregülasyonuna bağlı olduğunu ifade etmişlerdir (Lin ve ark 2012). Srinivasan ve ark. ETS bileşeni COX'un kanser progresyonuna dair rolünü aydınlatmışlardır. Özofagus ve meme kanseri hücrelerinde COX ifadesini baskıladıklarında, glikolize değişen metabolik bir profil ve artan invazif fenotip göstermişlerdir. Ayrıca COX kompleksinin bozulması, transmembran potansiyeli bozmuş ve Ca²⁺/kalsinörin sinyal iletimini uyarmıştır. Bu sinyal iletiminin gelişimi, PI3K, Akt ve Ca²⁺ duyarlı transkripsiyon faktörlerinin ve TGFβ1 ile MMP16 ifadelerinin artışı barındırdığı gösterilmiştir (Srinivasan ve ark. 2016). Bu çalışmalar, Warburg etkisinin kanser progresyonuna ve mitokondriyal enzimlerdeki değişikliklerin *in vitro* ve *in vivo* doğrudan tümör malignitesine sağladığı katkılara kanıt sağlamaktadır.

Bu kapsamda PDH mitokondri koruyucusu olarak TCA'nın ilk ve en önemli enzimi olup, ATP ve elektron donörlerini üretmek üzere TCA döngüsüne giren piruvatı asetil-CoA'ya dönüştürmektedir. PDH, E1, E2 ve E3 bileşenlerinden oluşmaktadır. E1 tarafından katalizlenen piruvat dekarboksilasyonu hız sınırlandırıcı basamak olarak görülmektedir (Rajagopalan ve ark 2015). E1 altünitesi PDHA1 geni tarafından kodlanmaktadır (Patel ve Korotchkina 2001). PDH'in aktivitesinden sorumlu esas altünite olarak PDHA1, aerobik glikoliz sürecindeki en önemli proteinlerden biri olarak görülmektedir. Dupuy ve ark. PDK1'in etkin bir karaciğer metastazı için gerekli olduğunu ve PDK1 ifadesinin meme kanseri hastalarının karaciğer metastazlarında arttığını ifade etmişlerdir. Hatta karaciğer metastatik meme kanseri hücrelerinin düşük OXPHOS ve buna karşın yüksek glikolitik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak PDK1'in meme kanserinde metabolizma ve metastatik potansiyelin kilit düzenleyicisi olduğunu belirtmişlerdir (Dupuy ve ark 2015). PDHA1'in işlevi hepatoselüler karsinomada çalışılmış; PDHA1 ifadesi hepatoselüler karsinoma dokularında düşük gözlenmiş ve hastaların kötü prognoz gösterdiği belirtilmiştir (Sun ve ark 2018). Ayrıca, PDHA1 overekspresyonu ettirildiğinde,

hücre proliferasyonunun azaldığı ve mitokondriyal apoptotik yolların aktifleştiği rapor edilmiştir (Sun ve ark 2018). Düşük PDHA1 ifadesi özofageal skuamöz hücreli karsinoma ve prostat kanserinde de kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Zhang ve ark 2015, Li ve ark 2016).

Bu tez çalışmasında PDH ile metastaz sürecinde önemli bir aşama olan EMD arasında olası bir ilişkinin varlığının araştırılması amaçlandı. Bu amaçla, ilk aşamada PDH inhibitörü Cpi-613'ün A-549 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde doz yanıtına bakıldı. Cpi-613, yeni bir anti-kanser ajan sınıfının ilki olma yani lipoik asit analoglarının ilk üyesidir ve tümör spesifik bir anti-mitokondriyal enerji metabolizması ajanıdır (Zachar ve ark 2011, Bingham ve Zachar 2012, Stuart ve ark 2014). Cpi-613 ile tedavi sonucunda tümör hücrelerinin metabolizmalarının ve redoks durumlarının bozulduğu rapor edilmiştir (Zachar ve ark 2011, Bingham ve Zachar 2012, Stuart ve ark 2014). Cpi-613'ün etki mekanizmaları arasında (1) PDH'nin PDK'ların aktivasyonu ile E1 α altünitesinin fosforilasyonu akabinde inhibisyonu, (2) α -ketoglutarat dehidrojenaz inhibisyonu yer almaktadır (Lee ve ark 2014). Cpi-613'ün antikanser aktivitesi hücre kültüründe, hayvan modellerinde ve klinik denemelerde rapor edilmiştir (Zachar ve ark 2011, Bingham ve Zachar 2012, Stuart ve ark 2014, Pardee ve ark 2012, Pardee ve ark 2014a, Pardee ve ark 2014b, Lee ve ark 2011, Lee ve ark 2012, Senzer ve ark 2012). Cpi-613 genellikle 3,000 mg/m²'ye kadar olan dozlarda iyi tolere edildiği; solid (Lee ve ark 2011, Lee ve ark 2012, Senzer ve ark 2012) tümörlü ve hematolojik maligniteye sahip hastalarda (Pardee ve ark 2011, Pardee ve ark 2012, Pardee ve ark 2014a) Faz I doz-eskalasyon çalışmasına göre kötü prognoz durumu ve ileri yaşta olan hastalarda kullanılabileceği belirtilmiştir. Güvenlik profili ve antikanser aktiviteleri nedeniyle, Cpi-613 şu anda çeşitli solid tümörlerde ve hematolojik malignitelerde, monoterapi olarak ve başka anti kanser ajanlar ile kombinasyon halinde çok sayıda klinik çalışmada araştırılmaktadır.

Kemik, meme, kolon, böbrek, akciğer, kas, over, pankreas, prostat ve rahim kanseri hücre soyları ile yapılan çalışmada Cpi-613'ün IC₅₀ değerleri 100 μ M-280 μ M aralığında gözlenmiş olup A-549 hücrelerinde 100 μ M olarak ifade edilmiştir. Ayrıca test edilen normal hücrelerin ise Cpi-613'e daha az duyarlı olduğu gösterilmiştir. Küçük hücreli akciğer kanseri hücrelerinin kullanıldığı bir diğer çalışmada, Cpi-613 toksik olmayan

dozlarda kullanılmış (50 μ M, 100 μ M ve 150 μ M) ve topotekan kombinasyonu, hücrelerde sinerjik etkiye neden olmuştur (Lycan ve ark 2016). Bu çalışmada ayrıca, pankreatik karsinom xenograflarında çalışılmış, gemsitabin tedavisine kıyasla Cpi-613'ün tümör büyümesini 2 kat inhibe ettiği, sağ kalımı 4 kat uzattığı ifade edilmiştir (Lycan ve ark 2016). Cpi-613'ün tümör büyümesini *in vivo* inhibe ettiği akciğer kanserinde de gösterilmiştir (Zachar ve ark 2011). Bu tez çalışmasında, 24, 48 ve 72 saatlerde çalışılan tüm dozlarda (6,25-200 μ M) Cpi-613'ün antiproliferatif etkiye neden olduğu gözlemlendi. Seçilen antiproliferatif dozlarda gözlenen az miktardaki p-PDHA1 protein artışı ile beraber PDK4'ün mRNA düzeylerindeki artışı, PDH aktivitesinde Cpi-613 uygulaması sonrası olası bir azalmayı düşündürmüştür. Dolayısıyla, PDH inhibisyonu ile antiproliferatif etkinin varlığı gösterilmiştir. Cpi-613'ün anti-kanser etkisi yani sitotoksitesisi bu çalışmanın konusu olmadığından, PDH aktivitesini baskıladığımızı düşündüğümüz dozlarla yani 6,25 μ M, 12,5 μ M ve 25 μ M ile ileri analizler gerçekleştirildi.

Cpi-613 uygulanan hücrelerde $\Delta\Psi_m$ düşük gözlemlendi. Ancak sağlıklı hücrelerde gözlenen ve J-agregatları olarak adlandırılan turuncu-kırmızı floresans veren kompleksler Cpi-613 uygulanan hücrelerde çok az görülürken, yeşil floresans veren JC-1'in monomerik hali oldukça yoğun gözlemlendi. Nitekim, bir lipoik asit analogu olan bu bileşiğin, kanser hücrelerinde selektif şekilde mitokondriyal metabolizmayı hedeflediği; PDK'ları hedefleyerek PDH'ı inhibe ederek pirüvatın TCA döngüsü gibi mitokondriyal metabolizmaya giremediği gösterilmiştir. Bu çalışmada ayrıca Cpi-613'ün mitokondri membran depolarizasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (Zachar ve ark. 2011).

PDH baskılanmasının, hücrelerde fibroblast-benzeri bir fenotipin yani mezenkimal bir profile geçişe sebep olduğu gözlemlendi. Bu morfolojik değişim, EMD'ye karakteristik olduğundan, bu sürecin belirteçleri analiz edildi ve Cpi-613 uygulanmış hücrelerde epitelyal belirteç e-kaderinin azaldığı, mezenkimal belirteç vimentinin protein düzeyinde arttığı belirlendi. Antiproliferatif etkiyi doğrular şekilde PCNA ifade düzeyi de doza bağlı azalma gösterdi. Smad4 azalışının da, EMD-uyarılması açısından gerekli olduğu düşünülmektedir (Cheng ve ark 2015). Smad4 ifadesinin Cpi-613 uygulaması sonrası doza ve zamana bağlı azaldığı gözlemlendi. EMD sürecinde aktin filamentleri, dramatik bir redistribüsyon göstererek stres liflerini/ipliklerini oluşturur. Bu iplikler phalloidin kullanılarak belirlenebilmektedir (Heldin ve ark. 2009). F-aktin stres ipliklerinin

organizasyonu ve dağılımı ile beraber hücre hareketliliğinin göstergesi protrüzyonların oluşumu, Cpi-613 uygulanan hücrelerde daha parlak, belirgin ve hücre boyunca gözlemlendi. Bu sonuçlar, Cpi-613'ün ya da PDH baskılanmasının A-549 hücrelerinde sitoskelet yeniden düzenlenmesini barındıran EMD fenotipini uyardığını göstermektedir.

Birçok EMD uyarıcı sinyal, hücre tipi veya doku tipine özgü olma eğilimindedir ve muhtemelen birden fazla sinyal yolağı arasındaki işbirliğini gerektirmektedir. TGF- β , Wnt, Notch ve büyüme faktörü reseptörü sinyal iletimleri dahil olmak üzere tüm temel gelişimsel sinyal yollarını EMT programı ile ilişkilendirilmiştir. Bunlar arasında, TGF- β yolağının EMD'nin primer uyarıcısı olduğu görülmektedir (Katsuno ve ark. 2013). A-549 hücrelerinde Cpi-613 uyarılmış EMD sürecinin TGF- β sinyal iletimine bağımlı olup olmadığını test etmek için SB-431542 (TGF- β reseptör inhibitörü) kullanıldı. SB-431542 uygulamasının, Cpi-613 ile azalan canlılıkları arttırdığı ve mezankimal benzeri hücre fenotipini epitelyal benzeri forma dönüştürdüğü gözlemlendi. Ayrıca, Cpi-613 uyarılmış vimentin protein artışı da SB-431542 uygulaması ile azaldı. Sonuç olarak SB-431542 uygulamasının, EMD sürecini tersine çevirdiği belirlendi ve Cpi-613 uyarılan EMD'nin TGF- β sinyal iletimini barındırdığı düşünülmüştür.

EMD geçiren kanser hücrelerinin migrasyon kapasitesi kazandığı ve metastaz yapabildikleri bilinmektedir (Pantel ve Brakenhoff 2004, Steeg 2006, Yang ve Weinberg 2008). EMD belirteçleri gözlemlendiği için Cpi-613 uygulanmış hücrelerin, migrasyon ve invazyon kapasiteleri değerlendirildi. Yara iyileşmesi Cpi-613 uygulanmış hücrelerde daha hızlı gözlemlendiğinden, migrasyon kapasitesinin arttığı sonucuna varıldı. Uyumlu şekilde %invazyon da Cpi-613 uygulanmış hücrelerde yüksek bulundu.

EMD'nin kemodirenci desteklediği bilinmektedir (Du ve Shim 2016). A-549 hücrelerinin Cpi-613 uygulaması sonrası, cisplatin ve doksorubisine karşı sırasıyla yaklaşık 4 ve 7 kat dirençli olduğu belirlendi. Cisplatin ve doksorubisin ile inkübasyon sonunda, geride kalan Cpi-613 uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerin yoğunluğu da bu direnç varlığını doğruladı. Selektif Cox2 inhibitörü celecoxib kullanılan bir çalışmada, akciğer kanseri hücrelerinde EMD uyarılması gözlemlenmiş ve celecoxibin hücre invazyonu ile beraber kemoterapötik direnci arttırdığı gösterilmiştir. Celecoxib'in A-549 hücrelerinde kullanılan 4 μ M ve 8 μ M dozlarında paklitaksel ve cisplatin yanıtı daha düşük rapor

edilmiştir. Çalışmada, son yıllarda NSCLC tedavisinde Cox2 inhibitörlerinin adjuvan terapi şeklinde kullanımının klinik denemelerdeki başarısızlığının araştırıldığı öne sürülmüş; ve gözledikleri MEK/ERK/SNAIL1 yolağı aracılığıyla uyarılan EMD süreci nedeniyle Cox2 inhibitörlerinin klinikte kullanımının yeniden değerlendirilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir.

PDH baskılaması için kullanılan farmakolojik inhibitör Cpi-613'ün "off-target" etkileri olabileceğinden, A-549 hücrelerinde PDHA1 gen ifadesinin baskılanması gerçekleştirildi. PDHA1 ifadesi baskılanmış stabil hücre soylarının eldesi neticesinde, shPDHA1 hücrelerinin morfolojileri iğsi ve uzun yani mezenkimal benzeri gözlenirken, shKontrol hücreler kıyasla daha epitelyal gözlendi. Bu gözlem, shPDHA1 hücrelerde artmış vimentin, α -Sma, N-kaderin ve fibronektin; buna karşın azalan e-kaderin protein ifadelerinin western blot kullanılarak gösterilmesi ile doğrulandı. Ayrıca, shPDHA1 hücrelerinde, shKontrol hücrelere kıyasla, sitoplazma boyunca daha uzun ve yoğun boyanan F-aktin stres iplikleri gözlendi. Sonraki adımda, EMD belirteçlerinin artışının hücrelerin davranışına yansımaları incelendi. shPDHA1 hücreler, shKontrol hücrelere göre daha invazif ve yara iyileşme hızına bakıldığında migrasyon kapasiteleri artmış belirlendi. Koloni oluşturma yetenekleri izlendiğinde, koloni halinde büyüyen shKontrol hücrelere kıyasla shPDHA1 hücreler daha ayrık ve yaygın; muhtelemen artmış migrasyon kapasitelerinden ötürü daha dağınık büyüdükleri gözlendi.

PDHA1 baskılanmasının kemodirenç yaratıp yaratmadığı araştırıldığında, shPDHA1 hücrelerinin paklitaksel, 5-florourasil, dosetaksel ve pemetreksed kemoterapötik ilaçları inkübasyonu sonunda %canlılık değerleri shKontrol hücrelere kıyasla yüksek gözlendi. Bu direncin, çoklu ilaç direnci ile ilişkilendirilen MRP-1'in sitozolde ve MDR-1'in nükleusta shKontrol hücrelere kıyasla daha fazla miktarda bulunmasına bağlı olduğu düşünüldü. Ayrıca kök hücre benzeri fenotipin sürdürülmesiyle ilişkili olarak Oct-4 protein ifadesi, shPDHA1 hücrelerde artmış bulundu. Buradan yola çıkarak, akciğer KKH belirteci olarak görülen CD133 ifadesi (Eramo ve ark. 2008) akım sitometri ile analiz edildi. Buna göre shPDHA1 hücrelerinde, CD133⁺ hücre yüzdesinin shKontrol hücrelerine oranla yaklaşık 10 kat arttığı belirlendi. Ayrıca shKontrol ve shPDHA1 hücrelerinin serum içermeyen koşullar altında yüzey bağımsız büyüme yetenekleri değerlendirildi. Bu koşullar altında kültüre edilen shPDHA1 hücrelerinin 5-7 gün sonra düzgün sınırlı morfolojiye sahip

yüzen koloniler oluşturduğu gözlemlendi. Bu veriler PDHA1 baskılanmasının hücrelere KKH benzeri bir fenotipin kazandırdığını düşündürmüştür. Ayrıca, shPDHA1 hücrelerin proliferasyon oranları yani ikilenme oranları shKontrolle göre kıyasla düşük gözlenmiştir. Nitekim KKH'ler, geçici ve geri dönüşümlü şekilde sessiz ve dormant hale geçerek bu sayede sitotoksik tedavilere direnç gösterip tümör nüksünden sorumlu tutulan yavaş-döngülü hücreler olarak kabul edilmektedir (Pietilä ve ark. 2016). shPDHA1 hücrelerde kanonik ve non-kanonik TGF- β sinyal iletimi varlığı da çeşitli bileşen proteinlerin artmış ifadeleri ile gösterildi. Aktifleşmiş PI3K/Akt/mTOR/p70S6K sinyal iletimi kolorektal kanser hücrelerinde artmış migrasyon ve azalmış e-kaderin ile ilişkilendirilmiştir (Wang ve ark. 2014). Ayrıca, P38 MAPK'ların aktivasyonunun, primer tümördeki hücrelerin EMD geçişlerine, invazyon ve migrasyon yeteneklerinin edinilmesine ve göç eden tümör hücrelerinin ekstrasvazasyonuna katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Koul ve ark. 2013).

Bu tez çalışmasında PDH inhibisyonunun ve/veya PDHA1 ifadesinin baskılanmasının EMD fenotipini uyardığı ve daha da önemlisi kemoterapötik ilaçlara direnç gelişimi ile sonuçlandığı gösterildi. Bulgular doğrultusunda, Cpi-613 veya PDH inhibitörlerinin antikanser terapide kullanılmasının tartışmalı olduğu düşünüldü. Nitekim Cpi-613 klinik denemelerde kullanılmaktadır (<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=cpi613>, 2018). Toplam 22 adet çalışmadan 2 tanesi akciğer kanseri ile alakalı görülmektedir. Bunlardan bir tanesi nüks eden küçük hücreli akciğer kanseri hastaları ile gerçekleştirilen bir çalışma iken (NCT01931787) diğerinde, 3B ve 4. evre küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarında Cpi-613 ve dosetaksel kombinasyonunun denenmesi amaçlanmıştır. Tahmini başlama tarihi haziran 2018 olarak belirtilen çalışma şu an geri çekilmiş görülmektedir (NCT03370159). Bulgularımız her ne kadar Cpi-613'ün klinikte kullanımını tartışmalı hale getirirse de, sitostatik/antiproliferatif ajanların sitotoksik kemoterapötiklerle kullanımı günümüzde pek çok çalışma ile kabul edilen bir tedavi rejimini oluşturmaktadır. Hücre döngüsü, neticesinde hücre bölünmesi olan bir süreçtir ve 4 fazdan meydana gelmektedir. Bunlar G₁, S, G₂ ve M olup, G₁ ve G₂ dinlenme fazları iken, S sentez periyodu, M ise duplike edilen DNA'nın yavru hücrelere dağıtıldığı mitoz sürecidir. Kanser ilaçları sitotoksik ve sitostatik olarak sınıflandırılabilir. Sitotoksik ilaçlar, hücrelere toksik olup onları öldürebilirken, sitostatik ilaçlar hücreleri öldürmezken, döngülerinde onları tutarak çoğalmalarını durdurmaktadır. Sitostatik ilacın konsantrasyonu azaldıkça hücreler tutulmadan çıkarak döngüye devam etmektedirler.

Sitotoksik faz spesifik ilaca örnek olarak Taxol yani paklitaksel verilebilir. Bu ilacın pek çok etki mekanizması bulunmaktadır. Bunlar arasında mitoz inhibisyonu, apoptoz uyarılması ve tümörün radyohassasiyetini arttırması yer almaktadır. Günümüzde paklitaksel tek başına veya diğer ilaçlarla birlikte kullanılmaktadır. Sitostaik ilaca örnek olarak ise Iressa yani gefitinib verilebilir. Gefitinib, EGFR'nin tirozin kinaz domaininin ilk selektif inhibitörüdür. Park ve ark. bu iki ilacın (paklitaksel ve gefitinib) kombinasyonunun gastrik kanser hücrelerinde toksisiteye neden olduğunu belirtmiştir (Park ve ark. 2004). Gefitinib hücre döngüsü progresyonunu 72 saat sonunda G₁ tutulması sağlayarak engellemiştir. Bu yaklaşımların temelinde, kullanılan sitostatik ilacın hücreleri belli bir döngüde tutarken, sitotoksik ilacın tutulana faza spesifik olması neticesinde, tek başlarına kıyasla daha iyi sitotoksikite yani sinerji göstermesi yatmaktadır (Villasana ve ark. 2010). Cpi-613, bu çalışmada kullanılan dozlarda G₂/M fazında tutulmaya sebep olmuştur. Bu faza spesifik ilaçlarla kombinasyon halinde kullanımı, gelecek deney planları arasında yer almaktadır. Ayrıca hem Cpi-613 hem PDHA1 baskılanması ile görülen EMD sürecinin, Warburg etkisi ile olan ilişkisi, bu çalışmanın devamı olarak araştırma konusu şeklinde ele alınacaktır. Nitekim PDHA1 baskılanan hücrelerde GLUT-1 artışı, bu süreçte metabolik değişimin yer alabileceğini düşündürmektedir. PDHA1'in CRISPR-Cas9 yöntemi ile knockout edilerek hem EMD hem KKH-benzeri fenotipin bağlantısının; *in vitro* bulguların *in vivo* modellere taşınarak doğrulanması yine gelecek araştırmaların konuları arasında yer almaktadır.

KAYNAKLAR

- Ahmad, I.M., Aykin-Burns, N., Sim, J.E., Walsh, S.A., Higashikubo, R., Buettner, G.R., Venkataraman, S., Mackey, M.A., Flanagan, S.W., Oberley, L.W., Spitz, D.R. 2005.** Mitochondrial and H₂O₂ mediate glucose deprivation-induced stress in human cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6): 4254-4263.
- Ahmed, S., Tsuchiya, T. 2004.** Novel mechanism of tumorigenesis: Increased transforming growth factor- β 1 suppresses the expression of connexin 43 in BALB/cJ mice after implantation of poly-L-lactic acid. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 70(2): 335-340.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., Clarke, M.F. 2003.** Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7): 3983-3988.
- Alix-Panabières, C., Mader, S., Pantel, K. 2017.** Epithelial-mesenchymal plasticity in circulating tumor cells. *Journal of Molecular Medicine*, 95(2): 133-142.
- Alper, S.L., Chernova, M.N., Stewart, A.K. 2002.** How pH regulates a pH regulator. *Cell biochemistry and biophysics*, 36(2-3): 123-136.
- Altenberg, B.A., Greulich, K.O. 2004.** Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics*, 84(6): 1014-1020.
- Andreopoulou, E., Yang, L. Y., Rangel, K. M., Reuben, J. M., Hsu, L., Krishnamurthy, S., Valero, V., Fritsche, H.A., Cristofanilli, M. 2012.** Comparison of assay methods for detection of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: AdnaGen AdnaTest BreastCancer Select/Detect™ versus Veridex CellSearch™ system. *International journal of cancer*, 130(7): 1590-1597.
- Arsura, M., Panta, G.R., Bilyeu, J.D., Cavin, L.G., Sovak, M.A., Oliver, A.A., Factor, V., Heuchel, R., Mercurio, F., Thorgeirsson, S.S., Sonenshein, G.E. 2003.** Transient activation of NF- κ B through a TAK1/IKK kinase pathway by TGF- β 1 inhibits AP-1/SMAD signaling and apoptosis: implications in liver tumor formation. *Oncogene*, 22(3): 412.
- Astuti, D., Latif, F., Dallol, A., Dahia, P.L., Douglas, F., George, E., Sköldbberg, F., Husebye, E.S., Eng, C., Maher, E.R. 2001.** Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *The American Journal of Human Genetics*, 69(1): 49-54.
- Attanasio, F., Caldieri, G., Giacchetti, G., van Horsen, R., Wieringa, B., Buccione, R. 2011.** Novel invadopodia components revealed by differential proteomic analysis. *European journal of cell biology*, 90(2-3): 115-127.
- Azuma, M., Motegi, K., Aota, K., Yamashita, T., Yoshida, H., Sato, M. 1999.** TGF- β 1 inhibits NF- κ B activity through induction of I κ B- α expression in human salivary gland cells: a possible mechanism of growth suppression by TGF- β 1. *Experimental cell research*, 250(1): 213-222.
- Bacci, M., Giannoni, E., Fearn, A., Ribas, R., Gao, Q., Taddei, M. L., Pintus, G., Dowsett, M., Isacke, C.M., Martin, L.A., Chiarugi, P., Morandi, A. 2016.** miR-155 drives metabolic reprogramming of ER+ breast cancer cells following long-term estrogen deprivation and predicts clinical response to aromatase inhibitors. *Cancer research*, 76(6): 1615-1626.
- Bachelder, R.E., Yoon, S.O., Franci, C., de Herreros, A. G., Mercurio, A.M. 2005.** Glycogen synthase kinase-3 is an endogenous inhibitor of Snail transcription: implications for the epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of cell biology*, 168(1): 29-33.

- Bakin, A.V., Rinehart, C., Tomlinson, A.K., Arteaga, C.L. 2002.** p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGF β -mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J Cell Sci*, 115(15): 3193-3206.
- Bakin, A.V., Tomlinson, A.K., Bhowmick, N.A., Moses, H.L., Arteaga, C.L. 2000.** Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor β -mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47): 36803-36810.
- Bates, R. C., Bellovin, D. I., Brown, C., Maynard, E., Wu, B., Kawakatsu, H., Sheppard, D., Oettgen, P., Mercurio, A.M. 2005.** Transcriptional activation of integrin β 6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *The Journal of clinical investigation*, 115(2): 339-347.
- Battle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J., de Herreros, A.G. 2000.** The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature cell biology*, 2(2): 84.
- Baumann, F., Leukel, P., Doerfelt, A., Beier, C.P., Dettmer, K., Oefner, P.J., Kastenberger, M., Kreutz, M., Nickl-Jockschat, T., Bogdahn, U., Bosserhoff, A.K., Hau, P. 2009.** Lactate promotes glioma migration by TGF- β 2-dependent regulation of matrix metalloproteinase-2. *Neuro-oncology*, 11(4): 368-380.
- Baysal, B. E., Ferrell, R. E., Willett-Brozick, J. E., Lawrence, E. C., Myssiorek, D., Bosch, A., Mey, A., Taschner, P.E.M., Rubinstein, W.S., Myers, E.N., Richard III, C.W., Cornelisse, C.J., Devilee, P., Devlin, B. 2000.** Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science*, 287(5454): 848-851.
- Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M. A., Vidal, M. N. C., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., Vousden, K. H. 2006.** TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*, 126(1): 107-120.
- Bhowmick, N.A., Zent, R., Ghiassi, M., McDonnell, M., Moses, H.L. 2001.** Integrin β 1 signaling is necessary for transforming growth factor- β activation of p38MAPK and epithelial plasticity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50): 46707-46713.
- Bingham, P.M., ve Zachar, Z. 2012.** The pyruvate dehydrogenase complex in cancer: implications for the transformed state and cancer chemotherapy. *In Dehydrogenases*. InTech.
- Bomken, S., Fišer, K., Heidenreich, O., Vormoor, J. 2010.** Understanding the cancer stem cell. *British journal of cancer*, 103(4), 439.
- Bonnet, D., Dick, J.E. 1997.** Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine*, 3(7): 730.
- Bonnet, S., Archer, S. L., Allalunis-Turner, J., Haromy, A., Beaulieu, C., Thompson, R., Lee, C.T., Lopaschuk, G.D., Puttagunta, L., Bonnet, S., Harry, G., Hashimoto, K., Porter, C.J., Andrade, M.A., Thebaud, B., Michelakis, E.D. 2007.** A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer cell*, 11(1): 37-51.
- Bonnomet, A., Brysse, A., Tachsidis, A., Waltham, M., Thompson, E.W., Polette, M., Gilles, C. 2010.** Epithelial-to-mesenchymal transitions and circulating tumor cells. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 15(2): 261-273.
- Bosticardo, M., Ariotti, S., Losana, G., Bernabei, P., Forni, G., Novelli, F. 2001.** Biased activation of human T lymphocytes due to low extracellular pH is antagonized by B7/CD28 costimulation. *European journal of immunology*, 31(9): 2829-2838.

- Bourguignon, L.Y., Singleton, P.A., Diedrich, F., Stern, R., Gilad, E. 2004.** CD44 interaction with Na⁺-H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26): 26991-27007.
- Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L.A., Knuechel, R., Kirchner, T. 2001.** Variable β -catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18): 10356-10361.
- Brabletz, T., Jung, A., Spaderna, S., Hlubek, F., Kirchner, T. 2005.** Migrating cancer stem cells—an integrated concept of malignant tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 5(9): 744.
- Buck, M.R., Karustis, D.G., Day, N.A., Honn, K.V., Sloane, B.F. 1992.** Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochemical Journal*, 282(1): 273-278.
- Bustamante, E., Pedersen, P.L. 1977.** High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(9): 3735-3739.
- Cano, A., Pérez-Moreno, M. A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M. J., del Barrio, M. G., Portillo, F., Nieto, M.A. 2000.** The transcription factor snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature cell biology*, 2(2): 76.
- Carey, L. A., Dees, E. C., Sawyer, L., Gatti, L., Moore, D. T., Collichio, F., Ollila, D.W., Sartor, C.I., Graham, M.L., Perou, C.M. 2007.** The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clinical cancer research*, 13(8): 2329-2334.
- Casas, E., Kim, J., Bendesky, A., Ohno-Machado, L., Wolfe, C.J., Yang, J. 2011.** Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer research*, 71(1): 245-254.
- Chaerkady, R., Harsha, H. C., Nalli, A., Gucek, M., Vivekanandan, P., Akhtar, J., Cole, R.N., Simmers, J., Schulick, R.D., Singh, S., Torbenson, M., Pandey, A., Thuluvath, P.J. 2008.** A quantitative proteomic approach for identification of potential biomarkers in hepatocellular carcinoma. *Journal of proteome research*, 7(10): 4289-4298.
- Chaffer, C. L., Brueckmann, I., Scheel, C., Kaestli, A. J., Wiggins, P. A., Rodrigues, L., Brooks, M., Reinhardt, F., Su, Y., Polyak, K., Arendt, L.M., Kuperwasser, C., Bieri, B., Weinberg, R.A. 2011.** Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(19): 7950-7955.
- Chaffer, C.L., Thompson, E.W., Williams, E.D. 2007.** Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs*, 185(1-3): 7-19.
- Chan, B., VanderLaan, P.A., Sukhatme, V.P. 2013.** 6-Phosphogluconate dehydrogenase regulates tumor cell migration in vitro by regulating receptor tyrosine kinase c-Met. *Biochemical and biophysical research communications*, 439(2): 247-251.
- Cheng, G.Z., Zhang, W., Sun, M., Wang, Q., Coppola, D., Mansour, M., Xu, L.M., Costanzo, C., Cheng, J.Q., Wang, L.H. 2008.** Twist is transcriptionally induced by activation of STAT3 and mediates STAT3 oncogenic function. *Journal of biological chemistry*, 283(21): 14665-14673.

Cheng, H., Fertig, E. J., Ozawa, H., Hatakeyama, H., Howard, J. D., Perez, J., Considine, M., Thakar, M., Ranaweera, R., Kringsfeld, G., Chung, C.H. 2015. Decreased SMAD4 expression is associated with induction of epithelial-to-mesenchymal transition and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer biology & therapy*, 16(8): 1252-1258.

Christiansen, J.J., Rajasekaran, A.K. 2006. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer research*, 66(17): 8319-8326.

Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Harris, M.H., Ramanathan, A., Gerszten, R.E., Wei, R., Fleming, M.D., Schreiber, S.L., Cantley, L.C. 2008. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*, 452(7184): 230.

Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., Maitland, N.J. 2005. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer research*, 65(23): 10946-10951.

Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschuere, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E Mareel M., Huylebroeck, D., van Roy, F. 2001. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Molecular cell*, 7(6): 1267-1278.

Condeelis, J., Segall, J.E. 2003. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nature Reviews Cancer*, 3(12): 921.

Cori, C.A., ve Cori, G.T. 1925. The carbohydrate metabolism of tumours. *J. Biol. Chem*, 65: 397-405.

Dahia, P.L., Ross, K.N., Wright, M.E., Hayashida, C.Y., Santagata, S., Barontini, M., Kung, A.L., Sanso, G., Powers, J.F., Tischler, A.S., Hodin, R., Heitritter, S., Moore, F., Dluhy, R., Sosa, J.A., Ocal, I.T., Benn, D.E., Marsh, D.J., Robinson, B.G., Schneider, K., Garber, J., Arum, S.M., Korbonits, M., Grossman, A., Pigny, P., Toledo, S.P., Nosé, V., Li, C., Stiles, C.D. 2005. A HIF1 α regulatory loop links hypoxia and mitochondrial signals in pheochromocytomas. *PLoS genetics*, 1(1): e8.

Dakubo, G.D. 2010. The Warburg phenomenon and other metabolic alterations of cancer cells. In *Mitochondrial genetics and cancer*. Springer, Berlin, Heidelberg, 39-66.

Dang, L., White, D.W., Gross, S., Bennett, B.D., Bittinger, M.A., Driggers, E.M., Fantin, V.R., Jang, H.G., Jin, S., Keenan, M.C., Marks, K.M., Prins, R.M., Ward, P.S., Yen, K.E., Liao, L.M., Rabinowitz, J.D., Cantley, L.C., Thompson, C.B., Heiden, M.G.V., Su, S.M. 2009. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 462(7274): 739.

Danhier, P., Copetti, T., De Preter, G., Leveque, P., Feron, O., Jordan, B. F., Sonveaux, P., Gallez, B. 2013. Influence of cell detachment on the respiration rate of tumor and endothelial cells. *PLoS One*, 8(1): e53324.

Della Corte, C. M., Bellevicine, C., Vicidomini, G., Vitagliano, D., Malapelle, U., Accardo, M., Fabozzi, A., Fiorelli, A., Fasano, M., Papaccio, F., Martinelli, E., Troiani, T., Troncone, G., Santini, M., Bianco, R., Ciardiello, F., Morgillo, F. 2015. SMO gene amplification and activation of the hedgehog pathway as novel mechanisms of resistance to anti-epidermal growth factor receptor drugs in human lung cancer. *Clinical cancer research*, 21(20): 4686-4697.

Devic, S. 2016. Warburg effect-a consequence or the cause of carcinogenesis?. *Journal of Cancer*, 7(7): 817.

Dhup, S., Kumar Dadhich, R., Ettore Porporato, P., Sonveaux, P. 2012. Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Current pharmaceutical design*, 18(10): 1319-1330.

Dimmer, K.S., Friedrich, B., Florian, L.A.N.G., Deitmer, J.W., Bröer, S. 2000. The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochemical Journal*, 350(1): 219-227.

Dong, C., Yuan, T., Wu, Y., Wang, Y., Fan, T. W., Miriyala, S., Lin, Y., Yao, J., Shi, J., Kang, T., Lorkiewicz, P., St Clair, D., Hung, M.C., Evers, B.M., Zhou, B.P. 2013. Loss of FBP1 by Snail-mediated repression provides metabolic advantages in basal-like breast cancer. *Cancer cell*, 23(3): 316-331.

Donowitz, M., Tse, C.M., Fuster, D. 2013. SLC9/NHE gene family, a plasma membrane and organellar family of Na⁺/H⁺ exchangers. *Molecular aspects of medicine*, 34(2-3): 236-251.

Du, B., Shim, J.S. 2016. Targeting epithelial–mesenchymal transition (EMT) to overcome drug resistance in cancer. *Molecules*, 21(7): 965.

Du, S., Guan, Z., Hao, L., Song, Y., Wang, L., Gong, L., Liu, L., Qi, X., Hou, Z., Shao, S. 2014. Fructose-bisphosphate aldolase a is a potential metastasis-associated marker of lung squamous cell carcinoma and promotes lung cell tumorigenesis and migration. *PLoS one*, 9(1): e85804.

Duivenvoorden, W.C., Hirte, H.W., Singh, G. 1999. Transforming growth factor β 1 acts as an inducer of matrix metalloproteinase expression and activity in human bone-metastasizing cancer cells. *Clinical & experimental metastasis*, 17(1): 33-42.

Dupuy, F., Tabaries, S., Andrzejewski, S., Dong, Z., Blagih, J., Annis, M.G., Omeroglu, A., Gao, D., Leung, S., Amir, E., Clemons, M., Aquilar-Mahecha, A., Basik, M., Vincent, E.E., St-Pierre, J., Jones, R.G., Siegel, P.M. 2015. PDK1-Dependent Metabolic Reprogramming Dictates Metastatic Potential in Breast Cancer. *Cell Metab*, 22(4):577-589.

Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., Miyazono, K. 2001. Smurf1 interacts with transforming growth factor- β type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(16): 12477-12480.

Eckert, M.A., Lwin, T.M., Chang, A.T., Kim, J., Danis, E., Ohno-Machado, L., Yang, J. 2011. Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis. *Cancer cell*, 19(3): 372-386.

Eger, A., Aigner, K., Sonderegger, S., Dampier, B., Oehler, S., Schreiber, M., Berx, G., Cano, A., Beug, H., Foisner, R. 2005. DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene*, 24(14): 2375.

Engelman, J.A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J.O., Lindeman, N., Gale, C.M., Zhao, X., Christensen, J., Kosaka, T., Holmes, A.J., Rogers, A.M., Cappuzzo, F., Mok, T., Lee, C., Johnson, B.E., Cantley, L.C., Jänne, P.A., Kosaka, T. 2007. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*, 316(5827): 1039-1043.

Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Pillozzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C., De Maria, R. 2008. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell death and differentiation*, 15(3): 504.

Fang, D., Nguyen, T.K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, A.N., Hotz, S., Van Belle, P.A., Xu, X., Elder, D.E., Herlyn, M. 2005. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer research*, 65(20): 9328-9337.

- Fang, X., Cai, Y., Liu, J., Wang, Z., Wu, Q., Zhang, Z., Yang, C.J., Yuan, L., Ouyang, G. 2011.** Twist2 contributes to breast cancer progression by promoting an epithelial–mesenchymal transition and cancer stem-like cell self-renewal. *Oncogene*, 30(47): 4707.
- Feng, X.H., Derynck, R. 2005.** Specificity and versatility in TGF- β signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21: 659-693.
- Ferreira, L.M. 2010.** Cancer metabolism: the Warburg effect today. *Experimental and molecular pathology*, 89(3): 372-380.
- Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Gottfried, E., Schwarz, S., Rothe, G., Hoves, S., Renner, K., Timischl, B., Mackensen, A., Kunz-Schughart, L., Andreesen, R., Krause, S.W., Kreutz, M. 2007.** Inhibitory effect of tumor cell–derived lactic acid on human T cells. *Blood*, 109(9): 3812-3819.
- Fonseca, L.M.D., Silva, V.A.D., Freire-de-Lima, L., Previato, J.O., Mendonça-Previato, L., Capella, M.A.M. 2016.** Glycosylation in Cancer: interplay between Multidrug Resistance and epithelial-to-Mesenchymal Transition?. *Frontiers in oncology*, 6: 158.
- Fox, J.E.M., Meredith, D., Halestrap, A.P. 2000.** Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 529(2): 285-293.
- Fu, Q.F., Liu, Y., Fan, Y., Hua, S.N., Qu, H.Y., Dong, S.W., Li, R.L., Zhao, M.Y., Zhen, Y., Yu, X.L., Chen, Y.Y., Luo, R.C., Li, R., Li, L.B., Deng, X.J., Fang, W.Y., Liu, Z., Song, X. 2015.** Alpha-enolase promotes cell glycolysis, growth, migration, and invasion in non-small cell lung cancer through FAK-mediated PI3K/AKT pathway. *Journal of hematology & oncology*, 8(1): 22.
- Fukumura, D., Xu, L., Chen, Y., Gohongi, T., Seed, B., Jain, R.K. 2001.** Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer research*, 61(16): 6020-6024.
- Gallagher, S.M., Castorino, J.J., Wang, D., Philp, N.J. 2007.** 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*, 67(9): 4182-4189.
- Gallihier, A. J., Schiemann, W.P. 2006.** β 3 Integrin and Src facilitate transforming growth factor- β mediated induction of epithelial-mesenchymal transition in mammary epithelial cells. *Breast cancer research*, 8(4): R42.
- Gallihier, A. J., Schiemann, W.P. 2007.** Src phosphorylates Tyr284 in TGF- β type II receptor and regulates TGF- β stimulation of p38 MAPK during breast cancer cell proliferation and invasion. *Cancer research*, 67(8): 3752-3758.
- Gallihier, A.J., Neil, J.R., Schiemann, W.P. 2006.** Role of transforming growth factor- β in cancer progression. 743-763.
- Gallihier-Beckley, A.J., Schiemann, W.P. 2008.** Grb2 binding to Tyr284 in T β R-II is essential for mammary tumor growth and metastasis stimulated by TGF- β . *Carcinogenesis*, 29(2): 244-251.
- Garber, K. 2006.** Energy deregulation: licensing tumors to grow. *Science*, 312: 1158–1159.
- Gatenby, R., ve Gillies, R. 2004.** Why do cancers have high aerobic glycolysis?. *Nat. Rev. Cancer*, 4(11): 891-899.
- Geiger, T.R., Peeper, D.S. 2009.** Metastasis mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1796(2): 293-308.

- Gibbs, C.P., Kukekov, V.G., Reith, J.D., Tchigrinova, O., Suslov, O.N., Scott, E.W., Ghivizzani, S.C., Ignatova, T.N., Steindler, D.A. 2005.** Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia*, 7(11): 967-976.
- Gilles, C., Newgreen, D.F., Sato, H., Thompson, E.W. 2005.** Matrix Metalloproteases and Epithelial-to-Mesenchymal Transition. In *Rise and Fall of Epithelial Phenotype* (pp. 297-315). Springer, Boston, MA.
- Gordan, J.D., Thompson, C.B., Simon, M.C. 2007.** HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer cell*, 12(2): 108-113.
- Graff, J.R., Herman, J.G., Lapidus, R.G., Chopra, H., Xu, R., Jarrard, D.F., Isaacs, W.B., Pitha, P.M., Davidson, N.E., Baylin, S.B. 1995.** E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer research*, 55(22): 5195-5199.
- Gu, K., Li, M.M., Shen, J., Liu, F., Cao, J.Y., Jin, S., Yu, Y. 2015.** Interleukin-17-induced EMT promotes lung cancer cell migration and invasion via NF- κ B/ZEB1 signal pathway. *American journal of cancer research*, 5(3), 1169.
- Hajra, K.M., Chen, D.Y., Fearon, E.R. 2002.** The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer research*, 62(6): 1613-1618.
- Hamabe, A., Konno, M., Tanuma, N., Shima, H., Tsunekuni, K., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J, Mimori, K., Gotoh, N., Yamamoto, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. 2014.** Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial–mesenchymal transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(43): 15526-15531.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. 2011.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646-674.
- Hanover, J.A., Krause, M.W., Love, D.C. 2012.** Bittersweet memories: linking metabolism to epigenetics through O-GlcNAcylation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(5): 312.
- Haraguchi, M., Okubo, T., Miyashita, Y., Miyamoto, Y., Hayashi, M., Crotti, T.N., McHugh K.P, Ozawa, M. 2008.** Snail regulates cell-matrix adhesion by regulation of the expression of integrins and basement membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 283(35): 23514-23523.
- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y. Y., Grinnell, B. W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A.Jr., Wrana, J.L., Falb, D. 1997.** The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF β receptor and functions as an antagonist of TGF β signaling. *Cell*, 89(7): 1165-1173.
- Heerboth, S., Housman, G., Leary, M., Longacre, M., Byler, S., Lapinska, K., Willbanks, A., Sarkar, S. 2015.** EMT and tumor metastasis. *Clinical and Translational Medicine*, 4:6.
- Heldin, C.H., Landström, M., Moustakas, A. 2009.** Mechanism of TGF- β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial–mesenchymal transition. *Current opinion in cell biology*, 21(2): 166-176.
- Herranz, N., Pasini, D., Díaz, V.M., Francí, C., Gutierrez, A., Dave, N., Escrivà, M., Hernandez-Muñoz, I., Di Croce, L., Helin, K., García de Herreros, A., Peiró, S. 2008.** Polycomb complex 2 is required for E-cadherin repression by the Snail1 transcription factor. *Molecular and cellular biology*, 28(15): 4772-4781.
- Hocevar, B.A., Smine, A., Xu, X.X., Howe, P.H. 2001.** The adaptor molecule Disabled-2 links the transforming growth factor β receptors to the Smad pathway. *The EMBO journal*, 20(11): 2789-2801.

- Hollier, B.G., Evans, K., Mani, S. A. 2009.** The epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells: a coalition against cancer therapies. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 14(1): 29-43.
- Horowitz, J.C., Rogers, D.S., Sharma, V., Vittal, R., White, E.S., Cui, Z., Thannickal, V. J. 2007.** Combinatorial activation of FAK and AKT by transforming growth factor- β 1 confers an anoikis-resistant phenotype to myofibroblasts. *Cellular signalling*, 19(4): 761-771.
- Hsu, D.S.S., Lan, H.Y., Huang, C.H., Tai, S.K., Chang, S.Y., Tsai, T.L., Chang, C.C., Tzeng, C.H., Wu, K.J., Kao, J.Y., Yang, M.H. 2010.** Regulation of excision repair cross-complementation group 1 by Snail contributes to cisplatin resistance in head and neck cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(18): 4561-4571.
- Hsu, P.P., Sabatini, D.M. 2008.** Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, 134(5): 703-707.
- Hu, C.J., Sataur, A., Wang, L., Chen, H., Simon, M.C. 2007.** The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α . *Molecular biology of the cell*, 18(11): 4528-4542.
- Huang, R., Zong, X. 2017.** Aberrant cancer metabolism in epithelial–mesenchymal transition and cancer metastasis: Mechanisms in cancer progression. *Critical reviews in oncology/hematology*, 115: 13-22.
- Izumi, H., Takahashi, M., Uramoto, H., Nakayama, Y., Oyama, T., Wang, K.Y., Sasaguri, Y., Nishizawa, S., Kohno, K. 2011.** Monocarboxylate transporters 1 and 4 are involved in the invasion activity of human lung cancer cells. *Cancer science*, 102(5): 1007-1013.
- Jeoung, N.H., Wu, P., Joshi, M.A., Jaskiewicz, J., Bock, C.B., Depaoli-Roach, A.A., Harris, R.A. 2006.** Role of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 (PDHK4) in glucose homeostasis during starvation. *Biochemical Journal*, 397(3): 417-425.
- Jiang, B.H., Agani, F., Passaniti, A., Semenza, G.L. 1997.** V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer research*, 57(23): 5328-5335.
- Jose, C., Bellance, N., Rossignol, R. 2011.** Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(6): 552-561.
- Kaelin, W.G. 2006.** The von Hippel-lindau Tumor Suppressor Gene: Roles in Cancer and Oxygen Sensing. *Toxicologic Pathology*, 34(7): 990.
- Kai, K., Arima, Y., Kamiya, T., Saya, H. 2010.** Breast cancer stem cells. *Breast Cancer*, 17(2): 80-85.
- Kakarala, M., Wicha, M.S. 2008.** Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(17): 2813.
- Kalluri, R. 2009.** EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *The Journal of clinical investigation*, 119(6): 1417-1419.
- Kalluri, R., Weinberg, R.A. 2009.** The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*, 119(6): 1420-1428.
- Kanai, Y., Ushijima, S., Hui, A. M., Ochiai, A., Tsuda, H., Sakamoto, M., Hirohashi, S. 1997.** The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human hepatocellular carcinomas. *International journal of cancer*, 71(3): 355-359.

- Kato, Y., Lambert, C.A., Colige, A.C., Mineur, P., Noël, A., Frankenne, F., Foidart, J.M., Baba, M., Hata, R., Miyazaki, K., Tsukuda, M. 2005.** Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12): 10938-10944.
- Kato, Y., Ozawa, S., Tsukuda, M., Kubota, E., Miyazaki, K., St-Pierre, Y., Hata, R. I. 2007.** Acidic extracellular pH increases calcium influx-triggered phospholipase D activity along with acidic sphingomyelinase activation to induce matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma. *The FEBS journal*, 274(12): 3171-3183.
- Katsuno, Y., Lamouille, S., Derynck, R. 2013.** TGF-beta signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Curr Opin Oncol*, 25(1): 76–84.
- Katsuno, Y., Lamouille, S., Derynck, R. 2013.** TGF-β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression. *Current opinion in oncology*, 25(1): 76-84.
- Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., Wrana, J.L. 2000.** Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGFβ receptor for degradation. *Molecular cell*, 6(6): 1365-1375.
- Kellum, J.A., Song, M., Li, J. 2004.** Science review: extracellular acidosis and the immune response: clinical and physiologic implications. *Critical care*, 8(5): 331.
- Kim, D.W., Sovak, M.A., Zanieski, G., Nonet, G., Romieu-Mourez, R., Lau, A.W., Hafer, L.J., Yaswen, P., Stampfer, M., Rogers, A.E., Russo, J., Sonenshein, G.E. 2000.** Activation of NF-κB/Rel occurs early during neoplastic transformation of mammary cells. *Carcinogenesis*, 21(5): 871-879.
- Kim, E.S., Kim, M.S., Moon, A. 2005.** Transforming growth factor (TGF)-β in conjunction with H-ras activation promotes malignant progression of MCF10A breast epithelial cells. *Cytokine*, 29(2): 84-91.
- Kim, E.S., Sohn, Y.W., Moon, A. 2007.** TGF-β-induced transcriptional activation of MMP-2 is mediated by activating transcription factor (ATF) 2 in human breast epithelial cells. *Cancer letters*, 252(1): 147-156.
- Kim, H.H., Joo, H., Kim, T.H., Kim, E.Y., Park, S.J., Park, J.K., Kim, H.J. 2009.** The mitochondrial Warburg effect: a cancer enigma. *Interdisciplinary Bio Central*, 1(2): 7-1.
- Kim, J.W., Dang, C.V. 2005.** Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends in biochemical sciences*, 30(3): 142-150.
- Kim, J.W., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., Dang, C.V. 2006.** HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell metabolism*, 3(3): 177-185.
- Kim, K.K., Kugler, M.C., Wolters, P.J., Robillard, L., Galvez, M.G., Brumwell, A.N., Sheppard, D., Chapman, H.A. 2006.** Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35): 13180-13185.
- Klein, A., Chan, A.L., Caplan, B.U., Malkin, A. 1990.** NADP+ reduction by human lymphocytes. *Clinical & Experimental Immunology*, 82(1): 170-173.
- Klein, M., Seeger, P., Schuricht, B., Alper, S.L., Schwab, A. 2000.** Polarization of Na⁺/H⁺ and Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers in migrating renal epithelial cells. *The Journal of general physiology*, 115(5): 599-608.

- Klymkowsky, M.W., Savagner, P. 2009.** Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *The American journal of pathology*, 174(5): 1588-1593.
- Kondaveeti, Y., Reed, I.K.G., White, B.A. 2015.** Epithelial–mesenchymal transition induces similar metabolic alterations in two independent breast cancer cell lines. *Cancer letters*, 364(1): 44-58.
- Kondoh, H., Leonart, M.E., Bernard, D., Gii, J. 2007.** Protection from oxidative stress by enhanced glycolysis; a possible mechanism of cellular immortalization. *Histology and histopathology*, 22(1/3): 85.
- Koppenol, W.H., Bounds, P.L., Dang, C.V. 2011.** Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*, 11(5): 325–337.
- Koul, H.K., Pal, M., Koul, S. 2013.** Role of p38 MAP kinase signal transduction in solid tumors. *Genes & cancer*, 4(9-10): 342-359.
- Krivtsov, A. V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M. C., Wang, Y., Faber, J., Levine, J.E., Wang, J., Hahn, W.C., Gilliland, D.G., Golub, T.R., Armstrong, S.A. 2006.** Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL–AF9. *Nature*, 442(7104): 818.
- Krockenberger, M., Honig, A., Rieger, L., Coy, J. F., Sutterlin, M., Kapp, M., Horn, E., Dietl, J., Kammerer, U. 2007.** Transketolase-like 1 expression correlates with subtypes of ovarian cancer and the presence of distant metastases. *International Journal of Gynecological Cancer*, 17(1): 101-106.
- Książkiewicz, M., Markiewicz, A., Żaczek, A.J. 2012.** Epithelial-mesenchymal transition: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells. *Pathobiology*, 79(4): 195-208.
- Kumar, A., Kant, S., Singh, S.M. 2012.** Novel molecular mechanisms of antitumor action of dichloroacetate against T cell lymphoma: Implication of altered glucose metabolism, pH homeostasis and cell survival regulation. *Chemico-biological interactions*, 199(1): 29-37.
- Kuo, Y.C., Su, C.H., Liu, C.Y., Chen, T.H., Chen, C.P., Wang, H.S. 2009.** Transforming growth factor- β induces CD44 cleavage that promotes migration of MDA-MB-435s cells through the up-regulation of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *International journal of cancer*, 124(11): 2568-2576.
- Kwon, H. S., Harris, R.A. 2004.** Mechanisms responsible for regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 gene expression. *Advances in enzyme regulation*, 44(1): 109-121.
- Lagana, A., Vадnais, J., Le, P.U., Nguyen, T.N., Laprade, R., Nabi, I.R., Noel, J. 2000.** Regulation of the formation of tumor cell pseudopodia by the Na (+)/H (+) exchanger NHE1. *Journal of cell science*, 113(20): 3649-3662.
- Lamouille, S., Derynck, R. 2007.** Cell size and invasion in TGF- β –induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. *The Journal of cell biology*, 178(3): 437-451.
- Langbein, S., Frederiks, W.M., zur Hausen, A., Popa, J., Lehmann, J., Weiss, C., Alken, P., Coy, J.F. 2008.** Metastasis is promoted by a bioenergetic switch: new targets for progressive renal cell cancer. *International journal of cancer*, 122(11): 2422-2428.
- Langbein, S., Zerilli, M., Zur Hausen, A., Staiger, W., Rensch-Boschert, K., Lukan, N., Popa, J., Ternullo, M.P., Steidler, A., Weiss, C., Grobholz, R., Willeke, F., Alken, P., Stassi, G., Schubert, P., Coy, J.F. 2006.** Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted. *British journal of cancer*, 94(4): 578.

- Lardner, A. 2001.** The effects of extracellular pH on immune function. *Journal of leukocyte biology*, 69(4): 522-530.
- Larue, L., Bellacosa, A. 2005.** Epithelial–mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene*, 24(50): 7443.
- Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P. C., Semenza, G.L. 2001.** HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Molecular and cellular biology*, 21(12): 3995-4004.
- Lazo, P.A. 1981.** Amino-acids and glucose-utilization by different metabolic pathways in ascites-tumor cells. *The FEBS Journal*, 117(1): 19-25.
- Leclerc, D., Pham, D.N.T., Levesque, N., Truongcao, M., Foulkes, W.D., Sapienza, C., Rozen, R. 2017.** Oncogenic role of PDK4 in human colon cancer cells. *British journal of cancer*, 116(7): 930.
- Lee, G.H., Yan, C., Shin, S.J., Hong, S.C., Ahn, T., Moon, A., Park, S.J., Lee, Y.C., Yoo, W.H., Kim, H.T., Kim, D.S., Chae, S.W., Kim, H.R., Chae, H.J. 2010.** BAX inhibitor-1 enhances cancer metastasis by altering glucose metabolism and activating the sodium-hydrogen exchanger: the alteration of mitochondrial function. *Oncogene*, 29(14): 2130.
- Lee, K., Khaira, D., Rodriguez, R., Maturo, C., O'Donnell, K., Shorr, R. 2011.** Long-term stable disease of stage IV pancreatic neuroendocrine tumors and without significant adverse effect by CPI-613, an investigational novel anti-cancer agent. *Case Study and Case Report*, 1(3): 137-145.
- Lee, K., Maturo, C., Luddy, J., Rodriguez, R., Shorr, R., Shorr, R. 2012.** Pseudo-progression of metastatic pancreatic cancer assessed by imaging studies-a case report. *Case Study and Case Report*, 2(3): 95-101.
- Lee, K.C., Maturo, C., Perera, C.N., Luddy, J., Rodriguez, R., Shorr, R. 2014.** Translational assessment of mitochondrial dysfunction of pancreatic cancer from in vitro gene microarray and animal efficacy studies, to early clinical studies, via the novel tumor-specific anti-mitochondrial agent, CPI-613. *Annals of translational medicine*, 2(9).
- Lee, S.Y., Jeon, H.M., Ju, M.K., Jeong, E.K., Kim, C.H., Yoo, M., Park, H.G., Han, S.I., Kang, H.S. 2015.** Dlx-2 is implicated in TGF- β -and Wnt-induced epithelial-mesenchymal, glycolytic switch, and mitochondrial repression by Snail activation. *International journal of oncology*, 46(4): 1768-1780.
- Lester, R.D., Jo, M., Montel, V., Takimoto, S., Gonias, S.L. 2007.** uPAR induces epithelial–mesenchymal transition in hypoxic breast cancer cells. *The Journal of cell biology*, 178(3): 425-436.
- Li, C. W., Xia, W., Huo, L., Lim, S. O., Wu, Y., Hsu, J.L., Chao, C.H., Yamaguchi, H., Yang, N.K., Ding, Q., Wang, Y., Lai, Y.J., LaBaff, A.M., Wu, T.J., Lin, B.R., Yang, M.H., Hortobagyi, G.N., Hung, M.C. 2012.** Epithelial–mesenchymal transition induced by TNF- α requires NF- κ B-mediated transcriptional upregulation of Twist1. *Cancer research*, 72(5): 1290-1300.
- Li, Y., Li, X., Li, X., Zhong, Y., Ji, Y., Yu, D., Zhang, M., Wen, J.G., Zhang, H., Goscinski, M.A., Nesland, J.M., Suo, Z. 2016.** PDHA1 gene knockout in prostate cancer cells results in metabolic reprogramming towards greater glutamine dependence. *Oncotarget*, 7(33):53837-53852.
- Li, Y., Welm, B., Podsypanina, K., Huang, S., Chamorro, M., Zhang, X., Rowlands, T., Egeblad, M., Cowin, P., Werb, Z., Tan, L.K., Rosen, J.M., Varmus, H.E. 2003.** Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway

preferentially induce mammary cancers from progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(26): 15853-15858.

Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K. R., André, F., Tordai, A., Mejia, J. A., Symmans, W.F., Gonzalez-Angulo, A.M., Hennessy, B., Green, M., Cristofanilli, M., Hortobagyi, G.N., Pusztai, L. 2008. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 26(8): 1275-1281.

Lin, C.C., Cheng, T.L., Tsai, W.H., Tsai, H.J., Hu, K.H., Chang, H.C., Yeh, C.W., Chen, Y.C., Liao, C.C., Chang, W.T. 2012. Loss of the respiratory enzyme citrate synthase directly links the Warburg effect to tumor malignancy. *Scientific reports*, 2: 785.

Linn, T.C., Pettit, F.H., Reed, L.J. 1969. α -Keto acid dehydrogenase complexes, X. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex from beef kidney mitochondria by phosphorylation and dephosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 62(1): 234-241.

Lo, H.W., Hsu, S.C., Xia, W., Cao, X., Shih, J.Y., Wei, Y., Abbruzzese, J.L., Hortobagyi, G.N., Hung, M.C. 2007. Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer research*, 67(19): 9066-9076.

López-Ríos, F., Sánchez-Aragó, M., García-García, E., Ortega, Á. D., Berrendero, J.R., Pozo-Rodríguez, F., López-Encuentra, A., Ballestín, C.,mCuezva, J.M. 2007. Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer research*, 67(19): 9013-9017.

Lu, C.W., Lin, S.C., Chen, K.F., Lai, Y.Y., Tsai, S.J. 2008. Induction of Pyruvate Dehydrogenase Kinase-3 by Hypoxia-Inducible Factor-1 Promotes Metabolic Switch and Drug Resistance. *J.biol. chem*, 283(42): 28106-28114.

Lu, H., Dalgard, C.L., Mohyeldin, A., McFate, T., Tait, A.S., Verma, A. 2005. Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1. *Journal of Biological Chemistry*, 280(51): 41928-41939.

Luo, M., Davis, A., McDermott, S., Jiagge, E., Brooks, M., Gheordunescu, E., Spitz, D.R., Conley, S., Clouthier, S.G., Luther, T., Wicha, M.S. 2015. Targeting EMT and MET breast cancer stem cell states through simultaneous inhibition of glycolytic and antioxidant pathways. *Cancer Res*, (15): 2311.

Lycan, T. W., Pardee, T. S., Petty, W. J., Bonomi, M., Alistar, A., Lamar, Z. S., Isom, S., Chan, M.D., Miller, A.A., Ruiz, J. 2016. A phase II clinical trial of CPI-613 in patients with relapsed or refractory small cell lung carcinoma. *PloS one*, 11(10): e0164244.

Maciewicz, R.A., Wotton, S.F., Etherington, D.J., Duance, V.C. 1990. Susceptibility of the cartilage collagens types II, IX and XI to degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B and L. *FEBS letters*, 269(1): 189-193.

Mak, P., Leav, I., Pursell, B., Bae, D., Yang, X., Taglienti, C.A., Gouvin, L.M., Sharma, V.M., Mercurio, A.M. 2010. ER β impedes prostate cancer EMT by destabilizing HIF-1 α and inhibiting VEGF-mediated snail nuclear localization: implications for Gleason grading. *Cancer cell*, 17(4): 319-332.

Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., Campbell, L.L., Polyak, K., Briskin, C., Yang, J., Weinberg, R.A. 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4): 704-715.

Martin, M., Beauvoit, B., Voisin, P. J., Canioni, P., Guerin, B., Rigoulet, M. 1998. Energetic and morphological plasticity of C6 glioma cells grown on 3-D support; effect of transient glutamine deprivation. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 30(6): 565-578.

Martinez-Outschoorn, U.E., Peiris-Pagés, M., Pestell, R.G., Sotgia, F., Lisanti, M.P. 2017. Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nature reviews Clinical oncology*, 14(1): 11.

Martínez-Zaguilán, R., Seftor, E.A., Seftor, R.E., Chu, Y.W., Gillies, R.J., Hendrix, M.J. 1996. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clinical & experimental metastasis*, 14(2): 176-186.

Masin, M., Vazquez, J., Rossi, S., Groeneveld, S., Samson, N., Schwalie, P.C., Deplancke, B., Frawley, L.E., Gouttenoire, J., Moradpour, D., Oliver, T.G., Meylan, E. 2014. GLUT3 is induced during epithelial-mesenchymal transition and promotes tumor cell proliferation in non-small cell lung cancer. *Cancer & metabolism*, 2(1): 11.

Massagué, J., Gomis, R.R. 2006. The logic of TGF β signaling. *FEBS letters*, 580(12): 2811-2820.

Masszi, A., Di Ciano, C., Sirokmány, G., Arthur, W. T., Rotstein, O. D., Wang, J., McCulloch, C.A., Rosivall, L., Mucsi, I., Kapus, A. 2003. Central role for Rho in TGF- β 1-induced α -smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 284(5): F911-F924.

Mathupala, S.P., Ko, Y.A., Pedersen, P.L. 2006. Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene*, 25(34): 4777.

Mathupala, S.P., Rempel, A., Pedersen, P.L. 1997. Aberrant glycolytic metabolism of cancer cells: a remarkable coordination of genetic, transcriptional, post-translational, and mutational events that lead to a critical role for type II hexokinase. *J Bioenerg Biomembr*, 29(4): 339–343.

Matoba, S., Kang, J. G., Patino, W. D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J., Bunz F, Hwang, P.M. 2006. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science*, 312(5780): 1650-1653.

Mayer, D., Klimek, F., Rempel, A., Bannasch, P. 1997. Hexokinase expression in liver preneoplasia and neoplasia. *Biochem Soc Trans*, 25: 122–127.

McFate, T., Mohyeldin, A., Lu, H., Thakar, J., Henriques, J., Halim, N.D., Wu, H., Schell, M.J., Tsang, T.M., Teahan, O., Zhou, S., Califano, J.A., Jeoung, N.H., Harris, R.A., Verma, A. 2008. Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(33): 22700-22708.

McInnes, L.M., Jacobson, N., Redfern, A., Dowling, A., Thompson, E.W., Saunders, C. M. 2015. Clinical implications of circulating tumor cells of breast cancer patients: role of epithelial–mesenchymal plasticity. *Frontiers in oncology*, 5: 42.

Michelakis, E.D., Webster, L., Mackey, J.R. 2008. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *British journal of cancer*, 99(7): 989.

Miura, S., Takeshita, T., Asao, H., Kimura, Y., Murata, K., Sasaki, Y., Hanai, J.I., Beppu, H., Tsukazaki, T., Wrana, J.L., Miyazono, K., Sugamura, K. 2000. Hgs (Hrs), a FYVE domain protein, is involved in Smad signaling through cooperation with SARA. *Molecular and cellular biology*, 20(24): 9346-9355.

- Mookerjee, S.A., Goncalves, R.L., Gerencser, A.A., Nicholls, D.G., Brand, M.D. 2015.** The contributions of respiration and glycolysis to extracellular acid production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1847(2): 171-181.
- Morandi, A., Taddei, M.L., Chiarugi, P., Giannoni, E. 2017.** Targeting the metabolic reprogramming that controls epithelial-to-mesenchymal transition in aggressive tumors. *Frontiers in oncology*, 7: 40.
- Morel, A. P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., Puisieux, A. 2008.** Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PloS one*, 3(8): e2888.
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., Saavedra, E. 2007.** Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS journal*, 274(6): 1393-1418.
- Moro, L., Arbini, A.A., Yao, J.L., di Sant'Agnes, P.A., Marra, E., Greco, M. 2009.** Mitochondrial DNA depletion in prostate epithelial cells promotes anoikis resistance and invasion through activation of PI3K/Akt2. *Cell death and differentiation*, 16(4), 571.
- Moustakas, A., Heldin, C.H. 2005.** Non-Smad TGF- β signals. *J Cell Sci*, 118(16): 3573-3584.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Morn, A., Nakayama, T., Christian, J. L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.E., Heldin, C.H., ten Dijke, P. 1997.** Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF- β signalling. *Nature*, 389(6651): 631-635.
- Nath, K.A., Ngo, E.O., Hebbel, R.P., Croatt, A.J., Zhou, B., Nutter, L.M. 1995.** alpha-Ketoacids scavenge H₂O₂ in vitro and in vivo and reduce menadione-induced DNA injury and cytotoxicity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 268(1): C227-C236.
- Neil, J.R., Schiemann, W.P. 2008.** Altered TAB1: I κ B kinase interaction promotes transforming growth factor β -mediated nuclear factor- κ B activation during breast cancer progression. *Cancer research*, 68(5): 1462-1470.
- Nguyen, L.V., Vanner, R., Dirks, P., Eaves, C.J. 2012.** Cancer stem cells: an evolving concept. *Nature Reviews Cancer*, 12(2): 133.
- Nowell, P.C. 1976.** The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194(4260): 23-28.
- Obre, E., ve Rossignol, R. 2015.** Emerging concepts in bioenergetics and cancer research: metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic remodeling, signaling and bioenergetic therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 59: 167-181.
- Ohkubo, T., Ozawa, M. 2004.** The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *J Cell Sci*, 117(9): 1675-1685.
- Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S.A., Yang, J., Lander, E.S., Weinberg, R.A. 2008.** Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer research*, 68(10): 3645-3654.
- Orrenius, S. 2007.** Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug metabolism reviews*, 39(2-3): 443-455.
- Osthus, R.C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L.A., Dang, C.V. 2000.** Dereglulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *Journal of Biological Chemistry*, 275(29): 21797-21800.
- Paik, S., Tang, G., Shak, S., Kim, C., Baker, J., Kim, W., Cronin, M., Baehner, F.L., Watson, D., Bryant, J., Costantino, J.P., Geyer, C.E.Jr., Wickerham, D.L.,**

- Wolmark, N. 2006.** Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *Journal of clinical oncology*, 24(23): 3726-3734.
- Pantel, K., Brakenhoff, R.H. 2004.** Dissecting the metastatic cascade. *Nature Reviews Cancer*, 4(6): 448.
- Papandreou, I., Cairns, R.A., Fontana, L., Lim, A.L., Denko, N.C. 2006.** HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell metabolism*, 3(3): 187-197.
- Pardee, T. S., DeFord-Watts, L. M., Peronto, E., Levitan, D. A., Hurd, D. D., Kridel, S., Harrelson, R., Manuel, M., Lyerly, S., Powell, B. L. 2012.** Evaluation of the first-in-class antimitochondrial metabolism agent CPI-613 in hematologic malignancies. *Journal of Clinical Oncology*, 30(15): 6524-6524.
- Pardee, T.S., Lee, K., Luddy, J., Maturo, C., Rodriguez, R., Isom, S., Miller, L.D., Stadelman, K.M., Levitan, D., Hurd, D., Ellis, L.R. Harrelson, R., Manuel, M., Dralle, S., Lyerly, S., Powell, B.L. 2014b.** A phase I study of the first-in-class antimitochondrial metabolism agent, CPI-613, in patients with advanced hematologic malignancies. *Clinical Cancer Research*, 20(20): 5255-5264.
- Pardee, T.S., Levitan, D., Hurd, D. 2011.** Altered mitochondrial metabolism as a target in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 29: 6590-6591.
- Pardee, T.S., Stadelman, K., Isom, S., Ellis, L.R., Berenzon, D., Hurd, D.D., Harrelson, R., Manuel, M., Dralle, S., Lyerly, S., Powell, B.L. 2014a.** The Mitochondrial Metabolism Inhibitor Cpi-613 Is Highly Active in Combination with High Dose Ara-C (HiDAC) and Mitoxantrone in a Phase I Study for Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia (AML). *Blood*, 124(21): 3744.
- Park, H.J., Lyons, J.C., Ohtsubo, T., Song, C.W. 1999.** Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity. *British journal of cancer*, 80(12): 1892.
- Park, J.I., Lee, M.G., Cho, K., Park, B.J., Chae, K.S., Byun, D.S., Ryu, B.K., Park, Y.K., Chi, S.G. 2003.** TGF- β 1 activates interleukin-6 expression in prostate cancer cells through the synergistic collaboration of the Smad2, p38-NF- κ B, JNK, and Ras signaling pathways. *Oncogene*, 22: 4314-4332.
- Park, S.S., Eom, Y.W., Kim, E.H., Lee, J.H., Kim, S., Kim, S.J., Choi, K.S. 2004.** Involvement of c-Src kinase in the regulation of TGF- β 1-induced apoptosis. *Oncogene*, 23(37): 6272.
- Park, S.Y., Kim, H.S., Kim, N.H., Ji, S., Cha, S.Y., Kang, J.G., Ota, I., Shimada, K., Konishi, N., Nam, H.W., Hong, S.W., Yang, W.H., Roth, J., Yook, J.I., Cho, J.W. 2010.** Snail1 is stabilized by O-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. *The EMBO journal*, 29(22): 3787-3796.
- Park, J.K., Lee, S.H., Kang, J.H., Nishio, K., Saijo, N., Kuh, H.J. 2004.** Synergistic interaction between gefitinib (Iressa, ZD1839) and paclitaxel against human gastric carcinoma cells. *Anti-cancer drugs*, 15(8): 809-818.
- Patel, M.S., Korotchkina, L.G. 2001.** Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation: complexity of multiple phosphorylation sites and kinases. *Exp Mol Med*, 33(4):191-197.
- Payen, V.L., Porporato, P.E., Baselet, B., Sonveaux, P. 2016.** Metabolic changes associated with tumor metastasis, part 1: tumor pH, glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Cellular and molecular life sciences*, 73(7): 1333-1348.
- Pedersen, P.L., Mathupala, S., Rempel, A., Geschwind, J.F., Ko, Y.H. 2002.** Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many

cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochim Biophys Acta*, 1555(1-3), 14-20.

Peinado, H., Olmeda, D., Cano, A. 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nature Reviews Cancer*, 7(6): 415.

Peinado, H., Portillo, F., Cano, A. 2004. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *International Journal of Developmental Biology*, 48(5-6): 365-375.

Perlman, R., Schiemann, W.P., Brooks, M.W., Lodish, H.F., Weinberg, R.A. 2001. TGF- β -induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nature cell biology*, 3(8): 708.

Pietilä, M., Vijay, G.V., Soundararajan, R., Yu, X., Symmans, W.F., Sphyris, N., Mani, S.A. 2016. FOXC2 regulates the G2/M transition of stem cell-rich breast cancer cells and sensitizes them to PLK1 inhibition. *Scientific Reports*, 6: 23070.

Plas, D. R., Thompson, C.B. 2005. Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene*, 24(50): 7435.

Pollard, P., Wortham, N., Barclay, E., Alam, A., Elia, G., Manek, S., Poulson, R., Tomlinson, I. 2005a. Evidence of increased microvessel density and activation of the hypoxia pathway in tumours from the hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome. *The Journal of pathology*, 205(1): 41-49.

Pollard, P.J., Briere, J.J., Alam, N.A., Barwell, J., Barclay, E., Wortham, N.C., Hunt, T., Mitchell, M., Olpin, S., Moat, S.J., Hargreaves, I.P., Heales, S.J., Chung, Y.L., Griffiths, J.R., Dagleish, A., McGrath, J.A., Gleeson, M.J., Hodgson, S.V., Poulson, R., Rustin, P., Tomlinson, I.P. 2005b. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1 α in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Human molecular genetics*, 14(15): 2231-2239.

Potentia, S., Zeisberg, E., Kalluri, R. 2008. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *British journal of cancer*, 99(9): 1375.

Qin, W., Li, C., Zheng, W., Guo, Q., Zhang, Y., Kang, M., Zhang, B., Yang, B., Li, B., Yang, H., Wu, Y. 2015. Inhibition of autophagy promotes metastasis and glycolysis by inducing ROS in gastric cancer cells. *Oncotarget*, 6(37): 39839.

Rajagopalan, K.N., Egnatchik, R.A., Calvaruso, M.A., Wasti, A.T., Padanad, M.S., Boroughs, L.K., Ko, B., Hensley, C.T., Acar, M., Hu, Z., Jiang, L., Pascual, J.M., Scaqlioni, P.P., DeBerardinis, R.J., Jiang, L. 2015. Metabolic plasticity maintains proliferation in pyruvate dehydrogenase deficient cells. *Cancer & metabolism*, 3(1), 7.

Ramos-Montoya, A., Lee, W.N.P., Bassilian, S., Lim, S., Trebukhina, R.V., Kazhyna, M.V., Ciudad, C.J., Noé, V., Centelles, J.J., Cascante, M. 2006. Pentose phosphate cycle oxidative and nonoxidative balance: A new vulnerable target for overcoming drug resistance in cancer. *International journal of cancer*, 119(12): 2733-2741.

Rastogi, I., Rajanna, S., Webb, A., Chhabra, G., Foster, B., Webb, B., Puri, N. 2016. Mechanism of c-Met and EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance through epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, 477(4): 937-944.

Rayet, B., Gelinas, C. 1999. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene*, 18(49): 6938.

Rempel, A., Bannasch, P., Mayer, D. 1994. Differences in expression and intracellular distribution of hexokinase isoenzymes in rat liver cells of different transformation stages. *Biochim Biophys Acta*, 1219(3): 660–668.

Riemann, A., Schneider, B., Gündel, D., Stock, C., Thews, O., Gekle, M. 2014. Acidic priming enhances metastatic potential of cancer cells. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 466(11): 2127-2138.

Rofstad, E.K., Mathiesen, B., Kindem, K., Galappathi, K. 2006. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer research*, 66(13): 6699-6707.

Rozhin, J., Sameni, M., Ziegler, G., Sloane, B.F. 1994. Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer research*, 54(24): 6517-6525.

Ruckenstuhl, C., Büttner, S., Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Kroemer, G., Sigrist, S. J., Fröhlich, K., Madeo, F. 2009. The Warburg effect suppresses oxidative stress induced apoptosis in a yeast model for cancer. *PloS one*, 4(2), e4592.

Saito, Y., Takazawa, H., Uzawa, K., Tanzawa, H., Sato, K. 1998. Reduced expression of E-cadherin in oral squamous cell carcinoma: relationship with DNA methylation of 5'CpG island. *International journal of oncology*, 12(2): 293-301.

Santisteban, M., Reiman, J.M., Asiedu, M.K., Behrens, M.D., Nassar, A., Kalli, K. R., Haluska, P., Ingle, J.N., Hartmann, L.C., Manjili, M.H., Radisky, D.C., Ferrone, S., Knutson, K.L. 2009. Immune-induced epithelial to mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells. *Cancer research*, 69(7): 2887-2895.

Saxena, M., Stephens, M.A., Pathak, H., Rangarajan, A. 2011. Transcription factors that mediate epithelial–mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell death & disease*, 2(7): e179.

Sayan, A. E., Griffiths, T. R., Pal, R., Browne, G. J., Ruddick, A., Yagci, T., Edwards, R., Mayer, N.J., Qazi, H., Goyal, S., Fernandez, S., Straatman, K., Jones, G.D., Bowman, K.J., Colquhoun, A., Mellon, J.K., Kriajevska, M., Tulchinsky, E. 2009. SIP1 protein protects cells from DNA damage-induced apoptosis and has independent prognostic value in bladder cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(35): 14884-14889.

Schafer, Z.T., Grassian, A.R., Song, L., Jiang, Z., Gerhart-Hines, Z., Irie, H.Y., Gao, S., Puigserver, P., Brugge, J.S. 2009. Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature*, 461(7260): 109.

Semenza, G.L. 2010. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current opinion in genetics & development*, 20(1): 51-56.

Senzer, N., Bedell, C., Maturo, C., Luddy, J., Rodriguez, R., Shorr, R., Lee, K. 2012. CPI-613, an investigational novel anti-cancer agent, provides long-term stable disease without significant adverse effects in a patient with stage IV relapsed hepatocellular carcinoma. *Case Study and Case Report*, 2(2): 38-45.

Sharma, S.V., Bell, D.W., Settleman, J., Haber, D.A. 2007. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(3): 169.

Sheta, E.A., Trout, H., Gildea, J.J., Harding, M.A., Theodorescu, D. 2001. Cell density mediated pericellular hypoxia leads to induction of HIF-1 α via nitric oxide and Ras/MAP kinase mediated signaling pathways. *Oncogene*, 20(52): 7624.

Shi, Q., Le, X., Wang, B., Abbruzzese, J.L., Xiong, Q., He, Y., Xie, K. 2001. Regulation of vascular endothelial growth factor expression by acidosis in human cancer cells. *Oncogene*, 20(28): 3751.

Shi, Q., Le, X., Wang, B., Xiong, Q., Abbruzzese, J.L., Xie, K. 2000. Regulation of interleukin-8 expression by cellular pH in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 20(11): 1023-1028.

Shi, Y., Massagué, J. 2003. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113(6): 685-700.

Shoemaker, R.H. 2006. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer*, 6(10): 813-823.

Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. 2016. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 66: 7–30.

Simpson, N.E., Han, Z., Berendzen, K.M., Sweeney, C.A., Oca-Cossio, J.A., Constantinidis, I., Stacpoole, P.W. 2006. Magnetic resonance spectroscopic investigation of mitochondrial fuel metabolism and energetics in cultured human fibroblasts: effects of pyruvate dehydrogenase complex deficiency and dichloroacetate. *Molecular genetics and metabolism*, 89(1): 97-105.

Singh, A., Settleman, J.E.M.T. 2010. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene*, 29(34): 4741.

Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., Dirks, P.B. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015): 396.

Souchelnytskyi, S., Nakayama, T., Nakao, A., Morén, A., Heldin, C.H., Christian, J.L., Ten Dijke, P. 1998. Physical and Functional Interaction of Murine and Xenopus Smad7 with Bone Morphogenetic Protein Receptors and Transforming Growth Factor- β Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 273(39): 25364-25370.

Spitz, D.R., Sim, J.E., Ridnour, L.A., Galoforo, S.S., Lee, Y.J. 2000. Glucose Deprivation-Induced Oxidative Stress in Human Tumor Cells: A Fundamental Defect in Metabolism?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1): 349-362.

Spugnini, E.P., Sonveaux, P., Stock, C., Perez-Sayans, M., De Milito, A., Avnet, S., Garcia, A.G., Harguindey, S., Fais, S. 2015. Proton channels and exchangers in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1848(10): 2715-2726.

Srinivasan, S., Guha, M., Dong, D.W., Whelan, K.A., Ruthel, G., Uchikado, Y., Natsugoe, S., Nakagawa, H., Avadhani, N.G. 2016. Disruption of cytochrome c oxidase function induces the Warburg effect and metabolic reprogramming. *Oncogene*, 35(12): 1585.

Steeg, P.S. 2006. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature medicine*, 12(8): 895.

Stern, R., Shuster, S., Neudecker, B.A., Formby, B. 2002. Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Exp. Cell Res*, 276(1): 24-31.

Stuart, S.D., Schauble, A., Gupta, S., Kennedy, A.D., Keppler, B.R., Bingham, P.M., Zachar, Z. 2014. A strategically designed small molecule attacks alpha-ketoglutarate dehydrogenase in tumor cells through a redox process. *Cancer & metabolism*, 2(1), 4.

Stubbs, M., McSheehy, P.M., Griffiths, J.R., Bashford, C.L. 2000. Causes and consequences of tumour acidity and implications for treatment. *Molecular medicine today*, 6(1): 15-19.

Sun, J., Li, J., Guo, Z., Sun, L., Juan, C., Zhou, Y., Gu, H., Yu, Y., Hu, Q., Kan, Q., Yu, Z. 2018. Overexpression of Pyruvate dehydrogenase E1 α subunit Inhibits Warburg effect and Induces Cell Apoptosis through Mitochondria-mediated Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Oncology research*.

- Szűts, D., ve Krude, T. 2004. Cell cycle arrest at the initiation step of human chromosomal DNA replication causes DNA damage. *Journal of cell science*, 117(21):4897-4908.
- Talbot, L.J., Bhattacharya, S.D., Kuo, P.C. 2012. Epithelial-mesenchymal transition, the tumor microenvironment, and metastatic behavior of epithelial malignancies. *International journal of biochemistry and molecular biology*, 3(2): 117.
- Teicher, B.A., Holden, S.A., Ara, G., Chen, G. 1996. Transforming growth factor- β in vivo resistance. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 37(6): 601-609.
- Thannickal, V.J., Lee, D.Y., White, E.S., Cui, Z., Larios, J.M., Chacon, R., Horowitz, J.C., Day, R.M., Thomas, P.E. 2003. Myofibroblast differentiation by TGF- β 1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(14): 12384-12389.
- Thiery, J.P. 2002. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6): 442.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., Nieto, M.A. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5): 871-890.
- Thompson, E.W., Williams, E.D. 2008. EMT and MET in carcinoma—clinical observations, regulatory pathways and new models. *Clinical & experimental metastasis*, 25(6): 591-592.
- Tian, H., McKnight, S. L., Russell, D.W. 1997. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes & development*, 11(1): 72-82.
- Townsend, T.A., Wrana, J.L., Davis, G.E., Barnett, J.V. 2008. Transforming growth factor- β -stimulated endocardial cell transformation is dependent on Par6c regulation of RhoA. *Journal of Biological Chemistry*, 283(20): 13834-13841.
- Trimboli, A. J., Fukino, K., De Bruin, A., Wei, G., Shen, L., Tanner, S. M., Creasap, N., Rosol, T.J., Robinson, M.L., Eng, C., Ostrowski, M.C., Leone, G. 2008. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer research*, 68(3): 937-945.
- Tsai, J.H., Yang, J. 2013. Epithelial–mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes & development*, 27(20): 2192-2206.
- Tseng, P.L., Wu, W.H., Hu, T.H., Chen, C.W., Cheng, H.C., Li, C.F., Tsai, W.H., Tsai, H.J., Hsieh, M.C., Chuang, J.H., Chang, W.T., Chang, W.T. 2018. Decreased succinate dehydrogenase B in human hepatocellular carcinoma accelerates tumor malignancy by inducing the Warburg effect. *Scientific reports*, 8(1): 3081.
- Tsuji, T., Ibaragi, S., Hu, G.F. 2009. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. *Cancer research*, 69(18): 7135-7139.
- Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L., Wrana, J.L. 1998. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF β receptor. *Cell*, 95(6): 779-791.
- Ullah, M.S., Davies, A.J., Halestrap, A.P. 2006. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 281(14): 9030-9037.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Thompson, C.B. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324(5930): 1029-1033.
- Vandewalle, C., Comijn, J., De Craene, B., Vermassen, P., Bruyneel, E., Andersen, H., Tulchinsky, E., Van Roy, F., Berx, G. 2005. SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing

genes of different epithelial cell–cell junctions. *Nucleic acids research*, 33(20): 6566-6578.

Vanharanta, S., Pollard, P.J., Lehtonen, H.J., Laiho, P., Sjöberg, J., Leminen, A., Aittomäki, K., Arola, J., Kruhoffer, M., Orntoft, T.F., Tomlinson, I.P., Kiuru, M., Arango, D., Aaltonen, L.A. 2005. Distinct expression profile in fumarate-hydratase-deficient uterine fibroids. *Human molecular genetics*, 15(1): 97-103.

Vaupel, P., Kallinowski, F., Okunieff, P. 1989. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer research*, 49(23): 6449-6465.

Velasco-Velázquez, M. A., Homsí, N., De La Fuente, M., Pestell, R. G. 2012. Breast cancer stem cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(4): 573-7.

Vesuna, F., Lisok, A., Kimble, B., Raman, V. 2009. Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression. *Neoplasia*, 11(12): 1318-1328.

Villasana, M., Ochoa, G., Aguilar, S. 2010. Modeling and optimization of combined cytostatic and cytotoxic cancer chemotherapy. *Artificial intelligence in medicine*, 50(3): 163-173.

Voulgari, A., Pintzas, A. 2009. Epithelial–mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1796(2): 75-90.

Walenta, S., Mueller-Klieser, W.F. 2004. Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *In Seminars in radiation oncology, Elsevier*, 14(3): 267-274.

Wang, D., Shi, W., Tang, Y., Liu, Y., He, K., Hu, Y., Li, J., Yang, Y., Song, J. 2017. Prefoldin 1 promotes EMT and lung cancer progression by suppressing cyclin A expression. *Oncogene*, 36(7): 885.

Wang, S., Wilkes, M.C., Leof, E.B., Hirschberg, R. 2005. Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF- β pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo. *The FASEB Journal*, 19(1): 1-11.

Wang, X., Jin, D.Y., Ng, R.W., Feng, H., Wong, Y.C., Cheung, A.L., Tsao, S.W. 2002. Significance of MAD2 expression to mitotic checkpoint control in ovarian cancer cells. *Cancer research*, 62(6): 1662-1668.

Wang, Z.L., Fan, Z. Q., Jiang, H.D., Qu, J.M. 2012. Selective Cox-2 inhibitor celecoxib induces epithelial-mesenchymal transition in human lung cancer cells via activating MEK-ERK signaling. *Carcinogenesis*, 34(3): 638-646.

Wang, H., Duan, L., Zou, Z., Li, H., Yuan, S., Chen, X., Yunyuan, Zhang., Xueru, Li., Hui, Sun., He, Zha., Yan, Zhang., Lan, Zhou. 2014. Activation of the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K pathway is involved in S100A4-induced viability and migration in colorectal cancer cells. *International journal of medical sciences*, 11(8): 841.

Warburg, O., Wind, F., Negelein, E. 1927. The metabolism of tumors in the body. *The Journal of general physiology*, 8(6): 519.

Ward, R.J., Dirks, P.B. 2007. Cancer stem cells: at the headwaters of tumor development. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 2: 175-189.

Weinhouse, S. 1967. Hepatomas. *Science*, 158(3800): 542-545.

Wendt, M.K., Allington, T.M., Schiemann, W.P. 2009. Mechanisms of the epithelial–mesenchymal transition by TGF- β . *Future Oncology*, 5(8): 1145-1168.

Wicha, M.S., Liu, S., Dontu, G. 2006. Cancer stem cells: an old idea—a paradigm shift. *Cancer research*, 66(4): 1883-1890.

- Wick, W., Naumann, U., Weller, M. 2006.** Transforming growth factor- β : a molecular target for the future therapy of glioblastoma. *Current pharmaceutical design*, 12(3): 341-349.
- Wilkes, M.C., Leof, E.B. 2006.** TGF- β activation of c-Abl is independent of receptor internalization and regulated by PI3K and PAK2 in mesenchymal cultures. *Journal of Biological Chemistry*. 281(38): 27846-27854.
- Williams, A.C., Collard, T.J., Paraskeva, C. 1999.** An acidic environment leads to p53 dependent induction of apoptosis in human adenoma and carcinoma cell lines: implications for clonal selection during colorectal carcinogenesis. *Oncogene*, 18(21): 3199.
- Witta, S.E., Gemmill, R.M., Hirsch, F.R., Coldren, C.D., Hedman, K., Ravdel, L., Helfrich, B., Dziadziuszko, R., Chan, D.C., Sugita, M., Chan, Z., Baron, A., Franklin, W., Drabkin, H.A., Girard, L., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Bunn, P.A.Jr. 2006.** Restoring E-cadherin expression increases sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in lung cancer cell lines. *Cancer research*, 66(2): 944-950.
- Wojtkowiak, J.W., Verduzco, D., Schramm, K.J., Gillies, R.J. 2011.** Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment. *Molecular pharmaceuticals*, 8(6): 2032-2038.
- Wu, Y., Deng, J., Rychahou, P.G., Qiu, S., Evers, B.M., Zhou, B.P. 2009.** Stabilization of snail by NF- κ B is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer cell*, 15(5): 416-428.
- Wu, Y.C., Tang, S.J., Sun, G.H., Sun, K.H. 2016.** CXCR7 mediates TGF β 1-promoted EMT and tumor-initiating features in lung cancer. *Oncogene*, 35(16): 2123.
- Xu, B., Sun, Z., Liu, Z., Guo, H., Liu, Q., Jiang, H., Zou, Y., Gong, Y., Tischfield, J.A., Shao, C. 2011.** Replication stress induces micronuclei comprising of aggregated DNA double-strand breaks. *PLoS one*, 6(4), e18618.
- Xu, L., Fidler, I.J. 2000.** Acidic pH-induced elevation in interleukin 8 expression by human ovarian carcinoma cells. *Cancer research*, 60(16): 4610-4616.
- Xu, L., Fukumura, D., Jain, R.K. 2002.** Acidic Extracellular pH Induces Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Human Glioblastoma Cells via ERK1/2 MAPK Signaling Pathway Mechanism of Low pH-induced VEGF. *Journal of Biological Chemistry*, 277(13): 11368-11374.
- Yan, H., Bigner, D.D., Velculescu, V., Parsons, D.W. 2009.** Mutant metabolic enzymes are at the origin of gliomas. *Cancer research*, 69(24): 9157-9159.
- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., Weinberg, R.A. 2004.** Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 117(7): 927-939.
- Yang, J., Weinberg, R.A. 2008.** Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Developmental cell*, 14(6): 818-829.
- Yang, L., Hou, Y., Yuan, J., Tang, S., Zhang, H., Zhu, Q., Du, Y.E., Zhou, M., Wen, S., Xu, L., Tang, X., Cui, X., Liu, M. 2015.** Twist promotes reprogramming of glucose metabolism in breast cancer cells through PI3K/AKT and p53 signaling pathways. *Oncotarget*, 6(28): 25755.
- Yang, M.H., Wu, M.Z., Chiou, S.H., Chen, P.M., Chang, S.Y., Liu, C.J., Teng, S.C., Wu, K. J. 2008.** Direct regulation of Twist by HIF-1 α promotes metastasis. *Nature cell biology*, 10(3): 295.

- Yauch, R. L., Januario, T., Eberhard, D. A., Cavet, G., Zhu, W., Fu, L., Pham, T.Q., Soriano, R., Stinson, J., Seshagiri, S., Modrusan, Z., Lin, C.Y., O'Neill, V., Amler, L.C. 2005.** Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 11(24): 8686-8698.
- Yazhou, C., Wenlv, S., Weidong, Z., Licun, W. 2004.** Clinicopathological significance of stromal myofibroblasts in invasive ductal carcinoma of the breast. *Tumor Biology*, 25(5-6): 290-295.
- Yu, M., Bardia, A., Wittner, B.S., Stott, S. L., Smas, M.E., Ting, D.T., Isakoff, S.J., Ciciliano, J.C., Wells, M.N., Shah, A.M., Concannon, K.F., Donaldson, M.C., Sequist, L.V., Brachtel, E., Sgroi, D., Baselga, J., Ramaswamy, S., Toner, M., Haber, D.A., Maheswaran, S. 2013.** Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*, 339(6119): 580-584.
- Yuan, J., Glazer, P.M. 1998.** Mutagenesis induced by the tumor microenvironment. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 400(1): 439-446.
- Yuan, J., Narayanan, L., Rockwell, S., Glazer, P.M. 2000.** Diminished DNA repair and elevated mutagenesis in mammalian cells exposed to hypoxia and low pH. *Cancer research*, 60(16): 4372-4376.
- Zachar, Z., Marecek, J., Maturo, C., Gupta, S., Stuart, S. D., Howell, K., Schauble, A., Lem, J., Piramzadian, A., Karnik, S., Lee, K., Rodriguez, R., Shorr, R., Bingham, P.M. 2011.** Non-redox-active lipoate derivatives disrupt cancer cell mitochondrial metabolism and are potent anticancer agents in vivo. *Journal of molecular medicine*, 89(11): 1137.
- Zavadil, J., Bitzer, M., Liang, D., Yang, Y.C., Massimi, A., Kneitz, S., Piek, E., Bottinger, E.P. 2001.** Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor- β . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12): 6686-6691.
- Zeisberg, E.M., Potenta, S. E., Sugimoto, H., Zeisberg, M., Kalluri, R. 2008.** Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(12): 2282-2287.
- Zeisberg, E.M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M., Kalluri, R. 2007a.** Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer research*, 67(21): 10123-10128.
- Zeisberg, E.M., Tarnavski, O., Zeisberg, M., Dorfman, A. L., McMullen, J. R., Gustafsson, E., Chandraker, A., Yuan, X., Pu, W.T., Roberts, A.B., Neilson, E.G., Sayegh, M.H., Izumo, S., Kalluri, R. 2007b.** Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nature medicine*, 13(8): 952.
- Zerilli, M., Amato, M. C., Martorana, A., Cabibi, D., Coy, J. F., Cappello, F., Pompei, G., Russo, A., Giordano, C., Rodolico, V. 2008.** Increased expression of transketolase-like-1 in papillary thyroid carcinomas smaller than 1.5 cm in diameter is associated with lymph-node metastases. *Cancer*, 113(5): 936-944.
- Zhang, W., Feng, M., Zheng, G., Chen, Y., Wang, X., Pen, B., Yin, J., Yu, Y., He, Z. 2012.** Chemoresistance to 5-fluorouracil induces epithelial–mesenchymal transition via up-regulation of Snail in MCF7 human breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 417(2): 679-685.

Zhao, M., Fang, W., Wang, Y., Guo, S., Shu, L., Wang, L., Chen, Y., Fu, Q., Liu, Y., Hua, S., Fan, Y., Liu, Y., Deng, X., Luo, R., Mei, Z., Jiang, Q., Liu, Z. 2015. Enolase-1 is a therapeutic target in endometrial carcinoma. *Oncotarget*, 6(17), 15610.

Zhong, Y., Huang, R., Li, X., Xu, R., Zhou, F., Wang, J., Fan, H., Goscinski, M., Zhang, M., Wen, J.G., Nesland, J.M., Suo, Z. 2015. Decreased Expression of PDHE1alpha Predicts Worse Clinical Outcome in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res*, 35(10):5533-5538.

Zhou, B.P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y.M., Gunduz, M., Hung, M.C. 2004. Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nature cell biology*, 6(10): 931.

Zu, X. L., ve Guppy, M. 2004. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochemical and biophysical research communications*, 313(3): 459-465.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Buse CEVATEMRE

Doğum Yeri ve Tarihi: Tekirdağ, 24 Temmuz 1989

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Bursa Erkek Lisesi, 2003-2006

Lisans: Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2006-2010

Yüksek Lisans: Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, 2010-2013

Çalıştığı Kurum/Kurumlar: Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011-2018

İletişim (e-posta): buse.cevatemre@gmail.com, bcevatemre@uludag.edu.tr

Yayınları:

Acilan, C., Cevatemre, B., Adiguzel, Z., Karakas, D., Ulukaya, E., Ribeiro, N., Correia, I., Pessoa, J.C. 2017. Synthesis, biological characterization and evaluation of molecular mechanisms of novel copper complexes as anticancer agents. *BBA General Subjects*, 1861(2): 218-234.

Ari, F., Cevatemre, B., Armutak, E.I., Aztopal, N., Yilmaz, V.T., Ulukaya, E. 2014. Apoptosis-inducing effect of a palladium(II) saccharinate complex of terpyridine on human breast cancer cells in vitro and in vivo. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22(17): 4948-4954.

Aydinlik, S., Erkisa, M., Cevatemre, B., Sarimahmut, M., Dere, E., Ari, F., Ulukaya, E. 2017. Enhanced cytotoxic activity of doxorubicin through the inhibition of autophagy in triple negative breast cancer cell line. *BBA General Subjects*, 1861(2): 49-57.

Aztopal, N., Cevatemre, B., Sarimahmut, M., Ari, F., Dere, E., Ozel, M.Z., Firat, M., Ulukaya, E. 2016. Pelargonium quercetorum Agnew induces apoptosis without PARP or cytokeratin 18 cleavage in non-small cell lung cancer cell lines. *Oncology Letters*, 12(2): 1429-1437.

Aztopal, N., Karakas, D., Cevatemre, B., Ari, F., Iysel, C., Daidone, M.G., Ulukaya, E. 2017. A trans-platinum(II) complex induces apoptosis in cancer stem cells of breast cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(1): 269-276.

Cetin, Y., Adiguzel, Z., Polat, H.U., Akkoc, T., Tas, A., Cevatemre, B., Celik, G., Carikci, B., Yilmaz, V.T., Ulukaya, E., Acilan, C. 2017. A palladium(II)-saccharinate complex of terpyridine exerts higher anticancer potency and less toxicity than cisplatin in a mouse allograft model. *Anticancer Drugs*, 28(8): 898-910.

- Cevatemre B, Ari F, Sarimahmut M, Oral AY, Dere E, Kacar O, Adiguzel Z, Acilan C, Ulukaya E. 2013.** Combination of fenretinide and indole-3-carbinol results in synergistic cytotoxic activity inducing apoptosis against human breast cancer cells in vitro. *Anti-Cancer Drugs*, 24(6): 577-586.
- Cevatemre, B., Botta, B., Mori, M., Berardozzi, S., Ingallina, C., Ulukaya, E. 2016.** The plant-derived triterpenoid tingenin B is a potent anticancer agent due to its cytotoxic activity on cancer stem cells of breast cancer in vitro. *Chemico-Biological Interactions*, 260: 248-255.
- Cevatemre, B., Erkisa, M., Aztopal, N., Karakas, D., Alper, P., Tsimplouli, C., Sereti, E., Dimas, K., Armutak, E.I., Gurevin, E.G., Uvez, A., Mori, M., Berardozzi, S., Ingallina, C., D'Acquarica, I., Botta, B., Ozpolat, B., Ulukaya, E. 2017.** A promising natural product, pristimerin, results in cytotoxicity against breast cancer stem cells in vitro and xenografts in vivo through apoptosis and an incomplete autophagy in breast cancer. *Pharmacological Research*, 129: 500-514.
- Cevatemre, B., Ulukaya, E., Sarimahmut, M., Oral, A.Y., Frame, F. 2015.** The M30 Assay does not detect apoptosis in epithelial-derived cancer cells expressing low levels of cytokeratin 18. *Tumor Biology*, 36(9): 6857-6865.
- Kacar, O., Adiguzel, Z., Yilmaz, T.V., Cetin, Y., Cevatemre, B., Arda, N., Ulukaya, E., Acilan, C. 2014.** In Vitro Evaluation of the Molecular Mechanisms of a Palladium(II) Saccharinate Complex with Terpyridine as an Anticancer Agent. *Anti-Cancer Drugs*, 25(1): 17-29.
- Kacar, O., Cevatemre, B., Hatipoglu, I., Arda, N., Ulukaya, E., Yilmaz, V.T., Acilan, C. 2017.** The role of cell cycle progression for the apoptosis of cancer cells induced by palladium(II)-saccharinate complexes of terpyridine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(6): 1770-1777.
- Karakas, D.*, Cevatemre, B.*, Aztopal, N., Ari, F., Yilmaz, V.T., Ulukaya, E. 2015.** Addition of niclosamide to palladium(II) saccharinate complex of terpyridine results in enhanced cytotoxic activity inducing apoptosis on cancer stem cells of breast cancer. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(17): 5580-5586. Eş Katkı *
- Karakas, D., Cevatemre, B., Ulukaya, E. 2015.** Cancer stem cells: emerging actors in both basic and clinical cancer Research. *Turkish Journal of Biology*, 38: 829-838.
- Oral, A.Y.*, Cevatemre, B.*, Sarimahmut, M., Icel, C., Yilmaz, V.T., Ulukaya, E. 2015.** Anti-growth effect of a novel trans-dichloridobis[2-(2-hydroxyethyl)pyridine]platinum (II) complex via induction of apoptosis on breast cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(15): 4303-4310. Eş Katkı *
- Oral, A.Y., Oral, H.B., Sarimahmut, M., Cevatemre, B., Ozkaya, G., Korkmaz, S., Ulukaya, E. 2017.** Combination of esomeprazole with chemotherapeutics results in more pronounced cytotoxic effect via apoptosis on A549 non-small-cell lung cancer cell line. *Turkish Journal of Biology*, 41(1): 231-241.
- Tunc, D., Dere, E., Karakas, D., Cevatemre, B., Yilmaz, V.T., Ulukaya, E. 2017.** Cytotoxic and apoptotic effects of the combination of palladium (II) 5,5-diethylbarbiturate complex with bis(2-pyridylmethyl)amine and curcumin on non small lung cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(5): 1717-1723.
- Ulukaya, E., Frame, F., Cevatemre, B., Pellacani, D., Walker, H., Mann, V., Simms, M., Stower, M., Yilmaz, V., Maitland, N. 2013.** Differential Cytotoxic Activity of a Novel Palladium-Based Compound on Prostate Cell Lines, Primary Prostate Epithelial Cells and Prostate Stem Cells. *PLoS One*, 10;8(5): e64278.

Ulukaya, E., Sarimahmut, M., Cevatemre, B., Ari, F., Yerlikaya, A., Dimas, K. 2014. Additive enhancement of apoptosis by TRAIL and fenretinide in metastatic breast cancer cells in vitro. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 68(4): 477-482.

Yılmaz, V.T., Içsel, C., Suyunova, F., Aygun, M., Cevatemre, B., Ulukaya, E. 2017. Synthesis, structures, DNA/protein binding, molecular docking, anticancer activity and ROS generation of Ni(II), Cu(II) and Zn(II) 5,5-diethylbarbiturate complexes with bis(2-pyridylmethyl)amine and terpyridine. *New Journal of Chemistry*, 41(16): 8092-8106.

