



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TWIST1 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN GLİKOZ
METABOLİZMASINDAKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Kadriye AKTAŞ KONT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Ağustos - 2018
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Kadriye AKTAŞ KONT tarafından hazırlanan “TWIST1 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN GLİKOZ METABOLİZMASINDAKİ ROLÜ” adlı tez çalışması .../.../... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Doç.Dr.Bahadır ÖRTÜRK

.....

Danışman

Dr. Öğr. Üy. Suray PEHLİVANOĞLU

.....

Üye

Dr. Öğr. Üy. E.Nedime KORUCU

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Mehmet KARALI
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğü tarafından 161315002 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Kadriye AKTAŞ KONT

Tarih: Ağustos, 2018

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TWIST1 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN GLİKOZ METABOLİZMASINDAKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Kadriye AKTAŞ KONT

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üy. Suray PEHLİVANOĞLU

2018, 86 Sayfa

Jüri

Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK
Dr. Öğr. Üy. Suray PEHLİVANOĞLU
Dr. Öğr. Üy. E. Nedime KORUCU

Kanser olgularının mortalite oranları kanser hücrelerindeki metastatik kabiliyetin artışına bağlı olarak yükselmektedir. Özellikle epitelyal kökenli olan karsinomalarda kanser hücreleri epitelyal karakterlerini kaybederek mezenkimal karakterler kazanır. Mezenkimal-benzer karaktere sahip bu hücreler invazyon kabiliyeti kazandığından bulunduğu ortamdan ayrılarak kan dolaşımına geçer ve farklı doku ve organlarda sekonder metastatik odakların oluşmasına neden olur. Metastatik invazyonun ilk aşaması epitelyal mezenkimal transizyon (EMT) mekanizmasıdır. Bu mekanizmanın temel düzenleyici faktörlerinden biri Twist1 transkripsiyon faktörüdür. Yapılan araştırmalar agresif kanser olgularında Twist1 geninin yüksek ekspresyon gösterdiğini belirlemiştir.

TWIST1, b-Helix-Loop-Helix yapısal özelliği gösteren bir transkripsiyon faktörü olup promotorlarında E-Box dizisi bulunduran genlerin transkripsiyonunu aktive veya inhibe eder. TWIST1 ilk olarak bir embriyonik gelişim bozukluğu olan Saethre-Chotzen sendromu ile ilişkilendirilerek tanımlanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar TWIST1'in aynı zamanda bir proto-onkogen olduğunu göstermiştir. Zira bu protein p53, E1A ve p14ARF gibi tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonunu baskılayarak, proto-onkogenler olan AKT2, c-SRC, STAT3 ekspresyonlarını indüklemektedir. Bu bulgulara paralellik gösterecek şekilde TWIST1 ekspresyonu osteosarkoma, prostat, glioma, mide, karaciğer ve endometrial kanser hücrelerinde aşırı ekspresyon göstermekte ve kötü prognoz'a sebep olmaktadır.

Günümüzde tümör heterojenitesine bağlı olarak yeni tedavi stratejileri geliştirilmektedir. Uygulanan ilaç tedavilerine ek olarak tümör hücrelerinin metabolik hedeflemesine de ilgi artmıştır. Tümör dokularında glikoz alımı, aerobik glikoliz oranı ve laktat üretimi artar. Bu bağlamda çalışmamızda 293T hücrelerinde Twist1 transkripsiyon faktörünün promotorlarında E-box (CANNTG) dizisi taşıyan glikoz taşıyıcıları Glut (1,2,3,4,5,12) ve glikoz metabolizmasında önem arz eden Hekzokinaz 2 (HK-2), Piruvat kinaz 2 (PKM-2), Glikoz-6 fosfat dehidrogenaz (G6-PD), Fosfofruktokinaz M (PFKM) ve Laktat dehidrogenaz A (LDH-A) genlerinin ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkisini RT-PCR yöntemi ile belirledik. Ayrıca glikoz alımında önemli rol oynayan insülin reseptörü (IR) ile insülin reseptör substrat-1 ve -2 (Irs-1,-2) gen ekspresyon seviyelerini saptadık. Twist1 ekspresyonu varlığında hücrelerin Glikoz alımının arttığını tesbit ettik. Bunun yanı sıra Glikoliz yolağının ve enerji tüketiminin hızlandığı, besi ortamındaki glikoz ,laktat ve osmolarite düzeyleri ile hücre içindeki ATP, ADP ve AMP oranlarını belirleyerek ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Epitelyal Mezenkimal Transizyon, Twist1, Glikoz uptake.

ABSTRACT

MSc THESIS

INVESTIGATION OF THE ROLE OF TWIST1 TRANSCRIPTION FACTOR IN GLUCOSE METABOLISM

Kadriye AKTAŞ KONT

**The Graduate School of Natural And Applied Science of Necmettin Erbakan University
The Degree of Master of Science / Doctor Of Philosophy in Mechanical Engineering**

Advisor: Assist. Prof. Dr. Suray PEHLIVANOGLU

2018, 86 Page

Jury

**Advisor: Assoc. Prof. Dr. Bahadır OZTURK
Assist. Prof. Dr. Suray PEHLIVANOGLU
Assist. Prof. Dr.E.Nedime KORUCU**

The mortality rates of cancer cases are increased due to the increase in metastatic ability in cancer cells. Especially in carcinomas of epithelial origin, cancer cells lose their epithelial characters and acquire mesenchymal characters. These cells, which have mesenchymal-like characteristics, are separated from the environment where they gain invasion ability and pass into the bloodstream and cause secondary metastatic foci in different tissues and organs. The first stage of metastatic invasion is the epithelial mesenchymal transition (EMT) mechanism. One of the basic regulatory factors of this mechanism is the Twist1 transcription factor. The investigations have determined that the Twist1 gene shows high expression in aggressive cancer cases.

TWIST1 is a transcription factor that shows b-Helix-Loop-Helix structural property and activates or inhibits the transcription of genes with E-Box sequence in their promoters. TWIST1 was first described in association with an embryonic developmental disorder, Saethre-Chotzen syndrome. Recent studies have shown that TWIST1 is also a proto-oncogen. Because this protein suppresses the function of tumor suppressor genes such as p53, E1A and p14ARF, it induces the proto-oncogenes AKT2, c-SRC, STAT3 expressions. In parallel with these findings, TWIST1 expression is overexpressed in osteosarcoma, prostate, glioma, stomach, liver and endometrial cancer cells and causes poor prognosis.

Today, new treatment strategies are being developed due to tumor heterogeneity. In addition to the drug treatments applied, the metabolic targeting of the tumor cell has also increased its interest. Glucose intake, aerobic glycolysis rate and lactate production are increased in tumor tissues. In this study, 293T cells, Glut (1,2,3,4,5,12) and Hexokinase 2 (HK-2) carrying the E-box (CANNTG) sequence in the promoters of Twist1 transcription factor and Hexokinase 2 (PKM-2), Glucose-6 phosphate dehydrogenase (G6-PD), Phosphofructokinase M (PFKM) and Lactate dehydrogenase A (LDH-A) genes at the expression level. In addition, we found insulin receptor (IR) and insulin receptor substrate-1 and -2 (Irs-1, -2) gene expression levels that play an important role in glucose uptake. In the presence of Twist1 expression, we detected the increase in glucose uptake of cells. In addition, we determined the rates of glycolysis pathway and energy consumption, glucose ,lactate levels and osmolarity in the medium, and ATP, ADP and AMP levels in the cell.

Keywords: Epithelial Mesenchymal Transition, Twist1, Glucose uptake,

ÖNSÖZ

Bu bitirme çalışmasında, Twist1 Transkripsiyon Faktörünün Glikoz Metabolizmasındaki Rolünün Araştırılması'nda yapmış olduğumuz çalışmanın sonucunda elde ettiğim bilgileri dikkatinize sunmaktayım.

Bu çalışmayı hazırlarken geçirdiğim süreçte Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü'nün maddi desteği, manevi desteğini her an yanımda hissettiğim aileme ve arkadaşlarıma, bilgi ve birikimleriyle bana yöne veren Doç.Dr. Bahadır ÖZTÜRK hocama, bana bu uygulama ödevini vererek kendimi daha da geliştirmeme katkı sağlayan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Suray PEHLİVANOĞLU'na ve sevgili laboratuvar çalışma arkadaşım İlkey SAK'a teşekkürü bir borç bilirim.

Kadriye AKTAŞ KONT
KONYA-2018

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	ii
TEZ BİLDİRİMİ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
2.1. Kanser Nedir?	2
2.1.1. Kanser Genetiği	2
2.1.2. Kanser Oluşumu	2
2.1.3. Kanser Yolakları	3
2.2. Kanser Metabolizması.....	6
2.2.1. Kanserde Protein Metabolizması.....	6
2.2.2. Kanserde Karbonhidrat Metabolizması	7
2.2.3. Kanserde Lipit Metabolizması.....	9
2.2.4. Adenozin Trifosfat (ATP).....	10
2.3. Aerobik Glikoz	10
2.4. İnsülin Sinyal Yolağı.....	12
2.4.1. İnsülin Reseptörü (IR)	12
2.4.2. İnsülin Reseptör Substrat-1 (IRS-1)	13
2.4.3. İnsülin Reseptör Substrat-2 (IRS-2)	14
2.5. İnsan TWIST1 Yapısı ve Hücrel Fonksiyonları	15
2.5.1 TWIST1 Geni	15
2.5.2. TWIST1 Proteini	17
2.5.3. TWIST1 Fonksiyonu	20

2.5.4. TWIST1'in Kanser Gelişimindeki Önemi.....	21
2.6. Kanser Hücresinin Metabolizması	22
2.7. Kanser Hücrelerinde Glukoz Alımı.....	23
2.7.1. Glikoz Transporterlar.....	23
2.7.1.1. Glikoz Transporter-1 (GLUT1)	27
2.7.1.2. Glikoz Transporter-2 (GLUT2)	27
2.7.1.3. Glikoz Transporter-3 (GLUT3)	27
2.7.1.4. Glikoz Transporter-4 (GLUT4)	28
2.7.1.5. Glikoz Transporter-5(GLUT5)	28
2.7.1.6. Glikoz Transporter-6 (GLUT-6).....	28
2.7.1.7.Glikoz Transporter-7(GLUT7)	29
2.7.1.8. Glikoz Transporter-8 (GLUT8)	29
2.7.1.9. Glikoz Transporter-9 (GLUT9)	29
2.7.1.10. Glikoz Transporter-10 (GLUT10)	30
2.7.1.11. Glikoz Transporter-11 (GLUT11)	30
2.7.1.12. Glikoz Transporter-12 (GLUT12)	30
2.7.1.13. Glikoz Transporter-13 (GLUT13)	31
2.7.1.14. Glikoz Transporter-14 (GLUT-14).....	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
3.1 Hücre Kültürü.....	32
3.2. <i>Escherichia coli</i> DH5α Suşuna Plasmid Vektör Transformasyonu	32
3.3. Transforme Edilen Bakterilerin Kültürü	32
3.4. Bakterilerden Plazmid Vektör İzolasyonu	32
3.5. HEK293T Hücrelerine Plazmid Vektörlerin Transfeksiyonu	33
3.6. Total RNA ve cDNA Kütüphanesinin Elde Edilmesi	33
3.6.1. Total RNA İzolasyonu	33
3.6.2. cDNA Kütüphanesinin Elde Edilmesi	34
3.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	34
3.8. Agaroz Jel Elektroforezi.....	37
3.8.1. Agaroz Jel Hazırlanması.....	37
3.8.2. Elektroforez	37

3.9. HEK293T Hücrelerinde ATP, ADP ve AMP Oranlarının Belirlenmesi.....	38
3.10. HEK293T Kültür Süpernatantlarında pH, CO ₂ Elektrolit ve Metabolit Düzeylerinin Ölçülmesi	Error! Bookmark not defined.
3.11. Glukoz Alım Deneyi	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	44
4.1. HEK293T Hücrelerine Transfeksiyon Etkinliğinin pmaxGFP plazmid vektörü ile belirlenmesi	44
4.2. pcDNA3.1 ve Tw+/pcDNA3.1 Ekspresyon Vektörlerinin E.coli DH5α Suşundan İzolasyonu.....	45
4.3. Transfekte Edilmiş HEK293T Hücrelerinde Twist1 Ekspresyonu	45
4.4. Twist1 Eksprese Eden ve Etmeyen HEK293T Hücrelerinde Bazı Glikoz Transporter (GLUT) Genlerinin Ekspresyon Düzeyleri.....	46
4.5. Twist1 Eksprese Eden ve Etmeyen HEK293T Hücrelerinde Glikolitik Yolakta Önemli Olan Bazı Genlerin Ekspresyon Düzeyleri.....	47
4.6. Twist1 Eksprese Eden ve Etmeyen HEK293T Hücrelerinde İnsülin Reseptörü ve İnsülin Reseptör Substrat 1 ve 2 Genlerin Ekspresyon Düzeyleri.....	48
4.7. Twist1 Eksprese Eden ve Etmeyen HEK293T Hücrelerinde ATP, ADP ve AMP Oranlarını Belirlenmesi	49
4.8. Twist1 Eksprese Eden ve Etmeyen HEK293T Hücrelerinin Kültür Süpernatantlarında Metabolit Düzeyleri.....	50
4.9. Twist1 Eksprese Eden ve Etmeyen HEK293T Hücrelerinde 100mM İnsülin ve %10 FBS varlığında Glikoz Alım Düzeyleri.....	51
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	54
5.1. Sonuçlar.....	54
5.2. Öneriler.....	59
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	76

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1. Kanserde önemli olan bazı temel yollar.	4
Tablo 2.2. GLUT ailesi proteinlerinin izoformları, substratları ve eksprese oldukları dokular.	26
Tablo 2.3. GLUT ailesi proteinlerinin çeşitli kanser türlerindeki ekspresyonları.	26
Tablo 3.1. gDNA uzaklaştırma reaksiyon içeriği.	34
Tablo 3.2. Reverse transkripsiyonla RNA'da cDNA eldesi reaksiyon içeriği.	34
Tablo 3.3. Polimeraz zincir reaksiyon içeriği.	35
Tablo 4.1. Twist1 Eksprese Eden ve Etmeyen HEK293T Hücrelerinde ATP, ADP ve AMP Düzeylerinin HPLC Sonuçları.	50
Tablo 4.2. Twist1 eksprese eden (Tw+/pcDNA3.1 transfekte) ve etmeyen (pcDNA3.1 kontrol vektörle transfekte) HEK293T hücrelerinin kültür süpernatantlarında pH, CO ₂ , elektrolit ve metabolit düzeyleri.	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Fosfo-inozitol 3 Kinaz (PI3K) yolağı.	5
Şekil 2.2. İnsülin duyarlılığı ile protein metabolizması arasındaki ilişki.	7
Şekil 2.3. Karbonhidrat metabolizmasının şematik gösterimi.	8
Şekil 2.4. HIF-1 α 'nın hipoksik ortamda tümör hücrelerindeki etkisi.	9
Şekil 2.5. Kanser hücrelerinde Warburg etkisinin şematik gösterimi.	11
Şekil 2.6. İnsülin reseptör yapısı.....	12
Şekil 2.7. İnsülin reseptörü aktivasyonu sonucunda glikozun hücre içine alınması	13
Şekil 2.8. İnsülin reseptör substrat-1 (IRS-1) protein yapısı	13
Şekil 2.9. İnsülin reseptör substrat-2 (IRS-2) protein yapısı	14
Şekil 2.10. TWIST1 geninin kromozomal lokalizasyonu	15
Şekil 2.11. İnsan TWIST1 gen yapısı	16
Şekil 2.12. İnsan TWIST1 geninin promotor dizisi.....	17
Şekil 2.13. Twist1 protein yapısı (A) ve bHLH motifi ile DNA'ya bağlanması (B).....	18
Şekil 2.14. TWIST1 transkripsiyon faktörünün fosforilasyon ile aktivasyonu	19
Şekil 2.15. TWIST1'in Transkripsiyonel Regülasyondaki Rolü ve EMT sürecini başlatması	21
Şekil 2.16. Sınıf I, II ve III GLUT'ların protein yapıları	24
Şekil 2.17. Normal ve kanser hücrelerinde GLUT ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	25
Şekil 3.9.1 Protein standart grafiği.....	38
Şekil 3.9.2.ATP Konsantrasyon-Pik Alanı.....	40
Şekil 3.9.3. ADP Konsantrasyon-Pik Alanı.....	41
Şekil 3.9.4. AMP Konsantrasyon-Pik alanı.....	41
Şekil 4.1. HEK293T hücrelerine transfeksiyon etkinliğini gösteren yeşil floresan protein (green fluorescence protein-GFP) geni içeren ökaryotik ekspresyon vektörünün (pmaxGFP) ifade düzeyi (büyütme gücü: 200x).....	44
Şekil 4.2. Plazmid izolasyon kiti ile izole edilmiş boş pcDNA3.1 ve Twist1 cDNA dizisi klonlanmış (Tw+/pcDNA3.1) plazmid vektörlerin %1'lik agaroz jel görüntüsü. ..	45

Şekil 4.3. Kontrol olarak boş pcDNA3.1 vektörü klonlanmış (pcDNA3) ve Twist1 yüksek ekspresyonu sağlanmış (Twist1+) 293T hücrelerinde Twist1 ve β -aktin gen ekspresyonlarının %2'lik agaroz jel görüntüsü ve normalize edilmiş göreceli mRNA düzeyleri	46
Şekil 4.4. Kontrol olarak boş pcDNA3.1 vektörü klonlanmış (pcDNA3) ve Twist1 yüksek ekspresyonu sağlanmış (Twist1+) 293T hücrelerinde glikoz transporter genleri olan Glut1, Glut2, Glut3, Glut4, Glut5 ve Glut12 gen ekspresyonlarının %2'lik agaroz jel görüntüsü ve normalize edilmiş göreceli mRNA düzeyleri	47
Şekil 4.5. Kontrol olarak boş pcDNA3.1 vektörü klonlanmış (pcDNA3) ve Twist1 yüksek ekspresyonu sağlanmış (Twist1+) 293T hücrelerinde glikolitik enzimler olan Hekzokinaz 2 (HK2), Fosfofruktokinaz M (PFKM), Piruvat kinaz M2 (PKM2), Laktat dehidrogenaz α (LDH α) ve Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) gen ekspresyonlarının %2'lik agaroz jel görüntüsü ve normalize edilmiş göreceli mRNA düzeyleri	48
Şekil 4.6. Kontrol olarak boş pcDNA3.1 vektörü klonlanmış (pcDNA3) ve Twist1 yüksek ekspresyonu sağlanmış (Twist1+) 293T hücrelerinde İnsülin sinyal yolağında önemli olan İnsülin reseptörü (InsR), İnsülin reseptör substrat 1 (Irs1) ve İnsülin reseptör substrat 2 (Irs2) gen ekspresyonlarının %2'lik agaroz jel görüntüsü ve normalize edilmiş göreceli mRNA düzeyleri	49
Şekil 4.7. pcDNA3.1 boş vektör (pcDNA3) ve Tw+/pcDNA3.1 vektörü transfekte edilmiş yüksek Twist1 ekspresyonu gösteren (Twist1) hücrelerinin akım sitometrisi ile belirlenmiş glikoz alım düzeyleri.	52
Şekil 5.1. TWIST1'in glikoz alımı ve glikolitik yolaktaki rolü.....	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

Å	Angstrom
AFP	Akut faz proteini
BRCA1, BRCA2	Meme kanseri genleri
BSA	Sığır Serum Albumini (Bovine Serum Albumin)
cAMP	Siklik AMP (cyclic AMP)
cDNA	Komplementer DNA (complementary DNA)
Cys	Sistein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNAase	Deoksiribonükleaz
dNTP	Deoksinükleotit
ssDNA	Tek zincirli DNA
dsRNA	Çift zincirli RNA (Double stranded RNA)
E.coli	Escherichia Coli
EDTA	Etilendiamin tetra-asetik asit
E	Kadrin
EMT	Epitelyal Mezenkimal Geçiş
FCS	Fetal Dana Serum (Fetal Calf serum)
G6PD	Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz
G1-G2-G3-G4-G5-G12	Glut'ların formları
HEK	İnsan Embriyonik böbrek (Human embryonic kidney)
HER2	Human Epidermal growth factor Receptor-2
His	Histidin
HK2	Hekzokinaz 2
Irs-1, 2, 3, 4	İnsulin reseptor substratı
IL-1	İnterlökin-1
LDH α	Laktat dehidrogenaz α
Lys	Lizin
Met	Metiyonin
mRNA	Mesajcı RNA (Messenger RNA)
MAPK	Mitojenler tarafından aktive edilen Kinaz

N-terminal	Amino terminal
NFKB	Nükleer Faktör Kappa B
OD	Optik Dansite
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	Fosfatla tamponlanmış tuzlu çözelti (Phosphate buffered saline)
PFKM	Fosfofruktokinaz M
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
PKM2	Piruvat kinaz M2
PI3K	Fosfoinositid-3-kinaz
PKC	Protein Kinaz C
RAS	Rat sarkoma virüsü
RNA	Ribonükleik asit
RNAaz	Ribonükleaz
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
RB1	Retinoblastoma1
STAT	Transkripsiyon Sinyal İletici Ve Aktivatör
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Thr	Treonin
Trp	Triptofan
Tyr	Tirozin
TP53	Tümör protein 53
TGFβ	Transforming Growth Faktör β
Val	Valin
WNT	Kanonik sinyal yolağı
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Mikro

1. GİRİŞ

Günümüzde, teknolojik araçlara fazla yönelimin olması, nüfusun artışı, yoğun stres ve radyasyon gibi çevresel faktörlerin etkisiyle insanların hücrelerinde genetik bozulmalar kansere neden olmaktadır.

Kanser, belirli zaman aralığında hücre genomunda ard arda gelen mutasyonlar sonucu oluşur. Çok basamaklı bir olay olan bu hastalığın patogenezinin daha iyi anlaşılması kanser metabolizmasının anlaşılmasıyla mümkün olacaktır. Ayrıca günümüzde uygulanan tedavilerin etkinliğinin artırılması için yeni terapötik hedeflerin tanımlanmasına ihtiyaç vardır.

TWIST1 geni, E kutusu (E-box) olarak isimlendirilen bir takım DNA elementlerini tanıyabilen bazik heliks loop heliks (bHLH) sınıfına ait bir transkripsiyon faktörüdür. TWIST1 geni iki ekzon ve bir introna sahiptir, ancak kodlama sekansı ilk ekzondan oluşur. Günümüzde TWIST1 geni kanser gelişimi ve metastazında anahtar rolü olan temel onkogen olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda kemoterapötik ilaçlara, radyoterapiye ve apoptozise direnci destekleyen önemli faktörlerden biridir. Bu nedenle TWIST1 geninin ifadesi ve fonksiyonu hakkındaki araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır. Son zamanlarda araştırmacılar kanser hücrelerinin metabolik özellikleri üzerinde yoğunlaşmaktadır. Yaptığımız literatür araştırmasında TWIST1'in glukoz alımındaki fonksiyonu ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlamadık. Bu nedenle çalışmamızı TWIST1'in glukoz alımını artırdığı hipotezi üzerine hazırladık.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser Nedir?

Kanser, sağlıklı hücrelerin çoğalması, sağkalımı ve gelişimi gibi yaşamsal fonksiyonlarının kontrol edilememesi sonucu meydana gelen, ölüm riski taşıyan bir komplike genetik bir hastalıktır. Kanseri hücreler hızlı bir şekilde çoğalabilen, çevresindeki dokulara yayılabilen ve bağımsız olarak hareket edebilen hücrelerdir (1). Kanseri türleri oluşum açısından benzerlik gösterse de gelişim ve yayılma açısından farklılık gösterirler (2).

2.1.1. Kanseri Genetiği

Normal hücrelerin hayati fonksiyonlarını sürdürebilmesi için, genlerin sağlıklı ve belirli bir koordinasyonda olması gerekmektedir (1). Hücre proliferasyonunu kontrol eden temel kontrol noktaları mevcuttur. Bunlardan biri G1 diğeri ise G2'dir. G1 evresinde alınan bölünme sinyali ile hemen replikasyon başlar ve hücre G1 evresinden S fazına geçer. G1 evresinde DNA replikasyonunun meydana geldiği S fazı için önemli olan proteinlerin sentezi gerçekleşir. G2 evresi ise mitoz için gerekli olan hazırlık aşamasıdır. Mitoz evresine giren hücrelerde mitozun kontrolü M kontrol noktası ile sağlanır (3).

Kanseri hücrelerden meydana gelmiş hücre kültürleriyle normal hücreler karşılaştırıldığında belirli genetik varyasyonlar saptanmaktadır. Genetiği farklılaşmış bu kanseri hücreleri 'Transforme' terimi ile nitelendirilmektedir. Transforme hücreler pH değişikliği, hipoksi, düşük serum düzeyi gibi daha ekstrem şartlara dayanıklıdır (4). Deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalara bakıldığında transforme kanseri hücre greftleriyle ilgili kanseri geliştirilebilmektedir. Bu bağlamda araştırmalarda kullanılabilecek birçok kanseri model organizmalar oluşturulmuştur (5). Karsinogenler hücrenin genetiğine doğrudan ya da dolaylı olarak etki ederler. Karsinogenler, hücre genomunda mutasyonları tetiklemesi ile hücre sağkalımında önemli olan protoonkogenlerin aşırı aktivasyonunu sağlayarak onkogenlere dönüşmesine sebep olur. Literatürde şimdiye kadar 100 onkogen tanımlandığı bilinmektedir (6).

2.1.2. Kanseri Oluşumu

Kanseri gelişiminde önemli olan temel genetik bozukluklar mevcuttur (7). Bu bağlamda kanseri genetiğindeki bazı temel kavramlar şunlardır;

Germline mutasyon; gonadlardaki eşey hücrelerinde (sperm, yumurta hücresi) ortaya çıkan genetik bozukluklardır. Bu mutasyon nesiller boyu aktarılabilir. Mutasyon

sadece eşey hücreleriyle sınırlı olmayarak diğer hücrelerde de bulunabilmektedir. Kalıtsal kanserlerden germline mutasyonları sorumludur (8).

Somatik mutasyon; bu tip mutasyonlar somatik hücrelerde görülmektedir. Kuşaktan kuşağa geçmez sadece etkilenen bireyle sınırlı kalır. Kalıtsal özellik içermeyen sporadik mutasyonlardan sorumludur (9).

Proto-onkogenler; hücrenin sağkalım, proliferasyon gibi olayları kontrol eden genlerdir (10). Transkripsiyon, büyüme ve gelişim faktörlerinde, apoptozisin sınırlandırılmasında, kromatin modifikasyonunda, hücre içi transfer mekanizmalarında işlev görmektedir (11).

Tümör süpresör (baskılayıcı) genler; hücrelerin çoğalmasını baskılayan genlerdir. Hücre siklusunu kontrol ederler ve gerektiğinde hücreyi apoptoze teşvik ederler (12).

Heterozigosite kaybı (loss of heterozygosity; LOH): İki allelden birinin kaybı durumudur. Örneğin, kalıtsal retinoblastomada, normal hücrelerde heterozigosite mevcutken, tümörlü hücrelerde LOH nedeniyle sadece mutant RB1 alleli mevcuttur (13). Kanserleşen hücrelerde normal RB1 allelinin bulunduğu 13q14 kromozomal bölgede bir allelde interstisiyel delesyon meydana gelmiştir. Çeşitli sporadik kanser türevlerinde, tümör süpresör genlerin olduğu birçok kromozomal alanlarda LOH gözlenmektedir (14). Örneğin; meme ve kolon kanserlerinde T53 kanser süpresör geninin olduğu 17p bölgesinde LOH durumu saptanmaktadır (13).

Onkogenezin birçok aşaması vardır, normal bir hücrenin kanser hücresine dönüşebilmesi için çok fazla mutasyona uğraması ve bu mutasyonların birikmesi gerekmektedir (15,16,17). Özellikle kolon kanseriyle alakalı yapılan çalışmalarda onkogeneze için tek bir genetik bozukluğun yeterli olmadığı, kanser süpresör genler ve proto-onkogen genlerde de çok sayıda mutasyon olması gerektiği görülmüştür (18,19). Onkogeneze evresi genetik anlamda çok aşamalıdır. Meydana gelen mutasyonlar, DNA tamir mekanizmasının yetersizliği, sporadik ya da çevresel etmenlerle oluşabilmektedir (20).

2.1.3. Kanser Yolakları

Kanserin oluşmasına sebep olan 250'den fazla genin olduğu düşünülmektedir (21). Bu genler hücrede birçok sinyal yolağında görev alırlar. Bu yolaklar normal hücrelerin yaşamsal fonksiyonlarını ve metabolizmalarını kontrol etmektedirler (22). Kanser yolaklarını kısaca tanımlamak gerekirse; bir kanserin gelişmesi için genetik olarak en az bir kez mutasyonla aktivasyona ihtiyaç duyan regülatör sistemlerdir (23).

Farklı kanser türlerinde aynı yolak farklı gen bölgelerinin mutasyonları neticesinde de kontrolsüz aktive olabilmektedir. Kanser yolakları; genel olarak MAPK, PI3K, TP53, RB, TGF β , JAK/STAT, NF κ B, WNT, SHH, NOTCH sinyal yolaklarıdır (23,24) (Tablo 2.1). Bu yolakların her biri birbiriyle bağlantı halindedir (25). Bu iletişime bakıldığında hücrede homeostaz açısından önemli fonksiyonları vardır (26).

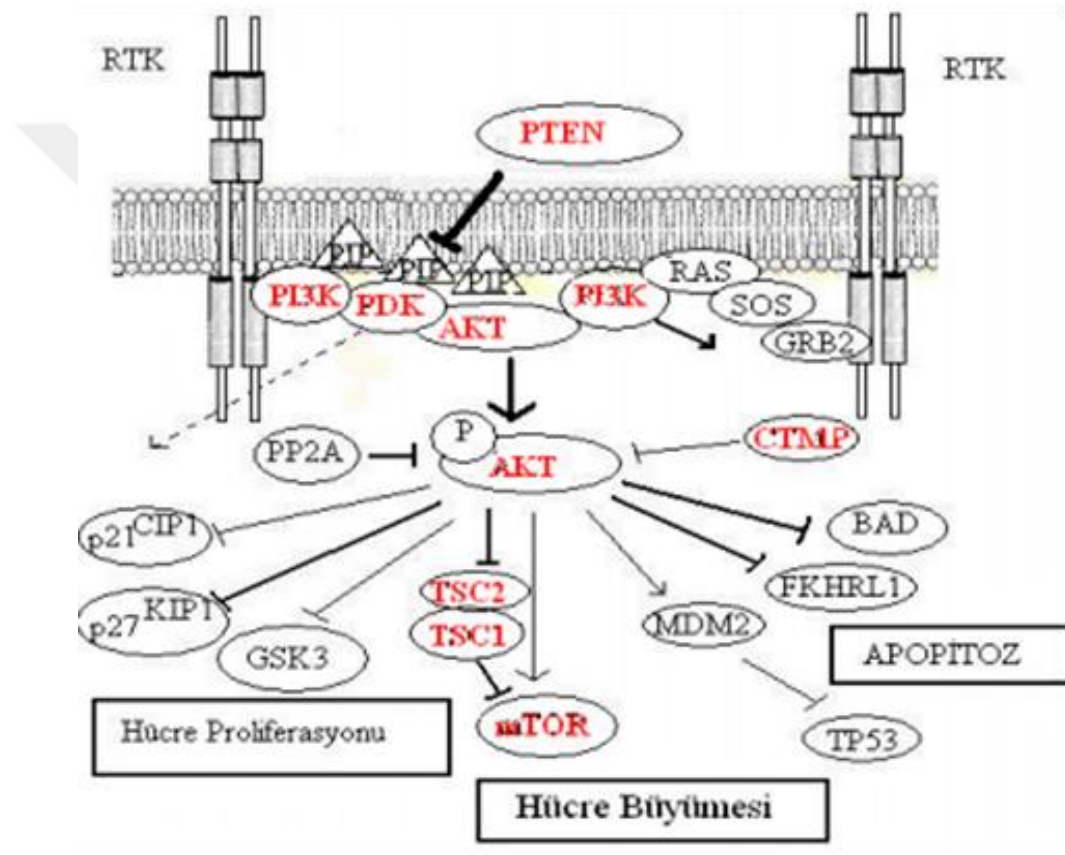
Tablo 2.1. Kanserde önemli olan bazı temel yolaklar (23).

Yolak veya Ağ	Görüldüğü Kanserler	Yolaktaki onkogen proteinler	Yolaktaki Tümör süpresörler	Açıklama
MAPK Yolağı (Standart)	Birçok	RAS.BRAF (MYC)		Onkogenik reseptör tirozin kinazların efektörleridir
PI3K Yolağı	Birçok	P13K. AKT	PTEN.CTMP	Onkogenik reseptör tirozin kinazların efektörleridir
TP53 ağı	Birçok	MDM2/HDM2	TP53.ATM.BAX	
RB1 ağı	Birçok	Cyclm D1.CDK4, (MYC)	RB1.p16 ^{NKAA} P15 ^{INK48} , p57 ^{KP2}	
TGF β Yolağı	Karsinomlar, bazı yumuşak doku kanserleri, bazı lösemiler		TGF β RII, SMAD2. SMAD4. RUNX	Karsinomda inaktive olmuş, yumuşak doku kanserinde aktive olmuştur.
JAK/STAT Yolağı	Bazı karsinomlar, birçok lösemi ve lenfomada	STAT3. STAT5(?)	STAT1(?). SOCS1	Onkogenik Sitokin Reseptörleri ve füzyon proteinlerinin efektörleridir
NF κ B Yolağı	Bazı lösemiler, birçok karsinomlar	REL proteinleri	CYLD	Etki büyük oranda hücre tipi ve içeriğine bağlıdır.
WNT Yolağı	Kolon. Karaciğer, meme, mide ve diğer karsinomlarda	WNT1, β -Catenin	APC.AXIN	E-Kaderin ve SFRP'lerce modüle edilir
SHH Yolağı	Spesifik deri, beyin ve akciğer kanserleri	SHH(?).SMO. GU1(?)	PTCH1.PTCH2 SUFU	
NOTCH Yolağı	T-hücre lenfomaları, karsinomlar	NOTCH 1	NOTCH 1	Etki büyük oranda hücre tipi, içeriği ve gen dozajına bağlıdır.

MAPK sinyal yolağı, RAF, MEK ve ERK protein kinazların aktivasyonu sonucunda meydana gelmektedir (26). MAPK yolağı özellikle hücre proliferasyonu için gereklidir. Bu yolaklar reseptör tirozin kinazlar (RTK) ile başlatılan sinyalleri hücre içine ve çekirdeğe aktarırlar, böylece gen ekspresyonları yeniden düzenlenmiş olur. Kanser hücrelerinde, özellikle RAS'ın aktivitesi sonrasında da MAPK sinyalleşmesi yüksek aktivasyon göstermektedir (27). UV ışınları gibi fiziksel ajanlarla ve çevresel

kimyasal etmenlerle ortaya çıkan oksidatif strese bağılı olarak RAS proteinleri aktif hale gelir. Bu aktivasyon sonucunda MAPK yolağı yanı sıra RAC veya CDC42 gibi hücrel olayları regüle eden GTP proteinlerini aktive ederler (28).

Hücrede önemli fonksiyonları olan bir diğ er sinyal yolağı da PI3K yolağıdır (Şekil 2.1). PI3K yolağı, RTK fosforilasyonu ile aktive olur (29). PI3K sinyalizasyonu, organizmanın metabolizmasının kontrol edilmesinde ve özellikle glukozun transferinde ve kullanımında, hücrel gelişimlerin denetlenmesinde, proteinlerin biyosentezi ve apoptozun inhibe olmasında rol oynamaktadır (30).



Şekil 2.1. Fosfo-inositol 3 Kinaz (PI3K) yolağı (29).

Apoptozisi regüle eden önemli bir protein olan TP53 proteini kanser gelişiminde oldukça temel proteinlerden biridir. TP53, ekstrinsik ve intrinsik mekanizmalarla aktive edilen apoptozis olayında bir çok proteinin birleşme noktasıdır (29). DNA hasarı durumunda TP53 intrinsik olarak aktive edilir. Bu aktivasyonda DNA hasarı ile aktifleşen çeşitli protein kinazların önemli rolü vardır (30,31).

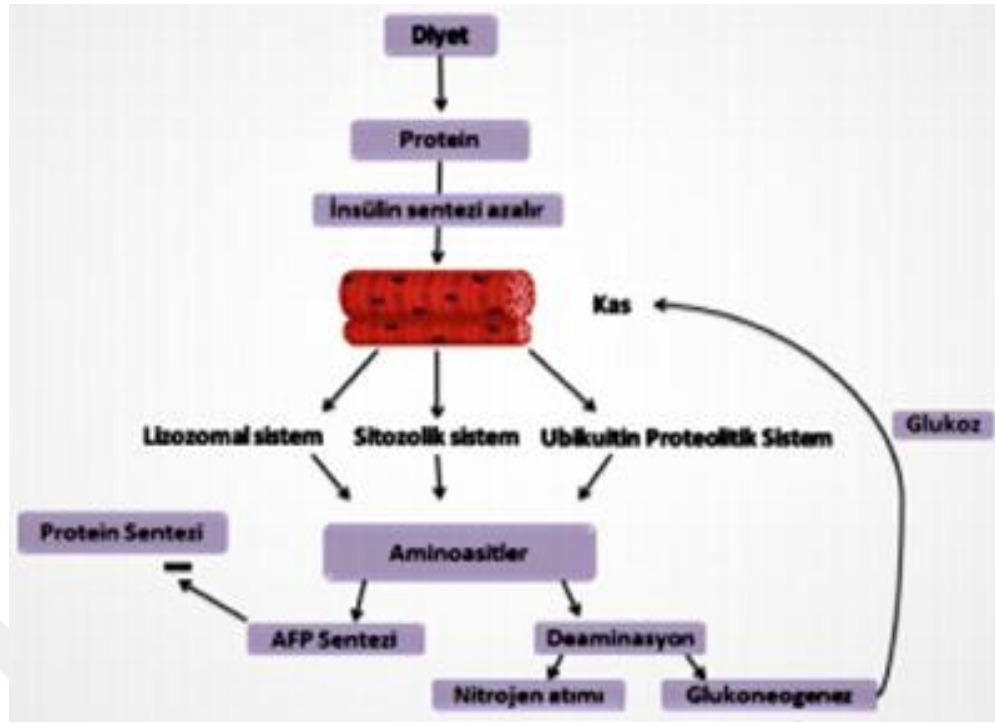
2.2. Kanser Metabolizması

Kanser progresyonu hücrel olaylar sonucu meydana gelen sekonder metabolitlerin etkileri ile ilerlemektedir (32). Kanser hastalarının mortalite nedenlerine bakıldığında %60'ı kilo kaybetmeye bağlı, diğer kısmı ise kaşeksiye bağlıdır (33). Kaşeksinin genel tanımı, progresif anlamda işlevsel bozukluk meydana getiren, tamamen geri dönüşümü olmayan, iskelet kasında doku kaybının yaşandığı bir durumdur (34). Kaşeksiye neden olan en önemli faktör anoreksi denilen iştahsızlık durumudur (35). Sağlıklı bireylerde ghrelin hormonu iştahı yükseltirken, kanserli hastalarda tam tersi etki yaratmaktadır. Anoreksinin oluşması iştah duygusunu veren peptidlerin azalmasından meydana gelmektedir (36). Hastalara kemoterapi ve radyoterapi uygulanması anoreksi gelişimini arttırmaktadır (37).

Hipotalamusun ventromedial nukleusundaki serotonerjik nöronlar tokluk duygusunu, lateral nukleusundaki dopaminerjik nöronlar da açlık duygusunu verir (38). Kanser durumunda immün sistem tümör nekrozis faktör (TNF) ve interleukin (IL) üretimini yükseltir ve omurilik sıvısındaki triptofan seviyesini artırır. Yani omurilik sıvısındaki serotonin oranı yükselir ve tokluk hissiyle beraber anoreksi gelişir (38,39). Bu anoreksik etkiler, kanserli bireylerin besin alımını kısıtlamasının yanında, metabolik dengenin bozulmasına, vücudun protein değerlerini kaybetmesine ve kaşeksiye neden olur (39).

2.2.1. Kanserde Protein Metabolizması

Proteinlerin diğer biyomoleküllerden farkı, yapılarında diğerlerine göre fazla oranda azot bulunmasıdır. Kanserli hücreler sağlıklı hücrelerden kendilerine sürekli azot transferi yaparlar. İskelet kaslarında protein metabolizmasının aktif olmasının sebebi, insülin seviyesindeki düşüştür ve buna bağlı olarak iskelet kaslarında 3 proteolitik yoldan birisi aktif hale gelir (Şekil 2.2) (40).



Şekil 2.2. İnsülin duyarlılığı ile protein metabolizması arasındaki ilişki (40).

Bu üç proteolitik yolak lizozomal sistem, kalsiyumla aktifleşen sitozolik sistem ve ATP'ye bağlı olan proteolitik sistem olarak sıralanabilir:

1. Lizozomal Sistem: Ekstrasellüler proteinleri ve hücre yüzey reseptörlerinin proteolizinde görev alır.

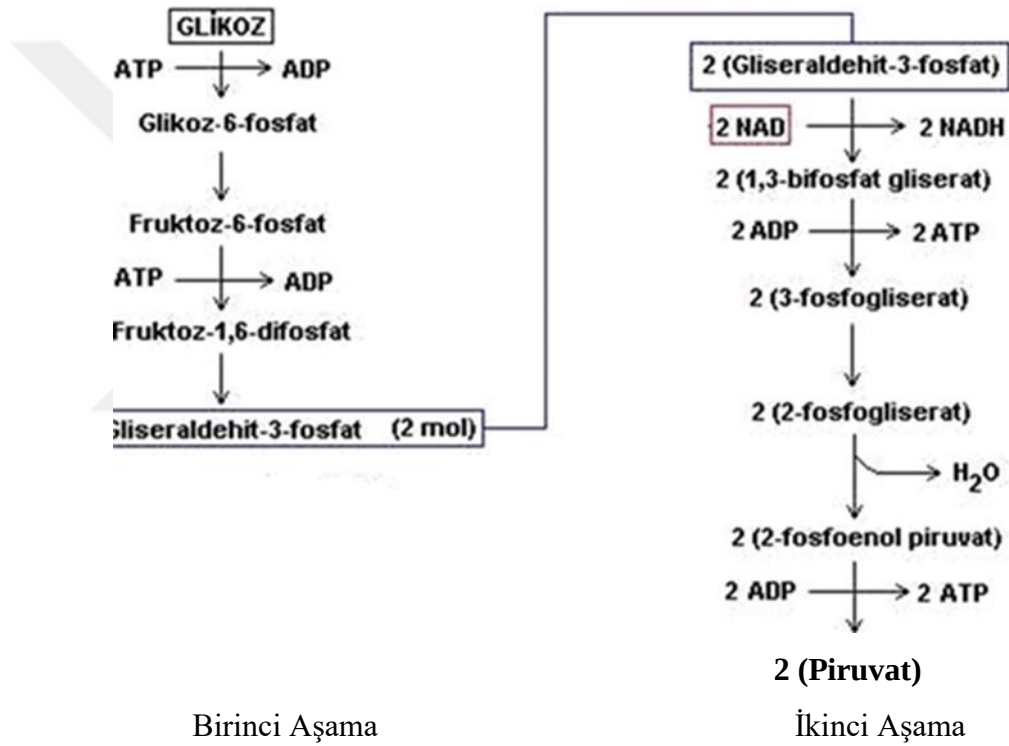
2. Kalsiyumla Aktif olan Sitozolik Sistem: Nekrotik yaralar, dokulardaki hasarlar ve otolizin oluşumundan sorumludur.

3. ATP'ye bağlı Ubikuitin Proteolitik Sistem: Tüm ökaryotik hücrelerde var olan 76 aminoasit rezidüsünden meydana gelen ubikuitin, sıcaklığa dayanıklı bir protein grubudur. Normal olmayan proteinlerin yıkımı için onları proteozomlara iletir. Proteinlerin yıkıma gönderilmeden önce işaretleme yapılır (41). Ubikitin ve lizin rezidüsü arasında ATP'ye bağlı bu işaretleme meydana gelir. Ubikitin işaretlenmiş olan protein, proteozomlarda proteolitik faaliyetler ile degrade edilir (42).

2.2.2. Kanserde Karbonhidrat Metabolizması

Kanser vakaları incelendiğinde karbonhidrat metabolizmasında birçok farklılığın olduğu görülmektedir. Bu değişiklikler kanserin tanısı ve tedavisinde kullanılan yöntemlerin optimize edilmesini sağlar (43). Örneğin; kanser teşhisinde tanıda kullanılan PET yöntemi yüksek glikoz kullanımı ile ilişkili olan kanser hücrelerini saptamak için kullanılır (44).

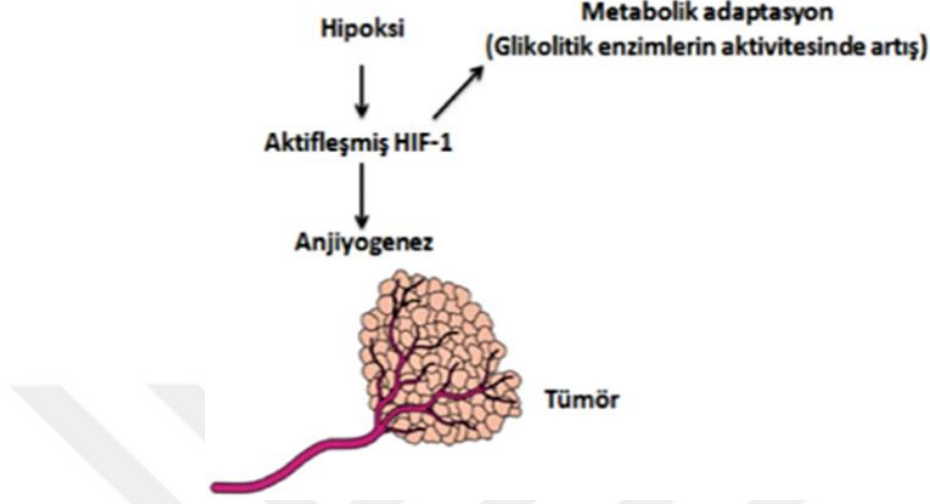
Kanserli vakaların biyokimyasal verileri hipoglisemiye işaret etmektedir. Bunun nedeni ise, kanserogeneze süresince glikolitik yolların yüksek aktivasyonudur (45). Anormal seviyelerde hücre proliferasyonunun ve gelişimin meydana geldiği tümör dokularında yetersiz perfüzyon sonucu hipoksi oluşur (46). Hipoksik ortam kanser hücrelerinde hipoksik sinyal yollarını aktive ederek anjiogenezi destekler. Meydana gelen yeni kan damarları aracılığıyla tümör dokusuna glikoz gibi besin maddelerinin iletilmesi artar. Kanser hücrelerinin glukozu alma seviyeleri normal hücrelere oranla 5-10 kat daha fazladır. Yani kanser hücrelerinde glikoz alımı ve karbonhidrat metabolizması yüksek düzeyde aktiftir (Şekil 2.3) (47).



Şekil 2.3. Karbonhidrat metabolizmasının şematik gösterimi (187,188).

Kanserli hücrede proliferasyon seviyesindeki artışın yanında aerobik ve anaerobik glikoliz yolları da oldukça aktiftir. Glikolizde piruvattan laktat sentezi daha da artmış durumdadır ve buna Warburg etkisi denir (48). Anaerobik ortamda bu durumun meydana gelmesinde asıl işlevi olan özel bir transkripsiyon faktörü mevcuttur. Hipoksi ile indüklenebilen faktör-1 alfa (HIF-1 α) olarak isimlendirilen bu faktörün asıl amacı kan damarlarındaki gelişimi sağlamak ve metabolik homeostazinin yerine gelmesidir (49). HIF-1 α , glukoz metabolizmasıyla beraber aminoasit ve nükleotid metabolizması ve pH kontrolünden de sorumludur. Vasküler endotelial büyüme faktörü

(VEGF) transferi üzerinden anjiyogenezi kontrol altına alır. Bunlara ek olarak, ekstraselüler matris (ECM) metabolizması ve hücre adezyonunda, ilaç direncinin gelişiminde görev alır (Şekil 2.4) (50,51).



Şekil 2.4. HIF-1α'nın hipoksik ortamda tümör hücrelerindeki etkisi (186).

2.2.3. Kanserde Lipit Metabolizması

Kanserde lipid metabolizmasındaki değişim neticesinde kilo kaybı ve kaşeksi gelişimi meydana gelir. İştah kaybı sonucu açlık durumu, glukoz yetersizliği sonucu adrenalın hormonuna bağlı olarak kan plazmasında serbest yağ asidi konsantrasyonu artar (52). Bu durum lipid metabolizmasında hiperaktivitenin oluşmasına neden olur (52,53).

Lipid mobilize edici faktör (LMF), adipoz dokuyu oksidasyona uğratarak serbest yağ asitleri (FFA) ve gliserolün meydana gelmesini sağlar. Aynı zamanda glukozun azlığına bağlı olarak gelişen hipoglisemi artışı da adipoz dokuda değişikliklerin meydana gelmesine neden olur (54). Proteolizi indükleyici faktör (PIF) iskelet kasında proteinleri otolize eder. Bunun yanında TNF-α glukoneogenezi, lipolizi ve proteolizi aktif hale getirirken glikojenezi, lipogenezi ve protein sentezini inhibisyona uğratar. Bu değişkenlerin hepsi kaşeksiye neden olduğundan TNF-α kaşektin olarak da isimlendirilir. Makrofajlardan salınan TNF-α'nın lipoprotein lipazı durdurduğu ve lipid depolanmasını önlediği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (55).

Ayrıca kanserde sağlıklı hücrelerde olmayan, atipik lipidler oluşturulur. Bunlardan biri dezmosteroldür. Bu lipid, kolesterolün meydana gelme sürecinde bir ara molekül olup, normalde sadece fetus beyinde saptanmıştır (56). Glioblastoma tanısı almış hastaların beyin dokusunda dezmosterol oranının yükseldiği saptanmıştır. Fukolipid

ise fukoz ihtiva eden bir lipiddir. Günümüzde fukoz kanser belirteci olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda, kanserde oluşumunu tamamlamış, çift bağ içeren normalin dışında glikosfingolipid oluşumu da görülebilir (57). Karbonhidrat dizisindeki değişimler sialik asidin gliloproteinlere yapışmasını etkiler. Yapılan incelemelerde, kanser süreci ile metastaz oluşumu ve sialik asit ile çok güçlü bağlar oluşturdıkları belirtilmiştir (58,59).

2.2.4. Adenozin Trifosfat (ATP)

Normal hücrelerde dinlenme (resting) süreçlerinde yalnızca enerji birikimi yapılırken, proliferen olan hücreler enerji üretimiyle birlikte yeni makro moleküllerin sentezi gerçekleşir ve hücrel redoks dengede tutulur. Kanser hücrelerinin metabolik süreçleri atipik özelliktedirler. Hızlı bir şekilde proliferen olabilen kanser hücreleri, bir molekül glikozdan sağlanan ATP miktarının yeterli olmamasına rağmen glikozu oksijensiz ortamda laktata çevirebilirler. Bu etki yükselen glikoz alımıyla birlikte nükleozitlerin ve aminoasitlerin birikmesine destek olmakta ve enerji üretimini kolaylaştırmaktadır (60).

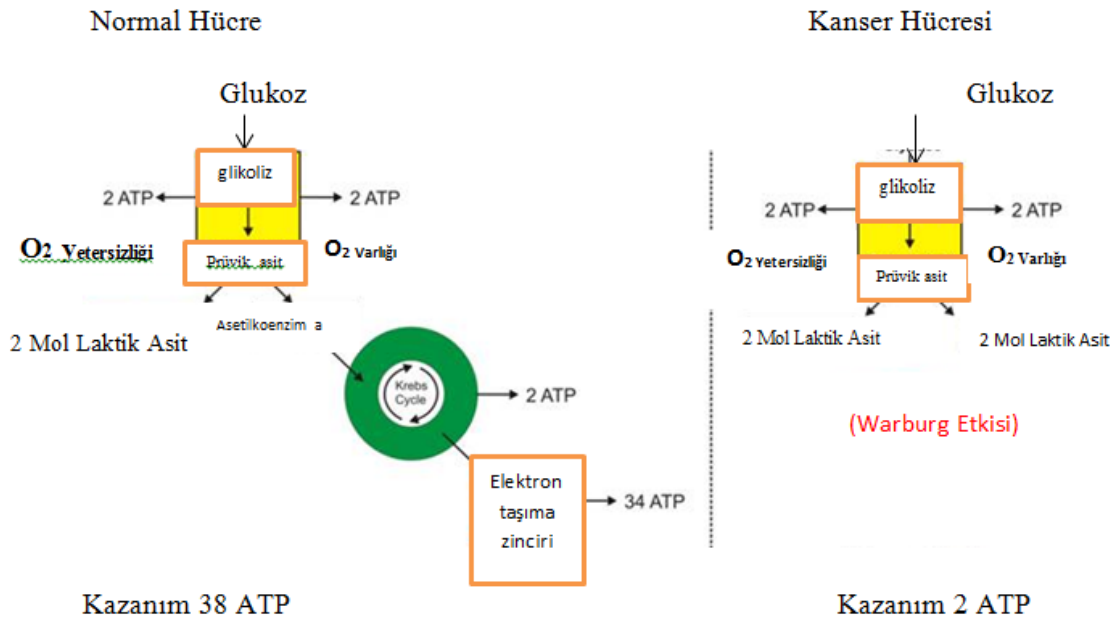
Kanser hücrelerinde, ATP'nin oluşması ve yıkılması metabolik süreçlerin devamı için önemlidir. Glikozun çeşitli taşıyıcılarla hücre içine taşınması, bazı protein formlarının metabolik süreçte işlev görebilmesi için ATP varlığına ihtiyaç vardır (61). Kanserli hücrelerde kaşeksiye bağlı lipid seviyesinin düşmesi ATP metabolizmasında da değişikliklerin olmasına neden olur. Normal hücrelerin dinlenme hallerine göre bile daha az seviyede ATP üretimi olur. Dinlenme dönemlerinde normal hücrelerin metabolik yolları, homeostatik dengelerini ATP'den elde ettikleri enerji ile karşılarlar (62). Buna rağmen proliferen halinde olan hücreler enerjiyi yalnızca hücrenin kendini çoğaltması için değil, aynı zamanda makromoleküllerin biyosentezinin gerçekleşmesi için de kullanmaktadırlar (63,64).

2.3. Aerobik Glikoz

Kanser hücrelerinin gelişmesi ve yayılması metabolik yollarla olur. Burada glikoz ve glutamin alımı önemlidir. Kanser hücresi, yoğun hücrel faaliyetlerini karşılamak için metabolik süreçleri yeniden düzenler. Metabolik değişiklikler, büyük oranda normal proliferen olan hücrelerle benzer olduğu halde, kanser hücrelerinde genetik bozukluklar ve genetik olmayan faktörlerin birleşmesi sonucu kontrolsüzce artar (65).

Kanser hücrelerinin atipik metabolik özelliklerinin olduğu Otto Warburg'un 20. YY. ilk dönemlerinde yaptığı araştırmalar sonucunda anlaşılmıştır. Normal hücreler

aerobik ortamda glikozu, pirüvata glikolizis yolunu kullanarak okside eder ve meydana gelen pirüvatın büyük bir kısmı mitokondride yakılarak karbondioksit'e çevrilir. Bu döngü sonucu elde edilen net 36 ATP 'dir. Oksijensiz koşullarda ise, normal hücreler ise glikolitik piruvatı laktata çevirir (65). Hızlı proliferasyon yapan kanser hücrelerinin, üretilen bir molekül glikozdan sağlanan 2 mol ATP miktarının yetersizliğine rağmen glikozu aerobik ortamda laktata çevirebilir. Bu teorem bilimsel anlamda "Warburg etkisi" veya "aerobik glikoliz" olarak isimlendirilir (Şekil 2.5). Kanser hücrelerinde bahsedilen birçok metabolik olayın sebebi Warburg etkisidir. Kanser hücrelerinin bu davranışı aslında zarar verici gibi gözükse de kanser dokularında fazla miktarda glikoz alımı aminoasitlerin üretimine olumlu yönde etki etmekte ve enerji üretimi sağlamaktadır. Bunun yanında, laktat yalnızca atık ürün değil, hücre göçünün sağlanması ve radyoaktif direncin oluşması gibi durumlarda da görev alır (67). Glikoz katabolizması, kanser metabolizmasında bir belirteç olarak ifade edilse de bu metabolizmada tek başına işlev gördüğünü söylenemez (68).



Şekil 2.5. Kanser hücrelerinde Warburg etkisinin şematik gösterimi (189).

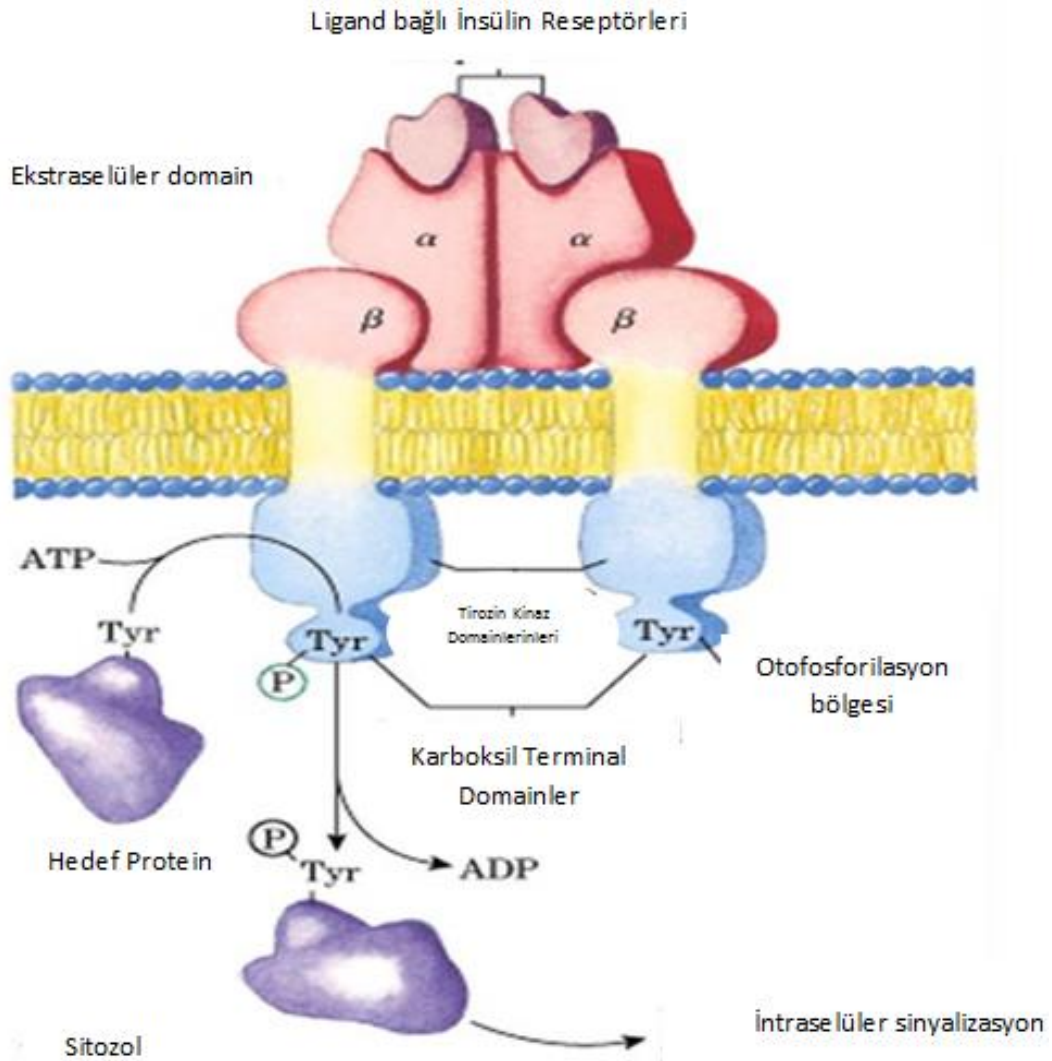
İnsanda hücre içine glikoz taşınımı birçok dokuda insülinin etkisiyle meydana gelir. İnsülinin görevini tam anlamıyla yapabilmesi için pankreastaki β hücrelerinden sekrete olması ile dolaşıma ve hedeflenen dokulara geçmesi gerekir. Glikoz transfer mekanizması hücre membranındaki reseptörler ve hidrojen ATPaz ile gerçekleşmektedir (64). İnsülin, etki edeceği hücre membranındaki insülin reseptörüne

bağlanır. İnsülin reseptör aktivasyonu ile insülin reseptör substrat-1 ve -2 (IRS-1,-2) fosforile edilerek aktive edilir. Kanserde IRS1 ve IRS2 aktivasyonu glikoz alımı ile beraber metastazda da işlev gördükleri bilinmektedir. IRS proteinleri son derece homolog olsa da her bir IRS'nin farklı hücresel görevleri vardır. IRS sınıflandırmasında IRS1,2,3 ve 4 olmak üzere dört protein olduğu bilinmektedir. Ancak insüline bağlı glikoz alımında IRS1 ve 2 büyük önem arz etmektedir (69).

2.4. İnsülin Sinyal Yolu

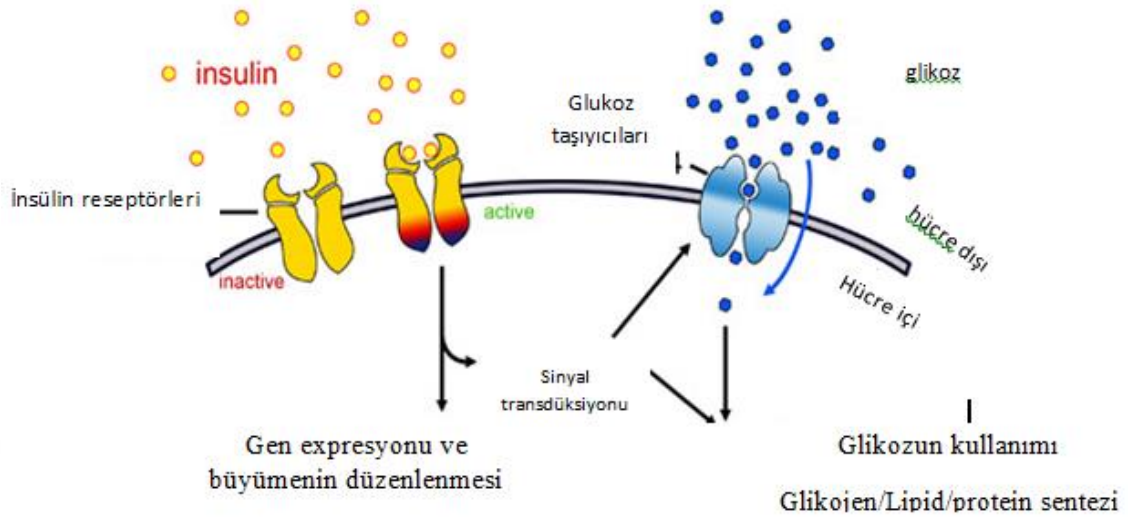
2.4.1. İnsülin Reseptörü (IR)

İnsülin, pankreasta bulunan Langerhans adacıklarında bulunan β hücreleri tarafından salgılanır. Kan dolaşımına salgılanan insülin hormonu glikozun hücre içine alımında etkilidir. İnsülin, hücre zarındaki insülin reseptörlerine (IR) bağlanarak reseptörlerin dimerizasyonunu ve aktivasyonunu sağlar (Şekil 2.6) (70).



Şekil 2.6. İnsülin reseptör yapısı (190).

Aktive olan IR yolağı, sitoplazmadaki glukoz taşıyıcı proteinleri hücre membranına transloke eder ve glukozun hücre içine girişini kolaylaştırır (Şekil 2.7).

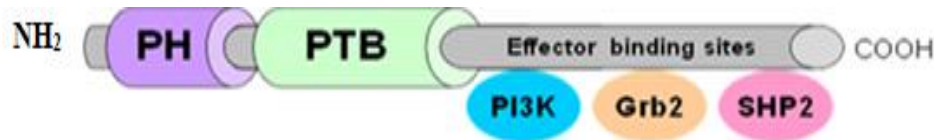


Şekil 2.7. İnsülin reseptörü aktivasyonu sonucunda glikozun hücre içine alınması (191).

IR sinyal yolağının hücre içindeki sinyalizasyonun devamını insülin reseptör substrat (IRS) proteinleri sağlar. IRS'ler aktive olmuş IR'ne bağlanarak tirozin kinaz aktivitesi ile fosforile olarak aktive olurlar. IRS proteinleri kanserde insülin bağımlı glukozun taşınmasında sorumlu adaptör proteinlerdir. IRS akciğer, prostat ve meme gibi farklı kanser türlerinde işlev gördüğü bilinmektedir (Şekil 2.7) (70).

2.4.2. İnsülin Reseptör Substrat-1 (IRS-1)

İnsanlarda insülin reseptör substart 1 (IRS-1) geni tarafından kodlanan bir sinyalleme adaptör proteindir. 1242 amino asitten meydana gelen 131 kDa büyüklüğünde bir proteindir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. İnsülin reseptör substrat-1 (IRS-1) protein yapısı (192).

IRS1 protein yapısında, N-terminalinde pleckstrin homoloji (PH) domaini ve fosforilasyon bağlanma (PTB) domaini içerir. Devamında fosfoinositol 3 kinaz (PI3K), Src-homoloji domain 2 (SH2) taşıyan Grb2 adaptör proteini ve C-terminal bölgede SH2 domaini içeren fosfataz 2 (SHP2) bağlanma bölgesi bulunur. IRS1, IR aktivasyonu neticesinde reseptördeki NPXY motifine, PTB domaini ile bağlanır ve tirozin (Y)

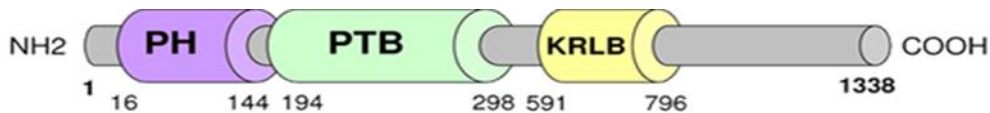
aminoasitlerinden fosforillenir. Bu fosforilasyon neticesinde efektör proteinler IRS1'e bağlanır ve PI3K, MAP Kinaz gibi sinyal yolları aktive olabilmektedir. Bu yollar hücrede gen ekspresyon düzenlenmesini, sağkalımı, hücre göçünü, glikoliz gibi metabolik olayları kontrol etmektedir (71,72,73).

IR sinyal yolağının kontrolü IRS1 degradasyonu ile de sağlanabilmektedir. IRS-1'in hücresel yıkımı, Cullin7 E3 ubikuitin ligaz ile ubikuitinlenmesi sonucunda proteozomlarda gerçekleşir (74). IRS1 degradasyonu mevcut IR sinyal yolağının aktivasyonunu olumsuz yönde etkiler. İnsülin uyarımına rağmen sinyal yolağının inhibisyonu veya yavaşlaması neticesinde insülin direnci de tetiklenebilmektedir. Alternatif olarak IRS1'in O-glikozilasyonu ve sitokin baskılayıcı proteinleri (SOCS) IR'ne bağlanmasını engeller (75).

IRS-1 yüksek ekspresyonu birden fazla kanser türü ile ilişkilendirilmiştir. Transgenik fare modellerinde IRS1'in glikoz metabolizmasında önemli görevler üstlendiği bulunmuştur (72). Bu araştırmaların çoğu meme kanseri modellerinde yapılmıştır. Fare meme bezinde IRS-1'in yüksek ekspresyonu meme dokusunda hiperplaziye neden olmuş ve tümörigenez sürecini başlatmıştır. IRS1 knock out transgenik fare modelleri (PyV-MT) ile yapılan çalışmalarda, meme kanseri progresyonunun önemli oranda azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre IRS1 önemli bir terapötik hedef olarak değerlendirilmektedir (72,73).

2.4.3. İnsülin Reseptör Substrat-2 (IRS-2)

İnsülin reseptör substrat 2 (IRS-2) IRS1 gibi IR sinyalinde görevli adaptör proteindir. IRS-2 geni, 1338 aminoasitten meydana gelen 137,3 kDa büyüklüğünde bir proteini kodlar (Şekil 2.9). IRS2, ilk defa IRS1-/- farelerde insülin büyüme faktörü (IGF) stimülasyonu sonucunda IGFR yolağını aktive eden alternatif adaptör protein olarak tanımlanmıştır. IRS2, mitojenik ve anti-apoptotik sinyal yollarını aktive edebilmektedir. Son yıllarda, IRS2'nin hücre proliferasyonu, klonojenisite, metabolizma ve sağkalım üzerindeki etkileri açığa çıkarılmıştır (76,77,78).



Şekil 2.9. İnsülin reseptör substrat-2 (IRS-2) protein yapısı (192).

IRS2, IRS1 ile yüksek homoloji gösterir ve yapısında benzer şekilde bir PH domaini ve bir PTB domaini mevcuttur. PH domaini, hücre zarındaki fosfolipidlere

bağlanmasını sağlar. PTB domaini ise, reseptör aktivasyonuna yol açan fosfo-tirozin aminoasitlerinin olduğu motiflere bağlanmayı sağlar. Farklı olarak, yapısında bir kinaz düzenleyici bağlama bölgesine (KRLB) sahiptir (Şekil 2.9) (79,80,81).

Xenograft modellerde IRS1'in baskılandığı durumlarda meme kanserinde hücre invazyonu ve metastazının azalmadığı gösterilmiştir. Aynı zamanda IRS2'nin eksprese edilmediği sadece IRS1 ekspresyonu gösteren hücrelerde ise IRS1 baskılanması hücre invazyonunun azalmasına neden olmuştur. Bu durum IRS2'nin de hücre göçünde ve invazyonunda önemli rolü olduğunu kanıtlamaktadır. Ayrıca IRS2 GLUT1 ekspresyonunu tetikleyerek aerobik glikoliz metabolizmasına katkı sağladığı ve tümörigenezi desteklediği saptanmıştır (82,83).

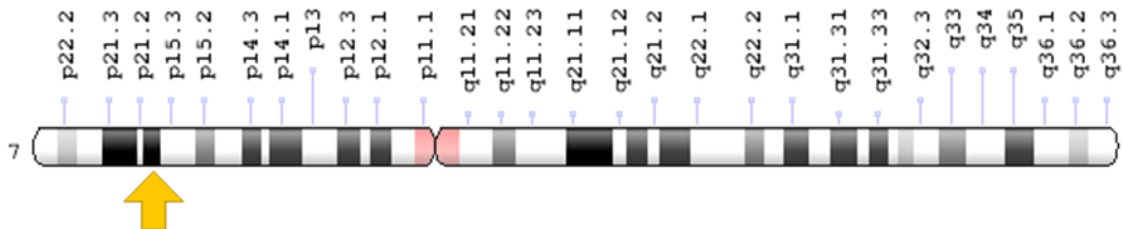
IRS1 ve IRS2 ekspresyonu baskılandığında metastatik sekonder odaklarda düşüş olduğu gözlenmiştir. Metastatik yolların aktivasyonunda TWIST1 transkripsiyon faktörünün önemli rolü olduğu günümüzde bilinmektedir. Yapılan araştırmalar TWIST1 ve IRS-1/-2'nin metastaz gelişiminde korele çalıştıklarını göstermektedir (84).

2.5. İnsan TWIST1 Yapısı ve Hücresel Fonksiyonları

2.5.1 TWIST1 Geni

TWIST1 geni, bazik helix-loop-helix (bHLH) yapısında olan bir transkripsiyon faktörünü kodlar. TWIST1 transkripsiyon faktörü, erken gelişim dönemlerinde protein oluşumunu sağlayan önemli bir faktördür. *Drosophila melanogaster*'de mezodermin gelişimi için gerekli olan bir gen olarak tanımlanmıştır (85, 86).

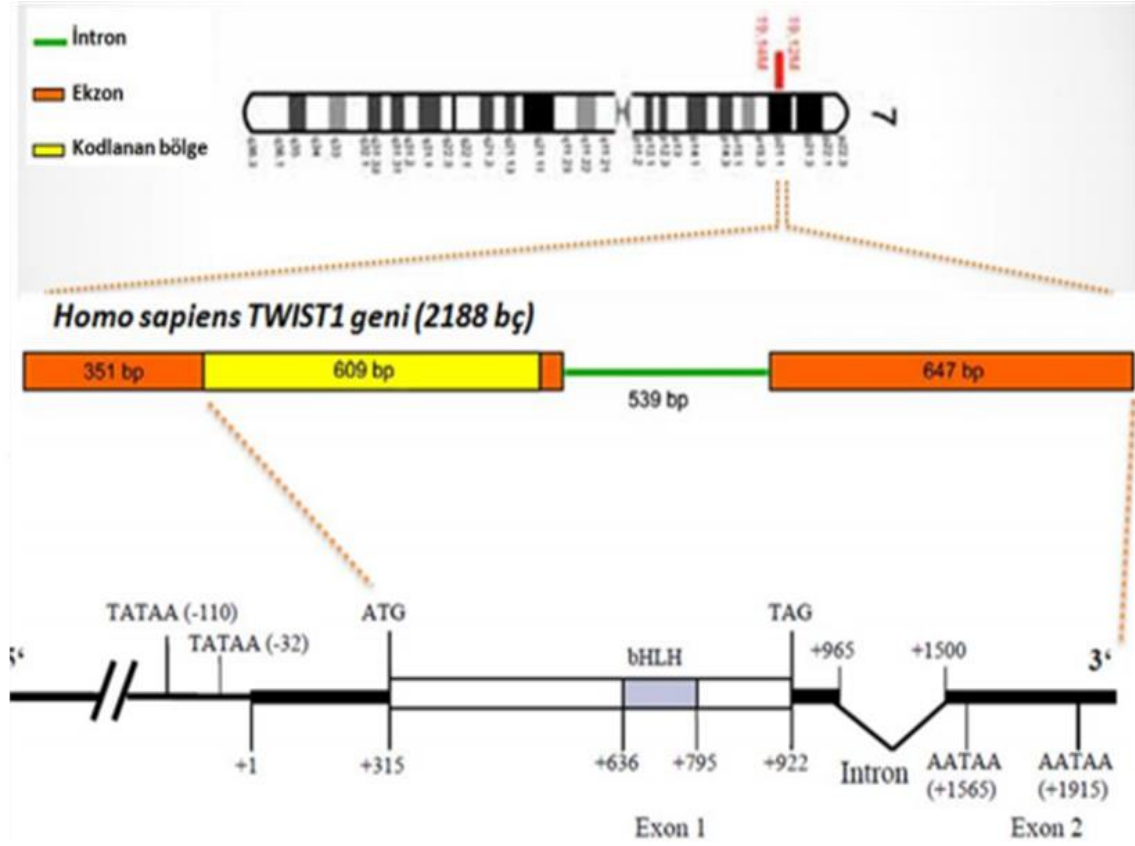
İnsan TWIST1 geni 7p21'de lokalize (Şekil.11), 2188 baz uzunluğunda iki ekzondan (960 bç ve 647 bç) ve bir introndan (539 bç) meydana gelmiştir (Şekil 2.10) (87).



Şekil 2.10. TWIST1 geninin kromozomal lokalizasyonu (87).

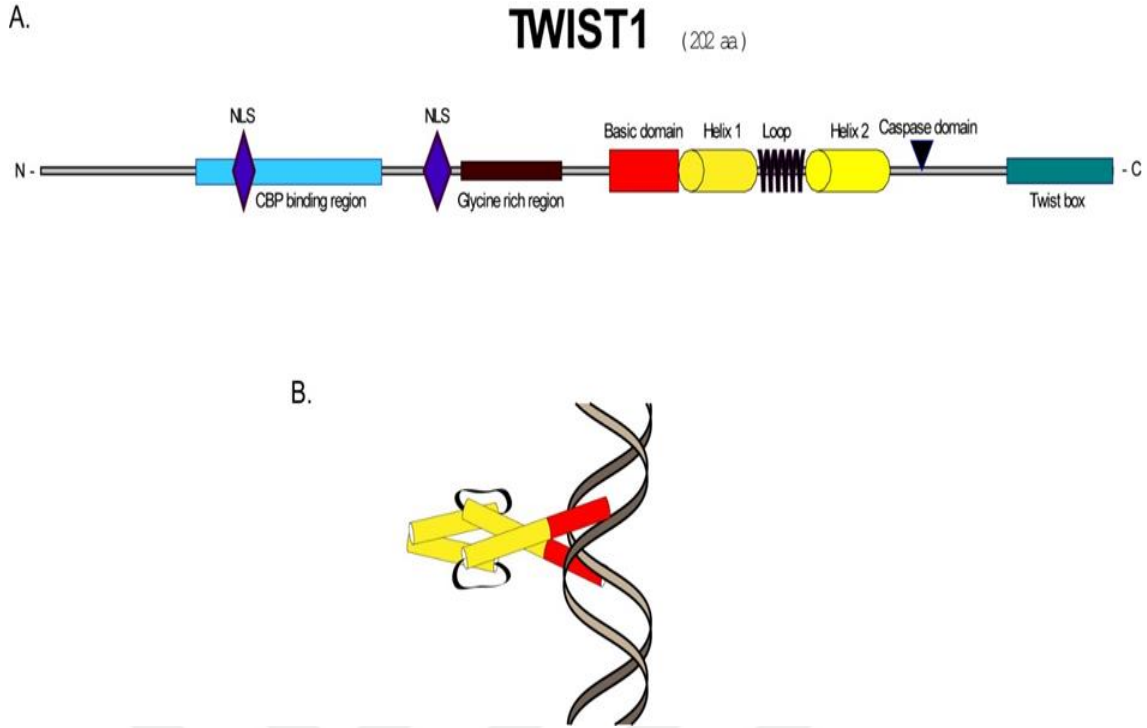
TWIST1, iki ekzonik bölgeden sadece birinci ekzon bölgesi kodlama bölgesidir (88). Bu bölge 609 bç uzunluğunda bir mRNA dizisini ifade eder. Başlangıç metiyonin

kodu +315, sonlanma kodu ise +922 bölgesindedir. bHLH domain yapısı ise +636 ve +795 bazları arasındaki gen bölgesinden kodlanır (Şekil 2.11) (89).



Şekil 2.11. İnsan TWIST1 gen yapısı (88,89).

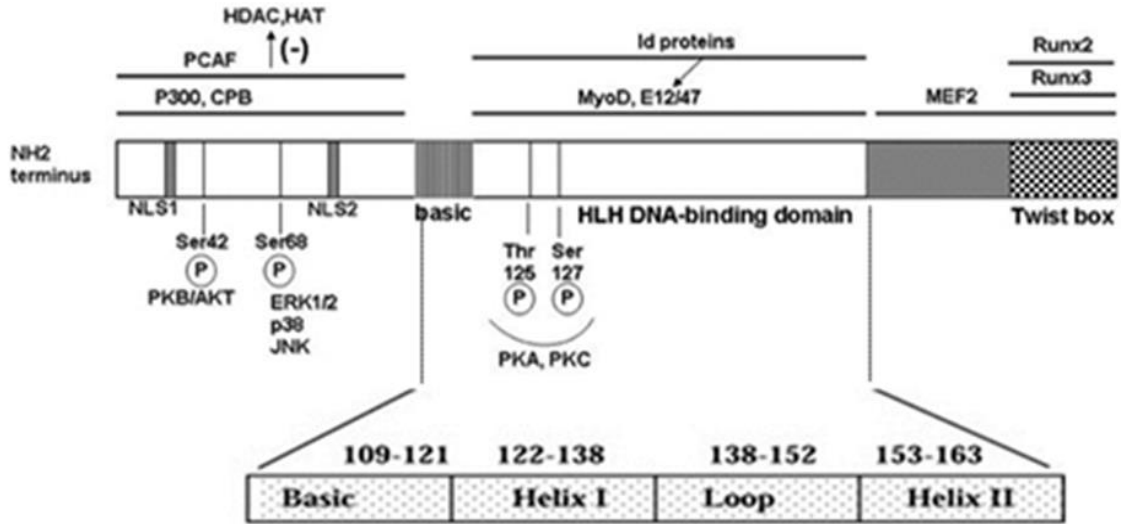
TWIST1 gen ekspresyon kontrolünü sağlayan promotor dizisinde TATAAA (-32) ve TATAAA (-110) dizileri bulunmaktadır. mRNA dizisinde 5' UTR dizisi, +1 ile +315 bazlarını kapsayan bölgedir ve mRNA'nın sitoplazmaya geçişi ve ribozomlarda doğru translasyonunu sağlar (Şekil 2.12).



Şekil 2.13. Twist1 protein yapısı (A) ve bHLH motifi ile DNA'ya bağlanması (B) (90).

TWIST1, E-kutusu adı verilen 'CANNTG' motifine sahip DNA dizilerine bağlanarak ilgili genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu düzenler(90). Bu fonksiyonel bağlanmanın meydana gelmesi için TWIST1 proteinin homodimer veya heterodimer yapıda olması gerekmektedir (Şekil 2.13B) (91,92,93).

TWIST1 transkripsiyon faktörü sitoplazmada fosforile edilerek aktive edilmektedir. TWIST1 proteini, PKA, PKB, PKC, ERK, p38 ve JNK gibi kinazların hedefidir ve Ser42, Ser68, Tre125 ve Ser127 aminoasitlerinden fosforile edilir. Fosforilasyon neticesinde TWIST1 homodimer veya heterodimer (Id proteinleri, MyoD, E12/47) oluşturarak hücre çekirdeğine transloke olur ve hedef genlerde transkripsiyonel regülasyonu sağlar. Bu regülasyonda TWIST1, histon asetilaz (HAT) veya histon deasetilaz enzimlerini (HDAC) kromatin yapıya çekerek genlerin transkripsiyonel olarak açılıp kapanmasını düzenler (Şekil 2.14) (94-100).



Şekil 2.14. TWIST1 transkripsiyon faktörünün fosforilasyon ile aktivasyonu (100).

Hücrelerde TWIST1'in yıkılması E3 ubiquitin ligazlar tarafından ubiquitinlenerek S26 proteozomlar tarafından yapılmaktadır. Small C-terminal Domain Phosphatase 1 (SCP1) Ser68 fosforile TWIST1'i defosforile ederek degradasyonunu hızlandırmaktadır (101).

TWIST1'in fonksiyonel özelliklerine bakıldığında ilk olarak embriyonik gelişim esnasında, morfogenezde, organogenezde, sefalik, maksiller ve ekstremite kemik, kas ve diğer dokuların meydana gelmesinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir. TWIST1 proteini ekstremitelerin erken gelişiminde ve ossifikasyonun regülasyonunda rol oynar. Araştırmacılar, TWIST1 proteininin, FGFR2 ve RUNX2 genleri de dahil olmak üzere, kemik oluşumunda önemli rol oynayan birkaç geni düzenlediğini kanıtlamışlardır. Saethre-Chotzen sendromu tanısı konmuş bireylerde TWIST1 geninde 80'den fazla mutasyon tespit edilmiştir. Bu mutasyonların bazıları nokta mutasyonu, diğerleri delesyon veya insersiyon mutasyonları olduğu literatürde belirtilmiştir (102,103,104).

TWIST 1 aynı zamanda nöral tüpün kapanmasını ve kahverengi yağ metabolizmasını kontrol edebilir. Kodlanan protein kanser hücresinin invazyonu ve metastazını desteklediği bilinmektedir. Bu gende meydana gelen mutasyonlar hastalarda, kraniosinostoz, pitoz ve hipertelorizm ile ifade edilen Saethre-Chotzen sendromuna sebep olur. TWIST1 fonksiyon kaybı, kafatasındaki, yüzdeki ve ekstremitelerdeki hücrelerin gelişimini ve olgunlaşmasını olumsuz yönde etkiler. Kraniofasial dismorfiteler ile karakterize olan bu fenotipik durumda yine Saethre-Chotzen sendromu olarak tanımlanmaktadır (105). TWIST1 ve RUNX2 proteinleri hücrelerin ossifikasyonunda birbirine zıt çalışan ve protein interaksyonu ile birbirinin

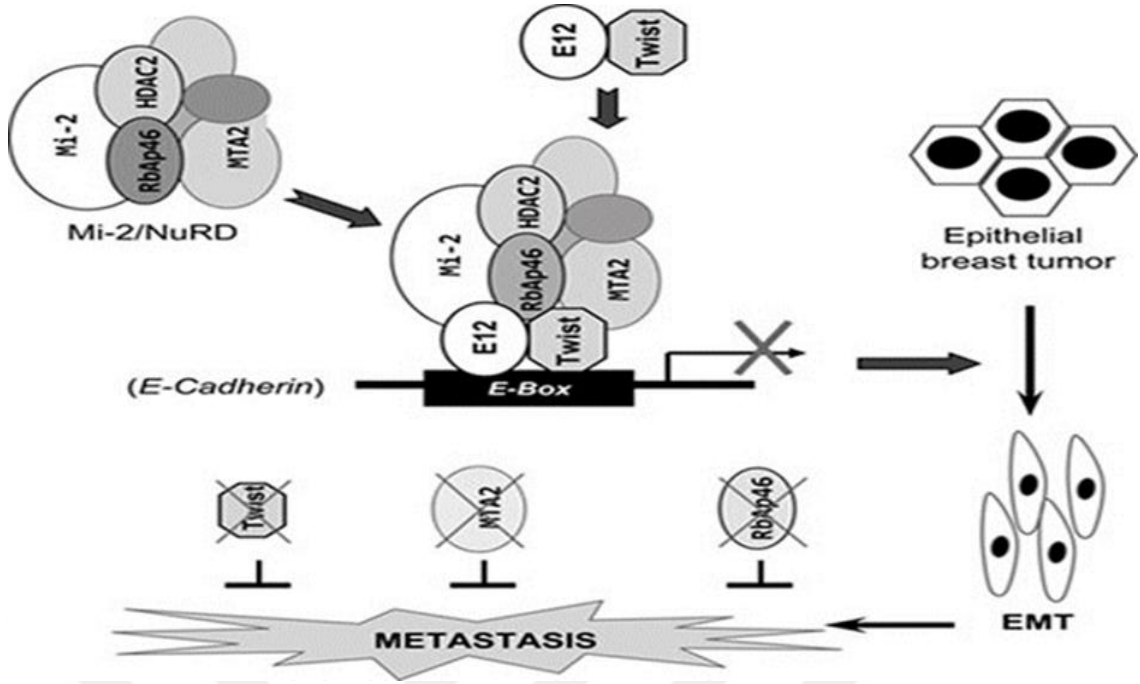
fonksiyonunu engellemek suretiyle düzenleyen yapılardır. TWIST1 geninde meydana gelen mutasyonlar RUNX2 aktivitesini etkin bir şekilde kontrol etmesini engeller. Bu durumda kafatası bölgesindeki hücrelerde kemik oluşumunun normal sürecini bozmakta ve kraniyosinosisitoya yol açmaktadır (106).

Yetişkin insanlarda TWIST proteinlerinin asıl görevi, miyogenik, osteoblastik, kondroblastik, odontoblastik ve miyelomonositik öncül hücrelerde farklılaşmamış durumlarını (undiferansiyel) korumaktır. TWIST1 proteininin, aynı zamanda, uyarıcı termogenezin (ısı olarak enerjiyi dağıtmaktan oluşan bir süreç) kilit bir düzenleyicisi olarak görev yaptığı kahverengi yağda da ifade edildiği bulunmuştur (107).

Kısa bir süre önce, TWIST proteinlerinin ek olarak lenfosit fonksiyonunda ve olgunlaşmasında önemli rol oynadığı belirlenmiştir. N. Bonnefoy-Berard yaptıkları araştırmada, TWIST1'in otoimmün inflamatuvar hastalıklarda B hücre aktivasyonunun kilit düzenleyicisi olarak görev yaptığını kanıtlamışlardır (108). TWIST1 ayrıca, T helper 1 (Th1/yardımcı) lenfositlerinde NF- κ B yolağı ile aktive olur ve tekrarlanan T hücre reseptör (THR) bağlanması ve aktivasyonu sonrasında indüklenir. Bu hücrelerde TWIST1, interferon gama (IFN- γ), interleukin 2 (IL-2) ve tümör nekroz faktör α (TNF- α)'nın sentezlenmesini durdurur. Böylece pro-inflamatuvar etkilerini önler (109,110,111). Aynı zamanda, hem B hem de T lenfositlerinde, TWIST1, immün regülasyon mekanizmalarında erken yanıtta işlevseldir. Benzer şekilde, makrofajlarda IFN ile uyarılan TWIST1 ekspresyonunun TNF- α ekspresyonunu baskıladığı bulunmuştur (111,112).

2.5.3. TWIST1 Fonksiyonu

TWIST1 transkripsiyon faktörü dimerize olarak fonksiyon görür. TWIST1, E12/E47 gibi proteinlerle heterodimer yapı meydana getirerek çekirdeğe göç eder. Daha sonra DNA'daki E kutusu dizilerine bağlanarak Mi2/NuRD kompleksi ile etkileşime geçer (113,114). Ayrıca, CREB bağlayıcı protein (CBP) / p300 ve PCAF transkripsiyonel komplekse dahil olur ve mRNA transkripsiyonu başlar (115). Bu koaktivatörler birbiriyle etkileşim halindedir ve her birinde intrinsik histon asetiltransferaz (HAT) fonksiyonu vardır. Aynı zamanda p300, DNA bağlama aktivitesini in vitro aktive edilmesine olanak sağlar. TWIST pro-metastatik potansiyel, EMT indüksiyonu ile başlar. Bu süreç, polarite özelliği olan epitel hücrelerinin karakterlerini kaybederek mezenkimal özellik kazandığı bir süreçtir (Şekil 2.15) (116).



Şekil 2.15. TWIST1'in Transkripsiyonel Regülasyondaki Rolü ve EMT sürecini başlatması (114).

TWIST1 transkripsiyon faktörünün, embriyonik gelişim sırasında EMT'yi destekleyerek, çoklu morfogenetik hücre hareketlerinin gerçekleşmesinde, gastrulasyon sırasında mezoderm oluşumu, nöral krest delaminasyonu, damak füzyonu ve kalp yastıklarının oluşumu dahil olmak üzere çoklu morfogenetik hücre göçlerinin belirlenmesinde önemli rolü vardır (117). Morfogenez sürecinde oldukça önemli olan EMT, yetişkin dokularda epitel hücrelerinin kollajen üretimini artırarak mezenkimal benzer-hücrelere dönüştürür ve böbrek, karaciğer ve akciğer fibrozu dahil olmak üzere birçok patolojiye neden olabilmektedir (118).

Son zamanlarda EMT, tümör gelişimi sırasında kanser hücrelerinin invazyonunu tetikleyen bir süreç olduğu anlaşılmıştır (119). TWIST1 genleri E-kaderin gibi epitelyal proteinlerin ekspresyonunu azaltarak ve N-kaderin, Vimentin ve düz kas aktin (SMA) gibi mezenkimal belirteçlerin ekspresyonunu indükleyerek EMT'yi destekler. E-kaderin baskılanması EMT sürecinin başlatılmasında oldukça önemlidir (120). E-Kaderin'in transkripsiyonel baskılanmasında TWIST1 doğrudan veya SNAIL çinko parmak transkripsiyon faktörü indüksiyonu yoluyla dolaylı olarak EMT sürecine katkı sağlar (119,121,122).

2.5.4. TWIST1'in Kanser Gelişimindeki Önemi

Onkogenler, normal hücre fonksiyonları için gerekli olan protoonkogenlerin mutasyona uğramasıyla yüksek ekspresyon veya aktivasyon gösteren genlerdir. Onkogenler tümör oluşumunda temel rol oynarlar. Onkogenlere zıt çalışan ve tümör

oluşumunu inhibe eden genler ise tümör inhibitör ya da süpresör genlerdir. Bunların en önemlilerinden biri p53 genidir. Tümör süpresör genler hücre proliferasyonun baskılanmasını ve apoptoz mekanizmalarının başlatılmasını indüklerler (123).

TWIST1 EMT'yi teşvik ederek hücre invazyonunu ve metastazını destekleyen önemli bir onkogen olarak tanımlanmıştır. Yüksek metastatik meme karsinoma hücrelerinde TWIST1 baskılanması neticesinde akciğere metastaz kabiliyetinin azaldığı saptanmıştır. Ayrıca TWIST1 ektopik ekspresyonunun sağlandığı durumlarda da E-Kaderin ekspresyonunun baskılandığını ve mezenkimal belirteçlerdeki (Vimentin, N-Kaderin) artış ile beraber hücre motilitesinde artışın olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular TWIST1'in EMT'yi tetikleyerek metastazı desteklediğini kanıtlamıştır (124). Ayrıca TWIST1 kromozomal instabiliteyi destekleyerek tümör progresyonuna katkı sağladığı ve dolayısıyla kanser gelişimini ve malignite kazanılmasını hızlandırdığı kanıtlanmıştır (125).

2.6. Kanser Hücresinin Metabolizması

Kanser hücresi ile normal hücre arasındaki metabolik fark ilk defa 1920'li yıllarda Otto Warburg tarafından ortaya konmuştur. Bu etki Warburg etkisi olarak tanımlanmıştır. Bu fenomene göre, normal hücreler yalnızca oksijensiz ortamda glikolizis yollarını kullanarak laktat üretirken, kanser hücreleri oksijen varlığında glikoliz yolağı ile laktat üretmektedir (126). Bu durum aerobik glikoliz olarak adlandırılmakta ve kanser hücrelerinin büyümesini olumlu yönde etkilemektedir. Oksijen varlığında bile hücrelerde laktik asit üretimi arttığından tümör dokusunda asidoz meydana gelmektedir (127,128).

Hücre içine glikoz alım düzeyi doğrudan glikoz metabolizmasının hızını etkileyen faktörlerdendir. Hücre membranından glikoz geçişini sağlayan temel transport kanalları glikoz transporter (GLUT) ailesi transmembran taşıyıcılardır. GLUT'lar insülin bağımlı veya insülin bağımsız olarak glikoz geçişine olanak sağlar (127).

Glikoz alımı ve glikoliz oluşumu çoğu kanser hücrelerinde normal hücrelere oranla daha hızlıdır. Genelde kanser hücreleri hipoksi durumundadır yani; oksijen destekleri sınırlandırılmıştır. Kanser hücreleri ATP üretimlerini anaerobik glikolizle meydana getirirler. Kanser hücreleri normal hücrelere oranla daha fazla glukoz alırlar ve hücre yapılarında daha az mitokondri vardır. Bu ters orantıda oksidatif fosforilasyonla ATP üretirler (129)

Kanser hücreleri karbon kaynağı olarak sadece glukozu kullanmazlar. Ancak bazı araştırmalarda, farklı kanser türleri arasında glukoz alım oranlarının değişmediği

belirlenmiştir. Bu hücreler glikoz dışında karbon kaynağı olarak glutamini de kullanabilmektedir. Glutamin ise, trikarboksilik asit (TCA) döngüsünün bir bileşimine denge oluşturur. Glukoz benzeri olan 2-deoksiglukozda aynı glukoz gibi glukoz taşıyıcılarıyla hücreye alınır ve 2-deoksiglukoz-fosfata çevrilir. 2-deoksi glukoz fosfat hücreden dışarı transfer olamaz 2-deoksiglukoz, florin-18 ile konjugasyonla PET yöntemi kullanılarak hücrenin alabildiği glukoz oranı ölçülerek tümörün metabolik aktivitesi görüntülenir (130).

2.7. Kanser Hücrelerinde Glukoz Alımı

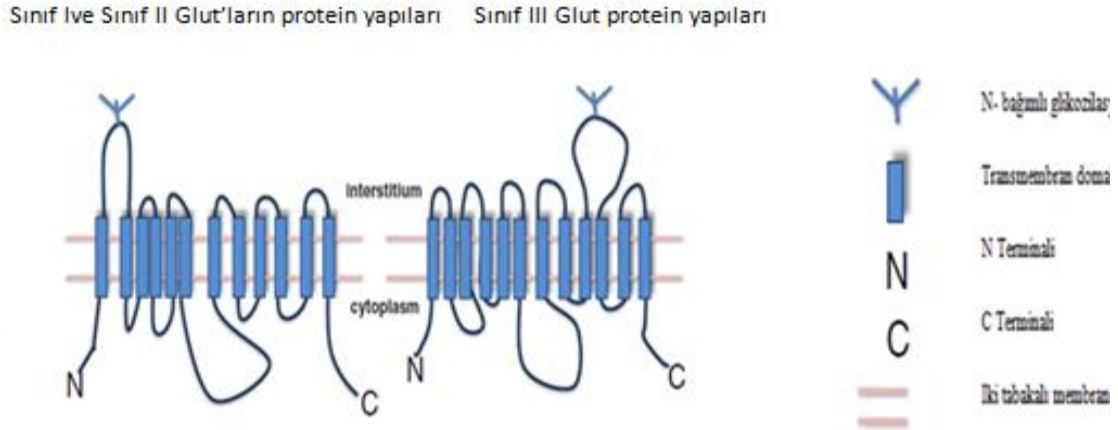
Malign hücrelerinin metabolizması, artan glukoz ihtiyaçlarına yönelik alım yaptıkları bilinmektedir. Glikozun hücre plazma zarı boyunca transportu, glukoz metabolizması için birinci hız sınırlandırıcı adımdır ve bu adım kolaylaştırıcı glikoz taşıyıcı (GLUT) proteinleri ile oluşmaktadır. Malign hücrelerinde artan glukozun transferi, GLUT1 ve / veya GLUT3'ün aşırı ekspresyonu ile ifade edilen, glikoz taşıyıcı proteinlerinin yükselen ve deregüle edilen hali arasındaki ilişki hakkında bilgi verir. Kültürlenmiş ökaryotik hücrelerin onkojenik taşınımı, GLUT1 promoteri sağlamlaştıran yapısal elemanlar ile bağlanmasıyla glukoz alımının ve GLUT1 ekspresyonunun hızlıca yükselmesine sebep olur. Kanser hücrelerinde artan seviyelerde GLUT1 ekspresyonu, zayıf sağkalım ile ifade edilir (131).

Glikoz metabolizmasını oluşturan ve kontrolünü sağlayan, glüköz taşıyıcı (GLUT) proteinleri plazma membranı etrafını sararak glukoz alımını sağlar. GLUT proteinlerinin 14 üyesi vardır. GLUT proteinlerinin her biri kanser hücrelerinde anormal ekspresyonuna neden olur. GLUT'lerin, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) -Akt, hipoksi-indüklenebilir faktör-1 (HIF-1), Ras, c-Myc ve p53 yolları dahil olmak üzere, anahtar proliferasyon ve pro-survival yollarla düzenlenir ve buna göre kanser hücrelerinde glukoz metabolizması oluşur. GLUT ekspresyonunun kansere faydalı olduğu görülmüştür ve GLUT'lerin prognostik veya prediktif belirleyici olarak ifade edilebilir (132).

2.7.1. Glikoz Transporterlar

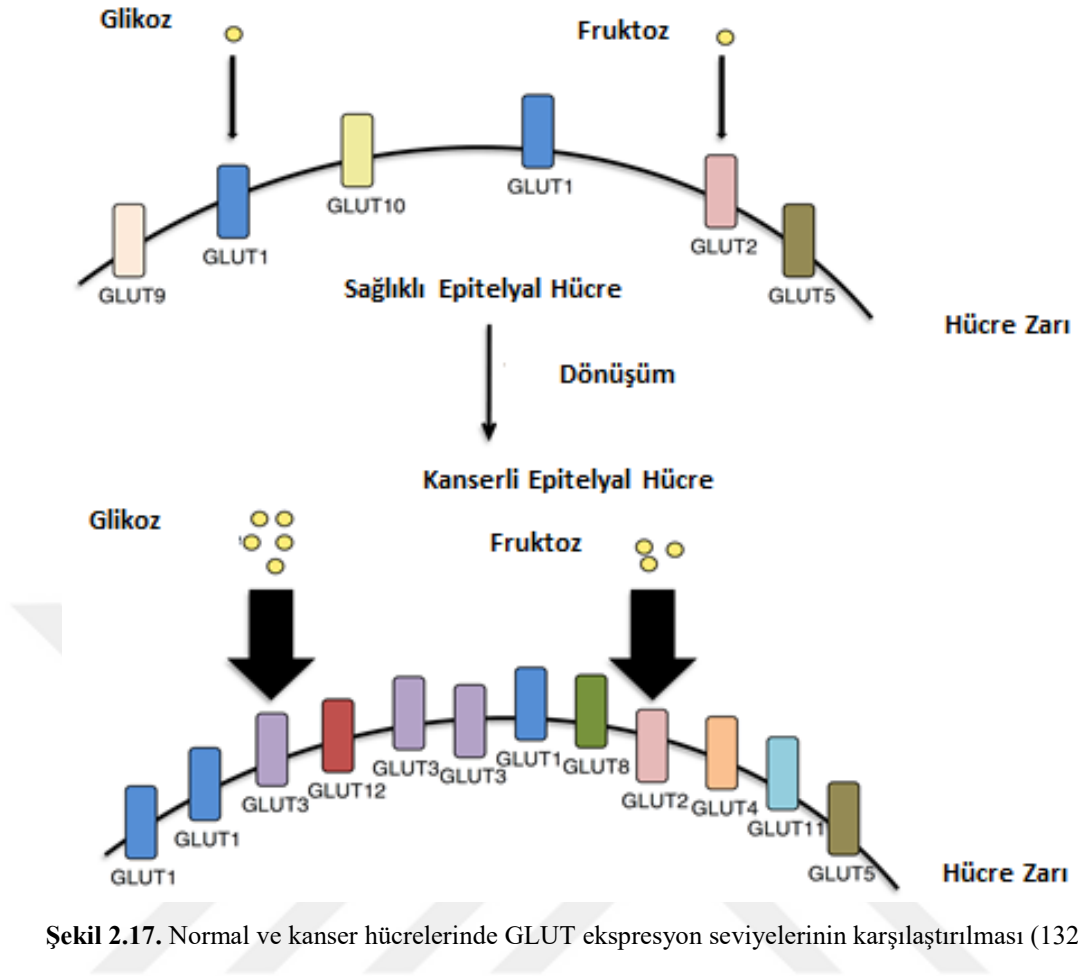
Glikoz hidrofilik özellikte olması nedeniyle hücre membranından geçemez. Hücre içine glikoz alımı membranda bulunan kanal proteinleri aracılığıyla kolaylaştırılmış difüzyon yoluyla sağlanır. Hücre zarında iki çeşit taşıyıcı kanal proteinleri mevcuttur; bunlar, glukoz transporter proteinleri (facilitative glucose transporter (GLUT)) ve sodyum-bağlı kotransporter proteinlerdir (sodium-coupled glucose co-transporter (SGLT)). Glikoz alımında önemli olan GLUT ailesi 14 farklı

transporter proteininden meydana gelmektedir. Bu aile sekans homolojilerine göre 3 sınıfa ayrılmıştır. Sınıf I; GLUT1-4, sınıf II; GLUT5, GLUT7, GLUT9 ve GLUT11, sınıf III; GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 ve GLUT13'ten oluşmaktadır. GLUT14 şu ana kadar herhangi bir sınıfa dahil edilmemiştir (Şekil 2.16) (133,134).



Şekil 2.16. Sınıf I, II ve III GLUT'ların protein yapıları (135).

Kanser gelişiminde ve metabolizmasında GLUT'ların ekspresyon seviyeleri normale göre yüksektir (Şekil 2.17). Örneğin, GLUT1 birçok tümör dokusunda yüksek ekspresyon gösterirken, GLUT2 karaciğer, meme, pankreas, kolon ve gastrik karsinomalarda yüksek ekspresyon göstermektedir (Tablo 2.2).



Şekil 2.17. Normal ve kanser hücrelerinde GLUT ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması (132).

GLUT'lar sadece glüköz taşınımını değil ayrıca galaktoz, mannoz, glükozamin, früktoz, ksiloz, DHA, ürik asit gibi karbon kaynaklarının taşınımını da sağlarlar. GLUT ailesi proteinleri normalde farklı dokularda eksprese olabildiklerinden doku spesifik ekspresyon göstermektedirler. Ayrıca kanser türüne göre de farklı GLUT ekspresyonları görülmektedir (Tablo 2.2 ve 2.3) (135).

Tablo 2.2. GLUT ailesi proteinlerinin izoformları, substratları ve eksprese oldukları dokular (135).

Transporter	Major izoform (aa)/ molecular Ağırlık (kDa)	Substratlar	Başlıca İfade Merkezleri
GLUT1 (SLC2A1)	492/54	Glukoz(K_m 3 mmol/L) Galaktoz(K_m 17 mmol/L) Mannoz (K_m 20 mmol/L) Glukozamin (K_m 2.5 mmol/L) DHA (K_m 1.1 mmol/L)	Pekçok yerde
GLUT2 (SLC2A2)	524/55	Glukoz (K_m 17 mmol/L) Galaktoz (K_m 92 mmol/L) Mannoz (K_m 125 mmol/L) Glukosamin (K_m 0.8 mmol/L) Fruktoz (K_m 76 mmol/L)	Böbrek, ince bağırsak,karaciğer, pankreas
GLUT3 (SLC2A3)	496/45	Glukoz (K_m 1.4 mmol/L) Galaktoz (K_m 8.5 mmol/L) Mannoz Ksiloz DHA	Beyin, testis
GLUT4 (SLC2A4)	509/55	Glukoz (K_m 5 mmol/L) DHA (K_m 0.98 mmol/L) Glukozamin (K_m 3.9 mmol/L)	Kas, yağ,kalp
GLUT5 (SLC2A5)	501/55	Fruktoz(K_m 6 mmol/L)	Bağırsak, böbrek, testis
GLUT6 (SLC2A6)	507/46	Glukoz	Dalak, beyin, lökosit
GLUT7 (SLC2A7)	524/53	Glukoz (K_m 0.3 mmol/L) Fruktoz (K_m 0.2 mmol/L)	İnce bağırsak,kolon, testis, prostat
GLUT8 (SLC2A8)	477/51.5	Glukoz (K_m 2 mmol/L)	Testis, beyin, adrenal bez, karaciğer, dalak, yağ, akciğer
GLUT9 (SLC2A9)	GLUT9a 511/66/ GLUT9b 540/46	Glukoz (K_m 0.61 mmol/L) Fruktoz (K_m 0.42 mmol/L) Urat (K_m 0.9 mmol/L)	karaciğer, böbrek, plasenta, pankreas
GLUT10(SLC2A10)	541/57	2-deoxy-D-glucose (K_m 0.3 mmol/L) Galaktoz	Kalp, akciğer, beyin, karaciğer, kas, pankreas, plasenta, böbrek
GLUT11(SLC2A11)	496/54 GLUT11-A GLUT11-B GLUT11-C	Glukoz (K_m 0.16 mmol/L) Fruktoz (K_m 0.16 mmol/L)	GLUT11-A- kalp, kas, böbrek GLUT11-B- plasenta, yağ, böbrek GLUT11-C-kalp, kas, yağ, pankreas
GLUT12(SLC2A12)	617/67	Glukoz	Kas, kalp, yağ, ince bağırsak, prostat, plasenta
HM1T (SLC2A13)	618/629/69	Myoinositol (K_m 0.1 mmol/L)	Beyin
GLUT14 SLC2A14)	497/520/N/A	N/A	Testis

Tablo 2.3. GLUT ailesi proteinlerinin çeşitli kanser türlerindeki ekspresyonları (135).

Transporter	Doku Ekspresyonları
GLUT1	Çeşitli tümörler
GLUT2	Karaciğer, meme, pankreatik, kolon ve gastrik kanser
GLUT3	Akciğer, beyin, meme, mesane, gırtlak, prostat, gastrik,baş ve boyun, ovarian and oral skuamöz karsinom
GLUT4	Kolon, lenfoid,meme, tiroid, pankreatik ve gastrik kanser
GLUT 5	meme, renal, kolon, karaciğer, testikular ve lenfoid kanser
GLUT6	Meme , pankreatik ve endometrial kanser, uterin leiomyom
GLUT8	Endometrial ve lenfoid kanser, multip myelom
GLUT9	Karaciğer, akciğer, cilt, tiroid, böbrek, adrenal, testis ve prostat kanseri
GLUT 10	Bilinmiyor
GLUT 11	Multip myelom, prostat kanseri
GLUT12	Meme, prostat, akciğer ve kolektoral kanser, rhabdomyosarcoma, oligodendroglioma, oligoastrocytoma, astrocytoma

2.7.1.1. Glikoz Transporter-1 (GLUT1)

Glikoz transporter 1 (GLUT1), 1p34.2'de lokalize olan Solute carrier family 1 (facilitated glucose transporter), member 1 (SLC2A1) geni (OMIM# 138140) tarafından kodlanmıştır. Çeşitli hücre türlerinde 45-55 kDa arasında değişen izoformları vardır. Literatürde en çok çalışılan GLUT ailesidir (136). GLUT1 hemen hemen tüm dokularda eksprese olur. Glikoz alımını sağlayan temel transporterlardan biridir. Erişkin eritrositlerde ve aynı zamanda kan-beyin bariyeri gibi dokularının endotel hücrelerinde en yüksek seviyelerde ifade edilir (137).

2.7.1.2. Glikoz Transporter-2 (GLUT2)

Glikoz transporter 2 (GLUT2), 3q26.2 'de lokalize olan Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2 (SLC2A2) geni (OMIM# 138160) tarafından kodlanmıştır. GLUT2 geni, 57 kDa ağırlığında bir proteini ifade eder. Kandan karaciğere glikozun taşınması açısından önemlidir. Ayrıca böbrekte glukozun geri emilimini sağlar. Glikoz taşınması yanısıra fruktoz taşınmasını da gerçekleştirebilir. Bu transport işlemi insülininden bağımsız olarak gerçekleştirilmektedir (138,139). SLC2A2 genindeki defektler, Fanconi-Bickel sendromu olarak adlandırılan glikojen depo hastalığına neden olmaktadır (140).

Diyabetik gebelik durumlarında, embriyonal gelişim bozuklukları sonucu beyin, omurga ve kalp disfonksiyonları, GLUT2 ile ilişkilendirilmiştir. GLUT2 daha çok diyabetik hastalarda görev aldığından “ diyabetik glukoz taşıyıcı” veya “ stres hiperglisemi glikoz taşıyıcısı” olarak isimlendirilebilir (141).

2.7.1.3. Glikoz Transporter-3 (GLUT3)

Glikoz transporter -3 (GLUT3), 12p13.31'de lokalize olan Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3 (SLC2A3) geni (OMIM# 138170) tarafından kodlanmıştır. GLUT3, 48-50 kDa büyüklüğünde bir proteini kodlar. GLUT3'ün farklı dokularda eksprese olmasına rağmen, en fazla nöronlarda ifadenmektedir. GLUT3, aksonlarda, dendritlerde ve hücre gövdesinin belli kısımlarında lokalizedir (142,143).

Astrosit-nöron laktat mekiği (ANLS) hipotezine göre astrositler nöronlar için gerekli olan laktatı üreterek nöronal enerjiyi sağlamaktadır. Bu hipotezde, astrositlerde glikoz transportu açısından öncü rolü GLUT1 üstlenmektedir. Ancak nöron hücrelerinde GLUT3 seviyesi daha yüksektir. GLUT3 artışı merkezi sinir sisteminde glikoz kullanımını

artırdığı belirlenmiştir (144). Glioma ve astrositomada GLUT3 ekspresyon seviyesi GLUT1'e göre daha yükselmektedir. Ayrıca mesane, larinks, prostat, gastrik, over, oral, baş ve boyun kanserlerinde yüksek ekspresyon göstermektedir (145-149).

2.7.1.4. Glikoz Transporter-4 (GLUT4)

Glikoz transporter 4 (GLUT4), 17p13.1'de lokalize olan Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 (SLC2A4) geni (OMIM# 138190) tarafından kodlanmıştır. GLUT4, yağ dokusunda ve çizgili kas hücrelerinde insülinin bağımlı glikoz taşıyıcısıdır. GLUT4 taşıyıcısı ilk defa 1988' de David James tarafından bulunmuştur (150). İnsan GLUT4 proteini 257-271 amino asitten meydana gelmiş 58 kDa'luk bir proteindir (151). GLUT4'ün ilk sekansındaki amino asit düzenlemesi, glikozun plazma membranı boyunca transferini sağlar. N-terminalinde fenilalanine eklenen iki lösin aminoasidi ve asidik motiflerin, endositoz ve ekzositoz kinetiğinde görev almaktadır (152,153). İnsan, sıgır, sıçan ve fare organizmalarındaki aminoasit dizisi %91-96 oranında homoloji göstermektedir. Kolon, meme, tiroid, pankreas ve gastrik karsinomalarda ekspresyonu artmaktadır (154).

2.7.1.5. Glikoz Transporter-5(GLUT5)

Glikoz transporter 5 (GLUT5), 1p36.2'de lokalize olan Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 5 (SLC2A5) geni (OMIM# 138230) tarafından kodlanmıştır. GLUT5, 58.4 kDa'luk bir proteindir ve ince bağırsakta enterositlerin apikal bölgerinde lokalize GLUT2 gibi fruktoz taşıyıcısıdır. GLUT5, fruktozun bağırsak lümenindeki yoğunluğuyla birlikte difüzyonu kolaylaştırarak bağırsak lümeninden enterosit'e taşınmasını sağlar (155). Beyinde mikrogial hücrelerde ve kan-beyin bariyerinde yüksek, böbrek, iskelet kası ve adipositlerde ise çok düşük ekspresyon gösterir. Meme, kolon, karaciğer, testis kanserlerinde ve lenfomalarda ekspresyonu artmıştır (156-159).

2.7.1.6. Glikoz Transporter-6 (GLUT-6)

Glikoz transporter 6 (GLUT6), 9p34.2'de lokalize olan Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 6 (SLC2A6) geni (OMIM# 606813) tarafından kodlanmıştır. GLUT6, 507aminoasitten oluşan yaklaşık 48kDa'luk bir proteindir. Dalak, beyin ve periferel lökositlerde yoğun olarak eksprese edilmektedir (160). Kanser ile ilişkisi çok iyi ortaya konmamasına rağmen meme, pankreas, uterus ve endometriyal kanser doku örneklerindeki artışı immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir (161,162).

2.7.1.7. Glikoz Transporter-7 (GLUT7)

Glikoz transporter 7 (GLUT7), 1p36.2'de lokalize olan Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 7 (SLC2A7) geni (OMIM# 610371) tarafından kodlanmıştır. GLUT7, insan SLC2A7 geni ile kodlan sınıf II glikoz transport proteinidir. GLUT5 ile % 53 sekans özdeşliği vardır(163). GLUT7 glikoz için yüksek afinitesi vardır. Fruktoz içinde afinitesi vardır. Esas olarak küçük apikal membranda ifade edilir. Bağırsak ve kolon epitel hücreleri tespit edilmiştir. Düşük mRNA seviyelerinde de testis ve prostat epitelyal hücrelerinde tespit edilmiştir. Glikoz için yüksek afinitesi olmasına rağmen, GLUT7'nin kanserde ifadesi yoktur (154,164).

2.7.1.8. Glikoz Transporter-8 (GLUT8)

Glikoz transporter 8 (GLUT8), 9q33.3'de lokalize olan Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 8 (SLC2A8) geni (OMIM# 605245) tarafından kodlanmıştır. GLUT8, 477 aminoasitten oluşan yaklaşık 50,819 kDa'luk bir proteindir (165,166).

GLUT-8 taşıyıcısı genel olarak *Xenopus* oositlerinin veya memeli hücrelerinin tabanından eksprese edilir. GLUT8'in glikoza yüksek duyarlılığı vardır. mRNA, testiste ve serebellum, adrenal bez, karaciğer, kahverengi adipoz doku ve akciğerde görülür. Glut-8, testislerde evre 1'de değişen spermatositlerde eksprese edilir. Aynı zamanda farelerin ve insanların spermatozoalarında var olduğu tespit edilmiştir. Beyinde, GLUT8, amigdalada ve primer olfaktör korteks bölgesinde, hipotalamik nukleus ve traktus solitariusun çekirdeğinde yer alır. Yüksek konsantrasyondaki GLUT8 düzeyleri, sinaptik keseciklere ve posterior hipofizde vazopressin olanlarda sekretuar granüllere lokalize olduğu yapılan çalışmalarda gözlenmiştir. GLUT8'in glikoz metabolizmasındaki yerini saptayabilmek için blastosislere bakılır. Oligonükleotitlerin sınırlandırılması apoptozun artmasına olanak sağlar. GLUT6, GLUT8 'le yaklaşık % 45 homoloji ile en yakından ilişkilidir(166-168).

2.7.1.9. Glikoz Transporter-9 (GLUT9)

Glikoz transporter 9 (GLUT9), 4p16.1'de lokalize olan Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 9 (SLC2A9) geni (OMIM# 606142) tarafından kodlanmıştır. GLUT9, 512 aminoasitten oluşan yaklaşık 58,702 Da'luk bir proteindir (169).

GLUT9, farklı amino-terminal sitoplazmik uzantıları kodlayan, hem fruktoz hem de glikoz taşıyıcı olarak bilinir. İnsanlarda ve farelerde GLUT9b yalnızca karaciğer ve

böbreklerde eksprese oluyorken, Glut9a karaciğer, böbrek, bağırsak, lökositler gibi çoğu dokuda yer almaktadır (170,171).

2.7.1.10. Glikoz Transporter-10 (GLUT10)

Glikoz transporter 10 (GLUT10), 20q13.12'de lokalize olan Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 10 (SLC2A10) geni (OMIM# 606145) tarafından kodlanmıştır. GLUT10, 477 aminoasitten oluşan yaklaşık 56,911 Da'luk bir proteindir (172).

Geni kromozom lokalizasyonunun tip-2 diyabet ile ilişkili bir lokustadır. İnsan kalp, akciğer, beyin, karaciğer, iskelet kası, pankreas, plasenta ve böbreklerde ekspresyonu tespit edilmiştir (173).

2.7.1.11. Glikoz Transporter-11 (GLUT11)

Glikoz transporter 11(GLUT11), 22q11.23'de lokalize olan Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 11 (SLC2A11) geni (OMIM# 610367) tarafından kodlanmıştır. GLUT11 yaklaşık 53,703 Da'lık proteindir bir proteindir (174). Sasaki ve diğ (2001), 1a, 1b ve 1c eksonları dahil olmak üzere SLC2A11 geninde toplam 14 ekson belirlemiştir (175).

Fruktoz taşıyıcı GLUT5 'e yaklaşık % 42 ile en yüksek benzerliği sergileyen bir glikoz transporterdir. Burada, SLC2A11 geninin N-terminallerinde ekzon 1A, ekzon 1B ve ekzon 1C şeklinde üç ayrı ekzon vardır. Amino asit dizisinde farklı olan üç GLUT11 varyantının (GLUT11-A, GLUT11-B ve GLUT11-C) mRNA'larını oluşturduğunu tespit edilmiştir. Ekson 1A, ekzon 1B ve ekzon 1C'nin üç ayrı 5'-ucu bölgesinin tümü, COS-7 hücrelerinde lusiferaz füzyon yapıları olarak eksprese edildiğinde promotör aktivitesi sergilemiştir. GLUT11-A'nın böbreklerde ve kalpte, GLUT11-B'de iskelet kası ve böbrek eksprese olduğunu gösterilmiştir. GLUT11-C adipoz doku, plasenta ve yağ dokusu, kalp, iskelet kası ve pankreas tespit edilmiştir. Fareler ve sıçanlar SLC2A11 geninden yoksundur. Xenopus oositlerinde eksprese edildiğinde, her üç GLUT11 izoformu glukoz ve fruktozu nakleder ancak galaktozu taşımamaktadır. COS-7 hücrelerinde ifade edilen üç izoformun subselüler dağılımında belirgin bir fark yoktur (83,175,176).

2.7.1.12. Glikoz Transporter-12 (GLUT12)

Glikoz transporter 12(GLUT12), 6q23.2'de lokalize olan Solute carrier family 12 (facilitated glucose transporter), member 12 (SLC2A12) geni (OMIM# 610372) tarafından kodlanmıştır. GLUT12, 617 aminoasitten oluşan yaklaşık 67 daltonluk bir proteindir (177).

Kalpdeki fizyolojik rolü aydınlatılamamıştır ve insülin ile uyarılmış miyokardiyal GLUT12 translokasyonunun düzenlenmesi bilinmemektedir. Ayrıca, GLUT12'nin rolü diyabetik miyokard da araştırılmamıştır. Bu nedenle, GLUT4'te olduğu gibi, insülinin, diyabet sırasında bozulmuş olan miyokardiyal hücre yüzeyine GLUT12 translokasyonunu düzenlediğini düşünülmektedir. MCF-7 göğüs kanseri hücrelerinde tanımlanmasını takiben, memede benign dokudan daha yüksek karsinomda GLUT12 ekspresyonu gösterilmiştir. Benzer şekilde, GLUT12 prostat kanserinde mRNA ve proteinde tespit edilmiş olup sağlıklı prostat dokusunda yoktur (178-182).

2.7.1.13. Glikoz Transporter-13 (GLUT13)

Glikoz transporter 13 (GLUT13), 12q12'de lokalize olan Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 13 (SLC2A13) geni (OMIM# 611036) tarafından kodlanmıştır. GLUT13, 629 aminoasitten oluşan yaklaşık 75-90kD'lık bir proteindir (183).

Glut13 veya proton miyo-inositol taşıyıcı (HMIT) ,H⁺ / miyo-oksitositol ko-transporteridir. Bazı izoformlar tarafından taşınan substratı henüz tanımlanmamıştır. Glial hücrelerde ve bazı nöronlarda yüksek oranda eksprese edilir. Glut-13 taşıma aktivitesi miyo-inositol için spesifiktir (184).

2.7.1.14. Glikoz Transporter-14 (GLUT-14)

Glikoz transporter 14 (GLUT14), 12p13.31'de lokalize olan Solute carrier family 1(facilitated glucose transporter), member 14 (SLC2A14) geni (OMIM# 611039) tarafından kodlanmıştır. GLUT14, 477 aminoasitten oluşan yaklaşık 50,819 kDa'luk bir proteindir.

GLUT14, geni SLC2A14 ile kodlanmıştır ve SLC2A3 geni ile % 95 sekansları benzeşmektedir, bu sebeple genlerin dublikasyonu ile kodlandığını ifade eden bir protein grubu olduğu bildirilmiştir. Özellikle testislerde gözlenmektedir. Membran tabanında glukozun hücreye transferini gerçekleştiren GLUT taşıyıcılarıdır. Taşıyıcılar, ekprese edildikleri bölgeler ve görevlerine göre farklı sayılarda sınıflandırılmıştır (134).

Bu taşıyıcılar olmadan hücreye glukoz aktarımı sağlanamaz. Kanserli organizmalarda glukozun taşıyıcı hücrelerle içeri alınmasını sağlayan bekçi hücreleri gibi fonksiyon gören gen *TWIST* genidir. *TWIST* geni hem taşınımında hem de ekspresyonda hücreye destek sağlar (156).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Hücre Kültürü

Çalışmamız HEK293T böbrek hücreleri hattında gerçekleştirilmiştir. HEK293T hücrelerinin kültürü, %10 FBS (Lonza), 1X Penisilin-Streptomisin (Merck) içeren DMEM (Gibco) besiyerinde yapılmıştır. HEK293T hücreleri saklandıkları -80°C'deki dondurucudan alınarak 37°C'de hızlıca çözündürülmüştür. Hücreler 5 mL besiyeri içeren 15mL'lik falkon tüp içerisine konularak 2000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiş, süpernatant atılarak pellet besiyeri içerisinde homojenize edilerek T25 flasklara ekilmiştir. HEK293T hücreleri 37°C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde (Schimadzu) kültüre edilmiştir. T25 flasklarda çoğaltılan hücreler gen transfeksiyonu ve glikoz alım deneylerini uygulamak üzere 6 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına alınmıştır. Hücre kültürü takibi inverted mikroskop (Nikon) yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

3.2. *Escherichia coli* DH5α Suşuna Plasmid Vektör Transformasyonu

Elimizde mevcut bulunan pcDNA3.1 boş ekspresyon vektörünü ve bu vektöre klonlanmış *Twist1* geni içeren Tw+/pcDNA3.1 vektörünü çoğaltmak için *E.coli* DH5α suşunu kullandık. Gen transformasyonu için mevcut bulunan ilgili bakterilerin kompetan formlarını kullandık. Bunun için -80°C'de saklanan kompetan bakterileri 30 dk. buzda çözözdürdükten sonra 75 µl bakteri süspansiyonu içerisine 1 µg plazmid vektör ilave edilmiş ve 1 dk. 42°C'de bekletilerek tekrar buza alınmıştır. Bu sıcaklık şoklamasının ardından bakteriler Luria-Bertani (LB) Broth besiyeri (Oxoid) içerisinde kültüre edilmiştir.

3.3. Transforme Edilen Bakterilerin Kültürasyonu

Isı şoklaması ile pcDNA3.1 ve Tw+/pcDNA3.1 plazmid vektörleri ile transforme edilen DH5α bakterileri öncelikle 1 saat boyunca 1 mL LB Broth besiyeri içerisinde 37°C'de 150 rpm'de çalkalamalı inkübatörde (Biobase) kültüre edilmiştir. Süre sonunda bakteriler 100 µg/mL Ampicillin içeren LB Broth besiyeri içerisinde söz konusu şartlarda gece boyunca çoğalmaları sağlanmıştır.

3.4. Bakterilerden Plazmid Vektör İzolasyonu

Gece boyu çalkalamalı inkübatörde Ampisilinli ortamda kültüre edilen ve çoğalmış olan bakteriler 50 mL falkon tüplere alınarak 4500 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pellet vorteks yardımıyla homojenize edilmiştir. Çoğalttığımız bakterilerden plazmid vektör izolasyonunu ticari olarak temin ettiğimiz Plasmid Midi Kit (Qiagen cat. 12143) yardımıyla gerçekleştirdik. İzole edilen plazmid

vektörlerin saflığı ve miktarı NanoDrop (Thermo) cihazı ile belirlendi ve ayrıca %1 agaroz jeldeki görüntüleri alındı.

3.5. HEK293T Hücrelerine Plazmid Vektörlerin Transfeksiyonu

İzole edilen pcDNA3.1 ve Tw+/pcDNA3.1 vektörlerini HEK 293T hücrelerine Neon Transfection System (Invitrogen) yardımıyla transforme ettik. Transformasyon deneyi için önceden HEK293T hücrelerini %70 konfluent olana kadar kültüre ettik. Deney çalışmasında plazmid vektörlerin her birinden 1 µg olacak şekilde ve her plazmid vektör için 1×10^6 hücre kullanılmıştır. Elektroporasyon şartları; 1,245 pulse voltage (v), 10 pulse width (ms), 3 pulse number olacak şekilde cihazda ayarlanmıştır. Elektroporasyon uygulamasının akabinde hücreler 300.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6-kuyucuklu kültür kaplarına ekilmiş ve kültüre edilmiştir.

3.6. Total RNA ve cDNA Kütüphanesinin Elde Edilmesi

Kontrol olarak pcDNA3.1 boş vektör ve Twist1 ekspresyonu için Tw+/pcDNA3.1 vektörlerini transfekte ettiğimiz HEK293T hücrelerinin kültürü transfeksiyondan 72 saat sonra sonlandırdık. Twist1 ekspresyonunu ve buna bağlı olarak hücrelerde GLUT-1,-2,-3,-4,-5,-12, HK-2, PKM-2, LDH- α , G6PD, PFKM, InsR, Irs-1,-2 ve kontrol olarak β -aktin genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonlarını incelemek için öncelikle kültüre ettiğimiz hücrelerde total RNA izolasyonunu gerçekleştirdik. Ardından cDNA'ların kütüphanesini elde ettik ve miktarlarını NanoDrop (Thermo) cihazı yardımıyla belirledik.

3.6.1. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için ticari RNeasy Mini kit (Qiagen) kullanılmış ve uygulama kit protokolüne göre yapılmıştır. Burada kısaca, besiyeri uzaklaştırılmış hücreler üzerine 10µl β -merkaptoetanol içeren 1 ml RLT Buffer ilave edilmiştir. Üzerine %70'lik 350µl etanol ilave edilmiştir. Hazırlanan örneğin tamamı (700µL) pipetle alınmıştır. RNeasy 2ml'lik çevirme kolonuna alınmıştır. Kolonun ağzı kapatılarak 15saniye 8000g'de santrifüj edilmiştir. Çevirme kolonundaki örneğin üzerine 700µl RW1 buffer ilave edilmiştir. Bu ilaveden sonra 15saniye 8000 g de santrifüj edilmiştir. Üzerine 500µl RPE tampon ilave edilerek hala kalmış tuz varsa temizlenmiştir. 15 saniye 8000 g de santrifüj edilmiştir. Bu işlem üç defa tekrar edilmiştir. Tabanda ki tüp atılıp en üst devirde santrifüj bir dakika yapılarak kurutulmuştur. Daha sonra çevirme kolonu 1, 5 ml ependorfa alınmıştır. Üzerine 30-50µl RNase free water eklenmiştir. Bu deneyde 50µl RNase free water kullanılmıştır. Ağzını kapatıp bir dakika 8000 g de santrifüj edilmiştir. Bu işlem buz üzerinde

gerçekleştirilmiştir. Hazırladığımız RNA'larının miktar ve saflığını hesaplamak için Nanodrop (Thermo) cihazında 260-280 nm ölçümleri yapılmıştır.

3.6.2. cDNA Kütüphanesinin Elde Edilmesi

Elde ettiğimiz total RNA'lardan cDNA eldesi için ticari QuantiTect Reverse Transcription kiti (Qiagen) kullanılmıştır. Deney çalışması kit protokolüne uygun bir şekilde yapılmıştır. Protokole göre ilk olarak kit içeriği buz üzerinde eritilmiştir. gDNA uzaklaştırma reaksiyonu için 0,2 ml ependorf tüp içerisine hazırladığımız reaksiyon aşağıda verilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. gDNA uzaklaştırma reaksiyon içeriği.

Kullanılan Ürün	Miktar
gDNA wipeout buffer 7x	4µl
Template RNA	2µg
RNase free water	22µl
Total hacim	28µl şeklinde hazırlandı.

gDNA'yı degrade etmek için hazırlanan reaksiyon, thermal cycler cihazında 42°C'de 10 dk. inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonun ardından kit protokolüne uygun şekilde ikinci bir reaksiyon ile cDNA eldesi gerçekleştirilmiştir. Bunun için 0,2 ml'lik ikinci bir tüp içerisine aşağıdaki reaksiyonu hazırladık (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Reverse transkripsiyonla RNA'da cDNA eldesi reaksiyon içeriği.

Kullanılan Ürün	Miktarı
Reverse transkription master mix	2µl
Reverse RT buffer 5x"	8µl
RT primer mix	2µl
Template RNA	28µl
Total Hacim	40µl oldu

Reaksiyon şartları; 42°C'de 30 dk, 95°C'de 3 dk. ve 4°C'de ∞ olacak şekildedir. Elde edilen cDNA'ların saflık ve miktar düzeyleri NanoDrop (Thermo) cihazında belirlenmiştir.

3.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Kontrol pcDNA3.1 ve Tw+/pcDNA3.1 vektörleri ile transfekte edilmiş HEK293T hücrelerinde tez projesi kapsamında incelediğimiz genlerin ekspresyon

düzeylerini semikantitatif reverse transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile belirledik. Bunun için elde ettiğimiz cDNA kütüphanelerini kullanarak her örnek için PCR reaksiyonlarını gerçekleştirdik. PCR yönteminde kullandığımız primerleri Integrative DNA Technology (IDT) yazılım aracını kullanarak dizayn ettik. Her tüp için gerçekleştirdiğimiz PCR reaksiyonu aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Polimeraz zincir reaksiyon içeriği.

10X BUFFER	2µl
MgCl ₂	1,2 µl
dNTP	0,5 µl
Fw	1 µl
Rw	1 µl
Taq Polimeraz	0,1 µl
H ₂ O	13,2 µl
cDNA	1 µl
Toplam	20 µl

Tez projesi kapsamında araştırdığımız genlerin RT-PCR reaksiyonlarında kullanılan primer dizileri aşağıda verilmiştir:

İnsan TWIST1

Forward TW: 5-GGCTCAGCTACGCCTTCTC-3 (19 mer)

Reverse TW: 5-TCCTTCTCTGGAAACAATGACA-3 (22 mer)

GLUT1 (SLC2A1)

Forward G1: 5-CCGCAACGAGGAGAACCG -3 (18 mer)

Reverse G1: 5-GTGACCTTCTTCTCCCGCATC-3 (21 mer)

GLUT2 (SLC2A2)

Forward G2: 5-AGTTAGATGAGGAAGTCAAAGCAA-3 (24 mer)

Reverse G2: 5-TAGGCTGTCGGTAGCTGG-3 (18 mer)

GLUT3 (SLC2A3)

Forward G3: 5-TCCCCTCCGCTGCTCACTATTT-3 (22 mer)

Reverse G3: 5-ATCTCCATGACGCCGTCCTTTC -3 (22 mer)

GLUT5 (SLC2A5)

Forward G5: 5-CCAGAGCAAGCATGGAGCAAC-3 (21 mer)

Reverse G5: 5-AGGATGACCCAAAGGCAGCTA-3 (21 mer)

GLUT4 (SLC2A4)

Forward G4: 5-CTTCATCATTGGCATGGGTTT-3 (21 mer)

Reverse G4: 5-AGGACCGCAAATAGAAGGAAGA-3 (22 mer)

GLUT12 (SLC2A12)

Forward: 5-CCTCCGCCTTAAGCTATGTATG-3 (22 mer)

Reverse: 5-GTGCAAGTAGTGTCTTGGTAGG-3 (22 mer)

HK2 (hekzokinaz2)

Forward HK2: 5-AAGGCTTCAAGGCATCTG-3 (18 mer)

Reverse HK2: 5-CCACAGGTCATCATAGTTCC-3 (20 mer)

PKM2 (Piruvat Kinaz M 2)

Forward PKM2: 5-CCACTTGCAATTATTTGAGGAA-3 (22 mer)

Reverse PKM2: 5-GTGAGCAGACCTGCCAGACT-3 (20 mer)

LDH- α (Laktat Dehidrogenaz- α)

Forward LDHA: 5-TTGGTCCAGCGTAACGTGAAC-3 (21 mer)

Reverse LDHA: 5-CCAGGATGTGTAGCCTTTGAG-3 (21 mer)

InsR (İnsülin Reseptörü)

Forward InsR: 5-GAGCTGTTCGAGCTGGATTAT-3 (21 mer)

Reverse InsR: 5-TCACTCTGGTTGTGCTTCTG-3 (20 mer)

IRS1 (İnsülin Reseptör Substrat-1)

Forward Irs1: 5-CTTTCCACAGCTCACCTTCT-3 (20 mer)

Reverse Irs1: 5-CCAGGTCCATCTTCATGTACTC-3 (22 mer)

IRS2 (İnsülin Reseptör Substrat-2)

Forward Irs2: 5-TAGGCATCAATGGGTGGTATTT-3 (22 mer)

Reverse Irs2: 5-CTACGGATAGAGGGCGAGTTA-3 (21 mer)

G6PD (Glikoz 6-Fosfat Dhidrogenaz)

Forward G6PD: 5-ACCTCATGGTGCTGAGATTTG-3 (21 mer)

Reverse G6PD: 5-GCTCCTTGAAGGTGAGGATAAC-3 (22 mer)

PFKM (Fosfofruktokinaz M)

Forward PFKM: 5-GCATCCCATTTGTGGTCATTC-3 (21 mer)

Reverse PFKM: 5-GTCACAGGTTGTGCAGATAGT-3 (21 mer)

 β -Aktin

Forward aktin: 5-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3 (21 mer)

Reverse aktin: 5-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3 (21 mer)

PCR Reaksiyonu Thermal Cycler (BioRad) cihazında; 94°C’de 5 dk. ön denatürasyon; 94°C’de 30 sn., 53-58 °C’de 30 sn., 72°C’de 30 sn., 35 döngü; 72°C’de 10 dk. final uzama ve 4°C’de ∞ olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Annealing sıcaklığı primerlerin Tm derecelerine göre uyarlanmıştır.

3.8. Agaroze Jel Elektroforezi**3.8.1. Agaroze Jel Hazırlanması**

Total RNA ve cDNA eldesi ve RT-PCR sonuçlarının analizi için agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır. Bunun için %1-2 agaroz içeren jeller kullanılmıştır. Bu yöntemde, gerekli olan agaroz miktarı hassas terazide tartılarak 100 mL 1X Tris-Borik asid-EDTA (TBE) tamponuna ilave edilmiştir. Mikrodalga fırın yardımıyla agaroz tampon içerisinde eritilmiş ve içerisine 4 μ l Etidiyum Bromür (10mg/ml) ilave edilmiştir. Sıvı haldeki jel agaroz jel tankında donmak üzere dökülmüş ve kuyucuklar için de uygun taraklar yerleştirilmiştir.

3.8.2. Elektroforez

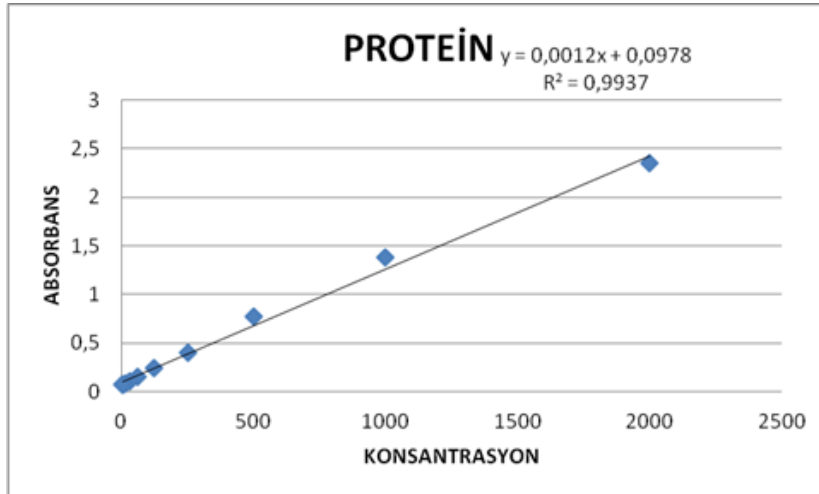
Hazırlanan agaroz jel 1X TBE’den oluşan yürütme tamponu içeren tank (Thermo) içerisine yerleştirildi. Örnekler, brom fenol mavisi içeren 2X yükleme tamponu yardımı ile kuyucuklara yüklendi. Amplikonların büyüklüklerinin tespiti için uygun marker örneklerle beraber ayrı bir kuyucukta yüklendi. Elektroforez 120 Volt’ta

30 dk. süre ile gerçekleştirildi. Süre sonunda agaroz jel UV transillüminatör cihazında (Shimadzu) görüntülendi.

3.9. HEK293T Hücrelerinde ATP, ADP ve AMP Oranlarının Belirlenmesi

Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

293T hücrelerinin enerji düzeylerini tespit etmek için önce protein konsantrasyonlarını hesaplandı. Bunun için protein konsantrasyonunu saptamak için Walker, 2002 bisinkoninik asit (BCA) yöntemine (194) göre çalışan BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Scientific) kullanıldı. Protein örnekleri saf su içerisinde 5:1 (ağırlık:hacim) oranında çözündürüldükten sonra 96 kuyucuklu kaplara 3 tekrarlı ve her bir kuyucukta 25 µL olacak şekilde eklendi. Üzerine 200 µL, kit içeriğindeki A reaktifi ile B reaktifinin 50:1 oranında karıştırılmasıyla hazırlanan BCA belirteci eklenerek 37°C’de 30 dk bekletildi. Ardından 562 nm’de kör örneğe (saf su) karşı absorbans ölçümü ELISA okuyucuda (BMG LABTECH CLARIOstar) alındı. Standart grafiğın oluşturulmasında ise kit içerisindeki sığır serum albumini (“Bovine Serum Albumin”, BSA) standardı ve kör örnek olarak saf su kullanıldı. Farklı konsantrasyonlarda (3-2000 mg/mL) hazırlanan standart protein örneklerinin konsantrasyon ve absorbans değerleri kullanılarak standart grafik oluşturuldu. Hücre lizatlarının protein konsantrasyonu bu grafik için elde edilen doğru denklemi yardımıyla hesaplandı.



Şekil 3.9.1 Protein standart grafiği (Konsantrasyon Birim: mg/mL)

Hücrelerin ATP, ADP ve AMP Ölçümüne Hazırlanması

Hücreler tripsinize edildi. PBS'le yıkandı ve 1 ml filtreden geçirilmiş hücre lizis buffer çözeltisi eklenerek -80°C'ye kaldırıldı. Hücrelerin enerji düzeylerini ölçmeden önce ön işlemler yapıldı. -80°C'den çıkarılan hücreler, 3 kere dondur-çöz yapılarak parçalandı. Parçalanmış hücreler 14000 rpm'de 30 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatanı alınıp 0,45 mikronluk filtreden geçirildi ve numuneler cihaza verilmeye uygun hale gelmiş oldu. Numuneler cihaza verilmeden önce hücrelerin protein miktarı BCA yöntemiyle analiz edildi.

Hücrelerin Enerji Düzeylerinin Ölçülmesi

Hücrelerin enerji düzeyleri, Saraçlıgil ve ark.'larının çalışmasındaki (195) metod kullanılarak ölçülmüştür. Mobil faz, içinde 160 mM KH₂PO₄ ve 100 mM KCl içeren solüsyonun pH'ı doygun KOH ile 6,5'a ayarlanarak, 0,45 µm'lik selüloz asetat filtreden süzülüp degaze edilerek hazırlandı. ATP, ADP ve AMP'den hem tek standartlar şeklinde, hem de mix standartlar şeklinde farklı konsantrasyonlarda çözeltiler distile suyla hazırlandı. Hücrelerin ATP, ADP ve AMP değerleri HPLC'de ölçülmüş ve enerji hesabı ATP, ADP ve AMP'nin tek tek protein sonuçlarına oranlanmasıyla bulunmuştur. Bu hesaplamalar yapılırken ayırım gücünü hesaplamak için;

$$R_s = \underbrace{\frac{1}{4}}_{\text{Etkinlik}} \underbrace{\sqrt{N}}_{\text{Seçicilik}} \cdot \underbrace{\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \cdot \left(\frac{k}{1 + k} \right)}_{\text{Kapasite faktörü}}$$

formülü kullanılmıştır.

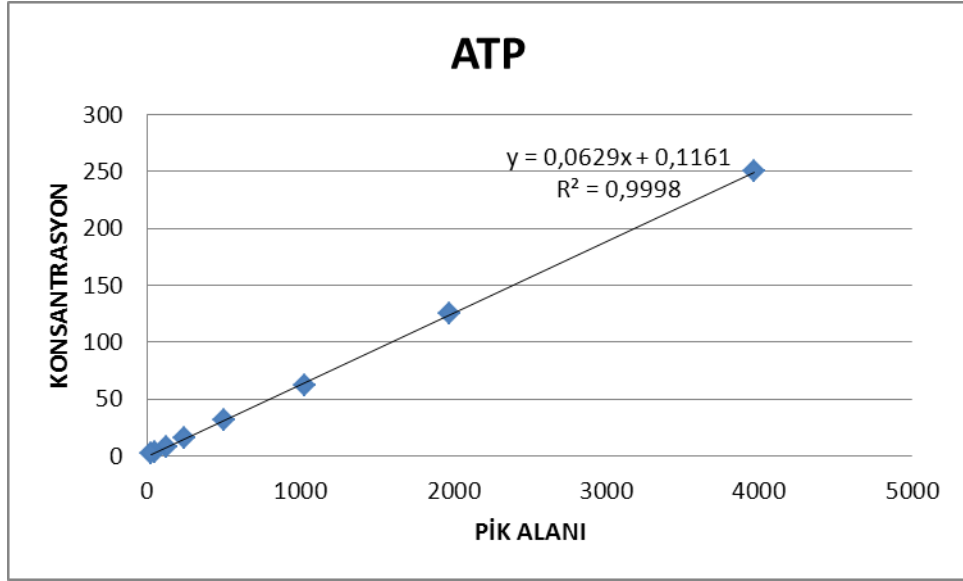
Ayırım gücü, kolonun pikleri ayırma kapasitesini ifade eder.

Etkin tabaka sayısına(N), seçiciliğe(a) ve kapasite faktörüne bağlıdır(k)

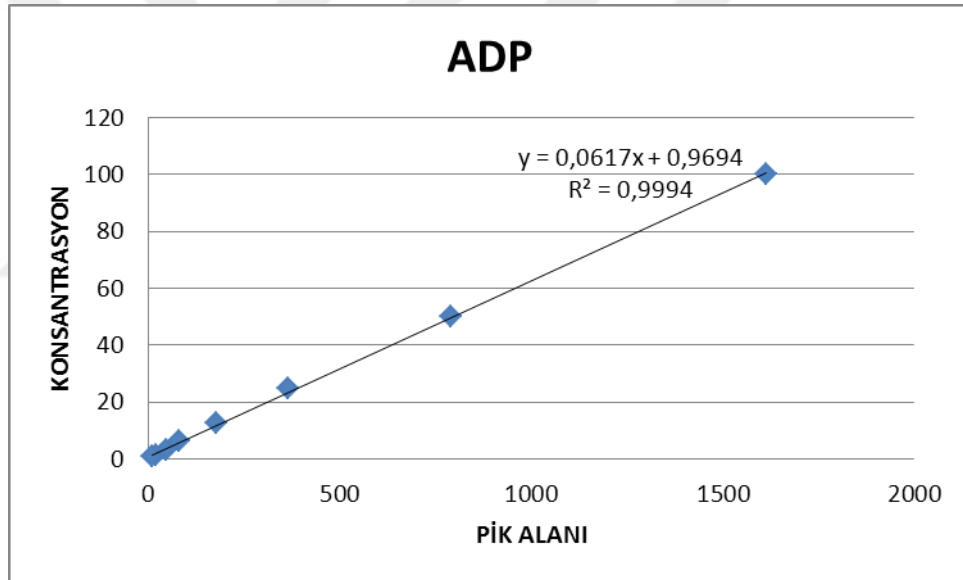
Çalışma Koşulları	Sistem Parametreleri
HPLC Modeli	Shimadzu DGU-20A3R
Dedektör	UV dedektör
Mobil Faz	160µM KH ₂ PO ₄ -100µM KCl ₂ içeren çözelti PH=6,5
Analitik Kolon	GES C18 HPLC column,4,6X150 mm,5µm
Dalga Boyu	254 nm
Akım Hızı	1 ml/dk
Numune Hacmi	50µL
Çalışma Süresi	15dk
Ayırım	Ters Faz İyon Değişimi

Tablo 3.4. Enerji Düzeyi Çalışmasının HPLC Çalışma Koşulları

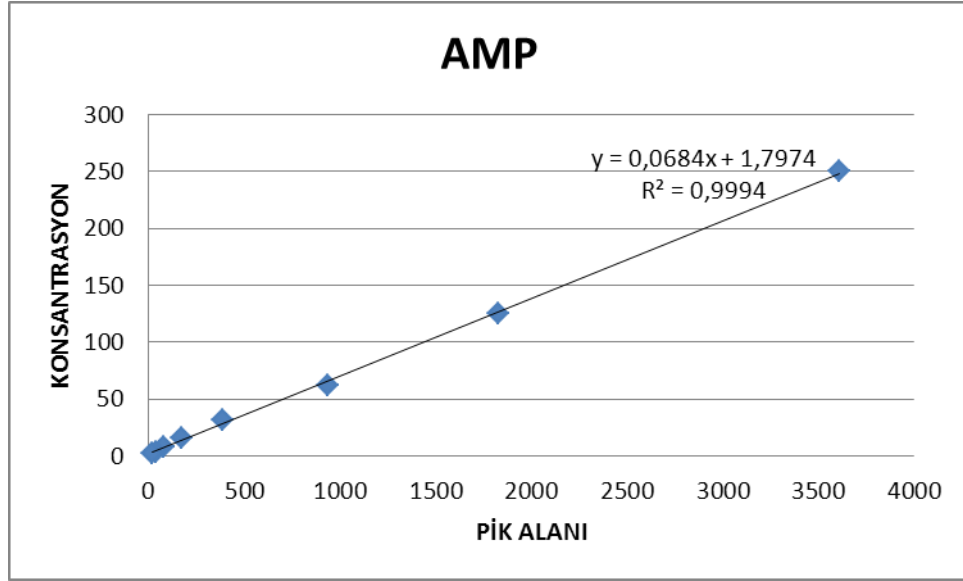
HPLC cihazı ATP, ADP ve AMP analizi için uygun çalışma koşullarına ayarlandı. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ATP, ADP ve AMP standartları HPLC sistemine verildikten sonra, piklerin ortaya çıkış zamanı, uygun mobil faz bileşeni ve uygun akım hızı saptandı. Enerji Düzeyi Çalışmasının HPLC Çalışma Koşulları Değişen konsantrasyonlarda hazırlanan ATP, ADP ve AMP standartları önce tek tek sisteme enjekte edilerek retansiyon süreleri belirlendi. Daha sonra mix standartlar HPLC sistemine verilerek piklerin ortaya çıkış zamanı, uygun mobil faz bileşeni ve uygun akım hızı saptandı. Standart çalışmalardan elde edilen pik alanları esas alınarak, ATP, ADP ve AMP standart eğrileri çizildi. ATP, ADP ve AMP için 10, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312, 0,156 ve 0,078 mM konsantrasyonlarında hazırlanan standartlar HPLC sistemine verildikten sonra, piklerin ortaya çıkış zamanı, uygun mobil faz bileşeni ve uygun akım hızı saptandı. Standart çalışmalardan elde edilen pik alanları esas alınarak, ATP, ADP ve AMP standart eğrileri çizildi. Elde edilen standart değerlere göre, numunelerden elde edilen pik alanlarından ATP, ADP ve AMP konsantrasyonları hesaplandı. Önceden hazırlanan hücreler de standartların ardından cihaza verildi ve standartlara göre numunelerin pik alanları değerlendirildi.



Şekil 3.9.2. ATP Konsantrasyon(mM)-Pik Alanı



Şekil 3.9.3. ADP Konsantrasyon(mM)-Pik Alanı



Şekil 3.9.4. AMP Konsantrasyon(mM)-Pik alanı

LDH Aktivitesinin Hesaplanması

LDH ölçümü için hücrelerin DMEM'leri alındı otoanalizörde (BECKMAN COULTER AU5800) U/L biriminde ölçümü yapıldı.

LDH, NAD⁺'nın NADH'ye indirgenmesi ile eş zamanlı olarak laktatın piruvata oksidasyonunu katalize eder. NADH artışı 340 nm'de ölçülmüştür ve numunedeki enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

3.10. HEK293T Kültür Süpernatantlarında Metabolit Değerlerinin Ölçülmesi

Kontrol olarak boş pcDNA3.1 ve Tw+/pcDNA3.1 vektörleri transfekte edilmiş HEK293T hücrelerinin kültür besiyeri süpernatantları, transfeksiyonun 72. saatinde ayrı tüplere alınmıştır. Alınan numunelerin PH parametreleri hem kan gazı cihazında (Techno Medica Analyzer-603ie Blood Gas Analyzer) hem de PH metre cihazında (ph 3110 SET 2 SenTix 41) ölçümleri yapıldı ve her iki farklı cihazda yapılan ölçüm sonuçlarının uyumlu olduğu görüldü. CO₂ parametreside kan gazı enjektörüne alınan DMEM'den Techno Medica Analyzer-603ie Blood Gas Analyzer cihazında ölçümü yapıldı. Bu cihazlardaki verilere göre her hücre grubu besiyeri süpernatantının metabolit (Glikoz, Laktat ve osmolarite) değerleri belirlenmiştir.

3.11. Glukoz Alımı Deneyi

pcDNA3.1 ve Tw+/pcDNA3.1 transfekte edilmiş HEK293T hücreleri 1×10^5 hücre/kuyucuk olacak şekilde 24 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Bu hücrelerin glukoz alım düzeylerini belirlemek için Glucose Uptake Cell-Based Assay Kit (Cayman cat. 600470) kullanıldı. Twist1 geni eksprese eden ve etmeyen HEK293T hücrelerinde insülin bağımlı ve insülin bağımsız glukoz alımını belirlemek için deney protokolümüzde 100mM insülin içeren/içermeyen ve %10 FBS içeren/içermeyen hücre gruplarını oluşturduk ve glukoz alım deneyimizi bu hücre gruplarında uyguladık.

Transfeksiyondan 72 saat sonra hücreler 1 saat boyunca glukozsuz besiyeri içerisinde bekletildi. Süre sonunda glukoz analogu olan 2-NBDG final konsantrasyonu 150 $\mu\text{g/ml}$ olacak şekilde glukozsuz besiyerinde hazırlanarak hücrelere verildi. HEK293T hücreleri 2-NBDG içeren ortamda 30 dk. kültüre edildi. Uygulama sonunda kültür kabı 400 g'de 5 dk. oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant aspire edilerek atıldı. Hücreler üzerine kit içeriğinde verilen 200 μl cell-based assay buffer ilave edildi. Hücreler tekrar 400 g'de 5 dk. oda sıcaklığında santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı. Kuyucuktaki hücreleri üzerine 100 μl cell-based assay buffer ilave edildi. Hücreler floresan mikroskopta (Leica) görüntülendi. Ayrıca, buffer içindeki hücreler pipetaj ile yavaşça kaldırılarak homojenize edildi ve 485/535 nm de akım sitometri cihazında (FACS Aria II) okutularak glukoz alım düzeyleri belirlendi.

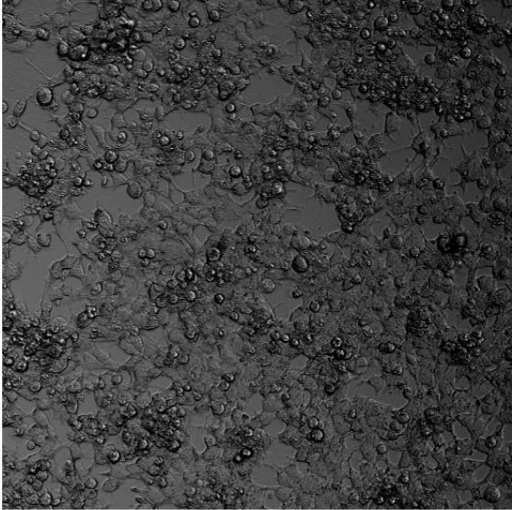
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Tez projesi kapsamında Twist1 transkripsiyon faktörünün glikoz alımı ve glikolitik yolda önemli olan bazı genlerin ekspresyon düzeyindeki etkisini inceledik. Bu bağlamda hipotezimizi test etmek amacıyla Twist1 genini çok zayıf eksprese eden HEK293T hücrelerini kullandık. Öncelikle bu hücrelerde ektopik olarak Twist1 genini yüksek düzeyde eksprese ettirmek amacıyla Twist1 geni klonlanmış pcDNA3.1 ekspresyon vektörünü (Tw+/pcDNA3.1) ve kontrol olarak Twist1 geni içermeyen boş vektörü (pcDNA3.1) kullandık. HEK293T hücrelerine transfeksiyon etkinliğini test etmek için yeşil floresan protein-green fluorescence protein (GFP) geni klonlanmış pmaxGFP ekspresyon vektörünü kullandık.

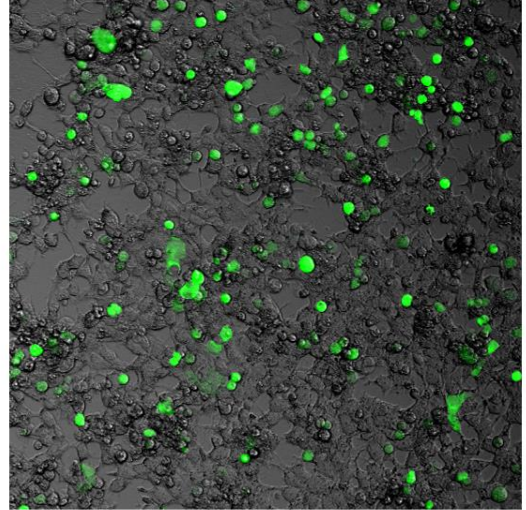
4.1. HEK293T Hücrelerine Transfeksiyon Etkinliğinin pmaxGFP plazmid vektörü ile belirlenmesi

HEK293T hücrelerine transfeksiyon şartlarını optimize etmek ve proje kapsamındaki vektörlerimizin transfeksiyonu açısından bilgi verici olabilecek pmaxGFP transfeksiyonunu gerçekleştirdik. Transfeksiyon etkinliğini floresan mikroskop yardımıyla hücrelerin GFP ekspresyonunu belirleyerek gerçekleştirdik (Şekil 4.1)

Kontrol



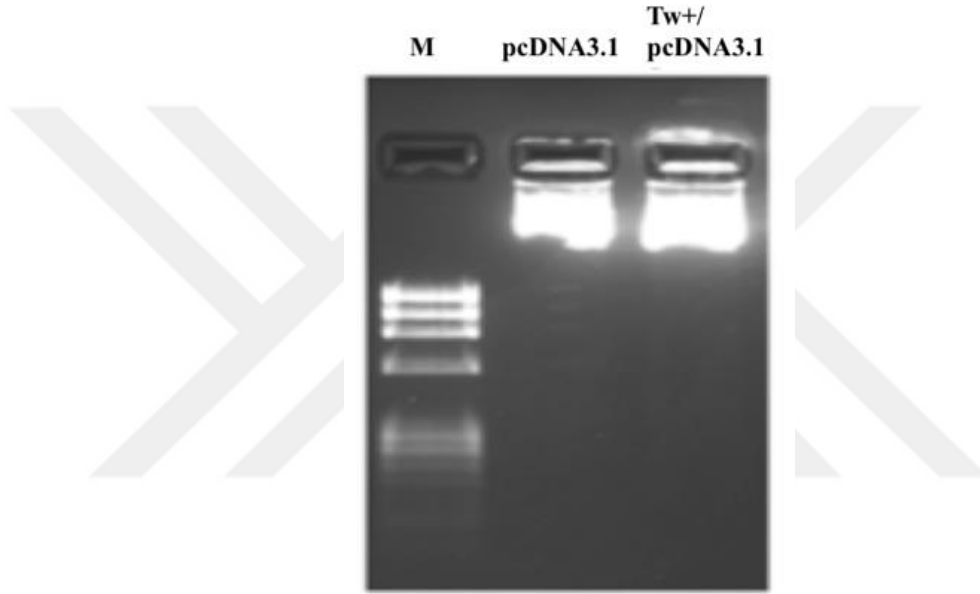
pmaxGFP



Şekil 4.1. HEK293T hücrelerine transfeksiyon etkinliğini gösteren yeşil floresan protein (green fluorescence protein-GFP) geni içeren ökaryotik ekspresyon vektörünün (pmaxGFP) ifade düzeyi (büyütme gücü: 200x).

4.2. pcDNA3.1 ve Tw+/pcDNA3.1 Ekspresyon Vektörlerinin E.coli DH5 α Suşundan İzolasyonu

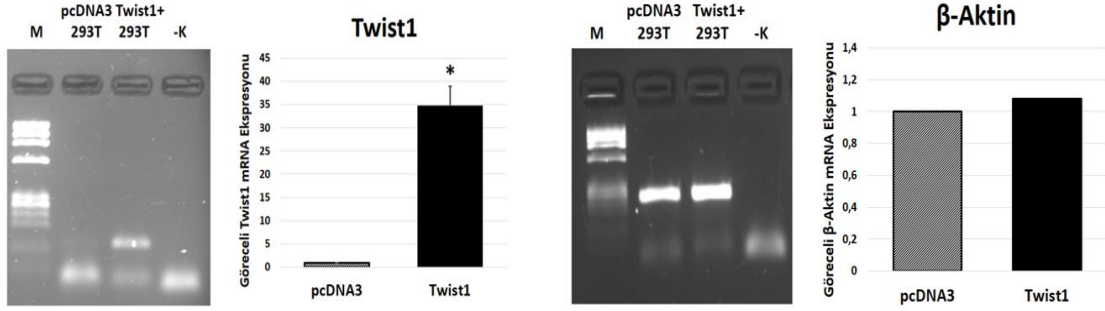
Kontrol pcDNA3.1 ve Tw+/pcDNA3.1 vektörlerini çoğaltmak amacıyla kompetan E.coli DH5 α suşuna transfer ettikten sonra gece boyu Ampisilin içeren LB Broth besiyeri içerisinde çoğaltıldı ve ticari kit yardımıyla plazmid vektörleri izole edildi. Tez deneylerinde kullandığımız vektörlerin miktar ve saflık düzeylerini belirledikten sonra intakt olup olmadıklarını görmek için % 1 agaroz jelde kontrol ettik (Şekil 4.2)



Şekil 4.2. Plazmid izolasyon kiti ile izole edilmiş boş pcDNA3.1 ve Twist1 cDNA dizisi klonlanmış (Tw+/pcDNA3.1) plazmid vektörlerin %1'lik agaroz jel görüntüsü.

4.3. Transfekte Edilmiş HEK293T Hücrelerinde Twist1 Ekspresyonu

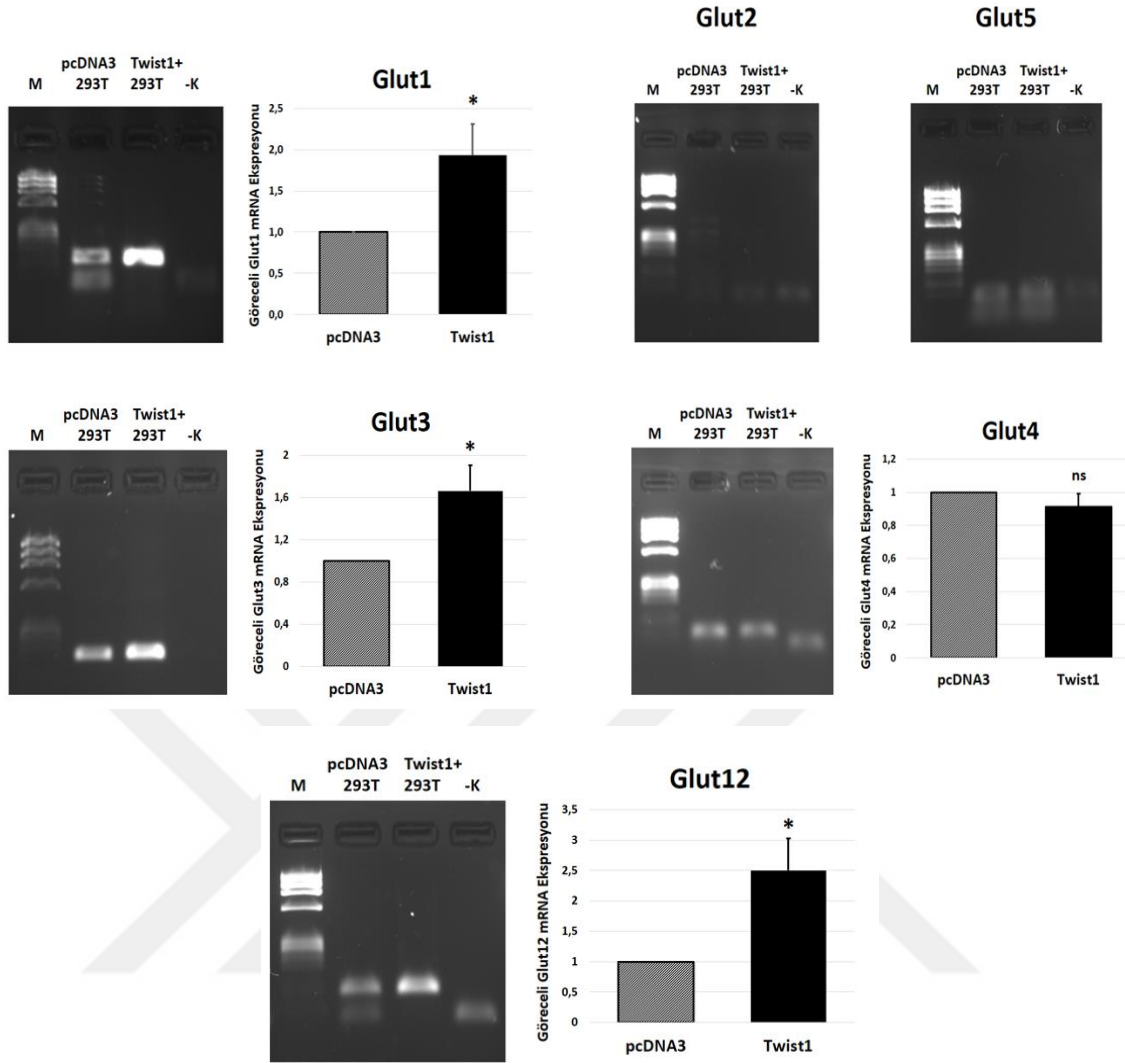
pcDNA3.1 ve Tw+/pcDNA3.1 vektörleri transfekte edilmiş HEK293T hücrelerinde Twist1 ekspresyonunu RT-PCR yöntemi ile belirledik. İnternal kontrol olarak β -aktin genini kullandık. Gerçekleştirdiğimiz transfeksiyon deneyinde HEK293T hücrelerinde yaklaşık 35 kat Twist1 ekspresyonunu artırdık (Şekil 4.3)



Şekil 4.3. Kontrol olarak boş pcDNA3.1 vektörü klonlanmış (pcDNA3) ve Twist1 yüksek ekspresyonu sağlanmış (Twist1+) 293T hücrelerinde Twist1 ve β-aktin gen ekspresyonlarının %2'lik agaroz jel görüntüsü ve normalize edilmiş göreceli mRNA düzeyleri (*, p değeri<0.05)

4.4. Twist1 Eksprese Eden ve Etmeyen HEK293T Hücrelerinde Bazı Glikoz Transporter (GLUT) Genlerinin Ekspresyon Düzeyleri

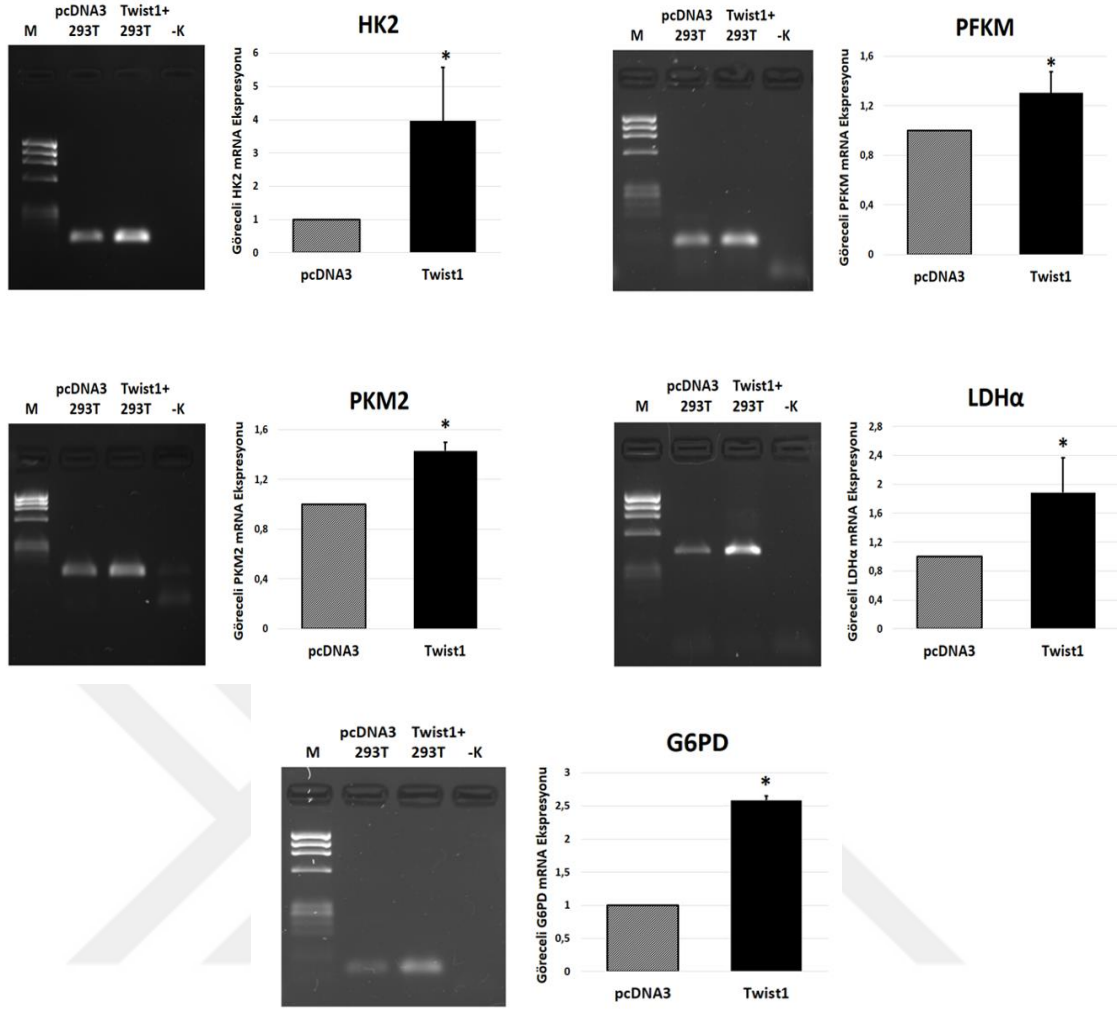
Ektopik yüksek Twist1 ekspresyonu gösteren HEK293T hücrelerinde Glut1 ekspresyonu kontrole göre yaklaşık 2 kat, Glut3 yaklaşık 1,6 kat ve Glut12 ekspresyonu ise yaklaşık 2,5 kat artmaktadır. Twist1 yüksek ekspresyonuna bağlı olarak Glut4 ekspresyonunda herhangi bir değişiklik saptamadık. Ayrıca yaptığımız çalışmaya göre, HEK293T hücrelerinde Glut2 ve Glut5 ekspresyonlarını belirleyemedik (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Kontrol olarak boş pcDNA3.1 vektörü klonlanmış (pcDNA3) ve Twist1 yüksek ekspresyonu sağlanmış (Twist1+) 293T hücrelerinde glikoz transporter genleri olan Glut1, Glut2, Glut3, Glut4, Glut5 ve Glut12 gen ekspresyonlarının %2'lik agaroz jel görüntüsü ve normalize edilmiş göreceli mRNA düzeyleri (*, p değeri<0.05; ns, anlamlı fark yok)

4.5. Twist1 Eksprese Eden ve Etmeyen HEK293T Hücrelerinde Glikolitik Yolda Önemli Olan Bazı Genlerin Ekspresyon Düzeyleri

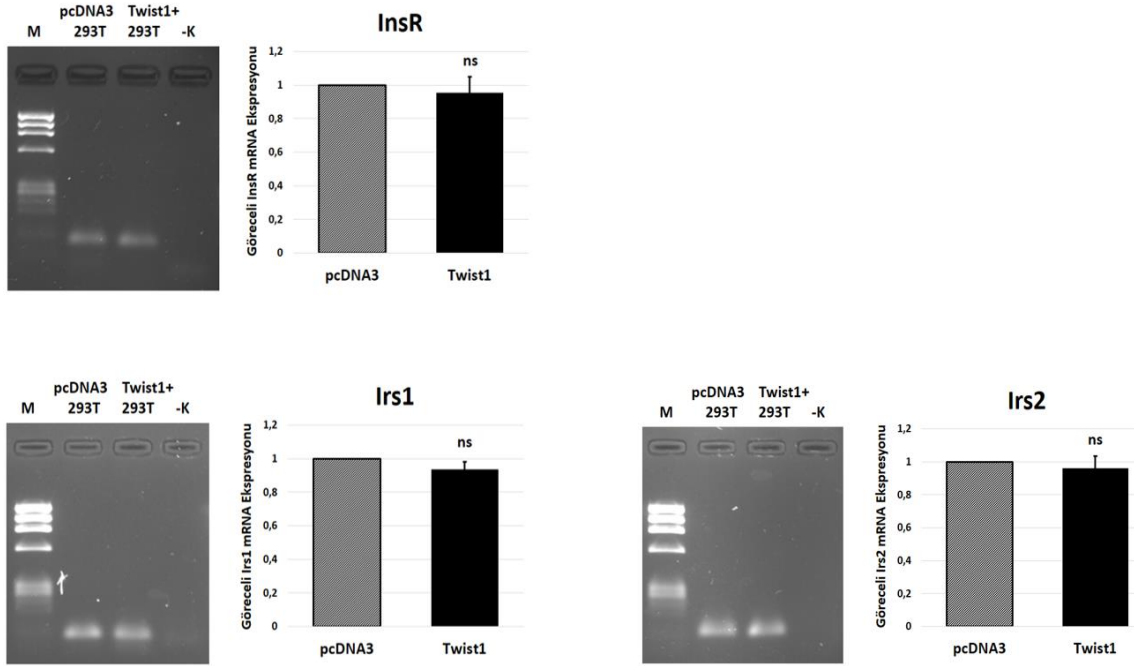
Yüksek Twist1 ekspresyonu gösteren HEK293T hücrelerinde kontrol hücrelere oranla HK2 geninde yaklaşık 4 kat, PFKM geninde yaklaşık 1,3 kat, PKM2 geninde yaklaşık 1,4 kat, LDH α 1,9 kat ve G6PD geninde yaklaşık 2,5 kat gen ekspresyon artışı saptadık (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Kontrol olarak boş pcDNA3.1 vektörü klonlanmış (pcDNA3) ve Twist1 yüksek ekspresyonu sağlanmış (Twist1+) 293T hücrelerinde glikolitik enzimler olan Hekzokinaz 2 (HK2), Fosfofruktokinaz M (PFKM), Piruvat kinaz M2 (PKM2), Laktat dehidrogenaz α (LDH α) ve Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) gen ekspresyonlarının %2'lik agaroz jel görüntüsü ve normalize edilmiş göreceli mRNA düzeyleri (*, p değeri<0.05)

4.6. Twist1 Eksprese Eden ve Etmeyen HEK293T Hücrelerinde İnsülin Reseptörü ve İnsülin Reseptör Substrat 1 ve 2 Genlerin Ekspresyon Düzeyleri

Yüksek Twist1 ekspresyonu gösteren ve göstermeyen kontrol HEK293T hücrelerinde İnsülin reseptöründe ve insülin reseptör aktivasyonunda önemli görev alan insülin reseptör substrat 1 ve 2 genlerinin ekspresyon düzeylerini inceledik. Bu genlerin ekspresyon seviyeleri insülin-bağımlı glikoz alımında anahtar rol oynamaktadır. Tez kapsamında bu genlerde anlamlı herhangi bir değişiklik saptamadık (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Kontrol olarak boş pcDNA3.1 vektörü klonlanmış (pcDNA3) ve Twist1 yüksek ekspresyonu sağlanmış (Twist1+) 293T hücrelerinde İnsülin sinyal yolağında önemli olan İnsülin reseptörü (InsR), İnsülin reseptör substrat 1 (Irs1) ve İnsülin reseptör substrat 2 (Irs2) gen ekspresyonlarının %2'lik agaroz jel görüntüsü ve normalize edilmiş göreceli mRNA düzeyleri (ns, anlamlı fark yok)

4.7. Twist1 Eksprese Eden ve Etmeyen HEK293T Hücrelerinde ATP, ADP ve AMP Oranlarını Belirlenmesi

Protokole uygun olarak hücre lizatları hazırlanmıştır. Ölçüme geçilmeden önce HPLC(Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Highperformance liquid chromatography) cihazı ATP-ADP-AMP çalışma koşullarına ayarlanmıştır. Mobil faz protokole göre hazırlanmıştır. Cihaza enjekte edilen madde miktarı genellikle 0,1--20µL arasında olup bu çalışmada farklı enjektör ucu kullanılarak 50 µL olarak kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonda hazırlanan ATP, ADP ve AMP standartları HPLC sistemine verildikten sonra piklerin ortaya çıkış zamanı, uygun mobil faz bileşeni ve uygun akım hızı saptanmıştır.

Hücrelerin ATP, ADP ve AMP aktivitelerinin Twist1 eksprese eden hücrelerin kontrol hücrelere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. ATP harcanmasını gösteren parametre AMP değerleridir. AMP değeri ne kadar yüksek ise o kadar fosfat koparılarak daha çok enerji açığa çıkmış ve daha çok enerji kullanılmış demektir. Bu çalışmadaki sonuçlara göre Twist1 geninin enerji seviyelerini de glukoz alımına bağlı olarak etkilediğini söyleyebiliriz.

Tablo 4.1. Twist1 Eksprese Eden ve Etmeyen HEK293T Hücrelerinde ATP, ADP ve AMP Düzeylerinin HPLC Sonuçları.

ATP Düzeyleri

	Miktar	Sonuç
Twist (+)	50µL	46,81306
pcDNA / Twist(-)	50µL	13,5138

ADP Düzeyleri

	Miktar	Sonuç
Twist (+)	50µL	41,46928
pcDNA / Twist(-)	50µL	25, 04474

AMP Düzeyleri

	Miktar	Sonuç
Twist (+)	50µL	44,84836
pcDNA / Twist(-)	50µL	58,90456

4.8. Twist1 Eksprese Eden ve Etmeyen HEK293T Hücrelerinin Kültür Süpernatantlarında Metabolit Düzeyleri

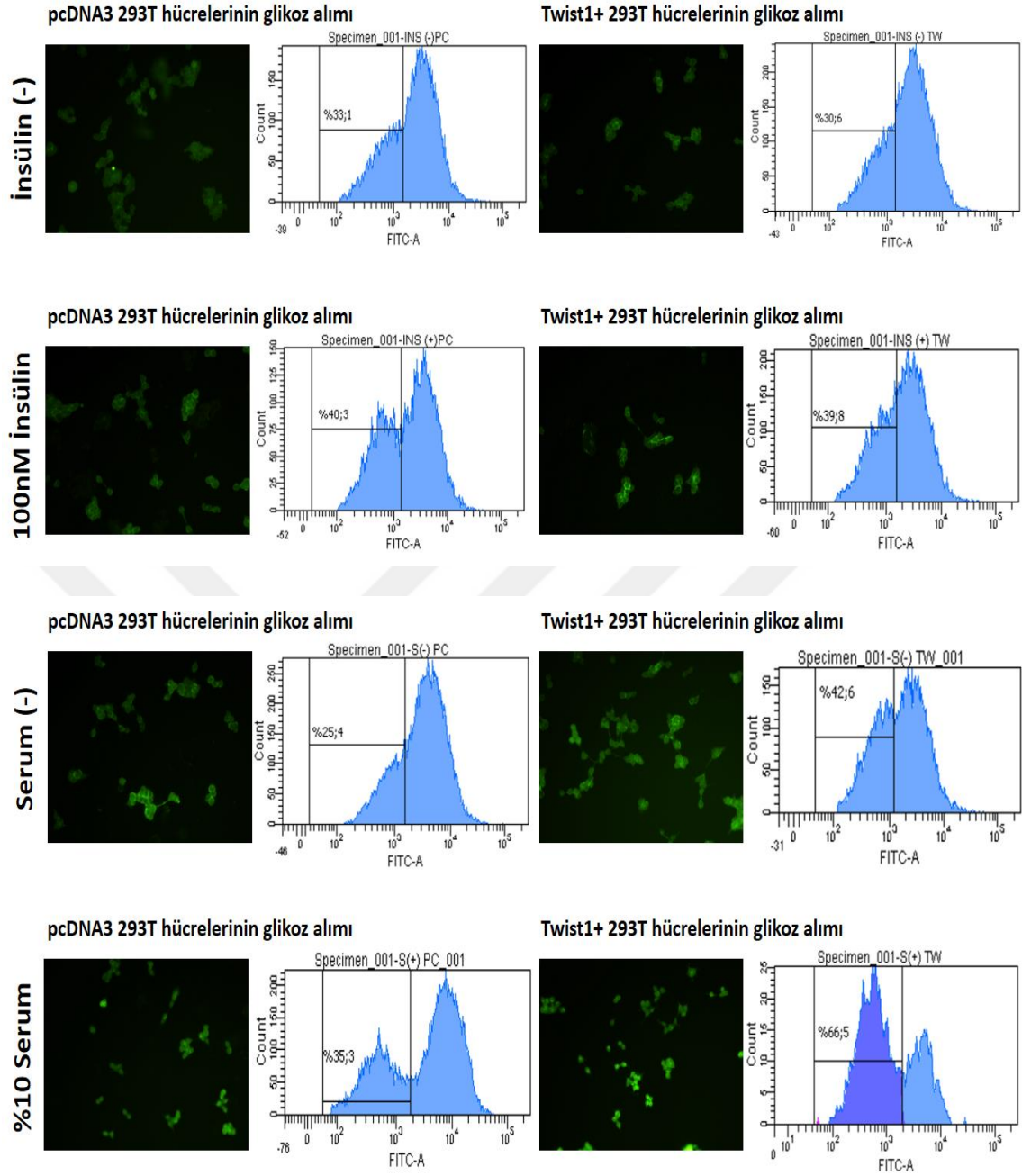
Plazmid vektörlerin transfeksiyonundan 72 saat sonra Twist1 eksprese eden ve etmeyen kontrol HEK293T hücre kültürlerinin besiyerleri (süpernatant) aspire edilerek kan gazı analizöründe bekletilmeden okutulmuştur. Elde ettiğimiz sonuçlara göre Twist1 eksprese eden hücrelerde glikoz seviyesi 265 mg/dl, kontrol hücrelerde ise 278 mg/dl'dır. Laktat seviyesi de kontrol hücrelerde 3,1 mmol/L iken Twist1 eksprese eden hücrelerde ise 3,5 mmol/L'ye çıkmıştır (Tablo 4.2). Bu bulgulara göre Twist1 ekspresyonu hücrelerde glikoz alımını artırdığını aynı zamanda aerobik glikolizi destekleyerek besiyeri ortamındaki laktat seviyesini artırdığını söyleyebiliriz.

Tablo 4.2. Twist1 eksprese eden (Tw+/pcDNA3.1 transfekte) ve etmeyen (pcDNA3.1 kontrol vektör transfekte) HEK293T hücrelerinin kültür süpernatantlarında metabolit değerleri.

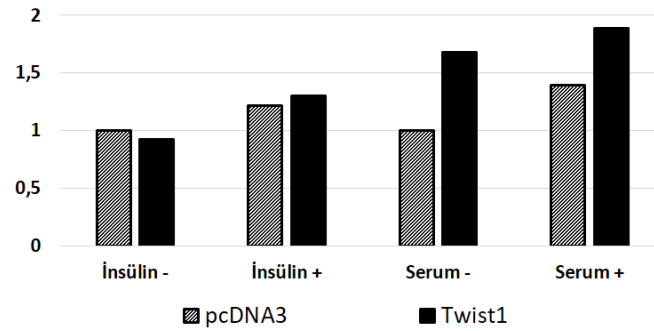
METABOLİK DEĞERLER	pcDNA3.1 Transfekte HEK293T Süpernatantı	Tw+/pcDNA3.1 Transfekte HEK293T Süpernatantı
Glikoz(mg/dl)	278	265
Laktat(mmol/L)	3,1	3,5
Osmolarite(mmol/kg)	317, 8	321, 3

4.9. Twist1 Eksprese Eden ve Etmeyen HEK293T Hücrelerinde 100mM İnsülin ve %10 FBS varlığında Glikoz Alım Düzeyleri

Yüksek Twist1 ekspresyonu gösteren ve kontrol HEK293T hücrelerinin glikoz alım seviyelerini ticari kit yardımıyla gerçekleştirdik. Hücrelerin insülin-bağımlı glikoz alım seviyelerini belirlemek için hücre kültüründe serumsuz glikozsuz besiyeri ve 2-NBDG uygulaması esnasında 100mM insülin ile muamele ettik. Aynı zamanda insülin-bağımsız glikoz alım seviyelerini belirlemek için de insülin yerine %10 FBS içeren besiyerini kullandık. Kit protokolünü uygulayarak elde ettiğimiz FACS sonuçlarına baktığımızda, insülinin kontrol hücrelerde %33,1'den 40,3'e, Twist1 eksprese eden hücrelerde ise 30,6'dan 39,8'e glikoz alımını artırmıştır. Ancak Twist1 ekspresyonu artışına bağlı olarak insülin-bağımlı glikoz alımında iki grup arasında anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. HEK293T hücrelerine %10 FBS uygulaması yaptığımızda ise glikoz alımı oranları kontrol hücrelerde %25,4'ten %35,3'e, Twist1 eksprese eden hücrelerde de %42,6'dan %66,5'e yükselmiştir. Ayrıca Twist1 eksprese eden hücrelerde kontrole oranla yaklaşık 2 kat glikoz alım düzeyi (%35,3'ten %66,5'e) artmıştır (Şekil 4.7).



293T Hücrelerinin Glikoz Alım Düzeyleri



Şekil 4.7. pcDNA3.1 boş vektör (pcDNA3) ve Tw+/pcDNA3.1 vektörü transfekte edilmiş yüksek Twist1 ekspresyonu gösteren (Twist1) hücrelerinin akım sitometrisi ile belirlenmiş glikoz alım düzeyleri.

Bu sonuçlara göre İnsülinin glikoz alımını yaklaşık %20 oranında desteklediğini ancak Twist1'in insülin-bağımlı glikoz alımında görev almadığını tesbit ettik. Aynı zamanda %10 FBS muamelesinin de %40 oranında glikoz alımını desteklediğini saptadık. Buna ek olarak, Twist1 insülin-bağımsız olarak %10 FBS varlığında hücre içine glikoz alımını yaklaşık iki katı artmasını desteklediğini söyleyebiliriz.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Çalışmamızda kanser hücrelerinde enerji ihtiyacının karşılanmasında ihtiyaç duyulan glukozun hücre içine alınmasında TWIST1 transkripsiyon faktörünün rolü incelenmiştir. Elde ettiğimiz bulgular neticesinde TWIST1 transkripsiyon faktörünün GLUT-1, GLUT-3 ve GLUT-12 glukoz transporterların ekspresyonlarını artırarak hücre içine glikoz alımını desteklediğini kanıtladık. Ayrıca HEK293T hücrelerinde incelediğimiz GLUT-2 ve GLUT-5 genlerinin ekspresyonunu belirleyemedik. Buna ilave olarak, insülin-bağımlı glikoz alımı için önemli olan GLUT-4'ün mRNA düzeyindeki transkripsiyonel aktivitesi TWIST1 varlığında anlamlı bir değişiklik göstermemiştir.

GLUT-1 metabolik olarak yüksek ihtiyaç duyulan ve bazal glikoz alımını sağlayan glikoz transporterlardan biridir. Sinir sisteminde, kan-beyin bariyerinde, eritrositlerde ve tiroid dokularında ekspresyonu önemlidir. Hepatik, pankreatik, meme, özofageal, beyin, renal, akciğer, kütanöz, kolorektal, endometriyal, ovaryan ve servikal gibi birçok kanser türünde ekspresyonu artmış durumdadır. T hücre lösemilere neden olan human T-cell leukemia virus (HTLV)'ün zarf glikoproteinleri hücre zarında GLUT-1 ile interaksiyona geçer. Bu bakımdan hematolojik malignansilerde GLUT-1 ekspresyon seviyesi önemlidir. Sıçanlarla yapılan araştırmalarda hipoglisemik koşullarda HEK293 hücrelerinde GLUT-1 mRNA stabilitesinde artış saptanmıştır. Tez projesi kapsamında yaptığımız çalışmalarda TWIST1 transkripsiyon faktörünün GLUT-1 ekspresyonunu 2 kat artırdığını gösterdik. GLUT-1 hücre içerisine insülin-bağımsız glikoz alımını sağlar. Dolayısıyla TWIST1, kanser gelişimini GLUT-1 ekspresyonunu tetiklemek suretiyle glikoz alım düzeyini artırarak destekler.

GLUT-3, plasentadan fetal sirkülasyona glikoz geçişini sağlayan faktörlerden biridir. Ayrıca sinir sisteminde ekspresyonu ve serebral glikoz alımında önemi yüksektir. GLUT-3, iskelet kası ve nöron hücrelerinde insülin-bağımlı glikoz alımını sağlamaktadır. Ancak GLUT-3-aracılı glikoz alımı için insülin şart değildir. İnsülin-bağımsız olarak da glikoz alımını sağlayabilir. GLUT-3, mesane, larinks, prostat, gastrik, over, oral, baş ve boyun kanserlerinde ekspresyonu artmaktadır. Tez bulgularımıza göre TWIST1 yüksek ekspresyonu varlığında GLUT-3 ekspresyonu 1,6 kat artmıştır. Bu durum embriyonik bir faktör olarak bilinen TWIST1'in glikoz

alımında embriyonik açıdan önem arz eden GLUT-3 ekspresyonunu tetiklediğini ve kanser gelişimini bu yolla desteklediğini söyleyebiliriz.

GLUT-4, insülin yolağı ile düzenlenen glikoz alımında önemli olan glikoz transporter kanalıdır. İnsülin-duyarlı dokularda ekspresyonu yüksektir ve glikoz homeostazının düzenlenmesinde oldukça önemlidir. Başlangıçta, GLUT-4 insülin-stimülasyonu ile glikoz alımını sağladığından kısıtlayıcı faktör olarak düşünülmekteydi. Ancak, GLUT-4 knock-out farelerle yapılan araştırmalarda hipergliseminin gelişmediği saptanmıştır. Bu durum diğer GLUT izoformlarının glikoz homeostazının düzenlenmesinde önemli rolleri olduğunu göstermektedir. Tez bulgularımıza baktığımızda insülin stimülasyonu ve TWIST1 ekspresyonunu sağladığımız şartlarda HEK293T hücrelerinde glikoz alım düzeyleri değişmemiştir. Dolayısıyla TWIST1 transkripsiyon faktörünün söz konusu böbrek hücre hattında GLUT-4 üzerinden insülin stimülasyonu eşliğinde glikoz alımı üzerinde etkisinin olmadığına kanaat getirdik.

İnsülin reseptörü, insülin bağlanması neticesinde dimerize olarak aktive olur. Bu aktivasyonda ve sinyalin hücre içerisine transdüksiyonunda insülin reseptör substrat (IRS) molekülleri oldukça önemlidir. İnsülin sinyal yolağı aktivasyonu neticesinde insülin-bağı glikoz transporterların membrana translokasyonu gerçekleşir ve hücre içerisine glikoz alımı sağlanır. Önemli insülin-bağı glikoz kanallarından biri GLUT-4'tür. Tez bulgularımıza göre insülin stimülasyonu ile glikoz alımı artmaktadır. Ancak TWIST1 ekspresyonu sağlandığında bu durumda anlamlı bir değişiklik saptamadık. Bahsettiğimiz gibi TWIST1 varlığında GLUT-4 ekspresyonunun değişmediğini belirlemiştik. Ancak bunun yanısıra İnsülin reseptörü, insülin reseptör substrat-1 ve -2 genlerinin de TWIST1'e bağlı ekspresyon değişikliği göstermemiştir. Bu bulgular ışığında, TWIST1'in HEK293T hücrelerinde insülin yolağının temel faktörleri ve glikoz alımındaki rolleri üzerinde anlamlı etkisi mevcut olmadığı anlaşılmıştır.

GLUT-12, MCF7 meme kanseri hücre hattında GLUT-4 ile yüksek homoloji gösteren bir glikoz transporter geni olarak tanımlanmıştır. İskelet kası, kalp, beyin, böbrek, dalak, ince barsak ve yağ dokularında ekspresyonu mevcuttur. Diyabetik böbrek durumlarında ekspresyonu artar. Diyabetik nefropati sıçan modellerinde GLUT-1 ile birlikte ekspresyonu artmış olduğu belirlenmiştir. Son zamanlarda GLUT-12, kanser tedavisinde potansiyel terapötik hedef olup olamayacağı tartışma konusudur. Araştırma sonuçlarımıza göre TWIST1 GLUT-12 transkripsiyonunu 2,5 kat artırmıştır ve incelediğimiz genler arasında TWIST1'e bağlı olarak ekspresyonu en çok artan glikoz

kanalı GLUT-12'dir. Dolayısıyla TWIST1 aracılı glikoz alımında GLUT-12'nin baskın rolünün olduğu kanısındayız.

Yapılan araştırmalar tümör hücrelerinde glikoz girişinin ve kullanımının arttığını kanıtlamıştır. Ancak bu olayda rol alan faktörler gün geçtikçe daha iyi anlaşılmaktadır. Kansere progresyonunda önemli temel faktörlerden biri olan TWIST1 transkripsiyon faktörünün hücre içine glikoz alımı ile ilgili literatürde herhangi bir bilgiye rastlamadık. Tez projemizin çıkış noktası olan bu konuda yaptığımız araştırmaya göre TWIST1'in hücre içine glikoz alımında rol aldığını göstermiş olduk. Bunu da HEK293T hücrelerinde GLUT-1,-3 ve -12 kanallarının gen ekspresyonunu destekleyerek sağladığını kanıtladık. Ancak glikoz alımı hücrede insülin-bağımlı veya bağımsız olarak meydana gelmektedir. Yaptığımız çalışmanın bulgularına göre TWIST1 transkripsiyon faktörü HEK293T hücrelerinde hücre içine glikoz alımını insülin-bağımsız olarak sağlamaktadır.

Glikoz alımında önemli olan glikoz transporterların yanısıra glikoz kullanımında önemli bazı genleri de çalışma kapsamında değerlendirdik. Burada TWIST1 yüksek ekspresyonu varlığında HEK293T hücrelerinde, Hekzokinaz 2 (HK2), Fosfofruktokinaz M (PFKM), Piruvat kinaz alttip M2 (PKM2), Laktat dehidrogenaz α (LDH α) ve Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) genlerinin ekspresyonel düzeylerini araştırdık.

HK2, glikozun glikolize girmesini sağlayan ilk basamağı katalize eder. Bu basamak geri dönüşümsüzdür ve glikozun fosforile edilerek glikoz-6-fosfat'a dönüşmesi reaksiyonudur. HK2 mitokondri dış membranındaki voltaj-bağımlı anyon kanalı (VDAC) ile bağlanır ve HK2-VDAC kompleksi oluşur. Bu komplekse reaksiyon için gerekli olan ATP mitokondri iç membranında bulunan ATP sentaz tarafından sağlanır. Bu sayede hücre içine alınan glikoz aktive edilmiş olur. Ayrıca glikolizin ilk basamağı olan bu aşamada meydana gelen HK2-VDAC kompleksi mitokondri-bağımlı apoptozisin meydana gelmesini engeller. HK2 normal dokularda düşük seviyede eksprese olur, ancak kanser gelişiminde yüksek ekspresyon göstermektedir. HK2 ekspresyonunun baskılandığı durumlarda anjiyogenezin, metastazın ve apoptozisin gerilediği belirlenmiştir. Ayrıca HK2 ekspresyon artışı laktat üretimi ile ilişkilendirilmiştir ve bu durum kanser dokularında asidoza neden olmaktadır. Tez çalışması kapsamında TWIST1 ekspresyonunu indüklediğimiz HEK293T hücrelerinde HK2 ekspresyonu yaklaşık 4 kat artmıştır. Bu bulgu TWIST1'in sadece glikoz alımında değil glikoliz yolağının başlatılmasında da oldukça önemli olduğunu göstermektedir.

PFKM, fosfofruktokinaz geninin iskelet kaslarındaki izoformudur. Bu enzim, glikoliz yolağındaki fruktoz-6-fosfatı fruktoz-1,6-bisfosfata geri dönüşümsüz olarak çevirmektedir. Erken-evre meme kanseri tanısı almış 3.523 olguda yapılan tüm genom analizi çalışmaları PFKM geni meme kanseri gelişimi ile ilişkilendirilmiş ve meme kanserinin etiyolojisinin anlaşılması için önemli genlerden biri olarak tanımlanmıştır. Kanserde önemi son zamanlarda anlaşılan bu geni tez projemizde değerlendirdik ve mRNA'sının TWIST1 yüksek ekspresyonu varlığında 1,3 kat arttığını belirledik. Böbrek hücre hattı olan HEK293T hücrelerimizde de TWIST1 indüksiyonlu kanser gelişimi açısından önemli olduğunu hedef glikolitik enzimlerden biri olduğu ileri sürülebilir.

PKM2, glikolizin son basamağı olan fosfoenolpiruvattan ADP'ye fosforil grubunu transfer ederek ATP oluşumunu katalizlemektedir. Reaksiyon sonucunda mitokondrideki Krebs döngüsü açısından önemli olan piruvat meydana gelmektedir. PKM2 embriyogeneizde, doku tamirinde ve kanser gelişiminde önemli rolleri vardır ve PKM1 izoformuna göre dominant ekspresyon paterni göstermektedir. PKM1 izoformu PKM2'nin aksine ekspresyonu tetiklendiğinde tümör progresyonunun baskılandığı belirlenmiştir. Dolayısıyla kanser araştırmalarında PKM2 izoformu ön plana çıkmaktadır. PKM2 aktivitesi fruktoz-1,6-bisfosfat varlığında artmaktadır. Glikoz girişi ile birlikte sitozoldeki monomerik PKM2 enzimleri tetramerik hale gelirler. Glikoz azalması ile birlikte tetramerik yapı kolaylıkla dağılır. Dolayısıyla PKM2 allosterik olarak aktivasyon göstermektedir. TWIST1'in PKM2 ekspresyonu üzerindeki etkisini incelediğimizde HEK293T hücrelerinde ortalama 1,4 kat artış tesbit ettik. Bu neticeye göre, PFKM fonksiyonel etkisinin devamında olan bu reaksiyon da TWIST1 tarafından desteklendiği ifade edilebilir.

LDH α , laktat ve piruvat arasındaki interkonversiyonu kataliz etmektedir. Hipoksik koşullarda NADH'ın NAD⁺'ya oksidasyonu ile piruvattan laktat oluşumunu geri dönüşümlü olarak katalizlemektedir. Bu basamak anaerobik glikolizin son basamağıdır. LDH α normal dokularda farklı aktivasyon paterni göstermesi ile birlikte daha çok iskelet kasında eksprese edilmektedir. Ancak doku hasarı, nekroz, hemoliz, hipoksi ve miyokardiyal enfarktüs gibi durumlarda hücresel LDH α düzeyi artar. Kanserde Myc ve HIF1 gibi onkogenler LDH α ekspresyonunu indüklemektedir. Bu faktörler genin promotorunda bulunan CACGTG E-kutusu motifine bağlanmakta ve gen regülasyonunu düzenlemektedir. Aynı E-kutusu dizisi tez kapsamında incelediğimiz TWIST1 geni açısından da hedef dizidir. Araştırma bulgularımıza göre TWIST1

ekspresyonu gösteren HEK293T hücrelerinde LDH α ekspresyon düzeyi yaklaşık 2 kat artmıştır. Bu durum TWIST1'in laktat oluşumunu desteklediğini ve tümör dokularında asidoza neden olabileceğini düşündürmektedir. Kanser hücrelerinde glikoz sarfiyatının artması sonucunda laktat üretiminin artışı mitokondriyal respirasyonu baskılar. Hücrelerde LDH α artışı sonucunda enerji üretimi oksidatif fosforilasyondan glikoliz yönüne dönmeye başlar. Dolayısıyla HEK293T hücrelerinde TWIST1, LDH α ekspresyonunu tetikleyerek aerobik glikolizi artırmaktadır.

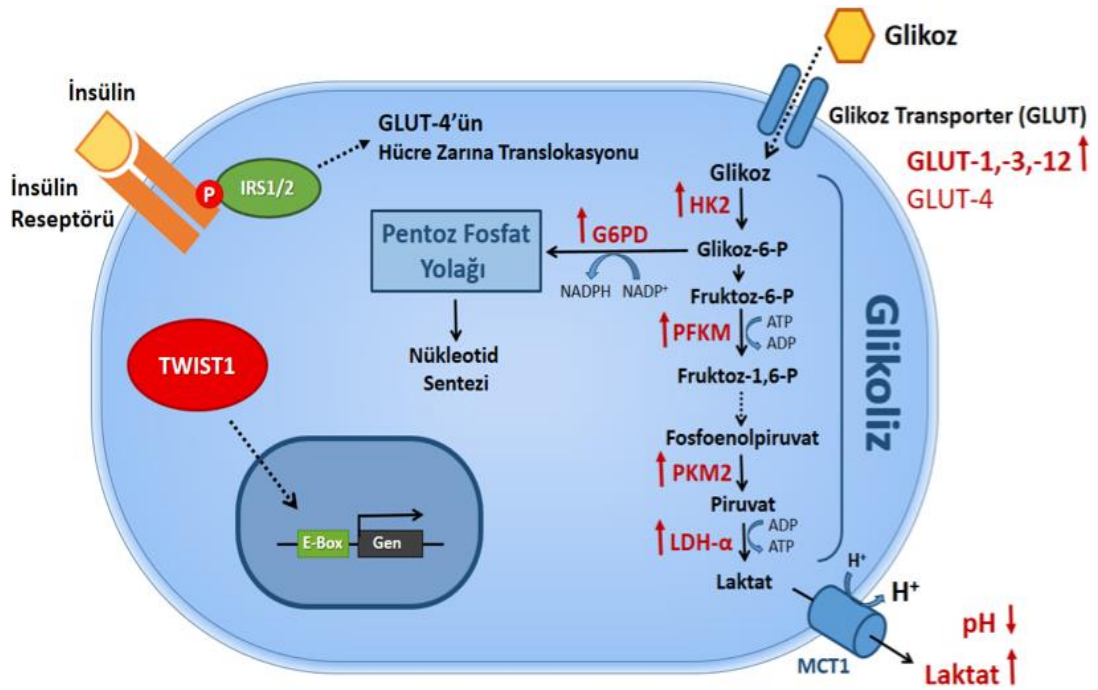
G6PD, riboz-5-fosfat oluşumunda anahtar rol oynamaktadır. Glikolize alternatif olan pentoz fosfat (hekzoz monofosfat) yolağını kontrol eden ve ilk reaksiyonu gerçekleştiren temel enzimdir. G6PD, Glikoz-6-fosfatın C1 karbonundan bir hidrit iyonunun NADP⁺'ye transferini 6-fosfoglukono- δ -lakton oluşturmak üzere katalizler. Bu yolak sayesinde hücreye nükleotid biyosentezinde kullanılan pentozlar ve yağ asidi ile kolesterol sentezinde gerekli olan NADPH molekülleri sağlanır. Lösemi, gastrointestinal, böbrek, kolon, meme, endometriyal, prostat ve karaciğer kanserlerinde ekspresyonu artmaktadır. Ektopik G6PD ekspresyon artışı NADPH ve glutatyon artışına neden olmaktadır. G6PD hücrede redoks potansiyelini hücre dışı pH'yı regüle eden faktörlerden biridir. Bu bilgiler doğrultusunda elde ettiğimiz verilere göre TWIST1 artışına bağlı olarak G6PD ekspresyonu 2,6 kat artmaktadır. Bu durum TWIST1'in pentoz fosfat yolunu desteklediğini göstermektedir. Bu sayede TWIST1 hücre proliferasyonu için gerekli olan nükleotidlerin ve diğer biyomoleküllerin yapıtaşlarının üretilmesine destek olarak kanser gelişimine katkı sağladığı söylenebilir.

Ayrıca TWIST'in kanser hücrelerinde enerji üretimi ve sarfiyatını ifade eden hücre içi ATP, ADP ve AMP seviyelerini inceledik. TWIST1 ekspresyonunu ektopik olarak sağladığımız HEK293T hücrelerinde daha fazla ATP üretimi sağlanmış ve kontrole oranla daha fazla AMP üretimi, dolayısıyla daha fazla enerji sarfiyatı gerçekleşmiştir. Bu bağlamda TWIST1'in kanser hücrelerinde enerji metabolizmasını düzenlediği anlaşılmaktadır.

Yüksek seviyede TWIST1 ekspresyonu gerçekleştirdiğimiz HEK293T hücreleri ile kontrol hücreleri kültüre ettiğimiz besiyerlerinin süpernatantlarını kan gazı analizör cihazı ile inceledik. Bu analiz neticesinde TWIST1 ekspresyonu varlığında hücrelerin besiyerinde mevcut olan glikoz düzeyi düşmekte (278 mg/dl'den 265 mg/dl'ye) ve laktat seviyesi de artmaktadır (3,1 mmol/L'den 3,5 mmol/L'ye). Bu veriler, TWIST1'in kanser hücrelerinde Warburg etkisi olarak tanımlanan aerobik glikolizi desteklediğini göstermektedir. Yani hücreler oksijenli ortamda olmalarına rağmen oksidatif

fosforilasyon ile değil de daha hızlı olarak glikolitik yolağı ATP eldesi için tercih etmektedir. Dolayısıyla TWIST1 kanser hücrelerindeki, literatürde iyi tanımlanmış olan, bu karakteristik enerji eldesi yön değişiminin, temel faktörlerinden biri olduğu ileri sürülebilir.

Tez projesinde elde ettiğimiz veriler ışığında, kanserde hücre içine glikoz alımı ve tüketimi konusunda TWIST1 transkripsiyon faktörünün rolünü ve önemini göstermeyi amaçladık (Şekil 5.1). Bu bağlamda TWIST1 kanser tedavisi açısından metabolik hedef olarak değerlendirilebilir kanısındayız.



Şekil 5.1. TWIST1'in glikoz alımı ve glikolitik yoldaki rolü.

5.2. Öneriler

1. TWIST1 transkripsiyon faktörü kanserde yeni bir metabolik hedef olarak değerlendirilebilir.
2. HEK293T hücrelerine TWIST1 transfeksiyonu stabil olarak gerçekleştirilebilir.
3. Tez projesinde araştırılan genlerin ekspresyon düzeyleri western blot yöntemi ile desteklenebilir ve hücresel lokalizasyonları immünsitokimya boyamaları ile gösterilebilir.
4. TWIST1'in hedefi olabilecek olan ve tez kapsamında değerlendirilmemiş diğer glikoz transporter genlerin ekspresyon düzeyleri incelenebilir.

5. Karbon kaynağı olarak glikozun yanısıra diğer moleküllerin kanal proteinlerinin ekspresyon seviyeleri ve fonksiyonları analiz edilebilir.

6. TWIST1 indüksiyonu ile regüle edilebilecek diğer glikolitik enzimlerin gen ekspresyon düzeyleri ile enzim aktiviteleri gösterilerek ayrıntılı olarak gösterilebilir.



KAYNAKLAR

1. Cantor JR, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer discovery*. 2012;2(10):881-98.
2. Lynch HT, Silva E, Snyder C, Lynch JF. Hereditary breast cancer: part I. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes. *Breast J* 2008; 14:3-13.
3. Vander Heiden MG, Lunt SY, Dayton TL, et al. Metabolic pathway alterations that support cell proliferation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2011; 76: 325-334
4. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 85-95
5. Cancer genetics. In: Adkison LR, Brown MD; eds. Elsevier's integrated genetics. Philadelphia: Mosby Elsevier; 2007:63-90.(2)
6. Anthony JF Griffiths, Jeffrey H Miller, David T Suzuki, Richard C Lewontin, and William M Gelbart. "An Introduction to Genetic Analysis, 7th edition" W. H. Freeman; 2000.
7. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(4):261-8.
8. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324: 1029-1033.
9. Martincorena and P. J. Campbell. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*. 2016 Mar 4;351(6277)
10. Lambertucci F1, Sedlmeier MG1, Pisani G2, Monti J1, Álvarez ML1,2, Francés DEA1, Ronco MT1, Carnovale CE1. Diethylnitrosamine Increases Proliferation in Early Stages of Hepatic Carcinogenesis in Insulin-Treated Type 1 Diabetic Mice' *Biomed Res Int*. 2018 Apr 23
11. Souldouzi R1, Razi M1, Shalizar Jalali A2, Jalilzadeh-Amin G3, Amani S1. Effect of (R)-(+)-Pulegone on Ovarian Tissue; Correlation with Expression of Aromatase Cyp19 and Ovarian Selected Genes in Mice. *Cell J*. 2018
12. Philip W. Hinds and Robert A. Weinberg. "Tumor suppressor genes" *Current Opinion in Genetics & Development*. Volume 4, Issue 1, February 1994, Pages 135-141
13. Olaf Bettendorf Hartmut Schmidt Annette Staebler Rainer Grobholz Achim Heinecke Werner Boecker Lothar Hertle Axel Semjonow. Chromosomal imbalances, loss of heterozygosity, and immunohistochemical expression of TP53, RB1, and PTEN

in intraductal cancer, intraepithelial neoplasia, and invasive adenocarcinoma of the prostate. 27 March 2008, Wiley - Liss, Inc.

14. Alain Latil, PhD, Ivan Bièche, PhD, Sandrine Pesche, Alain Volant, MD, Antoine Valèri, MD, Georges Fournier, MD, Olivier Cussenot, MD, Rosette Lidereau, DrSc'. Loss of heterozygosity at chromosome arm 13q and RB1 status in human prostate cancer. July 1999 Volume 30, Issue 7, Pages 809–815

15. Ivana Bozic, Tibor Antal, Hisashi Ohtsuki, Hannah Carter, Dewey Kim, Sining Chen, Rachel Karchin, Kenneth W. Kinzler, Bert Vogelstein, and Martin A. Nowak. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. PNAS October 26, 2010.

16. Patrick F Chinnery MRCPa, David C Samuels PhD, Joanna Elson PhD, Prof Douglass M Turnbull FRCPa. Accumulation of mitochondrial DNA mutations in ageing, cancer, and mitochondrial disease: is there a common mechanism? Volume 360, Issue 9342, 26 October 2002, Pages 1323-1325

17. Laura D. Wood¹, D. Williams Parsons¹, Siân Jones¹, Jimmy Lin¹, Tobias Sjöblom¹, Rebecca J. Leary¹, Dong Shen¹, Simi. The Genomic Landscapes of Human Breast and Colorectal Cancers. Science 16 Nov 2007

18. Thomas, Maren, Hartmann, Roland K. RNAi-based anti-cancer strategies - targeting the proto-oncogene PIM1 and oncogenic miRNAs. Philipps-Universität Marburg 2013

19. Emmanouil P. Pappou and Nita Ahuja. The Role of Oncogenes in Gastrointestinal Cancer. Gastrointest Cancer Res. 2010 Nov-Dec; (Suppl 1): S2–S15.

20. Ludmil B. Alexandrov, Serena Nik-Zaina, Michael R. Stratton. Signatures of mutational processes in human cancer. Nature volume 500, pages 415–421. 22 August 2013

21. WA Schulz. Molecular Biology of Human Cancers. The Netherlands: Springer 2007.

22. Weber GF. Molecular Mechanisms of Cancer. The Netherlands: Springer 2007.

23. Krauss G. Biochemistry of signal transduction and regulation 3rd ed. Wiley-VCH 2003.

24. Polakis P. Wnt signaling and cancer. Genes Devel. 2000;14:1837-1851.

25. Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signaling pathways in cancer. Nature 2001;411:349-354.

26. Cousineau I, Abaji C, Belmaaza A. BRCA1 regulates RAD51 function in response to DNA damage and suppresses spontaneous sister chromatid replication slippage: implications for sister chromatid cohesion, genome stability, and carcinogenesis. Cancer Res 2005;65: 11384–11391.

27. Hereditary breast and ovarian cancer. In: Nussbaum RL, McInnesRR, Willard H; eds. *Genetics in Medicine*. 7th. Edition. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007: 242-243
28. Gareth E.JonesAnne J.Ridley Daniel Zicha. Rho GTPases and cell migration: Measurement of macrophage chemotaxis. *Methods in Enzymology*, Volume 325, 2000, Pages 449-462
29. Pixu Liu, Hailing Cheng, Thomas M. Roberts, and Jean J. Zhao. Targeting the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Aug; 8(8): 627–644.
30. Jason S. L. Yu, Wei Cui. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development* 2016 143: 3050-3060; doi: 10.1242/dev.137075
30. Lempiäinen H, Halazonetis TD. '' Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. ''EMBO J. 2009 Oct 21; 28(20):3067-73.
31. Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science*. 1998 Dec 4; 282(5395):1893-7.
32. Suzuki H, Asakawa A, Amitani H, Fujitsuka N, Nakamura N, Inui A. Cancer cachexia pathophysiology and translational aspect of herbal medicine. *Jpn J Clin Oncol* 2013;43(7):695-705.
33. Sobrino Crespo C, Perianes Cachero A, Puebla Jimenez L, Barrios V, Arilla FerreiroE. Peptides and Food Intake. *Front Endocrinol* 2014;5:58.3.
34. Nicolini A, Ferrari P, Masoni MC, Fini M, Pagani S, Giampietro O, et al. Malnutrition, anorexia and cachexia in cancer patients: A mini-review on pathogenesis and treatment. *Biomed Pharmacother* 2013;67(8):807-17.
34. Tisdale MJ. Catabolic mediators of cancer cachexia. *Curr Opin Support PalliatCare* 2008;2(4):256-61.
35. Lisa S. Usdan, MD,1,3 Lalita Khadhiar, MD,2,3 and Caroline M. Apovian, MD, FACP, FACN2,3. The Endocrinopathies Of Anorexia Nervosa. *Endocr Pract*. 2008 Nov; 14(8): 1055–1063.
36. Thomas T, Thomas TJ. Polyamine metabolism and cancer. *J Cell Mol Med* 2003;7(2):113-26.
37. Eric Van Cutsem, Jann Arends. The causes and consequences of cancer-associated malnutrition. Volume 9, Supplement 2, Pages S51–S63, 2005
38. C. Daniel Salzman1,2,3,4,5,6 and Stefano Fusi1. Emotion, Cognition, and Mental State Representation in Amygdala and Prefrontal. *Annu Rev Neurosci*. 2010; 33: 173–202.
39. Albrecht JT1, Canada. Cachexia and anorexia in malignancy. TW. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1996 Aug;10(4):791-800.

40. Alessandro R. Dodesini, Stefano Benedini, Ileana Terruzzi, Lucia Piceni Sereni & Livio Luzi (2007) Protein, glucose and lipid metabolism in the cancer cachexia: A preliminary report, *Acta Oncologica*, 46:1, 118-120
41. Barbara A. Malynn and Averil Ma. Ubiquitin makes its mark on immune regulation. *Immunity*. 2010 Dec 14; 33(6): 843–852.
42. Geng Wu^{1,2}, Guozhou Xu¹, Brenda A. Schulman^{1,4}, Philip D. Jeffrey¹, J. Wade Harper³, Nikola P. Structure of a β -TrCP1-Skp1- β -Catenin Complex: Destruction Motif Binding and Lysine Specificity of the SCF β -TrCP1 Ubiquitin Ligase. Volume 11, Issue 6, June 2003, Pages 1445-1456
43. Artzi M, Bokstein F, Blumenthal DT, Aizenstein O, Liberman G, Corn BW, et al. Differentiation between vasogenic edema versus tumor-infiltrative area in patients with glioblastoma during bevacizumab therapy: A longitudinal MRI study. *Eur J Radiol* 2014;83(7):1250-6.
44. Gambhir S.S. 2002. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat. Rev. Cancer*. 2:683–693 10.1038/nrc882
45. Hubbi ME¹, Semenza GL². Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors. *Physiol Cell Physiol*. 2015 Dec 15;309(12):C775-82.
46. Zhao T, Ren H, Jia L, Chen J, Xin W, Yan F, et al. Inhibition of HIF-1 α by PX478 enhances the anti-tumor effect of gemcitabine by inducing immunogenic cell death in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget* 2014.
47. Marxsen JH, Stengel P, Doege K, Heikkinen P, Jokilehto T, Wagner T, et al. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF α -prolyl-4-hydroxylases. *Biochem J* 2004;381(Pt 3):761-7.
48. Maria V. Liberti^{1,2} and Jason W. Locasale². The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*. 2016 Mar; 41(3): 211–218.
49. Airley RE, Mobasher A. Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics. *Chemotherapy* 2007;53(4):233-56.
50. Geschwind JF, Georgiades CS, Ko YH, Pedersen PL. Recently elucidated energy catabolism pathways provide opportunities for novel treatments in hepatocellular carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2004;4(3):449-57.
51. Tariq Sethi, Robert C. Rintoul, Sarah M. Moore, Alison C. MacKinnon, Donald Salter, Chin Choo, Edwin R. Chilvers, Ian Dransfield, Seamas C. Donnelly, Robert Strieter & Christopher Haslett. Extracellular matrix proteins protect small cell lung cancer cells against apoptosis: A mechanism for small cell lung cancer growth and drug resistance in vivo. *Nature Medicine* volume 5, pages 662–668 (1999)
52. Claudio R. Santos Almut Schulze. "Lipid metabolism in cancer." First published: 23 May 2012

53. Khasawneh J, Schulz MD, Walch A, Rozman J, Hrabe de Angelis M, Klingenspor M, Buck A, Schwaiger M, Saur D, Schmid RM et al (2009) Inflammation and mitochondrial fatty acid beta - oxidation link obesity to early tumor promotion. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 3354–3359.
54. Legaspi A1, Jeevanandam M, Starnes HF Jr, Brennan MF. Whole body lipid and energy metabolism in the cancer patient. *Metabolism*. 1987 Oct;36(10):958-63.
55. Paoletti P, Fumagalli R, Weiss JF, Pezzotta S. Desmosterol: a biochemical marker of glioma growth. *Surg Neurol* 1977;8(6):399-405
56. Singhal AK, Singhal MC, Nudelman E, Hakomori S, Balint JP, Grant CK, et al. Presence of fucolipid antigens with mono- and dimeric X determinant (Lex) in the circulating immune complexes of patients with adenocarcinoma. *Cancer Res* 1987;47(21):5566-71.
57. Liang YJ1, Ding Y, Levery SB, Lobaton M, Handa K, Hakomori SI. Differential expression profiles of glycosphingolipids in human breast cancer stem cells vs. cancer non-stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Mar 26;110(13):4968-73.
58. Sillanauke P, Ponnio M, Jaaskelainen IP. Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. *Eur J Clin Invest* 1999;29(5):413-25.
59. Büll C1, Boltje TJ, van Dinther EA, Peters T, de Graaf AM, Leusen JH, Kreutz M, Figdor CG, den Brok MH, Adema GJ. Targeted delivery of a sialic acid-blocking glycomimetic to cancer cells inhibits metastatic spread. *ACS Nano*. 2015 Jan 27;9(1):733-45.
60. Natalya N. Pavlova and Craig B. Thompson. The Emerging Hallmarks Of Cancer Metabolism. *Cell Metab*. 2016 Jan 12; 23(1): 27–47.
61. Lawrence R. Gray, Sean C. Tompkins, and Eric B. Taylor. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell Mol Life Sci*. 2014; 71(14): 2577–2604.
62. Simons AL, Mattson DM, Dornfeld K, Spitz DR. Glucose deprivation-induced metabolic oxidative stress and cancer therapy. *J Cancer Res Ther*. 2009 Sep; 5 Suppl 1():S2-6.
63. Baljit S. Khakh and Geoffrey Burnstock. The Double Life Of Atp. *Sci Am*. 2009 Dec; 301(6): 84–92.
64. Boyer PD1. The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem*. 1997;66:717-49.
65. Guido Kroemer, Jacques Pouyssegur. Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. Volume 13, Issue 6, p472–482, 10 June 2008
66. Maria V. Liberti^{1,2} and Jason W. Locasale². The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*. 2016 Mar; 41(3): 211–218.
67. D. Cramer And G. B. Kistiakowsky. The Synthesis Of Radioactive Lactic Acid Richard. Received for publication, October 9, 1940)

68. Yasumasa Katoa Toyonobu Maedaa Atsuko SuzukiaYuh Babab. Cancer metabolism: New insights into classic characteristics. Volume 54, Issue 1, February 2018, Pages 8-21

69. Leslie M Shaw. The insulin receptor substrate (IRS) proteins. At the intersection of metabolism and cancer. *Cell Cycle*. 2011 Jun 1; 10(11): 1750–1756.

70. A De Vos, H Heimberg, E Quartier, P Huypens, L Bouwens, D Pipeleers, and F Schuit. Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J Clin Invest*. 1995 Nov; 96(5): 2489–2495.

71. Lee CH, Li W, Nishimura R, Zhou M, Batzer AG, Myers MG Jr, White MF, Schlessinger J, Skolnik EY: Nck associates with the SH2 domain-docking protein IRS-1 in insulin-stimulated cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90(24):11713-11717.

72. Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE: Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *JBiol Chem* 2003, 278(28):25323-25330.

73. Karas M, Koval AP, Zick Y, LeRoith D: The insulin-like growth factor I receptor-induced interaction of insulin receptor substrate-4 and Crk-II. *Endocrinology* 2001, 142(5):1835-1840.

74. Xinsong Xu,^{1,4} Antonio Sarikas,^{1,4} Dora C. Dias-Santagata,^{1,5} Georgia Dolios,² Pascal J. Lafontant,³ Shih-Chong Tsai,³ Wuqiang Zhu,³ Hidehiro Nakajima,³ Hisako O. Nakajima,³ Loren J. Field,³ Rong Wang,² and Zhen-Qiang Pan¹, The CUL7 E3 Ubiquitin Ligase Targets Insulin Receptor Substrate 1 for Ubiquitin-Dependent Degradation. *Mol Cell*. 2008 May 23; 30(4): 403–414.

75. Ueki K¹, Kondo T, Kahn CR. "Alternatively, IRS1 prevents O-glycosylation and cytokine repressor proteins (SOCS) from binding to IR." *Mol Cell Biol*. 2004 Jun; 24(12):5434-46.

76. Myers MG Jr, Wang LM, Sun XJ, Zhang Y, Yenush L, Schlessinger J, Pierce JH, White MF: Role of IRS-1-GRB-2 complexes in insulin signaling. *Mol Cell Biol* 1994, 14(6):3577-3587.

77. Shaw LM: Identification of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 as signaling intermediates in the $\alpha_6\beta_4$ integrin-dependent activation of phosphoinositide 3-OH kinase and promotion of invasion. *Mol Cell Biol* 2001, 21(15):5082-5093.

78. Myers MG Jr, Backer JM, Sun XJ, Shoelson S, Hu P, Schlessinger J, Yoakim M, Schaffhausen B, White MF: IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, 89(21):10350-10354.

79. Zhao FQ, Keating AF. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr Genomics* 2007; 8:113–28.

80. Thorens B, Cheng ZQ, Brown D, Lodish HF. Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. *Am J Physiol* 1990;259:C279–85.

81. Myers MG Jr, Wang LM, Sun XJ, Zhang Y, Yenush L, Schlessinger J, Pierce JH, White MF: Role of IRS-1-GRB-2 complexes in insulin signaling. *Mol Cell Biol* 1994, 14(6):3577-82. Itahana Y, Han R, Barbier S, Lei Z, Rozen S, Itahana K. Theuric acid transporter SLC2A9 is a direct target gene of the tumor suppressor p53 contributing to antioxidant defense. *Oncogene* 2015;34:1799–810.

83. Wu X, Li W, Sharma V, Godzik A, Freeze HH. Cloning and characterization of glucose transporter 11, a novel sugar transporter that is alternatively spliced in various tissues. *Mol Genet Metab* 2002;76:37–45. 3587

84. Xuan Luo Songqing Fan Wenbin Huang Sulan Zhai Zhuo Ma Ping Li Shi-Yong Sun. Downregulation of IRS-1 promotes metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. June 1, 2012.

85. Wang, S. M., Coljee, V. W., Pignolo, R. J., Rotenberg, M. O., Cristofalo, V. J., Sierra, F. Cloning of the human twist gene: its expression is retained in adult mesodermally-derived tissues. *Gene* 187: 83-92, 1997.

86. Shishido, E., Higashijima, S., Emori, Y., Saigo, K. Two FGF-receptor homologues of *Drosophila*: one is expressed in mesodermal primordium in early embryos. *Development* 117: 751-761, 1993

87. UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38)

88. El Ghouzzi, V., Le Merrer, M., Perrin-Schmitt, F., Lajeunie, E., Benit, P., Renier, D., Bourgeois, P., Bolcato-Bellemin, A.-L., Munnich, A., Bonaventure, J. Saethre-Chotzen sendromunda TWIST geninin mutasyonları. *Doğa Geneti.* 15: 42-46, 1997.

89. Genbank Acc.No. NM_000474

90. Thomson vd.2005.

91. Hector L. Franco, José Casasnovas, José R. Rodríguez-Medina, and Carmen L. Cadilla. Redundant or separate entities?—roles of Twist1 and Twist2 as molecular switches during gene transcription. *Nucleic Acids Res.* 2011 Mar; 39(4): 1177–1186.

92. Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB. Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell.* 1989;58:537–544

93. Wilson-Rawls J, Rhee JM, Rawls A. Paraxis is a basic helix-loop-helix protein that positively regulates transcription through binding to specific E-box elements. *J. Biol. Chem.* 2004;279:37685–37692.

94. Hong J, Zhou J, Fu J, He T, Qin J, Wang L, Liao L, Xu J. Phosphorylation of serine 68 of Twist1 by MAPKs stabilizes Twist1 protein and promotes breast cancer cell invasiveness. *Cancer Res.* 2011 Jun 1; 71(11):3980-90.
95. Xue G, Restuccia DF, Lan Q, Hynx D, Dirnhofer S, Hess D, Rüegg C, Hemmings BA. Akt/PKB-mediated phosphorylation of Twist1 promotes tumor metastasis via mediating cross-talk between PI3K/Akt and TGF- β signaling axes. *Cancer Discov.* 2012 Mar; 2(3):248-59.
96. Firulli BA, Howard MJ, McDaid JR, McIlreavey L, Dionne KM, Centonze VE, Cserjesi P, Virshup DM, Firulli AB. PKA, PKC, and the protein phosphatase 2A influence HAND factor function: a mechanism for tissue-specific transcriptional regulation. *Mol Cell.* 2003 Nov; 12(5):1225-37.
97. Firulli AB, Conway SJ. Phosphoregulation of Twist1 provides a mechanism of cell fate control. *Curr Med Chem.* 2008; 15(25):2641-7.
98. Vichalkovski A, Gresko E, Hess D, Restuccia DF, Hemmings BA. PKB/AKT phosphorylation of the transcription factor Twist-1 at Ser42 inhibits p53 activity in response to DNA damage. Dermo-1, a multifunctional basic helix-loop-helix protein, represses MyoD transactivation via the HLH domain, MEF2 interaction, and chromatin deacetylation.
99. Gong XQ, Li L. Dermo-1, a multifunctional basic helix-loop-helix protein, represses MyoD transactivation via the HLH domain, MEF2 interaction, and chromatin deacetylation. *J Biol Chem.* 2002 Apr 5; 277(14):12310-7.
100. Qian Qin, Young Xu, Tao He, Chunlin Qin & Jianming Xu. Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms. *Cell Research* volume 22, pages 90–106 (2012)
101. Sun T, *J Biol Chem.* 2016 May 27;291(22):11518-28.
102. Zhu DY1, Guo QS1, Li YL1, Cui B1, Guo J1, Liu JX1, Li P1. Twist1 correlates with poor differentiation and progression in gastric adenocarcinoma via elevation of FGFR2 expression. *World J Gastroenterol.* 2014 Dec 28;20(48):18306-15. doi: 10.3748/wjg.v20.i48.18306.
103. Bialek P1, Kern B, Yang X, Schrock M, Sosic D, Hong N, Wu H, Yu K, Ornitz DM, Olson EN, Justice MJ, Karsenty G. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. *Dev Cell.* 2004 Mar;6(3):423-35.
104. Cai J1, Goodman BK, Patel AS, Mulliken JB, Van Maldergem L, Hoganson GE, Paznekas WA, Ben-Neriah Z, Sheffer R, Cunningham ML, Daentl DL, Jabs EW. Increased risk for developmental delay in Saethre-Chotzen syndrome is associated with TWIST deletions: an improved strategy for TWIST mutation screening. *Hum Genet.* 2003 Dec;114(1):68-76. Epub 2003 Sep 25.
105. W A Paznekas, M L Cunningham, T D Howard, B R Korf, M H Lipson, A W Grix, M Feingold, R Goldberg, Z Borochowitz, K Aleck, J Mulliken, M Yin, and E W Jabs. Genetic heterogeneity of Saethre-Chotzen syndrome, due to TWIST and FGFR mutations. *Am J Hum Genet.* 1998 Jun; 62(6): 1370–1380.

106. Peter Bialek¹⁶Britt Kern¹²⁶Xiangli Yang¹Marijke Schrock¹Drazen Susic³Nancy Hong⁴HuaWu⁴KaiYu⁵David MOrnitz⁵Eric NOlson³Monica JJustice¹Gerard Karsenty. A Twist Code Determines the Onset of Osteoblast Differentiation. Volume 6, Issue 3, March 2004, Pages 423-435

107. P Seale. Transcriptional control of brown adipocyte development and thermogenesis. International Journal of Obesity volume 34, pages S17–S22 (2010).

108. J  r  my Bastid, Craponne(Fr); NathalieBonnefoy-Berard, Lyon(Fr); Agn  s Doreau-Bastid, Craponne (Fr); Jean-FrancoisEliaou, Montpellier (Fr) Methods of Treating and/or Preventing Cell Proliferation Disorders with IL-17 Antagonists. Dec. 1, 2011 Sheet 1 of 34 US 2011/0293629 A1

109. Thieu VT, Yu Q, Chang HC, Yeh N, Nguyen ET, Sehra S, Kaplan MH. Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell-fate determination. Immunity. 2008 Nov 14; 29(5):679-90

110.   o  ic D, Richardson JA, Yu K, Ornitz DM, Olson EN. Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kappaB activity. Cell. 2003 Jan 24; 112(2):169-80.

111. Niesner U, Albrecht I, Janke M, Doeblis C, Loddenkemper C, Lexberg MH, Eulenburg K, Kreher S, Koeck J, Baumgrass R, Bonhagen K, Kamradt T, Enghard P, Humrich JY, Rutz S, Schulze-Topphoff U, Aktas O, Bartfeld S, Radbruch H, Hegazy AN, L  hning M, Baumgart DC, Duchmann R, Rudwaleit M, H  upl T, Gitelman I, Krenn V, Gruen J, Sieper J, Zeitz M, Wiedenmann B, Zipp F, Hamann A, Janitz M, Scheffold A, Burmester GR, Chang HD, Radbruch A. Autoregulation of Th1-mediated inflammation by twist1.J Exp Med. 2008 Aug 4; 205(8):1889-901.

112. Doreau A., Belot A., Bastid J., Riche B., Trescol-Biemont M. C., Ranchin B., Fabien N., Cochat P., Pouteil-Noble C., Trolliet P., Durieu I., Tebib J., Kassai B., Ansieau S., Puisieux A., Eliaou J. F., Bonnefoy-Berard N (2009). Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. Nat. Immunol. 10, 778–785 10.1038/ni.1741.

113. Castanon I, Baylies MK.A Twist in fate: evolutionary comparison of Twist structure and function.Gene. 2002 Apr 3; 287(1-2):11-22.

114. Fu J, Qin L, He T. The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis. Cell Res. 2011;21:275–289.

115. Yasuo Hamamori, Vittorio Sartorelli, +5 authors L. Kedes. Regulation of Histone Acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH Protein Twist and Adenoviral Oncoprotein E1A. Published 1999 in Cell.

116. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. Cell. 2004;117:927–939.

117. Leptin, M. Twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev.* 1991; 5: 1568–1576
118. Yukiko Nakaya, Guojun Sheng. EMT in developmental morphogenesis. Lab for Early Embryogenesis, RIKEN Center for Developmental Biology, 2-2-3 Minatojima-minamimachi, Chuo-Ku, Kobe, Hyogo 650-0047, Japan
119. M.I. Kokkinos, P. Murthi, R. Wafai, E.W. Thompson, D.F. Newgreen, Cadherins in the human placenta–Epithelial–Mesenchymal Transition (EMT) and placental development, *Placenta* 31 (2010) 747–755.
120. Huang RY, Guilford P, Thiery JP. Early events in cell adhesion and polarity during epithelialmesenchymal transition. *J. Cell Sci.* 2012; 125:4417–4422. [PubMed: 23165231]
121. Kim Y, et al. Integrin $\alpha 3\beta 1$ -dependent β -catenin phosphorylation links epithelial Smad signaling to cell contacts. *J. Cell Biol.* 2009; 184:309–322. [PubMed: 19171760]. Illustrates the crucial role of an integrin, and the remarkable crosstalk and interdependence of signalling systems, in the control of EMT. Loss of a specific integrin impairs E-cadherin turnover and results in dysregulation of TGF β signalling and β -catenin–SMAD cooperation.
122. Cano A, et al. The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nature Cell Biol.* 2000; 2:76–83.
123. Wang SP, et al. p53 controls cancer cell invasion by inducing the MDM2-mediated degradation of Slug. *Nature Cell Biol.* 2009; 11:694–704.
124. Kang Y, Chen CR, Massagué J. A self-enabling TGF β response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol. Cell.* 2003; 11:915–926.
125. Jing Yang⁸, Sendurai A Mani⁸, Joana Liu Donaher, Sridhar Ramaswamy, Raphael A Itzykson, Christophe Come, Pierre Savagner, Inna Gitelman, Andrea Richardson, Robert A Weinberg, Robert A. Weinberg. Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis. Volume 117, Issue 7, p927–939, 25 June 2004
126. Maria V. Liberti^{1,2} and Jason W. Locasale². The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci.* 2016 Mar; 41(3): 211–218.
127. Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 2009; 458: 762-765.
128. Le A, Lane AN, Hamaker M, et al. Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells. *Cell Metab* 2012; 15: 110-121.
129. Obre E, Rossignol R. Emerging concepts in bioenergetics and cancer research: Metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic

remodeling, signaling and bioenergetic therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2015; 59: 167-181.

130. Sanjiv S. Gambhir, Johannes Czernin, Judy Schwimmer, Daniel H. S. Silverman, R. Edward Coleman and Michael E. Phelps. A Tabulated Summary of the FDG PET Literature. *J Nucl Med* May 1, 2001 vol. 42 no. 5 suppl 1S-93S.

131. Maria L. Macheda Suzanne Rogers James D. Bes Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. 17 August 2004 jcp.20166 Cited by: 441

132. Barron CC1, Bilan PJ2, Tsakiridis T3, Tsiani E4. Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment *Metabolism*. 2016 Feb;65(2):124-39. doi: 10.1016/j.metabol.2015.10.007. Epub 2015 Nov 13.

133. Thorens B, Mueckler M. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;298:E141–5.

134. Wu X, Freeze HH. GLUT14, a duplicate of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics* 80 : 553–557, 2002. *J Cancer* 2016; 7(7):817-822. doi:10.7150/jca.14274.

135. Uldry M, Thorens B. The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch* 2004;447:480–9.

136. OMIM Gene/Loci: 444 - 453 of 1,656 on Chromosome 1

137. Brockmann K1. The expanding phenotype of GLUT1-deficiency syndrome. *Brain Dev.* 2009 Aug;31(7):545-52. doi: 10.1016/j.braindev.2009.02.008. Epub 2009 Mar 21.

138. OMIM Gene / Loci: 758 - 767/903 Chromosome 3

139. Orci, L. Thorens, B., Ravazzola, M., Lodish, H. F. Localization of the pancreatic beta cell glucose transporter to specific plasma membrane domains. *Science* 245: 295-297, 1989

140. Akagi, M., Inui, K., Nakajima, S., Shima, M., Nishigaki, T., Muramatsu, T., Kokubu, C., Tsukamoto, H., Sakai, N., Okada, S. Mutation analysis of two Japanese patients with Fanconi-Bickel syndrome. *J. Hum. Genet.* 45: 60-62, 2000.

141. Armelle Leturque, Edith Brot-Laroche, and Maude Le Gall. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* Vol. 296, No. 5, 01 MAY 2009.

142. OMIM Gene / Loci: 94 - 103/865 Chromosome 12

143. Gould, G. W. Holman, G. D. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem. J.* 295: 329-341, 1993.

144. Wishart DS, Lewis MJ, Morrissey JA, Flegel MD, Jeroncic K, Xiong Y, Cheng D, Eisner R, Gautam B, Tzur D, Sawhney S, Bamforth F, Greiner R, Li L. The

human cerebrospinal fluid metabolome. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2008 Aug 15; 871(2):164-73.

145. Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia.* 1997 Sep; 21(1):2-21.

146. Starska K, Forma E, Jozwiak P, Brys M, Lewy-Trenda I, Brzezinska-Blaszczyk E, et al. Gene and protein expression of glucose transporter 1 and glucose transporter 3 in human laryngeal cancer-the relationship with regulatory hypoxia-inducible factor-1 α expression, tumor invasiveness, and patient prognosis. *Tumour Biol* 2015;36:2309–21.

147. Vaz CV, Marques R, Alves MG, Oliveira PF, Cavaco JE, Maia CJ, et al. Androgens enhance the glycolytic metabolism and lactate export in prostate cancer cells by modulating the expression of GLUT1, GLUT3, PFK, LDH and MCT4 genes. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-015-1992-4>.

148. Mellanen P, Minn H, Grenman R, Harkonen P. Expression of glucose transporters in head-and-neck tumors. *Int J Cancer* 1994;56:622–9.

149. Ayala FR, Rocha RM, Carvalho KC, Carvalho AL, da Cunha IW, Lourenco SV, et al. GLUT1 and GLUT3 as potential prognostic markers for oral squamous cell carcinoma. *Molecules* 2010;15:2374–87.

150. James DE, Brown R, Navarro J, Pilch PF (May 1988). Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. *Nature.* 333 (6169): 183–5

151. OMIM Gene / Loci: 126 - 135/970 Chromosome 17

152. Oshel, K. M., Knight, J. B., Cao, K. T., Thai, M. V., Olson, A. L. Identification of a 30-base pair regulatory element and novel DNA binding protein that regulates the human GLUT4 promoter in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 275: 23666-23673, 2000.

153. Inoue, M., Chang, L., Hwang, J., Chiang, S.-H., Saltiel, A. R. The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin. *Nature* 422: 629-633, 2003

154. McBrayer SK, Cheng JC, Singhal S, Krett NL, Rosen ST, Shanmugam M. Multiple myeloma exhibits novel dependence on GLUT4, GLUT8, and GLUT11: implications for glucose transporter-directed therapy. *Blood* 2012;119:4686–97.

155. OMIM Gene/Loci: 106 - 115 of 1,656 on Chromosome 1

156. Godoy A, Ulloa V, Rodriguez F, Reinicke K, Yanez AJ, Garcia Mde L, et al. Differential subcellular distribution of glucose transporters GLUT1-6 and GLUT9 in human cancer: ultrastructural localization of GLUT1 and GLUT5 in breast tumor tissues. *J Cell Physiol* 2006;207:614–27.

157. Zamora-Leon SP, Golde DW, Concha II, Rivas CI, Delgado-Lopez F, Baselga J, et al. Expression of the fructose transporter GLUT5 in human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93: 1847–52.

158. Chan KK, Chan JY, Chung KK, Fung KP. Inhibition of cell proliferation in human breast tumor cells by antisense oligonucleotides against facilitative glucose transporter 5. *J Cell Biochem* 2004; 93 :1134–42.

159. Medina Villaamil V, Aparicio Gallego G, Valbuena Rubira L, Garcia Campelo R, Valladares-Ayerbes M, Grande Pulido E, et al. Fructose transporter GLUT5 expression in clear renal cell carcinoma. *Oncol Rep* 2011; 25 :315–23.

160. OMIM Gene / Loci: 94 - 103/865 Chromosome 12

161. Doege H, Bocianski A, Joost HG, Schurmann A. Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem J* 2000;350(Pt 3):771-6.

162. Byrne FL, Poon IK, Modesitt SC, Tomsig JL, Chow JD, Healy ME, et al. Metabolic vulnerabilities in endometrial cancer. *Cancer Res* 2014;74:5832–45.

163. OMIM Gene / Loci: 105 - 114 of 1.656 Chromosome 1

164. Li Q, Manolescu A, Ritzel M, Yao S, Slugoski M, Young JD, et al. Cloning and functional characterization of the human GLUT7 isoform SLC2A7 from the small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G236–42.

165. OMIM Gene / Loci: 449 - 458/626 Chromosome 9

166. Ibberson M, Uldry M, Thorens B. GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J Biol Chem* 2000;275: 4607–12.

167. Gomez O, Ballester-Lurbe B, Poch E, Mesonero JE, Terrado J. Developmental regulation of glucose transporters GLUT3, GLUT4 and GLUT8 in the mouse cerebellar cortex. *J Anat* 2010;217:616–23.

168. Goldman NA, Katz EB, Glenn AS, Weldon RH, Jones JG, Lynch U, et al. GLUT1 and GLUT8 in endometrium and endometrial adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2006;19:1429–36.

169. Doblado M, Moley KH. Facilitative glucose transporter 9, a unique hexose and urate transporter. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;297:E831–5.

170. Augustin R, Carayannopoulos MO, Dowd LO, Phay JE, Moley JF, Moley KH. Identification and characterization of human glucose transporter-like protein-9 (GLUT9): alternative splicing alters trafficking. *J Biol Chem* 2004;279:16229–36.

171. Evans SA, Doblado M, Chi MM, Corbett JA, Moley KH. Facilitative glucose transporter 9 expression affects glucose sensing in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 2009;150:5302-10

172. Dawson PA, Mychaleckyj JC, Fossey SC, Mihic SJ, Craddock AL, Bowden DW. Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Mol Genet Metab* 2001;74:186–99.

173. McVie-Wylie AJ, Lamson DR, Chen YT. Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics* 2001;72:113–7.

174. Doege, H. Bocianski, A. Scheepers, A., Axer, H., Eckel, J., Joost, H.-G., Schurmann, A. Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem. J.* 359: 443-449, 2001.

175. Sasaki, T., Minoshima, S., Shiohama, A., Shintani, A., Shimizu, A., Asakawa, S., Kawasaki, K., Shimizu, N. Molecular cloning of a member of the facilitative glucose transporter gene family GLUT11 (SLC2A11) and identification of transcription variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 1218-1224, 2001.

176. Scheepers A, Schmidt S, Manolescu A, Cheeseman CI, Bell A, Zahn C, et al. Characterization of the human SLC2A11 (GLUT11) gene: alternative promoter usage, function, expression, and subcellular distribution of three isoforms, and lack of mouse orthologue. *Mol Membr Biol* 2005;22:339–51.

177. Rogers S, Chandler JD, Clarke AL, Petrou S, Best JD. Glucose transporter GLUT12-functional characterization in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:422–6.

178. Rogers S, Macheda ML, Docherty SE, Carty MD, Henderson MA, Soeller WC, et al. Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E733–8.

179. Rogers S, Docherty SE, Slavin JL, Henderson MA, Best JD. Differential expression of GLUT12 in breast cancer and normal breast tissue. *Cancer Lett* 2003;193:225–33.

180. Chandler JD, Williams ED, Slavin JL, Best JD, Rogers S. Expression and localization of

181. Pujol-Gimenez J, de Heredia FP, Idoate MA, Airley R, Lostao MP, Evans AR. Could GLUT12 be a potential therapeutic target in cancer treatment? A preliminary report. *J Cancer* 2015;6:139–43.

182. Stockhammer F, von Deimling A, Synowitz M, Blechschmidt C, van Landeghem FK. Expression of glucose transporter 1 is associated with loss of heterozygosity of chromosome 1p in oligodendroglial tumors WHO grade II. *J Mol Histol* 2008;39:553–60.

183. Uldry M, Ibberson M, Horisberger JD, Chatton JY, Riederer BM, Thorens B. Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J* 2001;20:4467–77.

184. Uldry M, Steiner P, Zurich MG, Beguin P, Hirling H, Dolci W,et al. Regulated exocytosis of an H⁺/myo-inositol symporter at synapses and growth cones. EMBO J 2004;23:531–40.

185. Doç.Dr. Nilüfer Şahin Calapoğlu. Hipoksiye Karşı Hücrel Cevabın Düzenleyicisi: HIF-1 Regulator of Cellular Response to Hypoxia. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

186. Journal of Clinical and Analytical Medicine | 1 DOI: 10.4328/JCAM.3234 Received: 15.01.2015

187. Lippincott Illustrated Reviews Biochemistry

188. Harper's Biochemistry

189. J Cancer 2016; 7(7 :817-822. doi:10.7150/jca.14274.)

190. Lehninger Principles Bchm 2000

191. Beta cell Biology Consortium 2004

192. Mardilovich K, Pankratz SL, Shaw LM. Expression and function of the insulin receptor substrate proteins in cancer. Cell Commun Signal. 2009 Jun 17;7:14.

193. Türközkan N, Seven I, Erdamar H, Çimen B. Effect of vitamin A pretreatment on Escherichia coli-induced lipid peroxidation and OZAN ve ark. Taurinin Beyinde Enerji Durumuna ve MDA'ya Etkisi Bozok Tıp Derg 2018;8(1):11-7 Bozok Med J 2018;8(1):11-7 level of 3-nitrotyrosine in kidney of guinea pig. Mol Cell Biochem 2005;278(1-2):33-37.

194. John M. Walker 1.The Bicinchoninic Acid (BCA) Assay for Protein Quantitation Book: The Protein Protocols Handbook. Protocol | DOI: 10.1385/1-59259-169-8:11

195. Saraçlıgil ve ark. D Vitamininin Mcf-7 Meme Kanseri Hücrel Metabolizması Üzerine Etkisi. Selçuk Üniversitesi, 2015

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Kadriye AKTAŞ KONT
Uyruğu : TC
Doğum Yeri ve Tarihi :
Telefon :
Faks :
e-mail :

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	:	
Üniversite	:	
Yüksek Lisans	:	
Doktora	:	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
-----	-------	--------

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR