



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

**HL-60 Lösemi Hücre Hattında TET2 Ekspresyonu ile
Glutamin Metabolizması Arasındaki İlişkinin
İncelenmesi**

Yüksek Lisans Tezi

Ahsen Merve Bayrak

Ocak 2023



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

**HL-60 Lösemi Hücre Hattında TET2 Ekspresyonu ile
Glutamin Metabolizması Arasındaki
İlişkinin İncelenmesi**

Yüksek Lisans Tezi

Ahsen Merve Bayrak

Danışman

Doç. Dr. Burcu Yücel

Ocak 2023

TEZ JÜRİSİ ONAYI

Ahsen Merve Bayrak tarafından hazırlanan HL-60 Lösemi Hücre Hattında TET2 Ekspresyonu ile Glutamin Metabolizması Arasındaki İlişkinin İncelenmesi" başlıklı bu Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Burcu Yücel
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Üyeler:

Doç. Dr. Birsen Elibol
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Prof. Dr. Selçuk Daşdemir
İstanbul Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 30/01/2023

BEYANLAR

Yazım ve Kaynak Gösterme Kılavuzu Beyanı

Danışmanlığımda yazılan bu tezin Vancouver yazım ve kaynak gösterme kılavuzunda belirtilen kurallara uygun olarak yapılandırıldığı ve bu kılavuzun Vancouver kaynak gösterme standartlarının bu tezde tutarlı olarak uygulandığı tarafımdan incelenerek teyit edilmiştir.

Doç. Dr. Burcu Yücel

Etik İlkeler Sadakat Beyanı

Hazırladığım bu tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Ahsen Merve Bayrak

TEŐEKKÖR

Lisans eğitimimden itibaren yanında çalıőtıęım, bilgi ve tecrübeleriyle bana daima yol gösteren, beni hem bilimsel hem de akademik anlamda yetiőtiren ve çalıőmalarım için iyi bir laboratuvar ortamı sunan danıőmanım Doç. Dr. Burcu YÖCEL' e

Laboratuvarda çalıőmaya baőladıęım günden itibaren bana her konuda yardımcı ve destek olan yüksek lisans süresince hem ders hem de tez döneminde motivasyonumu toplamamı sağlayan Tıbbi Biyokimya ABD. Arő. Gör. Saniye KOÇ ADA'ya

Deneylerimde ve çalıőmalarımda benden yardımlarını ve anlayıőını esirgemeyen Yahya YOZBATIRAN'a

İlkokul sıralarında baőlayan arkadaşlığımızı meslektaő olup aynı laboratuvar ortamına taőıdıęımız, iyi günümde ve kötü günümde her zaman yanımda olan, sevgisini ve desteğini bana her daim hissettiren çocukluk arkadaşım Aslı KARAMAN'a

Eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, umudumu kaybettiğim zamanlarda bana her zaman umut edecek bir sebep veren annem Saliha BAYRAK'a, attığım her adımda yanımda olan ve bana her türlü imkânı sunan babam Üzeyir BAYRAK'a ve her zaman desteklerini hissettiğim Safa ve Elif BAYRAK'a tüm kalbimle teőekkör ederim.

ÖZET

HL-60 Lösemi Hücre Hattında TET2 Ekspresyonu ile Glutamin Metabolizması Arasındaki İlişkinin İncelenmesi

Bayrak, Ahsen Merve

Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Burcu Yücel

Ocak 2023

Kanser, normal hücrelerde büyümeyi ve bölünmeyi düzenleyen kontrol mekanizmalarının bozulması nedeniyle kontrolsüz çoğalan hücrelerin çevre dokulara yayılmasıyla ortaya çıkan bir hastalıktır. Kanser hücreleri, hayatta kalmak ve çoğalabilmek için metabolizmalarını yeniden programlar ve tümör mikro çevresinden glikoz ve glutamin alımını arttıırırlar. Glutamin esansiyel olmayan bir amino asit olmasına ve de novo sentezlenebilmesine rağmen, birçok kanser hücresi hayatta kalmak için hücre dışı glutamine bağımlıdır.

Akut miyeloid lösemi (AML), çoğalma ve farklılaşma ile ilgili genetik anormalliklere sahip miyeloid progenitör hücrelerin klonal genişlemesi ile karakterize hematolojik bir malignitedir. TET2, DNA demetilasyonunda görev alır ve tümör baskılayıcı gen olarak bilinir. TET2 geni, AML dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde sık sık somatik mutasyonlara maruz kalır.

Çalışmamızda, TET2 geni baskılanmış AML hücre hattı HL-60 hücreleri ile glutamin metabolizması arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır. TET2 baskılanmış HL-60 hücrelerinde düşük glutamin ortamının; hücre proliferasyonu, canlılığı, glutamin metabolizmasında görev alan GLUL, GLS1, GLS2, GLUD1, SLC38A1 ve SLC38A2 genlerinin ekspresyon seviyeleri ve hücrelerin merkezi enerji sensörü olan AMPK aktivitesi üzerine etkilerini inceledik.

Bulgularımız, TET2 baskılanmış HL-60 hücrelerinin glutamin kısıtlamasına daha dirençli olabileceğini ve düşük glutamin ortamının HL-60 hücrelerinin glutamin bağımlılığına paralel olarak, glutamin metabolizmasında bazı genlerin ekspresyonunu arttırdığını göstermektedir. Ayrıca düşük glutamin ortamı TET2 baskılanmış HL-60 hücrelerinde P-AMPKα seviyesi artmıştır.

Anahtar Kelimeler: Glutamin metabolizması, TET2 ekspresyonu, AML, AMPK, shRNA-aracılı gen baskılama



ABSTRACT

Investigation of the Association Between TET2 Expression and Glutamine Metabolism in HL-60 Leukemia Cell Line

Bayrak, Ahsen Merve

Master's Thesis, Department of Molecular Medicine

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Burcu Yücel

January 2023

Cancer is a disease that occurs when cells proliferate uncontrollably and spread into surrounding tissues due to disruption of the control mechanisms that regulate growth and division in normal cells. Cancer cells reprogram their metabolism and increase glucose and glutamine uptake from the tumor microenvironment to survive and proliferate. Although glutamine is a non-essential amino acid and can be synthesized de novo, many cancer cells are dependent on extracellular glutamine for survival.

Acute myeloid leukemia (AML) is a hematological malignancy characterized by clonal expansion of myeloid progenitor cells with genetic abnormalities related to proliferation and differentiation. TET2 has a role in DNA demethylation and is known as a tumor suppressor gene. The TET2 gene is subjected to frequent somatic mutations in various cancers, including AML.

In our study, we aimed to investigate the relationship between TET2-knockdown AML cell line HL-60 cells and glutamine metabolism. We examined the effects of low glutamine medium on cell proliferation, viability, expression levels of GLUL, GLS1, GLS2, GLUD1, SLC38A1 ve SLC38A2 genes involved in glutamine metabolism, and AMPK activity, which is the central energy sensor of cells, in TET2-knockdown HL-60 cells.

Our findings indicate that TET2-knockdown HL-60 cells may be more resistant to glutamine restriction, and that low glutamine medium increases the expression of certain genes in glutamine metabolism, associated with the glutamine dependence of HL-60 cells. In addition, the level of P-AMPK α in TET2-knockdown HL-60 cells increased in low glutamine medium.

Keywords: Glutamine metabolism, TET2 expression, AML, AMPK, shRNA-mediated gene silencing



İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	iv
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser.....	3
2.1.1. Kanser Genetiği	4
2.1.1.1. Proto-onkogenler.....	4
2.1.1.2. Tümör Baskılayıcı Genler	5
2.1.2. Kanser Metabolizması.....	5
2.1.2.1. Aerobik Glikoliz ‘Warburg Etkisi’	6
2.1.2.2. AMPK (Adenozin Monofosfat Aktif Protein Kinaz) Sinyal Yolağı ...	8
2.2. Glutamin	9
2.2.1. Glutamin Metabolizması (Glutaminoliz)	9
2.2.2. Glutamin Metabolizmasının Kanser Hücre Gelişimindeki Rolü	12
2.3. Akut Miyeloid Lösemi (AML)	15
2.3.1. Akut Miyeloid Lösemi (AML) Genetiği	15
2.4. TET2.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	21
3.1. Gereç	21
3.1.1. Kimyasallar.....	21
3.1.2. Kitler.....	23
3.1.3. Cihazlar.....	23
3.1.4. Sarf Malzemeler.....	24

3.1.5.	Solüsyonlar	25
3.1.5.1.	Western Blot Solüsyonları.....	25
3.2.	Yöntem	27
3.2.1.	Hücre Kültürü	27
3.2.1.1.	Düşük Glutaminli Hücre Kültürü.....	27
3.2.1.2.	Hücre Sayımı	27
3.2.1.3.	Hücre Canlılık Deneyi: ATP seviyesinin ölçülmesi	27
3.2.2.	HL-60 Hücre Hattında TET2 Ekspresyonun shRNA Aracılı Plazmidlerle Baskılanması.....	28
3.2.3.	MiniPrep Kit ile Plazmid İzolasyonu	29
3.2.3.1.	Tek Koloni Süspansiyonu Hazırlanması	29
3.2.3.2.	Plazmid İzolasyonu	29
3.2.4.	Transfeksiyon.....	30
3.2.5.	Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR):.....	30
3.2.5.1.	RNA İzolasyonu.....	30
3.2.5.2.	cDNA Sentezi	31
3.2.6.	Western Blot	33
3.2.6.1.	Hücre Hatlarından Protein İzolasyonu	33
3.2.6.2.	Protein Konsantrasyonlarının Ölçülmesi.....	33
3.2.6.3.	Sodyum Dodesil Sülfat– Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE).....	34
3.2.6.4.	Blotlama (Islak Transfer)	35
3.2.6.5.	Membranın Bloklanması ve Proteinin İmmunokimyasal Görüntülenmesi	36
3.2.7.	İstatistiksel Hesaplamalar	36
4.	BULGULAR.....	37
4.1.	Düşük Glutaminli Ortamda HL-60 Hücrelerinin TET2 mRNA Ekspresyonu .37	

4.2.	Düşük Glutaminli Ortamda Hücre Proliferasyonu.....	38
4.3.	Düşük Glutaminli Ortamda Hücre Canlılığı.....	39
4.4.	Düşük Glutaminli Ortamda GLUL, GLS1, GLS2, GLUD1, SLC38A1 ve SLC38A2 mRNA Ekspresyonları	40
4.4.1.	GLUL mRNA Ekspresyonları	40
4.4.2.	GLS1 ve GLS2 mRNA Ekspresyonları.....	41
4.4.3.	GLUD1 mRNA Ekspresyonları.....	43
4.4.4.	SLC38A1 ve SLC38A2 mRNA Ekspresyonları.....	44
4.5.	TET2 Geni Baskılanmış HL-60 Hücrelerinde GLUL Protein Sentezi	46
4.6.	TET2 Geni Baskılanmış HL-60 Hücrelerinde AMPK α ve P- AMPK α Protein Sentezi.....	47
5.	TARTIŞMA.....	49
6.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	57
	KAYNAKÇA.....	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACC	Asetil-CoA Karboksilaz
ADP	Adenozin Difosfat
ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
AMP	Adenozin Monofosfat
AMPK	AMP Aktif Protein Kinaz
AML	Akut Miyeloid Lösemi
APL	Akut Premiyeloid Lösemi
ATP	Adenozin trifosfat
BCA	Bikinkoninik Asit
BER	Baz Eksizyon Onarımı
BSA	Sığır Serum Albumin
CDKN2A	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü 2A
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CD	Farklılaşma kümesi
CML	Kronik Miyeloid Lösemi
c-MYC	Hücrel MYC protoonkogeni
CO₂	Karbondioksit
Cys	Sistein
CN-AML	Sitogenetik olarak normal akut miyeloid lösemi
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNMT	DNA Metiltransferazlar
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DSBH	Çift Sarmallı β -sarmal Dioksijenaz
FAB	Fransız-Amerikan-İngiliz

FADH2	Flavin Adenin Dinükleotidi
FBS	Fetal Bovin Serum
GLS	Glutaminaz
GLUD	Glutamat Dehidrojenaz
GLUL	Glutamat-Amonyak Ligaz
GMP	Granülosit-Monosit Progenitör
GOT	Glutamat-Oksaloasetat Transaminaz
GPT	Glutamat-Pirüvat Transaminaz
GS	Glutamin Sentetaz
GSH/GSSG	İndirgenmiş/oksidlenmiş Glutasyon
GTP	Guanozin Trifosfat
HMG-CoA Redüktaz	3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA redüktaz
IDH	İzositrat Dehidrojenaz
MDS	Miyelodisplastik Sendrom
MPN	Miyeloproliferatif Neoplaziler
mTOR	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
mTORC1	Rapamisin protein kompleksi 1'in memeli hedefi
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NEAA	Esansiyel olmayan amino asitler
OXPHOS	Oksidatif Fosforilasyon
PIK3CA	Fosfatidilinositol - 4,5-bifosfat 3-kinaz
PSAT1	Fosfoserin Aminotransferaz 1
RAS	Ras onkogeni
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ribonükleik Asit
RNAi	RNA interferaz

ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RPLP0	Büyük Ribozomal Protein P0
SLC	Solüt Taşıyıcı ailesi
TCA	Trikloroasetik Asit
TDG	Timin DNA Glikosilaz
TET	10-11 translokasyon proteini
Thr172	Treonin 172
TP53	Tümör Proteini 53
5-caC	5-karboksilsitozin
5-hmC	5-hidroksimetil sitozin
5-mc	5-metil sitozin
5-fC	5-formilsitozin

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. DSÖ AML sınıflandırması (79).....	16
Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	21
Tablo 3. Çalışmada kullanılan kitler	23
Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihazlar	23
Tablo 5. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler	24
Tablo 6. 5X Protein yükleme tamponu bileşenleri.	25
Tablo 7. Protein izolasyonu lizis tamponu bileşenleri.....	26
Tablo 8. Düşük glutaminli RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması.	27
Tablo 9. High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) protokolü.....	31
Tablo 10. qRT-PCR için kullanılan PowerUp SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) protokolü.	32
Tablo 11. qRT-PCR Koşulları	32
Tablo 12. qRT-PCR primer listesi.....	32
Tablo 13. Normal ve düşük glutaminli besiyerinde GLS2 ekspresyonunun ortalama ct değerleri.	43
Tablo 14. Normal ve düşük glutaminli besiyerinde SLC38A1 ekspresyonunun ortalama ct değerleri.....	45

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Kanserın Özellikleri (19).	4
Şekil 2. Çoğalan kanser hücrelerinin artan glikoz ve glutamin alımı (31).	6
Şekil 3. Warburg etkisi (41).	7
Şekil 4. AMPK'nın upstream regülasyonu ve AMPK aktivasyonunun metabolik sonuçları (47).9	
Şekil 5. Glutamin sentezi ve hidrolizi (50).	10
Şekil 6. Kanser hücrelerinde glutamin metabolizması (59)	12
Şekil 7. Glutamin, kanserin metabolik yeniden programlanmasında kilit bir parçadır (67).	13
Şekil 8. Tümör hücrelerinde artan glutamin tüketimiyle birlikte, glutamini glutamata dönüştüren GLS1 ve GLS2 ekspresyonlarının MYC ve p53 proteinleri tarafından düzenlenmesi (70).	14
Şekil 9. TET'ler tarafından DNA demetilasyonunun düzenlenmesi (93).	17
Şekil 10. TET2 proteininin etki alanı yapısı (94).	18
Şekil 11. HL-60 hücrelerinin düşük glutaminli besiyerinde TET2 mRNA ekspresyonu analizi.37	
Şekil 12. HL-60 hücre hattında shRNA aracılı TET2 mRNA ekspresyonunun baskılanması. ...38	
Şekil 13. 2 mM (Normal) ve 50 µM (Düşük) glutamin içeren besiyerlerinde hücre proliferasyonu.	39
Şekil 14. TET2 ekspresyonu baskılanmış HL-60 hücrelerinde düşük glutaminli ortamın hücre canlılığına etkisi.	40
Şekil 15. Düşük glutaminli besiyerinde GLUL mRNA ekspresyonlarının analizi.	41
Şekil 16. Düşük glutaminli besiyerinde GLS1 mRNA ekspresyonlarının analizi.	42
Şekil 17. Düşük glutaminli besiyerinde GLS2 mRNA ekspresyonlarının analizi.	43
Şekil 18. Düşük glutaminli besiyerinde GLUD1 mRNA ekspresyonlarının analizi.	44
Şekil 19. Düşük glutaminli besiyerinde SLC38A1 mRNA ekspresyonlarının analizi.	45
Şekil 20. Düşük glutaminli besiyerinde SLC38A2 mRNA ekspresyonlarının analizi.	46
Şekil 21. HL-60, HL-60 shTET2-1 ve HL-60 shTET2-3 hücrelerinde normal ve düşük glutaminli ortamda GLUL proteininin immünoblotlanması.	47
Şekil 22. HL-60, HL-60 shTET2-1 ve HL-60 shTET2-3 hücrelerinde normal ve düşük glutaminli ortamda AMPKα proteininin immünoblotlanması.	48

Şekil 23. HL-60, HL-60 shTET2-1 ve HL-60 shTET2-3 hücrelerinde normal ve düşük glutaminli ortamda P-AMPK α proteininin immünotlotlanması	48
--	----



1. GİRİŞ

Karsinogenez, büyüme ve gelişmede yer alan kilit hücresel yolları etkileyen genetik değişikliklerle karakterize edilen çok adımlı bir süreçtir (1). Tümör baskılayıcı genler ve onkogenlerdeki somatik mutasyonlar gibi genetik varyasyonlar kanser gelişimi sırasında hücre çoğalmasına ve apoptoza büyük katkıda bulunur (2). Kanser hücreleri büyümeyi, hayatta kalmayı ve çoğalmayı desteklemek için metabolizmalarını yeniden düzenler. Bu değişmiş metabolizmanın ortak özelliği, artan glikoz alımı ve glikozun laktata fermentasyonudur. Bu fenomen, tamamen işleyen mitokondri varlığında bile gözlenir ve Warburg Etkisi olarak bilinir (3).

Metabolik yeniden programlama, kanser hücrelerinin ayırt edici bir özelliğidir. Birçok kanser hücresi, hayatta kalmaları ve çoğalmaları için onları yüksek oranda glutamine bağımlı kılan metabolik yeniden programlamaya tabi tutulur. Bu hücrelerde glutamin yoksunluğu, glutamin bağımlılıkları nedeniyle büyümenin durmasına ve hücre ölümüne neden olur (4). Kanser hücrelerindeki anormal enerji metabolizmasının ve glutaminin hücre içi kullanımındaki değişiklikler doğrudan malign fenotipe katkıda bulunan adaptif bir mekanizma oluşturmaktadır (5).

Glutamin, kan ve kasta en bol bulunan amino asittir ve mitokondriyal metabolizmayı sürdüren metabolitlerin sentezi; reaktif oksijen türlerini uzaklaştırmak için antioksidanların üretilmesi; hücre replikasyonu için esansiyel olmayan amino asitlerin, pürinlerin, pirimidinlerin, yağ asitlerinin sentezi ve hücre sinyalinin aktivasyonu gibi birçok temel hücre fonksiyonu için kritik öneme sahiptir (4).

Kanser hücrelerinde metabolik yeniden programlama, glutamin alımını ve anabolizma için kullanımını kolaylaştırır (5). Memeli hücreleri GLUL tarafından kodlanan glutamin sentetaz (GS) enzimi aracılığıyla glutamini de novo sentezleyebilmesine rağmen, bazı kanser hücreleri yüksek seviyelerde GLUL eksprese etmezler ve bunun yerine glutaminaz (GLS) yoluyla mitokondride katabolize edilebilen eksojen bir glutamin kaynağına bağımlıdırlar (6). Artan glutamin tüketimi, onkogenlerin ve tümör baskılayıcıların düzensizliği ile ilişkilendirilmiştir.

Erişkinlerde en sık görülen akut lösemi türü olan Akut Miyeloid Lösemi (AML), hematopoietik progenitör hücrelerin anormal proliferasyonu, farklılaşması ve olgunlaşma bozuklukları ile karakterize hematolojik bir malignite tümörüdür (7). Ten-Eleven

translokasyon protein (TET1-3) ailesinin bir üyesi olan TET2, hematopoetik ve bağışıklık sistemlerinde sıklıkla mutasyona uğramış genlerden biridir ve iyi bilinen bir tümör baskılayıcıdır (8). TET2, 5-metilsitozinin (5-mC) 5-hidroksimetilsitosine (-5hmC) oksidasyonunu katalize eden α -ketoglutarat ve Fe^{2+} bağımlı bir dioksijenazdır (9).

5'-adenozin monofosfat (AMP) ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK), hücresel enerji dengesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve yüksek AMP/ADP oranı ile aktive olur. AMPK aktivasyonu, hücre içindeki enerji homeostazını eski haline getirmek katabolik (ATP üreten) yolları inaktive ederken anabolik (ATP kullanan) yolları aktifleştirir (10). AMPK'nın aktivasyonu, tümör mikroçevresinde yaygın olan enerji stresi, hipoksi ve hipoglisemi gibi stresli koşullar altında tümör hücrelerinin hayatta kalması için çeşitli sinyal yollarını aktifleştirir (11).

Bu tez çalışmasının amacı TET2 ekspresyonu baskılanmış AML hücre hattı HL-60 hücreleri ile glutamin metabolizması arasındaki ilişkinin incelenmesidir. TET2 ekspresyonu baskılanmış HL-60 hücrelerinde glutamin kısıtlamasının; hücre proliferasyonu ve canlılığı ile glutamin metabolizmasında görev yapan GLUL, GLUD1, GLS1, GLS2, SLC38A1 ve SLC38A2 genlerinin ekspresyon seviyelerinde üzerine etkilerini araştırmaktır. Ek olarak, TET2 ekspresyonu baskılanmış HL-60 hücrelerinde düşük glutamin konsantrasyonunun AMPK aktivitesi üzerine etkisi de incelenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

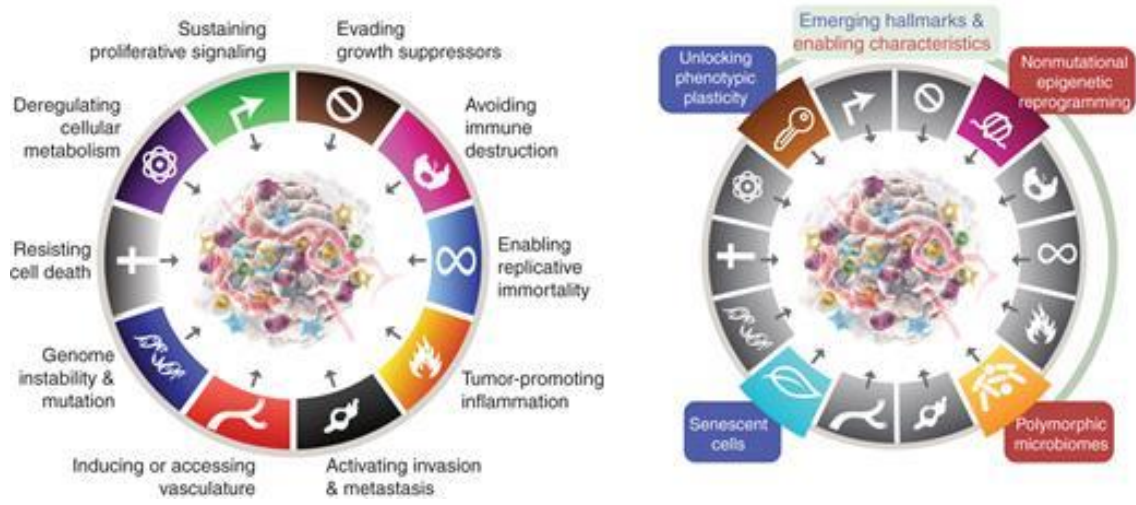
2.1. Kanser

Kanser, kontrolsüz hücre çoğalması ve hücrelerin vücudun diğer bölgelerine yayılması ile karakterize bir hastalıktır (12). Kanser, dünyada en sık görülen ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır ve insanların yaklaşık üçte biri yaşamları boyunca kansere yakalanır (13,14). Ölüm oranı, farklı kanser türleri için büyük ölçüde değişir. Akciğer ve pankreas kanserleri kötü prognoza sahiptir ve genellikle bir yıl içinde ölümle sonuçlanır. Ancak tüm kanserler ölümcül değildir: Meme vakalarının yalnızca beşte biri ölümle sonuçlanır (13).

Kanser sadece tek bir hastalığı değil, ortak özellikleri paylaşan iki yüzden fazla hastalık grubunu kapsayan genel bir terimdir (12). Kanser türleri genellikle kanserlerin oluştuğu organ veya dokulara göre adlandırılır (13). Pek çok kanser türü, hücrelerin strese yanıt vermemesi ve hasardan geri dönmemesi nedeniyle ortaya çıkar. Kanser hücrelerinin önemli bir özelliği, hücre bölünmesi kontrol noktalarından geçme yetenekleridir(15).

Hücre döngüsü boyunca uygun ilerleme, DNA sentezi ve kromozom ayrımı sırasında olası kusurları algılayan; biri G1'de, diğerleri S ve G2/M'de olmak üzere üç kontrol noktası tarafından izlenir (16,17). Bu kontrol noktaları, DNA hasarı veya onkogenik proteinlerin düzensiz ekspresyonu gibi hatalar olduğunda hücreleri döngü dışına veya programlanmış hücre ölümüne (apoptoz) yönlendirir. Hücre döngüsü kontrol noktalarının bozulması veya anahtar hücre döngüsü proteinlerindeki değişiklikler, hepsinde olmasa da birçok kanserde bulunur (17).

Günümüzde kanserin sekiz ayırt edici özelliği ve bu ayırt edici özelliklerin aktive edilmesinde temel olarak yer alan iki etkinleştirici özelliği bilinmektedir (Şekil 1). Sekiz ayırt edici özellik proliferatif sinyalleme, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, hücre ölümüne direnme, replikatif ölümsüzlüğü sağlama, anjiyogenezi (damar oluşumu) indüklemeye, invazyon/metastazı aktive etme, hücre metabolizmayı yeniden programlama ve immün yıkımdan kaçınmayı içermektedir. Etkinleştirici özellikler arasında ise genom kararsızlığı ve tümörü teşvik eden iltihaplanma yer almaktadır (18,19). 2022 yılında bu listeye 4 yeni özelliğin daha eklenebileceği önerilmiştir: hücre plastisite, yaşlanmış hücreler, mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama ve organ/doku mikrobiyomlarındaki polimorfik varyasyonlar (19).



Şekil 1. Kanserın Özellikleri (19).

2.1.1. Kanser Genetiği

Tüm kanserler, kanser hücrelerinin genomlarının DNA dizisinde meydana gelen değişikliklerin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Bu değişiklikler, bir bazın diğeriyle değiştirilmesi, DNA'nın küçük veya büyük bölümlerinin eklenmesi veya silinmesi, kromozomal translokasyon, gen amplifikasyonu ve DNA kopya sayısı azalmaları olabilir(20). Kanserde rol alan genler genel olarak onkogenler ve tümör baskılayıcı genler olarak gruplandırılır (21). Genetik olarak kanser, onkogenlerin fonksiyonlarının kazanılması ve tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonlarının kaybı ile karakterize edilir (22)

2.1.1.1.Proto-onkogenler

Pozitif hücre döngüsü düzenleyicilerini kodlayan genlere proto-onkogenler denir (23)Hücre büyümesini, bölünmesini ve hayatta kalmasını uyaran proto-onkogenler mutasyona uğradığında ya da hatalı ifade edildiğinde, kanser gelişimine katkıda bulunan onkogenlere dönüşebilir (24,25). Proto-onkogenler, üç genetik mekanizma ile onkojenik aktive kazanır: mutasyonlar, gen amplifikasyonu ve kromozomal translokasyonlar (26). Hücrelerde sinyal iletimi ve proliferasyonda rol oynayan Ras ve Myc genleri, en iyi bilinen proto-onkogenlerdir (23).

2.1.1.2.Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsünün negatif düzenleyici proteinlerini kodlayan genlerdir (23). Tümör baskılayıcı genler, aktive edildiğinde hücre proliferasyonunu ve tümör gelişimini inhibe eder (21,23). Bazı tümör baskılayıcılar transkripsiyonu düzenlerken, bazıları hücre çoğalması, farklılaşması ve ölüm süreçlerinin düzenlenmesinde rol oynayan sinyal iletim yollarında çalışır (27).

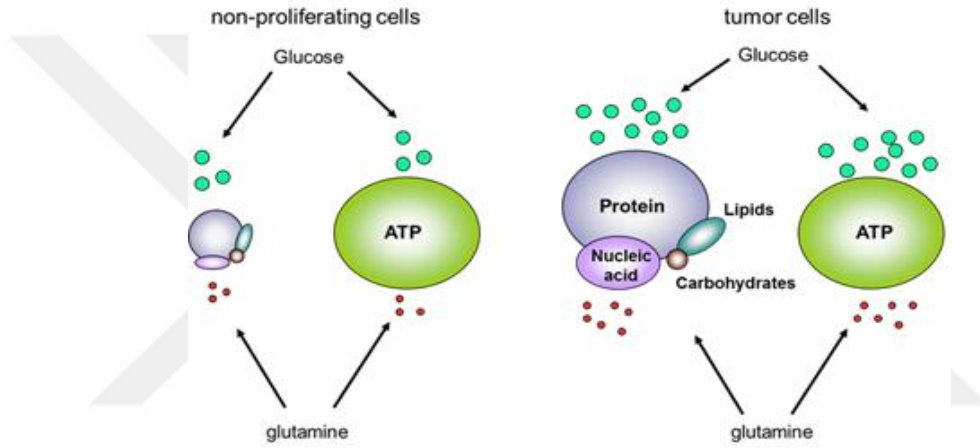
Normalde kontrolsüz hücresel büyümeyi önlemeye yardımcı olan, DNA onarımını ve hücre döngüsü kontrol noktası aktivasyonunu destekleyen tümör baskılayıcı genlerdeki fonksiyon kaybı mutasyonları kanserleşmeye neden olur (25). Malign tümörlerde bulunan başlıca somatik mutasyon türleri arasında nükleotid yer değiştirmeleri, küçük eklemeler, delesyonlar, kromozomal translokasyonlar ve kopya sayısı değişiklikleri bulunur. CDKN2A ve TP53 gibi tümör baskılayıcı genlerin nokta mutasyonları veya delesyonlar yoluyla fonksiyon kaybı birçok kanser türünde yaygındır (21).

Bir tümör baskılayıcı genin tümör oluşumuna izin vermesi için genin her iki kopyasını da inaktive edecek iki mutasyonel isabet (biallelik) gerekmektedir. İlk mutasyon, genellikle kalıtsal veya somatik bir nokta mutasyonudur; ikincisi ise tümör baskılayıcı genin ikinci kopyasını inaktive eden bir delesyondur (21).

2.1.2. Kanser Metabolizması

Kanser hücresi metabolizması, mutasyona uğramış onkogenler ve tümör baskılayıcı genler tarafından bozulan hücre içi sinyal yollarının modülasyonunun doğrudan bir sonucudur (28). Normal hücrelerde, büyüme faktörleri gibi hücre dışı uyaranlar uygun reseptörlerle etkileşerek hücre içi sinyal zincirini başlatır ve hücre çoğalmasını indükler. Kanser hücrelerinde, genetik mutasyonlar büyüme faktörü reseptörlerinin sayısını artırır. Hücresel proliferasyonu teşvik eden hücre içi sinyal yolları, sürekli olarak açılabilir veya güçlendirilebilir, bu da kötü huylu hücrelerin büyümeyi ve çoğalmayı kendi kendine uyarmasına izin verir (29). Ayrıca, kanser hücreleri sinyal yollarındaki değişimler sayesinde hayatta kalmak ve çoğalmak için tümör mikro çevresinden glikoz ve glutamin gibi temel besin maddelerinin alımını artırmaktadır (Şekil 2)(30,31).

Değiştirilen sinyal yolları, hücrelerin yalnızca tümör hücresi metabolizmasına uyum sağlamasına izin vermekle kalmaz, aynı zamanda bu metabolik değişikliklerin birçoğu malign transformasyon için de gereklidir(28). Tümör hücreleri artan proliferasyon, metastaz sırasında kuvvetli göç ve primer istila bölgesinden farklı dokulara adaptasyon gibi hızlandırılmış biyolojik fonksiyonlarını karşılamak için gelişmiş bir metabolizmaya ihtiyaç duyarlar(32). Bu nedenle, kanser hücreleri tümörün ilerlemesi sırasında normal hücrelere kıyasla artan enerji ihtiyaçlarını karşılamak için metabolizmalarını yeniden programlarlar (28,32,33).

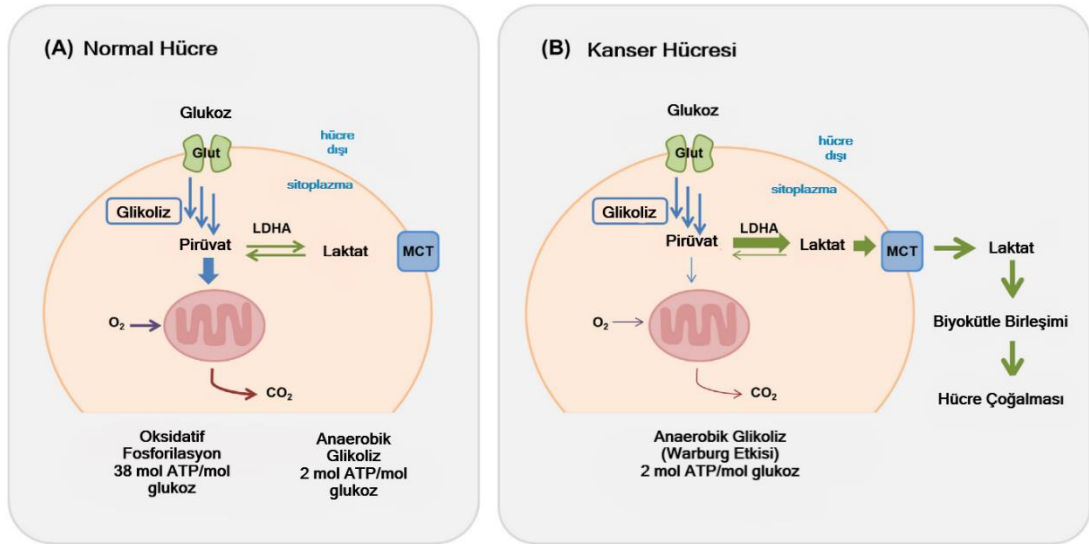


Şekil 2. Çoğalan kanser hücrelerinin artan glikoz ve glutamin alımı (31).

2.1.2.1. Aerobik Glikoliz ‘Warburg Etkisi’

Kanser hücrelerinde yeniden programlanmış hücresel metabolizmanın en önemli özelliklerinden biri aerobik glikoliz veya Warburg etkisidir; ilk kez 1926'da Alman Fizyolog Otto Warburg tarafından tanımlanmıştır (22,28,34). Normal hücrelerin, aerobik koşullar altında mitokondriyal oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) ile enerji ürettiği bilinmektedir. Hücreler oksijenin az olduğunda ortamda ise oksijen tüketen mitokondriyal metabolizma yerine sitoplazmada glikoliz ile enerji ihtiyaçlarını karşılarlar (35). Ancak kanser hücreleri değişen metabolizmaları ile oksijenin bol olduğu ortamlarda bile oksidatif fosforilasyon yerine, aerobik glikoliz yoluyla ATP elde ederler (Şekil 3) (28,34,35).

Warburg etkisinin nedeni henüz tam olarak bilinmemektedir. Warburg, başlangıçta, tümör hücrelerinde mitokondriyal fonksiyonun bozulmasının aerobik glikoliz indüklenmesinden sorumlu olabileceğini düşünmüştür (22,36). Bununla birlikte, sağlıklı memeli dokularından gelen hücreler de hızlı büyüme sırasında aerobik glikoliz ve glutaminoliz göstermektedir (37). Daha sonra yapılan çalışmalarda, yüksek proliferasyon oranlarına sahip birçok tümör hücre hattında oksidatif metabolizmanın bozulmadan kaldığı ve OXPHOS kullanarak enerji üretebilecekleri bulunmuştur. Bu OXPHOS yeteneğine rağmen, birçok tümör tipi, büyüme ve hipoksik tümör mikro-ortamlarına uyum sağlamak için aerobik glikolize güvenir(22,29). Bununla birlikte, son zamanlarda kanser hücrelerinde mitokondriyal fonksiyona odaklanan birçok çalışma, Warburg etkisinin, mitokondriyal kusurlardan ziyade glikoz alımını ve kullanımını kontrol eden sinyal yollarındaki değişikliklerle daha yakından ilişkili olduğunu öne sürmüştür (28,33). Diğer açıklamalar, tümör hücrelerinin sonsuz proliferasyonu için gerekli olan enerji ihtiyacını daha hızlı karşılamak amacıyla aerobik glikolizi tercih ettiğini içermektedir. Glikoz molekülü başına ATP üretimindeki verimlilik glikoliz yoluyla çok daha düşük olmasına rağmen, glikolizin ATP üretim hızı oksidatif fosforilasyondan daha fazladır (35,38,39,40).



Şekil 3. Warburg etkisi (41).

2.1.2.2.AMPK (Adenozin Monofosfat Aktif Protein Kinaz) Sinyal Yolağı

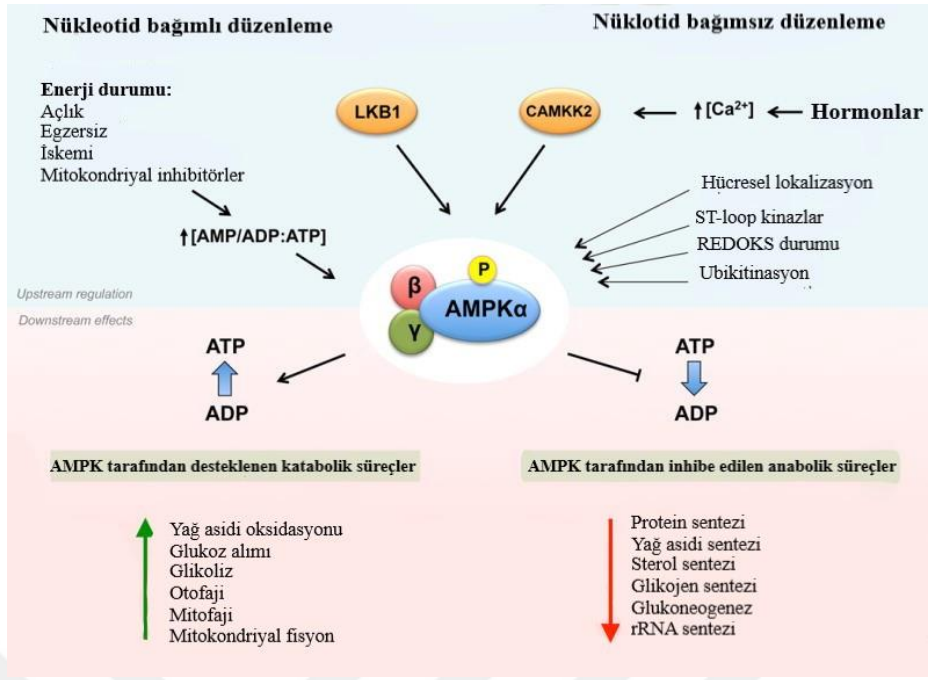
AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK), ökaryotik hücrelerde her yerde bulunan bir hücresel enerji ve besin durumu sensörüdür (42). AMPK sinyal ileti yolağı, AMP/ATP ve ADP/ATP oranlarındaki değişiklikleri entegre ederek ATP tüketimi ve sentezi arasındaki dengeyi ayarlar (43). AMPK, daha fazla ATP üretmek için katabolik yolları teşvik eder ve anabolik yolları engeller (Şekil 4)(44).

Yapısal olarak AMPK, memelilerde iki izoform tarafından kodlanan katalitik α -alt birimi ve sırasıyla iki ve üç izoform tarafından kodlanan düzenleyici β - ve γ - alt birimi olmak üzere üç alt birimden oluşan bir heterotrimerik protein kompleksidir (45). AMPK, α -alt biriminin kinaz alanının aktivasyon segmenti içinde bulunan treonin 172'nin (Thr172) fosforilasyonu yoluyla aktive edilir(10).

AMPK, serin/treonin kinaz ailesinin bir üyesidir ve ilk olarak, çok çeşitli ökaryotlarda yağ asidi ve sterol sentezi için hız sınırlayıcı adımlarda işlev gören kritik metabolik enzimler Asetil-CoA Karboksilaz (ACC1 ve ACC2) ve HMG-CoA redüktaz (3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA redüktaz) için upstream kinaz olarak tanımlanmıştır (44).

Enerji homeostazının korunmasındaki rolüne ek olarak AMPK, hücre büyümesi, hücre proliferasyonu, otofaji, stres tepkileri ve hücre polaritesinin düzenlenmesi yoluyla tümör oluşumunda önemli bir rol oynar(43,45). Bununla birlikte, artan kanıtlar, AMPK'nın bir tümör baskılayıcı veya onkogen olarak çalışabildiğini göstermektedir (46).

AMPK, besin yoksunluğu, hücresel stresler, açlık veya kalori kısıtlaması, kalori kısıtlama mimetikleri ve nükleozit analogları gibi çok çeşitli uyaranlarla aktive edilir ve hem hematopoetik maligniteler hem de katı tümörler dahil olmak üzere pek çok kanserin ve metabolik hastalıkların tedavisi için klinik çalışmalarda değerlendirilmiştir (43).



Şekil 4. AMPK'nın upstream regülasyonu ve AMPK aktivasyonunun metabolik sonuçları (47).

2.2. Glutamin

Glutamin 0,6–0,9 mmol/L konsantrasyonlarda, insan kanında en bol bulunan serbest amino asittir. Memeli hücreleri, glutamini glutamattan glutamin sentetaz (GS) yoluyla de novo sentezleyebildiği için esansiyel olmayan bir amino asit olarak kabul edilmiştir ancak enterositler, lenfositler gibi hızla çoğalan hücrelerde ve kanser hücrelerinde artan glutamin ihtiyacı endojen biyosentez tarafından karşılanamadığında, koşullu esansiyel bir amino asit haline gelir (48,49).

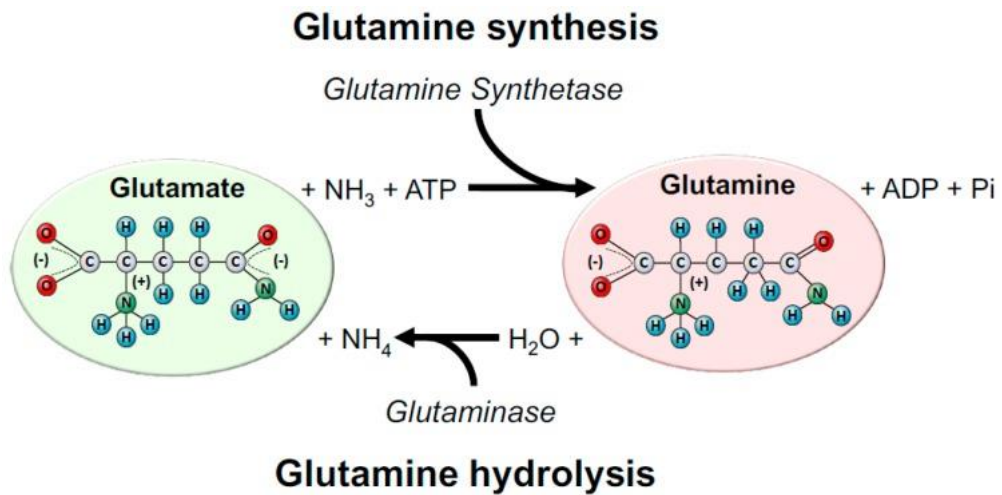
Glutamin 146.15 kDa moleküler ağırlığa sahip, nötral, beş karbon içeren bir L-α-amino asittir (50). Yapısındaki α-amino grubu ve kolayca hidrolize edilebilen yan zincirli amid grubu sayesinde amino asitler ve nükleotidler için önemli bir nitrojen donörüdür (50,51). Ayrıca glutamin, glikoza ek olarak, çoğalan kanser hücreleri için bir enerji kaynağıdır (52).

2.2.1. Glutamin Metabolizması (Glutaminoliz)

Glutaminoliz, sitrat döngüsünün ve malat-aspartat mekiğinin reaksiyon aşamalarını içeren; glutamin amino asidinin glutamat, aspartat, CO₂, pirüvat, laktat, alanin ve sitrata

parçalandığı bir dizi biyokimyasal reaksiyondur (6). Glutaminoliz, sitoplazmada ve mitokondride meydana gelen reaksiyonları içerir (53).

Glutamin metabolizması ile ilgili ana enzimler, sırasıyla glutamin kullanımı ve sentezindeki hız sınırlayıcı adımları katalize eden glutaminaz ve glutamin sentetaz enzimleridir (Şekil 5) (50). Kromozom 1q25.3'te bulunan GLUL geni tarafından kodlanan GS enzimi, ATP kullanarak glutamat ve amonyağı glutamine dönüştürür. GS ekspresyonu özellikle karaciğer, böbrek, iskelet kası ve beyinde yüksektir (54,55). Memeli hücreleri GLUL kullanarak glutamini de novo sentezleyebilmesine rağmen bazı kanser hücrelerinde GLUL ekspresyonu düşüktür, bu nedenle GLS yoluyla mitokondride katabolize edilebilen eksojen bir glutamin kaynağına bağımlıdırlar (56). GLS, glutamini glutamat ve amonyağa hidrolize eden mitokondriyal bir enzimdir (50). Memelilerde, böbrek tipi glutaminaz (GLS1) ve karaciğer tipi glutaminaz (GLS2) olmak üzere iki farklı glutaminaz izoformu eksprese edilir (57). Kromozom 2q32.2'de bulunan GLS1 tüm vücut organlarında eksprese edilirken, kromozom 12q13.3'te bulunan GLS2 ekspresyonu yalnızca karaciğerle sınırlıdır (49). Bu enzimlerin işlevleri hücre içi lokalizasyonlarıyla uyumludur; GS sitozolde bulunurken, aktif formdaki GLS mitokondri içinde bulunur. GS, sitoplazmik proteinlerin ve nükleotitlerin sentezi için glutamin üretirken; GLS, glutamini glutamata dönüştürerek, bir enerji kaynağı olarak TCA döngüsüne girebilmesini sağlamaktadır (50).

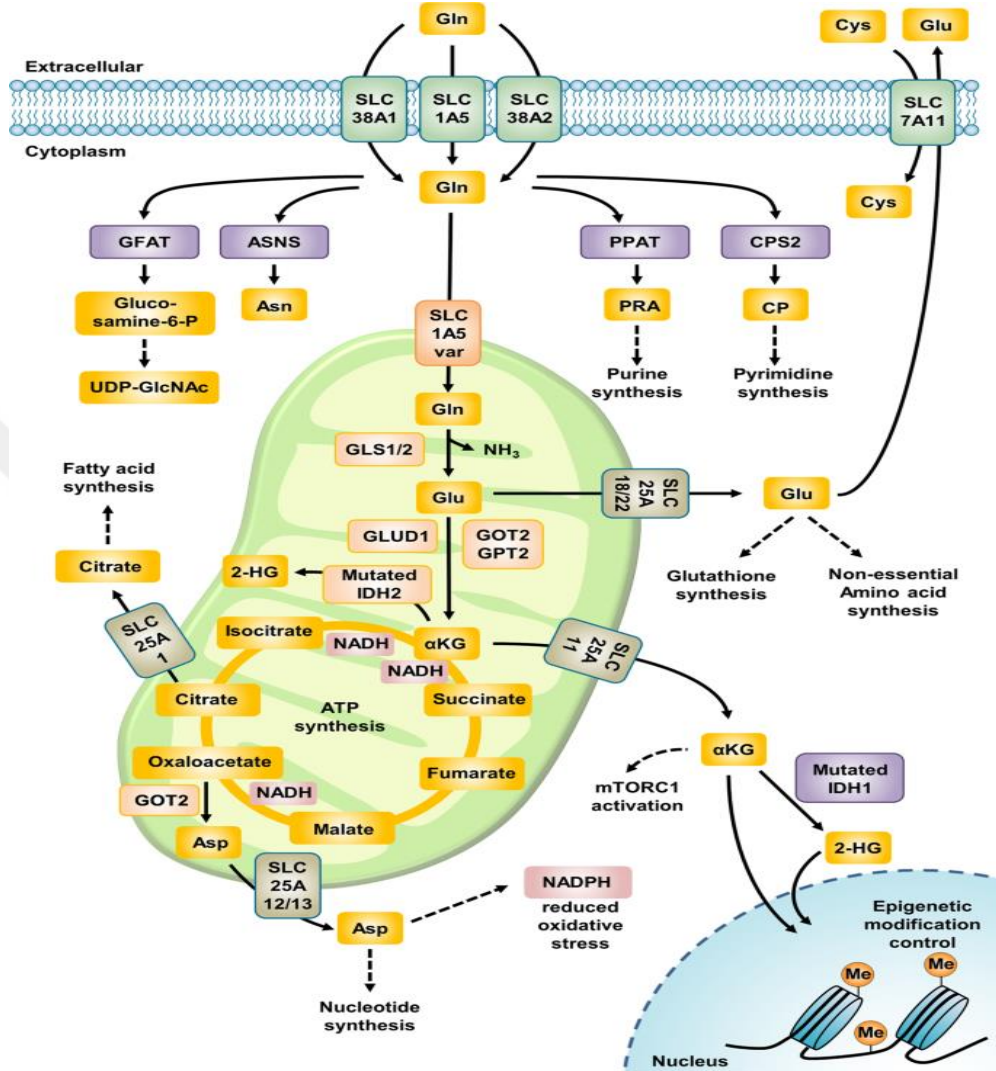


Şekil 5. Glutamin sentezi ve hidrolizi (50).

Glutamin, hücre içine çözünen taşıyıcı taşıyıcılar (SLC) olarak adlandırılan zara bağlı amino asit taşıyıcıları ile alınır (Şekil 6) (58). SLC'lerin birçoğu kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilir, bu durum kanser hücrelerin glutamin alımını arttırdığını göstermektedir. Glutamin, 12. kromozomun uzun kolunda (12q13.11) bulunan SLC38A1 (SNAT1) ve SLC38A2 (SNAT2) ile veya SLC1A5 (ASCT2), SLC7A5 (LAT1) gibi plazma zarı glutamin taşıyıcıları aracılığıyla hücreye girer. Sitozolik glutamin heksosamin, nükleotidler ve asparajinin biyosentezi için kullanılabilir (49,59). Mitokondride glutaminoliz, sitozolik glutaminin bir mitokondriyal glutamin taşıyıcısı olan SLC1A5 varyantı aracılığıyla iç mitokondriyal zardan taşınmasından sonra GLS1 ve GLS2 tarafından glutamata dönüştürülmesiyle başlar (60). GLS1, kanserde yüksek seviyelerde eksprese edilirken ve GLS2 ekspresyonu çoğunlukla bastırılır ve her iki tipin farklı moleküler formları, sitoplazma ve mitokondride farklı şekilde lokalize edilir (55). Bu katabolik yollar aracılığıyla üretilen mitokondriyal glutamatın bir kısmı, glutamat havuzuna katılmak üzere SLC25A18 ve SLC25A22 taşıyıcıları aracılığıyla sitozole gönderilir. Sitozolik glutamat, ana hücrel antioksidan olan glutatyonun (glutamat, sistein ve glisini içeren bir tripeptit) ve esansiyel olmayan alanin, prolin, aspartat, asparagin ve arginin gibi amino asitlerin biyosentezine katılır (59). Mitokondride kalan glutamat ise iki farklı yolla α -ketoglutarata dönüştürülür. Birinci yol, kromozom 10q23.2'de bulunan mitokondriyal matris enzimi glutamat dehidrogenazın (GLUD) aktivitesidir. İkinci yol, glutamat-oksaloasetat transaminaz (GOT), glutamat-piruvat transaminaz (GPT) ve fosfoserin aminotransferaz 1 (PSAT1) olmak üzere bir grup transaminazın aktivitesidir. GLUD yolu aynı zamanda, amonyum ve kofaktör NADH [indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit (NAD) formu] veya NADPH [indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP) formu] üretir. Transaminazlar ise sırasıyla, aspartat, alanin ve fosfoserin gibi diğer esansiyel olmayan amino asitlerin (NEAA) oluşumunu destekler (61,62).

Mitokondriyal α -KG daha sonra oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) yolunu veya indirgeyici karboksilasyon yolunu destekleyen TCA döngüsüne girerek hücre için enerji sağlayabilir. OXPHOS yolunda, guanozin trifosfat (GTP) ve adenozin trifosfatın (ATP) sentezinden sonra glutamin metabolitleri, NADH veya FADH₂ gibi bir elektron donörünün oluşumuna katılır. Alternatif olarak, α -ketoglutarat, TCA döngüsü boyunca geriye doğru ilerleyen indirgeyici karboksilasyon yoluyla sitoplazmada ve mitokondri içinde izositrat dehidrojenazlar (IDH'ler) tarafından sitrata dönüştürülür. Glutaminden

türetilen sitrat, özellikle hipoksi veya mitokondriyal disfonksiyon koşulları altında kanser hücrelerinde lipid sentezi için çok önemlidir (53,59,60,62,63).

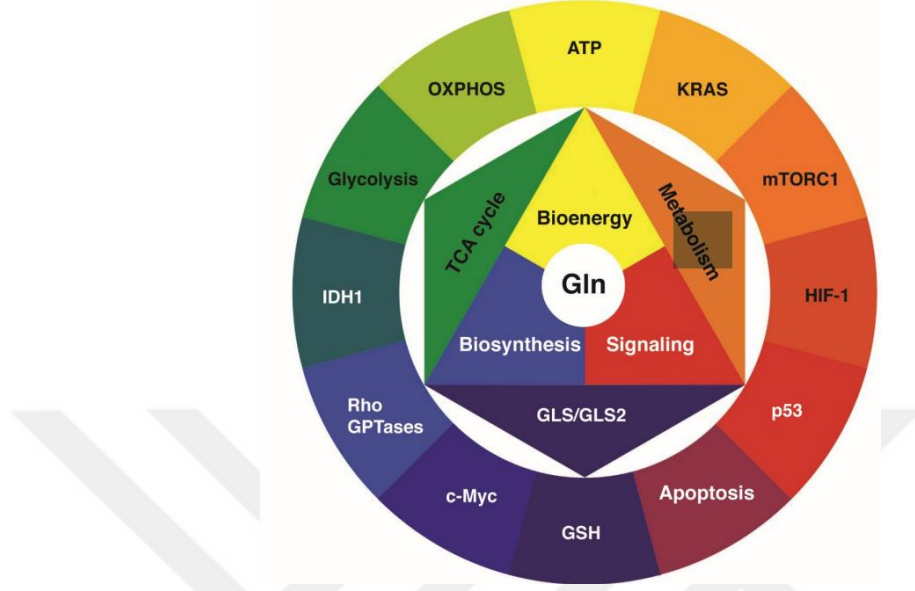


Şekil 6. Kanser hücrelerinde glutamin metabolizması (59)

2.2.2. Glutamin Metabolizmasının Kanser Hücre Gelişimindeki Rolü

Metabolik yeniden programlama, kanser hücrelerinin ayırt edici bir özelliğidir (Şekil 7). Birçok kanser hücresi, hayatta kalmaları ve çoğalmaları için artan glutamin ihtiyacı nedeniyle glutamin metabolizmalarını yeniden programlar (62,64). 1979'da yüksek glutamin konsantrasyonu içeren ortamdaki Hela hücrelerinde yapılan bir çalışmada, ATP

ihtiyacının yarısından fazlasının TCA döngüsünden aerobik oksidasyon yoluyla glutaminden geldiği gösterilmiştir (65–67).



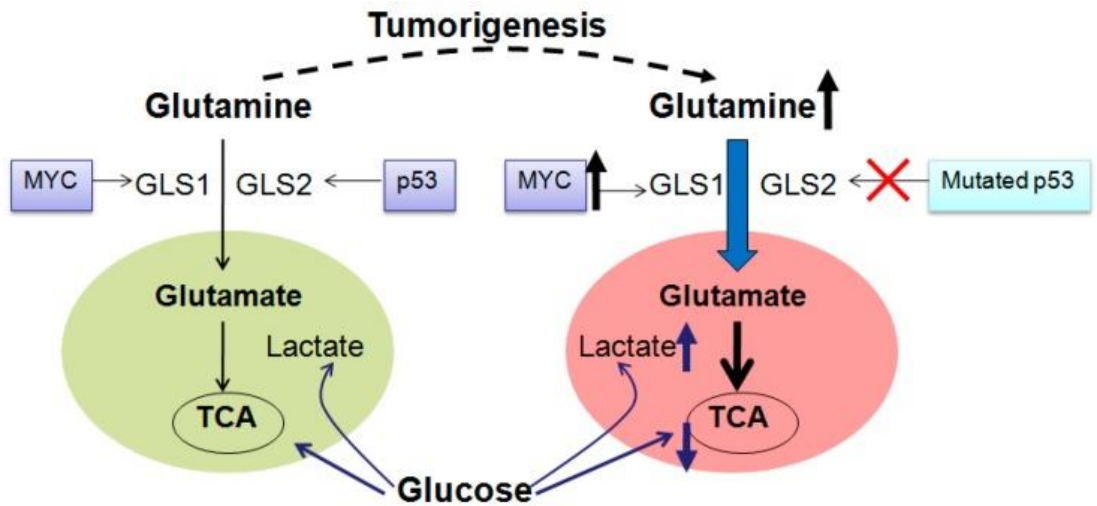
Şekil 7. Glutamin, kanserin metabolik yeniden programlanmasında kilit bir parçadır (67).

Glikoz ve glutamin, hücrelerin en çok kullandığı besin maddeleridir (58). Glutaminin tümör hücresi metabolizmasındaki önemi, glikoz ile paylaştığı özelliklerden kaynaklanmaktadır. Her iki besin de çoğalan kanser hücreleri için iki önemli ihtiyacı karşılamaya yardımcı olur: ATP üretimi ve makromolekülerin sentezi için ara maddelerin üretilmesi (52). Glikolitik yoldan üretilen pirüvat, TCA döngüsünde kullanılmak yerine laktata dönüştürülür ve glikozun TCA'ya katkısı azalır. Kanser hücrelerinde mitokondriyal ATP üretimine olan gereksinim azalmasına rağmen, biyosentetik öncülere ve NADPH'ye olan talep artmaktadır. Bu nedenle kanser hücreleri işlevsel bir TCA döngüsünü sürdürmek için genellikle yüksek glutaminolize güvenir (68). Bir karbon kaynağı sağlamanın yanı sıra, glutamin metabolizması ayrıca nükleik asitlerin ve diğer amino asitlerin sentezi için bir nitrojen kaynağı görevi görür ve ayrıca çeşitli mekanizmalar yoluyla hücresel redoks homeostazının düzenlenmesine katılır (53).

Glutamin bağımlılığı, kanser hücreleri glutamin sınırlaması koşullarında hücre ölümüne maruz kaldığında veya glutamin metabolizması inhibe edildiğinde ortaya çıkar. Yapı taşları ve enerji için glutamin katabolizmasına dayanan birçok kanser hücresinin

glutamine bağımlı olduğu bildirilmiştir. Glutamin bağımlısı hücreler, DNA hasarındaki artış, ROS'un aşırı üretimi veya indirgenmiş/oksidlenmiş glutatyon (GSH/GSSG) oranının azalması ile ilişkili olarak sağkalımda azalma gösterir veya apoptotik hücre ölümüne uğrar (64).

Kanser hücrelerinde artan glutamin tüketimi, onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin düzensizliği ile ilişkilendirilmiştir (68,69). Glutamin metabolizması, çeşitli onkojenik sinyal yolları tarafından yukarı doğru düzenlenir. Onkojenik transkripsiyon faktörü c-MYC, kanser hücrelerinin proliferasyonunu ve metabolizmasını in vitro ve in vivo olarak yönlendirir. MYC'nin GLUD geni, aminotransferazlar ve glutamin taşıyıcılarının mRNA ve protein seviyelerinin yanı sıra, glutaminolizin ilk adımını katalize eden glutaminaz enziminin ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur. Yüksek GLS ve glutamin taşıyıcı seviyeleri, tümör hücrelerinin enerjilerinin ve makromoleküllerinin büyük bir kısmını glutamin katabolizması yoluyla elde etmelerini sağlayarak miyelom ve glioma dahil olmak üzere çok sayıda kanser türünde glutamin bağımlılığına yol açar (51,61,62,69). Kanser hücrelerinde p53 mutasyona uğrarken, MYC aşırı eksprese edilir. Tümör hücrelerinde sırasında artan glutamin tüketimiyle birlikte, MYC onkogeni glutamini glutamata dönüştüren GLS1 aktivitesini arttırarak glutamin metabolizmasını destekler. GLS1, birçok tümörde yüksek oranda eksprese edilirken; p53 tarafından düzenlenen GLS2 ekspresyonu bazı tümörlerde azalır (Şekil 8) (70).



Şekil 8. Tümör hücrelerinde artan glutamin tüketimiyle birlikte, glutamini glutamata dönüştüren GLS1 ve GLS2 ekspresyonlarının MYC ve p53 proteinleri tarafından düzenlenmesi (70).

2.3. Akut Miyeloid Lösemi (AML)

Akut miyeloid lösemi (AML), kemik iliği ve periferik kandaki miyeloid progenitörlerinin (blastlar) klonal genişlemesi ile karakterize heterojen bir hastalıktır (71–73). AML, akut lösemi grubundaki vakaların yaklaşık %80'ini oluşturur ve görülme sıklığı yaşla birlikte artar (74,75). AML çocuklarda akut lösemi vakalarının %15-20'sini temsil ederken, yetişkinlerde bu oran yaklaşık %80'dir. Son yıllarda, genç hastalarda sağ kalım oranı iyileştirilmiş olsa da yaşlı hastalarda prognoz kötü ilerlemeye devam etmektedir (76).

Lösemi dahil tüm tümör tiplerinde gözlenen tümör heterojenliği, esas olarak gen değişikliklerinden kaynaklanan tümörlerdeki farklı morfolojik ve fenotipik özellikleri ifade eder. AML'nin heterojenliği, farklı sitogenetik anormallikler ve somatik mutasyonlar dahil olmak üzere hem genomik hem de epigenomik (DNA metilasyonu ve histon metilasyonu / asetilasyonu) değişiklikleri içerir ve bir dizi morfolojik, immünojenotipik, sitogenetik, biyomoleküler ve klinik özelliklerle sonuçlanır (77).

Çoğu AML vakasının etiyolojisi bilinmemekle birlikte, risk faktörleri arasında yaşlılık, erkek cinsiyeti, sigara kullanımı, kimyasallara maruz kalma, kronik miyeloproliferatif neoplazmalar, miyelodisplastik sendrom (MDS), kemoterapötik ilaçlar, yüksek doz radyasyona maruz kalma, genetik sendromlar ve ailede AML öyküsü yer alır (78,79).

AML tanısı, kemik iliğinde veya periferik kanda $\geq$ %20 miyeloid blastların saptanmasına veya belirli spesifik sitogenetik anormalliklerin saptanmasına dayanır. Spesifik tanı, immünojenotipleme ve sitokimya, blastlarda miyeloperoksidaz aktivitesinin araştırılması veya CD123, CD45, CD34, CD38 gibi yüzey tipi moleküllerin immünojenotiplenmesi ile doğrulanır (79,80)

2.3.1. AML Genetiği

Genetik anomalilerin belirlenmesi, AML'nin tanısında, prognozunda ve sınıflandırılmasında önemli bir rol oynar. Tüm erişkin primer AML hastalarının yaklaşık %52'sinde rastgele olmayan kromozomal anomaliler (delesyonlar, translokasyonlar) tanımlanır. Hastalığın genetik kökeni nedeniyle, AML'de sıklıkla görülen bazı yaygın sitogenetik anomaliler vardır, örneğin t(8;21), t(15;17), inversiyon 16, trizomi 8 daha uzun remisyon ve sağkalım ile ilişkilendirilirken; kromozom 5 ve 7'deki monozomiler, 5. kromozomun uzun kolunun silinmesi, 3. kromozomun uzun kolunun inversiyon veya

translokasyonları ve kompleks karyotip (>5 kromozom anomalisi olarak tanımlanır) tedaviye zayıf yanıt verir ve daha kısa sağkalım ile ilişkilendirilir. Buna karşılık, tüm AML vakalarının yaklaşık %40-50'si sitogenetik olarak normaldir (CN-AML) (71,76,80,81).

Çoğu AML vakasının birden fazla mutasyon vardır. AML tipik olarak, hücre çoğalmasını ve hayatta kalmasını teşvik etmek, hematopoetik hücrelerin farklılaşmasını ve apoptozunu bozmak (CEBPA, RUNX1 ve NPM1) ve epigenetik mekanizmaları modüle etmek (DNMT3A, TET2, IDH1 ve IDH2) dahil olmak üzere birçok işlevi kontrol eden genlerdeki mutasyonlarla ilişkilidir (79).

AML genellikle Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) veya Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sistemlerine göre sınıflandırılır (76,82). 1970'lerde FAB grubu, morfolojik ve sitokimyasal özelliklere dayanarak sekiz ana AML alt tipini (M0 ila M7) sınıflandırmıştır (83). Dünya Sağlık Örgütü, 2016 yılında AML sınıflandırmasını güncellenmiş ve altı AML grubu tanımlamıştır. DSÖ sınıflandırmasında; morfolojik ve sitogenetik özelliklerin yanı sıra moleküler biyolojik özellikler de göz önüne alınmış ve akut lösemi tanısı için blastik hücre sayısı %30'dan %20'ye indirilmiştir (71,78,82,84). Bu sınıflandırma Tablo 1'de özetlenmiştir.

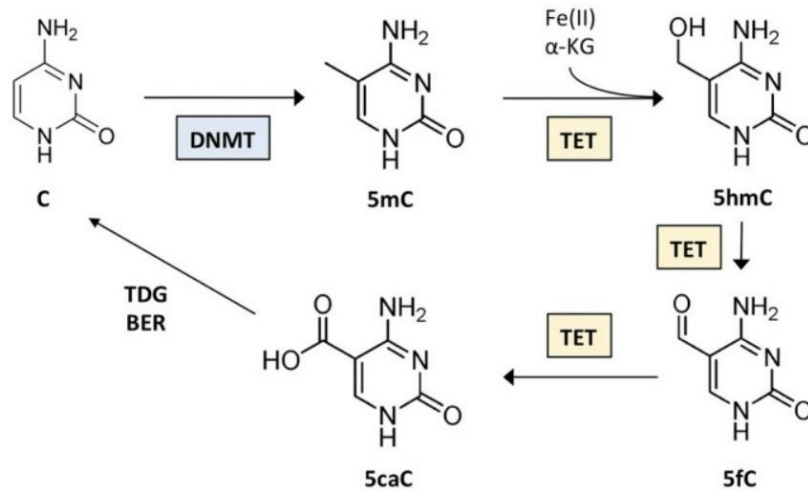
Tablo 1. DSÖ AML sınıflandırması (79).

Tekrarlayan genetik anomalileri olan AML
Myelodisplazi ile ilgili değişikliklere sahip AML
Terapi ile ilişkili AML
AML, sınıflandırılmayan grup
Myeloid Sarkom
Down sendromu ile ilgili myeloid proliferasyon

2.4. TET2

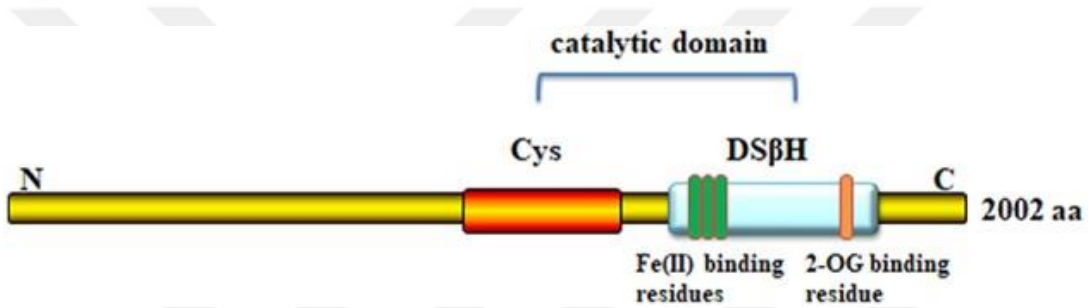
TET protein ailesi TET1, TET2 ve TET3 olmak üzere üç üyeden oluşmaktadır (85). TET proteinleri isimlerini AML'de sıklıkla görülen 10 ve 11. kromozomları arasındaki translokasyondan (t (10; 11) (q22; q23)) almışlardır. Bu translokasyon, kromozom 10'da bulunan MLL1 (mixed-lineage leukaemia 1) genini, kromozom 11'deki TET1 geni ile birleştirir (86,87). TET ailesinin ilk tanımlanan geni olan TET1, AML ve akut lenfositik lösemi (ALL) vakalarında füzyon düzenleyici görevi görür. Diğer iki TET genleri, TET2 ve TET3, TET1'in dizi homolojisine dayanarak tanımlanmıştır (88,89).

TET2 böbrek hücreleri, beyin hücreleri ve hematopoetik sistemde eksprese edilir (90). 4. kromozomun uzun kolunda (4q24) bulunan TET2 geni, 134 kB boyutundadır ve 11 ekson içerir. Alternatif kırılma yoluyla üretilen üç TET2 izoformu vardır. En uzun TET2 formu 2002 amino asitlik bir zincirden oluşmaktadır (91). TET2 proteini, 5-metilsitozini (5-mC) 5-hidroksimetilsitozine (5-hmC) oksitleyen Fe (II)- ve α -ketoglutarat (α -KG) bağımlı bir dioksijenazdır ve aktif DNA demetilasyonunda görev alır (92). DNA metiltransferazlar (DNMT) tarafından metillenmiş sitozinler, TET'ler tarafından sırasıyla 5-hidroksimetilsitozin (5-hmC), 5-formilsitozine (5-fC) ve 5-karboksilsitozine (5-caC) oksitlenir. Daha sonra 5-caC, timin DNA glikosilaz (TDG) aracılı baz eksizyon onarımı (BER) yolu tarafından tekrar metillenmemiş sitozine dönüştürülür (Şekil 9) (93).



Şekil 9. TET'ler tarafından DNA demetilasyonunun düzenlenmesi (93).

TET proteinlerinin karboksil (C)-terminali, 5-metilsitosine (5-mC) karşı oksidasyon aktivitesi gösteren katalitik çift sarmallı β -sarmal dioksijenaz (DSBH) alanını barındırır (Şekil 10). Bu alan, katalitik işlevleri için kritik olarak gerekli olan α -ketoglutarat (α -KG) ve Fe (II) için bağlanma bölgeleri içerir. TET dioksijenazları, aktiviteleri için oksijen, α -KG ve Fe (II) gerektirir. TET, enzime bağlı Fe (IV) -okso üreten ve ardından 5-mC'yi 5-hmC'ye dönüştüren α -KG'nin oksidatif dekarboksilasyonunu katalize etmek için bir substrat olarak moleküler oksijen kullanır. TET proteinlerinin ortasında, çift sarmallı β -sarmal dioksijenaz alanından hemen önce sistein (Cys) açısından zengin bir alan bulunur (89,94,95).



Şekil 10. TET2 proteininin etki alanı yapısı (94). C-terminal çekirdek katalitik alanı, sistein (Cys) bakımından zengin bir alandan ve her biri üç Fe bağlayıcı alan ve 2-oksooglutarat bağlanması için bir alan içeren çift sarmallı β -sarmal katlama alanından (DSBH alanı) oluşur.

TET proteinleri, gen transkripsiyonunun epigenetik düzenlenmesi, embriyonik gelişim, kök hücre fonksiyonu ve kanser dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde rol oynar (87). TET2 geni, miyeloid ve lenfoid kanser dahil olmak üzere çeşitli hematopoietik kanserlerde sık sık somatik mutasyonlara maruz kalır (88). Hematolojik malignitelerde TET2'nin tekrarlayan mutasyonu ilk olarak 2009'da 4q24 kromozomal bölgenin delesyonu veya uniparental dizomisi olan MDS hastalarında rapor edilmiştir (96). Daha sonra miyelodisplastik sendromlar (MDS), miyeloproliferatif neoplazmalar (MPN), kronik miyelomonositik lösemi (CMML) ve AML hastalarında TET2 geninde mutasyonlar ve delesyonlar keşfedilmiştir (89,97,98). TET2 mutasyonlarının sıklığı, CMML'de ~%50, MDS'de ~%30 ve AML'de ~%10'dur. Bu tür TET2 fonksiyon kaybı mutasyonları, DNA hipermetilasyon fenotipi, tümör ilerlemesi ve kötü prognoz ile ilişkilidir (99–101). TET2 mutasyonları sıklıkla MPN veya MDS'nin sekonder AML'ye

ilerlemesi sırasında edinilir ve AML'li hastalarda daha kısa genel sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (95,102,103). Fonksiyon kaybına neden olan anlamsız veya çerçeve kayması mutasyonlarının genellikle katalitik alandan önce (ve bazen de içinde) meydana geldiği, yanlış anlamlı mutasyonların ve çerçeve içi delesyonların ise katalitik alan içinde meydana geldiği bilinmektedir (101).

TET2, hematopoietik kök/progenitör hücrelerde yüksek oranda eksprese edilir ve kök hücrelerin kendini yenilemesi, monositlerin terminal farklılaşmasını gibi hematopoezde önemli rolleri vardır. Birincil kemik iliği hücrelerinde TET2'nin delesyonu, olgunlaşmamış c-Kit⁺Lin⁻ hücrelerinin yüzdesini arttırmaktadır, bu durum TET2 fonksiyon kaybının kök/progenitör hücre farklılaşmasını etkilediğini göstermektedir (94). RNA interferansı (RNAi) aracılı TET2 susturma, kordon kanı CD34⁺ hücrelerinde 5hmC seviyelerini azaltır ve granülo-monositik soylara doğru progenitör farklılaşmayı desteklemektedir (88).

TET2, yaygın olarak bir tümör baskılayıcı gen olarak kabul edilmiştir. TET1-3, hematopoietik sistemlerde eksprese edilir; ancak tek başına TET2 delesyonu, genomik DNA'da önemli bir 5hmC kaybına neden olur ve farelerde miyeloid ve lenfoid malignitelere neden olmak için yeterlidir. Hematopoietik malignitelere 5hmC kaybı, bozulmuş TET aracılı DNA demetilasyonunun tümörjenezde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (94,95). Birkaç çalışma, farelerde TET2 fonksiyon kaybını modellemiştir. TET2 eksikliği olan farelerin önemli bir kısmı, dolaşımda artan beyaz kan hücreleri, monositoz ve splenomegali ile karakterize CMML benzeri bir hastalık geliştirmiştir (98). TET2 ile mutasyona uğramış bir AML fare modeli üzerinde yapılan bir araştırmada, prelösemik hücrelerde TET2 fonksiyonunun kaybının güçlendiriciye özgü hipermetilasyon ile sonuçlandığını bulunmuştur. Fare embriyonik kök hücrelerinde ve insan kronik miyelomonositik lösemi hücrelerinde de benzer sonuçlar bulunmuştur (104). TET2 ekspresyon bozukluğu granülosit-monosit progenitör (GMP) ve embriyonik kök hücrelerde güçlendiricilerin DNA hipermetilasyonu ile sonuçlanır (88). TET2 hipermetilasyonu olan AML hastalarında ise, TET2 ekspresyonunda azalmaya olduğu gösterilmiştir (105).

Sonuç olarak, tümörlerde anormal DNA metilasyonu, tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına yol açarak maligniteye katkıda bulunabilir. TET genlerinin ekspresyonunda azalma ve sonuçta ortaya çıkan 5hmC kaybı, lösemi, meme kanseri,

kolorektal kanser, melanom ve akciğer kanseri dahil olmak üzere birçok insan kanserinde bulunmuş olup, bu gen ailesinin, normal hücresel fonksiyonun korunması için DNA metilasyonunu düzenlemede kritik bir rolü olduğunu öne sürmektedir (106).



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereç

3.1.1. Kimyasallar

Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Ürün	Marka
Fetal Bovin Serum	Gibco
Penisilin/Streptomisin	Gibco
L-glutamin	Gibco
RPMI 1640 w/o L-glutamin, glikoz	PAN
RPMI 1640 w/o L-glutamin	Gibco
Glikoz	Merck
DMSO	BioShop
Oligomycin Complex	Cayman
Dubleco's PBS (w/o Mg^{+2}/Ca^{+2})	Gibco
FuGENE HD Transfeksiyon ajanı	Promega
Etanol (C_2H_5O)	İsolab
İzopropanol (C_3H_8O)	Merck
Metanol	Merck
Tris Baz	Roche
Glisin	Sigma
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Fisher Bioreagents
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck
Tris	Roche
Tween 20	Sigma
Süt Tozu (yağsız)	Enka
CAPS	Sigma
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck

Gliserol	Fisher Bioreagents
2-merkaptotanol	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Bromfenol Mavisi	Sigma
PowerUp SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
Hidroklorik asit (HCl)	Merck
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Sigma
HEPES	Sigma
Nonil Fenoksipolietoksietanol (NP40)	Sigma
BSA	Merck
SureCast APS	Invitrogen
SureCast Stacking Buffer	Invitrogen
SureCast Resolving Buffer	Invitrogen
SureCast Acrylamide Solution (%40)	Invitrogen
SureCast TEMED	Invitrogen
cOmplete, Mini, EDTA-free Proteaz Inhibitor Cocktail	Roche
cOmplete, Mini, EDTA-free Fosfataz Inhibitor Cocktail	Roche
GLUL (D203F) Rabbit mAb	Cell Signalling Technology
AMPK-alpha (D5A2) Rabbit mAb	Cell Signalling Technology
P-AMPK-alpha (T172) (40H9) Rabbit mAb	Cell Signalling Technology
Beta-Actin (8H10D10 Mouse mAb	Cell Signalling Technology
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signalling Technology
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signalling Technology

3.1.2. Kitler

Tablo 3. Çalışmada kullanılan kitler

SureSilencing shRNA Plasmids	Qiagen
CellTiter GLO Luminescent Reagent	Promega
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
RNeasy Plus Mini Kit (50)	Qiagen
High-Capacity RNA-to-Cdna Kit (50)	Applied Biosystems

3.1.3. Cihazlar

Tablo 4. Çalışmada kullanılan cihazlar

Distile Su Cihazı	Millipore Elix
Real-Time PCR cihazı	Qiagen Rotor Q
Nanodrop	Denovix DS-11
Thermal Cycler	BioRad
Kar-Buz makinesi	Brema
Laminer Flow Kabin Class II	Thermo Scientific
CO ₂ İnkübatör	Thermo Scientific
İnkübatör	Memmert
Otoklav	VWR
Mikrotüp Santrifüj	Thermo Scientific
Santrifüj	Beckman Coulter
İnvert Mikroskop	Zeiss
Derin dondurucu -86°	Thermo Scientific
No frost Buzdolabı (+4,-20)	Beko

Elektroforez Güç Kaynağı	Biorad
Xcell Surelock™ Mini-Cell Elektroforez Sistemi	Thermo Scientific
Çalkalayıcı	VWR
Orbital Çalkalayıcı	VWR
pH Metre	Thermo Scientific
Tartı	SHIMADZU
Manyetik Karıştırıcı	IKA
Su banyosu	Nuve
Vortex	Wisd Laboratory Instruments
Isıtıcı Blok	BioSan
Isıtıcı Shaker	Grant-Bio
Poşet Kapatıcı (Sealer)	Brother
Jel Görüntüleme Sistemi	Azure Biosystems
PipetAİd	Eppendorf
Micropipet	Gibson

3.1.4. Sarf Malzemeler

Tablo 5. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Nitroselüloz Membran- 0.45	Millipore
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Mikro Santrifüj Tüpleri (1.5, 2 ml)	Axygen
Whatmann Kağıtları	BioRad
Well Plate (6, 12, 96)	SPL Life Science
Serolojik Pipetler (5, 10, 25 ml)	SPL Life Science
Mikropipet Uçları	Axygen
Falkon Tüpler (15, 50 ml)	SPL Life Science

Petri Kapları (100mm)	Greiner
Hücre Kültür Flaskaları (T25)	SPL Life Science
Pudrasız Eldiven (S)	Dolphin
Kriyojenik tüp (2ml)	Axygen
Tekli pcr tüpleri	Axygen

3.1.5. Solüsyonlar

3.1.5.1. Western Blot Solüsyonları

a) 5X Protein Yükleme Tamponu (45 ml, pH 6.8)

Tablo 6. 5X Protein yükleme tamponu bileşenleri.

	Miktar
%20 SDS	22.5 ml
2-merkaptoetanol	11.25 ml
Gliserol	11.25 ml
Tris-HCl	1.68 g
Bromofenol mavisi	0.025 g

22.5 ml %20 SDS hazırlamak için 4.5 g SDS 22.5 ml dH₂O içerisinde çözüldü. 22.5 ml %20 SDS içerisinde 11.25 ml 2-merkaptoetanol, 11.25 ml gliserol ve 1.68 g Tris-HCl çözüldü. pH 6.8'e ayarlandı. pH ayarlandıktan sonra 0.025 g bromofenol mavisi eklendi. Solüsyon 0.45 µm filtreden geçirildikten sonra 2 ml mikro santrifüj tüplere alikotlanarak -20 °C saklandı.

b) % 10 NP40 (200 ml)

20 ml NP40 200ml dH₂O içerisinde 42 °C su banyosunda çözüldü.

c) 0,5 M HEPES (500 ml, pH 7.4)

59.575 g HEPES 350 ml dH₂O içerisinde çözöldü. pH 7.4'e ayarlandı. Son hacim dH₂O ile 500 ml'ye tamamlandı.

d) Protein İzolasyonu Lizis Solüsyonu (500 ml)

Tablo 7. Protein izolasyonu lizis tamponu bileşenleri.

		Final Konsantrasyonu
HEPES (0.5 M)	50 ml	50mM
2M NaCl	75 ml	150 mM
% 10 NP40	50 ml	% 1
% 10 SDS	5 ml	% 0.1
0,5 M EDTA	2 ml	2 mM

e) 10X SDS; Jel Yürütme Solüsyonu (1 L)

300 g Tris baz, 1440 g Glisin ve 100 g SDS 500 ml dH₂O içerisinde çözöldü. Son hacim dH₂O ile 1 L'ye tamamlandı.

f) 10X TBS-T; Membran Yıkama Solüsyonu (1 L, pH 7.6)

1.37 M 80.063 g NaCl, 200mM 25.06 g Tris HCl, 4.954 g Tris Baz ve %1 10 ml Tween-20 700ml dH₂O'da çözöldü. pH 7.6'ya ayarlandı. Son hacim dH₂O ile 1 L'ye tamamlandı.

g) Transfer Solüsyonu (2 L)

6 adet NaCl tableti ve 4.42 g CAPS 1.5 L dH₂O'da çözöldü. Hazırlanan solüsyona 200 ml etanol eklendi. Son hacim dH₂O ile 2 L'ye tamamlandı.

h) %5 Süt Tozu veya BSA içeren TBS-T; Bloklama Solüsyonu

5 g BSA veya süt tozu 100 ml 1X TBS-T içerisinde çözöldü, 4 °C'de saklandı. Fosforile antikorla muamele edilecek membranları bloklamak için BSA, diğerleri için süt tozu ile hazırlanan solüsyon kullanıldı.

i) %0.1 PBS-T; Antikor Hazırlama Solüsyonu

Fosforile antikoru ekleneyeği solüsyon için 3 ml 1X PBS solüsyonunun içine 3 µl Tween-20 eklendi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan insan lösemi hücre hattı HL-60 hücreleri %10 FBS (Sigma), %1 penisilin/streptomisin (Sigma), %1 L-glutamin içeren RPMI 1640 (Gibco) besiyerine ekilerek 37 °C’de %5 CO₂’li inkübatörde çoğaltıldı.

3.2.1.1. Düşük Glutaminli Hücre Kültürü

Tablo 8. Düşük glutaminli RPMI 1640 besiyerinin hazırlanması.

Düşük Glutaminli RPMI 1640	Normal Glutaminli RPMI 1640
RPMI 1640 besiyeri (glikoz ve glutamin içermeyen)	RPMI 1640 besiyeri (glikoz ve glutamin içermeyen)
%10 FBS	%10 FBS
%1 Pen/strep	% Pen/strep
-	2 mM Glutamin
10 mM Glikoz (1M stok solüsyon)	10 mM Glikoz (1M stok solüsyon)

3.2.1.2. Hücre Sayımı

TET2 geni baskılanmış HL-60 lösemi hücre hatlarının düşük ve yüksek glutaminli besiyerlerinde hücre proliferasyonunu gözlemlemek için manuel olarak Thoma lamı ile hücre sayımı yapıldı. Hücrelerden sayım için homojen şekilde 50 µl alınarak 20 µl Thoma lamına yüklenerek sayıldı. Alınan partikül sayısından mililitredeki hücre sayısı aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\text{Hücre sayısı (ml)} = \text{Sayılan partikül sayısı} \times 10^4 \times (\text{dilüsyon kat sayısı})$$

3.2.1.3. Hücre Canlılık Deneyi: ATP seviyesinin ölçülmesi

Hücre canlılık deneyinde CellTiter GLO Luminescent Reagent (Promega) kiti kullanıldı. 25000 hücre/ml hücre süspansiyonu deneye uygun besiyeri içerisinde hazırlandı. 100 µL hücre süspansiyonu çok kanallı pipet yardımıyla beyaz opak duvarlı 96 kuyucuklu plate içine ekildi. Hücre süspansiyonu kuyucuklara dağıtıldıktan sonra üzerlerine uygun besiyerinden 100 µL eklendi. Plate 4 gün boyunca 37°C’de, %5 CO₂’li etüvde inkübe

edildi. Deney süresi sonunda plate inkübatörden alınarak üzerlerine 40 µL CellTiter Glo solüsyonu multichannel pipet yardımıyla ilave edildi. Plate çalkalayıcıda 2 dk oda ısısında 300 rpm’de çalkalandı. 10 dk oda ısısında bekletildikten sonra lüminasans değerleri optik okuyucu da okutuldu. Her bir hücre hattı için her bir deney grubu üç kere çalışıldı. Microsoft Office Excel programında üçlü kontrol grubunun ortalamaları alınarak diğer grupların lüminasans değerleri bu değere bölünerek, rölatif canlılık değerleri hesaplandı ve grafikleri GraphPad Prism version9 (GraphPAD software inc, ABD) grafik programında çizildi.

3.2.2. HL-60 Hücre Hattında TET2 Ekspresyonunun shRNA Aracılı Plazmidlerle Baskılanması

HL60 hücre hattında TET2 ekspresyonunu baskılamak için SureSilencing shRNA Plasmid (Qiagen) kiti kullanılarak kitin önerdiği protokole göre yapıldı. Kit içerisindeki 4 adet (klon 1 TET2, klon 2 TET2, klon 3 TET2, klon 4 TET2) SureSilencing TET2 shRNA plazmidleri kimyasal olarak kompetan hale getirilmiş DH5α suşuna transforme edildi.

- -80 °C’de alikot olarak saklanan 50 mL kompetan hücre DH5α buz üzerinde çözüldü.
- 50 µL plazmid 50 mL kompetan hücre DH5α içerisine konuldu.
- 42 °C’de 30 sn inkübe edilerek ısı şoku yapıldı.
- Tüp tekrar buza konuldu ve buz üzerinde 2 dk bekletildikten sonra içerisine 300 µL SOC besiyeri ilave edildi.
- Çalkalayıcı üzerinde 37 °C’de 1 saat inkübe edildi (recovery aşaması).
- İnkübasyon sonrası 50 µL bakteri 1:1000 ampisilin içeren LB-Agar plate’lere ekildi.
- Platelere 37 °C’de bir gece inkübe edildi.
- Ertesi gün plateler kontrol edildi. Transformasyonu başarılı olan, koloni oluşturmuş her plateden tek koloni seçildi. NucleoSpin Plasmid Miniprep (Macherey-Nagel) kiti kullanarak plazmid izolasyonu yapıldı.

3.2.3. MiniPrep Kit ile Plazmid İzolasyonu

3.2.3.1. Tek Koloni Süspansiyonu Hazırlanması

Petrilerden tek koloniler 10 µL pipet ucu ile alınarak 1:1000 ampisilin içeren 4 mL LB besiyerine alındı. Tüpler 37 °C'ye 250 rpm çalkalayıcı da bir gece bırakıldı.

3.2.3.2. Plazmid İzolasyonu

Tek koloni süspansiyonlarından plazmid izolasyonu NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit (Macherey-Nagel) kullanılarak, aşağıdaki protokole göre yapıldı.

- 15 ml falkon içerisinde çoğalan bakteri süspansiyonu 4000 g'de 10 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı. Pelet üzerine 250 µL Buffer A1 ilave edildi ve pelet pipetaj yapılarak resüspanse edildi. Daha sonra, bakteri süspansiyonu 15 ml falkondan 1.5 ml mikrosantrifüj tüpe alındı.
- 250 µL Buffer A2 ilave edildi ve tüp yaklaşık 6 kez yavaşça aşağı yukarı çevrilerek karıştırıldı. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 300 µL Buffer A3 ilave edildi ve tüp 6 kez aşağı yukarı çevrilerek karıştırıldı.
- 11000 g'de 10 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant kit ile gelen kolona transfer edildi. Kolon 11000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Toplama tüpünde biriken atık döküldü. Kolona yıkama amaçlı önceden 50 °C'de ısıtılmış 500 µL Buffer AW konuldu. Kolon 11000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Toplama tüpünde biriken atık döküldü. Kolona 600 µL içerisine önceden 24 mL etanol ilave edilmiş olan Buffer A4 konuldu. Kolon 11000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Toplama tüpünde biriken atık döküldü. Kolon yeni bir toplama tüpüne transfer edildi. Kolonun kuruması için 11000 g'de 2 dk santrifüj edildi.
- Kolon 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi. Üzerine 50 µL Buffer AE (Elüsyon Buffer) konuldu. 1 dk oda sıcaklığında bekletildi. 11000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolon atıldı, mikrosantrifüj tüpünde biriken plazmid konsantrasyonu nanodrop'ta ölçüldü.

3.2.4. Transfeksiyon

Miniprepi yapılan 4 adet SureSilencing TET2 shRNA (Qiagen) plazmidleri, FuGENE HD transfeksiyon ajanı (Promega) kullanılarak üreticinin önerdiği protokole göre HL-60 hücrelerine transfeke edildi.

24 well plate'in 5 kuyusuna 5×10^4 hücre ekildi ve bir gece 37 °C, %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Ertesi gün son hacim besiyeri ile 500 µL'ye tamamlanacak şekilde, mikrosantrifüj tüpüne 0.5 µg plazmid ve 1.5 µg transfeksiyon reaktifi FuGENE HD (1: 3 oranı) eklendi ve karışım 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra hücrelere transfeke edildi. Hücreler tekrar inkübatöre konuldu. Transfeksiyondan sonraki gün hücrelerin besiyeri değiştirildi. Transfeksiyonun ikinci gününde besiyeri tekrar değiştirildi ve hücrelere 1:1000 oranında puromisin eklenerek antibiyotik seleksiyonu başlatıldı. 3 gün sonra besiyeri değiştirildi ve TET2 down-regülasyonu qPCR ile doğrulandı.

3.2.5. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR):

Glutamin metabolizmasında rol alan GLUL, GLUD1, GLS1, GLS2, SLC38A1 ve SLC238A2 gen ekspresyonları, düşük glutaminli ve normal glutaminli besiyerlerinde çoğaltılan HL-60 hücre hattında ve TET2 geni baskılanmış HL-60 hücre hatlarında Real-Time PCR ile kontrol edildi. Kontrol için house-keeping gen olarak RPLP0 kullanıldı.

3.2.5.1. RNA İzolasyonu

HL-60, HL-60 Tet2 ShRNA1, HL-60 Tet2 ShRNA3 ve HL-60 Tet2 ShRNA4 hücre hatlarından RNA izolasyonu Qiagen RNeasy Plus Mini Kit'in protokolüne uygun yapıldı.

- Hücreler toplandı ve 1250 rpm'de 5dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra atık besiyeri uzaklaştırıldı. Pellet PBS ile süspanse edildikten sonra 1250 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve atık PBS tamamen uzaklaştırıldı.
- Pelletin üzerine 350 µl RLT lizis buffer ve 350 µl %70 Etanol eklendi. Yavaşça birkaç defa pipetaj yapılarak pellet çözüldü.
- Süspansiyon kit ile verilen altında toplama tüpleri bulunan kolonlara transfer edildi. 9000 g'de 15 sn santrifüj edildi.
- Kolonlar yeni toplama tüplerine transfer edildikten sonra üzerlerine 700 µl RW1 wash buffer eklendi. 9000 g'de 15 sn santrifüj edildi.

- Toplama tüplerindeki sıvı atık uzaklaştırıldı. Kolonlar tekrar aynı toplama tüplerine yerleştirildi ve üzerine 500 µl RPE buffer eklendi. 9000 g'de 15 sn santrifüj edildi.
- Toplama tüplerindeki sıvı atık uzaklaştırıldı. Kolonlar tekrar aynı toplama tüplerine yerleştirildi ve üzerine ikinci kez 500 µl RPE buffer eklendi. 9000 g'de 2 dk santrifüj edildi.
- Toplama tüplerindeki sıvı atık uzaklaştırıldı. Kolonlar yeni toplama tüpüne yerleştirilerek membranın kuruması için 14000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Kolonlar RNase-free mikrosantrifüj tüplere transfer edilerek üzerine 30 µl RNase-free su konuldu ve 9000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra içerisinde RNA bulunan eppendorflar buz üzerine alındı ve konsantrasyonları nanodropla ölçüldü. Elde edilen RNA'lar daha sonra cDNA sentezinde kullanıldıktan sonra -80°C' ye kaldırıldı.

3.2.5.2. cDNA Sentezi

RNA örneklerinden cDNA sentezi için High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) kiti ile Biorad Thermal Cycler cihazı kullanıldı. Reaksiyon, kit protokolüne uygun gerçekleştirildi. Bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.

Tablo 9. High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) protokolü

Karışım Bileşenleri	1X (Hacim)
2X RT Buffer Mix	10µl
20X RT Enzyme Mix	1 µl
RNA Örneği	(1 µg/µl olacak şekilde hesaplama yapıldı.)
Nükleaz içermeyen su	(Total hacim 20µl olacak şekilde ayarlandı.)

Son hacmi 20 µl RNA örnekleri Thermal Cycler'da önce 37°C' de 60 dk, sonra 95°C 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon tamamlanınca cDNA'lar 1:8 oranında nükleaz içermeyen su ile sulandırıldı. cDNA'lar qRT-PCR için kullanılmak üzere -20°C' ye kaldırıldı.

qRT-PCR reaksiyonu PowerUp SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) ile Qiagen Rotor Gene Q cihazı kullanılarak yapıldı. Çalışmada kullanılan primerler Tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 10. qRT-PCR için kullanılan PowerUp SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) protokolü.

qRT-PCR Karışım Bileşenleri	1X (Hacim)
PowerUp SYBR® Green PCR Master Mix	10 µl
Primer Forward (10 µM)	0,5 µl
Primer Reverse (10 µM)	0,5 µl
cDNA	2 µl
dH ₂ O	7 µl
Total	20 µl

Tablo 11. qRT-PCR Koşulları

qRT PCR Koşulları		
Başlangıç denatürasyonu	95°C 10 dk	
Denatürasyon	95°C 15 sn	} 40 Döngü
Bağlanma	60°C 60 sn	
Sentez	72°C 15 sn	
Bekleme	4°C ∞	

Tablo 12. qRT-PCR primer listesi

Gen	Primer Yönü (5'3')	Primer Dizisi
RPLP0	Forward	AGCATCTACAACCCTGAAGTG
	Reverse	AGCAAGTGGGAAGGTGTAATC
GLUL	Forward	TGGGAAGTGGGAATGGTGC
	Reverse	CGTTGATGTTGGAGGTTTCATG
GLUD1	Forward	CTGTTGGTGAGTCTGATGGG
	Reverse	TCTGGGTGCGTTGGATTTC
GLS1	Forward	GAAAGAGTACTGAGCCCTGAAG
	Reverse	GTTGCCCATCTTATCCAGAGG
GLS2	Forward	TGTGGATCGCATCTTTGAGG
	Reverse	TGGAGATGGCATAGGTGAGG

SLC38A1	Forward	CATTATGGGCAGTGGGATTTTG
	Reverse	AGGTGGCTCCAAAGATTACG
SLC38A2	Forward	GTTCTGTTGGTGTTCATTGGTG
	Reverse	TGTTGGCTGTGTTAAGGTGG

3.2.6. Western Blot

Qiagen SureSlicing shRNA plazmidleri kullanılarak HL-60 hücre hattında TET2 geni baskılanan hücre klonlarında GLUL, AMPK-alpha ve P-AMPK-alpha proteinlerinin ekspresyonları western blot yöntemi ile kontrol edildi.

3.2.6.1. Hücre Hatlarından Protein İzolasyonu

5 ml lizis solüsyonu içerisine yarım tablet PhosStop (Roche, USA) ve yarım tablet complete EDTA-free proteaz inhibitör kokteyl tableti eklendi. Solüsyon soğuk odada (+ 4 °C) falkon çeviriciye konuldu ve tabletler tamamen çözülünceye kadar beklendi.

- Süspansiyon hücreler 15 ml falkona toplandı. 1250 rpm’de 5 dk + 4 °C’de santrifüj edildi. Besiyeri atığı uzaklaştırıldı.
- Pellet buzda soğutulmuş 500 µL PBS ile resüspanse edilip eppendorf tüplere alındı. 1250 rpm’de 5 dk + 4 °C’de santrifüj edildi. PBS pelleti bozmadan ortamdan uzaklaştırıldı.
- Pelletin üzerine 200 µL (100000-300000 hücre için) lizis solüsyonu eklenip birkaç kez pipetlendi. Lizis için 10 dk buzda bekletildi.

3.2.6.2. Protein Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

Protein konsantrasyonları Bicinchoninic Acid (BCA) Assay kit (Pierce BCA kit, ThermoScientific) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol uygulanarak ölçüldü. BCA solüsyonu örnek sayısına göre gereken miktarda Reagent A ile Reagent B’nin 50:1 oranında karıştırılması ile elde edildi (2 ml için; 2 ml Reagent A, 40 µL Reagent B). Kit ile gelen 2 mg/ml albüminden sırasıyla 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 ve 0 (blank) µg/ml dilüsyonlar hazırlandı. 96 kuyucuklu platelere konsantrasyonu belirlenecek lizatlardan ve albümin dilüsyonlarından 20 µL dağıtıldı. Üzerlerine 200 µL BCA

solüsyonu konuldu. Plate 37 °C’de 30 dk karanlıkta çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plate-reader’da 562 nm’de absorbanslar ölçüldü. Albümin seri dilüsyonlarının sonuçları ile standart eğrisi çizildi. Eğriden elde edilen denklem kullanılarak örneklerin protein konsantrasyonları hesaplandı. Western Blotlama için örneklerin konsantrasyonları 1000 µg/ml’ye son hacim 160 µL olacak şekilde ayarlandı. Üzerlerine 5X protein yükleme tamponundan son hacim 1X olacak şekilde 40 µL eklendi ve ısıtıcı blokta 75 °C’de 5 dk bekletildi. Proteinler -20 °C’de saklandı.

3.2.6.3. Sodyum Dodesil Sülfat– Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS- PAGE)

Arasına ayırma jelinin yükleneceği 1.0 mm’lik camlar %70 etanol ile yıkanır ve toz bırakmayan mendil ile silindi. Camlar jel kasetine takıldı ve jel dökme tablasına yerleştirildi. Taze %10’luk APS solüsyonu hazırlandı. 15ml’lik falkon tüpte 0,3 gram toz APS, 3 ml dH₂O ile çözüldü, +4 °C’de saklandı.

a) Protein örneklerinin ayrılacağı %10’luk Ayırma Jeli (Resolving Gel) hazırlanması

1. Camların yerleştirildiği kaset yatay pozisyona alındı.
2. 15 ml falkon tüpe sırasıyla 3,9 ml dH₂O, 2 ml %40 akrilamid ve 2 ml Resolving buffer eklendi ve tüp iki kez alt-üst yapıldı.
3. Daha sonra hazırlanan solüsyona önce +4 °C’den alınan APS’den 80 µL, sonra 8 µL TEMED eklendi ve tüp tekrar alt-üst yapıldı.
4. Solüsyon serolojik pipetle iki kez hızlıca pipetaj yapıldıktan sonra kasete yerleştirilen camların arasında hava kabarcığı bırakılmadan camın bir köşesinden Fill line yazısına kadar aktarıldı.
5. Camların arasına dökülen ayırma jelinin eşit dağılım göstermesini sağlamak için yığma jeli için boş bırakılan kısmın (Fill line yazısının yukarısı) üzerine Pasteur pipetle eser miktarda izopropanol damlatıldı. Kaset dik pozisyona alındı ve jelin polimerizasyonu için 20 dk bekletildi.
6. Jel donduktan sonra jelin üzerindeki izopropanol döküldü. Ortamdaki fazla izopropanolden kurtulmak için jel yüzeyi eser miktarda dH₂O ile yıkandı.

7. Jeldeki fazla dH₂O, jelin yüzeyine fazla dokunmadan kurutma kağıdıyla alındı ve kaset tekrar yatay pozisyona alındı.

b) Protein örneklerinin yükleneceği %4'lük Yükleme Jeli (Stacking Gel) hazırlanması

1. 15 ml'lik falkon tüpe sırasıyla 1,92 ml dH₂O, 0,3 ml %40 akrilamid ve 0,75 ml Stacking buffer eklendi ve iki kez alt-üst yapıldı.
2. Daha sonra hazırlanan solüsyona önce +4 °C'den alınan APS'den 30 µL, sonra 3 µL TEMED eklendi ve serolojik pipetle iki kez pipetaj yapıp camın bir köşesinden boşaltıldı.
3. Tarak eklendikten sonra akan fazla jel silindi, kaset dik pozisyona alındı ve jelin polimerizasyonu için dakika beklendi. Jel donduktan sonra taraklar çıkarıldı.

c) SDS-PAGE yürütme aşaması

Jelin polimerleşmesi tamamlandıktan sonra tarak çıkarıldı ve cam jel tablası elektroforez tankına yerleştirildi. Tank 1X SDS solüsyonu ile dolduruldu. İlk kuyucuğa 3 µL protein ladder yüklendi. Sırayla diğer kuyucuklara 15 µL protein örnekleri yüklendi. Örnekler 120 voltta 120 dk yürütüldü.

3.2.6.4. Blotlama (Islak Transfer)

Örneklerin yürüdüğü jel kaset dikkatlice kırılarak çıkartıldı ve kenarlarındaki fazlalıklar kesildi. Bir kaba hazırlanan transfer solüsyonundan döküldü. 0.45 mikron por çapına sahip PDVF membran metanol içerisinde 2 dk tutularak aktive edildi. Transfer solüsyonu dolu kaba önce tutucu kaset yerleştirildi ve tutucu kaset içerisine sırayla en alta bir sünger üzerine whatman kâğıdı, jel, membran, whatman kâğıdı ve sünger yerleştirildi, arada hiç hava kabarcığı kalmamasına özen gösterildi. Bu sırada whatman kâğıtlarının, süngerlerin, jelin, membranın ve tutucu kasetin kabın içerisindeki transfer solüsyonu ile iyice ıslatılmasına dikkat edildi. Tutucu kasetin üst kapağı kapatıldı ve bir klips ile kapakların bir arada tutulması sağlandı. Jel (-) yönde kalacak şekilde transfer tankına yerleştirildi. Tankın içerisi transfer solüsyonu ile dolduruldu ve 45 voltta 120 dk transfer yapıldı.

3.2.6.5. Membranın Bloklanması ve Proteinin İmmunokimyasal Görüntülenmesi

Transfer sonrası fosforile antikor uygulanacak membranlar %5 BSA/1X TBS-T solüsyonunda, fosforile antikor uygulanmayacak membranlar 45 dk %5 yağsız süt tozu/1X TBS-T solüsyonu içerisinde çalkalayıcı üzerinde bloklandı. Bloklanan membranlar naylon poşetlere konuldu, içerisine birincil antikor solüsyonundan (GLUL-Rabbit, AMPKalpha-Rabbit, P-AMPKalpha-Rabbit, Beta-ACTİN-mouse) döküldü ve kenarı poşet kapatıcı ile içerisinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı. Membran +4 °C’de bir gece çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası poşet bir kenardan kesilerek membran bir penset yardımıyla çıkartıldı, 1X TBS-T solüsyonunda üç kez 10’ar dk yıkandı. Son yıkamadan sonra membran vakumlu poşete konuldu, içerisine ikincil antikor solüsyonu (anti-rabbit ve anti-mouse) döküldü ve kenarı poşet kapatıcı ile dikkatlice kapatıldı. Oda ısısında çalkalayıcıda 1 saat inkübe edildi. Birincil antikor solüsyonları GLUL ve AMPK-alpha için %5 süt tozu ile 1:1000, P-AMPKalpha için %0.1 PBS-T ile 1:1000 oranında hazırlandı. Beta Actin için %5 süt tozu ile 1:2000 oranında hazırlandı. İkincil antikor solüsyonları ise %5 süt tozu ile anti-rabbit için 1:2000, anti-mouse için 1:5000 dilüsyonda kullanıldı. Sekonder antikor ile inkübasyondan sonra poşetten penset ile çıkarılan membran bir kaba alınarak çalkalayıcı üzerinde 1X TBS-T solüsyonu ile üç kez 10 dk yıkandı. Proteinlerin kemilüminasan görüntülenebilmesi için membran 1 dk hazırlanan ECL solüsyonu (Pierce ECL, ThermoScientific) ile bekletildi. Membran üzerindeki fazla ECL solüsyonu bir kenarından peçeteye değdirilerek jel görüntüle sistemindeki görüntüleme tablasına yerleştirildi. Membran cihazda 2 ile 10 dakika arasında bekletilerek görüntü alındı.

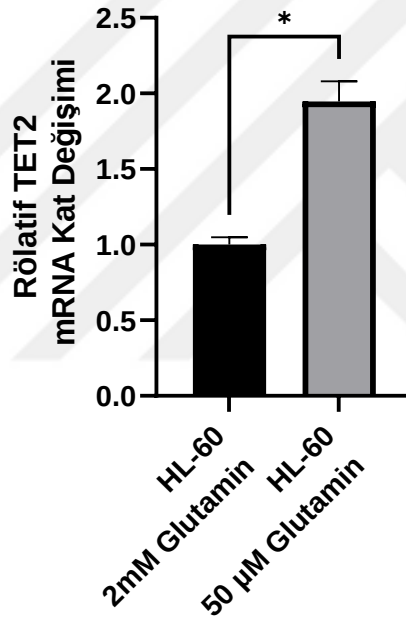
3.2.7. İstatistiksel Hesaplamalar

Elde edilen sonuçlardan her biri veri için Ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edildi. Farklı gruplar içinde ve arasında anlamlı bir fark olup olmadığını analiz etmek için Student’s t-test uygulandı. Analizler ve grafikler GraphPad PrismV9 programında yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. Düşük Glutaminli Ortamda HL-60 Hücrelerinin TET2 mRNA Ekspresyonu

HL-60 lösemi hücreleri, 2 mM (normal) ve 50 μ M (düşük) glutamin içeren besiyerinde 72 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası TET2 mRNA ekspresyonlarına qPCR yöntemiyle bakıldı. HL-60 hücrelerinin düşük glutaminli ortamda TET2 mRNA ekspresyonunu yaklaşık 2 kat arttırdığı bulundu (Şekil 11). Sonuç, istatistiksel olarak anlamlı bulundu (*p < 0.05).

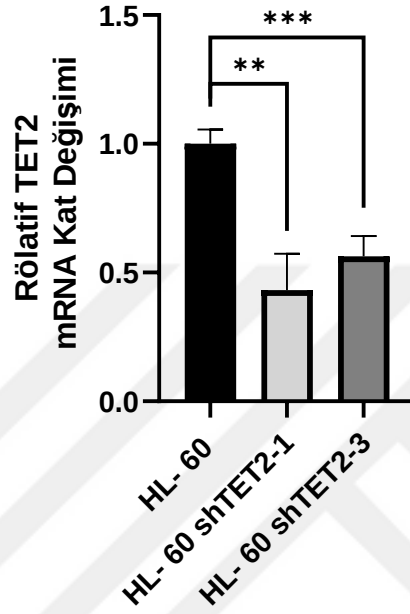


Şekil 11. HL-60 hücrelerinin düşük glutaminli besiyerinde TET2 mRNA ekspresyonu analizi. 20000 hücre/ml şeklinde 72 saat inkübe edildi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunuldu, *p < 0.05.

Şekil 11’de gösterilen veriden yola çıkılarak, HL-60 hücre hattında HL-60 hücre hattında TET2 mRNA ekspresyonu shRNA aracılığıyla baskılandı ve HL-60 shTET2 hücreleri ile glutamin metabolizması arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlandı.

HL-60 hücre hattı 4 farklı shRNA kullanılarak ayrı ayrı transfekte edildi. Toplam 4 hücre hattından (HL-60 shTET2-1, HL-60 shTET2-2, HL-60 shTET2-3 ve HL-60 shTET2-4) sadece HL-60 shTET2-1 ve HL-60 shTET2-3 hücrelerinde TET2 ekspresyonunun

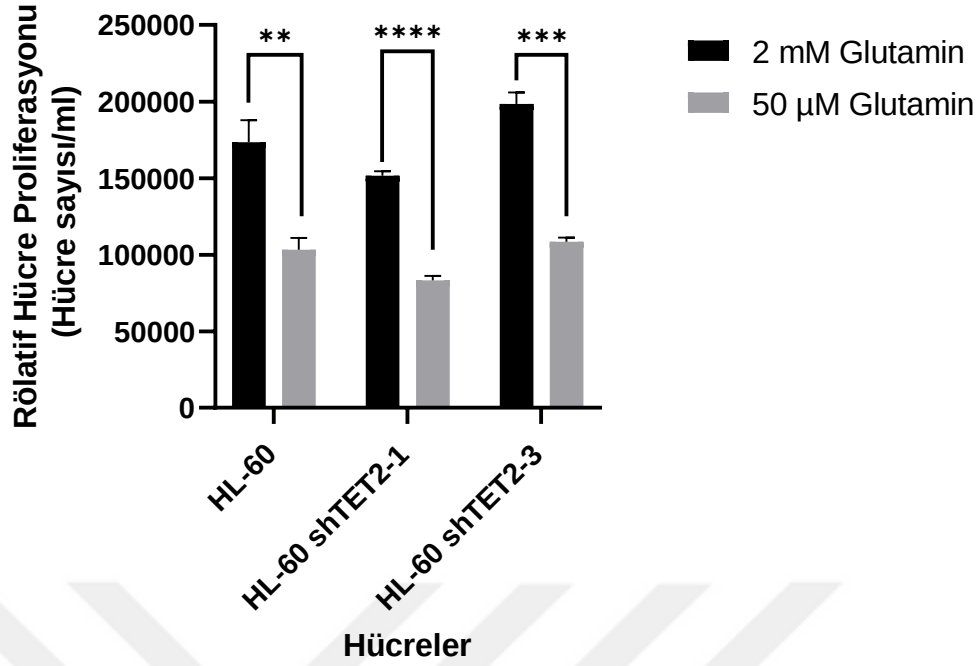
baskılandığı doğrulandı. Kontrol HL-60 hücrelerine kıyasla, HL-60 shTET2-1 ve HL-60 shTET2-3 hücrelerinde TET2 mRNA ekspresyonunu yaklaşık olarak yarım kat azaldı. HL-60 shTET2-1 hücre hattında TET2 ekspresyonun baskılanma oranı %56 iken, HL-60 shTET2-3 hücrelerinde bu oran %43 tespit edildi (Şekil 12).



Şekil 12. HL-60 hücre hattında shRNA aracılı TET2 mRNA ekspresyonunun baskılanması. Hücreler 20000 hücre/ml şeklinde 72 saat inkübe edildi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunuldu, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.2. Düşük Glutaminli Ortamda Hücre Proliferasyonu

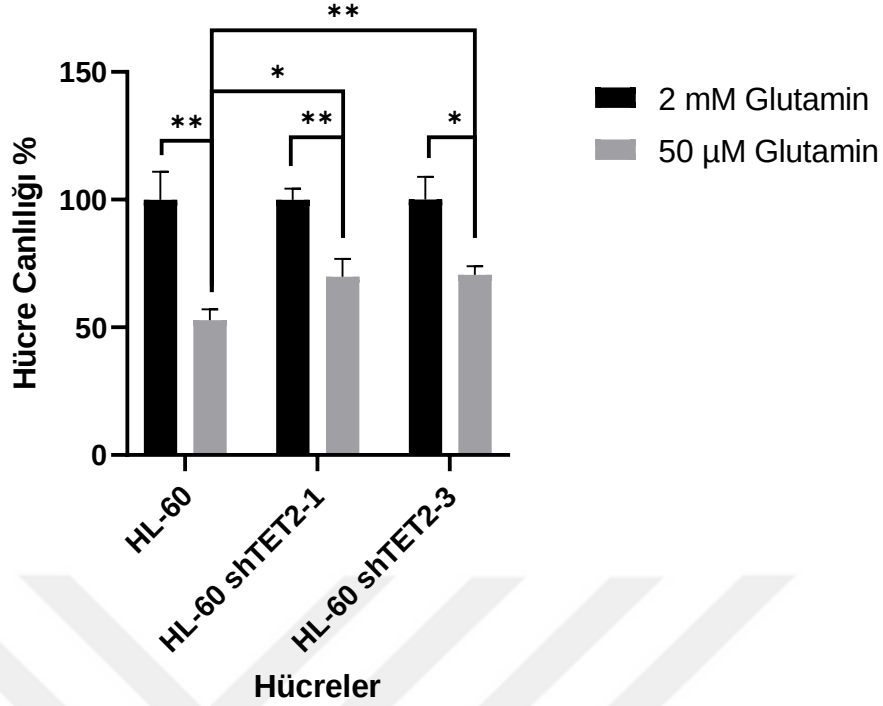
HL-60, HL-60 shTET2-1 ve HL-60 shTET2-3 hücreleri, 2 mM (normal) ve 50 μ M (düşük) glutamin içeren besiyerinde 72 saat inkübe edildi. Hücre proliferasyonları hücre sayım yöntemi ile belirlendi. Hem normal hem de düşük glutaminli ortamda HL-60 shTET2-1 hücrelerinin proliferasyonu kontrol HL-60 hücrelerine kıyasla azaldı. HL-60 shTET2-3 hücrelerinin proliferasyonu ise kontrol HL-60 hücrelerine kıyasla normal ve düşük glutaminli ortamda az miktarda arttı. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 13) (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).



Şekil 13. 2 mM (Normal) ve 50 µM (Düşük) glutamin içeren besiyerlerinde hücre proliferasyonu. Hücreler 20000 hücre/ml şeklinde 72 saat inkübe edildi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunuldu. **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

4.3. Düşük Glutaminli Ortamda Hücre Canlılığı

Düşük glutaminli ortamda HL-60 hücrelerinde canlılık oranı %100'den %52,79'a, HL-60 shTET2-1 hücrelerinde %69,81'e ve HL-60 shTET2-3 hücrelerinde %70,53'e düştüğü tespit edildi. Her üç hücre hattının düşük glutaminli ortamda hücre canlılıklarının azaldığı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (*p<0.05, **p<0.01) (Şekil 14). Bununla birlikte, düşük glutaminli ortamda TET2 ekspresyonu baskılanmış HL-60 hücrelerinde hücre canlılığının kontrol HL-60'a kıyasla daha fazla olduğu bulundu. Sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulundu (*p<0.05, **p<0.01).



Şekil 14. TET2 ekspresyonu baskılanmış HL-60 hücrelerinde düşük glutaminli ortamın hücre canlılığına etkisi. Hücreler 20000 hücre/ml şeklinde 4 gün inkübe edildi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunuldu, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

4.4. Düşük Glutaminli Ortamda GLUL, GLS1, GLS2, GLUD1, SLC38A1 ve SLC38A2 mRNA Ekspresyonları

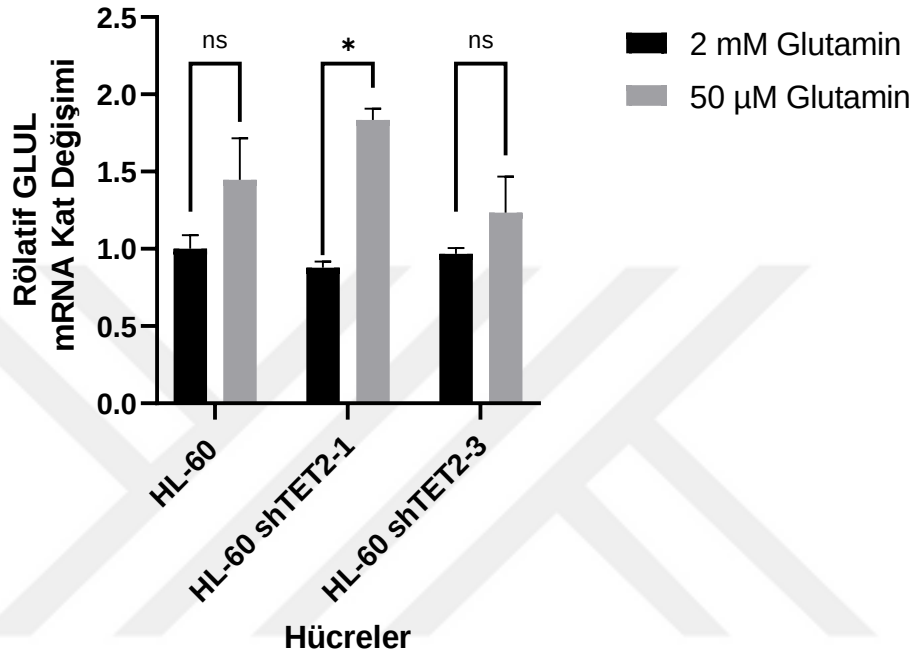
HL-60 lösemi hücre hattında TET2 geni baskılanmış hücrelerde, TET2 geni ve glutamin metabolizması arasındaki ilişkinin incelenmesi amacıyla glutamin metabolizmasında rol oynayan GLUL, GLS1, GLS2, GLUD1, SLC38A1 ve SLC38A2 genlerinin düşük glutaminli ortamdaki mRNA ekspresyon seviyeleri kantitatif Real-Time PCR ile analiz edildi.

4.4.1. GLUL mRNA Ekspresyonları

HL-60, HL-60 shTET2-1 ve HL-60 shTET2-3 hücrelerinin düşük glutaminli ortamda GLUL mRNA ekspresyonlarına qPCR yöntemiyle bakıldı (Şekil 15).

GLUL geni, glutamat ve amonyaktan glutamin sentezini katalize eden GS enzimini kodlar. Her üç hücre hattında normal glutaminli GLUL ekspresyonunda değişim

olmazken; düşük glutaminli ortamda GLUL mRNA ekspresyonunun arttığı bulundu. HL-60 shTET2-1 hücrelerinde düşük glutamindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunurken (*p <0.05), HL-60 ve HL-60 shTET2-3 hücrelerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (^{ns}p ≥ 0.05).



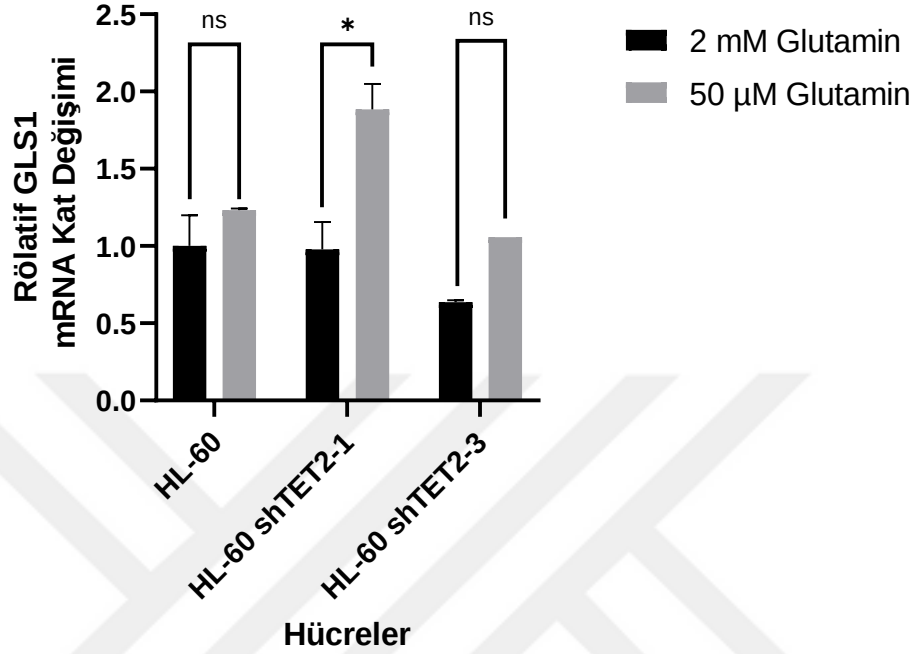
Şekil 15. Düşük glutaminli besiyerinde GLUL mRNA ekspresyonlarının analizi. Hücreler 20000 hücre/ml şeklinde 72 saat inkübe edildi. Veriler ortalama ±SD olarak sunuldu, *p <0.05, ^{ns}p ≥ 0.05.

4.4.2. GLS1 ve GLS2 mRNA Ekspresyonları

HL-60, HL-60 shTET2-1 ve HL-60 shTET2-3 hücrelerinin düşük glutaminli ortamda GLS1 ve GLS2 mRNA ekspresyonlarına qPCR yöntemiyle bakıldı (Şekil 16 ve 17). Tablo 13'te normal ve düşük glutaminli ortamda GLS2 ekspresyonunun ortalama ct değeri verilmiştir.

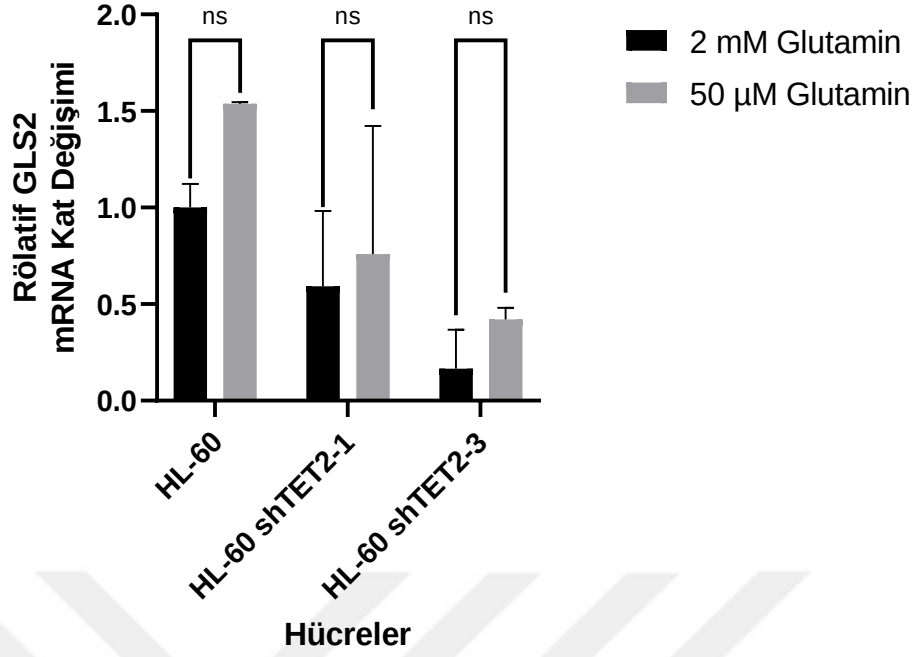
GLS1 ve GLS2 genleri, glutamini glutamat ve amonyağa hidrolize eden mitokondriyal enzimleri kodlar. Her üç hücre hattında da düşük glutaminli ortamda GLS1 mRNA ekspresyonunda artış bulundu. HL-60 ve HL-60 shTET2-3 hücrelerindeki artış istatistiksel

olarak anlamsızken ($^{ns}p \geq 0.05$), HL-60 shTET2-1 hücrelerindeki artış anlamlı bulundu ($*p < 0.05$).



Şekil 16. Düşük glutaminli besiyerinde GLS1 mRNA ekspresyonlarının analizi. Hücreler 20000 hücre/ml şeklinde 72 saat inkübe edildi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunuldu, $*p < 0.05$, $^{ns}p \geq 0.05$.

Her üç hücre hattında da düşük glutaminli ortamda GLS2 mRNA ekspresyonunun arttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ($^{ns}p \geq 0.05$). Bununla birlikte, HL-60 hücrelerinde TET2 ekspresyonu baskılandığında hem normal hem de düşük glutaminli ortamda kontrole kıyasla GLS2 mRNA ekspresyonunun azaldığı bulundu.



Şekil 17. Düşük glutaminli besiyerinde GLS2 mRNA ekspresyonlarının analizi. Hücreler 20000 hücre/ml şeklinde 72 saat inkübe edildi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunuldu, ^{ns} $p \geq 0.05$.

Tablo 13. Normal ve düşük glutaminli besiyerinde GLS2 ekspresyonunun ortalama ct değerleri.

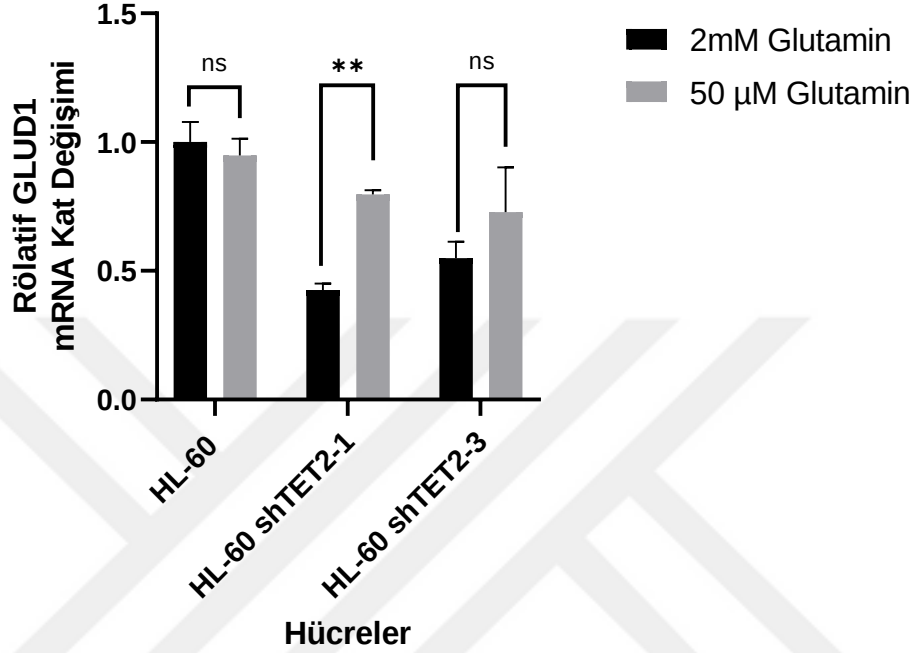
Hücre Hatları	2mM Glutamin	50µM Glutamin
HL-60 GLS2 mRNA ortalama ct değeri	29,1	29,06
HL-60 shTET2-1 GLS2 mRNA ortalama ct değeri	29,37	30,58
HL-60 shTET2-3 GLS2 mRNA ortalama ct değeri	33,88	30,22

4.4.3. GLUD1 mRNA Ekspresyonları

HL-60, HL-60 shTET2-1 ve HL-60 shTET2-3 hücrelerinin düşük glutaminli ortamda GLUD1 mRNA ekspresyonlarına qPCR yöntemiyle bakıldı (Şekil 18).

GLUD1 geni, glutamatin α -ketoglutarat ve amonyağa oksidatif deaminasyonunu katalize eden bir mitokondriyal matris enzimi olan glutamat dehidrojenazı kodlar. HL-60 hücrelerinde GLUD1 ekspresyonunda düşük glutaminde azalış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($nsp \geq 0.05$). HL-60 shTET2-1 ve HL-60 shTET2-

3 hücrelerinde ise HL-60'a zıt bir şekilde, düşük glutaminde artış bulundu. GLUD1 ekspresyon artışı HL-60 shTET2-1 için istatistiksel olarak anlamlı bulunurken (**p < 0.01), HL-60 shTET2-3 hücrelerinde anlamlı bulunmadı (^{ns}p ≥ 0.05).



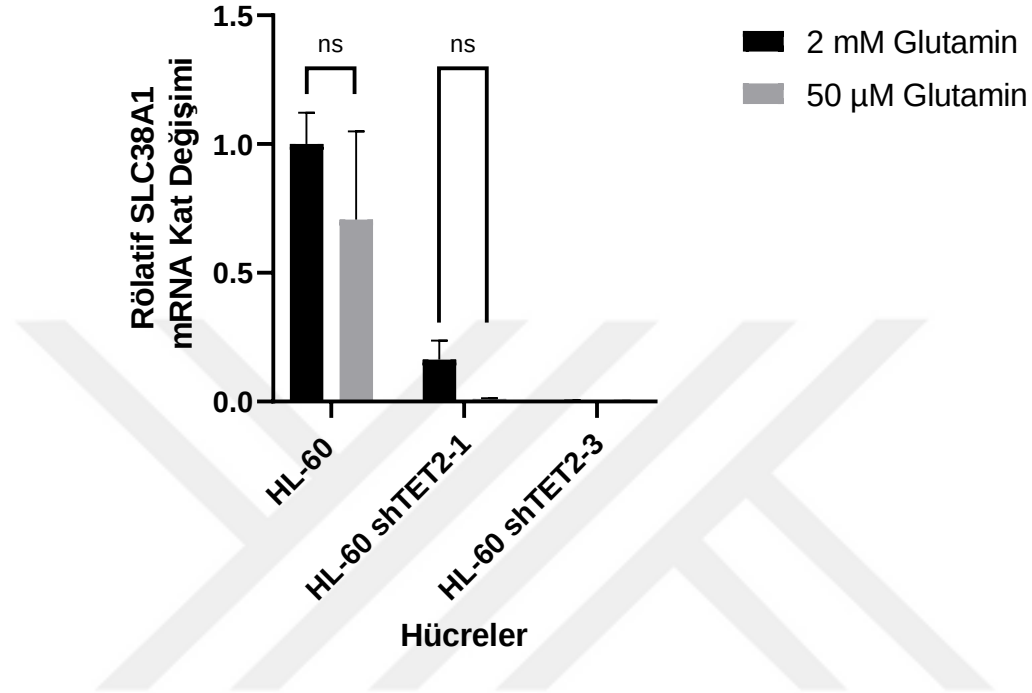
Şekil 18. Düşük glutaminli besiyerinde GLUD1 mRNA ekspresyonlarının analizi. Hücreler 20000 hücre/ml şeklinde 72 saat inkübe edildi. Veriler ortalama ±SD olarak sunuldu, **p < 0.01, ^{ns}p ≥ 0.05.

4.4.4. SLC38A1 ve SLC38A2 mRNA Ekspresyonları

HL-60, HL-60 shTET2-1 ve HL-60 shTET2-3 hücrelerinin düşük glutaminli ortamda SLC38A1 ve SLC38A2 mRNA ekspresyonlarına qPCR yöntemiyle bakıldı (Şekil 19 ve 20). Tablo 14'te normal ve düşük glutaminli besiyerinde SLC38A1 ekspresyonunun ortalama ct değeri verilmiştir.

Nötr amino asit taşıyıcıları SLC38A1 ve SLC38A2 kanser hücre hatlarında glutamin alımını sağlayarak glutaminolize aracılık ederler. HL-60 hücrelerinde SLC38A1 ekspresyonunun düşük glutaminde azaldığı bulundu. HL-60 shTET2-1 hücrelerinde ise normal glutaminli ortamda SLC38A1 ekspresyon seviyesinin kontrole kıyasla oldukça azaldığı, düşük glutaminli ortamda ise ekspresyonun yok denecek kadar az olduğu

bulundu. HL-60 shTET2-3 hücrelerinde ise her iki besiyerinde ekspresyon tespit edilmedi. Her üç hücre hattı için de ekspresyon seviyesindeki değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (^{ns}p ≥ 0.05).



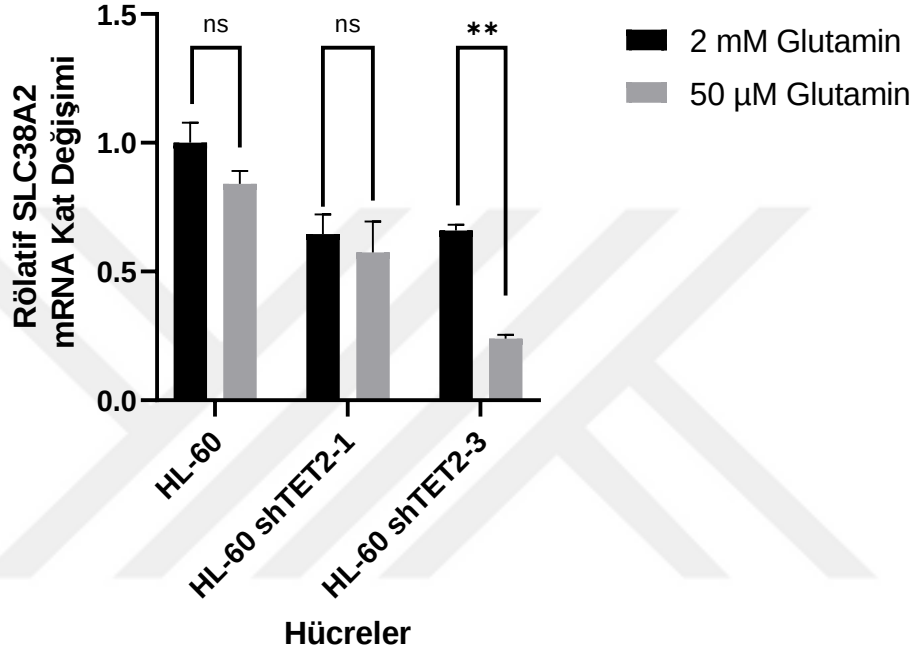
Şekil 19. Düşük glutaminli besiyerinde SLC38A1 mRNA ekspresyonlarının analizi. Hücreler 20000 hücre/ml şeklinde 72 saat inkübe edildi. Veriler ortalama ±SD olarak sunuldu, ^{ns}p ≥ 0.05.

Tablo 14. Normal ve düşük glutaminli besiyerinde SLC38A1 ekspresyonunun ortalama ct değerleri.

Hücre Hatları	2mM Glutamin	50μM Glutamin
HL-60 SLC38A1 mRNA ortalama ct değeri	26,28	27,39
HL-60 shTET2-1 SLC38A1 mRNA ortalama ct değeri	28,28	33,4
HL-60 shTET2-3 SLC38A1 mRNA ortalama ct değeri	35,27	34,53

Her üç hücre hattında düşük glutaminde SLC38A2 ekspresyon seviyesinin azaldığı tespit edildi. Kontrol HL-60 hücrelerinin hem normal hem de düşük glutaminli ortamda

SLC38A2 ekspresyon seviyelerinin TET2 geni baskılanmış hücrelerden daha yüksek olduğu bulundu. HL-60 shTET2-3 hücrelerinde düşük glutaminde ekspresyon seviyesindeki azalış, HL-60 shTET2-1 hücresine kıyasla daha fazla ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu (**p <0.01). HL-60 ve HL-60 shTET2-1 hücrelerindeki azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (^{ns}p ≥ 0.05).

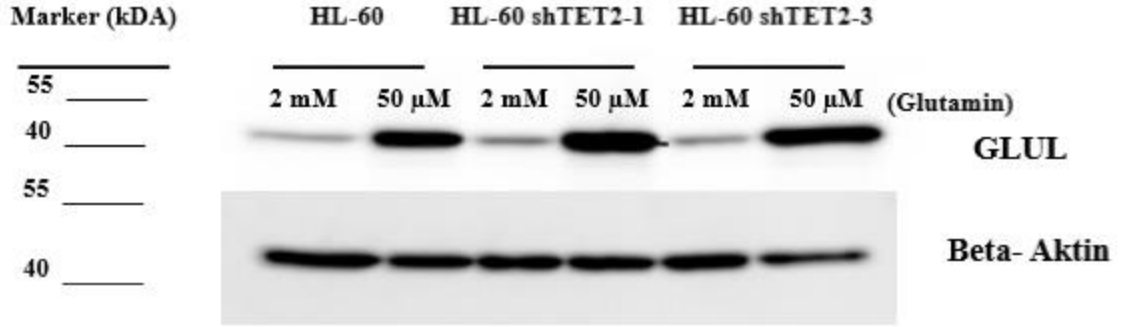


Şekil 20. Düşük glutaminli besiyerinde SLC38A2 mRNA ekspresyonlarının analizi. Hücreler 20000 hücre/ml şeklinde 72 saat inkübe edildi. Veriler ortalama ±SD olarak sunuldu, **p <0.01, ^{ns}p ≥ 0.05.

4.5. TET2 Geni Baskılanmış HL-60 Hücrelerinde GLUL Protein Sentezi

HL-60, HL-60 shTET2-1 ve HL-60 shTET2-3 hücrelerinin GLUL protein sentezine normal ve düşük glutaminli ortamda western blot yöntemiyle bakıldı (Şekil 21). Housekeeping protein olarak Beta-Aktin kullanıldı.

Kontrol ve TET2 geni baskılanmış her iki HL-60 hücrelerinde GLUL protein seviyesi, mRNA ekspresyonuna benzer şekilde düşük glutaminli ortamda artış gösterdi. HL-60 shTET2-1 ve HL-60 shTET2-3 hücrelerdeki GLUL seviyesinin kontrol HL-60'a kıyasla nispeten daha fazla olduğu görüldü.

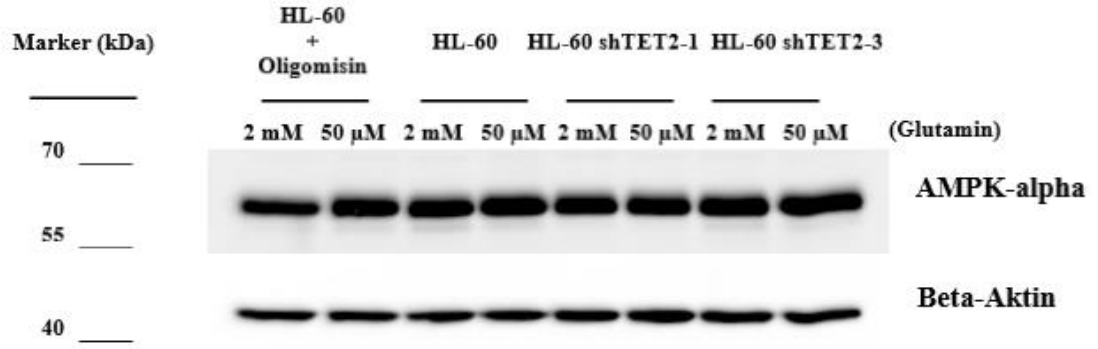


Şekil 21. HL-60, HL-60 shTET2-1 ve HL-60 shTET2-3 hücrelerinde normal ve düşük glutaminli ortamda GLUL proteininin immünoiblotlanması. Housekeeping protein olarak Beta-Aktin kullanıldı.

4.6. TET2 Geni Baskılanmış HL-60 Hücrelerinde AMPK α ve P- AMPK α Protein Sentezi

HL-60, HL-60 shTET2-1 ve HL-60 shTET2-3 hücrelerinin AMPK α ve P-AMPK α protein sentezine normal ve düşük glutaminli ortamda western blot yöntemiyle bakıldı (Şekil 22 ve 23). AMPK α ve P-AMPK α 'nın aktivasyon artışını doğrulamak için oligomisin kompleksi (Cayman) HL-60 hücrelerine normal ve düşük glutaminli ortamda 3 gün boyunca 1:1000 oranında uygulandı. Housekeeping protein olarak Beta-Aktin kullanıldı.

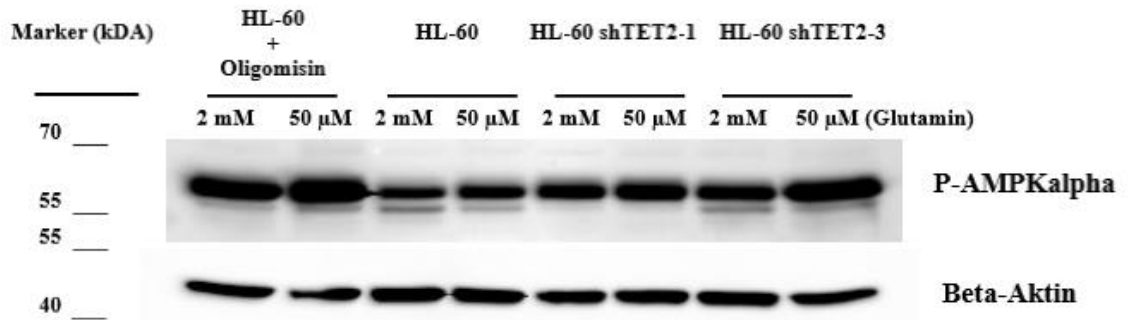
Hücrelerdeki AMPK aktivitesinin kontrolü için bakılan AMPK α protein seviyesi hem düşük hem de normal glutamin içeren ortamda tüm hücre hatlarında neredeyse aynı bulundu (Şekil 22).



Şekil 22. HL-60, HL-60 shTET2-1 ve HL-60 shTET2-3 hücrelerinde normal ve düşük glutaminli ortamda AMPK α proteininin immünoiblotlanması. AMPK α aktivitesinin pozitif kontrolü için kontrol HL-60 hücrelerine 3 gün boyunca oligomisin uygulandı. Housekeeping protein olarak Beta-Aktin kullanıldı.

HL-60 hücre hattında, P-AMPK α protein sentezinin pozitif kontrolü için hücrelere normal ve düşük glutamin ortamında oligomisin uygulandı. Oligomisin uygulamasının kontrol HL-60'a kıyasla normal ve düşük glutamin ortamında P-AMPK α protein sentezini arttırdığı bulundu.

P-AMPK α protein seviyesi, her üç hücre hattında da düşük glutaminde artış gösterdi. TET2 ekspresyonu baskılanmış her iki HL-60 hücre hattında P-AMPK α protein seviyesi, HL-60 hücre hattına kıyasla normal ve düşük glutaminli ortamda arttığı bulundu (Şekil 23).



Şekil 23. HL-60, HL-60 shTET2-1 ve HL-60 shTET2-3 hücrelerinde normal ve düşük glutaminli ortamda P-AMPK α proteininin immünoiblotlanması. P-AMPK α aktivitesinin pozitif kontrolü için kontrol HL-60 hücrelerine 3 gün boyunca oligomisin uygulandı. Housekeeping protein olarak Beta-Aktin kullanıldı.

5. TARTIŞMA

Küresel olarak ikinci önde gelen ölüm nedeni olan kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve bağışıklık sisteminin anormal bir şekilde tanınması ile karakterizedir (14). Tümör hücrelerinde en iyi karakterize edilen metabolik fenotip, normal oksijen konsantrasyonları altında bile oksidatif fosforilasyon yerine glikoliz yoluyla ATP üretildiği Warburg etkisidir (40). Kanser hücreleri, değişen metabolizmaları gereği artan enerji ihtiyacını karşılamak ve hızlı çoğalmak için daha fazla besine ihtiyaç duyarlar. Glikoz ve glutamin, plazmada en bol bulunan besinlerden ikisidir ve memeli hücrelerinde çoğu karbon ve nitrojen metabolizmasından sorumludurlar (107). Glutamin, glutaminaz enzimi aracılığıyla glutamata dönüştürülür ve glutamat, trikarboksilik asit döngüsünde bir ara metabolit olan α -ketoglutarat üretir. Hem in vivo hem de in vitro olarak yapılan çalışmalar, kanser hücresi ortamındaki glutamin miktarının kısıtlı olduğunu öne sürmüştür. Bu nedenle, kanser hücrelerinin hayatta kalmak ve çoğalmak için metabolizmalarını çevreye uyarladıkları bilinmektedir (40,56,107). Glutamin gereksinimleri, glutamin oksotroflarından, eksojen bir glutamin kaynağının yokluğunda hayatta kalabilen ve çoğalabilenlere kadar farklı kanser hücre hatları arasında çok heterojendir (6).

Normal hücrelere kıyasla neoplastik hücrelerin daha çok glutamin tüketmesi ve in vitro kültürde kanser hücrelerinin optimal büyüme ortamına glutamin takviyesi gerekliliği, glutaminin kanser hücresi proliferasyonu için ana enerji kaynağı olduğunu göstermektedir. Kanser hücrelerinin glutamin tüketiminin normal hücrelere kıyasla 5 ila 10 kat daha yüksektir (5). AML dahil olmak üzere birçok kanser hücre çeşidi yüksek oranda glutamine bağımlıdır (108). 2014 yılında 4 farklı AML hücre hattında yapılan bir çalışmada, en çok HL-60 hücre hattının glutamine bağımlı olduğu, HL-60 hücrelerinin büyümesinin glutamin yoksunluğu ve trikarboksilik asit döngü ara maddesi oksaloasetik asit tarafından kurtarılan glutaminolizin inhibisyonu ile baskılandığı bulunmuştur (109).

Kanser hücrelerindeki glutamin bağımlılığının tümör mikroçevresindeki glikoz miktarından bağımsızdır. P483B Burkitt lenfoma hücre hattında, glutaminden yoksun koşullarda değiştirilen ara TCA döngüsü metabolitlerinin miktarının glikoz miktarına bağlı olmadığı göstermiştir (110). K562, HL-60 ve NB-4 lösemi hücre hatlarında yapılan bir başka çalışmada ise hücrelerin proliferasyon için tümör mikroçevresindeki glikoz miktarından bağımsız olarak glutamine bağımlı gösterilmiştir (56). Glutamin açlığına ek olarak, glutaminaz inhibitörü CB-839 kullanımıyla glutamin metabolizmasının bloke

edilmesinin, birden fazla AML tipinde antioksidan glutatyon üretimini önemli ölçüde azalttığı, bunun da mitokondriyal ROS birikimine ve apoptotik hücre ölümüne yol açtığı bulunmuştur (108).

TET2 geni, 5-metilsitozini 5-hidroksimetilsitozine oksitleyerek DNA'nın epigenetik durumunu değiştiren TET ailesi enzimlerinin bir üyesini kodlar. TET2'nin somatik fonksiyon kaybı mutasyonları, miyelodisplastik sendromlar, miyeloproliferatif neoplazmalar ve kronik miyelomonositik lösemi dahil olmak üzere çeşitli miyeloid maligniteleri olan hastalarda sıklıkla görülür (60). TET2 mutasyonları, DNA hipermetilasyonu, artmış MDS ilerlemesi riski ve AML'de kötü prognoz ile ilişkilidir (99).

Birkaç çalışma, farelerde TET2 fonksiyon kaybını modellemiştir ve shRNA tabanlı yaklaşımların kullanıldığı in vitro çalışmalar, TET2'nin miyeloid farklılaşmasını ve kök/progenitör hücre proliferasyonunu düzenlemede bir rolü olduğunu göstermiştir (111). Hematopoietik kök ve progenitör hücrelerde (HSPC'ler) TET2 delesyonu, 5hmC kaybına, DNA hipermetilasyonuna ve kendini yenileyen progenitörlerde bir miyeloid soy genişlemesi dahil olmak üzere hematopoezde ilerleyici kusurlara neden olmaktadır. TET2 eksikliği olan farelerin önemli bir kısmı, dolaşımda artan beyaz kan hücreleri (WBC'ler), monositoz ve splenomegali ile karakterize edilen CMML benzeri bir hastalık geliştirmiştir (99).

Çalışmamızda, HL-60 hücre hattının glutamin bağımlılığı kanıtlayan yukarıdaki verilerden yola çıkarak, HL-60 lösemi hücre hattında TET2 geni ve glutamin metabolizması arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır. Düşük (50 μ M) glutamin içeren ortamda çoğaltılan HL-60 hücrelerinin TET2 mRNA ekspresyonunu yaklaşık olarak 2 kat arttırdığı bulunmuştur (Şekil 11). Bu nedenle, HL-60 hücrelerinde TET2 ekspresyonu shRNA aracılığıyla baskılanmış (Şekil 12) ve hücre proliferasyonunu kontrol etmek amacıyla hücreler normal (2 mM) ve düşük (50 μ M) glutamin içeren besiyerlerinde çoğaltılmıştır.

Hücre sayım sonuçlarına göre, her üç hücre hattında düşük glutamin içeren ortamda hücre çoğalmasının azaldığını bulunmuştur. HL-60 shTET2-1 hücrelerindeki hücre çoğalması hem normal hem de düşük glutamin içeren ortamda kontrol HL-60 hücrelerine kıyasla daha az bulunmuştur. Buna karşılık, HL-60 shTET2-3 hücrelerindeki hücre çoğalması her iki besiyerinde de kontrol HL-60 hücrelerinden daha fazla bulunmuştur (Şekil 13).

TET2 ekspresyonu baskılanmış bu iki HL-60 hücre hattındaki farklılığın nedeninin TET2 ekspresyonunun baskılanma oranından kaynaklandığı düşünülmüştür. HL-60 shTET2-1 hücre hattında TET2 ekspresyonun baskılanma oranı %56 iken, HL-60 shTET2-3 hücrelerinde bu oran %43 bulunmuştur (Şekil 12). Düşük glutamin ortamında azalan hücre sayım sonuçlarımıza benzer bir sonuç daha önce çeşitli AML hücre hatlarında yapılan bir çalışmada bulunmuştur. K562, HL-60 ve NB-4 hücre hatları düşük glutamin ortamında daha az çoğalmış ve proliferasyon için glutamine bağımlı oldukları bulunmuştur (56).

Düşük glutamin içeren ortamdaki hücrelerin canlılıkları Cell TiterGlo Assay yöntemi ile ölçülmüş ve TET2 ekspresyonu baskılanmış HL-60 hücrelerinin canlılık oranı kontrol HL-60'a kıyasla daha fazla olduğu bulunmuştur. Cell TiterGlo Assay sonucunda hücrelerin canlılık değerleri HL-60 hücrelerinde %100'den %52,79'a, HL-60 shTET2-1 hücrelerinde %69,81'e ve HL-60 shTET2-3 hücrelerinde %70,53'e düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 14). Sonuçlar, HL-60 hücre hattında TET2 ekspresyonun baskılanmasının glutamin eksikliğine karşı direnç kazandırdığı düşündürmüştür.

AML hücre hattı K562'de yapılan bir çalışmada, TET2 ekspresyonu shRNA aracılığıyla %50 oranında baskılanmış ve TET2 baskılanmasının hücre proliferasyonunu önemli ölçüde değiştirmediği ancak TET2 baskılanmış K562 hücrelerinin CAPE tedavisine daha dirençli olduğu bulunmuştur (90).

Bildiğimiz kadarıyla literatürde henüz AML hücrelerinde TET2 ekspresyonu ile glutamin metabolizması arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte TET2 ekspresyonun özellikle karsinogenezdeki rolüne dair çalışmalar farklı kanser türlerinde çalışılmıştır.

Bir çalışmada, SUM149 üçlü negatif meme kanseri hücreleri glutamin içermeyen ortamda kültüre edilmesiyle metabolik olarak uyumlu (MA) SUM149-MA hücreleri elde edilmiştir. TET2 gen delesyonları ve düşük TET2 ekspresyonu gösteren SUM149-MA hücrelerinde, TET2 protein seviyesi SUM149 hücrelerinden %90 daha düşük bulunmuştur. MA hücrelerindeki düşük TET2 protein seviyesi nedeninin düşük gen dozajından veya EMT programlarının bir parçası olarak artan ZEB1 ekspresyonunun TET2 anlatımının baskılanmasından kaynaklandığı düşünülmüştür (112).

2018 yılında yapılan bir çalışmada, normoksik (%20 O₂) koşullarda, düşük glikoz (5 mM) veya glutamin (0.5 mM) ile kültürlenmiş HepG2 insan hepatoma hücre hattında TET2 ve

TET3 mRNA seviyelerini arttırdığı; hipoksik (%1 O₂) koşullarda ise TET genlerinin mRNA seviyesinin, düşük glutamine kıyasla düşük glikozda daha çok azaldığı bulunmuştur. Bununla birlikte, değişen ortam koşullarının hücre canlılığını olumsuz etkilememiştir. Ayrıca, hipoksida azalan TET ekspresyonunun, DNA hidroksimetilasyonunun azalmasına ve DNA metilasyonunun artmasına neden olduğu bulunmuştur. Yine aynı çalışmada, hepatoselüler karsinomda (HCC), tümör olmayan numunelere kıyasla tümör olanlarda azaltılmış TET2 transkriptleri bulunmuştur. Bununla birlikte, tümör numunelerinde TET1 ve TET3 ekspresyon seviyelerini arttırdığı, nedeninin ise HCC'de azalan TET2 seviyesinin telafisi amaçlı olduğu düşünülmüştür (113).

Çalışmamızda TET2 geni baskılanmış HL-60 hücrelerinde glutamin metabolizmasında rol oynayan GLUL, GLS1, GLS2, GLUD1, SLC38A1 ve SLC38A2 genlerinin düşük glutamin içeren ortamdaki mRNA ekspresyon seviyeleri kantitatif Real-Time PCR ile analiz edilmiştir.

Yüksek GLUL ekspresyonu, glioblastoma, over kanseri ve hepatoselüler karsinomda kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (56,57,114). Bazal tip meme kanseri hücrelerinin GLUL ekspresyonunun düşük olduğu ve luminal tip meme kanseri hücrelerine göre glutamine daha fazla bağımlı oldukları bildirilmiştir. Ayrıca, GLUL ekspresyonunun bazal tip hücrelerde cMYC tarafından düzenlendiği gösterilmiştir, bu da glutamin bağımlılığının dokuya özgü olabileceğini düşündürmektedir (56,115). Başka bir çalışmada, L-asparaginazın bazı AML hücre hatlarında mTORC1'i inhibe ederek GS ekspresyonunu arttırdığı ve bu hücrelerde GS'nin azaltılmış ilaca bağlı apoptozu inhibe ettiği bulunmuş ve GS ekspresyonunun AML'de ilaç tepkisi için önemli olabileceğini düşünülmüştür (56).

Düşük glutaminli ortamda K562, HL-60 ve NB-4 lösemi hücre hatlarında GS protein ekspresyonunun arttığı, ancak mRNA seviyelerinin önemli ölçüde değişmediği gösterilmiştir. Ek olarak, HL-60 hücre hattında GLUL geni CRISPR/Cas9 aracılığıyla susturulmuş ve GS susturulan hücrelerin düşük glikoz/düşük glutamin ortamında ve düşük glutamin ortamında hücre çoğalmasının azaldığı tespit edilmiştir (56).

Sonuçlarımız, literatürle uyumlu şekilde, düşük glutamin ortamının hem TET2 ekspresyonu baskılanmış HL-60 hücrelerinde hem de kontrol hücrelerinde GLUL mRNA ekspresyonunda artışa neden olduğunu göstermektedir (Şekil 15). Bununla birlikte, HL-60 shTET2-1 hücrelerinde düşük glutamindeki GLUL ekspresyon artışı kontrol HL-60

hücrelerinden fazlayken, HL-60 shTET2-3 hücrelerindeki artış kontrol HL-60 hücrelerinden daha az bulunmuştur. Bunun nedeninin yine TET2 ekspresyonu bastırılma oranından kaynaklandığı düşünülmektedir. Western sonuçlarımız, qPCR sonuçlarını doğrulayan bir şekilde düşük glutaminli ortamda GLUL protein seviyesinin tüm hücrelerde arttığını göstermektedir (Şekil 21).

AML hastalarında, GLS izoformlarının ve GLUD1 ekspresyonun arttığı bilinmektedir (15,16,116). Yüksek GLS ve GLUD1 ekspresyonu gösteren AML hücre hatlarında, glutamin kısıtlaması veya glutaminaz inhibisyonu yoluyla hücre büyümesinin baskılandığı, iki AML hücre hattında (Kasumi-1, HL-60) ve bir ALL hücre hattında (Raji) apoptozun indüklendiği bulunmuştur. Bu bulgular, spesifik AML alt tiplerinin, TCA döngüsünde enerji kaynağı olarak glutamini kullanabilmek için gerekli olan genleri yüksek düzeyde eksprese ettiğini göstermektedir (117).

GLS1 ve GLS2, tümör gelişiminde karşıt rollere sahiptir. GLS1 genellikle kanserlerde yukarı doğru düzenlenirken, GLS2'nin ifadesi genellikle kanserlerde bastırılır (17). GLS1, tümör malignitesi ile pozitif olarak ilişkilidir ve c-Myc onkoproteini tarafından düzenlenirken, GLS2 tümör baskılayıcı özelliklere sahip olma eğilimindedir ve p53 proteini tarafından düzenlenir (118,119). Bir çalışmada, p53'ün indirgenmiş glutatyon üretimini artıran GLS2 ekspresyonunu arttırarak ROS üretimini baskıladığı ve eksojen GLS2 ekspresyonunun, p53'ün tümör baskılayıcı aktivitesi ile tutarlı olarak in vivo tümör büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (70). Promotör hipermetilasyonu yoluyla GLS2'nin epigenetik susturulmasının insan karaciğer ve kolon kanserlerinde yaygın olduğu ve GLS2'nin aşırı ekspresyonunun karaciğer ve kolon kanser hücrelerinin çoğalmasını ve koloni oluşumunu baskıladığı bulunmuştur (120). Ek olarak, glutaminaz enzimlerinin ekspresyonu ve aktivasyonu çeşitli faktörlerle düzenlenir. GLS1, yüksek fosfat seviyeleri ile aktive edilir ve son ürün glutamat tarafından inhibe edilirken, GLS2 düşük fosfat seviyeleri ile aktive edilir ve glutamat tarafından inhibe edilmez (70).

MYC onkogeni, glutamin taşıyıcılarının ve glutaminazın ekspresyonunu düzenlemektedir. MYC kaynaklı karaciğer tümörlerinde, glutamin sentezinin (GLUL) azalırken glutamin taşınmasının (SLC1A5) ve katabolizmasının (GLS1) arttığı bulunmuştur. Karaciğer tümörlerinin aksine, MYC kaynaklı akciğer tümörlerinde hem GLUL hem de GLS1 artan ekspresyonunu göstermiştir. Bununla birlikte, glutamin katabolizması için GLS2 yerine GLS1'in tercih edildiği ve GLS1 inhibisyonunun, MYC'yi aşırı eksprese eden hücrelerde apoptozu indüklediği görülmüştür (120,121).

Ayrıca, glutamin metabolizmasını bloke etmek için kullanılan GLS1 inhibitörü CB-839'nın üçlü negatif meme kanseri, akciğer adenokarsinomu, kondrosarkom, lenfomalar, özofagus skuamöz hücreli karsinomu ve hepatoselüler karsinoma karşı antikanser aktivitesine sahip olduğunu göstermiştir (116).

Akciğer kanseri H1299 ve meme kanseri MDA-MB231 hücrelerinde GLUD1'in shRNA aracılığıyla baskılanması sonucu glutaminoliz, hücre proliferasyonu, tümör büyümesi, lipidlerin ve glutaminden türetilen RNA'nın biyosentezinde azalma olduğu bulunmuştur. Ayrıca, hücrelerde mitokondriyal ROS seviyesi, hücre içi H₂O₂ seviyesi, glikoz alımı ve laktat üretiminin artarken; hücre içi ATP seviyesi değişmemiştir. Hücreler glikolitik inhibitör 2-deoksiglikoz (2-DG) veya glikoz açlığı uygulandığında hücre içi ATP seviyesi önemli ölçüde azalmış ancak oksidatif fosforilasyon inhibitörü oligomisin ile tedavi edildiğinde ATP seviyesinde değişim olmamıştır. Tüm bu sonuçlar, GLUD1'in susturulması sonucu azalmış glutaminolizin, hücreleri biyoenerji için glikolize bağımlı hale getirdiğini göstermektedir (122).

Çalışmamızda, GLS1 ve GLS2 ekspresyonunun hem kontrol hem de TET2 baskılanmış HL-60 hücrelerinde düşük glutaminli ortamda arttığı bulunmuştur (Şekil 16 ve 17). Bununla birlikte, düşük glutaminli ortamdaki GLS2 mRNA ekspresyonu TET2 baskılanmış hücre hatlarında kontrole kıyasla daha az tespit edilirken; GLS1 için farklı ekspresyon seviyeleri gösteren TET2 baskılanmış hücre hatları nedeniyle anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. TET2 ekspresyonu baskılanmış HL-60 hücrelerinde düşük glutaminli ortamda GLS1 ekspresyonunun GLS2'ye kıyasla daha fazla olması, glutaminin glutamata dönüşümünden GLS1'in sorumlu olduğunu düşündürmüştür.

GLUD1 mRNA ekspresyonu ise düşük glutaminde kontrol HL-60 hücrelerinde azalırken TET2 baskılanmış hücrelerde artmıştır (Şekil 18). Ayrıca, normal glutaminde TET2 baskılanmış hücreler, kontrole kıyasla daha az TET2 eksprese etmiştir.

SLC38A1 ve SLC38A2 aktivitesi, kanser hücre hatlarında net glutamin alımına ve glutaminolize aracılık etmeden sorumludur (123). SLC38A1'in susturulması, çeşitli katı tümör hücrelerinin çoğalmasını ve/veya göç etme potansiyelini önemli ölçüde azaltmıştır. Artan SLC38A1 ekspresyonu, insan osteosarkoma, kolanjiyokarsinom, mide kanseri, kolon kanseri ve AML'de kötü prognoz ile ilişkilidir (124). SLC38A1 ekspresyon seviyesi AML alt tipine göre değişmektedir. SLC38A1, AML hastalarının M0 alt tipinde en yüksek, M3 alt tipinde en düşük ekspresyon değerine sahiptir(7). FLT3 -

ITD⁺ AML'de tirozin kinaz inhibitörü gilteritinib kullanımı SLC38A1 ekspresyonunu azaltarak, glutamin alımını ve kullanımını inhibe etmiş, azalmış glutaminoliz ve redoks homeostazının bozulması hücrel yaşlanmaya neden olmuştur (125).

SLC38A2, hücreler amino asit açısından zengin ortamlarda büyütüldüğünde aktivitesi zor saptanabilen, oldukça indüklenebilir bir taşıyıcıdır. Ancak, hücrelerin amino asitsiz bir ortamda birkaç saat inkübe edilmesiyle yüzey ekspresyonu artabilir ve hücre içi depolardan yer değiştirmeyi ve de novo sentezi artırır (126). Üçlü negatif meme kanseri hücre hatlarında aşırı eksprese edilen SLC38A2'nin susturulması hücrelerde glutamin tüketimini azalttı, hücre büyümesini inhibe etti, otofajiye indükledi ve ROS seviyelerini artırırdı (127). Ayrıca SLC38A2 ekspresyonu, hipoksi ve östrojen reseptörü alfa (ER α) tarafından indüklenir ve meme kanserinde anti-endokrin tedaviye dirençte katkıda bulunur (128).

Çalışmamızda, TET2 baskılanmış HL-60 hücrelerinin düşük glutamin ortamında neredeyse hiç SLC38A1 eksprese etmediği ve SLC38A2 ekspresyonunun ise azaldığı bulunmuştur (Şekil 19 ve Şekil 20). Bununla birlikte, qRT-PCR sonuçları HL-60 hücrelerinde SLC38A2 ekspresyonunun SLC38A1'den fazla olduğunu göstermiştir. Bu nedenle hem kontrol hem de TET2 baskılanmış HL-60 hücrelerinde glutamin taşıyıcısı olarak SLC38A1 yerine SLC38A2'nin görev aldığı düşünülmüştür.

AMPK, hücrelerin merkezi enerji sensörüdür ve yüksek AMP/ATP veya ADP/ATP oranları AMPK'nın α -alt biriminin Thr-172'sinde fosforilasyonu yoluyla AMPK'yı aktive ederek enerji homeostazı korur (129). AMPK düzensizliği diyabet, obezite, iltihaplanma ve kanser gibi çeşitli hastalıklarına neden olur (130).

AMPK'nın, TET2'yi fosforile ederek DNA metilasyonu üzerinde etki ettiğini ve miyogenezde önemli bir rol oynadığını gösterilmiştir (131). Yakın tarihli bir çalışmada, AMPK'nın TET2'yi serin99'dan fosforillediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, AMPK'nın hiperglisemi aracılı inaktivasyonun TET2'nin AMPK aracılı fosforilasyonun engellenmesine ve kalpain aracılı proteolize duyarlılığının artmasına neden olduğu bulunmuştur. TET2 destabilizasyonu, hem 5-hmC seviyelerinin hem de TET2'nin in vitro ve in vivo tümör baskılayıcı fonksiyonunun düzensizleşmesine neden olarak diyabet hastalarını kansere yatkın hale getirmiştir. Ayrıca, anti-diyabetik ilaç metformin ile tedavinin, TET2'nin AMPK aracılı fosforilasyonunu koruyarak 5hmC seviyelerini arttırdığı ve tümör büyümesini baskıladığı gözlemlenmiştir (132).

İnsan AML U937 hücrelerinde, malign ilerlemeye neden olan hidrokinon (HQ) maruziyetinin AMPK aktivitesini artırarak hem U937 hem de U937/HQ hücrelerinde artan TET2 ve FOXP3 ekspresyonuna yol açtığı bulunmuştur. Bununla birlikte, bileşik C tarafından baskılanan AMPK aktivitesi, TET2 ve FOXP3 ekspresyonunun azaltarak U937 ve U937/HQ hücrelerinin ölümüne yol açmıştır. Bu sonuçlar, AMPK'nın AML hücrelerinin hayatta kalmasını modüle etmede TET2-FOXP3 eksenini ile bağlantı olduğunu ve AMPK-TET2-FOXP3 ekseninin baskılanmasının, AML'nin ilerlemesini ve AML hücrelerinin HQ kaynaklı malign dönüşümünü baskıladığını öne sürmektedir (47).

Endometrial karsinomda, AMPK gen ekspresyonunun siRNA ile susturulmasının TET2 ekspresyonunu ve 5hmC seviyesini önemli ölçüde azalttığını ve metformin tedavisinin AMPK'yi aktive ederek TET2 ekspresyonunu düzenlediği bulunmuştur. Ayrıca siRNA aracılı TET2 yıkımı, kanser hücrelerinin çoğalmasını arttırmıştır (133). Buna karşılık kolorektal kanserde, AMPK ve TET2'nin ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı bir korelasyon olmasına rağmen, çelişkili prognozlarla ilişkili olduğunu gösterilmiştir. Kanser ilerledikçe metilasyona yanıt olarak TET2'nin arttığı ve tümör hücrelerinin metabolik ihtiyaçlarına göre tümör hücresi göçü ve istilas sırasında AMPK'nın rolünün arttığı düşünülmüştür (11).

Çalışmamızda, düşük glutaminli ortamda TET2 ekspresyonu baskılanmış HL-60 hücrelerinde kontrole kıyasla P-AMPK α (Şekil 23) seviyesinin daha da arttığı görülmüştür. Literatürde, TET2 ekspresyonunun glikoza bağımlı AMPK aktivitesi tarafından düzenlediği gösterilmiştir. Bulduğumuz sonuç, literatüre ek olarak, TET2 ekspresyonunun AMPK aracılı düzenlenebileceği ve AMPK aktivitesi için düşük glutamin gerektiğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak, çalışmamızın sonucunda hem kontrol hem de TET2 baskılanmış HL-60 hücre hatlarında glutaminin az olduğu ortamda hücre canlılıklarının ve proliferasyonlarının azaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, düşük glutaminde hücre canlılığı kontrol HL-60'a kıyasla TET2 baskılanmış hücrelerde daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, TET2 ekspresyonu baskılanmış HL-60 hücrelerinde glutaminin az olduğu ortamda GLUL, GLS1, GLS2 ve GLUD1 ekspresyon seviyesinin arttığı, SLC38A1 ve SLC38A2 ekspresyon seviyelerinin ise düştüğü ve AMPK α protein seviyesi pek değişmezken P-AMPK α protein seviyesinin arttığı bulunmuştur.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonucunda,

1. Düşük glutaminli ortamda HL-60 lösemi hücrelerinde TET2 ekspresyonunun arttığını gördük. Bu nedenle HL-60 hücre hattı iki farklı shRNA ile TET2 ekspresyonu baskılanmıştır. Ancak qRT-PCR sonuçlarımız shRNA ile ekspresyonun en fazla yaklaşık %50'sinin baskılandığını göstermiştir. Ayrıca TET2 ekspresyonu azaldığında düşük glutaminli ortamda hücre canlılığının arttığını belirledik. Daha etkin sonuç almak adına TET2 ekspresyonu Crispr/Cas9 gen düzenlenme yöntemi ile tamamen susturulabilir.
2. TET2 ekspresyonu baskılanmış HL-60 hücrelerinde düşük glutaminli ortamda GLUL, GLS1, GLS2 ve GLUD1 ekspresyonları arttığını belirledik. Bu genlerin ekspresyonlarının protein seviyesinde de immunoblotlama ile kontrol edilebilir.
3. Düşük glutaminli ortamda TET2 baskılanmış hücrelerde glutamin taşıyıcılarından SLC38A1'in neredeyse hiç eksprese edilmediği, SLC38A2'nin ekspresyonunun ise azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, kontrol HL-60 hücrelerinde SLC38A2 ekspresyonunun SLC38A1'den fazla olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, TET2 baskılanmış HL-60 hücrelerinde glutamin taşıyıcı olarak SLC38A2'nin tercih edildiği ya da hücrelerin glutamini dışarıdan alma yerine de novo sentezlemeyi tercih ettiğini düşündürmüştür. İleride yapılacak çalışmalarda, bu çalışmada ekspresyonu bakılmayan SLC1A5, SLC7A5 gibi diğer glutamin taşıyıcılarının ekspresyon ve protein seviyeleri incelenmelidir.
4. Düşük glutaminli ortamda GLUL protein ekspresyonunun her hücrede arttığını gördük. GLUL ve TET2 ilişkisinin daha iyi değerlendirilmesi için Crispr/Cas9 gen düzenlenme yöntemiyle GLUL susturulmuş hücrelerde TET2 ekspresyon seviyeleri kontrol edilebilir.
5. Düşük glutaminli ortamda TET2 baskılanmış hücrelerde P-AMPK α seviyesinin daha da arttığı tespit edilmiştir. Bu durum TET2 baskılanmış hücrelerde enerji ihtiyacının arttığını düşündürdü. İleride yapılacak çalışmalarda, TET2 ve AMPK ilişkisinin daha fazla incelenmesi için düşük glutamin ortamında AMPK'nın TET2'yi nereden fosforillediğine bakılmalıdır. Ayrıca, TET2 ekspresyonu baskılanmış HL-60 hücrelerinde normal ve düşük glutaminde 5-hmC seviyeleri ölçülmeli, ek olarak bu

hücrelerin yüksek glutamin ortamındaki AMPK seviyesine ve 5-hmC seviyelerine bakılmalıdır.



KAYNAKÇA

1. Osborne C, Wilson P, Tripathy D. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications. *Oncologist* [Internet]. 2004 Jul 1;9(4):361–77.
2. Zhu K, Liu Q, Zhou Y, Tao C, Zhao Z, Sun J, et al. Oncogenes and tumor suppressor genes: comparative genomics and network perspectives. *BMC Genomics*. 2015 Dec 11;16(S7):S8.
3. Liberti M v., Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*. 2016 Mar;41(3):211–8.
4. Yang L, Venneti S, Nagrath D. Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annu Rev Biomed Eng*. 2017 Jun 21;19(1):163–94.
5. Mohamed A, Deng X, Khuri FR, Owonikoko TK. Altered Glutamine Metabolism and Therapeutic Opportunities for Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. 2014 Jan;15(1):7–15.
6. Cluntun AA, Lukey MJ, Cerione RA, Locasale JW. Glutamine Metabolism in Cancer: Understanding the Heterogeneity. *Trends Cancer*. 2017 Mar;3(3):169–80.
7. Cheng Y, Su Y, Wang S, Liu Y, Jin L, Wan Q, et al. Identification of circRNA-lncRNA-miRNA-mRNA Competitive Endogenous RNA Network as Novel Prognostic Markers for Acute Myeloid Leukemia. *Genes (Basel)*. 2020 Jul 31;11(8):868.
8. Lee M, Li J, Li J, Fang S, Zhang J, Vo ATT, et al. Tet2 Inactivation Enhances the Antitumor Activity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes. *Cancer Res*. 2021 Apr 15;81(8):1965–76.
9. Liu X, Wang X, Liu N, Zhu K, Zhang S, Duan X, et al. TET2 is involved in DNA hydroxymethylation, cell proliferation and inflammatory response in keratinocytes. *Mol Med Rep*. 2020 Feb 18;
10. Carling D. AMPK signalling in health and disease. *Curr Opin Cell Biol*. 2017 Apr;45:31–7.
11. Kang DH, Jeong DJ, Ahn TS, Lee HY, Kim HJ, Bae SB, et al. Expression of AMP-activated protein kinase/ten-eleven translocation 2 and their clinical relevance in colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2021 Jan 4;21(2):164.
12. Gabriel JA. *The Biology of Cancer*. 2nd Edition. John Wiley & Sons; 2007.
13. Lambert LA, Lambert DH, Keyomarsi K. *Understanding the Biology of Cancer*. In: *The Biology and Treatment of Cancer*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2008. p. 101–22.
14. Yin W, Wang J, Jiang L, James Kang Y. Cancer and stem cells. *Exp Biol Med*. 2021 Aug 5;246(16):1791–801.
15. Maniam S, Maniam S. Cancer Cell Metabolites: Updates on Current Tracing Methods. *ChemBioChem*. 2020 Dec 11;21(24):3476–88.
16. Knowles MA, Selby PJ. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. 4th Edition. Oxford University Press; 2005.

17. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009 Mar;9(3):153–66.
18. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011 Mar;144(5):646–74.
19. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* [Internet]. 2022 Jan 12;12(1):31–46.
20. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009 Apr;458(7239):719–24.
21. DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer: Principles and Practice of Oncology Primer of Molecular Biology in Cancer*. 3rd Edition. Lippincott Williams & Wilkins (LWW); 2020.
22. Dong W, Keibler MA, Stephanopoulos G. Review of metabolic pathways activated in cancer cells as determined through isotopic labeling and network analysis. *Metab Eng*. 2017 Sep;43:113–24.
23. Fowler S, Roush R, Roush R. *Concepts of Biology*. OpenStax; 2013.
24. Pazarbaşı A, Kasap M. Kanser Genetiği. *Journal*. 2003;12(4).
25. Lee EYHP, Muller WJ. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Oct 1;2(10):a003236–a003236.
26. Pierotti MA, Sozzi G, Croce CM. Mechanisms of oncogene activation. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, editors. *Holland-Frei Cancer Medicine* [Internet]. 6th Edition. BC Decker; 2003 [cited 2023 Feb 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12538/>
27. Knudson AG. Cancer genetics. *Am J Med Genet*. 2002 Jul 22;111(1):96–102.
28. Jang M, Kim SS, Lee J. Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. *Exp Mol Med*. 2013 Oct 4;45(10):e45–e45.
29. Romero-Garcia S, Lopez-Gonzalez JS, B´ez-Viveros JL, Aguilar-Cazares D, Prado-Garcia H. Tumor cell metabolism. *Cancer Biol Ther*. 2011 Dec 27;12(11):939–48.
30. Shi R, Tang YQ, Miao H. Metabolism in tumor microenvironment: Implications for cancer immunotherapy. Vol. 1, *MedComm*. Blackwell Publishing Inc.; 2020. p. 47–68.
31. von Schwarzenberg K. Cell Death Induction by Targeting Tumor Metabolism. In: *Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis*. InTech; 2015.
32. Neagu M, Constantin C, Popescu ID, Zipeto D, Tzanakakis G, Nikitovic D, et al. Inflammation and metabolism in cancer cell—mitochondria key player. *Front Oncol*. 2019;9(MAY).
33. Qian L, Zhang F, Yin M, Lei Q. Cancer metabolism and dietary interventions. Vol. 19, *Cancer Biology and Medicine*. *Cancer Biology and Medicine*; 2022. p. 163–74.
34. Park JH, Pyun WY, Park HW. Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. Vol. 9, *Cells*. NLM (Medline); 2020.

35. Xia L, Oyang L, Lin J, Tan S, Han Y, Wu N, et al. The cancer metabolic reprogramming and immune response. Vol. 20, *Molecular Cancer*. BioMed Central Ltd; 2021.
36. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS Journal*. 2007 Mar;274(6):1393–418.
37. Fernandez-De-Cossio-Diaz J, Vazquez A. Limits of aerobic metabolism in cancer cells. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).
38. Vaupel P, Schmidberger H, Mayer A. The Warburg effect: essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression. Vol. 95, *International Journal of Radiation Biology*. Taylor and Francis Ltd; 2019. p. 912–9.
39. Ada S, Ertürk C, Uçar A, Akyüz S, Doğan F, Yücel B. Kanser Hücre Metabolizması. *Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı Dergisi*. 2021 Nov 30;
40. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. Vol. 11, *Nature Reviews Cancer*. 2011. p. 85–95.
41. Kim SH, Baek KH. Regulation of cancer metabolism by deubiquitinating enzymes: The warburg effect. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI; 2021.
42. Hardie DG. AMPK—Sensing Energy while Talking to Other Signaling Pathways. *Cell Metab*. 2014 Dec;20(6):939–52.
43. Jacquet A, Luciano F, Robert G, Auberger P. Implication and Regulation of AMPK during Physiological and Pathological Myeloid Differentiation. *Int J Mol Sci*. 2018 Sep 30;19(10):2991.
44. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol*. 2011 Sep 2;13(9):1016–23.
45. Rehman G, Shehzad A, Khan AL, Hamayun M. Role of AMP-Activated Protein Kinase in Cancer Therapy. *Arch Pharm (Weinheim)*. 2014 Jul;347(7):457–68.
46. Chiou JT, Huang CH, Lee YC, Wang LJ, Shi YJ, Chen YJ, et al. Compound C induces autophagy and apoptosis in parental and hydroquinone-selected malignant leukemia cells through the ROS/p38 MAPK/AMPK/TET2/FOXP3 axis. *Cell Biol Toxicol*. 2020 Aug 3;36(4):315–31.
47. Garcia D, Shaw RJ. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Mol Cell*. 2017 Jun;66(6):789–800.
48. Villar VH, Merhi F, Djavaheri-Mergny M, Durán R v. Glutaminolysis and autophagy in cancer. *Autophagy*. 2015 Aug 3;11(8):1198–208.
49. Sharma S, Agnihotri N, Kumar S. Targeting fuel pocket of cancer cell metabolism: A focus on glutaminolysis. *Biochem Pharmacol*. 2022 Apr;198:114943.
50. Cruzat V, Macedo Rogero M, Noel Keane K, Curi R, Newsholme P. Glutamine: Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. *Nutrients*. 2018 Oct 23;10(11):1564.
51. Luengo A, Gui DY, vander Heiden MG. Targeting Metabolism for Cancer Therapy. *Cell Chem Biol*. 2017 Sep;24(9):1161–80.

52. Li T, Copeland C, Le A. Glutamine Metabolism in Cancer. In: Lee A, editor. *The Heterogeneity of Cancer Metabolism*. 2nd Edition. Springer; 2021. p. 17–38.
53. Choi YK, Park KG. Targeting Glutamine Metabolism for Cancer Treatment. *Biomol Ther (Seoul)*. 2018 Jan 1;26(1):19–28.
54. Sniegowski T, Korac K, Bhutia YD, Ganapathy V. SLC6A14 and SLC38A5 Drive the Glutaminolysis and Serine–Glycine–One-Carbon Pathways in Cancer. *Pharmaceuticals*. 2021 Mar 4;14(3):216.
55. Curi R, Newsholme P, Marzuca-Nassr GN, Takahashi HK, Hirabara SM, Cruzat V, et al. Regulatory principles in metabolism—then and now. *Biochemical Journal*. 2016 Jul 1;473(13):1845–57.
56. Yücel B, Ada S. Leukemia Cells Resistant to Glutamine Deprivation Express Glutamine Synthetase Protein. *Turkish Journal of Hematology*. 2022 Feb 24;39(1):22–8.
57. Kim GW, Lee DH, Jeon YH, Yoo J, Kim SY, Lee SW, et al. Glutamine Synthetase as a Therapeutic Target for Cancer Treatment. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 8;22(4):1701.
58. Cha Y, Kim ES, Koo J. Amino Acid Transporters and Glutamine Metabolism in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 19;19(3):907.
59. Yoo HC, Yu YC, Sung Y, Han JM. Glutamine reliance in cell metabolism. *Exp Mol Med*. 2020 Sep 17;52(9):1496–516.
60. Wang Z, Liu F, Fan N, Zhou C, Li D, Macvicar T, et al. Targeting Glutaminolysis: New Perspectives to Understand Cancer Development and Novel Strategies for Potential Target Therapies. *Front Oncol*. 2020 Oct 26;10.
61. Anderson NM, Mucka P, Kern JG, Feng H. The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism. *Protein Cell*. 2018 Feb 26;9(2):216–37.
62. Yang WH, Qiu Y, Stamatatos O, Janowitz T, Lukey MJ. Enhancing the Efficacy of Glutamine Metabolism Inhibitors in Cancer Therapy. *Trends Cancer*. 2021 Aug;7(8):790–804.
63. Altman BJ, Stine ZE, Dang C v. From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016 Oct 29;16(10):619–34.
64. Nguyen TL, Durán R v. Glutamine metabolism in cancer therapy. *Cancer Drug Resistance*. 2018;
65. Reitzer LJ, Wice BM, Kennell D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem*. 1979 Apr 25;254(8):2669–76.
66. Mates JM, Segura JA, Martin-Rufian M, Campos-Sandoval JA, Alonso FJ, Marquez J. Glutaminase Isoenzymes as Key Regulators in Metabolic and Oxidative Stress Against Cancer. *Curr Mol Med*. 2013 Apr 1;13(4):514–34.
67. Matés JM, di Paola FJ, Campos-Sandoval JA, Mazurek S, Márquez J. Therapeutic targeting of glutaminolysis as an essential strategy to combat cancer. *Semin Cell Dev Biol*. 2020 Feb;98:34–43.
68. Jin L, Alesi GN, Kang S. Glutaminolysis as a target for cancer therapy. *Oncogene*. 2016 Jul 14;35(28):3619–25.

69. Tang Z, Xu Z, Zhu X, Zhang J. New insights into molecules and pathways of cancer metabolism and therapeutic implications. *Cancer Commun.* 2021 Jan 10;41(1):16–36.
70. Chen L, Cui H. Targeting Glutamine Induces Apoptosis: A Cancer Therapy Approach. *Int J Mol Sci.* 2015 Sep 22;16(9):22830–55.
71. Saultz J, Garzon R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *J Clin Med.* 2016 Mar 5;5(3):33.
72. Manish A. Acute Myeloid Leukemia: Review and Current Update. *International Journal of Biochemistry & Physiology.* 2021;6(2).
73. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine.* 2015 Sep 17;373(12):1136–52.
74. Infante MS, Piris MÁ, Hernández-Rivas JÁ. Molecular alterations in acute myeloid leukemia and their clinical and therapeutical implications. *Med Clin (Barc).* 2018 Nov;151(9):362–7.
75. Vago L, Gojo I. Immune escape and immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Investigation.* 2020 Apr 1;130(4):1552–64.
76. Padmakumar D, Chandrababha VR, Gopinath P, Vimala Devi ART, Anitha GRJ, Sreelatha MM, et al. A concise review on the molecular genetics of acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2021 Dec 1;111:106727.
77. Yang X, Wang J. Precision therapy for acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol.* 2018 Dec 5;11(1):3.
78. Pelcovits A, Niroula R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. *R I Med J (2013).* 2020 Apr 1;103(3):38–40.
79. Narayanan D, Weinberg OK. How I investigate acute myeloid leukemia. *Int J Lab Hematol.* 2020 Feb 10;42(1):3–15.
80. Prada-Arismendy J, Arroyave JC, Röthlisberger S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. *Blood Rev.* 2017 Jan;31(1):63–76.
81. Medinger M, Lengerke C, Passweg J. Novel Prognostic and Therapeutic Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Genomics Proteomics.* 2016;13(5):317–29.
82. Suguna E, Farhana R, Kanimozhi E, Kumar PS, Kumaramanickavel G, Kumar CS. Acute Myeloid Leukemia: Diagnosis and Management Based on Current Molecular Genetics Approach. *Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets.* 2018 Oct 1;18(3):199–207.
83. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br J Haematol.* 1976 Aug;33(4):451–8.
84. Anak S, Uysal E. Akut Miyeloid Lösemi AML. *Journal.* 2012;12(4):153–8.
85. Abdel-Wahab O, Levine RL. Mutations in epigenetic modifiers in the pathogenesis and therapy of acute myeloid leukemia. *Blood.* 2013 May 2;121(18):3563–72.
86. Ono R, Taki T, Taketani T, Taniwaki M, Kobayashi H, Hayashi Y. LCX, leukemia-associated protein with a CXXC domain, is fused to MLL in acute myeloid leukemia with trilineage dysplasia having t(10;11)(q22;q23). *Cancer Res.* 2002 Jul 15;62(14):4075–80.

87. Pastor WA, Aravind L, Rao A. TETonic shift: Biological roles of TET proteins in DNA demethylation and transcription. Vol. 14, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013. p. 341–56.
88. Jiang S. Tet2 at the interface between cancer and immunity. Vol. 3, *Communications Biology*. Nature Research; 2020.
89. Nakajima H, Kunimoto H. TET2 as an epigenetic master regulator for normal and malignant hematopoiesis. Vol. 105, *Cancer science*. 2014. p. 1093–9.
90. Yucel B, Fural MA, Sonmez B, Bektas O, Sonmez M. Investigation of the association between tet2 expression and response to cape. *UHOD - Uluslararası Hematoloji-Onkoloji Dergisi*. 2021;31(3):146–52.
91. Kinney SRM, Pradhan S. Ten Eleven Translocation Enzymes and 5-Hydroxymethylation in Mammalian Development and Cancer. In 2013. p. 57–79.
92. Pasca S, Jurj A, Zdrenghia M, Tomuleasa C. The potential equivalents of tet2 mutations. Vol. 13, *Cancers*. MDPI AG; 2021.
93. Kunimoto H, Nakajima H. TET2: A cornerstone in normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Sci*. 2021 Jan 1;112(1):31–40.
94. Feng Y, Li X, Cassady K, Zou Z, Zhang X. TET2 function in hematopoietic malignancies, immune regulation, and DNA repair. *Front Oncol*. 2019;9(APR).
95. Li D, Guo B, Wu H, Tan L, Lu Q. TET Family of Dioxygenases: Crucial Roles and Underlying Mechanisms. Vol. 146, *Cytogenetic and Genome Research*. S. Karger AG; 2015. p. 171–80.
96. Langemeijer SMC, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*. 2009 Jul;41(7):838–42.
97. Delhommeau F, Dupont S, Valle V della, James C, Trannoy S, Massé A, et al. Mutation in TET2 in Myeloid Cancers. *New England Journal of Medicine*. 2009 May 28;360(22):2289–301.
98. Ko M, An J, Pastor WA, Koralov SB, Rajewsky K, Rao A. TET proteins and 5-methylcytosine oxidation in hematological cancers. *Immunol Rev*. 2015 Jan 1;263(1):6–21.
99. Cimmino L, Dolgalev I, Wang Y, Yoshimi A, Martin GH, Wang J, et al. Restoration of TET2 Function Blocks Aberrant Self-Renewal and Leukemia Progression. *Cell*. 2017 Sep 7;170(6):1079-1095.e20.
100. Zhang L, Padron E, Lancet J. The molecular basis and clinical significance of genetic mutations identified in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*. 2015 Jan;39(1):6–17.
101. Ferrone CK, Blydt-Hansen M, Rauh MJ. Age-Associated TET2 Mutations: Common Drivers of Myeloid Dysfunction, Cancer and Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan 17;21(2):626.
102. Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Becker H, et al. TET2 Mutations Improve the New European LeukemiaNet Risk Classification of Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2011 Apr 1;29(10):1373–81.

103. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, Garcia-Manero G, Patel J, Wadleigh M, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*. 2009 Jul 2;114(1):144–7.
104. Tulstrup M, Soerensen M, Hansen JW, Gillberg L, Needhamsen M, Kaastrup K, et al. TET2 mutations are associated with hypermethylation at key regulatory enhancers in normal and malignant hematopoiesis. *Nat Commun*. 2021 Oct 18;12(1):6061.
105. Wang J, He N, Wang R, Tian T, Han F, Zhong C, et al. Analysis of TET2 and EZH2 gene functions in chromosome instability in acute myeloid leukemia. *Sci Rep*. 2020 Feb 17;10(1):2706.
106. Wang L, Ozark PA, Smith ER, Zhao Z, Marshall SA, Rendleman EJ, et al. TET2 coactivates gene expression through demethylation of enhancers. *Sci Adv*. 2018 Nov 2;4(11).
107. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, et al. Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007 Dec 4;104(49):19345–50.
108. Gregory MA, Nemkov T, Park HJ, Zaberezhnyy V, Gehrke S, Adane B, et al. Targeting Glutamine Metabolism and Redox State for Leukemia Therapy. *Clinical Cancer Research*. 2019 Jul 1;25(13):4079–90.
109. Goto M, Miwa H, Shikami M, Tsunekawa-Imai N, Suganuma K, Mizuno S, et al. Importance of Glutamine Metabolism in Leukemia Cells by Energy Production Through TCA Cycle and by Redox Homeostasis. *Cancer Invest*. 2014 Jul 3;32(6):241–7.
110. Yuneva M, Zamboni N, Oefner P, Sachidanandam R, Lazebnik Y. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *Journal of Cell Biology*. 2007 Jul 2;178(1):93–105.
111. Ganguly BB, Kadam NN. Mutations of myelodysplastic syndromes (MDS): An update. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2016 Jul;769:47–62.
112. Singh B, Sarli VN, Kinne HE, Shamsnia A, Lucci A. Evaluation of 6-mercaptopurine in a cell culture model of adaptable triple-negative breast cancer with metastatic potential. *Oncotarget*. 2019 Jun 4;10(38):3681–93.
113. Lai AG, Forde D, Chang WH, Yuan F, Zhuang X, Orbegoza Rubio C, et al. Glucose and glutamine availability regulate HepG2 transcriptional responses to low oxygen. *Wellcome Open Res*. 2018 Sep 26;3:126.
114. Fan S, Wang Y, Zhang Z, Lu J, Wu Z, Shan Q, et al. High expression of glutamate-ammonia ligase is associated with unfavorable prognosis in patients with ovarian cancer. *J Cell Biochem*. 2018 Jul 25;119(7):6008–15.
115. Kung HN, Marks JR, Chi JT. Glutamine Synthetase Is a Genetic Determinant of Cell Type-Specific Glutamine Independence in Breast Epithelia. *PLoS Genet*. 2011 Aug 11;7(8):e1002229.
116. Bhingarkar A, Vangapandu H v., Rathod S, Hoshitsuki K, Fernandez CA. Amino Acid Metabolic Vulnerabilities in Acute and Chronic Myeloid Leukemias. *Front Oncol*. 2021 Jul 1;11.

117. Matre P, Velez J, Jacamo R, Qi Y, Su X, Cai T, et al. Inhibiting glutaminase in acute myeloid leukemia: metabolic dependency of selected AML subtypes. *Oncotarget*. 2016 Nov 29;7(48):79722–35.
118. Roh J, Im M, Chae Y, Kang J, Kim W. The Involvement of Long Non-Coding RNAs in Glutamine-Metabolic Reprogramming and Therapeutic Resistance in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2022 Nov 26;23(23):14808.
119. Masisi BK, el Ansari R, Alfarsi L, Rakha EA, Green AR, Craze ML. The role of glutaminase in cancer. *Histopathology*. 2020 Mar 18;76(4):498–508.
120. Zhang J, Wang C, Chen M, Cao J, Zhong Y, Chen L, et al. Epigenetic silencing of glutaminase 2 in human liver and colon cancers. *BMC Cancer*. 2013 Dec 14;13(1):601.
121. Yuneva MO, Fan TWM, Allen TD, Higashi RM, Ferraris DV, Tsukamoto T, et al. The Metabolic Profile of Tumors Depends on Both the Responsible Genetic Lesion and Tissue Type. *Cell Metab*. 2012 Feb;15(2):157–70.
122. Jin L, Li D, Alesi GN, Fan J, Kang HB, Lu Z, et al. Glutamate Dehydrogenase 1 Signals through Antioxidant Glutathione Peroxidase 1 to Regulate Redox Homeostasis and Tumor Growth. *Cancer Cell*. 2015 Feb;27(2):257–70.
123. Bröer A, Rahimi F, Bröer S. Deletion of Amino Acid Transporter ASCT2 (SLC1A5) Reveals an Essential Role for Transporters SNAT1 (SLC38A1) and SNAT2 (SLC38A2) to Sustain Glutaminolysis in Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2016 Jun;291(25):13194–205.
124. Li Y, Shao H, Da Z, Pan J, Fu B. High expression of SLC38A1 predicts poor prognosis in patients with de novo acute myeloid leukemia. *J Cell Physiol*. 2019 Nov 4;234(11):20322–8.
125. Zavorka Thomas ME, Lu X, Talebi Z, Jeon JY, Buelow DR, Gibson AA, et al. Gilteritinib Inhibits Glutamine Uptake and Utilization in FLT3-ITD - Positive AML. *Mol Cancer Ther*. 2021 Nov 1;20(11):2207–17.
126. Gauthier-Coles G, Bröer A, McLeod MD, George AJ, Hannan RD, Bröer S. Identification and characterization of a novel SNAT2 (SLC38A2) inhibitor reveals synergy with glucose transport inhibition in cancer cells. *Front Pharmacol*. 2022 Sep 21;13.
127. Morotti M, Zois CE, El-Ansari R, Craze ML, Rakha EA, Fan SJ, et al. Increased expression of glutamine transporter SNAT2/SLC38A2 promotes glutamine dependence and oxidative stress resistance, and is associated with worse prognosis in triple-negative breast cancer. *Br J Cancer*. 2021 Jan 19;124(2):494–505.
128. Kahya U, Köseer AS, Dubrovskaya A. Amino Acid Transporters on the Guard of Cell Genome and Epigenome. *Cancers (Basel)*. 2021 Jan 2;13(1):125.
129. Patil S, Sharma R, Sharma U, Padwad Y. AMPK and TET2 Signaling Pathway and their Natural Activators [Internet]. *Preprints.org*; 2022.
130. Zhang T, Guan X, Choi UL, Dong Q, Lam MMT, Zeng J, et al. Phosphorylation of TET2 by AMPK is indispensable in myogenic differentiation. *Epigenetics Chromatin*. 2019 Dec 4;12(1):32.

131. Wu D, Hu D, Chen H, Shi G, Fetahu IS, Wu F, et al. Glucose-regulated phosphorylation of TET2 by AMPK reveals a pathway linking diabetes to cancer. *Nature*. 2018 Jul 18;559(7715):637–41.
132. Zhang J, Kuang L, Li Y, Wang Q, Xu H, Liu J, et al. Metformin Regulates TET2 Expression to Inhibit Endometrial Carcinoma Proliferation: A New Mechanism. *Front Oncol*. 2022 Apr 11;12.

