



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Kanser Hücrelerinde Serin-Glisin Amino Asit  
Kısıtlamasının Moleküler İncelenmesi ve LC-MS/MS  
Yöntemi ile Metabolit Analizi**

Doktora Tezi

**Saniye Koç Ada**

Haziran 2024



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Kanser Hücrelerinde Serin-Glisin Amino Asit  
Kısıtlamasının Moleküler İncelenmesi ve LC-MS/MS  
Yöntemi ile Metabolit Analizi**

Doktora Tezi

**Saniye Koç Ada**

Danışman

**Prof.Dr. Mustafa Baki Çekmen**

Eş Danışman

**Doç.Dr. Burcu Yücel**

Haziran 2024

## TEZ JÜRİSİ ONAYI

Saniye Koç Ada tarafından hazırlanan " Kanser Hücrelerinde Serin-Glisin Amino Asit Kısıtlamasının Moleküler İncelenmesi ve LC-MS/MS Yöntemi ile Metabolit Analizi" başlıklı bu Doktora Tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

### **JÜRİ ÜYELERİ**

### **İMZA**

#### **Tez Danışmanı:**

Prof. Dr. Mustafa Baki Çekmen

Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi

#### **Eş Danışman:**

Doç.Dr. Burcu Yücel

Kurum: İstanbul Medeniyet Üniversitesi

#### **Üyeler:**

Prof.Dr. Ferruh K. İşman

Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Prof. Dr. Nilüfer Bayraktar

Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Prof. Dr. Alev Kural

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Berrin Öztaş

Kurumu: Kocaeli Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 10/06/2024

## **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 kaynak gösterme standartlarının bu tezde tutarlı olarak uygulandığı tarafımdan incelenerek teyit edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Mustafa Baki Çekmen

### **Etik İlkeler Sadakat Beyanı**

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

İmza

Saniye Koç Ada

# ÖZET

## Kanser Hücrelerinde Serin-Glisin Amino Asit Kısıtlamasının Moleküler İncelenmesi ve LC-MS/MS Yöntemi ile Metabolit Analizi

Ada Koç, Saniye

Doktora Tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa Baki Çekmen

Eş Tez Danışmanı: Doç. Dr. Burcu Yücel

Haziran, 2024

Kanser hücrelerinde metabolik yollar enerji üretimini artıracak şekilde yeniden düzenlenir. Kanser hücrelerinin metabolizmalarında rol alan biyokimyasal yolların aydınlanmasına karşın farklı fizyolojik durumlarda bu yollarla meydana gelen değişimlerin nasıl düzenlendiği halen bir araştırma konusudur. Ön sonuçlarımızda serin ve serin/glisin içermeyen besiyerlerinde çoğalamayan hücrelerde  $\gamma$ -glutamyl-hidrolaz (GGH) ekspresyonunun olmayışı bize GGH ekspresyonunun serin metabolizmasında da rolü olabileceğini düşündürmüştür. Bu çalışmada GGH ekspresyonunun serin besin kısıtlamasındaki rolünü ve terapötik anti-folatlarla verilen yanıtı *in vitro* koşullarda araştırılması amaçlandı.

GGH knock-out (KO) ve overeksprese (OE) izojenik hücre hatları elde ederek, serin, glisin ve serin/glisin içermeyen ortamda hücre çoğalmalarındaki farklılıklar hücre canlılık deneyi ile araştırıldı. GGH için izojenik hücre hatlarının 4 farklı besiyerinde metotreksat duyarlılıkları incelendi. PHGDH inhibitörü CBR-5884 ile serin endojen sentez inhibisyon deneyleri ile ekzojen ve endojen serin olmayışının hücre canlılığına etkisi değerlendirildi. Serin-glisin metabolizması ile ilgili bazı genlerin ekspresyonlarına bakıldı ve LC-MS/MS ile GGH KO hücre hatlarında 4 farklı besiyerinde metabolit analizi yapıldı.

Hücre canlılık seviyeleri serin bağımlı kontrol hücrelerine göre GGH KO hücre hatlarında serin içermeyen besiyerinde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde fazla idi. Serin bağımlı K562 GGH KO hücre hatlarında hücre canlılığını destekleyecek şekilde kontrol grubuna göre PHGDH gen ekspresyonu anlamlı olarak yüksek bulundu. CBR-5884 inhibitörü GGH KO olan hücrelerde hücre canlılığı anlamlı olarak daha da azalttı. Metabolit analizlerinde GGH KO hücrelerde kontrole göre metabolitlerin anlamlı olarak daha az olduğu bulundu.

Bulgularımız sonucunda; serin bağımlı hücrelerde GGH'nın serin-glisin metabolizmasında rolü olduğunu gösterdik. Bu hücrelerde GGH geninin silinmesi serin *de novo* sentezini arttırmıştır. Folatın hücre dışına gönderilememesi ve hücre proliferasyonunun artması onkojenik bir etki yaratmıştır.

**Anahtar Sözcükler:** Kanser, GGH, Serin-Glisin, Metotreksat, Metabolit

## ABSTRACT

### Molecular Investigation of Serine-Glycine Amino Acid Restriction and Metabolite Analysis by LC-MS/MS in Cancer Cells

Ada Koç, Saniye

Ph. D. Thesis in Department of Medical Biochemistry, School of Medicine

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa Baki Çekmen

Second Supervisor: Doç.Dr. Burcu Yücel

June, 2024

In cancer cells, metabolic pathways are reorganised to increase energy (ATP) production. Although the biochemical pathways involved in the metabolism of cancer cells have been elucidated, how these pathways are regulated in different physiological conditions is still a subject of research. In our preliminary results, the absence of GGH expression in cells that did not proliferate in serine and serine/glycine-free media suggested that GGH expression may also play a role in serine metabolism. In this study, we aimed to investigate the role of GGH expression in serine nutrient restriction and the response to therapeutic anti-folates in vitro.

GGH knock-out (KO) and overexpressed (OE) isogenic cell lines were obtained and the differences in cell proliferation in serine, glycine and serine/glycine-free medium were investigated by cell viability assay. Methotrexate sensitivity of isogenic cell lines for GGH was analysed in 4 different media. The effect of the absence of exogenous and endogenous serine on cell viability was evaluated by serine endogenous synthesis inhibition experiments with the PHGDH inhibitor CBR-5884. The expression of some genes related to serine-glycine metabolism was examined and metabolite analysis was performed by LC-MS/MS in GGH KO cell lines in 4 different media.

Cell viability levels were statistically significantly higher in serine-free medium in GGH KO cell lines compared to serine-dependent control cells. PHGDH gene expression was significantly higher in serine-dependent K562 GGH KO cell lines compared to the control group, supporting cell viability. CBR-5884 inhibitor significantly further reduced cell viability in GGH KO cells. Metabolite analyses showed that metabolites were significantly lower in GGH KO cells compared to control.

As a result of our findings; we showed that GGH has a role in serine-glycine metabolism in serine-dependent cells. Deletion of the GGH gene in these cells increased serine *de novo* synthesis. The inability to send folate out of the cell and increased cell proliferation created an oncogenic effect.

**Keywords:** Cancer, GGH, Serine-Glycine, Methotrexate, Metabolite

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürece uzun ve meşakkatli bir yolculuk, bu süreçte benim yanımda olup desteklerini her daim hissettiğim, yolumu güzelleştiren ve kolaylaştıran herkese tek tek gönülden teşekkürü bir borç bilirim.

Öncelikle hem yüksek lisans hem de doktorada değerli tez danışman hocam Prof. Dr. Mustafa Baki Çekmen 'e bu yolda kendimi geliştirmem için verdiği manevi desteğinden ve samimi, içten iletişim ve anlayışından dolayı çok teşekkür ederim.

İstanbul Medeniyet Üniversitesine geldikten sonra benim için en büyük şans olan, kendisinden hem akademik anlamda hem de hayata dair pek çok şey öğrendiğim, bana rehber ve öğretmen olan değerli eş danışman hocam Doç. Dr. Burcu Yücel'e en kalbi duygularıyla teşekkür ederim.

Deneyisel çalışmalarımı yürüttüğüm İstanbul Medeniyet Üniversitesi Bilim ve İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmayı finansal olarak destekleyen TÜBİTAK kurumuna çok teşekkür ederim (Bu tez 220S224 nolu Tübitak 1001 projesi ile desteklenmiştir).

Doktora tez çalışmasında LC-MS/MS metabolit analizlerinde bana yardımcı olan Dr. Ceren Sarı'ya çok teşekkür ederim.

Laboratuvarda hücre kültüründe bana destek olan İrem Ateş'e çok teşekkür ederim.

Tez yazım sürecinde bana destek olmaya çalışan kardeşim Sonay Koç'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte büyüdüğüm, bana yoldaş olan, her zaman yanımda olup, maddi manevi her türlü desteğini ve anlayışı sunan hayat arkadaşım, kıymetli eşim Serdar Ada'ya sonsuz sevgi ve şükranlarımla teşekkür ederim.

En son ama en büyük teşekkürü kendi küçük kalbi büyük olan benim ruhsal rehberim, hayat ışığım, hayatta en büyük güç kaynağım, laboratuvarda gece, gündüz, hafta içi, haftasonu, tatil demeden yanımda olup, bana koca yüreği ile anlayış gösterip yardımcı olan bal çocuğum Elen Güneş Ada'ya sonsuz sevgi ve şükranla en içten teşekkürlerimi sunarım.

## İTHAF

*Bu doktora tezini, doğduğu andan itibaren benim en büyük güç ve motivasyon kaynağım olan laboratuvarı büyüttüğüm canım kızım, gül çocuğum Elen Güneş Ada'ya ithaf ediyorum.*

|                                                                  |             |
|------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>TEZ JÜRİSİ ONAYI .....</b>                                    | <b>I</b>    |
| <b>BEYANLAR .....</b>                                            | <b>II</b>   |
| <b>ÖZET .....</b>                                                | <b>III</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                            | <b>IV</b>   |
| <b>TEŞEKKÜR .....</b>                                            | <b>V</b>    |
| <b>İTHAF .....</b>                                               | <b>VI</b>   |
| <b>İÇİNDEKİLER.....</b>                                          | <b>VII</b>  |
| <b>SİMGELER VE KISALTMALAR .....</b>                             | <b>VIII</b> |
| <b>TABLO LİSTESİ .....</b>                                       | <b>IX</b>   |
| <b>ŞEKİL LİSTESİ.....</b>                                        | <b>X</b>    |
| <b>1.GİRİŞ .....</b>                                             | <b>1</b>    |
| <b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>                                    | <b>4</b>    |
| 2.1. Kanser .....                                                | 4           |
| 2.1.1. Kanser Metabolizması .....                                | 9           |
| 2.1.1.2. Kanserde Serin-Glisin ve Tek Karbon Metabolizması ..... | 11          |
| 2.2. GGH Enzimi .....                                            | 15          |
| 2.3. Metabolomik Analizi.....                                    | 17          |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....</b>                               | <b>20</b>   |
| 3.1. Gereçler.....                                               | 20          |
| 3.1.1. Kimyasallar .....                                         | 20          |
| 3.1.2. Kitler.....                                               | 23          |
| 3.1.3. Cihazlar.....                                             | 23          |
| 3.1.4. Sarf Malzemeler .....                                     | 25          |
| 3.1.5. Solüsyonlar.....                                          | 25          |
| 3.1.5.1. Western Blotlama Solüsyonları .....                     | 25          |
| 3.2. Yöntem.....                                                 | 29          |

|                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2.1. Hücre Kültürü.....                                                                                                        | 29  |
| 3.2.1.1. Deneylerde Kullanılan Serin, Glisin, Serin+Glisin İçeren ve<br>İçermeyen Besiyerlerinin Hazırlanışı .....               | 29  |
| 3.2.2. Hücre Sayımı.....                                                                                                         | 31  |
| 3.2.3. Hücre Canlılığının ATP Seviyesinin Ölçülmesi ile Belirlenmesi .....                                                       | 31  |
| 3.2.4. RNA İzolasyonu .....                                                                                                      | 31  |
| 3.2.5. cDNA Sentezi.....                                                                                                         | 32  |
| 3.2.6. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) .....                                                                                  | 333 |
| 3.2.7. Protein İzolasyonu .....                                                                                                  | 34  |
| 3.2.7.1. Protein Konsantrasyonlarının Ölçülmesi.....                                                                             | 35  |
| 3.2.8. Western Blotlama .....                                                                                                    | 35  |
| 3.2.9. GGH Susturulmuş(Knock-Out) Hücre Hatlarının Eldesi .....                                                                  | 36  |
| 3.2.9.1. GGH KO için CRISPR/Cas9 Plazmitlerinin Hazırlanması .....                                                               | 36  |
| 3.2.9.2. Virüs Üretimi ve Transfeksiyon .....                                                                                    | 39  |
| 3.2.9.3. Tek Hücreden Klonlama Yöntemiyle GGH KO Hücrelerin Elde<br>Edilmesi.....                                                | 39  |
| 3.2.9.4. Plazmit izolasyonu (Miniprep).....                                                                                      | 40  |
| 3.2.9.5. DNA İzolasyonu .....                                                                                                    | 41  |
| 3.2.9.6. GGH Geninin Ekzon 1 Bölgesinin Çoğaltılması .....                                                                       | 41  |
| 3.2.10. GGH Eksprese Eden (Overekspresyon) Hücre Hatlarının Eldesi.....                                                          | 42  |
| 3.2.11. Hücrelerin Serin, Glisin ve Serin/Glisin İçermeyen Ortamda MTX ile<br>Muamele Edilmesi.....                              | 43  |
| 3.2.12. Hücrelerin Serin, Glisin ve Serin/Glisin İçermeyen Ortamda CBR-5884-<br>PHDHG Enzim İnhibitörü ile Muamele Edilmesi..... | 47  |
| 3.2.13. LC-MS/MS Metabolomik Analizi .....                                                                                       | 47  |
| 3.2.14. İstatistik Analizler .....                                                                                               | 49  |

|                                                                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>4. BULGULAR</b> .....                                                                                                                | 50  |
| 4.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatlarında Serin-Glisin ve Folat Metabolizması ile İlişkili Olan Genlerin <i>In Silico</i> Analizi..... | 50  |
| 4.2. İzojenik Hücre Hatlarının Hazırlanması ve Valide Edilmesi.....                                                                     | 59  |
| 4.2.1. GGH KO Hücre Hatlarının Validasyonu .....                                                                                        | 59  |
| 4.2.2. GGH OE Hücre Hatlarının Validasyonu .....                                                                                        | 71  |
| 4.3. Hücrelerin serin, glisin ve serin/ glisin içermeyen ortamda çoğalmalarının belirlenmesi.....                                       | 74  |
| 4.4. GGH KO hücre hatlarının serin, glisin ve serin/ glisin içermeyen ortamda MTX duyarlılıklarının araştırılması .....                 | 79  |
| 4.5. GGH KO Hücre Hatlarının Serin, Glisin ve Serin/ Glisin İçermeyen Ortamda CBR-5884/ PHGDH İnhibitör Etkisi .....                    | 83  |
| 4.6. Serin-Glisin Metabolizmasında Görevli PHGDH, SHMT1 ve SHMT2 Genlerin Ekspresyonlarının qRT-PCR ile Belirlenmesi.....               | 85  |
| 4.7. K562 GGH KO Hücre Hatlarının Metabolomik Analizi .....                                                                             | 88  |
| <b>5. TARTIŞMA</b> .....                                                                                                                | 99  |
| <b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b> .....                                                                                                       | 108 |
| <b>KAYNAKÇA</b> .....                                                                                                                   | 112 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                 |                                                           |
|-----------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>NEAA</b>     | Non-esansiyel amino asitler                               |
| <b>ETS</b>      | Elektron transport sistemi                                |
| <b>NOX</b>      | NADPH oksidaz                                             |
| <b>FPGS</b>     | Folat poliglutamat sentetaz                               |
| <b>GGH</b>      | $\gamma$ -glutamil-hidrolaz                               |
| <b>CRISPR</b>   | Düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar |
| <b>crRNA</b>    | CRISPR RNA                                                |
| <b>tracrRNA</b> | Trans-aktif edici crRNA                                   |
| <b>sgRNA</b>    | Tek rehber RNA                                            |
| <b>PAM</b>      | Protospacer bitişik motif                                 |
| <b>DSB</b>      | Bağlanıp çift iplik kırığı                                |
| <b>NHEJ</b>     | Homolog olmayan uç birleştirme                            |
| <b>HDR</b>      | Homolojiye yönelik onarım                                 |
| <b>CRC</b>      | Kolorektal kanserini                                      |
| <b>OxPhos</b>   | Oksidatif fosforilasyonu                                  |
| <b>HIF-1</b>    | Hipoksi ile indüklenebilir faktör-1                       |
| <b>PTEN</b>     | Fosfataz ve tensin homologu                               |
| <b>PHDGH</b>    | Fosfogliserat dehidrojenaz                                |
| <b>PSAT1</b>    | Fosfoserin aminotransferaz 1                              |
| <b>PSPH</b>     | Fosfoserin fosfataz                                       |
| <b>SHMT</b>     | Serin metiltransferazlar                                  |
| <b>PCFT</b>     | Protona bağlı folat transportur                           |
| <b>RFC</b>      | İndirgenmiş folat taşıyıcısı                              |
| <b>DHFR</b>     | Dihidrofolat redüktaz                                     |
| <b>THF</b>      | Tetrahidrofolat                                           |
| <b>me-THF</b>   | 5, 10-metilentetrahidrofolat                              |
| <b>MTHFD</b>    | Metilentetrahidrofolat dehidrojenaz                       |

|                                |                                               |
|--------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>FTHF</b>                    | 10-formiltetrahidrofolata                     |
| <b>MTHFR</b>                   | Metilentetrahidrofolat redüktaz               |
| <b>mTHF</b>                    | 5-metiltetrahidrofolat                        |
| <b>MAT</b>                     | Metiyonin adenozin transferaz                 |
| <b>SAM</b>                     | S-adenozilmetiyonin                           |
| <b>SAH</b>                     | S-adenosil homosistein                        |
| <b>dTMP</b>                    | Deoksitimidin monofosfatın                    |
| <b>IMP</b>                     | İnozin monofosfatın                           |
| <b>GMP</b>                     | Guanozin monofosfat                           |
| <b>AMP</b>                     | Adenozin monofosfata                          |
| <b>eIF2<math>\alpha</math></b> | Ökaryotik başlangıç faktörü 2 $\alpha$        |
| <b>MTX</b>                     | Metotreksat                                   |
| <b>ALL</b>                     | Akut lenfoblastik lösemi                      |
| <b>DDATHF</b>                  | 5,10-dideazatetrahidrofolat                   |
| <b>TS</b>                      | Timidilat Sentazı                             |
| <b>MTHFR</b>                   | Metilenetetrahidrofolat Redüktaz              |
| <b>MTHFD1</b>                  | Metilenetetrahidrofolat Dehidrogenaz 1        |
| <b>MS/MTRR</b>                 | Metiyonin Sentaz/Redüktaz                     |
| <b>GC</b>                      | Gaz kromatografisine                          |
| <b>LC</b>                      | Likit kromatografisine                        |
| <b>NMR</b>                     | Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi      |
| <b>MS</b>                      | Kütle spektrometresi                          |
| <b>HPLC</b>                    | Yüksek performanslı sıvı kromatografisi       |
| <b>UHPLC</b>                   | Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi |
| <b>BCA</b>                     | Bikinkoninik asit                             |
| <b>cDNA</b>                    | Tamamlayıcı DNA                               |
| <b>CTRL</b>                    | Kontrol                                       |
| <b>DAB</b>                     | 3,3'-Diaminobenzidin                          |
| <b>DAPI</b>                    | 4',6-diamidino-2-fenilindol                   |

|                        |                                                    |
|------------------------|----------------------------------------------------|
| <b>dH<sub>2</sub>O</b> | Distile su                                         |
| <b>DMEM</b>            | Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle medyumunu      |
| <b>DMSO</b>            | Dimetilsülfoksit                                   |
| <b>DNA</b>             | Deoksiribonükleik asit                             |
| <b>ECL</b>             | Artırılmış kemilüminesans                          |
| <b>EDTA</b>            | Etilendiamin tetraasetik asit                      |
| <b>FBS</b>             | Fetal bovin serum                                  |
| <b>PBS</b>             | Fosfat tamponlu salin                              |
| <b>PCR</b>             | Polimeraz zincir reaksiyonu                        |
| <b>Pen/Strep</b>       | Penisilin/Streptomisin                             |
| <b>PVDF</b>            | Polivinilidin florür                               |
| <b>qRT-PCR</b>         | Kantitatif gerçek zamanlı ters transkripsiyon PCR  |
| <b>RIPA</b>            | Radyo immünopresipitasyon tayini                   |
| <b>RNA</b>             | Ribonükleik asit                                   |
| <b>RPLP0</b>           | 60S asidik ribozomal protein P0                    |
| <b>RPM</b>             | Dakikadaki devir sayısı                            |
| <b>SDS</b>             | Sodyum dodesil sülfat                              |
| <b>SDS-PAGE</b>        | SDS- poliakrilamid jel elektroforezi               |
| <b>TBS-T</b>           | %0,1 Tween'li tris tamponlu salin                  |
| <b>TEMED</b>           | Tetrametiletildiamin                               |
| <b>SSP</b>             | Serin Sentez Yolu                                  |
| <b>nTPM</b>            | Milyon başına transkript                           |
| <b>d-2HG</b>           | d-2-hidroksiglutarata                              |
| <b>5-FU</b>            | 5- Florourasil                                     |
| <b>KO</b>              | Knock-Out                                          |
| <b>NADH</b>            | nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) + hydrogen |

## TABLO LİSTESİ

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> Çalışmada kullanılan Kimyasallar .....                                                                  | 20 |
| <b>Tablo 2.</b> Çalışmada kullanılan Kitler .....                                                                       | 23 |
| <b>Tablo 3.</b> Çalışmada kullanılan Cihazlar .....                                                                     | 23 |
| <b>Tablo 4.</b> Çalışmada kullanılan Sarf Malzemeler .....                                                              | 25 |
| <b>Tablo 5.</b> 5x Protein yükleme boyası (22.5 ml, pH 6,8) .....                                                       | 25 |
| <b>Tablo 6.</b> %10 IGEPAL CA-630 (100 ml) .....                                                                        | 26 |
| <b>Tablo 7.</b> 0,5 M EDTA (100 ml, pH 8,0) .....                                                                       | 26 |
| <b>Tablo 8.</b> 0,5 M HEPES (500 ml, pH 7,4) .....                                                                      | 26 |
| <b>Tablo 9.</b> RIPA protein izolasyonu lizis solüsyonu (250 ml) .....                                                  | 26 |
| <b>Tablo 10.</b> 10X SDS jel yürütme solüsyonu (1 L) .....                                                              | 27 |
| <b>Tablo 11.</b> 10X TBS-T yıkama solüsyonu (1 L, pH 7,6) .....                                                         | 27 |
| <b>Tablo 12.</b> Transfer tampon solüsyonu (1,5 L) .....                                                                | 27 |
| <b>Tablo 13.</b> Bloklama & antikör dilüsyon solüsyonu (100 ml) .....                                                   | 28 |
| <b>Tablo 14.</b> Membran yeniden kazanım solüsyonu (50 ml) .....                                                        | 28 |
| <b>Tablo 15.</b> Çalışmada kullanılan Hücre hatları .....                                                               | 29 |
| <b>Tablo 16.</b> Deneylerde Kullanılan Besiyerleri (Yukarıda hazırlanan MEM besiyerinin üzerine eklenenler) .....       | 30 |
| <b>Tablo 17.</b> Deneyde Kullanılan Hücre Hatları ve Besiyerleri. (OE: Overekspresyon KO: Knock-Out) .....              | 30 |
| <b>Tablo 18.</b> cDNA sentezi için kullanılan kitin protokolü .....                                                     | 33 |
| <b>Tablo 19.</b> qRT-PCR için kullanılan kitin protokolü .....                                                          | 33 |
| <b>Tablo 20.</b> qRT-PCR Koşulları .....                                                                                | 34 |
| <b>Tablo 21.</b> qRT-PCR primer listesi .....                                                                           | 34 |
| <b>Tablo 22.</b> sgRNA oligonükleotid dizileri .....                                                                    | 37 |
| <b>Tablo 23.</b> BbsI restriksiyon endonükleazı ile kesim protokolü .....                                               | 38 |
| <b>Tablo 24.</b> sgRNA'ların bağlanması (annealing) .....                                                               | 38 |
| <b>Tablo 25.</b> sgRNA'ların bağlanma koşulları .....                                                                   | 39 |
| <b>Tablo 26.</b> sgRNA'lar ile vektörün ligasyon protokolü .....                                                        | 39 |
| <b>Tablo 27.</b> 6 well plate için XtremeGene 9 transfeksiyon karışımı .....                                            | 40 |
| <b>Tablo 28.</b> GGH Genine ait Ekzon 1 Bölgesi için tasarlanmış primer dizileri .....                                  | 44 |
| <b>Tablo 29.</b> GGH Ekzon 1 Bölgesi için PCR karışımı .....                                                            | 44 |
| <b>Tablo 30.</b> GGH Ekzon 1 Bölgesi için PCR Koşulları .....                                                           | 44 |
| <b>Tablo 31.</b> GGH Genine ait PCR içeriği ve koşulları .....                                                          | 45 |
| <b>Tablo 32.</b> GGH Geninin Klonlanmasında Kullanılan Primerlerin Listesi. ....                                        | 46 |
| <b>Tablo 33.</b> Klonlama çalışmalarında kullanılan vektör ve kesim enzimlerinin listesi .....                          | 48 |
| <b>Tablo 34.</b> LC-MS/MS'de ilk yöntemde tespit edilen moleküllerden bazıları .....                                    | 90 |
| <b>Tablo 35.</b> Farklı besiyerlerindeki hücre hatlarında çözücü ve uçurulma etkisini gösteren metabolit sayıları ..... | 91 |

## ŞEKİL LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Yeni eklemeler ile kanserin ayırt edici özellikleri (14).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 5  |
| Şekil 2. Bakterilerde CRISPR aracılı bağışıklık mekanizması (20) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 6  |
| Şekil 3. CRISPR/Cas9 teknolojisi ile kanser modellemesine genel bakış (37).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 9  |
| Şekil 4. Serin-glisin biyosentez yolu (52).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 11 |
| Şekil 5. Hayvanlarda serin, kolin, treonin ve 4-hidroksiprolin'den glisinin sentezi (51). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 12 |
| Şekil 6. Serin ve glisin sentezi ve bir karbon metabolizması çıktıları (56).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 13 |
| Şekil 7. Folik asit (üstte) ve metotreksatın (altta) yapıları ( Dikey oklarla gösterilen kesim bölgeleri , (H) insan) (67).....                                                                                                                                                                                                                                                          | 16 |
| Şekil 8. MTX ve folat metabolizmasında önemli taşıyıcılar ve enzimler (68).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 17 |
| Şekil 9. LC-MS/MS Tabanlı Metabolomik İş Akışı ( Görsel BioRender.com üzerinden oluşturuldu).....                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 18 |
| Şekil 10. CRISPR/Cas9 için kullanılan lentiCRISPR v2 plazmitinin Haritası (Addgene.com'dan alınmıştır) (75) .....                                                                                                                                                                                                                                                                        | 38 |
| Şekil 11. Tek hücre seçimi için dikey ve yatay dilüsyonu gösteren plate düzeni (5).. .....                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 42 |
| Şekil 12. GGH Ekspresyonu için Kullanılan Ekspresyon Vektörlerinin Haritaları (5).. .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 46 |
| Şekil 13. Farklı hücre hatlarıyla birlikte Kato III ve U937 hücre hattında GGH mRNA ekspresyonunun doğrulanması .....                                                                                                                                                                                                                                                                    | 54 |
| Şekil 14. Çalışmalarda kullanılan hücre hatlarında folat metabolizmasında görevli enzimlerin The Human Protein Atlas veri tabanından yararlanılarak çizilen gen ekspresyon profilleri. ( <a href="https://www.proteinatlas.org/">https://www.proteinatlas.org/</a> ) (76) A., B., C., D. GGH, FPGS, DHFR, DHFR2 genlerinin hücre hatlarındaki ifadelerinin karşılaştırma grafikleri..... | 55 |
| Şekil 15. 4 Farklı hücre hattında folat taşıyıcısı proteinlerin SLC19A1, SLC46A1, SLC25A32 ve FOLR1 reseptörünün gen ekspresyon profilleri.....                                                                                                                                                                                                                                          | 56 |
| Şekil 16. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan hücre hatlarında serin-glisin amino asit metabolizması ile ilgili önemli enzimlerin in silico gen ifadelerinin gösterimi. ....                                                                                                                                                                                                                | 58 |
| Şekil 17. LentiCRISPR V2-sgRNA dizi analizi sonuçları. a) 1F, b)2F, c)3F, d)4F...62                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
| Şekil 18. CRISPR/Cas9 ile GGH susturulmuş hücre hatlarının validasyonu. K562 ve HGC27 hücre hatlarında viral transfeksiyon sonrası seçilen kolonilerin tamamen knockout (KO) olup olmadıkları Western Blot ile doğrulanması. İki basamaklı ifadelerde ilk rakam sgRNA numarası, ikinci rakam seçilen klon numarasıdır. İlk K562 hücre hattı Western Blotında protein eşitlemesi          |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| olmamasından klonlar seçilirken total proteini yüksek olanlar dikkate alınmıştır. Seçilen hücreler kalınlaştırılarak belirtilmiştir .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 64 |
| <b>Şekil 19.</b> A) K562 sg 2-2 GGH Ekzon 1 Sekansı. B) K562 sg 3-2 GGH Ekzon 1 Sekansı. C) K562 sg ctrl GGH Ekzon 1 Sekansı. D) Hgc27 sg1-2 GGH Ekzon 1 Sekansı. E) Hgc27 sg3-6 GGH Ekzon 1 Sekansı.F) Hgc27 sg ctrl GGH Ekson 1 Sekansı. Sarı arka planı olan kısım PCR ile çoğalttığımız bölgedir. Siyah kalın işaretli kısım delesyonun olduğu kısımdır. Kırmızı ile işaretli olanlar ise Ekzon 1 de eşleşen dizilerdir.....                                                               | 70 |
| <b>Şekil 20.</b> Deneylerde Kullanılacak Hücre hatlarının Western Blot Validasyonu. K562 ve Hgc27 hücre hatlarında GGH birincil antikoru 1:2000, ikincil antikoru anti-rabbit 1:5000 oranlarında kullanıldı.....                                                                                                                                                                                                                                                                               | 71 |
| <b>Şekil 21.</b> GGH kodlayan bölgenin PCR ile çoğaltılması. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 71 |
| <b>Şekil 22.</b> pMXS-blast-GGH vektörünün klonlamanın doğrulanması için yapılan diagnostik Restriksiyon sonucu agaroz jel görüntüsü. BamHI, HindIII enzim kesimleri yapıldı. Örnekler sırasıyla; ladder, kesilmemiş pMXS-GGH vektörü, kesilmiş pMXS-GGH koloni-1, cut pMXS-GGH koloni-2 vektörleri. ....                                                                                                                                                                                      | 72 |
| <b>Şekil 23.</b> pMXS-GGH Vektörün GGH Forward Primerinin Snapgene’de Gösterimi. Mavi ile işaretlenmiş bölge GGH geninin başlangıcını göstermektedir. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 72 |
| <b>Şekil 24.</b> pMXS-GGH plazmit sekansı.NCBI-Blast yüklendiğinde sekans dizisi GGH transkripti ile %96.6 oranın eşlendiği gösterilmiştir .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 73 |
| <b>Şekil 25.</b> pLENTİ-ef1alpha-GGH plazmit sekansı. NCBI-BLAST yüklendiğinde sekans dizisi GGH transkripti ile %99.4 oranın eşlendiği gösterilmiştir.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 73 |
| <b>Şekil 26.</b> Kato III ve U-937 hücre hattı GGH Overekspresyon Validasyonu A. Kato III hücre hattında pLENTİ-ef1alpha-GGH vektörünün antibiyotik öncesi 48. Saatte 10X’de GFP sinyali. B.Kato3 ve U-937 GGH Overekspresyonu Western Blot Validasyonu.....                                                                                                                                                                                                                                   | 74 |
| <b>Şekil 27.</b> K562, K562 GGH KO sg 2-2, sg3-2 ve K562 sgctrl hatlarının serin-glisin, serin, glisin ve serin-glisin olmayan besiyerlerindeki rölatif hücre sayımı grafiği. ** p<0.001, *** p<0.0001. Data mean±SD olarak sunuldu. ....                                                                                                                                                                                                                                                      | 74 |
| <b>Şekil 28.</b> K562 GGH KO hücre hatlarının rölatif hücre canlılık grafikleri. A. 15.5 mM Glukoz konsantrasyonunda K562 GGH KO hücre hatlarının hücre canlılığı. B. 5.5 mM Glukoz konsantrasyonunda K562 GGH KO hücre hatlarının hücre canlılığı. Data mean±SD olarak sunuldu. ** p<0.001, *** p<0.0001, **** p<0.00001 kontrol grubu serin -, glisin + besiyeri ile karşılaştırıldığında, +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.00001 serin ve glisin içermeyen besiyeri ile karşılaştırıldığında)..... | 75 |
| <b>Şekil 29.</b> HGC27 GGH KO sg 1-2, sg3-6 ve kontrol hücre hatlarının serin-glisin, serin, glisin ve serin-glisin olmayan besiyerlerindeki hücre proliferasyon grafiği. A. 5.5 mM Glukoz konsantrasyonunda HGC27 GGH KO hücre hatlarının hücre canlılığı. B. 15.5 mM Glukoz konsantrasyonunda HGC27 GGH KO hücre hatlarının hücre canlılığı.....                                                                                                                                             | 76 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 30.</b> A. Kato III ve Kato III GGH OE hücre hatlarının serin-glisin, serin, glisin ve serin-glisin olmayan besiyerlerindeki hücre proliferasyon grafiği. B. U-937 ve U-937 GGH OE hücre hatlarının serin-glisin, serin, glisin ve serin-glisin olmayan besiyerlerindeki hücre proliferasyon grafiği. Data mean±SD olarak sunuldu. ** p<0.001 .....                                                                  | 77 |
| <b>Şekil 31.</b> K562 hücre hattında farklı dozlarda MTX ilaç uygulaması sonucu hücre canlılık grafiği. Data mean±SD olarak sunuldu. **** p<0.00001.....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 78 |
| <b>Şekil 32.</b> K562 hücre hattının 4 farklı besiyerindeki MTX ilaç yanıtı. Data mean±SD olarak sunuldu. ** p<0.01**** p<0.00001. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 79 |
| <b>Şekil 33.</b> A. U-937 hücre hattında farklı dozlarda MTX ilaç uygulaması sonucu hücre canlılık grafiği B. U-937 hücre hattının 4 farklı besiyerindeki MTX ilaç yanıtı. Data mean±SD olarak sunuldu. **** p<0.00001.....                                                                                                                                                                                                   | 81 |
| <b>Şekil 34.</b> K562 GGH KO hücre hatlarının 4 farklı besiyerindeki MTX ilaç yanıtı. A., B., C., D. Serin +, glisin +, serin +, glisin -, serin -, glisin +, serin -, glisin - besiyerlerinde 3 hücre hattının 6 farklı MTX konsantrasyonunda Rölatif hücre canlılığı grafiği.Data mean±SD olarak sunuldu. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.0001, **** p<0.00001.(Alttaki şekil). ....                                           | 81 |
| <b>Şekil 35.</b> K562 GGH KO hücre hatlarının 4 farklı besiyerindeki CBR-5884 PHGDH inhibitörüne yanıtı. A. K562 hücre hattında CBR-5884 inhibitörünün IC50 % inhibisyon grafiği B., C., D. E. Serin +, glisin +, serin +, glisin -, serin -, glisin +, serin -, glisin - besiyerlerinde 3 hücre hattının 13 µM konsantrasyonunda Rölatif hücre canlılığı grafiği. Data mean±SEM olarak sunuldu. p<0.01, **** p<0.00001. .... | 84 |
| <b>Şekil 36.</b> K562 GGH KO hücre hatlarında 4 farklı besiyerinde A., B., C., PHGDH, SHMT1, SHMT2 genlerinin rölatif mRNA ekspresyon grafiği. Data mean±SEM olarak sunuldu. *p<0.05, *** p<0.0001, **** p<0.00001.. ....                                                                                                                                                                                                     | 86 |
| <b>Şekil 37.</b> HGC27 GGH KO hücre hatlarında 4 farklı besiyerinde A., B., C., PHGDH, SHMT1, SHMT2 genlerinin rölatif mRNA ekspresyon grafiği. Data mean±SEM olarak sunuldu. *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.0001.....                                                                                                                                                                                                           | 89 |
| <b>Şekil 38.</b> K562 GGH KO hücre hattı serilerinde glikolitik yolla bağlantılı bazı metabolitlerin normalize pik alanları Data mean±SD olarak sunuldu. *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.0001, **** p<0.00001 (Alt sayfadaki şekil). ....                                                                                                                                                                                         | 93 |
| <b>Şekil 39.</b> Şekil 39: K562 GGH KO hücre hattı serilerinde bazı amino asitlerin normalize pik alanları. Data mean±SD olarak sunuldu. *p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.0001, **** p<0.00001. ....                                                                                                                                                                                                                               | 96 |
| <b>Şekil 40.</b> K562 GGH KO hücre hattı serilerinde malik asit/glutamik asit normalize pik alan oranları. Data mean±SD olarak sunuldu. *p<0.05, ** p<0.01.....                                                                                                                                                                                                                                                               | 96 |
| <b>Şekil 41.</b> K562 GGH KO hücre hattı serilerinde nükleotid bazlarının normalize pik alanları. Data mean±SD olarak sunuldu. *p<0.05, ** p<0.01. (Alttaki Şekil) .....                                                                                                                                                                                                                                                      | 96 |

|                                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Şekil 42.</b> K562 GGH KO hücre hattı serilerinde enerji moleküllerinin normalize pik alanları. Data mean±SD olarak sunuldu. Kontrol ile karşılaştırıldığında,*p<0.05, *** p<0.0001, **** p<0.00001.....                                           | 99  |
| <b>Şekil 43.</b> K562 GGH KO hücre hattı serilerinde malik asit/ glutamik asit normalize pik alan oranları. Data mean±SD olarak sunuldu. Kontrol grubuna göre** p<0.01. ....                                                                          | 99  |
| <b>Şekil 44.</b> K562 GGH KO hücre hattı serilerinde A.,B., C., NADH, SAM, Glutasyon moleküllerinin normalize pik alanları. Data mean±SD olarak sunuldu. Kontrol ile karşılaştırıldığında,*p<0.05, *** p<0.0001, **** p<0.00001. (Alttaki şekil)..... | 99  |
| <b>Şekil 45.</b> K562 Kontrol grubuna ait bazı moleküllerin 4 farklı besiyerinde 3'lü tekrarları ile birlikte karşılaştırmalı kromotogramları(a10:serin-,glisin-, a11:serin-,glisin+, a12:serin+,glisin-, a9:serin+,glisin+) .....                    | 99  |
| <b>Şekil 46.</b> GGH proteine ait diğer fonksiyonel ve fiziksel etkileşimi olduğu protein etkileşim ağı (STRING veritabanında alınmıştır) (103). ....                                                                                                 | 108 |

## 1.GİRİŞ

Kanser, normal büyüme ve farklılaşmayı sağlayan mekanizmalardaki bozunum sonucu değişime uğramış bir hücrenin kontrolsüz çoğalmasıyla gelişen bir hastalıktır (1). Kanserli hücreler sahip oldukları genetik mutasyonlar nedeniyle hücre döngüsü kontrol mekanizmalarına yakalanmazlar ve apoptozdan kurtularak kontrolsüz biçimde çoğalırlar (2). Bu nedenle kanser, hücrelerin genetik bir hastalığı olarak da tanımlanır.

Pek çok kanser hücrelerinin esansiyel olmayan (non-esansiyel) amino asitleri (NEAA) farklı metabolik yollarla *de novo* sentezleyebilmelerine rağmen çoğalabilmeleri için bazı NEAA'ların dışarıdan eksojen alımına bağımlı oldukları gösterilmiştir (3). Bu bağımlılıkların altında farklı nedenler yatmaktadır. İlki *de novo* sentez ile üretilen amino asit miktarının çoğalan hücre için yetersiz gelmesidir. İkinci bir neden bazı kanser türlerinde sentez basamaklarında görevli anahtar enzimlerin farklı mutasyonlar sonucu işlev görememesidir. Böylece sentez gerçekleşemez (4). Bazı durumlarda ise artmış *de novo* amino asit sentezi olması kanser hücrelerini eksojen alıma daha az bağımlı yapmasına karşın bu kez hücre içerisinde meydana gelen bu endojen değişikliğe bağımlı hale gelirler. NEAA'lar protein sentezine katkılarının yanı sıra enerji üretimi, diğer amino asitlerin, lipidlerin ve nükleik asitlerin sentezi için karbon ve nitrojen kaynağıdır. Antioksidan savunma mekanizmasına da katkı sağlamaktadır (5). Kanser hücrelerinin çoğalmak için neden bazı NEAA'lara bağımlı olduklarının araştırılması yeni ilaç hedeflerinin geliştirilebilmesi için son yıllarda önem kazanmıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile farklı kanser hücre türlerinin çoğalmak için eksojen serin amino asit alımına bağımlı olduğu bilinmektedir. Serin depleksyonu yapılan ortamda kanser hücre çoğalmasının *in vitro* ve *in vivo* koşullarda azaldığı gösterilmiştir (6). Bir NEAA olan serin hücre içerisine farklı sayıda transport proteinler ile alınabildiği gibi *de novo* olarak da sentezlenmektedir. *De novo* sentezin serin miktarına önemli katkı yaptığı *in vivo* çalışmalarla gösterilmiştir (3). Hücre kültüründe kanser hücrelerinin artmış

eksojen serin tüketimleri tespit edilmiş ve serin içermeyen besiyerinde çoğaltıldıklarında hücre içerisindeki serin miktarında önemli bir oranda azalış belirlenmiştir. Bu koşullarda hücrelerin proliferasyonunun yavaşladığı ve metabolizmalarını adapte edebilmek için *de novo* serin sentezini artırdıkları görülmüştür (7).

Serin pek çok molekülün biyosentezinin merkezinde yer alır. Non-esansiyel amino asitler glisin ve sistein prekürsörüdür. Böylece dolaylı olarak glutatyon üretimine de katkı sağlar. Membran fosfolipidleri sfingolipid, fosfotidilserin, fosfotidiletanolamin ve fosfotidilkolin üretiminde görev alır. Tek karbon metabolizması aracılığı ile serin, folat döngüsü için en önemli tek karbon kaynağıdır. Diğer kaynaklar ise glisin, kolin, betain, sarkozin, histidin ve triptofan katabolizması ile üretilen formattır (4,5). Folat döngüsü NADPH ve NADH gibi kofaktörler ile ATP üretimine katkıda bulunur. Folat metabolizması hem sitozol hem de mitokondride birbirine oldukça yakın ancak farklı enzimler tarafından yürütülür. Farklı hücre hatları ve maya hücrelerinde yapılan çalışmalarda sitozolik tek karbon gruplarının çoğunlukla mitokondriyal serin katabolizmasından geldiği gösterilmiştir. Mitokondriyal folat döngüsünde NADH ve NADPH seviyesinin sabit tutulması sağlanır ve böylece elektron transport sistemi (ETS) ile ATP üretimine katkı sağlanır. Sitozolik NADPH üretimi ile özellikle kanser hücrelerinde redoks regülasyonu, lipid sentezi, NADPH oksidaz (NOX) sinyal sistemine katkı sağlanarak hücre proliferasyonu desteklenir. Folat metabolizması ayrıca pürin biyosentezi, mitokondriyal protein translasyonu ve methionin rejenerasyonunda görev alır. Metabolik yolların tüm bileşenleri tanımlanmış olmasına karşın metabolik akışın ne şekilde hangi mekanizmalar ile düzenlendiği halen araştırma konusudur. Bununla birlikte folat metabolizmasının halen bazı bileşenleri ve fonksiyonları tanımlanamamıştır (3,8).

Folat hücre içerisine plazma membranında yer alan SLC19A1 ve SLC46A1 transmembran taşıyıcılar ve FOLR1-1 reseptörü ile alınır. Folat hücre içerisine folat monoglutamat alınır ve dolaşımda bu şekilde bulunur. Ancak hücre içerisinde folatın tutulup folat bağımlı enzimlerin çalışabilmesi için polyglutamat eklenmesi

gerekir. Bu işlem sitozolde folat polyglutamat sentetaz (FPGS) tarafından gerçekleştirilir. Folat polyglutamat hücre dışına çıkarılamaz. Hücre dışına folat verilebilmesi için yeniden monoglutamat haline getirilmesi gerekir (8). Folatın monoglutamatlı haline gelmesinde (folat deglutamasyonu) görevli bilinen tek enzim  $\gamma$ -glutamil-hidrolaz (GGH)'dir. GGH hücre içerisinde lizozomda lokalizedir ve bazı durumlarda ekstraselüler ortama salındığı da gösterilmiştir (9). GGH'ın folat deglutamasyonundaki rolüyle uyumlu olarak hepatoselüler kanser hücre hatlarında GGH ekspresyonunun artmasıyla hücre içi folat dağılımının değiştiği, daha kısa folat polyglutamat zincirlerinin varlığı gösterilmiştir (10).

GGH geni 8. kromozomun uzun kolunda lokalizedir. Farklı dokulardan elde edilen cDNA analizlerinde tek bir transkripti olduğu bildirilmiştir. Hemen hemen her dokuda farklı miktarlarda eksprese olmaktadır. Artmış GGH ekspresyonu meme kanseri (11) ve prostat kanserinde (12) kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. TCGA veri tabanında yapılan analizlerde ise endometrium ve akciğer kanserlerinde de kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur.

Ön deneylerimizde serin ve serin/glisin içermeyen besiyerinde çoğalamayan hücrelerde GGH ekspresyonunun az olması ya da olmayışı bize GGH ekspresyonunun serin metabolizmasında da rolü olabileceğini düşündürmüştür. Bu düşünceden yola çıkarak GGH ekspresyonunun serin besin kısıtlamasındaki rolünü ve terapötik anti-folatlarla verilen yanıtı *in vitro* koşullarda araştırmayı planladık. Sunulan bu tez çalışmasındaki amacımız kanser hücrelerinde GGH ekspresyonunun serin-glisin besin kısıtlamasına bağlı hücre içindeki değişimleri izlemektir. Bu doğrultuda GGH knockout ve overeksprese izojenik hücre hatları elde edip serin, glisin ve serin/glisin içermeyen ortamlarda hücre çoğalmalarını inceledi ve GGH ekspresyonunun serin olmayan ortamdaki hücresel rolünü daha detaylı anlamak için metabolit analizi yapıldı. Metabolitlerin miktarı likit kromatografi ile entegre kütle spektrometresi ile belirlendi.

## 2. GENEL BİLGİLER

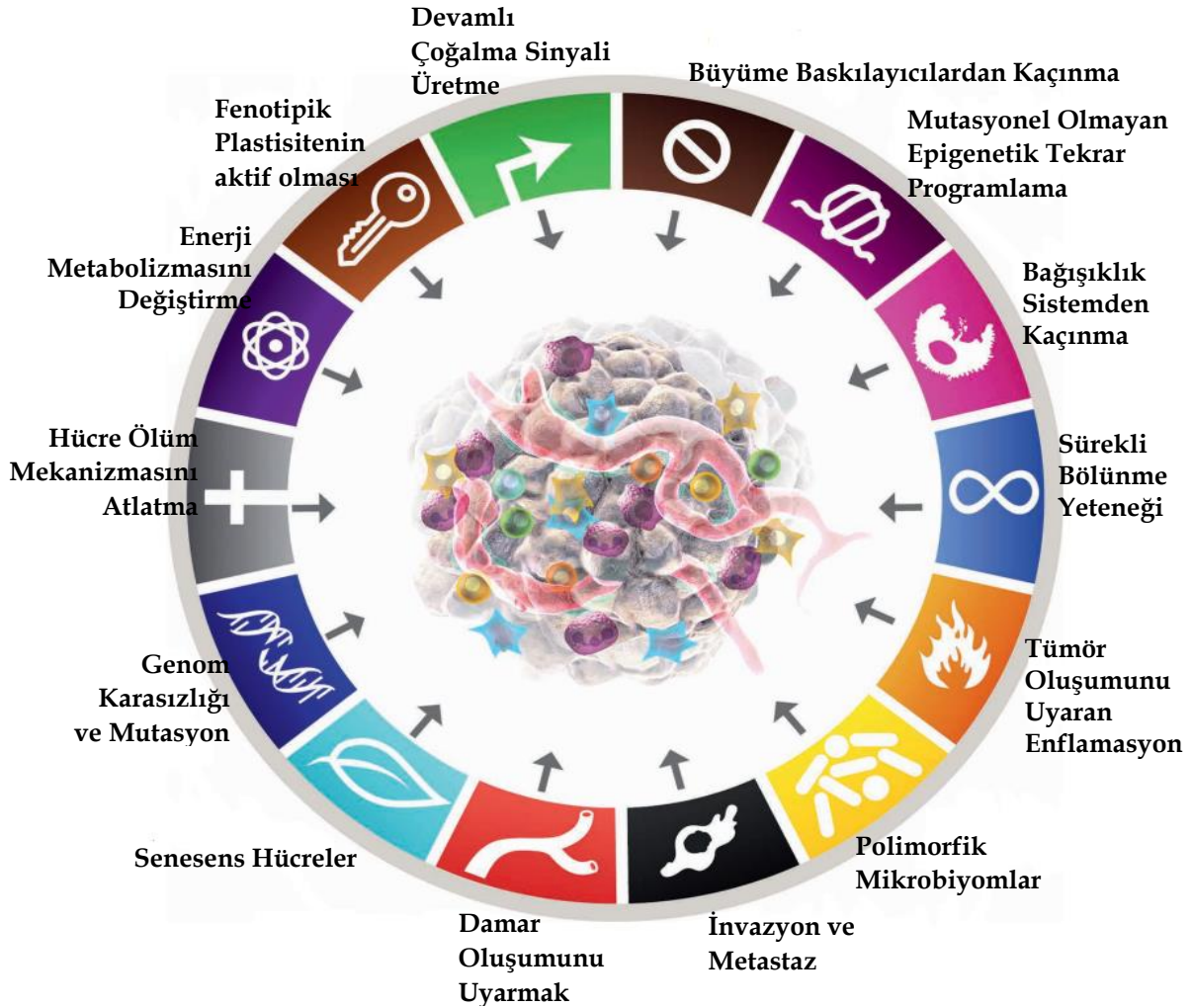
### 2.1. Kanser

Kanser, dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunudur. Kanserden ölüm oranları 1991'den bu yana sürekli olarak azalma göstermiş; genel olarak günümüze dek %33'lük bir düşüşle yaklaşık 3,8 milyon kanser ölümü önlenmiştir. Bu sigara kullanımındaki azalmadan, meme, kolorektal ve prostat kanserleri için taramalar yapılmasından, kolon ve meme kanserleri için adjuvan kemoterapiler gibi tedavideki gelişmelerden kaynaklanmaktadır. Son zamanlarda hedefe yönelik tedavilerdeki ve immünterapilerdeki ilerlemeler, akciğer kanseri ve diğer insidansı artan veya sabit olan kanserler (lösemi, melanom ve böbrek kanseri) için mortalite oranlarında azalmalar olarak yansımıştır (13).

Kanser karmaşık ve çok yönlü bir hastalıktır. Kanserin ayırt edici özellikleri yeni eklenenlerle birlikte Şekil 1'de gösterilmektedir (14). Temelde normal gen ekspresyonunu koordine eden epigenomun disregülasyonu kadar DNA'da onkogenleri aktive eden ve tümör baskılayıcıları da inaktive eden mutasyonların başlattığı bir genom hastalığıdır. Aynı zamanda, konakçının savunma sistemlerini atlatan, hücre yapısı, hareketliliğini ve büyüme ile ilgili metabolik değişikliklerden beslenen bir hücre hastalığıdır. Genomik değişikliklerin, hücre adaptasyonların, mikro çevredeki değişikliklerin nasıl gerçekleştiğini anlamak, bireysel kanserlerin başlangıcını, ilerlemesini ve terapötik yanıtların oluşumunu ortaya koymak, daha etkili tedavi seçeneklerini geliştirmek için çok önemlidir (15). Memeli hücrelerine adaptasyonundan sonra CRISPR (düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar) gen düzenleme yöntemi, hücre fonksiyonunun tüm yönlerini araştırmak için güçlü ve esnek bir araç olmuştur. Kanser biyolojisinin anlaşılması üzerinde büyük etki yaratmış ve CRISPR teknolojileri yakın gelecekte genetik hastalıkların üstesinden gelinmesinde insanlar için önemli tedaviler haline gelebilir (16).

**-CRISPR;** CRISPR ve CRISPR ile ilişkili (Cas) proteinler bir bakteriyel adaptif immün sistem temel bileşenleridir (17). Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa

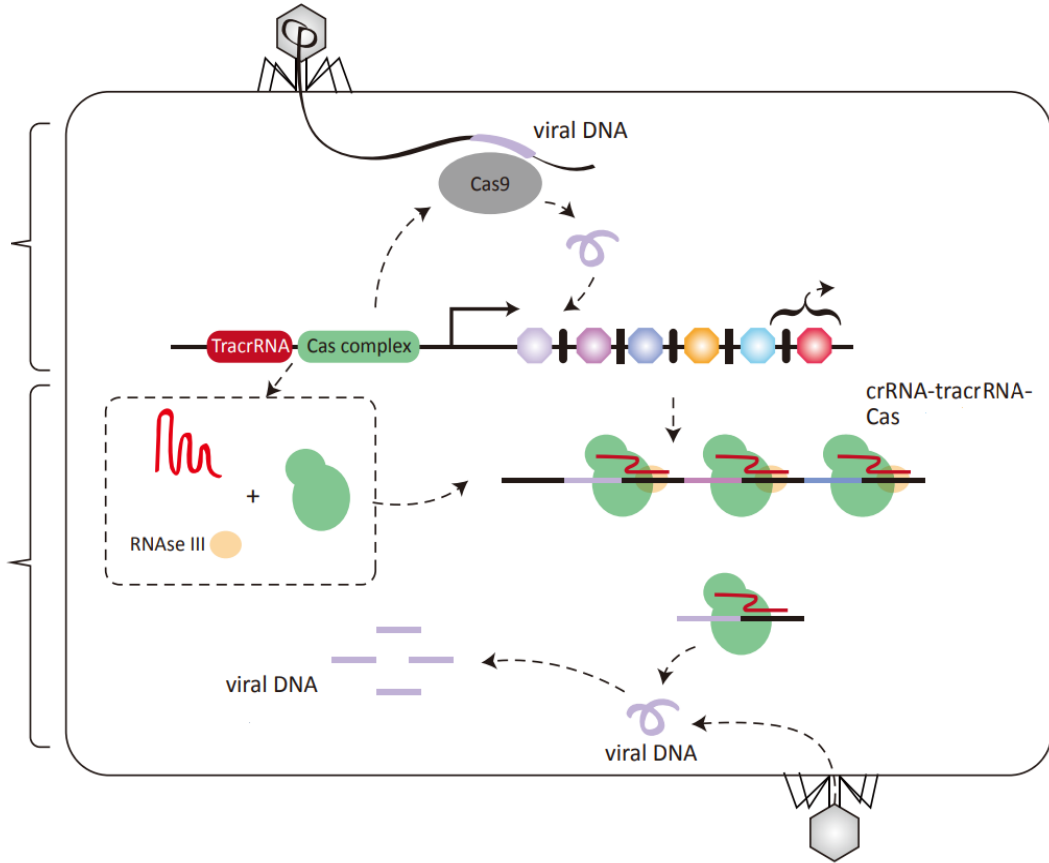
palindromik tekrarlar (CRISPR) - CRISPR ile ilişkili protein 9 (Cas9) sistemi, doğada faj enfeksiyonuna ve plazmid transferine karşı bakteriyel bir savunma mekanizmasıdır (Şekil 2). CRISPR/Cas adaptif bağışıklık sistemi iki ana aşamadan oluşur: aşılama ve bağışıklık. Aşılama aşamasında Cas proteinleri yabancı viral DNA'yı parçalayan bir kompleks oluşturur.



**Şekil 1:** Yeni eklemeler ile kanserin ayırt edici özellikleri (14). "Kanserin Ayırt Edici Özelliklerine" kanonik ve olası yeni eklemeler tasvir edilmiştir.

Bu yabancı DNA parçasığı daha sonra bakteriyel CRISPR lokuslarına dahil edilir (18). İkinci immünite aşamasında, yeniden aynı virüs ile enfeksiyonun ardından CRISPR lokuslarına entegre olan DNA birimi, CRISPR RNA (crRNA) öncüllerini oluşturmak için transkribe olur (19). Cas9 endonükleazı daha sonra trans-aktif edici crRNA'lar (tracrRNA) tarafından crRNA prekürsörlerine

bağlanmak üzere yönlendirilir. (Şekil 2) (20). RNase III tarafından bölünmenin ardından olgun bir crRNA-Cas-tracrRNA kompleksi oluşur (21). Olgun crRNA, aynı virüsün tekrar enfeksiyonu üzerine viral DNA ile eşleşerek Cas enziminin tetiklenmesi ve viral DNA'nın bölünmesi için küçük bir kılavuz RNA olarak hizmet eder (22).



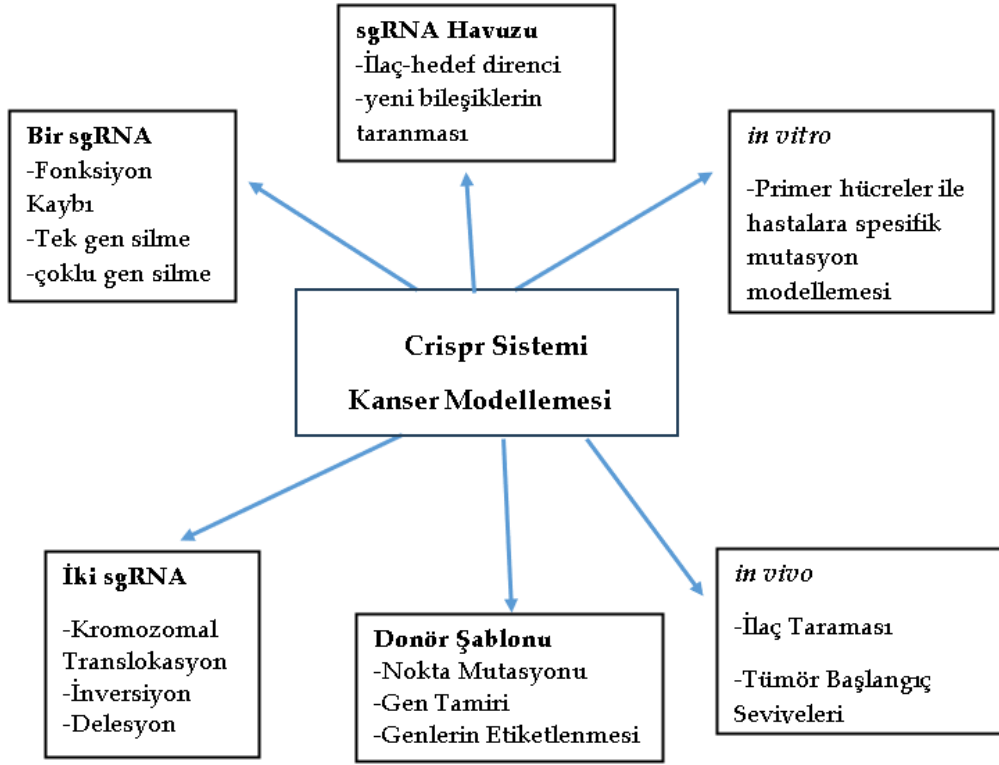
**Şekil 2:** Bakterilerde CRISPR aracılı bağışıklık mekanizması (20).

CRISPR/Cas9'un hedefinin değiştirilmesi yalnızca kılavuz RNA dizisinin değiştirilmesini gerektirir; bu da CRISPR/Cas9 genom düzenleme sisteminin çeşitli hücre tiplerinde ve organizmalarda genom düzenleme, transkripsiyonel pertürbasyon, epigenetik modülasyon ve genom görüntüleme gibi genetik materyali değiştirmek için güçlü bir RNA kılavuzlu DNA hedefleme aracı olarak uyarlanmasına yol açmıştır (23). CRISPR/Cas sistemi üç ana tipi (tip I, II ve III) ve 12 alt tipi kapsar. Tip I ve III ile karşılaştırıldığında, tip II sistem belirli bir DNA dizisini kesin olarak hedeflemede tek bir Cas proteinine ihtiyaç duyar ve bu

nedenle en yaygın kullanılan genom düzenleme aracı haline gelmiştir. *Streptococcus pyogenes* kaynaklı tip II CRISPR-Cas9 sisteminin bilim insanları tarafından memeli hücrelerinde başarılı bir şekilde uygulanması önceki yöntemlerin kısıtlamalarını eleyerek genom mühendisliğinde büyük bir adım olmuştur. Bu çok yönlü sistem, iki biyolojik bileşenden oluşur: RNA kılavuzlu DNA endonükleaz Cas9 ve kimerik tek rehber RNA (sgRNA). SgRNA molekülü, hem bir CRISPR RNA (crRNA) bileşeni hem de Cas9'a bağlanan ve onu hedef dizide baz eşleşmesi yapmak için ilgili genomik diziye yönlendiren bir trans-aktif edici crRNA (tracrRNA) bileşeni de içerir (24). İlgili bölgenin tanınmasında tek kriter, hedef dizinin *S. pyogenes* kaynaklı Cas9 için bir NGG veya NAG trinükleotitden oluşan protospacer bitişik motif (PAM) dizisine bitişik olmasıdır. PAM olmadan Cas9, sgRNA hedef dizi ile tamamen eşlenik olsa bile ilgili diziyi parçalayamaz. Tek rehber RNA'lı Cas9, genomda ilgili diziye bağlanıp çift iplik kırığına (DSB) sebep olur (25). Her iki DNA zincirinin kırılması genom stabilitesi için tehdit oluşturmaktadır. Ökaryotik hücrelerde bu ölümcül hasarın onarımı için iki ana yol vardır: homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ve homolojiye yönelik onarım (HDR). NHEJ, kırık uçları birbirine bağlayan, genellikle rastgele ekleme veya silme ile sonuçlanan, hataya açık bir onarım mekanizmasıdır. Bu, çerçeve kayması mutasyonlarına ve dolayısıyla gen fonksiyon kaybına yol açabilir (26). NHEJ ile karşılaştırıldığında HDR, kırık DNA'yı yeniden yapılandırmak için homolog DNA şablonları kullanır (27). Böylece, genomdaki belirli bölgelerde üretilen DSB'lere karşı hedef hücreye bir donör şablonu eklenerek ilgili genom dizisinin doğru bir şekilde modifiye edilmesi teorik olarak olasıdır (28). Bu prensibe dayanarak, tip II CRISPR/Cas sistemi insan hücrelerindeki endojen genomik bölgeleri doğru bir şekilde yıkabilir (29). Birden fazla rehber RNA'nın eşzamanlı olarak tanıtılması, ökaryotik genom düzenleme de bir araç olarak CRISPR/Cas9'un fizibilitesini kanıtlayarak hedef lokusun çoklu düzenlemesini sağlayabilir (30).

**-CRISPR-Cas9 sisteminin kanser biyolojisindeki potansiyel uygulamaları;** Geleneksel kanser tedavi yöntemleri (ör. cerrahi, radyoterapi, kemoterapi) nüksü geciktirebilir ve kanser hastalarının sağ kalımını uzatabilir, ancak tümörün nüksetmesi veya ilaç direnci genellikle kötü prognoza yol açar.

Ayrıca kemoterapi ve radyoterapinin özgülüğünün olmaması zararlı yan etkilere ve hatta bazı durumlarda ölüme yol açabilmektedir. Bununla birlikte, yeni kanser tedavilerine hala ihtiyaç duyulmaktadır ve CRISPR / Cas9 teknolojisi, kanser tedavisinde potansiyel devrim niteliğinde değişiklikler içermektedir. CRISPR-Cas9 sisteminin esnekliği ve modülerliği, çoğu hücre kültürü sistemlerinde başarıyla gerçekleştirilen pek çok genom mühendisliği uygulamasının geliştirilmesine yol açmıştır. Bunların birçoğu *in vivo* kullanım için de uyarlanabilir (31). Bu teknoloji, tümör baskılayıcı genlerde, onkogenlerde ve hücrel transformasyon diğer modulatorlerinde veya ilaç yanıtı incelemesinde hem fonksiyon kaybı hem de fonksiyon kazanımı mutasyonlarının hızlı ve hassas bir şekilde tasarlanması için kullanılır. Örneğin, Sato ve meslektaşları insan kolorektal kanserini (CRC) modellemek için transforme olmamış insan bağırsak organoidlerinde hem fonksiyon kaybı hem de fonksiyon kazanımı mutasyonlarını sistematik olarak tasarlamak için CRISPR-Cas9 sisteminin kullanımını gösterdiler. Dikkat çekici bir şekilde, sıklıkla insan CRC'si ile ilişkili beş bağımsız mutasyonun (üç fonksiyon kaybı mutasyonu ve iki fonksiyon kazanım mutasyonu) seri olarak tanıtılması, insan hastalığının tümörjenik ve metastatik özelliklerini tam olarak özetlememiş, bu da tam malignite için ek ikincil genetik ve/veya epigenetik olayların gerekli olduğunu düşündürmüştür (32). İlave olarak, CRISPR-Cas9 sisteminin çoklu kullanım olanağı, kanser hücrelerindeki kombinatorial güvenlik açıklarını araştırmak ve epistatik ilişkileri ve sentetik ölümcül etkileşimleri sistematik olarak test etmek için fırsat sunar. Aynı zamanda bölgeye özgü rekombinazlar, endojen alellerin etiketlenmesi ve kodlamayan DNA elementlerinin sorgulanmasına dayanan endojen koşullu alellerin üretilmesine de izin verir (33, 34). CRISPR-Cas9 sistemi, aynı veya farklı kromozomlarda iki uzak çift iplikli kırılmayı (DSB) tetiklemek için de kullanılabilir, bu da hedef dizilerin translokasyonu, delesyonuna veya inversiyonuna yol açar ki bu uygulama hücrelerde ve *in vivo* olarak etkin bir şekilde gösterilmiştir (Şekil 3) (35,36).



Şekil 3: CRISPR/Cas9 teknolojisi ile kanser modellemesine genel bakış (37).

### 2.1.1. Kanser Metabolizması

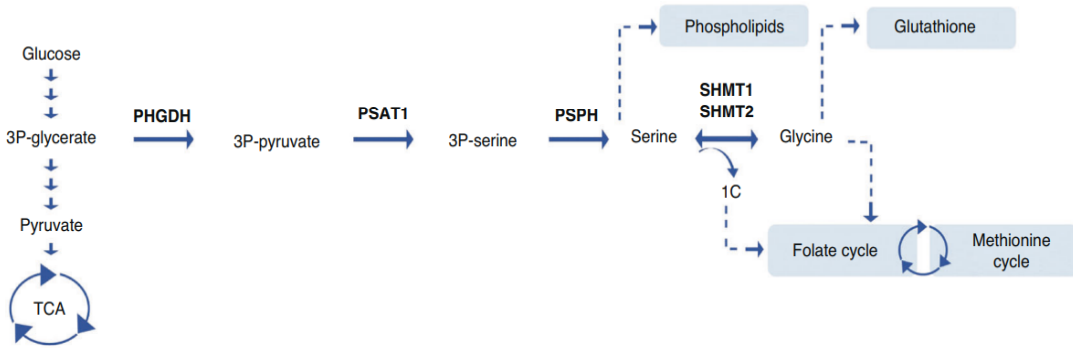
Kanser tedavisinde bugüne kadar kaydedilen ilerlemeye rağmen, hastalığı tamamen yenmekten hala çok uzağız. Normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesinden sonraki en önemli değişiklik, metabolizmalarındaki değişiktir. Kanser hücrelerinin metabolizması biyokütle üretimi ve çoğalmaya yöneliktir. Yerel doku içindeki metabolik kaynaklar sınırlı olduğundan, bu durum besin maddelerinin tükenmesine ve metabolik atıkların birikmesine yol açabilir. Bu koşullarda büyümeyi sürdürmek için kanser hücreleri, çeşitli metabolik adaptasyonlar kullanır (38). Ayrıca, belirli metabolitler sadece enerji ve biyokütle üretimi için substrat olarak hizmet etmekle kalmaz, aynı zamanda gen ve protein ekspresyonunu düzenleyebilir ve tümör çevresindeki transformasyona uğramamış hücrelerin davranışını etkileyebilir. Tümörler büyüdükçe ve metastaz yaptıkça vücuttaki besin dağılımını da etkileyebilir ve bundan etkilenebilir (39).

Glikoz alımı ve glikolizin upregülasyonu (Warburg etkisi) gibi aerobik koşullar altındaki metabolik değişiklikler, kanser metabolizmasının belirgin

özellikleri olan glutamin bağımlılığını ve reaktif oksijen türlerini (ROS) artırır (40). Otto Warburg, kanser hücrelerinin hasarlı mitokondri nedeniyle mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu (OxPhos) kullanmadığını ve aerobik glikolize (oksijenin bol olduğu ortamlarda bile glikozun laktata dönüşmesi) oldukça bağımlı olduklarını ileri sürmüştür. Ancak sonraki çalışmalar, kanser hücrelerinin çeşitli tümör mikro-ortamlarına bağlı olarak glikoliz ve solunum iki enerji metabolizmasının yönetimini tersine çevrilebildiğini veya eşzamanlı olarak kullanarak metabolik esneklik gösterebildiğine dair kanıtlar sunmuştur (41). Çoğu tümörde mitokondriyal işlev bozukluğu olmaksızın glikolizin arttığına dair net göstergeler vardır. Bu kanserlerde OxPhos, aynı oksijen kısmi basıncı altında normal dokulardaki OxPhos kadar ATP üretir ve fonksiyonunu yerine getirir (42). Chance ve çalışma arkadaşları, mitokondriyal işlev bozukluğuna karşı tümör hücrelerinin sitokromlarının sağlam ve işlevsel olduğunu göstermişlerdir (43-47). Proliferasyonu desteklemek için glikoz oksidasyonunu aktif olarak bastırmak yerine, kanser hücrelerindeki glikozun oksitlenebileceği glikoliz oranının maksimum oranı aştığı ileri sürülmektedir. Dolayısıyla, piruvat ve NADH sitozolde mitokondriye taşınabileceklerinden ve mitokondri tarafından kullanılacaklarından daha hızlı üretilir. Kanser hücrelerinin fermentasyona yönelmesi tercih edilen bir metabolik fenotip değildir, bunun yerine mitokondriyal doygunluğun ikincil bir sonucudur. Laktat üretimi de NAD<sup>+</sup> seviyelerinin yenilenmesini sağlayan bir kanal olarak kullanılır (48). Çoğu tümörde Warburg etkisi, (normoksik/hipoksik) hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 (HIF-1)'in aşırı ekspresyonu, onkogen aktivasyonu (cMyc, Ras), tümör baskılayıcıların işlev kaybı (mutant p53, mutant fosfataz ve tensin homologu (PTEN), aktive edilmiş (PI3K-Akt-mTORC1, Ras-Raf-MEK-ERK-cMyc, Jak-Stat3) veya deaktive edilmiş (LKB1-AMPK) sinyal yolları, tümör mikroçevresinin bileşenleri ve HIF-1'in epigenetik mekanizmalarla iş birliği arasındaki etkileşimden kaynaklanan 'bencil' metabolik yeniden programlamanın bir parçasıdır (49).

### 2.1.1.2. Kanserde Serin-Glisin ve Tek Karbon Metabolizması

Tek karbonlu birimler büyük ölçüde esansiyel olmayan amino asitler olan serin ve glisinden elde edilir. Hem serin hem de glisin dışarıdan hücre içine alınabildiği gibi hücre içinde diğer karbon kaynaklarından sentezlenebilir. Serin, glukozdan bir seri enzim [fosfogliserat dehidrojenaz (PHGDH), fosfoserin aminotransferaz 1 (PSAT1) ve fosfoserin fosfataz (PSPH)] aracılığıyla glikozdan *de novo* olarak oluşturulur (Şekil 4) (50). Memelilerde, kuşlarda ve balıklarda glisin amino asidi serin dışında treonin, kolin ve hidroksiprolinden de sentezlenmektedir (Şekil 5) (51).

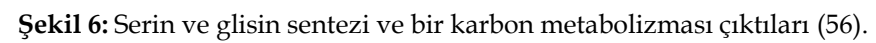


Şekil 4: Serin-glisin biyosentez yolu (52).

Serin, metiltrasferazlar SHMT1 (sitoplazmik) ve SHMT2 (mitokondriyal) tarafından glisine dönüştürülür. Bu reaksiyon sırasında serinden ayrılan tek karbon birimi tetrahidrofolata (THF) aktarılarak metilen-THF üretilir (53).

Tek karbon metabolizması, folat döngüsü ile metiyonin döngüsünün ve trans-sülfürasyon yolağının birleşmesiyle oluşan bisiklik bir yolaktır (54). Folat, pürin ve pirimidin nükleotidlerinin sentezinin yanı sıra serin ve homosistein gibi amino asitlerin metabolizması için gereklidir. Diyetle alınan folat, proksimal ince bağırsakta gamma-glutamil hidrolaz (GGH) enzimiyle poliglutamat formunda monoglutamata forma hidrolize edilir. Bu hali ile folat, proksimal ince bağırsakta protona bağlı folat transportur (PCFT) ile ve alt bağırsakta indirgenmiş folat taşıyıcısıyla (RFC) apikal fırçamsı kenardan enterosite geçer (55).





Tek karbon metabolizması, hızla bölünen kanser hücrelerinde DNA ve RNA sentezi için temel olan pürin ve pirimidin nükleotidlerinin sentezi yoluyla hücre büyümesine katkıda bulunur. Pirimidin nükleotidi deoksitimidin monofosfatın (dTMP) sentezinde metil donörü olarak 5,10-metilen tetrahidrofolat (MTHF) kullanılırken, pürin öncüsü inozin monofosfatın (IMP) oluşumu iki tek karbonlu birim ve bir molekül glisin dahil edilmesini içerir. Ayrıca IMP, guanozin monofosfat (GMP) veya adenozin monofosfata (AMP) dönüştürülebilir (57).

Tek karbon metabolizmasının çıktıları arasında proteinler, lipidler, nükleotidler ve metilasyon reaksiyonlarının substratlarının yanı sıra ATP, NADPH üretimi ve enerji dengesinin düzenlenmesi gibi biyomakromoleküllerin sentezi de yer alır. Folat döngüsünün bir turunda, me-THF'nin MTHFR tarafından indirgenmesi sırasında bir molekül NADP<sup>+</sup> üretilir. NADP<sup>+</sup> /NADPH oranının sabit tutulması redoks durumunun sürdürülmesine yardımcı olur. Ayrıca, sistein, glisin ve glutamik asit içeren bir tripeptit olan GSH, NADP<sup>+</sup> /NADPH oranının korunmasına katkıda bulunur ve redoks dengesine katkıda bulunur. Bu nedenle, kanser hücreleri bu metabolik yollardaki değişikliklerden hayatta kalma ve çoğalma avantajları elde eder (58).

**Serin ve glisin sentezinin düzenlenmesi;** Serin ve glisin sentez genlerindeki doğrudan genetik değişikliklerin yanı sıra, geleneksel onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki çeşitli mutasyonlar serin ve glisin sentezi boyunca akışı zorlar. Serin ve glisin sentezindeki akış, transkripsiyonel, epigenetik, translasyonel ve post-translasyonel mekanizmalar tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Transkripsiyon faktörleri ATF4, NRF2, MYC ve HIF1 $\alpha$ , serin ve glisin sentez genleri olan PHGDH, PSAT1, PSPH, SHMT1 ve/veya SHMT2'nin transkripsiyonlarını ya bu genlerin düzenleyici bölgelerine doğrudan bağlanarak ya da bu genlerini düzenleyen çok proteinli transkripsiyon faktörü komplekslerinin bir parçası olarak kontrol ederler. mTORC1 kompleksi ve fosforlanmış ökaryotik başlangıç faktörü 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) büyüme sinyallerine yanıt olarak veya serin yoksunluğu koşullarında ATF4 translasyonunu uyarırlar (56).

## 2.2. GGH Enzimi

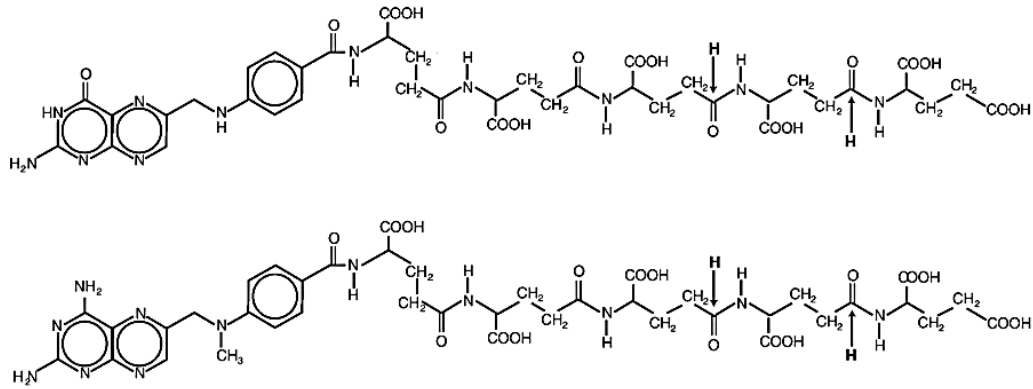
Gama-glutamil hidrolaz (GGH,  $\gamma$ -Glu-X Karboksipeptidaz, E.C. 3.4.19.9), türler arasında yüksek oranda korunmuş folatların ve anti-folat moleküllerin metabolizmasında rol oynayan bir lizozomal homodimer enzimdir. Bir memeli hücrelerine giren folatlara ve anti-folatlara bağlı gama-poliglutamat zincirlerini parçalamak için bir endo- ve/veya ekzo-peptidaz görevi görür. GGH, 8. kromozomda yer alıp (q12.23-13.1), 9 ekzon ve 36 kDa, 23,748bp (957 bp cDNA) 318 amino asittir (59).

GGH çoğu dokuda ifade edilmesine rağmen karaciğer, böbrek ve serumda çok daha fazla miktarlarda bulunduğunu tespit edilmiştir (60, 61). Lizozomal bir enzim olmasına ek olarak *in vitro* olarak hem normal hem de tümör hücrelerinden hücre dışına da sekrete edildiği gösterilmiştir (62, 63). Daha sonraki çalışmalarla cDNA'sında glikolizasyon için endoplazmik retikulumla yönlendirilen bir sinyal dizisi tespit edilmiştir (64, 65).

GGH aktivite için indirgenmiş tiyollere ihtiyaç duyar ayrıca bu aktivite, iyodoasetik asit ve *p*-hidroksimerküribenzoat gibi sistein modifikasyon reaktifleri ile de inhibe edilebilir. Aktif bölgesinde 4 tane sistein amino asiti vardır, bunlardan sadece bir tanesi enzimin aktivitesi için yeterlidir (66).

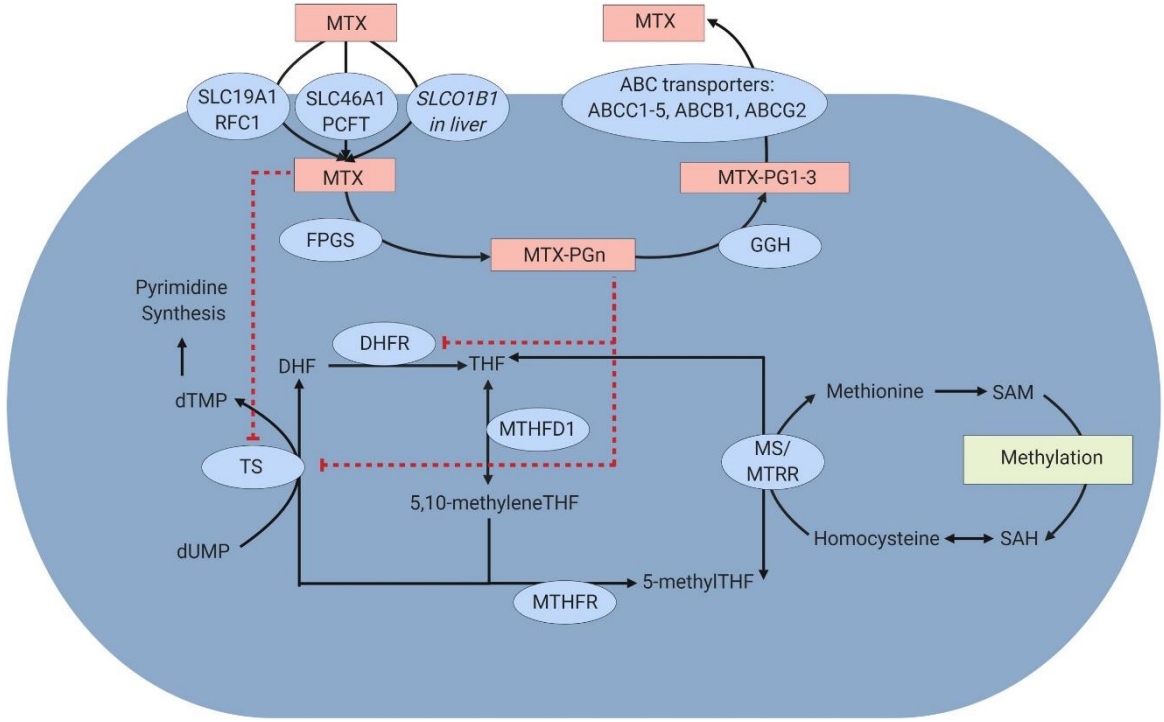
GGH, folatın hücrel homeostazisinde önemli bir rol oynar. Ayrıca, yüksek GGH seviyeleri anti-folatlara, özellikle metotreksata karşı hücrel dirençle ilişkilendirilmiştir (Şekil 7). Hücrelerin MTX ve diğer monoglutamil antifolatlara duyarlılığı hücre içi serbest ilaç seviyesine kritik ölçüde bağlıdır. Bir folat antagonisti olan metotreksat (MTX), akut lenfoblastik lösemi (ALL), osteosarkom ve non-Hodgkin lenfoma gibi hem çocukluk çağı hem de yetişkin kanserlerinin tedavisinin önemli bir kemoterapötiktir. MTX doğal, monoglutamatlı formunda dihidrofolat redüktaza (DHFR) bağlanıp onu inhibe edebilse de poliglutamilasyon MTX'i timidilat sentaz ve pürin biyosentez enzimleri Glisinamid Ribonükleotid Formiltransferaz ve Aminoimidazol Karboksamid Ribonükleotid Formiltransferaz gibi diğer enzimler için de inhibitör yapar. MTX'in aksine, Tomudex (ZD1694) ve 5,10-dideazatetrahidrofolat

(DDATHF) gibi diğer anti-folatlar, aktiviteleri için poliglutamasyona bağımlıdır. Sonuç olarak, FPGS tarafından katalizlenen reaksiyon ile GGH tarafından katalizlenen hidrolitik reaksiyonun toplamı olan bu anti-folatların poliglutamasyon derecesi, serbest ilaç birikiminde önemli bir faktör haline gelir ve FPGS ve GGH'nin göreceli aktivitelerinden etkilenir (67).



**Şekil 7:** Folik asit (üstte) ve metotreksatın (altta) yapıları ( Dikey oklarla gösterilen kesim bölgeleri , (H) insan) (67).

MTX hücre içine indirgenmiş folat taşıyıcı 1 (RFC1/SLC19A1) ve proton-bağlı folat taşıyıcı (PCFT/SLC49A1) tarafından taşınır. SLCO1B1 karaciğerde önemli bir MTX taşıyıcısıdır. Hücre içinde MTX, FPGS tarafından poliglutamasyona uğratılır (MTX-PG), bu da MTX'in hücrel tutulmasını ve farmakolojik aktivitesini artırır ve daha sonra GGH tarafından depoliglutamasyona uğratılır ve daha sonra ABCC1-5, ABCB1 ve ABCG2 (ATP Binding Cassette C1-5, B1, G2) tarafından hücre dışına taşınır. MTX(-PG), Dihidrofolat Redüktaz (DHFR) ve Timidilat Sentazı (TS) inhibe eder. Tek karbon ve folat metabolizmasında sıklıkla çalışılan ve bağlantılı genler; Metilenetetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR), Metilenetetrahidrofolat Dehidrogenaz 1 (MTHFD1) ve Metiyonin Sentaz/Redüktazdır (MS/MTRR) (Şekil 8) (68).



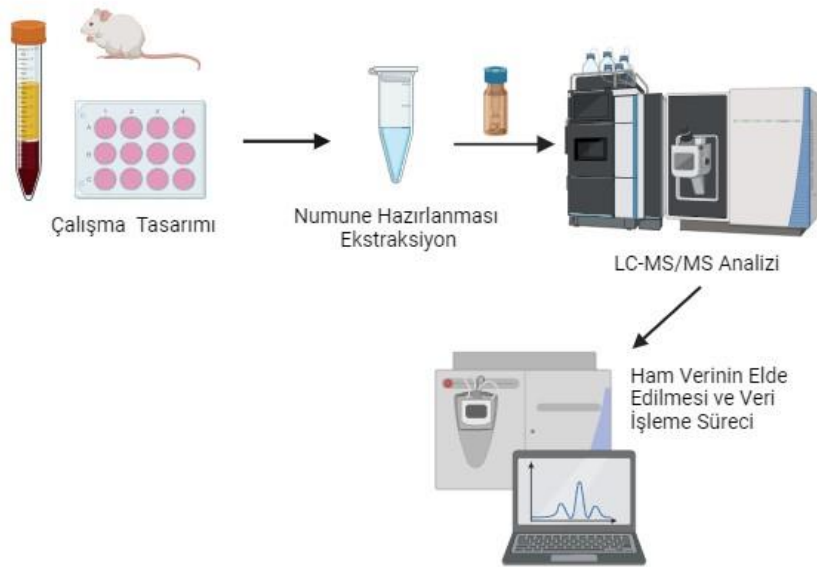
Şekil 8: MTX ve folat metabolizmasında önemli taşıyıcılar ve enzimler (68).

### 2.3. Metabolomik Analizi

Metabolomik, biyolojik örneklerdeki metabolitlerin kapsamlı değerlendirilmesiyle ilgilenen omik teknolojilerinden biridir. "Omik" (genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik) analizlerinden elde edilen detaylı bilgi; hastalıkların mekanizmasını anlamak, onların erken teşhisini kolaylaştırıcı, bireysel tedavi stratejilerinin seçilmesi ve bunların etkinliğini değerlendirmek için büyük bir potansiyele sahiptir. Omik, belirli bir biyomolekül türünün tamamının veya bir organizma içindeki moleküler bir sürecin bütününe araştırılmasıyla tanımlanan çeşitli biyolojik çalışma alanlarından herhangi biridir. (69). Biyolojik süreçlerin son noktası olan metabolitler, genlerin ekspresyonunu, proteinlerin fonksiyonunu, çevresel etkileri ve genetik yapıların karşılıklı ilişkilerinin anlık görüntüsünü sunar. Metabolomik; belirli bir zaman diliminde dokularda, hücrelerde ve fizyolojik sıvılarda küçük molekül metabolitlerin (moleküler ağırlığı <1000 Da) tanımlaması ve miktarının belirlenmesidir. Metabolomik

analizler bir doku veya vücut sıvılarındaki binlerce metabolitin aynı anda değerlendirilebilmesi ile hastalıklarda etkili olan metabolik yolların tanınması ve spesifik metabolitlerin derişimlerinin belirlenmesine ve böylece klinik vakalar arasındaki moleküler farklılıkların saptanması sonucunda erken teşhis ve tedavinin bireyselleştirilmesine olanak sağlamaktadırlar (70).

Metabolomik analiz birkaç temel adımı içerir: (1) numune hazırlama ve ekstraksiyon; (2) bir kolon üzerinde metabolit ayrıştırma (kromatografi), örneğin gaz kromatografisine (GC), likit kromatografisine (LC) gibi; (3) bir iyon kaynağı kullanılarak metabolitlerin iyonlaştırılması; (4) iyonlar uçarken veya salınırken bir kütle analizörü ile kütle-yük ( $m/z$ ) oranı temelinde ayrışma; ve (5) deteksiyon (Şekil 9) (71).



Created in BioRender.com bio

**Şekil 9 :** LC-MS/MS Tabanlı Metabolomik İş Akışı ( Görsel BioRender.com üzerinden oluşturuldu).

Metabolomik alanında, hem nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR) ve hem de kütle spektrometresi (MS) yöntemleri teknikleri en popüler olanlarıdır. Hem doğrudan enjeksiyon özelliği hem de kromatografik tekniklere bağlı MS yöntemleri, biyolojik sistemlerdeki düşük molekül ağırlıklı bileşiklerin

analizindeki başarısı nedeniyle metabolomik için güçlü bir teknolojiye dönüşmüştür. Kromatografik tekniklerle ilgili olarak, ilk metabolomik çalışmalar genellikle GC dayanıyordu, çünkü bu oldukça verimli, hassas ve tekrarlanabilir bir tekniktir. Ancak GC, yalnızca uçucu bileşiklerin veya uçucu hale gelen bileşiklerin analiz edilebilmesi ve kapsamlı numune hazırlığının gerekli olması gibi bir dezavantaja sahiptir. Buna karşılık, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (UHPLC), türevlendirme gereksizsinin daha geniş bir metabolit yelpazesinin analizine izin verdiği için GC'den daha kapsamlı olarak kabul edilmektedir (72).

Metabolomik stratejileri, her biri kendi avantajları ve sınırlamaları olan hedeflenmemiş ve hedeflenmiş yaklaşımlar olarak ikiye ayrılabilir. Hedeflenmemiş metabolomik, bilinmeyen kimyasal da dahil olmak üzere bir numunedeki tespit edilebilir tüm metabolitlerin analizine odaklanır. Buna karşılık, hedeflenen metabolomik tanımlanmış metabolit gruplarının ölçümüdür.

Hedefli metabolomik, tipik olarak bir veya daha fazla ilgili yolağa odaklanarak belirli bir sayıda (ortalama 20 gibi) bilinen metabolitleri aramayı amaçlar. Hipotezi doğrulama, spesifik özellikleri araştırma amaçlı kantitatif sonuç veren bir analizdir. Bu sonucu verebilmek için ticari standart kimyasallara ihtiyaç vardır. Ekstraksiyonu ise aranan moleküllere spesifiktir (73).

Hedeflenmemiş analizler, hem yeni hipotezlerin oluşturulmasına hem de yeni hedeflerin keşfi için fırsat sunmaktadır. Önceden belirlenmiş bir bileşik/metabolit sınıfını taramak yerine, hedeflenmemiş metabolomik, son yirmi yılda çeşitli hastalıklarda global metabolit keşfi (belirli bir fenotipin kimyasal mediyatörleri) için anahtar olmuştur. 1000'den fazla metabolit taraması yapar ve kimyasal standartlara gerek yoktur. Kolon olarak genel olarak hidrofobik bileşikler için C18, hidrofilik bileşikler için HILIC kolon tercih edilir. Çok fazla veri elde edildiği için analiz kısmında filtreleme yapılması gerekebilir (74).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Gereçler

##### 3.1.1. Kimyasallar

Tablo 1: Çalışmada kullanılan Kimyasallar

| Ürün                                          | Marka            |
|-----------------------------------------------|------------------|
| Metotreksat Hydrate, 13960                    | Cayman           |
| CBR-5884                                      | MedChemExpress   |
| U-13C6 Glukoz, 33874                          | Cambrige Isotope |
| D-Glukoz Solüsyonu 200g/L                     | Gibco            |
| Etidyum bromür                                | Sigma            |
| Agaroz LE                                     | Genaxxon         |
| İzopropanol (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O) | Merck            |
| Metanol                                       | Merck            |
| Tris Baz                                      | Roche            |
| Tris-HCl                                      | Sigma            |
| Tween 20                                      | Sigma            |
| Triton X-100                                  | Sigma            |
| 2-Merkaptoetanol                              | Sigma            |
| CAPS                                          | Sigma            |
| Amido Black 10B                               | Fisher           |
| Glisin                                        | Sigma            |
| Bovine Serum Albumin                          | Merck            |
| Sodyum Klorür (NaCl)                          | Merck            |
| Süt tozu                                      | Enka             |
| Sodyum Hidroksit (NaOH)                       | Merck            |
| Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)                   | Fisher           |
| Amonyum persülfat (APS)                       | Invitrogen       |
| TEMED                                         | Invitrogen       |
| Resolving Gel Buffer                          | Invitrogen       |
| Stacking Gel Buffer                           | Invitrogen       |

|                                             |                      |
|---------------------------------------------|----------------------|
| Glasiyel asetik asit                        | Merck                |
| Paraformaldehit                             | Sigma                |
| Ponceau S                                   | Fisher               |
| Nonyl phenoksipoliethoksiletanol (NP40)     | -                    |
| HEPES                                       | Sigma                |
| Antikor HMGCR (ab214018), rabbit            | Abcam                |
| cOmplete Tablets, mini, EDTA-free, EASYpack | Roche                |
| Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)        | Fisher               |
| DMSO                                        | Fisher               |
| Tryptone                                    | Sigma                |
| Yeast Extract                               | Sigma                |
| Agar                                        | Sigma                |
| DAPI                                        | Invitrogen           |
| 40% (w/v) Akrilamid                         | Invitrogen           |
| IGEPAL CA-630                               | Sigma                |
| Antikor Beta Aktin (8H10D10) mouse          | Cell Signaling       |
| Anti-GGH antibody ( NBP3-03614)             | Novus                |
| Recombinant Anti-GGH antibody [EPR8014]     | Abcam                |
| Antikor Beta Tubulin, rabbit                | Cell Signaling       |
| Antikor Anti-Rabbit                         | Cell Signaling       |
| Antikor Anti-Mouse                          | Cell Signaling       |
| BCA                                         | Thermo Scientific    |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)     | Gibco                |
| RPMI1640                                    | Gibco                |
| MEM (21090)                                 | Gibco                |
| Dialize FBS (FBS-DIA-12A)                   | Capricorn Scientific |
| MEM Vitamin Solution (11120)                | Gibco                |
| Sodyum Piruvat                              | Sigma-Aldrich        |
| L-Prolin                                    | Sigma-Aldrich        |
| L-Aspartik Asit                             | Sigma-Aldrich        |

|                                                                                      |                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| L-Glutamik Asit                                                                      | Sigma-Aldrich      |
| L-Alanin                                                                             | Sigma-Aldrich      |
| L-Asparajin                                                                          | Serva              |
| L-Serin                                                                              | Sigma-Aldrich      |
| L-Glisin                                                                             | Sigma-Aldrich      |
| 0.25% Trypsin-EDTA                                                                   | Gibco              |
| Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)<br>w/o Mg <sup>+2</sup> Ca <sup>+2</sup> | Gibco              |
| Fetal Bovin Serum (FBS)                                                              | Gibco              |
| Penisilin/Streptomisin                                                               | Gibco              |
| L-glutamin                                                                           | Gibco              |
| PowerUp SYBR® Green PCR Master Mix                                                   | Applied Biosystems |
| Etanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O)                                             | Merck              |
| FuGENE transfeksiyon ajanı                                                           | Promega            |
| XtremeGene 9 transfeksiyon ajanı                                                     | Sigma              |
| Polybrene                                                                            | Sigma              |
| DAB                                                                                  | -                  |
| Puromisin Dichloride                                                                 | Bishop             |
| GeneRuler 1kbp DNA Ladder                                                            | Thermo             |
| PageRuler Plus Prestained Protein Ladder                                             | Thermo             |
| Gel Loading Dye Purple (6x)                                                          | Biolabs            |
| Formaldehit %37                                                                      | ISOLAB             |
| Ksilen                                                                               | Merck              |
| Gliserol                                                                             | Tekkim             |
| ECL solüsyonu                                                                        | ThermoScientific   |
| Metanol LC-MS Grade                                                                  | Merck              |
| Asetonitril LC-MS Grade                                                              | Merck              |
| Su LC-MS Grade                                                                       | Merck              |
| Formik Asit LC-MS Grade                                                              | Merck              |
| Amonyum Karbanot LC-MS Grade                                                         | Merck              |

### 3.1.2. Kitler

**Tablo 2:** Çalışmada Kullanılan Kitler

| Ürün                                            | Marka                |
|-------------------------------------------------|----------------------|
| ➤ CellTiter-Glo® Lüminesans hücre canlılık kiti | ➤ Promega            |
| ➤ Nucleospin Gel-PCR cleanup                    | ➤ Macherey-Nagel     |
| ➤ DNA İzolasyon Kiti                            | ➤ Qiagen             |
| ➤ Nucleospin Plasmid                            | ➤ Macherey-Nagel     |
| ➤ RNAesy                                        | ➤ Qiagen             |
| ➤ High-Capacity RNA-to-Cdna Kit (50)            | ➤ Applied Biosystems |
| ➤ Pierce BCA Protein miktar tayini kiti         | ➤ Thermo Scientific  |
| ➤ Platinum SupeFi DNA Polimeraz Enzim Kiti      | ➤ Invitrogen         |

### 3.1.3. Cihazlar

**Tablo 3:** Çalışmada kullanılan Cihazlar

| Cihaz                                    | Marka                 |
|------------------------------------------|-----------------------|
| ➤ Distile Su cihazı                      | ➤ Millipore Elix      |
| ➤ Cytation 5 Multimode reader            | ➤ Biotek              |
| ➤ Real-Time PCR cihazı                   | ➤ Qiagen Rotor Gene Q |
| ➤ Nanodrop                               | ➤ Denovix DS-11       |
| ➤ MultiSkanGo Plate Reader               | ➤ Thermo Scientific   |
| ➤ Kar-Buz makinesi                       | ➤ Brema               |
| ➤ Laminer Flow Kabin Class II            | ➤ Thermo Scientific   |
| ➤ CO <sub>2</sub> İnkübatör HeraCell150i | ➤ Thermo Scientific   |
| ➤ CO <sub>2</sub> İnkübatör C 150        | ➤ Binder              |
| ➤ Etüv                                   | ➤ Memmert             |
| ➤ Santrifüj Allegra X-15R                | ➤ Beckman Coulter     |
| ➤ Santrifüj MicroCL21R                   | ➤ Thermo Scientific   |

|                                   |                                              |
|-----------------------------------|----------------------------------------------|
| ➤ İvert Mikroskop                 | ➤ Zeiss                                      |
| ➤ Derin dondurucu -86°            | ➤ Thermo Scientific                          |
| ➤ No frost Buzdolabı (+4, -20)    | ➤ Arçelik                                    |
| ➤ Frost-free Buzdolabı (+4, -20)  | ➤ Regal                                      |
| ➤ UV Transilluminator             | ➤ UVP                                        |
| ➤ Vortex                          | ➤ WiseMix                                    |
| ➤ Otoklav                         | ➤ VWR                                        |
| ➤ Su banyosu                      | ➤ VWR                                        |
| ➤ Çalkalayıcı inkübatör           | ➤ LABWIT                                     |
| ➤ Soğutmalı çalkalayıcı inkübatör | ➤ LabART                                     |
| ➤ Mikroplate çalkalayıcı          | ➤ Thermo Scientific                          |
| ➤ Su banyosu                      | ➤ Nüve                                       |
| ➤ Hot plate                       | ➤ Thermo Scientific                          |
| ➤ Orbital çalkalayıcı             | ➤ IKA                                        |
| ➤ Çalkalayıcı                     | ➤ VWR                                        |
| ➤ Mini çalkalayıcı                | ➤ VWR                                        |
| ➤ Manyetik karıştırıcı            | ➤ IKA                                        |
| ➤ pH metre                        | ➤ Thermo Scientific                          |
| ➤ Microcentrifuge MiniStar        | ➤ VWR                                        |
| ➤ PipetAid                        | ➤ Eppendorf                                  |
| ➤ Thermal Cycler                  | ➤ BioRad                                     |
| ➤ Güç kaynağı PowerPac Universal  | ➤ BioRad                                     |
| ➤ Güç kaynağı PowerPac 300        | ➤ BioRad                                     |
| ➤ LC-MS/MS Cihazı                 | ➤ Thermo Scientific<br>Orbitrap Exploris 240 |
| ➤ SpeedVac                        | ➤ Thermo Scientific<br>SPD140DDA             |

### 3.1.4. Sarf Malzemeler

**Tablo 4:** Çalışmada kullanılan Sarf Malzemeler

| Malzeme                             | Marka             |
|-------------------------------------|-------------------|
| Serolojik Pipetler (5, 10, 25 ml)   | SPL Life sciences |
| Falkon Tüpleri (15, 50 ml)          | SPL Life sciences |
| Hücre Kültür Flaskları (T25)        | SPL Life sciences |
| Petri Kapları (100mm)               | Fıratmed          |
| Cell culture dishes (100mm)         | Corning           |
| Well Plate (6,12,96)                | SPL Life sciences |
| Mikropipet Uçları (10, 200, 1000µl) | Axygen            |
| Mikro Santrifüj Tüpleri (1,5 ml)    | Axygen            |
| Pudrasız Eldiven (S, M, L)          | Dolphin           |
| Solüsyon Rezervuarı (50 ml)         | Isolab            |
| Kriyojenik tüp (2ml)                | Corning           |
| 8-stripli Pcr Tüpleri               | Thermo Scientific |
| Whatmann Kağıtları                  | BioRad            |
| N9 İnsert Hplc Vial ve Kapakları    | Chromtek          |

### 3.1.5. Solüsyonlar

#### 3.1.5.1. Western Blotlama Solüsyonları

**Tablo 5:** 5x Protein yükleme boyası (22.5 ml, pH 6,8)

| Kimyasal          | Miktar   | Final Konsantrasyon |
|-------------------|----------|---------------------|
| %20 SDS           | 11,25 ml | %10                 |
| 2-Merkaptoetanol  | 5,625 ml | %25                 |
| Tris-HCl          | 0,84 g   | 240 mM              |
| %100 Gliserol     | 5,625 ml | %25                 |
| Bromofenol mavisi | 12,5 mg  | 830 µM              |

%20 SDS için 2,25 g SDS dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü ve son hacim dH<sub>2</sub>O ile 11,5 ml'e tamamlandı. Hazırlanan SDS solüsyonu içerisinde tablo 5'te belirtilen miktarlarda

2-merkaptotanol, gliserol, Tris-HCl eklendi ve pH 6.8'e ayarlandı. Hazırlanan karışıma en son 12,5 mg bromofenol mavisi eklendi ve nihai karışım laminar air-flow kabininde 0,20  $\mu$ M por çapına sahip filtreden geçirilerek steril edildi. Sterilizasyonu takiben, solüsyon, 2 ml mikro santrifüj tüplere alikotlanarak -20 °C'de saklandı.

**Tablo 6:** %10 IGEPAL CA-630 (100 ml)

| Kimyasal      | Miktar | Final Konsantrasyon |
|---------------|--------|---------------------|
| IGEPAL CA-630 | 10 ml  | %10                 |

10 ml IGEPAL CA-630 80 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde, 42 °C su banyosunda çözüldü ve son hacim 100 ml'e dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı (Tablo 6). Solüsyon oda sıcaklığında saklandı.

**Tablo 7:** 0,5 M EDTA (100 ml, pH 8,0)

| Kimyasal                   | Miktar   | Final Konsantrasyon |
|----------------------------|----------|---------------------|
| EDTA.2Na.2H <sub>2</sub> O | 18,612 g | 0,5 M               |

Disodyum EDTA 70 ml dH<sub>2</sub>O'da 4 saat çalkalanarak çözüldü. Solüsyonun pH'ı 8,0'a ayarlandı ve son hacim distile su ile 100 ml'e tamamlandı (Tablo 7).

**Tablo 8:** 0,5 M HEPES (500 ml, pH 7,4)

| Kimyasal | Miktar   | Final Konsantrasyon |
|----------|----------|---------------------|
| HEPES    | 59,575 g | 0,5 M               |

400 ml dH<sub>2</sub>O içerisine tablo 8'de belirtilen miktarda HEPES eklendi ve pH 7,4'e ayarlandı. Son hacim dH<sub>2</sub>O ile 500 ml'e tamamlandı. Solüsyon oda sıcaklığında saklandı.

**Tablo 9:** RIPA protein izolasyonu lizis solüsyonu (250 ml)

| Kimyasal          | Miktar  | Final Konsantrasyon |
|-------------------|---------|---------------------|
| HEPES (0.5 M)     | 25 ml   | 50 mM               |
| NaCl (2 M)        | 37,5 ml | 150 mM              |
| %10 IGEPAL CA-630 | 25 ml   | %1                  |
| %10 SDS           | 2,5 ml  | %0,1                |
| EDTA (0.5 M)      | 1 ml    | 2 mM                |

RIPA lizis solüsyonu için tablo 9’de belirtilen kimyasallar 159 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü. Solüsyon +4 °C’de saklandı.

**Tablo 10:** 10X SDS jel yürütme solüsyonu (1 L)

| Kimyasal | Miktar | Final Konsantrasyon |
|----------|--------|---------------------|
| Tris baz | 30 g   | 250 mM              |
| Glisin   | 144 g  | 1.9 M               |
| SDS      | 10 g   | 35 mM               |

SDS-PAGE stok yürütme solüsyonu için tablo 10’da belirtilen kimyasallar 750 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü ve son hacim 1 L’ye dH<sub>2</sub>O ile tamamlandı. Solüsyon oda sıcaklığında saklandı.

**Tablo 11.** 10X TBS-T yıkama solüsyonu (1 L, pH 7,6)

| Kimyasal | Miktar   | Final Konsantrasyon |
|----------|----------|---------------------|
| NaCl     | 80,063 g | 1,37 M              |
| Tris baz | 4,954 g  | 40 mM               |
| Tris-HCl | 25,06 g  | 159 mM              |
| Tween-20 | 10 ml    | %1                  |

10X TBS-T solüsyonu hazırlamak için tablo 11’de belirtilen kimyasallar 700 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözöldü ve pH 7,6’ya ayarlandı. Son hacim dH<sub>2</sub>O ile 1 L’ye tamamlandı. Solüsyon oda sıcaklığında saklandı.

**Tablo 12:** Transfer tampon solüsyonu (1,5 L)

| Kimyasal | Miktar | Final Konsantrasyon |
|----------|--------|---------------------|
| NaOH     | 1,14 g | 19 mM               |
| CAPS     | 3,32   | 10 mM               |
| Etanol   | 150 ml | %10                 |

Yaklaşık 5 tablet NaOH ve tablo 12’de belirtilen miktarda CAPS ile etanol 1,2 L dH<sub>2</sub>O içerisinde, manyetik karıştırıcıda çözöldü. Son hacim distile su ile 1,5 L’ye tamamlandı. Solüsyon oda sıcaklığında saklandı.

**Tablo 13.** Bloklama & antikor dilüsyon solüsyonu (100 ml)

| Kimyasal | Miktar | Final Konsantrasyon |
|----------|--------|---------------------|
| Süt tozu | 5 g    | %5                  |

Bloklama ve çalışmada kullanılan antikorların dilüsyonu için tablo 13’te belirtildiği gibi 5 g süt tozu 100 ml 1X TBS-T içerisinde çözöldü. Solüsyon +4 °C’de saklandı.

**Tablo 14:** Membran yeniden kazanım solüsyonu (Stripping Buffer) (50 ml)

| Kimyasal         | Miktar   | Final Konsantrasyon |
|------------------|----------|---------------------|
| 2-Merkaptoetanol | 350      | %0.7                |
| %20 SDS          | 5 ml     | %2                  |
| 1 M Tris pH 6,8  | 3,125 ml | 62,5 mM             |

Stripping solüsyonu hazırlamak için 2-merkaptoetanol, %20 SDS ve 1 M Tris pH 6,8 50 ml distile suda çözöldü. Solüsyon oda sıcaklığında saklandı (Tablo 14).

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan K562, U-937 hücre hatları için, %10 FBS (Gibco), %1 penisilin/streptomisin (Gibco), 2mM L-glutamin içeren RPMI 1640 besiyeri kullanılmıştır. HGC27, HEK293-T hücre hattı için %10 FBS (Gibco), %1 penisilin/streptomisin (Gibco), 2mM L-glutamin içeren yüksek glukoz DMEM (Gibco) besiyeri kullanılmıştır. Kato III hücre hattı için %10 FBS (Gibco), %1 penisilin/streptomisin (Gibco), 2mM L-glutamin içeren IMDM (Gibco) besiyeri kullanılmıştır. Hücreler 37°C’de %5 CO<sub>2</sub>’li ortamda kültüre edilmiştir.

Çalışmada kullanılan hücre hatları listesi **tablo 15’**de verilmiştir.

**Tablo 15:** Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları

| Hücre Hattı | Hücre Tipi              |
|-------------|-------------------------|
| K562        | Kronik Miyeloid Lösemi  |
| U937        | Histiyoitik Lenfoma     |
| HGC27       | Mide Adenokarsinomu     |
| Kato III    | Mide Karsinomu          |
| HEK293-T    | İnsan Embriyonik Böbrek |

##### 3.2.1.1. Deneylerde Kullanılan Serin, Glisin, Serin+Glisin İçeren ve İçermeyen Besiyerlerinin Hazırlanışı

Serin-glisin deplezyon deneylerinde MEM (Gibco, 21090) besiyerine %10 diyalize FBS (Capricon, FBS-DIA-12A), %1 penisilin-streptomisin, D-glukoz (10 mM), sodyum piruvat (65 µM), 1X MEM vitamin çözeltisi (Gibco, 11120), L-Glutamin (2 mM), L-Prolin (0,15 mM), L-Alanin (0,15 mM), L-Aspartik asit (0,15 mM), L-Glutamik asit (0,15 mM) ve L-Asparajin (0,34 mM) eklendi. Bu hazırlanan besiyerinde serin ve glisin amino asitleri yoktur. Deneylerde kullanılmak üzere bu besiyerinden aşağıdaki tabloda gösterildiği üzere içerik olarak 4 farklı besiyeri hazırlandı.

**Tablo 16:** Deneylerde Kullanılan Besiyerleri (Yukarıda hazırlanan MEM besiyerinin üzerine eklenenler)

| Besiyerleri | Serin +, Glisin +             | Serin +, Glisin - | Serin -, Glisin + | Serin -, Glisin -            |
|-------------|-------------------------------|-------------------|-------------------|------------------------------|
| İçerikleri: | 0,4 mM Serin<br>0,4 mM Glisin | 0,4 mM Serin      | 0,4 mM Glisin     | Her iki amino asitte yoktur. |

**Tablo 17:** Deneyde Kullanılan Hücre Hatları ve Besiyerleri. (OE: Overekspresyon KO: Knock-Out)

| Hücre Hatları     | Deney Grupları    |                   |                   |                   |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| K562 GGH KO sg 1  | Serin +, Glisin + | Serin +, Glisin - | Serin -, Glisin + | Serin -, Glisin - |
| K562 GGH KO sg 2  | Serin +, Glisin + | Serin +, Glisin - | Serin -, Glisin + | Serin -, Glisin - |
| K562 sgCTRL       | Serin +, Glisin + | Serin +, Glisin - | Serin -, Glisin + | Serin -, Glisin - |
| K562              | Serin +, Glisin + | Serin +, Glisin - | Serin -, Glisin + | Serin -, Glisin - |
| HGC27 GGH KO sg 1 | Serin +, Glisin + | Serin +, Glisin - | Serin -, Glisin + | Serin -, Glisin - |
| HGC27 GGH KO sg 2 | Serin +, Glisin + | Serin +, Glisin - | Serin -, Glisin + | Serin -, Glisin - |
| HGC27 sgCTRL      | Serin +, Glisin + | Serin +, Glisin - | Serin -, Glisin + | Serin -, Glisin - |
| HGC27             | Serin +, Glisin + | Serin +, Glisin - | Serin -, Glisin + | Serin -, Glisin - |
| KATO III          | Serin +, Glisin + | Serin +, Glisin - | Serin -, Glisin + | Serin -, Glisin - |
| KATO III GGH OE   | Serin +, Glisin + | Serin +, Glisin - | Serin -, Glisin + | Serin -, Glisin - |
| U-937             | Serin +, Glisin + | Serin +, Glisin - | Serin -, Glisin + | Serin -, Glisin - |
| U-937 GGH OE      | Serin +, Glisin + | Serin +, Glisin - | Serin -, Glisin + | Serin -, Glisin - |

### 3.2.2. Hücre Sayımı

Çalışmada kullanılan tüm hücreler, hücre canlılık deneyinde, MTX duyarlılığın araştırılmasında, RNA, DNA izolasyonları için hücre ekimleri, PHDHG İnhibitörü CBR-5884 deneylerinde Thoma lamı ile sayıldı. Sayım için hücreler toplandı, 1250 rpm’de 5 dk. santirifüj edilip üzerindeki süpernatant atıldı, pelet 1ml taze besiyeri ile sulandırıldıktan sonra içinden homojen olacak şekilde 50 µl bir ependorf tüpe alındı. Sayım için Thoma lamının iki sayım bölgesine ayrı ayrı 10 µL+10 µL hacimlerde hücre eklendi. Yoğunluğu fazla olan hücrelere dilüsyon yapıldı. Thoma lamının her iki tarafındaki hücrelerin ortalaması alınıp aşağıdaki formülde yerine yazılıp hücre sayıları hesaplandı.

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

### 3.2.3. Hücre Canlılığının ATP Seviyesinin Ölçülmesi ile Belirlenmesi

Hücrelerin yukarıda belirtilen 4 farklı besiyerinde hücre canlılıkları CellTiter GLO Luminescent Reagent (Promega) kiti kullanılarak ölçüldü. Bunun için ml’inde 25.000 hücre hazırlanıp, bundan her bir kuyuya 200 µL olacak şekilde 96 kuyucuklu plate’e, dörtlü tekrarlar halinde ekildi. 96 saatlik inkübasyonun sonunda plate inkübatörden alınıp 30 dakika oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Her bir kuyucuğa oda sıcaklığına getirilmiş 40 µL Cell TiterGLO solüsyonu eklendikten sonra plate 5 dakika, 800 rpm’de mikroparka çalkalayıcıda çalkalandı. Plate 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrası lüminesans miktarı multimod mikroparka okuyucuda belirlendi. Kontrol hücrelerin serin+glisin amino asitlerinin her ikisinin de olduğu tam besiyeri içinde büyüyen hücreler referans alınarak, diğer deney koşullarındaki hücre canlılığı rölatif olarak Microsoft Office Excel programında hesaplandı. Grafikler GraphPad Prism 9 (GraphPAD software inc, ABD) programında oluşturuldu.

### 3.2.4. RNA İzolasyonu

Tablo 17’de belirtilen deney gruplarına ml’de 300 bin hücre olacak şekilde 6’lı well plate’e ekim yapıldı, 96 saat inkübasyondan sonra hücreler toplandı, 1250 rpm’de 5 dk. santrifüj edilip süpernatant atıldı ve hücre peletleri 2 ml soğuk PBS

ile resüspanse edilip, tekrar aynı devir ve sürede santrifüj edildi. Santrifüj sonrası PBS tamamen uzaklaştırıldı. Hemen çalışılmayacaksa hücre peletleri -80°C'ye kaldırıldı. Hücre hatlarından elde edilen hücre peletlerinden RNA izolasyonu RNeasy Plus Mini Kit'in (Qiagen) protokolüne uygun yapıldı.

- ✓ Hücre peletlerinin 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 yıkama solüsyon 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 ependorflar buz üzerine alındı ve konsantrasyonları nanodropla ölçüldü. Elde edilen RNA'lar daha sonra cDNA sentezinde kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

### 3.2.5. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lardan cDNA eldesi High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) kullanılarak protokole uygun yapıldı (Tablo 18). Bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Tabloda gösterilen karışım, son hacim enjeksiyonluk steril su ile 20 µl'ye tamamlanarak Thermal Cycler' da önce 37°C' de 60 dakika, sonra 95°C 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon tamamlanınca

cDNA'lar 1:8 oranında nükleaz içermeyen su ile dilüe edilerek qRT-PCR için kullanılmak üzere -20°C' ye kaldırıldı.

**Tablo 18.** cDNA sentezi için kullanılan kitin protokolü.

| Karışım Bileşenleri                                                  | 1X (Hacim)   |
|----------------------------------------------------------------------|--------------|
| RNA (1 µg/µl olacak şekilde hesaplama yapılarak örnek hacmi alındı.) | 1 µg (-µl?)  |
| 2x RT buffer mix                                                     | 10 µl        |
| 20x RT enzim mix                                                     | 1 µl         |
| Nükleaz içermeyen su (Steril enjeksiyonluk su kullanıldı)            | - µl         |
| <b>Total</b>                                                         | <b>20 µl</b> |

### 3.2.6. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR)

Serin-glisin amino asit metabolizmasında görevli enzimlerden *PHGDH*, *SHMT1*, *SHMT2*, *GGH* ile house-keeping gen olarak *RPLP0* için primerler Primer3 programı ile tasarlandı. PowerUp SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem) protokolü uygulanarak (Tablo 19) Qiagen Rotor Gene Q cihazında tablo 19'da belirtilen koşullar ayarlanarak gen ekspresyonları tespit edildi. Çalışmada kullanılan primerler tablo 20'de verilmiştir.

**Tablo 19.** qRT-PCR için kullanılan kitin protokolü

| 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 <sub>2</sub> O                  | 7 µl         |
| <b>Total</b>                       | <b>20 µl</b> |

**Tablo 20.** qRT-PCR Koşulları

| qPCR Koşulları          |       |       |
|-------------------------|-------|-------|
| UDG aktivasyonu         | 50 °C | 2 dk  |
| Başlangıç denatürasyonu | 95 °C | 2 dk  |
| Denatürasyon            | 95 °C | 15 sn |
| Bağlanma                | 60 °C | 15 sn |
| Sentez                  | 72 °C | 60 sn |
| Bekleme                 | 4 °C  | ∞     |

**Tablo 21.** qRT-PCR primer listesi (Primerler kullanılmadan önce 1:10 dilue edildi.)

| Gen          | Primer Yönü (5' 3') | Primer dizisi          |
|--------------|---------------------|------------------------|
| <b>RPLP0</b> | Forward             | AGCATCTACAACCCTGAAGTG  |
|              | Reverse             | AGCAAGTGGGAAGGTGTAATC  |
| <b>GGH</b>   | Forward             | ACCTCTGACTGCCAATTTC    |
|              | Reverse             | ACTCATAAGGTGCTTTCTCTGG |
| <b>PHGDH</b> | Forward             | AGGAAGGGCATCTTGGTTATG  |
|              | Reverse             | ATTCCCAGGGTCTTTCCATTC  |
| <b>SHMT1</b> | Forward             | CGAGCTGGCATGATCTTCTAC  |
|              | Reverse             | GTCAGAACCACCTGTGACTATT |
| <b>SHMT2</b> | Forward             | GATATCAGCCACGTCCATCTTC |
|              | Reverse             | GTAGTCAATGAGGCGAGCATAG |

### 3.2.7. Protein İzolasyonu

Hücreler ml'de 300 bin hücre olacak şekilde 6'lı well plate'e ekildi, 96 saat inkübasyondan sonra hücreler toplandı, 1250 rpm'de 5 dk. santrifüj edilip süpernatant atıldı ve hücre peletleri soğuk 500 µL PBS ile resüspanse edilip mikrosantrifüj tüplere alındı, 3000 rpm'de 2 dakika + 4 °C'de santrifüj edildi. PBS peleti bozmadan ortamdan uzaklaştırıldı. Peletin üzerine 200 µL proteaz inhibitörü eklenmiş RIPA lizis solüsyonu eklenip birkaç kez pipetlendi. 10 dakika

buzda lizis için bekletildi. Tüpler 12000 rpm'de 4 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Üstteki süpernatant ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. İçinden 20 µL alınarak protein konsantrasyonları Bicinchoninic Acid (BCA) Assay kit (Pierce BCA kit, ThermoScientific, USA) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol uygulanarak ölçüldü. Örneklerdeki protein miktarları lizis solüsyonu kullanılarak eşitlendi ve üzerine yükleme boyası eklenerek 95 °C, 5 dk. ısıtıp -20 °C'ye kaldırıldı.

#### **3.2.7.1. 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 µg/ml olarak hesaplandı.

#### **3.2.8. Western Blotlama**

Western Blotlama için protein örneklerinin konsantrasyonları 1 mg/ml'ye son hacim 120 µL olacak şekilde ayarlandı. Üzerlerine 5X protein yükleme tamponundan 30 µL eklendi. Örneklerden 20 µL %4-12'lik Tris-Glisin jellere yüklenerek SDS-PAGE jel elektroforezi yapıldı. Elektroforez sonrası jeller ıslak transfer yöntemi ile 0,45 µm por çapına sahip PVDF membrana transfer edildi. Transfer sonrası membran 1 saat 1X'lik TBS-T solüsyonu ile hazırlanmış %5 yağsız süt tozu içerisinde çalkalayıcı üzerinde bloklandı. Bloklanan membranlar 1:2000 konsantrasyonda birincil antikor ile bir gece +4 °C'de bırakıldı. Ertesi gün 15 dk. 1 olmak üzere 3 kere 1X TBS-T ile yıkanıp, 1:5000 konsantrasyonda ikincil antikor ile

oda ısıda 1 saat inkübe edildi. Sonrasında membran aynı şekilde tekrar 3 kez yıkandı. Proteinlerin kemilüminesans görüntülenebilmesi için membran 3 dakika, ECL solüsyonu (Pierce ECL, ThermoScientific, USA) ile muamele edildi. Görüntüler Azure C300 cihazında alındı. Housekeeping proteinlerin tespiti için membranlara yeniden kazanım (stripping) yapıldı. Membranlar 5 ml stripping solüsyonunda 30 dakika 60 °C su banyosunda inkübe edildi. Ardından 3 kez 5'er dk. çalkalayıcıda su ile yıkandı. Bloklama, antikör muameleri, yıkama ve diğer aşamalar tekrar edilerek görüntü elde edildi.

### **3.2.9. GGH Susturulmuş(Knock-Out) Hücre Hatlarının Eldesi**

#### **3.2.9.1. GGH KO için CRISPR/Cas9 Plazmitlerinin Hazırlanması**

GGH geni için 5 farklı guideRNA (gRNA) UCSC genome browser ve crispr.mit.edu web sayfaları kullanılarak belirlendi (Tablo 21). sgRNA'lar LentiCRISPR V2 vektörüne (Şekil 10) klonlandı (Zhang lab LentiCRISPR library protokolü kullanıldı) (73). Çalışmada kullanılan tüm primerler ve sekanslama hizmetleri Macrogen Firmasından alındı. Klonlama için öncelikle LentiCRISPR V2 vektörü BbsI restriksiyon endonükleazı ile 30 dakika 37 °C'de kesildi (Tablo 22). Aynı zamanda tablo 21'deki sgRNA'lar T4 PNK (NEB) enzimi ile fosforillendi ve bağlandı (Tablo 23). Bağlanma thermal cyclers cihazında gerçekleştirilmiştir ve koşullar tablo 24'te belirtilmiştir. Bağlanmış sgRNA'lar 1:200 oranında enjeksiyonluk su ile sulandırıldı. Klonlama için sulandırılmış sgRNA'lar ile kesilmiş vektör T4 DNA ligaz (NEB) enzimi kullanılarak 37 °C'de 30 dakika inkübasyon koşullarında bağlandı (Tablo 25). Kesilmiş vektörün kendi üzerine bağlanıp bağlanmadığını kontrol etmek için sgRNA içermeyen sadece vektör ve enzim içeren negatif kontrollü olarak ligasyon işlemi yapıldı ve sonrası transformasyon işlemine geçildi.

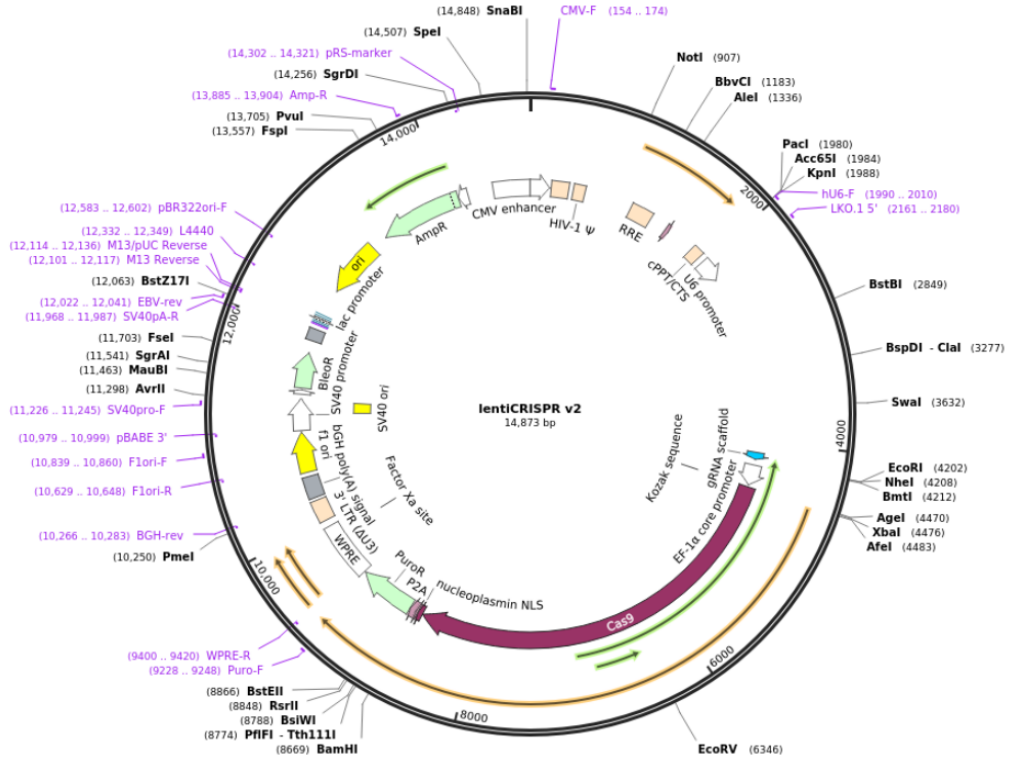
#### **Transformasyon:**

- ✓ Ligasyon ürünlerinden 5 µl alındı ve 50 µl *Escherichia coli* STBL3 suşu içerisine aktarıldı.

- ✓ Mikrosantrifüj tüpündeki bakteri ve plazmit karışımı 10 dakika buz içerisinde inkübe edildi.
- ✓ İnkübasyon sonrası 30 saniye 42 °C su banyosunda bekletilerek, bakteri ısı şokuna uğratıldı. Ardından tüp 2 dakika buzda inkübe edildi.
- ✓ Karışım 300 µl zenginleştirilmiş SOC besiyerine aktarıldı ve 45 dakika çalkalayıcıda 37 °C 250 rpm de inkübe edildi.
- ✓ Kültür, 3000 rpm’de 3 dakika santrifüj yapıldı. Supernatant atıldı ve bakteri pelleti 50 µl SOC besiyerinde resüspanse edilerek 100 µg/mL oranında ampisilinli petriye ekildi.
- ✓ Petri 30 °C’de 20 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası petriden tek koloni seçildi ve 5 ml ampisilinli LB içerisine aktarılarak gece boyu 37 °C’de kültürlendi.
- ✓ Kültürden MN plazmid izolasyonu kitinin protokolüne uygun olarak DNA izole edildi. Elde edilen plazmitlerin içinde sgRNA’ların düzgün bir şekilde yerleştiğini kontrol etmek için Sanger dizilemeye gönderildi.

**Tablo 22.** sgRNA’ler için sipariş verilen oligonükleotid dizileri

|                         |                                  |
|-------------------------|----------------------------------|
| <b>GGH sgRNA_1F</b>     | <b>caccGGGCCTGCTACTCTGCGGGG</b>  |
| <b>GGH sgRNA_1R</b>     | <b>aaacCCCCGCAGAGTAGCAGGCC</b>   |
| <b>GGH sgRNA_2F</b>     | <b>caccGCTTCTTGGCGGTGTCGCCG</b>  |
| <b>GGH sgRNA_2R</b>     | <b>aaacCGGCGACACCGCCAAGAAGC</b>  |
| <b>GGH sgRNA_3F</b>     | <b>caccGCACAGCAGGCAGCCCGGAC</b>  |
| <b>GGH sgRNA_3R</b>     | <b>aaacGTCCGGGCTGCCTGCTGTGC</b>  |
| <b>GGH sgRNA_4F</b>     | <b>caccGCAGGCCCAGCACGCACAGC</b>  |
| <b>GGH sgRNA_4R</b>     | <b>aaacGCTGTGCGTGCTGGGCCTGC</b>  |
| <b>GGH sgRNA_5F</b>     | <b>caccGATGCCGCTGAACCTCACTGG</b> |
| <b>GGH sgRNA_5R</b>     | <b>aacccCCAGTGAAGTTCAGCGGCAT</b> |
| <b>control sgRNA_2F</b> | <b>aacccCCAGTGAAGTTCAGCGGCAT</b> |
| <b>control sgRNA_2R</b> | <b>aaacCAGCTGTGAAGAGGTATAATC</b> |



**Şekil 10:** CRISPR/Cas9 için kullanılan lentiCRISPR v2 plazmitinin Haritası (Addgene.com'dan alınmıştır) (75).

**Tablo 23.** BbsI restriksiyon endonükleazı ile kesim protokolü

| Karışım Bileşenleri     | Miktar       |
|-------------------------|--------------|
| LentiCRISPR V2 plazmid  | 5 µg         |
| FastDigest BsmBI enzim  | 3 µl         |
| FastAP alkalın fosfataz | 3 µl         |
| 10X FastDigest buffer   | 6 µl         |
| dH <sub>2</sub> O       | - µl         |
| <b>Total</b>            | <b>60 µl</b> |

**Tablo 24.** sgRNA'ların bağlanması (annealing)

| Karışım Bileşenleri             | Miktar       |
|---------------------------------|--------------|
| sgRNA Forward primer<br>(100µM) | 1 µl         |
| sgRNA Reverse primer<br>(100µM) | 1 µl         |
| 10X T4 ligasyon buffer          | 1 µl         |
| T4 PNK                          | 0,5 µl       |
| dH <sub>2</sub> O               | 6,5 µl       |
| <b>Total</b>                    | <b>10 µl</b> |

**Tablo 25.** sgRNA'ların bağlanma koşulları

| Derece | Dakika |
|--------|--------|
| 37 °C  | 30     |
| 95 °C  | 5      |
| 5 °C   | 1      |
| 25 °C  | ∞      |

\*95 °C' den dk. 5 °C olacak şekilde düşerek 14 döngüde 25 °C'ye düşer

**Tablo 26.** sgRNA'lar ile vektörün ligasyon protokolü

| Karışım Bileşenleri             | Miktar       |
|---------------------------------|--------------|
| Bağlanmış sgRNA                 | 1 µl         |
| Kesilmiş LentiCRISPR V2 plazmid | 2 µl (50 ng) |
| 10X T4 ligasyon buffer          | 1 µl         |
| dH <sub>2</sub> O               | 6 µl         |
| T4 DNA ligaz                    | 1 µl         |
| <b>Total</b>                    | <b>11 µl</b> |

### 3.2.9.2. Virüs Üretimi ve Transfeksiyon

Virüs üretimi XtremeGene 9 (Roche) transfeksiyon ajanı protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Protokole göre ilk önce 6 well plate'in 6 kuyusuna  $5 \times 10^5$  sayıda Hek293T hücresi %5 FBS içeren DMEM besiyeri içerisine ekildi ve plate 37 °C %5 CO<sub>2</sub> etüvde gece boyu, hücrelerin kuyuların %80-%90'ını kaplaması için inkübe edildi. Transfeksiyon karışımı için sgRNA'ları içeren rekombinant vektör ile paketleme ve kılıf DNA'ları (pVSV-G, pLP1 ve pLP2) ve transfeksiyon ajanı tablo 27'da belirtilen miktarlarda 100 µl serum ve antibiyotik içermeyen DMEM besiyeri içerisine eklendi. Karışım oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Ardından 1 gün önce ekilen Hek293T hücrelerine damla damla damlatıldı. Plate 24 saat 37 °C %5 CO<sub>2</sub> etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerin besiyeri %10 FBS %1 pen/strep %1 L-glutamin içeren 3 ml DMEM besiyeri ile değiştirildi. Plate 24 saat 37 °C %5 CO<sub>2</sub> etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonrası virüs içeren besiyerleri 15 ml'lik falkon tüplere toplandı ve 0,45 µm por çapına sahip filtreden geçirildi. Elde edilen virüsler -80 °C'ye kaldırıldı.

### Transfeksiyon:

- ✓  $3 \times 10^5$  HGC27 ve K562 hücreleri 6 well plate'in 6 kuyusuna 2 ml %10 FBS %1 L-glutamin içeren DMEM ve RPMI besiyerleri içerisine ekildi, 37 °C %5 CO<sub>2</sub> etüvde inkübe edildi.
- ✓ Hücreler %50-60 yoğunluğa ulaştığında, virüsler -80 °C dolabından çıkarıldı ve 37 °C su banyosunda çözüldü.
- ✓ Hücrelere 8 µg/ml olacak şekilde polybrene ve 1'er ml virüs damla damla eklendi. Plate elle hafifçe çalkalandı ve 1 saat 2200 rpm 30 °C'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra plate 37 °C %5 CO<sub>2</sub> etüvde inkübasyona bırakıldı.
- ✓ 24 saat inkübasyonu takiben hücrelerin besiyeri %10 FBS %1 pen/strep %1 L-glutamin içeren 3 ml DMEM ve RPMI ile besiyerleri değiştirildi ve hücreler 24 saat 37 °C %5 CO<sub>2</sub> etüvde inkübasyona bırakıldı.
- ✓ Transfeksiyon sonrası 48. saatte hücrelere final konsantrasyonu 2 µg/ml şeklinde puromisin eklendi ve plate 3 gün 37 °C %5 CO<sub>2</sub> etüvde inkübasyona bırakıldı.
- ✓ İnkübasyondan sonra hücreler mikroskopta kontrol edildi ve kontrol hücrelerinin tamamen öldüğü gözlenirken deney gruplarındaki hücrelerde yüksek hücre popülasyonu saptandı.Ölmeyen kontrol hücreleri varsa ikinci doz antibiyotik uygulandı.

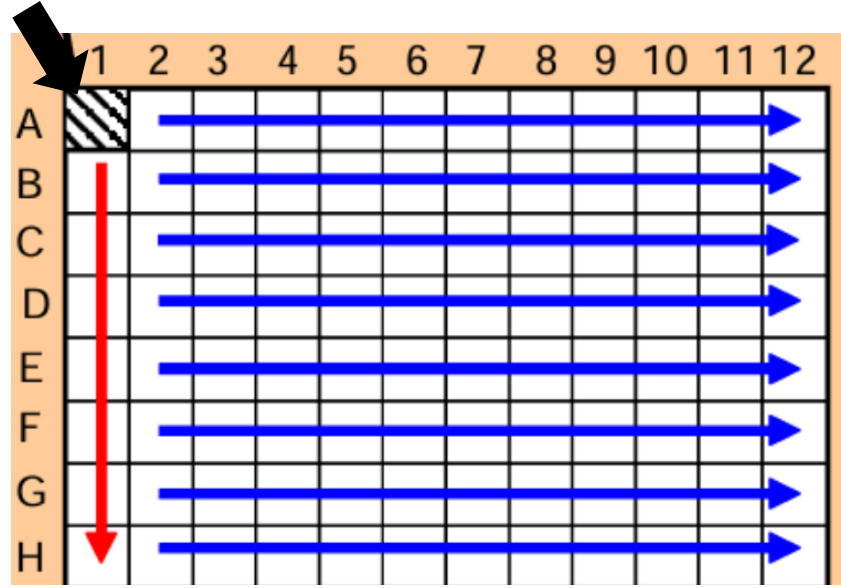
**Tablo 27.** 6 well plate için XtremeGene 9 transfeksiyon karışımı

| Karışım Bileşenleri                 | Miktar |
|-------------------------------------|--------|
| sgRNA içeren LentiCRISPR V2 plazmid | 1,5 µg |
| pVSVG                               | 1,5 µg |
| pLP1                                | 1,5 µg |
| pLP2                                | 1,5 µg |
| XtremeGene 9 transfeksiyon ajanı    | 18 µl  |
| Serumsuz ve antibiyotiksiz DMEM     | 100 µl |

### 3.2.9.3. Tek Hücreden Klonlama Yöntemiyle GGH KO Hücrelerin Elde Edilmesi

- ✓ Tek hücre klonlama yöntemi için adezif hücreler tripsin ile kaldırıldı, süspanse hücreler direk toplandı ve 15 ml falkonlara alınıp 1250 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Hücre pelleti 1 ml %10 FBS %1 pen/strep %1 L-glutamin içeren DMEM veya RPMI besiyeri ile resüspanse edildi ve hücre sayımı yapıldı.
- ✓ 96'lık well plate'in A1 olan ilk kuyusu hariç diğer tüm kuyularına 100 µl besiyeri konuldu.
- ✓ Her bir hücre grubu için 96 şeffaf well plate'lere ml'sinde 20.000 bin olarak hazırlanan hücrelerden 200 µl alınarak yaklaşık 4000 hücre olacak şekilde A1 olan ilk kuyuya ekildi.
- ✓ İlk sütunun 1. kuyusu hariç diğer kuyulara aynı besiyerinden 100'er µl eklendi. İlk kuyudan 100 µl hücre, pipetleme yapılarak, alındı ve 1. sütunun 2. kuyusuna eklendi. Ardından 2. kuyudan 100 µl hücre alınarak 3. kuyuya eklendi. Bu işlem ilk sütunun son kuyusuna kadar devam etti (Dikey dilüsyon).
- ✓ Son kuyuya da 100 µl hücre eklenince ilk sütunun diğer kuyularına 100 µl besiyeri eklendi ve ilk sütunun bütün kuyularda son hacim 200 µl oldu.
- ✓ Rezervuara 20 ml besiyeri döküldü ve 8-kanallı mikropipetör ile 100 µl alınarak 1. sütun hariç diğer tüm sütunlardaki kuyulara 100 µl eklendi.
- ✓ Ardından 1. sütundaki hücrelerden, pipetleme yapılarak, 100 µl alınarak 2. sütuna aktarıldı. Sonra 2. sütundaki hücrelerden 100 µl alınarak 3. sütuna aktarıldı. Bu işlem son sütuna kadar devam etti. Yatay yönde seri dilüsyon yapılmış oldu.
- ✓ Son sütun da tamamlanınca, son sütun hariç diğer tüm kuyulara 100 µl besiyeri eklenerek son hacim tüm kuyularda 200 µl'ye tamamlandı (Şekil 11).
- ✓ Plate 37 °C %5 CO<sub>2</sub> etüvde inkübasyona bırakıldı. 1 hafta inkübasyon sonrası hücreler mikroskopta kontrol edildi ve tek hücre kolonileri saptandı ve işaretlendi.

- ✓ Gözlenen koloniler kuyuyu kapladığında kaldırıldı ve 24 well plate ekildi. Hücreler bulunduğu kabı doldurduğunda 6 well plate'lere alındı. Yeteri kadar büyütülen protein izolasyonu yapılarak GGH protein bandı Western Blotlama ile kontrol edildi. GGH ekspresyonu gözlenmeyen hücreler etiketlendi sonraki deneylere bu hücreler ile devam edildi. Aynı zamanda KO hücrelerin validasyonu için Western Blot yanında ilgili genin sgRNA tarafından kesilen ekzonu için PCR yapıp, Sanger dizilemede yapıldı.



Şekil 11: Tek hücre seçimi için dikey ve yatay dilüsyonu gösteren plate düzeni.

#### 3.2.9.4. Plazmit izolasyonu (Miniprep)

- ✓ Petri kabındaki tek koloniler, 10 mikrolitrelik pipet uçlarıyla alınarak, 100 µg/mL oranında ampisilin içeren 15 ml falkon tüplerdeki 5 ml LB besiyerine aktarıldı. Bu kültür 250 rpm'de 37 °C'de bir gece boyunca çalkalandı.
- ✓ Falkon tüpteki kültürler 4000 xg'de 10 dk santrifüj yapıldı. Nucleospin miniprep kit (MachereyNagel™, MN) protokolüne uygun olarak süpernatant uzaklaştırıldı ve bakteri pelletleri 250 µl A1 solüsyonu ile vortex ve pipetleme yardımıyla resüspanse edildi.
- ✓ Süspansiyonlar 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerine alındı ve üzerine 250 µl A2 solüsyonu ilave edildi. Tüpler 8 kez yavaşça ters yüz edilerek karıştırıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

- ✓ Ardından üzerine 300 µl A3 solüsyonu eklendi ve tüpler tekrar 8 kez yavaşça ters yüz edildi. Süspansiyon 11000 xg'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, kitin içeriğinde bulunan kolona aktarıldı ve kolon 11000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve
- ✓ Kolona 500 µl 50 °C'de ısıtılmış AW yıkama solüsyonu eklendi. Kolon 11000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki atık uzaklaştırıldı ve 600 µl A4 yıkama solüsyonu eklendi ve kolon 11000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi.
- ✓ Kolon yeni bir toplama tüpüne takıldı ve etanolün uzaklaştırılması için 11000 xg'de 2 dakika santrifüj edildi.
- ✓ Kolon 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve kolona yapışan DNA'yı çöktürmek için 50 µl AE elüsyon solüsyonu eklendi. Kolon 3 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve ardından 11000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon atıldı ve mikrosantrifüj tüpüne çöktürülen plazmid DNA'sının konsantrasyonu nanodrop'ta ölçüldü.

#### **3.2.9.5. DNA İzolasyonu**

Hücrelerden GGH KO validasyonu için DNA, Qiagen DNA mini Kit ile üretici firma protokolüne uygun olarak izole edildi. Toplanan ve PBS ile yıkanan hücre peletlerinin üzerine proteinaz K ve ALT tampon solüsyon eklendi. 15 sn. vorteks sonrası 56°C'de 10 dk. inkübe edildi. 200 µl ethanol (96–100%) eklendi ve 15 sn. vorteks sonrası kolona aktarıldı. Santrifüj- yıkama döngülerinden sonra 50 µl'de elüsyon yapıldı ve konsantrasyonu ölçüldü.

#### **3.2.9.6. GGH Geninin Ekzon 1 Bölgesinin Çoğaltılması**

Hücrelerden elde edilen genomik DNA'dan GGH geninin ekzon 1 bölgesi polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile Platinum™ SuperFi™ DNA Polymerase enzim kiti kullanılarak çoğaltıldı. Tablo 27'deki GGH ekzon 1 primer dizileri gösterilmektedir. PCR karışımı Tablo 28'de, PCR koşulları Tablo 29'da yer almaktadır.

**Tablo 28:** GGH Genine ait Ekzon 1 Bölgesi için tasarlanmış primer dizileri.

| Gen         | Primer Yönü (5' 3') | Primer dizisi         |
|-------------|---------------------|-----------------------|
| GGH Ekzon 1 | Forward             | GACTGCATTTCCTCATAGGCC |
|             | Reverse             | GGTTCCTCCTTGACCAAAAG  |

**Tablo 29:** GGH Ekzon 1 Bölgesi için PCR karışımı.

| Karışım Bileşenleri    | Miktar       |
|------------------------|--------------|
| 5X Buffer              | 5 µl         |
| 10 mM dNTP             | 0,5 µl       |
| 10 µM Forward Primer   | 1 µl         |
| 10 µM Reverse Primer   | 1 µl         |
| DNA (genomik)          | 2 µl (50 ng) |
| 5X GC Enhancer         | 5 µl         |
| Super Fi DNA Polimeraz | 0,25 µl      |
| dH <sub>2</sub> O      | 10,25        |
| <b>Total</b>           | <b>25 µl</b> |

**Tablo 30:** GGH Ekzon 1 Bölgesi için PCR Koşulları

| PCR Koşulları           |       |        |
|-------------------------|-------|--------|
| Başlangıç denatürasyonu | 98 °C | 30 sn. |
| Denatürasyon            | 98 °C | 7 sn.  |
| Bağlanma                | 58 °C | 10 sn. |
| Sentez                  | 72 °C | 30 sn. |
| Bekleme                 | 4 °C  |        |

### 3.2.10. GGH Eksprese Eden (Overekspresyon) Hücre Hatlarının Eldesi

Total cDNA'lerden Platinum SuperFi DNA Polimeraz enzimi kullanarak GGH cDNA'sı PCR ile çoğaltıldı, PCR içeriği ve koşulları Tablo 30'da yer almaktadır. Bu işlem sırasında overhang enzim kesim bölgeleri eklendi, GGH için primer listesi tablo 31'de gösterilmiştir. Elde edilen cDNA uygun restriksiyon

enzimleri ile kesilip linearize edilmiş retroviral pMXS-blast ve lentiviral pLent\_-EF1a-GFP-2A-Puro vektörlerine (vektör haritaları şekil 12’de gösterilmiştir) klonlandı. Klonlama sonrası elde edilen plazmitlerin viral paketlemesi HEK293T hücrelerinde pMXS-blast vektörü için pHCMV-Ampho kılıf plazmidi ile pLent\_-EF1a-GFP-2A-Puro vektörü için paketleme vektörü olarak psPAX2 zarf vektörü olarak pMD2.G vektörleri ile yapılacaktır. Elde edilen virüslerin titresi belirlendikten sonra MOI:1 olacak şekilde U937 ve Kato III hücreleri transfekte edildi. Transfeksiyonun 24. Saatinde besiyeri değişecek, 48. Saatte blastisidin ve puromisin seleksiyonu başladı. Hücreler 72 saat 10 ug/ml final konsantrasyonda blastisidin antibiyotiği ile muamele edilmiş oldu. Seçilim sonrası GGH ekspresyonu western blotlama ve Sanger Dizileme ile kontrol edildi.

**Tablo 31:** GGH Genine ait PCR içeriği ve koşulları.\*cDNA olarak MCF7 hücre hattına ait cDNA kullanılmıştır.

| PCR Koşulları           |       |        |
|-------------------------|-------|--------|
| Başlangıç denatürasyonu | 98 °C | 30 sn. |
| Denatürasyon            | 98 °C | 7 sn.  |
| Bağlanma                | 58 °C | 10 sn. |
| Sentez                  | 72 °C | 30 sn. |
| Bekleme                 | 4 °C  |        |

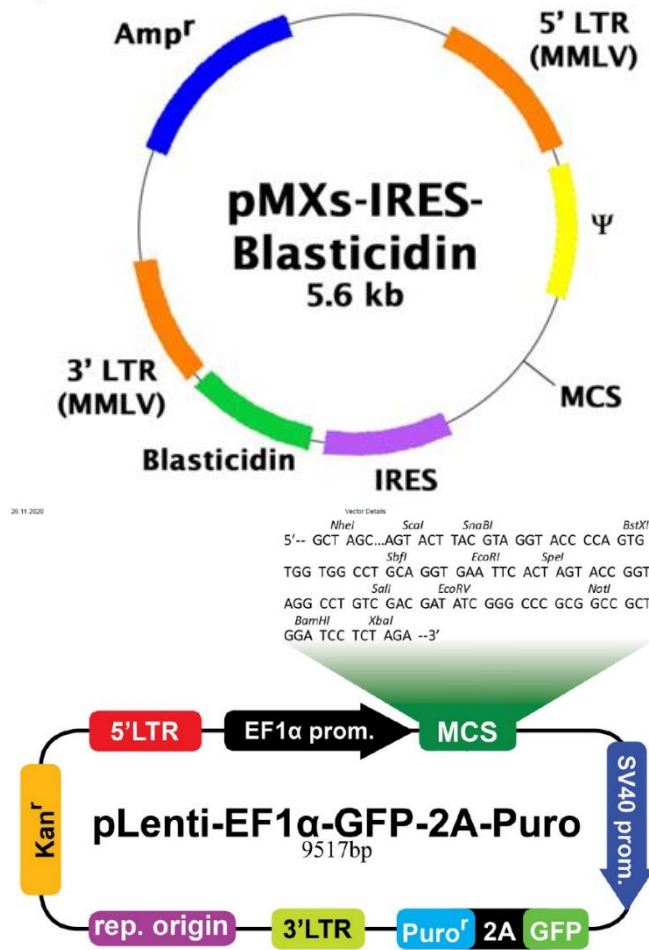
  

| Karışım Bileşenleri    | Miktar       |
|------------------------|--------------|
| 5X Buffer              | 10 µl        |
| 10 mM dNTP             | 1 µl         |
| 10 µM Forward Primer   | 2,5µl        |
| 10 µM Reverse Primer   | 2,5 µl       |
| Template DNA*          | 1 µl         |
| 5X GC Enhancer         | 10 µl        |
| Super Fi DNA Polimeraz | 0,5 µl       |
| dH <sub>2</sub> O      | 22,50 µl     |
| <b>Total</b>           | <b>50 µl</b> |

| Gen          | Primer Yönü (5' 3') | Primer dizisi           |
|--------------|---------------------|-------------------------|
| GGH          | Forward             | ATGGATCCGCCACCATGGCCAGT |
| BamHI/HindII | Reverse             | CCGGGCTGC               |
| pMXS-blast   |                     | ATAAGCTTTCAATCAAATATGTA |

|                   |         |                         |
|-------------------|---------|-------------------------|
| vektörü için      |         | ACATTGCTG               |
| <b>GGH</b>        | Forward | ATGTCGACTCAATCAAATATGTA |
| <b>SalI/BamHI</b> | Reverse | ACATTGCTG               |
| pLent_-EF1a-      |         | ATGGATCCTCAATCAAATATGTA |
| GFP-2A-Puro       |         | ACATTGCTG               |
| vektörü için      |         |                         |

**Tablo 32:** GGH Geninin Klonlanmasında Kullanılan Primerlerin Listesi.



**Şekil 12:** GGH Ekspresyonu için Kullanılan Ekspresyon Vektörlerinin Haritaları.

PCR ürünleri % 1'lik agaroz jelde 100 voltta yürütüldü. PCR bantları UV transillüminatör altında görüntülenerek kesildi ve ependorf tüplere transfer edildi. PCR ürünlerinin jelden temizlenmesi MN Nucleospin Gel-PCR cleanup kiti kullanılarak ticari firma protokolüne uygun olarak yapıldı.

- ✓ Kesilen jel parçası tartılarak ağırlığını iki katı üzerine  $\mu\text{L}$  NTI Buffer eklendi.
- ✓ 50 °C'de ısıtıcı blok üzerinde 10 dk inkübe edildi. Ara ara tüp hafifçe çalkalanarak jelin tamamen homojen olarak çözünmesi sağlandı.
- ✓ İnkübasyon sonrasında süspansiyon kit ile birlikte gelen PCR purification kolona transfer edildi.
- ✓ Kolon 11000 g'de 30 sn santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı atık uzaklaştırıldı.
- ✓ Kolona 700  $\mu\text{L}$  yıkamak için NT3 Buffer konuldu. Kolon 11000 g'de 30 sn santrifüj edildi.
- ✓ Yıkama bufferında bulunan etanolü tamamen uzaklaştırmak için kolon temiz bir tüpe alınarak 11000 g'de 1 dk. boş santrifüj edildi.
- ✓ Kolon 1,5 mL'lik ependorf tüpe alındı. PCR ürününün elüsyonu için üzerine 16  $\mu\text{L}$  EB buffer koyuldu. 2 dk oda ısısında inkübe edildi.
- ✓ 11000 g'de 1 dk. santrifüj edildi. Ependorfta biriken PCR ürününün konsantrasyonu nanodrop cihazında ölçüldü.

| Restriksiyon Karışımı         | Miktar                            |
|-------------------------------|-----------------------------------|
| DNA (plazmid ya da PCR ürünü) | 1 $\mu\text{g}$                   |
| Enzim 1                       | 1 $\mu\text{L}$                   |
| Enzim 2                       | 1 $\mu\text{L}$                   |
| 10X Buffer                    | 5 $\mu\text{L}$                   |
| dH <sub>2</sub> O             | 50 $\mu\text{L}$ ' ye tamamlanır. |

Ekspresyon vektörleri olarak retroviral pMXs-IRES-blasticidin ve lentiviral pLent\_-EF1a-GFP-2A-Puro plazmidleri kullanıldı. Kullanılan kesim enzimleri ve bufferlar tablo 32.'de verildi.

Karışım 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. Kesilen ürünler ligasyondan önce MN Nucleospin Gel-PCR cleanup kiti ile temizlendi.

**Tablo 33:** Klonlama çalışmalarında kullanılan vektör ve kesim enzimlerinin listesi.

| Insert | Vektör                  | Restriksiyon Enzimi (NEB) | Buffer (NEB)   |
|--------|-------------------------|---------------------------|----------------|
| GGH    | pMXS-blast              | BamHI/HindII              | Buffer 3.1     |
|        | pLent_-EF1a-GFP-2A-Puro | Sall/BamHI                | 10 X rCutSmart |

Restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra temizlenen vektör ve klonlanacak cDNA ligasyon reaksiyonuna alındı. Self-ligasyonun kontrolü için boş vektör DNA insert olmadan ligasyon reaksiyonuna alındı ve transformasyonda kullanıldı.

#### Ligasyon Karışımı

|                   | Boş Vektör          | Vektör+ İnsert      |
|-------------------|---------------------|---------------------|
| Vektör            | 1 birim (*)         | 1 birim (*)         |
| İnsert            | —                   | 3 birim (*)         |
| Buffer            | 1 µL                | 1 µL                |
| T4 quick ligase   | 0,5 µL              | 0,5 µL              |
| dH <sub>2</sub> O | 10 µL ye tamamlandı | 10 µL ye tamamlandı |

(\*):İnsert vektöre göre daha küçük yapıda olduğundan son konsantrasyonlarının birbirine eş olması için insertten 3 kat fazla miktarda konularak 3:1 (insert: vektör) oranı kullanıldı. Bu oran insert vektör büyüklüklerine bağlı olarak değişebilir.

Ligasyon reaksiyonları oda ısısında 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda reaksiyonlar hemen buza kaldırıldı. Ligasyon ürünleri kimyasal olarak kompetan hale getirilmiş DH5α suşuna transforme edildi ve pMXS vektörü ampicilinli petriye, plenti vektörü kanamisinli petriye ekildi. Ertesi gün petriler kontrol edildi. İçerisinde insert olan vektör ile boş vektörün oluşturduğu koloniler kontrol edildi. Boş vektör ekilen plate de hiç koloni olmadığı ya da insert& vektör ligasyonu ekilen plate göre en az 10 kat az koloni olduğu durumlarda klonlama

başarılı sayıldı. En az üç koloni seçilerek miniprep kit kullanarak plazmit izolasyonu yapıldı. Klonlamanın doğruluğu için plazmit ürünü DNA dizi analizine gönderildi. 3.2.9.2. Virüs Üretimi ve Transfeksiyon'daki protokole göre onaylanan plazmitler virüs yapılarak U-937 ve KATO III hücreleri transfekte edildi. Western Blot ile validasyonu yapıldı.

### **3.2.11. Hücrelerin Serin, Glisin ve Serin/Glisin İçermeyen Ortamda MTX ile Muamele Edilmesi**

Metotreksat (Cayman 13960) 4,54 mg tartılıp 5mL DMSO içinde çözüldü ve 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek 2mM stok solüsyonu hazırlandı. Hücreler 50.000 hücre/ml olacak şekilde 4 farklı besiyerinde hazırlandı ve beyaz renkli 96 well plate'e 100 µL hacimde ekildi. Üzerine 2X konsantrasyonda hazırlanan, final konsantrasyonu ise 0, 5, 10, 25, 50,100 nM MTX olacak şekilde ilaçlı besiyerinden de 100 µL ilave edildi. Hücreler 72 saat 37°C'de çoğaltıldı. Deney sonucunda hücre canlılığı ATP bazlı cell TiterGLO ile belirlendi. Kontrol hücreleri referans alınarak hücre canlılığı rölatif olarak Microsoft Office Excel programında hesaplandı. Grafikler GraphPad Prism 9 (GraphPAD software inc, ABD) programında oluşturuldu.

### **3.2.12. Hücrelerin Serin, Glisin ve Serin/Glisin İçermeyen Ortamda CBR-5884-PHDHG Enzim İnhibitörü ile Muamele Edilmesi**

CBR-5884, aktif, seçici bir fosfogliserat dehidrojenaz (PHGDH) inhibitörüdür. CBR-5884 kanser hücrelerinde de novo serin sentezini inhibe eder ve yüksek serin biyosentetik aktivitesine sahip kanser hücre hatları için seçici olarak toksiktir. CBR-5884 (MCE,40700)'den 5 mg tartıp, 5 ml DMSO çözüldü, 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek 3 mM stok solüsyonu hazırlandı. K562 hücre hatları için IC<sub>50</sub> 13 µM olarak belirlendi. Hücreler 50.000 hücre/mL olacak şekilde 4 farklı besiyerinde hazırlandı (final konsatrasyonda 25.000 hücre/mL)ve beyaz renkli 96 well plate'e 100 µL hacimde ekildi. Üzerine 2X konsantrasyonda hazırlanan, final konsantrasyonu ise 13 µM olacak şekilde CBR-5884'li besiyerinden de 100 µL ilave edildi. Hücreler 72 saat 37°C'de çoğaltıldı. Deney sonucunda hücre canlılığı ATP bazlı cell TiterGLO ile belirlendi. Kontrol hücreleri

referans alınarak hücre canlılığı rölatif olarak Microsoft Office Excel programında hesaplandı. Grafikler GraphPad Prism 9 (GraphPAD software inc, ABD) programında oluşturuldu.

### **3.2.13. LC-MS/MS Metabolit Analizi**

Metabolomik profillemeye için optimizasyon çalışması yapıldı. Bu çalışmada HILIC kolon Merck SeQuant ZIC-HILIC (5 µm 150x4.6 mm) kullanıldı. Optimizasyon çalışmasında hem çözücü etkisi hemde uçurma etkisi değerlendirildi. LC-MS cihazı olarak Thermo Scientific Orbitrap Exploris 240 kullanıldı.

#### **Optimizasyon Çalışması**

Hücreler (K562 sg2-2, sg3-2 ve sgctrl ) 6 'lı well plate ml'de 300 bin olacak şekilde 3'lü olarak 4 farklı (serin+ glisin+, serin + glisin -, serin - glisin +, serin - glisin -) besiyerinde ekildi. 4 gün inkübasyon sonrası hücreler toplandı ve PBS ile yıkandıktan sonra 200 µl soğuk ekstraksiyon bufferıyla (Metanol: Asetonitril: Su: Su: Su 50:30:20) süspanse edildi. Daha sonra hücreler, kısa bir vorteks sonrası 4°C, 10 dk. da çalkalayıcıda lizis edildi ve sonra 15 dakika 16,000 g de santrifüj edildi. İki set hücrenin süpernatantı direk LC-MS/MS'de okumaya verilirken bir set hücre evaporatörde çözücüler uçurulduktan sonra 200 µl su ile çözülerek LC-MS/MS'e enjekte edildi.

2 farklı yöntem kullanıldı. İlk yöntem optimizasyon için denendi. İzotop izleme için asıl 2. yöntem kullanıldı.

| Yöntem | Kolon                                          | Hareketli faz                                                        | Akış Hızı | Kolon sıcaklığı | Gradient profili                                                        | Analiz süresi |
|--------|------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-----------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 1      | Merck SeQuant ZIC-HILIC (5 µm 150x4.6 mm)      | % 0.1 formik asit içeren su ve % 0.1 formik asit içeren asetronitril | 0.1 mL/dk | 25°C            | 1.0 → 80<br>30.0 → 20<br>30.1 → 5<br>35.0 → 5<br>35.1 → 80<br>45.0 → 80 | 45 dk         |
| 2      | Merck SeQuant ZIC-pHILIC (2.1 mmX150 mm, 5 µm) | A:Amonyum Karbonat 20 mM içeren su ve B:Asetonitril                  | 0.2 mL/dk | 25°C            | 1.0 → 80<br>30.0 → 20<br>30.1 → 8<br>35.0 → 8<br>35.1 → 80<br>45.0 → 80 | 45 dk.        |

### **Ekstraksiyon**

- ✓ Süspanse hücreler homojen olacak şekilde pipetaj yapılır ve içinden hücre sayımı için hücre alındı.
- ✓ Hücreler PBS ile yıkanıp 1250 rpm, 5 dk. da santifüj edildi ve PBS uzaklaştırıldı.
- ✓ Soğuk lizis çözücü (Metanol 50%, Asetonitril 30%, Su 20%) 200 µl eklendi. (methanol ve asetronitril bir gün önceden 50 ml falkonda -20 derecede muhafaza edilir, su ise +4 de, ekstraksiyon günü sabahdan ne kadar kullanılacaksa o oranda yukardaki oranlarda karıştırılıp -20 de tutulur).
- ✓ Hücreler, kısa bir vorteks sonrası 4°C for 10 dk. çalkalayıcıda bırakıldı ve 15 dk. 16,000 santrifüj edildi ve süpernatant LC-MS/MS'de analiz edildi.

### **HPLC**

Kolon: Merck seQuant ZIC-PHILIC column (2.1 mmX150 mm, 5 µm)

Mobil Faz A: Amonyum Karbonat 20 mM (pH 9.4)

Mobil Faz: B:Asetonitril

Enjeksiyon hacmi: 5 µl

Total yürütme zamanı: 45 dk.

### **Akış Oranları**

| <b>Mobil Faz: A</b> | <b>Mobil Faz: B</b> | <b>Süre</b> |
|---------------------|---------------------|-------------|
| %20                 | %80                 | 0-30 min    |
| %92                 | %8                  | 31-37 min   |
| %20                 | %80                 | 37-46       |
| %20                 | %80                 | 42 min      |

### **MS analizleri:**

Süspanse hale getirilmiş örneklerden 5 µL SeQuant ZIC-pHILIC 2.1 mm x 150 mm (5 µm partikül boyutu) kolona yüklendi.. Kolon Sequant ZIC-pHILIC koruyucu kolon (2.1 x 20 mm, 5 µm) ile birlikte kullanıldı. Akış hızı 200 µL/dk. Sıcaklıklar kolon için 25°C, örnek tepsisi için 4°C kullanıldı. Mobil faz A 20 mM amonyum karbonat, %0.1 amonyum hidroksit Mobil faz B ise %100 asetonitril olacaktır. MS tam tarama, polarity- switching modunda çalıştırılacaktır. Spray voltajı 3.0 kV, kapiller sıcaklığı 275°C ve HESI probe sıcaklığı 350°C oldu. Sheath gaz 40 units, auxiliary gaz 15 units and the sweep gaz 5 unit ayarlandı. MS data toplanması 70–1000 m/z aralığında, 70.000 rezolüsyonda, AGC hedefi 1×10<sup>6</sup>, maksimum enjeksiyon zamanı 20 msn. olarak yapıldı. Data analizleri Compound Discover 3.3 (Thermo Fisher Scientific) programında yapıldı. Pik yüzeyleri hücre sayılarına göre normalize edilecektir. Metabolit ekstraksiyonu ve LC-MS enjeksiyon hacmi için dahili bir standart olarak U-13C<sub>6</sub>-Glukoz tam işaretli moleküllerin metabolit seviyelerini normalize etmek için kullanıldı

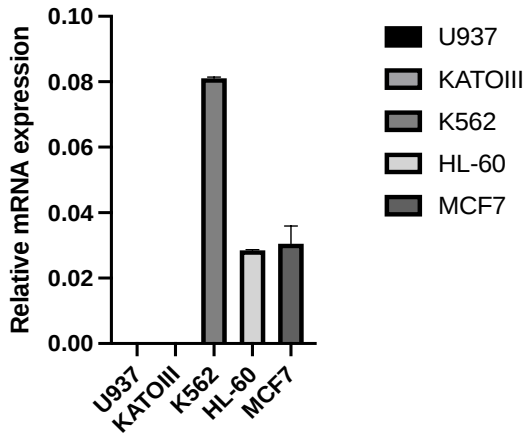
### **3.2.14. İstatistik Analizler**

Hücre deneyleri ve qRT-PCR deneyleri iki bağımsız deneyle tekrarlandı. Geri kalan tüm deneyler üç kez tekrar edildi. Hücre canlılık deneylerinde her bir grup en az triplikate olarak çalışıldı. Analizler ve grafikler GraphPad PrismV9 programında yapıldı. İki grup arasında anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için Student's t-test yöntemi kullanıldı.

## 4. BULGULAR

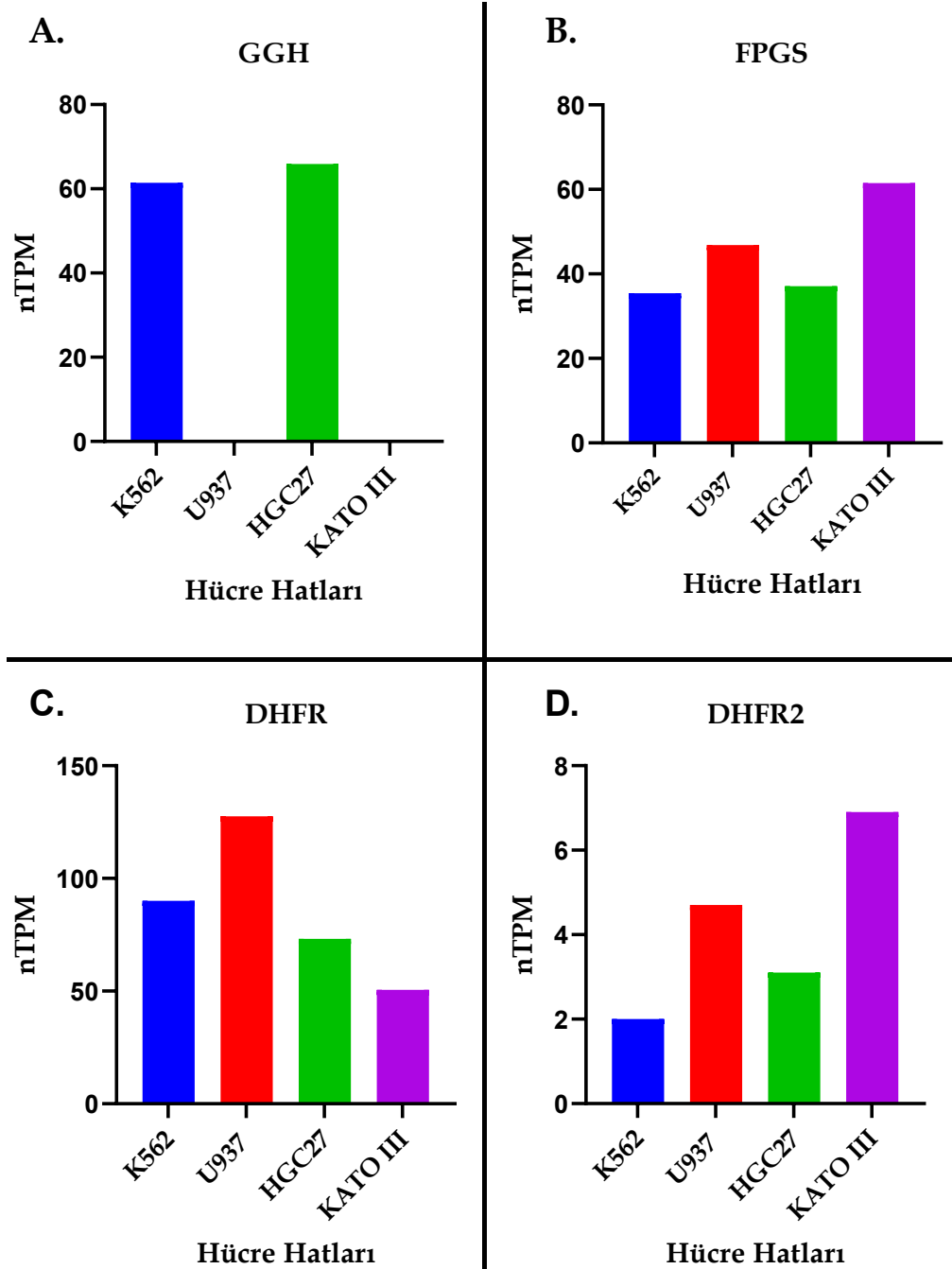
### 4.1.Çalışmada Kullanılan Hücre Hatlarında Serin-Glisin ve Folat Metabolizması ile İlişkili Olan Genlerin *in silico* Analizi

Çalışmada kullanılan K562, U937, HGC27 ve KATO III olmak üzere 4 farklı hücre hattı vardır. Bu hücre hatlarında serin-glisin ve folat metabolizması ilgili önemli enzimlerin ekspresyonları ‘The Human Protein Atlas’ veri tabanından nTPM (transcripts per million) değerleri alınarak karşılaştırmalı olarak incelendi. **Şekil 14** ‘de folat molekülün hücre içinde girdiğinde poliglutamat kuyruğu ekleyen FPGS enzimi ile polyglutamat kuyruğunun hidroliz edip folatın hücre dışına çıkışını sağlayan GGH enzimini ve folatın indirgenmesinde görevli DHFR ve DHFR2 enzimleri 4 farklı hücre hattında ekspresyon miktarları gösterilmektedir. **A** grafiğinde GGH enziminin U937 ve KATO III hücre hatlarında eksprese etmediğini görüyoruz ki bizde qRT-PCR ile de kendimiz **Şekil 13**’ de gösterildiği gibi GGH enzimini eksprese etmediklerini doğruladık.



**Şekil 13:** Farklı hücre hatlarıyla birlikte Kato III ve U937 hücre hattında GGH mRNA ekspresyonunun doğrulanması.

**B** grafiğinde 4 hücre hattında FPGS enziminin ekspresyonunun farklı olduğu görülmektedir. Hücrelerde FPGS/GGH oranı MTX gibi kemoterapi ajanlarının etkinlik gösterebilmesi için önemlidir.

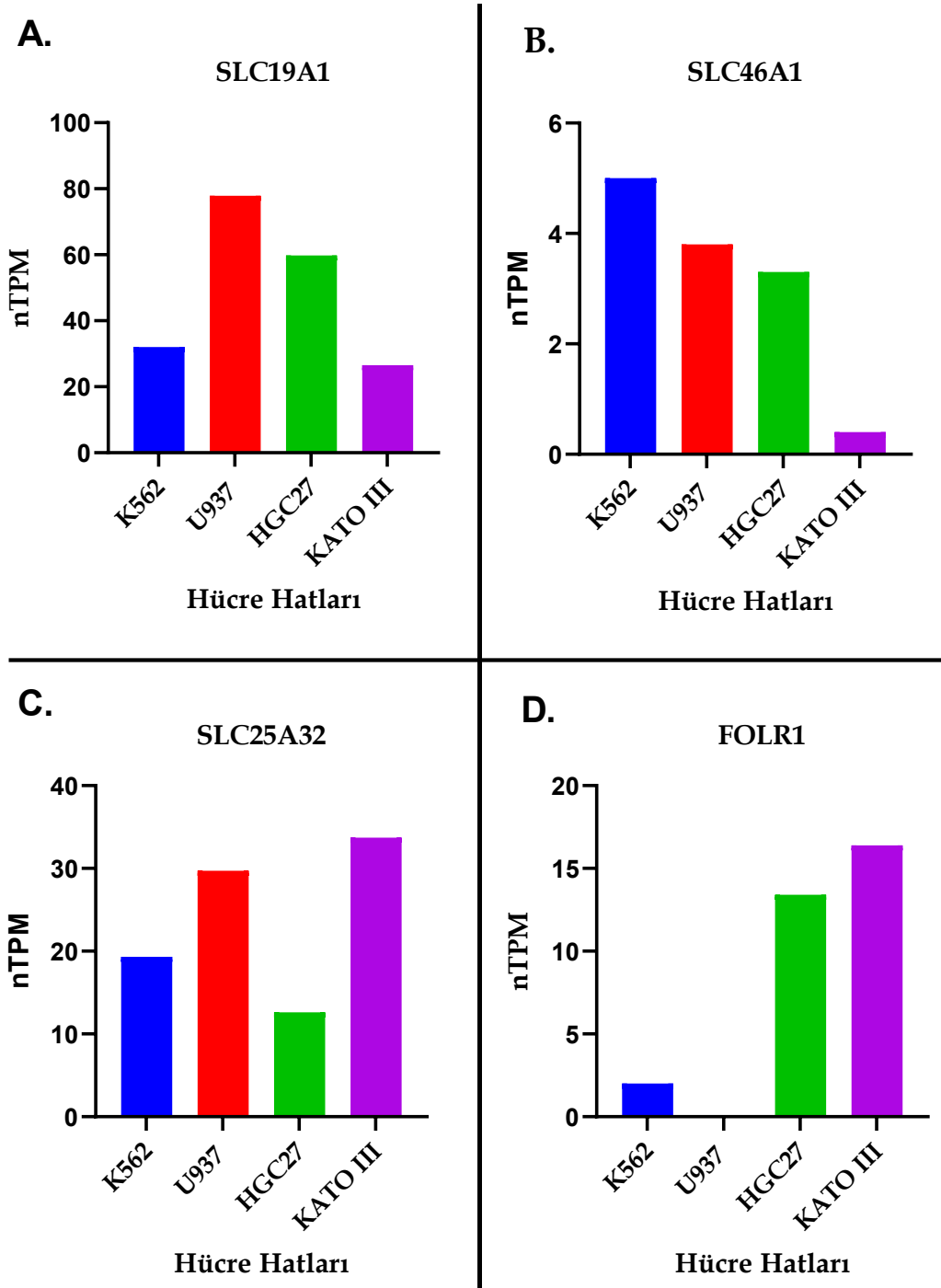


**Şekil 14:** Çalışmalarda kullanılan hücre hatlarında folat metabolizmasında görevli enzimlerin The Human Protein Atlas veri tabanından yararlanılarak çizilen gen ekspresyon profilleri. (<https://www.proteinatlas.org/>) (76). A., B., C., D. GGH, FPGS, DHFR, DHFR2 genlerinin hücre hatlarındaki ifadelerinin karşılaştırma grafikleri (nTPM: transkriptse per million).

C ve D grafiklerinde biri sitoplazmada biri mitokondride folat molekülünün indirgenmesinde görevli DHFR ve DHFR2 enzimleri vardır. Bu

genleri hücre hatlarının her biri farklı miktarlarda eksprese etmektedirler. K562, HGC27 ve U-937 hücre hatları *DHFR* genini *DHFR2*'ye göre daha fazla ifade ederken, KATO III hücre hattı ise tam tersi *DHFR2* genini *DHFR*'ye göre daha fazla eksprese etmektedir. Hücre hatlarını kendi içinde bu enzimler açısından değerlendirdiğimizde enzimlerden sitoplazmada eksprese eden yüksek ise mitokondride görevli olanın daha düşük ifade ettiği görülmektedir.

**Şekil 15'**te *SLC19A1*, *SLC46A1*, *SLC25A32* folat taşıyıcı proteinlerinin hücreler arasındaki gen ifadelerinin *in silico* incelenmesi gösterilmektedir. **A** grafiğinde *SLC19A1* genine ait ekspresyon seviyeleri görülmektedir. Bu gen tarafından kodlanan membran proteini bir folat taşıyıcısıdır ve hücre içi folat konsantrasyonlarının düzenlenmesinde rol oynar. U-937 ve HGC27 'de KATO III ve K562' göre daha fazla ifade edilmektedir. **B** grafiğinde hücre hatlarında *SLC46A1* geninin 4 farklı hücre hattında ekspresyonu görülmektedir. Bu gen asidik pH ortamlarında folat ve antifolat substratlarının hücre zarları boyunca hareketini kolaylaştıran bir transmembran proton-bağlı folat taşıyıcı proteini kodlar. En fazla K562'de en az Kato III'de eksprese etmektedir. **C** grafiğinde hücre hatlarında *SLC25A32* geninin 4 farklı hücre hattında ekspresyonu görülmektedir. Bu genin kodladığı protein folatı iç mitokondriyal membran boyunca taşır. Bu genin hücre hatları arasında en çok KATO III'de en az HGC27'de eksprese ettiği görülmektedir. **D** grafiğinde hücre hatlarında *FOLR1* geninin 4 farklı hücre hattında ekspresyonu görülmektedir. Bu gen tarafından kodlanan protein folat reseptör ailesinin bir üyesidir. Bu gen ailesinin üyeleri folik asit ve indirgenmiş türevlerini bağlar ve 5-metiltetrahidrofolatı hücrelere taşır. Bu gen ürünü, bir glikozil-fosfatidilinositol bağlantısı yoluyla membranlara bağlanan veya çözünür bir formda bulunan salgılanmış bir proteindir. HGC27 ve KATO III hücre hatları yüksek, K562 çok az ifade ederken, U-937 ise hiç eksprese etmemektedir.

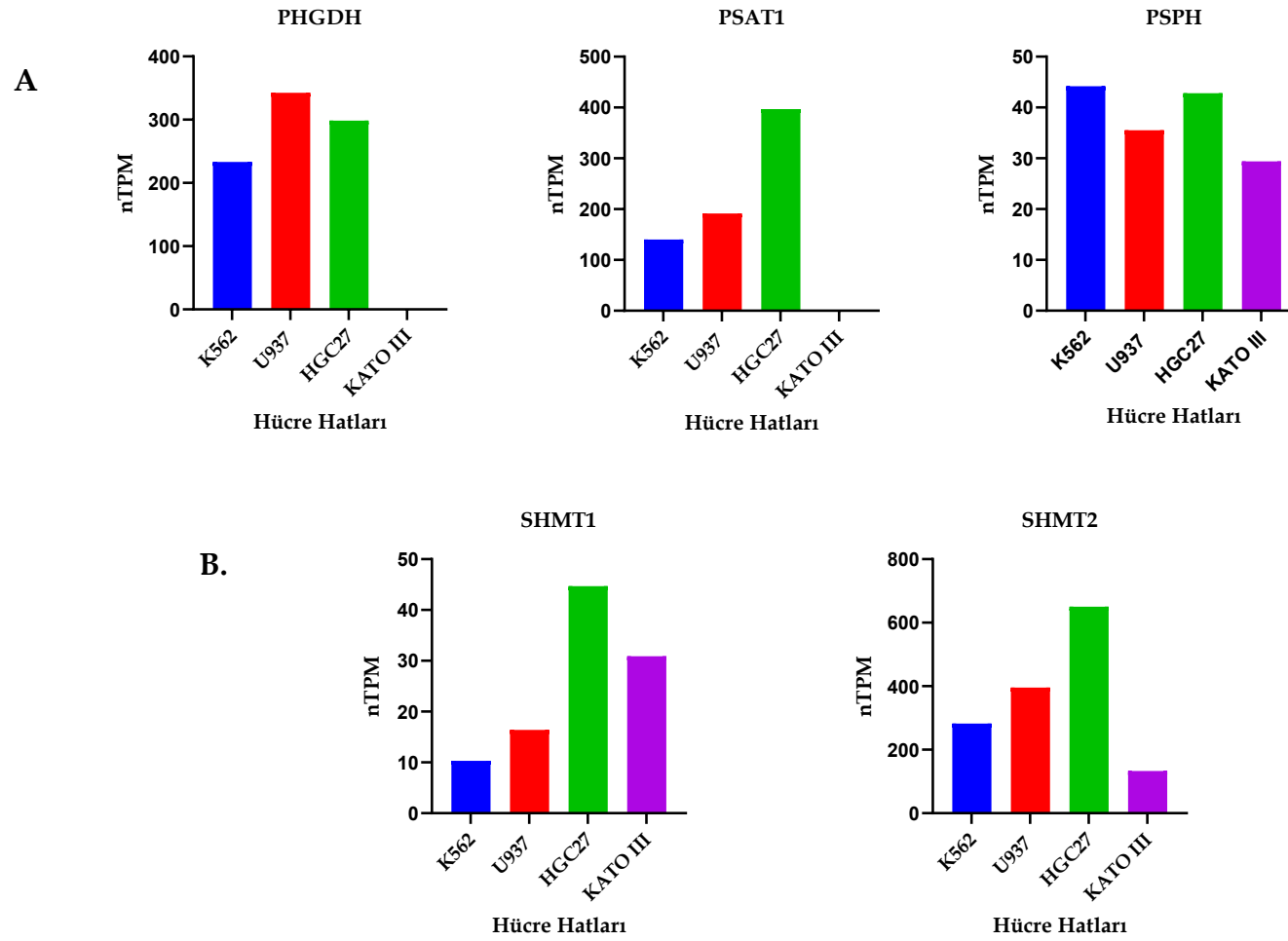


**Şekil 15:** 4 Farklı hücre hattında folat taşıyıcısı proteinlerin *SLC19A1*, *SLC46A1*, *SLC25A32* ve *FOLR1* reseptörünün gen ekspresyon profilleri.

Bir sonraki sayfada gösterilen Şekil 16A'da serin amino asidinin *de nova* sentezinde görevli enzimler ile Şekil 16B'de serinden glisin üretimde rol oynayan

enzimlerin gen ifadeleri yer almaktadır. **A** figüründe yer alan grafiklerde *PHGDH*, *PSAT1* ve *PSPH* genlerinin ekspresyonları görülmektedir. *PHGDH* ve *PSAT1* gen ekspresyon seviyelerinde KATO III hücre hattında ilginç olarak *de nova* serin sentezi için gerekli enzimlerin olmadığı görülmektedir. KATO III hücre hattı hem GGH hem de *PHGDH*, *PSAT1* enzimlerini sentezlememektedir. HGC27, K562 ve U-937 hücre hatlarına göre *PSAT1* genini daha fazla ifade etmektedir. **B** figüründe SHMT1 sitoplazmada SHMT2 mitokondride olmak üzere serinden glisin sentezinde görevli iki enzimdir. HGC27 her ikisinde yüksek eksprese ederken, K562 ve U-937 hücre hatları sitoplazmik forma göre mitokondriyal formda daha yüksek ifade etmektedir. KATO III ise sitoplazmik form SHMT1'de SHMT2'ye göre çok daha fazla eksprese etmektedir.

Deneyler öncesi hücre hatlarının daha yakından incelenmesi deney koşullarına karşı hücreler tarafından verilen cevapların değerlendirilmesinde yardımcı olmaktadır.

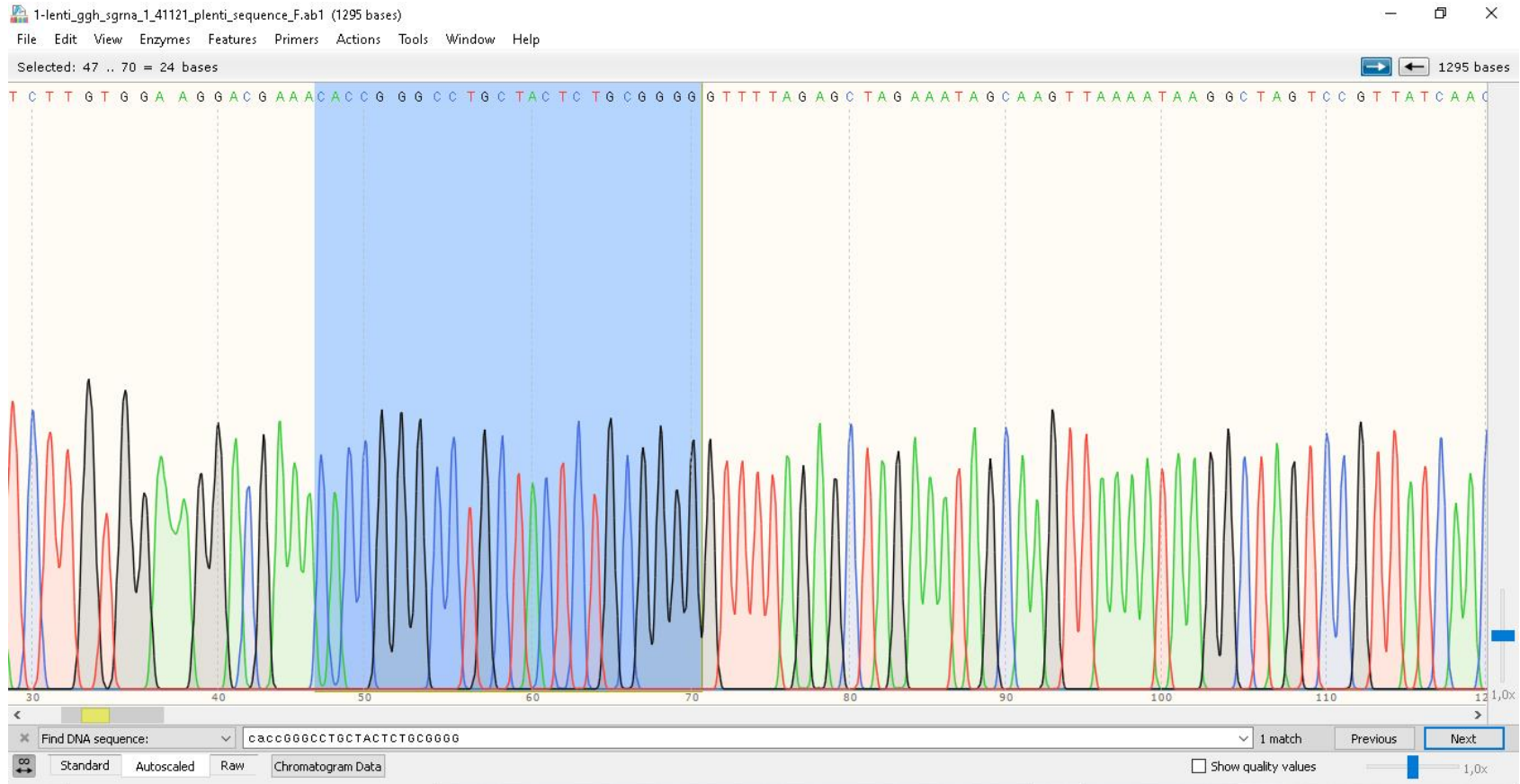


**Şekil 16:** Deneysel çalışmalarda kullanılan hücre hatlarında serin-glisin amino asit metabolizması ile ilgili önemli enzimlerin *in silico* gen ifadelerinin gösterimi.

## 4.2. İzogenik Hücre Hatlarının Hazırlanması ve Valide Edilmesi

### 4.2.1.GGH KO Hücre Hatlarının Validasyonu

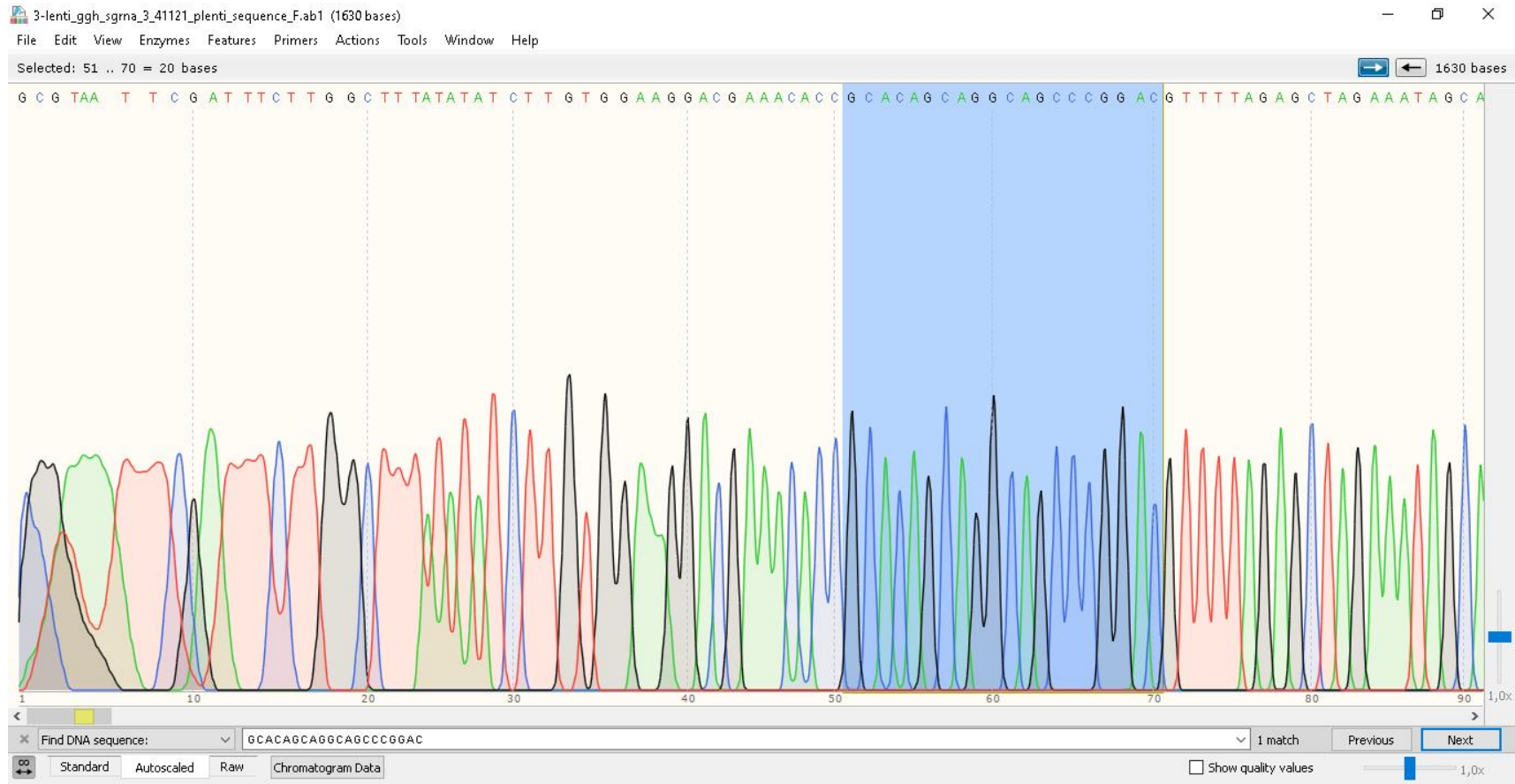
A.



B.



C.

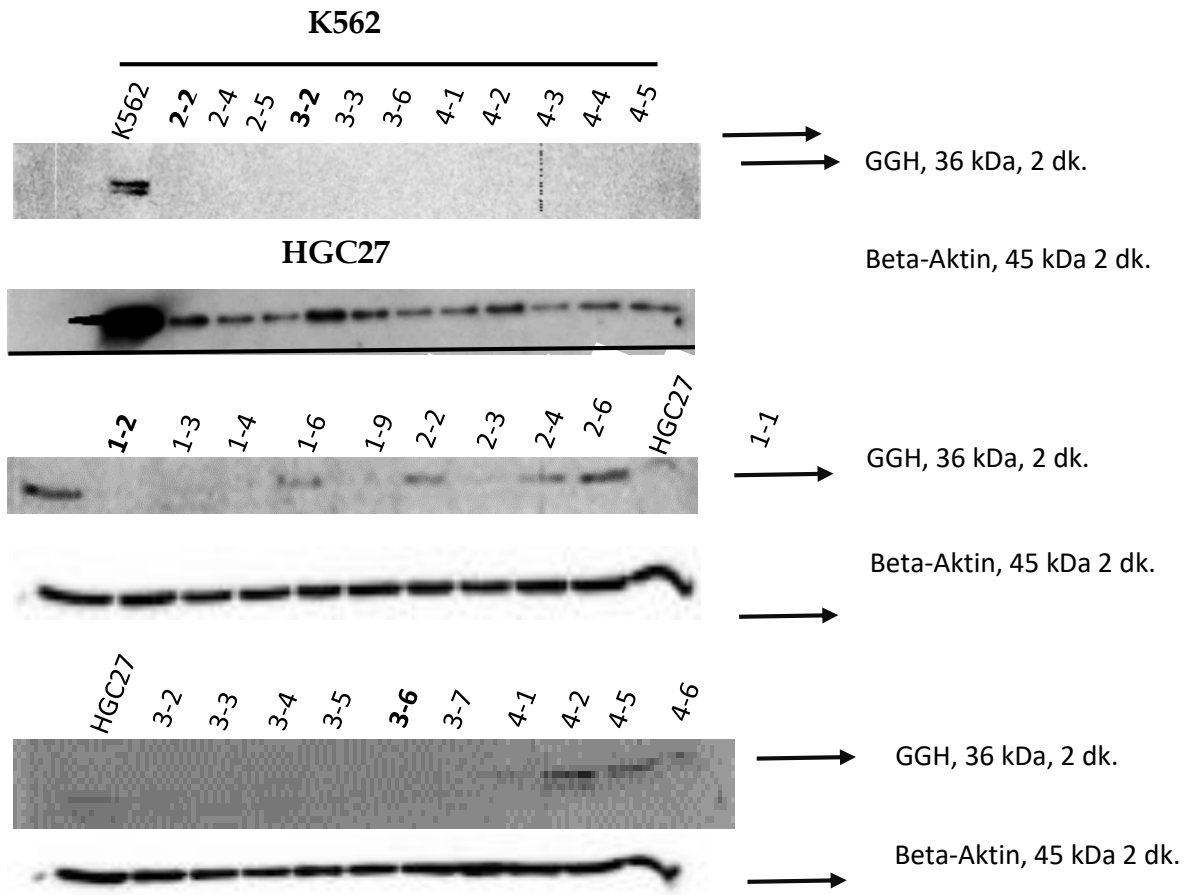


D.



Şekil 17. LentiCRISPR V2-sgRNA dizi analizi sonuçları. a) 1F, b)2F, c)3F, d)4F.

Şekil 17’de A., B.,C., D. sırası ile LentiCRISPR V2 vektörüne aktarılan sgRNA 1, 2,3 ve 4’ün Sanger Dizileme sonuçları Snapgene Programı kullanılarak görüntülendi ve sgRNA’ların Forward dizilerinin bulunduğu kısımlar mavi ile işaretlendi. Bu sayede ligasyon işleminin başarılı olduğu ve sgRNA’ların plazmide entegre olduğu doğrulandı. Doğruladığımız plazmitleri Hek293T hücre hattında virüs yapıldıktan sonra K562 ve HGC27 hücrelerine transfeke edildi. Transfeke hücreler tek hücre seçilimi ve koloni oluşturma yöntemi ile tek hücreden çoğaltıldı ve kolonilere GGH protein varlığının olup olmadığını gösteren Western Blot validasyonu yapıldı. GGH bandı göstermeyen koloniler seçildi.



**Şekil 18:** CRISPR/Cas9 ile GGH susturulmuş hücre hatlarının validasyonu. K562 ve HGC27 hücre hatlarında viral transfeksiyon sonrası seçilen kolonilerin tamamen knockout (KO) olup olmadıkları Western Blot ile doğrulanması. İki basamaklı ifadelerde ilk rakam sgRNA numarası, ikinci rakam seçilen klon numarasıdır. İlk K562 hücre hattı Western Blotında protein eşitlemesi olmamasından klonlar seçilirken total proteini yüksek olanlar dikkate alınmıştır. Seçilen hücreler kalınlaştırılarak belirtilmiştir.

GGH protein bandı olmayan klon hücre hatları seçildi, GGH protein bandı olan hücreler atıldı. Bu hücrelerden K562 sg2-2, sg3-2 ve Hgc27’den sg1-2 ve sg3-6

seçildi (Şekil 18). Bu hücre hatlarındaki sgRNA'lar GGH Genini Ekzon 1 bölgesinden kesmektedirler. O sebeple bu seçilen hücrelerden genomik DNA izole edilip, GGH Ekzon 1 bölgesinin PCR'ı yapılarak çoğaltıldı ve Macrogen firmasına Sanger Dizilemeye gönderildi. Ekzon 1 Bölgesinde değişiklik olup olmadığı kontrol edildi.

### **Sekans Sonuçları:**

Altta yer alan GGH Ekzon 1 bölgesi, promoter ile birlikte genome browser'dan alınmıştır. Yeşil renkle işaretli olanlar primer bölgeleridir. Büyük harfle gösterilen kısım kodlama yapan ekzon bölgesidir.

```
tcgccgtcccgtcttcacttctacagatgccgcgacccccaaatagcaagtgtggacattcacattcaggggcacaggctgtccgtaca
gcgaacgttgtcaccattcccggagatagggcccgaccttcaagggggcggtgcggttggcgcgagttctcaggcgcttctagaatcc
cctgccagcctccccgtgcctggttacaaactcggcggggacaccaacctcccctctcaggacctgggt tggccagcccagctttgt
acgggtgactgaagtccacatcgacgtaacagttgaaaggaaggacgcggagaccacccggtaccgccccaggcgcttccagagtct
ccgcttaggcggcccggtgggggtcggggtcgcggtcgcggtcgcggaaccggggacagagcaatggggcgggcgcgcagcgccggctgc
actccagagcctccaccgcccgcggccgctagcgcgcgccgg gactgcatttccataggcc cacgctgcggagcaccgcca
cccaggtctcacgcgagtcgctgccgcgaggtgtccctgccgcagccccgcccgcgcGAGAGCTTTTGAAGGCGGCGG
GAGGCGGCGAGCGCCATGGCCAGTCCGGGCTGCCTGCTGTGCGTGCTGGGCCTGCTACTCTGCGGGGC
GGCGAGCCTCGAGCTGTCTAGACCCACGGCGACACCGCCAAGAAGCCCATCATCGtaaggaggctgtgcgg
ggccgcagcagacggggaggagctgggtgttggcgctgggcgcctcccgcgcgcgctccagctggcgctccgcccgggaaaaacc
ccagatgtgcttcg ctttgggtgcaaggaggaacc cgggctgggcaccatttaggtcgactgaaatgtacctgggtgaggtacctcgttca
ttccttagactcatatgactcttaaaggtgggagggaggagggtgcacatgaagaatcctgcggattttctttttt gtacacagctagga
atttctactaaaataaaacatttcttttcgcacatagttgggaagtttactcatttacat
```

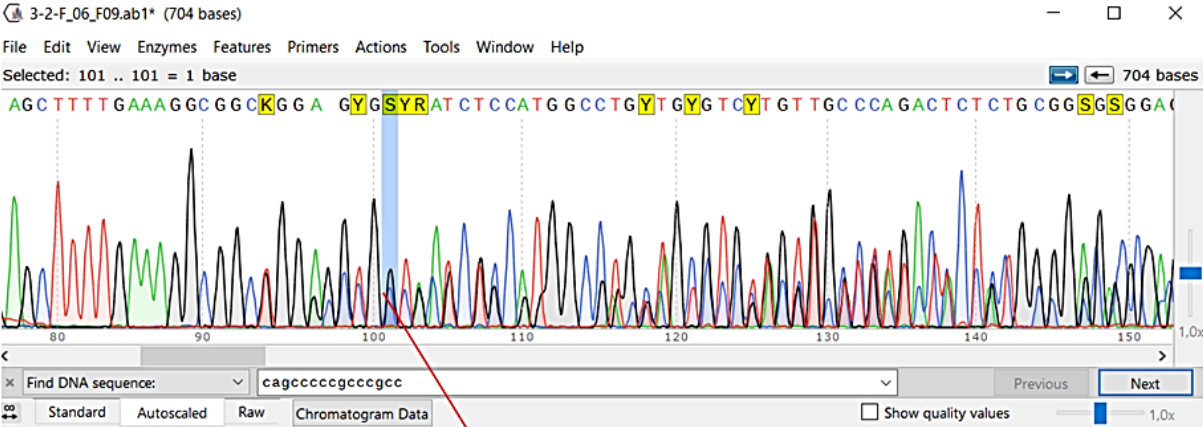
### A. K562 sg2-2 Forward



Tgcgctcccgtcttcacttctacagatgccgcgacccccaaatagcaagtgtggacattcacattcaggggcacaggctgtccgtacagcga  
acgttgtcacattccggagataggcccccacctcaagggggcggtgcggttggcgcgagttctcaggcgcttctagaatcccctgccagc  
ctccccgtgcctggttacaaactcgccggggacaccaactcccctctcaggacctgggttggcagccagcttgtacgggtgactgaa  
gtccacatcgacgtaacagttgaaagggaaggacgcggagaccacccggtaccgccccagggcgttccagagtctccgcttagcgcccggtg  
ggggtcggggtcgcggtcgcggtcgcgaccggggacagagcaatggggcgggcgcgagcgccggtgactcccagagcctccaccgccc  
ccccacggccgcctagcgcgcggggactgcatttcccataggcccacgctgcggagcaccgcccacccgagtctcacgagtgcgctgccg  
cgaggtgtccctgccgcagcccccgcccccccGAGAGCTTTTGAAGGCGGCGGGAGGCGGCGAGCGCCATGGCCAGT  
CCGGGCTGCCTGCTGTGCGTGCTGGGCCTGCTACTCTGCGGGGCGGCGAGCCTCGAGCTGTCTAGACCCAC  
GGCGACACCGCCAAGAAGCCCATCATCGtaaggaggctgtcgggggcgcagcagcggggaggagctgggtgtggcgctgg  
gcgcctcccgcgcgcgctccagctggcgctcccgcgggaaaaaccccagatgtgcttcgcttttggtgcaaggaggaacccgggctgggc  
accatttaggtcgactgaaatgtacctggttgaggtacctcgttattcctttagactcatatgactctaaaggtgggaggaggagggtgcacc  
atgaagaatcctgcggatttctttttgtacacagtaggaatttctactaaaataaacatttcttttcgcacatagttgggaagtttactcatt  
tacat

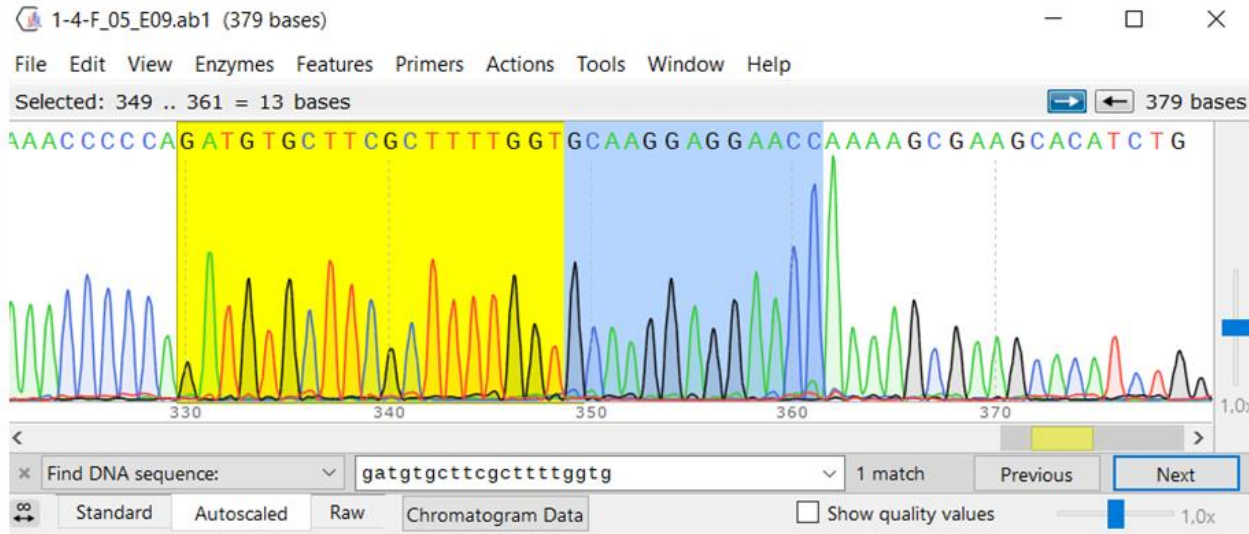
\*Kırmızı ile işaretli dizinin arasında kalan kalın siyah dizi S ile işaretli bölgeden itibaren yoktur.

### B. K562 sg3-2 Forward

[illegible]

\*Kırmızı ile işaretli olan diziden sonra siyah kalın ile yazılan dizi yok S ile işaretli kısımdan sonra sekans dizisi bozuluyor.

### C. K562 sg ctrl Forward



Tgccgtcccgtcttcattcctacagatgccgcgaccccccaaatagcaagtgtggacattcacattcaggggcacaggctgtccgtacagcga  
acgttgtcaccattcccggagatagggccccgacctcaagggggcggtgcggttggcgcgagttctcaggcgcttctagaatcccctgccagc  
ctcccgtgcctggttacaaactcggccggggacaccaacctcccctctcagggacctgggttgccagccagctttgtacgggtgactgaa  
gtccacatcgacgtaacagttgaaaggggaaggacgcggagaccacccggtaccgccccagggcgtttcagagctctccgcttaggcggcccg  
ggggtcggggtcgcggtcgcggtcgcggaccggggacagagcaatggggcgggcgcgagcgccggtgcactcccagagcctcccacgccc  
ccccacggccgctagcgcgcgcccgggactgcatttcccataggcccacccgagctctcacgcgagtgcgctgcgaggtgtccctgcgcgagc  
ccccgcccgcgcGAGAGCTTTTGAAGGCGGCGGGAGGCGGCGAGCGCCATGGCCAGTCCGGGCTGCCTGCTG  
TGCGTGCTGGGCTGCTACTCTGCGGGGCGGCGAGCCTCGAGCTGTCTAGACCCACGGCGACACCGCCAAG  
AAGCCCATCATCGtaaggaggctgtgcggggccgcagcagacggggaggagctgggtgttggcgctgggcgctcccgcgcccgcgctc  
cagctggcgctcccgcgggaaaaacccagatgtgcttgccttttgggcaaggaggaaacccgggctgggcaccatttaggtcgtactgaa  
tgtacctggttaggtacctcgttcattccttagactcatatgactcttaaaaggtgggaggaggagggtgcaccatgaagaatcctgcgattt  
ctttttgtacacagtaggaatttctactaaaataaaacatttcttttcgcacatagttgggaagttttactcattacat

\*Ekzon 1 bölgesi kontrol sekans dizisi ile eşleşiyor

1-2-F\_04\_D09.ab1 (367 bases)

File Edit View Enzymes Features Primers Actions Tools Window Help

Selected: 151 .. 158 = 8 bases

367 bases

ATGGCCAGTCCGGGCTGCCTGCTGTGCTGCTGGGCCTGCTACTCTGCKSSRAGTCTCTAGCCTCCTRSCTSCC

0 120 130 140 150 160 170 180 1,0x

< >

Find DNA sequence: GCCTGCTGTGC 1 match Previous Next

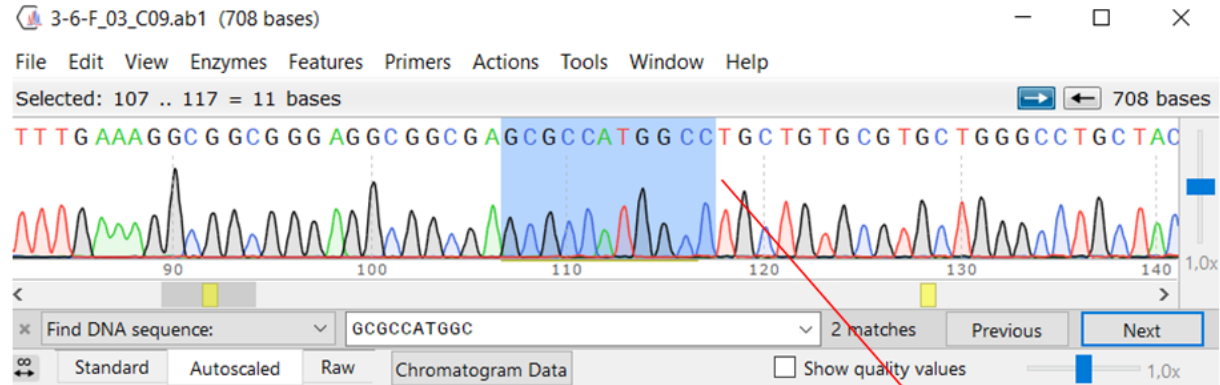
Standard Autoscaled Raw Chromatogram Data

Show quality values 1,0x

Tcgccgtcccgctcttcacttctctacagatgcccgcgaccccccaaatgacaagtgtggacattcacattcaggggcacaggctgtccgtacacgcga  
acgttgtcaccattcccggagatagggcccccaccttcaagggggcggtgcggttggcgcgcagttctcaggcgcttctagaatcccctgcca  
ctccccgctgctggttacaaactcgccggggacaccaacctcccctctcgaggacctgggttggccagcccagctttgtacgggtgactgaa  
gtccacatcgacgtaacagttgaaaggaaggacgcggagaccaccggatccgccccaggcggttccagagtctccgcttaggcggcccggtg  
ggggtcggggtcgcggtcgcggtcgcgaccggggacagagcaatggggcgggcgcgagcgccgggtgcaactcccagagcctcccaccgccc  
ccccagggccgctagcgcgcgccgggactgcatttcccataggcccacccgagctcacgcgagtgcgctgcccgcagggtgtccctgccgcagc  
ccccgccgcccGCAGAGCTTTGAAAGCGGCGGGAGGCGGCGAGCGCCATGGCCAGTCCGGGCTGCTGCTG  
TGCCTGCTGGGCTGCTACTCTGCGGGGCGGCGAGCCTCGAGCTGTCTAGACCCACGGCGACACCGCCAAG  
AAGCCCATCATCGtaaggaggctgtgcggggccgcagcagacggggaggagctgggtgttggcgctgggcgcctcccgcgcccgcgt  
ccagctggcgctcccgcgggaaaaaccccagatgtgtcttcgcttttggtgcaaggaggaaacccgggctgggcaccatttaggtcgactga  
aatgtacctggttaggtacctcgttcattccttagactcatatgactcttaaaagggtgggaggaggagggtgcacatgaagaatcctcgga  
ttttctttttgtacacagctaggaatttctactaaaataaaacatttcttttcgcacatagttgggaagttttactatttacat

68

### E. Hgc27 sg 3-6 Forward



Tgccgtcccgtcttcacttctacagatgccgcgacccccaaatagcaagtgtggacattcacattcaggggcacaggctgtccgtacagcga  
 acgttgtcaccattcccggagatagggccccgacctcaagggggcggtgcggttggcgcgagttctcagggcgcttctagaatcccctgccagc  
 ctcccgtgcctggttacaaactcgccggggacaccaacctcccctctcaggacctgggttggccagcccagcttctacgggtgactgaa  
 gtccacatcgacgtaacagttgaaagggaaggacgcggagaccacccggtaccgccccagcggttccagagtcctcgcttaggcggccggtg  
 ggggtcggggtcgcggtcgcggtcgcgaccggggacagagcaatggggcgggcgcgagcgccggtgcactcccagagcctcccaccgccc  
 cccacggccgcctagcgcgccgggactgcatttcccataggcccacgctgcggagcaccgcccaccgagtcacgcgagtgcgctgccc  
 cgagggtgtccctgcgcagccccgccccGCCAGAGCTTTTGAAGGCGGCGGGAGGCGGCGAGCGCCATGGCCAGT  
 CCGGGCTGCCTGCTGTGCGTGTGGCCTGCTACTCTGCGGGGCGGCGAGCCTCGAGCTGTCTAGACCCACG  
 GCGACACCGCCAAGAAGCCCATCATCGtaaggaggctgtgcggggccgcagcagacggggaggagctgggtgttggcgctgggc  
 gcctcccgcgcgcgtccagctggcggtcccgcgggaaaaacccagatgtgcttgccttttggtgcaaggaggaacccgggctgggcac  
 catttaggtcgactgaaatgtacctggttgaggtacctgttctttagactcatatgactcttaaggtgggaggaggagggtgcacat  
 gaagaatcctgcgattttctttttgtacacagctaggaatttctactaaaaataaacatttcttttcgacatagttgggaagttttactcattta  
 cat

\*Mavili bölgeden sonraki siyah kalın ile yazılan dizi sekans dizisi yoktur.

## F. Hgc27 sg ctrl Forward



\*Ekzon 1 bölgesinin tamamı dizi sekanslama ile eşleşmektedir.

Şekil 19: A) K562 sg 2-2 GGH Ekzon 1 Sekansı. B) K562 sg 3-2 GGH Ekzon 1 Sekansı. C) K562 sg ctrl GGH Ekzon 1 Sekansı. D) Hgc27 sg1-2 GGH Ekzon 1 Sekansı. E) Hgc27 sg3-6 GGH Ekzon 1 Sekansı. F) Hgc27 sg ctrl GGH Ekson 1 Sekansı. Sarı arka planı olan kısım PCR ile çoğalttığımız bölgedir. Siyah kalın işaretli kısım delesyonun olduğu kısımdır. Kırmızı ile işaretli olanlar ise Ekzon 1 de eşleşen dizilerdir.

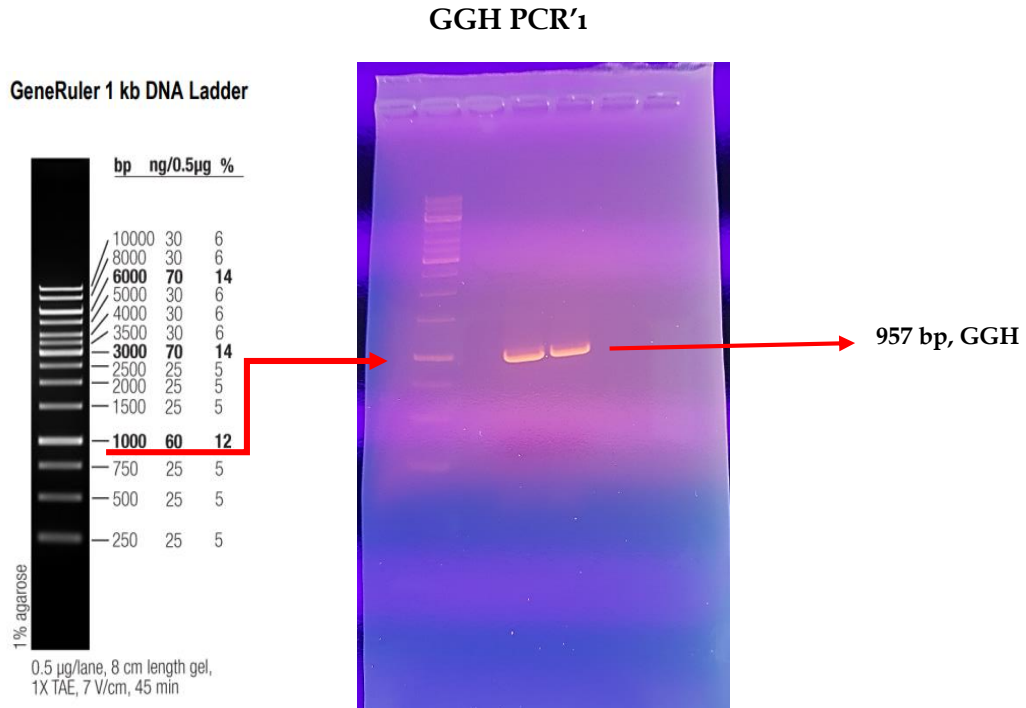
Hücreler sekanslama ile doğrulandıktan sonra (Şekil 19) bu hücreleri deneylerde kullanmadan önce tekrar bir Western Blot yapıldı (Şekil 20).



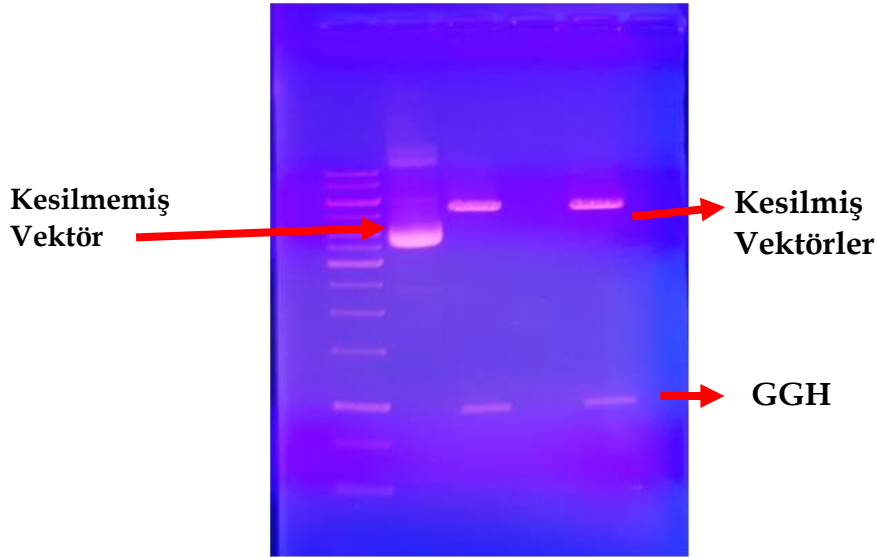
**Şekil 20:** Deneylerde Kullanılacak Hücre hatlarının Western Blot Validasyonu. K562 ve Hgc27 hücre hatlarında GGH birincil antikor 1:2000, ikincil antikor anti-rabbit 1:5000 oranlarında kullanıldı.

Hem sekanslama hem Western Blot ile KO hücre hatları validasyonunu yaptıktan sonra *in vitro* deneylere geçildi.

#### 4.2.2 GGH OE Hücre Hatlarının Validasyonu



**Şekil 21:** GGH kodlayan bölgenin PCR ile çoğaltılması.



**Şekil 22:** pMXS-blast-GGH vektörünün klonlamanın doğrulanması için yapılan diagnostik restriksiyon sonucu agaroz jel görüntüsü. BamHI, HindIII enzim kesimleri yapıldı. Örnekler sırasıyla; ladder, kesilmemiş pMXS-GGH vektörü, kesilmiş pMXS-GGH koloni-1, koloni-2 vektörleri.

Overekspresyon için kullanılan plazmitlerin elde edildikten sonra GGH gen bölgesinin düzgün bir şekilde vektöre entegre olup olmadığı kontrol etmek için diagnostik kesime (**Şekil 22**) ek olarak plazmitler Sanger Dizileme yapıp hem Snapgene Programında görüntülendi, hem de NCBI Blast ile gen dizisi eşleştirmesi doğrulandı (**Şekil 23, 24, 25**).



**Şekil 23:** pMXS-GGH Vektörün GGH Forward Primerinin Snapgene’de Gösterimi. Mavi ile işaretlenmiş bölge GGH geninin başlangıcını göstermektedir.

## Blast Sonucu:

Vektörün sekans datasını NCBI Blast a koyduğumuzda %96,6 eşleşmektedir.

Job Title: Nucleotide Sequence  
RID: ZCPUBHDB016  
Program: BLASTN  
Database: nt  
Query ID: lcl|Query\_8583  
Description: None  
Molecule type: dna  
Query Length: 1509  
Other reports: Distance tree of results, MSA viewer

Filter Results  
Organism: only top 20 will appear  
Percent Identity: to  
E value: to  
Query Coverage: to  
Filter Reset

Sequences producing significant alignments

| Description                                                                                      | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession      |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|----------------|
| Homo sapiens gamma-glutamyl hydrolase (GGH) transcript variant 1 mRNA                            | Homo sapiens    | 1134      | 1134        | 44%         | 0.0     | 96.66%     | 1248     | NM_003878.3    |
| Homo sapiens gamma-glutamyl hydrolase (GGH) transcript variant 2 mRNA                            | Homo sapiens    | 1134      | 1134        | 44%         | 0.0     | 96.66%     | 967      | NM_001410926.1 |
| Homo sapiens gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolygamma-glutamyl hydrolase) mRNA (cDNA) | Homo sapiens    | 1134      | 1134        | 44%         | 0.0     | 96.66%     | 1306     | BC025025.1     |
| Homo sapiens human gamma-glutamyl hydrolase (hGGH) mRNA, complete cds                            | Homo sapiens    | 1134      | 1134        | 44%         | 0.0     | 96.66%     | 1280     | U55206.1       |
| Human ORFeome Gateway entry vector pENTR223-GGH, complete sequence                               | Human ORFeo...  | 1133      | 1133        | 44%         | 0.0     | 96.65%     | 3744     | LT738200.1     |

Şekil 24: pMXS-GGH plazmit sekansı. NCBI-Blast yüklendiğinde sekans dizisi GGH transkripti ile %96.6 oranın eşlendiği gösterilmiştir.

Job Title: Nucleotide Sequence  
RID: H5N7EBMH016  
Program: BLASTN  
Database: nt  
Query ID: lcl|Query\_113513  
Description: None  
Molecule type: dna  
Query Length: 1075  
Other reports: Distance tree of results, MSA viewer

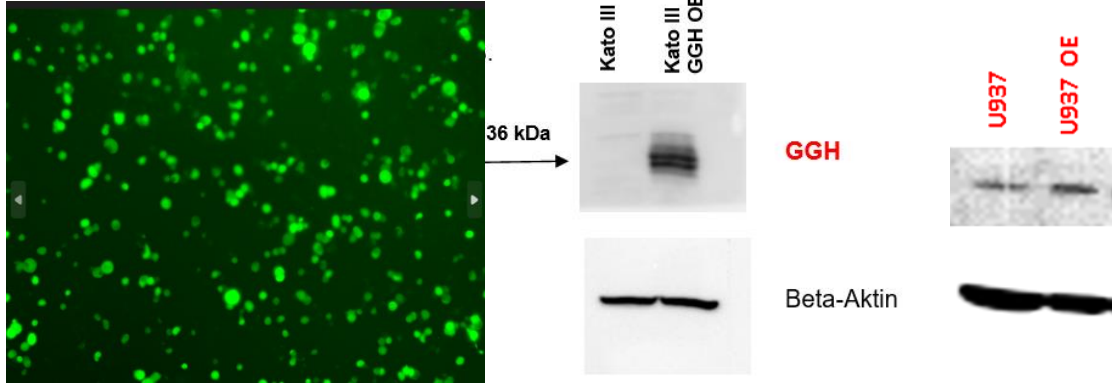
Filter Results  
Organism: only top 20 will appear  
Percent Identity: to  
E value: to  
Query Coverage: to  
Filter Reset

Sequences producing significant alignments

| Description                                                                                             | Scientific Name     | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|-------------|
| Homo sapiens gamma-glutamyl hydrolase (GGH) transcript variant 1 mRNA                                   | Homo sapiens        | 1674      | 1674        | 86%         | 0.0     | 99.04%     | 1248     | NM_003878.3 |
| Homo sapiens gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpolygamma-glutamyl hydrolase) mRNA (cDNA)        | Homo sapiens        | 1674      | 1674        | 86%         | 0.0     | 99.04%     | 1306     | BC025025.1  |
| Homo sapiens human gamma-glutamyl hydrolase (hGGH) mRNA, complete cds                                   | Homo sapiens        | 1674      | 1674        | 86%         | 0.0     | 99.04%     | 1280     | U55206.1    |
| Human ORFeome Gateway entry vector pENTR223-GGH, complete sequence                                      | Human ORFeo...      | 1672      | 1672        | 86%         | 0.0     | 99.04%     | 3744     | LT738200.1  |
| Synthetic construct Homo sapiens clone ccsbBroadEn_02029 GGH gene, encodes complete protein             | synthetic construct | 1672      | 1672        | 86%         | 0.0     | 99.04%     | 1086     | KJ892635.1  |
| Synthetic construct Homo sapiens clone IMAGE100073880 gamma-glutamyl hydrolase (conjugase, folylpoly... | synthetic construct | 1672      | 1672        | 86%         | 0.0     | 99.04%     | 1056     | JF432643.1  |

Şekil 25: pLenti-ef1alpha-GGH plazmit sekansı. NCBI-BLAST yüklendiğinde sekans dizisi GGH transkripti ile %99.4 oranın eşlendiği gösterilmiştir.

A.



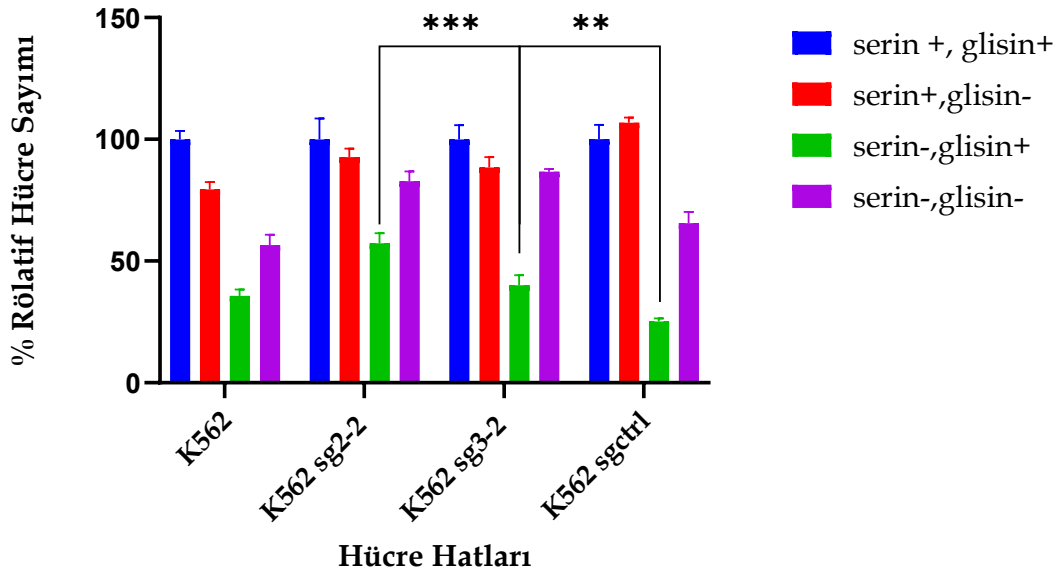
**Şekil 26:** Kato III ve U-937 hücre hattı GGH Overekspresyon Validasyonu **A.** Kato III hücre hattında pLENTI-ef1alpha-GGH vektörünün antibiyotik öncesi 48. Saatte 10X'de GFP sinyali.

**B.**Kato3 ve U-937 GGH Overekspersyonu Western Blot Validasyonu.

U-937 hücre hattı pMXS vektörü ile transfekte edilmişken, Kato III GFP sinyali olan pLENTI-ef1alpha vektörü ile transfekte edilmiştir. Şekil 26A'da pLENTI-ef1alpha-GGH vektörünün antibiyotik öncesi 48. Saatte 10X'de GFP sinyali gösteren fotoğraf varken **B** ve **C**'de Western Blot ile GGH overekspresyon validasyonu görseli yer almaktadır (**Şekil 26**).

#### 4.3. Hücrelerin serin, glisin ve serin/glisin içermeyen ortamda çoğalmalarının belirlenmesi

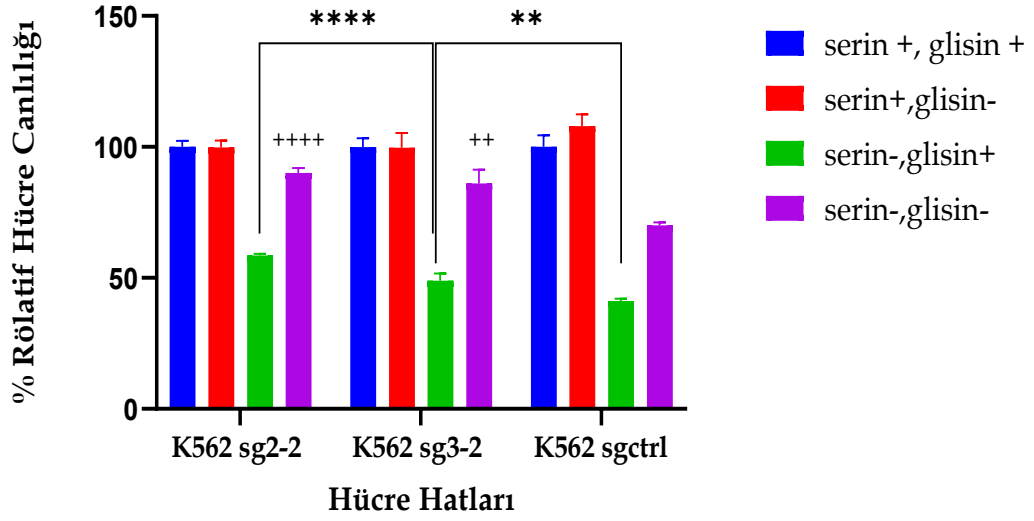
K562 hücre hatları K562, sg2-2, sg 3-2 ve sg ctrl olmak üzere 4 farklı hücre hattında serin ve glisin içeren tam besiyeri, sadece serin içeren glisin içermeyen, sadece glisin içerip serin içermeyen ve her iki amino asiti içermeyen 4 farklı besiyerinde hücre sayımı sonuçları **şekil 27'** de görülmektedir. Kontrol grubuna göre sadece serin içermeyen besiyerinde hücre sayısında ileri derecede anlamlı bir artış görülmektedir.



**Şekil 27:** K562, K562 GGH KO sg 2-2, sg3-2 ve K562 sgctrl hatlarının serin-glisin, serin, glisin ve serin-glisin olmayan besiyerlerindeki rölatif hücre sayımı grafiği. Kontrol grubunda sadece serin amino asiti içermeyen besiyeri ile karşılaştırıldığında, \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ . Data  $\text{mean} \pm \text{SD}$  olarak sunuldu.

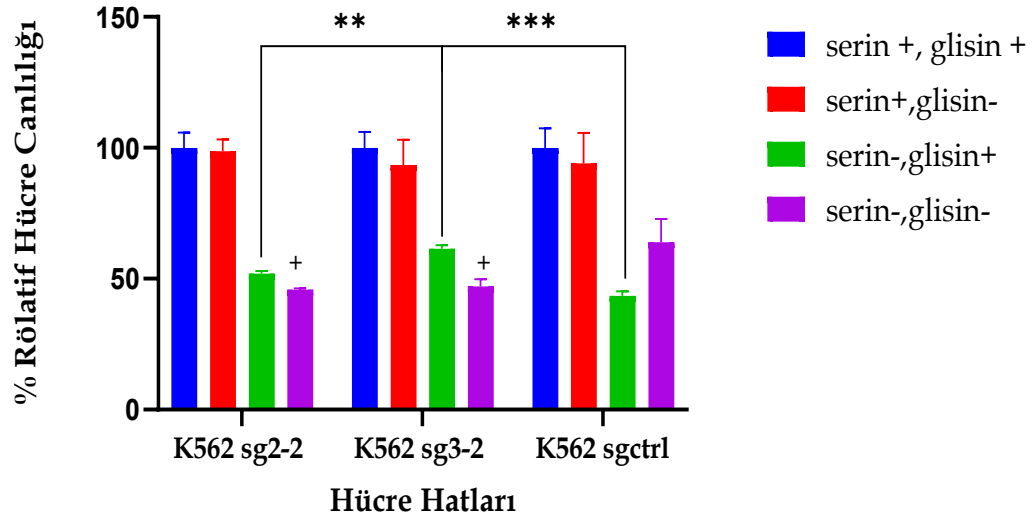
Hem 15.5 mM hem de 5.5 mM glukoz konsantrasyonunda K562 GGH KO hücre hatlarının 4 farklı besiyerinde hücre proliferasyonu altaki **şekil 28'** de görülmektedir. Her iki glukoz konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre serin -, glisin + besiyerinde sg2-2 ve sg3-2 hücre hatlarında 4 günün sonunda hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı olarak daha fazla arttığını gözlemlendi. Şekil 28A.'da 15.5 mM glukoz konsantrasyonunda serin ve glisin içermeyen besiyerinde hücre canlılığında kontrol grubuna göre ileri derecede anlamlı olarak daha fazla iken, **B.** 5.5 mM glukoz konsantrasyonun kontrol grubunun hücre canlılığını sg2-2 ve sg3-2 GGH KO hücre hatlarına göre hücre sayısında anlamlı bir şekilde artma gözlenmedi.

A.



B.

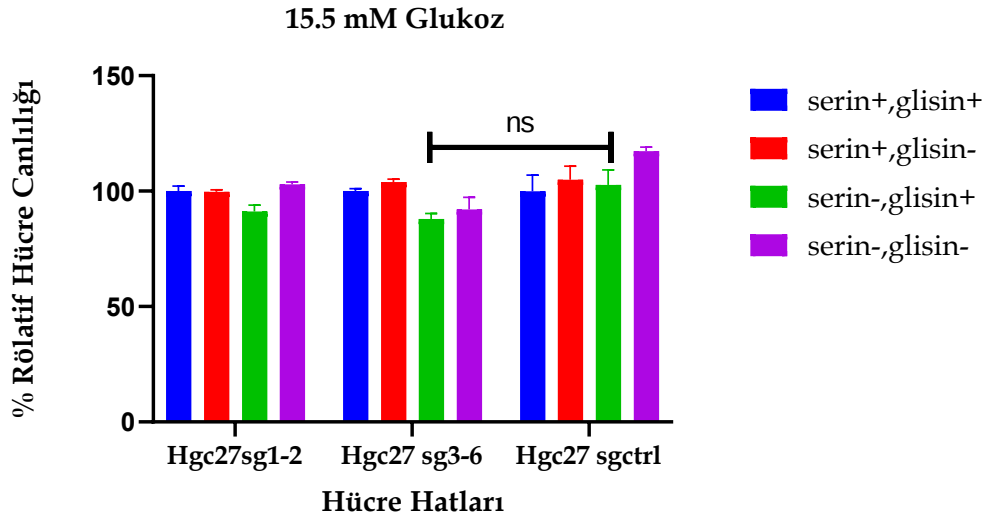
15.5 mM Glukoz



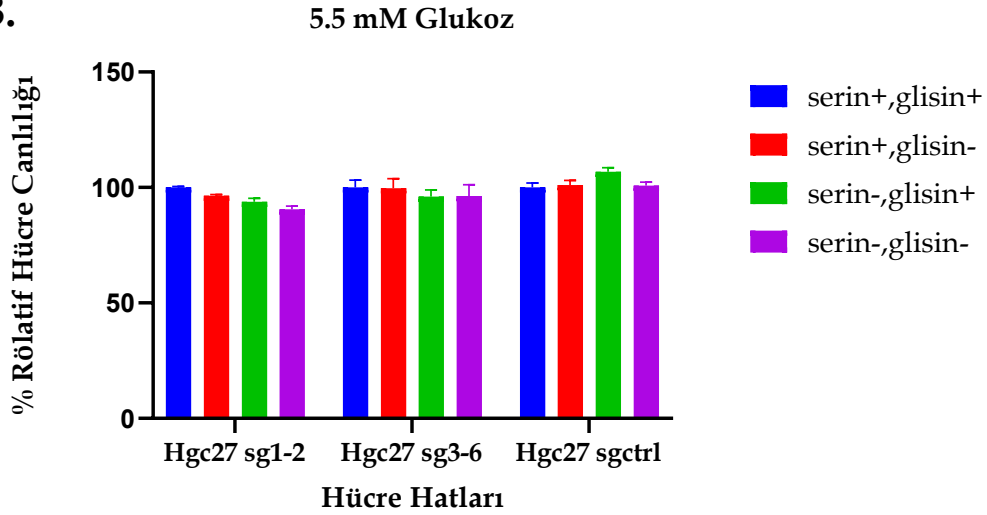
5.5 mM Glukoz

**Şekil 28:** K562 GGH KO hücre hatlarının rölatif hücre canlılık grafikleri. **A.** 15.5 mM Glukoz konsantrasyonunda K562 GGH KO hücre hatlarının hücre canlılığı. **B.** 5.5 mM Glukoz konsantrasyonunda K562 GGH KO hücre hatlarının hücre canlılığı. Data mean±SD olarak sunuldu. \*\* p<0.001, \*\*\* p<0.0001, \*\*\*\* p<0.00001 kontrol grubu serin -, glisin + besiyeri ile karşılaştırıldığında, +p<0.05, ++p<0.01, +++p<0.00001 serin ve glisin içermeyen besiyeri ile karşılaştırıldığında).

**A.**



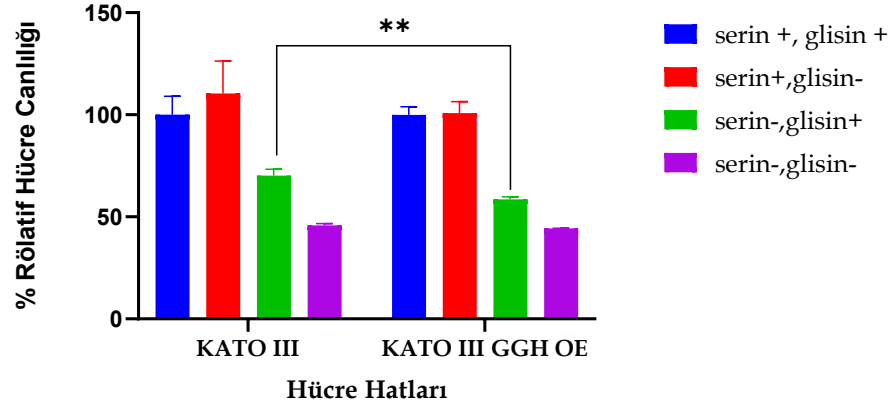
**B.**



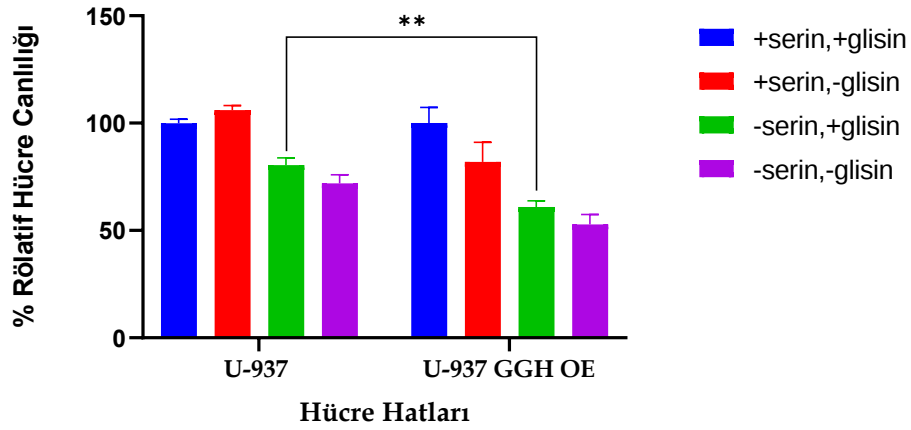
**Şekil 29:** HGC27 GGH KO sg 1-2, sg3-6 ve kontrol hücre hatlarının serin-glisin, serin, glisin ve serin-glisin olmayan besiyerlerindeki hücre proliferasyon grafiği. **A.** 5.5 mM Glukoz konsantrasyonunda HGC27 GGH KO hücre hatlarının hücre canlılığı. **B.** 15.5 mM Glukoz konsantrasyonunda HGC27 GGH KO hücre hatlarının hücre canlılığı Data mean±SD olarak sunuldu. Kontrol grubu serin içermeyen besiyerine göre karşılaştırma yapıldığında, anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Hücre canlılık deneyinde HGC27 GGH KO hücre hatları arasında kontrole göre her iki glukoz konsantrasyonunda da istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmedi (Şekil 29).

A.



B.

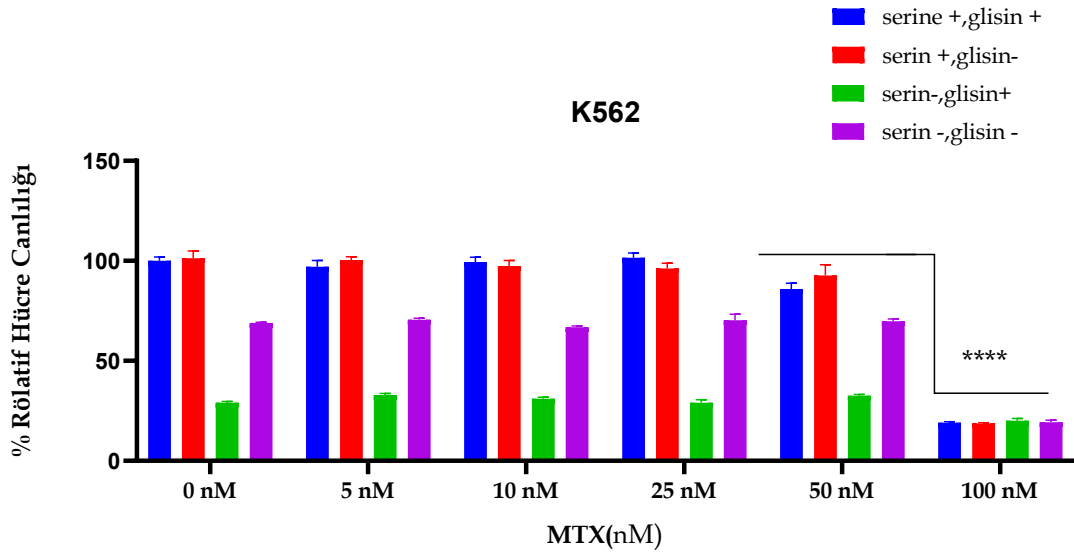


**Şekil 30: A.** Kato III ve Kato III GGH OE hücre hatlarının serin-glisin, serin, glisin ve serin-glisin olmayan besiyerlerindeki hücre proliferasyon grafiği. **B.** U-937 ve U-937 GGH OE hücre hatlarının serin-glisin, serin, glisin ve serin-glisin olmayan besiyerlerindeki hücre proliferasyon grafiği. Data mean SD olarak sunuldu. Serin içermeyen besiyerine göre karşılaştırma yapıldığında, \*\* p<0.001.

GGH eksprese etmeyen Kato III ve U-937 hücre hatlarında serin-, glisin+ besiyerleri üzerinden Kato III ve U-937 GGH OE hücre hatları ile karşılaştırma yapıldığında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir azalış gözlemlendi (** ekil 30**). KO hücre hatlarında hücre canlılığı artışına nazaran GGH overekspresyon da azalış tespit edilmesi deneyin kendi içinde uyumunu göstermektedir.

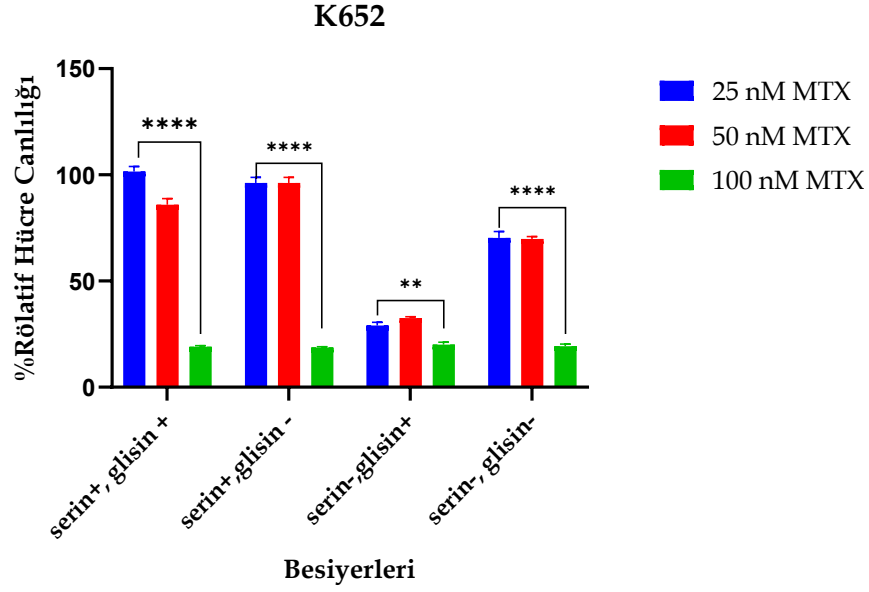
#### 4.4. GGH KO hücre hatlarının serin, glisin ve serin/glisin içermeyen ortamda MTX duyarlılıklarının araştırılması

K562 hücre hattına 0, 5, 10, 25, 50 ve 100 nM konsantrasyonlarda MTX ilaç uygulaması yapıldı ve 4 gün inkübasyon sonrası hücre canlılığı ölçüldü. Hücre canlılık ölçümlerine bakıldığında 50 nM'dan sonra 100 nM'da hücre canlılığı tüm besiyerlerinde ileri derecede anlamlı bir şekilde azalma göstermektedir (Şekil 31).



**Şekil 31:** K562 hücre hattında farklı dozlarda MTX ilaç uygulaması sonucu hücre canlılık grafiği. Data mean±SD olarak sunuldu. Kontrol grubunda her bir besiyerine göre karşılaştırma yapıldığında, \*\*\*\* p<0.00001.

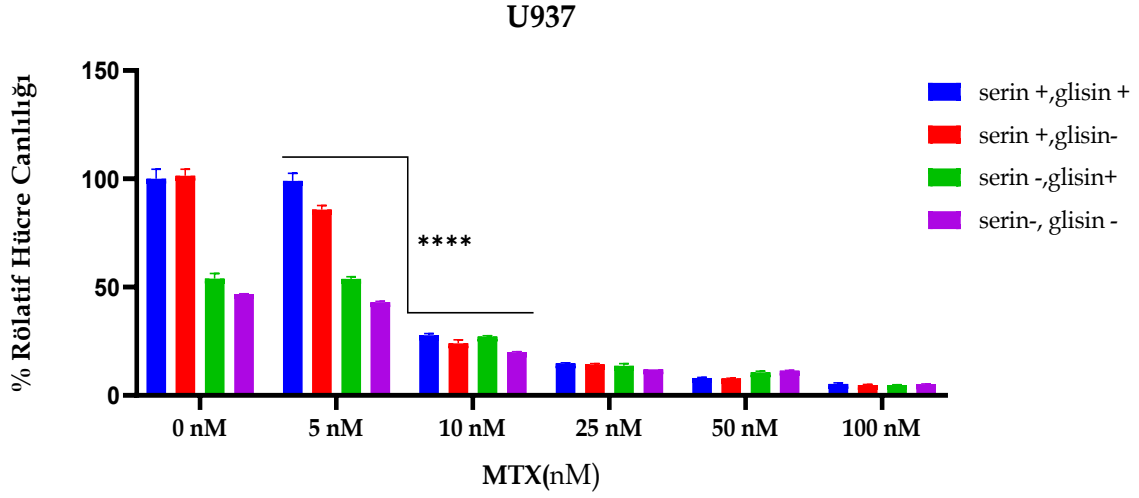
K562 hücre hattı 50 nM MTX konsantrasyonuna kadar ciddi bir hücre azalması göstermemektedir (grafik o sebeple 25 nM dan başlamaktadır 0 nM ile aynı olduğunda) 50 nM'dan sonra 4 farklı besiyerinde de istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir hücre canlılığı azalışı gözlemlendi (Şekil 32).



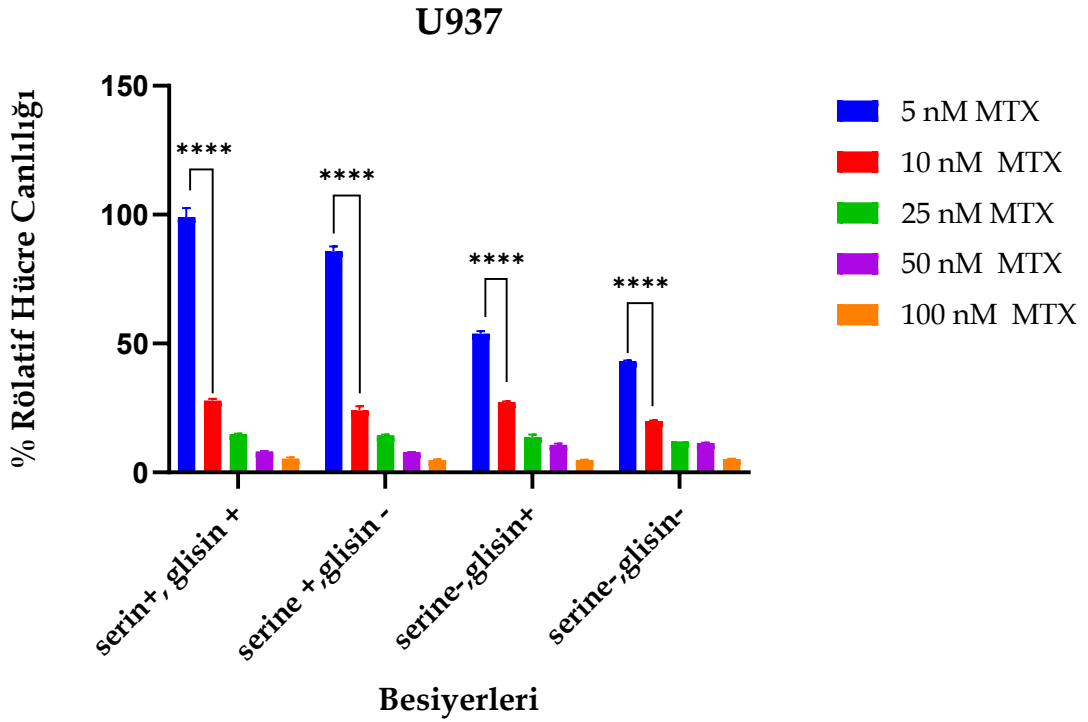
**Şekil 32:** K562 hücre hattının 4 farklı besiyerindeki MTX ilaç yanıtı. Data mean±SD olarak sunuldu. 100 nM MTX konsantrasyonuna göre karşılaştırma yapıldığında, \*\* p<0.01 \*\*\*\* p<0.00001.

U937 hücre hattında, 5 nM' a göre 10 nM MTX konsantrasyonunda hücre canlılığı %90'lardan %20'lere düşüş gösterdi. 0-5 nM yoğunlaşma arasında istatistiksel anlamlı bir fark yoktur (**Şekil33A**). 10 nM'lardan sonra %5 'lere kadar hücre canlılığı azalmıştır. U937 hücre hattı 4 farklı besiyerinde 5nM'a göre 10 nM 'da ileri derecede anlamlı bir hücre canlılık azalışı gösterdi (**Şekil 33B**). Serin amino asiti içermeyen glisin amino asiti içeren besiyerinde 5nM'a göre 10 nM 'da %50 civarındaki hücre canlılığı %25 civarlarına düşmüş yani yarı yarıya azalmıştır. GGH eksprese eden K562 hücre hattından 50 nM-100 nM MTX konsantrasyon arası görülen istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı hücre canlılık azalışı, U937 hücre hattında 5 nM-10 nM MTX konsantrasyon arası ileri derecede anlamlı bir azalış görüldü. Yani U937'de çok daha düşük bir konsantrasyonda (10 katı kadar) hücreler öldüler (**Şekil 33**).

A.



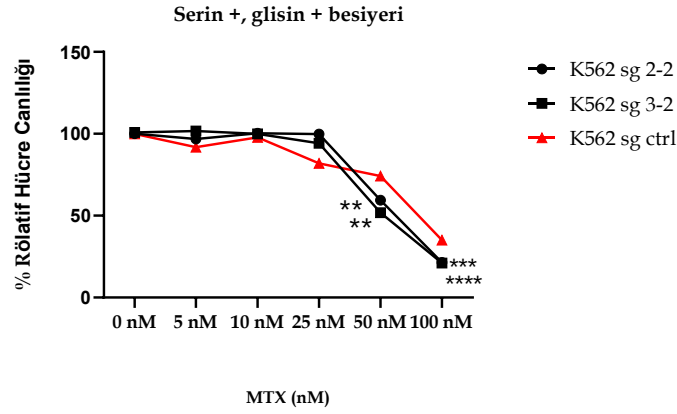
B.



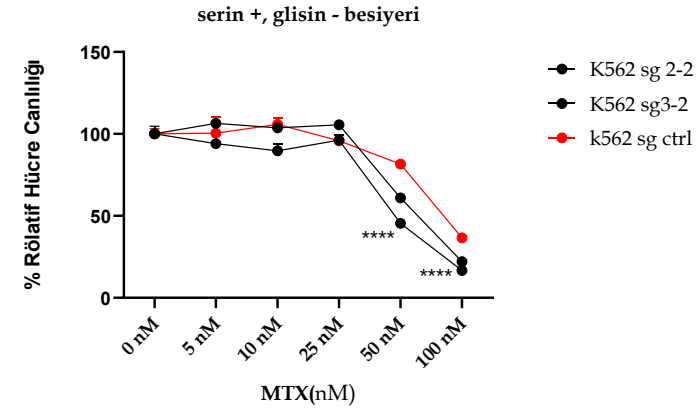
**Şekil 33: A.** U-937 hücre hattında farklı dozlarda MTX ilaç uygulaması sonucu hücre canlılık grafiği **B.** U-937 hücre hattının 4 farklı besiyerindeki MTX ilaç yanıtı. Data mean $\pm$ SD olarak sunuldu. 10 nM MTX konsantrasyonuna göre karşılaştırma yapıldığında \*\*\*\* p<0.00001.

GGH KO hücre hatlarında MTX uygulamasında kontrole göre daha fazla etkilenmişlerdir. 4 farklı besiyerinde A, B, C ve D grafiklerinde 50 ve 100 nM MTX konsantrasyonlarında kontrole göre sg 2-2 ve sg 3-2 hücre hatlarının proliferasyonu ileri derecede anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 34).

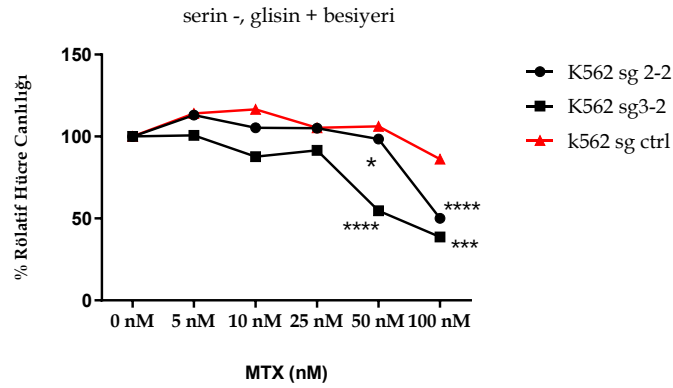
A.



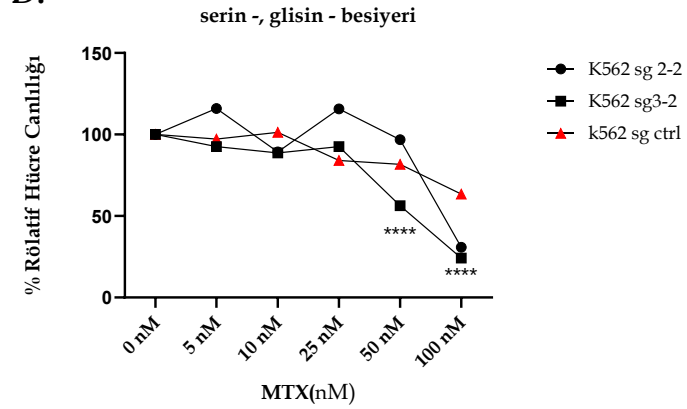
B.



C.



D.

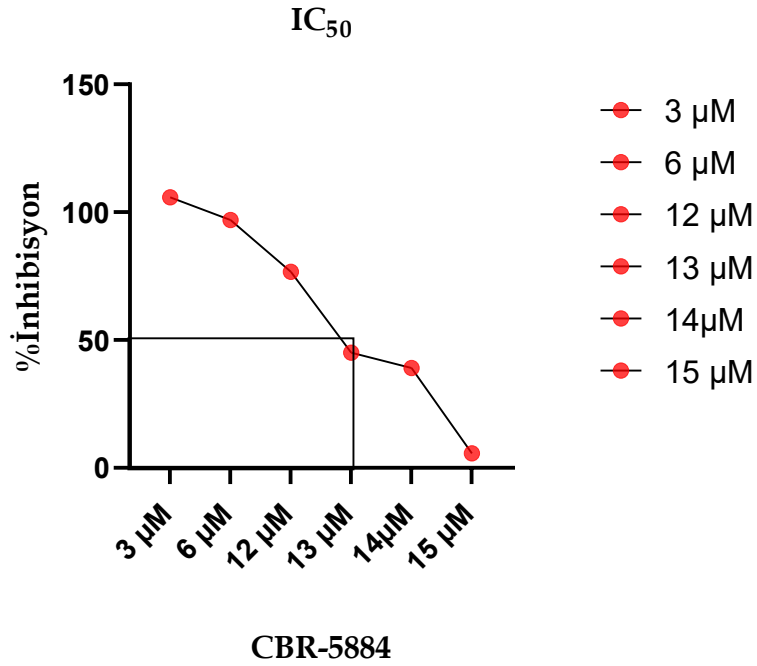


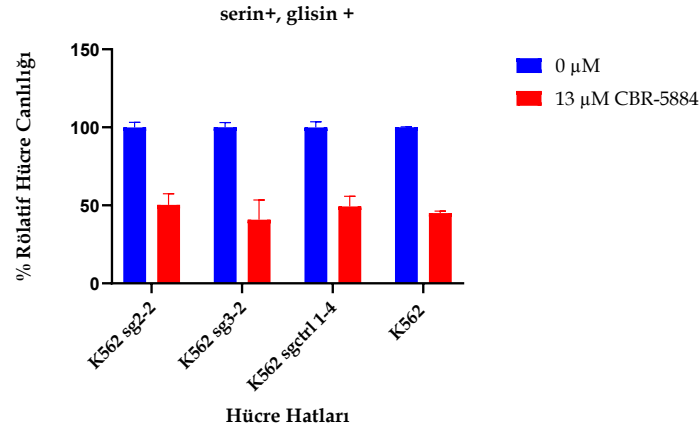
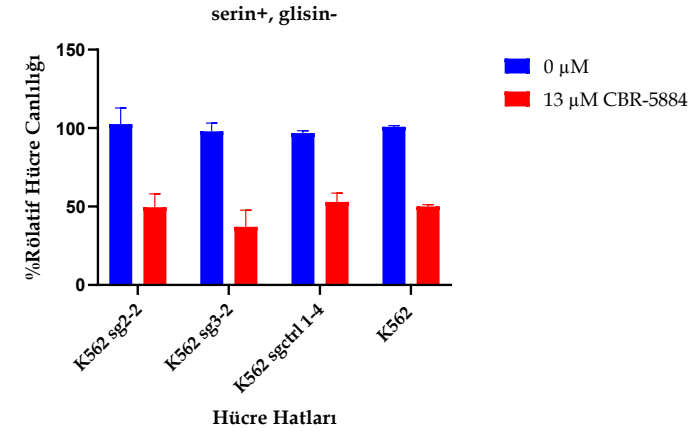
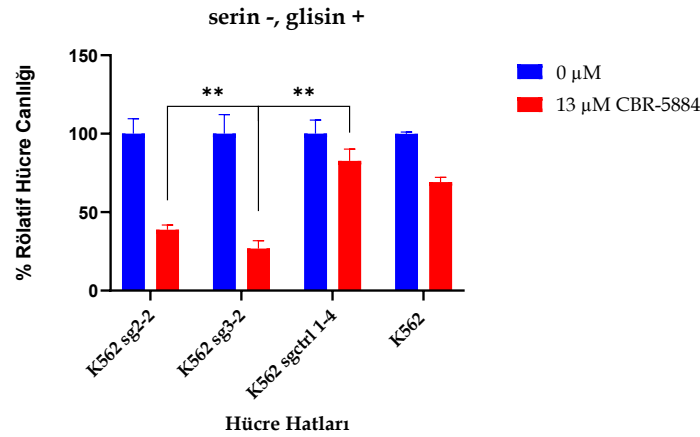
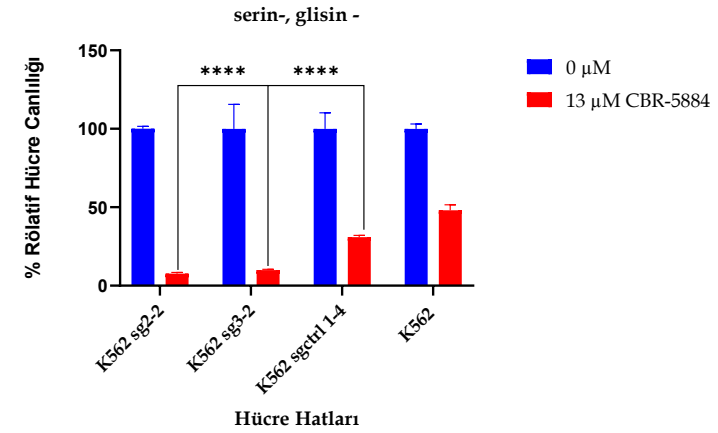
**Şekil 34:** K562 GGH KO hücre hatlarının 4 farklı besiyerindeki MTX ilaç yanıtı. A., B., C., D. Serin +, glisin +, serin +, glisin -, serin -, glisin +, serin -, glisin - besiyerlerinde 3 hücre hattının 6 farklı MTX konsantrasyonunda Rölatif hücre canlılığı grafiği. Data mean±SD olarak sunuldu. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.0001, \*\*\*\* p<0.00001.

#### 4.5. GGH KO Hücre Hatlarının Serin, Glisin ve Serin/Glisin İçermeyen Ortamda CBR-5884/PHGDH İnhibitör Etkisi

CBR-5884-PHGDH inhibitörü için literatürde 30  $\mu\text{M}$  doz için  $\text{IC}_{50}$  değeri belirtilmişken bu değerde %5 civarı bir canlılık azalışı olmasından dolayı farklı dozlarda  $\text{IC}_{50}$  'yi bulmak için denemeler sonrası bu doz 13  $\mu\text{M}$  olarak **Şekil 35A**'da gösterilmiştir. **B** ve **C** grafiklerinde serin, glisin içeren ve sadece serin içeren besiyerlerinde hücre hatları arasında inhibitör etkisinde bir fark yokken, **D** ve **E** garfiklerinde yani serin içermeyen glisin içeren ve her iki amino asiti içermeyen besiyerlerinde kontrol grubuna göre hücre canlılığında ileri derecede anlamlı olarak bir azalış vardı

A.

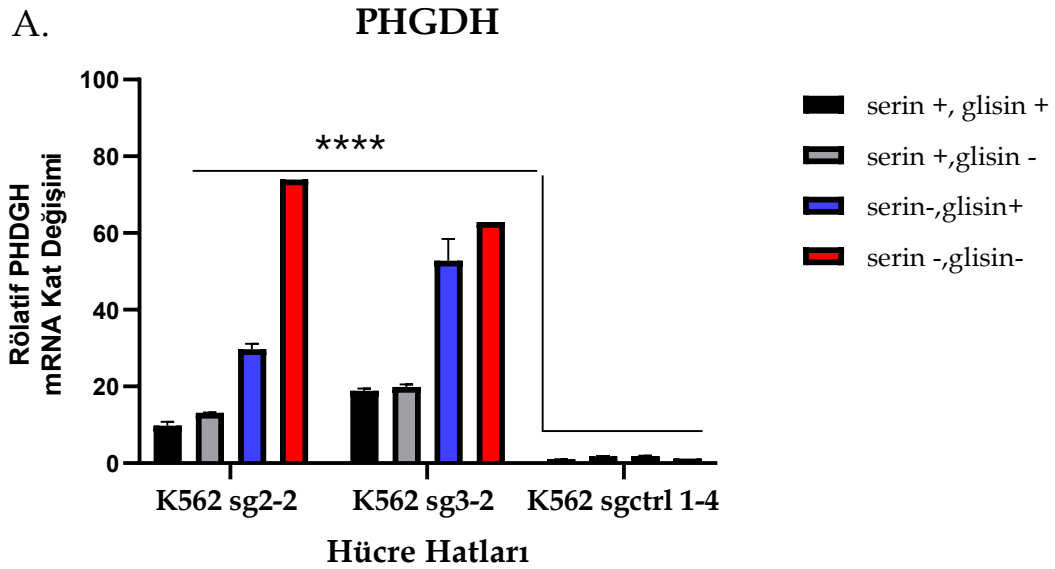


**B.****C.****D.****E.**

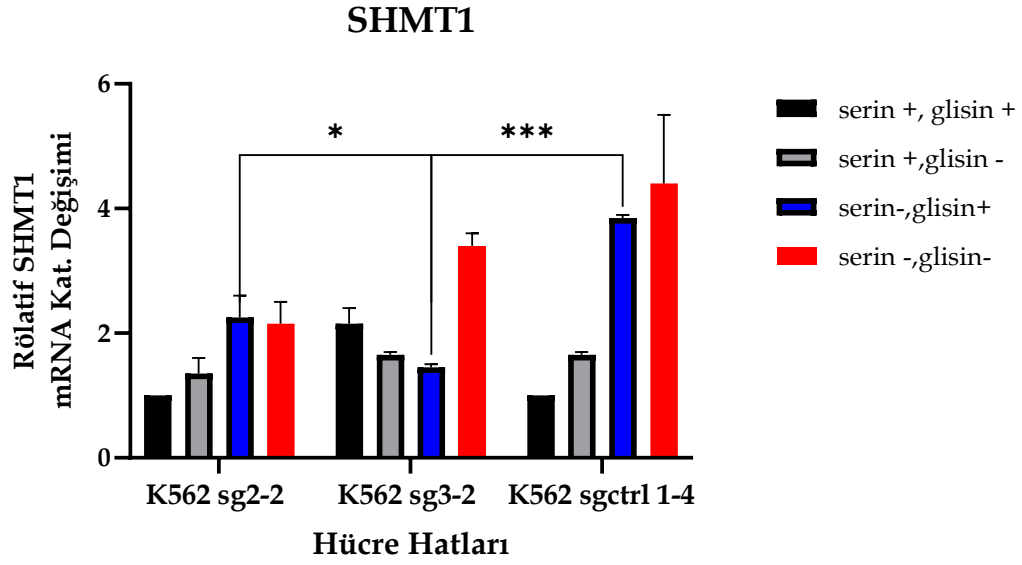
**Şekil 35:** K562 GGH KO hücre hatlarının 4 farklı besiyerindeki CBR-5884 PHGDH inhibitörüne yanıtı. **A.** K562 hücre hattında CBR-5884 inhibitörünün IC50 % inhibisyon grafiği **B., C., D. E.** Serin +, glisin +, serin +, glisin -, serin -, glisin +, serin -, glisin - besiyerlerinde 3 hücre hattının 13  M konsantrasyonunda Rölatif hücre canlılığı grafiği. 13  M'a göre karşılaştırıldığında, Data mean SD olarak sunuldu. p<0.01, \*\*\*\* p<0.00001.

#### 4.6.Serin-Glisin Metabolizmasında Görevli *PHGDH*, *SHMT1* ve *SHMT2* Genlerin Ekspresyonlarının qRT-PCR ile Belirlenmesi

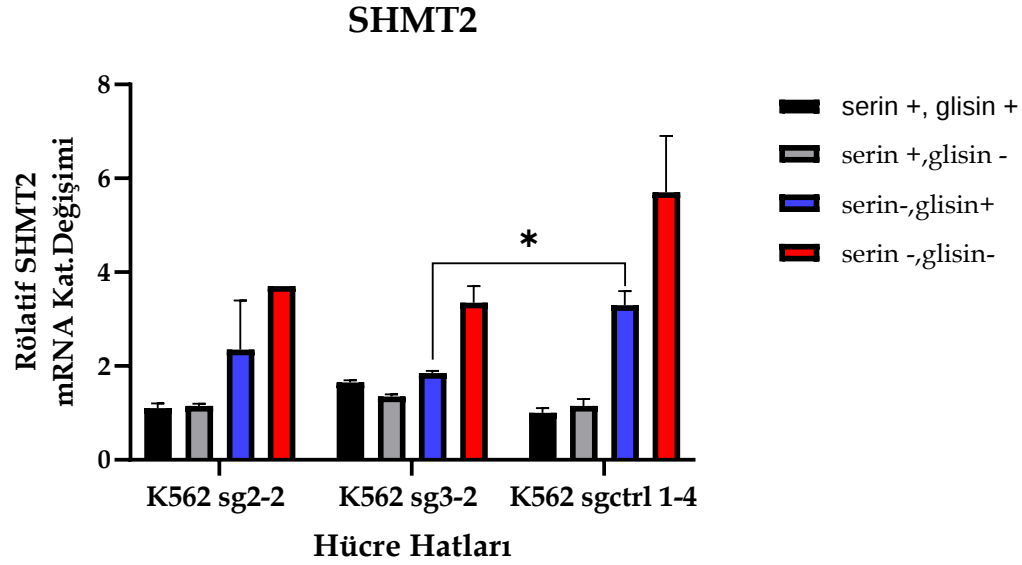
Şekil 36A grafiğinde K562 GGH hücre hatlarında *PHGDH* gen ekspresyonu kontrol grubuna göre 4 farklı besiyerinde de ileri derecede anlamlı olarak artış göstermiştir. B ve C garfikalarında *SHMT1* ve *SHMT2* genlerin ekspresyonları GGH KO hücre hatlarında serin ve serin-glisin içermeyen besiyerinde bir artış göstermesine rağmen kontrol grubu kadar artıramamıştır ve kontrole göre ileri derecede anlamlı bir azalış vardır.



B.

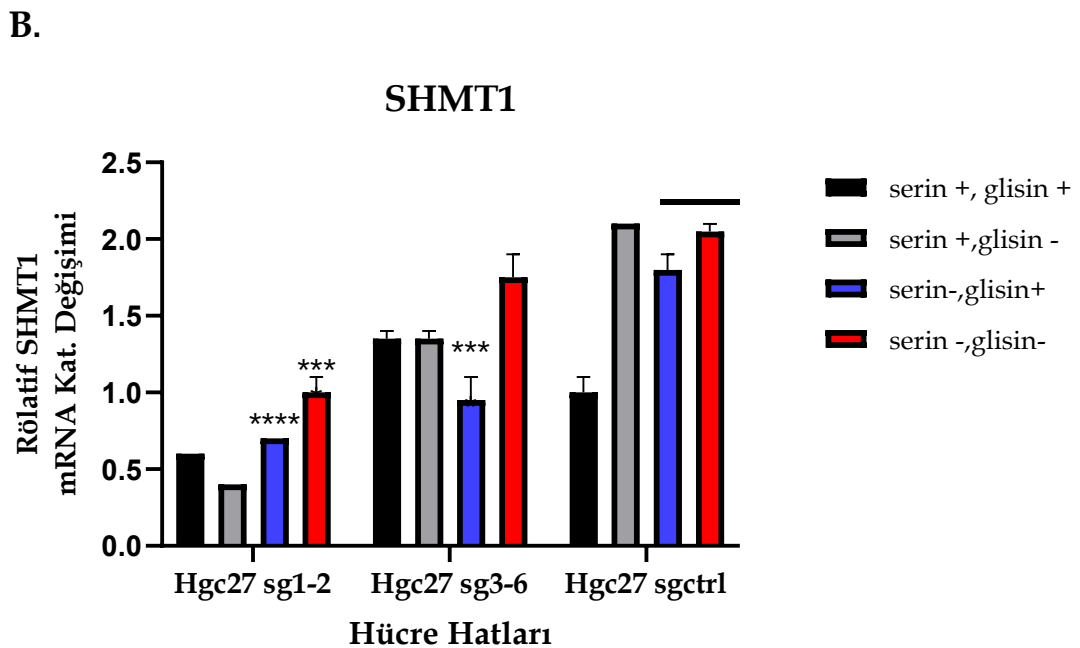
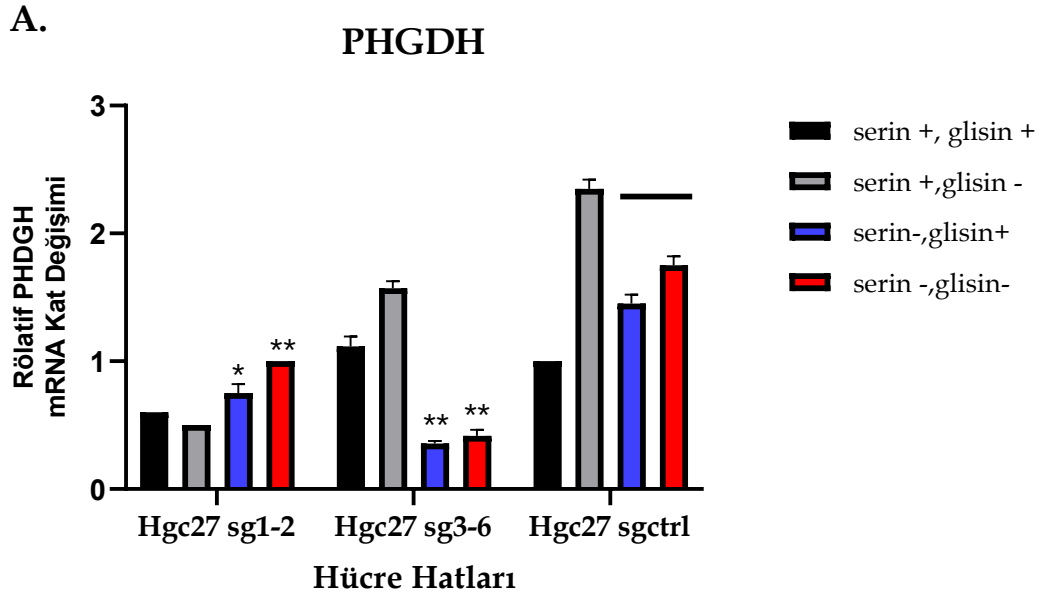


C.

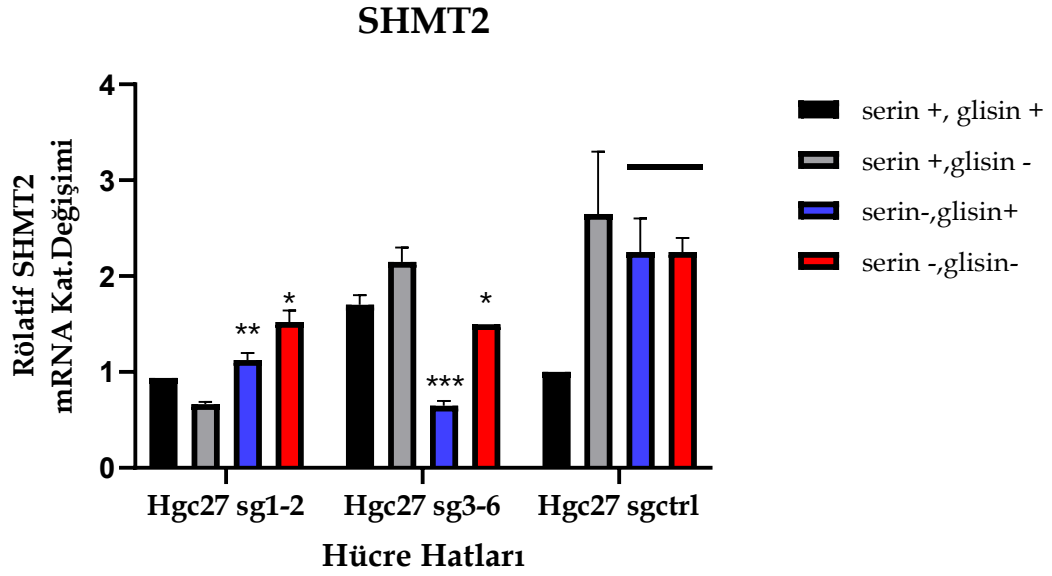


**Şekil 36:** K562 GGH KO hücre hatlarında 4 farklı besiyerinde A., B., C., PHGDH, SHMT1, SHMT2 genlerinin rölatif mRNA ekspresyon grafiği. Data mean±SEM olarak sunuldu. A. Kontrol grubu her bir besiyeri ile karşılaştırıldığında B.,C., Kontrol grubu serin amino asiti içermeyen besiyeri ile karşılaştırıldığında, \*p<0.05, \*\*\* p<0.0001, \*\*\*\* p<0.00001.

HGC27 GGH hücre hatlarında *PHGDH* gen ekspresyonu kontrol grubuna göre serin ve serin-glisin içermeyen besiyerlerinde anlamlı olarak azalış göstermiştir (Şekil 37A). *SHMT1* ve *SHMT2* genlerinin ekspresyonları ise kontrol grubuna göre serin içermeyen ve serin-glisin içermeyen besiyerlerinde GGH KO hücre hatlarında ileri derecede anlamlı bir azalış vardır (Şekil 37B/C).



C.



**Şekil 37:** HGC27 GGH KO hücre hatlarında 4 farklı besiyerinde A., B., C., PHGDH, SHMT1, SHMT2 genlerinin rölatif mRNA ekspresyon grafiği. Data mean±SEM olarak sunuldu. Kontrol grubu serin içermeyen besiyerlerinde karşılaştırıldığında, \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.0001, \*\*\*\* p<0.00001

#### 4.7. K562 GGH KO Hücre Hatlarının Metabolit Analizi

##### LC-MS/MS Optimizasyonu

Metabolomik profillemeye için optimizasyon çalışması yapıldı. Bu çalışmada HILIC kolon Merck SeQuant ZIC-HILIC (5 µm 150x4.6 mm) kullanıldı. Optimizasyon çalışmasında hem çözücü etkisi hemde uçurma etkisi değerlendirildi.

**Tablo 34:** LC-MS/MS’de ilk yöntemde tespit edilen moleküllerden bazıları.\*

| No | Metabolit Adı:  | MW       | m/z      | RT [min] | Area (Max.) |
|----|-----------------|----------|----------|----------|-------------|
| 1  | Malik asit      | 134,0213 | 133,0141 | 45,664   | 175216,4    |
| 2  | Glutamik asit   | 147,053  | 148,0603 | 7,154    | 7447955     |
| 3  | Glutamin        | 146,069  | 147,0762 | 16,757   | 62112027    |
| 4  | Laktik Asit     | 90,03166 | 89,02438 | 6,908    | 19290627    |
| 5  | Histidin        | 155,0695 | 156,0768 | 39,677   | 54963,61    |
| 6  | N-Asetil glisin | 197,0796 | 196,0723 | 19,409   | 167788,8    |
| 7  | Fumarik asit    | 284,1988 | 283,1915 | 24,646   | 309170,1    |
| 8  | Azelaik asit    | 188,1058 | 187,0985 | 28,303   | 136684      |

|    |                        |          |          |        |             |
|----|------------------------|----------|----------|--------|-------------|
| 9  | 2-Aminoizobütirik asit | 135,0173 | 136,0245 | 19,455 | 105191,1    |
| 10 | süksinat               | 116,0108 | 115,0035 | 3,744  | 198212      |
| 11 | Sitozin                | 111,0432 | 110,0359 | 12,485 | 30038064    |
| 12 | Treonin                | 119,0582 | 120,0654 | 13,561 | 36298876    |
| 13 | Prolin                 | 115,0632 | 116,0705 | 16,99  | 479623167,7 |
| 14 | 3-Hidroksibütirik asit | 104,0472 | 103,0399 | 40,744 | 52754,94    |
| 15 | Urasil                 | 112,0272 | 111,02   | 8,041  | 2443872     |
| 16 | Gliserik asit          | 106,0264 | 105,0192 | 26,525 | 42663,15    |
| 17 | Tirozin                | 181,0738 | 180,0665 | 9,694  | 447088,7    |
| 18 | Adenin                 | 135,0543 | 136,0616 | 8,013  | 298398,9    |
| 19 | Fosfokolin             | 183,0655 | 184,0728 | 34,711 | 21947039    |
| 20 | Taurin                 | 125,0146 | 124,0073 | 8,67   | 12022310    |
| 21 | Ksantin                | 152,0335 | 133,0157 | 14,183 | 119258,1905 |
| 22 | Valin                  | 117,0789 | 118,0861 | 12,694 | 21241890,34 |
| 23 | Serin                  | 105,0425 | 106,0498 | 4,854  | 382372,9    |
| 24 | Lizin                  | 146,1055 | 145,0982 | 28,628 | 51865,66    |
| 25 | Ornitin                | 132,0901 | 133,0973 | 37,048 | 194886,2    |
| 26 | Fenilalanin            | 165,0788 | 166,0861 | 6,99   | 30065018    |
| 27 | Asparajin              | 132,0532 | 133,0605 | 41,857 | 20852,85    |
| 28 | Alanin                 | 89,0476  | 90,05488 | 13,726 | 17357921    |
| 29 | Aspartik Asit          | 133,0374 | 134,0447 | 12,811 | 10846151    |
| 30 | karnozin               | 226,1066 | 225,0993 | 26,99  | 193969,4    |
| 31 | sitrat                 | 192,027  | 191,0197 | 22,681 | 71976,21    |
| 32 | Kreatin                | 131,0693 | 132,0766 | 13,827 | 87426826    |
| 33 | Kreatinin              | 113,0587 | 114,066  | 28,915 | 201085,5    |
| 34 | OH-piruvat             | 103,0035 | 101,9962 | 37,786 | 37005,24    |
| 35 | Ürik Asit              | 168,0285 | 167,0212 | 30,736 | 120555,2    |

\*LC-MS/MS sisteminin optimum kromatografik koşulları; Merck SeQuant ZIC-HILIC (5 µm 50x4.6 mm) kolon kullanılarak % 0.1 formik asit içeren su ve % 0.1 formik asit içeren asetonitril karışımından oluşan hareketli fazın 0.1 mL/dakika akış hızında, 25°C kolon sıcaklığında Tablo 33’de tespit edilen birçok maddeden bazıları gösterilmiştir. Analiz süresi 45 dakikadır. Ana deneyde Metabolitlerin pik alanları hücre sayımına oranlanarak değerlendirilecektir.(MW:Moleküler Ağırlığı m:kütle z:yük, RT:Retention time)

**Tablo 35:** Farklı besiyerlerindeki hücre hatlarında çözücü ve uçurulma etkisini gösteren metabolit sayıları.

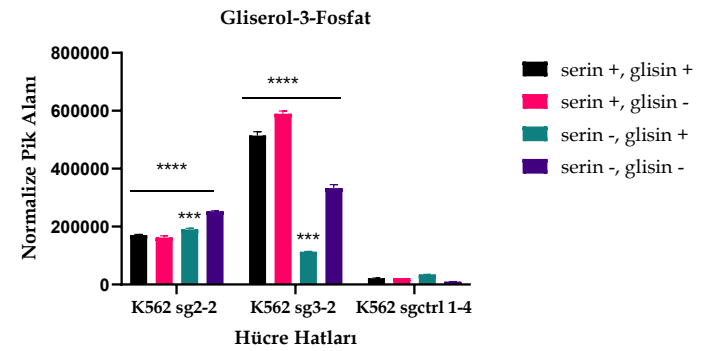
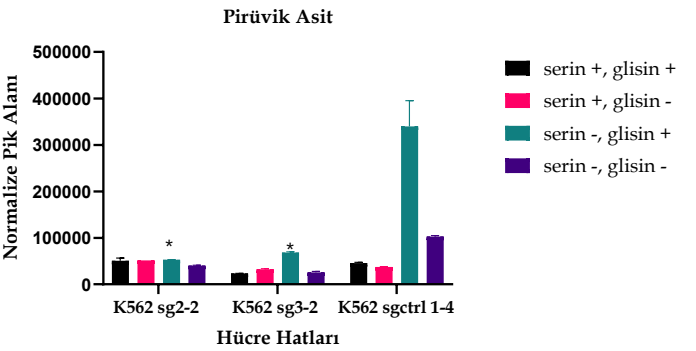
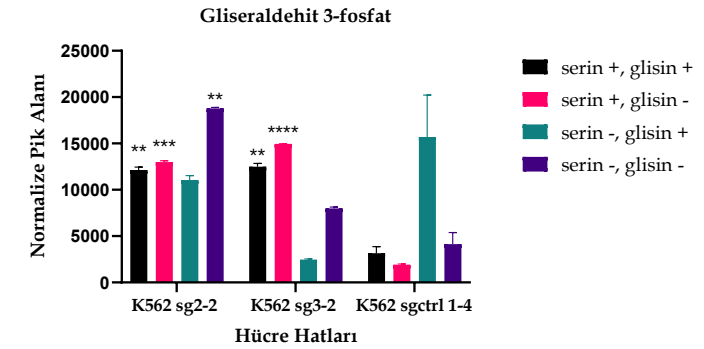
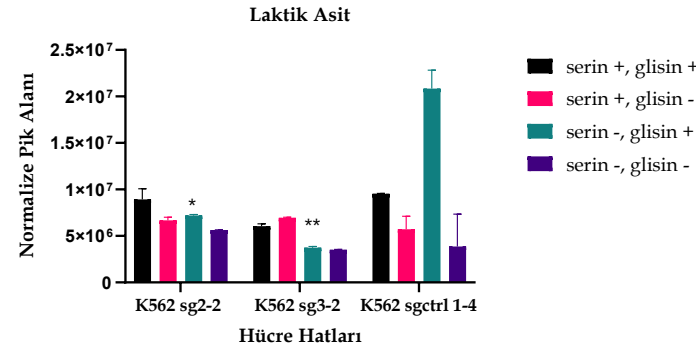
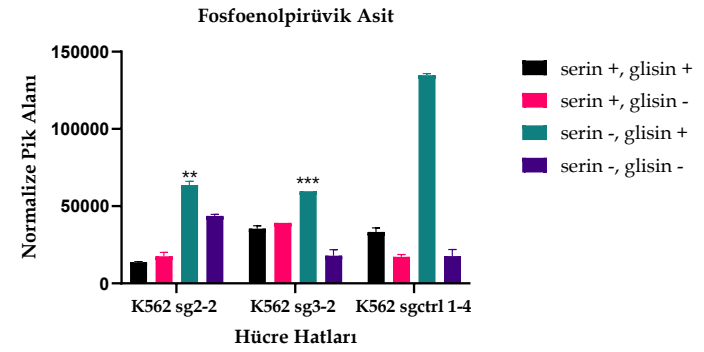
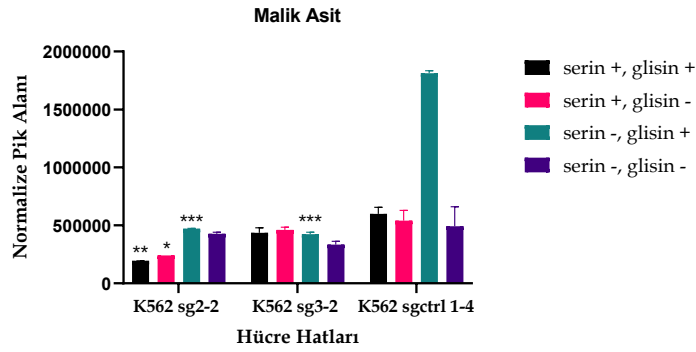
| Farklı Besiyerleri ile Hücre Hatları | Çözücü ile Direkt Enjekte Edilen Örnek Metabolit Sayısı | Çözücü Uçurulduktan Sonra Su ile Sulandırılan Örnek Metabolit Sayısı |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| K562 sgctrl serin +, glisin +        | 11.358                                                  | 20.896                                                               |
| K562 sgctrl serin +, glisin -        | 15.536                                                  | 21.464                                                               |
| K562 sgctrl serin -, glisin +        | 8.419                                                   | 19.687                                                               |
| K562 sgctrl serin -, glisin -        | 11.357                                                  | 20.327                                                               |
| K562 sg2-2 serin +, glisin +         | 8.225                                                   | 3 'lü örnekleri değerlendirmek için direkt okumaya verildi           |
| K562 sg2-2 serin +, glisin -         | 8.164                                                   | 8.164                                                                |
| K562 sg2-2 serin -, glisin +         | 11.365                                                  | 10.964                                                               |
| K562 sg2-2 serin-, glisin -          | 20.744                                                  | 11.271                                                               |
| K562 sg3-2 serin +, glisin +         | 17.660                                                  | 19.532                                                               |
| K562 sg3-2 serin +, glisin -         | 19.843                                                  | 11.120                                                               |
| K562 sg3-2 serin -, glisin +         | 19.791                                                  | 11.158                                                               |
| K562 sg3-2 serin-, glisin -          | 11.825                                                  | 8.040                                                                |

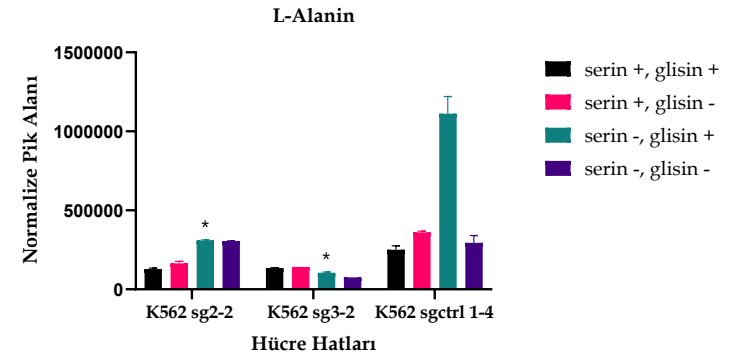
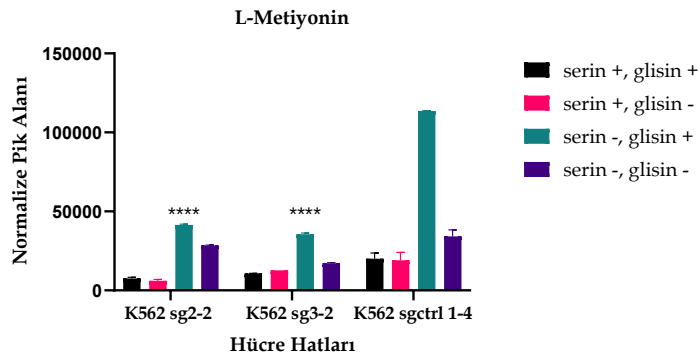
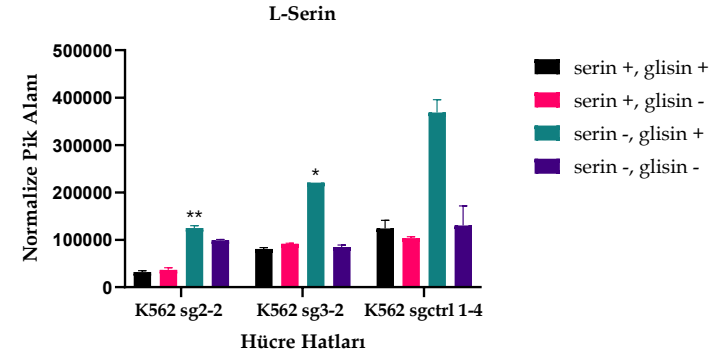
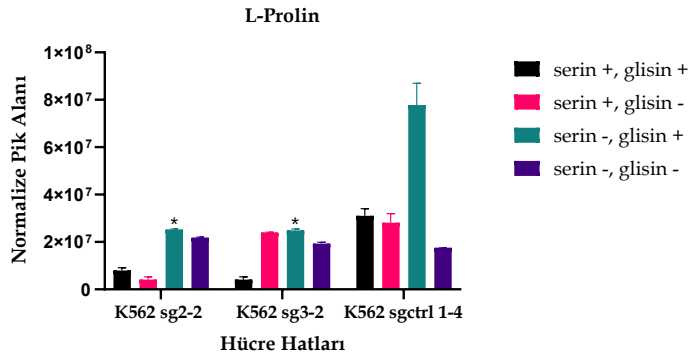
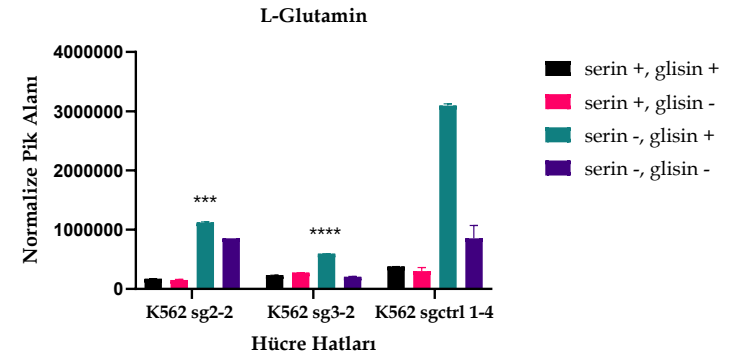
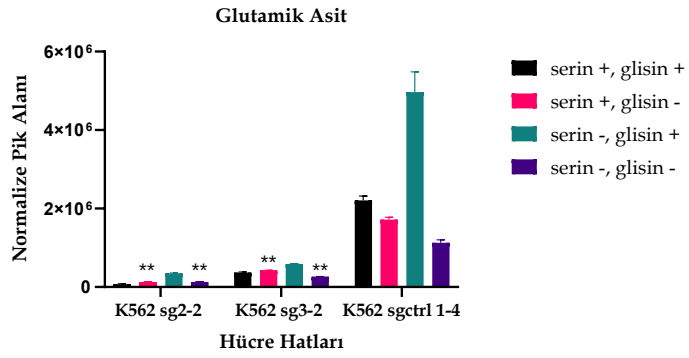
Ham veriler Compound Discover 3.3 programına aktarılarak herhangi bir filtreleme yapılmadan elde edilmiş eşleşen metabolit sayıları yukarıdaki tabloda gösterilmiştir. Kontrol hücrelerinde evaporatörlü grupta daha çok metabolit sayısı elde edilmişken, knock-out hücre gruplarında direkt okumada daha yüksek sayılar elde edilmiş olsa da özellikle ilgilendiğimiz metabolitler açısından uçurma işlemi uygulanarak hazırlanan örnekler ile uçurmadan hazırlanan örnekler

arasında geri kazanım değerleri açısından belirgin bir fark gözlenmemiştir. Bu nedenle uçurma işlemine gerek olmadığı gözlemlenmiştir.

**Şekil 38'**de LC-MS/MS analizi sonucu elde ettiğimiz hücre sayılarına göre normalize edilmiş hali pik alanlarını görülmektedir. K562 sg ctrl yani kontrol grubuna göre GGH KO hücre hatlarındaki glikolitik yolla bağlantılı bazı molekülerin değişimi izlenmektedir. Malik asit, laktik asit, pirüvik asit ve fosfoenolpirüvik asit molekülleri kontrol grubuna GGH KO hücre hatlarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az miktarda bulunurken, gliseraldehit 3-fosfat ve gliserol 3- fostat ise istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir şekilde yüksektir.

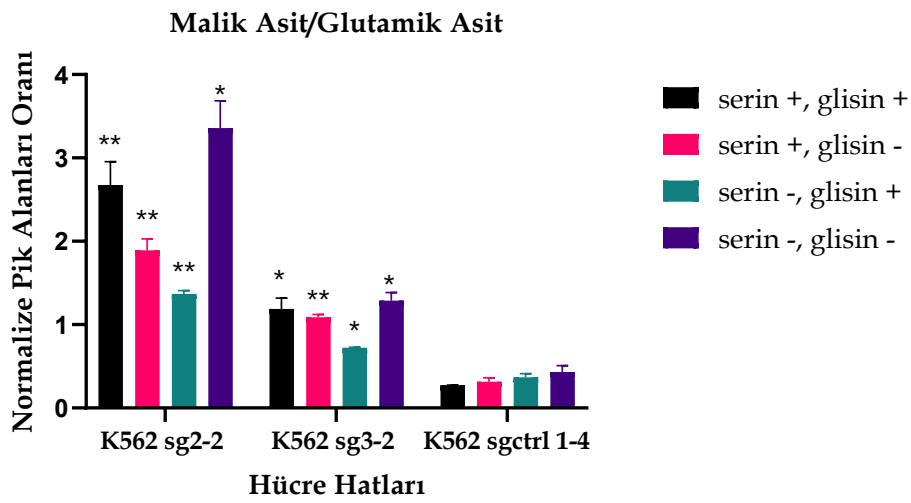
**Şekil 38:** K562 GGH KO hücre hattı serilerinde glikolitik yolla bağlantılı bazı metabolitlerin normalize pik alanları Data mean $\pm$ SD olarak sunuldu. Kontrol grubunda her bir besiyerine göre karşılaştırma yapıldığında, \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.0001, \*\*\*\* p<0.00001 (Bir sonraki sayfadaki şekil).





**Şekil 39:** K562 GGH KO hücre hattı serilerinde bazı amino asitlerin normalize pik alanları. Data mean±SD olarak sunuldu. \*p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.0001, \*\*\*\* p<0.00001.

**Şekil 39'**da K562 GGH KO hücre hattı serilerinde glutamik asit, glutamin, alanin, metiyonin, serin, prolin gibi amino asitlerin seviyeleri karşılaştırmalı olarak görülmektedir. Kontrol grubuna göre GGH KO hücre hatlarında serin içermeyen besiyerinde amino asitler istatistiksel olarak anlamlı olarak daha az bulunmaktadır.

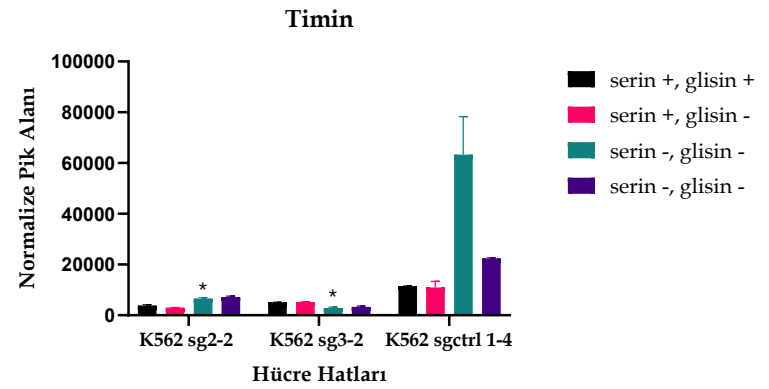
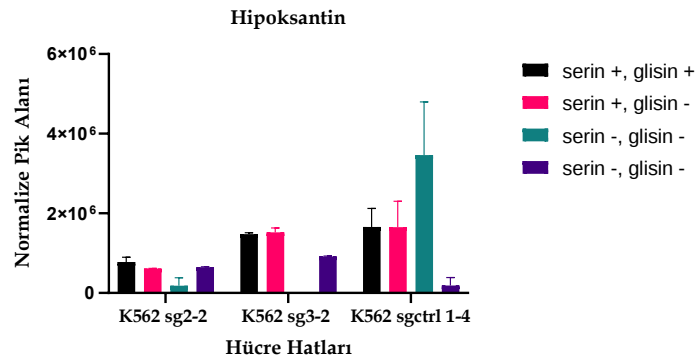
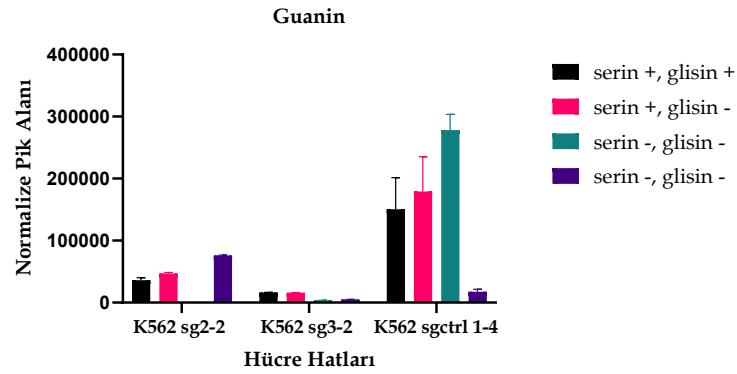
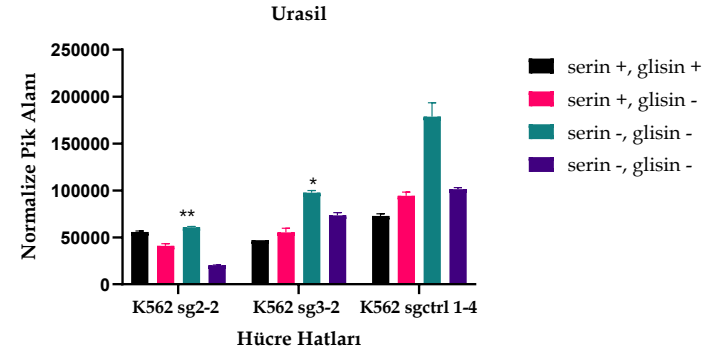
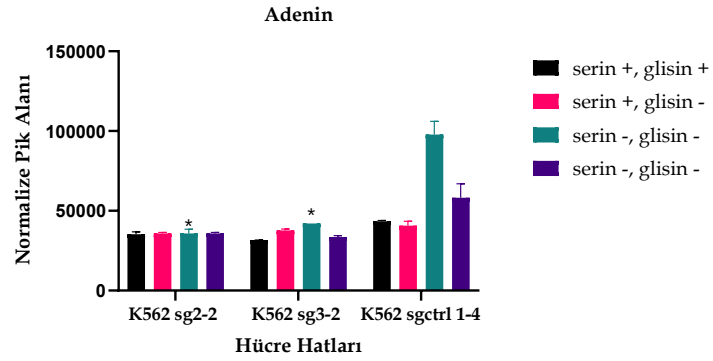


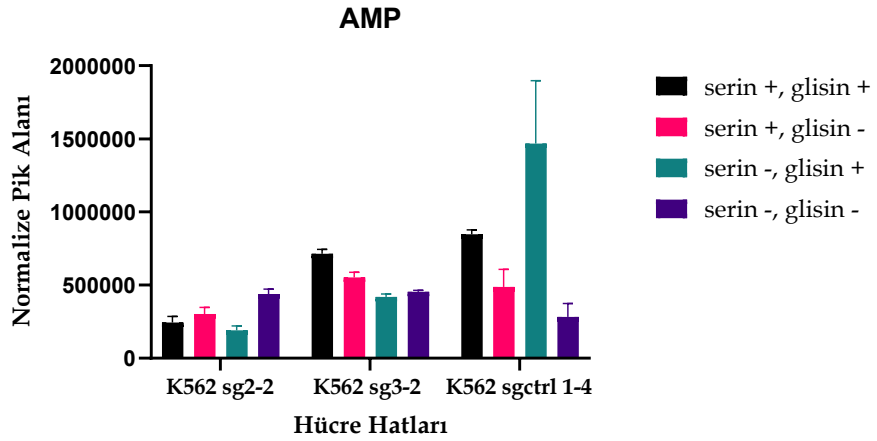
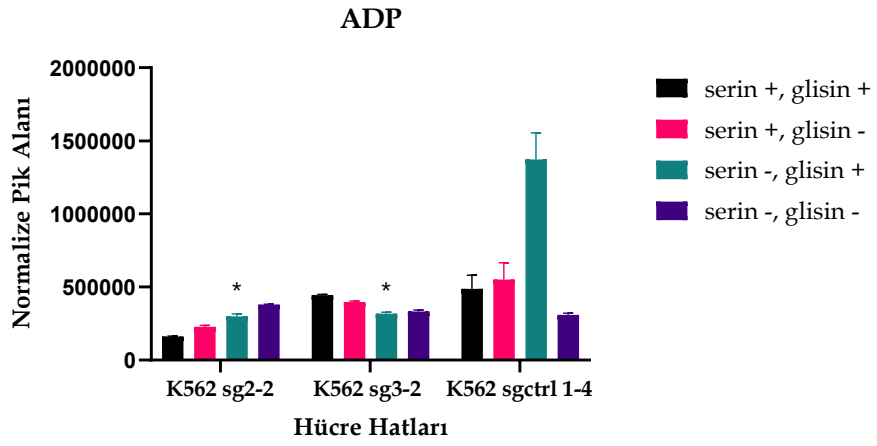
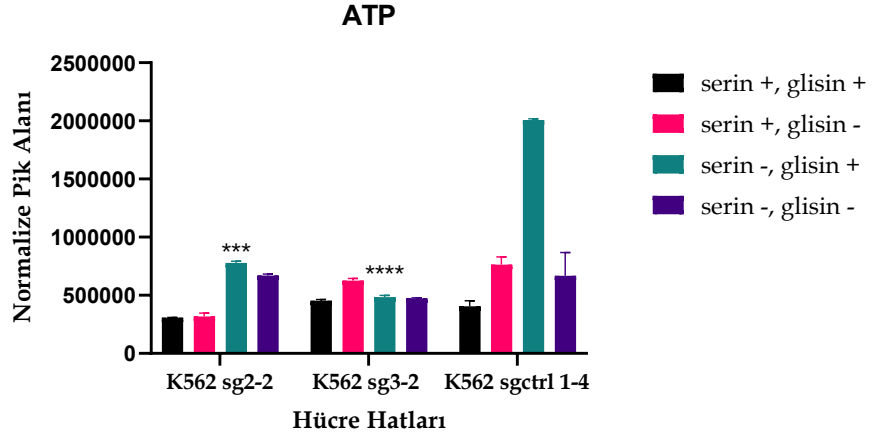
**Şekil 40:** K562 GGH KO hücre hattı serilerinde malik asit/glutamik asit normalize pik alan oranları. Kontrol grubunun her bir besiyeri ile karşılaştırıldığında. Data mean±SD olarak sunuldu. \*p<0.05, \*\* p<0.01.

Krebs indeksi olan malik asit/glutamik asit oranı kontrol grubuna göre GGH KO hücre hatlarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu (**Şekil 40**).

**Şekil 41'**de K562 GGH KO hücre hattı serilerinde adenin, timin, urasil, hipoksantin ve guanin gibi nükleik asitlerin yapısına katılan bazların seviyeleri karşılaştırmalı olarak görülmektedir. Kontrol grubuna göre GGH KO hücre hatlarında serin içermeyen besiyerinde amino asitler istatistiksel olarak anlamlı olarak daha az bulunmaktadır.

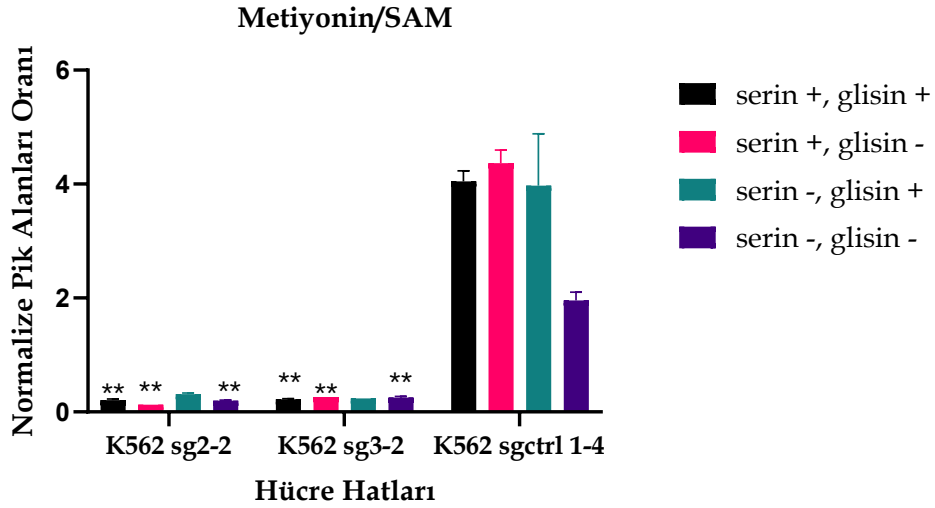
**Şekil 41:** K562 GGH KO hücre hattı serilerinde nükleotid bazlarının normalize pik alanları. Data mean±SD olarak sunuldu. Kontrol grubu serin içermeyen besiyeri ile karşılaştırma yapıldığında, \*p<0.05, \*\* p<0.01. (Bir sonraki sayfadaki şekil).





**Şekil 42:** K562 GGH KO hücre hattı serilerinde enerji moleküllerinin normalize pik alanları. Data mean±SD olarak sunuldu. Kontrol grubu serin içermeyen besiyeri ile karşılaştırma yapıldığında  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*\*\*  $p < 0.00001$ .

Şekil 42’da K562 GGH KO hücre hattı serilerinde ATP, ADP ve AMP enerji ile ilgili nükleotidlerin karşılaştırmalı olarak seviyeleri görülmektedir. Kontrol grubuna göre GGH KO hücre hatlarında serin içermeyen besiyerinde amino asitler istatistiksel olarak anlamlı olarak daha az bulunmaktadır

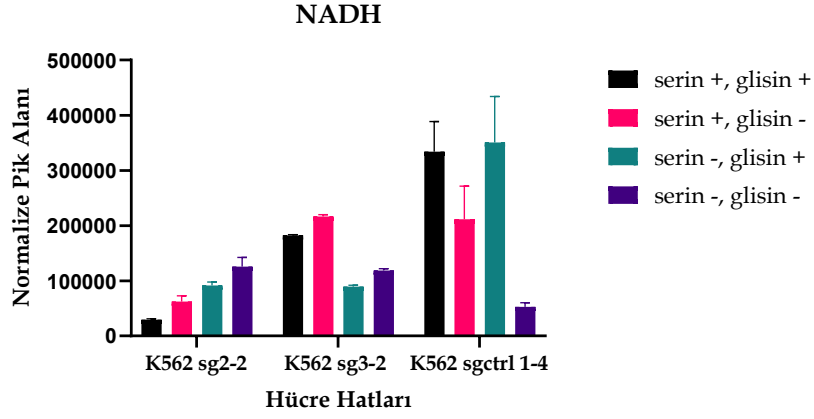


Şekil 43: K562 GGH KO hücre hattı serilerinde malik asit/ glutamik asit normalize pik alan oranları. Kontrol grubu her bir besiyerine göre karşılaştırma yapıldığında, Data mean±SD olarak sunuldu. Kontrol grubuna göre\*\* p<0.01.

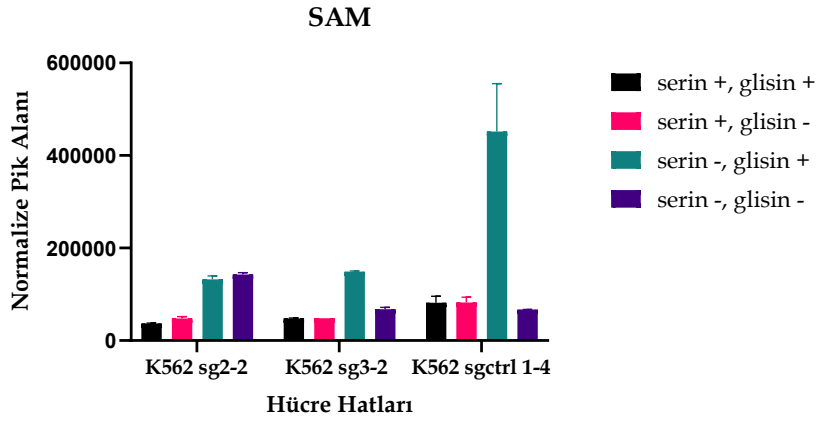
Metiyonin/SAM oranı kontrol grubuna göre GGH KO hücre hatlarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde az seviyelerde bulundu (Şekil 43).

Şekil 44A’da redoks reaksiyonlarında görevli NADH koenzimi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasada daha az olduğu görülmektedir. B ve C grafiklerinde de SAM ve Glutasyon moleküllerinin kontrol grubuna göre GGH KO hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı olmasada daha az seviyelerde bulunduğu görülmektedir (Şekil 44).

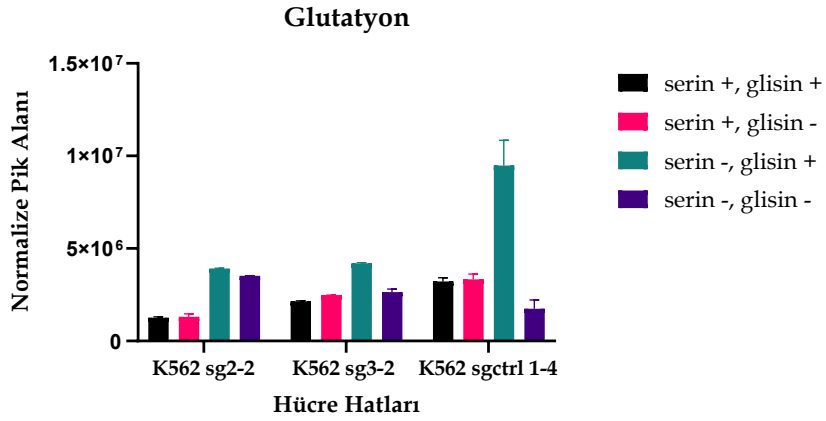
A



B

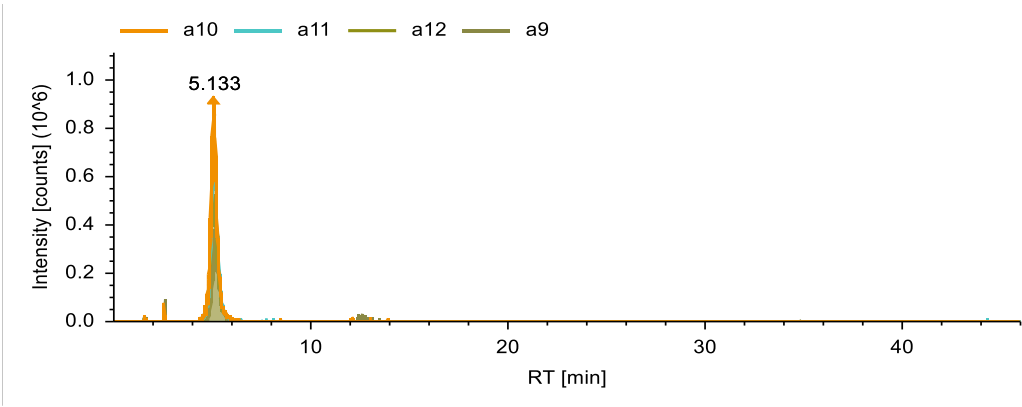


C

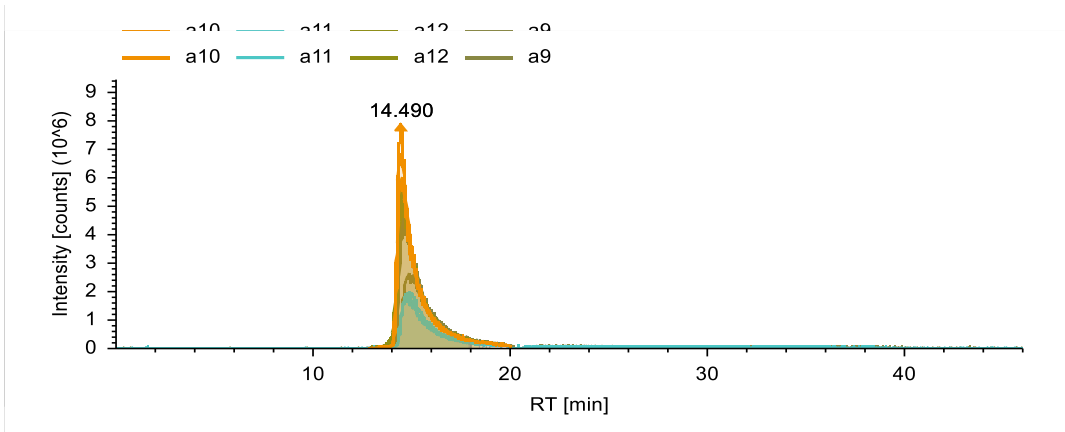


**Şekil 44:** K562 GGH KO hücre hattı serilerinde A.,B., C., NADH, SAM, Glutasyon moleküllerinin normalize pik alanları. Data mean±SD olarak sunuldu. Kontrol ile karşılaştırıldığında istatistiksel bir anlamlılık tespit edilmedi.

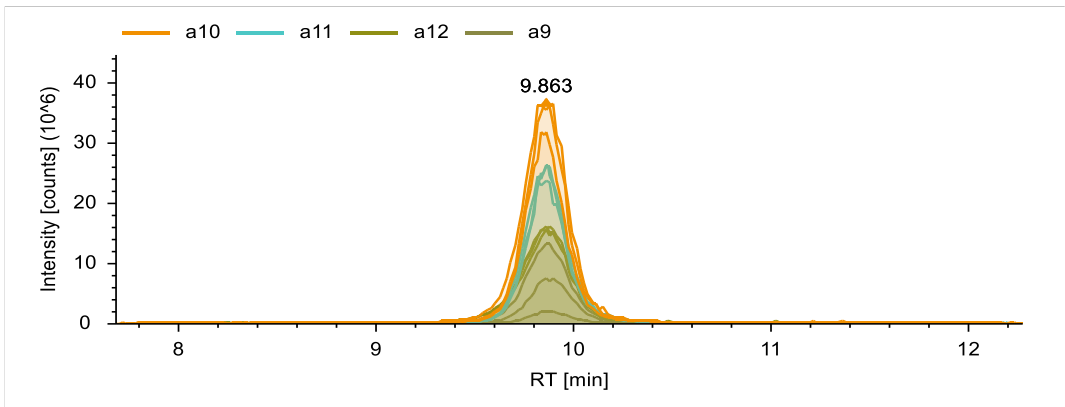
Metiyonin



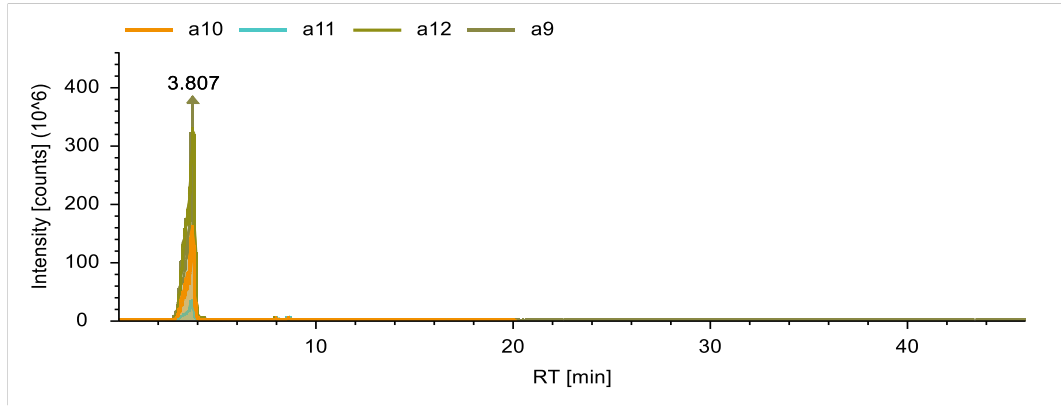
ATP



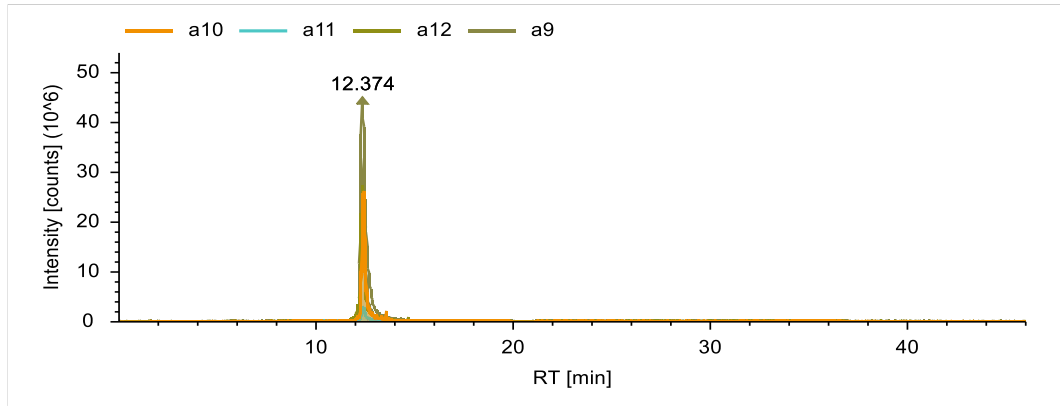
Glutamine



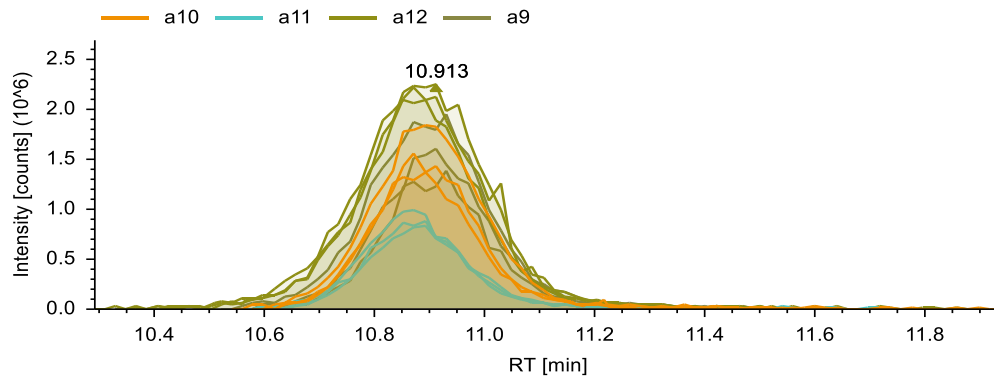
## Laktik Asit



## Malat



## Ornitin



**Şekil 45:** K562 Kontrol grubuna ait bazı moleküllerin 4 farklı besiyerinde 3'lü tekrarları ile birlikte karşılaştırmalı kromatogramları(**a10**:serin-,glisin-, **a11**:serin-,glisin+, **a12**:serin+,glisin-, **a9**:serin+,glisin+)

## 5. TARTIŞMA

GGH, hücre çoğalması, metilasyon, DNA sentezi ve onarımı için hücre içi folat metabolizmasını düzenleyen ve her yerde bulunan bir enzimdir. GGH, folilpoli-/antifolilpoli- $\gamma$ -glutamatların  $\gamma$ -poliglutamat kuyruklarının çıkarılmasını katalize ederek hücre dışına atılmalarını kolaylaştırır, böylece folatların metabolik homeostazını veya antifolatın farmakolojik etkinliğini korur (77). Serin-glisin metabolizmasında GGH enziminin rolünü araştırmak olan amacımız doğrultusunda Crispr-Cas9 yönetimi ile K562 ve HGC27 hücre hatlarında GGH genini KO ettik. GGH geninin genomdan silinmesinin proliferasyona etkisine baktığımızda serin amino asit bağımlı K562 hücre hattında proliferasyonu arttırdığını, serin amino asiti bağımlı olmayan HGC27 hücre hattında hücre canlılığında bir değişiklik izlenmedi. Yapılan bir araştırmada, 12.427 prostat kanseri içeren bir doku mikro dizisi üzerinde immünohistokimyasal olarak GGH boyaması yapılarak, kanserlerin %49,6'sında düşük yoğunluklu, %38,6'sında ise yüksek yoğunluklu GGH ekspresyonu olduğunu göstermişler (78). GGH'nın kanserlerin gelişimi ve/veya ilerlemesinde tümörle ilişkili upregülasyonu, mesanenin ürotelyal karsinomu, meme, akciğer, prostat kanseri veya kolorektal kanseri olmak üzere çeşitli insan kanserlerinde bildirilmiştir (79, 80, 81, 82).

Serin, hücre tarafından alınabilen veya serin sentez yolu (SSP) aracılığıyla glikolitik ara ürünlerden *de novo* olarak sentezlenebilen esansiyel olmayan bir amino asittir. Serin, nükleotid sentezini, metilasyon reaksiyonlarını, tek karbon döngüsü ve antioksidan savunmayı desteklemesi dâhil olmak üzere birçok biyosentetik yol için kullanılır. Serin metabolizması kanserlerde sıklıkla disregüledir; ancak bunun tümörlere sağladığı fayda tartışmalıdır. Birçok durumda, hücre dışı serin tek başına kanser hücresi çoğalmasını desteklemek için yeterli olurken, bazı kanser hücreleri glikozdan serin sentezini artırır ve bol miktarda hücre dışı serin varlığında bile *de novo* serin sentezine ihtiyaç duyar (5). HCT116, RKO, HCT-15, DLD-1 gibi çeşitli kanser hücre hatlarında yapılan serin depleksyon deneylerinde hücre canlılığının azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca glisinin serin yerine geçemeyeceğini ve serinden yoksun hücrelerde glisinin arttırılmasının

hücrelerin glisini serine dönüştürürken tek karbon havuzunu daha da tükettiğini gösterildi (7, 83, 84, 85). Literatür ile uyumlu olarak hücre sayımı ve hücre canlılık deneylerimizde 4 farklı hücre hattından 3'ünde serin içermeyen fakat glisin içeren besiyerinde hücre canlılıklarının anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi. HGC27 GGH KO hücre hatlarında 4 farklı besiyerinde hücre canlılığı açısından bir fark oluşmazken, K562 GGH KO hücre hattı serilerinde serin ve glisin içermeyen besiyerinde sadece serin içermeyen besiyerine göre hücre canlılığı daha yüksek tespit edildi. Bunun sebebinin hem literatür araştırmalarında hem de diğer deney sonuçlarımıza göre serin amino asidinin *de nova* sentezinin artışına bağlı olduğu anlaşıldı (86). K562'e nazaran normalde GGH genini eksprese etmeyen U-937 ve KATO III hücre hatlarına göre GGH OE ettirilen hücre hatlarında sadece serin içermeyen besiyerine göre daha fazla hücre canlılığında bir azalış oldu. KATO III hücre hattında serin *de nova* sentezi olmadığı için her iki amino asidi içermeyen besiyerinde sadece serin içermeyene göre hücre canlılığı daha da azaldı. HGC27 dışında diğer 3 hücre hattında hücre proliferasyonu için eksojen serin bağımlılığı görüldü. K562 GGH KO hücrelerinde ise sadece serin içermeyen besiyerinde kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunun daha fazla olduğu gözlemlendi. Ayrıca HGC27'lerde K562'lerdeki gibi % 50 civarı bir hücre canlılığı düşüşü izlenmemesi, HGC27 mide kanser hücre hattı olduğu için farklı genetik arka plana sahip olması serin ve serin/glisin depleksiyonuna yanıtın K562'den farklı olmasına neden olmuş olabilir. Her bir hücre hattının aynı deneysel koşullara farklı yanıtlar vermesi metabolik heterojeniteyi göstermektedir. Çalışmamızda kullandığımız hücre hatlarında serin-glisin ve folat metabolizması ilgili genlerin ekspresyon bilgileri, The Human Protein Atlas veritabanından alındı. Yapılan *in silico* analizde de hücre içi dinamiklerin birbirinden farklı olduğu görülmektedir. Çalışma sonuçlarını yorumlamada bu *in silico* gen analizleri çok fayda sağlamıştır. KATO III hücre hattında GGH geninin dışında serin *de nova* sentezi için görevli kilit iki enzim olan PHGDH ve PSAT1 mRNA ekspresyonlarında olmadığı görülmektedir. U-937 hücre hattı da GGH ve FOLR1 genlerinin ekspresyonlarının olmadığı görülmektedir. Diğer bağlantılı genlerinin de her bir hücre hattında farklı miktarlarda ekspresyonları vardır. KATO III hücre hattı SLC46A1 geninin

diğer hücre hatlarına göre çok daha az eksprese ederken, U-937 hücre hattının FOLR1 reseptörünü eksprese etmediğini, K562 hücre hattının ise çok az eksprese ettiği görülmektedir. Bu gen ifadelerinin incelenmesi sonucu kanser hücre hatlarında metabolik ifadelerinin birbirinden çok farklı olduğu ve yapılan deneylerde alınan yanıtların her hücre hattının kendi içindeki metabolik programlamaya göre değerlendirilmesi hatta transkriptomik ve metabolomik analizler ile bütüncül yaklaşımlar ile değerlendirilmesi gerektiği görülmektedir. Birbirinden farklı seviyelerde gen ekspresyonların olması hücrelerin aynı deney koşullarında farklı cevap vermelerine neden olmaktadır. Kanser hücreleri, büyüme ve hayatta kalmayı desteklemek için metabolizmalarını adapte ederek çeşitli bağımlılıklar ve hassasiyetler oluştururlar. Bu metabolik değişiklikler, tümördeki genetik varyasyonlar ve tümör ortamı veya köken dokusu dâhil olmak üzere çok sayıda faktör tarafından belirlenir. Normal sağlıklı hücrelerin aksine kanser hücrelerin çok yönlü, tekrar hızlı bir şekilde programlanabilen bir metabolik akışları vardır.

Serin amino asitinin yanında kanser hücreleri tarafından en çok tüketilen besin maddesi glukozdur. Hücre canlılık ve diğer deneysel çalışmalarımız için kullandığımız besiyerimiz 15.5 mM konsantrasyonda glukoz içermektedir. Deney koşullarına bir de hücre canlılık açısından düşük glukoz konsantrasyonunun etkisini ekledik. Glikolizin%10 civarı serin sentezine harcanmakta olduğundan düşük glukozun etkisi GGH KO hücrelerin proliferasyonu nasıl etkiler sorusu ile HGC27 ve K562 GGH KO hücre hattı serilerinde hem 15.5 mM hem de 5.5 mM konsantrasyonlarda hücre canlılık deneyi yapıldı. HGC27 hücre hattında da normal glukoz konsantrasyonun da olduğu gibi düşük glukoz seviyesinde hiçbir farklılık göstermedi. K562 GGH KO hücre hatlarında serin ve glisin içermeyen besiyerinde 5.5 mM'da GGH KO olan hücre hatları kontrole göre anlamlı bir şekilde hücre canlılığını artıramadı. Diğer besiyerlerinde 15.5 mM ile benzer sonuçlar verdi. Serin ve glisin içermeyen ortamda GGH KO hücreleri *de nova* sentezi normal glukoz seviyesindeki gibi arttırmadı. Literatür de düşük glukoz seviyeleri ile yapılan çalışmalar incelendiğinde bazı hücre hatların etkilenip proliferasyonlarının ileri derecede anlamlı olarak düştüğünü, bazı hücre

hatlarının ise etkilenmediği görülmektedir (87, 88, 89). GGH OE yapılan hücre hatları KATO III ve U-937 'de sadece serin içermeyen besiyerinde GGH KO hücrelerin aksine hücre canlılığı yabani tip hücre hattına göre proliferasyon anlamlı bir şekilde azaldı.

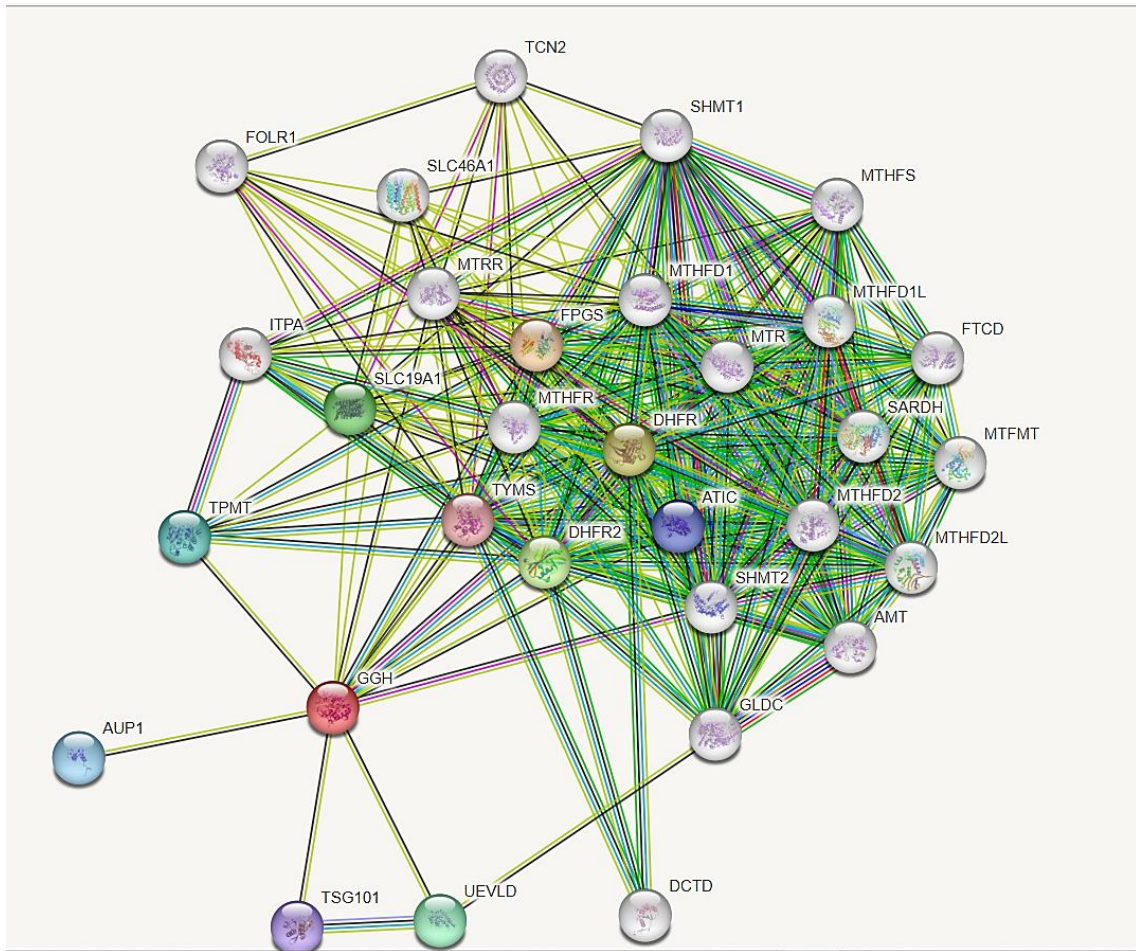
*PHGDH*'ye bağımlı hücre hatlarında *PHGDH*'nin knock-down olması toksik ve *PHGDH*'den bağımsız hücre hatlarında ise bu durum minimum düzeyde toksik olduğu gösterilmiştir (6, 90, 91). Pacold ve ark. yaptığı çalışmada 3 *PHGDH* bağımsız hücre hattının (MDA-MB-231, ZR-75-1 ve SK-MEL-2) ve beş *PHGDH* bağımlı hücre hattının (MDA-MB-468, BT-20, HCC70, HT1080 ve MT-3) NCT-503 *PHGDH* inhibitörü ile yapılan doz-cevap çalışmasında *PHGDH*'ye bağımlı hücre hatları için kullanılan 8-16  $\mu$ M  $EC_{50}$  konsantrasyonun bağımsız hücrelerden MDA-MB-231 hücre hattında 6 ila 10 kat daha yüksek olduğu ve diğer *PHGDH*'den bağımsız hücre hatlarına karşı toksisite oluşturmadığını göstermişlerdir (92). Eksojen olarak serin kısıtlamasının yanında serin sentezinin kilit enzimi olan *PHGDH*'in da hücre içinde inhibiyonunu da K562 GGH KO hücre setinde değerlendirdik. *PHGDH*'in aktif, seçici inhibitörü olarak CBR-5884'ü kullandık. K562 GGH KO hücre hatlarında 13  $\mu$ M konsantrasyonunda serin amino asiti sentezinde kilit bir enzim olan *PHGDH* enzimin inhibe eden CBR-5884 inhibitörünün etkisi incelendi. İnhibitör deneyinde GGH KO hücre hatlarında, sadece serin içermeyen ve her iki amino asiti ( serin+glisin) içermeyen besiyerlerinde kontrole göre hücre canlılığı ileri derecede anlamlı olarak azalmaktadır. Hem hücre içinde sentezlenmediğinde hem de dışarda serin amino asiti alınmadığında yani tamamen serin amino asit etkisi ortadan kaldırıldığında serin amino asitin hücre proliferasyonu için ne kadar önemli olduğunu görülmektedir (93).

Serin-glisin metabolizmasında görevli *PHGDH*, *SHMT1* ve *SHMT2* genlerinin ekspresyonlarını qRT-PCR ile K562 GGH KO ve HGC27 GGH KO hücre setlerinde incelendi. K562 GGH KO hücre hatlarında kontrole göre *PHGDH* gen ekspresyon seviyelerinin 4 besiyerinde de ileri derecede anlamlı şekilde arttırdığını tespit ettik. Hücre canlılığının K562 GGH KO hücre hatlarında

kontrole göre daha fazla olmasının nedeni *PHGDH* geninin çok fazla eksprese edilmesinden dolayı serin amino asiti artışına bağlı olduğu görünmektedir. HGC27 GGH KO hücre setinde kontrole göre *PHGDH* genini arttıramadığı görülmektedir ki bu hücre hattı serisinde paralel olarak hücre canlılığı da değişmemiştir. Yine eşlenik olarak yanıt aldığımız diğer bir deney de CBR-5884 inhibitör deneyinde *PHGDH* enzimini inhibe ettiğimizde serin olmayan besiyerlerinde kontrole göre daha fazla hücre canlılığı etkilendi. Serin bağımlı GGH KO hücrelerde GGH ve *PHGDH* arasında bir ilişki olduğu görülmektedir. Yüksek *PHGDH* aktivitesi tarafından *de novo* serin sentez yolunun up-regülasyonu, karsinogenezde metabolik adaptasyonun bir özelliği olarak kabul edilmiştir. Zhu ve ark. yaptığı çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer kanseri olan 319 hastada *PHGDH*'nin klinik önemini araştırmışlar ve tümör dokularında *PHGDH* mRNA ve protein seviyelerinde eşleşen komşu tümör dışı dokulara kıyasla önemli ölçüde arttığı tespit etmişlerdir (94). İnsan çalışmalarının dışında ratlarda yapılan çalışmalarda da kontrol gruplarına göre tümörlü dokular da *PHGDH* enziminin çok daha fazla üretildiği gösterilmiştir (95, 96, 97). Başka bir çalışmada, hem östrojen reseptörü pozitif hem de negatif meme kanseri hücrelerinde *PHGDH* ekspresyonunun RNAi aracılı susturulması, NADPH seviyelerinin azalmasına, mitokondriyal redoks homeostazının bozulmasına ve apoptozun artmasına neden olarak hipoksik koşullar altında meme kanseri kök hücrelerinin zenginleşmesini engellendiği gösterilmiştir (98). Fan vd., araştırmasında ise *PHGDH*'nin 3-fosfoglisaratın oksidasyonunu katalize etmenin yanı sıra,  $\alpha$ -ketoglutaratın NADH'ye bağlı olarak onkometabolit d-2-hidroksiglutarata (d-2HG) indirgenmesini de katalize ettiğini göstermişler. *PHGDH* OE meme kanseri hücre hatlarında MDA-MB-468 ve BT-20'de *PHGDH*'nin knock-down edilmesi, hücresel d-2HG'yi yaklaşık %50 oranında azalttığı ve *PHGDH*'nin aşırı ekspresyonu, normalde çok düşük *PHGDH* ekspresyonu gösteren *PHGDH* ile çoğaltılmamış MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde hücresel d-2HG'yi 2 kattan fazla arttırdığını ortaya koymuşlar (100).

Serin amino asitinden glisin sentezini katalizleyen enzimler SHMT1 ve SHMT2 hem K562 hem de HGC27 GGH KO hücre hattı serilerinde kontrole göre

ekspresyonunu anlamlı bir derecede arttıramamışlardır. GGH proteinin SHMT2 ve DHFR proteinleri ile deneysel olarak protein-protein etkileşimi gösterilmiştir (101, 102). GGH genine ait diğer proteinler ile ilişkilerini gösteren etkileşim ağı Şekil 46'de gösterilmiştir (103). GGH KO hücrelerde kontrole göre SHMT1/2 genlerinin anlamlı derecede daha az eksprese edildiklerini görüldü. Yapılan bir çalışmada, veritabanlarından elde edilen datalar üzerinden 224 kolorektal kanser tümörlerinin %43,39'unda SHMT2 ekspresyonunun düşük olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, SHMT2 düşük tümörlü hastalarda 5- Florourasil (5-FU) kemorezistansı ve kötü prognoz sergilediği gösterilmiştir. Daha ileri analizlerde, düşük SHMT2'nin otofajiyi indüklediğini ve ardından 5-FU direncini tetiklediğini ortaya koymuşlar. MS aracılığıyla, sitozolik p53'ü bir SHMT2 bağlayıcı protein olarak tanımlamış ve SHMT2'nin sitozolik p53'ü stabilize ederek otofajiyi inhibe ettiğini bildirmişler (104).



Şekil 46. GGH proteine ait diğer fonksiyonel ve fiziksel etkileşimi olduğu protein etkileşim ağı (STRING veritabanında alınmıştır) (103).

Serin-glisin metabolizmasında GGH bağlantısını araştırmak olan çalışmamızda GGH'nin anti-folat yanıtını da 4 farklı besiyerinde inceledik. MTX, folat bağımlı enzimlerin yarışmalı bir inhibitörü olan ve akut lenfoblastik lösemi de dahil olmak üzere birçok insan kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir antifolattır (104). K562 GGH KO hücre hatlarına 0, 5, 10, 25, 50, 100 nM MTX konsantrasyonlarını uygulandı. 4 farklı besiyerinde de kontrole göre anlamlı bir şekilde sg2-2 ve sg3-2 hücre hatlarında hücre canlılığı azaldı. GGH eksprese eden K562 hücre hattı U937 hücre hattına göre MTX ilacına karşı daha dirençlidir.

| Hücre Hattı  | 0 nM relative hücre canlılık ortalama yüzdesi | 50 nM MTX relative hücre canlılık ortalama yüzdesi | Net oran       |
|--------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------|
| K562 sg 2-2  | 100                                           | 58                                                 | ~%40 düşüş var |
| K562 sg 3-2  | 100                                           | 52                                                 | ~%50 düşüş var |
| K562 sg ctrl | 100                                           | 75                                                 | ~%25 düşüş var |

\*serin-glisin içeren besiyerinde MTX ilacına verilen yanıtın yüzde ortalama karşılaştırması.

| Hücre Hattı | 0 nM rölatif hücre canlılık ortalama yüzdesi | 10 nM/ 100 nM MTX rölatif hücre canlılık ortalama yüzdesi | Net oran    |
|-------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------|
| K562        | 30                                           | 20 (100 nM)                                               | %33 düşüyor |
| U937        | 52                                           | 26 (10 nM)                                                | %50 düşüyor |

\* serin içermeyen glisin içeren besiyeri sonuçları

Başlangıç hücre canlılığı tam besiyerine göre serin içermeyen besiyerinde rölatif olarak daha az olmasına göre K562 hücre hattı serin içermeyen ortamda MTX'a karşı direnç göstererek U937 'ye göre hücre canlılık oranı daha az

düşmüştür. MTX ilaç yanıtını değerlendirmede FPGS/GGH oranı önemlidir (105). Bu oran FPGS aleyhine yüksek ise MTX ilacı daha iyi yanıt verirken, GGH miktarı yüksekse MTX direnci görünmektedir. K562' nin FPGS/GGH oranı 0,58 iken, U-937'de bu 234'tür. O sebeple ilaca karşı birbirinden çok farklı cevap vermektedirler. Yüksek GGH aktivitesi fare hepatoma (106) ve insan sarcoma hücrelerinde (107) MTX direncine neden olduğu gösterilmiştir. HCT116 kolon kanseri ve MDA-MB-435 hücre hatlarında GGH overekspresyonu ile hücrelerin MTX yanı sıra 5-florourasil (5-FU)'ya karşı dirençli oldukları gösterilmiştir (108) . Bu çalışmada ek olarak GGH ekspresyonunun yanı sıra bu ilaçlara karşı hücresel yanıtta hücre içi folat miktarının da önemli olduğu gösterilmiştir. Artan folat konsantrasyonlarında direnç miktarının da arttığı gösterilmiştir. Bunun nedeni olarak ise polyglutamat ekli folatların GGH için lizozoma alınmasında bir eşik değeri olabileceği sunulmuştur (108) .

K562 GGH KO hücre setinde metabolomik analizler yaptık. Metabolitlerin LC-MS/MS'de elde edilen pik alanları hücre sayılarına oranlayarak sonuçları yorumlandı. Glikolitik akışla bağlantılı Malik asit, laktik asit, pirüvik asit ve fosfoenolpirüvik asit molekülleri kontrol grubuna GGH KO hücre hatlarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az miktarda bulunurken, gliseraldehit 3-fosfat ve gliserol 3- fosfat ise istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir şekilde yüksektir. Serin sentezi 3-fosfogliserattan başlamaktadır. 3-fosfogliserat öncesi glikoliz metabolik yolunun ara ürünü gliseraldehit 3- fosfat ve dihidroksiaseton fosfata dönüşen gliserol 3- fosfat molekülleri kontrol grubuna göre daha yüksek olması, 3-fosfogliserat sonrası oluşan fosfoenolpirüvik asit, pirüvik asit, laktik asit ve malik asit seviyelerinin kontrole göre düşük olması GGH KO hücrelerde serin *de nova* sentezinin artışı gösterip, glikolizin serin sentezine kaydığını diğer sonuçlar ile eşlenik olarak ortaya koyar. HCT116 hücrelerinde yapılan çalışmada serin deprivasyonu sonucu metabolomik analizlerde laktata giden glikolitik akışın azaldığı bildirmiştir (109). Diğer bazı çalışmalarda da serin yoksunluğunun laktata giden glikolitik akışı azalttığı gösterilmiştir (86,110).

Krebs indekslerinde biri olan malik asit/glutamik asit oranı K562 kontrol grubu ile kıyaslandığında GGH KO hücrelerinde 4 besiyerinde de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. Glikolitik akışın laktata akıbeti azalıp, krebs indeksi yüksek olan GGH KO hücrelerinde enerjiyi metabolizmasını daha çok Krebs üzerinde yönettiği görülmektedir.

K562 GGH KO hücrelerde amino asit profili incelendiğinde kontrol grubuna göre GGH KO'larda serin, alanin glutamin, glutamik asit, prolin ve metiyonin amino asitlerinin anlamlı bir şekilde daha az olduğu görülmektedir. Maddocks ve ark. yaptığı bir çalışmada serin glisin olmayan diyetle beslenen ApcMin/+ fare serumlarında glutamat, serin, prolinin azaldığı, glutaminin değişmediği, metiyonininde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir (111).

Hücre proliferasyonu artan K562 GGH KO hücrelerde kontrole göre nükleotid bazların özellikle serin içermeyen besiyerinde anlamlı olarak daha az olduğu görülmektedir. Kontrol grubuna göre bazların özellikle serin içermeyen besiyerinde anlamlı olarak daha az olması proliferasyonu artışı ile uyumludur. ATP, Metiyonin, SAM seviyeleri ile Metiyonin/SAM oranı kontrole göre anlamlı olarak az olması GGH KO hücrelerde bu akışın SAM üretimi yönünde olduğunu göstermektedir. Maddocks'un bir başka serin deprivasyon çalışmasında, serin açlığının metiyonin/S-adenozil metiyonin oranını artırarak metil gruplarının DNA ve RNA'ya transferini azalttığını ve serin açlığının ATP seviyelerini önemli ölçüde azaltırken, buna daha düşük seviyelerde AMP'nin eşlik etmesi ve AMPK'yı aktive etmemesini göstermişlerdir (112).

Kanser hücreleri eksojen serini hızla kullanır ve serin yoksunluğu serin sentez yolunun aktivasyonunu tetikler ve aerobik glikolizi hızla baskılayarak trikarboksilik asit döngüsüne akışın artmasına neden olur. Geçici p53-p21 aktivasyonu ve hücre döngüsünün durmasına, tükenmiş serin depolarının glutatyon sentezine verimli bir şekilde kanallı ederek hücre anti-oksidan kapasiteyi koruyarak hücre sağkalımını desteklemiştir. Tümör protein P53 (p53)'ten yoksun hücrelerde serin kısıtlaması artan oksidatif stres, azalmış canlılık ve ciddi şekilde bozulmuş proliferasyon ile sonuçlanmıştır (7). K562 GGH KO

hücre hattı serilerinde glutatyon kontrol grubuna göre daha az miktarlarda olduğu görülmektedir. GGH KO hücre hatlarında enerji akışının Krebs üzerinden düzenlenmesi oksidatif stresi daha fazla arttırmaktadır. Farelerde yapılan bir çalışmada serin amino asit desteğinin glutatyon sentezini ve metiyonin döngüsünü destekleyerek oksidatif stresi hafiflettiği gösterilirken (113), serin kısıtlamasının oksidatif stresi arttırdığı başka bir çalışmada uyumlu olarak bulunmuştur (7).

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu doktora tez çalışmasında en önemli özgün değeri GGH ekspresyonunun serin besin kısıtlamasında hücredeki rolünün araştırılmasıdır. Çalışmamızda GGH knockout ve overeksprese izojenik hücre hatları elde edildi.

✦ Elde edilen hücre hatlarının serin, glisin ve serin/glisin içermeyen ortamda hücre çoğalmalarındaki farklılık araştırıldı. Bu kapsamda elde edilen bulguların sonucunda;

1. Serin bağımlı hücre hatlarında (K562 GGH KO) yani besiyerinde serin amino asiti olmadığında hücre canlılığı istatistiksel olarak anlamlı olarak düşen hücre hatlarında, *GGH* geninin KO edilmesi proliferasyonu anlamlı olarak etkilemesi GGH'nın serin bağımlı hücrelerde serin-glisin metabolizmasında rolü olduğunu göstermektedir.
2. Serin bağımlı olmayan hücre hatlarında (HGC27 GGH KO), *GGH* geninin KO edilmesi proliferasyonu değiştirmedir. Hatta serin amino asitininin dışında düşük glukozda bile hücre canlılığı etkilenmedi. HGC27 hücre hattı hücre proliferasyonu için glutamin gibi farklı moleküllere bağımlı olabilir.
3. Serin bağımlı GGH eksprese etmeyen KATO III ve U-937'de GGH'nın ekzojen olarak eksprese edilmesi serin olmayan besiyerinde hücre canlılığının anlamlı bir şekilde azalmasına neden oldu. KO ve OE izojenik hücre hatları kendi içinde uyumlu bir sonuç verdi.
4. HGC27 ve K562 GGH KO hücre hatlarında, hücre canlılık deneylerine düşük konsantrasyonda glukoz etkisi olmak üzere bir değişken daha

ekledik. Serin bağımlı K562 GGH KO hücreleri kontrole göre hücre proliferasyonu çok daha ileri seviyede düşük glukozdan etkilendi. HGC27 GGH KO hücre setinde hücre proliferasyonu etkilenmedi. HGC27 hücre hattı kanser hücreleri arasındaki metabolik heterojeniteyi göstermede güzel bir örnek teşkil etti.

✦ K562 ve HGC27 GGH KO hücre hatlarında serin, glisin ve serin/glisin içermeyen ortamda serin-glisin metabolizması ile bağlantılı genlerin ekspresyonu incelenmesi sonucunda;

1. K562 GGH KO hücre hatlarında kontrole göre *PHDGH* geninin upregüle olduğunu görüldü. HGC27 GGH KO hücrelerin aksine down regüle olmaktadır.
2. *SHMT1* ve *SHMT2* genleri her iki hücre hattında da down regüledir. GGH geni ile etkileşimi gösterilen *SHMT2*'nin ekspresyonun azalması deney sonucunun literatür ile uyumunu göstermektedir.

✦ K562 GGH KO hücre hatlarında serin, glisin ve serin/glisin içermeyen ortamda PHGDH inhibitör ve MTX ilaç uygulamaları sonucunda;

1. GGH KO hücrelerde *PHGDH* geninin upregüle olması CBR-5884 inhibitörden çok daha fazla etkilenmesine neden oldu.
2. MTX ilaç deneylerinde GGH enzimin aktivitesinin olmadığı diğer bir validasyonu oldu. K562 GGH KO hücrelerinde ve GGH eksprese etmeyen U-937 hücre hatlarında MTX ilaç uygulamalarına karşı GGH'ın olmayışı hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azalttı. Hücre içi folat homeostazı için GGH'ın varlığı önemlidir. Bazı kanserlerde MTX karşı upregüle olduğunun gösterilmesi ve kötü prognoza ile ilişkilendirilmesi hücre sağkalımını arttırmaya yönelik bir metabolik adaptasyondur.

✦ K562 GGH KO hücre hatlarında serin, glisin ve serin/glisin içermeyen besiyerlerindeki metabolomik analizleri sonucunda;

1. Metabolomik analizler sonucunda GGH KO hücrelerde serin *de novo* sentezi öncülü olabilecek moleküllerin anlamlı olarak arttığı, 3-fosfoglisarat sonrası moleküllerde anlamlı azalma görülmesi diğer deneyler ile serin *de novo* sentezinin arttırdığını eşlenik olarak göstermiştir.
2. GGH KO hücrelerde laktat sentezinin azalması ve Krebs indeksinin artması enerji metabolizmasının aerobik glikolizden Krebse üzerinden sağlandığını göstermektedir.
3. Esansiyel ve non-esansiyel amino asit seviyelerinin azalması hem proliferasyonu artmış hem de Krebs döngüsünü daha çok enerji için kullanan GGH KO hücrelerde amino asit tüketiminin kontrole göre anlamlı olarak daha fazla olduğunu ortaya koydu.
4. Nükleotidler bazları proliferasyonu deneyleri ile değerlendirildiğinde GGH KO hücrelerde anlamlı olarak daha fazla tüketildiği bulundu.
5. Serin içermeyen besiyerlerine göre karşılaştırma yapıldığında ATP ve ADP molekülleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha az seviyelerde bulunmaktadır. Enerji moleküllerini çok daha fazla kullandıkları görülmektedir.
6. GGH KO hücrelerde glutatyon seviyesinin düşük olduğunu görülmektedir. Çalışmalarda serin deprivasyonun oksidatif stresi arttırdığının gösterilmesi ve bizim çalışmamızda da Krebs'i kullanması serbest radikal üretimini daha da arttıracığından glutatyon seviyelerinin az olması uyumlu bir sonuçtur.
7. Metiyonin amino asiti esansiyel bir amino asittir ve eşit miktarda besiyerinde her hücre hattı maruz kalır. Kontrol grubuna göre GGH KO olan hücrelerde anlamlı bir şekilde az olması çok daha fazla tüketildiğini gösterir. Metiyonin/SAM oranının düşük olması GGH KO hücrelerinde metiyonin SAM oluşumuna kaydığını gösterir. GGH geninin silinmesi hücre içi metilasyonu arttırmaktadır.

Kanser tedavilerinde GGH bağlantılı dirence karşı MTX gibi folat metabolizmasının hedeflenmesinde kullanılan ilaçlar etki edememektedir. Bu direnci kırabilmek için mevcut olası veya yeni geliştirilebilecek GGH inhibitörleri tedavinin etkinliği için kullanılabilir. Her bir kanser türünün kendine has metabolizma dinamiğinin olması ve değişen koşullara karşı çok hızlı adaptasyonlar geliştirmesi tedaviyi çok güçleştiren bir durumdur. Terapötik faydanın arttırılması için her bir kanser türüne ya da altgruplarına özgü metabolomik ve transkriptomik analiz yöntemlerinin kullanılarak bütüncül yaklaşımlarda bulunmak gerekir.

## KAYNAKÇA

1. Knudson AG. Cancer genetics. American journal of medical genetics. 2002 Jul 22;111(1):96-102.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
3. Yang M, Vousden KH. Serine and one-carbon metabolism in cancer. Nature Reviews Cancer. 2016 Oct;16(10):650-62.
4. Amelio I, Cutruzzolá F, Antonov A, Agostini M, Melino G. Serine and glycine metabolism in cancer. Trends in biochemical sciences. 2014 Apr 1;39(4):191-8.
5. Mattaini KR, Sullivan MR, Vander Heiden MG. The importance of serine metabolism in cancer. Journal of Cell Biology. 2016 Aug 1;214(3):249-57.
6. Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, Sethumadhavan S, Woo HK, Jang HG, Jha AK, Chen WW. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. Nature. 2011 Aug 18;476(7360):346-50.
7. Maddocks OD, Berkers CR, Mason SM, Zheng L, Blyth K, Gottlieb E, Vousden KH. Serine starvation induces stress and p53-dependent metabolic remodelling in cancer cells. Nature. 2013 Jan 24;493(7433):542-6.
8. Zheng Y, Cantley LC. Toward a better understanding of folate metabolism in health and disease. Journal of Experimental Medicine. 2019 Feb 4;216(2):253-66.
9. Schneider E, Ryan TJ. Gamma-glutamyl hydrolase and drug resistance. Clinica chimica acta. 2006 Dec 1;374(1-2):25-32.
10. Yao R, Rhee MS, Galivan J. Effects of gamma-glutamyl hydrolase on folyl and antifolylpolyglutamates in cultured H35 hepatoma cells. Molecular pharmacology. 1995 Sep 1;48(3):505-11.
11. Shubbar E, Helou K, Kovács A, Nemes S, Hajizadeh S, Enerbäck C, Einbeigi Z. High levels of  $\gamma$ -glutamyl hydrolase (GGH) are associated with poor prognosis and unfavorable clinical outcomes in invasive breast cancer. BMC cancer. 2013 Dec;13:1-2.
12. Melling N, Rashed M, Schroeder C, Hube-Magg C, Kluth M, Lang D, Simon R, Möller-Koop C, Steurer S, Sauter G, Jacobsen F. High-level  $\gamma$ -glutamyl-hydrolase (GGH) expression is linked to poor prognosis in ERG negative prostate cancer. International journal of molecular sciences. 2017 Jan 29;18(2):286.
13. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, Jemal A. Cancer statistics, 2023. Ca Cancer J Clin. 2023 Jan 1;73(1):17-48.

14. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*. 2022 Jan 1;12(1):31-46.
15. Katti A, Diaz BJ, Caragine CM, Sanjana NE, Dow LE. CRISPR in cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2022 May;22(5):259-79.
16. Zhang H, Qin C, An C, Zheng X, Wen S, Chen W, Liu X, Lv Z, Yang P, Xu W, Gao W. Application of the CRISPR/Cas9-based gene editing technique in basic research, diagnosis, and therapy of cancer. *Molecular Cancer*. 2021 Dec; 20:1-22.
17. Wang SW, Gao C, Zheng YM, Yi L, Lu JC, Huang XY, Cai JB, Zhang PF, Cui YH, Ke AW. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer. *Molecular cancer*. 2022 Dec;21(1):1-27.
18. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007 Mar 23;315(5819):1709-12.
19. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJ, Snijders AP, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, Van Der Oost J. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*. 2008 Aug 15;321(5891):960-4.
20. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011 Mar 31;471(7340):602-7.
21. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*. 2012 Aug 17;337(6096):816-21.
22. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *science*. 2008 Dec 19;322(5909):1843-5.
23. Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Human molecular genetics*. 2014 Sep 15;23(R1):R40-6.
24. Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF, Van Der Oost J. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2011 Jun;9(6):467-77.
25. Sánchez-Rivera FJ, Jacks T. Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. *Nature reviews cancer*. 2015 Jul;15(7):387-93.
26. Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003 Sep 1;4(9):712-20.

27. Cromie GA, Connelly JC, Leach DR. Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Molecular cell*. 2001 Dec 1;8(6):1163-74.
28. Rouet P, Smih F, Jasin M. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Molecular and cellular biology*. 1994 Dec 1;14(12):8096-106.
29. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013 Feb 15;339(6121):819-23.
30. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013 Feb 15;339(6121):823-6.
31. Zhang B. CRISPR/Cas gene therapy. *Journal of Cellular Physiology*. 2021 Apr;236(4):2459-81.
32. Matano M, Date S, Shimokawa M, Takano A, Fujii M, Ohta Y, Watanabe T, Kanai T, Sato T. Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nature medicine*. 2015 Mar;21(3):256-62.
33. Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*. 2013 Sep 12;154(6):1370-9.
34. Mansour MR, Abraham BJ, Anders L, Berezovskaya A, Gutierrez A, Durbin AD, Etchin J, Lawton L, Sallan SE, Silverman LB, Loh ML. An oncogenic super-enhancer formed through somatic mutation of a noncoding intergenic element. *Science*. 2014 Dec 12;346(6215):1373-7.
35. Ghezraoui H, Piganeau M, Renouf B, Renaud JB, Sallmyr A, Ruis B, Oh S, Tomkinson AE, Hendrickson EA, Giovannangeli C, Jasin M. Chromosomal translocations in human cells are generated by canonical nonhomologous end-joining. *Molecular cell*. 2014 Sep 18;55(6):829-42.
36. Xiao A, Wang Z, Hu Y, Wu Y, Luo Z, Yang Z, Zu Y, Li W, Huang P, Tong X, Zhu Z. Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic acids research*. 2013 Aug 1;41(14):e141-.
37. Akram F, Haq IU, Sahreen S, Nasir N, Naseem W, Imitaz M, Aqeel A. CRISPR/Cas9: A revolutionary genome editing tool for human cancers treatment. *Technology in Cancer Research & Treatment*. 2022 Oct;21:15330338221132078.
38. Chae HS, Hong ST. Overview of cancer metabolism and signaling transduction. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022 Dec 20;24(1):12.

39. Pavlova NN, Zhu J, Thompson CB. The hallmarks of cancer metabolism: Still emerging. *Cell metabolism*. 2022 Mar 1;34(3):355-77.
40. Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *The Journal of general physiology*. 1927 Mar 3;8(6):519.
41. Moldogazieva NT, Mokhosoev IM, Terentiev AA. Metabolic heterogeneity of cancer cells: an interplay between HIF-1, GLUTs, and AMPK. *Cancers*. 2020 Apr 2;12(4):862.
42. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*. 2011 May;11(5):325-37.
43. Chance B. Dynamics of respiratory pigments of ascites tumor cells. *Transactions of the New York Academy of Sciences*. 1953 Dec 1;16(2):74-5.
44. Chance B, Castor LN. Some patterns of the respiratory pigments of ascites tumors of mice. *Science*. 1952 Aug 22;116(3008):200-2.
45. Chance B, Hess B. On the control of metabolism in ascites tumor cell suspensions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1956 Mar;63(5):1008-16.
46. Chance B, Hess B. Metabolic Control Mechanisms: III. Kinetics Of Oxygen Utilization In Ascites Tumor Cells. *Journal of biological chemistry*. 1959 Sep 1;234(9):2416-20.
47. Aisenberg AC. *The glycolysis and respiration of tumors*. Academic press; 1961.
48. Wang Y, Patti GJ. The Warburg effect: a signature of mitochondrial overload. *Trends in Cell Biology*. 2023 Dec 1;33(12):1014-20.
49. Vaupel P, Multhoff G. Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *The Journal of physiology*. 2021 Mar;599(6):1745-57.
50. Locasale JW. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nature Reviews Cancer*. 2013 Aug;13(8):572-83.
51. Li P, Wu G. Roles of dietary glycine, proline, and hydroxyproline in collagen synthesis and animal growth. *Amino acids*. 2018 Jan;50:29-38.
52. Heylen E, Verstraete P, Van Aerschot L, Geeraerts SL, Venken T, Timcheva K, Nittner D, Verbeeck J, Royaert J, Gijbels M, Uyttebroeck A. Transcription factor NKX2-1 drives serine and glycine synthesis addiction in cancer. *British journal of cancer*. 2023 May 11;128(10):1862-78.
53. Pan S, Fan M, Liu Z, Li X, Wang H. Serine, glycine and one-carbon metabolism in cancer. *International Journal of Oncology*. 2021 Feb 1;58(2):158-70.

54. Lan X, Field MS, Stover PJ. Cell cycle regulation of folate-mediated one-carbon metabolism. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2018 Nov;10(6):e1426.
55. Said HM, Trebble T. Intestinal digestion and absorption of micronutrients. *Slesenger and Fordtran GI and Liver Disease*; Feldman M, Friedman L, and Brandt L, editors. 2015:1765-88.
56. Geeraerts SL, Heylen E, De Keersmaecker K, Kampen KR. The ins and outs of serine and glycine metabolism in cancer. *Nature metabolism*. 2021 Feb;3(2):131-41.
57. Kampen KR, Fancello L, Girardi T, Rinaldi G, Planque M, Sulima SO, Loayza-Puch F, Verbelen B, Vereecke S, Verbeeck J, Op de Beeck J. Translatome analysis reveals altered serine and glycine metabolism in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Nature Communications*. 2019 Jun 11;10(1):2542.
58. Newman AC, Maddocks OD. One-carbon metabolism in cancer. *British journal of cancer*. 2017 Jun;116(12):1499-504.
59. Yao R, Schneider E, Ryan TJ, Galivan J. Human gamma-glutamyl hydrolase: cloning and characterization of the enzyme expressed in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996 Sep 17;93(19):10134-8.
60. McGuire JJ. Pteroylpolyglutamates: biosynthesis, degradation, and function. *Folates and pterins*. 1984;1:135-90.
61. Samuels LL, Goutas LJ, Priest DG, Piper JR, Sirotnak FM. Hydrolytic cleavage of methotrexate  $\gamma$ -polyglutamates by folylpolyglutamyl hydrolase derived from various tumors and normal tissues of the mouse. *Cancer research*. 1986 May 1;46(5):2230-5.
62. Wang Y, Nimec Z, Ryan TJ, Dias JA, Galivan J. The properties of the secreted  $\gamma$ -glutamyl hydrolases from H35 hepatoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1993 Aug 7;1164(3):227-35.
63. Rhee MS, Ryan TJ, Galivan JH. Glutamyl hydrolase secreted from human tumour cell lines. *Cell Pharmacol*. 1995;2:289-92.
64. Yao R, Nimec Z, Ryan TJ, Galivan J. Identification, Cloning, and Sequencing of a cDNA Coding for Rat-Glutamyl Hydrolase (\*). *Journal of Biological Chemistry*. 1996 Apr 12;271(15):8525-8.
65. Yao R, Schneider E, Ryan TJ, Galivan J. Human gamma-glutamyl hydrolase: cloning and characterization of the enzyme expressed in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996 Sep 17;93(19):10134-8.
66. Galivan J, Ryan TJ, Chave K, Rhee M, Yao R, Yin D. Glutamyl hydrolase: pharmacological role and enzymatic characterization. *Pharmacology & therapeutics*. 2000 Mar 1;85(3):207-15.

67. Schneider E, Ryan TJ. Gamma-glutamyl hydrolase and drug resistance. *Clin Chim Acta*. 2006 Dec;374(1-2):25-32.
68. Maagdenberg H, Oosterom N, Zanen J, Gemmati D, Windsor RE, Heil SG, Esperon P, Jabeen S, Ruiz-Argüelles GJ, Zolk O, Hoerning S. Genetic variants associated with methotrexate-induced mucositis in cancer treatment: a systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2021 May 1;161:103312.
69. León Z, García-Cañaveras JC, Donato MT, Lahoz A. Mammalian cell metabolomics: experimental design and sample preparation. *Electrophoresis*. 2013 Oct;34(19):2762-75.
70. Artati A, Prehn C, Adamski J. LC-MS/MS-based metabolomics for cell cultures. *Cell-Based Assays Using iPSCs for Drug Development and Testing*. 2019:119-30.
71. Alseekh S, Aharoni A, Brotman Y, Contrepois K, D'Auria J, Ewald J, C. Ewald J, Fraser PD, Giavalisco P, Hall RD, Heinemann M. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. *Nature methods*. 2021 Jul;18(7):747-56.
72. Gorrochategui E, Jaumot J, Lacorte S, Tauler R. Data analysis strategies for targeted and untargeted LC-MS metabolomic studies: Overview and workflow. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016 Sep 1;82:425-42.
73. Lu W, Bennett BD, Rabinowitz JD. Analytical strategies for LC-MS-based targeted metabolomics. *Journal of chromatography B*. 2008 Aug 15;871(2):236-42.
74. Zeki ÖC, Eylem CC, Reçber T, Kır S, Nemutlu E. Integration of GC-MS and LC-MS for untargeted metabolomics profiling. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2020 Oct 25;190:113509.
75. [chromeextension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://media.addgene.org/cms/files/Zhang\\_lab\\_LentiCRISPR\\_library\\_protocol.pdf](https://media.addgene.org/cms/files/Zhang_lab_LentiCRISPR_library_protocol.pdf)
76. <https://www.proteinatlas.org/>
77. Chen J, Na R, Xiao C, Wang X, Wang Y, Yan D, Song G, Liu X, Chen J, Lu H, Chen C. The loss of SHMT2 mediates 5-fluorouracil chemoresistance in colorectal cancer by upregulating autophagy. *Oncogene*. 2021 Jun 10;40(23):3974-88.
78. Melling N, Rashed M, Schroeder C, Hube-Magg C, Kluth M, Lang D, Simon R, Möller-Koop C, Steurer S, Sauter G, Jacobsen F. High-level  $\gamma$ -glutamyl-hydrolase (GGH) expression is linked to poor prognosis in ERG negative prostate cancer. *International journal of molecular sciences*. 2017 Jan 29;18(2):286.
79. Shubbar E, Helou K, Kovács A, Nemes S, Hajizadeh S, Enerbäck C, Einbeigi Z. High levels of  $\gamma$ -glutamyl hydrolase (GGH) are associated with poor

- prognosis and unfavorable clinical outcomes in invasive breast cancer. *BMC cancer*. 2013 Dec;13:1-2.
80. Odin E, Wettergren Y, Nilsson S, Willén R, Carlsson G, Spears CP, Larsson L, Gustavsson B. Altered gene expression of folate enzymes in adjacent mucosa is associated with outcome of colorectal cancer patients. *Clinical cancer research*. 2003 Dec 1;9(16):6012-9.
  81. He P, Varticovski L, Bowman ED, Fukuoka J, Welsh JA, Miura K, Jen J, Gabrielson E, Brambilla E, Travis WD, Harris CC. Identification of carboxypeptidase E and  $\gamma$ -glutamyl hydrolase as biomarkers for pulmonary neuroendocrine tumors by cDNA microarray. *Human pathology*. 2004 Oct 1;35(10):1196-209.
  82. Pollard C, Nitz M, Baras A, Williams P, Moskaluk C, Theodorescu D. Genoproteomic mining of urothelial cancer suggests  $\gamma$ -glutamyl hydrolase and diazepam-binding inhibitor as putative urinary markers of outcome after chemotherapy. *The American journal of pathology*. 2009 Nov 1;175(5):1824-30.
  83. Odin E, Wettergren Y, Nilsson S, Willén R, Carlsson G, Spears CP, Larsson L, Gustavsson B. Altered gene expression of folate enzymes in adjacent mucosa is associated with outcome of colorectal cancer patients. *Clinical cancer research*. 2003 Dec 1;9(16):6012-9.
  84. Tajan M, Hennequart M, Cheung EC, Zani F, Hock AK, Legrave N, Maddocks OD, Ridgway RA, Athineos D, Suárez-Bonnet A, Ludwig RL. Serine synthesis pathway inhibition cooperates with dietary serine and glycine limitation for cancer therapy. *Nature communications*. 2021 Jan 14;12(1):366.
  85. Labuschagne CF, Van Den Broek NJ, Mackay GM, Vousden KH, Maddocks OD. Serine, but not glycine, supports one-carbon metabolism and proliferation of cancer cells. *Cell reports*. 2014 May 22;7(4):1248-58.
  86. Gravel SP, Hulea L, Toban N, Birman E, Blouin MJ, Zakikhani M, Zhao Y, Topisirovic I, St-Pierre J, Pollak M. Serine deprivation enhances antineoplastic activity of biguanides. *Cancer research*. 2014 Dec 15;74(24):7521-33.
  87. Banh RS, Biancur DE, Yamamoto K, Sohn AS, Walters B, Kuljanin M, Gikandi A, Wang H, Mancias JD, Schneider RJ, Pacold ME. Neurons release serine to support mRNA translation in pancreatic cancer. *Cell*. 2020 Nov 25;183(5):1202-18.
  88. Ma M, Ma C, Li P, Ma C, Ping F, Li W, Xu L, Zhang H, Sun Q, Li Y. Low glucose enhanced metformin's inhibitory effect on pancreatic cancer cells by suppressing glycolysis and inducing energy stress via up-regulation of miR-210-5p. *Cell cycle*. 2020 Sep 1;19(17):2168-81.

89. Çetiner BG, Terzi MY. Effect of glucose starvation on cell viability parameters in A549 and BEAS-2B cell lines. *Cytology and Genetics*. 2022 Jan;56(1):66-76.
90. Yucel B, Kara SA, Cekmen MB, Ada S, Tan BD. STAT3 mediated regulation of glucose metabolism in leukemia cells. *Gene*. 2022 Jan 30;809:146012.
91. Locasale JW, Grassian AR, Melman T, Lyssiotis CA, Mattaini KR, Bass AJ, Heffron G, Metallo CM, Muranen T, Sharfi H, Sasaki AT. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nature genetics*. 2011 Sep;43(9):869-74.
92. Chen J, Chung F, Yang G, Pu M, Gao H, Jiang W, Yin H, Capka V, Kasibhatla S, Laffitte B, Jaeger S. Phosphoglycerate dehydrogenase is dispensable for breast tumor maintenance and growth. *Oncotarget*. 2013 Dec;4(12):2502.
93. Pacold ME, Brimacombe KR, Chan SH, Rohde JM, Lewis CA, Swier LJ, Possemato R, Chen WW, Sullivan LB, Fiske BP, Cho S. A PHGDH inhibitor reveals coordination of serine synthesis and one-carbon unit fate. *Nature chemical biology*. 2016 Jun;12(6):452-8.
94. Diehl FF, Lewis CA, Fiske BP, Vander Heiden MG. Cellular redox state constrains serine synthesis and nucleotide production to impact cell proliferation. *Nature metabolism*. 2019 Sep;1(9):861-7.
95. Zhu J, Ma J, Wang X, Ma T, Zhang S, Wang W, Zhou X, Shi J. High Expression of PHGDH Predicts Poor Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer. *Translational Oncology*. 2016 Dec 1;9(6):592-9.
96. Davis, J.L., Fallon, H.J. and Morris, H.P., 1970. Two enzymes of serine metabolism in rat liver and hepatomas. *Cancer research*, 30(12), pp.2917-2920.
97. Snell K. Enzymes of serine metabolism in normal, developing and neoplastic rat tissues. *Advances in enzyme regulation*. 1984 Jan 1;22:325-400.
98. Snell K, Weber G. Enzymic imbalance in serine metabolism in rat hepatomas. *Biochemical Journal*. 1986 Jan 1;233(2):617.
99. Samanta D, Park Y, Andrabi SA, Shelton LM, Gilkes DM, Semenza GL. Correction: PHGDH Expression Is Required for Mitochondrial Redox Homeostasis, Breast Cancer Stem Cell Maintenance, and Lung Metastasis. *Cancer Research*. 2022 Mar 15;82(6):1153-.
100. Fan J, Teng X, Liu L, Mattaini KR, Looper RE, Vander Heiden MG, Rabinowitz JD. Human phosphoglycerate dehydrogenase produces the oncometabolite D-2-hydroxyglutarate. *ACS chemical biology*. 2015 Feb 20;10(2):510-6.
101. Marcon E, Ni Z, Pu S, Turinsky AL, Trimble SS, Olsen JB, Silverman-Gavrila R, Silverman-Gavrila L, Phanse S, Guo H, Zhong G. Human-

- chromatin-related protein interactions identify a demethylase complex required for chromosome segregation. *Cell reports*. 2014 Jul 10;8(1):297-310.
102. Huttlin EL, Bruckner RJ, Navarrete-Perea J, Cannon JR, Baltier K, Gebreab F, Gygi MP, Thornock A, Zarraga G, Tam S, Szpyt J. Dual proteome-scale networks reveal cell-specific remodeling of the human interactome. *Cell*. 2021 May 27;184(11):3022-40.
  103. <https://stringdb.org/cgi/network?taskId=bquNBGQ9wKLK&sessionId=bk8RIOjDIQ9B>
  104. Wang S, Chen Y, Fang H, Xu Y, Ding M, Ma C, Lin Y, Cui Z, Sun H, Niu Q, Sun S. A  $\gamma$ -glutamyl hydrolase lacking the signal peptide confers susceptibility to folates/antifolates in acute lymphoblastic leukemia cells. *FEBS letters*. 2022 Feb;596(4):437-48.
  105. Ouyang Z, Huang J, Ren Y, Li H, Ding Y, Zhang K, Jiang L, Yu P. Studies on the intracellular accumulation process of methotrexate and its correlation with the key protein using an LC-MS/MS method: a novel way to realize prospective individualized medication. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2021 Mar;413:1799-807.
  106. Rhee MS, Wang Y, Nair MG, Galivan J. Acquisition of resistance to antifolates caused by enhanced  $\gamma$ -glutamyl hydrolase activity. *Cancer Research*. 1993 May 15;53(10):2227-30.
  107. Li WW, Waltham M, Tong W, Schweitzer BI, Bertino JR. Increased activity of  $\gamma$ -glutamyl hydrolase in human sarcoma cell lines: a novel mechanism of intrinsic resistance to methotrexate (MTX). *Chemistry and biology of pteridines and folates*. 1993:635-8.
  108. Kim SE, Cole PD, Cho RC, Ly A, Ishiguro L, Sohn KJ, Croxford R, Kamen BA, Kim YI.  $\gamma$ -Glutamyl hydrolase modulation and folate influence chemosensitivity of cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *British journal of cancer*. 2013 Oct;109(8):2175-88.
  109. Gao X, Lee K, Reid MA, Sanderson SM, Qiu C, Li S, Liu J, Locasale JW. Serine availability influences mitochondrial dynamics and function through lipid metabolism. *Cell reports*. 2018 Mar 27;22(13):3507-20.
  110. Ye J, Mancuso A, Tong X, Ward PS, Fan J, Rabinowitz JD, Thompson CB. Pyruvate kinase M2 promotes de novo serine synthesis to sustain mTORC1 activity and cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012 May 1;109(18):6904-9.
  111. Maddocks OD, Athineos D, Cheung EC, Lee P, Zhang T, Van Den Broek NJ, Mackay GM, Labuschagne CF, Gay D, Kruiswijk F, Blagih J. Modulating the therapeutic response of tumours to dietary serine and glycine starvation. *Nature*. 2017 Apr 20;544(7650):372-6.

112. Maddocks OD, Labuschagne CF, Adams PD, Vousden KH. Serine metabolism supports the methionine cycle and DNA/RNA methylation through de novo ATP synthesis in cancer cells. *Molecular cell*. 2016 Jan 21;61(2):210-21.
113. Zhou X, He L, Wu C, Zhang Y, Wu X, Yin Y. Serine alleviates oxidative stress via supporting glutathione synthesis and methionine cycle in mice. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2017 Nov;61(11):1700262.