ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

6-FOSFOGLUKONAT DEHİDROGENAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNDE BAZI FLAVON VE FLAVONOLLERİN İN VİTRO VE İN SİLİCO ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mesut AYDIN

KİMYA ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2021

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Mesut AYDIN tarafından hazırlanan **"6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Üzerinde Bazı Flavon ve Flavonollerin in Vitro ve İn Silico Etkilerinin Araştırılması"** adlı tez çalışması 10/09/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman **:** Doç. Dr. Şevki ADEM

Jüri Üyeleri **:**

Başkan **:** Doç. Dr. Volkan EYÜPOĞLU
Kimya Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye **:** Dr. Öğr. Üyesi Ümit YIRTICI
Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı
Kırıkkale Üniversitesi

Üye **:** Doç. Dr. Şevki ADEM
Kimya Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**6-Fosfoglukonat Dehidrogenaz Enzim Aktivitesi Üzerinde Bazı Flavon ve Flavonollerin İn Vitro ve İn Silico Etkilerinin Araştırılması**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (10/09/2021).

Mesut AYDIN

Bu çalışma Çankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FF111115L34 numaralı proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

6-FOSFOGLUKONAT DEHİDROGENAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNDE BAZI FLAVON VE FLAVONOLLERİN İN VİTRO VE İN SİLİCO ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mesut AYDIN

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Şevki ADEM

6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD), oksidatif metabolik yolların ikinci adımını katalize eden pentoz fosfat yolunda önemli bir enzimdir önemlidir. 6PGD kanser tedavisi için yeni hedef enzimler arsındadır. Onun inhibisyonu kanserle mücadeleye yardımcı olabilir. Bu tez kapsamında, 6PGD enzim aktivitesi üzerine de bazı flavon ve flavonollerin etkileriin araştırlması amaçlanmıştır. Flavon sınıfı bileşiklerden Apigenin, Apiin, Baicalein, Baicalin ve Luteolin ile flovanol grubu bileşiklerden Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Fisetin, Galangin ve Morinin in vitro ve in silico etkileri test edilmiştir. İn vitro sonuçlardan elde edilen IC50 değerleri 9,7-99 μM aralığındadır. Enzim-ligand etkileşimlerini moleküler seviyede belirlemek için AutoDock Vina ve Molegro Virtual Docker MVD 2019.7.0 programları kullanılarak doking çalışması yapıldı. Hidrojen bağlarının ve hidrofobik etkileşmelerin Ligand-protein bağlanmasında etkili olduğu gözlemlendi. Benzen yapılarının hidrofobik etkileşmelerde görev aldığı tespit edilmiştir. İn vitro ve in silico çalışmalar değerlendirildiğinde bu moleküllerin enzimin inhibitörlerinin belirlemesinde önemli rol oynayacağı düşünülmektedir.

2021, 44 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, Flavon, Flovanol, Moleküler Docking, İnhibisyon

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION OF THE IN VITRO AND IN SILICO EFFECTS OF CERTAIN FLAVONES AND FLAVONOLS ON THE ENZYME ACTIVITY OF 6-PHOSPHOGLUCONATE DEHYDROGENASE

Mesut AYDIN

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Şevki ADEM

6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) is an important enzyme in the pentose phosphate pathway that catalyzes the second step of oxidative metabolic pathways. 6PGD is among the new target enzymes for cancer therapy. Its inhibition may help fight cancer. In this thesis, it is aimed to investigate the effects of some flavones and flavonols on 6PGD enzyme activity. In vitro and in silico effects of Apigenin, Apiin, Baicalein, Baicalin and Luteolin from flavone class compounds and Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Fisetin, Galangin and Morin from flovanol group compounds were tested. IC50 values obtained from in vitro results are in the range of 9,7-99 μM. In order to determine the enzyme-ligand interactions at the molecular level, a docking study was performed using AutoDock Vina and Molegro Virtual Docker MVD 2019.7.0 programs. It was observed that hydrogen bonds and hydrophobic interactions are effective in ligand-protein binding. It has been determined that benzene structures are involved in hydrophobic interactions. When in vitro and in silico studies are evaluated, it is thought that these molecules will play an important role in the determination of enzyme inhibitors.

2021, 44 pages

Keywords: 6-Phosphogluconate dehydrogenase (6PGD), Flavon**,** Flovanol, Molecular Docking, Inhibisyon

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Şevki ADEM'e, tez jürisinde yer alarak değerli katkılarını sunan Sayın Doç. Dr. Volkan EYÜPOĞLU'na ve Dr. Öğr. Üyesi Ümit YIRTICI'ya, değerli arkadaşlarım Mehmet Ali DEMİRCİ'ye ve Çağlar GÜLER'e, beni büyük bir sabır ve özveri ile destekleyen eşim Yağmur AYDIN'a, sevgili kızım Zeynep AYDIN'a, yaşamım boyunca maddi-manevi hep yanımda olan başta babam Fazıl AYDIN'a, annem Neziha AYDIN'a, kardeşim Tuğba Nur AYDIN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Mesut AYDIN
Çankırı, Eylül 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **i**
İÇİNDEKİLER ..... **ii**
SİMGELER DİZİNİ ..... **v**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vı**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vi**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **vi**
1. GİRİŞ **1**
1.1 PGD'ye Tarihsel Yaklaşım **3**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **6**
2.1 6PGD'nin Yapısal Özellikleri **6**
2.2 Kanser İlerlemesinde 6PGD'nin Rolü **6**
2.3 6PGD Hiperaktivasyonu Yoluyla Tümör Başlatma ve Metastatik Dönüşümler **9**
2.4 Kanser İçin Potansiyel Terapötik İlaç Hedefi Olarak 6PGD **10**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **15**
3.1 Materyal **15**
3.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler **15**
3.2 Yöntemler **17**
3.2.1 İnsan kanından 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin saflaştırılması **17**
3.3 Enzim Aktivitesinin Ölçümü **19**
3.4 Enzim İnhibisyon Çalışmaları **18**
3.5 Moleküler Docking Çalışmaları **20**
4. BULGULAR **21**
5. SONUÇ VE ÖNERİLER **34**
KAYNAKLAR **38**
ÖZGEÇMİŞ **44**

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
±	Artı-Eski
°C	Santigrat derece
Å	Bağ uzunluğu
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromol

KISALTMALAR DİZİNİ

Cu	Bakır
Dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DOPA	3,4-Dihidroksi-L-fenilalanin
g	Gram
HK	Hidrokinon
IC50	Aktivitenin %50'sini inhibe eden konsantrasyon değeri
kg	Kilogram
L1	Ligand 1
m^2	Metrekare
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
ng	Nanogram
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 6PGD çalışmasındaki önemli olayların zaman çizelgesi 3
Şekil 2.1 2007'den beri 6PGD ile ilgili yayınlar 7
Şekil 2.2 Farklı kanserlerde 6PGD'nin aşırı ekspresyonu 8
Şekil 2.3 6PGD'nin genetik inhibitörleri, 6PGD'nin aşırı ekspresyonunu ve aktivitesini bloke ederek metastazın inhibisyonu, hücresel büyüme ve lipogenez ve kanser hücrelerinde yaşlanmanın indüklenmesi ile sonuçlanır 9
Şekil 2.4 Physcion 2 boyutlu yapısı 14
Şekil 4.1 6PGD Yapısı ve Docking Bölgesi 22
Şekil 4.2 NADPH'ın 6PGD aktif bölgesinde etkileşime girdiği amino asitler ve etkileşim modelleri 22
Şekil 4.3 6PGD enzimi üzerine Baicalin bileşiğinin % aktivite – [I] grafiği 23
Şekil 4.4 Baicalinin, 6PGD'nin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası 23
Şekil 4.5 6PGD enzimi üzerine Baicalein bileşiğinin % aktivite – [I] grafiği 24
Şekil 4.6 Baicalein 6PGDnin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası 24
Şekil 4.7 6PGD enzimi üzerine Apiin bileşiğinin % aktivite – [I] grafiği 25
Şekil 4.8 Apiinin 6PGDnin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası 25
Şekil 4.9 6PGD enzimi üzerine Apigenin bileşiğinin % aktivite – [I] grafiği 26
Şekil 4. 10 Apigenin 6PGDnin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası 26
Şekil 4.11 PGD enzimi üzerine Luteolin bileşiğinin % aktivite – [I] grafiği 27
Şekil 4.12 Luteolin 6PGDnin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası 27
Şekil 4.13 6PGD enzimi üzerine Kamepferol bileşiğinin % aktivite – [I] grafiği 28
Şekil 4.14 Kaempferol 6PGDnin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası 28
Şekil 4.15 6PGD enzimi üzerine Fisetin bileşiğinin % aktivite – [I] grafiği 29
Şekil 4.16 Fisetin 6PGDnin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası 29
Şekil 4.17 PGD enzimi üzerine Galangin bileşiğinin % aktivite – [I] grafiği 30
Şekil 4.18 Galangin 6PGDnin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası 30
Şekil 4.19 6PGD enzimi üzerine Ouercetin bileşiğinin % aktivite – [I] grafiği 31
Şekil 4.20 Quercetin 6PGDnin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası 31
Şekil 4.21 6PGD enzimi üzerine Myrecetin bileşiğinin % aktivite – [I] grafiği 32
Şekil 4.22 Myricetin 6PGDnin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası 32
Şekil 4.23 6PGD enzimi üzerine Morin bileşiğinin % aktivite – [I] 33
Şekil 4.24 Morin 6PGDnin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası 33

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 6PGD enziminin aktivite ölçüm protokolü 19
Çizelge 4.1 Bazı flavon ve flovanolların insan eritrosit 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerinde etkileri 21

1. GİRİŞ

Kanser genetik mutasyonlar, epigenetik modifikasyonlar, anormal enzimatik makineler ve hatalı sinyal yollarıyla karakterize çok yönlü hiperproliferatif bir hastalıktır (Kumar *et al.* 2015, Vander Heiden and DeBerardinis 2017). Kanser, 2018 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde günlük bazda yaklaşık 1.670 ölümle son yıllarda başlıca sağlık sorunu ve ölümlerin ikinci önde gelen nedeni olarak ortaya çıkmıştır. Hastalığın önümüzdeki yıllarda artması beklenmektedir (Miller *et al.* 2018).

Karmaşık kanser biyolojisi kataloğu, genellikle kanserin ayırt edici özellikleri olarak bilinen altı anahtar fizyolojik değişiklikle özetlenebilir (Hanahan and Weinberg 2000, 2011). Dirençli hücresel apoptoz, metabolik yeniden düzenleme, anjiyogenez indüksiyonu, büyüme karşıtı sinyallerden kaçış, sınırsız replikasyon kapasitesi ve invazyon ve metastaz başlatma, kanserli hücrelerin kazanılmış özelliklerini temsil eder (Fouad and Aanei 2017, Sarfraz *et al.* 2018). Bu altı biyolojik yetenek, kanser hücrelerinin kendi kaderlerinin efendisi olmasını sağlar.

Son zamanlarda, metabolik yeniden düzenlemenin kanserin ortaya çıkan ayırt edici özelliği olduğu bildirilmiştir (Pavlova and Thompson 2016). Yeniden düzenlenmiş metabolizma, çoklu metabolik ve sinyal yollarındaki adaptasyonlarla elde edilen yukarı doğru düzenlenmiş metabolik akışı ifade eder (DeBerardinis and Chandel 2016, Miao *et al.* 2013). Bu değişmiş metabolik profilin temel özelliklerinden biri, kanser hücrelerinin enerjik olarak daha uygun oksidatif fosforilasyon yerine glikolitik yola bağımlı olmasıdır (Liberti and Locasale 2016). Buradaki asıl mesele, kanser hücrelerinin neden enerjik olarak daha az verimli olan bu yolları benimsemesidir? Metabolik yolların karmaşıklığı göz önüne alındığında, bu yeniden programlanmış yolların, yalnızca enerji (ATP) değil, aynı zamanda makromolekül sentezi için yapısal birimler (amino asitler, nükleotidler ve şekerler), redoks düzenleyicileri (NADPH) ve indirgeme güçleri. sağlayarak kanser hücrelerinin habis davranışlarını birlikte yönlendirdiği açıktır (Hitosugi *et al.* 2012, Molavian *et al.* 2016). Bu biyosentetik ara maddelerin kanser hücrelerinin çoğalmasını hızlandırması gerekliliği, kanserli hücrelerin neden artan glikoz alımıyla doğru orantılı dalgalandığını açıklayabilir. Tümörlerin bu talepleri,

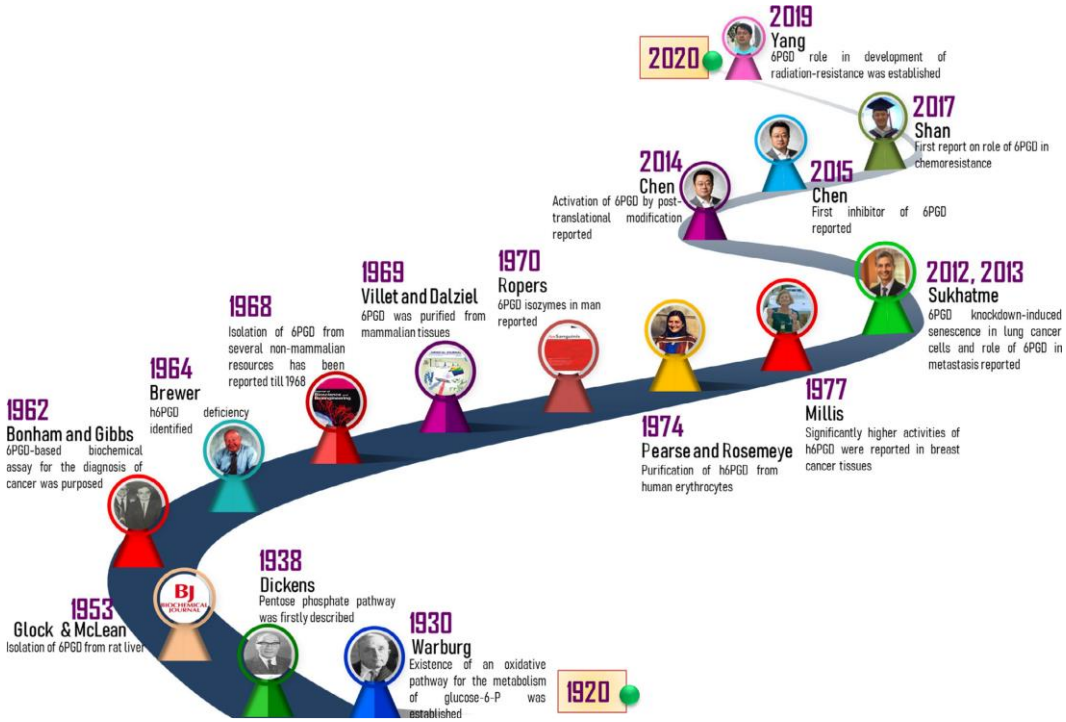
çekirdek glikolitik basamaklarından dallanan çeşitli yollarla karşılanır (Patra and Hay 2014). 20'den fazla karbonhidrat, amino asit ve lipid metabolizması yolunun kanser hücrelerinde aşırı eksprese olduğu bildirilmiştir (Poliakov *et al.* 2014).

Pentoz fosfat yolu (PPP), ilk adımda glikolitik basamaktan ayrılır. PPP yolu, kanser hücreleri için ana NADPH kaynağı ve yapısal birimler olarak hizmet eder (Cho *et al.* 2018). Çok sayıda kanıt, metabolik ve ROS aracılı stresli koşullar altında kanser hücrelerinin hayatta kalmasında NADPH homeostazının anahtar rolünü desteklemektedir. Bu nedenle, ROS kaynaklı oksidatif stresli kanser hücrelerinde NADPH homeostazının yeniden sarmalanması, kanser terapötiklerinde önemli bir yaklaşımdır (Jones and Schulze 2012, Vučetić *et al.* 2017).

6-Fosfoglukonat dehidrojenaz (6PGD), PPP'nin üçüncü adımında 6-fosfoglukonatın (6-PG) ribuloz 5-fosfata (R-5-P) dönüşümünü katalize ederek nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) üretir (Hanau *et al.* 2010). 6PGD'nin yukarı regülasyonu, birçok insan kanserinde rapor edilmiştir (Lin *et al.* 2015). Bu nedenle, 6PGD'yi hedeflemek, kanser gibi ölümcül hastalıklarla savaşmak için cazip bir yol olarak hizmet edebilir.

1.1 6PGD'ye Tarihsel Yaklaşım

Bu bölüm, 1920'den günümüze 6PGD çalışmasında tarihsel perspektiflere ve kilometre taşlarına ışık tutmayı amaçlamaktadır Veriler, son 100 yılda 6PGD'nin kanserdeki rolüne ilişkin mevcut anlayışa ilişkin görüşlerimizi şekillendiren bilimsel araştırmalardan derlenmiştir (Şekil 1.1)



Şekil 1.1 6PGD çalışmasındaki önemli olayların zaman çizelgesi

Tümör metabolizması üzerine modern kanser araştırmalarının hikayesi, 19. yüzyılın başlarından itibaren Otto Warburg'un normal ve tümör hücrelerinin glikoz metabolizmasındaki farklılıklar hakkında çığır açan gözlemleriyle başladı (Otto 2016). Warburg, artan glikoz alımını ve aşırı eksprese edilen glikolitik yolu kanser hücrelerinin temel özellikleri olarak varsaydı. 1930'larda Warburg, glikolitik basamağa ek olarak glikoz 6-fosfatın (G6P) metabolizması için başka bir oksidatif yolun varlığını keşfetti. Bu mekanizmayı destekleyen temel kanıt, G6P'nin oksidasyonu için $NADP^+$, daha sonra PPP'nin ilk adımı olarak rapor edildi (Stincone *et al.* 2015). Bununla birlikte, 1950'lerde, PPP'yi tamamen açıklayan Dickens ve Lipmann'ın merkezi çalışmasıydı

(Dickens and Glock 1951) ve PPP'nin ilk tam taslağı 1955'te sunuldu (Gunsalus *et al.* 1955). Bu çalışmalar kuşkusuz gelecekte ortaya çıkan tümör metabolizması eğilimleri için temel oluşturdu. Bununla birlikte, neredeyse yarım asır, kanserin ortaya çıkan ayırt edici özelliği olarak tümör metabolizmasının başlamasından önce geçti. 1962'de Bonham ve Gibbs, rahim ağzı kanserinin erken teşhisi için 6PGD tabanlı biyokimyasal tahlil hakkında bir ön rapor yayınladı. Bununla birlikte, testin duyarlılığı ve özgüllüğü, birkaç araştırmacı tarafından sorgulandı ve 1967 de modifiye edilmesine yol açtı (Sanner *et al.* 1967) 1968'e kadar, 6PGD'nin bira mayası, Escherichia coli, Candida utilis gibi çeşitli memeli olmayan kaynaklardan izolasyonunun yapıldığı bildirilmiştir (Ohara *et al.* 2004).

1964 yılında bir kadın hastada glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) eksikliği ile şizofreni arasındaki ilişki araştırılırken, başka bir eritrositik enzim olan 6PGD'de eksiklik tespit edilmiştir (Brewer and Dern 1964). Daha sonra bu hastalarda son derece nadir enzimopati olduğu ve sadece hafif hemoliz ile ilişkili olduğu bulundu (Corrons *et al.* 1996)

1953 yılında sıçan karaciğerinden 6PGD izolasyonu bildirilmiş olmasına rağmen (Glock and McLean 1953) ancak 6PGD ilk olarak 1969 yılında Villet ve Dalziel tarafından memeli dokularından koyun karaciğerinden saflaştırılmıştır (Villet and Dalziel 1969). 1977'de, yüksek derecede metastatik dereceli 3. evre meme kanseri dokularında 6PGD aktivitelerinde kademeli bir artış gözlendi (Deshpande *et al.* 1977). 6PGD'nin kanserin gelişimi ve ilerlemesindeki rolü, akciğer kanseri hücrelerinde p53 aracılı yaşlanma indüksiyonunun düzenlenmesinde 6PGD'nin rolünün keşfinden sonra 20. yüzyılın ikinci on yılında ortaya çıktı (Sukhatme and Chan 2012). 6PGD'nin K76 ve K294'te asetilasyon ile ilk translasyon sonrası modifikasyonu 2014'te tanımlanırken, (Shan *et al.* 2014) daha sonra 2019'da 6PGD'nin tirozin 481'de (Liu *et al.* 2019) fosforilasyonu ve m6A olarak bilinen 6PGD mRNA'nın transkripsiyon sonrası modifikasyonu rapor edildi (Sheng *et al.* 2020). Bu modifikasyonlar, 6PGD'nin ekspresyonunu, aktivitesini ve mRNA çevirisini teşvik ederek düzenlenmesinden sorumludur. İlginç bir şekilde 2015 yılında, ilk 6PGD inhibitörü, physcion ve türevi S3 tanımlanmış ve herhangi bir belirgin toksisite olmaksızın kanser ksenogreftlerinde tümör büyümesine karşı potansiyele sahip

olduğu rapor edilmiştir (Lin *et al.* 2015). 2017 yılında, 6PGD'nin ilk olarak akciğer ve yumurtalık kanserinde sisplatin direncinin gelişiminde rol oynadığı bildirildi (Zheng *et al.* 2017) ve daha sonra diğer çalışmalar, 6PGD'nin kemo-ilaçlara karşı direnç gelişiminde rol oynadığını gösterdi (Chen *et al.* 2019). Araştırmacılar son zamanlarda 6PGD'nin beyin kanseri hücrelerinde radyasyon direncini de desteklediğini araştırdı ve sundu (Liu *et al.* 2019). Bu tarihin yörüngesinden, 6PGD'nin, bu alanda daha fazla sömürü ve gelecekteki keşifler yoluyla kanser için yeni terapötik ilaç hedefine doğru gelişebileceğini tahmin ediyoruz.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

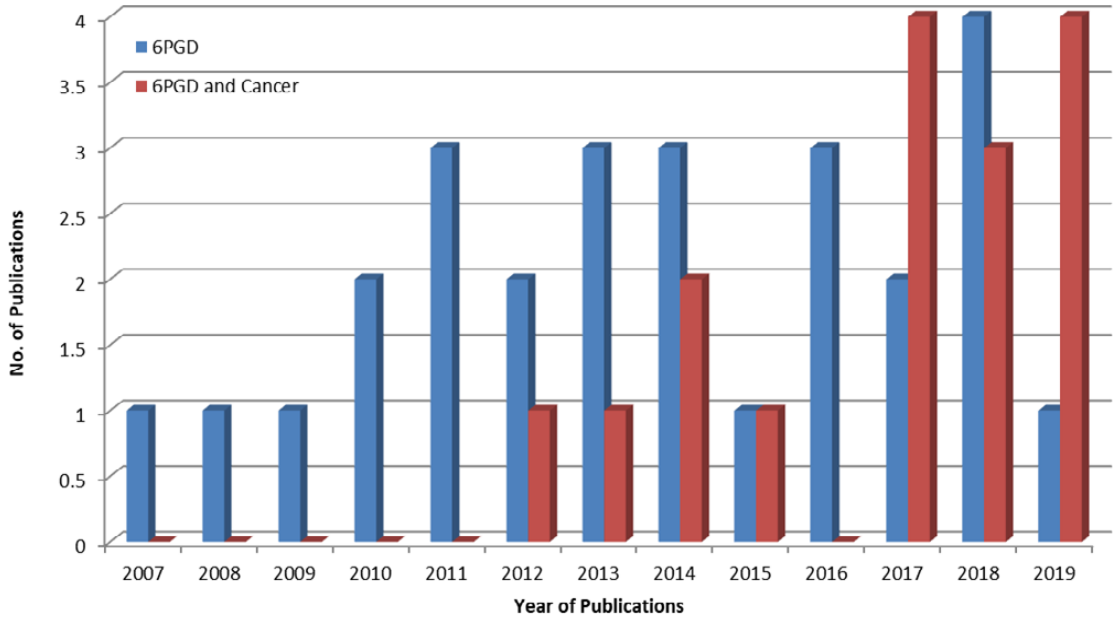
2.1 6PGD'nin Yapısal Özellikleri

6PGD, monomerleri birbirinden bağımsız olarak hareket eden bir homodimer proteinidir. Her monomer, büyük alfa-sarmal alandan oluşurken, altı iplikli bir beta yaprağı oluşturan küçük beta-alfa-beta alanından oluşur. Enzimin NADP'ye bağımlı olduğu bildirilmektedir (Trivizaki *et al.* 2010). NADP bağlanma bölgesi, küçük alanın bir yarığındayken, substrat bağlanma bölgesi, bitişik bir cepte bulunur. Genetik kanıtlar, kromozom 1p üzerindeki 6PGD geninin lokusunu belirtir (Bravard *et al.* 1991). Hücresel fraksiyonasyon çalışmaları, 6PGD geni tarafından kodlanan enzimin neredeyse tamamen sitozoldeki yerini göstermiştir (Toews *et al.* 1976). 6PGD proteini, E. coli'de 468 kalıntı ve koyunlarda 482 kalıntıdan oluşurken, 88 kalıntının neredeyse tüm dizilerde korunduğu bulunmuştur (Adams *et al.* 1994).

İnsan dokularından, 6PGD önce eritrositlerden izole edildi, ardından granülositlerden ve ardından insan beyninden saflaştırıldı (Rosemeyer 1987). h6PGD'nin tam uzunluktaki klonu, 483 amino asit uzunluğunda stop kodonları içermeyen dna dizisini şekillendirir. Koyun 6PGD ve h6PGD'nin hizalanmış amino asit dizileri, proteinler arasında %94.2 özdeşlik sergiler. h6PGD'nin molekül ağırlığı 53,149 Da olarak rapor edilmiştir. h6PGD'nin ikincil yapısı %36 alfa sarmalını, %9 beta yaprağını kapsar (Tsui *et al.* 1996).

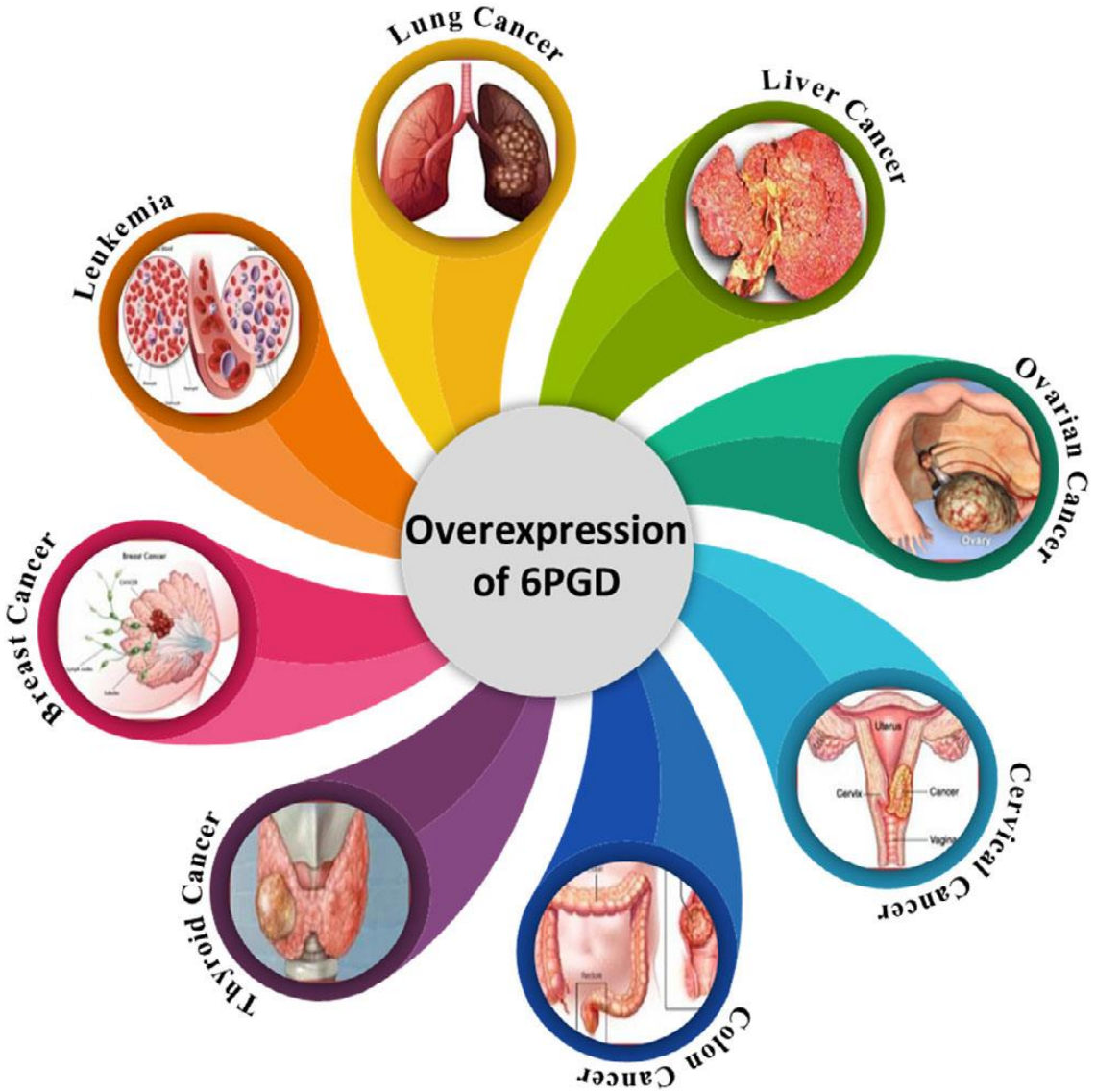
2.2 Kanser İlerlemesinde 6PGD'nin Rolü

Yüksek enerji taleplerini karşılamak için kanserli hücreler, yeniden programlanmış bir metabolizma yoluna uyum sağlar. Kanser hücrelerinde 20'den fazla metabolik yolun yeniden programlandığı bildirilmiştir (Poliakov *et al.* 2014). Kanser hücrelerinin metabolik yeniden programlanması, metabolik enzimlerin aşırı ekspresyonu ile karakterize edilir. 6PGD'nin çoklu kanserlerde aşırı ekspresyonu, son yıllarda araştırmacıların dikkatini çekti (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 2007'den beri 6PGD ile ilgili yayınlar

Bununla birlikte, 6PGD'nin kanser ilerlemesini desteklediği mekanizma hala araştırılmaktadır. Bununla birlikte, 6PGD'nin tümör ilerleyici rollerinin arkasındaki olası cevaplar, lipogenez, redoks homeostazı, (Lin *et al.* 2015) metastaz (Chan *et al.* 2013) ve hücre çoğalması gibi çoklu biyolojik fonksiyonlara aracılık etme kabiliyetinde yatmaktadır (Chen *et al.* 2019). Önceki araştırmalar kolorektal tümörler, (Bravard *et al.* 1991) meme karsinomu, (Yang *et al.* 2018) hepatoselüler kanser, (Chen *et al.* 2019) tiroid kanseri, (Giusti *et al.* 2008) servikal neoplazi, (Basu *et al.* 1993) lösemi, (Lin *et al.* 2015) yumurtalık (Brocklehurst *et al.* 1986) ve akciğer karsinomu (Sukhatme and Chan 2012) gibi çoklu insan kanserlerinde 6PGD'nin yukarı regülasyonunu bildirmiştir (Şekil 2.2).



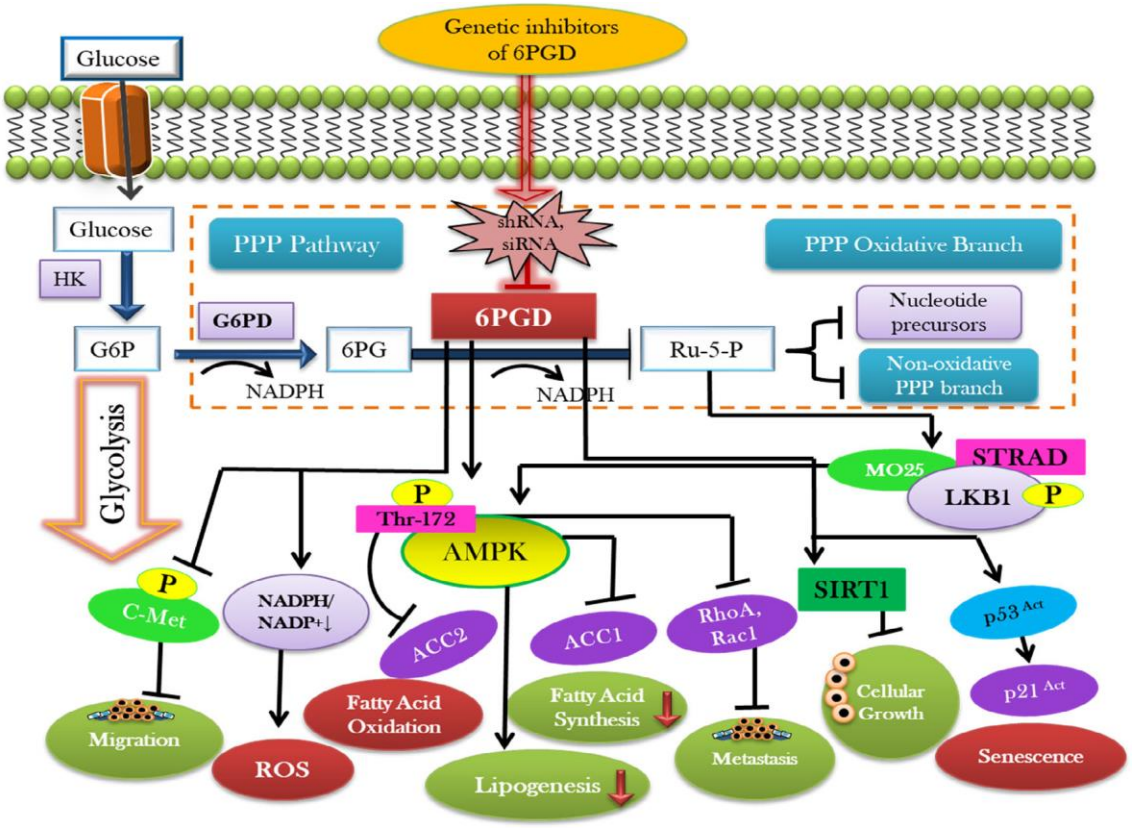
Şekil 2.2 Farklı kanserlerde 6PGD'nin aşırı ekspresyonu

Kanser, 200'den fazla farklı türü kapsayan karmaşık bir hastalıktır ve birçoğunun birden fazla alt türü vardır. Bununla birlikte, şimdiye kadar sekiz ana kanser türünde 6PGD'nin rolü araştırılmıştır. Ayrıca, 6PGD'nin aşırı ekspresyonunun genel bir kural olup olmadığı veya kanserden kansere değişip değişmediği de araştırılmalıdır. Bu nedenle, diğer kanser türlerinde 6PGD'nin ekspresyonunu ve aktivitesini incelemek faydalı olacaktır.

Metabolik dönüşümlerin kanserdeki rolünü anlamak için öncelikle metabolik enzimlerin hiperaktivasyonuna yol açan düzenleyici devreleri anlamamız gerekir.

2.3 6PGD Hiperaktivasyonu Yoluyla Tümör Başlatma ve Metastatik Dönüşümler

6PGD ekspresyonu, tümör ilerlemesi ve kanserli hücrelerin metastatik yetenekleri ile doğrudan ilişkilidir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 6PGD'nin genetik inhibitörleri, 6PGD'nin aşırı ekspresyonunu ve aktivitesini bloke ederek metastazın inhibisyonu, hücresel büyüme ve lipogenez ve kanser hücrelerinde yaşlanmanın indüklenmesi ile sonuçlanır

Tümör baskılayıcı karaciğer kinaz B1 (LKB1), AMPK (AMP ile aktive olan protein kinaz) yolunun bir yukarı akış kinazı olarak hizmet eder. LKB1-AMPK, enerji stresli koşullara yanıt olarak hücresel sağkalımı teşvik etmek için hücresel proliferasyon, hücre sağkalımı ve metabolizmaya aracılık etmede temel rol oynar (Li *et al.* 2015, Shaw *et al.* 2004).

6PGD'nin yıkılması, fizyolojik oranının altında azaltılmış Ru-5-P seviyelerine yol açar, bu da art arda sadece nükleotidlerin biyosentezini zayıflatmakla kalmaz, aynı zamanda LKB1 yasağını da hafifletir, böylece lipogenezin inhibisyonu ile AMPK'yi aktive eder. Bu çalışmanın sonuçları, 6PGD yıkımının Ru-5-P aracılı LKB1-AMPK sinyalinin yasaklanması yoluyla lipogenezi azalttığını ve ROS seviyelerini yükselttiğini, böylece proliferasyonu ve tümör büyümesini azalttığını önermektedir (Lin *et al.* 2015).

6PGD'nin inhibisyonu, aşağı akış substratı ACC1 ile birlikte AMPK'yi aktive etme potansiyeline sahiptir, bu da meme kanseri hücrelerinde lipitlerin biyosentezini azaltan ACC1 aktivitesinin azalmasına neden olur (Yang *et al.* 2018). Hepatik kanser hücrelerinde 6PGD'nin aşırı ekspresyonu, AMPK aracılı NADPH metabolik yeniden programlamayı aktive edebilir, böylece kanser hücrelerine metabolik avantaj sağlayabilir (Chen *et al.* 2019). 6PGD, akciğer, lösemi ve meme kanserlerinde AMPK aktivasyonunun yanı sıra rahim ağzı kanserinde de AMPK'yi hedefler. Ayrıca 6PGD, rahim ağzı kanseri hücrelerinde Rac1 ve RhoA'yı hedefleme potansiyeline de sahiptir. Rac1 ve RhoA, kanser hücrelerinde lamellipodium, lobopodium, fibroblastlar ve bleb aracılı migrasyon türeten Rho GTPaz'lardır (Ridley 2015). 6PGD inhibisyonu, sonuçta kanser hücrelerinin istilacı yeteneklerini azaltan Rac1 ve RhoA ekspresyonunda belirgin bir azalmaya neden olur. Bununla birlikte, 6PGD inhibitörleri, 6PGD'nin Rac1 ve RhoA ekspresyonuna AMPK'ye bağlı bir şekilde aracılık ettiğini açıkça beyan eden AMPK tükenmiş hücrelerde Rac1 ve RhoA ekspresyonunu azaltamadı (Guo *et al.* 2019).

6PGD tarafından düzenlenen ağları anlamak için başka bir girişimde, akciğer kanseri hücrelerinde tirozin kalıntılarında fosforilasyonunu artırarak c-Met'in aktivasyonu için 6PGD'nin gerekli olduğu bulundu (Chan *et al.* 2013). c-Met aktivasyonu, epitel hücrelerinin proliferasyonunu, ayrılmasını ve hareketliliğini elde etme potansiyeline

sahip olduğundan, c-Met'in 6PGD tarafından aktivasyonu, akciğer kanseri hücrelerinin 6PGD kaynaklı metastazı için zorunlu bir faktör olabilir (Bahrami *et al.* 2017, Birchmeier *et al.* 2003). Farklı bir çalışma da 6PGD ekspresyonunun akciğer karsinomu dokularının ilerleyen metastatik evresi ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (Chen *et al.* 2013).

6PGD'nin aşırı ekspresyonu, yaşlanmanın baskılanmasına doğru giden p53 ekspresyonuna aracılık eder. Yaşlanmanın uyarılması, kendisi metabolik yeniden programlama veya onkojenik mutasyonlar tarafından engellenen neoplastik dönüşümlere karşı çıkar. p53, çeşitli kanserlerde çoğunlukla inaktive edilen veya mutasyona uğrayan yaşlanmanın en zorunlu düzenleyicisidir (Chen *et al.* 2005, Rufini *et al.* 2013). 6PGD yıkımı, H1975 akciğer kanseri hücrelerinde p53 ve aşağı akış hedefi p21Waf1/Cip1/Sdi1'in ekspresyonunu yukarı regüle etti, böylece hücresel yaşlanmayı indükledi ve hücreleri neoplastik dönüşümlerden kurtardı (Sukhatme and Chan 2012).

2.4 Kanser İçin Potansiyel Terapötik İlaç Hedefi Olarak 6PGD

H1975 ve H1650 akciğer kanseri hücrelerinde shRNA sistemi tarafından 6PGD yıkımı, kanserli hücrelerin çoğalmasını azalttı. Bununla birlikte, 6PGD'nin 6PGD devrilme hücrelerinde aşırı ekspresyonu, kanserli hücrelerin proliferatif kabiliyetini restore etti. Ayrıca, doksisiklin kaynaklı ksenograflı tümör fare modelinde shRNA tarafından 6PGD yıkımı, tümörlerin büyümesini önemli ölçüde durdurdu (Sukhatme and Chan 2012). H1299 hücrelerinde 6PGD'nin yıkılması, oksidatif PPP akışının azalmasına, $NADPH/NADP^+$ oranının azalmasına ve fosfofruktokinazın glikolitik basamak aktivitesi, böylece kanser hücrelerinin proliferasyonunu hafifletir (Lin *et al.* 2015). 6PGD'nin inhibisyonu, kanserin in vitro ve ayrıca in vivo ksenograflı meme kanseri modelinde kemoterapötiklere karşı duyarlılığını arttırdı (Yang *et al.* 2018). HI975 hücrelerinde 6PGD yıkımı, kanserli hücrelerin in vitro invaziv yeteneklerini inhibe etti (Chan *et al.* 2013). 6-PGD'nin genetik ve farmakolojik inhibitörler tarafından fonksiyonel inhibisyonu, hepatoselüler kanserli hücrelerde apoptozun indüklenmesi yoluyla büyümeyi durdurdu ve sağkalımı azalttı (Chen *et al.* 2019). Rahim ağzı kanseri hücrelerinde 6PGD'nin farmakolojik inhibisyonu, kanser hücrelerinin Rho-GTPaz

aracılı göçünü önemli ölçüde yasaklamıştır (Guo *et al.* 2019). 6PGD enziminin kısmi inhibisyonu (kontrolün %36-61'i) NADPH arzını (kontrolün %58-61'i) azaltmak ve lösemi hücrelerinin büyümesini %39-44'üne düşürmek için yeterliydi, Bu da 6pgd'nin kanser gelişiminin ana aracı olarak hizmet ettiğini düşündürdü (Bhanot *et al.* 2017). 6PGD ekspresyonunun inhibisyonu, hücreleri neoplastik dönüşümlerden kurtaran H1975 hücrelerinde p53'e bağlı yaşlanmaya neden oldu (Sukhatme and Chan 2012). Tüm bu bulgular kümülatif olarak 6pgd'nin anormal şekilde aşırı eksprese edildiği kanserlerin tedavisi için umut verici terapötik bir hedef olabileceğini göstermektedir.

Pentoz fosfat yolunun üçüncü enzimi olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (E.C.1.1.1.44; 6PGD) $NADP^+$ varlığında 6-fosfoglukonat bileşiğini D-ribuloz 5-fosfata dönüştüren bir enzimdir. Reaksiyon sonucu birçok biyomolekülün yapısına giren riboz 5-fosfatın izomeri D-ribuloz 5-fosfat ve birçok biyokimyasal reaksiyonda indirgeyici güç olarak kullanılan NADPH oluşur. Enzim glukoz 6-fosfatın, glikolitik ve pentoz fosfat yolu arasındaki dengesinin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (Del Mar Medina-Puerta and Garrido-Pertierra 1986).

6PGD'nin doğal substratı 6-fosfoglukonat koenzimi $NADP^+$'dır. Enzimin koenzime olan ilgisi genelde substratı olan 6-fosfoglukonat'tan daha fazladır (Rippa *et al.* 1971). Ayrıca NADPH spesifik 6PGD'nin insan eritrositi, kuzu karaciğeri, Trypanosoma Brucei ve Candida utilis' de substrat olarak 2-deoksi-6-fosfoglukonat ve 3-keto-6-fosfoglukonatı kullanabildiği de çalışmalarda rapor edilmiştir (Topham and Dalziel 1986).

6-phospho-D-gluconate + $NAD(P)^+ \rightleftharpoons$ D-Ribulose 5-phosphate + CO_2 + NAD(P)H + H^+

Birçok araştırma güçlü kanser türlerinden olan kolerektal kanserler (Bravard *et al.* 1991), servikal intraepitelyal neoplazi (Basu *et al.* 1993, Jonas *et al.* 1992), karaciğer kanseri (Chen *et al.* 2019), rahim ağzı kanseri (Guo *et al.* 2019), anaplastik troid karsinomu (ATC) (Chen *et al.* 2018), meme kanseri (Yang *et al.* 2018), yumurtalık kanseri ve akciğer kanseri (Zheng *et al.* 2017) gibi türlerin oluşumunda 6pgd enzim ekspresyonunda artış olduğunu göstermiştir.

Sukhatme yaptığı çalışmayla, akciğer kanseri H1975 hücrelerinde 6PGD'nin yıkılmasının in vitro hücre proliferasyonunu ve in vivo tümör büyümesini inhibe ettiğini bildirmiştir (Sukhatme and Chan 2012). Birkaç çalışma, 6PGD'nin kanser hücrelerinde translasyon sonrası modifikasyonla da aktive edildiğini göstermiştir (Liu *et al.* 2019, Shan *et al.* 2014, Sheng *et al.* 2020). Liu ve arkadaşları, 6PGD'nin, Src ailesi kinaz Fyn tarafından tirozin (Y) 481'de fosforile edilerek aktive edildiğini ve bunun tümör büyümesine ve radyasyon direncine yol açtığını buldu.

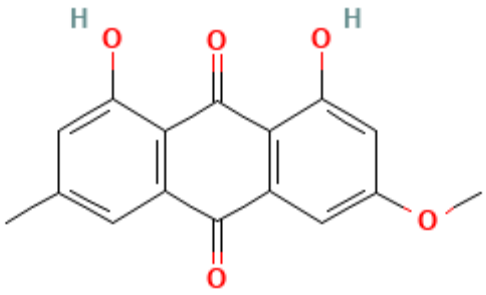
Shan ve diğerleri, 6PGD'nin insan kanserinde lizin asetilasyonu ile aktive edildiğini gösterirken (Lin *et al.* 2015), Sheng ve diğerleri, N6-metiladenosin (m6A) mRNA modifikasyonları okuyucusu YTHDF2'nin doğrudan 6PGD'nin m6A modifikasyon bölgesine bağlandığını ve 6PGDmRNA translasyonunu desteklediğini buldu (Sheng et al. 2019).

Chen ve arkadaşlarının çalışması, Physcion tarafından 6PGD'nin hedeflenmesinin hepatoselüler karsinom hücre büyümesini inhibe ettiğini ve hepatoselüler karsinoma tokemoterapötik ajan tedavisini duyarlı hale getirdiğini göstermiştir (Chen et al. 2019).

Roark ve arkadaşları (1996) tarafından bazı metal iyonları üzerine inhibisyon çalışmaları yapılmış, yapılan çalışmada bazı metal iyonlarının potansiyel inhibitör olduğu belirtilmiş ve Zn^{+2}, Cu^{+2}, Cd^{+2}' nin 6PGD enzimini inhibe ettiği gösterilmiştir (Roark and Brown 1996). Birçok anyon inhibisyon etkisi gösterir. Ancak asetat inhibisyon etkisi göstermediğinden diğer anyonların etkileri incelenirken sabit iyonik şiddet oluşturmakta kullanılabilir (Procsal and Holten 1972). Ayrıca enzim aktivitesi düşük Mg^{+2} konsantrasyonunda artarken, yüksek Mg^{+2} konsantrasyonunda ise düştüğü belirtilmiştir (Pearse and Rosemeyer 1975). Bazı türlerde okzalasetat, glukoz-6P, okzalat, fruktoz-6-P, fruktoz-1-P, glukoz-1,6 bisfosfat, PPi, Pi, Phi (fosfanat), sitrat ve sülfatın ibhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmiştir (Nordenberg *et al.* 1984).

Lin ve arkadaşları çok sayıda kanser hücresinde hücre proliferasyonunu etkili bir şekilde inhibe eden ve hedef dışı etki göstermeden normal hücrelerde düşük toksisiteye sahip olan Physcion adlı bir bileşik geliştirmişlerdir (Şekil 2.4). Lin ve arkadaşları

ayrıca physcion'un sıtma önleyici bir ajan olan dihidroartemisinin (DHA) ile kombinasyonunun hemolizi indüklemeden lösemi hücre büyümesini sinerjik olarak engellediğini bulmuşlardır (Lin *et al.* 2015).



Şekil 2.4 Physcion 2 boyutlu yapısı

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmalarımızda kullanılan standart diyaliz torbaları, β-nikotinamidadenindinükleotidfosfat (Na tuzu) ($NADP^+$), 6-fosfoglukonat (mono Na tuzu), sodyum bikarbonat ve etilendiamintetraasetikasit (EDTA) Sigma Chemical Comp.'den; sodyum hidroksit, trihidroksimetilaminometan (Tris), hidroklorik asit, glisin, fosforik asit, sodyum azotür, gliserin, potasyum bisfosfat, potasyum asetat, ve 2' 5' ADP-Sepharose 4B Pharmacia'dan; çalışmada kullanılan fenolic bileşikler Sigma'dan alındı.

3.1.2 Yararlanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar esnasında aşağıdaki alet ve cihazlardan faydalanılmıştır.

Santrifüj :Heraeus Sepatech
Multiplate Reader : CHEBİOS s.r.l.
pH metre : Sehott pH-Meter CG840
Peristaltik pompa : İsmatec
Karıştırıcı (Vorteks) : Fısons whirlımixer
Hassas terazi : Gec Avery
Afinite kolonu : Kapalı sistem oluşturucu ve soğutmalı (1x10), Sigma (ABD)
Otomatik pipet : Eppendorf
Mağnetik karıştırıcı : Chilten Hotplate Magmetic Stirrer HSBI
Saf su cihazı : Barnstead Easy Pure UV/UF
Güç kaynağı : 1-Bio Rad Power Pac 3000 2-Apparatus Corporation EC 135
Buzdolapları : Boch
Derin dondurucu : Sanyo Madical Freezer

3.1.3 Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

Tüm çalışmalarda su olarak saf su kullanılmıştır.

Eritrositlerin yıkanması için kullanılan çözelti

1. 0,16 M KCl : 11,92 g KCl (0,16 mol) alınarak su ile 1 L'ye tamamlandı.

Aktivite ölçümünde kullanılan çözeltiler:

1. 1 M Tris-HCl (pH= 8,0): 0,6057 g (5 mmol) Tris 90 mL destile suda çözüldü. HCl çözeltisi ile pH 8,0'a ayarlandı. Daha sonra toplam hacim su ile 50 mL'ye tamamlandı.

2. 6 mM 6PGA: 9.1 mg (0,3 mmol) 6PGA alınıp bir miktar suda çözüldü. Hacmi su ile 5 mL'ye tamamlandı.

3. 2mM $NADP^+$ Çözeltisi: 7.6 mg $NADP^+$ (0,1 mmol) alınarak bir miktar suda çözüldü. Hacim suyla 5 mL'ye tamamlandı.

Diyaliz kullanılan tampon:

1. 50 mM K–asetat/ 50 mM K–fosfat: 4,9 g K–asetat,6,8 g K-fosfat karışımı 800 mL suda çözündü. pH= 6'ya ayarlandı ve toplam hacim 1 L'ye tamamlandı.

Afinite kromatografisi kolonunda kullanılan çözeltiler:

1. 0,1 M K-asetat/0,1 M K-fosfat, pH= 6 (Kolonunun paketlenmesi ve dengelenmesi için kullanılan tampon): 9,8 g K-asetat (0,1 mol) ve 13,6 g K-fosfat (0,1 mol) karışımı 800 mL suda çözüldü. pH'sı 6'ya ayarlandıktan sonra toplam hacim 1L'ye tamamlandı.

2. 0,1 M K-asetat/0,1 M K-fosfat, pH= 7,85 (Afinite kromatografisi kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 9,8 g K-asetat (0,1 mol) ve 13,6 g K-fosfat (0,1 mol) karışımı 800 mL destile suda çözüldü. pH= 7,85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1L'ye tamamlandı.

3. 0,1 M K-fosfat/0,1 M KCl, pH= 7,85 (Numune tatbik ettikten sonra afinite kolonunun yıkanması için kullanılan tampon): 13,6 K-fosfat (0,1 mol) ve 7,45 g (0,1 mol) KCl karışımının hacmi su ile 800 mL'ye tamamlandı. pH'sı 7,85'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1L'ye tamamlandı.

4. 80 mM K-fosfat + 10 mM EDTA (pH= 7,85) + 80 mM KCI + 5 mM $NADP^+$ (Afinite jeline tutunmuş olan 6-fosfoglukonat dehirogenaz enziminin elüsyonu için kullanılan tampon): 0,544 g K-fosfat, 0,121g EDTA, 0,298 KCI ve 0,1913 g $NADP^+$ karışımı 40 mL suda çözüldü. pH= 7,8'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 50 mL'ye tamamlandı.

5. 0,1 M Na-asetat/0,5 M NaCl (pH= 4,5) (Afinite kromatografisi kolonunun rejenerasyonu için kullanılan tampon): 4,1 g Na-asetat(50 mmol) ve 14,61 g NaCl (0,25 mol) alınıp suda çözüldü, pH= 4,5'e ayarlandı ve toplam hacim suyla 500 mL'ye tamamlandı.

6. 0,1 M Tris + 0,5 M NaCl (pH= 8,5) (Afinite kromatografisi kolonunun rejeneresyonu için) 6,05 g Tris ve 14,61 g NaCI bir miktar suda çözündükten sonra pH= 8,5'e ayarlandı. Daha sonra hacim 500 mL'ye tamamlandı.

7. % 0.02'lik NaN_3 çözeltisi (Kromatografi kolon meteryallerini bakterilerden korumak için): 10 mg NaN_3 alınarak 50 mL suda çözüldü.

Fenolik bileşiklerin stok çözeltileri:

Bileşikler 1mg/mL olacak şekilde DMSO'da çözülerek stok çözeltiler hazırlandı.

3.2 Yöntemler

3.2.1 İnsan kanından 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enziminin saflaştırılması

Hemolize halde alınan eritrosit hücre zarlarını uzaklaştırmak için +4ºC'de 10.000xg'de 30 dakika santrifüj edildi. Çalışmalara süpernatantla devam edildi ve çökelek atıldı. Hemolizat hazırlanmış oldu. Hemolizatda enzim aktivitesi ve protein tayini yapıldı.

3.2.1 Afinite kolonunun hazırlanması ve insan eritrosit 6PGD enziminin saflaştırılması

2 g kuru 2',5'-ADP Sepharose 4B jeli 10 mL'lik kolon hacmi için tartıldı ve 500 mL destile su ile safsızlıkların maddelerin uzaklaştırılması için birkaç defa yıkandı. Yıkamaişlemi ile jelin şişmesi sağlandı. Jelin havası su trompu kullanılarak vakum pompası ile alındıktan sonra dengeleme ve yıkama tamponu (0,1 mM K-fosfat / 0,1 mM K-asetat, pH= 6) eklenerek jel süspanse hale getirildi. Jel, 1x10 cm'lik soğutmalı kolona paketlendi ve sabit akış hızı periltastik pompa ile sağlandı. Peristaltik pompanın hızı 5 rpm'de olarak ayarlandı. Kolonun dengelenmişi tatbik edilen ve elüe edilen çözeltilerin 280 nm'de absorbansının ve pH'larının eşitlenmesin ile takip edildi. Dengelenmiş kolona eritrosit hemolizatı uygulandı. Numune tamamı kolondan geçtikten sonra kanın kırmızı rengi tamamen kaybolana kadar kadar dengeleme tamponu geçirmeye devam edilerek kolonun temizlenmesi sağlandı. Bunu takiben kolondan sırasıyla 25'er mL'lik 0,1 mM K-fosfat / 0,1 mM K-asetat, (pH= 6) ve 0,1 mM K-fosfat/0,1 mM K-asetat, (pH= 7,85) geçirilerek yıkandı. Yıkama işlemi, spektrofotometrede takip edilerek absorbans değerlerinin köre eşit olmasıyla duduruldu. Yıkama işleminden sonra 30mL 80 mM K-fosfat + 10 mM EDTA (pH= 7.85) + 80mM KCI + 5 mM $NADP^+$ elüsyon tamponu kullanılarak elüsyon işlemi gerçekleştirildi. Elüsyonlar 1 mL olacak şekilde ependorf tüplerine alındı, ve aktif tüpler birleştirilerek bir havuz oluşturuldu. Tuzların uzaklaştırılması için diyaliz işlemi uygulandı. Diyaliz sonrası enzimler 1 mL'lik hacimlerde -20 ^oC'de muhafaza edildi. Enzim çalışmaları için kullanmadan önce buzdolabını +4 ^oC kısmında buzun çözülmesi için bekletildi.

Afinite jelinin rejenerasyonu için 0,1 M Na-asetat/ 0,5 M NaCl (pH= 4,5) ve 0,1 M Tris + 0,5 M NaCI (pH= 8,5) sırasıyla 30'ar mL halinde üç kez kolondan geçirildi. Kolon dengelendikten sonra, kolon materyallerini bakterilerden korumak için %0,02' lik 15 mL NaN_3 çözeltisi geçirildi. Kolunun bakterilerden korunması için buzdolabında muhafaza edilmesine dikkat edildi.

3.3 Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Enzimin katalizlediği reaksiyon aşağıda verilmiştir.

$$\text{6-fosfoglukonat} + NADP^{+} \xrightarrow{\text{6PGD}} \text{Riboz-5-fosfat} + NADPH$$

Reaksiyondada görüldüğü gibi 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, $NADP^{+}$ varlığında 6-fosfoglukonatın indirgenmesini sağlamaktadır. Enzimatic reaksiyon sonucunda NADPH oluştuğu görülmektedir. NADPH'ın 340 nm'de absorbans verdiği bilinmektedir. Enzim aktivitesi, daha önce belitilen metot kullanılarak 340 nm'de NADPH'ın spekrofotometrik olarak artışı ile ölçüldü (Beutler 1971). Aktivite ölçümleri için 96'lık micro plate kullanılmıştır. Çizelge 3.1'de aktivite ölçüm içerikleri verilmiştir.

Çizelge 3.1 6PGD enziminin aktivite ölçüm protokolü

	Kontrol küveti	Numune küveti
Stok çözeltiler	Hacim (µL)	Hacim (µL)
1 M Tris-HCl	50	50
2 mM $NADP^{+}$	20	20
Saf su	100	100
Enzim örneği	10	10
10 dakika inkübasyon		
6 mM 6PGA	-	20

3.4 Enzim İnhibisyon Çalışmaları

Flavon ve flovanol bileşiklerin enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini belirlemek için bileşikler 1 mg/mL DMSO'da çözüldü. Daha sonra 10 kat seyreltildi ve faklı konsantrasyonlarda bileşiklerin enzim aktivitesi üzerinde etkileri test edildi. Yüksek inhibisyon etkisi gösteren bileşikler seyreltilerek enzim aktivitesini yarıya düşüren konsantrasyona ulaşılmaya çalışıldı. Enzim aktivitesini yarıya düşüren konsamtrasyonun altında ve üstünde beş farklı konsantrasyonda aktivite ölçümlerialındı.

İnhibitörlerin eklenmediği enzim aktivitesi absorbansı kontrol olarak kabul edildi. İnhibitörlerin etkisi yüzde aktivite olarak hesaplandı. Daha sonra % aktivite-[konsantrasyon] grafikleri çizildi. Bu grafikler üzerinden IC_{50} değerleri hesaplandı.

3.5 Moleküler Docking Çalışmaları

İnhibisyon etkileri belirlenen bileşiklerin 3D yapıları PubMed (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov) web sayfasından sdf formatımda indirildi. İnsan 6PGD enzimin kristal yapısı Protein Data Bank web sayfasından pdb formatında indirildi (https://www.rcsb.org/structure/2JKV) .

Molegro Virtiual Docker için docking protokolü: Protein programa aktarıldı. Proteinin kristal yapısı üzerindeki su molekülleri ve ligand dışındaki heteroatomlar çıkarıldı. Moleküller programa aktarıldı (Molegro 2019). Docking için NADPH'ın bağlanma bölgesi belirlendi. Docking bölgesi olarak X:22.32, Y:-20.64 Z:-16.27 koordinasyon merkezi ve 16 Å bir alan docking için seçildi. Her bir ligand için 10 docking denemesi yapacak şekilde program ayarlandı. En yüksek MolDock Scoreları değerlendirmeye alındı.

AutoDock Vina: Bu program ile docking çalışmaları Chimera platformu kullanılarak yapıldı (Pettersen *et al.* 2004, Trott and Olson 2010). Diğer programda anlatıldığı şekilde proteinin kristal yapısı docking için hazırlandı. Aynı bölge docking için seçildi. Sonuçlar kcal/mol olarak alındı.

Dockin sonuçlarına göre etkileşim haritaları Discovery Studio 2021 Client programı kullanılarak incelendi.

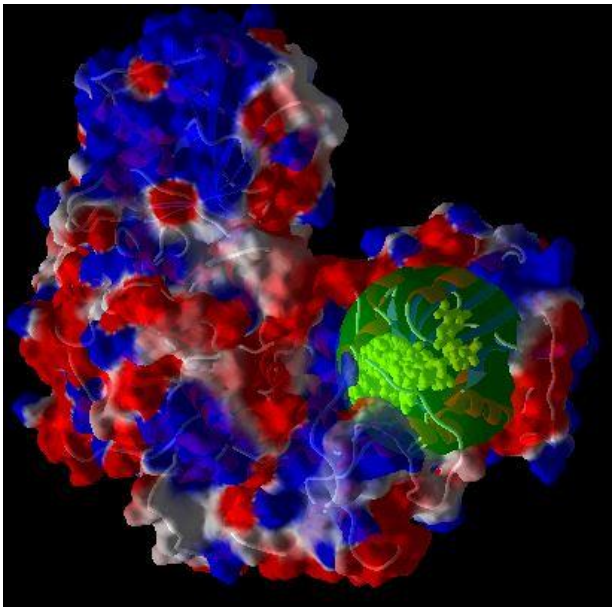
4. BULGULAR

Bu tez kapsamında altı flavon ve yedi flavonol doğal bileşiğin insan eritrosit 6-fosfoglukonat dehidrohenaz enzim aktivitesi üzerinde etkileri araştırılmıştır. Ayrıca bu moleküllerin enzimin aktif bölgesi ile moleküler düzeyde etkileşimleri moleküler MolegroVirtual Docker ve AutoDock Vina programları kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen *in vitro* ve *in silico* sonuçlar Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

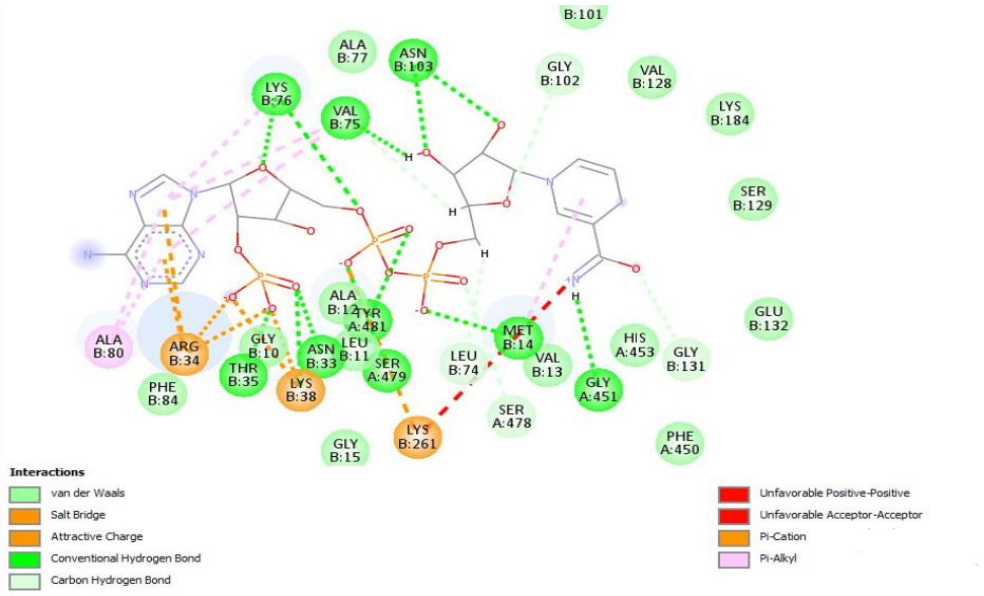
Çizelge 4.1 Bazı flavon ve flovanolların insan eritrosit 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzim aktivitesi üzerinde etkileri

Bileşiğin sınıfı	**Bileşiğin adı**	**Ligandların PubChem Kodları**	**IC_{50} değerleri (µM)**	**AutoDock Vina**	**MolDock Score**	**HBond**
Flavon	Apigenin	5280443	21,26	-8,3	-113,809	-12,8489
	Apiin	5280746	106,59	-9,1	-170,072	-22,4582
	Baicalein	5281605	13,73	-	-101,794	-11,512
	Baicalin	64982	138,91	-9,3	-159,521	-23,6418
	Luteolin	5280445	54,15	-8,5	-122,039	-17,7436
Flavonol	Kaempferol	5280863	149,15	-8,2	-114,014	-13,0534
	Quercetin	5280343	4,08	-8,5	-118,848	-20,8875
	Myricetin	5281672	13,03	-8,2	-123,607	-23,5189
	Fisetin	5281614	9,82	-8,3	-101,48	-13,6559
	Galangin	5281616	113,67	-8,0	-104,746	-11,4387
	Morin	5281670	8,10	-8,6	-119,647	-15,0972

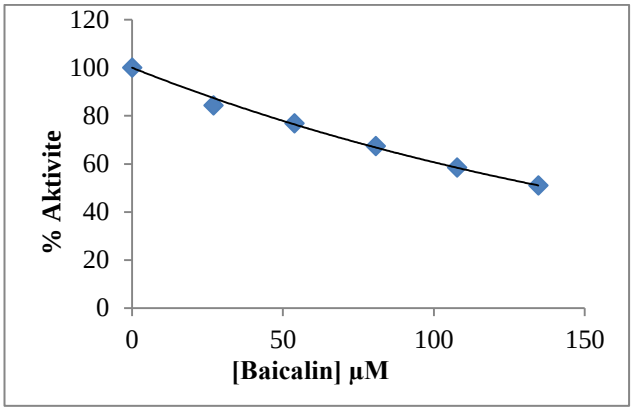
Şekil 4.1'de docking çalışmalarında seçilen aktif bölgeyi göstermektedir. Aktif bölge NADPH'ın bağlanma bölgesidir. NADPH'ın etkileştiği amino asit rezidüleri ve etkileşim tipleri Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.1 6PGD Yapısı ve Docking Bölgesi

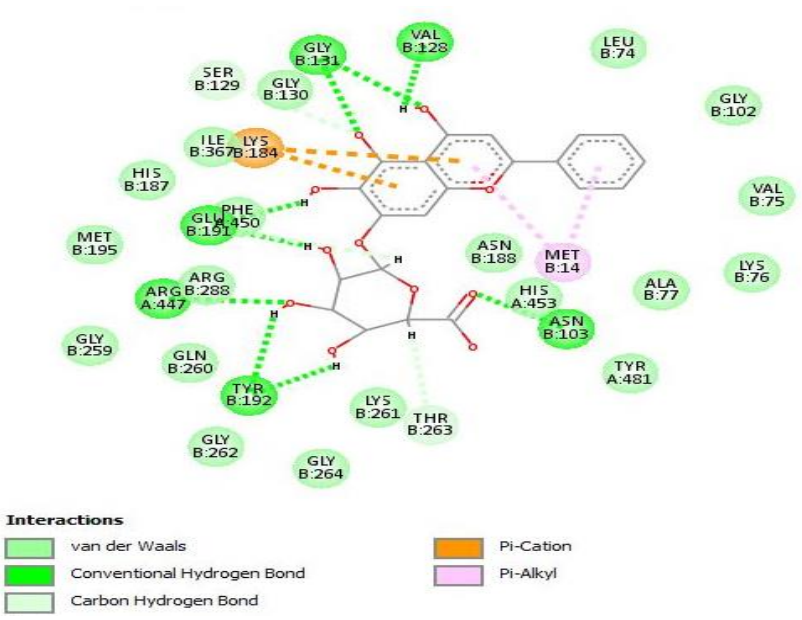


Şekil 4.2 NADPH'ın 6PGD aktif bölgesinde etkileşime girdiği amino asitler ve etkileşim modelleri

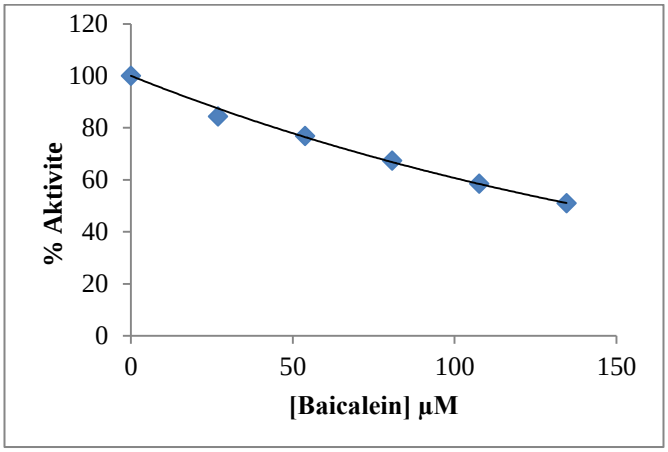


Şekil 4.3 6PGD enzimi üzerine Baicalin bileşiğinin % aktivite – [I] grafiği

Baicalinin enzim aktivitesi üzerindeki IC_{50} değeri 138,91 µM olarak belirlenmiştir. % aktivite – [I] grafiği Şekil 4.3'de ve 2D etkileşim haritası Şekil 4.4'de verilmiştir. Docking sonuçlarına göre -159,521 MolDock Scoru ve -9,3 kcal/mol olarak tesbit edilmiştir. Enzim ile 2D etkileşim haritası incelendiğinde, Val 128, Gly 131, Glu191, Arg 447, Tyr192 ve Asn 103 ile hidrojen bağları yaptığı görülmektedir. Lys 184 rezidü ile Pi-Cation bağı yaparken, Met 14 ile Pi-Alkyle etkileşimleri yapmıştır. Gly 264, Lys 261, Gly 262, Gln 260, Gly 259, Met 195 gibi amino asitler van der Walls etkileşimlerine katkı sağlamıştır.

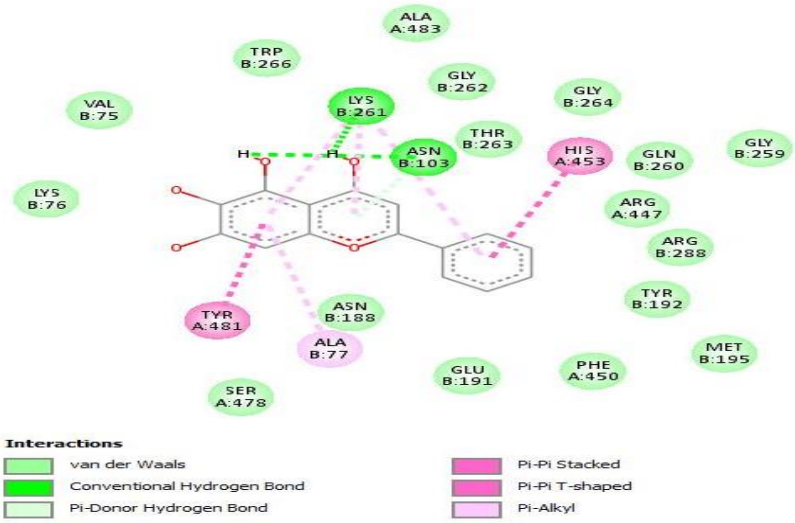


Şekil 4.4 Baicalinin, 6PGD'nin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası

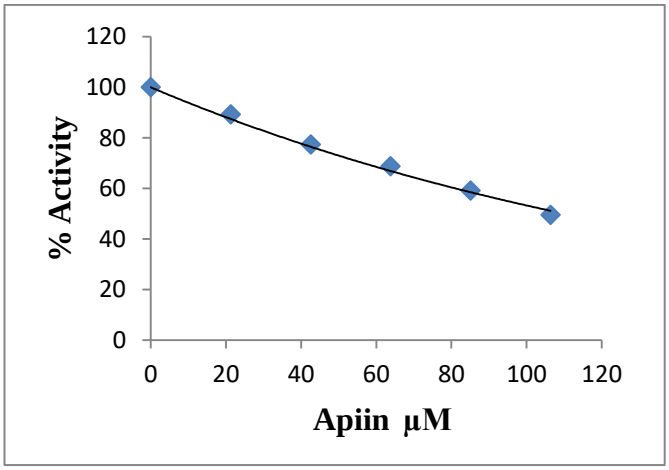


Şekil 4.5 6PGD enzimi üzerine Baicalein bileşiğinin % aktivite – [I] grafiği

Baicalein enzim aktivitesi üzerindeki IC_{50} değeri 13,73 µM olarak belirlenmiştir. % aktivite – [I] grafiği Şekil 4.5'de ve 2D etkileşim haritası Şekil 4.6'de verilmiştir. Docking sonuçlarına göre -101,794 MolDock Scoru ve -8,2 kcal/mol olarak tesbit edilmiştir. Enzim ile 2D etkileşim haritası incelendiğinde, Lys 261, Asn 103 ile hidrojen bağları yaptığı görülmektedir. Hıs 453, Tyr 481 rezidü ile Pi-Stacked bağı yaparken, Ala 77 ile Pi-Alkyle etkileşimleri yapmıştır. Gly 264, Lys 76, Gly 262, Gln 260, Gly 259, Met 195 gibi amino asitler van der Walls etkileşimlerine katkı sağlamıştır.

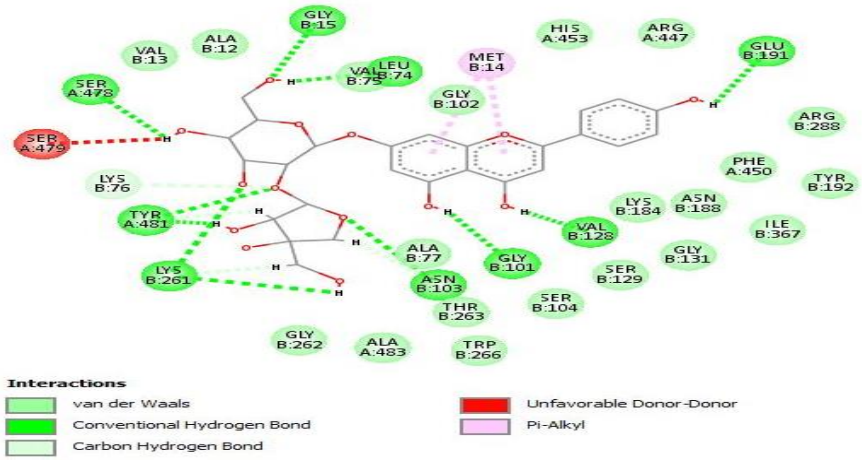


Şekil 4.6 Baicalein 6PGDnin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası

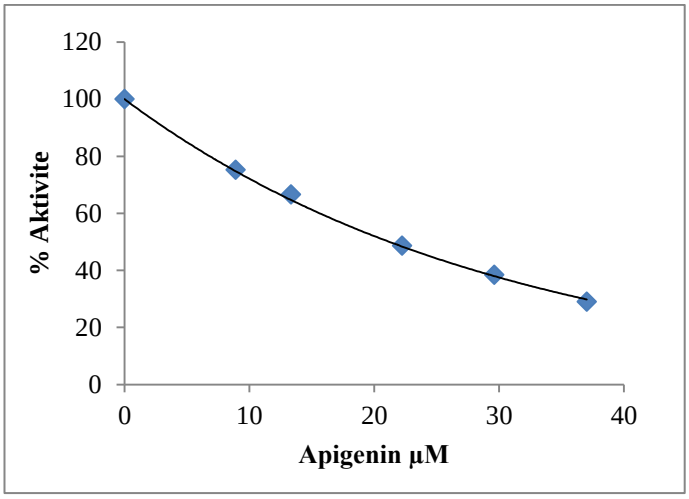


Şekil 4.7 6PGD enzimi üzerine Apiin bileşiğinin % aktivite – [I] grafiği

Apiin enzim aktivitesi üzerindeki IC_{50} değeri 106,59 µM olarak belirlenmiştir. % aktivite – [I] grafiği Şekil 4.7'de ve 2D etkileşim haritası Şekil 4.8'de verilmiştir. Docking sonuçlarına göre -170,072 MolDock Scoru ve -9,1 kcal/mol olarak tesbit edilmiştir. Enzim ile 2D etkileşim haritası incelendiğinde, Val 128, Gly 101, Asn 103, Lys 261, Tyr 481, Ser 478, Gly 15, Leu 74 ve Glu 191 ile hidrojen bağları yaptığı görülmektedir. Ser 479 Unfavorable Donor-Donor. Met 14 ile Pi-Alkyle etkileşimleri yapmıştır. Gly 131, Lys 184, Gly 262, gibi amino asitler van der Walls etkileşimlerine katkı sağlamıştır.

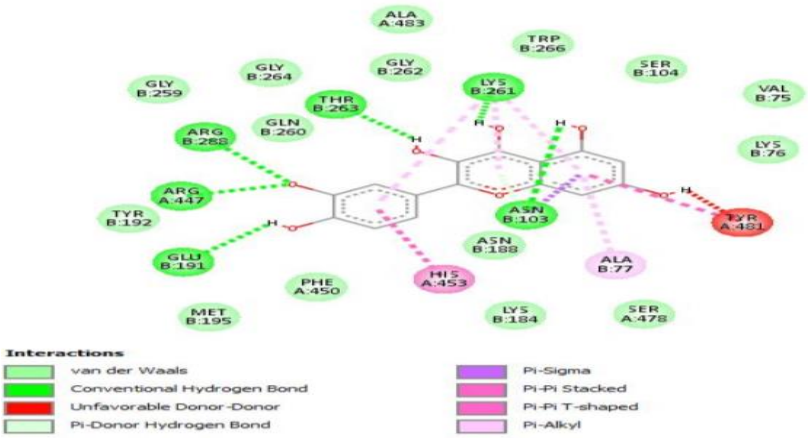


Şekil 4.8 Apiinin 6PGDnin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası

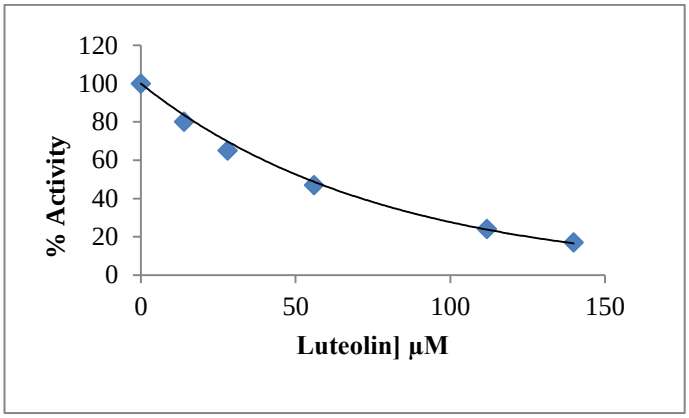


Şekil 4.9 6PGD enzimi üzerine Apigenin bileşiğinin % aktivite – [I] grafiği

Apigenin enzim aktivitesi üzerindeki IC_{50} değeri 21,26 µM olarak belirlenmiştir. % aktivite – [I] grafiği Şekil 4.9'de ve 2D etkileşim haritası Şekil 4.10'de verilmiştir. Docking sonuçlarına göre -113,809 MolDock Scoru ve -8,3 kcal/mol olarak tesbit edilmiştir. Enzim ile 2D etkileşim haritası incelendiğinde, Asn 103, Glu 191, Arg 447, Arg 288, Thr 263 ve Lys 261 ile hidrojen bağları yaptığı görülmektedir. Hıs 453 rezidü ile Pi-Sigma bağı yaparken, Ala 77 ile Pi-Alkyle etkileşimleri yapmıştır. Gly 264, Lys 184, Gly 259, Gln 260, Gly 262, Met 195 gibi amino asitler van der Walls etkileşimlerine katkı sağlamıştır.

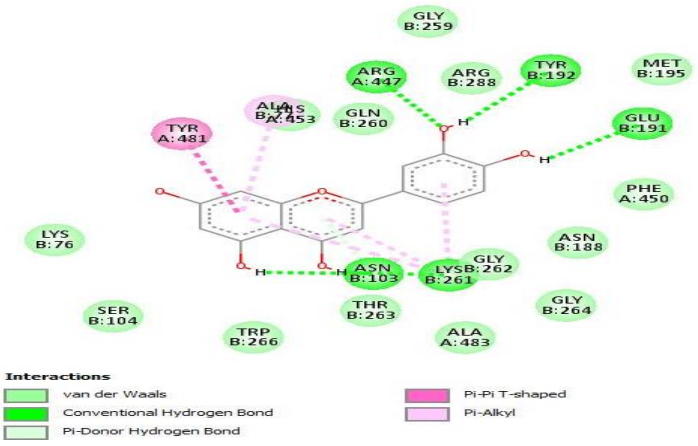


Şekil 4.10 Apigenin 6PGDnin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası

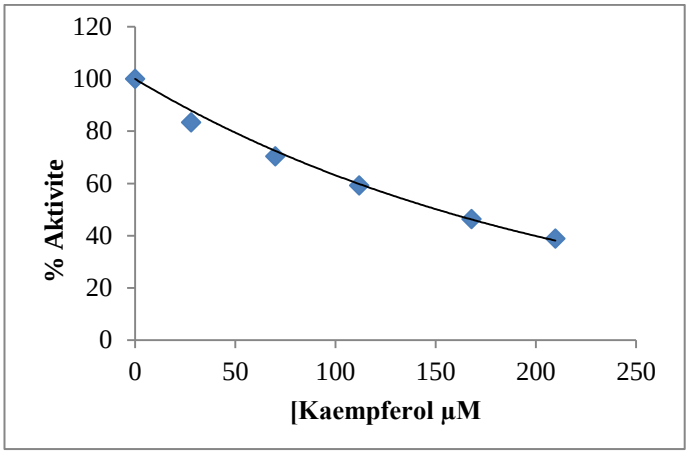


Şekil 4.11 PGD enzimi üzerine Luteolin bileşiğinin % aktivite – [I] grafiği

Luteolin enzim aktivitesi üzerindeki IC_{50} değeri 54,15 µM olarak belirlenmiştir. % aktivite – [I] grafiği Şekil 4.11'de ve 2D etkileşim haritası Şekil 4.12'de verilmiştir. Docking sonuçlarına göre -122,039 MolDock Scoru ve -8,5 kcal/mol olarak tesbit edilmiştir. Enzim ile 2D etkileşim haritası incelendiğinde, Glu191, Arg 447, Tyr192 ve Asn 103 ve Lys 261 ile hidrojen bağları yaptığı görülmektedir. Tyr 481 rezidü ile Pi-Pi T-shaped bağı yaparken, Ala 77 ile Pi-Alkyle etkileşimleri yapmıştır. Gly 264, Lys 76, Gly 262, Gln 260, Gly 259, Met 195 gibi amino asitler van der Walls etkileşimlerine katkı sağlamıştır.

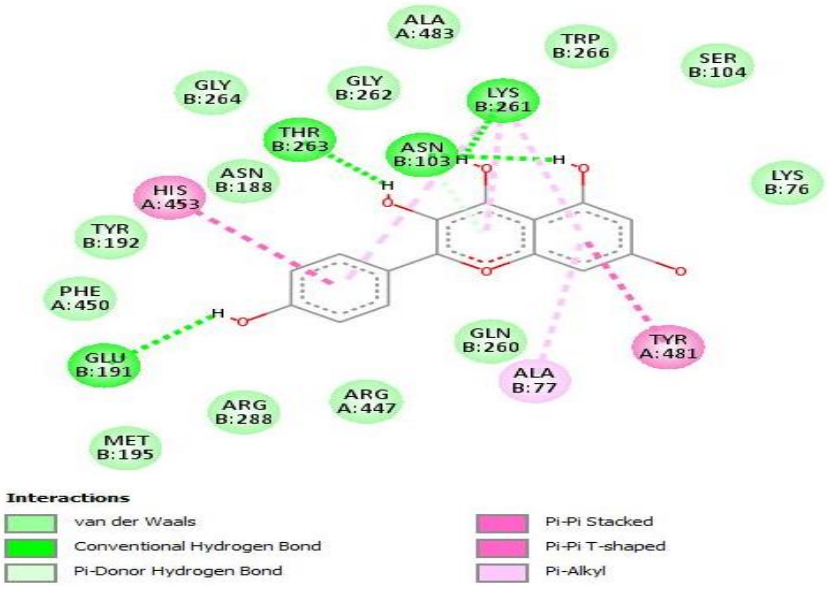


Şekil 4.12 Luteolin 6PGDnin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası

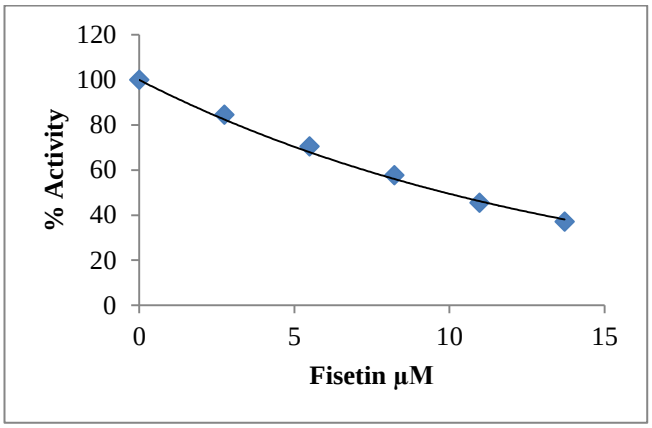


Şekil 4.13 6PGD enzimi üzerine Kamepferol bileşiğinin % aktivite – [I] grafiği

Kaempferol enzim aktivitesi üzerindeki IC_{50} değeri 149,15 µM olarak belirlenmiştir. % aktivite – [I] grafiği Şekil 4.13'de ve 2D etkileşim haritası Şekil 4.14'de verilmiştir. Docking sonuçlarına göre -114,014 MolDock Scoru ve -8,2 kcal/mol olarak tesbit edilmiştir. Enzim ile 2D etkileşim haritası incelendiğinde, Glu191, Lys 261, Thr 263 ve Asn 103 ile hidrojen bağları yaptığı görülmektedir. Ala 77 ile Pi-Alkyle etkileşimleri yapmıştır. Gly 264, Lys 76, Gly 262, Gln 260, Met 195 gibi amino asitler van der Walls etkileşimlerine katkı sağlamıştır.

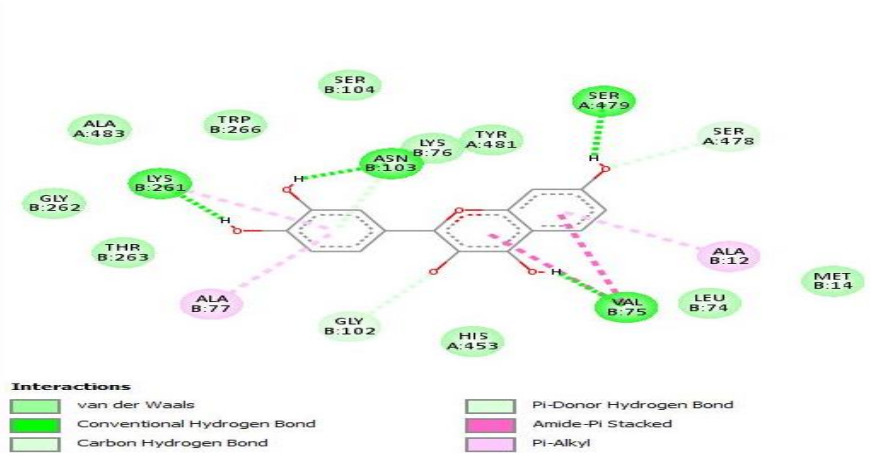


Şekil 4.14 Kaempferol 6PGDnin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası

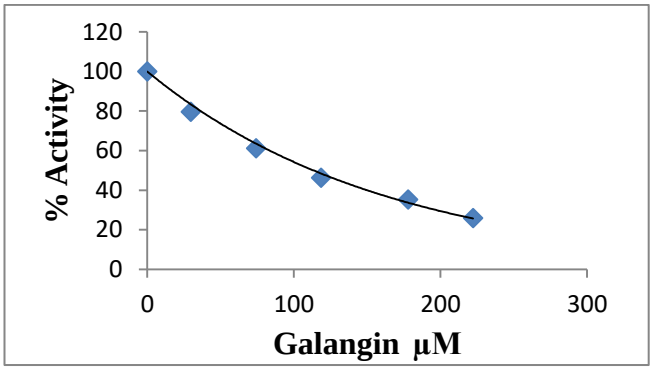


Şekil 4.15 6PGD enzimi üzerine Fisetin bileşiğinin % aktivite – [I] grafiği

Fisetin enzim aktivitesi üzerindeki IC_{50} değeri 9,82 µM olarak belirlenmiştir. % aktivite – [I] grafiği Şekil 4.15'de ve 2D etkileşim haritası Şekil 4.16'de verilmiştir. Docking sonuçlarına göre -101,48 MolDock Scoru ve -8,3 kcal/mol olarak tesbit edilmiştir. Enzim ile 2D etkileşim haritası incelendiğinde, Val 75, Ser 479, Lys 261 ve Asn 103 ile hidrojen bağları yaptığı görülmektedir. Lys 184 rezidü ile Pi-Cation bağı yaparken, Ala 12, Ala 77 ile Pi-Alkyle etkileşimleri yapmıştır. Lys 76, Gly 262, Gly 102, Met 14 gibi amino asitler van der Walls etkileşimlerine katkı sağlamıştır.

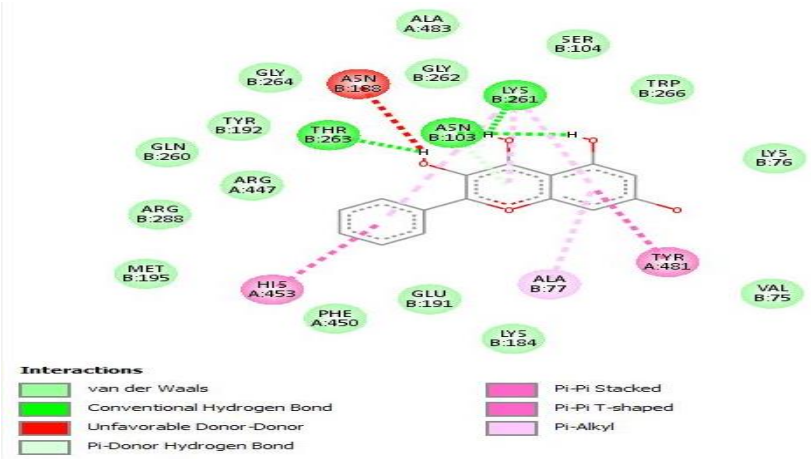


Şekil 4.16 Fisetin 6PGDnin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası

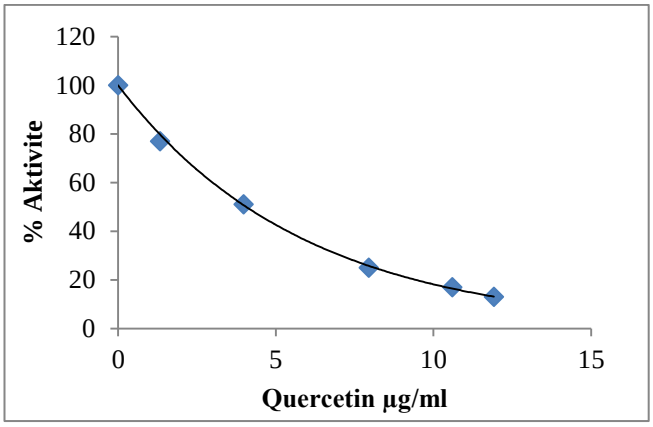


Şekil 4.17 PGD enzimi üzerine Galangin bileşiğinin % aktivite – [I] grafiği

Galangin enzim aktivitesi üzerindeki IC_{50} değeri 113,67 µM olarak belirlenmiştir. % aktivite – [I] grafiği Şekil 4.17'de ve 2D etkileşim haritası Şekil 4.18'de verilmiştir. Docking sonuçlarına göre -104,746 MolDock Scoru ve -8,0 kcal/mol olarak tesbit edilmiştir. Enzim ile 2D etkileşim haritası incelendiğinde, Lys 261, Thr 263 ve Asn 103 ile hidrojen bağları yaptığı görülmektedir. Ala 77 ile Pi-Alkyle etkileşimleri yapmıştır. Gly 264, Lys 184, Gly 262, Gln 260, Met 195 gibi amino asitler van der Walls etkileşimlerine katkı sağlamıştır.

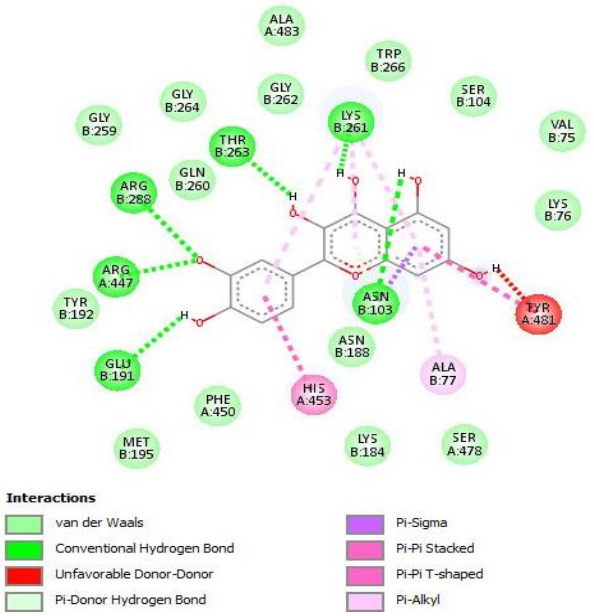


Şekil 4.18 Galangin 6PGDnin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası

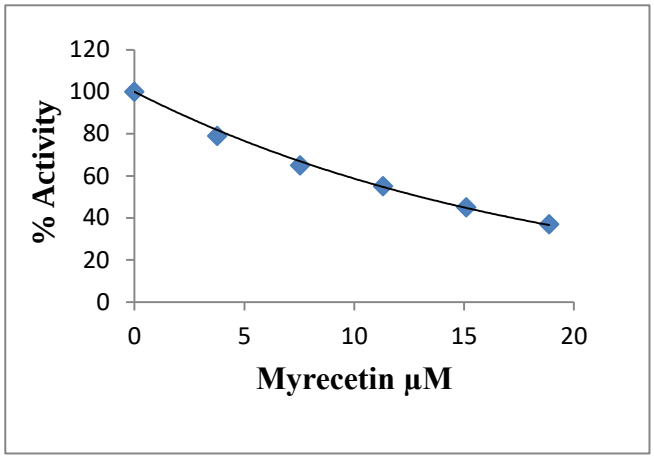


Şekil 4.19 6PGD enzimi üzerine Ouercetin bileşiğinin % aktivite – [I] grafiği

Quercetin enzim aktivitesi üzerindeki IC_{50} değeri 4,08 µM olarak belirlenmiştir. % aktivite – [I] grafiği Şekil 4.19'de ve 2D etkileşim haritası Şekil 4.20'de verilmiştir. Docking sonuçlarına göre -118,848 MolDock Scoru ve -8,5 kcal/mol olarak tesbit edilmiştir. Enzim ile 2D etkileşim haritası incelendiğinde, Val 75, Gly 131, Glu191, Arg 447, Tyr192 ve Asn 103 ile hidrojen bağları yaptığı görülmektedir. Hıs 453 rezidü ile Pi-Cation bağı yaparken, Ala 77 ile Pi-Alkyle etkileşimleri yapmıştır. Gly 264, Lys 261, Gly 262, Gln 260, Gly 259, Met 195 gibi amino asitler van der Walls etkileşimlerine katkı sağlamıştır.

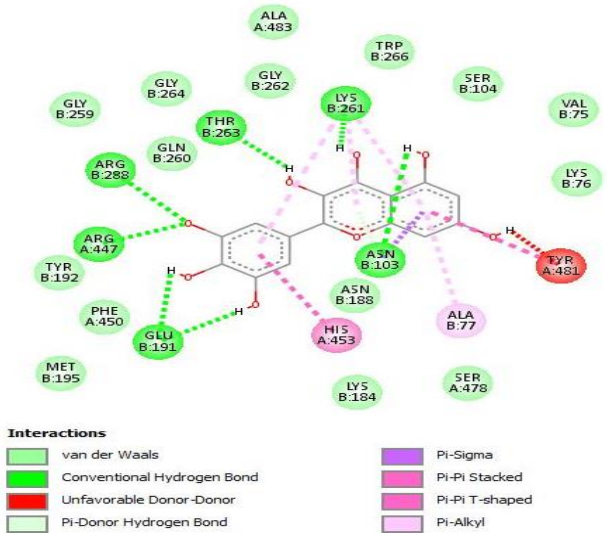


Şekil 4.20 Quercetin 6PGDnin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası

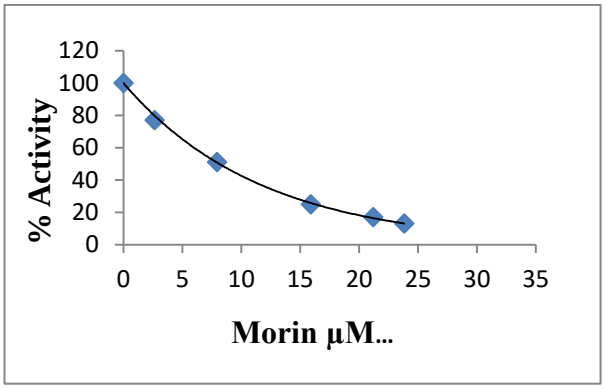


Şekil 4.21 6PGD enzimi üzerine Myrecetin bileşiğinin % aktivite – [I] grafiği

Myrecetin enzim aktivitesi üzerindeki IC_{50} değeri 13,03 µM olarak belirlenmiştir. % aktivite – [I] grafiği Şekil 4.21'de ve 2D etkileşim haritası Şekil 4.22'de verilmiştir. Docking sonuçlarına göre -123,607 MolDock Scoru ve -8,2 kcal/mol olarak tesbit edilmiştir. Enzim ile 2D etkileşim haritası incelendiğinde, Lys 261, Thr 263, Arg 288, Arg 447, Glu 191 ve Asn 103 ile hidrojen bağları yaptığı görülmektedir. Hıs 453 rezidü ile Pi-Cation bağı yaparken, Ala 77 ile Pi-Alkyle etkileşimleri yapmıştır. Gly 264, Lys 261, Gly 262, Gln 260, Gly 259, Met 195 gibi amino asitler van der Walls etkileşimlerine katkı sağlamıştır.

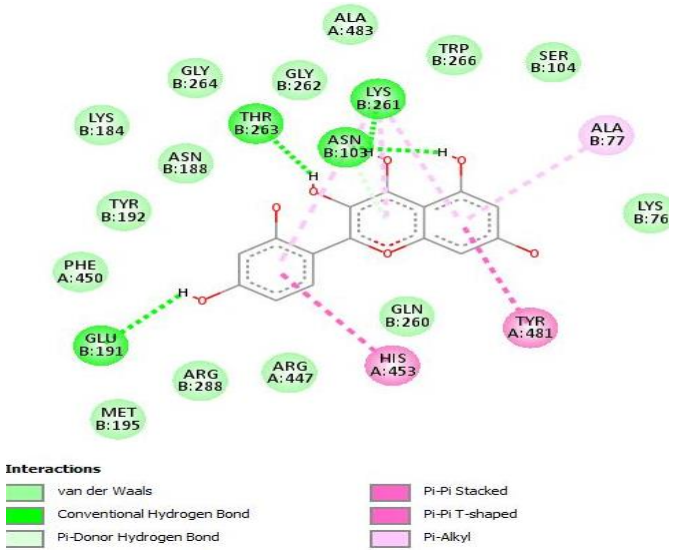


Şekil 4.22 Myricetin 6PGDnin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası



Şekil 4.23 6PGD enzimi üzerine Morin bileşiğinin % aktivite – [I]

Morin enzim aktivitesi üzerindeki IC_{50} değeri 8,10 µM olarak belirlenmiştir. % aktivite – [I] grafiği Şekil 4.23'de ve 2D etkileşim haritası Şekil 4.24'de verilmiştir. Docking sonuçlarına göre -119,647 MolDock Scoru ve -8,6 kcal/mol olarak tesbit edilmiştir. Enzim ile 2D etkileşim haritası incelendiğinde, Lys 261, Thr 263, Glu 191 ve Asn 103 ile hidrojen bağları yaptığı görülmektedir. Ala 77 ile Pi-Alkyle etkileşimleri yapmıştır. Gly 262, Lys 184, Gly 259, Gln 260, Gly 264, Met 195 gibi amino asitler van der Walls etkileşimlerine katkı sağlamıştır.



Şekil 4.24 Morin 6PGDnin aktif bölgesinde 2D etkileşim haritası

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Pentoz fosfat yolu, oksidatif ve oksidatif olmayan olmak üzere iki aşamadan oluşur. Bu metabolik yolun amacı sitozolde meydana gelen indirgeyici biyosentez olayları için NADPH ve çeşitli riboz 5-fosfat yapısındaki bileşikleri üretmektir. 6-Fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGD; E.C. 1.1.1.44) enzimi yaşam için hayati önem taşıyan metabolik ara ürünlerin sentezinde görev alır. Örneğin 6PGD, oksidatif metabolik yolların ikinci adımını katalize eden pentoz fosfat yolunda önemli bir enzimdir.

Hücrelerde pentoz fosfat yolunun iki temel işlevi vardır; bunlar DNA, RNA için gerekli olan riboz 5-fosfat sentezi ve indirgeme reaksiyonlarında kullanılan indirgeyici madde NADPH'nin ribonükleotid sentezidir (Eggleston and Krebs 1974). Ayrıca aromatik amino asitler ve vitaminlerin sentezi için hayati önem taşıyan eritroz-4-fosfat gibi fosforile edilmiş karbonhidratlar ve bakteri hücre duvarının bir bileşeni olan sedoheptuloz-7-fosfat sentezlenir (Wood 1986). 6-Fosfoglukonat dehidrojenaz enzimi (6PGD; E.C.1.1.1.44), pentoz fosfat yolunun üçüncü basamağı olan $NADP^+$ varlığında 6-fosfoglukonatın D-ribuloz 5-fosfata dönüşüm reaksiyonunu katalize eder (Çiftçi *et al.* 2002). Bu reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan ürünlerden biri olan NADPH, hücrelerde yağ asidi, kolesterol, L-askorbik asit, nitrik oksit biyosentezinde, peroksitlerin azaltılmasında, ilaç ve ksenobiyotik detoksifikasyonunda ve glutatyonun indirgenmesinde rol oynar (Temel and Çiftci 2016, Wood 1986). İndirgenmiş glutatyon (GSH) ve GSH'ye bağlı enzimler, hücreyi, toksik bileşiklerin ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) kaynağının iç ve dış kısmına karşı korur (Siems *et al.* 2000). Bu nedenle 6PGD, antioksidan enzim sınıfında sınıflandırılır (Kozar *et al.* 2000).

6PGD enzimi aktivite ölçümleri Beutler metoduna göre oda şartlarında yapılmıştır. Aktivite 6PGD enziminde ortamdaki NADPH oluşumuyla ölçülmüştür. 6PGD enziminin kinetik çalışmalarında, maddelerin inhibisyon etkilerinin belirlenmesinde bu yöntem kullanılmıştır.

Bu çalışmada 6PGD enzimi üzerine flavon sınıfı bileşiklerden Apigenin, Apiin, Baicalein, Baicalin ve Luteolin ile flovanol grubu bileşiklerden Kaempferol, Quercetin, Myricetin, Fisetin, Galangin ve Morinin *in vitro* ve *in silico* etkileri araştırılmıştır.

İn vitro çalışmasında belirlenen inhibisyon etkisi büyükten küçüğe sırasıyla; Quercetin, Morin, Fisetin, Myricetin, Baicalein,Apigenin, Luteolin, Apiin, Galangin Baicalin ve Kaempferol şeklindedir. İnhibisyon/aktivasyon mekanizmasını netleştirmek için in silico çalışmaları da yapılmıştır. Quercetin 4,08 µM, Morin 8,10 µM, Fisetin 9,82 µM inhibisyon değerleriyle 6PGD enziminin olası inhibitörleri olarak ön plana çıkmışlardır.

İn silico çalışmalarında enzimin koenzimi olan NADP'nin enzimin aktif bölgesine bağlanan kısmı üzerine çalışılmıştır. Moleküler docking çalışmalarında MolDock algoritması kullanılarak hesaplamalar gerçekleştirilmştir Çalışma da inhibisyon etkileri büyükten küçüğe sırasıyla Apiin, Baicalin, Myricetin, Luteolin, Morin, Quercetin, Kaempferol, Apigenin, Galangin, Baicalein, Fisetin şeklindedir.

En son araştırmalar, bu yeni çok yönlü biyolojik molekül olan 6PGD'yi kanser için ortaya çıkan bir terapötik hedef olarak ortaya çıkardı. Birden fazla kanıt, 6PGD'nin yeniden programlanmış tümör biyoenerjetiği yoluyla tümör hücrelerinin proliferasyonunu, hayatta kalmasını ve metastazını arttırdığı gerçeğini desteklemektedir. Ayrıca, 6PGD aşırı ekspresyonu, kemorezistansın gelişimine katkıda bulunur.

6PGD'nin yapısal aşırı ekspresyonu ile yukarı regüle edilmiş oksidatif PPP, buna karşılık olarak enerji tedarikini, nükleotid öncüllerinin üretimini ve ayrıca ROS temizleyicilerini hızlandırır. Bu nedenle, 6PGD inhibisyonu, tümör büyümesinin yanı sıra hücre proliferasyonunu azaltmak için zorunlu anabolik süreçlerin bloke edilmesiyle zorunlu enerji arzının azaltılması ve redoks homeostazının bozulması gibi ikili fonksiyonel strateji sağlar.

KAYNAKLAR

Adams, M.J. Ellis, G.H. Gover, S. Naylor, C.E. and Phillips, C. 1994. Crystallographic study of coenzyme, coenzyme analogue and substrate binding in 6-phosphogluconate dehydrogenase: implications for NADP specificity and the enzyme mechanism. Structure, 2, 651-668.

Bahrami, A. Shahidsales, S. Khazaei, M. Ghayour- Mobarhan, M. Maftouh, M. Hassanian, S.M. and Avan, A. 2017. C- Met as a potential target for the treatment of gastrointestinal cancer: Current status and future perspectives. Journal of cellular physiology, 232, 2657-2673.

Basu, J. Duttagupta, C. Vermund, S.H. Ahn, C. Palan, P.R. and Romney, S.L. 1993. Alterations in erythrocyte glutathione metabolism associated with cervical dysplasias and carcinoma in situ. Cancer investigation, 11, 652-659.

Beutler, E. 1971. Red cell metabolism manual of biochemical methods. Academic Press, London.

Bhanot, H. Weisberg, E.L. Reddy, M.M. Nonami, A. Neuberg, D. Stone, R.M. Podar, K. Salgia, R. Griffin, J.D. and Sattler, M. 2017. Acute myeloid leukemia cells require 6-phosphogluconate dehydrogenase for cell growth and NADPH-dependent metabolic reprogramming. Oncotarget, 8, 67639.

Birchmeier, C. Birchmeier, W. Gherardi, E. and Woude, G.F.V. 2003. Met, metastasis, motility and more. Nature reviews Molecular cell biology, 4, 915-925.

Bravard, A. Luccioni, C. Muleris, M. Lefrancois, D. and Dutrillaux, B. 1991. Relationships between UMPK and PGD activities and deletions of chromosome 1p in colorectal cancers. Cancer genetics and cytogenetics, 56, 45-56.

Brewer, G.J. and Dern, R.J. 1964. A New Inherited Enzymatic Deficiency of Human Erythrocytes: 6-Phospho-gluconate Dehydrogenase Deficiency. American journal of human genetics, 16, 472.

Brocklehurst, D. Champion, A. Cheek, T. and Dewhurst, D. 1986. The value of 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH) activity as a marker of tumour cellularity and prognostic indicator in primary breast cancer. Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 7, 99-104.

Chan, B. VanderLaan, P.A. and Sukhatme, V.P. 2013. 6-Phosphogluconate dehydrogenase regulates tumor cell migration in vitro by regulating receptor tyrosine kinase c-Met. Biochemical and biophysical research communications, 439, 247-251.

Chen, A. Chen, Z. Xia, Y. Lu, D. Yang, X. Sun, A. Zou, Y. Qian, J. and Ge, J. 2018. Liraglutide attenuates NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis via regulating SIRT1/NOX4/ROS pathway in H9c2 cells. Biochemical and biophysical research communications, 499, 267-272.

Chen, H. Wu, D. Bao, L. Yin, T. Lei, D. Yu, J. and Tong, X. 2019. 6PGD inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma to chemotherapy via AMPK activation and metabolic reprogramming. Biomedicine & Pharmacotherapy, 111, 1353-1358.

Chen, Y.-C. Chang, H.-Y. Deng, J.-S. Chen, J.-J. Huang, S.-S. Lin, I.-H. Kuo, W.-L. Chao, W. and Huang, G.-J. 2013. Hispolon from Phellinus linteus induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in NB4 human leukaemia cells. The American journal of Chinese medicine, 41, 1439-1457.

Chen, Z. Trotman, L.C. Shaffer, D. Lin, H.-K. Dotan, Z.A. Niki, M. Koutcher, J.A. Scher, H.I. Ludwig, T. and Gerald, W. 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. Nature, 436, 725-730.

Cho, E.S. Cha, Y.H. Kim, H.S. Kim, N.H. and Yook, J.I. 2018. The pentose phosphate pathway as a potential target for cancer therapy. Biomolecules & therapeutics, 26, 29.

Corrons, J.L.V. Colomer, D. Pujades, A. Rovira, A. Aymerich, M. Merino, A. and Bascompte, J.L.A.i. 1996. Congenital 6- phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) deficiency associated with chronic hemolytic anemia in a Spanish family. American journal of hematology, 53, 221-227.

Çiftçi, M. Beydemir, S. Yilmaz, H. and Bakan, E. 2002. Effects of some drugs on rat erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase: an in vitro and in vivo study. Polish journal of pharmacology, 54, 275-280.

DeBerardinis, R. and Chandel, N. 2016. Fundamentals of cancer metabolism. Scıence advances, 2(5), e1600200.

Del Mar Medina-Puerta, M.a. and Garrido-Pertierra, A. 1986. Purification and properties of the enzyme 6-phosphogluconate dehydrogenase from Dicentrarchus labrax L. liver. Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry, 83, 215-220.

Deshpande, N. Mitchell, I. and Millis, R. 1977. Enzyme studies in human breast tumours. European Journal of Cancer (1965), 13, 1261-1267.

Dickens, F. and Glock, G. 1951. Direct oxidation of glucose-6-phosphate, 6-phosphogluconate and pentose-5-phosphates by enzymes of animal origin. Biochemical Journal, 50, 81.

Eggleston, L.V. and Krebs, H.A. 1974. Regulation of the pentose phosphate cycle. Biochemical Journal, 138, 425-435.

Fouad, Y.A. and Aanei, C. 2017. Revisiting the hallmarks of cancer. American journal of cancer research, 7, 1016.

Giusti, L. Iacconi, P. Ciregia, F. Giannaccini, G. Donatini, G.L. Basolo, F. Miccoli, P. Pinchera, A. and Lucacchini, A. 2008. Fine-needle aspiration of thyroid nodules: proteomic analysis to identify cancer biomarkers. Journal of proteome research, 7, 4079-4088.

Glock, G.E. and McLean, P. 1953. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. Biochemical Journal, 55, 400-408.

Gunsalus, I. Horecker, B. and Wood, W. 1955. Pathways of carbohydrate metabolism in microorganisms. Bacteriological reviews, 19, 79.

Guo, H. Xiang, Z. Zhang, Y. and Sun, D. 2019. Inhibiting 6-phosphogluconate dehydrogenase enhances chemotherapy efficacy in cervical cancer via AMPK-independent inhibition of RhoA and Rac1. Clinical and Translational Oncology, 21, 404-411.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. cell, 100, 57-70.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. cell, 144, 646-674.

Hanau, S. Montin, K. Cervellati, C. Magnani, M. and Dallocchio, F. 2010. 6-Phosphogluconate dehydrogenase mechanism: evidence for allosteric modulation by substrate. Journal of Biological Chemistry, 285, 21366-21371.

Hitosugi, T. Zhou, L. Elf, S. Fan, J. Kang, H.-B. Seo, J.H. Shan, C. Dai, Q. Zhang, L. and Xie, J. 2012. Phosphoglycerate mutase 1 coordinates glycolysis and biosynthesis to promote tumor growth. Cancer cell, 22, 585-600.

Jonas, S. Benedetto, C. Flatman, A. Hammond, R. Micheletti, L. Riley, C. Riley, P. Spargo, D. Zonca, M. and Slater, T. 1992. Increased activity of 6-phosphogluconate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in purified cell suspensions and single cells from the uterine cervix in cervical intraepithelial neoplasia. British journal of cancer, 66, 185-191.

Jones, N.P. and Schulze, A. 2012. Targeting cancer metabolism–aiming at a tumour's sweet-spot. Drug discovery today, 17, 232-241.

Kozar, R.A. Weibel, C.J. Cipolla, J. Klein, A.J. Haber, M.M. Abedin, M.Z. and Trooskin, S.Z. 2000. Antioxidant enzymes are induced during recovery from acute lung injury. Critical care medicine, 28, 2486-2491.

Kumar, S. Ahmad, M.K. Waseem, M. and Pandey, A.K. 2015. Drug targets for cancer treatment: an overview. Med chem, 5, 2161-0444.1000252.

Li, N. Huang, D. Lu, N. and Luo, L. 2015. Role of the LKB1/AMPK pathway in tumor invasion and metastasis of cancer cells. Oncology reports, 34, 2821-2826.

Liberti, M.V. and Locasale, J.W. 2016. The Warburg effect: how does it benefit cancer cells? Trends in biochemical sciences, 41, 211-218.

Lin, R. Elf, S. Shan, C. Kang, H.-B. Ji, Q. Zhou, L. Hitosugi, T. Zhang, L. Zhang, S. and Seo, J.H. 2015. 6-Phosphogluconate dehydrogenase links oxidative PPP, lipogenesis and tumour growth by inhibiting LKB1–AMPK signalling. Nature cell biology, 17, 1484-1496.

Liu, R. Li, W. Tao, B. Wang, X. Yang, Z. Zhang, Y. Wang, C. Liu, R. Gao, H. and Liang, J. 2019. Tyrosine phosphorylation activates 6-phosphogluconate dehydrogenase and promotes tumor growth and radiation resistance. Nature communications, 10, 1-14.

Miao, P. Sheng, S. Sun, X. Liu, J. and Huang, G. 2013. Lactate dehydrogenase A in cancer: a promising target for diagnosis and therapy. IUBMB life, 65, 904-910.

Miller, K.D. Goding Sauer, A. Ortiz, A.P. Fedewa, S.A. Pinheiro, P.S. Tortolero- Luna, G. Martinez- Tyson, D. Jemal, A. and Siegel, R.L. 2018. Cancer statistics for hispanics/latinos, 2018. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 68, 425-445.

Molavian, H.R. Kohandel, M. and Sivaloganathan, S. 2016. High concentrations of H2O2 make aerobic glycolysis energetically more favorable for cellular respiration. Frontiers in physiology, 7, 362.

Molegro, A. 2019. MVD 7.0 Molegro Virtual Docker. DK-8000 Aarhus C, Denmark.

Nordenberg, J. Aviram, R. Beery, E. Stenzel, K.H. and Novogrodsky, A. 1984. Inhibition of 6-phosphogluconate dehydrogenase by glucose 1, 6-diphosphate in human normal and malignant colon extracts. Cancer letters, 23, 193-199.

Ohara, H. Russell, R.A. Uchida, K. and Kondo, H. 2004. Purification and characterization of NAD-specific 6-phosphogluconate dehydrogenase from Leuconostoc lactis SHO-54. Journal of bioscience and bioengineering, 98, 126-128.

Otto, A.M. 2016. Warburg effect (s)—a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism. Cancer & metabolism, 4, 1-8.

Patra, K.C. and Hay, N. 2014. The pentose phosphate pathway and cancer. Trends in biochemical sciences, 39, 347-354.

Pavlova, N.N. and Thompson, C.B. 2016. The emerging hallmarks of cancer metabolism. Cell metabolism, 23, 27-47.

Pearse, B.M. and Rosemeyer, M.A. 1975. 6-Phosphogluconate dehydrogenase from human erythrocytes, Methods in enzymology. Elsevier, 220-226.

Pettersen, E.F. Goddard, T.D. Huang, C.C. Couch, G.S. Greenblatt, D.M. Meng, E.C. and Ferrin, T.E. 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. Journal of computational chemistry, 25, 1605-1612.

Poliakov, E. Managadze, D. and Rogozin, I.B. 2014. Generalized portrait of cancer metabolic pathways inferred from a list of genes overexpressed in cancer. Genetics research international, 2014.

Procsal, D. and Holten, D. 1972. Purification and properties of rat liver 6-phosphogluconate dehydrogenase. Activity at normal in vivo concentration of coenzyme. Biochemistry, 11, 1310-1314.

Ridley, A.J. 2015. Rho GTPase signalling in cell migration. Current opinion in cell biology, 36, 103-112.

Rippa, M. Picco, C. Signorini, M. and Pontremoli, S. 1971. Evidence for a tyrosine residue at the triphosphopyridine nucleotide-binding site of 6-phosphogluconate dehydrogenase. Archives of biochemistry and biophysics, 147, 487-492.

Roark, S. and Brown, K. 1996. Effects of metal contamination from mine tailings on allozyme distributions of populations of great plains fishes. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 15, 921-927.

Rosemeyer, M. 1987. The biochemistry of glucose- 6- phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase. Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease, 5, 79-95.

Rufini, A. Tucci, P. Celardo, I. and Melino, G. 2013. Senescence and aging: the critical roles of p53. Oncogene, 32, 5129-5143.

Sanner, T. Bergsjø, P. Koller, O. Kolstad, P. and Pihl, A. 1967. Technical modifications of the 6-phosphogluconate dehydrogenase test of the vaginal fluid. American journal of obstetrics and gynecology, 98, 800-803.

Sarfraz, I. Rasul, A. Hussain, G. Hussain, S.M. Ahmad, M. Nageen, B. Jabeen, F. Selamoglu, Z. and Ali, M. 2018. Malic enzyme 2 as a potential therapeutic drug target for cancer. IUBMB life, 70, 1076-1083.

Shan, C. Elf, S. Ji, Q. Kang, H.-B. Zhou, L. Hitosugi, T. Jin, L. Lin, R. Zhang, L. and Seo, J.H. 2014. Lysine acetylation activates 6-phosphogluconate dehydrogenase to promote tumor growth. Molecular cell, 55, 552-565.

Shaw, R.J. Kosmatka, M. Bardeesy, N. Hurley, R.L. Witters, L.A. DePinho, R.A. and Cantley, L.C. 2004. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101, 3329-3335.

Sheng, H. Li, Z. Su, S. Sun, W. Zhang, X. Li, L. Li, J. Liu, S. Lu, B. and Zhang, S. 2020. YTH domain family 2 promotes lung cancer cell growth by facilitating 6-phosphogluconate dehydrogenase mRNA translation. Carcinogenesis, 41, 541-550.

Siems, W. Sommerburg, O. and Grune, T. 2000. Erythrocyte free radical and energy metabolism. Clinical nephrology, 53, S9-17.

Stincone, A. Prigione, A. Cramer, T. Wamelink, M.M. Campbell, K. Cheung, E. Olin-Sandoval, V. Grüning, N.M. Krüger, A. and Tauqeer Alam, M. 2015. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. Biological Reviews, 90, 927-963.

Sukhatme, V.P. and Chan, B. 2012. Glycolytic cancer cells lacking 6-phosphogluconate dehydrogenase metabolize glucose to induce senescence. FEBS letters, 586, 2389-2395.

Temel, Y. and Çiftci, M. 2016. Purification of 6PGD enzyme from rat erythrocytes.

Toews, M.L. Kanji, M. and Carper, W. 1976. 6-Phosphogluconate dehydrogenase. Purification and kinetics. Journal of Biological Chemistry, 251, 7127-7131.

Topham, C. and Dalziel, K. 1986. The chemical mechanism of sheep liver 6-phosphogluconate dehydrogenase. A Schiff-base intermediate is not involved. Biochemical journal, 234, 671-677.

Trivizaki, S. Laliotis, G.P. Bizelis, I. Charismiadou, M.A. and Rogdakis, E. 2010. Enzymatic and mRNA transcript response of ovine 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) in respect to different Milk yield. Biochemistry research international, 2010.

Trott, O. and Olson, A.J. 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. Journal of computational chemistry, 31, 455-461.

Tsui, S.K.W. Chan, J.Y.W. Waye, M.M.Y. Fung, K.P. and Lee, C.Y. 1996. Identification of a cDNA encoding 6-phosphogluconate dehydrogenase from a human heart cDNA library. Biochemical genetics, 34, 367-373.

Vander Heiden, M.G. and DeBerardinis, R.J. 2017. Understanding the intersections between metabolism and cancer biology. Cell, 168, 657-669.

Villet, R.H. and Dalziel, K. 1969. Purification and properties of 6-phosphogluconate dehydrogenase from sheep liver. Biochemical Journal, 115, 639-643.

Vučetić, M. Cormerais, Y. Parks, S.K. and Pouysségur, J. 2017. The central role of amino acids in cancer redox homeostasis: vulnerability points of the cancer redox code. Frontiers in oncology, 7, 319.

Wood, T. 1986. Distribution of the pentose phosphate pathway in living organisms. Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease, 4, 235-240.

Yang, X. Peng, X. and Huang, J. 2018. Inhibiting 6-phosphogluconate dehydrogenase selectively targets breast cancer through AMPK activation. Clinical and translational oncology, 20, 1145-1152.

Zheng, W. Feng, Q. Liu, J. Guo, Y. Gao, L. Li, R. Xu, M. Yan, G. Yin, Z. and Zhang, S. 2017. Inhibition of 6-phosphogluconate dehydrogenase reverses cisplatin resistance in ovarian and lung cancer. Frontiers in pharmacology, 8, 421.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Mesut AYDIN

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı	2014-Halen
Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü	2010-2014
Ön Lisans	Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Sağlık Kurumları İşletmeciliği Bölümü	2014-2021