

**REPUBLIC OF TURKEY
HACETTEPE UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES**

**THE ROLE OF MITOCHONDRIAL TRANSPORTERS
IN CANCER METABOLISM**

Ranya ERDAL, MD, PhD

**Tumor Biology and Immunology Program
Doctor of Philosophy Thesis**

ANKARA

2025

**REPUBLIC OF TURKEY
HACETTEPE UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES**

**THE ROLE OF MITOCHONDRIAL TRANSPORTERS
IN CANCER METABOLISM**

Ranya ERDAL, MD, PhD

**Tumor Biology and Immunology Program
Doctor of Philosophy Thesis**

**Advisor of the Thesis
Associate Professor Hande CANPINAR, PhD**

**ANKARA
2025**

The Role of Mitochondrial Transporters in Cancer Metabolism**Ranya ERDAL, MD, PhD****Supervisor of the thesis:** Assoc. Prof. Hande CANPINAR, PhD

This thesis study has been approved and accepted as a PhD dissertation in the “Tumor Biology and Immunology Program” by the assessment committee, whose members are listed below, on August 26, 2025.

Chairman of the Committee: Prof. Ayşegül ATAK YÜCEL, MD, PhD
Gazi University

Member: Prof. Resul KARAKUŞ, MD, PhD
Gazi University

Member: Prof. Güneş ESENDAĞLI, PhD
Hacettepe University

Member: Prof. Yasemin BAYAZIT, PhD
Hacettepe University

Member: Assoc. Prof. Sevil OSKAY HALAÇLI, PhD
Hacettepe University

This dissertation has been approved by the above committee in conformity with the related issues of Hacettepe University Graduate Education and Examination Regulation.

Prof. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN, MD, PhD

Institute Director

28 August 2025

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

26/08/2025

Ranya ERDAL

i

ⁱ“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın**ın önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın**ın önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın**ın önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETHICAL DECLARATION

In this thesis, I affirm that all data and materials have been obtained in accordance with academic principles, and that all written, visual, and audio content, as well as the results, have been presented in line with scientific and ethical standards. The dataset has not been altered in any way. When utilizing the work of others, proper citations have been provided in full compliance with academic referencing guidelines. I also confirm that, apart from the referenced sources, this thesis represents my original work. It was carried out under the guidance of Assoc. Prof. K1vanç Birsoy, PhD, and Assoc. Prof. Hande Canpınar, PhD, and prepared in accordance with the thesis writing guidelines of Hacettepe University Institute of Health Sciences.

Ranya ERDAL, MD, PhD

ACKNOWLEDGEMENTS

I would first like to express my deepest gratitude to my mentors: Dr. Kivanc Birsoy, Dr. Gokhan Unlu, and Dr. Hande Canpinar. Dr. Canpinar has supported me since I was a second-year medical student, guiding me even before I entered the MD-PhD program. Her wisdom and kindness have been invaluable in helping me pursue my dreams. Dr. Birsoy has broadened my perspective on molecular biology, and his challenging nature has pushed me to think critically. Words cannot fully express my gratitude to Dr. Unlu. His patience, guidance, and unwavering support, particularly during tough times, have shaped me both professionally and personally. I am fortunate to have worked alongside such incredible individuals in Birsoy Laboratory. I want to thank Frederick Yen for his technical expertise and friendship, Artem Khan for his support both in and out of the lab, Yuyang Liu for his scientific advice and witty personality, and Rebecca Timson for our late-night talks. Mariluz Soula, you've been my soul sister in the lab, and Mark Gad, thank you for being the best desk neighbor I could ask for. I am grateful to all the lab members, past and present, whose contributions made this journey so meaningful and memorable.

I also owe a debt of gratitude to the MD-PhD Program and the Department of Basic Oncology at Hacettepe University. Dr. Alev Ozon and the program team have been a constant source of support. Dr. Lale Dogan's classes on cancer metabolism were pivotal in shaping my academic path. I am thankful to Dr. Gul Karakaya for being an inspiring role model during my medical education. I appreciate all those at Hacettepe, from peers to patients, who have helped shape me into the physician I am today. Grateful to the MD-PhD students before me for all I learned from their experiences. This thesis is dedicated to my parents, whose sacrifices and unconditional support have been the foundation of everything I have achieved. Their guidance and love continue to inspire me every day. Finally, I am deeply grateful to the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK) for their financial support through the 2214-A scholarship.

ABSTRACT

Erdal, R. The Role of Mitochondrial Transporters in Cancer Metabolism, Hacettepe University Graduate School Health Sciences, Basic Oncology Department, Doctor of Philosophy Thesis in Tumor Biology and Immunology, Ankara, 2025. Mitochondrial transporters play crucial roles in cellular metabolism; however, the specific substrates and functions of many remain unknown. This study aimed to identify the physiological substrate and function of SLC25A47, a liver-specific mitochondrial transporter associated with hepatocellular carcinoma. Using mitochondrial immunoprecipitation and metabolomics approaches in cell lines and mouse models, we demonstrated that SLC25A47 functions as an exporter of N-acetylglutamate (NAG) from the mitochondrial matrix. Overexpression of SLC25A47 led to the depletion of mitochondrial NAG levels, whereas knockout mice showed accumulation of NAG in liver mitochondria. NAG is an essential allosteric activator of carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1), which is the rate-limiting enzyme of the urea cycle. By modulating mitochondrial NAG levels, SLC25A47 may serve as a novel regulator of urea cycle activity in hepatocytes. Additionally, we identified the mitochondrial protease YME1L1 as a regulator of SLC25A47 protein levels. This study identifies SLC25A47 as a previously uncharacterized component of hepatic nitrogen metabolism and provides new insights into the regulation of ammonia detoxification in the liver.

Keywords: mitochondria, liver, urea cycle, SLC25A47, N-acetylglutamate, hepatocellular carcinoma

ÖZET

Erdal, R. Mitokondriyal Transport Proteinlerinin Kanser Metabolizmasındaki Rolü, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji Bilim Dalı, Tümör Biyolojisi ve İmmünolojisi Programı Doktora Tezi, Ankara, 2025.

Mitokondriyal taşıyıcılar hücreSEL metabolizmada hayati roller oynarlar, ancak birçoğunun spesifik substratları ve işlevleri hâlâ bilinmemektedir. Bu çalışma, daha önce hepatoselüler karsinoma ile ilişkilendirilmiş olan karaciğere özgü bir mitokondriyal taşıyıcı protein olan SLC25A47'nin fizyolojik substratını ve işlevini belirlemeyi amaçlamaktadır. Hücre hatlarında ve fare modellerinde mitokondriyal immünopresipitasyon ve metabolomiks yaklaşımları kullanılarak, SLC25A47'nin mitokondriyal matriksten N-asetilglutamatı (NAG) sitozole çıkaran bir taşıyıcı olarak görev yaptığını gösterdik. SLC25A47'nin aşırı ekspresyonu, mitokondri içindeki NAG seviyelerinin azalmasına yol açarken, genetik olarak SLC25A47 geninin silindiği farelerin karaciğer mitokondrilerinde NAG birikimi gözlemlendi. NAG, üre döngüsünün hız sınırlayıcı enzimi olan karbamoil fosfat sentetaz 1 (CPS1)'in görev yapması için gerekli bir allosterik aktivatördür. Mitokondriyal NAG seviyelerini modüle ederek, SLC25A47'nin hepatositlerde üre döngüsü aktivitesinin yeni bir düzenleyicisi olarak görev yapabileceği düşünülmektedir. Ek olarak, SLC25A47 proteininin mitokondriyal bir proteaz olan YME1L1 tarafından regüle edildiğini gösterdik. Bu çalışma, SLC25A47'yi karaciğerde azot metabolizmasının daha önce tanımlanmamış bir bileşeni olarak ortaya koymakta ve karaciğerde amonyak detoksifikasyonunun regülasyonuna dair yeni bilgiler sunmaktadır.

Anahtar kelimeler: mitokondri, karaciğer, üre siklusu, SLC25A47, N-asetilglutamat, hepatoselüler karsinoma

GENİŞ TÜRKÇE ÖZET

1. GİRİŞ

Mitokondriler, hücrelerde metabolik bir merkez olarak görev yaparlar ve çok çeşitli biyokimyasal süreçleri organize ederler. Birçok metabolik yol ya mitokondri içinde başlar ya da burada üretilen metabolitlere bağımlılık gösterir. Metabolitlerin iç mitokondriyal zar boyunca taşınması oldukça sıkı bir şekilde düzenlenen bir süreçtir. SLC25 protein ailesi, bir membran taşıyıcısı süper ailesidir ve küçük moleküller ile iyonların zarlar arasında taşınmasını sağlayarak metabolizmada kritik bir rol oynar; böylece hücrelerin ve dokuların biyokimyasal bileşimini etkiler. Metabolit taşınmasındaki bozukluklar, doğuştan gelen metabolizma hastalıkları ve kanser gibi çeşitli patolojilerle ilişkilidir. SLC ailesinin bazı üyeleri karakterize edilmiş olsa da, birçok üyenin spesifik moleküler substratları hâlâ tanımlanamamıştır. Bunun sebebi, dokuya özgü gen ekspresyon profilleri, izoformlar arasındaki fonksiyonel yedeklilik ve geniş substrat spesifitesidir. Bu faktörler detaylı fonksiyonel karakterizasyonu zorlaştırmakta ve bu proteinlerin metabolik patolojilerdeki rollerinin ve farmakolojik hedef olarak kullanılabilirliklerinin anlaşılmasını sınırlamaktadır.

SLC25 ailesinin üyeleri, kansere yönelik tedavilerin geliştirilmesinde potansiyel hedeflerden biri olabilir. Bu hedefleri keşfetmek için, her bir taşıyıcının işlevinin belirlenmesi ve taşıdığı substrat veya substratların tanımlanması gerekmektedir. Bu çalışmada, daha önce kanserle ilişkilendirilmiş bir taşıyıcı seçmeyi ve substratını ile fonksiyonunu belirleyerek kanserleşmedeki rolünü anlamayı amaçladık.

Bu çalışmada, SLC25A47 geni üzerine odaklanılmıştır. Bunun sebebi genin hepatoselüler karsinom (HCC) ile olan ilişkisinin daha önce bildirilmiş olması ve proteinin karaciğere spesifik ekspresyon göstermesidir. Bu yüksek doku özgüllüğü, SLC25A47'nin karaciğer fonksiyonu için kritik olan ve potansiyel olarak HCC tümör oluşumunda rol oynayan özel metabolik yollarla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. SLC25A47'nin, karaciğerde yürüttüğü metabolik işlev için gerekli

olan spesifik substrat(lar)ın mitokondriye taşınmasını sağladığı hipotezini ortaya koyduk. Bu ilişkiyi ortaya çıkararak, HCC tedavilerinde kullanılabilecek karaciğere özgü metabolik zayıflıkları aydınlatmayı amaçladık.

Son olarak, SLC25A47'nin hücrel ve organizma metabolizmadaki rolünü anlamak için, hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda mitokondriyal immünopresipitasyon (MITO-IP) yöntemini kullandık. MITO-IP, mitokondriyal metabolitlerin hassas profillenmesini sağlar ve mitokondri matriks içindeki konsantrasyonlarının ölçülmesine olanak tanır. Bu, mitokondrilerin immünopresipitasyon yoluyla izole edilmesi ve ardından sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi (LC/MS) kullanılarak özgün standartlarla hedefe yönelik metabolomik analiz yapılmasıyla gerçekleştirilir. SLC25A47 ile ilişkili potansiyel substratları belirlemek amacıyla, genetiği düzenlenmiş hücre ve fare modellerinde gen knockout ve knock-in stratejileri uyguladık. Genetik olarak modifiye edilmiş bu hatlar arasında mitokondriyal metabolit profillerini karşılaştırarak, SLC25A47 tarafından taşınan ve/veya düzenlenen spesifik metabolit(ler)i ortaya çıkarabilecek anlamlı değişiklikleri keşfetmeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mitokondrilerin genel özellikleri

“Mitochondrion” terimi, spermatogenez sırasında bu yapıların görünümünü tanımlayan Yunanca “mitos” (iplik) ve “chondros” (granül) kelimelerinden türetilmiştir. 1890 yılında Altmann, mitokondrileri organel olarak tanımlamıştır. Hücrel solunum ile mitokondriler arasındaki bağlantı ise ancak 1912 yılında Benjamin F. Kingsbury tarafından morfolojik gözlemler kullanılarak keşfedilmiştir. 1940'lar ve 1950'lerde organel izolasyon yöntemlerindeki ilerlemeler, mitokondriyal fonksiyonlar hakkında birçok önemli keşfin yapılmasını sağlamıştır. Kennedy ve Lehninger, mitokondrilerin ökaryotik hücrelerde oksidatif fosforilasyonun merkezi olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmayı, mitokondrilerin temel metabolik süreçler için gerekli enzimleri içerdiğini gösteren sayısız önemli araştırma izlemiştir.

Mitokondriler, bakterilerden köken almaları nedeniyle diğer organellerden ayrılmaktadır. Prokaryotlarla benzerliklerinden bir tanesi, mitokondriyal genomun dairesel yapısıdır; bu yapı, bakteriyel DNA'ya benzer şekilde intronsuz genlerden oluşur. Ayrıca, mitokondriyal protein sentezi, bakterilerde kullanılan modifiye bir amino asit olan N-formilmetiyonin ile başlar ve mitokondriyal mRNA'lar, ökaryotik mRNA'larda bulunan 5' başlık yapısını içermez; bu yönüyle bakteriyel mRNA yapısına benzerlik gösterir. Ek olarak, mitokondrilerde bulunan 12S ve 16S rRNA yapıları bakterilerdekine çok yakındır.

Yapısal olarak mitokondriler; matriks, iç zar (IMM), dış zar (OMM) ve zarlar arası boşluktan oluşur. Mitokondrilerin çapı genellikle yaklaşık 0,2 ile 1 µm arasında değişir ve hücresel ortama bağlı olarak sürekli bölünme (fizyon) ve birleşme (füzyon) yoluyla dinamik morfolojik değişiklikler geçirirler. İç mitokondriyal zar ile çevrili olan matriks, mitokondriyal metabolik enzimlerin çoğunu, mitokondriyal DNA'yı, ribozomları, kofaktörleri ve çeşitli organik ile inorganik molekülleri içerir. Bu zar iyonlara ve küçük moleküllere karşı yüksek seçicilik gösterir ve geçirgen değildir; bu nedenle, moleküllerin bu bariyer üzerinden taşınması için spesifik taşıyıcı proteinler gereklidir. Diğer karakteristik özelliklerinden biri, elektron taşıma zinciri bileşenleri ve taşıyıcı proteinleri barındıran, lipid çift tabakasının içe doğru kıvrımları olan kristalardır; bu yapılar zarın yüzey alanını önemli ölçüde artırarak oksidatif fosforilasyonu kolaylaştırır. Dış mitokondriyal zar, yapısal olarak plazma membranı ile benzerdir ve yaklaşık 6 kDa'dan küçük moleküllerin pasif difüzyonuna izin veren Porin isimli proteinleri içerir. Daha büyük proteinlerin mitokondriye taşınması ise özel bir mitokondri hedefleme sinyali gerektirir. Zarlar arası boşluğun bileşimi, protein içeriği dışında sitozol ile yakından benzerlik gösterir.

2.2. Mitokondrilerdeki SLC proteinleri

SLC (solute carrier) proteinleri, hücre ve organizma düzeyinde homeostazın sağlanması için gereklidir ve küçük moleküller ile iyonların zarlar arasında taşınmasında görev alırlar. İç mitokondriyal zara özgü olan SLC25 ailesi,

mitokondrideki en büyük taşıyıcı protein grubudur ve insanlarda 53 üyesi bulunur. Bu proteinler, 6 tane transmembran α -sarmal içeren, korunmuş bir yapıya sahiptir ve amino asitler, nükleotitler ve iyonlar gibi metabolitlerin mitokondri matriksi ile sitoplazma arasında taşınmasında hayati öneme sahiptir.

İlk olarak mayalarda tanımlanan SLC25 proteinleri, mitokondriyal fonksiyon ve hücre metabolizma açısından kritik bir rol oynar. Bu taşıyıcılardaki mutasyonlar metabolik bozukluklara neden olabilir ve kanser gelişimiyle ilişkilendirilmiştir. Genel olarak, SLC25 proteinleri metabolik yolların seçiminde görev alan kritik regülatörlerdir ve tümörlerin büyümesi, hayatta kalması, metastaz ve ilaç direnci gibi süreçleri etkilemektedir.

2.3. Mitokondriyal amino asit metabolizmasında karaciğerin önemi

Karaciğer; hormonal, nöral ve nütrisyonel sinyallere yanıt vererek metabolik durumlara uyum sağlayabilen hepatositler sayesinde, besin maddelerinin kullanılabilirliğini ve metabolik homeostazı düzenleyen başlıca organ olarak görev yapmaktadır. Lobüler düzeyde hepatositler, kan akışı doğrultusunda periportal bölgeden perisentral bölgeye uzanan üç metabolik zona ayrılmıştır. Bu metabolik zonlanma, eş zamanlı olarak, bölgelere özgü biyokimyasal süreçlerin gerçekleştirilmesine olanak tanır. Örneğin, periportal hepatositler, amino asit alımı, katabolizması ve üre sentezi gibi süreçleri gerçekleştirmektedir. Glutaminden amonyak üretimini sağlayan glutaminaz 2 (GLS2) enzimi bu bölgede eksprese edilmektedir. Buna karşılık, perisentral hepatositler fazla amonyağı yeniden glutamine dönüştüren glutamin sentetaz (GS) enzimini eksprese eder.

Hücre metabolizmasında hepatositlerin fonksiyonları, zengin organel içeriği ile desteklenir. Mitokondri ve endoplazmik retikulum, karaciğerin toplam protein kütlelerinin yaklaşık %80'ini oluşturur. Mitokondriler; trikarboksilik asit (TCA) döngüsü, oksidatif fosforilasyon, yağ asidi oksidasyonu, amino asit metabolizması ve amonyak detoksifikasyonu gibi temel metabolik süreçlerde görev alır ve aynı zamanda

hücrel enerji dengesinin ve besin algılamasının düzenlenmesinde merkezi bir rol üstlenir.

Karaciğer, altıgen lobüllerden oluşur ve her lobülün köşelerinde hepatik arter, portal ven ve safra kanalı içeren bir portal triad bulunur. Radyal olarak düzenlenmiş sinüzoidler, kanı santral vene doğru taşır. Hepatositler, santral ven ile portal triad arasındaki eksen boyunca konsantrik katmanlar halinde dizilmiştir. Hepatosit fonksiyonunu destekleyen parankim dışı hücreler de karaciğer lobülünün akseni boyunca dağılmıştır. Hepatositler tarafından sentezlenen safra, santral bölgeden portal alana doğru safra kanalikülleri aracılığıyla akar ve sonunda safra kanallarına ulaşır. Kan akışı ve içindeki bileşenler, mekânsal olarak derecelenmiş bir organizasyon oluşturur ve bu da farklı katmanlarda farklı işlevlerin gerçekleştirilmesini sağlamaktadır.

2.4. Hepatoselüler karsinom

Hepatoselüler karsinom (HCC), dünya genelinde en yaygın karaciğer kanseri türüdür. Başlıca risk faktörleri, kronik hepatit B (HBV) ve hepatit C (HCV) enfeksiyonlarıdır. Batı ülkelerinde ise metabolik sendrom ve diyabetle ilişkili olup alkole bağlı olmayan steatohepatit (NASH) giderek daha önemli bir etken haline gelmektedir. HCC vakalarının %90'ından fazlası, özellikle sirozu olan hastalarda, kronik karaciğer hastalığı zemininde gelişmektedir. Siroz, HCC için en güçlü altta yatan etken olup sirotik hastalarda en sık ölüm nedenidir.

Günümüzde HCC için tedavi seçenekleri önemli ölçüde ilerlemiştir. Karaciğer rezeksiyonu ve karaciğer nakli küratif tedavi olarak uygulanmaktadır. Erken evre, cerrahiye uygun olmayan hastalarda lokal ablasyon (örneğin, radyofrekans ablasyonu) tercih edilmekteyken orta evre hastalık için transarteriyel kemoembolizasyon yapılabilmektedir. İleri evrelerde immün checkpoint inhibitörleri, tirozin kinaz inhibitörleri ve monoklonal antikorlar gibi yeni sistemik tedaviler, tedavi stratejilerini yeniden şekillendirmektedir. Moleküler düzeyde, HCC tümörlerinin yaklaşık %25'i hedeflenebilir mutasyonlar taşımaktadır, ancak klinik uygulamada bu mutasyonlara

spesifik hedef tedaviler verilebilmesi henüz yaygınlaşmamıştır. HCC için yaygın ‘driver’ mutasyonlar şunlardır: TERT promotör mutasyonları, viral kaynaklı gen amplifikasyonları; tümör baskılayıcı genlerde (örneğin, *TP53*, *RBI*, *PTEN*) silinmeye yol açan mutasyonlar; *CCND1*, *FGF19*, *VEGFA*, *MYC* ve *MET* gibi onkogenlerin amplifikasyonu.

2.5. Mitokondriyal amino asit metabolizması ve üre siklusu

Amino asitler, organizma tarafından belirli koşullar altında enerji kaynağı olarak kullanılabilir. Protein alımının fazla olduğu durumlarda, yeni protein sentezi için gerekli olmayan amino asitlerin normal protein yıkımı sırasında ortaya çıkması durumunda veya açlık sırasında vücut proteinlerinden enerji elde edilmesi gerektiğinde kullanılmaktadır. Biyolojik olarak kullanılabilir azot kaynakları sınırlı olduğundan, organizmalar genellikle amino asitler, nükleotitler ve amonyak gibi azot içeren bileşikleri koruma eğilimindedir. Atmosferde bol miktarda bulunan azot gazı (N_2), kimyasal olarak inert olduğu için biyokimyasal kullanıma uygun değildir; bu nedenle az sayıda organizma azotu amonyak gibi kullanılabilir formlara dönüştürebilmektedir.

Ökaryotik hücrelerde amino asit katabolizması iki ana bileşeni içerir: amino grubunun uzaklaştırılması ve karbon iskeletinin parçalanması. Amino grubu genellikle piridoksal fosfat yardımıyla uzaklaştırılıp azot metabolizmasına katılırken, karbon iskeleti enerji üretimi için TCA döngüsünün ara ürünlerine dönüştürülür. Fazla azot, organizmaya bağlı olarak farklı formlarda dışarı atılır. Suda yaşayan hayvanlar (amonyotelik), amonyağı doğrudan atabilirken; memeliler de dahil olmak üzere çoğu kara hayvanı (üreotelik) amonyağı üreye dönüştürür; kuşlar ve sürüngenler (ürikotelik) ise ürik asit olarak dışarı atarlar.

Memelilerde üre döngüsü, amonyağı detoksifiye edip suda çözünebilen üreye çevirerek güvenli bir şekilde atılmasını sağlayan temel yoldur. Bu döngü yalnızca hepatositlerde gerçekleşir ve mitokondride glutamat veya glutaminden hidrolize edilen amonyakla başlar. Karaciğer dışı dokular genellikle azotu glutamine dönüştürür ve bu

glutamin karaciğere taşınır. Karaciğerde bulunan glutaminaz enzimi glutamindeki amonyağı serbestleştirir ve bu amonyak üre döngüsüne girer.

Üre döngüsü ilk olarak 1932'de Hans Krebs ve Kurt Henseleit tarafından tanımlanmıştır. Karaciğer dokusu ile yaptıkları deneylerde Krebs, ornitin ve amonyağın varlığında üre oluştuğunu göstermiştir. Devamında sitrülün ile arjinin gibi ara ürünleri tanımlayarak bu döngünün basamaklarını ortaya koydu.

Üre döngüsünün ilk adımı; amonyak, bikarbonat ve ATP'nin birleşerek karbamoil fosfat oluşturduğu ve karbamoil fosfat sentetaz 1 (CPS1) enzimi tarafından katalizlenen reaksiyondur. Bu adım, N-asetilglutamat sentaz (NAGS) tarafından sentezlenen ve arjinin tarafından uyarılan N-asetilglutamat (NAG) tarafından düzenlenir. Daha sonra ornitin transkarbamoilaz (OTC), ornitin ile karbamoil fosfatı birleştirerek sitrülün oluşturur. Sitrülün, mitokondriyal taşıyıcı SLC25A15 (veya SLC25A2) aracılığıyla sitozole taşınırken, aynı anda ornitin mitokondri içine alınır. Sitozolda sitrülün, glutamat ve okzaloasetatın transaminasyonu ile oluşan aspartat ile birleşerek arjinosüksinat oluşturur; bu reaksiyon arjinosüksinat sentetaz (ASS) tarafından katalizlenir. Arjinosüksinat daha sonra arjinosüksinat liyaz (ASL) tarafından arjinin ve fumarata ayrılır. Fumarat malata dönüştürülerek mitokondriye geri girer ve TCA döngüsüne katılır. Son olarak arjinaz (ARG1), arjininin üre ve ornitine ayrılmasını sağlar. Üre kana karışarak böbreklerden atılır, ornitin ise döngünün devam etmesi için mitokondriye geri taşınır.

Mitokondrideki amonyak, serbest amonyak ile glutamin ve glutamatın parçalanmasından köken alır; bu süreçler sırasıyla GLS2 ve glutamate dehidrogenaz (GDH) enzimleri tarafından sağlanır. Mitokondriye alınan glutamat, GDH reaksiyonuna girerek amonyak ve 2-oksoglutarat üretir. Glutamatın mitokondri içine taşınması, Citrin ve SLC25A22 taşıyıcıları aracılığıyla gerçekleştirilir. *SLC25A13* geni tarafından kodlanan Citrin, mitokondri iç zarında bulunan bir taşıyıcıdır ve bir antiporter olarak çalışarak, mitokondri matrisinden sitozole aspartat taşırken karşılığında glutamat alır. Buna karşılık, Glutamat Taşıyıcısı 1 olarak da bilinen SLC25A22, glutamat ve protonları (H⁺) mitokondri matrisine birlikte taşıyan bir

simporterdir. GDH aktivitesi ADP ve lösin tarafından uyarılırken, GTP bir inhibitör olarak görev yapar. GDH reaksiyonundan oluşan α -ketoglutarat, TCA döngüsüne katılır. CPS1, bikarbonat ve amonyağı karbamoil fosfata dönüştürmekten sorumludur ve bu süreç NAG tarafından aktive edilir. NAG, amino asit arjinin tarafından regüle edilen NAGS enzimi tarafından üretilir. OTC, ornitin ile karbamoil fosfatın sitruline dönüşümünü sağlar. Ayrıca, SLC25A15 (veya onun paralogu SLC25A2) taşıyıcısı olan ORNT1, sitrulin ve ornitin değişimini sağlayarak üre döngüsünün devamını sağlar. Üre döngüsü, ARG1 enzimi tarafından katalizlenen ve arjininin ornitin ve üreye ayrıştığı reaksiyonla sonlanır. ARG2 mitokondriyal bir arginaz formu olmasına rağmen, hepatositlerdeki spesifik işlevi henüz net değildir.

2.6. Üre siklusunun regülasyonu

Üre döngüsünün tek hız kısıtlayıcı enzimi olan karbamoil fosfat sentetaz 1 (CPS1), NAG tarafından allosterik olarak aktive edilir; bu da her iki molekülü memelilerde azot detoksifikasyonunun temel düzenleyicileri haline getirir. NAG ilk olarak 1950'li yıllarda *E. coli*'de arjinin biyosentezinin ara ürünü olarak tanımlanmış ve daha sonra memelilerde CPS1'in doğal kofaktörü olduğu belirlenmiştir. Memelilerde NAG, N-asetilglutamat sentaz (NAGS) tarafından sentezlenir ve bu enzim L-arjinin tarafından allosterik olarak aktive edilir; bu durum, daha alt organizmalarda görülen L-arjininle feedback inhibisyonunun tersidir.

Karbamoil fosfat sentetaz enziminin üç formu tanımlanmıştır: CPS1, CPS2 ve CPS3. CPS1 mitokondriyal, amonyak-bağımlı ve NAG ile aktive edilen bir enzimdir ve üre döngüsünde görev alır. CPS2 ise sitozolde bulunur, glutamin kullanır, NAG'den bağımsız çalışır ve CAD adı verilen trifonksiyonel bir enzim kompleksinin parçası olarak pirimidin biyosentezinin hız sınırlayıcı basamağını katalizler. CPS2, UTP tarafından allosterik olarak inhibe edilir. CPS3 ise bazı omurgasızlar ve deniz canlılarında (özellikle köpekbalığı) bulunur; glutamin kullanır ve NAG tarafından kısmen aktive edilir. Bu türlerde CPS3, vücutta üre birikimini sağlayarak osmotik dengeyi korumada rol oynadığı düşünülmektedir.

Alt organizmalarda, NAG glutamattan arjinin biyosentezine giden sekiz basamaklı bir yolun ilk ara ürünüdür ve bu sentez ya NAGS (*argA* geni) ya da ornitin asetiltransferaz (OAT, *argJ* geni) aracılığıyla gerçekleşir. Buna karşın, üreotelik canlılarda NAG sentezi yalnızca NAGS tarafından gerçekleştirilir. Ayrıca, memelilerde NAGS aktivitesi L-arjinin ile uyarılırken, alt organizmalarda bu enzim L-arjinin tarafından inhibe edilir. Memelilerde NAG'nin bilinen tek görevi, CPS1'in aktivasyonu için gerekli olan allosterik kofaktör olarak işlev görmektir. Arjinin sentezi ise memelilerde NAG aracılığıyla değil, doğrudan üre döngüsünün enzimatik bileşenleri ile gerçekleşir.

NAGS, mitokondride bulunan ve glutamat ile asetil-Koenzim A (KoA)'dan NAG sentezleyen bir enzimdir. Hepatositlerde glutamat; glutaminaz (GLS2) ve glutamat dehidrogenaz (GDH) enzimleri aracılığıyla sentezlenebileceği gibi, SLC25A22 ve Citrin gibi taşıyıcılar aracılığıyla sitozolden mitokondri matriksine taşınabilir. Asetil-KoA ise genellikle mitokondride yağ asitlerinin β -oksidasyonu ve pirüvat dehidrogenaz (PDH) kompleksi yoluyla üretilir. NAGS aktivitesi L-arjinin tarafından allosterik olarak aktive edilirken, metilmalonil-KoA ve propiyonil-KoA gibi bazı organik asitler tarafından asetil-KoA bağlanmasını engelleyerek kompetitif biçimde inhibe edilir.

NAGS aktivitesi ve karaciğer NAG düzeyleri, protein ve amonyak alımındaki artışla birlikte yükselir. Sıçanlarda yüksek proteinli diyetin, karaciğerdeki mitokondriyal NAG konsantrasyonunu artırmakta ve sitrülün üretimini hızlandırmakta olduğu gösterilmiştir. NAG'nin CPS1 üzerindeki düzenleyici rolü, sabit amonyak düzeyleri altında üre döngüsü akışının sağlanmasını mümkün kılmaktadır. Mitokondrideki arjinin ve/veya glutamat seviyeleri, organizmadaki azot birikimini yansıtır. Substrat olarak kullanılan glutamat ve allosterik aktivatör olan arjinin düzeyleri NAG sentezini etkiler.

Bir çalışmada sıçanlara amonyak verilmesi, karaciğerde mitokondriyal NAG seviyelerinde bir artışa yol açmış; ancak CPS1 miktarında bir değişiklik gözlenmemiştir. Bu durum, NAG'nin mitokondriden sitozole olan taşınımının

azalmasının bu birikime neden olabileceğini düşündürmektedir. Önceki bir çalışmada da benzer şekilde beslenen hayvanlarda NAG'nin yarı ömrü 14 dakika iken aç bırakılanlarda 60 dakikaya kadar uzadığı bildirilmiştir. Bu bulgular, NAG'nin yıkımının esas olarak mitokondriden sitozole taşınımıyla düzenlendiğini göstermektedir. Ayrıca, NAG'nin sitozolde glutamat ve asetata hidrolize edildiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir; bu da yıkım için öncelikle mitokondriden taşınması gerektiğini düşündürmektedir. Meijer ve ark. çalışması, karaciğer mitokondrisinin iç zarının NAG geçirgenliğini incelemiş ve *in vivo* ortamda bu taşınımın tek yönlü olduğunu, yani NAG'nin matriksten sitozole doğru taşındığını ortaya koymuştur.

2.7. Üre Siklusu Bozuklukları

Hepatik mitokondriler, portal sistemden gelen amino asitleri işlemek veya amino asitlerden enerji üretiminde kullanılan ara ürünleri sentezlemek için çok sayıda metabolik yola ev sahipliği yapar. Çoğu amino asidin metabolizması, mitokondriyal enzimlerin düzgün çalışmasına bağlıdır; bu yollardaki bozukluklar, özellikle doğuştan gelen amino asit metabolizması bozuklukları olmak üzere insanlarda çeşitli hastalıklara yol açabilir. Üre döngüsü enzimleri veya taşıyıcılarındaki bozulmalar, hiperammonemiye ve çeşitli üre döngüsü bozukluklarına yol açar. Bu bozukluklar genellikle kusma, halsizlik, epileptik nöbetler gibi belirtilerle kendini gösterir; özellikle katabolik stres veya protein fazlalığı durumlarında ortaya çıkar. Hiperammonemi, proksimal (mitokondriyal) üre döngüsü bozukluklarının temel belirtisidir ve acil tedavi gerektirir. Bu tedaviler arasında azot bağlayıcı ajanların kullanımı, diyetle protein alımının durdurulması ve ciddi vakalarda fazla amonyağın uzaklaştırılması için diyaliz yer almaktadır.

Hiperammoneminin yenidoğanlarda erken semptomları arasında beslenmede azalma, kusma, letarji ve uykululuk hali yer alabilir. Hiperammoneminin devam etmesiyle birlikte solunum yetmezliği, takipne, hiperventilasyon, respiratuvar alkaloz, hipotermi veya hipertermi ve hipotoni izlenebilmektedir. Hayatı tehdit eden semptomlar arasında akut ensefalopati, serebral ödem, nöbet, nörojenik postür, periferik dolaşım bozukluğu, çoklu organ yetmezliği ve koma yer alabilir. Hastaların

laboratuvar değerleri incelendiğinde karaciğer fonksiyon testlerinde artış, üre düzeylerinde azalma ve fizik muayenede hepatomegali görülebilir.

Bebeklerde, çocuklarda ve erişkinlerde hiperamonemi bulguları öncelikle fizyopatolojik değişikliklerle kendini gösterir. Ekstraselüler potasyum ve glutamin seviyeleri artar, osmolarite ve inflamatuvar sitokinlerde artış izlenir. Amonyak seviyeleri arttıkça psikiyatrik semptomlar da eklenmeye başlar. Bunlara örnek olarak davranış değişiklikleri, uyku bozuklukları, hiperaktivite, agresiflik, delüzyonlar ve psikoz verilebilir. Hiperamoneminin daha da yerleşmesiyle birlikte konfüzyon, letarji, migren tarzı baş ağrıları, tremor, ataksi, dizartri, öğrenme güçlüğü, nörogelişimsel gecikmeler, nöbetler, hemipleji ve koma gibi nörolojik etkilenmeler görülebilir. Bu yaş grubunda gastrointestinal semptomlar da ortaya çıkabilir. Karın ağrısı, bulantı ve kusma, kilo alamama, düşük protein toleransı veya proteinli besinlerden kaçınma gözlenebilmektedir. Aynı şekilde bu hastalarda hepatik enzimlerde artış, üre seviyelerinde azalma ve fizik muayenede hepatomegali görülebilmektedir.

2.7.1. Karbamoil Fosfat Sentetaz 1 (CPS1) Eksikliği

CPS1 eksikliği, klinik belirtileri diğer proksimal üre döngüsü bozukluklarına çok benzeyen, nadir görülen otozomal resesif bir hastalıktır. Karbamoil fosfat oluşumunun bozulması, idrarda orotik asit atılımının azalmasına yol açar. Bugüne kadar CPS1 geninde, 6. ekzon hariç tüm ekzonzara dağılmış birçok farklı mutasyon tanımlanmıştır.

2.7.2. Ornitin Transkarbamoilaz (OTC) Eksikliği

OTC enzimi esas olarak karaciğer ve ince bağırsakta eksprese edilir. OTC eksikliği, en yaygın görülen üre döngüsü bozukluğudur. X'e bağlı resesif kalıtım paternine sahip olduğu için, hastalık genellikle erkek hemizigot taşıyıcıları etkiler. Bugüne kadar OTC geninde 500'den fazla farklı patojenik mutasyon belgelenmiştir. Klinik semptomların şiddeti büyük ölçüde kalan enzimatik aktiviteye bağlı olarak değişkenlik gösterir. OTC aktivitesinin tamamen yokluğu, genellikle hemizigot

erkeklerde görülür ve yenidoğan döneminde ciddi hiperammonemiye yol açar. OTC eksikliği, görece yaygın olması, iyi tanımlanmış monogenik temeli ve mevcut prelinik modeller nedeniyle gen tedavisi için kapsamlı şekilde araştırılmaktadır.

2.7.3. N-Asetilglutamat Sentaz (NAGS) Eksikliği

NAGS eksikliği, en nadir görülen üre döngüsü bozukluklarından biridir; tahmini insidansı 3.500.000 ila 7.000.000 doğumda birdir. Klinik tablo genellikle bebeklik döneminde hiperammonemi ile ortaya çıkar. L-arjinin bağlanmasını etkileyen mutasyonlar (örneğin Glu360Asp varyantı) ve NAGS geninin kodlayıcı olmayan düzenleyici bölgelerindeki varyantlar, NAGS aktivitesini bozarak NAGS eksikliği fenotipine neden olabilir. NAGS eksikliği tedavisinde, NAGS'nin yerine geçebilen ve CPS1'i aktive eden biyoyararlanımı yüksek bir NAG analogu olan karglumik asit (N-karbamoilglutamat, NCG) kullanılır. Açıklanamayan hiperammonemi vakalarında, NCG uygulanması tanısal bir test olarak önerilmektedir.

2.7.4. Karbonik Anhidraz Va (CA-VA) Eksikliği

Karbonik anhidrazlar, karbondioksitin hidrasyonu yoluyla bikarbonat oluşumunu katalizleyen enzimlerdir. CA-VA ve CA-VB, mitokondride bulunan izoenzim formlardır. Hepatik mitokondrilerde bikarbonat, dört farklı enzimatik reaksiyonda kullanılır: karbamoil fosfat sentetaz 1, piruvat karboksilaz, propiyonil-KoA karboksilaz ve 3-metilkrotonil-KoA karboksilaz. CA-VA eksikliği, epizodik hiperammoneminin potansiyel bir nedeni olarak tanımlanmıştır. Metabolik dekompanasyon atakları sırasında yüksek amonyak düzeylerinin yanı sıra laktik asidoz ve ketonüri görülmektedir. Diğer üre döngüsü bozukluklarına kıyasla semptomlar yaşamın daha ileri dönemlerinde ortaya çıkabilir. CPS1 reaksiyonu için gerekli bikarbonatın eksikliği, proksimal üre döngüsü bozukluğu fenotipi ortaya çıkmasına katkıda bulunur. Özellikle, NCG'nin CA-VA eksikliği olan hastalarda hiperammonemiye tedavi etmede etkili olduğu gösterilmiştir. Kesin mekanizma henüz net olmamakla birlikte, bikarbonat eksikliğinin propiyonil-KoA karboksilaz aktivitesini etkilediği ve propiyonil-KoA'nın birikimine yol açtığı öne sürülmektedir.

Propiyonil-KoA'daki bu artış, asetil-KoA ile rekabet ederek NAGS aktivitesini engeller ve bu da NAG üretiminin azalmasına neden olur. NAG ve bikarbonattaki eşzamanlı azalma CPS1 aktivitesini bozar ve ikincil hiperammonemiye yol açar. Sonuç olarak NCG, CA-VA eksikliğinde NAG eksikliğini atlayarak CPS1 fonksiyonunun geri kazanılmasına yardımcı olabilir.

2.7.5. Hiperornitinemi-Hiperammonemi-Homositrullinüri Sendromu

Hiperornitinemi-hiperammonemi-homositrullinüri (HHH) sendromu, *SLC25A15* geninde meydana gelen bozukluk sonucu oluşan otozomal resesif bir üre döngüsü bozukluğudur. Bu gen, ornitin taşıyıcısı 1 (ORC1) proteinini kodlamaktadır. ORC1 proteinin işlevinin bozulması, sitozolde ornitin birikimine neden olur. Bunun sonucunda mitokondriyal ornitin düzeyleri azalır, bu da OTC aktivitesini düşürerek karbamoil fosfat seviyelerinin artmasına ve hiperammonemiye yol açar. Artan karbamoil fosfat, pirimidin sentez yoluna girerek idrarda artmış orotik asit atılımına neden olur. HHH sendromunun klinik belirtileri, diğer proksimal üre döngüsü bozukluklarıyla benzerlik gösterir.

2.7.6. Üre Döngüsü Bozuklukları için Tedavi Yöntemleri

Karaciğerdeki mitokondriyal amino asit metabolizması; azot atılımı, enerji üretimi, redoks dengesi ve protein biyosentezi gibi çeşitli fizyolojik işlevleri destekler. Bu süreçler oldukça düzenli şekilde işler, vücuttaki besin seviyelerine dinamik olarak uyum sağlar. Genetik mutasyonlar ya da sonradan edinilen patolojiler nedeniyle amino asit metabolizma yollarının bozulması, özellikle merkezi sinir sistemini etkileyen sistemik toksisiteye yol açabilir. Doğuştan gelen birçok metabolizma hastalığı, mitokondriyal enzimlerde veya taşıyıcılarda meydana gelen bozukluklardan kaynaklanmaktadır ve toksik metabolit birikimi, hiperammonemi ve metabolik dekompanseasyon atakları görülmektedir.

Anormal metabolit düzeyleri; hastalığın anlaşılması, tanısı ve takibi açısından önemli bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Mevcut tedaviler, toksik maddelerin

vücuttan uzaklaştırılmasına, gerekli besin veya kofaktörlerin takviyesine, metabolit birikimini önlemeye yönelik diyet değişikliklerine ve hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak için ara ürün seviyelerini sınırlamaya yöneliktir. Ancak enfeksiyonlar veya bazı ilaçlar gibi stres faktörleri, akut dekompanseasyonu tetikleyebilir ve bu durum acil müdahale gerektirmektedir. Sık dekompanseasyon, tedaviye uyumsuzluk ya da klinik durumun ciddi şekilde kötüleştiği vakalarda tedavi daha da zorlaşır. Kontrol altına alınamayan semptomların olduğu hastalar için karaciğer nakli en etkili seçenek olarak kabul edilmektedir; çünkü sağlıklı karaciğerle beraber eksik olan enzim aktivitesini geri kazandırılır. Üre döngüsü bozuklukları ve organik asidemiler gibi hastalıklar, çocuklarda karaciğer naklinin en yaygın nedenleri arasında yer alır. Karaciğer nakli bu hastalarda klinik sonuçları iyileştirir; ancak transplantasyonun yeterli sayıda organ bulunamaması, cerrahi riskler ve ömür boyu süren immünsüpresyon yükü gibi çeşitli limitasyonları bulunmaktadır.

Yeni teknolojiler, özellikle monogenik hastalıkların tedavisini köklü bir şekilde değiştirmektedir. Adeno-ilişkili virüs aracılı gen ekleme ve mRNA aktarımı gibi gen tedavisi teknikleri, propiyonik asidemi ve OTC eksikliği gibi hastalıklar için klinik olarak test edilmektedir. Bu yöntemler, karaciğer hücrelerinde enzim aktivitesini doğrudan geri kazandırmayı hedefleyerek uzun vadeli tedavi imkanı sunmaktadır. Örneğin, geç başlangıçlı OTC eksikliği olan hastalarda DTX301 adlı tedavinin faz III düzeyinde, randomize, çift kör, plasebo kontrollü bir klinik çalışması yürütülmektedir (NCT05345171). DTX301 tedavisinde insan OTC genini kodlamak için adeno-ilişkili virüs serotip 8 kullanılmaktadır. Yakın zamanda Musunuru ve ark. yenidoğan bir hastada CPS1 eksikliğini hedef alan, kişiye özel, lipid nanoparçacık aracılı baz düzenleme yaklaşımını ortaya koymuşlardır. Bu tedavi yönteminde, CPS1 Q335X stop mutasyonunu düzeltmek amacıyla *kayjayguran abengcemeran* veya *kabe* olarak adlandırılan bir adenin baz düzenleyicisi kullanılmıştır. Tedavi sonrası plazma amonyak düzeylerindeki düşüş, zararlı CPS1 varyantının başarıyla düzeltildiğinin bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Sürekli izlem gerekli olmakla birlikte, bu araştırma metabolik hastalıkların tedavisinde kişiselleştirilmiş genom düzenleme tekniklerinin kullanımında kayda değer bir ilerlemeye işaret etmektedir.

Genom düzenleme ve taşıyıcı hedefleme alanlarındaki eş zamanlı gelişmeler, tedavi seçeneklerini geleneksel enzim eksikliklerinin ötesine taşıyabilir.

Metabolik reaksiyonlar fizyolojik işlevlerin merkezinde yer aldığından, metabolomik profillemeye, hastalıklar ile belirli metabolik yollar arasındaki daha önce bilinmeyen bağlantıların keşfedilmesini sağlamıştır. İnsan metabolomu üzerine yapılan kapsamlı son dönem Genom Düzeyinde İlişkilendirme Çalışmaları (GWAS), metabolik profillerdeki bireysel farklılıklar üzerinde önemli genetik etkiler olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, gen ekspresyonunun genetik modellerini, genler tarafından yönlendirilen metabolit seviyelerinin düzenlenmesiyle birleştiren GeneMAP (Gen-Metabolit İlişkisi Tahmin Platformu) gibi sistemler, metabolik gen fonksiyonlarını belirlemek amacıyla geliştirilmiştir. Bu platformlar, hastalıkların altında yatan mekanizmaları daha iyi anlamamıza yardımcı olma potansiyeli taşımaktadır. Genel olarak, karaciğerdeki mitokondriyal amino asit metabolizmasının mekanistik yönlerine dair bilginin derinleşmesi, nadir hastalıkların yönetilmesine ve kanser gibi hastalıklara yönelik yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

2.8. Mitokondriyal amino asit metabolizması ve kanser

Metabolik yeniden programlama, kanserin temel özelliklerinden biridir ve kanser hücrelerinin çoğalma ve hayatta kalma süreçlerini sürdürebilmek için metabolik yollarını çeşitli koşullara uyacak şekilde değiştirme yeteneğini yansıtır. Bu adaptasyona klasik bir örnek Warburg etkisidir; kanser hücreleri, oksijen varlığında bile glikozu laktata dönüştürmeyi tercih eder. Kanserle ilişkili metabolik değişimlerin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması tümör biyolojisinin daha iyi anlaşılmasını sağlar ve kanser hücrelerinin metabolik zayıflıklarını hedef alan yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için önemli fırsatlar sunar.

Amino asit metabolizması, kanser hücrelerinin hayatta kalmasını destekleyen protein sentezi ve enerji üretimi gibi süreçlerde önemli rol oynamaktadır. Epigenetik düzenleme, protein ve nükleik asit metilasyonu aracılığıyla tek karbon metabolizmasıyla yakından ilişkilidir. Metiyonin adenosiltransferaz, metiyonini S-

adenosilmetiyonine (SAM) dönüştürerek, bu bileşiğin başlıca metil donörü olarak işlev görmesini sağlar. SAM, proteinlerdeki lizin ve arjinin kalıntılarının yanı sıra DNA, RNA ve metabolitlerin modifikasyonunda kullanılır. Bu süreçten sonra SAM, demetilasyonla S-adenosilhomosisteine (SAH) dönüşür. Tümör baskılayıcı genlerin metilasyon yoluyla susturulması SAM düzeylerine bağlı olan bir süreçtir ve birçok kanser türünün gelişiminde kritik bir ilk adımdır. Glutasyon (GSH), canlı organizmalarda en yaygın bulunan antioksidandır ve hücrel redoks dengesinin korunmasında temel bir rol oynar. Bu üçlü peptid yapı glutamik asit, sistein ve glisinden oluşur. GSH, kanserin ilerlemesinde çift yönlü bir işleve sahiptir. GSH düzeylerinin azalması, oksidatif strese karşı artan bir duyarlılıkla ilişkilidir; bu durum, kanserin ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Öte yandan, hücre içi GSH düzeylerinin yüksek olması, hücrenin antioksidan kapasitesini artırarak oksidatif hasara karşı direnç sağlar. Bu da çeşitli malign hücrelerde yaygın olarak görülen bir durumdur.

Glutamat dehidrogenaz 1 (GLUD1), farklı kanser türlerinde farklı etkiler gösterebilir. Örneğin, GLUD1 bazı malign tümörlerde, özellikle küçük hücre dışı akciğer kanseri (NSCLC) gibi, aşırı ifade edilirken; hepatoselüler karsinomda (HCC) baskılanmıştır. GLUD1 ve GLUD2'yi inhibe eden epigallokateşin gallat'ın (EGCG), IDH1 mutasyonu taşıyan kanser hücre serilerinin çoğalmasını *in vitro* ortamda baskıladığı gösterilmiştir. Başka bir GLUD1 inhibitörü olan R162, NSCLC hastalarından türetilmiş xenograft fare modellerinde hücre çoğalmasını etkili biçimde azaltarak umut verici sonuçlar vermiştir.

Çeşitli kanser türleri, proliferatif kapasitelerini sürdürmek için ana enerji kaynağı olarak glutamini kullanır. Bu genellikle glutamin alımının artması ve glutaminolizis yolunun aktive edilmesiyle gerçekleşir. Karaciğer tipi glutaminaz (*GLS2* tarafından kodlanır), tümör oluşumunda tümör tipine bağlı olarak hem tümör baskılayıcı hem de tümör destekleyici etkiler gösterebilmektedir. Saha ve ark., Oncomine veritabanını kullanarak yaptıkları çalışmada, *GLS2* geninin mesane, kolon, rektum, baş-boyun, periton ve akciğer kanserlerinde belirgin şekilde aşırı ekspres olduğunu; buna karşılık beyin, karaciğer ve pankreas kanserlerinde ifadesinin anlamlı derecede azaldığını bulmuşlardır. Karaciğer kanserinde *GLS2*'nin tümör baskılayıcı

rollerini araştıran Suzuki ve ark. ise, GLS2'nin *in vivo* olarak hepatoselüler karsinomu ferroptozis indüksiyonu yoluyla baskılayabildiğini göstermişlerdir. Bu etki, glutamatin α -ketoglutarata dönüştürülmesi sırasında artan ROS üretimiyle sağlanmaktadır.

Kanserde metabolik yeniden programlamanın bir diğer örneği, küçük hücre dışı akciğer kanseri (NSCLC) alt tiplerinden birinde önemli olduğu gösterilen karbamoil fosfattır (CP). CP sitozolde CAD olarak bilinen trifonksiyonel bir enzim tarafından, mitokondride ise CPS1 tarafından sentezlenir. CAD, *de novo* pirimidin biyosentezi yolağında glutamin, karbondioksit ve ATP'yi substrat olarak kullanarak karbamoil fosfat üretir. NSCLC hücreleri ise CPS1'i aşırı ifade ederek mitokondride CP seviyelerinin artmasına ve bu CP'nin sitozole taşınıp pirimidin biyosentezine katılmasını sağlar. Buna karşılık, HCC'de CPS1 ifadesi sıklıkla hipermetilasyon yoluyla baskılanır. CPS1 düzeylerinin düşük olması, CAD ekspresyonunun artışıyla ilişkilendirilmiştir ve bu durumun, glutaminin CAD reaksiyonuna yönlendirilmesini kolaylaştırdığı düşünölmektedir.

OTC düzeylerinin azalması, CP'nin substrat olarak yeterince kullanılmaması nedeniyle mitokondride birikmesine yol açabilir. OTC ifadesinin azalması, ornitinin kanser hücrelerinin hayatta kalmasını destekleyen poliamin biyosentezi gibi alternatif metabolik yollara yönlendirilmesini kolaylaştırır. OTC ifadesinin azalması HCC hasta örneklerinde de bildirilmiştir.

2.9. Mitokondriyal bir proteaz olan YME1L1

Mitokondriyal homeostazın sürdürölmesinin önemli parçalarından bir tanesi protein kalite kontrol mekanizmalarının sorunsuz çalışmasıdır. Mitokondri içinde, farklı alt bölmelere dağılmış, özğün substrat özğüllüklerine sahip çeşitli ATP'ye bağlı proteolitik kompleksler bulunur. Bu kompleksler mitokondriyal proteostazın korunmasında kritik roller üstlenir. Bu önemli proteolitik sistemler arasında, m-AAA ve i-AAA proteazları bulunmaktadır. İç mitokondriyal membrana gömölü olarak konumlanan bu proteazların katalitik bölgeleri birbirlerine zıt yönlere sahiptir. i-AAA

proteazları proteolitik aktivitesini intermembran boşlukta gerçekleştirir ve bu tür proteazlara örnek olarak YME1L1 verilebilir. Buna karşılık, m-AAA proteazları proteolitik aktivitesini mitokondri matriksi yönünde gösterir ve en bilinen örneği AFG3L2 proteazıdır.

AAA proteazları, protein kalite kontrolü, mitokondriyal morfolojinin düzenlenmesi ve ETC komplekslerinin biyogenezi gibi çeşitli mitokondriyal süreçlerde görev alır. YME1L1, mitokondriyal füzyonun kilit düzenleyicisi olan OPA1'in proteolitik işlenmesini gerçekleştirir. Ayrıca YME1L1, Tim17A ve OMA1 dahil olmak üzere birçok başka substratı da hedef alarak mitokondriyal dinamiklerin düzenlenmesine katkıda bulunur. Buna ek olarak MacVicar ve ark., mTORC1–LIPIN1–YME1L eksenini mitokondriyal proteostazın post-translasyonel düzenleyicisi olarak tanımlamış ve mitokondriyal besin metabolizması ile proteaz sistemi arasında bir bağlantı olabileceğini öne sürmüştür.

3. MATERYAL VE METOTLAR

3.1. Hücre hatları ve kültür koşulları

İnsan hücre hatları HEK293T ve HepG2, ATCC'den temin edilmiştir. Tüm hücre hatlarının mikoplazma içermediği doğrulanmıştır. HEK293T hücreleri, 2 mM glutamin, %10 fetal sığır serumu ve %1 penisilin/streptomisin içeren RPMI-1640 ortamında kültüre edilmiştir. HepG2 hücreleri ise 4,5 g/L glukoz, 110 mg/L piruvat, 4 mM glutamin içeren ve %10 fetal sığır serumu ile %1 penisilin/streptomisin ilavesiyle desteklenen DMEM ortamında kültüre edilmiştir. Tüm hücreler 37 °C'de, %21 O₂ ve %5 CO₂ ortamının sağlandığı inkübatörlerde muhafaza edilmiştir.

3.2. Knockout ve cDNA overekspresyon hücre hatlarının oluşturulması

Aşırı ekspresyon hücre hatları için, insan SLCA25A47, 3xFlag-SLC25A47 ve NAGS'nin kodlama dizilerini içeren sentetik gen parçaları Twist Biosciences tarafından sentezlendi. SLC25A47, 3xFLAG-SLC25A47 ve NAGS'ye ait cDNA'lar,

Gibson klonlama yöntemiyle pMXS-IRES-BLAST veya pLV-EF1a-IRES-Puro vektörlerine klonlandı. pMXS-IRES-BLAST vektörü BamHI ve NotI ile, pLV-EF1a-IRES-Puro ise EcoRI ve BamHI ile lineerleştirildi.

Knockout hücre hatları için, *SLC25A47* ve *YME1L1* genlerine özgü sgRNA'ların klonlanması için gerekli oligonükleotidler IDT tarafından sentezlendi ve lentiCRISPRv2-Opti plazmidine (BsmBI ile lineerleştirilmiş) Gibson klonlama yöntemiyle eklendi. Knockout hücreler, puromisin veya blastisidin ile seçildikten sonra FACS kullanılarak tek hücre klonlaması ile izole edilip çoğaltıldı.

sgRNA veya cDNA içeren vektörler; Delta-VPR (lentivirüs için, pLV) veya Gag-Pol (retrovirüs için, pMXs) gibi paketleme vektörleri ve pCMV-VSV-G ile birlikte HEK293T hücrelerine XTremeGene 9 transfeksiyon reaktifi kullanılarak eşzamanlı olarak transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra virüs içeren süpernatant toplandı ve 0.45 µm filtre ile süzüldü. Hedef hücreler, 6 kuyucuklu doku kültürü plakalarında, filtrelenmiş viral süpernatantın kültür ortamına 4 µg/mL polybrene ile eklenmesi ve ardından 2200 rpm'de 80 dakika santrifüjlenmesiyle enfekte edildi. Ertesi gün ortam değiştirilerek geriye kalan virüs ortamdan uzaklaştırıldı.

pMXS-IRES-BLAST taşıyan hücreler blastisidin, pLV-EF1a-IRES-Puro taşıyan hücreler ise puromisin ile seçildi. Endojen *SLC25A47* proteini için güvenilir bir antikor olmadığından, sg*SLC25A47* ile transfekte ya da transdükte edilen hücreler, genomik DNA'nın Sanger sekansına dayalı olarak Synthego tarafından geliştirilen ICE (Inference of CRISPR Edits) analiz yöntemiyle değerlendirildi. Tüm yapılar için, gen eklenmemiş boş vektörler kontrol olarak kullanıldı. Her yapı, Sanger dizileme yöntemiyle doğrulandı.

3.3. Fareler

3.3.1. Slc25a47-knockout farelerin oluşturulması

Slc25a47-KO fareleri, ekson 2'de indel oluşturup SLC25A47 proteininin translasyonunu sonlandırmak amacıyla Cas9/gRNA RNP kompleksinin C57BL/6J fare zigotlarına enjekte edilmesiyle oluşturulmuştur. Slc25a47'nin ekson 2'sine bağlanan iki gRNA'nın, off-target potansiyeli CRISPOR aracıyla değerlendirilmiştir ve fare embriyolarındaki on-target etkinliği temel alınarak seçim yapılmıştır. gRNA'yı bir araya getirmek için sentetik crRNA ve tracrRNA kullanılmıştır. gRNA ve Cas9 proteini içeren mikroenjeksiyon kokteyli hazırlama yöntemi daha önce tanımlandığı şekliyle uygulanmıştır.

3.3.2. Fare plazmasının metabolik analizi

Farelerin kanı submandibular damardan lanset yardımıyla EDTA içeren tüplere alınmış ve 4 °C'de, 500 × g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanttan 5 µL, amino asit standartları içeren %75 asetonitril/%25 metanol'den 45 µL ilave edilip karıştırılmıştır. Karışım, 4 °C'de >14.000 × g hızda 10 dakika santrifüj edilmiş, ardından -80 °C'de saklanmıştır.

3.3.3. Fare serumundan BUN (kan üre azotu) ölçümü

BUN (Kan Üre Azotu), kanda bulunan üre miktarını ölçer. Bu test hem karaciğer hem de böbrek fonksiyonlarının önemli bir göstergesidir çünkü üre karaciğerde üretilir ve böbrekler yoluyla vücuttan atılır. BUN tayini, bağlantılı bir enzimatik reaksiyon sistemine dayanır. İlk adımda, üre, üreaz enzimi tarafından amonyak ve karbondioksit parçalanır. Açığa çıkan amonyak, NADH varlığında α-ketoglutarat ile reaksiyona girerek glutamat oluşturur. Bu süreçte NADH, eşit oranda oksitlenir ve 340 nm dalga boyunda absorbans azalması meydana gelir. Bu absorbans azalması, örnekteki üre azotu konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

3.3.4. Fare tümör deneyleri

NSG farelerine, tümörler maksimum hacim olan 2 cm³'e ulaşmadan önce, 4 hafta sonunda ötenazi yapıldı. Subkutan tümör oluşumu için, 1×10^6 HepG2 hücresi, %30 Matrigel içeren 100 µL serumsuz DMEM ortamında süspanse edilerek farelerin yan taraflarındaki deri altına enjekte edildi. Her fareye farklı deney grupları her iki yanına ayrı ayrı uygulandı. Fareler ötenaziyle sonlandırıldıktan sonra tümörler çıkarılıp tartıldı.

3.4. Western blot

Kültüre edilen hücreler için, 1×10^6 hücre soğuk PBS ile yıkandı ve Triton lizis tamponu içinde, 1:200 oranında proteaz inhibitör kokteyli eklenerek lizise uğratıldı. Doku örnekleri için, 10–20 mg doku örneği soğuk PBS ile yıkandı, mikro santrifüj tüplerinde homojenize edildi ve EDTA içermeyen proteaz inhibitör kokteyl tableti ilavesiyle Triton lizis tamponu içinde lizise uğratıldı. Lizatlar sonikasyona tabi tutuldu, 1.000 × g'de santrifüj edildi ve süpernatant protein lizatı olarak toplandı. Toplam protein, protein standardı olarak sığır serum albümini kullanılarak BCA Protein Assay Kit'i ile kantitatif olarak belirlendi ve örnekler arasında eşit seviyelere ayarlandı. Protein örnekleri 95 °C'de 5 dakika kaynatıldı, %10–20 SDS-PAGE jellerinde ayrıştırıldı. Transfer sonrasında %5 BSA içeren Tris-tamponlu salin (TBS) ve %0,1 Tween-20 (TBS-T) ile bloklama sonrası, PVDF membranlar 4 °C'de birincil antikolarla bir gece inkübe edildi. Membranlar TBS-T ile yıkandıktan sonra, ikincil antikolarla oda sıcaklığında 1 saat inkübasyon yapıldı. İkincil antikolar olarak anti-mouse IgG–HRP bağlı ve anti-rabbit IgG–HRP bağlı kullanıldı ve 1:3000 oranında seyreltildi. Membranlar TBS-T ile iyice yıkandıktan sonra görüntüleme yapıldı.

3.5. İmmünofloresan

HEK293T hücreleri, poli-D-lizin kaplı lamalar üzerine ekildi. Deney günü, hücreler üç kez PBS ile yıkandı ve PBS içinde %4 formaldehit ile 15 dakika fikse edildi. Ardından tekrar yıkandı ve %0,1 Triton-X 100 ile geçirgenleştirildi. Hücreler,

%1 sığır serum albümini ile 30 dakika bloklandıktan sonra, birincil antikorlarla 4 °C'de bir gece boyunca inkübe edildi. Lamlar üç kez PBS ile yıkandıktan sonra, 1:300 dilüsyonda hazırlanmış ikincil antikorlarla boyandı. Antikorla işaretlenen lamlar, DAPI (100 ng/ml) ile boyandı. Üç PBS yıkamasının ardından, lameller cam lamlar üzerine ProLong Gold Antifade Mountant kiti ile monte edilerek oje ile kapatıldı. Konfokal görüntüleme gerçekleştirildi.

3.6. Mitokondriyal immünopürifikasyon

3.6.1. Hücrelerden mitokondriyal immünopürifikasyon

Mitokondriler, 3×HA–OMP25–mCherry ve 3×Myc–OMP25–mCherry (kontrol) eksprese eden HEK293T ve HepG2 hücrelerinden saflaştırılmıştır. Kısaca, 25–30 milyon hücre toplanmış ve soğuk salin (%0.9 NaCl) ile iki kez yıkanmış, ardından 1 ml soğuk KPBS ile kazınarak toplanmıştır. Toplanan hücreler 1.000 × g'de 1,5 dakika, 4 °C'de santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Hücreler 1 ml KPBS içinde yeniden süspansiyon edilmiştir. Hücrelerin 10 µL'si tüm hücre proteini örneği elde etmek üzere 1% Triton lizis tamponu içeren 40 µL'ye; başka bir 10 µL'lik kısım ise doğrudan tüm hücre metabolitlerinin ekstraksiyonu için %80 metanol 50 µL'ye aktarılmıştır. Kalan örnek, bir set 20 darbe ve bir set 10 darbe olacak şekilde 2 ml'lik bir homojenizatörle homojenize edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen homojenat, 4 °C'de 5 dakika boyunca döner çalkalayıcıda 200 µL KPBS ile önceden yıkanmış anti-HA manyetik boncuklarla inkübe edilmiştir. Boncuklar soğuk KPBS ile üç kez yıkandıktan sonra, hacimlerinin %10'u protein ekstraksiyonu için %1 Triton tamponu ile, kalan %90'ı ise ağır izotop etiketli amino asit standartları içeren %80 metanolde, 4 °C'de 10 dakika boyunca döner çalkalayıcıda inkübe edilerek ekstrakte edilmiştir. Numuneler daha sonra 20.000 × g'de santrifüj edilerek olası hücre kalıntıları veya boncuk kontaminasyonları uzaklaştırılmıştır. Numuneler, kurutma işlemi uygulanmaksızın LC-MS ile polar metabolit profillemesine tabi tutulmuştur. Elde edilen veriler sitrat sentaz (CS) protein düzeyi (Western blot ile) veya NAD⁺ miktarına göre normalize edilmiştir.

3.6.2. Dokulardan mitokondriyal immünopürifikasyon

Karaciğer, punch biyopsi aleti kullanılarak çıkarıldıktan hemen sonra soğuk KPBS ile üç kez yıkanmıştır. İki parça karaciğer dokusu (toplam ~50 mg), 1 mL KPBS içerisinde, homojenizatör kullanılarak 4 °C soğuk odada 220 rpm hızla doku tamamen homojen hale gelene kadar homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat, santrifüj tüpüne aktarılmış ve 4 °C’de, 1.000 × g’de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatanttan 10 µL alınarak, yapılacak ileri analiz türüne (metabolit veya protein ekstraksiyonu) göre uygun ekstraksiyon tamponu ile işleme alınmıştır. Kalan süpernatant, önceden KPBS ile üç kez yıkanmış anti-HA boncukları ile 4 °C’de, döner çalkalayıcıda 5 dakika immünopresipitasyona tabi tutulmuştur. Bağlanmamış materyalin uzaklaştırılması için KPBS ile üç kez yıkanmıştır. Son yıkamada, boncuk süspansiyonunun %50’si protein ekstraksiyonu ve Western blot amacıyla ayrılmış, KPBS aspire edilerek boncuklar 50 µL Triton lizis tamponu ile karıştırılmıştır. Kalan kısım ise ağır izotoplar ile işaretlenmiş amino asit standartları içeren %80 metanol kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Girdi örneklerinden ve immünopresipite edilmiş protein örneklerinden 5 µL alınarak 45 µL Triton lizis tamponu ile seyreltilmiş ve Western blot analizinde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

3.7. LC/MS ile metabolit profillemeye

Deneyden iki gün önce, yaklaşık 300.000 HEK293T hücresi 6 kuyucuklu plakalara ekildi. Farmakolojik işlemleri takiben, hücreler hızla %0,9 NaCl ile iki kez yıkandı ve polar metabolitler, tamamen ¹⁵N ve ¹³C ile işaretlenmiş amino asit standartları içeren %80 metanol kullanılarak ekstrakte edildi. Hücre ekstraktları 4 °C’de 10 dakika döndürülerek karıştırıldı, çözünmeyen hücre kalıntılarının uzaklaştırılması için 19.000 × g’de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant, azot gazı üflenerek kurutuldu ve analiz öncesine kadar -80 °C’de saklandı. Metabolit miktarları, BCA Protein Assay Kit ile ölçülen toplam protein miktarına normalize edildi. Relatif metabolit seviyeleri, internal metabolit kontrollerine normalize edildi.

3.8. LC/MS ile tüm hücre ve mitokondri metabolitlerinin kantifikasyonu

MitoIP ekstraktları (%80 metanol içinde) 10 saniye vorteks ile karıştırıldı, 4 °C'de $20.000 \times g$ 'de 30 dakika santrifüj edildi ve süpernatanttan 5 μ L'lik örnek, ZIC-pHILIC 150 \times 2.1 mm kolonu üzerine enjekte edildi. Kurutulmuş polar ekstraktlar, %50 asetonitril içeren 60 μ L tamponda çözündürülüp 20 saniye vortex yapıldıktan sonra aynı koşullarda santrifüj edildi ve 5 μ L süpernatant enjekte edildi. LC-MS analizi, Ion Max kaynak ve HESI II problu Dionex Ultimate 3000 UPLC sistemiyle entegre bir Q Exactive orbitrap kütle spektrometresi kullanılarak yürütüldü.

3.9. FACS temelli CRISPR taraması

Split mNeonGreen2-SLC25A47 ve split mNeonGreen2-MICU1 cDNA'larını birlikte eksprese eden HEK293T hücrelerinden tek hücreli bir klon, FACS tabanlı ayırma işleminden sonra 96 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına ortalama <0.5 hücre yoğunluğunda ekilerek elde edildi. Bu klon daha sonra çoğaltıldı ve tarama (screen) için kullanıldı. Kısaca, kütüphanedeki sgRNA sayısının yaklaşık 1000 katı kadar hücre, MOI (multiplicity of infection) değeri 0.5 olacak şekilde enfekte edildi. Enfekte edilen hücreler, enfeksiyondan 48 saat sonra 2 μ g/ml puromisin ile 3 gün boyunca seçildi. Ardından puromisin ortamdan çıkarıldı ve hücrelerin toparlanmasına 2 gün izin verildi. Daha sonra hücreler tripsinizasyonla toplandı, soğuk PBS ile yıkandı ve süspansiyon halinde soğuk metanol, hücre süspansiyonuna yavaşça karıştırılarak %80'lik son derişime ulaşılacak şekilde damla damla eklendi. Sorting işleminden önce hücreler, damla damla PBS eklenerek yeniden sıvı hale getirildi. Ardından hücreler pelet haline getirilip soğuk PBS ile iki kez yıkandı ve FACS tamponunda (PBS içinde %0.5 BSA ve 2 mM EDTA) süspanse edildi. Hücreler FACS tamponuyla iki kez yıkandı ve 70 μ m'lik hücre filtresinden geçirildi. FITC sinyal şiddetine göre Sony MA900 sorting cihazı ile sıralandı. Mitokondriyal proteaz taraması için, mNeonGreen yüksek sinyalli hücrelerin yaklaşık %3'ü ve düşük sinyalli hücrelerin yaklaşık %10'u toplandı. Sıralama öncesi ve sonrası hücrelerden genomik DNA, Qiagen Blood & Cell Culture DNA Midi Kit ile izole edildi; sgRNA dizileri PCR ile çoğaltıldı ve Illumina MiSeq veya NextSeq 500 platformlarında dizilendi. Gen skorları, sıralanmış

fraksiyonlardaki sgRNA miktarlarının sıralama öncesi kontrol grubuna göre log₂ değişimlerinin medyanı olarak hesaplandı.

3.10. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler için GraphPad PRISM v10 ve Microsoft Excel 16.98 kullanılmıştır. Metabolomik analizler Skyline (v.20.1.1.158) ile, görüntü analizleri ise ImageJ FIJI (NIH, Sürüm 1.0) programlarıyla gerçekleştirilmiştir. P değerleri ve kullanılan istatistiksel testler şekil altı açıklamalarda belirtilmiştir. Tüm deneyler en az iki kez, benzer sonuçlarla tekrarlanmıştır. Hem teknik hem biyolojik replikatlar güvenilir şekilde çoğaltılmıştır. İki ortalama değer arasındaki karşılaştırma, iki yönlü bağımsız gruplar t-testi ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Kanser metabolizmasını incelemek için model bir taşıyıcının belirlenmesi

Bu çalışma için, çalışılacak transport proteinini belirlemek amacıyla kriterler oluşturduk. Birincil kriter, belli bir organda yüksek ekspresyona sahip bir taşıyıcıya odaklanılması amacıyla seçilecek taşıyıcı proteinin organ özgüllüğü olarak belirlendi. Bu kriter, yalnızca taşıyıcının ilgili organda potansiyel olarak özelleşmiş bir fizyolojik role sahip olduğunu göstermekle kalmayıp, aynı zamanda deneysel tasarımın da kolaylaşmasını sağlamaktadır. İkincil kriter ise taşıyıcının kanser ile ilişkili olduğuna dair önceki çalışmaların literatürde olmasıydı. SLC25A ailesi üyeleri tarandıktan sonra, SLC25A47 proteinin her iki kriteri karşıladığı görüldü. Öncelikle, SLC25A47'nin yalnızca karaciğerde eksprese edildiği anlaşıldı. Ek olarak, bir çalışmada SLC25A47'nin hepatosellüler karsinom dokularında, eşleştirilmiş non-kanseröz karaciğer dokularına kıyasla anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir. Bu azalma nedeniyle SLC25A47, HDMCP (HCC-down-regulated mitochondrial carrier protein) olarak adlandırılmıştır.

Phylogene platformu kullanılarak yapılan filogenetik analiz, SLC25A47'nin, üre döngüsünde rol alan ornitin–sitrülin antiporterlerini kodlayan paraloglar olan SLC25A15 ve SLC25A2 ile ortak evrim geçirdiğini ortaya koymuştur. Bu evrimsel ilişki, SLC25A47'nin üre döngüsü ile bağlantılı olabilecek karaciğere özgü bir metabolik yolda görev alabileceğini düşündürmektedir. Literatür incelendiğinde, daha önce yapılan çalışmalarda sıçan karaciğerinde N-asetilglutamat (NAG) hidrolizinin mitokondride gerçekleşmediğini ve mitokondriden NAG'nın dışarı aktarımını sağlayan taşıyıcının henüz tanımlanmadığını göstermektedir. Literatürdeki bu boşluğa dayanarak bu çalışmanın hipotezi, SLC25A47'nin mitokondriden sitozole NAG taşıyan bir transport proteini olarak işlev görmesidir.

4.2. SLC25A47 overeksprese hücrelerde mitokondriyal NAG miktarı önemli ölçüde azalmıştır

Bu çalışma için en uygun *in vitro* model olarak HepG2 insan hepatosellüler karsinom hücre hattı seçilmiştir. Bulguların doğrulanması amacıyla, mitokondriyal immünopresipitasyonun daha net sonuçlar verdiği HEK293T hücreleri kontrol olarak kullanılarak paralel deneyler gerçekleştirilmiştir. Bunun nedeni, HEK293T hücrelerinin daha küçük boyutlarının olması ve daha az kontaminan organel içermeleridir.

SLC25A47'nin fonksiyonelliğini objektif şekilde değerlendirmek için, Mito-Tag (3×HA–OMP25–mCherry) eksprese eden *SLC25A47*-knockout ve *SLC25A47* cDNA eklenmiş HepG2 hücreleri oluşturuldu. Mito-Tag kontrolü olarak ise 3×myc–OMP25–mCherry içeren Mito-Tag kullanıldı. Ardından, hem tüm hücrelerin hem de immünopürifiye edilmiş mitokondrilerin polar metabolomu, LC-MS ile profillendi. *SLC25A47* cDNA eklenmiş ve *SLC25A47* geni silinmiş hücrelerde NAG düzeyinde anlamlı bir azalma gözlemlendi. SLC25A47 kaybı, tüm hücredeki NAG düzeyini ve çoğu mitokondriyal metabolit seviyesini etkilemedi; ancak mitokondrideki NAG düzeylerinde 5 ila 8 kat artışa neden oldu. Bu sonuçlar, SLC25A47-null HEK293T hücrelerinde de doğrulandı. Bu veriler, SLC25A47'nin mitokondriyal NAG düzeylerini düzenlediği hipotezini desteklemektedir.

4.3. SLC25A47, mitokondrideki fizyolojik düzeyin üzerindeki NAG düzeylerini düşürebilmektedir

Yüksek protein alımını taklit eden koşullarda mitokondriyal NAG düzeylerinin artmasına karşılık SLC25A47'nin bu metaboliti dışa taşıyıp taşıyamadığını test etmek amacıyla, HEK293T hücrelerinde NAGS enzimini overeksprese ettik. İlk olarak, NAGS eksprese eden HEK293T hücre hatları oluşturduk, ardından bu hücreler SLC25A47 cDNA'sı taşıyan bir vektör ile enfekte edildi. Önceki bulguları doğrulayacak şekilde NAGS ve SLC25A47'yi birlikte eksprese eden hücrelerde, yalnızca NAGS eksprese eden hücelere kıyasla mitokondriyal NAG düzeylerinin daha düşük olduğu gözlemlendi. Tüm hücre düzeyinde, NAGS overekspresyonu NAG düzeylerini artırırken, SLC25A47 ile birlikte ifade edildiğinde bu artış daha da belirgin hale geldi. Bu bulgular, SLC25A47 ile NAGS arasında olası bir feedback regülasyon ilişkisi olabileceğini düşündürmekte olup, bu ilişkinin moleküler düzeyde daha ayrıntılı araştırılması gerekmektedir.

4.4. SLC25A47 mitokondriyal N-Karbamilglutamat seviyelerini etkiler

N-Karbamilglutamat (veya karglumik asit, NCG), hiperammonemi tedavisinde kullanılan sentetik bir NAG analogudur. Hücrelerin bir gece boyunca 1 mM veya 2 mM NCG ile muamele edilmesinin ardından mitokondri immünopürifikasyonunu gerçekleştirildi. Kontrollerle karşılaştırıldığında, SLC25A47 cDNA'sı ile tamamlanmış HEK293T hücrelerinde mitokondrideki NCG miktarı daha az olduğu görüldü. Bu durum, SLC25A47'nin yalnızca mitokondriyal NAG seviyelerini etkilemediğini, aynı zamanda onun sentetik analogu olan NCG'nin mitokondriyal düzeylerini de azalttığını düşündürmektedir.

4.5. SLC25A47 silinmesi, *in vivo* olarak mitokondriyal NAG birikimine yol açar

4.5.1. Fonksiyon kaybı fenotipi için *in vivo* modelin oluşturulması

SLC25A47 geninin fizyolojik rolünü karakterize etmek amacıyla, CRISPR/Cas9 genom düzenleme yöntemi kullanılarak tüm vücut *Slc25a47* knockout fare modeli oluşturduk. Tüm deneylerde genetik arka plan olarak C57BL/6J fare suşu kullanıldı. 6 ekzon içeren *Slc25a47* geni için, yöntemler bölümünde ayrıntılı olarak açıklandığı üzere, 2. ekzona hedeflenen sgRNA'lar tasarlandı. Yapılan taramalar sonucunda 63 baz çifti silinmiş bir mutant hat elde edildi ve bu mutasyonun, olgun mRNA'da intron tutulmasına neden olduğu, dolayısıyla hatalı protein sentezine yol açtığı doğrulandı. Karaciğere özgü mitokondriyal immünopürifikasyon gerçekleştirebilmek amacıyla, *Slc25a47* heterozigot fareler, Mito-Tag alleli için heterozigot olan farelerle çaprazlandı.

4.5.2. Mitokondriyal NAG, *Slc25a47*-knockout farelerin mitokondrilerinde artmıştır

SLC25A47'nin *in vivo* NAG düzeylerini nasıl etkilediğini aydınlatmak amacıyla, *Slc25a47*-knockout farelerini MITO-Tag fareleriyle çaprazlayarak elde ettiğimiz hayvanların karaciğer dokusundan mitokondriyal immünopürifikasyon gerçekleştirdik ve bu örnekleri, aynı anneden aynı anda doğan kontrol farelerle (wild-type) karşılaştırdık. Kalite kontrolü amacıyla, mitokondriyal protein ve metabolitlerin başarıyla zenginleştirildiğini ve diğer organellerden kaynaklanan kontaminasyonun minimal olduğunu doğruladık. LC-MS analizi, SLC25A47 proteini olmayan mitokondrilerde NAG düzeylerinin belirgin şekilde arttığını, ancak diğer metabolitlerde anlamlı bir değişiklik olmadığını gösterdik. Bu bulgular, SLC25A47'nin mitokondriyal NAG homeostazını düzenleyici bir rol oynadığını göstermektedir.

4.5.3. Yüksek proteinli diyet, *Slc25a47*-knockout farelerde serum glutamin seviyelerinin azalmasına yol açar

Mitokondriden NAG taşınmasını artırmak amacıyla, deneyden iki hafta önce farelere yüksek proteinli bir diyet (normal protein düzeyi olan %20'ye kıyasla %65

protein) verildi. Serum örneklemeinden hemen önce, üre döngüsü yoluyla metabolitlerin temizlenmesini sağlamak amacıyla fareler 4 saat (veya gece boyunca) süreyle aç bırakıldı. Ardından, Slc25a47-knockout fareler ile aynı anneden aynı anda doğan kontrol farelerinde (wild-type) serum metabolomik profillemeye gerçekleştirildi. Açlık periyodunun ardından, Slc25a47-knockout farelerde anlamlı şekilde artmış kan üre azotu (BUN) düzeyleri gözlemlendi; bu durum, artmış üre döngüsü aktivitesine işaret etmektedir. Bu bulguya paralel olarak, knockout farelerde serum glutamin konsantrasyonunun belirgin şekilde azalmış olduğu görüldü; bu da, açlık durumuna rağmen devam eden üre döngüsü aktivitesine bağlı olarak glutaminin birincil azot kaynağı olarak harcandığına işaret etmektedir. Diğer amino asit düzeylerinde ise anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

4.6. Mitokondriyal proteaz YME1L1, SLC25A47 proteininin yıkımından sorumludur

Mitokondride SLC25A47 proteininin stabilitesini düzenleyen mekanizmaları araştırmak amacıyla, proteinin yarı ömrünü sikloheksimid takip deneyleriyle inceledik. Bulgularımız, SLC25A47'nin doğal olarak kararsız olduğunu ve yaklaşık 20 dakikalık bir yarı ömre sahip olduğunu ortaya koydu. Ancak, BSO (1 mM) ve erastin (5 µM) ile yapılan muamelelerin SLC25A47'nin yarı ömrünü belirgin şekilde uzattığını gözlemledik; bu etkinin altında yatan mekanizma ise henüz bilinmemektedir. Bu veriler, SLC25A47'nin yıkımında proteolitik süreçlerin rol oynayabileceğine işaret etmektedir.

SLC25A47'nin yıkımından sorumlu olabilecek olası mitokondriyal proteazları belirlemek için, split mNeonGreen2-SLC25A47 yapısını kullanan FACS temelli CRISPR taraması tasarladık. SLC25A47-NG2(11)'in, mitokondriyal zarlar arası boşlukta lokalize olan MICU1-NG2(1-10) ile birlikte eksprese edilmesi, başarılı protein etkileşimi sonucunda artan güçlü floresans sinyali ile sonuçlandı. Bu hücrelere, 34 adet mitokondriyal proteaz genini hedefleyen (her gen için yedi sgRNA içeren) bir sgRNA kütüphanesi tanıtıldı. Hücreler, floresan sinyal yoğunluğuna göre ayrılarak yüksek (SLC25A47-hi) ve düşük (SLC25A47-lo) mNeonGreen sinyali veren

popülasyonlardan elde edilen sgRNA'lar NGS ile analiz edildi. Taramaya dahil edilen genler arasında, yalnızca mitokondriyal bir proteaz olan YME1L1'nin kaybı SLC25A47'nin stabilitesini anlamlı biçimde artırdı. Bu sonuç, YME1L1'nin SLC25A47'nin yıkımında temel bir düzenleyici olarak rol oynadığını göstermektedir.

4.7. HepG2 hücre hattı ile subkütan tümör oluşumu

Tümör büyümesini incelemek amacıyla NSG fareleri model olarak kullanıldı. Hayvanlara tümör enjeksiyonundan 4 hafta sonra ötenazi uygulandı. Subkütan tümör oluşumu için, 1×10^6 HepG2 hücresi — SLC25A47-geni knockout veya SLC25A47 cDNA'sı eklenmiş knockout hücreler (addback) — 100 μ L'lik serum içermeyen DMEM ortamında, %30 Matrigel içerecek şekilde süspanse edilerek farelerin yan taraflarına enjekte edildi. Her fareye, sol taraftan knockout hücreler, sağ taraftan ise addback hücreler enjekte edildi. İlk deneyler, SLC25A47-addback hücrelerinden oluşan tümörlerin, knockout hücrelerden oluşanlara kıyasla anlamlı şekilde daha büyük olduğunu gösterdi. Ancak, daha sonraki tekrarlanan deneylerde bu fark yeniden gözlemlenemedi ve aynı tek hücre klonları kullanılarak yapılan ortotopik karaciğer enjeksiyonlarında da knockout ve addback grupları arasında tümör büyümesinde herhangi bir fark görülmedi.

5. TARTIŞMA

Mitokondriyal taşıyıcı ailesinin (SLC25 ailesi) üyeleri de dahil olmak üzere birçok taşıyıcı proteininin (solute carrier) fizyolojik substratları büyük ölçüde tanımlanmamıştır. SLC25 ailesi, doğuştan gelen metabolizma bozukluklarından kansere kadar çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilen bir grup mitokondriyal taşıyıcıyı kapsamaktadır. Bu çalışmada, karaciğere özgü yüksek düzeyde ifade edilen ve hepatosellüler karsinom ile potansiyel ilişkisi bulunan bir mitokondriyal taşıyıcı olan SLC25A47'nin fizyolojik substratını tanımlamaya odaklandık.

Bu çalışma, karaciğere özgü olarak eksprese edilen mitokondriyal bir taşıyıcı olan SLC25A47'nin, hepatik azot metabolizmasının önemli bir düzenleyicisi

olduğunu ortaya koymaktadır. Filogenetik analizlerde SLC25A47'nin üre döngüsü taşıyıcılarıyla birlikte evrimleşmiş olması ve bilinen bir taşıyıcı olmadan NAG (N-asetilglutamat) hidrolizinin mitokondri dışında gerçekleştiğine dair kanıtlar doğrultusunda, SLC25A47'nin mitokondriden NAG'ı dışarı taşıyan bir taşıyıcı olarak görev yaptığı hipotezini ortaya koyduk. Bu hipotezi test etmek için hem *in vitro* hem de *in vivo* deneyler gerçekleştirerek SLC25A47'nin işlev kazanımı veya kaybının mitokondriyal ve sitozolik NAG düzeylerini etkileyip etkilemediğini değerlendirdik. Hem *in vitro* hem de *in vivo* modeller kullanılarak yapılan deneyler, SLC25A47'nin silinmesi ve overekspresyon durumlarında mitokondriyal NAG seviyelerinde değişiklikler olduğunu ortaya koymuştur. Overekspresyon mitokondriyal NAG miktarlarını azaltırken, knockout edilmesi bu seviyeleri arttırmıştır. Bulgularımız, SLC25A47'nin NAG'nin mitokondri dışına taşınması için gerekli olan bir mitokondriyal taşıyıcı olduğunu göstermekte ve böylece karaciğer azot metabolizmasında daha önce tanımlanmamış bir bileşen tanımlanmıştır.

Önceki çalışmalar, serum amino asit düzeyleri ile üre üretim hızı arasında doğrusal bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bu durum, üre sentezinde sınırlayıcı ana faktörün karaciğerin içsel sentez kapasitesinden ziyade serum amino asit konsantrasyonu olduğunu ortaya koymaktadır. İnsanlar, fazla miktarda alınan diyet proteininin yıkımı için son derece etkili bir mekanizmaya sahiptir. Bu mekanizma hepatositlerde üre döngüsü tarafından gerçekleştirilir. Üre döngüsü, hepatositlerin yaşamının son evrelerine kadar işlevini sürdürebilecek kadar dayanıklıdır. Üre döngüsü aktivitesinde belirgin bozulma genellikle yalnızca belirgin hepatoselüler kayıp veya karaciğer metabolizmasını bypass eden portosistemik şant gibi ciddi karaciğer hastalıklarında gözlemlenir.

Üre döngüsünün iyi tanımlanmış tek düzenleyici kontrolü, NAG tarafından aktive edilen CPS1 düzeyinde gerçekleşmektedir. Ancak, hepatositlerin mitokondriyal matriksine amino asit akışında geçici bir artışı takiben döngünün nasıl baskılandığına dair mekanizma hâlâ net değildir. NAG mitokondriyal matrikste hidrolize uğramadığına göre, mitokondriden dışa taşınması, üre döngüsü aktivitesinin azalmasına katkıda bulunabilir. Bulgularımıza dayanarak SLC25A47 taşıyıcısının,

portal dolaşım ile karaciğere iletilen yemek sonrası azotlu substrat artışına yanıt olarak üre döngüsü aktivitesini düzenleyen ek bir kontrol bileşeni olarak görev yapabileceğini öne sürmekteyiz. Bu hipotez, Slc25a47-KO farelerinde periferik kanda anlamlı derecede azalmış glutamin düzeylerinin gözlemlenmesiyle desteklenmektedir. Bu da üre döngüsünün normalden daha uzun süre aktif kaldığını ve azotun daha etkin bir şekilde atıldığını göstermiştir. Bu bulgular, SLC25A47'nin karaciğerin özellikle beslenme sonrasında amino asit miktarlarının artmasına verdiği metabolik yanıtı uyum sağlamasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Üre döngüsünü *in vitro* olarak çalışmanın bazı kısıtlılıkları nedeniyle, bu çalışmada *in vivo* knockout deneyleri kullanılmıştır. Bu kısıtlılıklar arasında, döngüde yer alan proteinlerin çoğunun hücre hatlarında eksprese edilmemesi, eksik bileşenlerin aşırı eksprese edilmesi durumunda anlamlı olabilecek değişikliklerin maskelenmesi ve işlev kaybı fenotipinin değerlendirilememesi yer almaktadır. Ayrıca, organizma düzeyinde, tüm vücut metabolizmasındaki downstream etkiler *in vitro* sistemlerde ele alınamamaktadır.

Mitokondride NAG'nin metabolize edilmediği göz önüne alındığında, bu bileşiğin dışarıya taşınması, üre döngüsünün aktivitesini baskılamayı sağlayan bir mekanizma olarak ortaya çıkmış olabilir. Dolayısıyla SLC25A47'nin, hem bir taşıyıcı hem de düzenleyici bir protein olarak görev yaptığı söylenebilir.

Çalışmada ayrıca, bu taşıyıcının düzenleyicileri de tanımlanmaktadır. Mitokondriyal proteaz YME1L1'in, SLC25A47'nin protein düzeyini düzenlemekte olduğu gösterilmiştir. YME1L1'in genetik olarak silinmesi, taşıyıcının protein seviyelerini daha stabil hale getirmektedir. Ek olarak, mTORC1/2 inhibitörü Torin'in SLC25A47'nin stabilitesini azalttığı ve bu taşıyıcının besin duyarlı mTORC sinyali tarafından kontrol edildiği gösterilmektedir.

Açlık sırasında, portal dolaşımdaki amino asit konsantrasyonu düşer ve bu durum mTORC gibi besin algılama yollarının aktivasyonunun azalmasına ve üre döngüsü aktivitesinin düşmesine yol açar. Özellikle arjinin, glutamin ve glutamat

amino asitlerinin azalan girişine bağlı olarak NAGS, CPS1 ve GLS2 enzim aktiviteleri azalır. Mitokondride aşırı düzeyde NAG bulunmadığında, mitokondriyal proteaz YME1L1 aktif kalır ve SLC25A47'nin proteolitik yıkımını kolaylaştırarak NAG'nin sitozole çıkışını azaltır. Buna karşılık, yemek sonrası durumda arjinin ve lösin gibi amino asitlerin artan varlığı mTORC yolunun aktivasyonunu teşvik eder. mTORC ile YME1L1 arasında doğrudan bir düzenleyici bağlantı henüz kurulmamış olsa da, mTORC'nun YME1L1 aktivitesini dolaylı mekanizmalarla etkileyerek SLC25A47'nin stabilizasyonuna katkıda bulunması mümkündür. Ayrıca, NAGS'nin allosterik aktivatörü olan arjininin, NAGS için substrat olan glutamin ve glutamatin ve amino asit katabolizmasından kaynaklanan amonyağın mitokondriye girişi, NAG ve üre sentezini artırır. Fazla mitokondriyal NAG, SLC25A47 aracılığıyla sitozole ihraç edilir ve burada hidroliz edilir; bu da üre döngüsü akışının ayarlanmasına katkı sağlar.

Sonuç olarak, SLC25A47 daha önce tanımlanmamış bir mitokondriyal NAG taşıyıcısı olarak tanımlanmış ve üre döngüsünün regülasyonunda kilit bir rol oynadığı gösterilmiştir. YME1L1 ve mTORC sinyal yolları tarafından kontrol edilen bu taşıyıcı, karaciğerin azot metabolizmasını besin durumuna göre ayarlamasında kritik bir bileşen olarak görev yapmaktadır.

6. SONUÇLAR VE GELECEK ÇALIŞMA ALANLARI

1. SLC25A47, karaciğere özgü bir mitokondriyal taşıyıcıdır. Üre döngüsünün bilinen tek doğrudan düzenleyicisi olan N-asetilglutamatin (NAG) mitokondriden daha önce bilinmeyen bir taşıyıcı aracılığıyla dışarı taşındığı gösterilmiştir.
2. HepG2 ve HEK293T hücre hatlarının mitokondrilerinde SLC25A47 overeksprese edildiğinde, mitokondriyal NAG seviyeleri önemli ölçüde azalırken, sitoplazmik NAG seviyelerinde değişiklik gözlenmemiştir.

3. NAG seviyeleri fizyolojik sınırların üzerinde olduğunda bile, SLC25A47 NAG'yi mitokondriden sitozole taşıyabilmektedir.
4. NAG'nin kimyasal analogu olan NCG (N-karbamoilglutamat) da SLC25A47'nin overeksprese edildiği hücrelerin mitokondrilerinde belirgin şekilde azalmıştır.
5. Yüksek proteinli diyet uygulanan Slc25a47-KO fareleri, açlık sonrası kan üre azotu (BUN) ve üre düzeylerini WT farelere kıyasla yüksek tutabilmiştir; bu da yüksek üre döngüsü aktivitesine işaret etmektedir.
6. Slc25a47-KO farelerinde, WT farelere kıyasla daha düşük serum glutamin seviyeleri gözlenmiştir; bu da artmış döngü aktivitesi olduğuna yönelik bulguları desteklemektedir.
7. Açlık sonrası Slc25a47-KO farelerinin mitokondrilerinde daha yüksek NAG seviyeleri bulunmuştur; bu da SLC25A47'nin NAG'yi mitokondriden taşıdığına dair *in vitro* kanıtları desteklemektedir.
8. SLC25A47'nin yarı ömrünün yaklaşık 20 dakika olduğu gösterilmiştir. Mitokondiyal bir proteaz olan YME1L1'in silinmesi, SLC25A47'nin stabil hale gelmesine neden olurken; Torin ile yapılan mTOR inhibisyonu, SLC25A47 proteinini destabilize etmektedir. Bu bulgular SLC25A47'nin farklı metabolik sinyallerle regüle edilen bir protein olduğuna işaret etmektedir.
9. Gelecekte SLC25A47'nin regülasyon mekanizmalarının tamamen ortaya çıkarılması üre siklusunun ve memelilerde azot dengesinin nasıl sağlandığına ilişkin daha detaylı bilgiler elde edilmesini sağlayacaktır. Ek olarak, yeni fare modelleri ile SLC25A47'nin hastalıklarla ilişkisi daha net bir şekilde ortaya konabilir.

TABLE OF CONTENTS

CONFIRMATION PAGE	iii
PUBLISHING AND INTELLECTUAL PROPERTY STATEMENT	iv
ETHICAL DECLARATION PAGE	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
ABSTRACT	vii
ÖZET	viii
GENİŞ TÜRKÇE ÖZET	ix-xlii
TABLE OF CONTENTS	xliii-xlv
ABBREVIATIONS	xlvi-xlviii
LIST OF FIGURES	xlix
LIST OF TABLES	1
1. INTRODUCTION	1
2. GENERAL INFORMATION	3
2.1. General features of mitochondria	
2.2. Solute Carrier (SLC) proteins of mitochondria	
2.3. Importance of liver in mitochondrial amino acid metabolism	
2.4. Hepatocellular carcinoma	
2.5. Mitochondrial amino acid metabolism and urea cycle	
2.6. Regulation of urea cycle	
2.7. Urea cycle disorders	
2.7.1. Carbamoyl Phosphate Synthetase 1 (CPS1) deficiency	
2.7.2. Ornithine Transcarbamoylase (OTC) deficiency	
2.7.3. N-Acetylglutamate Synthase (NAGS) deficiency	
2.7.4. Carbonic Anhydrase Va (CA-VA) deficiency	
2.7.5. Hyperornithinemia-Hyperammonemia-Homocitrullinuria Syndrome	
2.7.6. Current and developing treatment modalities for urea cycle disorders	
2.8. Mitochondrial amino acid metabolism and cancer	
2.9. Mitochondrial protease YME1L1	

3. MATERIALS AND METHODS	27
3.1. Cell Lines and Culture Conditions	
3.2. Establishment of Knockout and Overexpression Models in Cell Lines	
3.3. Mice	
3.3.1. Generation of Slc25a47-KO mice	
3.3.2. Mouse serum for metabolomic analysis	
3.3.3. BUN assay for mouse serum samples	
3.3.4. Mouse tumor experiments	
3.4. Immunoblotting	
3.5. Immunofluorescence	
3.6. Mitochondrial immunopurification	
3.6.1 Mitochondrial immunopurification from cells	
3.6.2. Mitochondrial immunoprecipitation from tissues	
3.7. Metabolite profiling by LC/MS	
3.8. LC-MS quantification of whole-cell and mitochondrial metabolites	
3.9. FACS-based CRISPR screen	
3.10. Quantification and Statistical Analysis	
4. RESULTS	39
4.1. Determining a model transporter to study cancer metabolism	
4.2. Mitochondrial NAG is depleted in SLC25A47-overexpressing cells	
4.3. SLC25A47 lowers supraphysiological levels of mitochondrial NAG	
4.4. SLC25A47 affects mitochondrial NCG levels	
4.5. SLC25A47 loss leads to NAG accumulation <i>in vivo</i>	
4.5.1. Generation of <i>in vivo</i> model for loss-of-function phenotype	
4.5.2. Mitochondrial NAG is enriched in the mitochondria of Slc25a47-knockout mice	
4.5.3. High-Protein Diet Leads to Reduced Serum Glutamine Levels in Slc25a47-Knockout Mice	
4.6. Mitochondrial protease YME1L1 degrades SLC25A47	
4.7. Subcutaneous tumor formation using HepG2 single clones	
5. DISCUSSION	55
6. SUMMARY AND FUTURE DIRECTIONS	59

7. REFERENCES	60
8. APPENDIX	71
Appendix-1: List of cDNA sequences designed for the project	
Appendix-2: Ethical approval for animal use for the project	
Appendix-3: Turnitin originality report and digital receipt of the thesis	
9. CURRICULUM VITAE	78

ABBREVIATIONS

α -KG	α -ketoglutarate
AAA	ATPases Associated with diverse cellular Activities
AAV	Adeno-associated virus
AB	Addback
ADP	Adenosine diphosphate
ARG1/2	Arginase 1/2
ASL	Argininosuccinate lyase
ASS	Argininosuccinate synthetase
ATP	Adenosine triphosphate
BSO	Buthionine sulfoximine
BUN	Blood urea nitrogen
CA	Carbonic anhydrase
CAD	Carbamoyl-phosphate synthetase 2, Aspartate transcarbamylase, and Dihydroorotase
cDNA	Complementary DNA
CHX	Cycloheximide
CoA	Coenzyme-A
CP	Carbamoyl phosphate
CPS1/2/3	Carbamoyl phosphate synthetase 1/2/3
CPS1D	CPS1 deficiency
CRC	Colorectal cancer
CRISPR/Cas9	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Caspase 9
crRNA	CRISPR RNA
CS	Citrate synthase
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGCG	Epigallocatechin gallate
ETC	Electron transport chain

FACS	Fluorescence-associated cell sorting
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GeneMAP	Gene-Metabolite Association Prediction
GFP	Green fluorescent protein
GLS2	Glutaminase 2
GLUD1/2	Glutamate dehydrogenase 1/2
gRNA	Guide RNA
GS	Glutamine synthetase
GSH	Glutathione
GWAS	Genome-Wide Association Studies
HBV	Hepatitis B virus
HCC	Hepatocellular carcinoma
HCV	Hepatitis C virus
HEK293T	Human Embryonic Kidney 293 T cell line
HHH	Hyperornithinemia-Hyperammonemia- Homocitrullinuria
IMM	Inner mitochondrial membrane
kDa	kiloDalton
K _i	Inhibition constant
KO	Knockout
LC/MS	Liquid chromatography–mass spectrometry
LKB1	Liver kinase B1
MAT	Methionine adenosyltransferase
MITO-IP	Mitochondrial immunoprecipitation
mRNA	Messenger ribonucleic acid
mtDNA	Mitochondrial DNA
mTOR	Mechanistic target of rapamycin complex
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NAG	N-acetylglutamate
NAGS	N-acetylglutamate synthase
NAGSD	NAGS deficiency
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis

NCG	N-carbamylglutamate
NSCLC	Non-small cell lung cancer
OAT	Ornithine acetyltransferase
OGDH	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component
OMM	Outer mitochondrial membrane
ORC1	Ornithine carrier 1
OTC	Ornithine transcarbamylase
OTCD	OTC deficiency
PBS	Phosphate buffered saline
PDH	Pyruvate dehydrogenase
ROS	Reactive oxygen species
rRNA	Ribosomal RNA
SAH	S-adenosylhomocysteine
SEM	Standard error of the mean
sgRNA	Single-guide RNA
SLC	Solute carrier
ssDNA	Single-stranded DNA
TACE	Transarterial chemoembolization
TCA cycle	Tricarboxylic acid cycle
tracrRNA	Trans-activating CRISPR RNA
UCD	Urea cycle disorder
UTP	Uridine-5'-triphosphate
VDAC	Voltage-dependent anion channel
WT	Wild type

LIST OF FIGURES

Figures	Pages
2.1: Metabolic zonation of liver lobules.	7
2.2: Metabolic pathway of the urea cycle in the liver mitochondria.	12
2.3: Substrates of NAGS and the fate of NAG.	16
2.4: Clinical manifestations of hyperammonemia in neonates, in infants, children, and adults.	17-18
4.1: Liver specificity of SLC25A47 and co-evolution of urea cycle transporters.	40
4.2: Mitochondrial and whole cell levels of metabolites in HepG2 SLC25A47-KO and HEK293T SLC25A47 expressing cells.	42
4.3: Mitochondrial levels of NAG in HEK293T cells expressing NAGS and SLC25A47.	43
4.4: Mitochondrial NCG levels in HEK293T cells expressing 3xFLAG-SLC25A47 vs WT.	44
4.5: Representative western blots confirming enrichment of mitochondria from <i>in vitro</i> MITO-IP experiments.	44
4.6: Validation of Slc25a47-KO mice.	46
4.7: Workflow of mouse diet experiments.	47
4.8: Mitochondrial and whole-cell metabolite comparisons between Slc25a47-KO vs WT mice.	48
4.9: Comparison of serum metabolites of Slc25a47-KO vs WT mice.	50
4.10: Representative western blots confirming enrichment of mitochondria from <i>in vivo</i> MITO-IP experiments.	50
4.11: Stability and half-life of SLC25A47 protein.	52
4.12: Determining protease cleaving SLC25A47 protein.	53
4.13: Subcutaneous tumor formation using HepG2 knockout and addback single cell clones.	54
5.1: Regulation of SLC25A47 according to nutritional states.	58

LIST OF TABLES

Table	Pages
3.1: Sequences of single guide RNA's used in this project.	28
3.2: List of reagents, cell lines, animal models and tools used in this project.	36-38

1. INTRODUCTION

Mitochondria serve as metabolic hubs in cells and orchestrate a wide array of biochemical processes. Numerous metabolic pathways either originate within the mitochondria or rely on metabolites generated there. The transfer of metabolites through the inner mitochondrial membrane is a highly regulated process. The solute carrier family 25 (SLC25 protein family) is a superfamily of membrane transporters that plays a pivotal role in metabolism by mediating the transport of small molecules and ions across membranes, thereby influencing the biochemical composition of cells and tissues. Impairments in metabolite transport are commonly associated with a range of pathologies, including inborn errors of metabolism and cancer. Although extensive progress has been made in characterizing numerous SLC family members, the specific molecular substrates of many remain unidentified. This is primarily due to their tissue-specific expression patterns, functional redundancy, and substrate promiscuity, all of which complicate their functional analysis and limit our understanding of their roles in metabolic disorders and their potential therapeutic applications.

Members of the SLC25 family hold significant potential as biomarkers for the diagnosis and prognosis of various cancers. They may serve as viable targets for the development of anti-cancer therapies. To identify these targets, it is necessary to determine the function of each transporter and identify the transported substrate(s). In this study, we aimed to select a transporter previously associated with cancer and determine its substrate and function to understand its role in carcinogenesis.

We selected SLC25A47 as the focus of our study because of its previously reported association with hepatocellular carcinoma (HCC) and its highly liver-specific expression profile (1). This unique tissue specificity suggests that SLC25A47 may be involved in specialized metabolic pathways that are critical for hepatic function and potentially for HCC tumorigenesis. Given that mitochondrial carrier proteins often mediate the transport of key metabolic intermediates, we hypothesized that SLC25A47 facilitates the translocation of specific substrate(s) essential for hepatic metabolic function. By uncovering this relationship, we aim to provide new insights into liver-

specific metabolic vulnerabilities that may be exploited for therapeutic interventions in HCC.

Finally, we used the mitochondrial immunoprecipitation (MITO-IP) method *in vitro* and *in vivo* to understand the role of SLC25A47 in cellular and organismal metabolism. MITO-IP enables precise profiling of mitochondrial metabolites and allows for the quantification of their concentrations within the mitochondrial matrix. This is achieved by isolating mitochondria through immunoprecipitation, followed by targeted metabolomics analysis using liquid chromatography–mass spectrometry (LC/MS) with authentic standards for accurate quantification. To identify candidate substrates or metabolites associated with SLC25A47, we employed gene knockout and knock-in strategies in engineered cell and mouse models. By comparing the mitochondrial metabolite profiles across these genetically modified lines, we aimed to uncover significant changes that may reveal the specific metabolite(s) transported and/or regulated by SLC25A47.

2. GENERAL INFORMATION

2.1. General features of mitochondria

The term mitochondrion comes from the Greek words "mitos" (meaning thread) and "chondros" (meaning granule), which describe the appearance of these structures during spermatogenesis (2). In 1890, Altmann recognized mitochondria as organelles (3). It was not until 1912 that the link between cellular respiration and mitochondria was discovered by Benjamin F. Kingsbury based on morphological observations (4). In the 1940s and the 1950s, advancements in organellar isolation methods led to multiple monumental discoveries regarding mitochondrial function. Kennedy and Lehninger discovered that mitochondria are the main site of oxidative phosphorylation in eukaryotic cells (5). This work was followed by numerous landmark studies that demonstrated that mitochondria contain enzymes essential for key metabolic processes (6-8).

Mitochondria exhibit several unique characteristics that distinguish them from other organelles. They are believed to have originated from prokaryotic ancestors (9). One notable similarity to prokaryotes is the circular structure of the mitochondrial genome, which is analogous to bacterial DNA in that it contains intron-free genes (10). Additionally, mitochondrial protein synthesis begins with N-formylmethionine, a modified amino acid used by bacteria (11), and mitochondrial mRNAs lack the 5' caps typically found in eukaryotic mRNAs, resembling the structure of bacterial mRNA (12). Furthermore, the 12S and 16S rRNAs present in mitochondria are closely related to those found in bacteria (10).

Mitochondria are characterized by distinct ultrastructures, including the matrix, inner mitochondrial membrane (IMM), intermembrane space, and outer mitochondrial membrane (OMM). Mitochondria typically range in diameter from approximately 0.2 to 1 μm and undergo dynamic morphological changes through continuous fission and fusion, depending on the cellular environment. The matrix, which is enclosed by the IMM, contains the majority of mitochondrial metabolic enzymes, mitochondrial DNA

(mtDNA), ribosomes, cofactors, and various organic and inorganic molecules. The IMM is highly selective and impermeable to ions and small molecules; therefore, specific transport proteins are essential for molecular translocation across this barrier (13). A hallmark of the IMM is the presence of cristae, which are invaginations of the lipid bilayer that house components of the electron transport chain (ETC) and transport proteins, significantly increasing the surface area of the membrane to facilitate oxidative phosphorylation. The OMM shares structural similarities with the plasma membrane and contains Porin proteins that permit passive diffusion of molecules smaller than ~6 kDa. The voltage-dependent anion channel (VDAC) serves as a major conduit for metabolite exchange between the intermembrane space and cytosol (14). Import of larger proteins into the mitochondria requires a specific mitochondrial targeting sequence. The intermembrane space closely resembles the cytosol in composition, except for its protein composition.

2.2. Solute Carrier (SLC) proteins of mitochondria

Solute carrier (SLC) proteins maintain cellular and organismal homeostasis by transporting small molecules and ions. SLC proteins act as metabolic gatekeepers that regulate the transport of various substances across cellular and organellar membranes. The SLC family includes approximately 450 proteins that are grouped into 70 distinct families (15). Among these, the solute carrier 25 family (SLC25) is specific to the mitochondria and is predominantly located in the inner mitochondrial membrane.

The SLC25 family of mitochondrial transporters was first identified in *Saccharomyces cerevisiae* and has since become known as the largest family of solute transport proteins in humans, comprising 53 members encoded by nuclear genes (15). This family is highly conserved and is characterized by a three-domain structure with six transmembrane α -helices and a 3-fold repeated motif of hydrophobic and charged residues (16). Most structural insights into the SLC25 family have been derived from studies of the mitochondrial ADP/ATP carrier, largely because of its high natural abundance and the presence of inhibitors that can lock the carrier in defined conformational states (17).

Members of the SLC25 family serve as a link between the mitochondrial matrix and cytoplasm, thereby affecting the distribution and concentration of transported substrates, such as amino acids, fatty acids, carboxylic acids, inorganic ions, cofactors, and nucleotides. Mutations in mitochondrial carrier proteins have been implicated in a range of pathologies, including inborn errors of metabolism and cancer. For instance, pathogenic variants in *SLC25A13* (encoding Citrin) and *SLC25A15* are responsible for Citrin deficiency and Hyperornithinemia-Hyperammonemia-Homocitrullinuria (HHH) syndrome, respectively.

The SLC25 family of mitochondrial transporters has been implicated in carcinogenesis. As they play a pivotal role in the selection of cellular metabolic pathways by modulating metabolite transport across the mitochondrial membrane, these carriers serve as key regulatory sites for the metabolic reprogramming of cancer cells. These functions profoundly influence tumor cell proliferation, survival, metastatic potential, and responsiveness to chemotherapeutic agents (18).

Citrin, encoded by *SLC25A13*, functions as an aspartate/glutamate antiporter and supports redox balance by regenerating NAD⁺ and NADH. Citrin deficiency is also linked to hepatocellular carcinoma, suggesting its potential role in tumorigenesis (19, 20). High *SLC25A13* expression is also associated with poor prognosis in neuroblastoma and colorectal cancer (CRC) (21, 22). In addition, *SLC25A22* has been shown to promote the progression of KRAS-mutant CRC (23). It has been suggested that KRAS enhances *SLC25A22* expression, which drives succinate production from α -ketoglutarate (α -KG). Elevated succinate disrupts α -KG-dependent epigenetic regulation and downregulates WNT repressors, thus activating WNT/ β -catenin signaling. These examples illustrate that the SLC25 transporter family is instrumental in directing cellular metabolic pathway choices through various mechanisms.

2.3. Importance of liver in mitochondrial amino acid metabolism

The liver is the principal organ responsible for regulating nutrient availability in humans. This critical function is facilitated by the metabolic plasticity of hepatocytes, which respond to fluctuations in nutrient excess or deficiency by integrating various hormonal, neural, and nutritional signals. The central role of the liver in maintaining metabolic homeostasis necessitates systematic organization at multiple levels (24).

The liver is organized into hexagonal lobules, with each lobule's corners housing a triad composed of a hepatic artery (HA), portal vein (PV), and bile duct (BD). Blood from the hepatic artery and portal vein flows through radially arranged sinusoids toward the central vein, while hepatocytes are organized in layered cords extending from the central vein toward the periphery (Figure 2.1). Non-parenchymal cells, which play supportive roles, are distributed along this lobular axis. Bile produced by hepatocytes flows in the opposite direction of blood, from the central region outward toward the portal areas via bile canaliculi, ultimately draining into the bile ducts. This countercurrent arrangement of bile and blood flow establishes spatial gradients that give rise to zoned metabolic functions within the lobule (25).

At the lobular level, morphologically analogous hepatocytes are segregated into three distinct metabolic zones based on their proximity to the portal and central veins. This phenomenon, termed "metabolic zonation of hepatocytes," ensures rapid and targeted processing of nutrients and permits a diverse array of biochemical reactions to occur simultaneously within the liver (Figure 2.1). The significance of metabolic zonation in amino acid metabolism has been extensively documented (24). Periportal hepatocytes have a high capacity for amino acid uptake, catabolism, and urea synthesis (26). The periportal synthesis of urea is primarily attributed to the expression of glutaminase 2 (GLS2), which liberates ammonia from glutamine, facilitating the initiation of the urea cycle. Following urea synthesis in the periportal region, excess ammonia reaches perivenous hepatocytes and arrives at pericentral hepatocytes, where the expression of glutamine synthetase (GS) allows the conversion

of ammonia back into glutamine (Figure 2.1). This intercellular cycling of glutamine within hepatic lobules is essential for regulating ammonia levels and maintaining the pH balance in the body (26).

At the cellular level, the meticulous organization of hepatocytes is largely dictated by their organellar architecture. Mitochondria and endoplasmic reticulum together constitute approximately 80% of the total liver protein content (27). Mitochondria perform crucial metabolic functions in hepatocytes, including participation in the tricarboxylic acid (TCA) cycle, oxidative phosphorylation, fatty acid oxidation, ammonia detoxification, and amino acid biosynthesis and catabolism. The functional integrity of hepatocyte mitochondria is critical for systemic metabolic homeostasis, given their central role in nutrient sensing and energy metabolism.

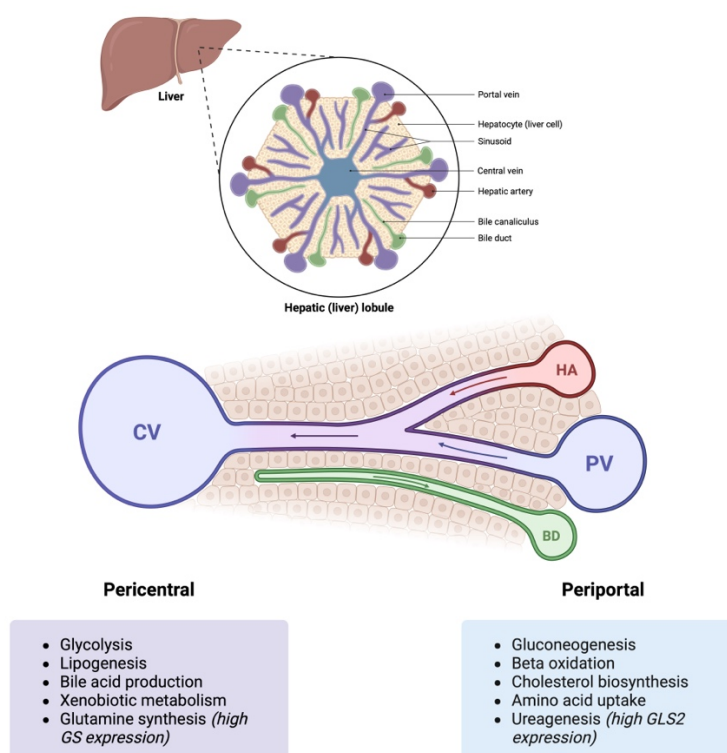


Figure 2.1: Metabolic zonation of liver lobules (25). (Created with Biorender.com)

2.4. Hepatocellular carcinoma

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most prevalent form of liver cancer worldwide (28). Chronic hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) infections are the primary risk factors for HCC. However, in Western populations, the incidence of HCC associated with non-alcoholic steatohepatitis (NASH), often linked to metabolic syndrome and diabetes mellitus, is increasing (29). Over 90% of HCC cases arise in the context of chronic liver disease, with cirrhosis being the most significant predisposing factor, regardless of the etiology (30). HCC is the leading cause of mortality among patients with cirrhosis.

The therapeutic management of HCC has improved substantially in recent years. Curative options predominantly include hepatic resection and liver transplantation. For patients with early-stage disease who are not candidates for surgery, local ablation techniques, such as radiofrequency ablation, remain the standard of care. Transarterial chemoembolization (TACE) is the most widely adopted treatment modality for intermediate-stage HCC. Recently, systemic therapies comprising immune checkpoint inhibitors, tyrosine kinase inhibitors, and monoclonal antibodies have emerged as promising alternatives, particularly for advanced-stage HCC, challenging the traditional treatment paradigms (31).

Genomic profiling has revealed that approximately 25% of HCC tumors harbor potentially actionable mutations, although the clinical translation of these findings remains unclear (32). Advances in understanding the molecular pathogenesis of HCC have identified several critical driver mutations. Among these, telomerase activation through *TERT* promoter mutations, viral genome insertions, chromosomal translocations, and gene amplification are the most frequent oncogenic events (33). Additional recurrent mutations occur in key tumor suppressors and cell cycle regulators, such as *TP53*, *RBI*, *CCNA2*, *CCNE1*, *PTEN*, *ARID1A*, *ARID2*, *RPS6KA3*, and *NFE2L2* genes (34-36). Moreover, genetic alterations affecting epigenetic regulators, oxidative stress response pathways, and signaling cascades, including the AKT–mTOR and MAPK pathways, further contribute to carcinogenesis. Recurrent

focal amplifications involving oncogenes, such as *CCND1*, *FGF19*, *VEGFA*, *MYC*, and *MET*, lead to their overexpression and consequent activation of multiple oncogenic signaling pathways (37, 38).

2.5. Mitochondrial amino acid metabolism and urea cycle

Amino acids serve as fuel sources for many organisms, although their extent of use varies. Carnivores, for example, rely heavily on proteins for energy, whereas plants seldom oxidize amino acids for energy. As proteins are essential structural components of cells, amino acid oxidation typically occurs under specific conditions: when amino acids from routine protein turnover are not required for new protein synthesis, when the dietary intake of amino acids surpasses the body's needs, or when cellular proteins are broken down for energy due to a lack of carbohydrates or during periods of starvation.

Biologically available nitrogen compounds are limited in nature; therefore, organisms conserve nitrogen-containing molecules such as amino acids, nucleotides, and ammonia. Although nitrogen gas (N_2) is abundant in the atmosphere, its chemical inertness renders it largely unavailable for biochemical reactions. Only a few organisms can convert N_2 into usable forms, such as ammonia, making efficient nitrogen utilization essential in eukaryotic cells. Amino acid catabolism follows two main pathways: one involving the amino group and the other involving the carbon skeleton of the amino acid. A common step in these pathways is the use of pyridoxal phosphate to remove the α -amino group. The carbon skeletons are broken down into TCA cycle intermediates. Excess amino groups are eventually funneled into a single primary excretory product. Most aquatic species are ammonotelic and excrete toxic ammonia directly into the water. Terrestrial animals minimize toxicity and water loss by converting nitrogen into less toxic forms. Most terrestrial animals are ureotelic and excrete urea, whereas birds and reptiles are uricotelic and excrete uric acid.

Mammals convert toxic ammonia into water-soluble urea for safe disposal in urine. The processing of ammonia into urea is carried out by the urea cycle, a chain of

enzymatic reactions that occurs exclusively in hepatocytes. The cycle begins with free ammonia in the hepatic mitochondria. Ammonia usually arrives in the form of glutamate or glutamine. Glutamate is a key reservoir of amino groups. Extrahepatic tissues often integrate excess nitrogen into glutamine, which is subsequently transported to the liver. In the liver, ammonia is released from the amide group of glutamine and enters the urea cycle.

The urea cycle, also known as the ornithine cycle, was first described in 1932 by Hans Krebs and his assistant Kurt Henseleit (39). Urea cycle was the first metabolic cycle to be discovered and elucidated. At that time, it was known that urea was produced in the liver, but the biochemical pathway underlying nitrogen excretion remained unknown. Using liver tissue slice assays, Krebs demonstrated that the addition of ornithine in the presence of ammonia stimulates urea synthesis. Building on earlier findings that arginine is hydrolyzed by arginase to yield ornithine and urea, Krebs investigated the arginine biosynthesis pathway. Through experiments involving ornithine and citrulline, which were hypothesized to be intermediates in arginine formation, he observed that citrulline facilitated urea production from ammonia and carbon dioxide (40). These findings were critical in defining the cyclic nature of urea metabolism.

CPS1 is the rate-limiting enzyme that initiates the urea cycle by catalyzing the first committed step, the synthesis of carbamoyl phosphate (CP) from ammonia, bicarbonate, and two ATP molecules. This mitochondrial form is distinct from the cytosolic form named CPS2 or CAD, which plays a role in pyrimidine synthesis. NAGS is allosterically regulated by the amino acid arginine. Both arginine and glutamate indirectly influence the rate of the urea cycle through their involvement in NAGS-mediated NAG production.

The second step involves the incorporation of ornithine and carbamoyl phosphate to form citrulline, which is catalyzed by the enzyme ornithine transcarbamylase (OTC). Once formed, citrulline is transported from the mitochondria to the cytosol by the inner mitochondrial membrane transporter SLC25A15 (or its

paralog, SLC25A2). SLC25A15 functions as a co-transporter, importing ornithine and exporting citrulline, thereby shuttling metabolites between cellular compartments (Figure 2.2). The export of citrulline from the mitochondria initiates cytosolic reactions that form intermediates carrying nitrogenous groups for disposal.

The next step of the urea cycle incorporates the second amino group, which comes from aspartate. Aspartate is produced in the mitochondria through a transamination reaction between glutamate and oxaloacetate, which is then transported into the cytosol. Argininosuccinate synthetase (ASS) catalyzes the ATP-dependent condensation of citrulline and aspartate to form argininosuccinate (Figure 2.2). Argininosuccinate is then cleaved by argininosuccinase (or argininosuccinate lyase, ASL) to form arginine and fumarate. Notably, argininosuccinase catalyzes the only reversible reaction in this cycle. Fumarate is subsequently converted to malate and transported back into the mitochondria, where it enters the TCA cycle. Finally, arginine is cleaved by the cytosolic enzyme arginase (ARG1) to produce urea and ornithine (Figure 2.2). Urea then diffuses into the bloodstream, travels to the kidneys, and is excreted into the urine. Ornithine is transported back into the mitochondria to initiate a new cycle of urea synthesis.

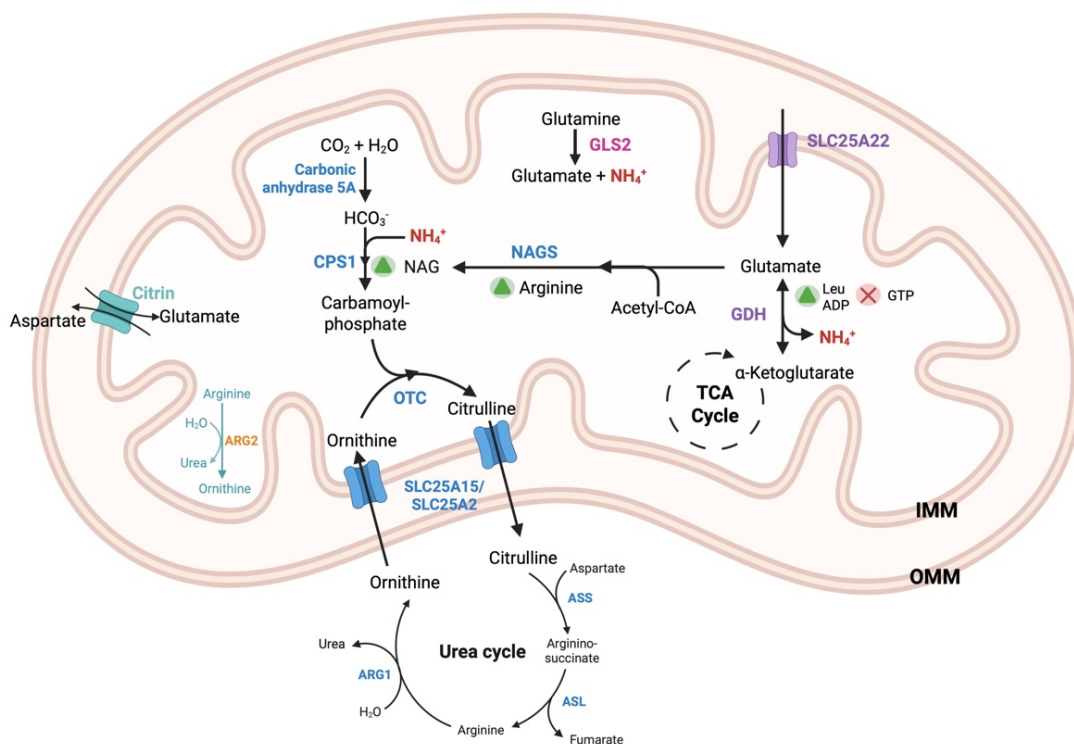


Figure 2.2: Metabolic pathway of the urea cycle in the liver mitochondria (41).

Within mitochondria, ammonia is derived both from free ammonia and from the breakdown of glutamine and glutamate, processes catalyzed by the enzymes GLS2 and GDH, respectively. Imported glutamate enters the GDH reaction, yielding ammonia and 2-oxoglutarate. The transport of glutamate into the mitochondria is carried out by the carriers Citrin and SLC25A22. Citrin, encoded by the *SLC25A13* gene, is an inner mitochondrial membrane transporter that operates as an antiporter, mediating the exchange of aspartate from the mitochondrial matrix with cytosolic glutamate. In contrast, SLC25A22, also known as Glutamate Carrier 1, functions as a symporter that co-transporters glutamate and protons (H^+) into the mitochondrial matrix. GDH activity is enhanced by ADP and leucine, while GTP serves as an inhibitor. The α -ketoglutarate produced by GDH enters the TCA cycle. CPS1 uses ammonia and bicarbonate to form carbamoyl phosphate, a reaction that is activated by NAG. NAG is synthesized by NAGS, an enzyme regulated by the amino acid arginine. OTC then combines carbamoyl phosphate with ornithine to form citrulline. The transporter ORNT1 (also known as SLC25A15 or its paralog SLC25A2) is responsible for exchanging ornithine and citrulline between the cytosol and mitochondria, allowing

the urea cycle to proceed. The cycle concludes with a reaction catalyzed by ARG1, which breaks arginine down into urea and ornithine. While ARG2 is a mitochondrial form of arginase, its precise role in hepatocytes is not yet clearly defined.

2.6. Regulation of urea cycle

Since the only rate-limiting enzyme in the urea cycle is CPS1, it is natural to consider CPS1 and its only allosteric activator, NAG, to be the main regulators of the cycle. NAG was initially discovered in the 1950s as an intermediate in the arginine biosynthesis pathway in *Escherichia coli* (42-44). Subsequent research confirmed that in prokaryotes and lower eukaryotes, NAG serves as the first intermediate in the synthesis of arginine. In 1953, Grisolia *et al.* demonstrated that a glutamate-derived compound is necessary for citrulline production in rat liver (45). In 1957, Hall *et al.* isolated acetyl-L-glutamic acid from the mammalian liver and revealed that this derivative is a natural cofactor in carbamoyl phosphate biosynthesis (46). Subsequently, the same group characterized purified carbamoyl phosphate synthetase (47) and established the biochemical basis for NAG's role as the allosteric activator of CPS1 (48).

There are three isoforms of carbamoyl phosphate synthetase (CPS): CPS1, CPS2, and CPS3 (49). CPS1 uses ammonia as its nitrogen donor, requires NAG as an allosteric activator, is composed of a single polypeptide subunit, and is located in the mitochondria. In contrast, CPS2 utilizes glutamine as its nitrogen source, functions independently of NAG, and is composed of two distinct subunits. CPS2 is a cytosolic enzyme that produces carbamoyl phosphate (CP). It catalyzes the rate-limiting step of pyrimidine biosynthesis and is a part of a trifunctional multi-domain enzyme complex named CAD (carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase). Uridine-5'-triphosphate (UTP), an end product of this reaction, allosterically inhibits CPS2 via negative feedback. CPS3 exhibits characteristics that are intermediate between those of CPS1 and CPS2; it uses glutamine as the nitrogen donor, and its activation is enhanced by the addition of NAG (although not necessary for its activation). CPS3 activity has been detected in some invertebrates and fish (50,

51). CPS3 has also been identified in the livers of certain teleost fish and is present at significantly higher levels in the livers of marine elasmobranchs, such as sharks (50, 52). In these elasmobranch species, CPS3 is involved in urea synthesis, which contributes to maintaining osmotic equilibrium with the surrounding water by allowing urea retention in their bodies.

Carbamoyl phosphate synthetases involved in pyrimidine biosynthesis in bacteria, fungi, and the cytosol (CPS2) are not dependent on NAG for activity (49). However, NAG plays a crucial role as an intermediate in arginine metabolism across various organisms. In lower organisms, the biosynthesis of arginine from glutamate follows an eight-step pathway that begins with the acetylation of glutamate to form NAG. This compound can be synthesized through two enzymatic pathways: one catalyzed by N-acetylglutamate synthase (NAGS), encoded by the *argA* gene, and the other by ornithine acetyltransferase (OAT), encoded by the *argJ* gene (53). In contrast, ureotelic animals rely exclusively on NAGS for NAG production. The regulation of NAGS differs between taxa; in lower organisms, L-arginine inhibits NAGS through feedback inhibition, whereas in mammals, it is activated allosterically by L-arginine. In mammals, the sole known function of NAGS is to generate NAG, which is an essential allosteric activator of mitochondrial CPS1. Unlike in lower organisms, arginine biosynthesis in mammals does not require NAG as a precursor and instead utilizes the enzymes of the urea cycle. Moreover, ornithine in mammals is derived from proline or glutamate through the activity of OAT. Unlike lower organisms, mammalian tissues lack expression of OAT isoforms required for *de novo* arginine biosynthesis (54).

NAGS is a mitochondrial enzyme that catalyzes the formation of NAG from glutamate and acetyl-CoA. In hepatocytes, glutamate can be generated through the enzymatic activity of GLS2 and GDH, or it can be transported into the mitochondrial matrix from the cytosol via carriers such as SLC25A22 or Citrin. Acetyl-CoA, the second substrate for NAGS, is produced within the mitochondria primarily via β -oxidation of fatty acids or the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex. NAGS activity is allosterically activated by arginine and inhibited by elevated concentrations of

several organic acids, including methylmalonyl-CoA and propionyl-CoA (55). Excess organic acids act as competitive inhibitors by interfering with acetyl-CoA binding, thereby attenuating the catalytic efficiency of NAGS (Figure 2.3).

Increased protein and ammonia intake correlates with elevated NAGS activity and higher hepatic NAG concentration. In rats, consumption of a high-protein diet results in increased mitochondrial NAG concentration in the liver and an enhanced citrulline production rate (56). NAGS in rat liver is reported to be subject to feedback inhibition by its product, NAG, with an inhibition constant (K_i) of approximately 0.07 mM (55). The regulation of CPS1 activity by NAG enables modulation of the urea cycle flux under relatively stable ammonium levels. The mitochondrial levels of arginine and/or glutamate may reflect the nitrogen disposal demand of the organism, influencing NAG synthesis via their roles as glutamate, a substrate, and arginine, an allosteric activator of NAGS.

Administration of ammonium to rats led to an increase in mitochondrial NAG levels in the liver without a corresponding change in the amount of CPS1 (57), indicating that the reduced efflux of NAG from the mitochondria may account for its accumulation in the liver. A previous study reported a similar finding, demonstrating an extension of NAG's half-life from 14 min in fed animals to 60 min in fasted ones (58). These results suggest that NAG degradation is primarily regulated by its export from the mitochondria to the cytosol. Several studies have indicated that NAG hydrolysis into glutamate and acetate occurs in the cytosol (58, 59), implying that NAG must first be transported out of the mitochondria for degradation. Meijer *et al.* studied the permeability properties of the inner membrane of liver mitochondria for NAG and revealed that NAG transport *in vivo* is predominantly unidirectional, occurring from the mitochondrial matrix to the cytosol (60-62).

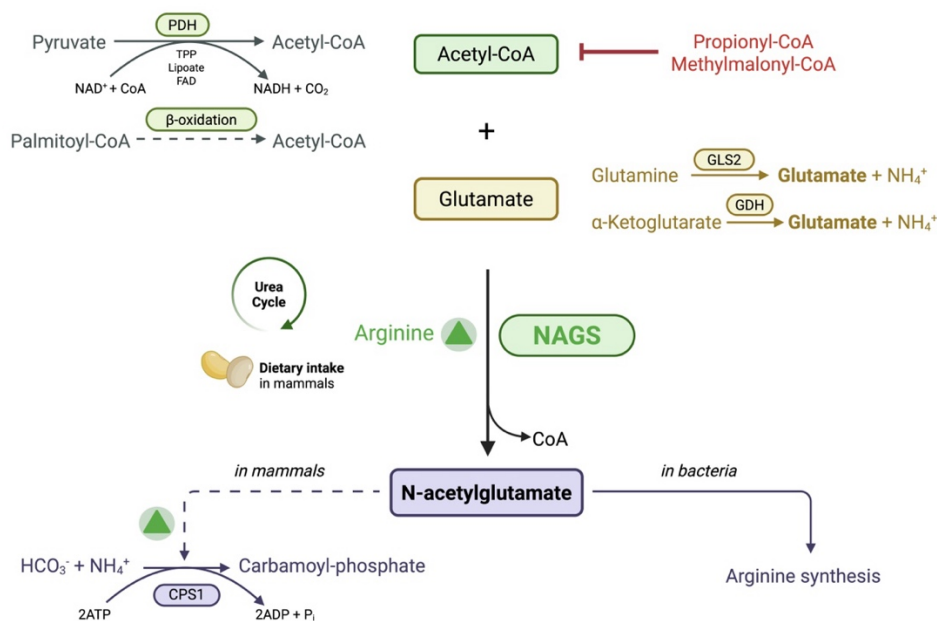
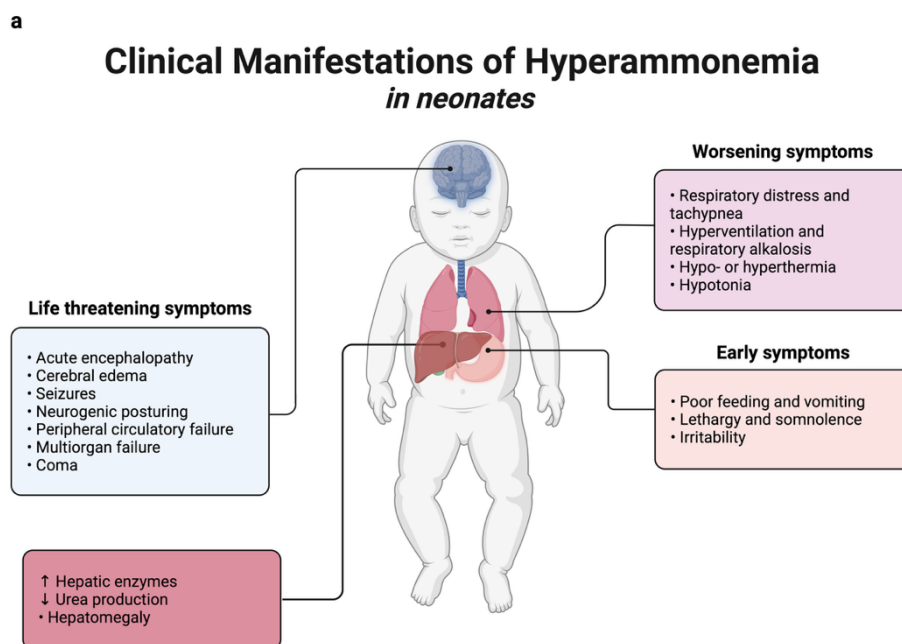


Figure 2.3: Substrates of N-acetylglutamate synthase and the fate of N-acetylglutamate. (Created with Biorender.com)

2.7. Urea cycle disorders

Hepatic mitochondria harbor a multitude of pathways to process incoming amino acids from the portal system or to generate intermediates from amino acids to yield energy. Metabolism of most amino acids is contingent upon the proper functioning of mitochondrial enzymes; deficiencies in these pathways can lead to various human disorders, particularly inborn errors of amino acid metabolism. Disruptions in urea cycle enzymes or transporters can cause ammonia to accumulate in the body, resulting in various urea cycle disorders (UCDs). These disorders typically present with symptoms such as vomiting, fatigue, seizures, and encephalopathy, particularly during states of increased protein breakdown or high protein intake. In mitochondrial (proximal) UCDs, the main concern is hyperammonemia, which requires immediate medical intervention. Treatment strategies include stopping protein consumption, administering nitrogen-scavenging medications, and, in severe cases, using dialysis to rapidly remove excess ammonia from the bloodstream.

The symptoms of an acute hyperammonemic episode differ based on a person's age and underlying health conditions. In neonates (Figure 2.4a), early signs typically include lethargy, poor feeding and vomiting. As ammonia levels rise, symptoms can progress to hypotonia and hyperventilation. If not promptly treated, severe hyperammonemia can lead to encephalopathy, seizures, coma and even death. In contrast, late-onset hyperammonemia—seen in infants, children, and adults (Figure 2.4b)—usually occurs in people with underlying metabolic disorders and is often triggered by physical or metabolic stress. These individuals usually present with failure to thrive, gastrointestinal symptoms, and psychiatric issues. Neurological complications such as developmental delays and seizures are also common. The psychiatric and neurological effects of hyperammonemia stem from elevated ammonia levels in the brain, which are metabolized to glutamine by astrocytes. The accumulation of glutamine and potassium raises intracellular osmolality, leading to cerebral edema, neuronal injury, and the release of inflammatory cytokines.



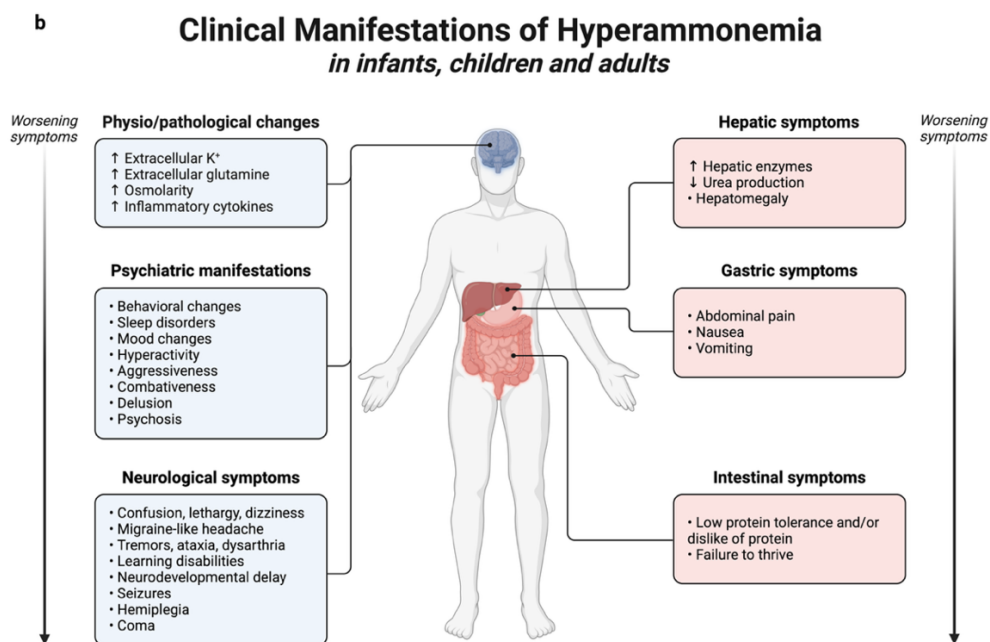


Figure 2.4: Clinical manifestations of hyperammonemia in neonates (a), in infants, children, and adult (b) (63). (Created with Biorender.com)

2.7.1. Carbamoyl Phosphate Synthetase 1 (CPS1) deficiency

CPS1 deficiency (CPS1D) is a rare autosomal recessive disorder with clinical manifestations that closely resemble those of other proximal urea cycle disorders. Impaired carbamoyl phosphate formation leads to decreased urinary excretion of orotic acid. To date, over 270 distinct mutations in the CPS1 gene have been identified, which are distributed across all exons, except exon 6 (64).

2.7.2. Ornithine Transcarbamoylase (OTC) deficiency

Ornithine transcarbamylase (OTC), an enzyme primarily located in the liver and small intestine, plays a key role in the urea cycle. Deficiency of this enzyme is known as OTC deficiency (OTCD) and is the most frequently occurring urea cycle disorder. Inherited in an X-linked recessive manner, OTCD mainly affects males who possess hemizygous mutations. Over 500 distinct pathogenic variants of the *OTC* gene

have been identified to date (65). The clinical presentation of OTCD is highly variable and largely depends on the level of residual enzyme function. In males lacking any OTC activity, the disorder typically manifests as severe hyperammonemia during the neonatal period. Due to its relatively high incidence, clear monogenic cause, and availability of animal models, OTCD has become a major focus of ongoing gene therapy research (66).

2.7.3. N-Acetylglutamate Synthase (NAGS) deficiency

Among the rarest of the urea cycle disorders, N-acetylglutamate synthase deficiency (NAGSD) has an estimated prevalence ranging from 1 in 3.5 to 7 million individuals (67). It typically presents in infancy with symptoms of hyperammonemia. The condition arises from mutations that impair NAGS enzyme function. These include variants like Glu360Asp, which disrupt L-arginine binding, as well as mutations located in regulatory noncoding regions of the gene. Such alterations reduce enzymatic activity, resulting in the NAGSD phenotype (68). Management of NAGSD involves treatment with carglumic acid (N-carbamylglutamate or NCG), a stable and bioavailable analog of NAG. NCG serves to activate CPS1, effectively bypassing the defective NAGS step (69). Moreover, in patients with unexplained hyperammonemia, a trial of NCG has been suggested as a potential diagnostic tool to assess responsiveness in lowering ammonia levels (70).

2.7.4. Carbonic Anhydrase Va (CA-VA) deficiency

Carbonic anhydrases (CAs) are crucial enzymes that facilitate the conversion of carbon dioxide to bicarbonate (Figure 2.2). Among their mitochondrial isoforms, CA-VA and CA-VB play key roles in this process. In hepatic mitochondria, bicarbonate is required for 4 critical enzymatic reactions: those catalyzed by carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1), pyruvate carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase. A deficiency in CA-VA disrupts bicarbonate availability, particularly affecting CPS1 activity, and has been associated with episodic hyperammonemia (71). Patients with CA-VA deficiency

often experience metabolic crises marked by elevated ammonia levels, lactic acidemia, and ketonuria. Unlike other urea cycle disorders, symptoms may not present immediately in infancy and can emerge later in life. The underlying mechanism involves a shortage of bicarbonate, impairing the CPS1 reaction and contributing to a proximal urea cycle disorder phenotype. Interestingly, N-carbamylglutamate (NCG) has demonstrated therapeutic benefit in managing hyperammonemia related to CA-VA deficiency (72). Although the exact pathway is not fully understood, it is proposed that reduced bicarbonate impairs propionyl-CoA carboxylase, resulting in an accumulation of propionyl-CoA. This excess competes with acetyl-CoA, inhibiting NAGS activity and diminishing NAG synthesis. The combined decrease in both NAG and bicarbonate availability compromises CPS1 function, ultimately leading to hyperammonemia. NCG appears to compensate for the NAG deficiency, thereby partially restoring CPS1 activity in affected individuals (73).

2.7.5. Hyperornithinemia-Hyperammonemia-Homocitrullinuria Syndrome

Hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria (HHH) syndrome is a rare autosomal recessive urea cycle disorder caused by mutations in the *SLC25A15* gene. This gene encodes ornithine carrier 1 (ORC1), a mitochondrial transporter responsible for shuttling ornithine into the mitochondria and exporting citrulline out. These transport functions are critical for maintaining normal urea cycle activity (Figure 2.2). When ORC1 function is compromised, ornithine builds up in the cytosol, resulting in hyperornithinemia. At the same time, reduced ornithine availability within the mitochondria impairs the activity of OTC, which leads to the accumulation of carbamoyl phosphate. The excess carbamoyl phosphate contributes to hyperammonemia and is also diverted into the pyrimidine synthesis pathway, resulting in increased urinary excretion of orotic acid. Clinically, HHH syndrome presents with features similar to other proximal urea cycle disorders. Affected individuals may exhibit symptoms of hyperammonemia, including lethargy, vomiting, failure to thrive, seizures, and, in more severe cases, coma (74).

2.7.6. Current and developing treatment modalities for urea cycle disorders

Mitochondrial amino acid metabolism in the liver is essential for key physiological functions, including nitrogen disposal, energy production, redox balance, and the synthesis of biomolecules. These pathways are highly organized within specific cellular compartments, tightly regulated, and responsive to nutrient availability. These processes can be disrupted either by genetic mutations or acquired conditions. This can result in the accumulation of toxic substances, often with severe effects on the central nervous system. Many inherited metabolic disorders are linked to defects in mitochondrial enzymes or transporters, leading to excessive metabolite buildup, elevated ammonia levels, and episodes of metabolic decompensation.

Current therapeutic strategies primarily focus on the elimination of toxic metabolites, supplementation with essential amino acids or cofactors, dietary modifications to limit the production of harmful intermediates, and metabolic pathway modulation to slow disease progression. Acute elevations in toxic metabolites are often precipitated by infections, medications, or other stressors. The elevations can result in metabolic decompensation, necessitating prompt clinical intervention and intensive monitoring. Effective management remains challenging due to factors such as recurrent decompensations, suboptimal adherence to treatment protocols, and progressive clinical deterioration. Liver transplantation represents the most definitive treatment option for patients with refractory metabolic decompensation, as it reestablishes the enzymatic function that is deficient. Disorders such as urea cycle defects and organic acidemias constitute a significant proportion of pediatric liver transplant indications (75). Liver transplantation has been shown to improve clinical outcomes (76). However, the limited availability of donor organs poses a major barrier to timely intervention for many patients. Additionally, the risks associated with post-transplant complications and the long-term impact of immunosuppressive therapy underscore the pressing need for novel therapeutic strategies to enhance long-term prognosis and quality of life.

Emerging technologies are revolutionizing the management of inborn errors of metabolism, with gene therapy leading the way. Techniques such as AAV-mediated gene addition and mRNA-based therapies are being actively explored in clinical settings for disorders like propionic acidemia and ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency. These strategies aim to reestablish functional enzyme activity within hepatocytes, potentially offering durable therapeutic outcomes. A notable example is the ongoing Phase III clinical trial (NCT05345171) evaluating DTX301, a gene therapy candidate designed for late-onset OTC deficiency. DTX301 uses a self-complementary AAV serotype 8 (scAAV8) vector to deliver the human OTC gene, and the study employs a randomized, double-blind, placebo-controlled design to assess efficacy and safety (77). In parallel, a recent breakthrough by Musunuru et al. introduced a personalized genome editing technique to correct CPS1 deficiency in a newborn (78). This innovative approach utilized lipid nanoparticles to deliver an adenine base editor—*kayjayguran abengcemeran* (k-abe)—to precisely convert a G-to-A nonsense mutation (Q335X) in the CPS1 gene. A subsequent reduction in plasma ammonia levels provided early evidence of successful genetic correction. These developments underscore a growing shift toward precision medicine in metabolic disease management. Continued progress in genome editing tools and targeted delivery systems may soon expand treatment possibilities beyond traditional enzyme replacement strategies, addressing a broader spectrum of metabolic conditions.

Abnormal levels of metabolites, commonly observed in various human diseases, play a crucial role in shedding light on disease mechanisms and serve as key biomarkers for diagnosis, prognosis, and treatment monitoring. Since metabolic reactions are fundamental to physiological balance, metabolomic analyses have uncovered previously unknown associations between specific metabolic pathways and pathological conditions. Recent advances in large-scale Genome-Wide Association Studies (GWAS) targeting the human metabolome have highlighted the significant influence of genetic variation on individual metabolic profiles (79). Building on these findings, integrative tools such as the Gene-Metabolite Association Prediction (GeneMAP) platform have emerged. GeneMAP leverages genetically predicted gene

expression and its regulatory impact on metabolites to help infer the roles of metabolic genes (80). These innovative approaches enhance our ability to unravel the complex interplay between genetic factors and metabolic networks involved in disease. In particular, deepening our understanding of hepatic mitochondrial amino acid metabolism is likely to improve the clinical management of rare metabolic diseases and contribute to the development of new therapies for more complex disorders, including cancer.

2.8. Mitochondrial amino acid metabolism and cancer

One of the defining features of cancer is metabolic reprogramming, which allows tumor cells to modify their metabolic processes to support continuous growth and survival, even in challenging environments such as the tumor microenvironment or distant metastatic sites. A well-known example of this shift is the Warburg effect, where cancer cells favor the aerobic conversion of glucose to lactate. This seemingly inefficient pathway benefits cancer cells by supplying essential biosynthetic precursors and preserving redox balance. By uncovering the molecular drivers behind these metabolic shifts, researchers gain deeper insight into tumor biology. Moreover, such knowledge opens the door to innovative therapies aimed at exploiting the unique metabolic dependencies of cancer cells.

Amino acid metabolism is vital for cancer cell survival, not only by supplying the building blocks for protein synthesis and generating energy but also by contributing to redox regulation and epigenetic modifications through multiple pathways (81, 82). One critical link between metabolism and epigenetics is one-carbon metabolism, which supports methylation processes involving both proteins and nucleic acids (83). Central to this process is methionine adenosyltransferase (MAT), which catalyzes the transformation of methionine into S-adenosylmethionine (SAM). SAM serves as the primary methyl group donor for methylation reactions involving lysine and arginine residues on proteins, as well as DNA, RNA, and various metabolites. After donating its methyl group, SAM is converted into S-adenosylhomocysteine (SAH). The availability of SAM is directly tied to methylation-driven silencing of

tumor suppressor genes—an early and critical event in the onset of many cancers (84). In parallel, the antioxidant glutathione (GSH), composed of glutamic acid, cysteine, and glycine, plays a key role in maintaining cellular redox homeostasis. GSH's role in cancer is paradoxical: low levels increase susceptibility to oxidative stress, which can promote tumor progression (85), while elevated intracellular GSH enhances antioxidant defenses, often enabling malignant cells to resist oxidative damage and sustain their growth (86).

Glutamate dehydrogenase 1 (GLUD1) exhibits divergent functions across different cancer types. While it is notably upregulated in certain malignancies such as non-small cell lung cancer (NSCLC) (87), its expression is diminished in others, including hepatocellular carcinoma (HCC) and clear cell renal carcinoma (88). Zhao *et al.* revealed that elevating GLUD1 expression suppresses both the proliferation of HCC cells and tumor growth *in vitro* and *in vivo*, whereas reducing GLUD1 levels accelerates HCC development (89). Due to its context-dependent roles, GLUD1 has emerged as a promising target for therapeutic intervention. For instance, epigallocatechin gallate (EGCG), a compound known to inhibit both GLUD1 and GLUD2, has been shown to impede the growth of IDH1-mutant cancer cell lines *in vitro* (90). Similarly, the GLUD1 inhibitor R162 has demonstrated notable anti-tumor activity by significantly limiting cell proliferation in NSCLC patient-derived xenograft models (87).

Numerous cancer types rely on glutamine as a key energy source to maintain their ability to proliferate, mainly by increasing glutamine uptake and glutaminolysis (91, 92). The enzyme glutaminase, specifically the liver-type isoform encoded by the *GLS2* gene, plays a complex and context-dependent role in cancer development, acting either as an oncogene or a tumor suppressor depending on the cancer type. Using the Oncomine database, Saha *et al.* identified that *GLS2* expression is significantly elevated in cancers such as those of the bladder, colon, rectum, head and neck, peritoneum, and lung. Conversely, its expression is notably downregulated in brain, liver, and pancreatic tumors (93). In liver cancer specifically, Suzuki *et al.* demonstrated a tumor-suppressive function for *GLS2*. Their *in vivo* studies showed

that GLS2 inhibits HCC progression by promoting ferroptosis. This effect is mediated by increased production of lipid reactive oxygen species (ROS), a byproduct generated when glutamate is converted into α -ketoglutarate during glutaminolysis (92).

Carbamoyl phosphate (CP) plays a significant role in the metabolic reprogramming of cancer cells. While it is best known as the first intermediate in the rate-limiting step of the urea cycle, CP also has an essential function in *de novo* pyrimidine biosynthesis, where it is synthesized in the cytosol by the multi-functional enzyme CAD using glutamine, CO₂, and ATP. Interestingly, certain cancer cells repurpose mitochondrial CP generated by the enzyme CPS1 to fuel cytosolic pyrimidine synthesis. This is made possible by CPS1 overexpression, which leads to elevated mitochondrial CP levels that are transported into the cytosol to support nucleotide production. Such metabolic rerouting has been observed in specific non-small cell lung cancer (NSCLC) cases, particularly where KRAS activation is combined with LKB1 loss, both of which promote tumor progression (94). Moreover, high CPS1 expression has been associated with poor prognosis in cholangiocarcinoma, reinforcing its role in aggressive cancer phenotypes (95). In contrast, HCC often shows reduced CPS1 expression, commonly resulting from promoter hypermethylation. This decrease in CPS1 is typically accompanied by upregulation of CAD, which may redirect glutamine toward the CAD-mediated *de novo* pyrimidine synthesis pathway (96).

Just as CPS1 overexpression contributes to CP buildup, a reduction in OTC levels can also result in mitochondrial CP accumulation, owing to decreased utilization of CP in the urea cycle. When OTC expression is diminished, ornithine is diverted into alternative metabolic routes, such as polyamine biosynthesis, which supports cancer cell survival (97). This metabolic adaptation has been observed in HCC, where studies have identified reduced OTC expression in patient tissue samples, highlighting a potential mechanism through which tumor cells adjust to altered metabolic demands (98).

2.9. Mitochondrial protease YME1L1

The maintenance of mitochondrial homeostasis depends on robust protein quality control mechanisms. Within mitochondria, several ATP-dependent proteolytic complexes with distinct substrate specificities are distributed across various sub-compartments, where they perform essential roles in preserving mitochondrial proteostasis. Among the key proteolytic systems, the m-AAA and i-AAA (ATPases Associated with diverse cellular Activities) proteases are embedded within the inner mitochondrial membrane, with their catalytic domains projecting toward opposite compartments. The i-AAA protease, exemplified by YME1L, carries out proteolysis on the intermembrane space side. Conversely, the m-AAA protease, represented by AFG3L2, exerts its proteolytic activity toward the mitochondrial matrix.

These AAA proteases participate in a wide range of mitochondrial processes, including protein quality control, the regulation of mitochondrial morphology, and the biogenesis of respiratory chain complexes (99). YME1L1 mediates the proteolytic processing of OPA1, a key regulator of mitochondrial fusion. Furthermore, YME1L1 targets several additional substrates, including Tim17A and OMA1, thereby contributing to the dynamic regulation of mitochondrial function. Additionally, MacVicar *et al.* identified the mTORC1–LIPIN1–YME1L axis as a post-translational regulator of mitochondrial proteostasis, suggesting a link between mitochondrial nutrient metabolism and protease system.

3. MATERIALS AND METHODS

All reagents and equipment used in this study were sourced from Birsoy Laboratory at The Rockefeller University in New York, NY.

3.1. Cell Lines and Culture Conditions

Human cell lines, HEK293T and HepG2, were obtained from ATCC. Cell line authentication was verified through short tandem repeat (STR) profiling. Cell lines were routinely verified to be free of mycoplasma contamination. HEK293T cells were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine. HepG2 cells were cultured in DMEM containing 4.5 g/L glucose, 110 mg/L sodium pyruvate, and 4 mM L-glutamine. Culture media for both cell lines were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin. All cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 21% O₂.

3.2. Establishment of Knockout and Overexpression Models in Cell Lines

For overexpression cell lines, synthetic gene fragments containing the cDNA for the coding sequences of human *SLCA25A47*, 3xFlag-*SLC25A47*, and *NAGS* were purchased from Twist Biosciences. cDNA for *SLC25A47*, 3xFlag-*SLC25A47*, *NAGS* were cloned into pMXS-IRES-BLAST or pLV-EF1 α -IRES-Puro by Gibson assembly (Appendix-1). The pMXS-IRES-BLAST plasmid was linearized by restriction digestion with BamHI and NotI, whereas the pLV-EF1 α -IRES-Puro plasmid was linearized using EcoRI and BamHI.

For generation of knockout cell lines, oligonucleotides encoding sgRNAs targeting *SLC25A47* and *YME1L1* were synthesized by IDT and cloned into the lentiCRISPRv2-Opti vector, which had been linearized with BsmBI, using Gibson assembly (Table 3.1). Knockout cells were selected by puromycin selection and consequent FACS-based single-cell cloning.

HEK293T cells were co-transfected with sgRNA- or cDNA-expressing plasmids, packaging vectors—including Delta-VPR (for lentiviral systems such as pLV) or Gag-Pol (for retroviral systems such as pMXs)—and pCMV-VSV-G, using XTremeGene 9 transfection reagent. Viral supernatants were harvested 48 h post-transfection, filtered through a 0.45 μm membrane, and used to transduce target cells in 6-well plates. Transduction was carried out in the presence of 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ polybrene, followed by centrifugation at 2200 rpm for 80 minutes. The culture medium was replaced the next day to remove residual virus.

Selection of transduced cells was performed using blasticidin for constructs derived from pMXS-IRES-BLAST, and puromycin for those derived from pLV-IRES-Puro. Each construct was validated through Sanger sequencing. Due to the lack of a validated antibody for reliable detection of endogenous SLC25A47, cells transduced or transfected with sgSLC25A47 were analyzed using Synthego® ICE (Inference of CRISPR Edits), based on Sanger sequencing of genomic DNA. Matching empty vectors (lacking inserts) were used as controls for all constructs. Additional constructs used in this study include pMXS-IRES-BLAST_3xHA-OMP25-mCherry; pMXS-IRES-BLAST_3xMyc-OMP25-mCherry.

Table 3.1: Sequences of single guide RNA's used in this project.

sgSLC25A47_4	CCTGACGTCGCCCACTGAG
sgSLC25A47_5	TTGCCACCTACTTCCTTTCC
sgYME1L1_3	GTCGAGCACGGTGCAACCCC
sgYME1L1_4	GCATTGATGAGATGACTCAG

3.3. Mice

3.3.1. Generation of Slc25a47-KO mice

All animal studies were performed in accordance with a protocol approved by the Institutional Animal Use and Care Committee (IACUC) at The Rockefeller

University. Animals were housed in ventilated cages on a standard light-dark cycle with food and water *ad libitum* unless otherwise specified.

The C57BL/6J wild-type mice, NSG mice strain were acquired from Jackson Laboratory. To produce CMV-Cre;mito-tag mice, male CMV-Cre mice—also obtained from Jackson Laboratory—were bred with mito-tag floxed female mice. Offspring were then genotyped to confirm the presence of both the mito-tag transgene and Cre recombinase.

Slc25a47-KO mice were generated by CRISPR/Genome Editing and the Transgenic/Reproductive Center at The Rockefeller University. Slc25a47 KO mice were generated by injecting the Cas9/gRNA RNP complex into C57BL/6J mouse zygotes to create indels in exon 2 and frameshift, thereby aborting the translation of the Slc25a47 protein. Two gRNA's binding to the genomic target (5'-TGTTGCTGTGGGCTACCCTC *TGG* and 5' - GTACCTTCACTGTATCCAGA *GGG*) on exon 2 of *Slc25a47* were selected based on the evaluation of off-target potential using the web-based tool CRISPOR (<http://crispor.tefor.net>) (100) and of on-target efficiency in mouse embryos. We used synthetic crRNA and tracrRNA from IDT to assemble the gRNA. A microinjection cocktail containing gRNA and Cas9 protein was prepared as described previously (101). Briefly, crRNA and tracrRNA were annealed by heating to 98°C for 2 min and cooling at room temperature for 5 min. Cas9 protein (0.2µM, Cat#1081061, IDT) was added to the solution containing the assembled gRNA (0.1µM), incubated at 37 °C for 15 min to form the ribonucleoprotein complex, purified using a Millipore Ultrafree column (Cat# UFC30VV25, Millipore), and placed on ice until microinjection. After microinjection, the embryos were transferred to the oviduct of surrogate mice on the same day and allowed to develop to term.

3.3.2. Mouse serum for metabolomic analysis

Mouse blood was collected from the submandibular vein (or facial vein) using a lancet into EDTA-containing tubes and centrifuged at $500 \times g$ for 5 min at 4°C. The

plasma from supernatant (5 μ L) was added to 45 μ L of cold 75% acetonitrile:25% methanol buffer containing heavy amino acid standards, mixed, centrifuged for 10 min at over $14,000 \times g$ at 4°C, and preserved at -80°C.

3.3.3. BUN Assay for mouse serum samples

BUN (Blood Urea Nitrogen) measures the amount of urea present in the blood. It serves as a key indicator of both kidney and liver function since urea is formed in the liver and eliminated by the kidneys. The BUN assay relies on a coupled enzymatic reaction. In the first step, urease breaks down urea into ammonia and carbon dioxide. The released ammonia then reacts with α -ketoglutarate in the presence of NADH to form glutamate. During this process, NADH is oxidized in equal proportion, causing a reduction in absorbance at 340 nm. This decrease in absorbance is directly related to the concentration of urea nitrogen in the sample.

3.3.4. Mouse tumor experiments

NSG mice were euthanized at 4 weeks post-injection, before tumor volumes reached the maximum permitted size of 2 cm³. For subcutaneous tumor initiation, 1×10^6 HepG2 cells were suspended in 100 μ L of serum-free DMEM containing 30% Matrigel and injected into the flanks of each mouse, with distinct experimental conditions administered to each side. At the time of euthanasia, tumors were excised and weighed.

3.4. Immunoblotting

For cultured cells, 1×10^6 cells were washed in cold PBS and lysed using Triton lysis buffer (50 mM Tris-HCl at pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100) supplemented with 1:200 protease inhibitor cocktail. For tissue samples, ~10–20 mg of tissue sample was washed with cold PBS, mechanically homogenized in microcentrifuge tubes using polypropylene pestles. The homogenized tissue then lysed in Triton lysis buffer containing one tablet of cComplete™ EDTA-free protease

inhibitor cocktail. All lysates were subsequently sonicated, centrifuged at $1,000 \times g$, and the supernatant was collected as the protein lysate.

Total protein concentration was determined using the BCA® Protein Assay Kit, with bovine serum albumin (BSA) as the protein standard. Protein levels were normalized across samples. Equal amounts of protein were denatured by boiling at 95°C for 5 min, separated on 10%–20% SDS-PAGE gels, and analyzed by standard immunoblotting protocol. After the electrophoretic transfer and PVDF membranes were blocked with 5% BSA in TBS-T (Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20) and incubated overnight at 4°C with primary antibodies. Following washes with TBS-T (at least 3 times), membranes were incubated with secondary antibodies (diluted 1:3,000) for 1 h at room temperature. After additional washes with TBS-T, membranes were treated with ECL chemiluminescent substrate and visualized using autoradiography films.

3.5. Immunofluorescence

HEK293T cells were seeded on coverslips pre-coated with poly-D-lysine in 6-well plates. On the day of the experiment, the cells were washed three times with PBS, fixed with 4% formaldehyde for 15 min, washed again, and permeabilized with 0.1% Triton-X 100. After blocking with 1% BSA for 30 min, the cells were stained with the indicated primary antibodies overnight at 4°C . Coverslips were then washed with PBS for 3 times, stained with corresponding goat anti-mouse Alexa Fluor 488, goat anti-mouse Alexa Fluor 488 conjugated secondary antibodies. The antibody-labelled slides were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as nuclear counterstain (100 ng/ml). After three additional PBS washes, the coverslips were mounted on glass slides using Molecular Probes ProLong Gold Antifade Mountant and sealed with nail polish. Confocal imaging was performed using a confocal microscope. FLAG (diluted 1:400) and Citrate Synthase (diluted 1:200) antibodies were used.

3.6. Mitochondrial immunopurification

3.6.1 Mitochondrial immunopurification from cells

Mitochondria were rapidly isolated from cultured cells following established protocols (102, 103), with all procedures performed on ice to preserve organelle integrity. HEK293T and HepG2 cells expressing either 3×HA–OMP25–mCherry (for mitochondrial enrichment) or 3×Myc–OMP25–mCherry (as a negative control) were utilized. Approximately 3×10^7 cells were harvested, washed twice with ice-cold 0.9% saline solution, and then scraped into 1 mL of cold KPBS buffer (136 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄, pH 7.25, prepared using LC/MS-grade water). Cells were then pelleted by centrifugation at $1,000 \times g$ for 90 seconds at 4°C. The cell pellet was gently resuspended in 1 mL of KPBS. Two small aliquots were taken for downstream analyses: one 10 µL aliquot was combined with 40 µL of 1% Triton lysis buffer supplemented with protease inhibitors for whole-cell protein extraction, while a second 10 µL aliquot was mixed with 50 µL of 80% methanol containing fully ¹⁵N- and ¹³C-labeled amino acid standards for metabolite extraction.

The remaining cells were homogenized using a 2 mL Dounce homogenizer with two sets of 20 strokes each. The homogenate was centrifuged and subsequently incubated with 200 µL of anti-HA magnetic beads (pre-washed in KPBS) on a rotator for 5 minutes at 4°C. The beads were washed three times with ice-cold KPBS. ~10% of the bead suspension was lysed in 1% Triton buffer for protein analysis, while the remaining 90% was subjected to extraction with 80% methanol containing heavy isotope-labeled amino acid standards. This extraction was performed on a rotator for 10 minutes at 4°C. Following centrifugation at $20,000 \times g$ to remove residual beads or debris, the supernatant was directly utilized for LC-MS analysis of polar metabolites without prior drying. Metabolite concentrations were normalized to citrate synthase protein abundance, determined by Western blot or to NAD⁺ levels.

3.6.2. Mitochondrial immunoprecipitation from tissues

A modified protocol based on a previously published method was employed for mitochondrial immunoprecipitation (104). All steps were performed on ice. Liver tissue was collected using a 4 mm punch biopsy tool and rinsed three times in ice-cold K-PBS. ~50 mg of liver tissue (from two tissue pieces) was homogenized in 1 mL of K-PBS using a pestle attached to a mixer rotating at 220 rpm in a 4 °C cold room for 30 seconds or until complete homogenization. The homogenate was then transferred to a low-protein-binding microcentrifuge tube and centrifuged at $1,000 \times g$ for 2 min at 4 °C. A 10 μ L aliquot of the supernatant was retained as the input sample and processed with appropriate extraction buffers. The remaining supernatant was incubated with anti-HA magnetic beads pre-washed three times with K-PBS for 5 minutes on a rotator at 4°C. Beads were then washed three times with K-PBS to remove unbound material. Following the final wash, the bead suspension was split equally: one half was subjected to protein extraction by removing the buffer and resuspending the beads in 50 μ L of Triton lysis buffer, while the other half was extracted using 80% methanol containing fully labeled ^{15}N and ^{13}C amino acid internal standards. For immunoblotting, 5 μ L aliquots of both input and immunoprecipitated protein samples were diluted in 45 μ L of Triton lysis buffer.

3.7. Metabolite profiling by LC/MS

Two days before the experiment, approximately 300,000 HEK293T cells were seeded into 6-well plates. Following pharmacological treatments, cells were rapidly washed with 0.9% NaCl twice, and polar metabolites were extracted in 80% methanol containing ^{15}N and ^{13}C fully labeled amino acid standards. Cell extracts were rotated end-to-end for 10 min at 4°C and spun at $19,000 \times g$ to remove insoluble cell debris. The supernatant was dried using nitrogen blowdown and stored at -80°C until analysis. The metabolite amount was normalized to the total protein amount measured using the BCA Protein Assay Kit. Relative metabolite levels were quantified using XCalibur QualBrowser 2.2 and Skyline Targeted Mass Spec Environment, applying a 5-ppm mass tolerance and referencing a pooled metabolite standard library for metabolite

identification. Relative metabolite levels were normalized to internal metabolite controls.

3.8. LC-MS quantification of whole-cell and mitochondrial metabolites

Polar metabolites were extracted in 80 % methanol containing ^{15}N and ^{13}C fully labeled amino acid standards. Extracts were rotated end-to-end for 10 min at 4°C , spun at $19,000 \times g$ to remove insoluble cell debris, and stored at -80°C until liquid chromatography-mass spectrometry analysis. Subsequently, LC-MS analysis was conducted following previously established protocols (105). Relative metabolite levels were reported by normalizing to internal metabolite controls, NAD for mito-IP and tryptophan for whole cell samples.

3.9. FACS-based CRISPR screen

For the mitochondrial protease CRISPR screen, sgRNA sequences were designed using the CRISPick portal (106) and ordered from Integrated DNA Technologies (IDT) (<https://portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/public>). For the whole-mitochondrial (MITO-sgRNA) library, mitochondrial-localized protein candidates were selected from the IMPI or MitoCarta2.0 databases (107, 108), and ssDNA oligonucleotide pool was ordered from Agilent. The pooled oligonucleotide was Gibson-assembled as ssDNA or dsDNA after PCR amplification into a linearized LentiCRISPRv2-Opti modified vector (in which the FLAG tag on Cas9 was removed) using NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix or Gibson Assembly Master Mix. The assembly product was used to transform Electrocompetent cells by electroporation on a BioRad Gene Pulser with the following settings: 25 μF , 200 Ohm, and 1600 Volts. Transformed bacteria were allowed to grow overnight shaking at 32°C . The library plasmids were extracted using the QIAGEN Plasmid Midi or Maxi Kit and packaged into lentiviruses.

A single-cell clone of HEK293T cells co-expressing split mNeonGreen2-*SLC25A47* and split mNeonGreen2-*MICU1* cDNA was generated by seeding these

cells in a 96-well plate at an average density of <0.5 cells per well after FACS-based sorting (109). This clone was then expanded and used for the screen. Briefly, cells approximately 1,000X the number of sgRNAs in the library were infected at MOI of 0.5. Infected cells were selected 48 h post-infection with 2 μ g/ml puromycin for three days. Puromycin was then withdrawn, and the cells were allowed to recover for two days. The cells were then harvested by trypsinization, washed, and resuspended in ice-cold PBS. Before sorting, cells were rehydrated by adding 100% volume of PBS dropwise; the cells were then pelleted and washed twice with ice-cold PBS and resuspended in FACS buffer (0.5% BSA and 2 mM EDTA in PBS). The cells were then washed twice with FACS buffer, passed through a 70 μ m cell strainer, and sorted based on FITC signal intensity. For the mitochondrial protease screen, approximately top 3% of mNeonGreen-hi and 10% of mNeonGreen-lo cells were collected. Genomic DNA from pre-sorted and sorted cells was extracted using the Qiagen Blood & Cell Culture DNA Midi Kit. sgRNA sequences were amplified by PCR and sequenced on Illumina MiSeq or NextSeq 500 sequencers. Gene scores were calculated as the median log₂ fold change of sgRNA abundance in a sorted fraction over the pre-sort control.

3.10. Quantification and Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism v10 and Microsoft Excel 16.98. Metabolomic data were analyzed with Skyline (v.20.1.1.158), and image analysis was performed using ImageJ FIJI (NIH, Version 1.0). Details regarding error bars, P-values, and statistical tests are provided in the figures. All experiments were conducted at least twice, yielding consistent results. Both technical and biological replicates were consistently reproducible throughout the study. Comparisons between two group means were assessed using a two-tailed unpaired or paired t-test.

Table 3.2: List of reagents, cell lines, animal models and tools used in this project.

	SOURCE	Catalog #
Cell Lines		
HepG2	ATCC	HB-8065
HEK293T	ATCC	CRL-1573
Mouse		
C57BL/6J	The Jackson Laboratory	000664
B6.C-Tg(CMV-cre)1Cgn/J	The Jackson Laboratory	006054
NSG	The Jackson Laboratory	005557
Bacterial Strains		
NEB Stable Competent <i>E. coli</i>	New England Biolabs	C3040
Chemicals		
RPMI 1640 Culture Media	GIBCO	11875
DMEM Culture Media	GIBCO	11965
Trypsin	GIBCO	25200
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	GIBCO	15140122
Fetal Bovine Serum	Sigma	12306C
DMSO	AlfaAesar	A13280-36
HPLC Grade Water	Fisher Scientific	W6
HPLC Grade Methanol	Fisher Scientific	A454-1
Heavy labeled amino acid internal standards	Cambridge Isotopes	MSK-A2-1.2
Ethanol	Fisher Scientific	04-355-222
EcoRI-HF	New England Biolabs	3101L
BamHI-HF	New England Biolabs	R3136L
BsmBI	New England Biolabs	R0580
T4 DNA ligase	New England Biolabs	M0202
ExTaq DNA Polymerase	Takara	RR001A
XtremeGene9	Roche	6365779001
Polybrene	Sigma	H9268
Puromycin	Sigma	P8833
Blasticidin	Invivogen	ant-bl-1
Molecular Probes ProLong Gold Antifade Mountant	Thermo Fisher Scientific	P36934
cOmplete EDTA-free protease inhibitor	Roche	11836170001
Protease inhibitor cocktail	EMD Millipore	535140

L-Buthionine-sulfoximine	Sigma	B2515
N-Carbamyl-L-glutamic acid	Sigma	C4375
Erastin	Selleckchem	S7242
Cycloheximide	Cayman Chemical Company	14126
Cultrex UltiMatrix Reduced Growth Factor Basement Membrane Extract	R&D Systems	BME001-05
Phosphate Buffered Saline	Corning	21-040-CM
Optima LC-MS Grade Water	Fisher Scientific	W6500
Optima LC-MS Grade Methanol	Fisher Scientific	A456-500
Devices		
Z2 Coulter Counter	Beckman	Model Z2
SpectraMax Microplate Reader	Molecular Devices	Model M5
Primovert Microscope	Carl Zeiss	415510-1105-000
FACSAriaII	BD Biosciences	643181
SRX-101A Film Processor	Konica Minolta	
Multiphoton microscope with confocal modality	Nikon	A1R MP
Cell Sorter	Sony	MA900
Tools - Assays		
Disposable Biopsy Punch 4mm	Integra-Miltex	33-34
anti-HA magnetic beads	Thermo Scientific Pierce	88837
Immobilon-P PVDF Membrane	Merck Millipore	IPVH10100
Novex 10%–20% SDS-PAGE gels	Thermo Fisher	
Pierce™ BCA® Protein Assay Kits	Thermo Scientific	23225
Premium Autoradiography Films	Thomas Scientific	
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix	New England Biolabs	E2621L
Blood & Cell Culture DNA Midi Kit	Qiagen	13343
Plasmid Mini Kit	Qiagen	12123
Plasmid Midi Kit	Qiagen	12143
Plasmid Maxi Kit	Qiagen	12162
ECL Chemiluminescent Detection System	Perkin Elmer LLC	E-IR-R307
Antibodies		
Citrate Synthase	Cell Signaling Technology	14309S
VDAC	Cell Signaling Technology	4661S
OGDH	Proteintech	15212-1-AP
GAPDH	GeneTex	GTX627408

SLC25A12	abcam	200201
Beta-actin	GeneTex	GTX109639
Cathepsin C	Santa Cruz Biotechnology	sc-74590
Beta-tubulin	GeneTex	GTX101279
YME1L1	Proteintech	11510-1-AP
OPA1	Cell Signaling Technology	67589T
FLAG	Sigma-Aldrich	F1804
SLC25A47	Proteintech	26292-1-AP
NAGS	Proteintech	21566-1-AP
Anti-mouse IgG-HRP linked	Cell Signalling	7076
Anti-rabbit IgG-HRP linked	Cell Signalling	7074

4. RESULTS

4.1. Determining a model transporter to study cancer metabolism

The SLC25A family of transporters, localized to the inner mitochondrial membrane, facilitates the translocation of various nutrients across this membrane. To date, only a limited number of SLC25A transporters have been functionally characterized, with several members remaining as orphan transporters. For this study, we established specific criteria to select candidate transporters for our investigation. The primary criterion was organ specificity, with the intention to focus on a transporter exhibiting a high degree of organ-specific expression. This criterion not only implies a potentially specialized physiological role within that organ but also simplifies experimental design. The secondary criterion required the transporter to have documented associations with cancer.

Upon evaluating various SLC25A family members, SLC25A47 emerged as a suitable candidate, fulfilling both established criteria. Notably, SLC25A47 demonstrates exclusive expression in the liver (Figure 4.1a). Furthermore, the tau specificity score for SLC25A47 is 0.98. This score quantifies how specifically a gene is expressed across different cell or tissue types, ranging from 0 to 1—where 0 reflects uniform expression across all types, and 1 indicates expression limited to a single cell or tissue type. Therefore, a score of 0.98 suggests that SLC25A47 has highly tissue-specific expression.

Prior studies have reported a significant downregulation of SLC25A47 in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues compared to matched non-cancerous liver tissues (1). Due to this observed reduction, SLC25A47 has been designated as HDMCP (HCC-down-regulated mitochondrial carrier protein).

Preliminary phylogenetic analysis using the Phylogene platform revealed that SLC25A47 co-evolved with SLC25A15 and SLC25A2, which are paralogs encoding ornithine–citrulline antiporters involved in the urea cycle (Figure 4.1b) (110). This

evolutionary relationship suggests that *SLC25A47* may participate in a liver-specific metabolic pathway potentially linked to the urea cycle. Upon reviewing the literature, previous studies in rat liver have shown that NAG hydrolysis does not occur within the mitochondria and the mitochondrial transporter responsible for exporting N-acetylglutamate (NAG), the key allosteric activator of CPS1 in the urea cycle, had not yet been identified (58-62). Based on this knowledge gap, we hypothesized that *SLC25A47* functions as a mitochondrial exporter of NAG.

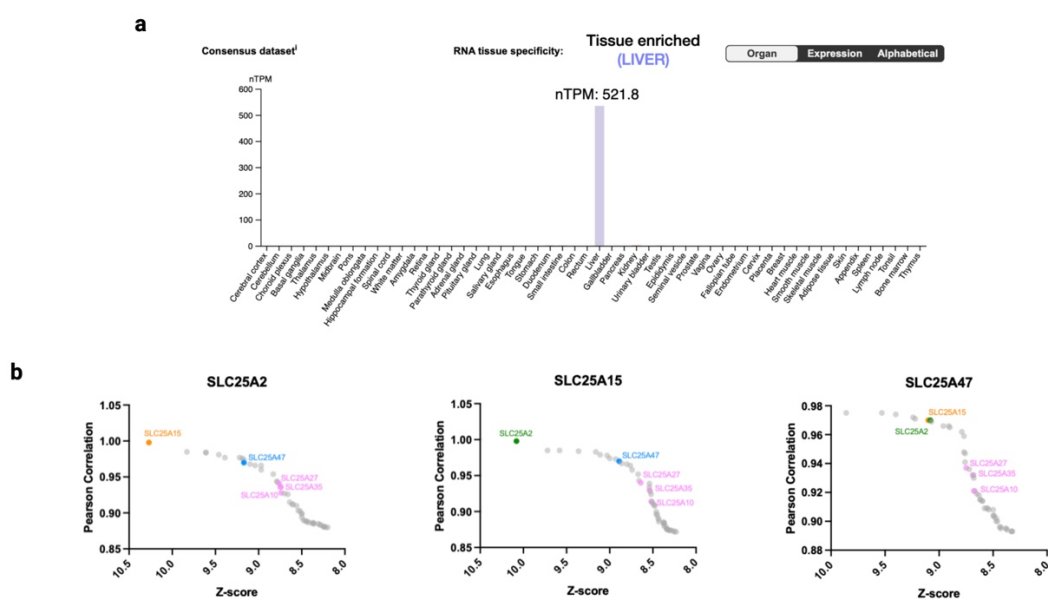


Figure 4.1: Adapted from Human Protein Atlas, The RNA specificity category is based on mRNA expression levels in the consensus dataset which is calculated from the RNA expression levels in samples from HPA (Human Protein Atlas) RNA-seq data and The Genotype-Tissue Expression (GTEx) RNA-seq data. nTPM (transcripts per million) for *SLC25A47* is 521.8 in liver samples indicating tissue specific expression (**a**). Top 50 genes co-evolved with *SLC25A2*, *SLC25A15*, and *SLC25A47* according to PhyloGene platform. Additional members of *SLC25A* family are indicated in pink (**b**).

4.2. Mitochondrial N-acetylglutamate is depleted in SLC25A47-overexpressing cells

The HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line was selected as the optimal *in vitro* model for this study. To validate our findings, parallel experiments were conducted using HEK293T cells as controls, given that mitochondrial immunoprecipitation in these cells yields more distinct results, attributable to their smaller size and reduced presence of contaminating organelles.

To assess the functionality of this transporter in an unbiased way, we generated *SLC25A47*-knockout and cDNA complemented HepG2 cells expressing Mito-Tag construct (3×HA-OMP25-mCherry). 3×myc-OMP25-mCherry construct was used as the Mito-Tag control. Then, we profiled the polar metabolome of both whole cells and immunopurified mitochondria by liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS). *SLC25A47*-knockout cells complemented with *SLC25A47* cDNA showed a significant depletion of N-acetylglutamate (NAG) (Figure 4.2b-c). Notably, loss of SLC25A47 did not affect the levels of whole cell NAG or most other mitochondrial metabolites but caused a 5- to 8-fold increase in mitochondrial NAG (Figure 4.2a). These results were further confirmed in *SLC25A47*-null HEK293T cells exhibiting overexpression phenotype (Figure 4.2d-g). These data support the hypothesis that SLC25A47 mediates mitochondrial levels of NAG.

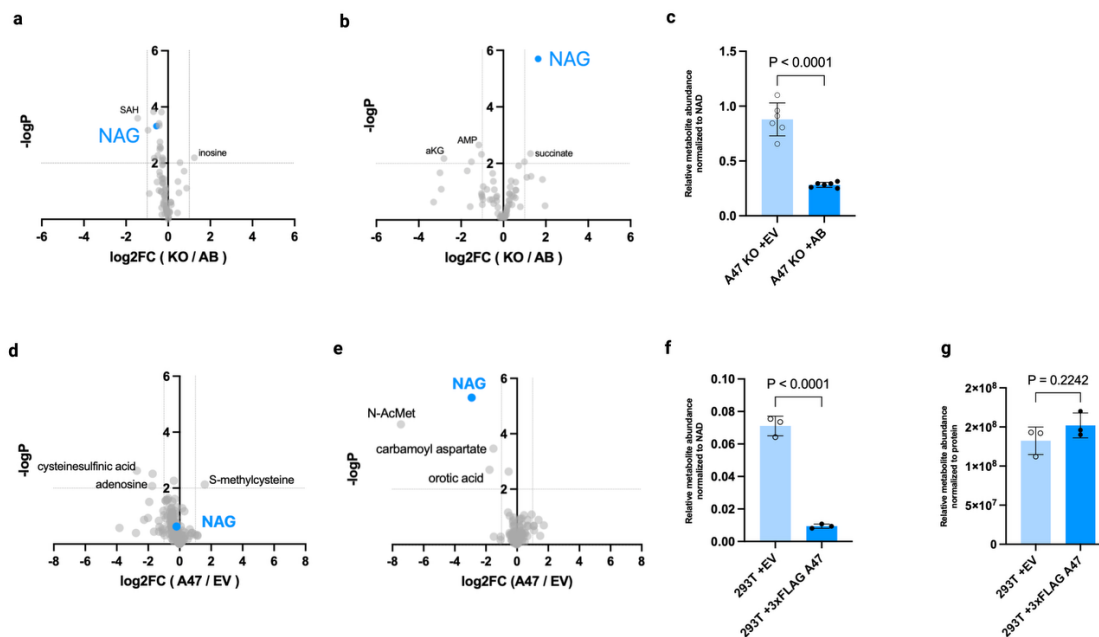


Figure 4.2: Volcano plot with $-\log_{10}(\text{p-adj})$ versus \log_2 (fold change) in metabolite abundance normalized to nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) levels. Input (whole cell) **(a)** and mitochondria **(b)** from HepG2 *SLC25A47*-knockout and corresponding control cells. Relative metabolite abundance of mitochondrial NAG **(c)** levels from *SLC25A47*-knockout HepG2 cell lines compared with the control ones. Input **(d)** and mitochondria **(e)** from HEK293T 3xFLAG-*SLC25A47* cDNA complemented cells and corresponding controls. Relative metabolite abundance of mitochondrial **(f)** and whole cell **(g)** NAG levels from *SLC25A47*-cDNA complemented HEK293T cell lines compared with the control ones. The horizontal dotted line is the significance threshold of $p < 0.05$. The vertical dotted line corresponds to $\text{Abs}(\log_2\text{FC}) = 1$. Statistical significance was determined by the two-tailed unpaired t-test; $n = 3$ biological replicates. For bar plots, data are the mean \pm SEM with the individual points shown. A47: *SLC25A47*, AB: addback, EV: empty vector, KO: knockout.

4.3. *SLC25A47* lowers supraphysiological levels of mitochondrial NAG

To determine whether *SLC25A47* facilitates the export of elevated mitochondrial NAG levels under conditions mimicking high protein intake, we overexpressed the NAGS enzyme in HEK293T cells. Initially, we generated stable HEK293T cell lines expressing NAGS, followed by superinfection with a vector encoding *SLC25A47*. This experimental design corroborated findings from previous

experiments. Notably, cells co-expressing NAGS and SLC25A47 exhibited reduced mitochondrial NAG levels compared to cells expressing NAGS alone (Figure 4.3a). At the whole cell level, NAG concentrations were elevated in the NAGS-overexpressing group, with even greater increases observed in cells co-expressing SLC25A47 (Figure 4.3b). These findings suggest a potential feedback regulatory interaction between SLC25A47 and NAGS, warranting further investigation to elucidate the underlying molecular mechanisms.

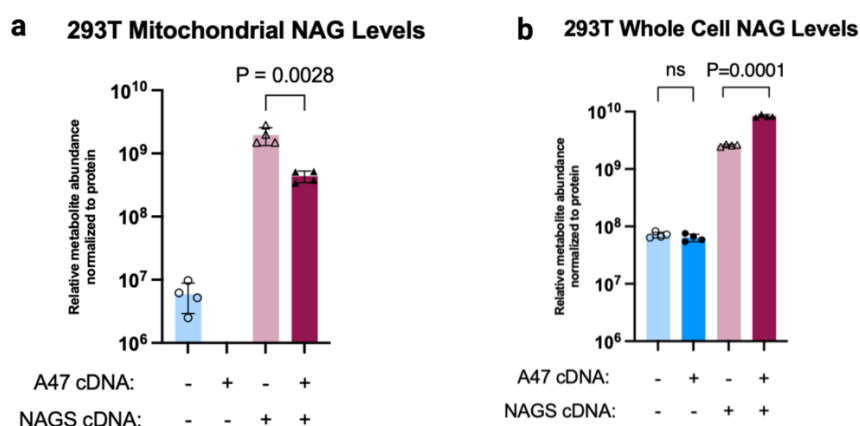


Figure 4.3: Relative metabolite abundance of mitochondrial (a) or input (whole cell) (b) NAG levels from HEK293T expressing *SLC25A47* cDNA and/or *NAGS* cDNA compared with an empty vector control. Data are the mean \pm SEM, with the individual points shown. Statistical significance was determined by the two-tailed unpaired t-test; $n = 4$ biological replicates.

4.4. SLC25A47 affects mitochondrial N-Carbamylglutamate levels

N-Carbamylglutamate (or carglumic acid, NCG) is a synthetic structural analogue of NAG used in the treatment of hyperammonemia. We treated cells with either 1mM or 2mM NCG overnight and then, proceeded with immunopurification of mitochondria. Compared to empty vector controls, SLC25A47-overexpressing cells had less NCG in their mitochondria (Figure 4.4b). This suggests that SLC25A47 not only decreases mitochondrial NAG levels (Figure 4.4a), but also decreases mitochondrial levels of its synthetic analogue, NCG. Whole cell levels of NCG remain unaffected (Figure 4.4c).

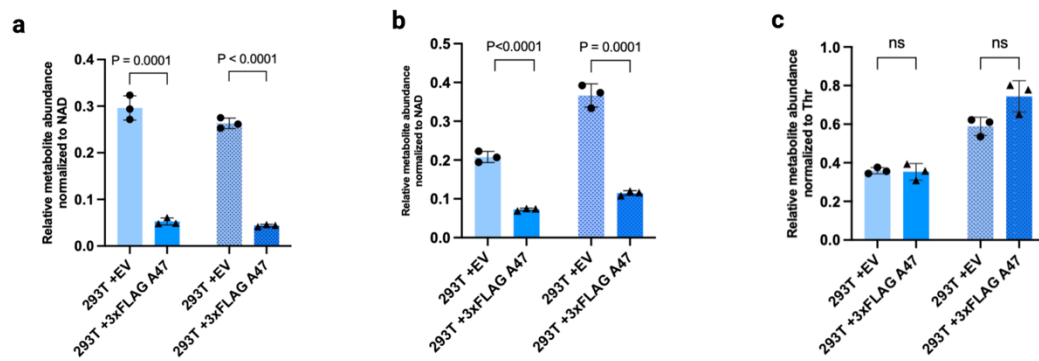


Figure 4.4: The bar plots with the relative abundance of NAG **(a)** or N-carbamylglutamate (NCG) **(b)** normalized to NAD⁺ from the mitochondria of HEK293T cells expressing 3xFLAG-*SLC25A47* compared with an empty vector control. The relative abundance of NCG from whole cell samples normalized to Threonine levels **(c)**. Plain graphs represent NCG treatment with 1mM while dotted graphs represent NCG treatment with 2mM. Data are the mean \pm SEM with the individual points shown. Statistical significance was determined by the two-tailed unpaired t-test; n = 3 biological replicates.

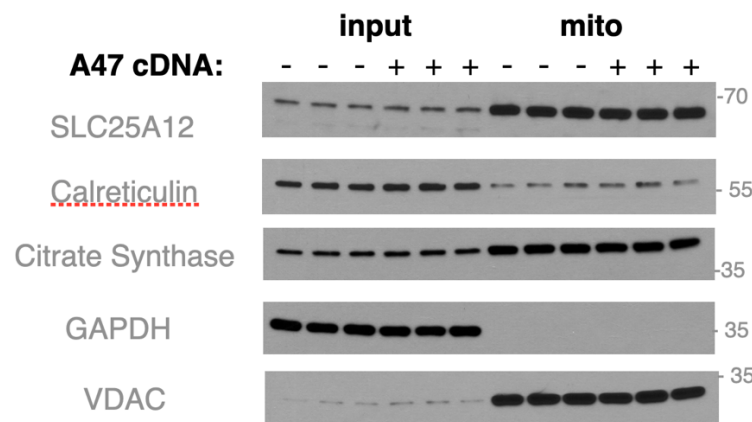


Figure 4.5: Representative western blots confirming enrichment of mitochondria from *in vitro* MITO-IP experiments. Organellar specificity of the proteins: SLC25A12 from inner mitochondrial membrane, CS from mitochondrial matrix, VDAC from outer mitochondrial membrane, Calreticulin from endoplasmic reticulum, GAPDH from cytosol. “Input” refers to whole cell samples while “mito” refers to mitochondrial samples.

4.5. SLC25A47 loss leads to NAG accumulation *in vivo*

4.5.1. Generation of *in vivo* model for loss-of-function phenotype

To investigate the physiological function of SLC25A47, we created a whole-body *Slc25a47* knockout mouse model via CRISPR/Cas9-mediated genome editing. The C57BL/6J strain was employed as the genetic background for all experiments. The *Slc25a47* gene comprises six exons, and single guide RNAs (sgRNAs) were designed to target exon 2, as detailed in the Methods section (Figure 4.6a). A founder line harboring a 63-base pair deletion was identified, and subsequent analyses confirmed that this mutation resulted in intron retention in the mature mRNA, leading to impaired splicing and disrupted protein translation (Figure 4.6b-d). To enable liver-specific mitochondrial immunopurification, *Slc25a47* heterozygous mice were crossed with mice heterozygous for the Mito-Tag allele (*Rosa26* knock-in mice that express the MITO-Tag (3XHA-EGFP-OMP25) only in cells that express Cre recombinase, as a result of a loxP-STOP-loxP (LSL) cassette).

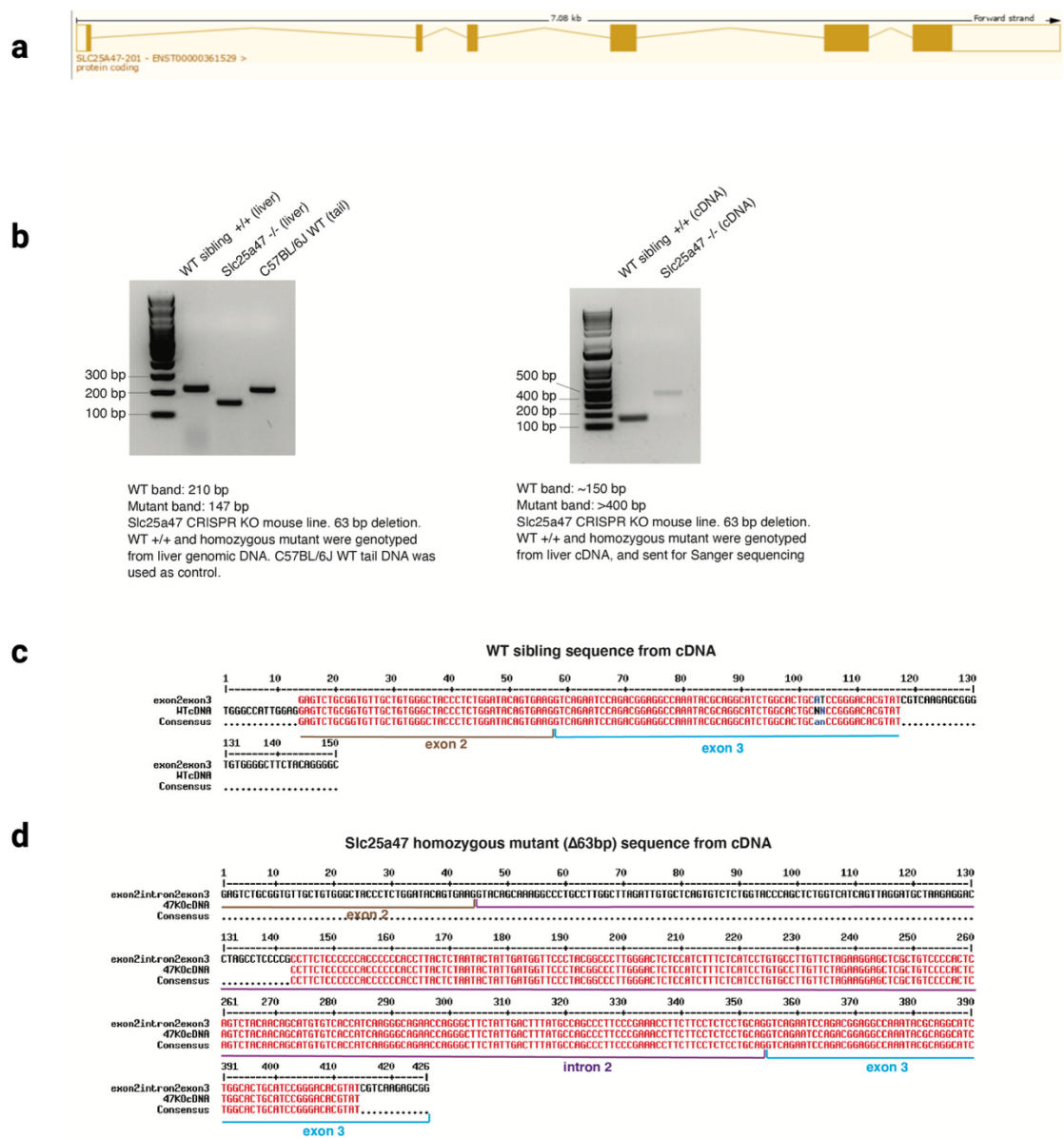


Figure 4.6: SLC25A47 transcript adapted from *Ensembl*. This gene has 6 exons, is annotated with 21 domains and features, is associated with 829 variant alleles (a). Genetic validation of *Slc25a47*-knockout mouse colony (b). Sequence data from WT (c) and 63 base-pair homozygous deletion of *Slc25a47* gene with intron retention (d).

4.5.2. Mitochondrial NAG is enriched in the mitochondria of *Slc25a47*-knockout mice

To elucidate the mechanism by which SLC25A47 influences *in vivo* NAG levels, we generated *Slc25a47*-knockout mice crossed with MITO-Tag mice and subsequently performed mitochondrial immunopurification from liver tissues of knockout animals compared to littermate wild-type controls. As a quality control measure, we verified successful enrichment of mitochondrial proteins and metabolites with minimal contamination from non-mitochondrial organelles. LC-MS analysis revealed a substantial accumulation of NAG in mitochondria lacking SLC25A47, with no significant alterations observed in other metabolites (Figure 4.8a-b). These findings indicate that SLC25A47 plays a regulatory role in maintaining mitochondrial NAG homeostasis.

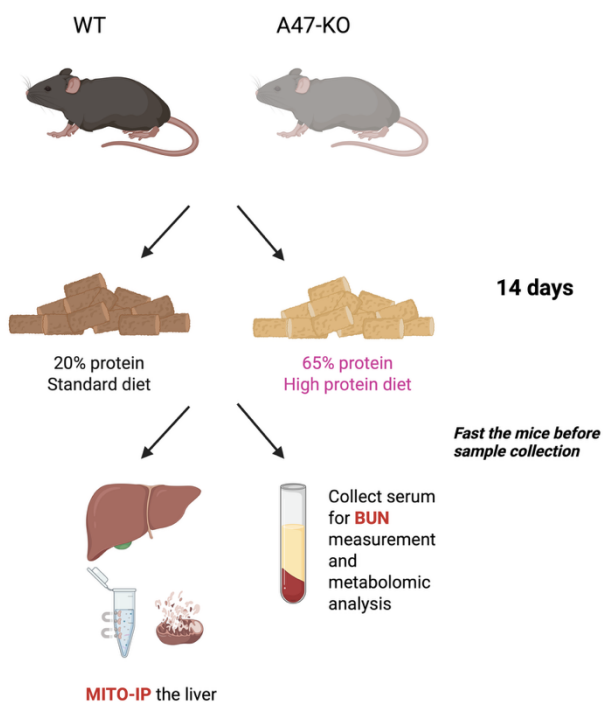


Figure 4.7: Workflow of mouse diet experiments. (Created with Biorender.com)

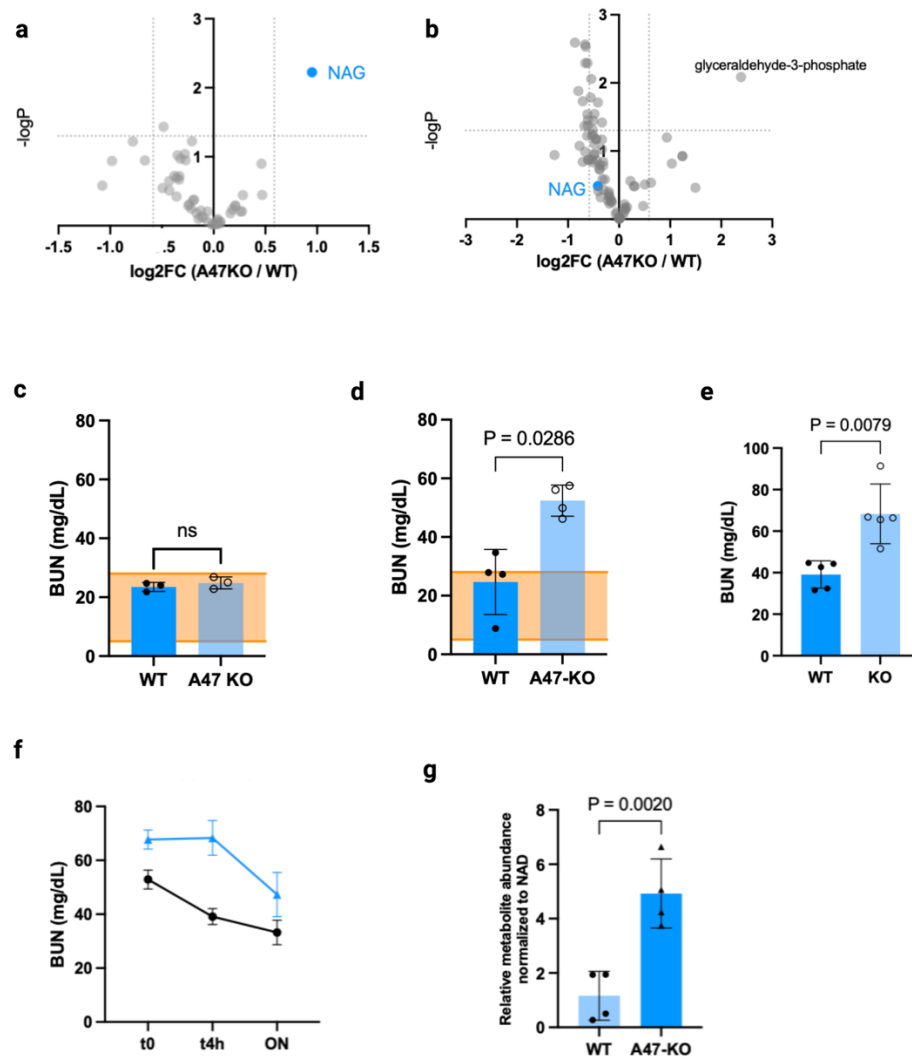


Figure 4.8: Volcano plot with $-\log_{10}(p\text{ value})$ versus $\log_2(\text{fold change})$ in metabolite abundance in mitochondria (a) and whole cell (b) normalized to NAD^+ levels in the liver of *Slc25a47*-knockout ($n=3$) and wild type ($n=3$) 6-week-old female C57BL/6J mice. Statistical significance was determined by the two-tailed unpaired t-test. The horizontal dotted line is the significance threshold of $p\text{ value} < 0.05$. BUN levels of *Slc25a47*-knockout ($n=3$) and wild type ($n=3$) female mice on standard diet (20% protein) for 14 days (c). BUN levels of *Slc25a47*-knockout ($n=4$) and wild type ($n=4$) female mice on high protein diet (65% protein) for 14 days (d). Normal range for BUN is shown in orange. BUN levels of *Slc25a47*-knockout ($n=5$) and wild type ($n=5$) female mice on high protein diet (65% protein) for 14 days, additionally fasted for 4 hours before blood withdrawal (e). Line graph comparing BUN levels taken at initial point (t0), 4 hours of fasting (t4h), and overnight (ON) fasting in *Slc25a47*-knockout mice (blue line) compared to wild type (black line) (f). Relative metabolite abundance of mitochondrial NAG levels from *Slc25a47*-knockout mice ($n=4$) and WT littermates ($n=4$) on high protein diet for 14 days, fasted for 4 hours before experiment (g). Data

are the mean \pm SEM with the individual points shown. Statistical significance was determined by the two-tailed unpaired t-test.

4.5.3. High-Protein Diet Leads to Reduced Serum Glutamine Levels in *Slc25a47*-Knockout Mice

To augment mitochondrial transport activity, mice were administered a high-protein diet (65% protein vs normal protein levels at 20%) for a duration of 14 days prior to experiment (Figure 4.7). Serum metabolomic profiling was subsequently performed on *Slc25a47*-knockout mice and their wild-type littermate controls. Mice on standard diet did not show significant difference in BUN levels between groups, however *Slc25a47*-KO mice on high protein diet had higher BUN levels than WT control (Figure 4.8c-d). To enhance metabolite clearance through urea cycle activity, animals were fasted prior to serum collection. Following the fasting period, *Slc25a47*-KO mice exhibited significantly elevated blood urea nitrogen (BUN) levels, indicative of heightened urea cycle flux. Fasting at various time intervals (4 hours or overnight) revealed that *Slc25a47*-knockout mice maintained stable blood urea nitrogen (BUN) levels for a prolonged duration compared to controls (Figure 4.8e-g). Consistent with this observation, serum glutamine concentrations were markedly reduced in KO mice, likely reflecting sustained urea cycle activity and continued utilization of glutamine as a primary nitrogen donor despite the fasting state (Figure 4.9a-b). Notably, the levels of other amino acids remained largely unaltered (Figure 4.9c).

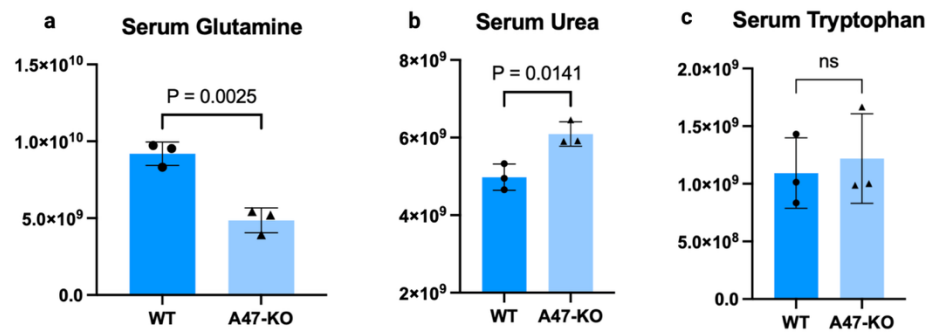


Figure 4.9: The bar plots with the relative abundance of glutamine (a), urea (b), and tryptophan (c) normalized to protein levels in the serum samples from *Slc25a47*-knockout (n=3) vs. WT (n=3) female mice upon fasting after high protein diet. Data are the mean \pm SEM with the individual points shown. Statistical significance was determined by the two-tailed unpaired t-test.

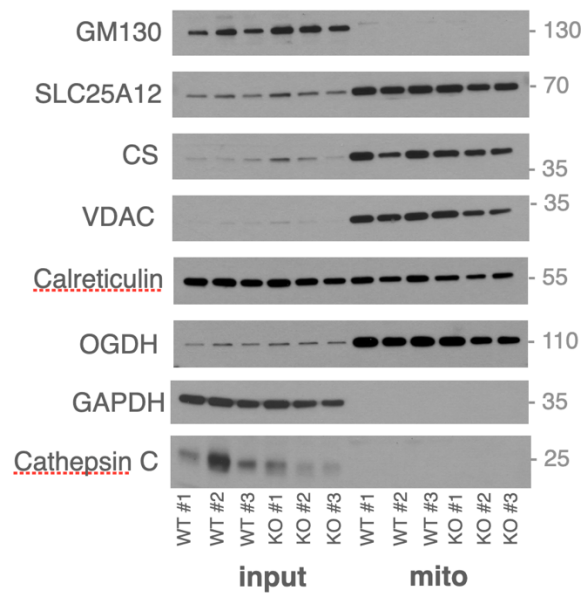


Figure 4.10: Representative western blots confirming enrichment of mitochondria from *in vivo* MITO-IP experiments. Organellar specificity of the proteins: GM130 from golgi apparatus, SLC25A12 from inner mitochondrial membrane, CS from mitochondrial matrix, VDAC from outer mitochondrial membrane, Calreticulin from endoplasmic reticulum, OGDH from mitochondrial matrix, GAPDH from cytosol, Cathepsin C from lysosome. “Input” refers to whole cell samples while “mito” refers to mitochondrial samples.

4.6 Mitochondrial protease YME1L1 degrades SLC25A47

To investigate the regulatory mechanisms governing SLC25A47 stability within mitochondria, we assessed its protein half-life using cycloheximide chase assays. Our results demonstrated that SLC25A47 is intrinsically unstable, exhibiting an approximate half-life of 20 minutes (Figure 4.11a-b). Notably, pharmacological treatments with buthionine sulfoximine (BSO, 1 mM) and erastin (5 μ M) markedly prolonged the half-life of SLC25A47, although the underlying mechanism remains undefined (Figure 4.11c). These findings suggest the involvement of proteolytic processes in mediating SLC25A47 turnover. To identify potential mitochondrial proteases responsible for its degradation, we designed a FACS-based CRISPR screen utilizing a split mNeonGreen2-SLC25A47 construct. Co-expression of SLC25A47-NG2(11) with MICU1-NG2(1–10), which is localized to the mitochondrial intermembrane space (IMS), resulted in reconstituted fluorescence upon successful protein interaction. A pooled sgRNA library targeting 34 annotated mitochondrial protease genes (seven sgRNAs per gene) was introduced into these reporter cells. Cells were subsequently sorted based on fluorescence intensity, and sgRNA representation in populations with high (SLC25A47-hi) or low (SLC25A47-lo) mNeonGreen signal was analyzed via next-generation sequencing (Figure 4.12a). Among the genes screened, YME1L1 emerged as the sole candidate whose loss significantly stabilized SLC25A47, implicating it as a key regulator of SLC25A47 degradation (Figure 4.12b-c). Additionally, treatment of cells overexpressing SLC25A47 with Torin, an inhibitor of both mTORC1 and mTORC2 reduces SLC25A47 protein levels (Figure 4.12d).

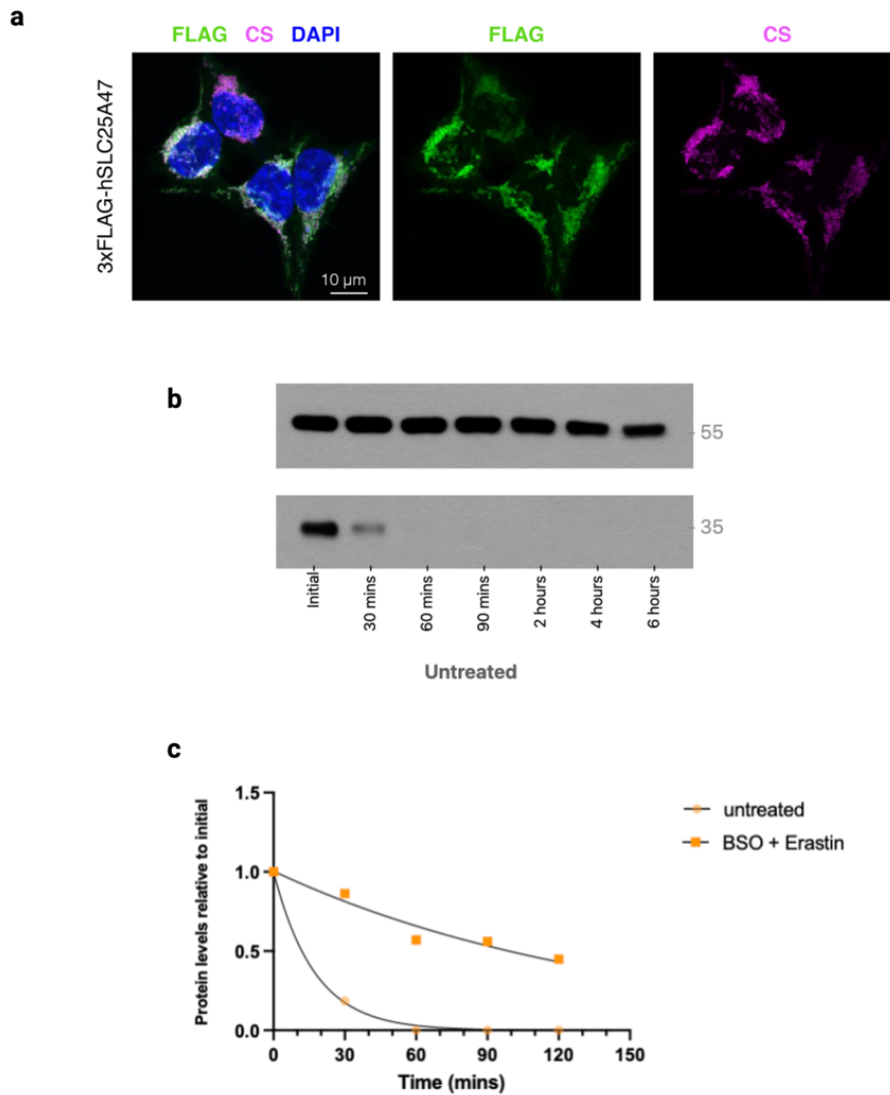


Figure 4.11: Immunofluorescence imaging confirming mitochondrial localization of FLAG-tagged SLC25A47 (**a**). Immunoblot of FLAG protein (bottom) and a-tubulin protein (top, loading control) in HEK293T cells expressing 3xFLAG-SLC25A47 upon treatment with cycloheximide (CHX, 50 μ g/ml) for the indicated times (**b**). Half-life was calculated by the non-linear fitting of FLAG band signal intensity versus time, increased half-life with BSO (1mM) and Erastin (5 μ M) is shown (**c**).

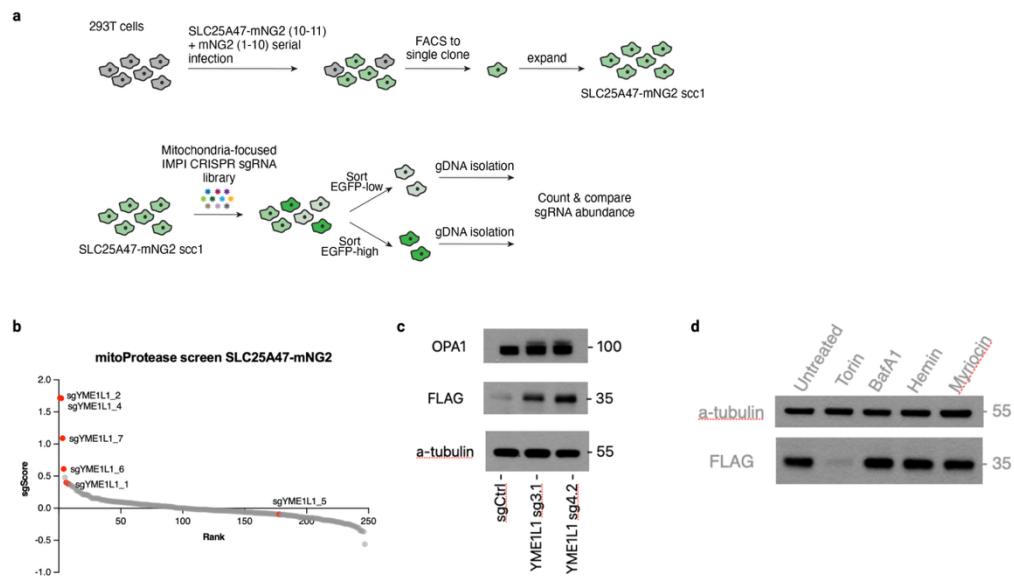


Figure 4.12: Schematic for screen design **(a)**. Enrichment of sgRNAs (guide scores) in the SLC25A47-hi and SLC25A47-lo fractions for the indicated genes in the MITO-sgRNA CRISPR screen **(b)**. Immunoblots of the indicated proteins in HEK293T cells expressing 3xFLAG-SLC25A47 and sgRNAs targeting *YME1L1* or control **(c)**. Immunoblots of the indicated proteins in HEK293T cells expressing 3xFLAG-SLC25A47 treated with different pharmacologic agents **(d)**. mNG: mNeonGreen, scc: single cell clone.

4.7 Subcutaneous tumor formation using HepG2 single clones

NSG mice (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) were used as a model to study tumor growth. Animals were euthanized after 4 weeks. For subcutaneous tumor formation, 1×10^6 HepG2 cells, either *SLC25A47*-knockout or *SLC25A47*-knockout expressing SLC25A47 cDNA (addback), were prepared as described in Methods. Each mouse received knockout cells on the left flank and addback cells on the right flank. Initial experiments indicated that tumors derived from *SLC25A47*-addback cells were significantly larger than those from knockout cells (Figure 4.13a-b). However, subsequent replicate studies failed to reproduce this difference, and orthotopic liver injections using the same single cell clones did not reveal any tumor growth differences between the knockout and addback groups (not shown).

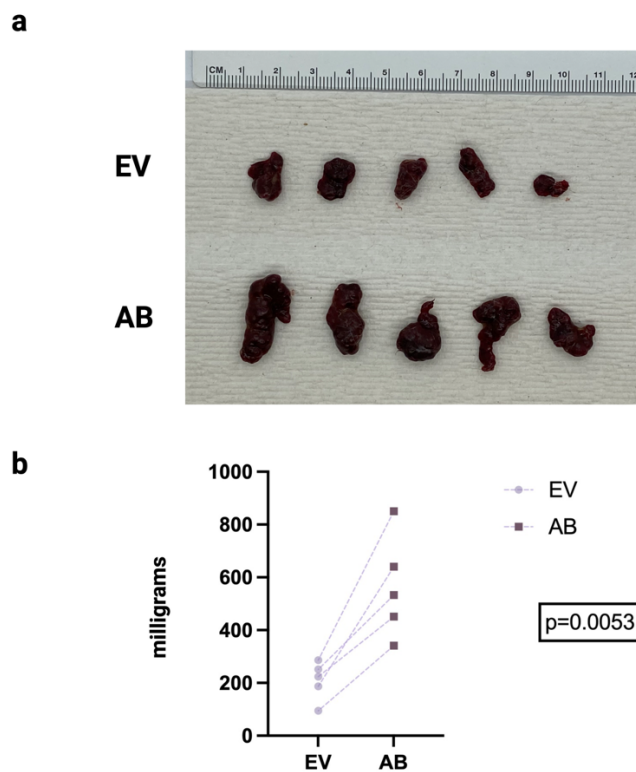


Figure 4.13: Tumor images (**a**) and mass (**b**) of subcutaneously injected HepG2 *SLC25A47*-knockout cells (n=5, top) and *SLC25A47*-knockout with *SLC25A47* cDNA grown in NSG mice (n=5, bottom). Data are the mean \pm SEM with the individual points shown. Statistical significance was determined by the paired samples t-test.

5. DISCUSSION

The physiological substrates of many solute carrier proteins, including members of the mitochondrial carrier family (SLC25 family), remain largely undefined. The SLC25 family encompasses a group of mitochondrial transporters implicated in various diseases, ranging from inborn errors of metabolism to cancer. In this study, we focused on identifying the physiological substrate of SLC25A47, a mitochondrial carrier with a highly liver-specific expression pattern and potential relevance to hepatocellular carcinoma.

Based on the co-evolution of SLC25A47 with urea cycle transporters and evidence that NAG hydrolysis takes place outside the mitochondria in the absence of a known transporter, we hypothesized that SLC25A47 functions as the mitochondrial exporter of N-acetylglutamate. To test this hypothesis, we conducted both *in vitro* and *in vivo* experiments to assess whether gain- or loss-of-function of SLC25A47 affects the mitochondrial and cytosolic NAG levels. We demonstrated that overexpressing SLC25A47 reduced mitochondrial NAG levels *in vitro*, whereas deleting Slc25a47 in mice resulted in elevated mitochondrial NAG levels. Our findings demonstrate that SLC25A47 is a mitochondrial carrier required for the export of NAG, identifying a previously uncharacterized component of hepatic nitrogen metabolism.

Previous studies have demonstrated a linear correlation between serum amino acid levels and urea production rate (111). This indicates that serum amino acid concentration is the primary limiting factor for urea synthesis, rather than the intrinsic synthetic capacity of the liver. Humans possess a highly efficient mechanism for the catabolism of excess dietary protein, with the urea cycle, confined entirely to hepatocytes, exhibiting remarkable resilience. This cycle remains functional until the late stages of hepatocyte viability are reached. Significant impairment of urea cycle activity is typically observed only in severe liver pathology, such as substantial hepatocellular loss or portosystemic shunting that bypasses hepatic metabolism.

The sole well-characterized regulatory control of the urea cycle is exerted at the level of CPS1, which is activated by NAG. However, the mechanism by which the cycle is suppressed following a transient increase in amino acid influx into the mitochondrial matrix of hepatocytes remains unclear. Given that NAG is not subject to hydrolysis within the mitochondrial matrix, its export from the mitochondria may contribute to the attenuation of urea cycle activity. Based on our results, we speculate that the transporter SLC25A47 may serve as an additional regulatory component that modulates urea cycle activity in response to a postprandial surge of nitrogenous substrates delivered to the liver via portal circulation. This hypothesis is supported by evidence showing that *Slc25a47*-KO mice had significantly reduced glutamine levels in their peripheral blood, consistent with sustained urea cycle activity.

Due to some limitations in studying the urea cycle *in vitro*, *in vivo* knockout experiments were deemed vital in this study. These limitations include the majority of the proteins involved in the cycle not being expressed in cell lines, changes that could be relevant are masked when missing components are overexpressed, and loss-of-function phenotype cannot be assessed. Additionally, on an organismal level, downstream effects at the whole-body metabolism level cannot be addressed *in vitro*.

Further research is required to elucidate the pathological roles associated with SLC25A47. While our subcutaneous tumor data did not show difference using HepG2 cells, additional methods such as endogenous tumor models via hydrodynamic tail vein injection could be employed to investigate the gene's involvement in the development of hepatocellular carcinoma.

Furthermore, our data demonstrate that the expression of SLC25A47 is regulated by the mitochondrial protease YME1L1. Genetic deletion of YME1L1 stabilizes SLC25A47 protein levels. In addition, we identified the mechanistic target of rapamycin complex (mTORC) as a potential upstream regulator of SLC25A47, as treatment with Torin, an inhibitor of both mTORC1 and mTORC2, led to a reduction in SLC25A47 stability. Our findings demonstrate that the liver-specific mitochondrial

transporter SLC25A47 is required for the export of NAG, thereby modulating the rate of the urea cycle (Figure 5.1).

In summary, the concentration of amino acids in the portal circulation declines during fasting, leading to reduced activation of nutrient-sensing pathways such as mTORC, as well as diminished urea cycle activity. The decreased influx of amino acids—particularly arginine, glutamine, and glutamate—results in lower enzymatic activity of NAGS, CPS1, and GLS2. In the absence of excess NAG within the mitochondria, the mitochondrial protease YME1L1 remains active and facilitates the proteolytic cleavage of SLC25A47, thereby reducing the export of NAG into the cytosol. In contrast, the postprandial state is characterized by increased availability of amino acids such as arginine and leucine, which promotes activation of the mTORC pathway. Although a direct regulatory link between mTORC and YME1L1 has not yet been established, it is plausible that mTORC may influence YME1L1 activity and contribute to the stabilization of SLC25A47 through indirect mechanisms. Additionally, the influx of arginine, an allosteric activator of NAGS, along with glutamine and glutamate, which serve as substrates for NAGS, and ammonia derived from amino acid catabolism, collectively enhance the synthesis of NAG and urea. The excess mitochondrial NAG is exported to the cytosol via SLC25A47, where it undergoes hydrolysis, thereby contributing to the fine-tuning of urea cycle flux.

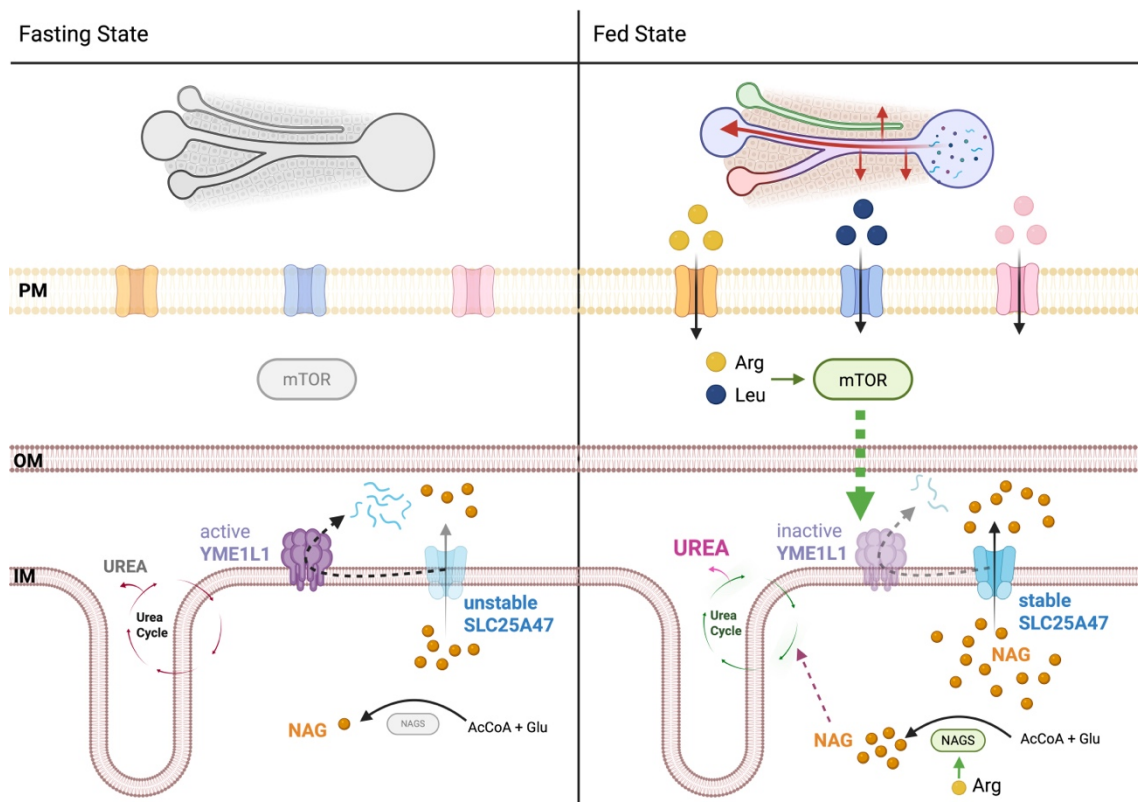


Figure 5.1: Regulation of SLC25A47 according to nutritional states. (Created with Biorender.com)

6. SUMMARY AND FUTURE DIRECTION

1. SLC25A47 is a liver-specific mitochondrial transporter. N-acetylglutamate, the only known direct regulator of the urea cycle, was shown to be exported out of the mitochondria by an unknown transporter.
2. When SLC25A47 is overexpressed in the mitochondria of HepG2 and HEK293T cell lines, mitochondrial NAG levels significantly decrease, whereas cytoplasmic NAG levels remain unaffected. Even when NAG levels are above physiological levels, SLC25A47 can export NAG into the cytosol.
3. Similar to NAG, the levels of its chemical analog, NCG, significantly decreased in the mitochondria of cells overexpressing SLC25A47.
4. *Slc25a47*-KO mice on a high-protein diet were able to sustain high levels of BUN and urea after fasting compared to WT mice. In addition, *Slc25a47*-KO mice showed lower serum glutamine levels than WT mice, indicating increased cycle activity.
5. After fasting, *Slc25a47*-KO mitochondria had higher NAG levels, supporting *in vitro* evidence that SLC25A47 exports NAG from the mitochondria.
6. The half-life of SLC25A47 is estimated to be approximately 20 min. Deletion of *YME1L1* causes the stabilization of SLC25A47. Additionally, inhibition of mTOR via Torin destabilizes SLC25A47 protein, suggesting a regulatory mechanism involving different metabolic inputs.
7. In the future, a comprehensive understanding of the regulatory mechanisms governing SLC25A47 is expected to yield deeper insights into the urea cycle and nitrogen homeostasis in mammals. Furthermore, the development of novel mouse models may elucidate the role of SLC25A47 in the pathogenesis of various diseases more precisely.

7. REFERENCES

1. Tan GKM, Ooi PJLL, Aw ES, Hui MK. Cloning and Identification of Hepatocellular Carcinoma Down-regulated Mitochondrial Carrier Protein, a Novel Liver-specific Uncoupling Protein. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(43):45235-44.
2. Ernster L, Schatz G. Mitochondria: a historical review. *The Journal of cell biology*. 1981;91(3):227s-55s.
3. O'Rourke B. From bioblasts to mitochondria: ever expanding roles of mitochondria in cell physiology. *Frontiers in Physiology*. 2010;1.
4. Pagliarini JD, Rutter J. Hallmarks of a new era in mitochondrial biochemistry. *Genes & Development*. 2013;27(24):2615-27.
5. Kennedy PE, Lehninger LA. Oxidation of Fatty Acids and Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates by Isolated Rat Liver Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. 1949;179(2):957-72.
6. Schneider CW, Potter RV. Intracellular distribution of enzymes; the distribution of oxalacetic oxidase activity in rat liver and rat kidney fractions. *Journal of Biological Chemistry*. 1949;177(2):893-903.
7. Green ED. The Cyclophorase Complex of Enzymes. *Biological Reviews*. 1951;26(4):410-53.
8. Schneider CW, Hogeboom HG. Intracellular Distribution of Enzymes: V. Further Studies on the Distribution of Cytochrome c in Rat Liver Homogenates. *Journal of Biological Chemistry*. 1950;183(1):123-8.
9. Ettema GJT. Mitochondria in the second act. *Nature*. 2016;531(7592):39-40.
10. Gray WM. Mitochondrial Evolution. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012;4(9):a011403-a.
11. Carp H. Mitochondrial N-formylmethionyl proteins as chemoattractants for neutrophils. *The Journal of experimental medicine*. 1982;155(1):264-75.
12. Mercer RT, Neph S, Dinger EM, Crawford J, Smith AM, Shearwood JA-M, et al. The Human Mitochondrial Transcriptome. *Cell*. 2011;146(4):645-58.
13. O'Rourke B. Mitochondrial Ion Channels. *Annual Review of Physiology*. 2007;69(1):19-49.

14. Varughese TJ, Buchanan KS, Pitt SA. The Role of Voltage-Dependent Anion Channel in Mitochondrial Dysfunction and Human Disease. *Cells*. 2021;10(7):1737.
15. Palmieri F. The mitochondrial transporter family SLC25: Identification, properties and physiopathology. *Molecular Aspects of Medicine*. 2013;34(2-3):465-84.
16. Kunji SRE, King SM, Ruprecht JJ, Thangaratnarajah C. The SLC25 Carrier Family: Important Transport Proteins in Mitochondrial Physiology and Pathology. *Physiology*. 2020;35(5):302-27.
17. Ruprecht JJ, Kunji RSE. The SLC25 Mitochondrial Carrier Family: Structure and Mechanism. *Trends in Biochemical Sciences*. 2020;45(3):244-58.
18. Hossen SM, Islam USM, Yasin M, Ibrahim M, Das A. A Review on the Role of Human Solute Carriers Transporters in Cancer. *Health Science Reports*. 2025;8(1).
19. Chang K-W, Chen H-L, Chien Y-H, Chen T-C, Yeh C-T. SLC25A13 gene mutations in Taiwanese patients with non-viralhepatocellular carcinoma. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2011;103(3):293-6.
20. Mention K, Curt CJM, Dessein A-F, Douillard C, Dobbelaere D, Vamecq J. Citrin deficiency: Does the reactivation of liver aralar-1 come into play and promote HCC development? *Biochimie*. 2021;190:20-3.
21. Miyo M, Konno M, Nishida N, Sueda T, Noguchi K, Matsui H, et al. Metabolic Adaptation to Nutritional Stress in Human Colorectal Cancer. *Scientific Reports*. 2016;6(1):38415.
22. Lee C-F, Ling Z-Q, Zhao T, Fang S-H, Chang W-C, Lee S-C, et al. Genomic-wide analysis of lymphatic metastasis-associated genes in human hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*. 2009;15(3):356.
23. Wong CC, Xu J, Bian X, Wu J-L, Kang W, Qian Y, et al. In Colorectal Cancer Cells With Mutant KRAS, SLC25A22-Mediated Glutaminolysis Reduces DNA Demethylation to Increase WNT Signaling, Stemness, and Drug Resistance. *Gastroenterology*. 2020;159(6):2163-80.e6.
24. Gebhardt R. Metabolic zonation of the liver: Regulation and implications for liver function. *Pharmacology & Therapeutics*. 1992;53(3):275-354.

25. Ben-Moshe S, Itzkovitz S. Spatial heterogeneity in the mammalian liver. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2019;16(7):395-410.
26. Häussinger D, Lames HW, Moorman FMA. Hepatocyte Heterogeneity in the Metabolism of Amino Acids and Ammonia. *Enzyme*. 1992;46(1-3):72-93.
27. Moldeus WP, Cha Y-N, Cinti LD, Schenkman BJ. Hepatic Organelle Interaction. *Journal of Biological Chemistry*. 1973;248(24):8574-84.
28. Siegel LR, Kratzer BT, Giaquinto NA, Sung H, Jemal A. Cancer statistics, 2025. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2025;75(1):10-45.
29. Akinyemiju T, Abera S, Ahmed M, Alam N, Alemayohu AM, Allen C, et al. The Burden of Primary Liver Cancer and Underlying Etiologies From 1990 to 2015 at the Global, Regional, and National Level. *JAMA Oncology*. 2017;3(12):1683.
30. Villanueva A. Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2019;380(15):1450-62.
31. Galle RP, Forner A, Llovet MJ, Mazzaferro V, Piscaglia F, Raoul J-L, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 2018;69(1):182-236.
32. Llovet MJ, Montal R, Sia D, Finn SR. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2018;15(10):599-616.
33. Schulze K, Imbeaud S, Letouzé E, Alexandrov BL, Calderaro J, Rebouissou S, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nature Genetics*. 2015;47(5):505-11.
34. Llovet MJ, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016;2(1):16018.
35. Nault CJ, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Laurent C, et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nature Communications*. 2013;4(1).
36. Ahn SM, Jang JS, Shim HJ, Kim D, Hong SM, Sung OC, et al. Genomic portrait of resectable hepatocellular carcinomas: Implications of *RBI* and *FGF19* aberrations for patient stratification. *Hepatology*. 2014;60(6):1972-82.

37. Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault J-C, Llovet MJ. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2015;149(5):1226-39.e4.
38. Chiang YD, Villanueva A, Hoshida Y, Peix J, Newell P, Minguez B, et al. Focal Gains of *VEGFA* and Molecular Classification of Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research*. 2008;68(16):6779-88.
39. Wilson AB, Schisler CJ, Willis SM. Sir Hans Adolf Krebs: Architect of Metabolic Cycles. *Laboratory Medicine*. 2010;41(6):377-80.
40. Kornberg H. Krebs and his trinity of cycles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2000;1(3):225-8.
41. Erdal R. Metabolic pathway of urea cycle in the liver mitochondria.: Created in BioRender.; 2025.
42. Vogel JH. Path of Ornithine Synthesis in Escherichia Coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1953;39(7):578-83.
43. Vogel JH, Abelson HP, Bolton TE. On ornithine and proline synthesis in Escherichia coli. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1953;11:584-5.
44. Maas KW, Novelli DG, Lipmann F. Acetylation of Glutamic Acid by Extracts of Escherichia Coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1953;39(10):1004-8.
45. Grisolia S, Cohen PP. Catalytic Role of Glutamate Derivatives in Citrulline Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 1953;204(2):753-7.
46. Hall ML, Metzenberg RL, Cohen PP. Isolation and Characterization of a Naturally Occurring Cofactor of Carbamyl Phosphate Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 1958;230(2):1013-21.
47. Marshall M, Metzenberg RL, Cohen PP. Purification of Carbamyl Phosphate Synthetase from Frog Liver. *Journal of Biological Chemistry*. 1958;233(1):102-5.
48. Marshall M, Metzenberg RL, Cohen PP. Physical and Kinetic Properties of Carbamyl Phosphate Synthetase from Frog Liver. *Journal of Biological Chemistry*. 1961;236(8):2229-37.
49. Caldovic L, Tuchman M. N-Acetylglutamate and its changing role through evolution. *Biochemical Journal*. 2003;372(2):279-90.

50. Mommsen PT, Walsh JP. Evolution of Urea Synthesis in Vertebrates: The Piscine Connection. *Science*. 1989;243(4887):72-5.
51. Julsrud AE, Walsh JP, Anderson MP. N-Acetyl-l-glutamate and the Urea Cycle in Gulf Toadfish (*Opsanus beta*) and Other Fish. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1998;350(1):55-60.
52. Saha N, Ratha BK. Ureogenesis in Indian air-breathing teleosts: adaptation to environmental constraints. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 1998;120(2):195-208.
53. Cunin R, Glansdorff N, Piérard A, Stalon V. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiological Reviews*. 1986;50(3):314-52.
54. Marc F, Weigel P, Legrain C, Almeras Y, Santrot M, Glansdorff N, et al. Characterization and kinetic mechanism of mono- and bifunctional ornithine acetyltransferases from thermophilic microorganisms. *European Journal of Biochemistry*. 2000;267(16):5217-26.
55. Coude XF, Sweetman L, Nyhan LW. Inhibition by propionyl-coenzyme A of N-acetylglutamate synthetase in rat liver mitochondria. A possible explanation for hyperammonemia in propionic and methylmalonic acidemia. *Journal of Clinical Investigation*. 1979;64(6):1544-51.
56. Morimoto HB, Brady FJ, Atkinson ED. Effect of level of dietary protein on arginine-stimulated citrulline synthesis. Correlation with mitochondrial N-acetylglutamate concentrations. *Biochemical Journal*. 1990;272(3):671-5.
57. Felipo V, Miñana MD, Grisolia S. Long-term ingestion of ammonium increases acetylglutamate and urea levels without affecting the amount of carbamoyl-phosphate synthase. *European Journal of Biochemistry*. 1988;176(3):567-71.
58. Morita T, Mori M, Tatibana M. Regulation of N-Acetyl-L-Glutamate Degradation in Mammalian Liver. *The Journal of Biochemistry*. 1982;91(2):563-9.
59. Reglero A, Rivas J, Mendelson J, Wallace R, Grisolia S. Deacylation and transacetylation of acetyl glutamate and acetyl ornithine in rat liver. *FEBS Letters*. 1977;81(1):13-7.
60. Meijer JA, Woerkom VMG. Control of the rate of citrulline synthesis by short-term changes in N-acetylglutamate levels in isolated rat-liver mitochondria. *FEBS Letters*. 1978;86(1):117-21.

61. Meijer JA, Woerkom VMG, Wanders AJR, Lof C. Transport of N-Acetylglutamate in Rat-Liver Mitochondria. *European Journal of Biochemistry*. 1982;124(2):325-30.
62. Meijer JA, Lof C, Ramos CI, Verhoeven JA. Control of ureogenesis. *European Journal of Biochemistry*. 1985;148(1):189-96.
63. Raina R, Bedoyan KJ, Lichter-Konecki U, Jouvet P, Picca S, Mew AN, et al. Consensus guidelines for management of hyperammonaemia in paediatric patients receiving continuous kidney replacement therapy. *Nature Reviews Nephrology*. 2020;16(8):471-82.
64. Häberle J, Shchelochkov AO, Wang J, Katsonis P, Hall L, Reiss S, et al. Molecular defects in human carbamoyl phosphate synthetase I: mutational spectrum, diagnostic and protein structure considerations. *Human Mutation*. 2011;32(6):579-89.
65. Nguyen H-H, Nguyen KN, Vu DC, Nguyen HTT, Nguyen N-L. Late-Onset Ornithine Transcarbamylase Deficiency and Variable Phenotypes in Vietnamese Females With OTC Mutations. *Frontiers in Pediatrics*. 2020;8.
66. Wang L, Bell P, Morizono H, He Z, Pumbo E, Yu H, et al. AAV gene therapy corrects OTC deficiency and prevents liver fibrosis in aged OTC-knock out heterozygous mice. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2017;120(4):299-305.
67. Summar LM, Koelker S, Freedenberg D, Mons LC, Haberle J, Lee H-S, et al. The incidence of urea cycle disorders. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2013;110(1-2):179-80.
68. Haidar AL, Pachnis P, Gotway KG, Ni M, Deberardinis JR, Menutt CM. Partial N-acetyl glutamate synthase deficiency presenting as postpartum hyperammonemia: Diagnosis and subsequent pregnancy management. *JIMD Reports*. 2023;64(6):403-9.
69. Kim S, Paik KW, Cohen PP. Ammonia Intoxication in Rats: Protection by N-Carbamoyl-L-Glutamate Plus L-Arginine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1972;69(12):3530-3.
70. Guffon N, Schiff M, Cheillan D, Wermuth B, Häberle J, Vianey-Saban C. Neonatal Hyperammonemia: The N-carbamoyl-L-glutamic Acid Test. *The Journal of Pediatrics*. 2005;147(2):260-2.

71. Karnebeek VDC, Sly SW, Ross JC, Salvarinova R, Yaplito-Lee J, Santra S, et al. Mitochondrial Carbonic Anhydrase VA Deficiency Resulting from CA5A Alterations Presents with Hyperammonemia in Early Childhood. *The American Journal of Human Genetics*. 2014;94(3):453-61.
72. Olgac A, Kasapkara SC, Kilic M, Keskin YE, Sandal G, Cram SD, et al. Carbonic anhydrase VA deficiency: a very rare case of hyperammonemic encephalopathy. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 2020;33(10):1349-52.
73. Diez-Fernandez C, Rüfenacht V, Santra S, Lund MA, Santer R, Lindner M, et al. Defective hepatic bicarbonate production due to carbonic anhydrase VA deficiency leads to early-onset life-threatening metabolic crisis. *Genetics in Medicine*. 2016;18(10):991-1000.
74. Martinelli D, Diodato D, Ponzi E, Monné M, Boenzi S, Bertini E, et al. The hyperornithinemia–hyperammonemia–homocitrullinuria syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 2015;10(1):29.
75. Kayler KL, Rasmussen SC, Dykstra MD, Punch DJ, Rudich MS, Magee CJ, et al. Liver Transplantation in Children with Metabolic Disorders in the United States. *American Journal of Transplantation*. 2003;3(3):334-9.
76. Mazariegos G, Shneider B, Burton B, Fox JI, Hadzic N, Kishnani P, et al. Liver transplantation for pediatric metabolic disease. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2014;111(4):418-27.
77. Wang L, Warzecha CC, Kistner A, Chichester AJ, Bell P, Buza LE, et al. Prednisolone reduces the interferon response to AAV in cynomolgus macaques and may increase liver gene expression. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development*. 2022;24:292-305.
78. Musunuru K, Grandinette AS, Wang X, Hudson RT, Briseno K, Berry MA, et al. Patient-Specific In Vivo Gene Editing to Treat a Rare Genetic Disease. *New England Journal of Medicine*. 2025;392(22):2235-43.
79. Yin X, Chan SL, Bose D, Jackson UA, Vandehaar P, Locke EA, et al. Genome-wide association studies of metabolites in Finnish men identify disease-relevant loci. *Nature Communications*. 2022;13(1).

80. Khan A, Unlu G, Lin P, Liu Y, Kilic E, Kenny CT, et al. Metabolic gene function discovery platform GeneMAP identifies SLC25A48 as necessary for mitochondrial choline import. *Nature Genetics*. 2024;56(8):1614-23.
81. Faubert B, Solmonson A, Deberardinis JR. Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science*. 2020;368(6487):eaaw5473.
82. Pavlova NN, Thompson BC. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*. 2016;23(1):27-47.
83. Locasale WJ. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nature Reviews Cancer*. 2013;13(8):572-83.
84. Kulis M, Esteller M. DNA Methylation and Cancer. *Advances in Genetics* 2010. p. 27-56.
85. Kennedy L, Sandhu KJ, Harper M-E, Cuperlovic-Culf M. Role of Glutathione in Cancer: From Mechanisms to Therapies. *Biomolecules*. 2020;10(10):1429.
86. Gamcsik PM, Kasibhatla SM, Teeter DS, Colvin MO. Glutathione levels in human tumors. *Biomarkers*. 2012;17(8):671-91.
87. Wang Q, Wu M, Li H, Rao X, Ao L, Wang H, et al. Therapeutic targeting of glutamate dehydrogenase 1 that links metabolic reprogramming and Snail-mediated epithelial–mesenchymal transition in drug-resistant lung cancer. *Pharmacological Research*. 2022;185:106490.
88. Wang L, Fang Z, Gao P, Zheng J. GLUD1 suppresses renal tumorigenesis and development via inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway. *Frontiers in Oncology*. 2022;12.
89. Zhao Q, Yu M, Li J, Guo Y, Wang Z, Hu K, et al. GLUD1 inhibits hepatocellular carcinoma progression via ROS-mediated p38/JNK MAPK pathway activation and mitochondrial apoptosis. *Discover Oncology*. 2024;15(1).
90. Peeters HT, Lenting K, Breukels V, Lith VMAS, Heuvel DVMANC, Molenaar R, et al. Isocitrate dehydrogenase 1-mutated cancers are sensitive to the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer & Metabolism*. 2019;7(1).
91. Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, Lee YS, Kita K, Ochi T, et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*. 2009;458(7239).

92. Suzuki S, Venkatesh D, Kanda H, Nakayama A, Hosokawa H, Lee E, et al. GLS2 Is a Tumor Suppressor and a Regulator of Ferroptosis in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Research*. 2022;82(18):3209-22.
93. Saha S, Islam SM, Abdullah-Al-Wadud M, Islam S, Ali F, Park K. Multiomics Analysis Reveals that GLS and GLS2 Differentially Modulate the Clinical Outcomes of Cancer. *Journal of Clinical Medicine*. 2019;8(3):355.
94. Kim J, Hu Z, Cai L, Li K, Choi E, Faubert B, et al. CPS1 maintains pyrimidine pools and DNA synthesis in KRAS/LKB1-mutant lung cancer cells. *Nature*. 2017;546(7656):168-72.
95. Ma S-L, Li A-J, Hu Z-Y, Shang F-S, Wu M-C. Co-expression of the carbamoyl-phosphate synthase 1 gene and its long non-coding RNA correlates with poor prognosis of patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Molecular Medicine Reports*. 2015;12(6):7915-26.
96. Liu H, Dong H, Robertson K, Liu C. DNA Methylation Suppresses Expression of the Urea Cycle Enzyme Carbamoyl Phosphate Synthetase 1 (CPS1) in Human Hepatocellular Carcinoma. *The American Journal of Pathology*. 2011;178(2):652-61.
97. Lee M-S, Dennis C, Naqvi I, Dailey L, Lorzadeh A, Ye G, et al. Ornithine aminotransferase supports polyamine synthesis in pancreatic cancer. *Nature*. 2023;616(7956):339-47.
98. He L, Cai X, Cheng S, Zhou H, Zhang Z, Ren J, et al. Ornithine transcarbamylase downregulation is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncology Letters*. 2019.
99. Cesnekova J, Rodinova M, Hansikova H, Zeman J, Stiburek L. Loss of Mitochondrial AAA Proteases AFG3L2 and YME1L Impairs Mitochondrial Structure and Respiratory Chain Biogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(12):3930.
100. Concordet J-P, Haeussler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Research*. 2018;46(W1):W242-W5.
101. Shree Ram Singh, Robert M. Hoffman, Singh A. *Mouse Genetics: Methods and Protocols*: Springer Protocols; 2021.

102. Wang Y, Yen SF, Zhu GX, Timson CR, Weber R, Xing C, et al. SLC25A39 is necessary for mitochondrial glutathione import in mammalian cells. *Nature*. 2021;599(7883):136-40.
103. Chen WW, Freinkman E, Sabatini MD. Rapid immunopurification of mitochondria for metabolite profiling and absolute quantification of matrix metabolites. *Nature Protocols*. 2017;12(10):2215-31.
104. Bayraktar CE, Baudrier L, Özerdem C, Lewis AC, Chan HS, Kunchok T, et al. MITO-Tag Mice enable rapid isolation and multimodal profiling of mitochondria from specific cell types in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(1):303-12.
105. Garcia-Bermudez J, Baudrier L, La K, Zhu XG, Fidelin J, Sviderskiy VO, et al. Aspartate is a limiting metabolite for cancer cell proliferation under hypoxia and in tumours. *Nat Cell Biol*. 2018;20(7):775-81.
106. Doench GJ, Fusi N, Sullender M, Hegde M, Vaimberg WE, Donovan FK, et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology*. 2016;34(2):184-91.
107. Calvo ES, Clauser RK, Mootha KV. MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(D1):D1251-D7.
108. Smith CA, Robinson JA. MitoMiner v4.0: an updated database of mitochondrial localization evidence, phenotypes and diseases. *Nucleic Acids Research*. 2019;47(D1):D1225-D8.
109. Fessler E, Krumwiede L, Jae TL. DELE1 tracks perturbed protein import and processing in human mitochondria. *Nature Communications*. 2022;13(1).
110. Sadreyev RI, Ji F, Cohen E, Ruvkun G, Tabach Y. PhyloGene server for identification and visualization of co-evolving proteins using normalized phylogenetic profiles. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(W1):W154-W9.
111. Vilstrup H. Synthesis of urea after stimulation with amino acids: relation to liver function. *Gut*. 1980;21(11):990-5.

8. APPENDIX

Appendix-1: List of cDNA sequences designed for the project.

1- SLC25A47 codon optimized sequence:

ATGGATTTTGTAGCTGGAGCGATTGGCGGGGTATGTGGAGTGGCC
 GTTGGGTATCCTTTGGATACTGTTAAAGTACGGATTCAAACAGAACCCAA
 ATATACCGGAATTTGGCATTGTGTGAGAGACACTTACCATAGAGAAAGG
 GTCTGGGGCTTTTATAGGGGTTTGTCCCTTCCAGTCTGTACCGTTAGTCTC
 GTGTCATCTGTAAGCTTCGGGACTTATAGGCATTGTCTCGCCCATATTTGT
 CGTTTGCATATGGTAATCCCGATGCTAAACCGACAAAAGCAGATATTAC
 ACTTAGCGGCTGTGCTTCAGGGCTGGTGAGAGTCTTTCTCACCTCTCCGA
 CGGAAGTAGCAAAGGTGAGGCTGCAAACCCAAACTCAAGCACAAAAGC
 AACAACGTCGTCTGTCTGCATCCGGCCCACTTGCCGTTCCACCTATGTGC
 CCCGTTCCACCCGCATGTCCCGAACCGAAATATAGGGGTCTCTCCATTG
 TCTCGCGACAGTGGCACGCGAAGAAGGCTTGTGTGGACTGTATAAAGGG
 TCCTCAGCATTGGTACTGCGTGATGGTCATAGCTTCGCAACATATTTTCTG
 AGCTATGCTGTGTTGTGTGAATGGCTTTCTCCAGCAGGGCATTCCCGACC
 GGACGTTCCCTGGGGTCCCTCGTCGCTGGTGGTTGCGCTGGGGTGCTCGCAT
 GGGCCGTAGCAACTCCAATGGATGTCATAAAATCCCGGCTCCAAGCTGAT
 GGCCAAGGGCAACGCCGGTATCGAGGGCTTCTTCATTGCATGGTTACAAG
 TGTCGGGAAGAAGGTCCTCGCGTGCTCTTTAAAGGATTGGTGCTTAACT
 GTTGTCGAGCATTTCCTGTAATATGGTCGTGTTTGTGGCATAACGAAGCG
 GACTCCGGCTGGCTAGAGGGCTTCTTACCTAA

2- 3xFLAG-SLC25A47 codon optimized sequence:

ATGGACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATT
 GATTACAAGGATGACGATGACAAGGGAGGTTTCAGGTGGATCAGATTTTG
 TAGCTGGAGCGATTGGCGGGGTATGTGGAGTGGCCGTTGGGTATCCTTTG
 GATACTGTTAAAGTACGGATTCAAACAGAACCCAAATATACCGGAATTT
 GGCATTGTGTGAGAGACACTTACCATAGAGAAAGGGTCTGGGGCTTTTAT
 AGGGGTTTGTCCCTTCCAGTCTGTACCGTTAGTCTCGTGTCATCTGTAAGC

TTCGGGACTTATAGGCATTGTCTCGCCCATATTTGTCGTTTGCATATGGT
AATCCCGATGCTAAACCGACAAAAGCAGATATTACACTTAGCGGCTGTG
CTTCAGGGCTGGTGAGAGTCTTTCTCACCTCTCCGACGGAAGTAGCAAAG
GTGAGGCTGCAAACCCAACTCAAGCACAAAAGCAACAACGTCGTCTGT
CTGCATCCGGCCCACTTGCCGTTCCACCTATGTGCCCCGTTCCACCCGCAT
GTCCCGAACCGAAATATAGGGGTCTCTCCATTGTCTCGCGACAGTGGCA
CGCGAAGAAGGCTTGTGTGGACTGTATAAAGGGTCTCAGCATTGGTACT
GCGTGATGGTCATAGCTTCGCAACATATTTTCTGAGCTATGCTGTGTTGTG
TGAATGGCTTTCTCCAGCAGGGCATTCCCGACCGGACGTTCTCTGGGGTCC
TCGTCGCTGGTGGTTGCGCTGGGGTGCTCGCATGGGCCGTAGCAACTCCA
ATGGATGTCATAAAATCCCGGCTCCAAGCTGATGGCCAAGGGCAACGCC
GGTATCGAGGGCTTCTTCATTGCATGGTTACAAGTGTCCGGGAAGAAGGT
CCTCGCGTGCTCTTTAAAGGATTGGTGCTTAACTGTTGTCGAGCATTGCC
GTGAATATGGTCGTGTTTGTGGCATAACGAAGCGGTACTCCGGCTGGCTAG
AGGGCTTCTTACCTAA

3- MICU1-mNeonGreen(1-10) sequence:

TTTCTTCCATTTTCAGGTGTCGTGAGGATCCGCCACCATGTTTCGTCT
GAACTCACTTTCTGCTTTGGCAGAACTGGCTGTGGGTTCTCGATGGTACC
ATGGAGGATCACAGCCCATCCAGATCCGGCGAAGACTAATGATGGTGGC
TTTCTGGGAGCATCTGCAGTAACTGCAAGTACTGGTCTTTTGTGGAAGA
GGGCCCATGCAGAATCTCCAGGAGGCTCAGTGAGCAAGGGTGAGGAGGA
TAACATGGCCTCTCTCCAGCGACTCATGAGTTACACATCTTTGGCTCCAT
CAACGGTGTGGACTTTGACATGGTGGGTCAGGGTACCGGCAATCCAAAT
GATGGTTATGAGGAGTTAAACCTGAAGTCCACCAAGGGTGACCTCCAGTT
CTCCCCCTGGATTCTGGTCCCTCATATCGGGTATGGCTTCCATCAGTACCT
GCCCTACCCTGACGGGATGTCGCCTTTCCAGGCGCCATGGTAGATGGCT
CCGGATACCAAGTCCATCGCACAAATGCAGTTTGAAGATGGTGCCTCCCTT
ACTGTTAACTACCGCTACACCTACGAGGGAAGCCACATCAAAGGAGAGG
CCCAGGTGATGGGGACTGGTTTCCCTGCTGACGGTCTGTGATGACCAAC
ACGCTGACCGCTGCGGACTGGTGCATGTCGAAGAAGACTTACCCCAACG
ACAAAACCATCATCAGTACCTTTAAGTGGAGTTACACCACTGTAAATGGC

AAACGCTACCGGAGCACTGCGCGGACCACCTACACCTTTGCCAAGCCAA
 TGGCGGCTAACTATCTGAAGAACCAGCCGATGTACGTGTTCCGTAAGACG
 GAGCTCAAGCACTCCATGGAATTCCTCGAGGGCGGCCGCTCTAGAGTC

4- mNeonGreen(11)-SLC25A47 sequence:

ATGACCGAGCTCAACTTCAAGGAGTGGCAAAGGCCTTTACCGAT
 ATGATGGGAGGTTCAAGTGGATCAGATTTTGTAGCTGGAGCGATTGGCG
 GGGTATGTGGAGTGGCCGTTGGGTATCCTTTGGATACTGTTAAAGTACGG
 ATCAAACAGAACCCAAATATACCGGAATTTGGCATTGTGTGAGAGACA
 CTTACCATAGAGAAAGGGTCTGGGGCTTTTATAGGGGTTTGTCCCTTCCA
 GTCTGTACCGTTAGTCTCGTGTCACTGTAAAGCTTCGGGACTTATAGGCAT
 TGTCTCGCCCATATTTGTCGTTTGCATATGGTAATCCCGATGCTAAACCG
 ACAAAGCAGATATTACACTTAGCGGCTGTGCTTCAGGGCTGGTGAGAG
 TCTTTCTCACCTCTCCGACGGAAGTAGCAAAGGTGAGGCTGCAAACCCAA
 ACTCAAGCACAAAAGCAACAACGTCGTCTGTCTGCATCCGGCCCACTTGC
 CGTTCCACCTATGTGCCCGTTCCACCCGCATGTCCCGAACCGAAATATA
 GGGGTCCTCTCCATTGTCTCGCGACAGTGGCACGCGAAGAAGGCTTGTGT
 GGACTGTATAAAGGGTCCTCAGCATTGGTACTGCGTGATGGTCATAGCTT
 CGCAACATATTTTCTGAGCTATGCTGTGTTGTGTGAATGGCTTTCTCCAGC
 AGGGCATTCCCGACCGGACGTTCCCTGGGGTCCTCGTCGCTGGTGGTTGCG
 CTGGGGTGCTCGCATGGGCCGTAGCAACTCCAATGGATGTCATAAAATCC
 CGGCTCCAAGCTGATGGCCAAGGGCAACGCCGGTATCGAGGGCTTCTTC
 ATTGCATGGTTACAAGTGTCCGGGAAGAAGGTCCTCGCGTGCTCTTTAAA
 GGATTGGTGCTTAACTGTTGTCGAGCATTTCCTCGTGAATATGGTTCGTGTT
 GTGGCATAACGAAGCGGTACTCCGGCTGGCTAGAGGGCTTCTTACCTAA

5- NAGS codon optimized sequence:

ATGGCTACAGCACTTATGGCCGTTGTCCTTAGAGCCGCCGCGCTGG
 CTCCTAGATTGCGCGGACGCGGTGGAACAGGTGGGGCTAGGCGGTTATC
 ATGTGGTGCCAGGAGAAGGGCTGCACGAGGGACAAGTCCTGGCCGTCGA
 TTGTCCACAGCGTGGTCAACCTCAACCACCCCAAGAAGAATATGCTGG
 TGCCGATGATGTAAGTCAATCCCGGTGGCGGAAGAACCTAGCTGGGTTT

CTTCTCCACGTCCACCCGTCCCACATGAATCTCCCGAACCACCAAGTGGA
CGGAGCCTCGTACAACGCGATATAACAAGCATTCTCAATCAATGTGGCGC
ATCCCCCGGAGAAGCCAGGCATTGGCTGACCCAATTTCAAACGTGTCACC
ATAGCGCCGATAAACCTTTTGCTGTGATAGAAGTTGATGAAGAAGTTCTG
AAATGTCAACAAGGTGTCTCTTCACTCGCATTTCGCACTCGCTTTTCTGCAA
AGGATGGATATGAAACCTTTAGTCGTTTTGGGCCTTCCAGCTCCGACAGC
CCCGAGTGGGTGCTTAAGCTTTTGGGAAGCAAAAGCCCAACTTGCAAAA
TCTTGTAAGTACTCGTCGATGCACTGAGGCATAATGCGGCAGCCGCCGT
CCTTTCTTCGGTGGTGGAAAGCGTCTTGCGAGCAGCAGAACCTGCACCAC
ACGCATCCTATGGTGGTATTGTCTCGGTGGAGACAGACCTGCTGCAGTGG
TGCCTGGAGTCGGGCAGCATCCCCATCCTGTGCCCATCGGGGAGACGGC
CGCGCGCCGCTCCGTGCTTCTCGACTCCCTGGAGGTGACCGCGTCTGCTGG
CCAAGGCGCTGCGGCCACCAAAATCATCTTCCTCAATAACACAGGCGG
CCTGCGCGACAGCAGTCATAAGGTCCTGAGTAACGTGAACCTGCCCGCC
GACCTGGACCTGGTGTGCAACGCCGAGTGGGTGAGCACAAAAGAACGGC
AGCAGATGCGGCTCATCGTGGACGTGCTCAGCCGCCTGCCCCACCACTCC
TCGGCCGTCATCACCGCCGCTAGCACGCTGCTCACTGAGCTCTTTAGCAA
CAAGGGGTCCGGGACCCTGTTCAAGAACGCCGAGCGAATGCTACGGGTG
CGCAGCCTGGACAAGCTGGACCAGGGCCGTCTAGTGGACCTGGTCAACG
CCAGCTTCGGCAAGAAGCTCAGGGACGACTACCTGGCCTCGCTGCGCCC
GCGGCTGCACTCCATCTACGTCTCCGAGGGGTACAACGCCGCCGCCATTC
TGACCATGGAGCCCGTCCTGGGGGGCACCCCGTACCTGGACAAATTTGTG
GTGAGCTCCAGCCGCCAGGGCCAAGGCTCCGGCCAGATGCTGTGGGAGT
GCCTGCGGCGGGACCTTCAGACACTTTTCTGGCGCTCCCGGGTCACCAAC
CCATCAATCCCTGGTACTTCAAACACAGTGATGGCAGCTTCTCCAACAA
GCAGTGGATCTTCTTCTGGTTTGGCCTGGCTGATATCCGGGACTCCTATG
AGTTGGTCAACCACGCCAAGGGACTGCCAGACTCCTTTCACAAGCCAGCT
TCTGACCCAGGCAGCTGA

Appendix-2: Ethical approval for animal use for the project.

The Rockefeller University
Comparative Bioscience Center
MEMORANDUM

To: Kivanc Birsoy

From: IACUC

Re: Approval Notice: Protocol #21102-H (Previous # 18124-H)

Date: May 19, 2022

The Rockefeller University Institutional Animal Care and Use Committee (RU IACUC) reviewed and approved the animal work pertaining to animal protocol #21102-H, *Nutrient Dependencies of Cancer cells* on January 4, 2022. This approval is granted for 3 years and will expire on January 4, 2025.

Sincerely,

Engin Ozertugrul, M.Ed., Ph.D.
The Rockefeller University



July 11, 2025

To whom it may concern,

Ethical committee approval has been obtained for Ranya ERDAL who is an MD-PhD student enrolled in Tumor Biology and Immunology doctoral program of Hacettepe University Basic Oncology Institute under the supervision of Assoc. Prof. Hande Canpinar for her thesis entitled "The Role of Mitochondrial Transporters in Cancer Metabolism". The document containing information regarding the ethical committee approval is provided with this document.

Sincerely,

Kivanç Birsoy

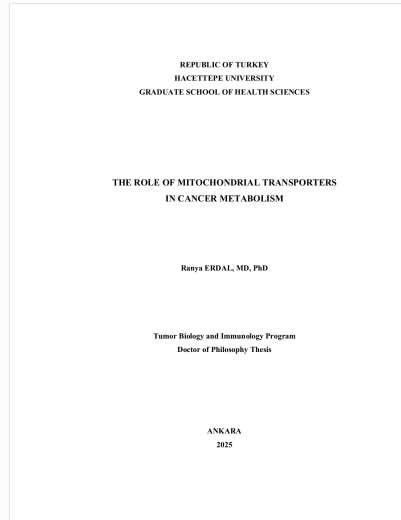
Appendix-3: Turnitin originality report and digital receipt of the thesis.

Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Ranya Erdal
Ödev başlığı: The Role of Mitochondrial Transporters in Cancer Metabolism
Gönderi Başlığı: The Role of Mitochondrial Transporters in Cancer Metabolism...
Dosya adı: The_Role_of_Mitochondrial_Transporters_in_Cancer_Metabolis...
Dosya boyutu: 6.34M
Sayfa sayısı: 133
Kelime sayısı: 26,910
Karakter sayısı: 182,073
Gönderim Tarihi: 26-Ağu-2025 10:43ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2735765460



Title of the Thesis: The Role of Mitochondrial Transporters in Cancer Metabolism
Name of the Student: Ranya ERDAL
Total Number of Pages: 133

The Role of Mitochondrial Transporters in Cancer
 Metabolism.docx

ORJİNALLIK RAPORU

% **18** BENZERLİK ENDEKSİ
 % **15** İNTERNET KAYNAKLARI
 % **15** YAYINLAR
 % **3** ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	%3
2	www.biorxiv.org İnternet Kaynağı	%2
3	www.mdpi.com İnternet Kaynağı	%1
4	www.frontiersin.org İnternet Kaynağı	%1
5	Gokhan Unlu, Benjamin Prizer, Ranya Erdal, Hsi-Wen Yeh, Erol C. Bayraktar, Kıvanç Birsoy. "Metabolic-scale gene activation screens identify SLCO2B1 as a heme transporter that enhances cellular iron availability", Molecular Cell, 2022 Yayın	%1
6	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
7	www.nature.com İnternet Kaynağı	%1
8	dlib-pr.mpiers.mpg.de İnternet Kaynağı	<%1
9	www.science.org İnternet Kaynağı	<%1
10	Wenbin Mei, Schayan Faraj Tabrizi, Christopher Godina, Anthea F. Lovisa et al. "A commonly inherited human PCSK9 germline	<%1

9. CURRICULUM VITAE