



Değişik Glukoz Konsantrasyonlarının E2F1 Seviyesi ve Hücre Proliferasyonuna Etkisi

The Effect of Different Glucose Concentrations on E2F1 Level and Cell Proliferation

Mustafa Gökhan ERTOSUN¹, Fatma Zehra HAPİL², Fatma Ece ÇOPUROĞLU³, Osman Nidai ÖZEŞ⁴

¹Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

²İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, İzmir, Türkiye

³Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

⁴Altay Biopharma, San Bruno, CA, ABD

Yazışma Adresi
Correspondence Address

Mustafa Gökhan ERTOSUN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik
Cerrahi Anabilim Dalı,
Antalya, Türkiye
E-posta: mgertosun@akdeniz.edu.tr

Geliş tarihi \ Received : 18.10.2018
Kabul tarihi \ Accepted : 12.11.2018
Elektronik yayın tarihi : 13.02.2019
Online published

Bu makaleye yapılacak atıf:
Cite this article as:
Ertosun MG, Hapil FZ, Çopuroğlu
FE, Özeş ON. Değişik glukoz
konsantrasyonlarının E2F1 seviyesi ve
hücre proliferasyonuna etkisi.
Akd Tıp D 2019; 5(2):312-6.

Mustafa Gökhan ERTOSUN
ORCID ID: 0000-0002-2557-7346
Fatma Zehra HAPİL
ORCID ID: 0000-0002-0055-9926
Fatma Ece ÇOPUROĞLU
ORCID ID: 0000-0003-4984-0513
Osman Nidai ÖZEŞ
ORCID ID: 0000-0002-8906-4662

ÖZ

Amaç: E2F1 transkripsiyon faktörü, hücre döngüsünün kontrolü, proliferasyon, hücre farklılaşması, DNA tamiri ve apoptosis üzerinde düzenleyici etkisine ek olarak enerji metabolizmasının düzenlenmesinde ve glukoz kullanımında da anahtar rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Bu nedenle çalışmamızda, farklı glukoz konsantrasyonlarının E2F1 protein ekspresyonuna ve bunun hücre proliferasyonuna etkisinin olup olmadığını belirlemeye çalıştık.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmamızda İnsan Embriyonik Böbrek Hücre Hattı olan HEK293 hücrelerinde farklı glukoz konsantrasyonlarının, E2F1 ekspresyonuna olan etkisi Western Blot (SDS-Page) yöntemi ile ve hücre içerisinde sentezlenen E2F1 protein miktarını artırmak için kullanılan ekotopik E2F1 ekspresyonunun hücre proliferasyonuna olan etkisi MTT yöntemi ile gösterilmiştir.

Bulgular: Farklı glukoz konsantrasyonlarının E2F1 protein seviyelerini etkilediği tespit edilmiştir. HEK293 hücrelerinde 2 g/L glukoz konsantrasyonunda en yüksek proliferasyon gözlenirken, 20 g/L glukoz konsantrasyonunda negatif bir etki gözlenmiştir. E2F1 transfekte hücrelerinde farklı glukoz konsantrasyonlarının hücre proliferasyonuna anlamlı bir etkisi saptanmamıştır.

Sonuç: Artan glukoz konsantrasyonu E2F1 protein seviyesinde artışa yol açmıştır. 20 g/L değerinde gözlenen negatif etki glukoz toksisitesi ile uyumludur.

Anahtar Sözcükler: E2F1, Enerji metabolizması, Glukoz, Hücre proliferasyonu, Western Blot, MTT

ABSTRACT

Objective: The E2F1 transcription factor plays a key role in the control of the cell cycle, proliferation, cell differentiation, DNA repair, and apoptosis as well as regulation of energy metabolism and glucose utilization. Therefore, we wanted to determine whether different concentrations of glucose would affect the cellular level of E2F1 and whether this would also affect cellular proliferation.

Material and Methods: In this study, the effect of different glucose concentrations on E2F1 expression in the Human Embryonic Kidney Cell Line which is called HEK293 cells was shown by the Western Blot (SDS-Page) method and the effect of ectopic E2F1 expression, which was used to increase the amount of E2F1 protein synthesized in the cell, on cell proliferation was shown by the MTT method.

Results: We detected that different glucose concentrations affected E2F1 levels differently. The highest proliferation was observed at the 2 g/L glucose concentration in the HEK293 cells, while a negative effect was detected with a 20 g/L glucose concentration. E2F1 transfected cells did not show any significant effect on cell proliferation of different glucose concentrations.

Conclusion: Increased glucose concentration led to an increase in the E2F1 protein level. The observed negative effect at 20 g/L is compatible with glucose toxicity.

Key Words: E2F1, Energy metabolism, Glucose, Cell proliferation, Western Blot, MTT

GİRİŞ

Ökaryotik hücrelerde hücre döngüsü birçok düzenleyici mekanizma tarafından gerçekleştirilen ardışık bir sistem olarak işlemektedir. Hücre döngüsü mekanizmasını kontrol etmede rol oynayan düzenleyici proteinler; siklin ailesini (cyc), siklin bağlı kinazları (cdk), retinoblastoma proteinini (pRB) içermektedir. Cyc/cdk kompleksleri hücre döngüsünün ilerlemesinde kritik rol oynarlar ve bu rollerden biri pRB fosforilasyonu yaparak transkripsiyon faktörü E2F1'in aktivasyonunun sağlanmasıdır (1). Fosforile olmuş pRB'den ayrılarak aktifleşen E2F transkripsiyon faktörü dimerizasyon partneri (DP) proteini ile heterodimer yaparak hücre çekirdeğine göç edip DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi için gerekli hedef genlerin promotörlerine bağlanıp bu genlerin transkripsiyonunu indükleyerek döngünün tamamlanmasına ve proliferasyona yol açar (2). E2F1 hücre döngüsünün kontrolündeki vazgeçilmez rolünün yanısıra apoptosis ve DNA hasarı tamirinde de kritik görevler alarak hücre homeostasisin sağlanmasında da rol oynar (2-5).

E2F1, hücre içi enerji kaynağı olarak adipoz doku metabolizmasının düzenlenmesinde glikoliz sürecinde karşımıza çıkar (6, 7). Buna ek olarak E2F1 peptidi, glukoz kullanımında da rol oynar. Glukoz metabolizmasının E2F1 tarafından düzenlenmesinin yollarından biri de, aynı zamanda besin sensörü olarak görev yapan, Piruvat Dehidrojenaz Kinaz 4 (PDK4) enziminin aktivasyonu ile glukoz metabolizmasının baskılanmasıdır (8). Son yıllarda yapılan bir çalışmada pankreatik β -hücrelerinde, E2F1 peptidin glukoz ile uyarılan hücrelerde insülin sekresyonunu kolaylaştırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca E2F1(-/-) farelerin diyetle bağlı obeziteye dirençli oldukları gösterilmiştir. İnsülin salınımında önemli görevi olan Kir6.2 geninin ekspresyonunun E2F1 bağımlı olması pankreas β -hücrelerinde insülin sentezi ve salınımı sürecinde E2F1'in gerekli olduğunu göstermektedir (9).

Bu çalışmamızda, farklı glukoz konsantrasyonlarının E2F1 ekspresyonunu nasıl etkilediğini ve bunun hücre proliferasyonu ile ilgili olup olmayacağını belirlemeye çalıştık.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Hücre Kültürü

Çalışmamızda, İnsan Embriyonik Böbrek Hücre Hattı olan HEK293 hücreleri kullanılmıştır. Bu hücrenin kullanılmasının nedeni bazal bir hücre metabolizmaya sahip olması ve transfeksiyon işlemi için uygun bir hücre hattı olmasıdır. Hücreler L-glutamin (Lonza), esansiyel olmayan amino asitler, sodyum pirüvat, %10 Fetal Dana Serumu (FBS-Biochrom cat. No:S0115), Penisilin/Streptomisin/Amfotersin B (BI- 03 033 113) ve gentamisin ilaveli düşük glukoz (1 g/L) miktarına sahip DMEM'e

(Dulbecco's Modified Eagle Medium- Sigma D5921), 2g/L- 4g/L- 8g/L- 12g/L- 20g/L son konsantrasyona sahip olacak şekilde glukoz (Sigma G8270) eklenerek oluşturulan glukoz miktarları birbirinden farklı besin ortamları içinde monolayer kültürler halinde; %5 CO₂'lik atmosfer, %95 nem ve 37°C'lik inkübatörde çoğaltılmıştır.

Transfeksiyon

Hücre içerisinde sentezlenen E2F1 protein seviyesinin artımı için kullanılan transfeksiyon işlemi -insan E2F1 plazmidinin HEK293 hücrelerine aktarımı- Kalsiyum fosfat çöktürme (CaPO₄ precipitation) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyonun ardından 16 saat serumsuz besiyerinde bekletilen hücreler, deney basamaklarına göre değişen sürelerde inkübe edilmiştir. 30 gün boyunca E2F1 ektopik ekspresyonu gösteren hücre popülasyonu 800 ug/ml Neomisin varlığında seçilmiştir.

Hücre Lizat Eldesi

Besin ortamı uzaklaştırılarak hücre lizati Triton-X (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% TritonX-100 and 5% gliserol) ve proteaz inhibitör kokteyli içeren lizis tamponunda hazırlanmıştır.

Klonlama

293T hücrelerinden Trizol (Sigma-T9424) ile RNA izolasyonu yapılarak izole edilen RNA'nın Roche kiti (05 081 955 001) kullanılarak cDNA kütüphanesi elde edilmiş ve bu kütüphaneden E2F1 cDNA'sinin amplifikasyonu için ileri primer: 5'- CCG GAA TTC GCC GCC ATG GCC TTG GCC GGG GCC CCT GCG GG- 3' ve geri primer: 5'- CCG GAA TTC GAA ATC CAG GGC GGT GAG GTC CCC AAA GTC- 3' kullanılmıştır. Amplifiye edilen insan E2F1 cDNA'sı pcDNA 3.1B vektörüne klonlanmıştır ve ekspresyonu wester blot ile gösterilmiştir (Şekil 1).

Western Blot

Hücre lizatlarının protein konsantrasyonu Bradford tayin yöntemi ile belirlenmiştir. Konsantrasyonu belirlenen proteinler eşit miktarda (100 ug) yüklenerek SDS-Page ile ayrıştırılmış ve gece boyu PVDF membrana (Biorad cat No:1620177) transfer edilmiştir. Blotlar primer antikora (Deneylerde kullanılan Anti-E2F1 monoklonal antikor kendi laboratuvarlarımızda üretilmiştir.) ve HRP-konjuge sekonder antikor ile işaretlenmiştir. Membranda işaretlenen protein seviyelerinin filme aktarılmasında Clarity ECL Western Blot substratı (Biorad Clarity ECL cat. No:1705061) kullanılmıştır.

MTT Assay

Yabancıl tip HEK293 ve E2F1 transfekte 293T hücreleri 96 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 25.000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyonunu ölçmek amacıyla

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) testi kullanılmıştır. Farklı glukoz konsantrasyonlarındaki büyüme hızlarını araştırmak için 1g/L, 2g/L, 4g/L, 8g/L, 12g/L, 20g/L glukoz konsantrasyonlarında besiyerleri ile muamele edilmiştir. 24 saat sonra besiyerleri ortamdan uzaklaştırılarak 100ul %10 FBS'li besiyeri içerisine 25 ul MTT solüsyonu ile 3 saat boyunca ışısız ortamda inkübasyonu sağlanmıştır. Süre sonunda DMSO (Sigma) ile enzim aktivitesi durdurulan hücreler 1g/mL glukoz konsantrasyonu içeren besi ortamı içinde büyüyen yüksek E2F1 ekspresyonu gösteren hücreler referans alınarak 540 nm referans 690 nm dalga boylarında ölçüm yapılmıştır. Elde edilen verilerin analizleri Prism GraphPad programları kullanılarak değerlendirilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Western Blot yönteminde elde edilen sonuçlar İmage J programı kullanılarak analiz edilmiştir. Grafikler, GraphPad Prism programı ile oluşturulmuştur. İstatistiksel analizler yine GraphPad Prism programı aracılığıyla yapılmıştır.

BULGULAR

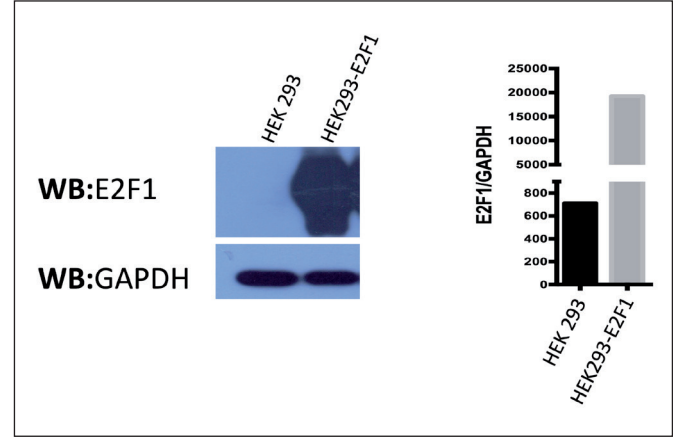
Ektopik olarak E2F1 ekspresyonu gösteren HEK293 hücrelerinde farklı Glukoz konsantrasyonlarının E2F1 ekspresyonuna olan etkisinin belirlenmesi.

HEK293 insan embriyonik böbrek hücre hattında gerçekleştirilen çalışmamızda HEK293 hücreleri oluşturduğumuz yabancı tip E2F1 ekspresyon vektörü ile kalsiyum fosfat yöntemi ile transfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiş ve 30 gün boyunca E2F1 ektopik ekspresyonu gösteren hücre popülasyonu 800 ug/ml Neomisin varlığında seçilmiştir. Ardından, bu hücreler farklı konsantrasyonlarda glukoz bulunduran ortamlarda 24 saat inkübe edildikten sonra hücre lizatları hazırlanmış ve lizatların protein miktarı saptandıktan sonra 100 mikrogram protein SDS-PAGE'de yürütüldükten sonra hazırlanan blott'da E2F1 protein seviyesi ve GAPDH miktarları Western Blott yöntemi ile saptanmıştır.

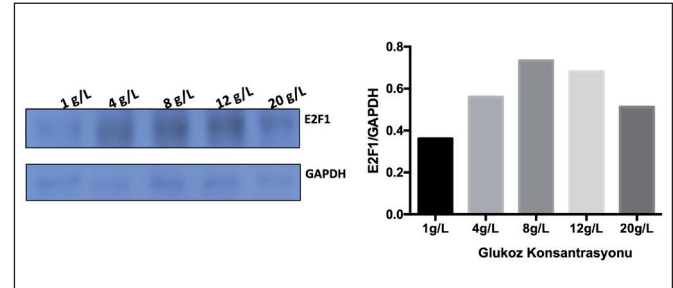
Ektopik olarak E2F1 ekspresyonunun gösterilmesi. Kalıcı transformasyon yöntemi (Kalsiyum fosfat yöntemi) ile transfekte edilmiş HEK293 ve yabancı tip HEK293 hücrelerinde oluşturulan ektopik ekspresyon vektörünün etkisinin gösterilmesi için hücre lizatlarından SDS-Page yöntemi ile E2F1 protein seviyeleri gösterilmiştir. Ektopik ekspresyon sağlanan transfekte HEK293 hücrelerdeki E2F1 protein seviyesinin yabancı tip HEK293 hücrelerine göre yaklaşık 25 kat artmış olduğu saptanmıştır.

Ektopik olarak E2F1 ekspresyonu gösteren hücrelerde farklı Glukoz konsantrasyonlarının E2F1 ekspresyonuna olan etkisi. Kalıcı transformasyon yöntemi (Kalsiyum fosfat yöntemi) ile transfekte edilmiş ve

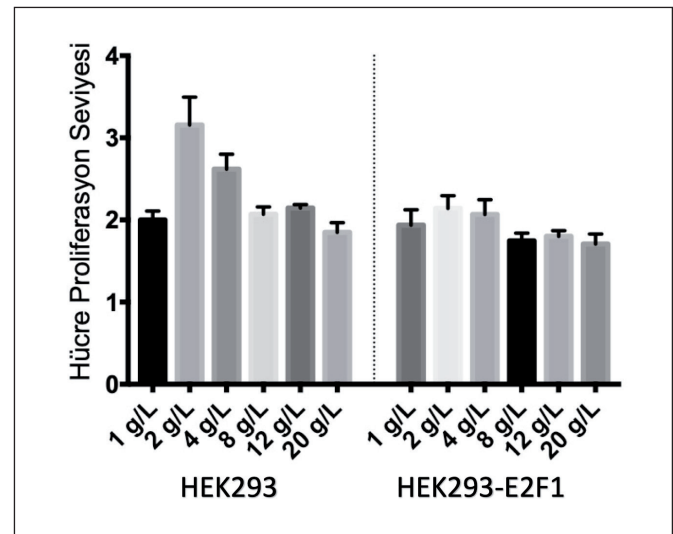
Neomisin varlığında 30 gün boyunca seçilmiş HEK293 hücreleri 1,4,8,12 ve 20 g/L glukoz içeren besi ortamında 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve hazırlanan hücresel lizatin 100 mikrogramında E2F1 ve GAPDH miktarları Wester Blott yöntemi ile belirlenmiştir. E2F1 ve GAPDH



Şekil 1: Ektopik olarak E2F1 ekspresyonunun gösterilmesi.



Şekil 2: Ektopik olarak E2F1 ekspresyonu gösteren hücrelerde farklı Glukoz konsantrasyonlarının E2F1 ekspresyonuna olan etkisi.



Şekil 3: Ektopik E2F1 ekspresyonu gösteren HEK293 ve transfekte edilmemiş HEK293 hücrelerinde farklı Glukoz konsantrasyonlarının hücre proliferasyonuna olan etkilerinin belirlenmesi.

bantlarının densitometrik değerleri elde edildikten sonra E2F1/GAPDH normalizasyonu yapılarak E2F1 seviyesindeki değişim saptanmıştır. En yüksek E2F1 ekspresyonu 8g/L glukoz konsantrasyonunda saptanmış olup; 8g/L'nin altında veya üstündeki glukoz konsantrasyonlarında E2F1 seviyesi, 8g/L glukoz konsantrasyonuna göre azalma göstermektedir.

Ektopik E2F1 ekspresyonun farklı glukoz konsantrasyonlarında hücre proliferasyona etkisinin olup olmadığını saptamak için ektopik E2F1 ekspresyonu gösteren HEK293 hücreleri ile transfekte edilmemiş HEK293 hücreleri farklı glukoz konsantrasyonu içeren besi ortamında 72 saat boyunca inkübe edilmiş ve bu süre sonunda hücre proliferasyonu, MTT yöntemi belirlenmiştir. Şekil 3'de gösterildiği gibi 2 ve 4 g/L glukoz hücrenin proliferasyonunu artırırken bu artış ektopik E2F1 ekspresyonu gösteren hücrelerde çok daha az olmuştur. Ayrıca, yüksek glukoz varlığında 8,12 ve 20 g/L konsantrasyonlarında ektopik E2F1 ekspresyonu gösteren hücrelerde proliferasyon 1 g/L dozunda elde edilen proliferasyondan daha düşük seviyeye inmiştir ($p < 0.05$); ancak transfekte edilmemiş hücrelerde anlamlı bir değişim saptanmamıştır.

TARTIŞMA

Hücre canlılığının devam ettirilmesi ve proliferasyonun kontrolü, enerji üretim ve tüketim dengesinin sağlanması ile mümkündür. Evrensel olarak glukoz tüm canlılarda enerji eldesi için kullanımı ve tedariği en kolay bileşik olup hücre içine alınması ve yakılması çok sıkı kontrol altında olan bir moleküldür. Son yıllarda E2F1'in hücre döngüsünün kontrolünün dışında enerji metabolizmasının düzenlenmesinde de kilit rol oynadığı ortaya konmuştur. Bu bağlamda Annicotte ve ark. 2009 yılında CDK4-pRB-E2F1 yolu sonuca aktive olan E2F1'in pankreas beta-hücrelerinden glukoz-bağımlı insulin sekresyonunda önemli rol oynayan Kir6.2 isimli KATP kanal proteininin ekspresyonunu indüklediğini göstermişlerdir. Bu sonuç E2F1 aktivitesinin Glukoz Homeostasis'inin sağlanmasında çok önemli olduğunu göstermiştir (10). Buna benzer yapılan bir diğer çalışmada ise E2F1(-/-) farelerde ise vücut kitlesinin azaldığı, pankreas büyümesi ve insülin sekresyonunda bozulmaların meydana geldiği ve bu farelerin besin-indüklü diyabet gelişimine dayanıklı oldukları gösterilmiştir (11). Yapılan bir diğer çalışmada ise E2F1'in enerji üretimini gerektirmeyen

bazal şartlarda hem kas hem de kahverengi yağ dokusunda oksidatif metabolizmayı baskıladığı gösterilmiş ve bununla uyumlu E2F1-negatif farelerde kontrolsüz oksidatif fosforilasyondan dolayı vücut kitlesinde azalma saptanmıştır (11, 12). Bu sonuçlarla paralellik gösterecek şekilde yapılan diğer çalışmalarda ise E2F1'in glukoz oksidasyon inhibitörü PDK4 enzimin ekspresyonunu indükleyerek glukoz yakılmasını artırdığı (13) ve yağ dokusuna özgül pRB inaktivasyonu yapıldığında, artan E2F1 aktivitesine bağlı olarak enerji metabolizmasında büyük bir artış saptanmış ve bu kilo kaybı olarak kendini göstermiştir (14). Bu çalışmalar E2F1'in birbirinden bağımsız olarak E2F1'in hem hücre ve vücut büyümesini hem de glukoz homeostasisinin sağlanmasında çok önemli olduğunu ortaya koymuştur.

Bu bilgiler ışığında, Şekil 2'de görüldüğü gibi HEK293 hücreleri artan glukoz varlığında, glikozun kullanımını sağlayabilecek yolların aktivasyonu için E2F1 seviyesini yükseltmektedir. Her ne kadar 20 g/L glukoz varlığında hücresel E2F1 seviyesi 4-8-12 g/L dozlarına kıyasla düşüyor gibi görünse de o seviyedeki E2F1 miktarı 1 g/L dozdaki miktarından daha yüksektir. Aşırı glukoz birikimine karşı hücrenin geri-beslemeli kontrol yolları mutlaka olabilir ancak artan glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak, glikozun kullanımını kolaylaştıracak E2F1 miktarının da yükselmesi önemli bir bulgudur. HEK293 hücreleri ile kıyaslandığında ektopik E2F1 ekspresyonunun beklenen aksine hücre proliferasyonunu artırmaması aslında açıklanabilir bir durumdur. Zira, daha önce de pek çok yayında gösterildiği gibi E2F1 seviyesinin aşırı miktarda artması, kontrolsüz çoğalmanın önüne geçmek için E2F1'in apoptosis indüksiyonu yapan genlerin ekspresyonunu indüklediği bilinmektedir (15).

Hücrenin orkestra şefi olarak çalışan E2F1 transkripsiyon faktörü, hücre proliferasyonundan, apoptoza, DNA hasar tamirinden, enerji metabolizmasına birçok hücre içi sistemde uyum ve denge içinde çalışarak çok yönlü bir protein olduğunu kanıtlamaktadır. E2F1 proteininin glukoz homeostazisindeki keşfi ile birçok metabolik hastalığa özellikle Tip-2 diyabete yeni kapılar açarak literatüre katkı sağlanmıştır. Sadece bir hücre döngüsü düzenleyicisi olmanın ötesinde E2F1, metabolik yaşamsal faaliyetlerde önemli bir rol üstlenmekte ve metabolik hastalıkların tedavilerine yeni yaklaşımlar ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

1. Malumbres M. Revisiting the “Cdk-centric” view of the mammalian cell cycle. *Cell Cycle* 2005; 4:206-10.
2. Dimova DK, Dyson NJ. The E2F transcriptional network: Old acquaintances with new faces. *Oncogene* 2005; 24:2810-26.
3. Cobrinik D, Dowdy SF, Hinds PW, Mittnacht S, Weinberg RA. The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling. *Trends Biochem Sci* 1992; 17:312-5.
4. Qin XQ, Livingston DM, Kaelin WG Jr, Adams PD. Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:10918-22.
5. Stevens C, La Thangue NB. The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA Repair (Amst)* 2004; 3:1071-9.
6. Fajas L, Landsberg RL, Huss-Garcia Y, Sardet C, Lees JA, Auwerx J. E2Fs regulate adipocyte differentiation. *Dev Cell* 2002; 3:39-49.
7. Darville MI, Antoine IV, Mertens-Strijthagen JR, Dupriez VJ, Rousseau GG. An E2F-dependent late-serum-response promoter in a gene that controls glycolysis. *Oncogene* 1995; 11:1509-17.
8. Hsieh MC, Das D, Sambandam N, Zhang MQ, Nahle Z. Regulation of the PDK4 isozyme by the Rb-E2F1 complex. *J Biol Chem* 2008; 283:27410-7.
9. Blanchet E, Annicotte JS, Fajas L. Cell cycle regulators in the control of metabolism. *Cell Cycle* 2009; 8:4029-31.
10. Annicotte JS, Blanchet E, Chavey C, Iankova I, Costes S, Assou S, Teyssier J, Dalle S, Sardet C, Fajas L. The CDK4-pRB-E2F1 pathway controls insulin secretion. *Nat Cell Biol* 2009; 11:1017-23.
11. Fajas L, Annicotte JS, Miard S, Sarruf D, Watanabe M, Auwerx J. Impaired pancreatic growth, beta cell mass, and beta cell function in E2F1 (-/-)mice. *J Clin Invest* 2004; 113:1288-95.
12. Blanchet E, Annicotte JS, Lagarrigue S, Aguilar V, Clape C, Chavey C, Fritz V, Casas F, Apparailly F, Auwerx J, Fajas L. E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nat Cell Biol* 2011; 13:1146-52.
13. Sugden MC, Holness MJ. Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. *Arch Physiol Biochem* 2006; 112:139-49.
14. Dali-Youcef N, Matakı C, Coste A, Messaddeq N, Giroud S, Blanc S, Koehl C, Champy MF, Chambon P, Fajas L, Metzger D, Schoonjans K, Auwerx J. Adipose tissue-specific inactivation of the retinoblastoma protein protects against diabetes because of increased energy expenditure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:10703-8.
15. Ertosun MG, Hapil FZ, Osman Nidai O. E2F1 transcription factor and its impact on growth factor and cytokine signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2016; 31:17-25.