

**KRAS-İLİŞKİLİ ONKOJENİK TRANSFORMASYONDA
6-FOSFOFRUKTO-2-KİNAZ/FRUKTOZ-2,6-
BİSFOSFATAZ-3 (PFKFB3)'ÜN ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

Aydan MUTLU



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KRAS-İLİŞKİLİ ONKOJENİK TRANSFORMASYONDA 6-FOSFOFRUKTO-2-
KİNAZ/FRUKTOZ-2,6-BİSFOSFATAZ-3 (PFKFB3)'ÜN ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

Aydan MUTLU
511403008

Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2020
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

KRAS-İLİŞKİLİ ONKOJENİK TRANSFORMASYONDA 6-FOSFOFRUKTO-2-KİNAZ/FRUKTOZ-2,6-BİSFOSFATAZ-3 (PFKFB3)'ÜN ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI
Aydan MUTLU

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI
İkinci Danışman: Prof. Dr. Abdullah YALÇIN Uludağ Üniversitesi

“Warburg etkisi” olarak bilinen ve oksijen varlığında bile gözlenen artmış glikolizis, tümör hücrelerinin tipik özelliklerinden biridir. Bifonksiyonel enzim ailesi olan 6-fosfofrukto2kinaz/fruktoz2,6bisfosfataz (PFKFB3)'lar glikolizin düzenlenmesi için önemlidir. Bu enzimler arasında katalitik aktivitesi en yüksek olan PFKFB3, pankreatik duktal adenokarsinom dâhil birçok kanser türünde fazlaca ifade edilmektedir.

Ras onkoproteinleri, hücrel yaşamın devamlılığını sağlayan birçok sinyal yolağının düzenlenmesinden sorumludurlar. Birçok kanser türünde Kras mutasyonu gözlenmekte, bu durum artmış glikolizis ve hücre proliferasyonu ile ilişkilendirilmektedir. Solid maligniteler arasında en ölümcüllerinden biri olan pankreatik duktal adenokarsinomların %90'ından fazlasında Kras mutasyonu izlenmektedir.

Bu çalışmanın amacı, Kras mutasyonunun PFKFB3 üzerindeki etkisinin araştırılması ve PFKFB3'ün Kras ilişkili onkojenik özelliklerin sürdürülebilirliğine olan etkisinin gözlemlenmesidir. Yapılan çalışmalar sonucunda Kras mutasyonlu hücrelerde PFKFB3 proteinin ifadesinin yaklaşık 6 kat arttığı, PFKFB3 baskılanmış hücrelerde glikoz alınıminin azaldığı (besi yerinde bulunan glikoz miktarları IPDE siCtrl: 127 µmol/mg, IPDE siP3/2: 176,35 µmol/mg, KPDE siCtrl: 83 µmol/mg, KPDE siP3/2: 97,74 µmol/mg) glikolizin baskılandığı (besi yerinde bulunan laktik asit miktarları; IPDE siCtrl: 38,16 µmol/mg, IPDE siP3/2: 24,40 µmol/mg, KPDE siCtrl: 48 µmol/mg, KPDE siP3/2: 29,29 µmol/mg) canlılığının azaldığı (baskılanmadan 48 saat sonraki hücre sayıları; IPDE siCtrl: $520 \pm 14 \times 10^3$, IPDE siP3/2: $605 \pm 70 \times 10^3$, KPDE siCtrl: $673,3 \pm 20 \times 10^3$, KPDE siP3/2: $550 \pm 20 \times 10^3$) ve invazyonun baskılandığı fakat yumuşak agarda koloni oluşturma kapasitelerinin değişmediği gözlenmiştir. Ayrıca PFK158'in Gemstabine karşı olan direnci etkilemediği bulunmuştur. Sonuç olarak Kras mutasyonlu hücrelerin glikolizi PFKFB3 üzerinden denetliyor olabileceği ortaya konmuştur. Kras mutasyonlu hücrelerin devamlılığında ve invazyonunda PFKFB3'ün rol alıyor olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: PFKFB3, Kras, Pankreatik duktal adenokarsinom, Fruktoz2,6bisfosfat, Onkojenik transformasyon, Glikolizis

2021, xi + 77 sayfa

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF THE ROLE OF 6-PHOSPHOFRUCTO-2-KINASE/FRUCTOSE-2,6-BISPHOSPHOTASE-3 (PFKFB3) ON KRAS ASSOCIATED ONCOGENIC TRANSFORMATION

Aydan Mutlu

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI
Second Supervisor: Prof. Dr. Abdullah YALÇIN Uludağ Üniversitesi

Cancer cells have increased glycolysis in the presence of oxygen and this phenomenon is called 'Warburg effect'. Bifunctional 6-phospho-2kinase/fructose-2,6-bisphosphate (PFKFB3) protein family is highly considerable in glycolysis regulation. In this protein family, PFKFB3 has the highest kinase activity and it is expressed most of the malignancies including pancreatic ductal adenocarcinoma.

Ras proteins regulate signal transduction underlying cellular activities. Various types of cancers has Kras mutation. Moreover, increased glycolysis and cell proliferation is associated with Kras mutation. Pancreatic ductal adenocarcinoma is one of the most lethal type of solid malignancies and %90 of cases have Kras mutation.

The purpose of this study; investigation of effect of Kras mutation on PFKFB3 and PFKFB3 effect of Kras associated oncogenic transformation. We found that PFKFB3 expression is increased in Kras mutated cells. Silencing of PFKFB3 caused reduced glucose uptake (glucose levels in medium; IPDE siCtrl: 127 µmol/mg, IPDE siP3/2: 176,35 µmol/mg, KPDE siCtrl: 83 µmol/mg, KPDE siP3/2: 97,74 µmol/mg), lactate production (lactic acid levels in medium; IPDE siCtrl: 38,16 µmol/mg, IPDE siP3/2: 24,40 µmol/mg, KPDE siCtrl: 48 µmol/mg, KPDE siP3/2: 29,29 µmol/mg) and increased cell mortality (cell numbers after 48 hours of transfection; IPDE siCtrl: $520 \pm 14 \times 10^3$, IPDE siP3/2: $605 \pm 70 \times 10^3$, KPDE siCtrl: $673,3 \pm 20 \times 10^3$, KPDE siP3/2: $550 \pm 20 \times 10^3$). Also, silencing of PFKFB3 decreased invasion but didn't effect the colony formation capacity in soft agar. Furthermore, we found that PFK158 doesn't effect the susceptibility of Gemcitabine. In conclusion, we showed that glycolysis may be regulated by PFKFB3 in Kras mutated cells. Furthermore, PFKFB3 may have role in cell sustainability and invasion in these cells.

Key words: PFKFB3, Kras, Pankreatic ductal adenocarcinoma, Fructose2,6bisphosphate, Oncogenic transformation, Glycolysis

2021, xi + 77 pages.

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

İlk olarak doktora eğitim süresince benimle her türlü bilgi ve birikimlerini paylaşan sayın danışmanım Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI ve sıkılmadan tüm sorularıma cevap vererek bu çalışmanın ilerlemesine yardımcı olan eş danışmanım Prof. Dr. Abdullah YALÇIN başta olmak üzere laboratuvarlarını bana açarak çalışmam için gerekli her türlü materyal ve malzemenin sağlanmasına yardımcı olan Uludağ Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Saime GÜZEL, Prof. Dr. Nazmiye GÜNEŞ, Prof. Dr. Ümit POLAT, Prof. Dr. Meltem TANRIVERDİ ve Dokt. Öğr. Üyesi Duygu UDUM'a teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmaları sırasında çalışmalarımın ilerlemesi için gereken her türlü yardımı esirgemeyen değerli arkadaşlarım, Mehmet SARIMAHMUT'a ve Tuba Hazal SOLAKOĞLUNA'na, çalışmalarımın ilerlemesi için gereken fiziksel yardım dışında laboratuvardaki zamanımın eğlenceli, güzel ve zevkli geçmesini sağladıkları için çok sevgili dostlarım Aybike SARIOĞLU'na, Deniz Ekin YILDIRIM'a, Yaşar TEMİZ'e ve Yunus GÜRPINAR'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

DDP(F)-2018/3 numaralı araştırma projesini finanse eden Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (UÜ-BAP)'a teşekkür ederim.

Son olarak başta beni bugünlere kadar getiren, beni olduğum kişi yapan, maddi ve manevi hiçbir desteğini esirgemeyen çok sevdiğim annem Hacer MUTLU ve babam merhum Hüsamettin MUTLU'ya, aralarında tek çiçek kaldığım için ayrıcalıklarına göz yuman değerli abim Ahmet MUTLU ve bir tanecik kardeşim Kenan MUTLU'ya ve ilerlediğim bu yolda mesafelerin önemi olmadan bana ulaşabildiği kadar yakın olup her türlü desteğini yanımda hissettiren sevgili nişanlım Barış Can AĞCA'ya minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Aydan Mutlu

.../.../.....

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜRLER.....	iii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	3
2.1. Glikolitik Metabolizma.....	3
2.1.1. Glikoz taşıyıcıları.....	3
2.1.2. Glikolizis.....	5
2.1.3. Laktat metabolizması.....	8
2.1.4. TCA döngüsü.....	9
2.1.5. Pentoz fosfat yolağı (PFY).....	11
2.2. PFKFB Enzim Ailesi.....	12
2.2.1. PFKFB1 izoformu.....	14
2.2.2. PFKFB2 izoformu.....	15
2.2.3. PFKFB3 izoformu.....	15
2.2.4. PFKFB4 izoformu.....	16
2.3. Glikolitik Metabolizma ve Kanser İlişkisi.....	17
2.3.1. PFKFB enzim ailesi ve kanser ilişkisi.....	20
2.4. Ras Onkojenik Mutasyonu ve Pankreatik Duktal Adenokarsinom.....	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	30
3.1 Kimyasallar, Cihazlar ve Çözeltiler.....	30
3.1.1. Kimyasallar.....	30
3.1.2. Cihazlar.....	31
3.1.3. Çözeltiler.....	31
3.2. Hücre Kültürü ve Proliferasyon Analiz.....	33
3.3. mRNA Ekspresyon Analizleri.....	33
3.3.1. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi.....	33
3.3.2. Gerçek zamanlı kantitatif PCR analizi.....	33
3.3. Protein İzolasyonu ve Western Blotlama.....	35
3.3.1 Total protein izolasyonu.....	35
3.3.2. Protein kontrasyon ölçümü.....	35
3.3.3. Western blotlama.....	36
3.4. Transfeksiyon.....	37
3.5. Tümörojenik Potansiyel Deneyleri.....	38
3.5.1. Yumuşak agarda koloni formasyonu.....	38
3.5.2. Koloni formasyonu.....	38
3.5.3. İnvazyon.....	38
3.5.4. İlaç direnci deneyi.....	39
3.6. Fruktoz-2,6-Bisfosfat Analizleri.....	39
3.7. Glikoz Alımı Analizi.....	40
3.8. Glikoliz Analizi.....	41
3.9. İstatiksel Analizler.....	42

4. BULGULAR.....	43
4.1. IPDE Hüçelerinin KRAS ^{G12D} ile Transformasyonu Glikoz Alımını, Glikolizi, F2,6BP miktarını ve Proliferasyonu Arttırır.....	43
4.2. PFKFB3'ün IPDE ve KPDE Hücre Hattında Ekspresyonu.....	44
4.2.1. PFKFB3 ekspresyonu KRAS ^{G12D} mutasyonu bulunan hüçelerde artmaktadır.....	44
4.3. PFKFB3 Ekspresyonunun IPDE ve KPDE Hüçelerinde Glikolitik Metabolizma Üzerine Etkileri.....	45
4.3.1. PFKFB3'ün IPDE ve KPDE hüçelerinde siRNA aracılı baskılanması.....	45
4.3.2. PFKFB3'ün siRNA aracılı baskılanması hem IPDE hem de KPDE hüçelerinde glikoz alımını azaltır.....	47
4.3.3. PFKFB3'ün siRNA aracılı baskılanması IPDE ve KPDE hücre hatlarında glikolizisi baskılar ve bu baskılanma KRAS ^{G12D} mutasyonunun olduğu hüçelerde daha fazladır.....	49
4.3.4. KRAS ^{G12D} mutasyonu IPDE hüçelerinde F-2,6-BP konsantrasyonunu arttırır ve PFKFB3'ün siRNA aracılı baskılanması sonucunda IPDE ve KPDE hüçelerinde F-2,6-BP konsantrasyonu azalır.....	50
4.4. PFKFB3 Ekspresyonunun IPDE ve KPDE Hüçelerinde Onkojenik Potansiyele Etkileri.....	51
4.4.1. PFKFB3'ün siRNA ile baskılanması IPDE hüçelerinde proliferasyonu etkilemezken KRAS ^{G12D} mutasyonlu KPDE hüçelerde proliferasyonu baskılar.....	51
4.4.2. PFKFB3 ekspresyonunun siRNA aracılı baskılanması KRAS ^{G12D} mutasyonlu KPDE hüçelerinde yumuşak agarda koloni oluşturma kapasitelerini etkilemez.....	52
4.4.3. PFKFB3'ün siRNA aracılı baskılanması KRAS ^{G12D} mutasyonlu KPDE hüçelerinde matrijel invazyonunu azaltır.....	52
4.4.4. PFKFB3'ün siRNA aracılı baskılanması KRAS ^{G12D} mutasyonlu KPDE hüçelerinde Gemsitabine duyarlılığı etkilemez.....	53
4.4.5. PFK158 ile PFKFB3 baskılanması KRAS ^{G12D} mutasyonlu KPDE hüçelerinde Gemsitabine duyarlılığı etkilemez.....	54
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	56
KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	77

SİMEGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Simgeler	Açıklama
α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta
δ	Delta
ϵ	Epsilon
γ	Gama
H ⁺	Hidrojen
μ	Mikro
M	Molar
°C	Santigrad
ξ	Xi

Kısaltmalar

Kısaltmalar	Açıklama
3PO	3-(3-piridin)-1-(4-piridin)-2-propan-1-on
5MPN	5-(n-(8-metoksi-4-kinol)amino)pentil nitrat
6PGDH	6-fosfoglukonat dehidrogenaz
6PGL	6-fosfoglukonolaktonaz
A	Adenin
Akt	Protein kinaz B
AMP	Adenozin monofosfat
AMPK	AMP activated protein kinase
	AMP tarafından aktive edilen protein kinaz
APC/C	Anafaz promote edici kompleks
ATP	Adenozin trifosfat
BCA	Biokinkoninik asit
CAMK	Kalmodulin bağımlı protein kinaz
c-AMP	Siklik AMP
CDK	Cyclin dependent kinase
	Siklin bağımlı kinaz
CDKN2A	Cyclin dependant kinase inhibitor 2A
Cip/Kip	CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein
	CDK ilişkili protein/kinaz inhibe edici protein
CLOCK	Circadian locomoter output cycles protein kaput
CO ₂	Karbondioksit
CoA	Coenzim A
	Koenzim A
COOH	Karboksi
CS	Citrat synthase

	Sitrat sentaz
DMEM	Dulbecco's Modified Essential Media
	Dulbecco tarafından modifiye edilmiş Eagle besiyeri
dNTP	Deoksinükleotid tri fosfat
DPC4	Deleted in pancreatic cancer/ SMAD family member 4
	Pankreatik kanserde delesyon /SMAD ailesi üyesi 4
E1A	Adenovirus early region 1A
EGF	Epidermal Growth Factor
	Epidermal büyüme faktörü
EMT	Epitelyal-mezenşimal dönüşüm
ERK	Extracellular signal related kinase
ERN1	Endoplazmik retikulum nuklei- 1
ETS	Elektron taşıma sistemi
F6P	Fruktoz-6-fosfat
F-1,6-BP	Fruktoz-1,6-bisfosfat
F-2,6-BP	Fruktoz-2,6-bisfosfat
F-2,6-BPaz	Fruktoz-2,6-bisfosfataz
FAD	Flavin adenin dinükleotid
FBS	Fötal Bovin Serumumu
FH	Fumarat dehidrolaz
G	Guanin
G3P	Gliseraldehit-3-fosfat
G6P	Glukoz-6-fosfat
G6PDH	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GAP	GTPase activating protein
	GTPaz aktive edici protein
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GDP	Guanozin difosfat
GEF	Guanin exchange factor
	Guanin değişim faktörü
GLUT	Glikoz transporter proteini
GOT1	Aspartat transaminaz
GPI	Glukoz-6-fosfat izomeraz
GTP	Guanozin trifosfat
GTPaz	Guanozin trifosfataz
H ₂ O	Hidrojen monoksit (Su)
HIF	Hipoksi indükleyici faktör
HK	Hekzokinaz
HNF-6	Hepatosit nükleer faktör 6
HVR	Hyper variable region
	Hiper değişken bölge
IDH	Izositrat dehidrogenaz

IGF	İnsülin like growth factor İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-6	İnterlöykin-6
IPDE	hTERT-HPNE E6/E7/st
KPDE	hTERT-HPNE E6/E7/st/KRAS ^{g12d}
LDH	Laktat dehidrogenaz
MACC	Metastasis-associated in colon cancer protein Kolon kanserinde metastaz ilişkili pteoin
MAPK	Mitogen activated protein kinase Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz
MCT	Monocarboxyl transporter Monokarboksil taşıyıcılar
MDH	Malat dehidrojenaz
MK2	MAPK aktive edilmiş protein 2
mTOR	Mammalian target of rapamycine Memeli rapamisin hedef proteini
MYC	Proto-onkojen c-MYC proteini
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
Nore1	RASSF5-ras association domain-containing family protein 5 RASSF-5- ras ilişkili bölge içeren aile proteini 5
PanIN	Pankreatik intraepitelial neoplazi
PBS	Fosfat ile tamponlanmış salin çözeltisi
PCR	Polymerase chain reaction Polimeraz zincir reaksiyonu
PDA	Pankreatik duktal adenokarsinom
PDH	Piruvat dehidrojenaz
PDK	Piruvat dehidrojenaz kinaz
PFK-1	Fosfofruktokinaz-1
PFKFB	6-fosfofrukto-2-kinaz/Fruktoz-2,6-bisfosfataz
PFY	Pentoz fosfat yolağı
PGM	Fosfogliserat mutaz
PI3K	Fosfatidilinozitol 3 kinaz
Pi	İnorganik Fosfat
PKA	Protein kinaz A
PKB	Protein kinaz B
PKC	Protein kinaz C
PK	Piruvat kinaz
PLC	Phospholipase C Fosfolipaz c
PTEN	Fosfataz ve tensin homolog proteini
qPCR	Quantitative PCR
RalGDS	Ral Guanine Nucleotide Dissociation Stimulator

RIN1	Ral guanin dinükleotid ayırma stimulatörü
ROBO1	Ras And Rab Interaktör 1
ROE	Roundabout homolog proteini 1
RPE	Reaktif oksijen elementleri
RPI	Ribuloz-5-fosfat epimeraz
RPM	Ribuloz-5-fosfat izomeraz
	Rotation per minute
	Dakikadaki dönüş sayısı
RSK	Ribozomal s6 kinaz
SCMT	Sodium-coupled monocarboxly transporters
	Sodyum eşlenikli monokarboksil taşıyıcılar
SDH	Sukkinat dehidrogenaz
siRNA	Small interfering RNA
	Küçük interferans RNA'sı
SGLT	Sodyum glukoz taşıyıcıları
SLIT2	Slit guidans ligandı
SRB	Sulforhamid B
SRC	Proto-onkojen c-SRC protein
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktive edici 5
TALDO	Transaldolaz
TCA	Trikarboksilik asit döngüsü
TIAM	T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein
	T- hücreli lenfoma invazyon ve metastaz indükleyici protein
TIGAR	TP-53 inducible glycolysis and apoptosis regulator
	TP-53 indüklenebilir glikolizis ve apoptozis regülatörü
TP53	Tümör protein 53
TKT	Transketolaz
VHL	von Hippel-Lindau proteini

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Glikozun piruvata çevrilmesiyle 2 molekül ATP oluşur.....	7
Şekil 2.2. TCA döngüsü.....	10
Şekil 2.3. PFY oksidatif ve non-oksidatif kol olmak üzere iki ayrı reaksiyon zinciri içermektedir.....	12
Şekil 2.4. F-2,6-BP glikolizisin anahtar enzimi olan PFK-1'i pozitif olarak etkilemekte ve glikolizisi uyarmaktadır.....	13
Şekil 2.5. PFKFB enzim ailesi üyeleri bifonksiyonel enzimlerdir. N-terminal ucu kinaz aktivitesi göstermekte ve ATP kullanarak F6P'ı F-2,6-BP'a katalizlemektedir.....	13
Şekil 2.6. PFKFB enzim ailesi üyeleri	17
Şekil 2.7. Prolifere olan bir kanser hücresinde glikolitik programlanma.....	19
Şekil 2.8. Ras proteinleri etkileştikleri diğer proteinler ile birçok sinyal yolağının düzenlenmesinde kritik rol oynarlar ve hücrel biyolojik süreçlerin düzenleyen kilit proteinlerden biri olarak kabul edilirler.....	26
Şekil 2.9. Pankreatik duktal adenokarsinomun öncül lezyonları ve malign dönüşüme neden olan genetik değişiklikler.....	29
Şekil 3.1. BCA standart Absorbans / Konsantrasyon grafiği.....	36
Şekil 3.2. Fruktoz-2,6-bisfosfat standart absorbans değişim hızı / Konsantrasyon grafiği.....	40
Şekil 3.3. Glikoz konsantrasyonu/absorbans grafiği.....	41
Şekil 3.4. Laktat konsantrasyonu/absorbans grafiği.....	42
Şekil 4.1. IPDE ve KPDE hücre hatlarında glikolizis ve proliferasyonun karşılaştırılması.....	43
Şekil 4.2. IPDE ve KPDE hücre hattına mRNA seviyelerinin % kat değişimleri.....	45
Şekil 4.3. Kras baskılanmış IPDE ve KPDE hücre hattında Kras baskılanması sonrasındaki PFKFB3 ve Kras sinyal kaskadı alt yolağındaki protein seviyeleri.....	45
Şekil 4.4. IPDE ve KPDE hücre hattında mRNA kat değişimi ve baskılanma sonucundaki protein seviyeleri.....	46
Şekil 4.5. Hücrelerin siRNA ile baskılandıktan 48 saat sonra besi yerlerinde bulunan glikoz miktarları.....	48
Şekil 4.6. Piruvat varlığında PFKFB3 baskılanması sonucunda hücrelerin glikoz alınımında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.....	48
Şekil 4.7. PFKFB3'ün siRNA ile baskılanmasından 48 saat sonra besi yerinde bulunan laktik asit miktarları. Baskılanma sonucunda glikoliziste azalma izlenmiştir.....	49
Şekil 4.8. Ölçülen Fru-2,6-BP değerleri hücrelerin protein konsantrasyonlarına normalize edilerek pmol/mg protein olarak verilmiştir.....	50
Şekil 4.9. PFKFB3'ün siRNA ile transfeksiyonundan 48 saat sonraki IPDE ve KPDE hücre sayısı.....	51
Şekil 4.10. KPDE hücrelerinin yumuşak agarda oluşturduğu kolonilerin makroskopik görüntüsü.....	52
Şekil 4.11. İnvaze olan hücreler kristal violet ile boyanarak ışık mikroskopunda 10x büyütmede görüntülenerek rastgele 1 alanın görüntüsü kaydedilmiştir.....	53
Şekil 4.12. Gemstabile uygulanmış hücrelerde 10 gün sonundaki koloni görüntüleri....	54
Şekil 4.13. PFK158 kullanımı hücrelerin gemstabile karşı olan dirençlerini etkilemez..	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasallar ve bilgileri.....	30
Çizelge 3.2. Cihaz listesi.....	31
Çizelge 3.3. Gerçek zamanlı kantitatif PCR analizinde kullanılan proplar.....	34
Çizelge 3.4. Kullanılan Antikorların Listesi.....	37
Çizelge 3.5. Kullanılan siRNA moleküllerinin listesi.....	37

1. GİRİŞ

Tüm hücreler homeostazı sağlamak için enerjiye ihtiyaç duyarlar. Ayrıca çoğalan hücrelerin bu homeostazı sağlarken, büyümek ve bölünmek için de enerjiye gereksinimleri vardır (Kwon ve Vander Heiden 2011). Glikolitik metabolizma enerji üretmek için ana yoldur ve glikolitik ara metabolitler diğer hücre bileşenlerinin biyosentezinde öncü molekül olarak kullanılırlar. Glikolitik yolak, metabolik ağlar arasında en eski olanıdır ve türler arasında oldukça korunmuştur (Kim ve Dang 2005).

Glikoliz olarak adlandırdığımız metabolik olay, glikozun piruvata çevrilmesidir ve daha sonra piruvat laktik aside çevrilir. Çoğu memeli hücresinde, oksijen varlığı durumunda glikoliz baskılanmakta ve piruvat mitokondride karbondioksit (CO_2) ve suya (H_2O) okside olmaktadır (Gatenby ve Gillies, 2004). Fakat kanser hücrelerinde ve hızlı çoğalan bazı hücrelerde oksijen varlığında bile artmış glikoliz izlenmiştir (Feron, 2009). Bu durum araştırmacıların oldukça ilgisini çekmektedir. Çünkü araştırmacılar, glikolitik yolda bulunan bazı kilit enzimlerin baskılanması ile glikolizin azaltılabileceğini dolayısıyla kanser hücrelerinin büyümesinin ve bölünmesinin yavaşlatılabileceğini düşünmektedir.

6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bisfosfat (PFKFB) enzimleri, glikolitik yolağın regülasyonundan sorumludur. Bu enzimler, fosfofruktokinaz-1 (PFK1)'in aktivatörü olan fruktoz-2,6-bisfosfat (F2,6BP)'in hücre içi yapım ve yıkımını üstlenirler (Minchenko ve ark. 2003). PFK1 ise glikolitik yoldaki kilit enzimlerden biridir ve glikolizin işleyişinde bu enzimin düzenlenmesinin yeri çok önemlidir. PFKFB enzimlerinin tümör hücrelerinde de önemli görevleri vardır. Yapılan araştırmalarda, birçok tümör hücresinde bu enzim ailesinin çeşitli izoformlarının ifadesinin arttığını gözlenmiştir. PFKFB enzim ailesinde dört adet ana izoform bulunmaktadır (PFKFB1-4). Bu izoformlardan PFKFB3, en yüksek kinaz aktivitesine sahip izoformdur ve neoplastik dönüşümde önemli bir yeri bulunmaktadır (Shi ve ark. 2017).

Ras protein ailesi, hücre dışından gelen uyarıları hücrelerin büyümesi, farklılaşması, devamlılığı ve hareketliliği gibi birçok biyolojik olayın gerçekleşmesini sağlayan hücre içi sinyal yolağına dönüştüren bir GTPaz (Guanin tri fosfat) protein ailesidir. Bu proteinlerin aşağı yolağında kalan proteinler ise, hücrenin yaşamsal aktivitesini sağlaması için gerekli olan önemli yolakların elemanlarıdır (Takashima ve Fallor 2013). Çoğu kanser türünde ras proteinlerinin mutasyonlarına rastlanmıştır. Özellikle Kras mutasyonu

birçok kanser türünde izlenmektedir. Bu mutasyon sonucu, glikoz taşıyıcı proteinlerin ve çeşitli glikolitik enzimlerin ifadelerinin arttığı dolayısıyla glikolizin de arttığı bildirilmiştir (Shimizu ve ark. 1983). Pankreatik duktal adenokarsinomların %90'unda da Kras mutasyonu olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla bu proteinde görülen mutasyon ve mutasyon sonucundaki değişen hücresel süreçlerin onkojenezdeki önemi büyüktür (Hidalgo 2010).

Pankreatik duktal adenokarsinomlar, ölüm oranlarının en yüksek olduğu kanserlerden biridir ve tedavi yöntemi oldukça radikal olan bir hastalıktır. Pankreatik karsinom gelişimi için Kras mutasyonunun gerekliliği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Ayrıca Kras mutasyonunun glikolizi de arttırdığı gösterilmiştir. (Collins ve ark 2012). Ras transformasyonu için PFKFB3 gerekliliği akciğer fibroblastlarıyla yapılan bir çalışmada bildirilmiştir. Bu çalışmada PFKFB3 baskılanmış H-ras'lı farelerde F2,6BP seviyelerinde, glikolizde, laktat seviyesinde ve tümör büyümesinde azalma görülmüştür (Telang ve ark. 2006). Dolayısıyla PFKFB3 proteinini ve genini hedef alacak terapötik ajanlar pankreas gibi ölüm oranı yüksek bir kanser için etkili bir ajan olabilir.

Bu çalışmanın amacı, Kras mutasyonlu pankreatik duktal adenokarsinom hücre hatlarını kullanarak Kras'ın PFKFB3 üzerindeki etkisinin, PFKFB3 üzerinden glikoliz aktivitesindeki etkisinin araştırılması ve Kras mutasyonlu pankreatik duktal karsinom hücrelerinde onkojenik özelliklerin sürdürülebilmesi için PFKFB3'ün gerekliliğinin belirlenmesidir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Glikolitik Metabolizma

Glikoz hücre içine alındıktan sonra üç farklı şekilde metabolize olabilir. İlk olarak glikoliz sonrası laktik aside çevrilebilir, ikinci olarak piruvata çevrildikten sonra trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne katılabilir, üçüncü olarak ise pentoz fosfat yolağı (PFY) ile oksidatif strese karşı korunmak için okside olabilir ya da nükleotid yapımında kullanılabilir (Mulukutla ve ark. 2016, Wilson 2003). Ayrıca, glikolitik ara metabolitler bazı aminoasitlerin sentezinde öncü olarak kullanılırlar (Kwon ve Vander Heiden 2011).

Glikolizi anlatmadan önce glikozun hücre içerisine nasıl taşındığına değinmemiz gerekmektedir. Glikozun hücre içine girişinde ve glikoliz sonrası oluşan metabolitlerin çıkışında üç ana taşıyıcı bulunmaktadır. Bunlar; glikoz taşıyıcılar, laktat ve diğer substratları taşıyan monokarboksilat taşıyıcılar ve mitokondriyal piruvat taşıyıcılarıdır (Mulukutla ve ark. 2016). Glikoz hücre içine iki farklı taşıyıcı ile alınabilir. İlki sodyum yönlendirmeli şeker taşıyıcılar (SGLT); ikincisi ise glukoz taşıyıcılarıdır. SGLT'ler, glikozun böbrekte idrardan, gastrointestinal boşlukta ise yiyeceklerden alınımı ve tekrar emilmesi için gereklidir. Glikoz taşıyıcılar ise glikozun hücre dışından sitozole taşınmasında görev almaktadır. Burada glikoz taşıyıcılarına değinilecektir (Zhao ve Keating 2007).

2.1.1. Glikoz taşıyıcıları

Glikozun hücre zarından pasif geçişini sağlayan taşıyıcılar, 14 adet izoform içeren GLUT (Glukoz transporters) protein ailesidir. Bu protein ailesi primer dizi farklılıklarına göre üç sınıfa ayrılır. Sınıf I; GLUT 1, 2, 3, 4'ü içerir ve klasik taşıyıcılar olarak adlandırılır. Sınıf II; 'tuhaf' izoformlardır ve GLUT 5, 7, 9, 11'i içerir. Son olarak sınıf III; GLUT 6, 8, 10, 12 ve proton yönlendirmeli myoinositol transporter HMIT (GLUT 13) izoformlarını içermektedir (Augustin 2010).

Sınıf I izoformlar iyi karakterize edilmiş formlardır. Bu sınıfta bulunan GLUT 1, ilk klonlanan izoformdur ve neredeyse tüm dokularda ifade edilmektedir (Hillsley 2000, Mueckler ve ark. 1994). Ayrıca laboratuvarlarda rutin olarak kullanılan hücre hatlarında da yüksek seviyede bulunmaktadır (Augustin 2010).

GLUT 2 ana olarak karaciğer, böbrek ve bağırsakta bulunmaktadır (Fukumoto ve ark. 1988). GLUT 3, çeşitli türlerde beyinde baskın olarak ifade edildiği için nöron-özgü taşıyıcı olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca bazı kanser hücrelerinde de ifade edildiği görülmüştür (Ciampi ve ark 2008, McCall ve ark 1994). GLUT 4 ise kahverengi ve beyaz yağ dokusunda, kalp ve iskelet kasında insülin ile uyarılmış glikoz alımında hız belirleyici olarak görev alır (Huang ve Czech 2007). Bu sınıfın son üyesi ise %95 oranında GLUT 3 ile benzerlik gösteren ve özellikle testiste ifade edilen GLUT 14 izoformudur (Wu ve Freeze 2002).

Sınıf II ailesinin kendine has özellikleri fruktozu taşıyabilmeleridir. Fakat yapılan son araştırmalarda GLUT 2'nin de fruktozu taşıdığı gösterilmiştir (Manolescu ve ark. 2007). GLUT 5, jejunumda ve portal vendeki epitelyal hücrelerde bulunmaktadır (Blakemore ve ark. 1995). GLUT 7, ince barsak ve kolonda primer olarak ifade edilmektedir (Li ve ark. 2004). GLUT 9, böbreğe ve karaciğere özgüdür (Augustin 2010). GLUT 11'in üç farklı varyantı bulunur ve bu varyantlar dokuya özgündürler. A varyantı kalp kası, iskelet kası ve böbrek de, B varyantı; plasenta, yağ doku ve böbrekte, C varyantı ise yağ doku, kalp kası, iskelet kası ve pankreasta bulunur (Scheepers ve ark. 2005).

Sınıf III ailesi üyeleri bu sınıfa özgü bir özelliği paylaşmaktadırlar. Tüm izoformlar N-glikolizasyon bölgelerini beşinci hücre dışı katlantılarında taşırlar. GLUT 6 baskın olarak beyin, dalak ve periferal lökositlerde ifade edilir (Augustin 2010). GLUT 8 (GLUTX1) ana olarak testiste, az miktarda da beyin, adrenal bez, karaciğer, dalak, kahverengi yağ doku ve akciğerde bulunmaktadır (Ibberson ve ark. 2000). GLUT 10 insanda kalp, akciğer, beyin, karaciğer, iskelet kası, pankreas ve böbrekte bulunmaktadır (McVie-Wylie ve ark. 2001). GLUT 12, ilk olarak insan meme kanseri hücre hattından izole edilmiştir ve duktal karsinoma in situ'da GLUT 12'nin fazla ifade edildiği ortaya konmuştur. Ana olarak iskelet kası, kalp kası, ince barsak ve plasentada ifade edilmektedir (Rogers ve ark. 2003, 2020). Son olarak GLUT 13'ten bahsedecek olursak, bu izoform baskın olarak beyinde, hipotalamusta, serebellumda, hipokampusta ve beyincikte bulunur (Augustin 2010, Uldry ve ark. 2001).

Yukarıda glikozun hücre içine alındıktan sonra üç farklı yola gidebileceğinden bahsedilmişti. Şimdi bu yollardan ilki olan glikoliz detaylı bir şekilde anlatılacaktır.

2.1.2. Glikoliz

Glikoliz, glikozun pirüvata dönüştürüldüğü çeşitli basamakları içeren bir süreçtir. Piruvat, oksijen varlığında TCA (Trikarboksilik asit) döngüsüne katılır ya da yeterli oksijen olmadığı durumlarda laktik asite çevrilebilir (Gatenby ve Gillies 2004).

1920'li yıllarda Otto Warburg ve arkadaşları kanser hücrelerinin, zengin oksijen ortamına rağmen normal hücrelere göre çok daha fazla miktarda glikoz tükettiğini ve baskın olarak glikoliz ile yüksek seviyede laktat ürettiğini göstermiştir. Bu durum aerobik glikoliz ya da 'Warburg etkisi' olarak adlandırılmaktadır. Glikoliz, ATP üretimi açısından yetersizdir. Fakat bu az üretime rağmen, oksidatif fosforilasyondan daha hızlı ATP üretir. Dolayısıyla kanser hücreleri ve hızlı bölünen hücrelerde artmış glikoliz izlenmektedir (Kwon ve Vander Heiden 2011, Liberti ve Locasale 2016).

Glikolizin ilk basamağı, glikozun geri dönüşümsüz olarak glikoz-6-fosfata (G6P)'a çevrilmesidir. Bu reaksiyon heksokinaz (HK) tarafından katalizlenmektedir ve ATP harcanır (Mulikutla ve ark. 2016). Hekzokinazın dört adet izoformu bulunur. Bu izoformlar tip I, II, III ve glukokinaz olarak bilinen tip IV'dür. Tip III glikoza karşı en fazla afinite gösteren izoenzimdir (Wilson 2003).

Daha sonra G6P, glukoz-6-fosfat izomeraz (GPI) ile fruktoz-6-fosfat (F6P)'a çevrilir (Achari ve ark. 1981). F6P'in fosforilasyonu ATP harcanan ikinci basamaktır ve PFK1 ile katalizlenir. Bu reaksiyon sonucu F6P, fruktoz-1,6-bisfosfat (F1,6BP)'a çevrilir. Bu tepkime hücre içi koşullarda geri dönüşümsüzdür ve glikolizin kilit noktasıdır (Sola-Penna ve ark. 2010). F2,6BP bu enzimin aktivatörüdür ve glikolizin düzenlenmesinde önemli bir yeri vardır. Hücre içi F2,6BP miktarları ise PFKFB enzim ailesi tarafından sağlanmaktadır (Minchenko ve ark. 2003).

PFK'nın üç izoformu bulunmaktadır. Bunlar PFK1 (M) kas hücrelerinde ifade edilen formu; PFK-L, akciğerde ifade edilen izoformu ve PFK-P, plasentada ifade edilen izoformudur. PFK1 miktarı, büyüme sinyallerine cevaben artmaktadır ve çoğalmakta olan hücrelerde artmış glikoliz ile ilişkilidir (Mor ve ark. 2011).

F1,6BP, aldolaz ile gliseraldehit 3-fosfat (G3P) ve dihidroksiaseton fosfata (DHAP) çevrilir. Aldolazın üç farklı izoformu bulunmaktadır. Aldolaz A kas hücrelerinde, aldolaz B karaciğerde ve aldolaz C ise beyinde ifade edilmektedir (Penhoet ve ark. 1966).

DHAP, trioz fosfat izomeraz (TPI) ile G3P'a çevrilir. TPI mükemmel yakın bir katalist olarak görülmektedir. Çünkü katalitik hızı substrat difüzyon oranına bağlıdır (Grüning ve ark. 2014).

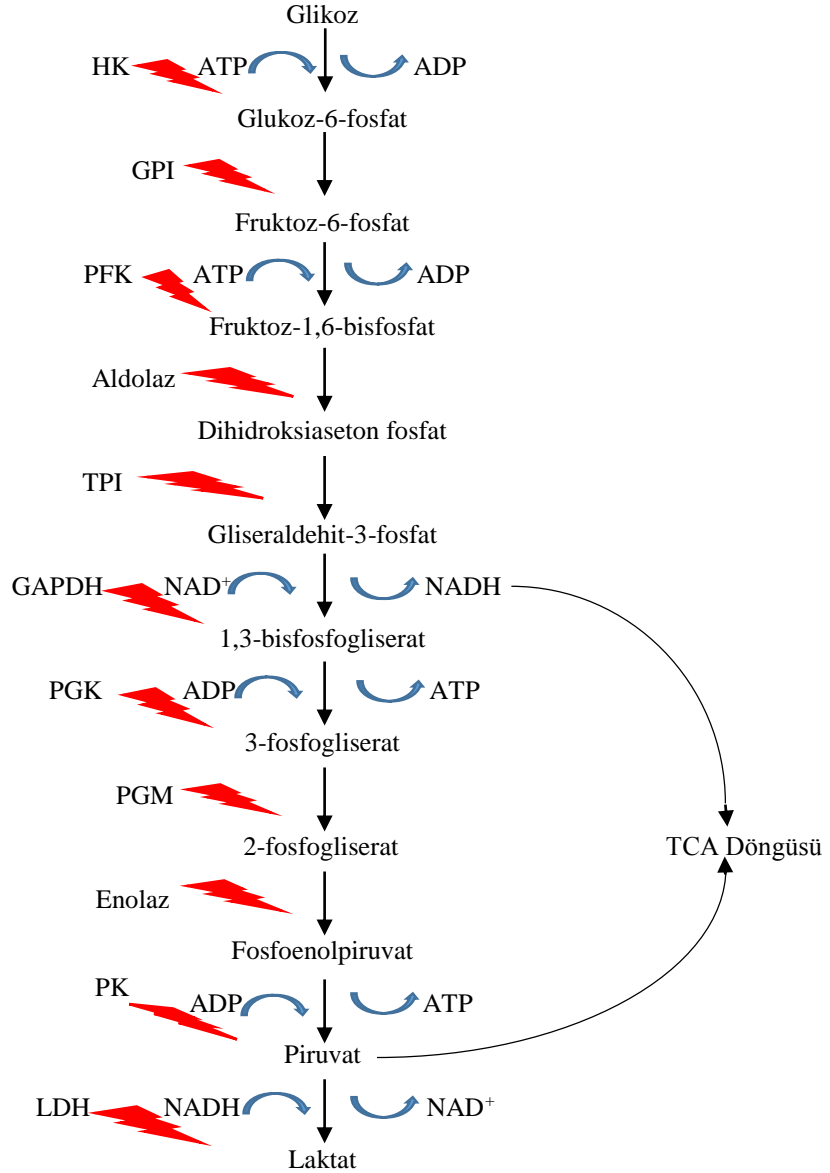
Daha sonra gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), NAD⁺ (nikotinamid adenin dinükleotid) ile düzenlenen oksidatif fosforilasyonu katalizleyerek G3P'ı 1,3-bisfosfogliserata çevirir. Bu arada NAD⁺, NADH'a indirgenir ve TCA döngüsüne elektron sağlar (Buehner ve ark. 1973).

Fosfogliserat kinaz (PGK), 1,3-bisfosfogliseratın yüksek enerjili fosforilasyonu ile 3-fosfogliseratu oluşturur. Bu enzim glikolitik yolda ATP üretiminin yanı sıra, bitkilerde karbon fiksasyonu için de gereklidir (Blake ve Rice 1981). Fosfogliserat mutaz (PGM), 3-fosfogliseratu 2-fosfogliserata dönüştüren enzimdir ve fosforilasyon ile katalitik aktivitesi etkinleşir (Winn ve ark 1981).

2-fosfogliseratu, fosfoenolpiruvata katalizleyen enzim enolaz (2-fosfo-D-gliserat hidrolaz)'dır. Bu enzim dimerik formdadır ve iyi korunmuş gen ailelerinden biri olarak evrimsel çalışmalarda önemli rol oynamaktadır (Tracy ve Hedges 2006).

Glikolizin son basamağı ise fosfoenolpiruvatın piruvata indirgenmesidir. Bu tepkime piruvat kinaz (PK) tarafından katalizlenir ve glikolitik yolda ATP üreten ikinci basamaktır. Bu enzim, bakterilerden bitkilere kadar birbirinin aynısı olan 500 adet aminoasit rezidüsüne sahip bir enzimdir (Muirhead et al., 1986). PK'nın dimerik ve tetramerik olarak iki formu bulunmaktadır. Tetramerik formun PEP'e olan afinitesi dimerik forma göre daha fazladır. Enzimin tetramerik forma dönmesi için de yüksek miktarlarda F1,6BP gerekmektedir. Normal proliferasyon yapan hücrelerde PK genellikle tetramerik formdadır. Ayrıca PK'nın birden fazla izomeri bulunmaktadır. PK-L karaciğer ve böbrek gibi glikoneojenezin olduğu dokularda bulunur. Eritrositler PK tip R'yi ifade ederler. PK-M1 kas ve beyin gibi büyük miktarda enerji gereken dokularda bulunur. PK-M2 ise nükleik asit sentezinin yüksek olduğu embriyonik hücrelerde, yetişkin kök hücrelerinde, akciğer hücrelerinde ve kanser hücrelerinde ifade edilmektedir (Mazurek ve ark. 2005).

Daha sonra piruvat, dış ortam koşullarına ve uyarılara bağlı olarak hücre tarafından laktik asit (laktat) oluşumuna yönlendirilir ya da oksijenli solunuma katılır (Şekil 2.1.). İlk olarak değinilecek yolak piruvatın laktik asite dönüşümüdür.



Şekil 2.1. Glukozun piruvata çevrilmesiyle 2 molekül ATP oluşur. Piruvat oksijen varlığına ve ya dışarıdan gelen sinyallere göre ya laktat dehidrogenaz (LDH) ile laktik asite çevrilir ya da oksijenli solunum ile ATP üretmek amacıyla TCA döngüsüne katılır.

2.1.3. Laktat metabolizması

Hücreler, hipoksi durumuna karşı hayatta kalabilmek için piruvatı laktata çevirmek zorundadırlar. Oksijen yokluğunda ana enerji kaynağı olan anaerobik glikoliz için NAD^+ gereklidir ve bu ihtiyaç piruvatın laktata çevrilmesi sonucu NADH 'ın yükseltgenmesi ile karşılanır (Cohen ve Roy 1975). Fakat hücreler sadece oksijen yokluğunda laktat üretmezler. Tümör hücreleri ve hızlı çoğalan hücrelerde oksijen varlığında bile yüksek oranda glikoliz ve laktik asit oluşumu izlenir (Feron 2009).

Laktat insan vücudunda iki izomer halinde bulunan bir hidroksikarboksilik asittir. Bu izomerler L-laktat ve D-laktattır. L-laktat, glikoliz sonucunda oluşan piruvatın indirgenmesi ile oluşurken, D-laktat süt ürünleri, şarap, elma, bira ve domates gibi besinlerin tüketilip sindirildikten sonra bağırsakta bulunan bakteriler tarafından gerçekleştirilen fermantasyon sonucunda oluşur (Adeva-Andany ve ark. 2014).

Piruvat, LDH tarafından laktik asite çevrilir. LDH alt üniteleri iki ana yapısal formda bulunur. Bunlar LDH- A (M) ve LDH- B (H)'dir. LDH- A anerobik koşullarda piruvatı laktata çevirir. LDH- B ise kalp kası gibi aerobik dokularda bol bulunur ve laktatın piruvata çevrilmesini kinetik olarak sağlar (Eventoff ve ark 1977, Shim ve ark. 1997).

Laktatın hücre zarından taşınması proton ya da sodyum eşlenikli monokarboksilat taşıyıcılar tarafından sağlanır. Şu ana kadar tanımlanmış dört adet proton eşlenikli monokarboksilat taşıyıcı (MCT) vardır (Adeva-Andany ve ark. 2014). Bunlar MCT1, MCT2, MCT3 ve MCT4'tür. MCT1 ve MCT2 L-laktat için stereo seçkinlik gösterirler ve MCT2'nin piruvat taşıma afinitesi yüksektir (Lin ve ark. 1998). MCT4 insan hücrelerinde salınan laktatın taşınmasında ana taşıyıcı olarak düşünülmektedir. MCT3 ise insan retina pigment epitelinde bulunmaktadır (Feron 2009, Gerlinger ve ark. 2012, Ritzhaupt ve ark. 1998). Hipoksi durumlarında in vitro ortamdaki hücrelerde MCT4 proteinin ifadesinin arttığı, MCT1'in ise değişmediği gösterilmiştir. Çünkü MCT4 geni iki adet hipoksi-cevap elementi içeren promotör bölgeye sahiptir (Feron 2009).

Diğer bir laktat taşıyıcısı ise sodyum-eşlenikli monokarboksilat (SCMT) taşıyıcılarıdır ve bugüne kadar SCMT1 (SLC5A8) ve SCMT2 (SLC5A12) olmak üzere iki adet taşıyıcı tanımlanmıştır. SCMT2'nin substrat afinitesi SCMT1'e göre daha düşüktür (Kerr ve ark. 2009).

2.1.4. TCA döngüsü

Piruvatın laktik asite çevrilmeyip enerji üretmek amacıyla izlediği diğer yol ise TCA döngüsüdür. Bu döngü primidin ve yağ asidi sentezi için gerekli metabolitleri sağlamakla beraber, mitokondriyal membran potansiyelini ve demir sülfür bileşiklerinin biyogenezini de sağlamaktadır. TCA döngüsündeki ara metabolitler, ilk olarak 1980 yılında Krebs ve Johnson tarafından ortaya konulmuş olduğu için bu metabolik olay Krebs döngüsü olarak da adlandırılmaktadır (Krebs ve Johnson 2014, Martínez-Reyes ve ark. 2016).

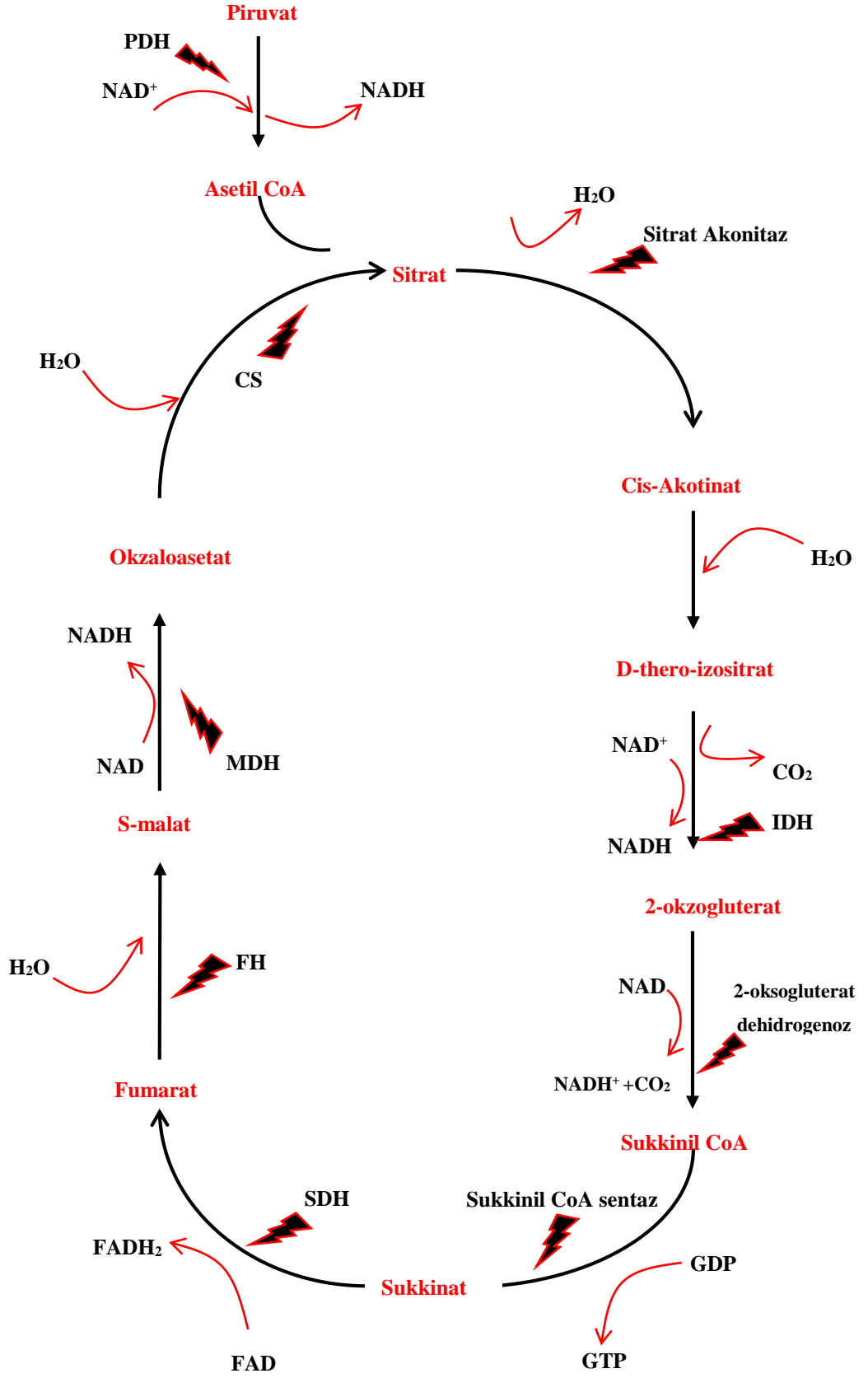
Glikoliz sonucu oluşan piruvat, ilk olarak mitokondriyal piruvat taşıyıcılar ile mitokondriye yönlendirilir ve burada piruvat dehidrogenaz (PDH) ile geri dönüşümsüz olarak Asetil koenzimA (CoA)'ya dönüştürülerek TCA döngüsüne katılır (Patel ve Korotchkina 2006). Bu döngü ise okzaloasetat ve Asetil CoA'nın sitrat sentaz (CS) tarafından, sitrati oluşturmak amacı ile birleştirilmesi ile başlar. Bu reaksiyon in vivo ortamda geri dönüşümsüzdür (Stobbe ve ark. 2012). Daha sonra sitrat, sitrat akonitaz ile D-thero-izositrata çevrilir. Bu reaksiyonda ara metabolit olarak sis-akonitat oluşur (Krebs ve Holzach 1952).

İzositarat, izositrat dehidrojenaz (IDH) ile 2-okzogluterata'a dönüştürülür. Bu reaksiyon sırasında 1 molekül CO₂ oluşur ve NAD⁺ NADH'a indirgenir (Martínez-Reyes ve Chandel 2020). 2-okzogluterat dehidrojenaz enzimi, oksidatif dekarboksilasyonu, CoA ester bağının oluşmasını ve lipoamid kofaktör reoksidasyonunu içeren karmaşık bir tepkime gerçekleştirerek sukkinil CoA'yı oluşturur (Gibson ve ark. 2005).

Daha sonra sukkinil CoA sentaz, enerji açısından zengin olan CoA ester bağını kırarak sukkinatı oluşturur. Bu tepkime sonucunda açığa çıkan enerji ile Guanizin difosfat (GDP), Guanizin trifosfat (GTP)'a dönüştürülür (Johnson ve ark. 1998).

Sonraki aşamada sukkinat dehidrojenaz (SDH), sukkinatı fumarata okstiler. Bu reaksiyon sırasında elektronlar FAD⁺ (Flavin adenin dinükleotid)'e transfer olarak FADH oluşturulur (Mewies ve ark. 1998).

Fumarat, fumarat hidrolaz (FH) ile (S)- malat'a dönüştürülür. Bu çift yönlü bir tepkimedir. Son olarak ise malat dehidrojenaz (MDH), malat'ı oksaloasetata çevirir ve döngü tekrar başlar (Stobbe ve ark. 2012) (Şekil 2.2.)



Şekil 2.2. TCA döngüsü. Bu döngü glikozun glikolizis ile piruvata indirgenmesinden sonra oksidatif fosforilizasyonun gerçekleşmesi için gereken ikinci aşamadır. Asetil CoA,

oksalasetat ile birleşerek sitrati oluşturur ve bir dizi tepkime sonrası tekrar oksaloasetata çevrilir bu yüzden bu yolak, döngü olarak adlandırılmaktadır.

2.1.5. Pentoz fosfat yolağı (PFY)

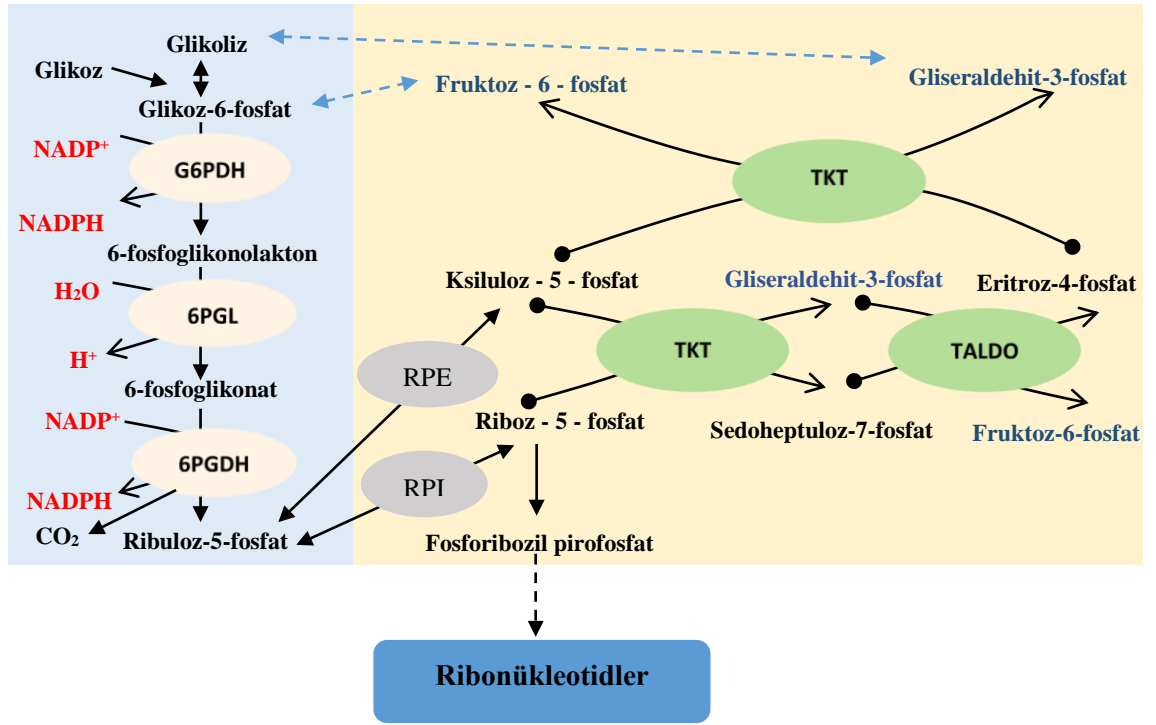
Çoğu dokuda glikoz oksidasyonun %80-90'ı glikoliz ile gerçekleşmektedir. Geri kalan %10-20'si ise PFY ile sağlanmakta ve ATP üretimi olmamaktadır. PFY'nın iki ana görevi vardır. Bunlar, hücreyi oksidatif hasara karşı korumak ve nükleik asit sentezi için gerekli riboz-5-fosfatı üretmektir. Heksoz monofosfat yan yolağı olarak da bilinen bu yol, glikolizi ilk basamakta terk ederek iki dala ayrılır (Riganti ve ark. 2012, Wamelink ve ark. 2008).

İlk dal, oksidatif kol olarak adlandırılmaktadır ve geri dönüşümsüz üç reaksiyon içermektedir. Hekzokinaz'ın ürünü G6P, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) ile 6-fosfo-glukono- δ -laktona oksitlenir. Bu tepkime sırasında nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP⁺) indirgenerek NADPH oluşur. G6PDH, hız belirleyici olarak görev yapmaktadır. İnaktif formu monomer, aktif formu ise dimerdir. NADP⁺/NADPH oranı bu enzimin ana modülatörüdür (P. Cohen ve Rosemeyer 1969). Daha sonra 6-fosfo-glukono- δ -lakton hızlı bir şekilde 6-fosfoglukonolaktonaz (6PGL) tarafından hidrolizlenerek 6-fosfo-glukonat oluşturulur (Wamelink ve ark. 2008). Son olarak 6-fosfoglukonat dehidrogenaz (6PGDH) ile ribuloz-5-fosfat oluşur. Bu tepkime sırasında bir molekül NADP⁺ daha indirgenir ve bir molekül CO₂ oluşur (Toews ve ark. 1976).

Diğer dal ise non-oksidatif koldur. Bu yolda oksidatif kolda üretilen ribuloz-5-fosfat, ribuloz-5-fosfat isomeraz (RPI) ile riboz-5-fosfata dönüştürülebilir ya da ribuloz-5-fosfat epimeraz (RPE) ile ksiluloz-5-fosfata çevrilir (Spencer ve Hopkinson 1980). Ksiluloz-5-fosfat, PFKFB'ı defosforilize eden protein fosfataz 2A'yı aktive ederek hücre içi F2,6BP seviyelerini ayarlamaktadır. Riboz-5-fosfat ise nükleotidler ve nükleik asitlerin yapısına katılmaktadır (Patra ve Hay 2014). Fakat NADPH gereksinimi nükleotid gereksiniminden fazla ise bu durumda transketolaz (TKT), gliseraldehit-3-fosfat ve sedoheptulaz-7-fosfatı oluşturur (Lindqvist ve ark. 1992). Bu iki ürün transaldolaz (TALDO) aracılığı ile F6P ve eritroz-4-fosfata çevrilir (Heinrich ve ark. 1976). TKT'in yönettiği diğer bir tepkimede ise eritroz-4-fosfat, ikinci bir ksiluloz-5-fosfat ile F6P ve Gliseraldehit-3-fosfatı oluşturur. F6P, NADPH üretmek üzere tekrar G6P'a çevrilirken gliseraldehit-3-fosfat glikolize katılabilir (Patra ve Hay 2014) (Şekil 2.3.)

Oksidatif kol

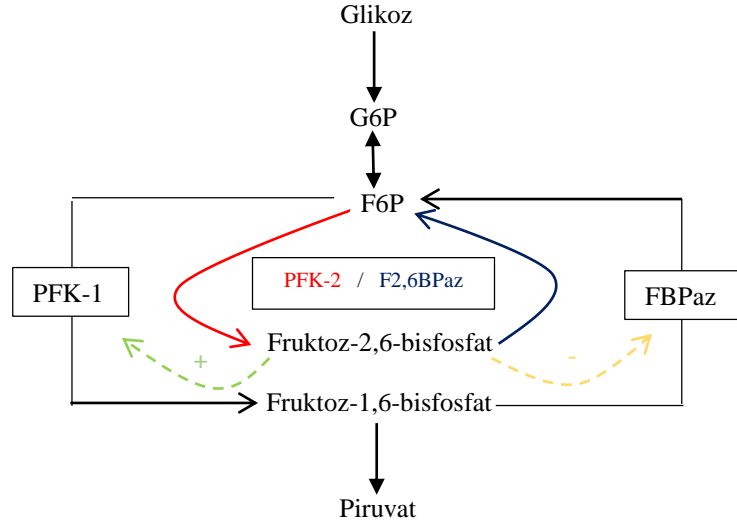
Non-oksidatif kol



Şekil 2.3. PFY oksidatif ve non-oksidatif kol olmak üzere iki ayrı reaksiyon zinciri içermektedir. Oksidatif koldaki tepkimeler geri dönüşümsüzdür ve bu tepkimelere sonucu oluşan metabolit nükleotid yapısına katılır. Non-oksidatif kol ise NADH ihtiyacını karşılamak için tercih edilen yoldur ve bu koldaki tepkimeler geri dönüşümlüdür (Patra ve ark. 2014).

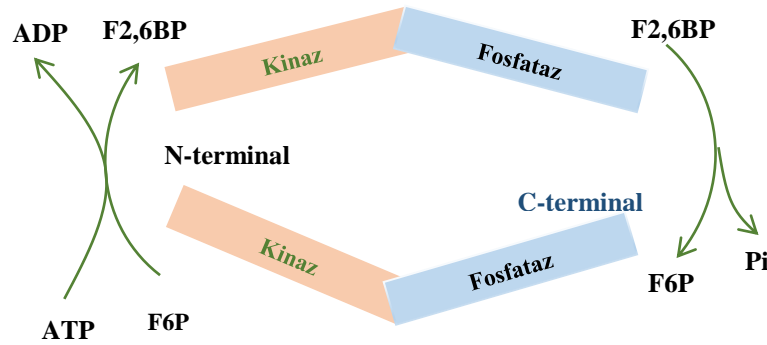
2.2. PKFKB Enzim Ailesi

F2,6BP ilk olarak, karaciğerde glukagonun glukoneojenez üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmalar sırasında keşfedilmiştir. Bu metabolitin karaciğerde fruktozbisfosfataz-1' i inhibe ederek glukoneojenezi düzenlediği fark edilmiştir. Daha sonra F2,6BP'ın PFK1'i aktive ederek glikolizi uyardığı ortaya konmuştur. F2,6BP seviyeleri ise homodimerik bifonksiyonel bir enzim olan PKFKB enzim ailesi tarafından düzenlenmektedir (Minchenko ve ark. 2003, Shi ve ark. 2017) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. F2,6BP glikolizisin anahtar enzimi olan PFK-1’i pozitif olarak etkilemekte ve glikolizisi uyarmaktadır. PFKFB enzim ailesi ise bu metabolitin hücre içi düzeylerini dengeleyerek glikolizisi kontrol altında tutan önemli bir enzim ailesidir (Ros ve Schulze 2013).

Bu enzim ailesi üyeleri, aynı polipeptid zinciri üzerindeki farklı uçlarda hem kinaz hem de fosfataz aktivitesine sahiptirler. Zincirin amino (N) terminal ucu kinaz aktivitesine sahip iken, karboksi (C) terminal ucu fosfataz aktivitesi göstermektedir (Pilkis ve ark. 1995, Rider ve ark. 2004). Kinaz aktivitesi gösteren kısım yani fosforuktokinaz-2 (PFK-2), ATP’taki bir fosfatı kullanarak F6P’tan F2,6BP sentezlerken, fosfataz aktivitesi gösteren kısım yani fruktoz-2,6-bisfosfataz (F2,6BPaz), F2,6BP’ı F6P ve inorganik fosfat (Pi)’a parçalar (Okar ve ark. 2001) (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. PFKFB enzim ailesi üyeleri bifonksiyonel enzimlerdir. N-terminal ucu kinaz aktivitesi göstermekte ve ATP kullanarak F6P’ı F2,6BP’a katalizlemektedir. C- terminal ucu ise fosfataz aktivitesi göstermekte ve F2,6BP’ı F6P’a parçalamaktadır (Shi ve ark. 2017).

Enzimin kinaz aktivitesi gösteren kısmı Pi fosfat ihtiyacını ATP'den sağlamak istese de GTP'yi de fosfat kaynağı olarak kullanabilmektedir. Tercih ettiği substrat ise D-F6P'tır. Fakat L-sorboz-6-fosfat da substrat olarak görev yapabilir. Enzimin çalışması için gerekli optimum pH 8-9 arasındadır. Kinaz aktivitesi ATP tarafından inhibe edilmemekle birlikte ADP ve F2,6BP inhibitör olarak görev yapmaktadır (Hers and Van Schaftingen, 1982, Tauler ve ark. 1990, Van Schaftingen ve ark. 1982). Pi ve arsenat, enzimin F6P'a olan afinitesini artırır. Ayrıca sitrat, fosfoenolpiruvat ve gliseraldehit-3-fosfat da enzimin inhibitörlerindedir (Hers ve Van Schaftingen, 1982, Pilkis ve ark. 1995). Memeli PFK-2'nin katalitik aktivitesi için sistein rezidülerinin önemli olduğu ortaya konmuştur. Arjinin rezidülerinin ise F6P'ı bağlamada görev aldığı düşünülmektedir (S. J. Pilkis ve ark. 1987).

F2,6BPaz, fosfatı özellikle C-6 pozisyonundan hidrolize etmektedir. F1,6P ya da glikoz-1,6-fosfatla tepkimeye girmemektedir. Reaksiyon için optimal pH 5,5-6,5 arasındadır. Enzim hem F6P hem de F2,6BP tarafından inhibe olmaktadır. Yapısal olarak PGM ile benzerlik gösterir. Katalitik bölgesinde Arg-His-Gly rezidüleri yer almaktadır. Substrat bağlayan kısmı ise 8 adet glutamik, 2 adet asparjik ve 4 adet ana aminoasit rezidüsü içerir. F2,6BPaz her ne kadar nükleotid bağlamasa da bunları bağlamak için de bir bölge içermektedir (Simon J. Pilkis ve ark. 1995).

PFKFB enzim ailesinin ana olarak 4 adet farklı izomeri bulunmaktadır. Bu enzim ailesindeki üyeler her ne kadar doku spesifik olarak ifade edilseler de farklı dokularda farklı izomerlerin de bulunduğu ortaya konulmuştur. Bu izomerler arasındaki temel fark, kinaz/fosfataz katalitik aktivitelerinden kaynaklanmaktadır (Mykhalchenko ve ark. 2008).

2.2.1. PFKFB1 izoformu

PFKFB1, ilk olarak karaciğerden izole edilmiştir ve bu yüzden karaciğer izoformu olarak adlandırılmıştır. PFKFB1 geni L, M, F adlı üç farklı promotor bölgesinden L ve M adlı iki farklı izoform sentezlemektedir. L izoformu karaciğerde, M izoformu ise fibroblastlar, beyaz yağ doku, fetüs ve iskelet kasında bulunmaktadır (Minchenko ve ark. 2003, Rider ve ark. 2004). Bu genin transkripsiyonel aktivitesi EGF (Epidermal growth factor), HNF-6 (Hepatocyte nuclear factor 6) ve v-src ya da E1A (Adenovirüs early region 1A) gibi bazı onkogenler tarafından artırılmaktadır. Ayrıca glioblastoma hücrelerinde PFKFB1

geninin düzenlenmesinin, ERN1 (Endoplasmic reticulum-nuclei) enzim sinyalinin işleyişine bağlı olduğu gösterilmiştir (Dupriez ve ark. 1993, Lee ve ark. 2003, Lypova ve ark. 2003). cAMP (siklin adenzin mono fosfat) enzimi Ser32 ucundan fosforillemektedir (Simon J. Pilgis ve ark. 1995).

2.2.2. PFKFB2 izoformu

PFKFB2 izoformu ilk olarak kalpten izole edilmiştir ve bu yüzden kalp izoformu olarak adlandırılmıştır. PFKFB2 geni iki farklı izoform ifade etmektedir. Ekzon 15'in alternatif kesilimi ve farklı promotor kullanımı bu iki farklı izoforma neden olmaktadır. Kesimdeki değişiklik COOH terminal bölgesinde uzunluk farklılığına neden olmakta ve izoformlardan biri uzun diğeri ise kısa olmaktadır. Bu genin aktivitesi de PFKFB1'de olduğu gibi glioblastoma hücrelerinde ERN1 enzim sinyalinin işleyişi ile ilişkilidir. PFKFB2 kalpte, böbrekte ve Langerhans adacıklarında ifade olmaktadır (Lypova ve ark. 2003, Okar ve ark. 2001). Kalpte insülin, GLUT proteinlerinin seviyelerini arttırarak ve enzimin kinaz bölgesini aktifleştirerek glikolizi arttırmaktadır. AMPK (AMP activated protein kinaz), PKA (Protein kinaz A), Akt (Protein kinaz B-PKB) ve PKC (Protein kinaz C) ise enzimi Ser466 ve Ther475 kısmından fosforlamaktadır (Rider ve ark. 2004).

2.2.3. PFKFB3 izoformu

Bu araştırmanın ana konusunu oluşturan ve K-ras mutasyonun, üzerindeki etkisini araştırdığımız bu izoform ilk olarak plasenta ve beyinden izole edilmiştir. PFKFB3 geni, onkogen benzeri AUUUA instabilite elementinin çoklu kopyasını 3' ucunda bulundurur. Bu gen en az 19 ekzon ve farklı yapısal izoformların ifade olmasına neden olan COOH-terminalinin alternatif kesim varyantlarını içerir (Kessler ve Eschrich 2001). Şimdiye kadar iki ana izoform tespit edilmiştir fakat en az 6 farklı varyantı olduğu düşünülmektedir (Mykhalchenko ve ark. 2008). İzoformlardan biri devamlı diğeri ise indüklenebilir olarak adlandırılmaktadır. İndüklenebilir form daha çok tümör hücre hatlarında ve proliferen olan hücrelerde daha fazla bulunmaktadır (Atsumi ve ark. 2002, Navarro-Sabaté ve ark. 2001). PFKFB3, izoformlar arasında en yüksek kinaz/fosfataz oranına sahip formdur (Shi ve ark. 2017). İnsülin, interlökin 6, lipopolisakkarit, adenzin ve hidrojen peroksit ya da ultraviyole uyarılar gibi farklı stres kaynakları PFKFB3'ün gen ifadesini arttırmaktadır (Ando ve ark. 2010, Novellademunt ve ark. 2013, Ruiz-García ve ark. 2011). Progesterin ve estradiol, PFKFB3 geninin promotor bölgesine

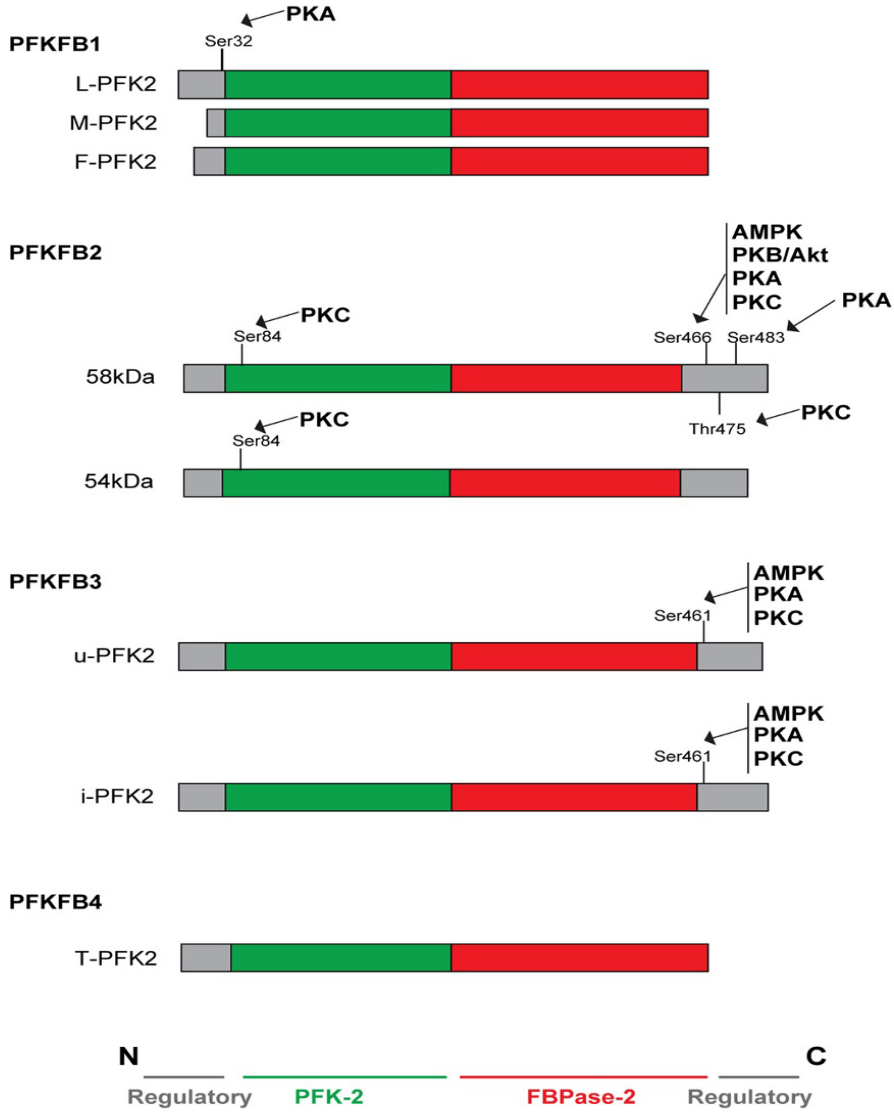
yerleşmiş progesteron ve östrojen reseptörü ile etkileşerek PFKFB3'ün ifadesini arttırmaları (Imbert-Fernandez ve ark. 2014, Novellasdemunt ve ark. 2012).

AMPK, PKC, PKA ve MK2 (MAPK activated protein 2), bu enzimi Ser461 bölgesinden fosforlamaktadır. Ayrıca PFKFB3'ün s-glutatyolinazasyonu ve demetilasyonu glikolizi inhibe ederek PFY'nı aktifleştirir. PFKFB3, siklin bağımlı kinazları (cdks) aktive ederek Cip/Kip (CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein) p27'nin fosforlanmasını sağlar. p27, G1/S geçişini baskılayan ve apoptozu aktive eden bir protein olduğu için PFKFB3'ün hücre döngüsü ilerlemesinde önemli bir rolü bulunmaktadır (Shi ve ark.2017). Ayrıca PFKFB3'ün AMPK-abağımlı olarak fosforlanması hücre döngüsü sırasında artmaktadır. Dolayısıyla mitoz sırasında artan glikolizle ilişkilidir (Doménech ve ark. 2015).Endotel hücrelerinde bu enzimi baskılamak, uç hücrelerin göçünü azaltarak damarlanmayı baskılamaktadır (De Bock ve ark.2013).

2.2.4. PFKFB4 izoformu

İlk olarak testisten izole edilen ve önceleri testis izoformu olarak adlandırılan bu izoform, PFKFB4 geni tarafından kodlanmaktadır. Bu gen, tek izoform olarak ifade edilmektedir. Yapılan bir araştırmada nöral krest hücrelerinin göçü için PFKFB4 ifadesinin gerekli olduğu bulunmuştur (Figueiredo ve ark. 2017) (Şekil 2.6.).

Tüm PFKFB izoformlarının hipoksi durumunda HIF-1 α (Hypoxia inducible factor 1 α) bağımlı bir mekanizma ile indüklendiği ve özellikle malignite durumlarında tanımlandıkları dokular dışında da ifade edildikleri gözlenmiştir (Minchenko ve ark. 2003, 2004).



Şekil 2.6. PFKFB enzim ailesi üyeleri (Rider ve ark. 2004.)

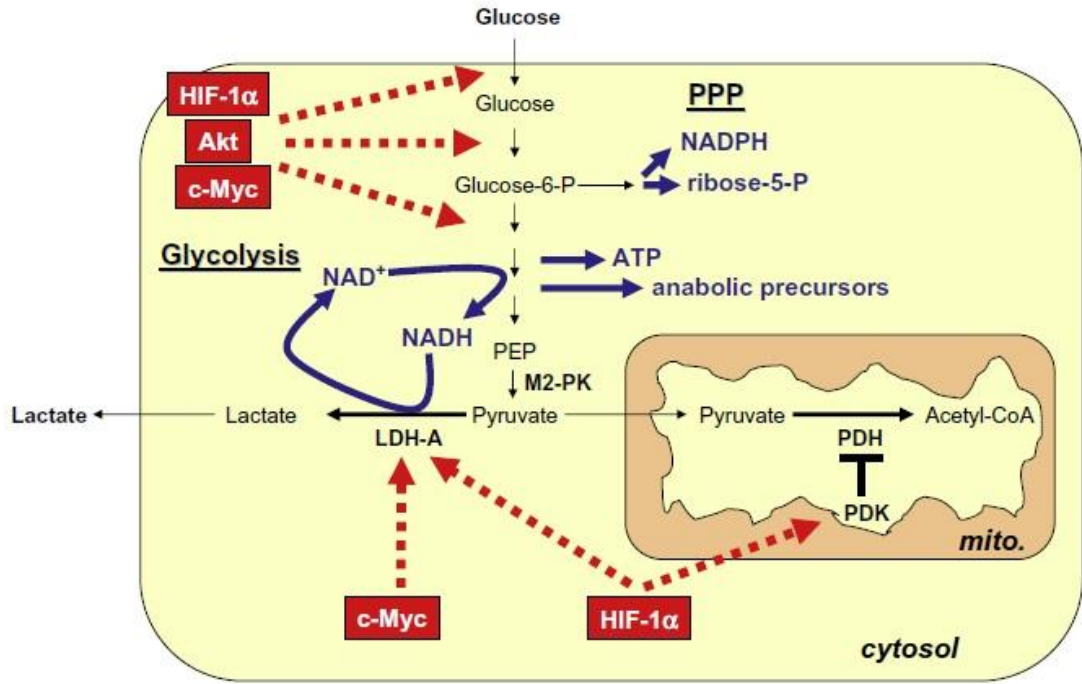
2.3. Glikolitik Metabolizma ve Kanser İlişkisi

Kanserlerin ortak özelliklerinden birisi değişmiş glikoz metabolizmalarıdır. Çoğu memeli hücresinde, oksijen varlığında glikoliz sonucu oluşan piruvat mitokondriye yönlendirilerek oksidatif fosforilasyona katılmaktadır ve oksijenin yetersiz olduğu durumlarda ise piruvat laktik asite indirgenmektedir. Oksijenin bu kısıtlayıcı etkisi Pastör etkisi olarak bilinmektedir (Gatenby ve Gillies 2004). Warburg etkisi olarak bilinen olayda ise, tümör hücreleri oksijen varlığına rağmen artmış glikoliz ile baskın olarak laktik asit sentezlemektedirler (Feron, 2009). Glikolizi gerçekleştiren enzimler, hücre içi

hemostazı sağlamak amacıyla bazen kendi substratları bazen de farklı sinyal yolları tarafından inhibe edilmekte ve glikoliz kontrol altına alınmaktadır. Kanser hücrelerinde ise bu kontrol bazı genlerin daha fazla ifade olması, bazılarının ise inhibe olmasıyla ortadan kalkmaktadır. Bu bölümde glikolitik metabolizma da bu değişikliklere neden olan etkenlerden bahsedilecektir.

Fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K) sinyal yolu glikoz metabolizmasının ana düzenleyicilerinden biridir. Protein kinaz Akt aracılı PI3K sinyali, GLUT1 ifadesini arttırarak glikoz alınımlı arttırmaktadır (Barthel ve ark. 1999). Normal hücrelerde PI3K, büyüme sinyallerine cevap olarak glikoz alınımlı arttırmaktadır. Fakat tümör hücrelerinde PI3K üzerinde görülen mutasyonlar sonucu bu yolak, büyüme faktörleri olmadan da aktif olabilmektedir (Frauwirth ve ark. 2002, Vander Heiden ve ark. 2009). Yapılan bir çalışmada Her2/neu⁺ duktal adenokarsinom hücrelerinin, PI3K aktivasyonunu koruyarak EGF (Epidermal growth factor) azalmasını önlediği ve glikolizi arttırarak hayatta kalma avantajı sağladığını ortaya konmuştur (Zachary ve ark. 2010).

Tümör büyüdükçe ortamdaki oksijen miktarı azalmakta ve tümör hipoksi durumuyla karşı karşıya kalmaktadır. Bu durumda HIF1- α , glikoz taşıyıcılarının, LDH-A'nın ve neredeyse tüm glikolitik enzimlerin transkripsiyonunu arttırmaktadır (Hirschhaeuser ve ark. 2011). HIF 1- α , PI3K/Akt/mTOR (mammalian target of rapamycin) ve Raf (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma)/MAPK (mitogen-activated protein kinase) sinyal yollarının kontrolü altındadır. Ayrıca HIF1- α , tümör hücrelerinde oksijen varlığında dahi aktive olmaktadır. Normal hücrelerde oksijen varlığında HIF1- α proteini yıkılmaktadır. Bu işlem von Hippel-Lindau (VHL) proteinin HIF 1- α 'ya bağlanması ve ubiquitin tarafından tanımlanan bu kompleksin proteazlar ile yıkılmasıyla olmaktadır. Fakat tümör hücrelerinde VHL inaktivasyonu nedeniyle HIF 1- α stabil halde bulunmaktadır (Hasawi ve ark. 2014). HIF1- α , piruvat dehidrogenaz kinazın aktivitesini de arttırmakta ve piruvatın asetil-CoA'ya çevrilmesine engel olmaktadır. Akt, ras, myc ve p53, HIF1- α 'nın direkt aktivatörlerdir (Feron, 2009). Bunun yanı sıra, bu onkojenik transkripsiyon faktörleri LDH-A ve glikolitik enzimlerin ifadelerini de uyarmaktadır (Semenza, 2008) (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Prolifere olan bir kanser hücresinde glikolitik programlanma. HIF-1, Akt ve c-Myc aracılığı ile glikolitik enzimlerde, LDH-A'da ve PDK'da aktivasyon sonucunda glikoliziste ve laktat oluşumunda artış gözlenmektedir (Feron 2009).

p53, hücrelerde apoptozu başlatan protein olarak bilinmektedir. Fakat bu protein, TIGAR (TP53 inducible glycolysis and apoptosis regulator)'ün transkripsiyonel aktivasyonu aracılığıyla glikolizi inhibe ederek oksidatif fosforilasyonu uyarmaktadır. TP53 üzerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda, glikoliz üzerindeki inhibisyon ortadan kalkmakta ve artmış glikoliz izlenmektedir (Gatenby ve Gillies 2004). Mutant p53, ayrıca heksokinaz II'yi de transkripsiyonel olarak aktive etmektedir. Heksokinaz II'nin akciğer ve meme kanserinde onkojenik transformasyon için gerekli olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Patra ve ark. 2014). Bunun yanı sıra p53, GLUT1 ve GLUT4'ün promotor bölgelerini direk bağlayarak ifadelerini engeller. Dolayısıyla kanser hücrelerinde p53 kaybı glikoz alımını arttırmaktadır (Patra ve Hay 2014).

PI3K'ın negatif regülatörü olan PTEN (Phosphatase and tensin homolog)'in de bazı kanser hücrelerinde inaktif olduğu gösterilmiştir. PTEN kaybı, Akt aktivasyonuna ve artmış glikolize neden olmaktadır (Sun ve ark. 1999).

İnsanda serviks kanserine neden olan insan papillom virüs tip 16'nın onkoproteini olan E17, PK-M2'yi direkt bağlamaktadır. Bu bağlanma sonucunda enzimin tetramerik forma

dönüşmesi için daha yüksek seviyede F1,6BP gerekmede, dolayısıyla glikoliz artmaktadır (Mazurek ve ark. 2005).

Artmış glikoliz sonucu oluşan laktik asit de kanser hücreleri için önemlidir. Oksidatif tümör hücreleri glukoz yerine laktatı kullanmayı tercih etmektedirler. Lakat ise, LDH-B ile piruvata oksitlenmekte ve oksijenli solunumda kullanılmaktadır. Böylelikle oksidatif tümör hücreleri glikozu, damar ağından uzak ve oksijen bakımından fakir tümör hücrelerine bırakırlar (Feron, 2009). Ayrıca HIF-1 α , MCT1 seviyelerinin arttırarak laktatın hücre içine alınmasını sağlamaktadır (Hui ve ark. 2018).

Qian ve ark. (2017) yaptığı bir çalışmada, gastrik kanser hücrelerinde enolaz 1 seviyelerinin fazlalaşarak glikolizi arttırdığı ve sisplatin bazlı kemoterapiye karşı direncin görüldüğünü ortaya koymuştur.

PFY da glikoliz ile birlikte tümör hücre büyümesine ve canlılığının devamına büyük katkı sağlamaktadır. Hızlı çoğalan hücreler, artan biyosentetik ihtiyaçlarını karşılamak ve antioksidant savunmayı sağlamak amacıyla glikoz akışını PFY'na yönlendirebilmektedirler. Yapılan bir araştırmada pankreatik duktal adenokarsimonda K-ras^{G12D} mutasyonunun glikolizi stimüle ederek glikolitik ara metabolitleri non-oksidatif PFY'na yönlendirdiği gösterilmiştir (Jiang ve ark. 2014).

2.3.1. PFKFB enzim ailesi ve kanser ilişkisi

Yapılan araştırmalar sonucunda F2,6BP seviyelerinin kanser hücrelerinde değişmiş olduğu izlenmiştir. Bu değişiklik, kanser hücrelerinde PFKFB enzimlerinin gen ifadelerindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Normal hücrelerde PFK1'in aktivasyonu PFKFB enzimleri tarafından sentezlenen F2,6BP ile düzenlenirken kanser hücrelerinde bu metabolitin arttığı ve PFK1'in sürekli aktif olduğu görülmüştür (Okar et al., 2001).

PFKFB enzimlerinin fosfataz aktivitesinin artması ile F6P miktarının artması ve glikolitik ara metabolit olan G6P'in PFY'na yönlendirilerek biyosentetik süreçte ve redoks kontrolünde kullanılabileceği öne sürülen görüşler arasındadır (Ros ve Schulze 2013).

PFKFB enzimlerinin kanser hücreleri üzerine etkisini yeni yeni araştırmacıların ilgisini çekmeye başlamış ve bu enzimler ile ilgili birçok çalışma yapılmaya başlanmıştır. PFKFB1 izoformu ile yapılan çok fazla araştırma bulunmamaktadır. Öte yandan PFKFB3

izoformu en geniş araştırma alanına ait izoformdur. PFKFB2 ve PFKFB4 ile ilgili araştırmalar da literatüre geçmeye başlamıştır.

Yapılan bir çalışmada, PFKFB1 dışında tüm izoformların akciğer kanserinde fazlaca ifade edildiği ortaya konmuştur. Özellikle PFKFB2 ve PFKFB4'ün normal akciğer hücrelerine göre çok daha fazla olduğu gösterilmiştir (Minchenko ve ark. 2005). Ayrıca özellikle PFKFB3'ün tümör büyümesi için gerekli olabileceği bunun yanı sıra PFKFB2 ve PFKFB4'ün de tümörjenezde önemli olabileceği düşünölmektedir (Houddane ve ark. 2017).

PFKFB2 gen ifadesinin, prostat kanser hücrelerinde transkripsiyonel değişiklikler sonucu arttığı gösterilmiştir. Dahası, androjen muamelesi sonrası LNCaP hücre hattında PFKFB2'nin indöklendiği görölmüştür (Massie ve ark. 2011, Moon ve ark. 2011). Ayrıca ortalama yaşam süresi kısalımış over kanserli hastalarda, PFKFB2 seviyelerinde artma olduğu bulunmuştur (L. Zhao ve ark. 2017). Diğer taraftan; tiroit kanseri hastalarında PFKFB2 promotörünün metilasyon seviyesi azalmaktadır (Barros-Filho ve ark. 2019). Bunların yanı sıra MACC1 (Metastasis-associated in colon cancer protein 1)'in tümör metabolizmasını PFKFB2 ekspresyonu ve fosforlanması üzerinden denetleyebileceği de ortaya konmuştur (Dong ve ark. 2014). Osteosarkom hücrelerinde, SLIT2 (Slit Guidance Ligand 2)/ROBO1(Roundabout Guidance Receptor 1) sinyalinin SRC'yi fosforlayarak ERK/c-MYC/PFKFB2 yolağını aktive ettiği ve glikolizi arttırdığı araştırmacılar tarafından sunulan bilgiler arasındadır (S. J. Zhao ve ark. 2018). Houles ve ark. (2018) yaptığı bir araştırmada da BRAF mutasyonlu melanom hücrelerinde, RSK (Ribosomal s6 kinase)'ın PFKFB2'yi devamlı fosforlayarak enzimin kinaz aktivitesini arttırdığı ve PFKFB2'nin hücre çoğalması için gerekli olduğu gösterilmiştir.

PFKFB3 glikolizdeki kilit enzimlerden biri olmanın yanı sıra, onkojenez ve kanser hücrelerinin canlılığının devamlılığında da önemli bir rol oynamaktadır. Örneğin meme kanseri hücrelerinde PFKFB3'ün ifadesi estradiol ve progesteron tarafından yükseltilmekte ve bu hücrelerin büyümesi, çoğalması ve metastazı artmaktadır (Imbert-Fernandez ve ark. 2014, Novellademunt ve ark. 2012). Ayrıca Her2'nun devamlı ifadesi de meme kanserinde PFKFB3'ü fazlalaştırarak glikolizi arttırmaktadır (Shi ve ark. 2017).

Atsumi ve ark. (2002) yaptıkları bir çalışmada kolon, prostat, akciğer, pankreas, over, böbrek ve tiroit kanserinde PFKFB3 ifadesinin arttığını ortaya koymuşlardır.

Chen ve ark. (2016) ise yaptığı farklı bir araştırmada tümör hücrelerinde, CLOCK (Circadian locomoter output cycles protein kaput) proteinin, PFKFB3 geninde promotör bölgedeki E-box kısmını bağlayarak PFKFB3 ifadesini arttırdığını göstermişlerdir. Akut myeloid lösemide de PFKFB3'ün ifadesinin, mTOR tarafından artırıldığı gösterilmiştir (Feng ve Wu 2017).

HeLa, meme ve kolon karsinom hücrelerinde siRNA (small interfering ribonükleic acid) ile PFKFB3 geninin susturulması sonucu, hücrelerin büyüme, bölünme ve göç kapasitelerinde belirgin bir azalma izlenmiştir (Calvo ve ark. 2006, Klarer ve ark. 2014, Peng ve ark. 2018).

Ayrıca PFKFB3, hepatoselüler karsinom hücrelerinde de fazlaca ifade olmakta ve tümör büyüklüğüyle ilişkilendirilmektedir. PFKFB3'ün fazla sentezlendiği hücrelerde tümör çapının arttığı gözlenmiştir ve PFKFB3'ü inhibe etmek tümör büyümesini engellemektedir (Shi ve ark. 2018).

Tümör hücrelerinde artmış metabolizma hızından dolayı, çevrelerinde çok miktarda rekatif oksijen elementleri (ROE) bulunmaktadır ve bu durumda hücreler ortam dengelerini ayarlamak için glikozu PFY'na yönlendirirler. Kanser hücrelerinde PFKFB3'ün metilasyonunda azalma glikozu PFY'na yönlendirmektedir (Yamamoto ve ark. 2014).

Reddy ve ark. (2012) yaptığı bir çalışmada ise JAK2 (Janus kinase 2)/STAT5 (Signal transducer and activator of transcription 5) yolağının PFKFB3 gen ifadesini arttırdığı ve tümör hücre büyümesini desteklediği ortaya konmuştur. Ayrıca osteosarkom hücrelerinde, miRNA-26b ile yapılan PFKFB3 inhibisyonu sonucunda tümör hücre göçünde ve invazyonunda azalma görülmüştür (Zheng ve ark. 2015).

DB-1 melanoma hücreleri, U87 glioblastoma hücreleri ve SK-MEL-5 melanoma hücreleri ile yapılan bir çalışmada ise düşük ortam pH'sının PFKFB3 fosforlanmasını arttırarak glikolizi arttırdığı ortaya konmuştur (Mendoza ve ark. 2012).

TGF β 1 (Trans Growth Factor β 1), epitelyal-mezenkimal dönüşümün (EMT) indükleyici proteinlerinden biridir ve EMT, tümör hücrelerinin metastaz yapması için gerekli bir aşamadır. Yapılan in vitro bir araştırmada ise tümör hücrelerinde TGF β 1'in PFKFB3'ü indükleyerek EMT'yi uyardığı bulunmuştur (Yalçın ve ark. 2017).

PFKFB3'ün bu kadar çok farklı kanser türünde aktive olduğu ve ifadesinin arttığı bulunmasıyla bu enzimi inhibe ederek kanser hücrelerinin büyümesini durdurmak ve spesifik bir ilaç geliştirmek bilim insanlarının ortak görüşü olmaya başlamıştır. PFKFB enzimlerini baskılamak amacıyla çeşitli metabolitler geliştirilmiştir. Bu amaçla geliştirilen metabolitlerden biri 3-(3-Pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one (3PO)'dur. Yapılan çalışmalar sonucunda 3PO muamelesi sonucu hücrelerde glikolizde baskılanma görülmüştür. Örneğin mesane kanseri hücrelerinde 3PO ile PFKFB3 baskılanması, hücre proliferasyonunda azalmaya sebep olmuştur (Lea ve ark. 2015). Ayrıca meme kanseri hücrelerinde de aynı şekilde azalma olduğu bildirilmiştir (Imbert-Fernandez ve ark. 2014). Ayrıca 3PO'yu kopolimer ile bloklayarak hidrofilik bir kapsül içine koyabilecek olmak bu bileşiği ilaç olarak çok uygun olmasını sağlamaktadır (Bartrons ve ark. 2018).

Daha sonra 3PO'nun farmokinetik özelliklerini geliştirmek adına bu bileşiğin 73 farklı çeşidi daha sentezlenmiştir. Bunlardan 1-(4-pyridinyl)-3-(2-quinolinyl)-2-propen-1-one (PFK15) ileri klinik araştırmalarda kullanılması için uygun bulunmuştur (Koptyra ve ark. 2006). Yapılan bir araştırmada PFK15 ile inhibe edilmiş baş-boyun skuamöz hücreli karsinom hücrelerinde glikolizde azalma gözlemlenmiştir (Li ve ark. 2017). Ayrıca mide kanseri hücrelerinin PFK15 ile muamele edilmesi sonucunda glikolizde azalma ve apoptozda indüklenme izlenmiştir (Zhu ve ark. 2016). Bunun dışında akciğer kanseri ve glioblastoma hücrelerinin de PFK15 ile muamelesi sonucu hücre proliferasyonlarında azalma izlenmiştir (Koptyra ve ark. 2006).

PFK15 ile yapılan çalışmalar üçüncü nesil ilaçların gelişmesine olanak sağlamıştır. Bu ilaçlardan biri (E)-1-(4-Pyridinyl)-3-[7-(trifluoromethyl)-2-quinolinyl]-2-propen-1-one (PFK-158)'dir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, PFK158 ile birlikte ER ve EGF reseptörlerinin inhibisyonunun kanser hücre hatlarında apoptozu arttırdığı gösterilmiştir (Bartrons ve ark. 2018). Ayrıca malign melanomlu farelere, PFK158 ile birlikte BRAF(V600E) inhibitörü vemurafenib verilmesinin tümörde regresyona neden olduğu bulunmuştur (Telang ve ark. 2015).

PFKFB4 izoformu, PFKFB3'ten sonra dikkat çeken diğer izoformlardan biridir. Yapılan bir araştırmada, küçük hücreli akciğer kanserlerinde PFKFB4'ün kemoterapiye karşı dirençte görev aldığı bulunmuştur (Wang ve ark. 2018). PFKFB4 akciğer kanserinde

ifadesi en yüksek olan izoformdur (Minchenko ve ark. 2005). Ayrıca kolon, meme ve prostat kanseri hücre hatlarıyla yapılan çalışmada PFKFB4 seviyelerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Chesney ve ark. 2014).

Prostat kanserlerinde PFKFB4 yokluğunun, tümör büyümesini azalttığı gösterilmiştir (Ros ve ark., 2012). Meme kanserlerinde PFKFB4'ün Src'yi fosforlayarak aktivasyonunu arttırdığı ve tümör büyümesine katkı sağladığı ortaya konulmuştur (Dasgupta ve ark. 2018). Strohecker ve ark (2015) yaptığı bir çalışmada da PFKFB4 yokluğunda otofajinin indüklendiği ve kanser hücrelerinin devamlılığı için PFKFB4'ün gerekliliği gösterilmiştir.

PFKFB4'ün tümör gelişimindeki önemli yeri anlaşılınca bu izoform içinde ilaç geliştirme çalışmaları başlamıştır. 5-(n-(8-metoksi-4-kinol)amino) pentil nitrat (5MPN) bu amaçla geliştirilen bileşiklerden biridir. 5MPN ile muamele edilen farelerde tümör büyümesinin baskılandığı gözlenmiştir (Chesney ve ark. 2015).

2.4. Ras Onkojenik Mutasyonu ve Pankreatik Duktal Adenokarsinom

Ras onkoproteinleri hücre proliferasyonunu, hücre yaşama devamlılığını, hücre göçü ve farklılaşmayı sağlayan sinyal yolunu düzenleyen GTPaz'lardır. GTP bağımlı ras proteinleri, hücre dışı uyarıları hücre aktivite düzenleyecek olan hücre içi sinyal kaskadına çevirirler (Takashima ve Faller 2013).

Üç farklı ras geninden dört farklı izoform ifade edilmektedir. İlk bulunan gen, Harvey sarkoma virüs onkogeninin insandaki homologu olan Hras genidir ve Hras izoformunu ifade eder. Daha sonra Kristen sarkoma virüs onkogeninin insandaki homologu bulunmuş ve Kras geni olarak adlanmıştır. Bu gen K-ras4A ve K-ras4B olmak üzere iki izoform kodlamaktadır. Son olarak da nöroblastoma dönüşümüne neden olan onkogen bulunmuş ve Nras olarak adlandırılmıştır (Shimizu ve ark. 1983, Appels ve ark 2005).

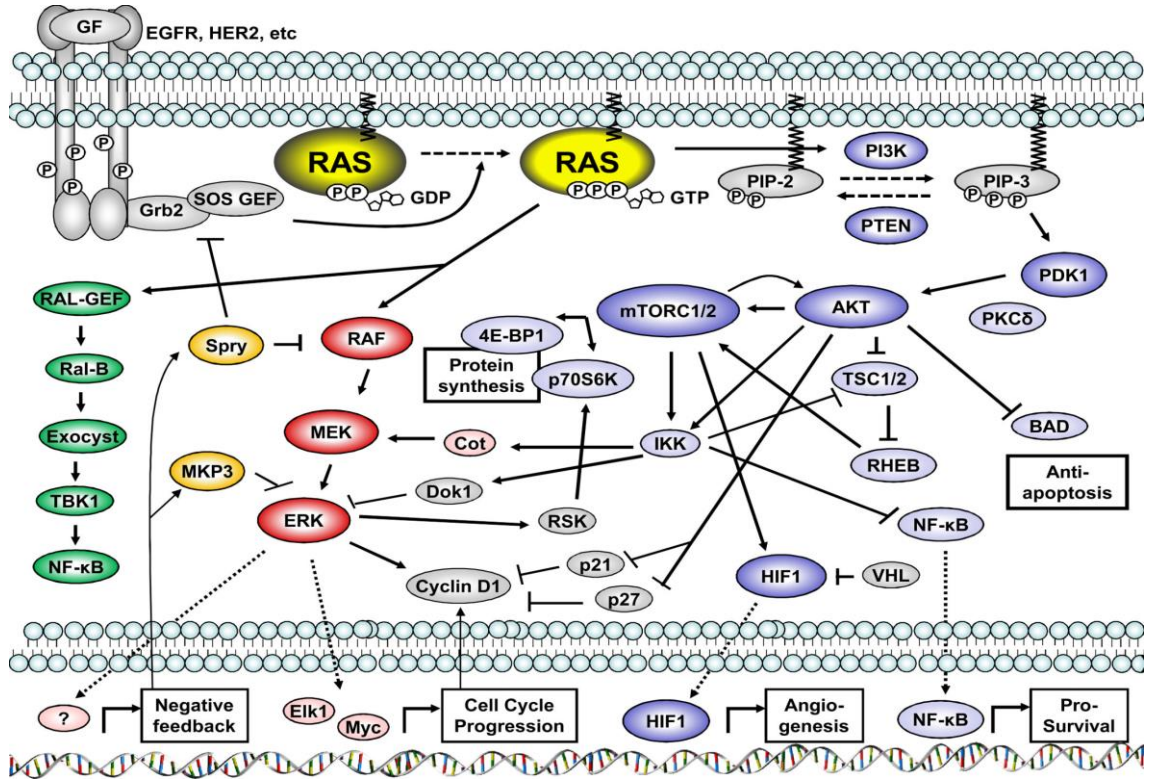
Ras proteinleri iki ana bölgeden oluşur: katalitik bölge olan G-bölgesi ve C-terminal hiper değişken (Hyper variable region-HVR) bölge. Katalatik bölge, üç izoformda da homologtur ve fosfat bağlayan katlantı ile iki parça nükleotid bağlayan anahtar bölgeyi içerir (Prior ve ark. 2012). HVR bölgesi ise translasyon sonrası değişikliklerin

gerçekleştiği ve plazma zarında yerleşim için gerekli olan bölgedir. HVR bölgesi üç izoformda yalnızca %15 oranında benzerlik gösterir (Gysin ve ark. 2011).

Ras proteinlerinin fonksiyonel olarak aktif olabilmeleri için translasyon sonrası modifikasyon geçirmeleri gerekmektedir (Appels ve ark 2005). Bazı durumlarda ras proteinleri galaktin 1 ve 3 gibi ras-escort proteinleri ile bağlı halde bulunurlar. Bu proteinler, ras proteinlerinin GTP-bağlı yani aktif hallerini kontrol altında tutarlar (Rotblat ve ark. 2008).

GTP bağlı ras proteini, GTPaz aktive edici proteinler (GTPase activating proteins-GAP)'in yönettiği GTP hidrolizi ile inaktif duruma geçerler. Dışarıdan tekrar uyarı geldiğinde Shc gibi toplayıcı adaptör proteinler guanin nükleotid değişim faktörlerini (guanin nükleotid exchange factor GEF) sitoplazmaya getirirler ve GEF'ler de GDP'yi proteinden çözerek GTP'nin bölgeye yerleşmesini sağlarlar. GTP bağlanması sonucu oluşan konformasyonel değişiklikler, ras proteinlerinin aşağı yolda bulunan proteinlere bağlanma afinitesini arttırmaları (Vigil ve ark. 2011).

Ras proteinlerinin aşağı yolağında şimdiye kadar 10 adet protein olduğu bulunmuştur. Bunlar Raf, GAP, RalGDS (Ral Guanine Nucleotide Dissociation Stimulator), RIN1 (Ras And Rab Interactor 1), TIAM (T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein), PI3K, PKC ξ (protein kinase C ξ type), PLC ϵ (Phospholipase C- ϵ) , Nore1 (RASSF5-ras association domain-containing family protein 5), AF6'dır. Raf ve PI3K en çok çalışılan yollar arasındadır (Rajalingam ve ark. 2007) (Şekil 2.8.).



Şekil 2.8. Ras proteinleri etkileştikleri diğer proteinler ile birçok sinyal yolağının düzenlenmesinde kritik rol oynarlar ve hücrel biyolojik süreçlerin düzenleyen kilit proteinlerden biri olarak kabul edilirler (Takashima ve Faller 2013).

İnsanlarda görülen kanserlerin yaklaşık %30'nda bu üç proteinden birinin aktive edici mutasyonuna rastlanmaktadır ve üç izoform arasında Kras mutasyonu en sık görülendir. Kras mutasyonu özellikle kolorektal, küçük hücreli dışı akciğer ve pankreatik duktal karsinomlarda baskın olarak görülmektedir. Bunun dışında mide, over, meme ve safra kesesi kanserlerinde de Kras mutasyonlarına rastlanmaktadır. Malign melanomda, sarkomlarda, akut myeloid lösemi ve akut lenfoblastik lösemide ise Nras mutasyonu görülmektedir. Bazı meme ve mesane kanserlerinde ise Hras mutasyonu izlenmektedir (Bos, 1988).

Ras proteinlerinde görülen mutasyonların hepsi katalitik bölgede gerçekleşmektedir. Aktive edici mutasyonlar, GTPaz etkisini ortadan kaldırarak ras proteinlerinin sürekli aktif olmasını sağlamaktadırlar. Bu mutasyonlar 12., 13. ve 61. kodonlarda olmaktadır (Takashima ve Faller 2013). Kras mutasyonlarının %80'i 12. kodonda görülür. Baskın patern ise 12. ve 13. kodondaki ikinci bazın guaninden (G) adenine (A) dönmesidir ve bu durum G12D ya da G13D ile sonuçlanır. G'nin timine (T) dönüştüğü mutasyonlarsa

G12V ile sonuçlanır. Akciğerde ise özel bir durum söz konusudur. İlk bazdaki G-T dönüşümü G12C ile sonuçlanmaktadır. Hras %50 12. kodon %40 61. kodonda mutasyona uğrarken, Nras da mutasyonların %60'ı 61. kodonda %35'i ise 12. kodonda olmaktadır (Prior ve ark. 2012).

Kras mutasyonu sonucunda glikoliz artmakta öte yandan TCA döngüsü üzerinde bir etki görülmemektedir. Kras'ın baskılandığı hücrelerde G6P, F6P ve F1,6BP'ta belirgin azalma gözlenmiştir. Ayrıca GLUT1, HK1, HK2, PFK-1 ve LDH-A gibi enzimlerde de transkripsiyonel seviyede azalma bulunmuştur. Bunun yanı sıra Kras mutasyonu, PFY'nın oksidatif olmayan kolunda riboz sentezini de uyarmaktadır ve bu yolaktaki enzimleri baskılamak Kras bağımlı tümör gelişimini azaltmaktadır (Ying ve ark. 2012).

Glutamin, TCA döngüsü için karbon kaynağı olmakta, nükleotidler için nitrojen sağlamak ve heksozamin biyosentezinde kullanılabilir (Deberardinis ve Cheng 2010). Glutamin, glutamat dehidrogenaz ile glutamata oradan da α -ketoglutarata çevrilerek TCA döngüsüne katılabilir ya da aspartada çevrildikten sonra aspartat transaminaz (GOT1) ile oksaloasetata çevrilebilir. GOT1 aracılı çevrilmenin NADPH üreterek redoks dengesini ayarlayabileceği düşünülmektedir. Kras mutasyonlu tümör hücrelerinde ise GOT1 seviyelerinin arttığı ve glutaminin tümör hücre büyümesini bu yolla destekleyebileceği gösterilmiştir. Kras mutasyonlu hücrelerin PFY'nın oksidatif kolunda bir değişikliğe neden olmadığını düşünürsek, tümör hücrelerinin ROE ile bu şekilde başa çıkabileceği önerilen görüşler arasındadır (Son ve ark. 2013).

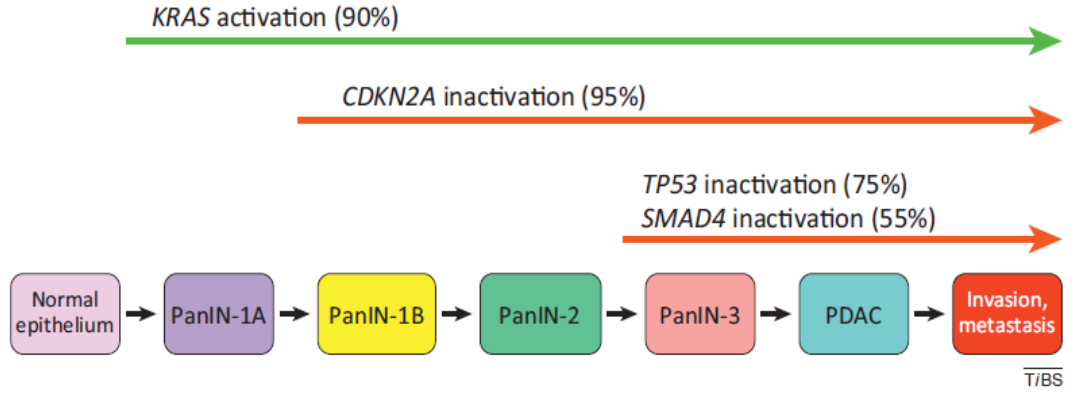
Pankreatik duktal adenokarsinom (pankreatik kanser) solid maligniteler arasında en ölümcül olanlardan biridir ve 5 yıllık yaşam süresi %5'ten azdır (Hidalgo 2010). Pankreasın malign neoplazmlarının çoğu adenokarsinomdur. İnsülin ve glukokagon gibi hormon salgılayan nöroendokrin tümörleri ve sindirim enzimlerini salgılayan asiner karsinomları daha nadir görülen tümörlerdir. Pankreatik kanserlerde yaş önemli faktörlerden biridir. Çoğu hastanın yaşı 50'nin üzerindedir ve yaş ortalaması 73 olarak bildirilmiştir (Kleeff ve ark. 2016).

Pankreasta histolojik olarak farklı öncül lezyonlar bildirilmiştir. Bunlar pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN), intraduktal papiller müsinöz adenom ve müsinöz kistik

adenomdur. Bu lezyonlar erken teşhis edildiğinde kansere çevrilmeden tümör hastadan çıkarılabilir ve hasta tedavi edilebilir (Maitra ve Hruban 2008).

Pankreatik kanserlerin %90'ından fazlasında Kras mutasyonu izlenmektedir. PanIN evre I'de %36 oranında Kras mutasyonu izlenirken PanIN evre II-III geldiğimizde bu oran %87'lere çıkmaktadır. PanIN'de gördüğümüz Kras mutasyonundaki yüksek sıklık, PanIN'nin pankreatik tümör oluşumunu başlattığı görüşünü desteklemektedir (Maitra ve ark. 2005). Kras mutasyonunun, pankreatik kanser oluşumu dâhil karsinogenezin tüm aşamalarında olması gerektiği Collins ve ark. (2012) yaptığı bir çalışmada ortaya konmuştur. Kras mutasyonu, pankreatik kanser hücrelerini PI3K/Akt sinyal yolu üzerinden etkilemektedir ve tümör hücrelerinin büyümesi için de gereklidir (Bryant ve ark. 2014). Önemli noktalardan biri de pankreatik kanser hücrelerinde Kras mutasyonu denetiminin EGF sinyaline bağlı olmasıdır (Navas ve ark. 2012).

CDKN2A/p16 inaktifleşmesi de pankreas tümörlerinde sık görülen bir mutasyondur. Ayrıca TP53 geni de pankreas tümörlerinin %50-75'inde inaktive olmaktadır. DPC4 (deleted in pancreatic cancer 4/ SMAD family member 4) de pankreatik tümörlerin %55'inde inaktive olan diğer bir genidir (Maitra ve Hruban 2008) (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. Pankreatik duktal adenokarsinomun öncül lezyonları ve malign dönüşüme neden olan genetik değişiklikler (Bryant ve ark. 2013).

Pankreatik duktal adenokarsinomlarda PFKFB3 seviyeleri fazlaca ifade olmaktadır (Bobarykina ve ark. 2006). Yapılan çalışmalarda PFKFB3'ün pankreatik tümör hücrelerinde otofajiyi düzenlediği ve PFKFB3 baskılanmasının otafiyi indüklediği gösterilmiştir (Minchenko ve ark. 2014). Ayrıca PFKFB3, pankreatik kanserde kalsiyum pompalarını da düzenlemektedir. PFKFB3 inhibisyonu sitotoksik kalsiyum birikimine ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Richardson ve ark. 2020).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kiyasallar, Cihazlar ve Çözeltiler

3.1.1. Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar çeşitli firmalardan temin edilmiş ve üretici firmanın belirttiği talimatlar doğrultusunda deney için gerekli konsantrasyonlarda hazırlanmışlardır. Kimyasalların üretici firma ve katalog numarası bilgileri Çizelge 1’de sunulmuştur. Kullanılan konsantrasyonlar, ilgili yöntem anlatımında verilmiştir. Aksi belirtilmedikçe kimyasallar çözülürken ultra-saf steril su kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Kullanılan kimyasallar ve bilgileri

Kimyasal Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) Besiyeri	Pan Biotech	P04-03550
Fötal sığır Serumu	Biological Industries	04-007-1A
L-glutamin	Gibco	25030081
Tripsin -EDTA (% 0,05)	Gibco	25300054
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen	137780
Agaroz	Invitrogen	16520050
Tris	Invitrogen	15504020
Sodyum Klorür	Sigma	433209
Tween-20	Sigma	P9416
Hidroklorik Asit (%37)	Sigma	435570
Sodyum bikarbonat	Fischer	S200
Sığır Serum Albumini	Sigma	A2058
Tripan Mavisi	Sigma	T8154
Kristal Violet	Sigma	C3886
Sodyum Dodesil Sülfat	Sigma	436143
Sodyum hidroksit	Merck	106462
Fruktoz-6-fosfat	Sigma	F3627
Nikotinamid dinükleotid (NAD)	Sigma	N9410
Fosfofruktokinaz-1	Sigma	F6803
Aldolaz	Sigma	A2714
Triozfosfat izomeraz	Sigma	T6258
Gliserol-3-fosfat dehidrojenaz	Sigma	10127779001
Pirofosfat	Sigma	221368
Fruktoz-2,6-bisfosfat	Sigma	47822
HEPES	Merck	391340
Triton-X	Merck	108643
Etanol	Merck	100983
Metanol	Merck	1060091011
K-Ras inhibitor	Sigma	5380920001
Gemcitabine	Sigma	G6423-10MG
PFK-158	Cayman Chemical	22987
M3:D™ Chemically Defined Media without Growth Supplements	Incell	M3DEF-500

EGF (Epidermal growth factor)	Merck	Gf144
Penisilin-Streptomisin	Pan Biotech	P06-07050
Puromisin	Calbiochem	540411

3.1.2. Cihazlar

Çalışmalarda kullanılan cihazlar Çizelge 2’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Cihaz listesi

Cihaz Adı	Cihaz Modeli
Steril Kabin	BioII Advance, Telstar
Santrifüj	NF1200R, Nüve
Santrifüj	3K30, Sigma
Otoklav	OT40L, Nüve
PCR Cihazı	MyGenie96, Bioneer
Realttime	OneStepPlus, Applied Biosystems
Görüntüleme cihazı	ChemiDoc MP, Biorad
Güç kaynağı	300 Volt, VWR
Spektrofotometre	Epoch, Biotek
Manyetik Karıştırıcı	MSH-300, Biosan
Hassas Terazi	CPA225D, Sartorius
Saf su cihazı	Simplicity, Millipore
Blok ısıtıcı	TS-100, Biosan
İnvert mikroskop	3032, AccuScope
İnkübatör	Incusafe, Panasonic

3.1.3. Çözeltiler

Fosfat ile Tamponlanmış Salin Çözeltisi; PBS.

1 litre PBS çözeltisi hazırlamak için, satın alınan 10X PBS çözeltisi (Thermo; Kat. No. 70011044) distile su ile 10 kat sulandırıldı ve otoklavda sterilize edildi. Yıkama amacıyla steril 1X PBS kullanıldı.

Tris Asetat EDTA Çözeltisi; TAE.

1 litre TAE çözeltisi hazırlamak için, satın alınan 10X TAE çözeltisi (Fisher; Kat. No. BP133520) distile su ile 10 kat sulandırıldı ve otoklavda sterilize edildi. Agaroz jel hazırlanırken çözücü olarak 1X TAE çözeltisi kullanıldı.

Tris ile Tamponlanmış Salin, Tween-20 Çözeltisi; TBS-T

10X TBST çözeltisi, 200 mM Tris, 1,5 M Sodyum klorür ve %1 Tween-20 kullanılarak hazırlandı. Kullanım için 1X olacak şekilde 10 kat dilüsyon uygulandı.

HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit) Çözeltisi

1 M 100 ml HEPES çözeltisi için 10 ml 10X HEPES (Merck Kat. No. 391340) çözeltisi 90 ml distile su ile 10 kat sulandırıldı.

TCA (Trikloroasetik asit) çözeltisi

40 gr TCA (Sigma Kat. No. T6399-100G) 200 ml distile su ile çözdürüldü. 1x olarak kullanıldı.

Protein lizis çözeltisi

Protein lizisi için RIPA (Thermo; Kat. No. 89900) çözeltisi kullanıldı. (RIPA çözeltisi 25mM TrisHCl (pH 7.6), 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodyum deoksikolat, 0.1% SDS) Kullanım öncesinde RIPA çözeltisine, proteaz ve fosfataz inhibitör karışımı (Cell Signaling Technologies; Kat. No. 5872) 1:1000 dilüsyon kullanılarak ilave edildi.

Western blot bloklama çözeltisi

Western blot deneylerinde bloklama amacıyla %5 yağsız süt tozu (Sigma; Kat. No. M7409) kullanıldı. Yağsız süt tozu hazırlanırken TBST çözeltisi ile sulandırıldı.

Western blot antikor dilüsyon çözeltisi

Western blotlamada kullanılacak antikorların dilüsyonu için %5 sığır serum albümini (BSA) kullanıldı. Çözücü olarak TBST kullanıldı.

Western blot jel yürütme çözeltisi

Western blotda örnekler 10 kat sulandırılmış Tris/Glisin/SDS (Biorad; Kat. No. 1610772) çözeltisi içinde yürütüldü.

Western blot jel transfer çözeltisi

Western blotda örnekler 10 kat sulandırılmış Tris/Glisin (Biorad; Kat. No. 1610771) çözeltisi içinde transfer edildi.

3.2. Hücre Kültürü ve Proliferasyon Analizi

IPDE (ATCC; Kat. No. CRL-4037) ve IPDE+KRAS^{G12D} (KPDE) (ATCC; Kat. No. CRL-4038) hücreleri % 75, % 5 fötal sığır serumu (FBS), 5,5 mM glikoz, 10 ng/ml insan rekombinant epidermal büyüme faktörü (EGF), 750 ng/ml puromisin, 10,000 µg/ml penisilin-streptomisin eklenmiş ve 1,5 g/L sodium bikarbonat içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ve %25 M3 Base içeren besi yerinde çoğaltıldı. Bu besi yeri PDE besi yeri olarak adlandırıldı. IPDE ve KPDE hücreleri arasındaki temel fark, KPDE hücrelerinde 12. kodonda G-A dönüşümünü barındıran Kras muatsyonunu içermesidir. Çalışmamızda bu hücreleri seçmemizin nedeni pankreatik kanserlerde en sık görülen mutasyonun bu olması ve genetik olarak stabil hale getirilen bu hücrelerde başka etki beklemeden çalışılabilmesinin kolay olmasıdır.

Pasajlamalarda kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS) ve Tripsin-EDTA kullanıldı. Hücreler 37°C'ye ayarlı, %5 CO₂ içeren nemli inkübatörde çoğaltıldı.

Hücre proliferasyon analizlerinde 6 kuyucuklu plaklara kuyucuk başına 150.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ekimden 24 saat sonra siRNA eklenerek 48 saat inkübe edildi. Daha sonra hücreler tripsinize edildi ve besi yeri ile karıştırıldı. Hücre-besiyeri süspansiyonu 1:1 oranda Tripan mavisi ile karıştırılarak hemasitometreye 10 µl uygulanarak invert mikroskop (Accu Scope) ile sayıldı.

3.3. mRNA Ekspresyon Analizleri

3.3.1. RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Hücrelerden RNA izolasyonu için ticari bir kit kullanıldı (Thermo; Kat. No. K0731). Toplam RNA miktarı ve saflığı 260 nm dalga boyunda belirlendi (Biotek, Epoch Monokromatör). Yine ticari bir kit kullanılarak (Invitrogen; Kat. No. 4368814) ve imalatçının protokolü takip edilerek RNA'daki mRNA fraksiyonundan RT yöntemi ile komplementer DNA (cDNA) sentezlendi. 1 µg total RNA, oligo dT primer, dNTP, reverse transkriptaz ve RNaz inhibitörü içeren 20 µl'lik karışım 25°C/10 dk (Aşama 1), 37°C/120 dk (Aşama 2) ve 85°C/5 dk (Aşama 3)' ya ayarlı PCR programında ters transkripsiyon (reverse transcription - RT) işlemine tabi tutuldu. Elde edilen cDNA'lar

ilgili genlerin ekspresyonlarının kantitasyonu için gerçekleştirilecek analiz ve polimeraz zincir reaksiyonlarında (Polymerase Chain Reaction, PCR) kalıp olarak kullanıldı.

3.3.2. Gerçek zamanlı kantitatif PCR analizi

Uygulanmış olan gerçek zamanlı kantitatif qPCR yöntemi ve prensibi daha önceden rapor edilmiştir (Yalcin, 2004). Kısaca; mRNA kantitasyonu için her bir gen komplementer DNA`sına (cDNA) spesifik bir çift PCR primeri ve floresan işaretli prob (FAM) içeren TaqMan sisteminden (Promega) yararlanıldı. cDNA amplifikasyonu Taq polimeraz (İnvitrogen; Kat. No. 4369016) ile gerçekleştirildi ve imalatçının protokolü takip edildi. Kısaca; 200 nM gen spesifik primer, 250 nM gen spesifik floresan prob, dNTP ve Taq polimeraz enzim içeren karışım 95 °C/2 dk (Aşama 1), 95 °C/15 sn (Aşama 2; denatürasyon) ve 60 °C/1 dk (Aşama 3; yapışma, uzama ve deteksiyon) programına ayarlı qPCR cihazında reaksiyona tabi tutuldu. İkinci ve üçüncü aşamalar 40 kere tekrarlandı. Reaksiyonlar StepOnePlus (Applied Biosystems) cihazında gerçekleştirildi ve StepOne Software v2.3 yazılımı kullanılarak analiz edildi. Elde edilen amplifikasyon eğrilerinden döngü eşiği (Ct) değerleri kullanılarak hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerindeki nispi değişimler $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu ile hesaplandı. Hesaplamalarda β -aktin internal amplifikasyon kontrolü olarak kullanıldı. Kantitatif gerçek zamanlı PCR analizinde kullanılan problemlerin bilgileri Çizelge 3`de gösterilmiştir. Bütün problemler Applied Biosystems firmasından temin edilmiştir.

Çizelge 3.3. Gerçek zamanlı kantitatif PCR analizinde kullanılan problemler

Prob Adı	Katalog no
PFKFB 1	Hs00997227_m1
PFKFB 2	Hs01015408_m1
PFKFB 3	Hs00998700_m1
PFKFB 4	Hs00894606_m1

ACTB	Hs01060665_g1
GAPDH	Hs02786624_g1

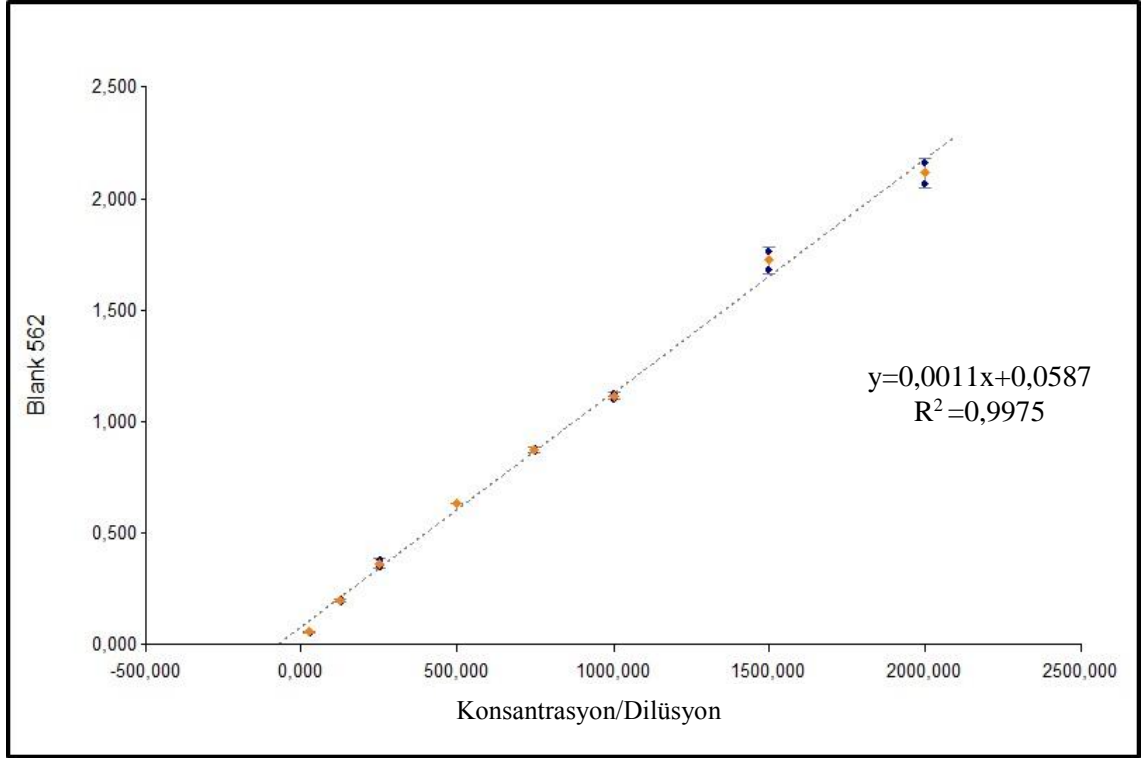
3.3. Protein İzolasyonu ve Western Blotlama

3.3.1. Total protein izolasyonu

Protein analizi yapılacak deneylerde, deney bitiminde hücreler tripsinize edildi ve santrifüj ile hücre pelletleri elde edildi. Sonrasında protein analizi için total protein lizatları hazırlandı. Bu amaçla pelletlere protein lizis çözeltisi uygulandı ve 25 dakika buz üzerinde bekletildi. Lizatlar çok yüksek devirde (14000xg) soğutmalı santrifüjde (+4°C) 15 dakika santrifüj edilerek membran ve erimeyen atıklardan arındırıldı. Süpernatant, total protein lizatı olarak elde edildi ve bu lizatlar sonraki aşamalarda -80 °C derin dondurucuda saklandı. Konsantrasyon ölçümü sonrasında ekstraktlar, SDS-PAGE yükleme tamponu ile 1:1 oranında karıştırılıp 95°C'de denatüre edildi ve Western blot analizine tabi tutuldu.

3.3.2. Protein konsantrasyon ölçümü

Western blotlama deneylerinde örnekler arası farkların etkin belirlenmesi için örnekler arasında total protein konsantrasyon farkı bulunmamalıdır. Bu amaçla Western blotlama deneylerinde protein elde edildikten sonra protein konsantrasyonları bikinkoninik asit metodu ile (BCA) kolorimetrik olarak (Thermo; Kat. No. 23225) ölçülmelidir. Kısaca, elde edilen protein örnekleri 40 kat sulandırıldı. 5 µl protein örneği kit protokolüne göre hazırlanmış, 200 µl BCA reagent karışımı ile 96 kuyucuklu plakalarda karıştırıldı. 30 dakika 37°C'de ve 300 rpm'de inkübe edilen örnekler daha sonra bir mikropilaya ölçüm (Epoch; Biotek) cihazında 562 nanometre (nm) dalga boyu kullanılarak optik absorbans değerleri okundu. Elde edilen absorbans değerleri, konsantrasyonu bilinen standartların okunması ile elde edilen standart grafiğine göre konsantrasyon değerlerine çevrildi (Şekil 3.1.) ve Western blotlama öncesinde örneklerin protein konsantrasyonları 50 µg olacak şekilde eşitlendi.



Şekil 3.1. BCA standart Absorbans / Konsantrasyon grafiği. Protein konsantrasyonları hesaplanması amacıyla, konsantrasyonu bilinen sığır serumu albümin (BSA) dilüsyonlarının absorbansları ölçüldü ve elde edilen grafiğe göre örnek konsantrasyonları hesaplandı.

3.3.3. Western blotlama

Eşit miktarda protein içeren (50 µg) örnekler poliakrilamid jellere (BioRad; Kat. No. 4561043) yüklendi ve elektroforez uygulanarak separe edildi. Sonrasında jeller, Western blot ile deteksiyon için polivinilidin florür (PVDF) membranlara (Millipore; Kat. No. IPVH00010) transfer edildi. Transfer sonrasında membranlar Western blot bloklama çözeltisi ile 1 saat süreyle bloklandı ve +4 °C’de gece boyunca primer antikor uygulandı. Antikor dilüsyonlarında Western blot antikor dilüsyon çözeltisi kullanılmıştır. Western blot deneylerinde kullanılan antikorların bilgileri Çizelge 3.4’te sunulmuştur. Sonrasında membranlar 3 kez TBST ile yıkandı ve 1 saat süreyle oda ısısında peroksidaz (HRP) ile konjuge sekonder antikor (primer antikor tavşanda sentezlenmiş ise anti-Rabbit; primer antikor farede sentezlenmiş ise anti-Mouse) uygulandı. Sekonder antikorlar 1:10000 dilüsyonda hazırlandı. Son olarak membranlara kemiluminesan substrat (BioRad; Kat. No. 1705061) uygulandı ve bantlar görüntüleme cihazı ile (BioRad; ChemiDoc MP)

görüntülendi. Bant analizleri ve dansitometrik ölçümler ImageLab (BioRad) yazılımı ile gerçekleştirildi.

Çizelge 3.4. Kullanılan Antikorların Listesi

Antikor Adı	Üretici Firma	Katalog Numarası
PFKFB 3	Cell Signalling	13123
Anti- β -actin	Cell Signalling	3700
Anti-Rabbit IgG	Cell Signaling	7074
Anti-Mouse IgG	Cell Signaling	7076
Fosfo-p38	Cell Signalling	9211
Fosfo p44/p42 MAPK (Erk 1/2)	Cell Signalling	9106

3.4. Transfeksiyon

Çalışmalar kapsamında kurgulanan deneylerde ihtiyaç duyulan gen ekspresyonu azaltılması manipülasyonları, gen-spesifik tasarlanmış, siRNA molekülleri aracılığıyla gerçekleştirilen ekspresyon baskılama yöntemi ile sağlandı. siRNA transfeksiyonlarında Lipofectamine RNAiMAX kullanılmıştır. Transfeksiyonlar üretici tarafından önerilen protokole göre yapılmıştır. Kısaca, Lipofectamine ve siRNA (Applied Biosystems) ayrı 1,5 ml santrifüj tüplerinde serumsuz DMEM ile dilüe edilmiştir. Daha sonra tüp içerikleri 1:1 oranda birbirine karıştırılmıştır ve %50 yaygınlıktaki hücrelere uygulanmıştır. Final siRNA konsantrasyonu 10 nM kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan siRNA molekülleri katalog numaraları Çizelge 3.5’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.5. Kullanılan siRNA moleküllerinin listesi

siRNA	Katalog Numarası
Kontrol siRNA-2	4390846
PFKFB3 siRNA-1	4390824- s10358
PFKFB3 siRNA-2	4390824- s10359

3.5. Tümörijenik Potansiyel Deneyleri

3.5.1. Yumuşak agar da koloni formasyonu

Bazal laminaya tutunmadan canlılığını devam ettirebilme ve çoğalabilme karsinomların en karakteristik özelliklerinden biridir (Fridman ve ark. 1990). *In vitro* olarak, yumuşak agar deneyleri karsinomların bu özelliğini ölçebilen (anchorage-independent growth) en güvenilir yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir (Cheung ve ark. 2004). Yumuşak agar testleri daha önce tarif edildiği gibi yapılmıştır (Telang ve ark. 2006). Kısaca; 60x15mm hücre kültür petrilere %0,6 yoğunluktaki agaroz (42°C) içeren besi yerinden 2,5 ml eklendi ve agarın soğuması ve katılaşması için oda ısısında 30 dakika beklendi. Daha sonra son konsantrasyonu %0,3 olacak şekilde sıvı agaroz ilave edilen ve hücre yoğunluğu 30,000 olacak şekilde hücre içeren besi yeri hazırlandı. Bu sıvı agaroz-hücre karışımından % 0,6 agaroz-besiyeri içeren her bir petriye 2,5 ml eklendi. Hücreler 30 dakika oda ısısında bırakıldıktan sonra inkübatöre kaldırıldı. Haftada iki kez besi yerinden 0,5 ml eklendi. 3 hafta sonra koloniler sayı olarak ölçüldü.

3.5.2. Koloni formasyonu

Koloni formasyonu (Klonojenik analiz) deneyi, yumuşak ayarda koloni formasyonu ile benzer şekilde, tümör hücrelerinin onkojenik potansiyelini ölçmeye yöneliktir. Yumuşak agar deneyinde, agaroz katılması ile 3 boyutlu yarı katı ortamda oluşan koloniler incelenebilirken, koloni formasyonu deneylerinde 2 boyutlu yüzeyde büyüyen hücrelerin, tek bir hücreden koloni oluşturabilme gücü ölçülmektedir. Bu deney için kullanılacak hücreler, hücre sayısı 2000 olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve yaklaşık 10 gün beklenmiştir. Sonrasında, besi yeri uzaklaştırıldı ve hücreler metanol ile -20°C'de 10 dakika fikse edildi. Fiksasyondan sonra 10 dakika %0,05 tripan mavisi çözeltisi (metanolde çözülmüş) uygulanan petrilere 5 defa PBS ile yıkandı ve kolonilerin görüntüleri mikroskopik ve makroskopik olarak kaydedildi. Görüntülerin incelenmesi ile test edilen hücrelerin koloni oluşturabilme yetenekleri karşılaştırıldı.

3.5.3. İnvazyon

İnvazyon deneyi, tümör hücrelerinin bazal lamina invazyon yeteneğini ölçmek üzere tasarlanmış ve bazal laminayı *in vitro* taklit eden Matrigel (Sigma; Kat. No. DLW354263)

kullanılarak gerçekleştirilen bir deneydir (Kramer ve ark. 2013). Kısaca, hazneler 2 saat FBS içermeyen besi yerinde inkübe edildi ve 50,000 hücre FBS içermeyen 500 µl besi yerinde süspansiyon edilerek ve tabanı büyüme faktörü azaltılmış bazal lamina bileşenleri (ekstrasellüler matriks) ile kaplı 8 µm'lik membran içeren Boyden invazyon haznelerinin (Millipore; Kat.No. PIEP12L04) üst bölmesine aktarıldı. Kemoatraktan olarak alt bölmeye 500-750 µL % 5 FBS içeren normal besi yeri eklendi. 24 saat sonra, üst bölmedeki invaze olmamış hücreler ısıtılmış Q-tip ile uzaklaştırıldıktan sonra invaze olan hücreler metanolde fikse edildi (2 dk) ve %2 etanol içerisindeki %0.2 kristal viole solüsyonunda boyandı (15 dk). Boyalı hücreler invert ışık mikroskopunda (Accu Scope) 10X'lik objektif altında en az üç sahada sayıldı. Normal plakalarda büyüyen hücrelerle veriler normalize edildi ve kontrol hücreleri baz alınarak invazyon % şeklinde hesaplandı.

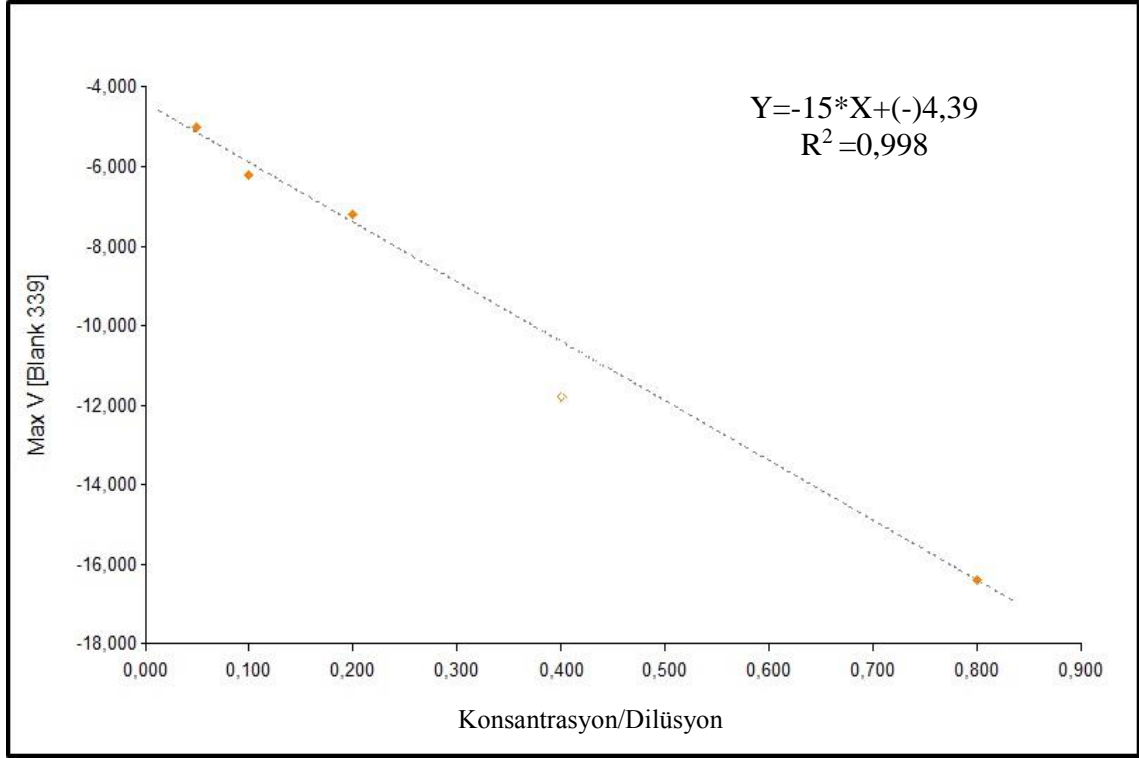
3.5.4. İlaç direnci deneyi

Kemoterapötiklere direnç, kanserin önemli özelliklerindedir ve tedavide karşılaşılan en önemli güçlüklerdendir. Gemcitabin, pankreatik kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan bir nükleozid analogudur. İlaç direnci deneyleri için ticari olarak satılan gemcitabin (Sigma; Kat. No. G6423-10MG) kullanıldı. PFKFB3'ü baskılamak için ticari olarak satılan PFK158 kullanıldı. 96 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 3000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler 30 nM gemstabin ve 2 µM PFK158 ile muamele edildi. 72 saat sonra hücreler Sülforhodamin B (SRB) boyama yöntemine göre boyanarak % canlılık hesaplandı. SRB boyama yönteminde hücreler %20'lik TCA'da 4 saat fikse edilir. Daha sonra Distile su ile yıkanan hücreler 1,5 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. SRB boyası ile 26 °C'da 30 dk çalkalanmaya konur. Daha sonra stik asit ile yıkanıp kurutulur.

3.6. Fruktoz-2,6-Bisfosfat Analizleri

Hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandı ve 100 mM NaOH solüsyonunda 80 °C'de 5 dk lize edildi. Lizatların pH'ı soğuk asetik asit (1 M) ve HEPES ile 7.2'ye düşürüldü. Schaftingen ve ark. (1980) tarafından tanımlanan yöntem kullanılarak F2,6BP konsantrasyonu kinetik spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu yöntemde örnekler 25 °C'de 10 dakika boyunca; 50 mM Tris, 2mM Mg⁺², 1 mM Fruktoz-6-fosfat, 0,15 mM NAD, 10 kU/l Pirofosfat-bağlı fosfofruktokinaz-1, 0,45 kU/l aldolaz, 0,5 kU/l tirozfosfat izomeraz, 1,7 kU/l gliserol-3-fosfat dehidrojenaz ve 0,5 mM pirofosfat bulunan ortamda inkübe edildiler. 0,5 mM pirofosfat eklenmesiyle başlatılan reaksiyon boyunca dakikada

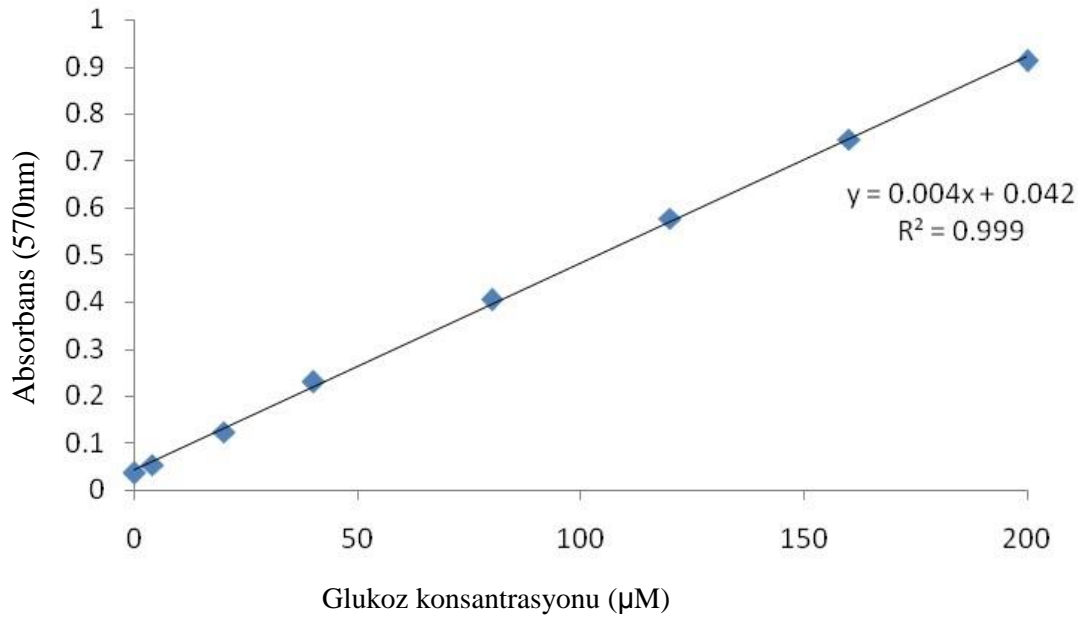
bir 339 nanometre dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Örneklerin F2,6BP konsantrasyonları, ölçülen standartlara göre hazırlanmış grafiğe göre (Şekil 3.2.) hesaplandı ve total proteine normalize edildi.



Şekil 3.2. Fruktoz2,6bisfosfat standart absorbans değişim hızı / Konsantrasyon grafiği. Hücrelerden elde edilen lizatlardaki F2,6BP konsantrasyonları hesaplanması amacıyla, bilinen konsantrasyonlarda F2,6BP'in reaksiyondaki varlığına göre absorbans değişim hızları ölçüldü ve elde edilen grafiğe göre örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.7. Glikoz Alınımı Analizi

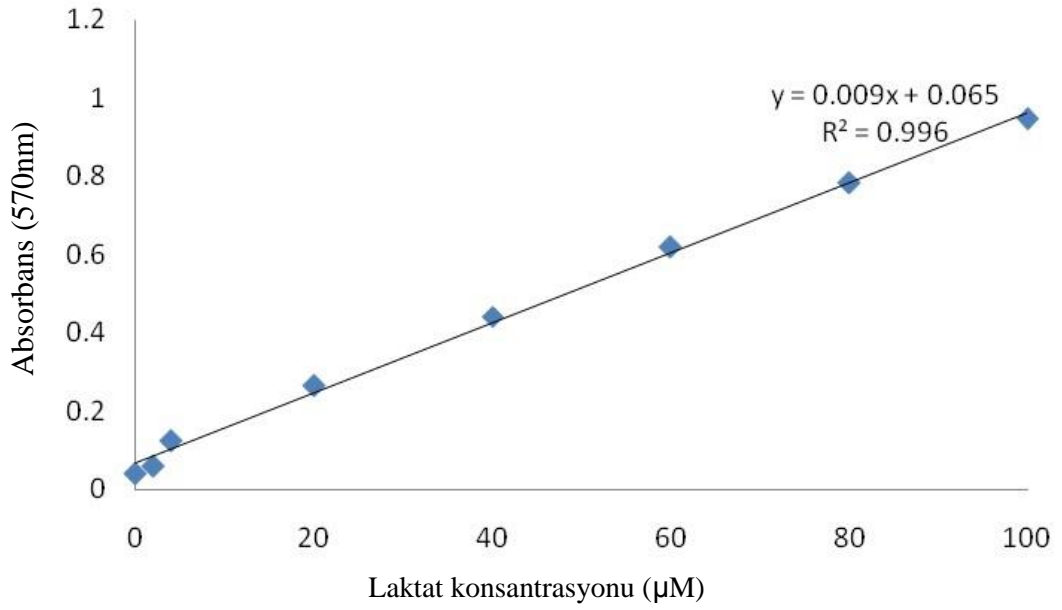
Glikoz tüketiminin hesaplanması için plakalara ekilmiş ve transfeksiyon yapılmış hücrelerin besi yerleri 48 saat sonunda toplanmış ve analizleri yapılmak üzere -20'de saklanmıştır. Besi yerindeki glikoz miktarının ölçülmesi için ticari bir kit (Eton bioscience Kat. No. 1200071002) kullanılmıştır. Üretici firmanın verdiği talimatlar üzerine örnekler 50 kat sulandırılmış ve 50 µl dilüe edilmiş örnek 50 µl kit karışımı okuyucu plaklara konulmuştur. 37 °C' de 30 dakika inkübe edilen örneklerin Epoch biotek cihazı ile 570 nanometre dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Örneklerin konsantrasyonları ölçülen standartlara göre hazırlanmış grafiğe bakılarak hesaplanmış (Şekil 3.3.) ve total proteine normalize edilmiştir.



Şekil 3.3. Glikoz konsantrasyonu/absorbans grafiği. Ortamda bulunan glikoz miktarının belirlenmesi amacıyla bilinen konsantrasyonlardaki glikoz miktarlarına göre olan absorbanslar ölçüldü ve elde edilen grafiğe göre değerler hesaplandı.

3.8. Glikoliz Analizi

Hücrelerdeki glikoz miktarının hesaplanması için ortamda bulunan laktik asit miktarına bakılmıştır. Besi yerinden laktik asit ölçümü için ilk olarak transfeksiyon edilen hücrelerden 48 saat sonra örnek alınıp -20'ye kaldırılmıştır. Daha sonra üretici firmanın verdiği talimatlar üzerine örnekler 200 kat sulandırılmış ve ölçüm plaklarına 50 µl örnek 50 µl kit karışımı olacak şekilde konulmuştur. Daha sonra karışım 37 °C'da 30 dakika inkübe edilmiştir. Örneklerin Epoch biotek cihazında 570 nanometre dalga boyundaki absorbanslarına bakılmıştır. Örneklerin konsantrasyonları ölçülen standartlara göre hazırlanmış grafiğe bakılarak hesaplanmış (Şekil 3.4.) ve total proteine normalize edilmiştir.



Şekil 3.4. Laktat konsantrasyonu/absorbans grafiği. Ortamda bulunan laktik asit miktarının belirlenmesi amacıyla bilinen konsantrasyonlardaki laktik asit miktarlarına göre olan absorbanslar ölçüldü ve elde edilen grafiğe göre değerler hesaplandı.

3.9. İstatistiksel Analizler

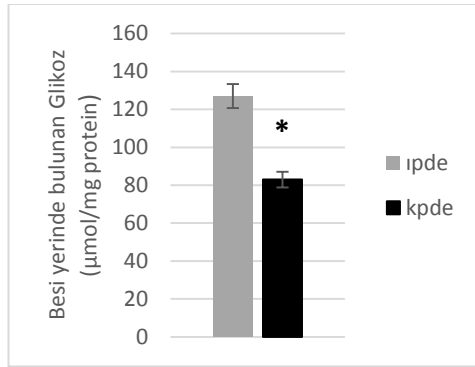
İki grup arası matematiksel farkın karşılaştırıldığı istatistiksel analizlerde çift kuyruklu (2-tailed) t-testi (Microsoft Office Excel) kullanılmıştır (Deneye göre eşli veya iki örnek eşit olmayan varyans t-testi seçildi). İstatistiksel analizlerde elde edilen p değerleri bulgular ile beraber sunulmuş ve $p < 0,05$, $p < 0,001$ anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

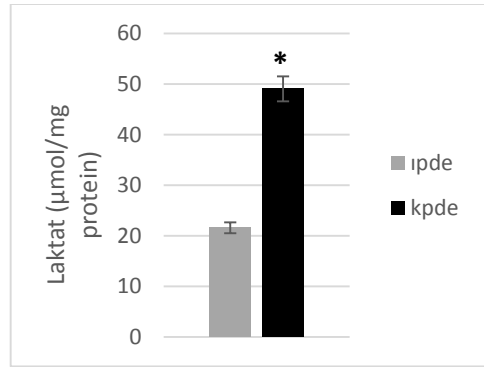
4.1. IPDE Hücrelerinin KRAS^{G12D} ile Transformasyonu Glikoz Alımını, Glikolizi, F2,6BP miktarını ve Hücre Canlılığını Arttırır.

Çalışmamızda ilk olarak Kras transformasyonunun glikoliz ve proliferasyon üzerindeki etkilerine bakıldı. Yapılan deneyler sonucunda KPDE hücre hattında glikoz alımınının, glikolizin, F2,6BP miktarlarının ve proliferasyonun arttığı gözlemlendi. IPDE hücre hattında besi yerinde bulunan glikoz miktarı 127 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ iken KPDE hücre hattında 83 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 'dır (Şekil 4.1.A.). Glikolizis sonucu oluşan laktik asit miktarlarına baktığımızda ise IPDE; 21,55 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, KPDE ise; 49,05 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ 'dır (Şekil 4.1.B.). F2,6BP miktarlarına bakacak olursak IPDE: 0,487 pmol/mg , KPDE ise 1,165 pmol/mg 'dır (Şekil 4.1.C.). 48 saat sonundaki hücre sayısı ise IPDE: 170000, KPDE:285000'dir (Şekil 4.1.D.).

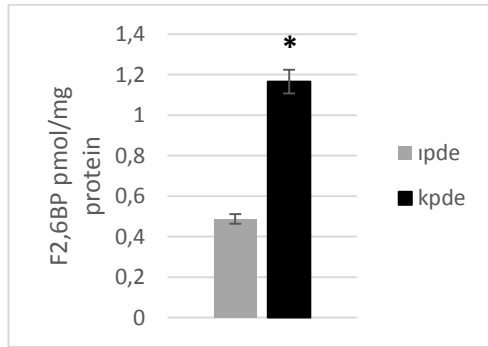
A.



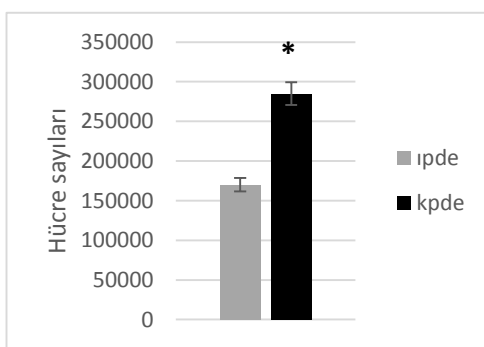
B.



C.



D.



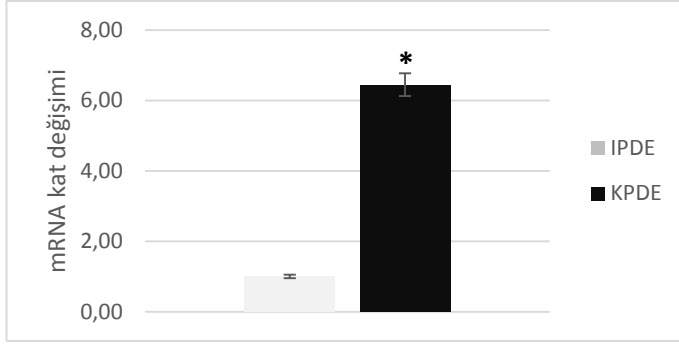
Şekil 4.1. IPDE ve KPDE hücre hatlarında glikolizis ve proliferasyonun karşılaştırılması. Kras mutasyonunun bulunduğu hücrelerde **A)** besi yerinde bulunan glikoz miktarları; IPDE: 127 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, KPDE: 83 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ **B)** laktik asit üretimi IPDE; 21,55 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, KPDE

ise; 49,05 µmol/mg C) F2,6BP seviyeleri IPDE: 0,487 pmol/mg, KPDE ise 1,165 pmol/mg ve D) 48 saat sonundaki hücre sayıları: IPDE: 170000, KPDE:285000

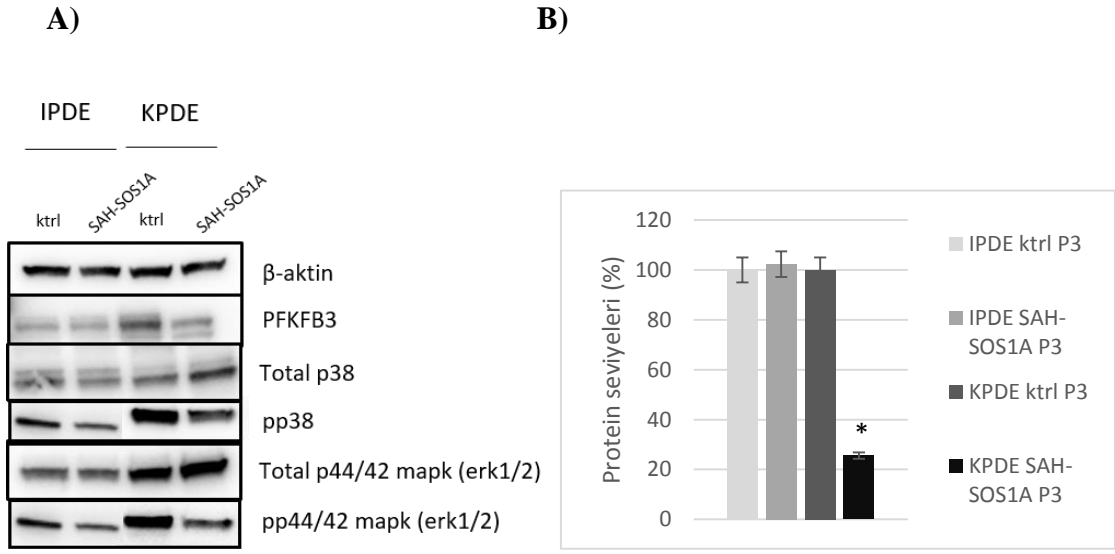
4.2. PFKFB3'ün IPDE ve KPDE Hücre Hattında Ekspresyonu

4.2.1. PFKFB3 ekspresyonu KRAS^{G12D} mutasyonu bulunan hücrelerde artmaktadır.

Mutant Kras'ın IPDE hücrelerindeki PFKFB3 ekspresyonu üzerindeki etkisini anlamak için IPDE ve KPDE hücrelerinde PFKFB3 mRNA seviyeleri gerçek-zamanlı kantitatif PCR ile analiz edildi. IPDE+KRAS^{G12D} (KPDE) hücre hattında PFKFB3 mRNA ekspresyonunun IPDE hücre hattına göre yaklaşık 6 kat arttığı gözlemlendi (Şekil 4.2.). Daha sonra hem KPDE hücrelerindeki PFKFB3 ekspresyonundaki bu artışın Kras-ilişkili olduğunu ispatlamak ve hem de mRNA seviyesindeki değişimin protein seviyesine de yansıyor yansımadığını anlamak için her iki hücre hattı KRAS inhibitörü SAH-SOS1A (Sigma Kat. No. 5380920001) 6 saat inkübe edildi. Elde edilen protein lizatlarında Western blot analizi gerçekleştirildi. Analizler sonucunda, KRAS inhibisyonunun IPDE hücrelerindeki PFKFB3 protein seviyesine bir etki yapmazken, KPDE hücrelerindeki PFKFB3 protein miktarını IPDE hücrelerindeki seviyeye indirdiği görüldü (Şekil 4.3) . Ayrıca Kras aktivitesinin baskılandığının doğrulanması için Kras sinyalizasyonunun alt yolağında kalan p38 ve p44/42 mapk proteinlerinin hem total hem de fosforlanmış miktarlarına Western blot ile bakılarak KRAS inhibisyonunun gerçekleştirildiği doğrulanmıştır. IPDE hücreleri ile karşılaştırıldığında, KPDE hücrelerinde p38 ve p44/42 proteinlerinin fosforlanma seviyelerinde bir artış olduğu ve KRAS inhibisyonu ile fosforlanmanın baskılandığı gözlemlendi (Şekil 4.3 A.). Bant yoğunluklarının Image J programı ile analiz sonuçları; IPDE ktrl P3: %100, IPDE SAH-SOS1A P3: %112, KPDE ktrl P3: %100 ve KPDE SAH-SOS1A P3: %25'dir (Şekil 4.3.B).



Şekil 4.2. IPDE ve KPDE hücre hattına mRNA seviyelerinin kat değişimleri. PFKFB3 seviyesi KPDE hücrelerinde yaklaşık 6 kat artmıştır.



Şekil 4.3.A) Kras baskılanmış IPDE ve KPDE hücre hattında Kras baskılanması sonrasındaki PFKFB3 ve Kras sinyal kaskadı alt yolağındaki protein seviyeleri. Yükleme kontrolü olarak β -aktin kullanılmıştır. **B)** Bant yoğunluklarının Image J programı ile analiz sonuçları; IPDE ktrl P3: %100, IPDE SAH-SOS1A P3: %112, KPDE ktrl P3: %100 ve KPDE SAH-SOS1A P3: %25.

4.3. PFKFB3 Ekspresyonunun IPDE ve KPDE Hücrelerinde Glikolitik Metabolizma Üzerine Etkileri

4.3.1. PFKFB3'ün IPDE ve KPDE hücrelerinde siRNA aracılı baskılanması

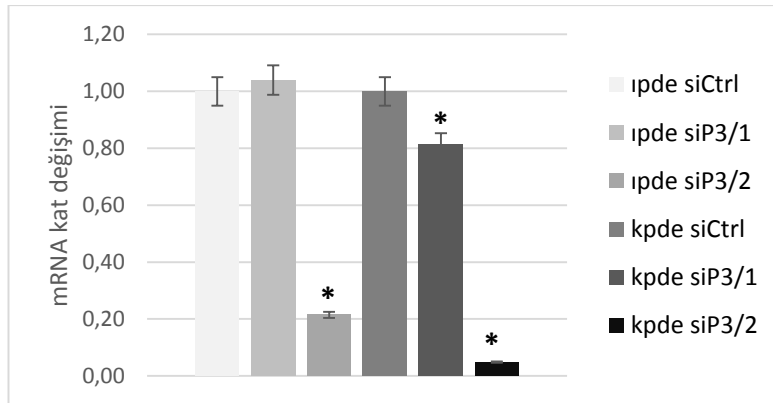
IPDE ve KPDE hücrelerinde endojen eksprese edilen PFKFB3'ün glikoliz ilişkili rollerinin anlaşılması amacıyla gen ekspresyonları siRNA kullanılarak baskılandı. Deneyleerde 1 adet genomda karşılığı olmayan kontrol siRNA (siCtrl) ve 2 adet PFKFB3 siRNA (siP3/1 ve siP3/2) kullanıldı. Deneyleer siRNA transfeksiyonundan 48 saat sonra

gerçekleştirildi. Gen ekspresyonlarının baskılanmasının kontrolü için gerçek-zamanlı kantitatif(q)-PCR kullanıldı.

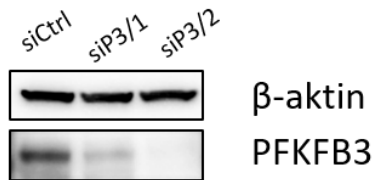
PFKFB3 ekspresyonları sırası ile IPDE siCtrl: $1 \pm 0,12$, IPDE siP3/1 $1,04 \pm 0,09$, IPDE siP3/2 $0,21 \pm 0,11$ ve KPDE siCtrl: $1 \pm 0,16$, KPDE siP3/1: $0,81 \pm 0,23$, KPDE siP3/2: $0,05 \pm 0,01$ olarak saptanmıştır. Elde edilen verilerde IPDE sonuçları IPDE siCtrl hücrelerine KPDE sonuçları ise KPDE siCtrl hücrelerine göre relatif olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4. A).

Ayrıca baskılanmış hücrelerin protein seviyelerine Western blot yöntemi ile bakıldı ve siRNA aracılı baskılama sonucunda protein seviyelerinde azalma olduğu doğrulandı. Western blot sonuçları image J programında analiz edildi ve protein seviyelerindeki azalma sırasıyla Kpde siCtrl: %100, Kpde siP3/1: %13,89 ve KPDE siP3/2: 1,55 olarak kaydedildi. (Şekil 4.4.B ve C.)

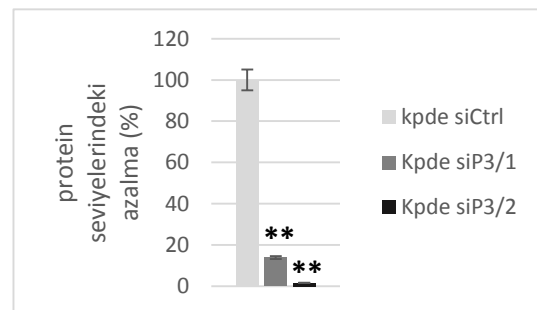
A.



B.



C.



Şekil 4.4. IPDE ve KPDE hücre hattında mRNA kat değişimi ve baskılanma sonucundaki protein seviyeleri. **A)** PFKFB3 mRNA değişimlerini göstermektedir. Baskılama için iki

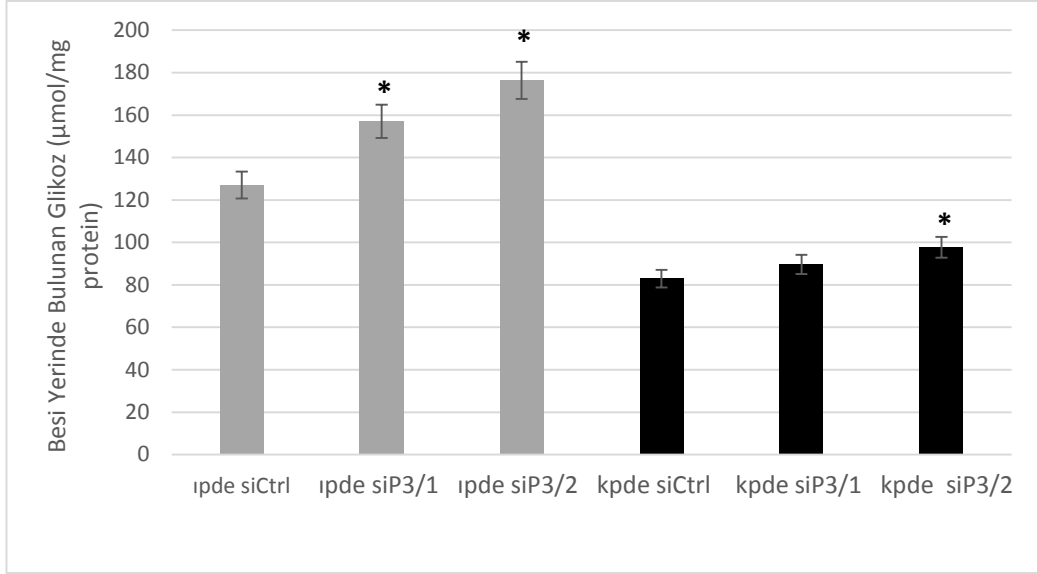
farklı suş kullanılmıştır. IPDE siCtrl: $1 \pm 0,12$, IPDE siP3/1 $1,04 \pm 0,09$, IPDE siP3/2 $0,21 \pm 0,11$ ve KPDE siCtrl: $1 \pm 0,16$, KPDE siP3/1: $0,81 \pm 0,23$, KPDE siP3/2 $0,05 \pm 0,01$ **B)** Baskılanma sonucundaki protein seviyelerini göstermektedir. Kontrol olarak β -aktin kullanılmıştır. (* $p=0,02$) **C)** Western blot sonuçlarının image J programı ile analiz sonuçları; Kpde siCtrl: %100, Kpde siP3/1: %13,89, Kpde siP3/2: %1,55

4.3.2. PFKFB3'ün siRNA aracılı baskılanması hem IPDE hem de KPDE hücrelerinde glikoz alınımını azaltır.

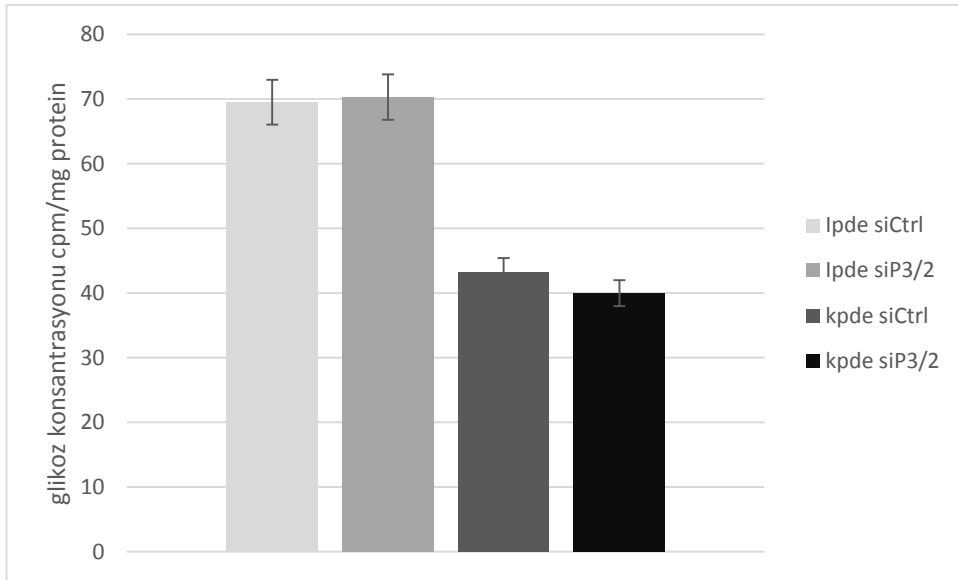
Glikoz alınımındaki değişikliği gözlemek amacıyla kuyucuk başına 15×10^4 olacak şekilde 6-kuyucuklu plakaya ekim yapıldı. Daha sonra yöntemler kısmında anlatıldığı gibi siRNA yöntemi uygulandı ve 48 saat sonunda besi yerlerinden örnekler alınarak glikoz tahlil kiti ile ölçüm yapıldı. KRAS^{G12D} mutasyonu hücrelerde proliferasyonu ve dolayısıyla glikoz alınımını arttırmaktadır. PFKFB3 baskılanması sonucunda her iki hücre hattında da glikoz alınımını azalmıştır. Bu azalma IPDE (yaklaşık %28)'de KPDE (yaklaşık %15)'ye oranla daha fazla olmuştur. Fakat iki hücre hattı arasında glikoz alınımındaki azalma arasında istatistiksel açıdan belirgin bir fark gözlenmemiştir.

PFKFB3 baskılanması sonucunda sırasıyla IPDE ve KPDE hücrelerinin besi yerindeki glikoz miktarları IPDE siCtrl: 127 $\mu\text{mol/mg}$, IPDE siP3/1: 157,11 $\mu\text{mol/mg}$, IPDE siP3/2: 176,35 $\mu\text{mol/mg}$ ve KPDE siCtrl: 83 $\mu\text{mol/mg}$, KPDE siP3/1: 89,62 $\mu\text{mol/mg}$, KPDE siP3/2: 97,74 $\mu\text{mol/mg}$ ($p=0,01 < 0,05$) olarak ölçülmüştür (Şekil 4.5.).

Ayrıca besi yerinde piruvat varlığı hücrelerin glikoz alınımını da etkilemiştir. Ortamda piruvat olduğunda hücrelerin glikoz alınımını azalmakta ve PFKFB3 baskılanması hücrelerdeki glikoz alınımını anlamlı bir şekilde etkilememektedir. Piruvat varlığında PFKFB3 baskılanması sonucu besi yerlerinde bulunan glikoz miktarları ise sırasıyla IPDE siCtrl: 69,5 $\mu\text{mol/mg}$, IPDE siP3/2: 70,29 $\mu\text{mol/mg}$ ve KPDE siCtrl: 43,25 $\mu\text{mol/mg}$, KPDE siP3/2: 39,98 $\mu\text{mol/mg}$ ($p=0,11 > 0,05$) olarak ölçülmüştür. (Şekil 4.6.)



Şekil 4.5. Hücrelerin siRNA ile baskılandıktan 48 saat sonra besi yerlerinde bulunan glikoz miktarları. KPDE hücrelerinin daha fazla glikoz kullandığı ve baskılanma sonucu hücrelerde glikoz alınımının azaldığı görülmektedir. IPDE siCtrl: 127 µmol/mg, IPDE siP3/1: 157,11 µmol/mg, IPDE siP3/2: 176,35 µmol/mg ve KPDE siCtrl: 83 µmol/mg, KPDE siP3/1: 89,62 µmol/mg, KPDE siP3/2: 97,74 µmol/mg (* $p = 0,01$).

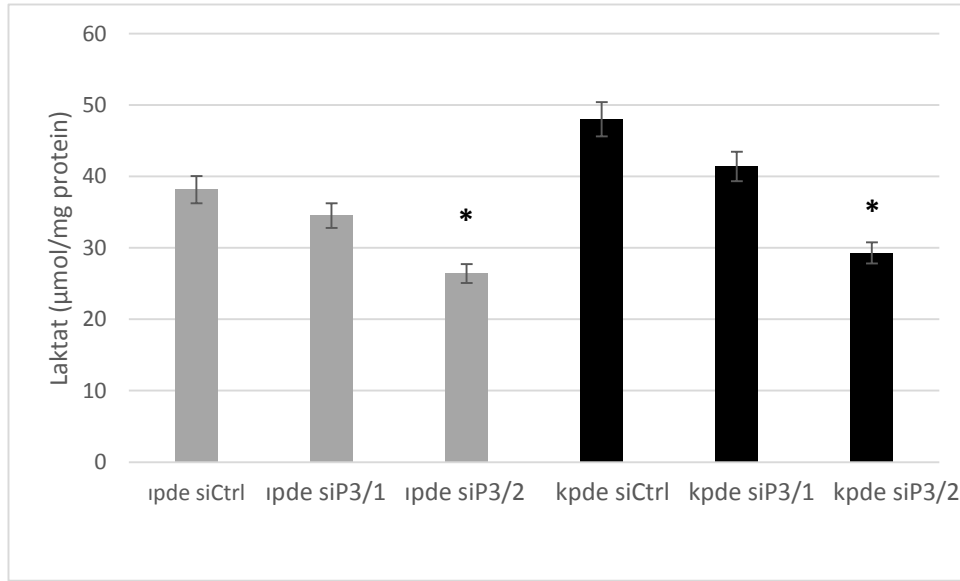


Şekil 4.6. Pirüvat varlığında PFKFB3 baskılanması sonucunda hücrelerin glikoz alınımında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. IPDE siCtrl: 69,5 µmol/mg, IPDE siP3/2: 70,29 µmol/mg ve KPDE siCtrl: 43,25 µmol/mg, KPDE siP3/2: 39,98 µmol/mg.

4.3.3. PFKFB3'ün siRNA aracılı baskılanması IPDE ve KPDE hücre hatlarında glikolizi baskılar ve bu baskılanma KRAS^{G12D} mutasyonunun olduğu hücrelerde daha fazladır.

Hücrelerdeki glikolizin ölçülmesi amacıyla laktat tahlil kiti kullanılmıştır. Bu amaçla transfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerin besi yerlerinden örnekler alınmış ve üretici firmanın talimatları doğrultusunda besi yerindeki laktik asit miktarları ölçülmüştür. Ölçüm sonunda IPDE hücrelerinde glikolizde yaklaşık %36'lık bir azalma görülürken KPDE hücrelerinde %39,5'luk bir azalma görülmüştür.

PFKFB3 baskılanması sonucunda bulunan laktik asit miktarları ise sırasıyla IPDE siCtrl: 38,16 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, IPDE siP3/1: 34,53 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, IPDE siP3/2: 24,40 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ve KPDE siCtrl: 48 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, KPDE siP3/1: 41,40 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, KPDE siP3/2: 29,29 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ($p=0,2 < 0,5$) olarak ölçülmüştür (Şekil 4.7.).

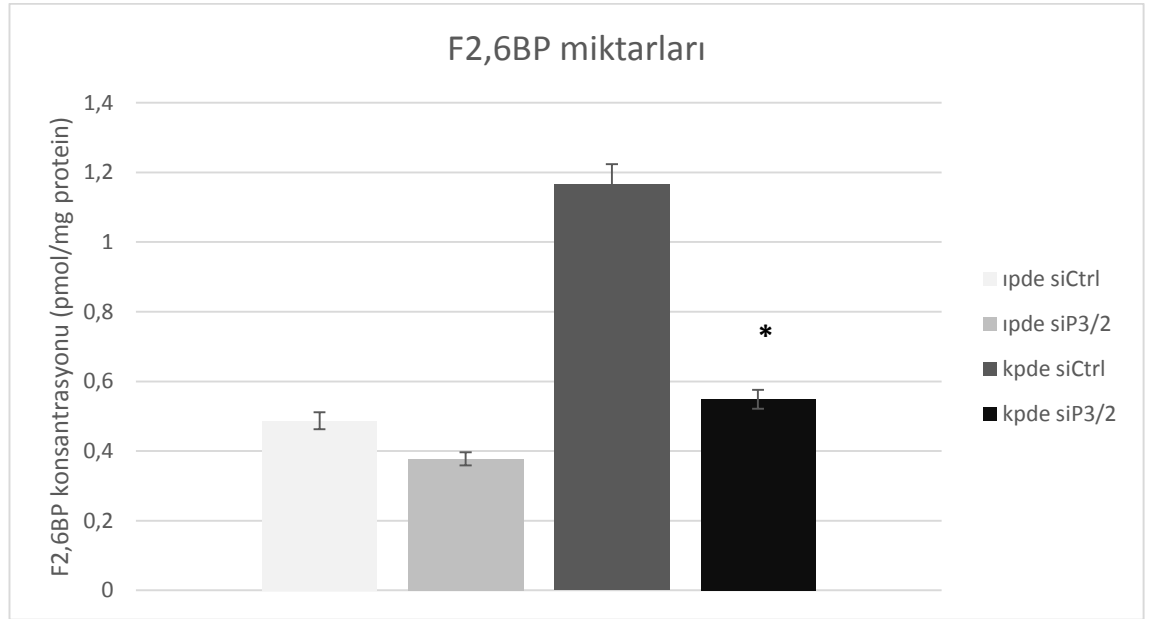


Şekil 4.7. PFKFB3'ün siRNA ile baskılanmasından 48 saat sonra besi yerinde bulunan laktik asit miktarları. Baskılanma sonucunda glikoliziste azalma izlenmiştir. IPDE siCtrl: 38,16 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, IPDE siP3/1: 34,53 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, IPDE siP3/2: 24,40 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ve KPDE siCtrl: 48 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, KPDE siP3/1: 41,40 $\mu\text{mol}/\text{mg}$, KPDE siP3/2: 29,29 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ (* $p=0,2$)

4.3.4. KRAS^{G12D} mutasyonu IPDE hücrelerinde F2,6BP konsantrasyonunu artırır ve PFKFB3'ün siRNA aracılı baskılanması sonucunda IPDE ve KPDE hücrelerinde F2,6BP konsantrasyonu azalır.

PFKFB3'ün siRNA ile transfeksiyonundan 48 saat sonra F2,6BP konsantrasyonları ölçülmüştür. Konsantrasyon değerleri sırasıyla IPDE siCtrl: $0,487 \pm 0,03$ pmol/mg, IPDE siP3/2: $0,377 \pm 0,03$ pmol/mg ($p=0,05 \leq 0,05$) ve KPDE siCtrl: $1,16 \pm 0,3$ pmol/mg, KPDE siP3/2: $0,54 \pm 0,1$ pmol/mg ($p=0,01 < 0,05$) olarak ölçülmüştür (Şekil 4.8.)

Bu sonuçlar dikkate alındığında KRAS^{G12D} mutasyonlu hücreler de F2,6BP konsantrasyonlarının oldukça arttığı dikkati çekmekte ve PFKFB3 siRNA ile baskılanması sonucunda KPDE hücrelerindeki konsantrasyon azalması IPDE hücrelerine göre belirgin olarak daha fazla olmaktadır.



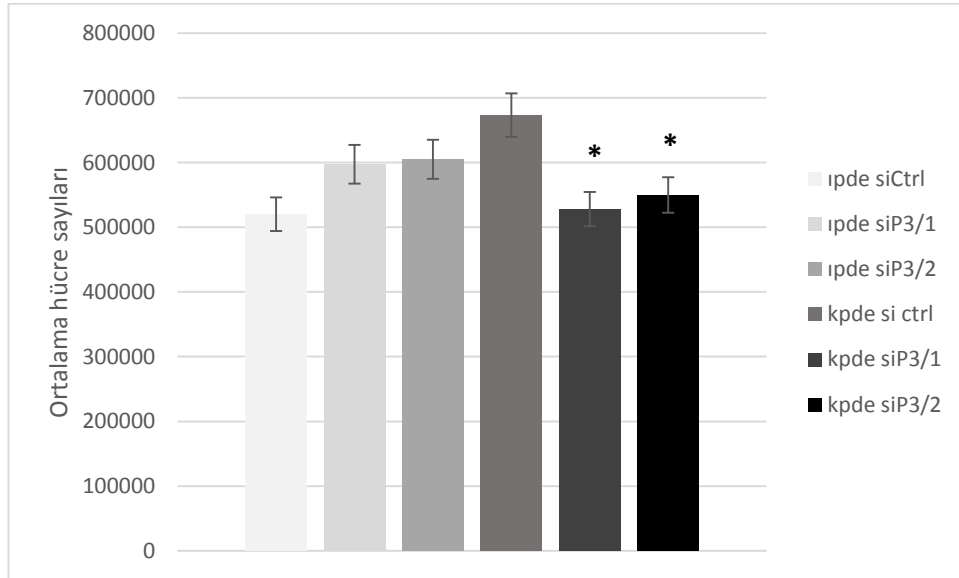
Şekil 4.8. Ölçülen F2,6BP değerleri hücrelerin protein konsantrasyonlarına normalize edilerek pmol/mg protein olarak verilmiştir. IPDE siCtrl: $0,487 \pm 0,03$ pmol/mg, IPDE siP3/2: $0,377 \pm 0,03$ pmol/mg ve KPDE siCtrl: $1,16 \pm 0,3$ pmol/mg, KPDE siP3/2: $0,54 \pm 0,1$ pmol/mg ($*p=0,01$).

4.4. PFKFB3 Ekspresyonunun IPDE ve KPDE Hücrelerinde Onkojenik Potansiyele Etkileri

4.4.1. PFKFB3'ün siRNA ile baskılanması IPDE hücrelerinde canlılığı etkilemezken KRAS^{G12D} mutasyonlu KPDE hücrelerde canlılığı azaltır.

PFKFB3'ün IPDE ve KPDE hücrelerinde proliferasyona olan etkisini değerlendirmek amacıyla 12 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 70×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. PFKFB3'ün siRNA aracılı transfeksiyonundan 48 saat sonra hücreler tripsinize edilerek hemasitometrik olarak sayıldı.

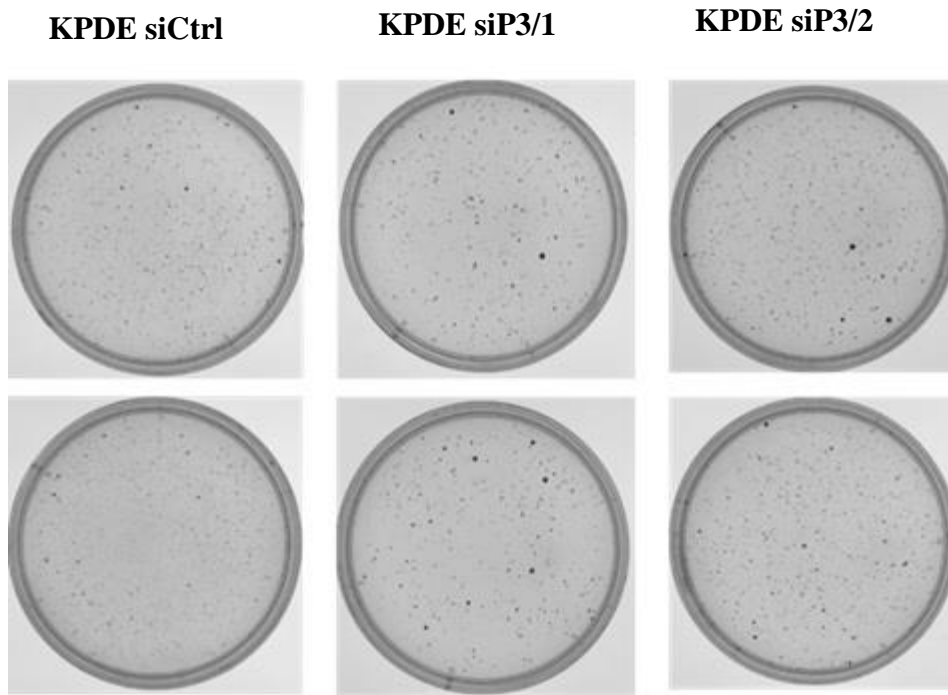
48 saat sonraki hücre sayıları sırasıyla IPDE siCtrl: $520 \pm 14 \times 10^3$, IPDE siP3/1: $597,5 \pm 14 \times 10^3$, IPDE siP3/2: $605 \pm 70 \times 10^3$ ($p = 0,07 > 0,05$) ve KPDE siCtrl: $673,3 \pm 20 \times 10^3$, KPDE siP3/1: $528 \pm 70 \times 10^3$, KPDE siP3/2: $550 \pm 20 \times 10^3$ ($p = 0,03 < 0,05$) olarak sayılmıştır (Şekil 4.9.). Sonuçları değerlendirecek olursak IPDE hücrelerinde proliferasyonda hafif bir artış gözlenirken KRAS^{G12D} mutasyonlu hücrelerin proliferasyonunda ortalama %25'lik bir azalma görülmüştür.



Şekil 4.9. PFKFB3'ün siRNA ile transfeksiyonundan 48 saat sonraki IPDE ve KPDE hücre sayısı. Hücre proliferasyonları hemasitometrik sayım ile belirlenmiştir. IPDE siCtrl: $520 \pm 14 \times 10^3$, IPDE siP3/1: $597,5 \pm 14 \times 10^3$, IPDE siP3/2: $605 \pm 70 \times 10^3$ ve KPDE siCtrl: $673,3 \pm 20 \times 10^3$, KPDE siP3/1: $528 \pm 70 \times 10^3$, KPDE siP3/2: $550 \pm 20 \times 10^3$ (* $p = 0,03$)

4.4.2. PFKFB3 ekspresyonunun siRNA aracılı baskılanması KRAS^{G12D} mutasyonlu KPDE hücrelerinde yumuşak agarda koloni oluşturma kapasitelerini etkilemez.

PFKFB3'ün siRNA ile transfeksiyonundan 48 saat sonra hücreler yumuşak agara ekildi. Ekilen hücreler iki hafta yumuşak agarda büyütüldükten sonra makroskobik ve mikroskobik görüntüleri kaydedilerek koloni sayıları ve büyüklükleri açısından incelendi. KPDE hücre hattındaki hücrelerin yumuşak agarda minik koloniler halinde diffüz bir yayılım gösterdiği izlendi. PFKFB3'ün baskılanması sonucunda koloni oluşturma kapasitesinde bir azalma izlenmedi (Şekil 4.10.).

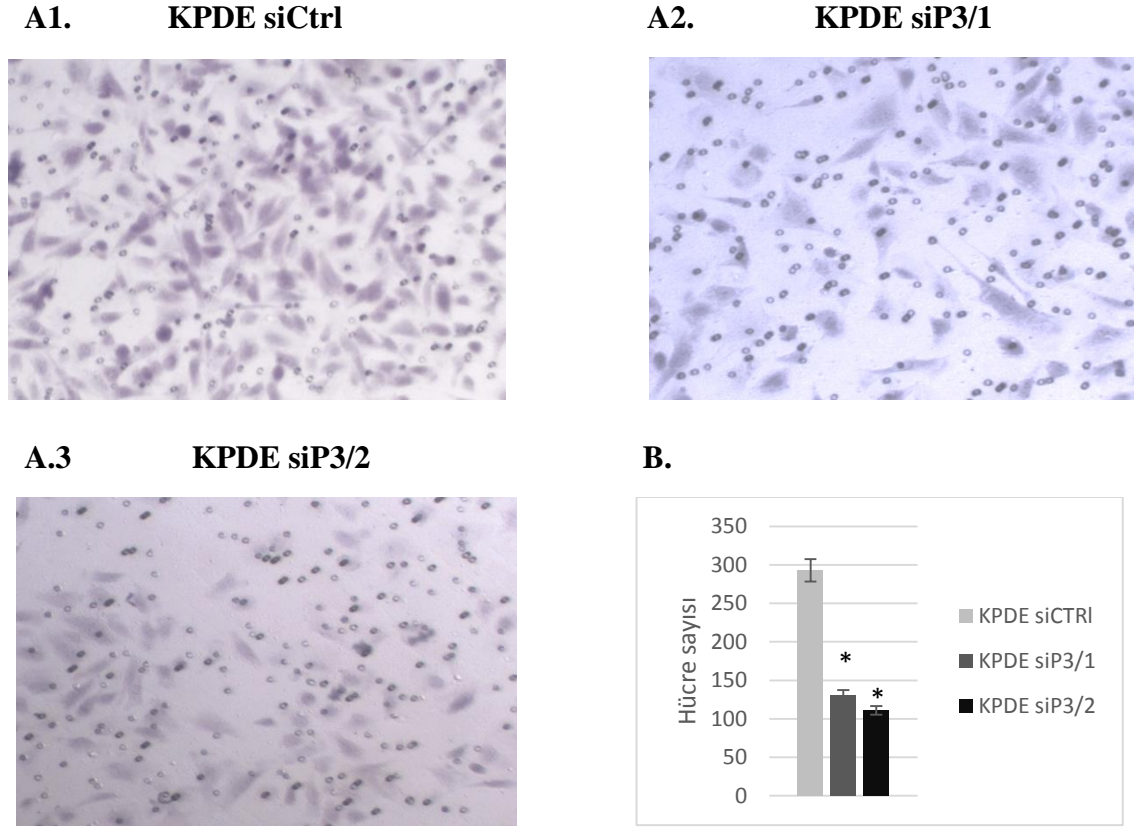


Şekil 4.10. KPDE hücrelerinin yumuşak agarda oluşturduğu kolonilerin makroskobik görüntüsü.

4.4.3. PFKFB3'ün siRNA aracılı baskılanması KRAS^{G12D} mutasyonlu KPDE hücrelerinde matrijel invazyonunu azaltır.

siRNA aracılı baskılama deneyinde siCtrl, siP3/1 ve siP3/2 siRNA ile transfekte edilen KPDE hücrelerinin invazyon yetenekleri incelendi. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler matrijel kaplı kuyucuklara FBS içermeyen besiyerinde ekildi ve invaze olabilmeleri için 1 gün beklendi. Sonraki gün invaze olmuş hücreler kristal violet ile boyanarak ışık mikroskobunda görüntülendi. PFKFB3'ün siRNA aracılı baskılanmasının KPDE hücrelerinin matrijele olan invazyonunu azalttığı izlendi. Işık mikroskobunda 10x

büyütmede rastgele 5 alan seçilerek sayım yapıldı ve KPDE siCtrl'de hücre sayısı; 293, KPDE siP3/1'de hücre sayısı; 131 ve KPDE siP3/2'de hücre sayısı 111 olarak bulundu (Şekil 4.11 A1,2,3 ve B.).

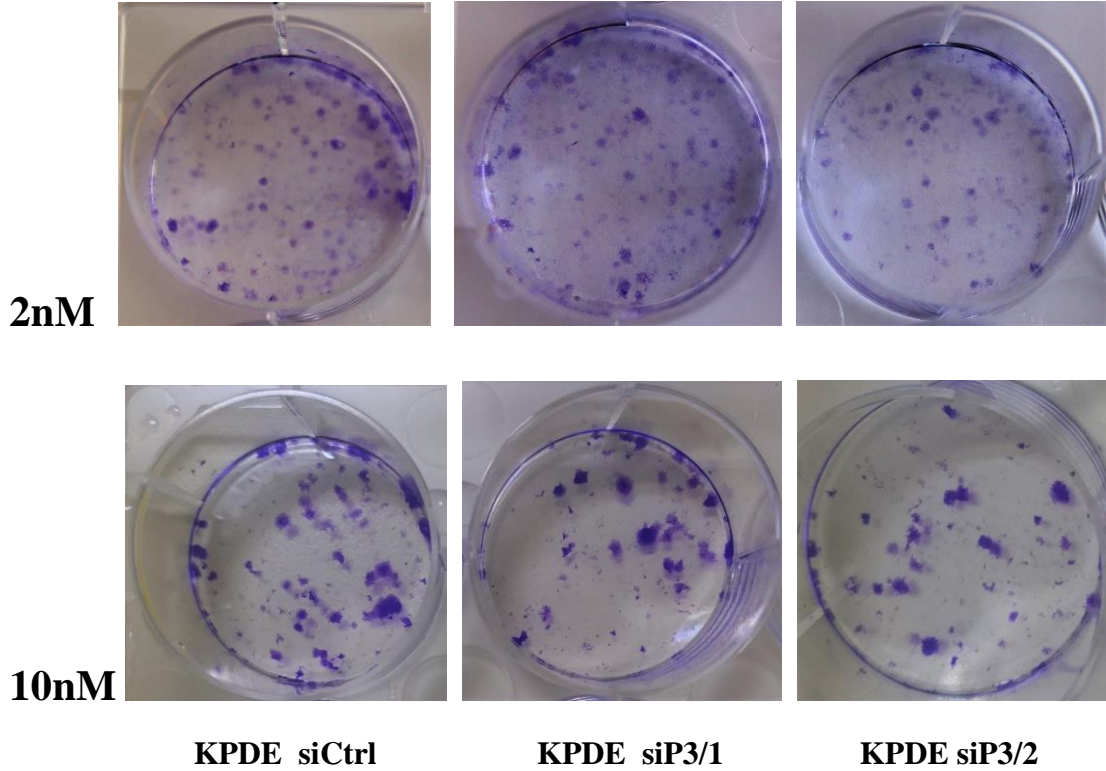


Şekil 4.11. A1,2,3. İnvaze olan KPDE hücreleri kristal violet ile boyanarak ışık mikroskopunda 10X büyütmede görüntülenerek rastgele bir alanın görüntüsü kaydedilmiştir. **B.** KPDE siCtrl: 293, KPDE siP3/1: 131 ve KPDE siP3/2: 111

4.4.4. PFKFB3'ün siRNA aracılı baskılanması KRAS^{G12D} mutasyonlu KPDE hücrelerinde Gempitabine duyarlılığı etkilemez.

Pankreas kanser tedavisinde sıklıkla gempitabin kullanılmaktadır ve ilaçlara direnç gelişimi kanser tedavisinde önemli bir sorundur. Hücrelerde endojen eksprese edilen PFKFB3'ün ilaç direncine etkisinin incelenmesi için siCtrl, siP3/1 ve siP3/2 siRNA uygulanarak PFKFB3 ekspresyonu baskılanmış, KPDE hücrelerine gempitabin uygulanarak hücrelerin koloni oluşturma kapasiteleri test edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra 6 kuyucuklu plakalara 2000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve ekimden 1 gün sonra kuyucuklara iki farklı konsantrasyon denemek amacıyla 10 nM ve 2 nM gempitabine eklendi. Besi yerleri ve ilaçlar 3 günde bir tazelendi. 10 gün sonunda hücreler

kristal viyole ile boyandı ve makroskobik olarak incelendi. İnceleme sonrası kontrol grubu ve siRNA aracılı PFKFB3 baskılanmış hücrelerde koloni oluşturma kapasitesi açısından bir fark saptanmadı (Şekil 4.12.).

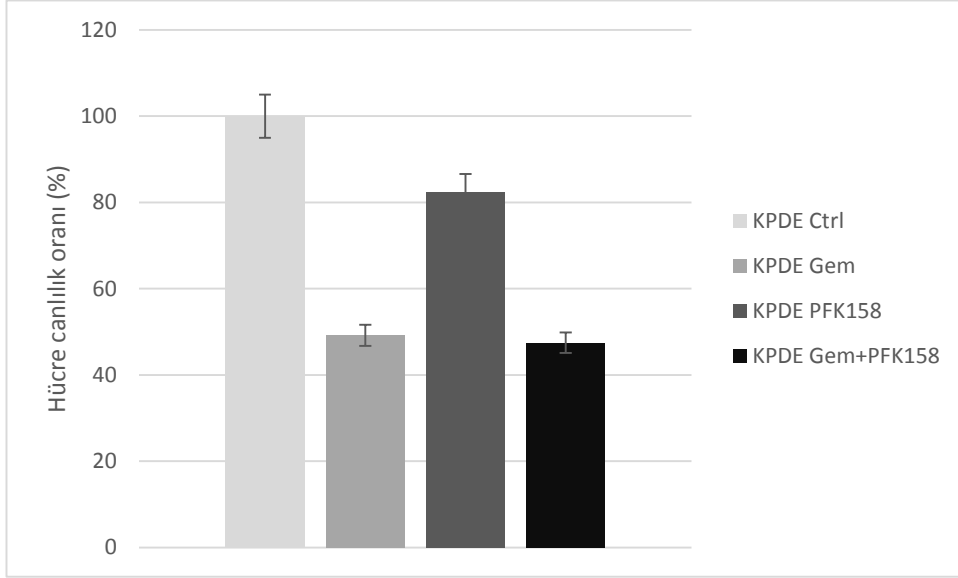


Şekil 4.12. Gemstabine uygulanmış KPDE hücrelerinde 10 gün sonundaki koloni görüntüleri.

4.4.5. PFK158 ile PFKFB3 baskılanması KRAS^{G12D} mutasyonlu KPDE hücrelerinde Gemsitabine duyarlılığı etkilemez.

Glikolizi azaltmak amacıyla PFKFB3'ü baskılamak için kullanılan yeni nesil ilaçlardan PFK158 birçok araştırmada kullanılmaktadır. Biz çalışmamızda PFK158 ile PFKFB3 baskılanmasının gemstabine duyarlılığı üzerine etkisi olup olmadığını araştırdık. Bu amaçla 96 kuyucuklu plakalara 3000 bin hücre olacak şekilde triplike ekim yapıldı. Bir gün sonra kontrol grubuna sadece besi yeri, referans grubuna 30 nM gemstabine, çalışma grubuna ise 30 nM gemstabine ve 2µM PFK158 eklendi. 72 saat sonra SRB boyama yöntemi ile hücreler boyanarak dansitometrik ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonuçlarında PFK158 ile PFKFB3 inhibisyonu, hücre canlılığını %82,5' a düşürmüştür. Gemstabin

kullanımı sonrası hücre canlılığı ise %49,4 iken, PFK158 ile inhibisyon sonrası gemstabin varlığında canlılık %47,5 olarak ölçüldü. PFK158 kullanımının gemstabine olan duyarlılığı etkilemediği izlendi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. PFK158 kullanımı hücrelerin gemstabine karşı olan dirençlerini etkilemez. PFK158 ile PFKFB3'ü baskılandıktan sonra hücre canlılığı %82,5'tur. Gemstabine kullanımı sonrası hücre canlılığı ise %49,2'ye düşerken, PFK158 inhibisyonu ve gemstabine varlığında canlılık %47,5'tur.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Tüm hücreler hayatlarının devamlılığı ve biyolojik süreçlerin gerçekleşmesi için enerjiye ihtiyaç duyarlar. Bu gereken enerjiyi ise glikozu metabolize ederek sağlamaktadırlar. Glikoliz, tüm canlılarda evrimsel olarak korunmuş basamaklardan biridir. Glikoliz sonucunda oluşan piruvat oksijen varlığında oksidatif fosforilasyona yönlendirilirken oksijenin yetersiz olduğu durumlarda laktik aside çevrilir (Kim ve Dang 2005, Kwon ve Vander Heiden 2011). Kanser hücreleri ise oksijen varlığında bile glikoliz ile laktik asit üretmekte ve glikolitik yolaktaki enzimleri aktif tutmaktadırlar. Bu etki Warburg etkisi olarak adlandırılmakta ve kanser hücrelerinin tipik özelliği olarak kabul edilmektedir (Gatenby ve Gillies 2004).

Glikolitik yolağın kilit enzimlerinden biri PFK1'dir. Bu enzim F6P'ı F1,6BP'ta indirger ve glikolitik sürecin hız belirleyici enzimi olarak çalışır (Sola-Penna ve ark. 2010). PFKFB enzim ailesi ise F2,6BP hücre içi konsantrasyonlarını düzenleyerek PFK1'in katalitik aktivasyonunu dengeleyen bir enzim ailesidir. Bu enzim ailesindeki üyelerin hücre içindeki ifadesi glikolitik yolağın yönetilmesinde önemli rol oynamaktadır (Pilkis ve ark. 1995).

PFKFB enzim ailesi üyelerinden PFKFB3 kinaz aktivitesi en yüksek olan izoformdur ve birçok kanser türünde yüksek derece ifade olarak glikolizi arttırdığı bilinmektedir (Shi ve ark. 2017) Ayrıca PFKFB3'ün pankreatik kanserde de fazlaca ifade olduğu gösterilmiştir (Bobarykina ve ark. 2006).

Pankreatik duktal adenokarsinom ise mortalite oranı en yüksek kanserlerden biridir ve PDA'ların %95'inde Kras mutasyonu izlenmektedir (Maitra ve ark. 2005). Ras proteinleri hücrelerin büyümesini, gelişmesini ve çoğalmasını sağlayan birçok sinyal yolağının düzenlenmesinden sorumludur ve hücre dışından aldığı uyarıları hücre içi sinyallerle dönüştüren bir proteindir (Takashima ve Faller 2013). Bu proteinlerin içinde Kras izoformu önemli bir yere sahiptir. Kras mutasyonlu hücrelerde glikoliz artmaktadır (Ying ve ark. 2012). Dolayısıyla bu hücrelerde glikolizi baskılamak tümör hücrelerinin büyümesini ve migrasyonunu baskılamaya yardımcı olacaktır. Bu çalışmanın amacı PFKFB3'ün Kras üzerindeki etkisini ve Kras mutasyonlu tümör hücrelerindeki onkojenik etkisinin izlenmesidir.

Çalışmada ilk olarak Kras mutasyonlu hücrelerde glikolizis ve hücre proliferasyonuna bakılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda Kras mutasyonlu hücre hattında (KPDE) glikoz alınımının, laktik asit üretiminin, F2,6BP miktarının ve proliferasyonun arttığı izlenmiştir. Kras mutasyonunun glikolitik yolaktaki bazı enzimlerin ifadesini artırarak glikolizisi arttırdığı ve proliferasyonu desteklediği bilinmektedir (Bryant ve ark. 2014). Ayrıca Kras mutasyonlu koleraktal kanser hücrelerinde proliferasyonu arttığı gösterilmiştir. (Liu ve ark. 2011).

Sonraki aşama olarak, Kras mutasyonlu hücrelerde PFKFB3 protein seviyesinin değişip değişmediğine bakılmıştır. PCR ve Western blot çalışmaları sonucunda PFKFB3 gen ve protein seviyesinin KRAS^{G12D} mutasyonlu hücrelerde yaklaşık 6 kat arttığı gözlenmiştir. KRAS^{G12D} mutasyonun PFKFB3 enziminin genetik olarak ifadesini arttırmaktadır. Daha önce Telang ve ark. (2006) yaptığı çalışmada H-ras mutasyonun PFKFB3 enzim seviyesini akciğer fibroblastlarında arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca Özcan (2018) tarafından yayınlanan doktora tezinde Kras mutasyonunun Pdac (Pnakreatik duktal adenokarsinom) hücre hattında PFKFB3 ifadesini ve protein miktarını arttırdığı ortaya konmuştur. Yapılan literatür araştırması sonucunda bir çalışmada da Kras mutasyonun pankreatik duktal adenokarsinomlarda PFKFB3'ü arttırdığı gösterilmiştir (Wang ve ark. 2020).

Bu çalışmada, PFKFB3'ün Kras mutasyonlu hücrelerde glikolizis üzerine ne gibi etkilerinin olacağını araştırmak üzere hücrelerin tükettiği glikoz miktarlarına bakılmıştır. PFKFB3'ün baskılandığı IPDE ve KPDE hücre hatlarında glikoz alınımında azalma izlenmiştir. Fakat IPDE hücrelerindeki azalma Kras mutasyonlu KPDE hücrelerine oranla yaklaşık %13 daha fazla olmuştur. Bu noktada dikkat edilmesi gereken hususlardan biri glikoz taşıyıcıların seviyeleridir. Çünkü Kras mutasyonlu hücrelerde GLUT1 proteinlerinin arttığı bilinmektedir ve pankreatik duktal adenokarsinomda GLUT1 seviyeleri ciddi oranda artmaktadır (Sharen ve ark. 2017, Ying ve ark. 2012). Dolayısıyla KRAS^{G12D} mutasyonlu hücrelerde glikoz alınımı mutasyon olmayan hücelere göre daha fazladır. Ayrıca pankreatik kanser hücreleri glutamini PFY'da ve TCA döngüsünde ara metabolit olarak kullanmaktadırlar. Dolayısıyla bölünme ve büyüme sırasında artan enerji ihtiyacını glutamini metabolize ederek karşılıyor olabilirler (Son et al., 2013).

Öte yandan glikoliz miktarının belirlenmesi amacıyla laktik asit miktarlarına bakılmış ve PFKFB3 baskılanmış Kras mutasyonlu hücrelerde laktik asit üretiminin mutasyon olmayanlara göre daha fazla azaldığı izlenmiştir. Bu sonuç Özcan (2018) tarafından yapılan çalışmalardan farklılık göstermektedir. Daha önce yapılan araştırmalarda Kras mutasyonlu hücrelerde PFK-1, HK ve LDH-A'nın seviyelerinin arttığı ve glikolizisin bu yolla arttığı gösterilmiştir (Ying ve ark. 2012). Dolayısıyla Kras mutasyonlu hücrelerde daha fazla baskılanmanın görülmesi, bu hücrelerde glikolitik akışın PFKFB3 üzerinden denetlenebilir olabileceğini düşündürmektedir.

Hücre içi F2,6BP miktarlarına bakıldığında Ras mutasyonlu hücrelerde bu metabolitin arttığı bulunmuştur (Telang ve ark. 2006). Bizim çalışmamızda da KPDE hücre hattında da F2,6BP seviyeleri oldukça artmış olarak izlenmiştir. KPDE hücre hattında PFKFB3 seviyelerinin arttığını düşünecek olursak bu beklenen sonuçlardan biridir. Dolayısıyla Kras mutasyonlu hücrelerde PFK1 enzimine pozitif bir geri bildirim olmakta ve enzim aktivitesi artarak glikoliz artmaktadır. Yaptığımız deneyler sonucunda PFKFB3'ün baskılanması F2,6BP miktarlarını büyük ölçüde azaltmakta ve bu azalış Kras mutasyonlu hücrelerde daha fazla olmaktadır. Yapılan bir çalışmada ise F2,6BP sentezinin tümör büyümesine ve hipoksiye glikolitik cevap için gerektiği ortaya konmuştur (Chesney ve ark. 2014). Dolayısıyla PFKFB3 ifadesinin baskılanması ile F2,6BP miktarının azaltılması, tümör büyümesini yavaşlatabilir ve olası bir ilaç hedefi olarak PFKFB3'ün inhibe edilmesi düşünülebilir.

Bir sonraki aşamada ise PFKFB3'ün tümör hücrelerinde canlılığı nasıl etkilediği incelenmiştir. Kras mutasyonu, tümör hücrelerinde canlılığı arttırmaktadır (Bryant ve ark. 2014). Ayrıca PFKFB3'ün Cdk'lar aracılığıyla F2,6BP miktarını arttırarak proliferasyonu arttırdığı yapılan araştırmayla gösterilmiştir (Yalcin ve ark. 2009). MAPkinazların da bu mekanizmada görev alabileceği ortaya sürülen diğer görüşlerden biridir (Bolaños 2013). PFKFB3'ün nazofaranjiyel karsinomda da proliferasyonu arttırdığı bildirilmiştir (Gu ve ark. 2017). Yaptığımız çalışmada Kras mutasyonlu hücrelerde hücre canlılığının oldukça arttığı ve PFKFB3'ün baskılanması sonucu canlılığın mutasyon olmayan hücrelerde değişmediği, Kras mutasyonlu hücrelerde ise azaldığı görülmüştür. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, Kras mutasyonlu hücrelerde hücre canlılığının PFKFB3 ve F2,6BP üzerinden artıyor olabileceği sonucuna varılmıştır.

Kras mutasyonlu hücrelerde PFKFB3'ün onkojenik transformasyona olan etkilerini gözlemlemek amacıyla ilk olarak yumuşak agar da koloni oluşturma deneyi yapılmıştır. Bu deney tümör hücrelerinin in vitro ortamdaki transformasyonlarını değerlendirmek için yapılan bir deneydir ve canlı ortamdaki mekanizmaya en yakın mekanizma olarak kabul edilmektedir. Telang ve ark. (2006) akciğer fibroblastlarıyla yaptığı çalışmada, PFKFB3 ifadesinin baskılanması sonucu yumuşak agar da koloni oluşmadığı dolayısıyla Ras mutasyonlu onkojenik özellikler için PFKFB3 ifadesi gerektiği gösterilmiştir. Fakat bizim gerçekleştirdiğimiz yumuşak agar deneyleri sonucunda PFKFB3'ün baskılanmasının yumuşak agar da koloni oluşturma kapasitesine bir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Burada göz önünde bulundurulması gereken noktalardan biri bizim kullandığımız izoformun farklı bir izoform olmasıdır. Telang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada H-ras mutasyonlu hücreleri kullanmışlardır. Dolayısıyla hücrelerde oluşan etkiler birbirinden farklı olabilir. İkinci önemli nokta ise, Telang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kalıcı genetik bir baskılama uygulamışlardır. Biz ise çalışmamızda geçici bir baskılama gerçekleştirdik. Bu geçici durum hücrelerin koloni oluşturma kapasitelerini baskılamaya yetmemiş olabilir. Son olarak da çalışan hücre hatlarının birbirinden farklı olması sonuçlar arasında değişikliğe neden olmuş olabilir. Hücrelerin kendi genetik özellikleri de koloni oluşturma kapasitelerini değiştirmektedir. Bu farklılıklar göz önüne alındığında tam bir kıyaslama yapabilmek pek de olası değildir.

Diğer bir neden olarak; PFKFB3'ün baskılanması ile glikolizis ve proliferasyon baskılandığı halde yumuşak agar da koloni oluşturma kapasitesinin değişmemesi, pankreatik duktal adenokarsinom hücrelerinin primer enerji kaynağı olarak oksidatif fosforilasyonu kullanıyor olmaları olabilir (Wylie ve ark. 2014). Dolayısıyla glikolizisi baskılamak tümör oluşturma kapasitesi için gereken enerjiyi engellemeye yetmiyor olabilir. Ayrıca besi yerinde bulunan glutaminin enerji için destek metabolit olarak görev aldığı göz önünde bulundurulmalıdır. Pankreatik duktal adenokarsinomlar, glutamini metabolize ederek pentoz fosfat yolağına ve TCA döngüsüne ara metabolit olarak kullanmaktadırlar (Son ve ark. 2013) Dolayısıyla PFY yeni hücre oluşması için gereken nükleotid yapı taşıyı sağlarken TCA döngüsünde oksidatif fosforilasyonun devamlılığını sağlamaktadır.

Onkojenik transformasyonda görülen etkiyi araştırmak için yaptığımız diğer çalışma ise matrijel invazyon deneyidir. Bu deneyde ise hücrelerin invazyon kapasitelerine bakılmaktadır ve pankreatik duktal adenokarsinom gibi agresif tümörlerin invazyon özellikleri çok yüksektir. Dolayısıyla bir kanser türünde invazyon kapasitesini baskılamak tümörün yayılma hızını ve kabiliyetini etkileyecektir. Yalçın ve ark. (2017) yaptığı bir çalışmada TGF- β aracılı PFKFB3 ifadesinin invazyonu indüklediğini göstermiştir. Bizim bulduğumuz sonuçlarda bu bulguyu destekler yöndedir. Kras mutasyonlu hücreler ile yaptığımız deneyler sonucunda PFKFB3 baskıladığımız hücrelerin invazyon kapasitelerinin azaldığı gözlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada da PFKFB3 susturulmasının glikoz alınımı, glikolizi ve proliferasyonu Kras mutasyonlu hücrelerde baskıladığını fakat bu baskılanmanın p38 γ ile ilişkili olduğu ve p38 γ susturulmuş farelerde bu etkinin görülmediği bildirilmiştir (F. Wang ve ark. 2020).

PFKFB enzimlerinin kanser biyolojisindeki yerinin önemi anlaşıldıktan sonra bu enzimlerin baskılanması için çeşitli ilaçlar geliştirmeye başlanmıştır. Bu ilaçları geliştirmekteki amaç, PFKFB enzimlerini baskılayarak glikolizisi azaltmak ve tümör gelişimini yavaşlatmaktır. Biz çalışmamızda PFKFB3'ü baskılamak için 3. nesil ilaç olan PFK-158'i kullandık. PFK-158 insanlarda ilk kullanılan, klinik açıdan hala gelişmekte olan ve iyi tolöre edilebilen bir PFKFB3 inhibitörüdür (Redman ve ark. 2015). Yapılan çalışmalarda PFKF-158'in jinekolojik kanserlerde, kanser hücrelerinde hücre ölümünü indüklediği ve endometriyal kanserlerde hücre proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Mondal ve ark. 2019, Xiao ve ark. 2021). Ayrıca Wang ve ark. (2020) yaptığı çalışmada da bir başka PFKFB3 inhibitörü olan PFK15'in koloni oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir.

Bizim deneyimizdeki amaç, ilaç kullanılan durumlarda koloni oluşturma kapasitesinin azalıp azalmadığını gözlemlemektir. 6 kuyucuklu plakalara 2000 hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve kontrol grubu ile birlikte belirlenen dozlarda ilaçlarla 10 gün sonraki koloni oluşturma kapasitelerine bakılmıştır ve deney sonucunda Kras mutasyonlu hücrelerde PFK158 varlığında koloni oluşturma kapasitelerinde bir fark izlenmemiştir. Ayrıca PFK158 varlığı hücrelerin gemstabine karşı olan dirençlerini de etkilememiştir. PFK158 ile PFKFB3 baskılanan hücreler ile baskılanmayan hücreler arasında canlılık

yüzdesi açısından bir fark saptanmamıştır. Boyd ve ark. (2015) yaptığı çalışmada, PFK158'in PFKFB3'ün kinaz aktivitesini baskılamada çok da etkili olmadığı gösterilmiştir. Dolayısıyla hala PFKFB3 için daha spesifik ve potent bir inhibitör ihtiyacı bulunmaktadır.

Elde ettiğimiz sonuçları topluca değerlendirecek olursak yapılan bu çalışmada, (i) Kras mutasyonlu pankreatik duktal adenokarsinom hücrelerinde PFKFB3 mRNA ve protein seviyelerinin arttığı (ii) Kras mutasyonlu hücrelerde glikolizis ve hücre canlılığının PFKFB3 üzerinden denetlenebiliyor olabileceği (iii) Kras mutasyonlu hücrelerde PFKFB3'ü baskılamanın invazyonu azalttığı (iv) PFKFB3'ü baskılamanın koloni oluşturma kapasitesini etkilemediği ve son olarak (v) PFK158 ile inhibisyon sonucunda Kras mutasyonlu hücrelerin Gemstabile karşı olan direncinin değişmediği gösterilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, Kras mutasyonlu kanser hücrelerinde PFKFB3 baskılanması olası bir ilaç hedefi olarak düşünülebilir. Tabi ki bu sonuçların in vivo ortamda yapılacak ileri faz deneyleri ile desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Achari, A., Marshall, S. E., Muirhead, H., Palmieri, R. H., & Noltmann, E. A. 1981.** Glucose-6-phosphate isomerase. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 293(1063): 145–157.
- Adeva-Andany, M., López-Ojén, M., Funcasta-Calderón, R., Ameneiros-Rodríguez, E., Donapetry-García, C., Vila-Altesor, M., Rodríguez-Seijas, J. 2014.** Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion*, 17: 76–100.
- Ando, M., Uehara, I., Jogure, K., Asano, Y., Nakajima, W., Ave, Y., Kawauchi, K., Tanaka, N. 2010.** Interleukin 6 Enhances Glycolysis through Expression of the Glycolytic Enzymes Hexokinase 2 and 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase-3. *J Nippon Med Sch*, 77(2): 97–105.
- Appels, N. M. G. M., Beijnen, J. H., Schellens, J. H. M. 2005.** Development of Farnesyl Transferase Inhibitors: A Review. *The Oncologist*, 10(8): 565–578.
- Atsumi, T., Chesney, J., Metz, C., Leng, L., Donnelly, S., Makita, Z., Mitchell, R., Bucala, R. 2002.** High Expression of Inducible 6-Phosphofructo-2-Kinase / Fructose-2,6-Bisphosphatase. *Cancer Research*, 62: 5881–5887.
- Augustin, R. 2010.** The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life*, 62(5): 315–333.
- Barros-Filho, M. C., de Lima, L. B. M., Dos Reis, M. B., de Mello, J. B. H., Beltrami, C. M., Pinto, C. A. L., Kowalski, L. P., Rogatto, S. R. 2019.** PFKFB2 promoter hypomethylation as recurrence predictive marker in well-differentiated thyroid carcinomas. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6): 1–13.
- Barthel, A., Okino, S. T., Liao, J., Nakatani, K., Li, J., Whitlock, J. P., Roth, R. A. 1999.** Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. *Journal of Biological Chemistry*, 274(29): 20281–20286.
- Bartrons, R., Rodríguez-García, A., Simon-Molas, H., Castaño, E., Manzano, A., Navarro-Sabaté, À. 2018.** The potential utility of PFKFB3 as a therapeutic target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 22(8): 659–674.
- Blake, C. C., Rice, D. W. 1981.** Phosphoglycerate kinase. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 293(1063): 93–104.
- Blakemore, S. J., Aledo, J. C., James, J., Campbell, F. C., Lucoco, J. M., Hundal, H. S. 1995.** The GLUT5 hexose transporter is also localized to the basolateral membrane of the human jejunum. *Biochemical Journal*, 309(1): 7–12.
- Bobarykina, A. Y., Minchenko, D. O., Opentanova, I. L., Moenner, M., Caro, J., Esumi, H., Minchenko, O. H. 2006.** Hypoxic regulation of PFKFB-3 and PFKFB-4 gene expression in gastric and pancreatic cancer cell lines and expression of PFKFB genes in gastric cancers. *Acta Biochimica Polonica*, 53(4): 789–799.

Bolaños, J. P. 2013. Adapting glycolysis to cancer cell proliferation: The MAPK pathway focuses on PFKFB3. *Biochemical Journal* 452(3): 10–12.

Bos, J. L. 1988. The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 195(3): 255–271.

Boyd, S., Brookfield, J., Critchlow, S. E., Cumming, I., Curtis, N., Debreczeni, J., Degorce, L., Donald, C., Evans, N. J., Groombridge, S., Hopcroft, P., Jones, N., Grant, J., Lamont, S., Lewis, H., Macfaul, P. A., Mcloughlin, S., Rigoreau, L., Smith, J., Wingfield, J. 2015. Structure-based design of potent and selective inhibitors of the metabolic kinase PFKFB3. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(8): 3611–3625.

Bryant, K. L., Mancias, J. D., Kimmelman, A. C., Der, C. J. 2014. KRAS: Feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(2): 91–100.

Buehner, M., Ford, G. C., Moras, D., Olsen, K. W., Rossmant, M. G. 1973. D-Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase: Three-Dimensional Structure and Evolutionary Significance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(11): 3052–3054.

Calvo, M. N., Bartrons, R., Castaño, E., Perales, J. C., Navarro-Sabaté, A., Manzano, A. 2006. PFKFB3 gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay and inhibits anchorage-independent growth in HeLa cells. *FEBS Letters*, 580(13): 3308–3314.

Chen, L., Zhao, J., Tang, Q., Li, H., Zhang, C., Yu, R., Zhao, Y., Huo, Y., Wu, C. 2016. PFKFB3 Control of Cancer Growth by Responding to Circadian Clock Outputs. *Scientific Reports*, 6: 1–12.

Chesney, J., Clark, J., Klarer, A. C., Imbert-Fernandez, Y., Lane, A. N., Telang, S. 2014. Fructose-2,6-bisphosphate synthesis by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 (PFKFB4) is required for the glycolytic response to hypoxia and tumor growth. *Oncotarget*, 5(16): 6670–6686.

Chesney, J., Clark, J., Lanceta, L., Trent, J. O., Telang, S. 2015. Targeting the sugar metabolism of tumors with a first-in-class 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB4) inhibitor. *Oncotarget*, 6(20), 18001–18011.

Cheung, S. T., Wong, S. Y., Leung, K. L., Chen, X., So, S., Ng, I. O., Fan, S. T. 2004. Granulin-epithelin precursor overexpression promotes growth and invasion of hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10(22): 7629–7636.

Ciampi, R., Vivaldi, A., Romei, C., Del Guerra, A., Salvadori, P., Cosci, B., Pinchera, A., Elisei, R. 2008. Expression analysis of facilitative glucose transporters (GLUTs) in human thyroid carcinoma cell lines and primary tumors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 291(1–2): 57–62.

Cohen, P., Rosemeyer, M. A. 1969. Subunit Interactions of Glucose- 6- Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocytes. *European Journal of Biochemistry*, 8(1): 8–15.

Cohen, R. D., Roy, S. 1975. Lactate Metabolism. *Anesthesiology*, 43(6), 661–673.

Collins, M. A., Bednar, F., Zhang, Y., Brisset, J. C., Galbán, S., Galbán, C. J., Rakshit, S., Flannagan, K. S., Adsay, N. V., Pasca Di Magliano, M. 2012. Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 122(2): 639–653.

Dasgupta, S., Rajapakshe, K., Zhu, B., Nikolai, C. B., Yi, P., Putluri, N., Choi, M. J., Jung, Y. S., Coarfa, C., Westbrook, F. T., Zhang, H.-F. X., Foulds, E. C., Tsai, Y. S., Tsai, M.-J., O'Malley, W. B. 2018. Metabolic enzyme PFKFB4 activates transcriptional coactivator SRC-3 drive breast cancer. *Nature*, 10(1): 249-254

De Bock, K., Georgiadou, M., Schoors, S., Kuchnio, A., Wong, B. W., Cantelmo, A. R., Quaegebeur, A., Ghesquière, B., Cauwenberghs, S., Eelen, G., Phng, L. K., Betz, I., Tembuyser, B., Brepoels, K., Welti, J., Geudens, I., Segura, I., Cruys, B., Bifari, F., Carmeliet, P. 2013. Role of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell*, 154(3): 651–663.

Deberardinis, R. J., Cheng, T. 2010. Q's next: The diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*, 29(3): 313–324.

Doménech, E., Maestre, C., Esteban-Martínez, L., Partida, D., Pascual, R., Fernández-Miranda, G., Seco, E., Campos-Olivas, R., Pérez, M., Megias, D., Allen, K., López, M., Saha, A. K., Velasco, G., Rial, E., Méndez, R., Boya, P., Salazar-Roa, M., Malumbres, M. 2015. AMPK and PFKFB3 mediate glycolysis and survival in response to mitophagy during mitotic arrest. *Nature Cell Biology*, 17(10): 1304–1316.

Dong, J., Lu, Z.-T., Li, Y.-Q., Liang, Z.-Y., Zhang, P.-F., Li, C., Zhang, J.-L., Zheng, X., Yao, Y.-M. 2014. MACC1 expression correlates with PFKFB2 and survival in hepatocellular carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(2): 999–1003.

Dupriez, V. J., Darville, M. I., Antoine, I. V., Gegonne, A., Ghysdael, J., Rousseau, G. G. 1993. Characterization of a hepatoma mRNA transcribed from a third promoter of a 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-encoding gene and controlled by ets oncogene-related products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(17): 8224–8228.

Eventoff, W., Rossmann, M. G., Taylor, S. S., Torff, H. J., Meyer, H., Keil, W., Kiltz, H. H. 1977. Structural adaptations of lactate dehydrogenase isozymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(7): 2677–2681.

Feng, Y., Wu, L. 2017. mTOR up-regulation of PFKFB3 is essential for acute myeloid leukemia cell survival. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(2): 897–

Feron, O. 2009. Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiotherapy and Oncology*, 92(3): 329–333.

Figueiredo, A. L., Maczkowiak, F., Borday, C., Pla, P., Sittewelle, M., Pegoraro, C., Monsoro-Burq, A. H. 2017. PFKFB4 control of AKT signaling is essential for

pre migratory and migratory neural crest formation. *Development (Cambridge)*, 144(22): 4183–4194.

Frauwirth, K. A., Riley, J. L., Harris, M. H., Parry, R. V., Rathmell, J. C., Plas, D. R., Elstrom, R. L., June, C. H., Thompson, C. B. 2002. The CD28 Signaling Pathway Regulates Glucose Metabolism ability of resting cells to take up and utilize nutrients at levels sufficient to maintain viability. *Immunity*, 16(6): 769–777.

Fridman, R., Giaccone, G., Kanemoto, T., Martin, G. R., Gazdar, A. F., Mulshine, J. L. 1990. Reconstituted basement membrane (matrigel) and laminin can enhance the tumorigenicity and the drug resistance of small cell lung cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(17): 6698–6702.

Fukumoto, H., Seino, S., Imura, H., Seino, Y., Eddy, R. L., Fukushima, Y., Byers, M. G., Shows, T. B., Bell, G. I. 1988. Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(15): 5434–5438.

Gatenby, R. A., Gillies, R. J. 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer*, 4(11): 891–899.

Gerlinger, M., Santos, C. R., Spencer-Dene, B., Martinez, P., Endesfelder, D., Burrell, R. A., Vetter, M., Jiang, M., Saunders, R. E., Kelly, G., Dykema, K., Rioux-Leclercq, N., Stamp, G., Patard, J. J., Larkin, J., Howell, M., Swanton, C. 2012. Genome-wide RNA interference analysis of renal carcinoma survival regulators identifies MCT4 as a Warburg effect metabolic target. *Journal of Pathology*, 227(2): 146–156.

Gibson, G. E., Blass, J. P., Beal, M. F., Bunik, V. 2005. The α -Ketoglutarate – Dehydrogenase Complex. *Molecular Neurobiology*, 31: 43–63.

Grüning, N. M., Du, D., Keller, M. A., Luisi, B. F., Ralser, M. 2014. Inhibition of triosephosphate isomerase by phosphoenolpyruvate in the feedback-regulation of glycolysis. *Open Biology*, 4: 1-11

Gu, M., Li, L., Zhang, Z., Chen, J., Zhang, W., Zhang, J., Han, L., Tang, M., You, B., Zhang, Q., You, Y. 2017. PFKFB3 promotes proliferation, migration and angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma. *Journal of Cancer* 8(18): 3887–3896.

Gysin, S., Salt, M., Young, A., McCormick, F. 2011. Therapeutic strategies for targeting Ras proteins. *Genes and Cancer*, 2(3): 359–372.

Hasawi, N. Al, Alkandari, M. F., Luqmani, Y. A. 2014. Phosphofructokinase: A mediator of glycolytic flux in cancer progression. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 92(3): 312–321

Heinrich, P. C., Morris, H. P., Weber, G. 1976. Behavior of Transaldolase (EC 2 . 2 . 1 . 2) and Transketolase (EC 2.2.1.1) Activities in Normal , Neoplastic , Differentiating , and Regenerating Liver. *Cancer Research*, 36: 3189–3197.

Hers, H. G., Van Schaftingen, E. 1982. Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its

discovery. *The Biochemical Journal*, 206(1): 1–12.

Hidalgo, M. 2010. Pancreatic Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 362: 1605–1617.

Hirschhaeuser, F., Sattler, U. G. A., Mueller-Klieser, W. 2011. Lactate: A metabolic key player in cancer. *Cancer Research*, 71(22): 6921–6925.

Houddane, A., Bultot, L., Novellademunt, L., Johanns, M., Gueuning, M. A., Vertommen, D., Coulie, P. G., Bartrons, R., Hue, L., Rider, M. H. 2017. Role of Akt/PKB and PFKFB isoenzymes in the control of glycolysis, cell proliferation and protein synthesis in mitogen-stimulated thymocytes. *Cellular Signalling*, 34: 23–37.

Houles, T., Gravel, S. P., Lavoie, G., Shin, S., Savall, M., Meant, A., Grondin, B., Gaboury, L., Yoon, S. O., St-Pierre, J., Roux, P. P. 2018. RSK regulates PFK-2 activity to promote metabolic rewiring in melanoma. *Cancer Research*, 78(9): 2191–2204.

Huang, S., Czech, M. P. 2007. The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metabolism*, 5(4): 237–252.

Hui, S., Ghergurovich, J. M., Morscher, R. J., Jang, C., Teng, X., Esparza, L. A., Reya, T., Zhan, L., Guo, Y., White, E., Rabinowitz, J. D. 2018. Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. *Nature*, 551(7678): 115–118.

Ibberson, M., Uldry, M., Thorens, B. 2000. GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 275(7): 4607–4612.

Illsley, N. P. 2000. Glucose transporters in the human placenta. *Placenta*, 21(1): 14–22.

Imbert-Fernandez, Y., Clem, B. F., O’Neal, J., Kerr, D. A., Spaulding, R., Lanceta, L., Clem, A. L., Telang, S., Chesney, J. 2014. Estradiol stimulates glucose metabolism via 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3). *Journal of Biological Chemistry*, 289(13): 9440–9448.

Jiang, P., Du, W., Wu, M. 2014. Regulation of the pentose phosphate pathway in cancer. *Protein and Cell*, 5(8):1–11.

Johnson, J. D., Muhonen, W. W., Lambeth, D. O. 1998. Characterization of the ATP- and GTP-specific succinyl-CoA synthetases in pigeon: The enzymes incorporate the same α -subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 273(42): 27573–27579.

Kerr, C. A., Dunne, R., Hines, B. M., Zucker, M., Cosgrove, L., Ruszkiewicz, A., Lockett, T., Head, R. 2009. Measuring the combinatorial expression of solute transporters and metalloproteinases transcripts in colorectal cancer. *BMC Research Notes*, 2: 1–7.

Kessler, R., Eschrich, K. 2001. Splice isoforms of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in human brain. *Molecular Brain Research*, 87(2): 190–195.

Kim, J. W., Dang, C. V. 2005. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(3): 142–150.

Klarer, A. C., O’Neal, J., Imbert-Fernandez, Y., Clem, A., Ellis, S. R., Clark, J., Clem, B., Chesney, J., Telang, S. 2014. Inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) induces autophagy as a survival mechanism. *Cancer and Metabolism*, 2(1): 1–14.

Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C. D., Biankin, A. V., Neale, R. E., Tempero, M., Tuveson, D. A., Hruban, R. H., Neoptolemos, J. P. 2016. Pancreatic cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 2: 1–23.

Koptyra, M., Falinski, R., Nowicki, M. O., Stoklosa, T., Majsterek, I., Nieborowska-Skorska, M., Blasiak, J., Skorski, T. 2006. BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. *Blood*, 108(1): 319–327.

Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M., Dolznig, H. 2013. In vitro cell migration and invasion assays. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 752(1): 10–24.

Krebs, H. A., Holzach, O. 1952. The conversion of citrate into cis-aconitate and isocitrate in the presence of aconitase. *The Biochemical Journal*, 52(3): 527–528.

Krebs, H. A., Johnson, W. A. 2014. The Role of Citric Acid in Intermediate Metabolism in Animal Tissues. *A Source Book in Chemistry, 1900-1950*, 117: 383–390.

Kwon, K. Y., & Vander Heiden, G. M. 2011. Aerobic Glycolysis: Meeting Requirements of Cell Proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1): 441–464.

Lea, M. A., Altayyar, M., DesBORDES, C. 2015. Inhibition of growth of bladder cancer cells by 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one in combination with other compounds affecting glucose metabolism. *Anticancer Research*, 35(11): 5889–5899.

Lee, Y. H., Li, Y., Uyeda, K., Hasemann, C. A. 2003. Tissue-specific structure/function differentiation of the liver isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1): 523–530.

Li, H. M., Yang, J. G., Liu, Z. J., Wang, W. M., Yu, Z. L., Ren, J. G., Chen, G., Zhang, W., Jia, J. 2017. Blockage of glycolysis by targeting PFKFB3 suppresses tumor growth and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 36(1): 1–12.

Li, Q., Manolescu, A., Ritzel, M., Yao, S., Slugoski, M., Young, J. D., Chen, X. Z., Cheeseman, C. I. 2004. Cloning and functional characterization of the human GLUT7 isoform SLC2A7 from the small intestine. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287(1 50-1): 236–242.

Liberti, M. V., Locasale, J. W. 2016. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3, SI): 287.

- Lin, R. Y., Vera, J. C., Chaganti, R. S. K., Golde, D. W. 1998.** Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 273(44), 28959–28965.
- Lindqvist, Y., Schneider, G., Ermler, U., Sundstrom, M. 1992.** Three-dimensional structure of transketolase, a thiamine diphosphate dependent enzyme, at 2.5Å resolution. *EMBO Journal*, 11(7): 2373–2379.
- Liu, X., Jakubowski, M., Hunt L. J., 2011.** Kras gene mutation in colorectal cancer is correlated with increased proliferation and spontaneous apoptosis. *Anatomic Pathology*, 135: 245-252.
- Lypova, N.M., Minchenko, D.M., Kubaichuk K.I., Minchenko, O. H. 2003.** Expression Of 6-Phosphofructokinase/Fructose-2,6bisphosphatas-1 And -2 And Its Unique Alternative Splice Variants In U87 Glioma Cells With Ern1 Loss Of Function. *Physics of the Alive*, 19(212): 40-51.
- Maitra, A., Fukushima, N., Takaori, K., Hruban, R. H. 2005.** Precursors to invasive pancreatic cancer. *Advances in Anatomic Pathology*, 12(2): 81–91.
- Maitra, A., Hruban, R. H. 2008.** Pancreatic cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 3(2): 157–188.
- Manolescu, A. R., Witkowska, K., Kinnaird, A., Cessford, T., Cheeseman, C. 2007.** Facilitated hexose transporters: New perspectives on form and function. *Physiology*, 22(4), 234–240.
- Martínez-Reyes, I., Chandel, N. S. 2020.** Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature Communications*, 11(1): 1–11.
- Martínez-Reyes, I., Diebold, L. P., Kong, H., Schieber, M., Huang, H., Hensley, C. T., Mehta, M. M., Wang, T., Santos, J. H., Woychik, R., Dufour, E., Spelbrink, J. N., Weinberg, S. E., Zhao, Y., DeBerardinis, R. J., Chandel, N. S. 2016.** TCA Cycle and Mitochondrial Membrane Potential Are Necessary for Diverse Biological Functions. *Molecular Cell*, 61(2): 199–209.
- Massie, C. E., Lynch, A., Ramos-Montoya, A., Boren, J., Stark, R., Fazli, L., Warren, A., Scott, H., Madhu, B., Sharma, N., Bon, H., Zecchini, V., Smith, D. M., Denicola, G. M., Mathews, N., Osborne, M., Hadfield, J., MacArthur, S., Adryan, B., Mills, I. G. 2011.** The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *EMBO Journal*, 30(13): 2719–2733.
- Mazurek, S., Boschek, C. B., Hugo, F., Eigenbrodt, E. 2005.** Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. *Seminars in Cancer Biology*, 15(4): 300–308.
- McCall, A. L., Van Bueren, A. M., Moholt-Siebert, M., Cherry, N. J., Woodward, W. R. 1994.** Immunohistochemical localization of the neuron-specific glucose transporter (GLUT3) to neuropil in adult rat brain. *Brain Research*, 659(1–2): 292–297.
- McVie-Wylie, A. J., Lamson, D. R., Chen, Y. T. 2001.** Molecular cloning of a novel

member of the GLUT family of transporters, SLC2A10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: A candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics*, 72(1): 113–117.

Mendoza, E. E., Pocceschi, M. G., Kong, X., Leeper, D. B., Caro, J., Limesand, K. H., Burd, R. 2012. Control of glycolytic flux by AMP-activated protein kinase in tumor cells adapted to low pH. *Translational Oncology*, 5(3): 208–216.

Mewies, M., McIntire, W. S., Scrutton, N. S. 1998. Covalent attachment of flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN) to enzymes: The current state of affairs. *Protein Science*, 7(1): 7–20.

Minchenko, O. H., Ogura, T., Opentanova, I. L., Minchenko, D. O., Ochiai, A., Caro, J., Komisarenko, S. V., Esumi, H. 2005. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family overexpression in human lung tumor. *Ukrain'skyi Biokhimichniy Zhurnal*, 77(6): 46–50.

Minchenko, O., Opentanova, I., Caro, J. 2003. Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Letters*, 554(3): 264–270.

Minchenko, O., Opentanova, I., Minchenko, D., Ogura, T., Esumi, H. 2004. Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 gene via hypoxia-inducible factor-1 α activation. *FEBS Letters*, 576(1–2): 14–20.

Minchenko, Oleksandr H., Tsuchihara, K., Minchenko, D. O., Bikfalvi, A., Esumi, H. 2014. Mechanisms of regulation of PFKFB expression in pancreatic and gastric cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 20(38): 13705–13717.

Mondal, S., Roy, D., Sarkar Bhattacharya, S., Jin, L., Jung, D., Zhang, S., Kalogera, E., Staub, J., Wang, Y., Xuyang, W., Khurana, A., Chien, J., Telang, S., Chesney, J., Tapolsky, G., Petras, D., Shridhar, V. 2019. Therapeutic targeting of PFKFB3 with a novel glycolytic inhibitor PFK158 promotes lipophagy and chemosensitivity in gynecologic cancers. In *International Journal of Cancer* 144(1): 178–189.

Moon, J. S., Jin, W. J., Kwak, J. H., Kim, H. J., Yun, M. J., Kim, J. W., Park, S. W., Kim, K. S. 2011. Androgen stimulates glycolysis for de novo lipid synthesis by increasing the activities of hexokinase 2 and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 2 in prostate cancer cells. *Biochemical Journal*, 433(1): 225–233.

Mor, I., Cheung, E. C., Vousden, K. H. 2011. Control of glycolysis through regulation of PFK1: Old friends and recent additions. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 76: 211–216.

Mueckler, M., Weng, W., Kruse, M. 1994. Glutamine 161 of Glut1 glucose transporter is critical for transport activity and exofacial ligand binding. *Journal of Biological Chemistry*, 269(32): 20533–20538.

Muirhead, H., Clayden, D. A., Barford, D., Lorimer, C. G., Fothergill-Gilmore, L. A., Schiltz, E., Schmitt, W. 1986. The structure of cat muscle pyruvate kinase. *The*

EMBO Journal, 5(3): 475–481.

Mulukutla, B. C., Yongky, A., Le, T., Mashek, D. G., Hu, W. S. 2016. Regulation of Glucose Metabolism – A Perspective From Cell Bioprocessing. *Trends in Biotechnology*, 34(8): 638–651.

Mykhalchenko, V. G., Minchenko, D. O., Tsuchihara, K., Moenner, M., Komisarenko, S. V., Bikfalvi, A., Esumi, H., Minchenko, O. H. 2008. Expression of mouse 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 mRNA alternative splice variants in hypoxia. *Ukrain'skyi Biokhimichnyi Zhurnal*, 80(1): 1–25.

Navarro-Sabaté, A., Manzano, A., Riera, L., Rosa, J. L., Ventura, F., Bartrons, R. 2001. The human ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (PFKFB3): Promoter characterization and genomic structure. *Gene*, 264(1): 131–138.

Navas, C., Hernández-Porras, I., Schuhmacher, A. J., Sibilia, M., Guerra, C., Barbacid, M. 2012. EGF Receptor Signaling Is Essential for K-Ras Oncogene-Driven Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell*, 22(3): 318–330.

Novellademunt, L., Bultot, L., Manzano, A., Ventura, F., Rosa, J. L., Vertommen, D., Rider, M. H., Navarro-Sabate, A., Bartrons, R. 2013. PFKFB3 activation in cancer cells by the p38/MK2 pathway in response to stress stimuli. *Biochemical Journal*, 452(3): 531–543.

Novellademunt, L., Obach, M., Millán-ariño, L., Manzano, A., Ventura, F., Rosa, J. L., Jordan, A., Navarro-Sabate, A., Bartrons, R. 2012. Progestins activate 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3) in breast cancer cells. *Biochemical Journal*, 442(2): 345–356.

Okar, D. A., Lange, A. J., Manzano, A., Navarro-Sabatè, A., Riera, L., Bartrons, R. 2001. PFK-2/FBPase-2: Maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1): 30–35.

Özcan, S. C., 2018. Pankreas Epitel Hücrelerinin Onkogenik Transformasyonunda PFKFB2'nin Rolü. *Doktora Tezi*, UÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veterinerlik Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Bursa.

Patel, M. S., Korotchkina, L. G. 2006. Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochemical Society Transactions*, 34(2): 217–222.

Patra, C. K., Hay, N. 2014. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(8): 1–7.

Patra, K. C., Wang, Q., Bhaskar, P. T., Miller, L., Wang, Z., Chandel, N., Laakso, M., Muller, W. J., Allen, E. L., Jha, K., Smolen, G. A., Clasquin, M. F., Robey, B. 2014. Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance in mouse models of cancer. *Cancer Cell*, 24(2), 213–228.

Peng, F., Li, Q., Sun, J.-Y., Chen, M., Bao, Y. 2018. PFKFB3 is involved in breast cancer proliferation, migration, invasion and angiogenesis. *International Journal of*

Oncology, 52(3): 945–954.

Penhoet, E., T. R., Rutter, W. T. 1966. Multiple Forms Of Fructose Disphosphate Aldolase In Mammalian Tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1275–1282.

Pilkis, S. J., Lively, M. O., el-Maghrabi, M. R. 1987. Active site sequence of hepatic fructose-2,6-bisphosphatase. Homology in primary structure with phosphoglycerate mutase. *Journal of Biological Chemistry*, 262(26): 12672–12675.

Pilkis, Simon J., Claus, T. H., Kurland, I. J., Lange, A. J. 1995. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: A metabolic signaling enzyme. *Annual Review of Biochemistry*, 64: 799–835.

Prior, I. A., Lewis, P. D., Mattos, C. 2012. A comprehensive survey of ras mutations in cancer. *Cancer Research*, 72(10): 2457–2467.

Qian, X., Xu, W., Xu, J., Shi, Q., Li, J., Weng, Y., Jiang, Z., Feng, L., Wang, X., Zhou, J., Jin, H. 2017. Enolase 1 stimulates glycolysis to promote chemoresistance in gastric cancer. *Oncotarget*, 8(29), 47691–47708.

Rajalingam, K., Schreck, R., Rapp, U. R., Albert, Š. 2007. Ras oncogenes and their downstream targets. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1773(8): 1177–1195.

Reddy, M. M., Fernandes, M. S., Deshpande, A., Weisberg, E., Inguilizian, H. V., Abdel-Wahab, O., Kung, A. L., Levine, R. L., Griffin, J. D., Sattler, M. 2012. The JAK2V617F oncogene requires expression of inducible phosphofructokinase/fructose-bisphosphatase 3 for cell growth and increased metabolic activity. *Leukemia*, 26(3): 481–489.

Richardson, D. A., Sultan, A., Sritangos, P., James, A., Bruce, J. I. E. 2020. Metabolic regulation of calcium pumps in pancreatic ductal adenocarcinoma: role of phosphofructokinase-fructose-bisphosphatase-3 (PFKFB3). *Cancer & Metabolism*, 8(2): 1–11.

Rider, M. H., Bertrand, L., Vertommen, D., Michels, P. A., Rousseau, G. G., Hue, L. 2004. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: Head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochemical Journal*, 381(3): 561–579.

Riganti, C., Gazzano, E., Polimeni, M., Aldieri, E., Ghigo, D. 2012. The pentose phosphate pathway: An antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(3): 421–436.

Ritzhaupt, A., Wood, I. S., Ellis, A., Hosie, K. B., Shirazi-Beechey, S. P. 1998. Identification and characterization of a monocarboxylate transporter (MCT1) in pig and human colon: Its potential to transport L-lactate as well as butyrate. *Journal of Physiology*, 513(3): 719–732.

Rogers, S., Docherty, S. E., Slavin, J. L., Henderson, M. A., Best, J. D. 2003.

Differential expression of GLUT12 in breast cancer and normal breast tissue. *Cancer Letters*, 193(2): 225–233.

Rogers, S., Macheda, M. L., Docherty, S. E., Carty, M. D., Henderson, M. A., Soeller, W. C., Gibbs, E. M., James, D. E., Best, J. D., Macheda, M. L., Do-, S. E., Carty, M. D., Henderson, M. A., Soeller, W. C., Gibbs, E. M., James, D. E. 2020. Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12 *Am J Endocrinol Metab.* 283: 733–738.

Ros, S., Santos, C. R., Moco, S., Baenke, F., Kelly, G., Howell, M., Zamboni, N., Schulze, A. 2012. Functional metabolic screen identifies 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-biphosphatase 4 as an important regulator of prostate cancer cell survival. *Cancer Discovery*, 2(4): 328–343.

Ros, S., Schulze, A. 2013. Balancing glycolytic flux: the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatases in cancer metabolism. *Cancer & Metabolism*, 1(1): 1–10.

Rotblat, B., Ehrlich, M., Haklai, R., Kloog, Y. 2008. The Ras Inhibitor Farnesylthiosalicylic Acid (Salirasib) Disrupts The Spatiotemporal Localization Of Active Ras: A Potential Treatment For Cancer. *Methods in Enzymology*, 439(07): 467–489.

Ruiz-García, A., Monsalve, E., Novellademunt, L., Navarro-Sabaté, Á., Manzano, A., Rivero, S., Castrillo, A., Casado, M., Laborda, J., Bartrons, R., Díaz-Guerra, M. J. M. 2011. Cooperation of adenosine with macrophage toll-4 receptor agonists leads to increased glycolytic flux through the enhanced expression of PFKFB3 gene. *Journal of Biological Chemistry*, 286(22): 19247–19258.

Schafer, Z. T., Grassian, A. R., Song, L., Jiang, Z., Zachary Gerhart-Hilnes, H. Y. I., Gao, S., Puigserver, P., Brugge, J. S. 2010. Antioxidant and Oncogene Rescue of Metabolic Defects Caused by Loss of Matrix Attachment. *Nature*, 23(1): 1–7.

Scheepers, A., Schmidt, S., Manolescu, A., Cheeseman, C. I., Bell, A., Zahn, C., Joost, H. G., Schürmann, A. 2005. Characterization of the human SLC2A11 (GLUT11) gene: Alternative promoter usage, function, expression, and subcellular distribution of three isoforms, and lack of mouse orthologue. *Molecular Membrane Biology*, 22(4): 339–351.

Semenza, L. G. 2008. Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *Journal of Clinical Investigation*, 118(12): 3930–3942.

Sharen, G., Peng, Y., Cheng, H., Liu, Y., Shi, Y., Zhao, J. 2017. Prognostic value of GLUT-1 expression in pancreatic cancer: Results from 538 patients. *Oncotarget* 8(12): 19760–19767.

Shi, L., Pan, H., Liu, Z., Xie, J., Han, W. 2017. Roles of PFKFB3 in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2: 1–10.

Shi, W. K., Zhu, X. D., Wang, C. H., Zhang, Y. Y., Cai, H., Li, X. L., Cao, M. Q.,

Zhang, S. Z., Li, K. S., Sun, H. C. 2018. PFKFB3 blockade inhibits hepatocellular carcinoma growth by impairing DNA repair through AKT article. *Cell Death and Disease*, 9(428):1-12.

Shim, H., Dolde, C., Lewis, B. C., Wu, C. S., Dang, G., Jungmann, R. A., Dalla-Favera, R., Dang, C. V. 1997. c-Myc transactivation of LDH-A: Implications for tumor metabolism and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13): 6658–6663.

Shimizu, K., Goldfarb, M., Suard, Y., Perucho, M., Li, Y., Kamata, T., Feramisco, J., Stavnezer, E., Fogh, J., Wigler, M. H. 1983. Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(8 I): 2112–2116.

Sola-Penna, M., Da Silva, D., Coelho, W. S., Marinho-Carvalho, M. M., Zancan, P. 2010. Regulation of mammalian muscle type 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for the control of the metabolism. *IUBMB Life*, 62(11): 791–796.

Son, J., Lyssiotis, C. a, Ying, H., Wang, X., Hua, S., Ligorio, M., Perera, R. M., Ferrone, C. R., Mullarky, E., Shyh-, N., Kang, Y., Fleming, J. B., Bardeesy, N., Asara, J. M. 2013. Glutamine supports pancreatic cancer growth through a K-ras regulated metabolic pathway. *Nature*, 496(7443): 101–105.

Spencer, N., Hopkinson, D. A. 1980. Biochemical genetics of the pentose phosphate cycle: human ribose 5-phosphate isomerase (RPI) and ribulose 5-phosphate 3-epimerase (RPE). *Annals of Human Genetics*, 43(4): 335–342.

Stobbe, M. D., Houten, S. M., Kampen, A. H. C., Wanders, R. J. A., Moerland, P. D. 2012. Improving the description of metabolic networks: the TCA cycle as example. *The FASEB Journal*, 26(9): 3625–3636.

Strohecker, A. M., Joshi, S., Possemato, R., Abraham, R. T., Sabatini, D. M., White, E. 2015. Identification of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as a novel autophagy regulator by high content shRNA screening. *Oncogene*, 34(45): 5662–5676.

Sun, H., Lesche, R., Li, D. M., Liliental, J., Zhang, H., Gao, J., Gavrilo, N., Mueller, B., Liu, X., Wu, H. 1999. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(11): 6199–6204.

Takashima, A., Faller, D. 2013. Targeting the RAS oncogene. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 17(5): 507–531.

Tauler, A., Lin, K., Pilkis, S. J. 1990. Hepatic 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase. *The Journal Of Biological Chemistry*, 265(26): 15617–15622.

Telang, S., Yalcin, A., Clem, A. L., Bucala, R., Lane, A. N., Eaton, J. W., Chesney, J. 2006. Ras transformation requires metabolic control by 6-phosphofructo-2-kinase.

Oncogene, 25(55): 7225–7234.

Telang, Sucheta, O2Neal, J., Imbert-Fernandez, Y., Clem, B., Lypova, N., Tapolsky H., G., Trent, J., & Chesney, J. 2015. 6-Phosphoructokinase (PFKFB3): At the crossroads of resistance to targeted cancer therapies. *Cancer Research*, 75(15).

Tielens, A. G. M., Van Hellemond, J. J. 1998. The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1365(1–2): 71–78.

Toews, L. M., Kanji, I. M., Carper, W. R. 1976. 6-Phosphogluconate Dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 251(23): 7127–7131.

Tracy, R. M., Hedges, S. B. 2006. Evolutionary history of the enolase gene family. *Gene*, 378(1–2): 74–83.

Uldry, M., Ibberson, M., Horisberger, J. D., Chatton, J. Y., Riederer, B. M., Thorens, B. 2001. Identification of a mammalian H⁺-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO Journal*, 20(16): 4467–4477.

Van Schaftingen, E., Davies, D. R., Hers, H. - G. 1982. Fructose- 2,6- bisphosphatase from Rat Liver. *European Journal of Biochemistry*, 124(1): 143–149

Vander Heiden, M., Cantley, L., Thompson, C. 2009. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, 324(5930): 1029–1033.

Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, L. K., Der, J. C. 2011. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nature Reviews Cancer*, 10(12): 842–857.

Wamelink, M. M. C., Struys, E. A., Jakobs, C. 2008. The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: A review. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 31(6): 703–717.

Wang, F., Qi, X. M., Wertz, R., Mortensen, M., Hagen, C., Evans, J., Sheinin, Y., James, M., Liu, P., Tsai, S., Thomas, J., Mackinnon, A., Dwinell, M., Myers, C. R., Bartrons Bach, R., Fu, L., Chen, G. 2020. p38 γ MAPK Is Essential for Aerobic Glycolysis and Pancreatic Tumorigenesis. In *Cancer Research* 80(16):3251–3264.

Wang, Q., Zeng, F., Sun, Y., Qiu, Q., Zhang, J., Huang, W., Huang, J., Huang, X., Guo, L. 2018. Etk interaction with PFKFB4 modulates chemoresistance of small-cell lung cancer by regulating autophagy. *Clinical Cancer Research*, 24(4): 950–962.

Wilson, J. E. 2003. Isozymes of mammalian hexokinase: Structure, subcellular localization and metabolic function. *Journal of Experimental Biology*, 206(12): 2049–2057.

Winn, S. I., Watson, H. C., Harkins, R. N., Fothergill, L. A. 1981. Structure and activity of phosphoglycerate mutase. *Philosophical Transactions of the Royal Society of*

London. *Series B, Biological Sciences*, 293(1063): 121–130.

Wu, X., Freeze, H. H. 2002. GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics*, 80(6): 553–557.

Wylie, B. J., Singh, M. P., Coull, B. a, Quinn, A., Yeboah-, K., Sabin, L., Hamer, D. H., Singh, N., Macleod, W. B., Hospital, M. G., Road, N., Garha, P., Pradesh, M., Road, K., Garha, P., Pradesh, M. 2014. Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature*, 514(7524): 628–632.

Xiao, Y., Jin, L., Deng, C., Guan, Y., Kalogera, E., Ray, U., Thirusangu, P., Staub, J., Bhattacharya, S. S., Xu, H., Fang, X., Shridhar, V. 2021. Inhibition of PFKFB3 induces cell death and synergistically enhances chemosensitivity in endometrial cancer. *Oncogene*.

Yalçın, A., Clem, B. F., Simmons, A., Lane, A., Nelson, K., Clem, A. L., Brock, E., Siow, D., Wattenberg, B., Telang, S., Chesney, J. 2009. Nuclear targeting of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) increases proliferation via cyclin-dependent kinases. *Journal of Biological Chemistry* 284(36): 24223–24232.

Yalçın, A., Solakoglu, T. H., Özcan, S. C., Güzel, S., Peker, S., Çelikler, S., Balaban, B. D., Sevinç, E., Gürpınar, Y., Chesney, J. A. 2017. 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase-3 is required for transforming growth factor β 1-enhanced invasion of Panc1 cells in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 484(3): 687–693.

Yamamoto, T., Takano, N., Ishiwata, K., Ohmura, M., Nagahata, Y., Matsuura, T., Kamata, A., Sakamoto, K., Nakanishi, T., Kubo, A., Hishiki, T., Suematsu, M. 2014. Reduced methylation of PFKFB3 in cancer cells shunts glucose towards the pentose phosphate pathway. *Nature Communications*, 5: 1-16

Ying, H., Kimmelman, A. C., Lyssiotis, C. A., Hua, S., Chu, G. C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J. W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J. L., Yan, H., Wang, W., Chen, S., Viale, A., Zheng, H., Paik, J. H., Lim, C., Guimaraes, A. R., Martin, E. S., Depinho, R. A. 2012. Oncogenic kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*, 149(3): 656–670.

Zhao, F.-Q., Keating, A. 2007. Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. *Current Genomics*, 8(2): 113–128.

Zhao, L., Ji, G., Le, X., Wang, C., Xu, L., Feng, M., Zhang, Y., Yang, H., Xuan, Y., Yang, Y., Lei, L., Yang, Q., Lau, W. B., Lau, B., Chen, Y., Deng, X., Yao, S., Yi, T., Zhao, X., Zhou, S. 2017. Long noncoding RNA LINC00092 acts in cancer-associated fibroblasts to drive glycolysis and progression of ovarian cancer. *Cancer Research*, 77(6): 1369–1382.

Zhao, S. J., Shen, Y. F., Li, Q., He, Y. J., Zhang, Y. K., Hu, L. P., Jiang, Y. Q., Xu, N. W., Wang, Y. J., Li, J., Wang, Y. H., Liu, F., Zhang, R., Yin, G. Y., Tang, J. H., Zhou, D., Zhang, Z. G. 2018. SLIT2/ROBO1 axis contributes to the Warburg effect in

osteosarcoma through activation of SRC/ERK/c-MYC/PFKFB2 pathway. *Cell Death and Disease*, 9(3): 1-13.

Zheng, W. D., Zhou, F. L., Lin, N. 2015. MicroRNA-26b inhibits osteosarcoma cell migration and invasion by down-regulating PFKFB3 expression. *Genetics and Molecular Research*, 14(4): 16872–16879.

Zhu, W., Ye, L., Zhang, J., Yu, P., Wang, H., Ye, Z., Tian, J. 2016. PFK15, a small molecule inhibitor of PFKFB3, induces cell cycle arrest, apoptosis and inhibits invasion in gastric cancer. *PLoS ONE*, 11(9): 1–14.