



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI



**PANKREAS EPİTEL HÜCRELERİNİN ONKOJENİK  
TRANSFORMASYONUNDA PFKFB2'NİN ROLÜ**

**SELAHATTİN CAN ÖZCAN**

**(DOKTORA TEZİ)**

**BURSA-2018**





T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI



**PANKREAS EPİTEL HÜCRELERİNİN ONKOJENİK  
TRANSFORMASYONUNDA PFKFB2'NİN ROLÜ**

**Selahattin Can ÖZCAN**

**(DOKTORA TEZİ)**

**DANIŞMAN:**

**Prof. Dr. Abdullah YALÇIN**

**114Z496 - TÜBİTAK (1001)**

**1059B141400673 - TÜBİTAK (2214-A)**

**2017/4 - UÜ BAP (OUAP)**

**BURSA-2018**

**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ETİK BEYANI**

Doktora tezi olarak sunduğum “Pankreas Epitel Hücrelerinin Onkojenik Transformasyonunda PFKFB2'nin Rolü” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

**Selahattin Can ÖZCAN**

**18/10/2018**

## SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Uludağ Üniversitesi Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Selahattin Can Özcan tarafından hazırlanan “Pankreas Epitel Hücrelerinin Onkojenik Transformasyonunda PFKFB2'nin Rolü” konulu Doktora tezi 18/10/2018 günü, 10.30-13.00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

	<b>Adı-Soyadı</b>	<b>İmza</b>
<b>Tez Danışmanı</b>	Prof. Dr. Abdullah YALÇIN	
<b>Üye</b>	Prof. Dr. Hale ŞAMLI	
<b>Üye</b>	Doç. Dr. Saime GÜZEL	
<b>Üye</b>	Doç. Dr. Feraye ESEN GÜRSEL	
<b>Üye</b>	Doç. Dr. Atilla ATEŞ	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı toplantısında alınan ..... numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali AYDOĞDU  
Enstitü Müdürü

## TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

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

Adı Soyadı: Selahattin Can Özcan

Anabilim Dalı: Veteriner-Biyokimya

Tez Konusu: Pankreas Epitel Hücrelerinin Onkojenik Transformasyonunda PFKFB2'nin Rolü

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

### ANABİLİM DALI ONAYI

Ünvanı Adı Soyadı:

İmza:

### ENSTİTÜ ONAYI

Ünvanı Adı Soyadı: Prof. Dr.

Ali AYDOĞDU

İmza:

## İÇİNDEKİLER

**Dış Kapak**

**İç Kapak**

<b>ETİK BEYAN</b> .....	I
<b>KABUL ONAY</b> .....	II
<b>TEZ KONTROL BEYAN FORMU</b> .....	III
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	IV
<b>TÜRKÇE ÖZET</b> .....	X
<b>İNGİLİZCE ÖZET</b> .....	XI
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	4
2.1. Pankreatik Adenokarsinoma ve Onkojenik Transformasyon .....	4
2.2. Tümör Hücrelerinde Enerji Metabolizmasının Yeniden Düzenlenmesi ve Warburg Etkisi .....	11
2.3. PFKFB Enzimleri ve Tümör Enerji Metabolizması .....	16
2.3.1. Fruktoz-2,6-bisfosfat ve PFKFB enzimleri.....	16
2.3.2. PFKFB Enzimlerinin Tümör Hücre Biyolojisinde Rollerini .....	21
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b> .....	26
3.1. Kimyasallar, Cihazlar ve Çözeltiler .....	26
3.1.1. Kimyasallar .....	26
3.1.2. Cihazlar .....	27
3.1.3. Çözeltiler.....	28
3.2. Veritabanı Analizleri.....	30
3.2.1. ONCOMINE Veritabanı Analizi.....	30
3.2.2. Nükleus Lokalizasyon Sinyali (NLS) Sekansı Analizi .....	30
3.3. Hücre Kültürü ve Proliferasyon Analizi .....	31
3.4. mRNA Ekspresyon Analizleri .....	32
3.4.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	32
3.4.2. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizi .....	32
3.4.3. Varyant Ekspresyonlarının Tespiti İçin Primer Tasarımı .....	33
3.4.4. CRISPR İnaktivasyonlarının Tespiti İçin Primer Tasarımı .....	34
3.4.5. PCR Amplifikasyonu ve Agaroz Jel Görüntüleme .....	34
3.5. Protein İzolasyonu ve Western Blotlama.....	35

3.5.1. Total Protein İzolasyonu .....	35
3.5.2. Sitoplazmik/Nükleus Protein Fraksiyonlarının Ayrı İzolasyonu .....	36
3.5.3. Protein Konsantrasyon Ölçümü .....	36
3.5.4. Western Blotlama.....	37
3.6. Immunfloresan Konfokal Mikroskopi (Immunsitokimya - IF-IC) .....	38
3.7. İmmunhistokimya .....	39
3.8. Transfeksiyon.....	39
3.8.1. Plazmid Transfeksiyonu.....	40
3.8.1.1. Transient (Geçici) Transfeksiyon.....	40
3.8.2. siRNA Transfeksiyonu.....	42
3.9. Tümörijenik Potansiyel Deneyleri .....	42
3.9.1. Yumuşak Agarda Koloni Formasyonu .....	42
3.9.2. Koloni Formasyonu.....	43
3.9.3. İnvazyon.....	43
3.9.4. Yara İyileşmesi Deneyi .....	44
3.9.5. Sfer Formasyonu .....	44
3.9.6. İlaç Direnci Deneyi .....	45
3.10. Fruktoz-2,6-Bisfosfat Analizleri .....	45
3.11. Glikoz Alımı Analizi.....	46
3.12. Glikoliz Analizi.....	47
3.13. Akış Sitometri .....	48
3.13.1. Hücre Siklusu Analizi .....	48
3.13.2. Apoptoz Analizi .....	48
3.14. Plazmid Üretimi ve Klonlama.....	48
3.14.1. Bakteriyel Transformasyon ve Plazmid Ekstraksiyonu .....	48
3.14.2. <i>PFKFB2</i> 'nin pCMV6-BSD vektörüne klonlanması .....	49
3.15. İstatistiksel Analizler.....	51
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>53</b>
4.1. <i>PFKFB2</i> 'nin Kanser Hücrelerinde Ekspresyonu ve Lokalizasyonu.....	53
4.1.1. <i>PFKFB2</i> Ekspresyonu Kanser Dokularında Artmaktadır. ....	53
4.1.1.1. ONCOMINE Veritabanı Analizi .....	53
4.1.1.2. İmmunhistokimya Analizi Sonuçları .....	55
4.1.2. <i>PFKFB2</i> Kanser Hücre Hatlarında Eksprese Edilmektedir. ....	56
4.1.3. <i>PFKFB2</i> 'nin Her İki Varyantı Kanser Hücre Hatlarında Eksprese Edilmektedir.....	57
4.1.4. <i>PFKFB2</i> Hücre Nükleusuna Lokalize Olmaktadır. ....	58

4.1.5. PFKFB2 Transkript Varyant-1, Varyant-2'ye Göre Daha Yüksek Oranda Nükleusa Lokalize Olmaktadır. ....	60
4.2. KRAS <sup>G12D</sup> 'nin iPDE Hücrelerin Onkojenik Transformasyonuna Ve PFKFB Enzimlerine Etkileri .....	63
4.2.1. KRAS <sup>G12D</sup> ile iPDE Hücrelerinin Onkojenik Transformasyonu Proliferasyon, Glikoliz ve Fru-2,6-BP Miktarlarını Artırır. ....	63
4.2.2. KRAS <sup>G12D</sup> Ekspresyonu PFKFB3 mRNA Ekspresyonunu Artırırken PFKFB2 Ekspresyonunu Azaltır. ....	65
4.2.3. KRAS <sup>G12D</sup> ile Onkojenik Transformasyon PFKFB2 Total Protein Miktarını Azaltırken PFKFB2'nin Nükleusa Lokalizasyonunu Etkilemez. ....	66
4.2.4. iPDE ve iPDE+KRAS Hücrelerinde PFKFB2'nin Fosforilasyonu Nükleusa Lokalizasyon İçin Gerekli Değildir. ....	67
4.2.5. KRAS <sup>G12D</sup> ile Onkojenik Transformasyon PFKFB2 Transkript Varyant-1 Ekspresyonunu Azaltırken, Transkript Varyant-2 Ekspresyonunu Etkilemez. ....	68
4.2.6. iPDE Hücrelerde PFKFB2 Transkript Varyant-2 Düşük Oranda Nükleusa Lokalizasyona Sahipken, iPDE+KRAS Hücrelerinde Yüksek Oranda Nükleusta Saptanmaktadır. ....	69
4.3. PFKFB2 ve PFKFB3 Over-ekspresyon ve Baskılanmasının iPDE ve iPDE+KRAS Hücrelerinin Glikolitik Özelliklerine Etkileri .....	71
4.3.1. iPDE ve iPDE+KRAS Hücrelerde PFKFB2 Varyantları Over-ekspresyonu .....	71
4.3.2. P2-v1 Over-Ekspresyonunun Glikoz Alımına Etkisi Yoktur ve P2-v2 Over-ekspresyonu Yalnızca iPDE+KRAS Hücrelerde Glikoz Alımını Artırır. ....	72
4.3.3. PFKFB2 Varyantları Over-ekspresyonu iPDE ve iPDE+KRAS Hücrelerde Glikolizi Etkilemez. ....	73
4.3.4. PFKFB2 Over-ekspresyonu iPDE+KRAS Hücrelerinde Fru-2,6-BP Konsantrasyonunu Artırır. ....	74
4.3.5. PFKFB2 ve PFKFB3'ün iPDE ve iPDE+KRAS Hücrelerinde siRNA Aracılı Baskılanması .....	75
4.3.6. PFKFB2'nin siRNA Aracılı Baskılanması iPDE ve iPDE+KRAS Hücrelerinde Glikoz Alımını Etkilemezken, PFKFB3'ün Baskılanması Glikoz Alımını Azaltır. ....	76
4.3.7. PFKFB2'nin ve PFKFB3'ün siRNA Aracılı Baskılanmaları iPDE ve iPDE+KRAS Hücrelerinde Glikolizi Etkilemez. ....	78
4.3.8. PFKFB3'ün siRNA Aracılı Baskılanması Her İki Hücrede Fru-2,6-BP Konsantrasyonunu Düşürürken, PFKFB2'nin siRNA Aracılı Baskılanması Yalnızca iPDE+KRAS Hücrelerde Fru-2,6-BP Konsantrasyonunu Düşürür. ....	79
4.4. PFKFB2 Varyantları Stabil Ekspresyonunun iPDE ve iPDE+KRAS Hücrelerinde Onkojenik Potansiyele Etkileri. ....	80
4.4.1. iPDE ve iPDE+KRAS Hücrelerinde PFKFB2 Varyantları Stabil Over-ekspresyonu ve Proliferasyona Etkileri. ....	80



4.4.2. iPDE+KRAS Hücrelerinde PFKFB2 Varyantları Ekspresyonu Yumuşak Agarda Daha Az Sayıda, Fakat Daha Büyük Koloniler Oluşmasını Sağlar. ....	82
4.4.3. Koloni Formasyon Deneyinde iPDE+KRAS Hücrelerinde P2-v2 Ekspresyonu Koloni Oluşturmaz, Yaygın Üreme Sağlar. ....	84
4.4.4. PFKFB2 Stabil Ekspresyonu iPDE+KRAS Hücrelerinde Twist mRNA Ekspresyonunu Azaltırken Slug Ekspresyonunu Artırmaktadır. ....	86
4.4.5. PFKFB2 Varyantlarının Stabil Ekspresyonu iPDE+KRAS Hücrelerinde PFKFB3 mRNA Ekspresyonunu Azaltır. ....	88
4.4.6. PFKFB2 Varyantları Ekspresyonu iPDE+KRAS Hücrelerin Sfer Formasyonunu Etkilememektedir. ....	89
4.5. PDA (Mia PaCa-2, Panc1, s2vp10, BxPC-3) Hücrelerinde Endojen PFKFB2 Ekspresyonu ve Lokalizasyonları .....	90
4.5.1. PDA Hücrelerinde PFKFB2 Eksprese Olmaktadır. ....	90
4.5.2. PDA Hücrelerinde Her İki PFKFB2 Varyantı Eksprese Olmaktadır.....	91
4.5.3. PDA Hücrelerinde Endojen PFKFB2 Nükleusa Lokalize Olmaktadır. ....	92
4.6. PFKFB2 Over-ekspresyonunun PDA Hücrelerinde (Mia PaCa-2, Panc1) Glikolitik Özelliklere ve Proliferasyona Etkileri .....	93
4.6.1. Mia PaCa-2 ve Panc1 Hücrelerinde PFKFB2 Varyantlarının Plazmid Aracılı Over-ekspresyonu. ....	93
4.6.2. Mia PaCa-2 Hücrelerinde PFKFB2 Varyantlarının Plazmid Aracılı Over-ekspresyonu Proliferasyonu Artırırken Panc1 Hücrelerinde Önemli Farka Yol Açmaz. ....	94
4.6.3. PDA Hücrelerinde (Mia PaCa-2 ve Panc1) PFKFB2 Varyantları Over-ekspresyonu Fru-2,6-BP Konsantrasyonunu Artırır. ....	96
4.6.4. PDA Hücrelerinde (Mia PaCa-2 ve Panc1) P2-v2 Over-ekspresyonu Glikoz Alımını Artırır. ....	97
4.6.5. PDA Hücrelerinde (Mia PaCa-2 ve Panc1) PFKFB2 Varyantları Over-ekspresyonunun Glikoliz Üzerine Önemli Etkisi Yoktur. ....	98
4.7. PFKFB2 Stabil Ekspresyonunun Mia PaCa-2 Hücrelerinde Onkojenik Özelliklere Etkileri .....	100
4.7.1. PFKFB2 Varyantlarının Mia PaCa-2 Hücrelerinde Stabil Over-ekspresyonu. ....	100
4.7.2. PFKFB2 Varyantlarının Stabil Over-ekspresyonu Mia PaCa-2 Hücrelerinin Proliferasyonunu Artırır. ....	102
4.7.3. PFKFB2 Varyantlarının Stabil Over-Ekspresyonu Mia PaCa-2 Hücrelerinin Koloni Formasyonunu Etkilemez Fakat P2-v2 Ekspresyonu Yaygın Üreme Sağlar. ....	104
4.7.4. Mia PaCa-2 Hücrelerinde P2-v2 Stabil Over-ekspresyonu Migrasyonu Artırır.....	106
4.7.5. Mia PaCa-2 Hücrelerinde PFKFB2 Varyant-2 Stabil Over-ekspresyonu Vimentin ve Fibronektin mRNA Ekspresyonlarını Artırır. ....	107

4.8. PFKFB2 Baskılanmasının PDA Hücrelerinde (Panc1 ve BxPC-3) Glikolitik ve Onkojenik Özelliklere Etkileri .....	108
4.8.1. PFKFB2'nin Panc1 ve BxPC-3 Hücrelerinde siRNA Aracılı Baskılanması .....	108
4.8.2. Panc1 Hücrelerinde PFKFB2'nin siRNA Aracılı Baskılanması Fru-2,6-BP Konsantrasyonunu Azaltır.....	110
4.8.3. Panc1 Hücrelerinde PFKFB2'nin siRNA Aracılı Baskılanması Glikoz Alımını Etkilemezken Glikolizi Azaltır.....	111
4.8.4. PFKFB2'nin Baskılanması Panc1 Hücrelerinde Proliferasyonu Azaltır. .	112
4.8.5. BxPC-3 Hücrelerinde PFKFB2'nin siRNA Aracılı Baskılanması Fru-2,6-BP Konsantrasyonunu Azaltır.....	113
4.8.6. PFKFB2'nin Baskılanması Panc1 ve BxPC-3 Hücrelerinde Hücre Siklus Fazları Dağılımını Etkilemez. ....	114
4.8.7. Panc1 Hücrelerinde PFKFB2 Baskılanması Apoptozu Etkilemezken BxPC-3 Hücrelerinde Apoptotik Hücre Oranını Artırır. ....	116
4.8.8. Panc1 ve BxPC-3 Hücrelerinde PFKFB2 Baskılanması Gemsitabine Duyarlılığı Artırır. ....	118
4.8.9. Panc1 Hücrelerinde PFKFB2 Ekspresyonunun Baskılanması Matrijel İnvazyonunu Azaltır.....	120
4.9. <i>PFKFB2</i> 'nin CRISPR Aracılı İnaktivasyonunun PDA Hücrelerinde (Mia PaCa-2) Etkileri.....	121
4.9.1. Mia PaCa-2 Hücrelerinde <i>PFKFB2</i> 'nin CRISPR Aracılı İnaktivasyonu .	121
4.9.2. Mia PaCa-2 Hücrelerinde CRISPR Aracılı <i>PFKFB2</i> Gen İnaktivasyonu Gemsitabine Duyarlılığı Artırır.....	123
4.9.3. Mia PaCa-2 Hücrelerinde CRISPR Aracılı <i>PFKFB2</i> Gen İnaktivasyonu Hücre İçi Fru-2,6-bisfosfat Konsantrasyonunu Azaltır.....	124
4.9.4. Mia PaCa-2 Hücrelerinde CRISPR Aracılı <i>PFKFB2</i> Gen İnaktivasyonu Besiyerine Salınan Laktat Miktarını Azaltır. ....	125
4.9.5. Mia PaCa-2 Hücrelerinde CRISPR Aracılı <i>PFKFB2</i> Gen İnaktivasyonu Koloni Formasyonunu Azaltır.....	126
4.9.6. Mia PaCa-2 Hücrelerinde CRISPR Aracılı PFKFB2 Gen İnaktivasyonu Gemsitabin Varlığında Koloni Formasyonunu Azaltır. ....	127
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b> .....	128
5.1. Tanımlanmış İkinci Nükleusa Lokalize Olan PFKFB Enzimi: PFKFB2 ....	128
5.2. Pankreas Kanserinde Yeni Bir Moleküler Hedef Olarak PFKFB2.....	131
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	140
<b>7. SİMGELER ve KISALTMALAR</b> .....	154
<b>8. EKLER</b> .....	158
8.1. Şekiller Listesi.....	158

8.2. Tablolar Listesi.....	164
<b>9. TEŞEKKÜR .....</b>	<b>165</b>
<b>10. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>166</b>



## TÜRKÇE ÖZET

Pankreas duktal adenokarsinomu (PDA), tedavi seçeneklerinin sınırlı kaldığı ölümcül kanser türlerinin başında gelmektedir. PDA'ların yaklaşık %90'ında KRAS onkogeninin aktive edici mutasyonları görülmektedir. Bu durum KRAS'ın PDA oluşumundaki önemini ortaya koymaktadır. Mutant K-Ras'ın fonksiyonel aracılığını yapan gen ürünlerinin ortaya koyulması hem PDA biyolojisinin daha iyi anlaşılmasını, hem de bu ölümcül kanserin tedavisine yönelik alternatif moleküler hedeflerin belirlenmesini sağlayabilir.

6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bisfosfataz (PFKFB) ailesine ait çift fonksiyonlu enzimler dört farklı gen tarafından (*PFKFB1*, *PFKFB2*, *PFKFB3* ve *PFKFB4*) kodlanmakta ve hücre içi fruktoz-2,6-bisfosfat (Fru-2,6-BP) molekülünün yapım ve yıkımını sağlamaktadırlar. Fru-2,6-BP, glikolitik geçitin hız sınırlayıcı enzimlerinden olan 6-fosfofrukto-1-kinaz (PFK1)'in bilinen en kuvvetli allosterik aktivatörüdür. Birçok tümör hücresinde birlikte eksprese edilen PFKFB proteinleri (*PFKFB2*, *PFKFB3* ve *PFKFB4*) arasında *PFKFB2*, kanser hücre biyolojisinde en az çalışılan izoformdur.

Bu çalışmada ilk defa *PFKFB2*'nin farklı kanser hücre hatlarında ekspresyonu karşılaştırılarak hücre nükleusuna lokalizasyonu ve *PFKFB2* mRNA varyantlarının farklı oranlarda nükleusa lokalize olduğu tespit edildi. Pankreatik duktal epitel hücrelerinin mutant KRAS ekspresyonu ile gerçekleşen onkojenik transformasyonunda ve mutant KRAS bulundurduğu bilinen pankreatik duktal adenokarsinoma hücrelerinde *PFKFB2*'nin glikolitik fenotipe ve onkojenik özellikler üzerine etkisi incelendi. Elde edilen bulgulara göre pankreas kanserlerinde *PFKFB2*'nin onkojenik özellikleri ve glikolizi desteklediği görüldü.

Sonuç olarak, *PFKFB2* pankreatik hücre adenokarsinomalarının glikolitik fenotiplerinde ve onkojenik özelliklerinde önemlidir ve *PFKFB2* pankreatik adenokarsinoma tedavisinde moleküler bir ilaç hedefi olarak değerlendirilebilir.

**Anahtar Kelimeler:** *PFKFB2*, KRAS, Pankreatik duktal adenokarsinoma, Fruktoz,2-6-bisfosfat, Onkojenik transformasyon

## İNGİLİZCE ÖZET

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA) is one of the leading lethal malignancies with few therapeutic options. Ninety percent of PDA cases are characterized by an activating mutation in the KRAS oncogene. The fact that these mutations are detected in early phases of the molecular evolution of the disease progression suggests a key role for the K-Ras gene in oncogenic transformation of pancreatic duct cells. Discovery of gene products that mediate the effects of mutant K-Ras will not only help us better understand the biology of PDA but may also lead to the identification of novel molecular targets that may be utilized for the development of therapeutics against this deadly disease.

The family of the bifunctional enzymes known as 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases (PFKFB) are encoded by four distinct genes (*PFKFB1*, *PFKFB2*, *PFKFB3* and *PFKFB4*) and is responsible for production and degradation of fructose-2,6-bisphosphate (Fru-2,6-BP). Fru-2,6-BP is the most potent allosteric activator of 6-phosphofructo-1-kinase (PFK1), one of the rate-limiting enzymes of glycolysis. PFKFB2 is the least studied member of the PFKFB isozymes that are co-expressed in tumor cells (PFKFB2, PFKFB3 ve PFKFB4).

In this study, expression of PFKFB2 in different cancer cell lines was compared and nuclear localization of PFKFB2 was determined for the first time. It was observed that 2 mRNA variants of PFKFB2 have different nuclear localization ratios. Effects of PFKFB2 on glycolytic phenotype and oncogenic capabilities was investigated in mutant KRAS driven oncogenic transformation of pancreatic ductal epithelia cells and mutant KRAS harboring pancreatic adenocarcinoma cells. According to recent findings, it was observed that PFKFB2 supports oncogenic and glycolytic features of pancreatic cancers.

In conclusion, PFKFB2 is important for the oncogenic characteristics and glycolytic phenotype of pancreatic adenocarcinomas and PFKFB2 could be considered as a molecular drug target for the treatment of pancreatic adenocarcinoma.

**Keywords:** PFKFB2, KRAS, Pancreatic ductal adenocarcinoma, Fructose-2,6-bisphosphate, Oncogenic transformation

## 1. GİRİŞ

Kanser, dünyada ve ülkemizde sebebi bilinen ölümler sıralamasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci ölüm nedeni olması sebebiyle önemli bir toplum sağlığı problemidir ([www.kanser.gov.tr](http://www.kanser.gov.tr)). Kanser, dünya genelinde giderek artan bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır ve toplumlarda önemli bir sosyoekonomik yüke, bireylerde de maddi ve manevi kayıp ve zorluklara yol açmaktadır. Pankreas kanserleri, prognozu en kötü kanser olgularının başında gelmekte olup teşhisten sonra 5-yıllık sağ kalım oranı %5 olarak bildirilmiştir. T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu tarafından 2017 yılında yayınlanan 2010-2014 yılları arasındaki kanser istatistiklerini içeren raporda pankreas kanserlerinde “yalnız ölüm bildirimini” ile kayıt olan hasta oranı 6966 hastada % 4 olarak saptanmıştır. Bu oranın pek çok kanser tipinde % 0.1 - % 1 değerleri arasında olması, pankreas kanserlerinin teşhisinin zorluğunu ve ülkemiz dahil tüm dünyada yüksek mortalitesini göstermektedir (T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu, 2017).

Pankreas adenokarsinomlarının önemli bir kısmı duktal hücrelerden orijin alır (pankreatik duktal adenokarsinoma; PDA). Normal dukt hücrelerinin malignite öncesi intraepitelyal neoplaziye (PanIN) dönüşümünde gözlemlenen ilk moleküler değişikliklerden bir tanesi PDA’ların yaklaşık % 90’ında karşılaşılan KRAS proto-onkogeninin 12.kodon’u tarafından kodlanan glisin amino asitinin (G) aspartik asit (D) ya da valin (V)’e dönüşümü ile karakterize mutasyonlarıdır (KRAS<sup>G12D</sup>, KRAS<sup>G12V</sup>) ve (Bournet ve ark., 2013b; Bryant ve ark., 2014). KRAS, küçük GTPaz sınıfına ait Ras alt ailesine mensup olup, bu proteinler hücre içi Mitojenler Tarafından Aktive Edilen Protein Kinaz (mitogen-activated protein kinase; MAPK) ve Fosfatidil İnozitol 3-Fosfat Kinaz (PI3K)/AKT gibi önemli onkojenik sinyal yollarının aktivasyonunu sağlarlar (Deramautd ve Rustgi, 2005). PDA ve daha birçok kanser türünde kanıtlanan rolüne rağmen direkt olarak Ras proteinlerini inhibe etmeye yönelik girişimler büyük oranda başarısızlıkla sonuçlanmıştır

(Baines ve ark., 2011). Bu nedenle Ras tarafından indüklenen onkojenik transformasyonda Ras'ın fonksiyonel aracısı olarak görev yapan yeni moleküler hedeflerin keşfi önem arz etmektedir.

Hücre içi ATP formunda enerji üretimi ve hücre canlılığı ile proliferasyonun devamlılığı için tüm canlı hücreler glikolizi kullanırlar. Glikoliz yolunda, hücreye alınan glikoz molekülü piruvata kadar parçalanır ve bu metabolik yol ile ATP üretimi sağlanır. Glikolizin regülasyonu, negatif feedback mekanizmaları ile üç noktadan sağlanır. Bunlar sırası ile; (i) Heksokinaz tarafından katalizlenen ve hücre içerisine alınan glikozun fosforlanarak glikoz-6-fosfat'a çevrildiği ilk reaksiyon, (ii) 6-Fosfofrukto-1-kinaz (PFK1) tarafından katalizlenen fruktoz-6-fosfat'ın fosforlanarak fruktoz-1,6-bisfosfat'a çevrildiği reaksiyon ve (iii) Piruvat kinaz tarafından katalizlenen fosfoenolpiruvatın piruvat'a çevirildiği son reaksiyondur (Bartrons ve Caro, 2007; DeBerardinis ve ark., 2008; Gatenby ve Gillies, 2004). Bu reaksiyonlar glikolizin "kontrol noktaları" olarak da adlandırılmakta olup, reaksiyonları gerçekleştiren enzimlerin aktiviteleri negatif feedback ile inhibisyona ve allosterik aktivasyona tabidir.

6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bisfosfataz (PFKFB) ailesine ait enzimler (PFKFB1, PFKFB2, PFKFB3 ve PFKFB4), glikolitik geçitin önemli kontrol basamaklarından birini katalize eden PFK1 enziminin bilinen en kuvvetli allosterik aktivatörü olan fruktoz 2,6-bisfosfat (Fru-2,6-BP) molekülünün yapım ve yıkımını üstlenirler (Chesney, 2006; Rider ve ark., 2004). Bu nedenle tümör hücrelerinde gözlemlenen artmış glikolitik aktiviteden kısmen de olsa normal hücrelere kıyasla yüksek Fru-2,6-BP konsantrasyonu sorumlu tutulmaktadır. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar, PFKFB enzimlerinin kanser hücre biyolojisinde birbirlerinden farklı rolü olabileceğine işaret etmektedir. Örneğin, PFKFB3 bazı kanser hücrelerinin nükleusuna lokalize olmakta ve hücre proliferasyonunu uyarmaktadır (Yalcin ve ark., 2014; Yalcin ve ark., 2009a). Bunun yanında PFKFB4'ün glikoliz dışında tümör hücre hatlarında apoptozun inhibisyonunda rolü olduğu güncel bir çalışma ile ortaya koyulmuştur (Ros ve ark., 2012). PFKFB3 ve PFKFB4'ün tümör hücre biyolojisinde kısmen iyi bilinen rollerine rağmen PFKFB2'nin direkt olarak belirli genetik elemanlarla kontrol edilen neoplastik transformasyona katkısı bilinmemektedir.

Bu doktora tez çalışmasında, ilk olarak PFKFB2'nin farklı kanser hücre tiplerindeki ekspresyonu ve fonksiyonu incelendi. Son yıllarda yapılan çalışmalar (Yalcin ve ark., 2009a) PFKFB3'ün bilinen fonksiyonunu gösterdiği sitoplazmanın yanı sıra, hücre nükleusuna lokalize olduğunu göstermiştir. Bu doğrultuda PFKFB2'nin hücre-içi lokalizasyonu da incelenerek yapılan çalışmalarla PFKFB2'nin KRAS<sup>G12D</sup> tarafından gerçekleşen onkojenik transformasyondaki etkisi değerlendirildi. Bu amaçla ilk olarak, KRAS ile gerçekleşen onkojenik transformasyonun PFKFB enzimlerinin ekspresyonuna etkisi, immortalize pankreatik duktal epitel (iPDE) ve KRAS<sup>G12D</sup> ile transforme pankreatik duktal epitel (iPDE+KRAS) hücreleri karşılaştırılarak analiz edildi. Ardından PFKFB2'nin bu hücrelerdeki fonksiyonu over-ekspresyon ve siRNA aracılı baskılama çalışmaları ile değerlendirilerek PFKFB2'nin etkileri mutant KRAS taşıdığı bilinen PDA hücrelerinde (MIA PaCa-2, Panc1 ve BxPC-3) incelendi. Bu amaçla endojen PFKFB2 ekspresyonu nispeten düşük saptanan MIA PaCa-2 hücrelerinde over-ekspresyon; PFKFB2 ekspresyonu yüksek düzeyde bulunan Panc1 ve BxPC-3 hücrelerinde siRNA aracılı baskılama uygulanmıştır ve PFKFB2'nin hücrelerin proliferasyonuna, glikolitik fenotiplerine ve invazyon/metastaz gibi hücre biyolojisi ilişkili durumlara etkileri incelenmiştir. Son olarak *PFKFB2* geninin CRISPR aracılı genomik olarak uzaklaştırılması ile PFKFB2'nin, MIA PaCa-2 hücrelerinde glikolitik fenotip ve ilaç direnci üzerine etkileri araştırıldı.

Bu çalışmada KRAS<sup>G12D</sup>'nin pankreatik duktal epitel hücrelerinin transformasyonunda PFKFB enzimlerine etkisi ve bu enzimlerden PFKFB2'nin pankreatik adenokarsinoma hücre biyolojisindeki rolü ilk kez incelenerek elde edilen sonuçlar güncel bilgiler ışığında tartışılarak sunuldu.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Pankreatik Adenokarsinoma ve Onkojenik Transformasyon

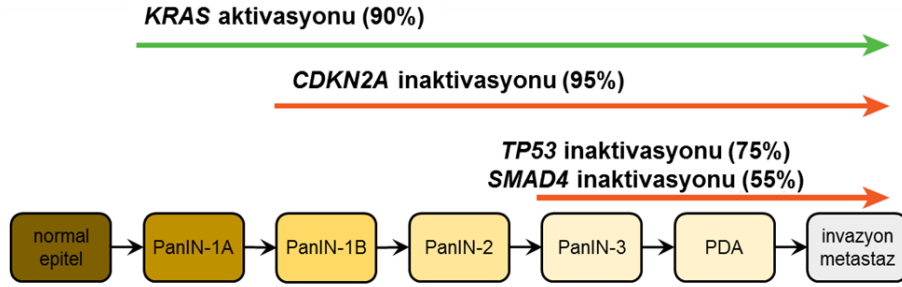
Pankreas kanserleri, (i) endokrin pankreas tümörleri ve (ii) ekzokrin pankreas tümörleri olarak ikiye ayrılır. Endokrin pankreas tümörleri, pankreasın hormon üreten hücrelerinin tümörleridir ve pankreas adacık hücresi tümörleri (nöroendokrin pankreas tümörleri) olarak da bilinirler. Ekzokrin pankreas tümörlerine göre daha yavaş gelişim gösteren bu tümörler hormon salgılama fonksiyonuna sahip olabilirler. Endokrin pankreas tümörlerin başlıcaları; İnsülinoma, glukagonoma, somatostatinoma gibi hormon salgılayan tümörler ve Çoklu Endokrin Neoplazi Tip-1 (MEN-1) gibi hormon salgılamayan tümörlerdir. Endokrin pankreas tümörleri tüm pankreatik tümörlerin %6'sını oluşturur. Pankreas kaynaklı tümörlerin %94'ünü oluşturan ekzokrin pankreas tümörleri ise pankreasın ekzokrin hücrelerinde başlayarak buradan yayılan tümörlerdir. Sıklıkla görülen örnekleri; adenokarsinoma, asinar hücre karsinomu, intraduktal-papiller müköz neoplazm ve müköz kist adenokarsinomadır. Bu tümör tiplerinden pankreatik adenokarsinomlar, tüm pankreasta görülen tümörlerin %85'ini oluşturmaktadır ve pankreas dukt hücrelerinden orjin aldıklarından Pankreatik Duktal Adenokarsinom (PDA) olarak adlandırılırlar (Morgan ve Adams, 2010; Nguyen ve ark., 2011; Notta ve ark., 2017; Siegel ve ark., 2018).

Pankreas adenokarsinomu, prognozu en kötü kanser olgularının başında gelmekte olup teşhisten sonra 5-yıllık sağ kalım oranı %5'tir (Bournet ve ark., 2013a; Campbell ve ark., 2008). Pankreas adenokarsinomlarının oluşum ve gelişim süreci Fearon ve Vogelstein tarafından 1980'lerde yapılan kolon kanseri çalışmaları ile anlaşılmaya başlanmıştır. Bu çalışma ile araştırmacılar ilk defa histolojik ilerleyiş ile genetik ilerleyiş arasında bağlantı kurulabilmişlerdir (Vogelstein ve ark., 1988). Daha sonra Almoguera ve ark. (1988), *KRAS* mutasyonlarının tüm PDA

hücrelerde görüldüğünü raporlamışlardır. Sonraki çalışmalar PDA’larda kromozom 9, 17 ve 18’de allel kayıplarının da oldukça sık görüldüğünü göstermiştir ve *CDKN2A*, *TP53*, *SMAD4* gibi önemli tümör baskılayıcı genler tanımlanmıştır (Seymour ve ark., 1994). Birlikte ele alındığında, yaklaşık yirmi yıldır PDA gelişiminin bu dört gendeki değişimler ile ilişkili olduğu geniş çevrelerce kabul görmüştür. Pankreas duktal epitelinin hiperplastik lezyonlarının gözlemlenmesinin tarihçesi 1936 yılına kadar uzamaktadır (Notta ve ark., 2017). Bu lezyonlar Pankreatik İntraepitelyal Neoplazi (PanIN) şeklinde adlandırılmaktadır. Uzun süre boyunca bu lezyonlara ilişkin ortak bir sınıflandırma bulunmaması, lezyonların isimlendirilmesinde sorunlara yol açmış ve sonunda 2001 yılında standart bir adlandırma ve sınıflandırma sistemi geliştirilmiştir, bu sistem 2015 yılında revize edilerek son halini almıştır (Basturk ve ark., 2015). Pankreatik neoplazilerde, gelişim sürecini göstermek amacıyla epitelyal atipiye göre 3 alt dönem tanımlanmıştır. Bunlar sırasıyla (i) flat tip (1A) ve papiller tip (1B) olabilen ve displazi göstermeyen hiperplazik lezyonlar olarak tanımlanan PanIN-1, (ii) az veya orta displazik papiller lezyonlar olarak tanımlanan PanIN-2 ve (iii) yüksek displazik PanIN-3 olarak adlandırılır (Basturk ve ark., 2015; Notta ve ark., 2017). Bu lezyonlarda *KRAS* mutasyonları, lezyonun aşamasından bağımsız olarak yüksek bulunmuş ve tüm pankreatik adenokarsinomlardaki *KRAS* mutasyon oranıyla beraber düşünüldüğünde, bu mutasyonlar “kanser başlatıcı olay” olarak değerlendirilmiştir (Şekil - 1) (Lohr ve ark., 2005).

Eğer *KRAS* mutasyonu gerçekten kanser başlatıcı olay ise, *KRAS* mutasyonlarının tüm aşamalarda benzer oranlarda olması beklenirdi. Fakat çalışmalar, *KRAS* mutasyonlarının lezyon aşaması ile arttığını göstermişlerdir. PanIN-1 aşamasında %40 olarak saptanan mutasyon prevalansı, PanIN-3’de %80’den yüksek olarak belirlenmiştir ve bu oran pankreatik adenokarsinom seviyesine oldukça benzerdir (Lohr ve ark., 2005). Yakın zamanlarda yapılan ve daha hassas bir mutasyon saptama tekniği kullanan bir çalışmada ise *KRAS* mutasyonları tüm PanIN’lerde benzer ve oldukça yüksek (>%90) frekansta saptanmıştır (Kanda ve ark., 2012). Yazarlar PanIN aşaması arttıkça mutant *KRAS*’ın allel frekansının arttığını saptamışlardır, bunun sebebini ise PanIN-1 ve

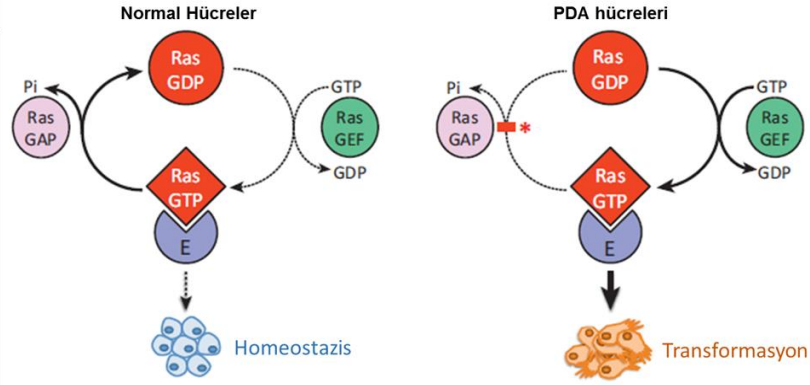
PanIN-2'nin *KRAS* normal ve mutant hücrelerin karışımı (heterojenite) ile oluşması olarak belirlemişlerdir (Kanda ve ark., 2012; Notta ve ark., 2017).



**Şekil - 1: Pankreatik adenokarsoma oluşumu art arda gerçekleşen aktive edici ve inaktive edici mutasyonlar ile gerçekleşir.** Pankreatik duktal epitel hücreleri *KRAS* aktivasyonu ile PanIN hücrelerine dönüşürler ve *CDKN2A*, *TP53*, *SMAD4* genlerinin inaktive edici mutasyonları ile pankreatik duktal adenokarsinoma (PDA) hücreleri oluşur. (Bryant, K.L. ve ark. (2014)'den türkçeleştirilerek alınmıştır.)

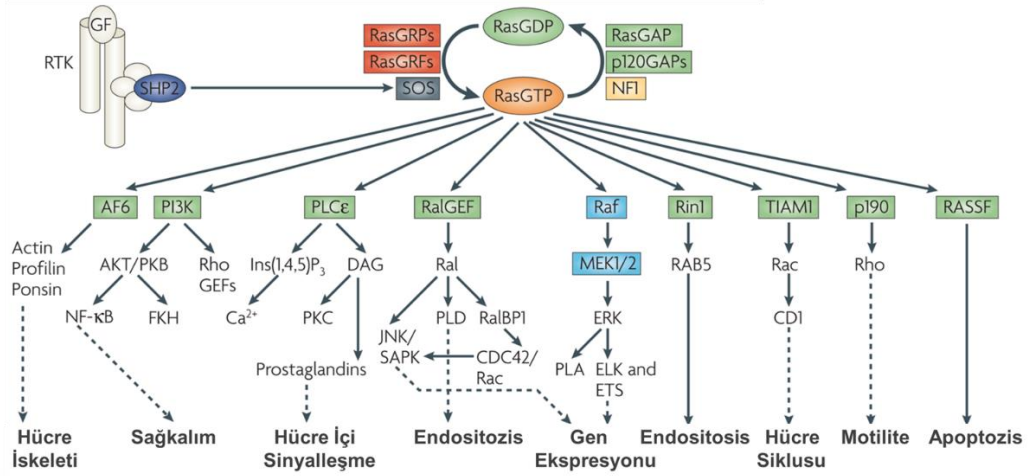
Ras, tüm hayvanlarda ve hücrelerde tespit edilmiş, küçük GTPaz sınıfı bir protein ailesidir (Bos, 1989). Hücre içi bir sinyal aktarım aracı proteini olup, büyüme faktörleri gibi ekstra-sellüler stimulanların uyarımını hücre içi aracılara aktarır (Pylayeva-Gupta ve ark., 2011). İlk olarak 1970 ve 1980'lerde yapılan çalışmalarda ratlardan elde edilen Harvey-Kirsten sarkoma retroviruslarının kanser patogenezinin bazı genler üzerinden etki ettiğinin keşfedilmesi ile ras (rat sarkoma virusundan uyarlanarak) olarak adlandırılmıştır (DeFeo ve ark., 1981; Stehelin ve ark., 1976). 1981 yılında ilk defa ras sekanslarının hücre analogları rat genomunda ve hemen ardından fare ve insan genomlarında tespit edilmiştir (Chang ve ark., 1982).

Harvey sarkoma virus ilişkili onkojen Ha-ras (memelilerde *HRAS*) ve Kirsten sarkoma ilişkili virus Ki-ras (memelilerde *KRAS*) olarak adlandırılmıştır. 1983 yılına gelindiğinde ise ras-ilişkili genlerin üçüncü üyesi olan *NRAS* keşfedilmiştir (Shimizu ve ark., 1983). Zamanla bu genlerin işlevi ve mutasyonlarının önemleri ortaya koyulmuştur.



**Şekil - 2: Ras aktivasyonu ve inaktivasyonu GEF ve GAP enzimleri ile gerçekleşir.** Ras proteinleri inaktif formu olan Ras-GDP halindeyken, uyarımlar sonucu Ras-GEF enzim reaksiyonu ile Ras-GTP haline gelirler ve Ras-GTP, Ras'ın aktif formudur. Normal hücrelerde aktif Ras proteinleri Ras-GAP enzimleri ile tekrar inaktive edilirler ve bu süreç hücre homeostazisini sağlar. Fakat PDA'larda RAS mutasyonları sonucunda Ras-GTP inaktive edilemez ve «sürekli aktif» Ras formunda kalır ve Ras aşırı aktivasyonu onkojenik transformasyon ile sonuçlanır. (Bryant, K.L ve ark. (2014)'den türkçeleştirilerek alınmıştır.)

İnsanlarda, üç RAS geni, yüksek homolojiye sahip 21 kDa ağırlığındaki dört farklı Ras proteinlerini (HRAS, NRAS, KRAS4A ve KRAS4B) kodlar. Bu proteinler aktif ve inaktif durumları arasında geçiş yaparak hücre yüzey reseptörlerindeki uyarımı hücre içine aktarırlar. Ras inaktif haldeyken GDP bağlı RAS-GDP olarak bulunur. Fizyolojik durumlarda aktivasyonu guanin nükleotid değişim faktörleri (guanine nucleotide exchange factors; GEF) aracılığıyla olur ve GDP-GTP değişimi ile Ras'a GTP bağlanır. Ras inaktivasyonu ise, GTPaz aktive edici proteinlerin (GTPase-activating proteins; GAP) etkisiyle Ras aracılı GTP hidrolizi sağlanarak gerçekleştirilir (Bos, 1989; Bryant ve ark., 2014). Onkojenik transformasyon sürecinde gerçekleşen Ras mutasyonları, birkaç örnek dışında, genellikle bu reaksiyonu engeller ve Ras'a GAP bağlanamaz, GTP hidrolizinin bozulmasıyla Ras sürekli aktif (constitutively active) formda kalır (Şekil - 2). G12 ve G13 mutasyonları Ras ile RasGAP arasında van der Waals bağı kurulmasını engellerken (Scheffzek ve ark., 1997), Q61 mutasyonu, GTP hidrolizi için gerekli su molekülünün bağlanmasını engeller (Scheidig ve ark., 1999). Bu mutasyonlar en sık KRAS'da görülür ve mutasyon sıklıkları incelenen bir çalışmada KRAS mutasyonları safra yolu (%31), kolon (%33) ve pankreas tümörlerinde (tüm pankreas tümörlerinin %57'si; PDA'larda %90'dan fazla) yüksek oranda saptanmıştır (Pylayeva-Gupta ve ark., 2011).



**Şekil - 3: Ras aktivasyonu ile aktive olan bazı önemli hücre içi yollar ve hücre biyolojisine etkileri.** Ras sinyalleşmesi hakkında klasik görüşe göre, büyüme faktörleri gibi stimulanların etkisi sonucunda Resptör Tirozin kinazların (RTK) aktivasyonu ile Ras, GTP bağlanarak aktive olur ve bu aktivasyon sonrasında pek çok hücre içi yolağı aktive eder. Bu yollar hücre biyolojisi ile ilgili siklus ilerleyişi, sağkalım, gen ekspresyonu düzenlemesi gibi pek çok olayda görev alır. (Karnoub, A.E. ve ark. (2008)'den türkçeleştirilerek alınmıştır.)

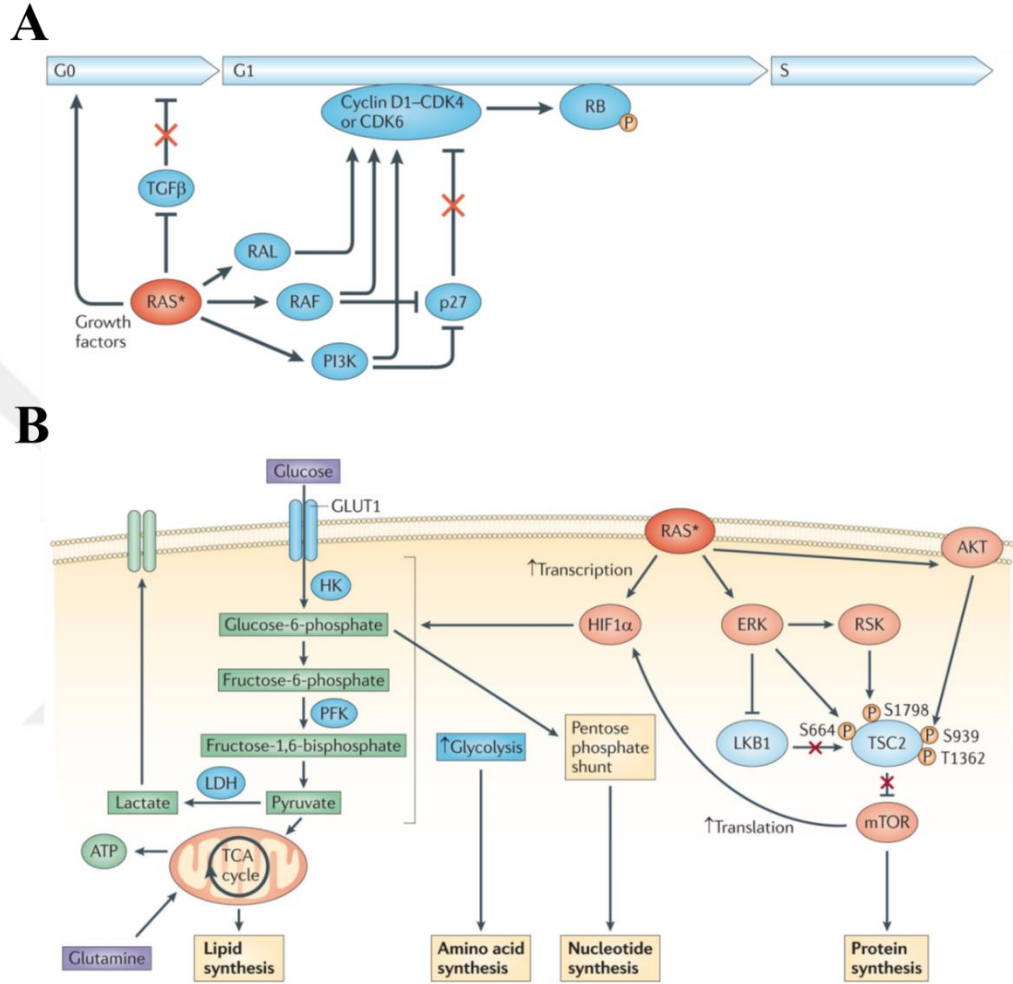
Ras proteinlerinin, mitojenik uyarımları aktarmalarından dolayı, hücre proliferasyonunu hızlandırması sürpriz değildir. Keşfinden kısa süre sonra yapılan ilk çalışmalarda yalnızca onkojenik HRAS over-ekspresyonunun, G0 fazında durmuş hücreleri büyüme faktörü uygulanmadan, bu durumdan kurtararak tekrar hücre siklusuna soktuğu gözlenmiştir (Feramisco ve ark., 1984). Ras, sinyal aktarımında merkezi bir roledir ve aktivasyonu, pek çok farklı sinyal yolunu aktifleştirir. Bunlardan en önemlilerinden bazıları PI3K/Akt, Raf/MAPK, RalGEF gibi sinyal yollarıdır ve bu aktivasyon ile hücre siklusu ilerleyişi sağlanır, apoptoz engellenir, gen ekspresyonları regüle edilir (Şekil - 3) (Pylayeva-Gupta ve ark., 2011). Onkojenik Ras sinyali ile Serum cevap faktörü (SRF), Löysin zipper proteini (JUN), ETS-domeini içeren transkripsiyon faktörü (ELK1), Nükleer faktör  $\kappa$ -B (NF- $\kappa$ B) gibi bazı hücre siklus ilerleyişiyle ilişkili transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu artar ve bu faktörler G1 faz siklini olarak bilinen Siklin D1 ekspresyonunu artırır (Malumbres ve Pellicer, 1998; Stacey ve ark., 1987; Ulrich ve ark., 1997). Ek olarak, GSK3 $\beta$  inhibisyonu ile Siklin D1'in proteozomal degradasyonu engellenerek stabilitesi artar (Filmus ve ark., 1994). Ayrıca Ras sinyali ile p21 ve p27 gibi siklin-bağımlı kinaz (CDK) inhibitörleri baskılanır ve bu

da hücre siklus ilerleyişine katkıda bulunur (Leone ve ark., 1997; Rivard ve ark., 1999) (Şekil - 4-A).

Proliferasyondaki artış, metabolizma hızında yükselme gerektirdiğinden Ras ilişkili sinyaller, beklendiği gibi hücre metabolizmasını da hızlandırır. Pek çok farklı çalışma RAS onkojenlerinin glikolizi artırdığını göstermiştir (Bryant ve ark., 2014; Racker ve ark., 1985; Vizan ve ark., 2005). *KRAS*, GLUT1 glikoz transporter ekspresyonunu arttırarak hücre içine glikoz alımını yükseltir. Bu da hızlanmış glikolitik aktivite ve laktat üretimiyle sonuçlanır (Gaglio ve ark., 2011; Yun ve ark., 2009). Bu durum onkojenik *KRAS* taşıyan hücrelerin düşük glikoz bulunduran ortamlarda hayatta kalımını artırarak, hücreler için ciddi avantaj sağlamaktadır (Yun ve ark., 2009). Ayrıca, son zamanlarda mutant *KRAS*'ın Heksokinaz (HK1 ve HK2) ve Fosfofruktokinaz-1 gibi hız sınırlayıcı glikolitik enzimlerin ve Laktat dehidrojenazın ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Şekil - 4-B) (Ying ve ark., 2012). Bu enzimlerin ekspresyon artışı hızlanmış glikolitik akış ile sonuçlanmaktadır. Öte yandan mutant *KRAS* ekspresyonu, glikoliz ara metabolitlerinin pentoz-fosfat geçidi ve heksozamin biyosentezi gibi diğer anabolik metabolik yollara geçişini de arttırmaktadır (Bryant ve ark., 2014; Ying ve ark., 2012).

Artmış glikoz alımı ve glikolizin yanısıra, kanser hücrelerinin, diğer amino asitlerden on kat fazla glutamin tükettiği 1955'de gözlemlenmiştir (Eagle, 1955). Kanser hücrelerinde glutamin, karbon iskeleti ile TCA siklusuna ve nitrojen ile nükleotid sentezine, non-esansiyel amino asit sentezine ve heksozamin sentezine katkıda bulunur (DeBerardinis ve ark., 2007; Hensley ve ark., 2013). Ayrıca glutamin, malik enzim reaksiyonu ile ciddi miktarlarda NADPH sentezleyerek hücre içi redoks sağlar (DeBerardinis ve ark., 2007). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, PDA hücrelerinin düşük hücre içi reaktif oksijen seviyelerini tercih ettiğini göstermiştir (Kong ve ark., 2013). *KRAS*<sup>G12D</sup> ekspresyonunun, bir reaktif oksijen detoksifiye edici olan Eritroid-2 ilişkili faktör (NRF2) transkripsiyonunu artırdığı ve hücre hayatta kalımını sağladığı gösterilmiştir (De Nicola ve ark., 2011). Bunun yanı sıra farklı çalışmalarda, glikolitik akış artışı görülen kanser hücrelerinin daha fazla glutamin tükettiği ve glutaminin tümör hücre

proliferasyonunda anabolik rolü olduğu gösterilmiştir (DeBerardinis ve ark., 2007; DeBerardinis ve ark., 2008; Gaglio ve ark., 2011).



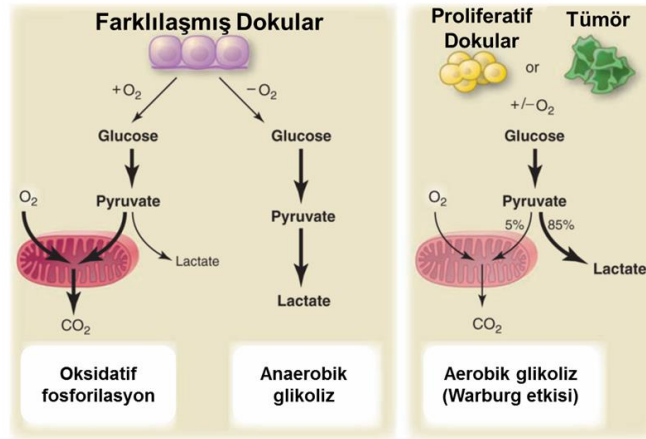
**Şekil - 4: Ras aktivasyonunun hücre proliferasyonuna ve metabolizmaya etkileri. A)** Ras aktivasyonu ile aktive olan Ral ve Ras gibi Ras efektörleri ve PI3K yolu ile direkt ve indirekt şekilde Siklin D1-CDK4 kompleksi oluşumu ve Retinoblastoma fosforilasyonu ile G1 fazı ilerleyişi sağlanır. **B)** Ras aktivasyonu, HIF1α transkripsiyonunu artırarak Warburg etkisine katkıda bulunur ve aerobik glikolizi sağlar. Benzer şekilde, Ras; Heksokinaz, Fosfofruktokinaz ve Laktat Dehidrojenaz gen ekspresyonlarını artırır. Diğer yandan; ERK, AKT ve TSC2 fosforilasyonu ile protein sentezini uyarır. (Gupta-Pylayeva ve ark. (2013)'den alınmıştır.)

## 2.2. Tümör Hücrelerinde Enerji Metabolizmasının Yeniden Düzenlenmesi ve Warburg Etkisi

Bakteriler gibi tek hücreli organizmalarda, ortamda besin maddeleri bulunduğunda oldukça hızlı üremek için evrimsel baskı bulunmaktadır ve metabolik kontrol sistemleri buna uygun gelişmiştir. Yaşam ortamında bol besin maddesi bulunduğunda bakteriler besinleri katabolik yollara oldukça hızlı sokarak enerji ve makromolekül sentezlerlerken, gerekenden az besin bulunduğunda ise hücreler biyokütle arttırımını durdurup, metabolizmalarını açlık dönemini atlama için gereken maksimum enerjiyi elde etmeye adapte ederler. Bu metabolik ihtiyaçlardaki farklılıklardan dolayı, proliferen olan ve olmayan hücrelerde metabolizma kontrolü için farklı mekanizmalar gelişmiştir (Vander Heiden ve ark., 2009).

Çok hücreli organizmalarda ise, çoğu hücre sürekli besin maddelerine erişebilir durumdadır ve organizmanın hayatta kalışı, ortamda sürekli besin maddesi bulunsa dahi, hücrelerin aşırı bölünmesinin sınırlanması ile mümkündür. Bu sebeple, çok hücreli organizmalarda besin maddelerinin hücrelere alınması ve kullanılması, büyüme faktörlerine bağlıdır. Normal hücrelerde büyüme faktörleri ile stimülasyon, besin maddelerinin alınması ve hücre proliferasyonunun devamlılığı için esansiyeldir. Fakat kanser hücrelerinde bu “büyüme faktörü bağımlılığı” durumu, reseptör ilişkili büyüme faktörü sinyal yollarını aktive edici mutasyonlar ile aşılır. Giderek büyüyen kanıtlar, bu sinyal yollarının mutasyonlarının besin maddelerinin alınımını ve metabolizmasını artırdığını göstermektedir (DeBerardinis ve ark., 2008; Gillies ve Gatenby, 2007; Hsu ve Sabatini, 2008).





**Şekil - 5: Hızlı proliferasyon yapan dokularda ve tümör dokularında Warburg etkisi görülür.** Farklılaşmış dokularda Oksijen varlığında oksidatif fosforilasyon ile ATP elde edilirken, ortamda oksijen olmaması halinde anaerobik glikoliz ile ATP elde edilir. Proliferatif dokularda ve tümörlerde ise ortamda oksijen olup olmamasından bağımsız olarak, glikozun büyük çoğunluğundan laktat elde edilir ve bu durum aerobik glikoliz (Warburg etkisi) olarak tanımlanmıştır. (Vander Heiden ve ark. (2009)'dan türkçeleştirilmiştir.)

Farklılaşmış proliferasyon olmayan dokular ve hücreler oksijen varlığında, öncelikli olarak glikozdan glikoliz ile piruvat elde ederler. Sonrasında piruvat, trikarboksilik asit (TCA) siklusuna girerek indirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NADH) üretir. Burada üretilen NADH molekülleri de oksidatif fosforilasyonu besler ve bu sayede ATP üretimi maksimize edilirken laktat üretimi oldukça az olur. Bu hücrelerde yalnızca anaerobik koşullarda fazla miktarda laktat üretilir. Bu durumun tersine, kanser hücrelerinin çoğu oksijen bulunurluğundan bağımsız şekilde çok miktarda laktat üretmektedir ve bu durum aerobik glikoliz olarak adlandırılmıştır. Bu gözlemi ilk defa 1920'lerde Otto Warburg ve ark. (1956) gerçekleştirmiştir ve bundan dolayı 'Warburg etkisi' olarak da adlandırılmaktadır (Şekil - 5) (Vander Heiden ve ark., 2009; Warburg, 1956; Warburg ve ark., 1927).

Warburg etkisi hücrelerde glikolizi hızlandırarak ATP üretimini arttırmaktadır, fakat hala tam olarak çözülememiş bir paradoks doğurmaktadır: "Neden çok miktarda ATP ihtiyacı duyan proliferasyon yapan tümör hücreleri, metabolizmanın ATP açısından bu kadar verimsiz bir yolunu tercih ediyorlar?" Çünkü glikoz metabolize olup laktat üretildiğinde 1 molekül glikoz için 2 ATP üretilmektedir, fakat 1 molekül glikozun tam bir oksidatif fosforilasyon döngüsüne girmesi ile 36 ATP üretilmektedir (Wieringa ve ark., 1981). Bu durumun bir kaç sebebi bulunduğu düşünülmektedir, fakat bunların en önemlisi yine direkt ATP

sentezi ile ilgilidir. Glikolizde her ne kadar oksidatif fosforilasyona göre çok daha az ATP molekülü sentezleniyor olsa dahi, glikolizin tam bir oksidatif fosforilasyon döngüsüne göre 10-100 kat daha hızlı gerçekleştiği göz önünde bulundurulursa, belirli bir zaman aralığında yalnızca glikoliz ile daha çok ATP üretilmektedir (Guppy ve ark., 1993). Diğer bir deyişle, tüketilen glikoz başına elde edilen ATP miktarı düşük olsa dahi, eğer ortamda yeterince glikoz bulunuyor ve glikolitik akış yeterince hızlı ise, glikolizden oksidatif fosforilasyona göre daha fazla ATP üretilabilecektir. Bunun mekanizmasal sebepleri tartışmalı olsa da bazı bulgular bunu enzim regülasyonu ve kinetiği ile açıklamaktadır ve tümör hücrelerinde, glikoliz hızının piruvat oksidasyon hızını geçtiğini ve elimine edilemeyen fazla piruvatın laktata çevrilerek eliminasyonunun sağlandığını göstermektedir (Curi ve ark., 1988). Piruvat oksidasyonu için öncelikle piruvatın mitokondri matrisine transportu sağlanmalı ve Piruvat dehidrojenaz (PDH) enzim kompleksi ile reaksiyona girmelidir. Bu enzimin regülasyonu fosforilasyon, serbest Asetil-KoA seviyeleri ve  $NAD^+/NADH$  oranı ile sağlanmakta ve glikolitik akışa göre aktivitesi düzenlenmektedir. Glikolitik akış hızı, PDH'nin  $V_{max}$ 'ını geçtiğinde piruvatın akümüasyonu farklı bir yolla engellenmelidir ve Laktat dehidrojenaz (LDH) enzimi bu problemi, piruvatı laktik asite çevirerek çözmektedir (Curi ve ark., 1988; Vander Heiden ve ark., 2009).

Son zamanlarda yapılan ve ekonomi alanında çığır açan Oyun Teorisi (Game Theory)'nin (Kuhn ve ark., 1996) kanser biyolojisine uygulandığı bir modelleme çalışmasında, ortamda paylaşılan ve limitlenmiş enerji kaynağı bulunması halinde, daha verimsiz, fakat daha yüksek hızda ATP üretiminin, hücrelere selektif avantaj sunabileceği görülmüştür (Chang ve ark., 2015a; Pfeiffer ve ark., 2001). Modelleme ile aynı doğrultuda, tümör mikro-çevresinde de sınırlı glikoz bulunmaktadır ve tümör hücreleri bölgedeki stromal hücreler ve immun hücreler ile kompetisyon halindedir (Chang ve ark., 2015a; Chang ve ark., 2015b).

Warburg etkisinin kanser hücrelerine katkısı yalnızca ATP ile sınırlı değildir. Glikoliz ara metabolitleri, pek çok farklı metabolik yol tarafından da kullanılabilirler. Kanser hücrelerinin hızlı proliferasyon için ihtiyaç duyduğu makromoleküllerin sentezleri de glikoliz ile yakın ilişki içerisindedir. Örnek olarak fruktoz-6-fosfat amino şeker sentezi, glikolipid ve glikoprotein sentezi; dihidroksi

aseton fosfat lipid sentezi; 3-fosfogliserat serin sentezi; piruvat ise alanin sentezi için kullanılabilir (Gatenby ve Gillies, 2004; Kroemer ve Pouyssegur, 2008; Liberti ve Locasale, 2016). Benzer şekilde yine bir glikoliz ara metaboliti olan glikoz-6-fosfat, pentoz fosfat yoluna girebilir ve bu metabolik yolda üretilen riboz-5-fosfat nükleotid sentezi için, NADPH ise hücrenin anti-oksidan durumunun korunması ve yağ asidi sentezi için kullanılmaktadır (Gatenby ve Gillies, 2004; Gillies ve Gatenby, 2007).

Kanser hücrelerinde görülen aerobik glikolizin bir başka önemli etkisi de tümör mikro çevresi üzerinedir (Kroemer ve Pouyssegur, 2008; Swietach ve ark., 2007). Glikoliz artışı sonucu yükselen laktik asit salınımı, tümör hücrelerini çevreleyen dokunun eradikasyonu ve tümör hücrelerinin invazyonu için önemlidir (Estrella ve ark., 2013). Dokuda fazlasıyla düşen pH'a yanıt veren normal hücreler apoptoza uğrarlar (Culmsee ve Mattson, 2005). Aynı zamanda invazyon ve metastaz için aktivitesi gerekli olan katepsinler ve metalloproteinazlar düşük pH'da aktive olmaktadır (Swietach ve ark., 2007).

Warburg etkisini başlatan ve destekleyen üç majör onkojenik olay bulunmaktadır ve bunlar sırası ile: (i) hipoksiye yanıt veren transkripsiyon faktörleri aktivasyonu (HIF1 gibi), (ii) onkojenik proteinlerin aktiviteleri (KRAS, BRAF gibi) ve (iii) tümör supresörlerin inaktivasyonudur (p53, PTEN gibi).

Oksijen varlığında, Hipoksi tarafından indüklenen faktör 1- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), üretildikçe yıkımlanan bir proteindir. Bu degradasyon, VHL (von Hippel-Lindau) proteininin HIF-1 $\alpha$ 'ya bağlanması ve bu yapının ubiquitin tarafından tanınması ile proteazom aracılı degradasyon şeklinde gerçekleşir (Haase, 2009). Kanser hücrelerinde HIF1- $\alpha$ 'nın degradasyonu azalır ve neredeyse tüm glikolitik genler HIF-1 $\alpha$ 'nın transkripsiyonel hedefleridir (Yalcin ve ark., 2009b). HIF-1 $\alpha$  artışı ile Heksokinaz-2 (HK2), Fosfofruktokinaz-1 (PFK1), Piruvat kinaz 2 (PKM2), GLUT1 ve GLUT3 ekspresyonları artar. Piruvat dehidrojenaz kinaz-1 (PDK1) ekspresyonu artışı ile piruvat dehidrojenaz enzimi baskılanır ve piruvat'ın Asetil koenzim A'ya dönüşümü ve sitrik asit siklusuna girişi azalır (Porporato ve ark., 2011). HIF-1 $\alpha$ 'nın ekspresyonu ise PI3K/Akt/mTOR ve Raf/MAPK gibi büyüme faktörü ilişkili yollarla kontrol edilir (Jiang ve ark., 2001; Yalcin ve ark., 2009b).

HIF-1 $\alpha$  stabilizasyonu hipoksik olmayan tümörlerde bile görülür ve *SRC*, *RAS* onkojenik aktivasyonları ve/veya tümör süpresör VHL inaktivasyonu kaynaklı gerçekleşebilir (Dang ve ark., 2008; Semenza, 2003).

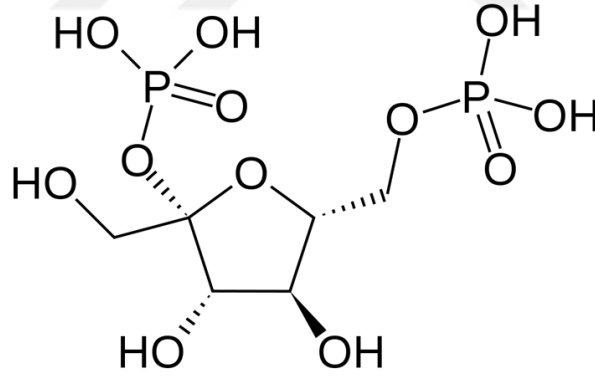
Onkojenik proteinlerin aktivasyonu ile pek çok sinyal yolu aktifleşir ve hücrel proliferasyon artışı, metabolik transformasyon gibi yanıtlarla sonuçlanır. Ras, Src, c-Myc'i kapsayan bu onkojenik proteinler doğrudan veya dolaylı yollarla metabolizma hızlanmasından sorumludurlar. Örneğin HK2, Laktat dehidrojenaz (LDH) ve Enolaz enzimleri *MYC* geninin direk hedefleridir (Kim and Dang, 2006).

Kanserde metabolizma hızı artışının bir diğer nedeni de tümör baskılayıcı "tümör süpresör" faktörlerin kaybıdır. Özellikle tümör süpresör faktörlerden *TP53* geni tarafından kodlanan p53'ün kaybı metabolizmanın hızlanmasına direkt etkilidir. Ekspresyonu p53 ile kontrol edilen TIGAR (TP53 tarafından indüklenen glikoliz ve apoptoz düzenleyicisi) varlığında, glikoliz baskılanır (Bensaad ve ark., 2006). p53 kayıplı tümör hücrelerinde TIGAR ekspresyonu da azalır ve glikoliz baskılanamaz (Bensaad ve ark., 2006; Green ve Chipuk, 2006). Tümör süpresörlerden yine pVHL (von Hippel-Lindau proteini) de HIF-1 $\alpha$ 'nın degradasyonunu sağlayan faktörlerdendir ve bu protein fonksiyonu kaybolduğunda hipoksik olmayan ortamda bile HIF-1 $\alpha$  stabilize olmaya başlar (Haase, 2009). Son olarak *PTEN* de önemli bir tümör baskılayıcıdır ve fonksiyonunun pek çok kanser tipinde kaybedildiği belirtilmiştir (Sun ve ark., 1999). Son zamanlarda yayınlanmış bir araştırma sonuçlarına göre *PTEN*-kayıplı hücrelerde fruktoz-2,6-bisfosfat'ın artan konsantrasyonlarının Warburg etkisine yardımcı olduğu gösterilmiştir (Cordero-Espinoza ve Hagen, 2013).

## 2.3. PFKFB Enzimleri ve Tümör Enerji Metabolizması

### 2.3.1. Fruktoz-2,6-bisfosfat ve PFKFB enzimleri

1980 yılında karaciğerde glukagonun glukoneogeneze etkisini araştıran bir araştırma sonucunda PFK1 enzim aktivitesini artırıp, Fruktoz-1,6-bisfosfataz'ı inhibe eden küçük bir molekül keşfedilmiştir. İlk deneylerde, bu molekülü içeren total karaciğer lizatının PFK1 aktivitesi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Değişik miktarlarda glikoz ile inkübe edilen karaciğerlerden izole edilen ve protein dışındaki küçük molekülleri de ihtiva eden ekstraktın PFK1 aktivitesine etkisi incelenmiştir. Karaciğere uygulanmış glikoz miktarı arttıkça PFK1'in aktivitesinin arttığı görülmüştür. Daha sonra yapılan detaylı kimyasal analizlerde bu molekülün fruktoz-1,6-bisfosfat'a çok benzeyen fruktoz-2,6-bisfosfat (Fru-2,6-BP) olduğu ve PFK1 aktivitesini artırdığı anlaşılmıştır (Van Schaftingen ve Hers, 1980) (Şekil - 6).



Şekil - 6: Fruktoz-2,6-bisfosfat molekülünün kimyasal yapısı.

Daha sonra yapılan deneylerde Fru-2,6-BP'nin PFK1'in substratına (Fruktoz-6-fosfat) olan affinitesini artırdığı ve ATP'nin PFK1 üzerindeki inhibe edici etkisini ortadan kaldırdığı gözlenmiştir. Fru-2,6-BP'nin ATP tarafından allosterik inhibisyon ile baskılanmış fosfofruktokinaz-1 aktivitesini tekrar sağlayabildiği önemli bir gelişmedir, çünkü normal hücrelerde ATP artışı ile enerji ihtiyacı ortadan kalkar ve PFK-1'in allosterik inhibisyonu ile glikoliz yavaşlar

(Vander Heiden ve ark., 2009). Kanser hücrelerinde Fru-2,6-BP konsantrasyonu fazla olduğundan Fru-2,6-BP varlığında bu etkinin ortadan kalkması, Warburg etkisini kısmen de olsa açıklar (Hers ve Van Schaftingen, 1982; Okar ve ark., 2001; Van Schaftingen ve ark., 1980b).

Fru-2,6-BP, zamanla tüm memeli dokularında tespit edilmiştir ve bununla beraber mantarlarda ve bazı tek hücreli ökaryotlarda dahi saptanmış bir moleküldür (Hue ve Rider, 1987). Fru-2,6-BP, Piruvat kinaz'ın allosterik aktivatörü olarak görev yaptığı bazı protistler dışında bulunduğu organizmaların çoğunda PFK1 enziminin pozitif allosterik aktivatörüdür (Rider ve ark., 2004).

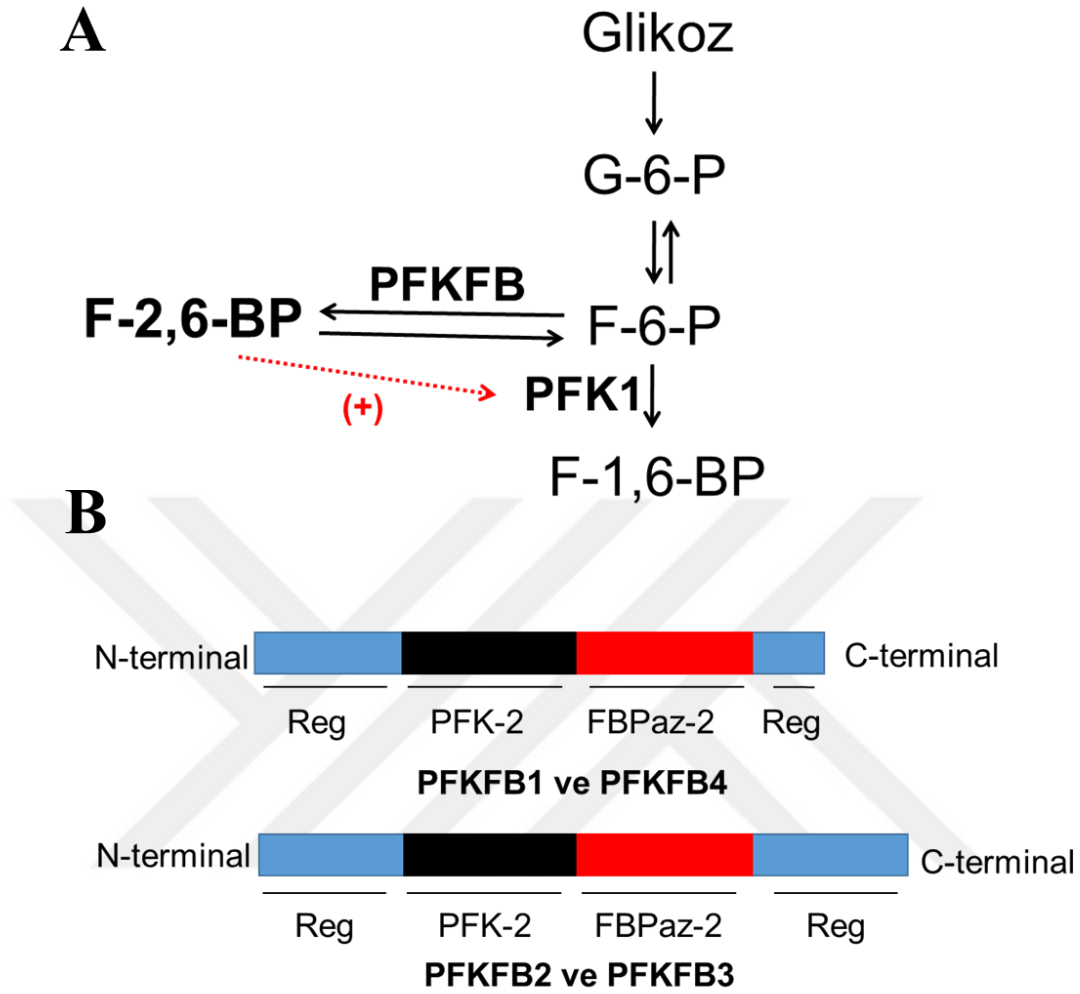
Fruktoz-2,6-bisfosfat'ın yapımı ve yıkımı 6-Fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bisfosfataz (PFKFB) enzimleri tarafından katalizlenmektedir. Bifonksiyonel yapıdaki bu enzimler kinaz ve fosfataz aktiviteli domeinler içeren homodimerik enzimlerdir. PFKFB enzimleri Fosfofruktokinaz-1 ile aynı substratı, fruktoz-6-fosfat'ı, kullanırlar ve kinaz aktivitesi ile fruktoz-6-fosfat'ı fruktoz-2,6-bisfosfat'a çevirebilirken, fosfataz aktivitesi ile fruktoz-2,6-bisfosfat'ın fruktoz-6-fosfat'a defosforilasyonunu sağlarlar (Okar ve ark., 2001; Yalcin ve ark., 2009b). Reaksiyon sonucunda oluşan fruktoz-2,6-bisfosfat, Fosfofruktokinaz-1'i aktive eder (Şekil - 7-A).

PFKFB enziminin dört adet izoformu tanımlanmıştır. Başlangıçta karaciğer izoformu, kalp izoformu, plasenta izoformu, testis izoformu olarak tanımlanan bu dört izoform sonrasında PFKFB 1-4 olarak isimlendirilmiştir. Bu izoformlar farklı genler tarafından kodlanmaktadır ve *PFKFB* genlerine ve transkriptlerine ait bilgiler Tablo 1'de sunulmuştur.

**Tablo 1:** *PFKFB* genlerine ve transkriptlerine ait bilgiler.

Gen Adı	Kromozom Lokasyonu	Baz Çifti	Ekson Sayısı	Transkriptler
<i>PFKFB1</i> (Rider ve ark., 2004)	Xp11.21	60,944	17	L - Karaciğer M - Kas F - Fötal
<i>PFKFB2</i> (Heine-Suner ve ark., 1998)	1q32.1	27,961	15	4 - tam uzunlukta protein kodlayan (İzoformlar a ve b) 2 - kesilmiş protein kodlayan 3 - protein kodlamayan
<i>PFKFB3</i> (Chesney ve ark., 1999; Kessler ve Eschrich, 2001; Navarro-Sabate ve ark., 2001)	10p15.1	109,770	19	2 ana izoform - uPFK-2 - iPFK-2 4 diğer transkript
<i>PFKFB4</i> (Sakata ve ark., 1991)	3p21.31	44,332	14	2 ana izoform

PFKFB protein yapısı; N-terminal domein, kinaz domeini, fosfataz domeini ve C-terminal regülatör domein olmak üzere 4 ana bölgeden oluşmaktadır. İzoformlar katalitik domeinlerde %85 benzerlik gösterirken, N-terminal ve C-terminal regülatör kısımları birbirlerinden oldukça farklıdır (Yalcin ve ark., 2009b) (Şekil - 7-B). Enzim komisyonu isimlendirmesine göre, 6-fosfofrukto-2-kinaz (Fosfofruktokinaz-2) (EC 2.7.1.105) ve Fruktoz-2,6-bisfosfat-2-fosfataz (Fruktoz-2,6-bisfosfataz) (EC 3.1.3.46) olarak enzimler aktivitesine göre sınıflandırılmışlardır (Okar ve ark., 2001). Farklı izoformlar farklı kinaz:fosfataz aktivitelere sahiptirler. *PFKFB1*'in kinaz:fosfataz aktivite oranı 1.2, *PFKFB2* kinaz:fosfataz aktivite oranı 1.8, *PFKFB4* kinaz:fosfataz aktivite oranı 0.9'dur. *PFKFB3* ise diğerlerinin dengeli oranlarının tersine, 700'den yüksek kinaz:fosfataz oranına sahiptir (Loiseau ve ark., 1988; Shi ve ark., 2017; Susana ve ark., 2013). Fakat bu aktivite deneyleri *in vitro* gerçekleştirildiği için *in vivo* aktiviteler tam bilinmemektedir.



**Şekil - 7: PFKFB enzimleri protein domeinleri ve PFKFB enzimleri tarafından katalizlenen reaksiyon.** A) PFKFB enzimleri kinaz domeini ile fruktoz-6-fosfat'ı fosforlayarak fruktoz-2,6-bisfosfat sentezini ve fosfataz domeini ile fruktoz-2,6-bisfosfattan fruktoz-6-fosfat sentezini sağlar. B) PFKFB enzimleri N-terminal ve C-terminal iki regülatör domeine, kinaz domeinine ve fosfataz domeinine sahiptirler. PFKFB1 ve PFKFB4 enzimlerinin C-terminal regülatör domeinleri PFKFB2 ve PFKFB3 enzimlerine göre daha az sayıda amino asit içermektedir. PFKFB2 ve PFKFB3 enzimlerinin özellikle C-terminal regülatör domeinde bulunan bazı amino asitlerden fosforlanarak post-translasyonel olarak regüle edildiği saptanmıştır.

Fruktoz-2,6-bisfosfat, organizmaların ve dokuların değişen çevrelerine ve metabolik durumlarına adaptasyonlarında önemli rol oynar (Bartrons ve ark., 2018). Fruktoz-2,6-bisfosfat da, PFKFB enzimleri ile düzenlenir. PFKFB enzimlerinin regülasyonu ise, substrat varlığına, transkripsiyonel düzenlenmeye ve post-translasyonel modifikasyonlara bağlıdır. Özellikle PFKFB1, PFKFB2 ve PFKFB3 aktiviteleri post-translasyonel modifikasyonlar ile kontrol edilir.



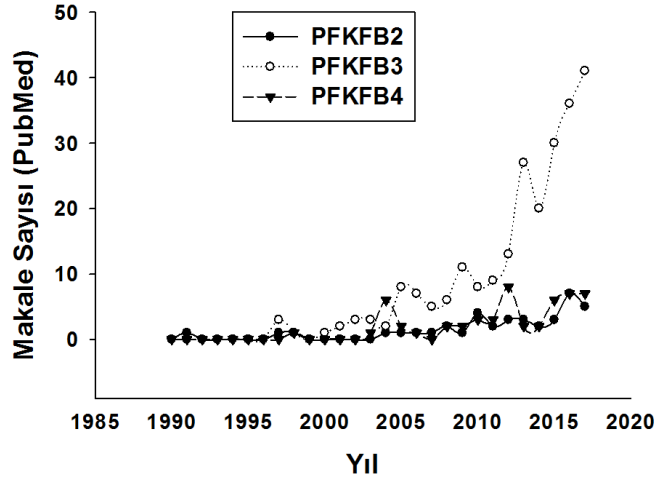
Karaciğerde PFKFB1, glukagon ile uyarıldığında, c-AMP bağımlı Protein kinaz A ile, 32. Pozisyondaki Serin amino-asidi fosforlanır ve buna bağlı olarak PFKFB1 enziminin fosfataz aktivitesi artar. Fosfofruktokinaz aktivitesi azalırken Fruktoz-1,6-bisfosfataz aktivitesi artar ve hücrede glikolitik akış azalarak glukoneogenez artar. Bu modifikasyonun önemi, karaciğerin kana glukoz sağlama görevi düşünülünce, ortaya çıkmaktadır (Bartrons ve ark., 1983). Kalp izoformu olan PFKFB2, kalbin insülin ve adrenalin ile uyarılması ile post-translasyonel modifikasyona uğrar. İnsülin varlığında uyarılan Protein kinaz B, PFKFB2'nin 466. konumdaki serin amino asidinde fosforilasyon sağlar. Adrenalin varlığında da benzer şekilde Protein kinaz A 483. konumdaki serini fosforlar. Bu fosforilasyonlar sonucu PFKFB2'nin kinaz aktivitesi artarken fosfataz aktivitesi azalır. Sonuç olarak glikolitik akış hızlanır. Bu modifikasyon adrenalin ve insülinin fazla olduğu hallerde gerekli enerjinin karşılanması ve sürekli glikolitik akış sağlanabilmesi için önemlidir (Deprez ve ark., 1997; Hue ve ark., 2002; Rider ve ark., 1992). PFKFB2, AMPK (AMP-ilişkili protein kinaz) aracılığı ile 461. konumdaki serin amino asidinden fosforlanabilir (Marsin ve ark., 2000). Hücre hayatta kalımı için önemli proteinler olan 14-3-3 proteinlerinin, IGF (insülin benzeri büyüme faktörü) ve insülin uyarımı sonrasında PFKFB2'ye bağlanarak büyüme faktörü tarafından indüklenen glikolizi yönettiği bildirilmiştir (Rubio ve ark., 2003).

PFKFB3 ekspresyonu; hipoksi (Bartrons ve Caro, 2007), progesteronlar (Hamilton ve ark., 1997), östrojen (Imbert-Fernandez ve ark., 2014), insülin (Riera ve ark., 2002), IL-6 (İnterlöykin-6) (Han ve ark., 2016) gibi farklı pek çok uyarıcı ile kontrol edilmektedir. AMPK, RSK, PKA, PKB gibi farklı protein kinazlar C-terminal bölge kovalent modifikasyonu ile PFKFB3 aktivitesini düzenlemektedirler (Bartrons ve ark., 2018). PFKFB3'ün hücre içi miktarları, diğer izoenzimlerden farklı olarak, protein stabilitesinin kontrolü ile de düzenlenir. Yapısında bulundurduğu "KEN Box" bölgesi sayesinde APC/C-Cdh1 (Anafaz promote edici kompleks) kompleksi ile regüle edilir. Bu kompleks hücre siklusunun G1 fazında esansiyel bir rol oynayan bir E3-ubikuitin ligaz kompleksidir ve bazı hücre siklusu proteinleri ile PFKFB3'ün degradasyonunu sağlar (Almeida ve ark., 2010). Bu kompleksin regülatör kısmı olan Cdh1'in bazı tümör hücre hatlarında malignantlık ile miktarının azaldığı gösterilmiştir ve bu da tümörlerde artan PFKFB3

miktarlarını açıklamaktadır (Wang ve ark., 2000). PFKFB4 ile ilgili bir post-translasyonel modifikasyon henüz bildirilmemiştir, bu da bu izoformun daha az dinamik olduğunu gösterebilir. Fakat, substrat konsantrasyonuna göre ve aktivatör/inhibitör varlığına göre aktivitesinin regüle edildiği bilinmektedir (Susana R ve ark., 2013).

### 2.3.2. PFKFB Enzimlerinin Tümör Hücre Biyolojisinde Rollerini

Özellikle son yıllarda tümör metabolizması, tümör biyolojisi alanında önemli konulardan biri haline gelmiş ve Weinberg ve Hanahan (2011) tarafından kanserin ayırıcı niteliklerinden biri olarak tanımlanmıştır. Metabolizmanın tekrar ilgi çekmesi ile PFKFB enzimlerinin etkilerini anlamaya yönelik çalışmaların sayısı da artmıştır. Özellikle PFKFB3 ile ilgili çalışmalar oldukça artmış, PFKFB2 ve PFKFB4 ise daha yavaş da olsa dikkat çekmeye başlamışlardır (Şekil - 8).



Şekil - 8: PFKFB2, PFKFB3 ve PFKFB4 kelimeleri içeren PubMed veritabanındaki çalışmaların yıllara göre değişimi.

PFKFB1'in kanser hücrelerindeki rolüne ilişkin gerçekleştirilmiş çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır, fakat yapılmış bir çalışmada PFKFB1 enzimine hipoksinin etkileri farklı tümör hücrelerinde araştırılmıştır ve özellikle HeLa ve A549 hücre hatlarında hipoksik durumun PFKFB1 mRNA ekspresyonlarını arttırdığı görülmüştür (Minchenko ve ark., 2003).

PFKFB2 enziminin kanserdeki rollerine ilişkin çalışmalar da az olsa dahi, özellikle son zamanlarda dikkat çekmeye başlamıştır. Moon ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada androjenin prostat kanseri hücre hattı LNCaP'de PFKFB2 ekspresyonunu arttırdığı ve Meng ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada ise androjen reseptörünün transkripsiyonel hedeflerinden olan miR-421 aracılığı ile PFKFB2 ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir. Diğer taraftan, PFKFB2'nin RAS proteinlerinin önemli fonksiyonel araçlarından olan AKT tarafından fosforlanarak aktive edildiği rapor edilmiştir (Novellademunt ve ark., 2013). Ayrıca, hepatosellüler karsinomlarda PFKFB2 ekspresyonu ile MACC1 onkogeni ekspresyonu arasında pozitif bir ilişki saptanmıştır (Ji ve ark., 2014). Melanomada sık görülen bir mutasyon olan BRAF-V600E formunun RSK aktivasyonu ile PFKFB2 aktivasyonu ve glikoliz artışı sağladığı bildirilmiştir (Houles ve ark., 2018). Son olarak osteosarkomalarda, PFKFB2 aktivasyonunun Warburg etkisine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Zhao ve ark., 2018).

Kanserdeki ve hücre biyolojisindeki etkileri en iyi şekilde çalışılmış izoform, PFKFB3'tür. Ovaryum ve tiroid karsinomaları (Atsumi ve ark., 2002), meme kanseri (Novellademunt ve ark., 2012), gastrik kanser (Han ve ark., 2017) ve kolon kanseri (Bando ve ark., 2005) gibi pek çok farklı kanser tipinde over-ekspresyonu bildirilmiştir. Chesney ve ark. (2005) tarafından gerçekleştirilmiş bir çalışmada *PFKFB3* geni fare embriyolarında homozigot silinmiş (*PFKFB3*<sup>-/-</sup>) ve bu silinmenin embriyonik ölüme yol açtığı görülmüştür. 3 farklı benzer izoenzim bulunmasına rağmen yalnızca *PFKFB3*'ün silinmesi bunu sağlamıştır (Chesney ve ark., 2005). Bir immunhistokimya çalışmasında kolon, prostat, meme, akciğer, pankreas, ovaryum, böbrek ve tiroid dokularında PFKFB3 protein miktarlarının, neoplastik dokularda, karşılık geldiği normal dokuya göre artmış olduğu saptanmıştır (Atsumi ve ark., 2002). Telang ve ark. (2006) *PFKFB3*<sup>+/+</sup> ve *PFKFB3*<sup>+/-</sup> farelerin akciğer fibroblastlarını izole ederek mutant HRAS ile

transforme etmişlerdir ve bu hücrelerin onkojenik potansiyelleri değerlendirildiğinde *PFKFB3*<sup>+/-</sup> hücrelerin koloni oluşturma kapasitesinin daha az olduğu görülmüştür (Telang ve ark., 2006). Bu sonuç, PFKFB3'ün Ras ile transformasyonda gerekli olduğunu göstermiştir. Sonrasında, Yalçın ve ark. (2009a) tarafından PFKFB3'ün hücre nükleusuna lokalize olduğu ve bu lokalizasyonun glikoz metabolizmasını etkilemeksizin hücre proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir. PFKFB3'ün ürünü, Fru-2,6-BP hücre nükleusunda Siklin-bağlı kinazları aktive etmektedir ve p27 fosforlanarak proteazomal degradasyonu sağlanmaktadır. Benzer şekilde HeLa hücrelerinde PFKFB3'ün p27 fosforilasyonu ile apoptozu engellediği de raporlanmıştır (Shi ve ark., 2017; Yalcin ve ark., 2014). Farklı bir çalışmada, PFKFB3'ün asetillenmesinin nükleusa lokalizasyonu engelleyerek sitoplazmada birikim sağladığı, ve bu durumun hücreleri sisplatin tarafından gerçekleşen apoptozdan koruduğu bildirilmiştir (Li ve ark., 2018). Bunlara ek olarak PFKFB3'ün, Panc1 hücrelerinde TGF- $\beta$  tarafından indüklenen epitelyal-mezenkimal dönüşüm (EMD) için gerekli olduğu gösterilmiştir ve PFKFB3'ün inhibisyonu ile kanser invazyonu ve metastazının azaltılabileceği rapor edilmiştir (Yalcin ve ark., 2017). Endotellerde eksprese edilen PFKFB3'ün anjiyogenezde kritik bir rol oynadığı ve baskılanmasının damar oluşumunu azalttığı (Xu ve ark., 2014) ve endotelde PFKFB3 inhibisyonunun tümör damarlaşmasında normalizasyon sağladığı ve metastazı azalttığı (Cantelmo ve ark., 2016) gösterilmiştir. Son olarak benzer bir araştırmada endotellerin TNF- $\alpha$  ile uyarımının PFKFB3 ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2018).

PFKFB3'ün kanser metabolizmasındaki rolleri keşfedildikçe, PFKFB3 inhibitörü sentezi ve geliştirilmesi konusuna daha fazla araştırmacı eğilmeye başlamıştır. Standart kemoterapi ve radyasyon terapisi genellikle yalnızca hızlı proliferen olan tumor hücrelerini hedeflemektedir. Daha yavaş bölünen hücrelerde bu tedaviler beklenen etkiyi gösterememektedir. Yavaş bölünen ve geleneksel kemoterapötikler ile inhibisyonu sağlanamayan bazı kanser türlerinde, geleneksel terapiye ek olarak glikolizin baskılanmasının terapiye yardımcı olduğu gösterilmiştir (Liu ve ark., 2001). Diğer yandan, günümüzde hedefe yönelik terapi ve kombinasyon terapileri giderek önem kazanmaktadır ve PFKFB3, bu tedaviler için iyi bir hedef olarak değerlendirilebilir.

3-(3-piridin)-1-(4-piridin)-2-propan-1-on (3PO), iyi çalışılmış bir PFKFB3 inhibitörüdür ve katalitik aktiviteyi inhibe ederek hücre için Fru-2,6-BP miktarını azaltır, bu da azalmış glikolitik akış ile sonuçlanır (Clem ve ark., 2008). 3PO'nun meme (Pisarsky ve ark., 2016), mesane (Lea ve ark., 2015) ve hepatosellüler karsinoma (Clem ve ark., 2008) gibi kanser tiplerinde sitotoksik olduğu ve apoptoz sağladığı gösterilmiştir. 3PO *in vivo* uygulandığında serum glikozunu, alyuvar ve akyuvar sayılarını etkilememektedir ve bu ciddi bir avantaj olarak görülmektedir (Telang ve ark., 2012). İyi çalışılmış bir diğer PFKFB3 inhibitörü, 3PO derivatı olarak sentezlenmiş PFK15'dir. Yapılan çalışmalarda PFK15'in Siklin-CDK/Rb/E2F sinyal yolağını inhibe ederek G0/G1 fazında hücre siklusu arresti sağladığı, apoptozu indüklediği ve hücre içi FAK ekspresyonunun azalması ile invazyonu azalttığı gösterilmiştir (Clem ve ark., 2013; Zhu ve ark., 2016). Ek olarak, diğer PFKFB3 inhibitörleriyle karşılaştırıldığında PFK15, PFKFB3'e karşı daha potent ve selektif aktivite göstermiştir (Clem ve ark., 2013; Zhu ve ark., 2016). PFK15'in geliştirilmesi ile elde edilmiş PFK-158 ise yaygın antitumor ve immunomodülatör etki göstermiştir ve 2016 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde faz-1 klinik deneyleri başarılı bir şekilde tamamlanmıştır (Shi ve ark., 2017). 1-(3-piridin)-3-(2-kinolin)-2-propan-1-on (PQP) (Lea ve ark., 2016), 5,6,7,8-tetrahidroksi-2-(4-hidroksifenil) krom-4-on (N4A) ve 7,8-dihidroksi-3-(4-hidroksifenil) krom-4-on (YN1) (Seo ve ark., 2011) gibi sentezlenmiş diğer PFKFB3 inhibitörleri de bulunmaktadır.

Son olarak, PFKFB4 de yakın zamanda metabolik hedef olarak ilgi çekmeye başlamıştır. Prostat (Minchenko ve ark., 2003), pankreas (Bobarykina ve ark., 2006), mesane (Zhang ve ark., 2016), mide (Bobarykina ve ark., 2006) gibi farklı organlar kökenli kanser tiplerinde yüksek ekspresyonu tespit edilmiştir. 2012 yılında yapılan bir çalışmada PFKFB4'ün, prostat kanserlerinin yaşayabilmesi için gerekli olduğu ve prostat kanseri tedavisinde moleküler bir hedef olarak değerlendirilebileceği gösterilmiştir (Ros ve ark., 2012). PC3 prostat kanseri hücrelerinde ROS detoksifikasyonu için PFKFB4'ün gerekliliği (Strohecker ve ark., 2015) ve p53 bulunmayan kanserlerde hücre hayatta kalımı için gerekli olduğu (Ros ve ark., 2017) gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada PFKFB4'ün protein kinaz gibi çalışarak SRC-3'ü fosforladığı ve transkripsiyonel

aktivitesini artırarak meme kanseri büyümesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Dasgupta ve ark., 2018). Yakın zamanda Chesney ve ark. (2015) tarafından sentezlenmiş PFKFB4 inhibitörü 5-(n-(8-metoksi-4-kinol)amino)pentil nitrat (5MPN), farelerde oral yolla toksik olmayan dozlarda uygulandığında glikoz metabolizmasını ve tümör büyümesini azaltmıştır.



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Kimyasallar, Cihazlar ve Çözeltiler

##### 3.1.1. Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar çeşitli firmalardan temin edilmiş ve üretici talimatları doğrultusunda gerekli konsantrasyonlarda hazırlanmışlardır. Kimyasalların üretici firma ve katalog numarası bilgileri Tablo 2’de sunulmuştur. Kullanılan konsantrasyonlar, ilgili yöntemin anlatımında verilmiştir. Aksi belirtilmedikçe kimyasallar çözülürken ultra-saf steril su kullanılmıştır.

**Tablo 2:** Kullanılan Kimyasallara İlişkin Bilgiler.

<b>Kimyasal Adı</b>	<b>Üretici Firma</b>	<b>Katalog Numarası</b>
Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) Besiyeri	Sigma	D-5030
RPMI Besiyeri	Gibco	12633
M3 Base Besiyeri	Incell Corp.	M300F
Mc Coy’s 5A Besiyeri	Gibco	16600082
Fötal Sığır Serum	Gibco	10500064
L-glutamin	Gibco	25030081
At Serum	Biologic Industries	04-124-1A
Gentamisin	Sigma	G1914
Tripsin -EDTA (% 0,05)	Gibco	25300054
Microscint-40	Parkin Elmer	6013641
Higromisin	Millipore	400052
Blastisidin	Sigma	15205
Puromisin	Sigma	P8833
Ampisillin	Sigma	10835242001
Kanamisin	Sigma	60615
<sup>14</sup> C-ışaretleli deoksi glikoz	Perkin Elmer	NEC495050UC
<sup>3</sup> H-ışaretleli glikoz radyoizotopu	Perkin Elmer	NET238C005MC
Opti-MEM	Gibco	31985062
Lipofectamine 3000	Invitrogen	L30000
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen	137780
Agaroz	Invitrogen	16520050
Luria Agar	Sigma	L2025
Miller’s LB Broth	Sigma	L3022
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

### 3.1.2. Cihazlar

Çalışmalarda kullanılan cihazlar Tablo 3’de belirtilmiştir.

**Tablo 3:** Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar.

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



### 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.

#### **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.

### **Immunfloresan bloklama çözeltisi**

Immunfloresan deneylerinde bloklama çözeltisi olarak %5 keçi serumu kullanıldı. Keçi serumu (Cell Signaling Technologies; Kat. No. 5425) PBS ile çözdürüldü ve karıştırılırken son konsantrasyon % 0.3 olacak şekilde Triton-X eklendi.

### **Immunfloresan antikor dilüsyon çözeltisi**

Immunfloresan deneylerinde kullanılan antikorların hazırlanması için % 1 sığır serum albümini, PBS kullanılarak çözdürüldü. Son konsantrasyonu % 0.3 olacak şekilde Triton-X eklendi.

## **Bakteriyel besiyerleri**

Bakteri üretimi için LB Agar (Miller's LB Agar) (Conda; Kat. No. 1551) ve LB Broth (Miller's LB Broth) (Conda; Kat. No. 1552) kullanıldı. LB Agar 40 g/l ve LB Broth 25 g/l suda çözdürülerek ve otoklavlanarak kullanıma hazırlandı.

### **3.2. Veritabanı Analizleri**

#### **3.2.1. ONCOMINE Veritabanı Analizi**

PFKFB2 ekspresyonunun kanser dokularında, karşılık gelen normal dokulara göre değişiminin değerlendirilmesi amacıyla ONCOMINE veritabanı kullanıldı. ONCOMINE, mikro-array çalışma sonuçlarının toplandığı ve kamuya açık kullanılabilen bir veritabanıdır.

PFKFB2 ekspresyonu değerlendirilmesi amacı ile veritabanında PFKFB2 verisi içeren çalışmalar incelendi ve farklı dokuları içeren üç mikro-array çalışması seçildi. Pankreas kanserleri için Grutzman ve ark. (2004) tarafından elde edilen, meme kanserleri için Turashvili ve ark. (2007) tarafından elde edilen ve serviks kanserleri için Scotto ve ark. (2008) tarafından elde edilen veri setleri kullanıldı.

#### **3.2.2. Nükleus Lokalizasyon Sinyali (NLS) Sekansı Analizi**

PFKFB2 transkript varyantlarının hücre içi lokalizasyonu için PSORT2 adlı veritabanı (Horton ve Nakai, 1997) kullanıldı. Veritabanına kopyalanan PFKFB2 protein sekansları incelenerek nükleusa lokalizasyon sinyali (NLS) bölgesi varlığı değerlendirildi.

### 3.3. Hücre Kültürü ve Proliferasyon Analizi

iPDE (ATCC; Kat. No. CRL-4037) ve iPDE+KRAS<sup>G12D</sup> (ATCC; Kat. No. CRL-4038) hücreleri % 75, % 5 fetal sığır serumu (FBS), 5,5 mM glikoz, 10 ng/ml insan rekombinant epidermal büyüme faktörü (EGF), 750 ng/ml puromisin eklenmiş, ekstradan 2 mM L-glutamin ve 1,5 g/L sodyum bikarbonat içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) ve %25 M3 Base içeren besiyerinde çoğaltıldı. Bu besiyeri PDE besiyeri olarak adlandırıldı.

PANC-1 (ATCC; Kat. No. CRL-1469), HeLa (ATCC; Kat. No. CCL-2), A375 (ATCC; Kat. No. CRL-1619), DU145 (ATCC; Kat. No. HTB-81), MCF7 (ATCC; Kat. No. HTB-22), ve S2VP10 (metastatik pankreas hücre hattı; Dr. Brian Clem tarafından hediye edildi.) hücreleri % 10 FBS ve 5 µg/ml gentamisin içeren DMEM besiyerinde çoğaltıldı. MIA PaCa-2 (ATCC; Kat. No. CRL-1420) hücreleri için %10 FBS, % 2,5 At Serumu ve 5 ug/ml gentamisin içeren DMEM besiyeri kullanıldı. A549 (ATCC; Kat. No.CCL-185) ve BxPC-3 (ATCC; Kat. No. CRL - 1687) hücrelerinin çoğaltılması için % 10 FBS ve 5 ug/ml gentamisin içeren RPMI-1640 besiyeri kullanıldı. HCT116 (ATCC; Kat. No. CCL-247) hücreleri % 10 FBS ve 5 ug/ml gentamisin içeren McCoy's 5A besiyerinde çoğaltıldı. Pasajlamalarda kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS) ve Tripsin-EDTA kullanıldı. Hücreler 37°C`ye ayarlı, %5 CO<sub>2</sub> içeren nemli inkübatörde çoğaltıldı.

Hücre proliferasyon analizlerinde hücreler tripsinize edildi ve besiyeri ile karıştırıldı. Hücre-besiyeri süspansiyonu 1:1 oranda Tripan mavisi ile karıştırılarak hemasitometreye 10 µl uygulanarak invert mikroskop (Accu Scope) ile sayıldı.

### **3.4. mRNA Ekspresyon Analizleri**

#### **3.4.1. RNA İzolasyonu 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.

#### **3.4.2. 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 (Applied Biosystems) yararlanıldı. cDNA amplifikasyonu Taq polimeraz (Invitrogen; 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 50 °C/2 dk (Aşama 1), 95 °C/20 sn (Aşama 2; ilk denatürasyon) , 95 °C/1 sn (Aşama 3; denatürasyon) ve 60 °C/20 sn (Aşama 4; yapışma, uzama ve deteksiyon) programına ayarlı qPCR cihazında reaksiyona tabi tutuldu. Üçüncü ve dördüncü 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  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metodu ile hesaplandı (Kole ve ark., 1991). Hesaplamalarda  $\beta$ -aktin internal amplifikasyon kontrolü olarak kullanıldı. Kantitatif gerçek zamanlı PCR analizinde kullanılan problemlerin bilgileri Tablo 4’de gösterilmiştir. Bütün problemler Applied Biosystems firmasından temin edilmiştir.

**Tablo 4:** Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizinde Kullanılan Problemler.

<b>Prob Adı</b>	<b>Katalog No.</b>
PFKFB1	Hs00997227_m1
PFKFB2	Hs01015408_m1
PFKFB3	Hs00998700_m1
PFKFB4	Hs00894606_m1
ACTB	Hs01060665_g1
Vimentin(VIM)	Hs00958111_m1
Fibronectin(FN1)	Hs01549976_m1
Twist	Hs01675818_s1
Snail (SNAI1)	Hs00195591_m1
Slug (SNAI2)	Hs00161904_m1

### 3.4.3. Varyant Ekspresyonlarının Tespiti İçin Primer Tasarımı

PFKFB2 mRNA varyantlarının ekspresyon analizi amacıyla NCBI (National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknolojik Enformasyon Merkezi); Amerika Birleşik Devletleri) veritabanında kayıtlı PFKFB2 mRNA varyantları incelendi. İnceleme sonucunda insanlarda eksprese olduğu tanımlanmış ve protein kodlayan iki ana varyant belirlendi. Bunlar sırası ile (i) 7,073 baz çiftinden oluşan ve NM\_006212.2 numaralı PFKFB2 mRNA varyant-1 ve (ii) 3,529 baz çiftinden oluşan ve NM\_001018053.1 numaralı PFKFB2 mRNA varyant-2 olarak belirlendi. Bu varyantlar, çalışmalarımızda P2-v1 (varyant-1) ve P2-v2 (varyant-2) olarak adlandırıldı. Varyantların birbirinden ayrımı amacıyla kullanılacak primerler yine NCBI’nin “Primer-BLAST” (NCBI) hizmeti kullanılarak tasarlandı ve satın alındı (AlphaDNA (Kanada); SACEM Hayat Teknolojileri (Türkiye) aracılığı ile).

**Tablo 5:** Tasarlanan PCR Primerlerinin Sekansları.

<u>Amplifikasyon hedefi</u>	<u>Primer Yönü</u>	<u>Primer Sekansı</u>
PFKFB2 transkript varyant - 1	İleri	5'-GACTGCTGAATCTCTCGGGG-3'
	Ters	5'-CCCTTCTTGCATGTCCTGGG-3'
PFKFB2 transkript varyant - 2	İleri	5'-CCTCAAAGTGTGGACAAGCC-3'
	Ters	5'-CAAGGCAACATGAGGGACG-3'
$\beta$ -aktin	İleri	5'-AGAGCTACGAGCTGCCTGAC-3'
	Ters	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

#### 3.4.4. CRISPR İnaktivasyonlarının Tespiti İçin Primer Tasarımı

CRISPR sistemi ile *PFKFB2* inaktivasyonu gerçekleştirilmiş hücrelerde, gen değişikliğinin doğrulanması amacı ile primerler tasarlandı. CRISPR sistemi incelendiğinde, *PFKFB2* geni Ekson 1 içerisinde kesim gerçekleştirdiği görüldü ve bu bölgeyi içerisine alacak ileri ve geri yönlü primerler tasarlandı. *PFKFB2* pozitif hücrelerde bu bölgenin amplifiye olarak 293 baz çifti uzunluğunda bant vereceği, fakat *PFKFB2*<sup>-/-</sup> hücrelerde bu bölgenin amplifikasyonu sonucu daha uzun PCR ürünü oluşacağı ve bu ürünün uygulanan PCR reaksiyonunun “Uzama” adımı süresinde görülemeyeceği düşünüldü. Bu yaklaşım göz önünde bulundurularak GGGCATCTTCCTCAGAACAG sekansına sahip ileri yönlü primer ve CTTCATGGCCTCCTCATTGT sekansına sahip geri yönlü primer tasarlandı ve CRISPR uygulanmış hücrelerin doğrulanması amacıyla kullanıldı.

#### 3.4.5. PCR Amplifikasyonu ve Agaroz Jel Görüntüleme

*PFKFB2* varyantlarının mRNA ekspresyon analizi için bir PCR reaksiyon karışımı (New England Biolabs; Kat. No. M0482) kullanıldı ve üretici firma protokolü takip edildi. 25  $\mu$ l reaksiyon karışımı için kısaca; 12,5  $\mu$ l 2X-Reaksiyon karışımı, 7,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O, 0,5  $\mu$ l (0,2  $\mu$ M son konsantrasyon) ileri yönlü primer, 0,5  $\mu$ l (0,2  $\mu$ M son konsantrasyon) geri yönlü primer ve 4  $\mu$ l cDNA kullanılarak hazırlandı ve bir PCR cihazında (Bioneer, MyGenie96) reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon koşulları aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

1) İlk denatürasyon	94°C	30 saniye
2) Denatürasyon	94°C	30 saniye
3) Bağlanma	54°C	20 saniye
4) Uzama	68°C	30 saniye
5) Final Uzaması	68°C	5 dakika

Reaksiyonun 2., 3. ve 4. adımları sırasıyla 35 kez tekrarlandıktan sonra 5. adıma geçildi ve reaksiyonlar tamamlandıktan sonra örnekler 4 °C’de bekletildi. Örnekler 6X yükleme boyası (NEB; Kat. No. B7024S) ile karıştırıldı ve % 1 agaroz (TAE ile hazırlanmış) jele yüklenerek elektroforez uygulandı. 30 dakikalık elektroforez sonrasında jel görüntüleme cihazı (BioRad; ChemiDoc MP) ile görüntüledi. Görüntülemeye markör olarak 100’er baz çifti ağırlıktaki DNA fragmentleri karışımı (100-200-300-...-1500) kullanıldı (NEB; Kat. No. N3231).

### **3.5. Protein İzolasyonu ve Western Blotlama**

#### **3.5.1. Total Protein İzolasyonu**

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 15 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.



### 3.5.2. Sitoplazmik/Nükleus Protein Fraksiyonlarının Ayır İzolasyonu

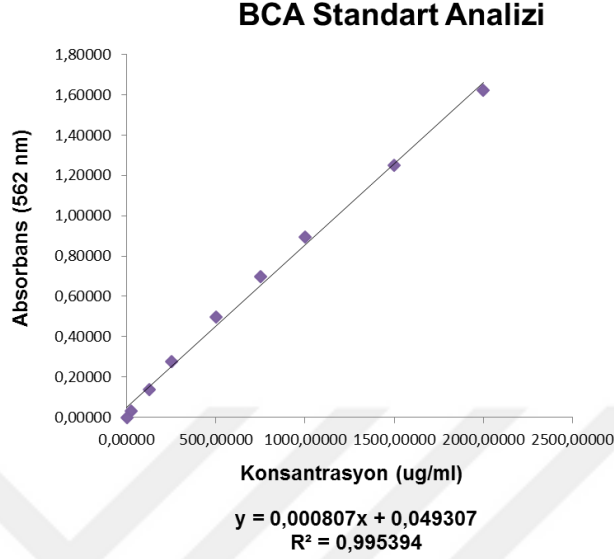
Hücre nükleusu ve sitoplazmasının ayırımı için ticari bir kit (Pierce; Kat. No. 78833) kullanıldı ve imalatçı firmanın protokolü takip edildi. Kısaca; tripsinize edilen hücreler yıkanarak pellet elde edildi ve ilk aşamada bu pelletlerden hücre sitoplazmaları CER1 ve CER2 adlı çözeltiler ve santrifügasyon ile elde edildi ve sitoplazmik ekstrakt olarak adlandırıldı. Tüplerde kalan pelletlere NER çözeltisi uygulandı ve sonrasında vorteksleme ve santrifügasyon ile nükleus ekstraktları elde edildi. Ekstraktlar SDS-PAGE yükleme tamponu ile 1:1 oranında karıştırılıp 95 °C’de denatüre edildi ve Western blot analizine tabi tutuldu. Bütün sitoplazmik ve nükleus ekstraktı içeren Western blotlamalarda sitoplazma ve nükleus markörleri olarak sırası ile  $\alpha$ -tubulin ve Oct-1 kullanıldı (antikorlara ilişkin bilgiler Başlık 3.5.4’de detaylı sunulmuştur).

Kromatine bağlı nükleus ekstraktı elde edilen deneylerde benzer bir ticari kit (Pierce; Kat. No. 78840) kullanıldı, firmanın protokolü takip edildi. Kromatin bağlı ekstrakt markörü olarak Histon H3 kullanıldı.

### 3.5.3. 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) ölçüldü. Kısaca, elde edilen protein örnekleri 5 kat sulandırıldı ve 25  $\mu$ l protein örneği kit protokolüne göre hazırlanmış 200  $\mu$ l BCA reagent karışımı ile 96 kuyucuklu plakalarda karıştırıldı. 30 dakika 37°C’de inkübasyon sonrasında 562 nanometre (nm) dalga boyu kullanılarak bir mikropilaka ölçüm (Epoch; Biotek) cihazında optik absorbans değerleri okundu. Elde edilen absorbans değerleri, konsantrasyonu bilinen standartların okunması ile elde edilen standart grafiğine göre konsantrasyon değerlerine çevrildi (Şekil - 9) ve Western

blotlama öncesinde örneklerin protein konsantrasyonları 30 µg yüklenecek şekilde eşitlendi.



**Şekil - 9: 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.

#### 3.5.4. Western Blotlama

Eşit miktarda protein içeren (30 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 Tablo 6'da 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) görüntüledi. Bant analizleri ve dansitometrik ölçümler ImageLab (BioRad) yazılımı ile gerçekleştirildi.

**Tablo 6:** Kullanılan Antikorlara İlişkin Bilgiler.

<b>Antikor Adı</b>	<b>Üretici Firma</b>	<b>Katalog Numarası</b>
Anti-PFKFB2	Abcam	AB70157
Anti-PFKFB3	Proteintech	13763-1-AP
Anti-PFKFB4	Abcam	AP8154
Anti-FLAG (DYKDDDDK)	Origene	TA50011
Anti- $\alpha$ -tubulin	Cell Signaling	3873
Anti- $\beta$ -aktin	Cell Signaling	3700
Anti-Oct-1	Cell Signaling	8157
Anti-Siklin D3	Cell Signaling	2936
Anti-Fosfo-PFKFB2	Cell Signaling	13064
Anti-Fosfo-PFKFB3	Proteintech	Özel Üretim
Anti-Rabbit IgG	Cell Signaling	7074
Anti-Mouse IgG	Cell Signaling	7076
Histon H3	Cell Signaling	4499

### 3.6. Immunfloresan Konfokal Mikroskopi (Immunsitokimya - IF-IC)

İmmunfloresan deneyleri için HeLa hücreleri Fibronektin ile kaplı slaytlarda (Millipore; Kat. No. PEZGS0816) büyütüldü. Hücreler ekildikten bir gün sonra plazmid transfeksiyonları gerçekleştirildi. (Transfeksiyon yöntemi başlık 3.8.'de detaylı anlatılmıştır.) Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler % 4 formalin (Pierce; Kat. No. 28906) kullanılarak fikse edildi. 15 dakikalık fikzasyon sonrasında slaytlara immunfloresan bloklama solüsyonu uygulandı. 1 saatlik bloklama sonrasında immunfloresan antikor dilüsyon solüsyonu ile 1:1000 dilüe edilmiş farede sentezlenmiş FLAG (DYKDDDDK) antikorunu (Origene; Kat. No. TA50011) bir gece süreyle +4 C'de uygulandı. Sonrasında 3 kez PBS ile yıkanmış slaytlara yine antikor dilüsyon solüsyonu ile 1:1000 dilüe edilmiş Alexa-Fluor-488 konjuge fare sekonder antikorunu (Cell Signaling; Kat. No. 4408) uygulandı. 1 saatlik inkübasyondan sonra slaytlar tekrar 3 kez PBS ile yıkandı ve F-aktin boyanması ve sitoplazma işaretlemesi için 15 dakika süreyle Falloidin (Cell Signaling; Kat. No. 8953) uygulandı. Bu aşamadan sonra tekrar 1 kez PBS ile yıkanan slaytların üst separatörleri alt kısımdan (lam) ayrıldı ve DAPI içeren yapıştırıcı solüsyon (Cell

Signaling; Kat. No. 9071) damlatıldı. Üzeri lamel ile kapatıldıktan sonra iyice kuruması için karanlıkta bir gece bekletildi. Sonrasında A-1R (Nikon) konfokal mikroskop ile görüntüleme yapıldı.

### 3.7. İmmunhistokimya

İnsanlardan elde edilmiş doku kesitlerinde endojen PFKFB2 ekspresyonunun saptanması ve normal dokular ile karşılaştırılması için bir pankreas tümörü doku array'i (BioChain; Kat. No. Z7020090) satın alınmıştır. Kesitler ilk önce deparafinize ve rehidre edilip 10 dakika endojen peroksidaz inaktive edilmiştir. Sitrata tamponu ile antijen maskelenmesi kaldırılmış ve %3'lük BSA ile slaytlar bloklanmıştır. +4°C'de bir gece boyunca primer antikor (PFKFB2 antikor; abcam, Kat. No.: ab70157) ile inkübe edildi. PBS ile 3 kez yıkayıp ticari bir immunhistokimya deteksiyon reagenti (Cell Signaling Technologies; Kat. No. 8114) ile 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. 3 kez PBS ile yıkayarak HRP substratı ile 10 dakika inkübe edildi. Arkaplan boyaması için Hematoksilin (Sigma; Kat. No. H3136) uygulanıp 5 dakika bekledikten sonra kapatma solüsyonu uygulanarak slaytlar lamel ile kapatıldı. Işık mikroskopunda slaytlar görüntülenerek mikroskopik görüntüler kaydedildi.

### 3.8. Transfeksiyon

Çalışmalar kapsamında kurgulanan deneylerde ihtiyaç duyulan gen ekspresyonu artış manipülasyonları, plazmid aracılı over-ekspresyon yöntemi kullanılarak ve ihtiyaç duyulan gen ekspresyonu azaltılması manipülasyonları, gen-spesifik tasarlanmış siRNA molekülleri aracılığıyla gerçekleştirilen ekspresyon baskılama yöntemi ile sağlandı. *PFKFB2*'nin genetik olarak silinmesi amacıyla yine plazmid aracılı over-ekspresyon kullanılmıştır ve Cas9 enzimi ile birlikte *PFKFB2* spesifik gRNA ekspresyonu sağlanmıştır. Detaylar ilgili alt başlıklarda verilmiştir.

### **3.8.1. Plazmid Transfeksiyonu**

#### **3.8.1.1. Transient (Geçici) Transfeksiyon**

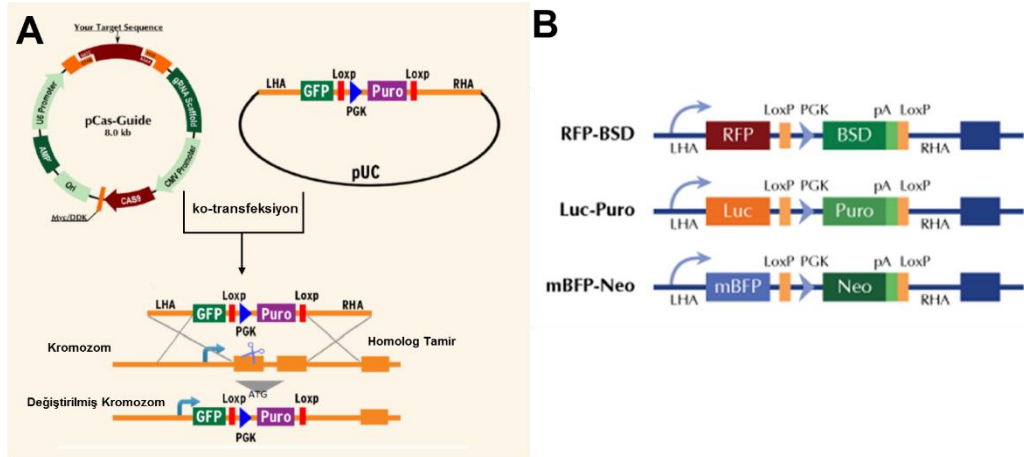
PFKFB2 ekspresyon artışının etkilerinin anlaşılması amacıyla hücrelerde PFKFB2 varyantlarının plazmid aracılığı ekspresyonu sağlandı. (Kullanılan plazmidlerin bilgileri ve klonlanmasına ilişkin bilgiler Başlık 3.13.2’de sunulmuştur.) Bunun için öncelikle hücreler % 80 yaygınlığa sahip olacak şekilde 6-kuyucuklu plakalara ekildi ve bir sonraki gün plazmidler uygulandı. Plazmid transfeksiyonu Lipofectamine 3000 kullanılarak gerçekleştirildi ve üretici firmanın protokolü takip edildi. Kısaca, Lipofectamine 3000 ve 2 µg plazmid DNA’sı ayrı tüplerde OptiMEM ile dilüe edildi ve 1:1 oranında karıştırıldı. Hücrelerin besiyeri taze besiyeri ile değiştirildi ve transfeksiyon karışımı hücrelere damlatarak uygulandı.

#### **3.8.1.2. Stabil (Kalıcı) Transfeksiyon**

Hücrelerin stabil transfeksiyonu için, transient transfekte edilen hücrelere seleksiyon uygulandı. PFKFB2 over-ekspresyon deneylerinde selektif amaçlı blastisidin (5 µg/ml), CRISPR deneylerinde ise puromisin (2 µg/ml) kullanıldı. Antibiyotik, transfekte edilmemiş ve hiçbir manipülasyon yapılmamış bir hücre grubuna da uygulandı ve hücre grubunda canlı hücre kalmadığında seleksiyon sona erdirildi. Sonrasında hücreler 96-kuyucuklu plakalara seri dilüsyon tekniği ile aktarıldı. Kısaca, bir kuyucuğa bir hücre gelecek şekilde hücreler besiyeri ile dilüe edildi ve kuyucuklara ekildi. 1 hafta sonra tek bir hücreden tek bir koloni oluşmuş kuyucuklar işaretlendi ve iki haftanın sonunda 96-kuyucuklu plakadan tripsinize edilerek 24-kuyucuklu plakalara aktarıldılar. Gerçek zamanlı qPCR ve Western blotlama kullanılarak hücre manipülasyonları doğrulandı. Elde edilen hücreler ile planlanan deneyler gerçekleştirildi.

### 3.8.1.3. *PFKFB2*'nin CRISPR/Cas9 ile İnaktivasyonu Amacıyla Plazmid Transfeksiyonu

CRISPR aracılı gen silinmesi manipülasyonları için ticari bir kit satın alındı (Origene; Kat. No. KN211359). Bu kit 4 plazmid içermektedir. Bunlar sırası ile kontrol gRNA içeren pCas-guide (GE100003) vektörü, *PFKFB2*'ye spesifik gRNA-1 ve gRNA-2 içeren iki pCas-guide vektörü (KN211329G1 ve KN211329G2) ve homolog rekombinasyon ile *PFKFB2* silinen bölgeye entegre olması planlanan pUC-Luc-Puro (KN211329LP-D) vektörüdür. Vektör diyagramları Şekil-10'da gösterilmiştir. Bu sistemde kontrol gRNA, gRNA-1 ve gRNA-2 içeren plazmidlerin her biri ayrı ayrı, pUC plazmidi ile birlikte transfekte edildi (ko-transfeksiyon). Bu işlem temel olarak 3.8.1.1. ile aynı şekilde uygulandı, fakat kullanılan toplam 2 µg DNA'nın 1 µg'ı gRNA ve Cas9 kodlayan plazmid, 1 µg'ı ise pUC plazmidi içerecek şekilde ayarlandı. Böylelikle *PFKFB2* gen inaktivasyonu gerçekleştirilen bölgeye homolog rekombinasyon ile Luc-Puro ekspresyon kasetleri entegrasyonu hedeflendi.



**Şekil - 10: Çalışmada kullanılan CRISPR plazmidleri diyagramı. A.** Bu sistemde pCas-Guide ve pUC plazmidleri ko-transfekte edilerek hedef bölge inaktivasyonu sonrası homolog tamir mekanizması ile aynı bölgeye Puro (puromisin direnç geni) eklenebilmektedir ve bu sayede ilgili genin çıkarıldığı hücreler seçilebilmektedir. **B.** Bu sistemde antibiyotik direnç geni ve reporter proteinini seçilebilmektedir ve çalışmamızda *Luc-Puro* (*Lusiferaz - Puromisin*) kombinasyonu seçilmiştir.

### 3.8.2. siRNA Transfeksiyonu

siRNA transfeksiyonlarında Lipofectamine RNAiMAX kullanılmıştır. Transfeksiyonlar üretici tarafından önerilen protokole göre yapılmıştır. Kısaca, Lipofectamine ve siRNA (Applied Biosystems) ayrı 1,5 ml santrifüj tüplerinde OptiMEM 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 Tablo 7’de belirtilmiştir.

**Tablo 7:** Kullanılan siRNA Moleküllerine İlişkin Bilgiler.

<b>siRNA Adı</b>	<b>Katalog Numarası</b>
Kontrol siRNA-1	4390843
Kontrol siRNA-2	4390846
PFKFB2 siRNA-1	4390824- s10355
PFKFB2 siRNA-2	4390824- s10356
PFKFB3 siRNA-1	4390824- s10357
PFKFB3 siRNA-2	4390824- s10359

### 3.9. Tümörjenik Potansiyel Deneyleri

#### 3.9.1. Yumuşak Agarda Koloni Formasyonu

Bazal laminaya tutunmadan canlılığını devam ettirebilme ve çoğalabilme karsinomların en karakteristik özelliklerinden biridir (Fridman ve ark., 1990). İn 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 %0,7 yoğunluktaki agaroz (42°C) içeren besiyerinden 3 ml eklendi ve agarın soğuması ve katılaşması için oda ısısında 30 dakika beklendi. Daha sonra son konsantrasyonu %0,35 olacak şekilde sıvı agaroz ilave edilen ve hücre yoğunluğu

1,5 x 10<sup>4</sup> olacak şekilde hücre içeren besiyeri hazırlandı. Bu sıvı agaroz-hücre karışımından % 0,7 agaroz-besiyeri içeren her bir petriye 3 ml eklendi. Hücreler 30 dakika oda ısısında bırakıldıktan sonra inkübatöre kaldırıldı. Haftada iki kez % 0,35 agaroz içeren besiyerinden 0,5 ml eklendi. 3 hafta sonra koloniler çap olarak ve sayı olarak ölçüldü. Ölçümler için Image J yazılımı kullanıldı (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

### 3.9.2. Koloni Formasyonu

Koloni formasyonu (Klonojenik analiz) deneyi, yumuşak agarda 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 1 x 10<sup>3</sup> olacak şekilde hücre kültürü petrilere toplam 5 ml besiyeri içerisinde ekilmiş ve bir hafta büyütülmüştür. Sonrasında, besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler metanol ile -20°C'de 10 dakika fikse edildi. Fikzasyondan sonra 10 dakika %0,05 tripan mavisi çözeltisi (metanolde çözülmüş) uygulanan petrilere 5 defa PBS ile yıkandı ve kolonilerin görüntüleri mikroskobik ve makroskobik olarak kaydedildi. Görüntülerin incelenmesi ile test edilen hücrelerin koloni oluşturabilme yetenekleri karşılaştırıldı.

### 3.9.3. İnvazyon

İnvazyon deneyi, tümör hücrelerinin bazal lamina invazyon yeteneğini ölçmek üzere tasarlanmış ve bazal laminayı *in vitro* taklit eden Matrigel (Corning; Kat. No. 354228) kullanılarak gerçekleştirilen bir deneydir (Justus ve ark., 2014). Kısaca, hücreler 12 saat FBS içermeyen besiyerinde inkübe edildi ve 20x10<sup>3</sup> hücre FBS içermeyen 500 µl besiyerinde 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 besiyeri eklendi. 24 saat sonra, üst bölmedeki invaze olmamış hücreler ıslatılmış 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) 20X'lik objektif altında en az üç sahada sayıldı. Normal plakalarda büyüyen hücrelerle veriler normalize edildi ve kontrol hücreleri baz alınarak invazyon % şeklinde hesaplandı.

#### **3.9.4. Yara İyileşmesi Deneyi**

Yara iyileşmesi deneyi, tümör hücrelerinin göç yeteneklerini ölçmek üzere kullanılan bir yöntemdir (Rodriguez ve ark., 2005). Bu deney için hücreler sayılarak %80 yaygınlıkta olacak şekilde 6-kuyucuklu plakalara ekildi. Bir gün sonra 10 µl'lik bir pipet ucu yardımıyla plakalarda “+” işareti olacak şekilde 2 çizik (hücrelerin uzaklaştırıldığı bölge) oluşturuldu ve invert mikroskop ile başlangıç görüntüleri kaydedildi. Sonrasında 6, 12, 24 ve 36 saat sonra görüntüler kaydedilerek hücre grupları karşılaştırılarak migrasyon yeteneği farkları karşılaştırıldı.

#### **3.9.5. Sfer Formasyonu**

Hücrelerin yüzey bağımsız büyümelerini gösterebilmek için; 1X B27 Supplement (Gibco; Kat. No.:17504044), 2 µg/ml Heparin (Stem Cell Technologies; Kat. No.: 7980), 20 ng/ml EGF (Invitrogen; Kat. No.: PHG0311L), 10 ng/ml FGF (Gibco; Kat. No.: PHG0261), 5 µg/ml gentamisin içeren DMEM besiyeri kullanıldı. 24-kuyucuklu “ultralow attachment” plakalara, kuyu başına 750 hücre ekildi ve

37°C'de %5'lik CO<sub>2</sub>'li inkübatöre kaldırıldı. Kürecik (sfer) oluşumunun takibi, hücre ekiminden 7 gün sonra görüntü alınarak yapıldı.

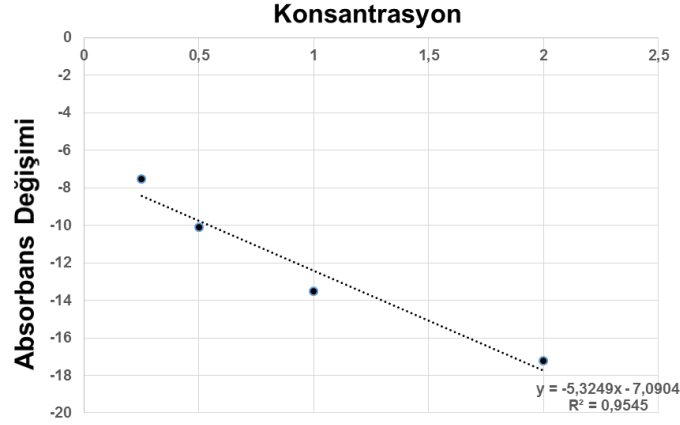
### **3.9.6. İlaç Direnci Deneyi**

Kemoterapötiklere direnç, kanserin önemli özelliklerindedir ve tedavide karşılaşılan en önemli güçlüklerdendir. Gemcitabin, pankreatik kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan bir nükleozid analogudur. İlaç direnci deneyleri için Gemko (Koçak Farma) kullanıldı ve Uludağ Üniversitesi Kemoterapi İlaç Hazırlama Merkezi'nden temin edildi.

### **3.10. 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 Fru-2,6-BP konsantrasyonu kinetik spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu yöntemde örnekler 25 °C'de 10 dakika boyunca; 50 mM Tris, 2mM Mg<sup>+2</sup>, 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 Fru-2,6-BP konsantrasyonları, ölçülen standartlara göre hazırlanmış grafiğe göre (Şekil - 11) hesaplandı ve total proteine normalize edildi.

### Fruktoz-2,6-bisfosfat Standart Analizi



**Şekil - 11: Fruktoz-2,6-bisfosfat standart absorbans değişim hızı / Konsantrasyon grafiği.** Hücrelerden elde edilen lizatlardaki Fru-2,6-BP konsantrasyonları hesaplanması amacıyla, bilinen konsantrasyonlarda Fru-2,6-BP'nin reaksiyondaki varlığına göre absorbans değişim hızları ölçüldü ve elde edilen grafiğe göre örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

### 3.11. Glikoz Alımı Analizi

Glikoz alım analizi için hücreler glikoz içermeyen besiyerine ekildi ve 30 dakika süre boyunca glikoz açısından aç bırakıldı. Besiyerlerine hızlıca 2-[<sup>14</sup>C]-Deoksiglikoz (0.25 µCi/ml; PerkinElmer Life Sciences) eklendi ve 15 dakika süreyle 37 °C'de inkübe edildi. 15 dakika sonunda kuyucuklar FBS ve glikoz içermeyen soğuk besiyeri ile 3 kez yıkandı ve 500 µl % 0.1 Sodyum dodesil sülfat uygulandı. Örnekler 1,5 ml tüp içerisine toplandı ve 350 µl örnek cam sintillasyon ölçüm kaplarına aktarıldı. Her birinin üzerine 5 ml sintillasyon sıvısı (Microscint-40) eklenerek karıştırıldı ve Tri-Carb 2910 sıvı sintillasyon analiz cihazında (PerkinElmer) örneklerin CPM (dakikadaki sintillasyon sayısı) değerleri okundu. Geri kalan 150 µl lizat ile protein konsantrasyonu ölçüldü (Başlık 3.5.3'de anlatılan yöntem ile). CPM değerleri protein konsantrasyonuna göre normalize edildi.

### 3.12. Glikoliz Analizi

Glikoliz analizi daha önce tarif edildiği gibi, enolaz reaksiyonu ile gerçekleştirildi (Imbert-Fernandez ve ark., 2014; Yalcin ve ark., 2014). Deney kısaca, kullanılan glikoz molekülünün 5. konumundaki karbon atomuna bağlı hidrojenin ve bu hidrojen ile enolaz reaksiyonunda sentezlenen H<sub>2</sub>O molekülünün radyoaktif olmasına dayanmaktadır. Deneyin gerçekleştirilmesi için kısaca; 6 kuyucuklu plakalarda büyütülmüş hücrelerin besiyeri, 500 µl 1 µCi 5-[<sup>3</sup>H]-glikoz içeren besiyeri ile değiştirildi ve 30 dakika süreyle 37 °C'de inkübe edildi. Sonrasında besiyerleri toplandı ve herhangi bir ölü hücrenin uzaklaştırılması amacıyla 5 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi. Deney sonucunda oluşmuş <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O molekülünün besiyerinde bulunan normal H<sub>2</sub>O moleküllerinden ayırımı amacıyla kapalı bir evaporasyon tekniği uygulandı. Kısaca, bir sintillasyon tüpüne 1 ml H<sub>2</sub>O eklendi ve içerisine ağzı açık olacak şekilde 500 µl hacimli bir santrifüj tüpü kondu. Bu santrifüj tüpünün içerisine 150 µl hücrelerden toplanmış besiyeri koyuldu ve sintillasyon tüpleri, ağzı sıkıca kapalı olacak şekilde 48 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Bu sayede örneklerden alınan besiyerlerinde bulunan <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O'nun sintillasyon tüpü içerisindeki H<sub>2</sub>O'ya difüzyonu sağlandı. 48 saat sonra santrifüj tüpleri, sintillasyon tüpleri içerisinden çıkarıldı ve sintillasyon tüplerine 5 ml sintillasyon sıvısı (Microscint-40) eklenerek karıştırıldı ve Tri-Carb 2910 sıvı sintillasyon analiz cihazında (PerkinElmer) örneklerin CPM (dakikadaki sintillasyon sayısı) değerleri okundu. Protein konsantrasyonlarına göre normalizasyon için hücrelere, besiyeri toplandıktan sonra 500 µl % 0.1 sodyum dodesil sülfat uygulandı ve protein konsantrasyonları ölçüldü (Başlık 3.5.3'de anlatılan yöntem ile). CPM değerleri protein konsantrasyonuna göre normalize edildi. Glikoz alımı ve glikoliz analizleri yapılamayan durumlarda hücre besiyerlerindeki laktat konsantrasyonu ticari bir kit ile (Biovision; Kat. No. K627) ölçülerek laktat analizi yapıldı.

### **3.13. Akış Sitometri**

#### **3.13.1. Hücre Siklusu Analizi**

Hücre döngüsü analizi için Muse hücre siklusu analiz kiti (Millipore; Kat. No.: MCH100106) kullanıldı. Hücreler tripsinize edildi ve pellet üzerine 500 µl %70'lik etanol eklenerek -20°C'de 3 saat boyunca fikse edildi. Fiksasyon sonrasında santrifüjleme ile etanol uzaklaştırıldı "Cell Cycle Reagent" eklendi. Hücreler oda sıcaklığında, karanlıkta 20 dakika inkübasyon sonrasında hücrelerin döngü fazlarındaki dağılımları, 5000 event ile Muse® cihazında (Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı) değerlendirildi.

#### **3.13.2. Apoptoz Analizi**

Apoptoz analizi için Muse apoptoz analiz kiti (Millipore; Kat. No.: MCH100105) kullanıldı. Hücreler tripsinize edildi ve %1 FBS içerisinde süspanse edildi. Sonrasında 100 µl "Annexin V & Dead Cell Reagent" adlı analiz reaktif eklendi ve hücreler Muse® cihazında (Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı) analiz edildi.

### **3.14. Plazmid Üretimi ve Klonlama**

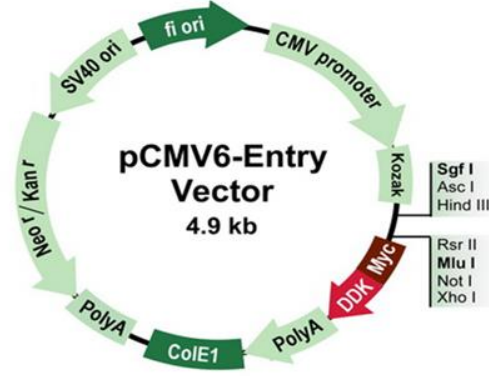
#### **3.14.1. Bakteriyel Transformasyon ve Plazmid Ekstraksiyonu**

Bakteriyel transformasyon için ticari olarak satılan bir E.coli suşu kullanıldı (NEB; Kat. No. C2987). Transformasyon için, 50 µl hücreye 50 ng plazmid uygulandı ve hafifçe karıştırarak 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Sonrasında 30 saniye süreyle 42 °C ısı şoku uygulandı ve hemen tekrar 5 dakika süreyle buz üzerinde bekletildi. Bakteri karışımı üzerine 950 µl S.O.C. besiyeri (NEB; Kat. No.

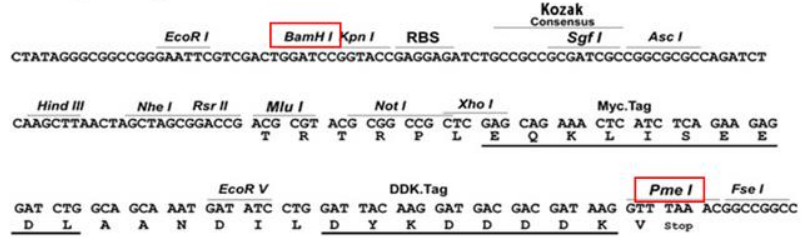
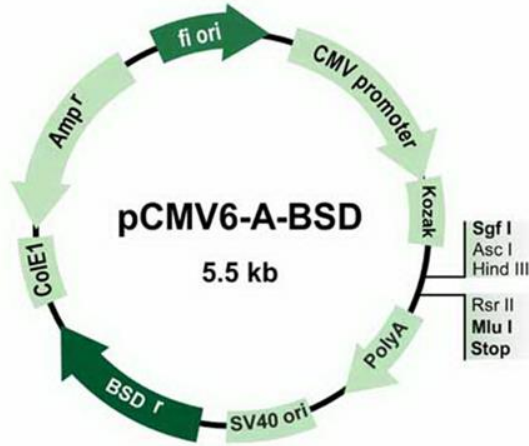
B9020) eklendi ve 37 °C'de 1 saat süreyle inkübe edildi. 1 saatlik ilk üretim sonrasında bakterilerin seleksiyonu amacıyla antibiyotikli LB Agar kullanıldı ve 37 °C inkübatörde 8 saat inkübe edildi. Oluşan koloniler antibiyotikli Luria Broth besiyerinde tekrar 37 °C'de 8 saat üretildi. Seleksiyon amacıyla pCMV6-Entry için kanamisin (30 µg/ml) veya pCMV6-A-BSD için ampisilin (100 µg/ml) kullanıldı. Plazmid ekstraksiyonu ticari bir kit kullanılarak yapıldı (QIAGEN; Kat. No: 27104) ve üretici firmanın protokolü takip edildi.

### **3.14.2. PFKFB2'nin pCMV6-BSD vektörüne klonlanması**

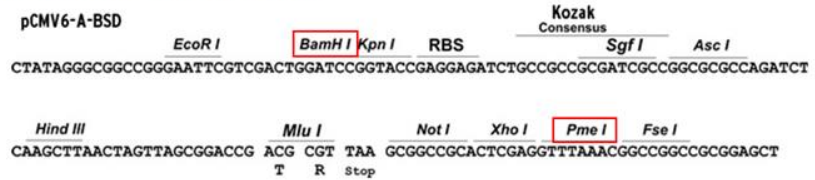
PFKFB2'nin iPDE, iPDE+KRAS ve MIA PaCa-2 hücrelerinde stabil ekspresyonunun sağlanması amacıyla ticari olarak satın alınan PFKFB2 varyant-1 ve PFKFB2 varyant-2 klonlanmış pCMV6-Entry vektörlerinde (Origene; Kat. No. RC211329 ve RC219676) bulunan PFKFB2 kodlayan bölge (Daha önce firma tarafından *Sgf1* ve *Mlu1* ile klonlanmış), pCMV6-BSD vektörüne (Origene; Kat. No. PS100022) klonlandı. Bu klonlama için her iki vektörde de kesim alanı bulunan BamH1 (NEB; Kat. No. R3136) ve Pme1 (NEB; Kat. No. R0560) enzimleri kullanıldı. Vektör haritaları ve kesim bölgeleri Şekil-12'de görülmektedir.

**A**

Schematic of the multiple cloning sites:  
pCMV6-Entry

**B**

Schematic of the multiple cloning sites:  
pCMV6-A-BSD



Şekil - 12: Çalışmada kullanılan ekspresyon vektörleri. A. pCMV6-Entry vektörü. B. pCMV6-A-BSD vektörü. Her iki vektörde kesim bölgesi olarak kullanılmış BamH1 ve Pme1 restriksiyon bölgeleri sekanslar üzerinde işaretlenmiştir.

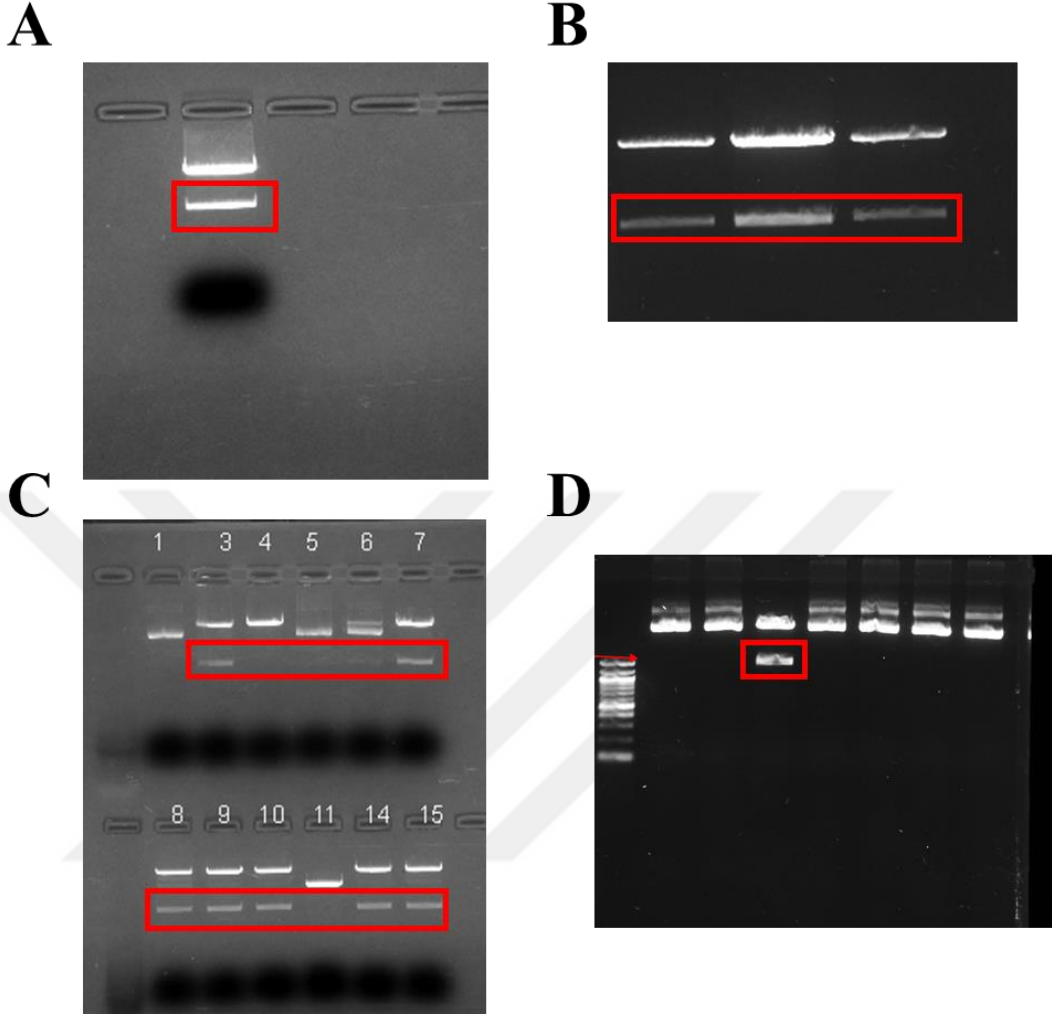
İlk olarak PFKFB2 varyant-1 ve 2 kodlayan 1'er µg plazmid ve pCMV6-BSD plazmidini her iki kesim enzimiyle 37 °C'de reaksiyona sokuldu. 1 saat süren restriksiyon reaksiyonu sonrası DNA'lar, bir DNA saflaştırma kiti kullanılarak (Macherey Negel, Kat. No. 740609.50) saflaştırıldı ve agaroz jel elektroforezi ile separe edildi (Şekil - 13-A ve 13-B). Elde edilen saf DNA fragmentleri, yine BamH1 ve Pme1 ile restrikte edilmiş pCMV6-BSD plazmidini ile ticari bir kit kullanarak 1 saat süreyle oda ısısında ligaz reaksiyonuna sokuldu ve sonrasında 3.13.1.'de anlatıldığı şekilde kompetent bakteri hücrelerine transformasyonu sağlandı.

Bakteri üremesi sonrasında, bakteri kolonilerinden elde edilen plazmidler ile restriksiyon kontrolü gerçekleştirildi. Bu kontrolde, elde edilen klonlanmış plazmidler, tekrar BamH1 ve Pme1 enzimleri ile restrikte edildi ve klonlanmak istenen PFKFB2 cDNA boyutunda fragment olup olmadığı kontrol edildi. Sonuçlara göre; P2-v1 klonlanmış plazmidlerden 7 adetinde (Şekil - 13-C), P2-v2 klonlanmış plazmidlerde ise 1 adetinde (Şekil - 13-D) ~1500 baz çifti ürün görüldü ve bu plazmidler pozitif kabul edildi. Son bir kontrol olarak HeLa hücrelerinde transient over-ekspresyon gerçekleştirilerek PFKFB2 ekspresyonuna etkisi orjin plazmid olan pCMV6-Entry plazmidleri ile karşılaştırılarak değerlendirildi ve pozitif plazmidler pCMV6-P2-v1-BSD (PFKFB2 transkript varyant-1) ve pCMV6-P2-v2-BSD (PFKFB2 transkript varyant-2) olarak adlandırıldı ve over-ekspresyon deneylerinde kullanıldı.

### 3.15. İstatistiksel Analizler

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





**Şekil - 13: PFKFB2 cDNA klonlanması.** **A.** PFKFB2 varyant-1 kodlayan pCMV6-Entry vektörü restrikte edildikten sonra alınan jel elektroforez görüntüsü. İnsert kırmızı ile işaretlenmiştir. **B.** PFKFB2 varyant-2 kodlayan pCMV6-Entry vektörü restriksiyonu sonrası alınan agaroz jel elektroforez görüntüsü. İnsert kırmızı olarak işaretlenmiştir. Görülen üç adet bant aynı olup birleştirilerek kullanılmıştır. **C.** Plazmid ekstraksiyonu sonrasında elde edilen PFKFB2 varyant-1 klonlanmış pCMV6-A-BSD plazmidlerinin BamH1 ve Xho1 enzimleri ile restriksiyonu sonrası alınan jel elektroforez görüntüsü. Kırmızı ile işaretlenmiş bölge restriksiyon sonrası 1500 baz çifti büyüklüğünde bölgeyi göstermektedir. **D.** Plazmid ekstraksiyonu sonrasında elde edilen PFKFB2 varyant-2 klonlanmış pCMV6-A-BSD plazmidlerinin BamH1 ve Xho1 enzimleri ile restriksiyonu sonrasında alınan jel elektroforez görüntüsü. Kırmızı ile işaretli bölge restriksiyonu sonrası 1500 baz çifti büyüklüğündeki bölgeyi göstermektedir.

## 4. BULGULAR

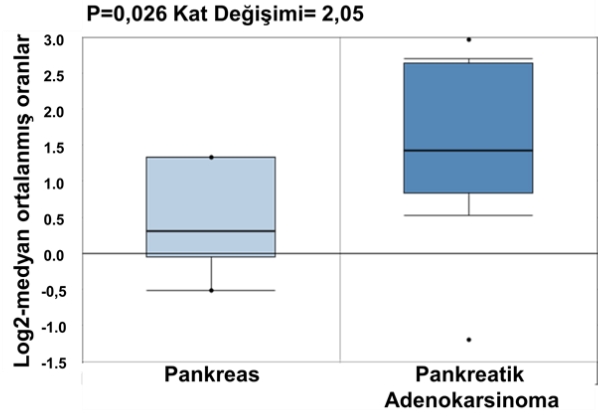
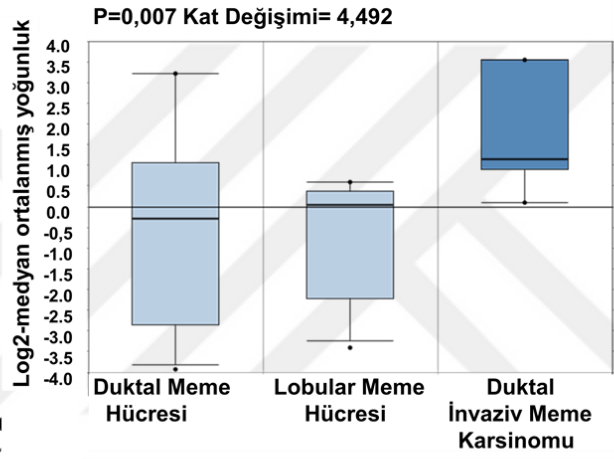
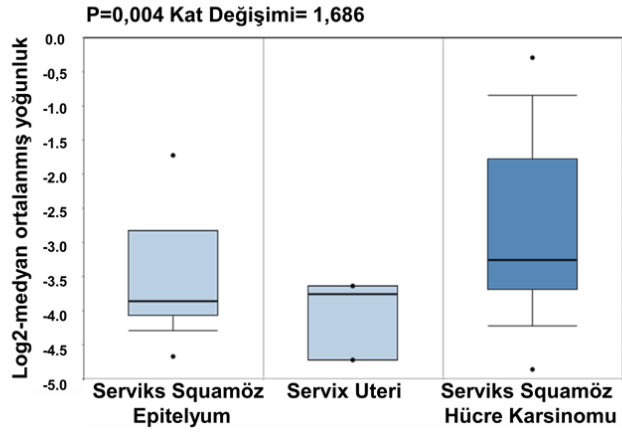
### 4.1. PFKFB2'nin Kanser Hücrelerinde Ekspresyonu ve Lokalizasyonu

#### 4.1.1. PFKFB2 Ekspresyonu Kanser Dokularında Artmaktadır.

PFKFB2'nin kanser biyolojisindeki rolünün incelenmesi amacı ile ilk olarak kanser dokularındaki PFKFB2 ekspresyonları, karşılık gelen normal dokular ile karşılaştırıldı. Bu amaçla ilk olarak ONCOMINE veri tabanında bulunan örneklerdeki PFKFB2 mRNA ekspresyon verileri incelendi. Sonrasında donörlerden toplanmış normal ve tümör kesitleri içeren doku kesiti setleri kullanılarak immunhistokimyasal boyama yapıldı.

##### 4.1.1.1. ONCOMINE Veritabanı Analizi

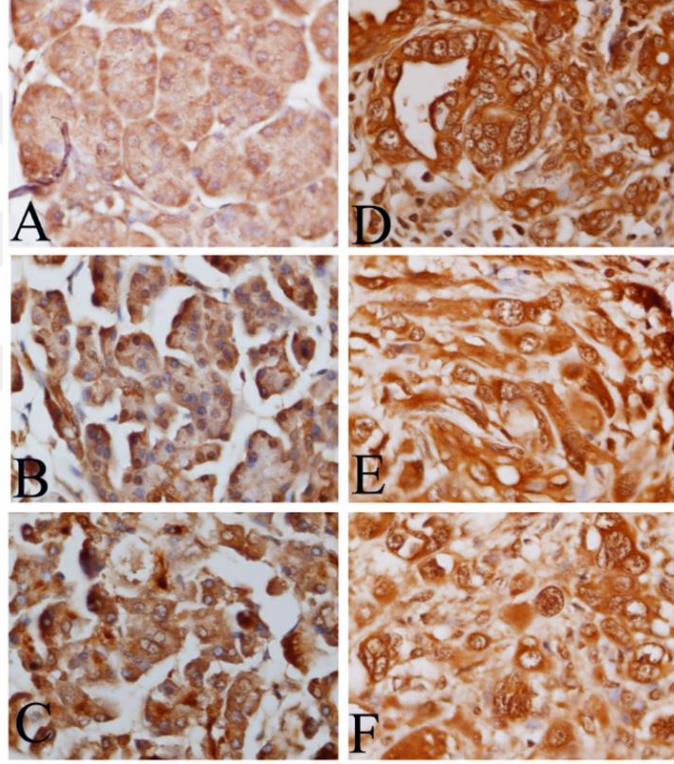
Yapılan veritabanı analizi sonucunda, PFKFB2 mRNA ekspresyonlarının pankreatik adenokarsinomalarda, normal pankreas dokusuna göre 2,05 kat arttığı ( $p=0,026<0,05$ ) (Şekil - 14-A); duktal invaziv meme karsinomlarında, duktal meme hücrelerine göre 4,492 kat arttığı ( $p=0,007<0,01$ ) (Şekil - 14-B); serviks skuamöz hücre karsinomlarında, serviks skuamöz epitel hücrelerine göre 1,686 kat arttığı ( $p=0,004<0,01$ ) (Şekil - 14-C) saptandı.

**A****B****C**

Şekil - 14: ONCOMINE veritabanından elde edilen veri setlerinde yapılan analizlere göre kanser dokularında, karşılık gelen normal dokulara göre PFKFB2 ekspresyonu önemli oranda artmaktadır. A) Pankreatik adenokarsinoma veri seti. B) Meme kansinomu veri seti. C) Serviks skuamöz hücre kansinomu veri seti.

#### 4.1.1.2. İmmunhistokimya Analizi Sonuçları

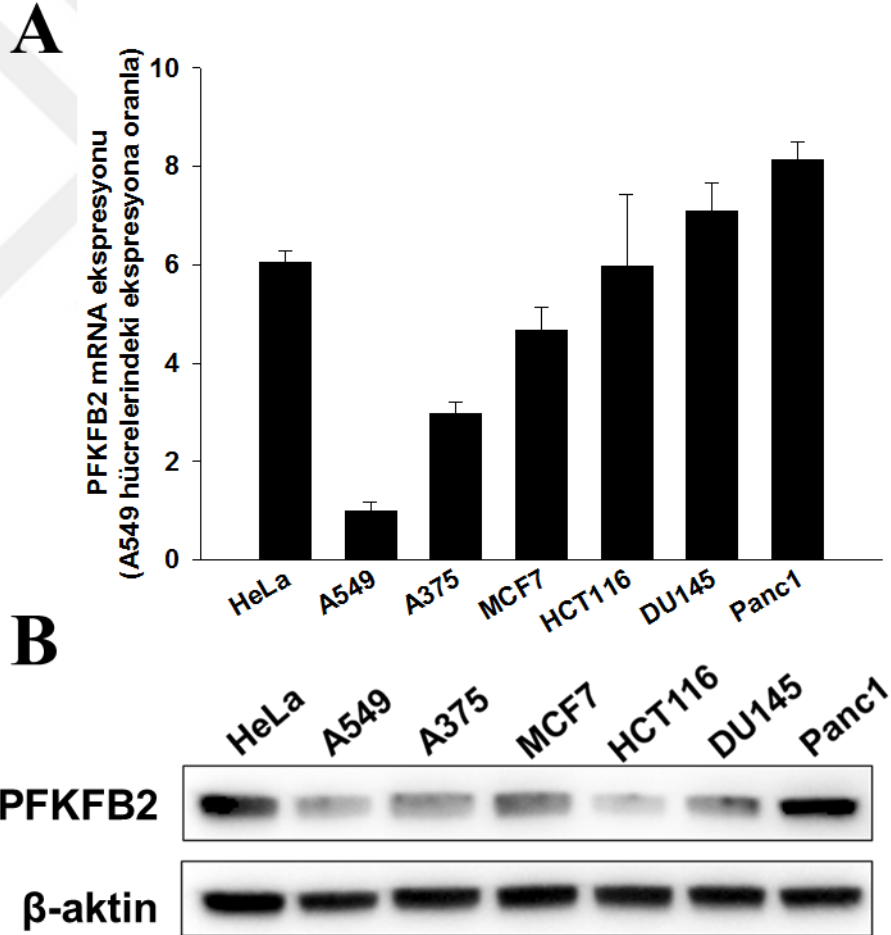
İncelenen doku kesitlerinde, PFKFB2 ekspresyonunun, karşılık gelen normal dokuya göre arttığı görüldü. Şekil - 15’de görüldüğü gibi, tümör dokularında daha koyu boyanma elde edildi. Benzer şekilde, normal dokularda hücre nükleusları görünür iken, tümör dokularında nükleusların görünürlük kaybı, PFKFB2’nin nükleusa lokalize olduğunu düşündüren ilk ipucu olarak değerlendirildi.



**Şekil - 15: Pankreatik adenokarsinoma dokularında PFKFB2 ekspresyonu, pankreas normal dokusuna göre artmaktadır. A,B ve C normal pankreas dokusu; D,E ve F pankreatik adenokarsinoma dokusu.**

#### 4.1.2. PFKFB2 Kanser Hücre Hatlarında Eksprese Edilmektedir.

Kanser dokularındaki PFKFB2 mRNA ekspresyon artışı ve doku kesitlerindeki PFKFB2 protein miktarı artışı gözlemlendikten sonra farklı bölge tümörlerinden elde edilmiş hücre modellerindeki PFKFB2 ekspresyonları karşılaştırıldı. HeLa (serviks), A549 (akciğer), A375 (melanoma), MCF7 (meme), HCT116 (kolon), DU145 (prostat) ve Panc1 (pankreas) hücre hatları farklı dokuları yansıtmaları amacıyla seçildi ve hücreler normal koşullarda büyütüldü. Elde edilen lizatlardan mRNA ve protein elde edilerek PFKFB2 ekspresyonu açısından incelendi.



**Şekil - 16:** Farklı dokulardan elde edilmiş farklı kanser hücre hatlarında PFKFB2 ekspresyonu tespit edilmiştir. **A)** Normal koşullarda büyütülmüş hücrelerdeki PFKFB2 mRNA ekspresyonları. Endojen kontrol olarak  $\beta$ -aktin kullanılmıştır. **B)** Normal koşullarda büyütülmüş hücrelerdeki PFKFB2 protein miktarları. Yükleme kontrolü olarak  $\beta$ -aktin kullanılmıştır.

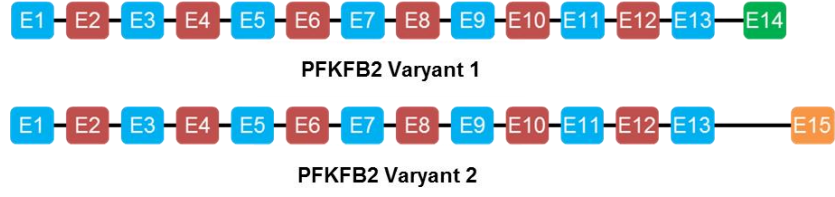
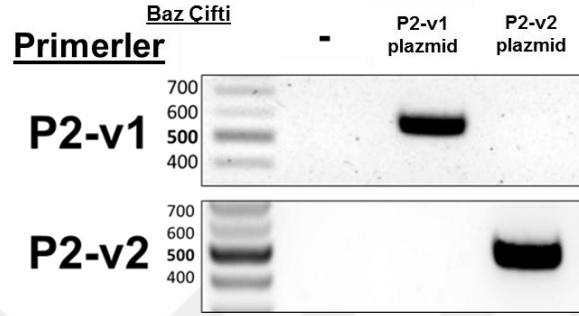
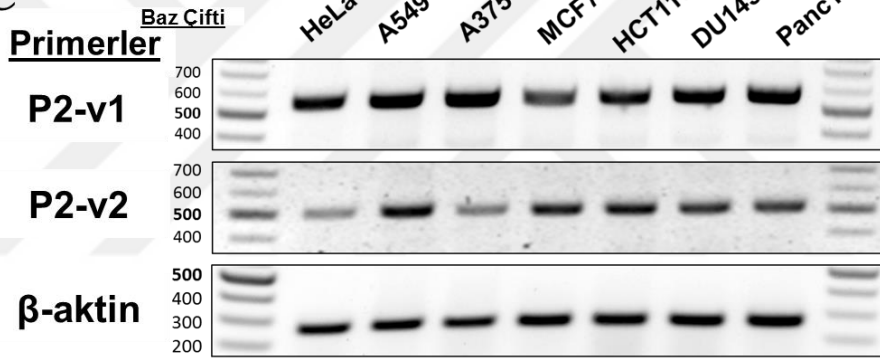
PFKFB2 mRNA ekspresyonu en düşük A549 hücresinde saptandı ve relatif kantitasyon hesaplamasında A549 hücrelerindeki ekspresyon 1 (bir) kabul edildi. Diğer hücrelerde sırası ile ekspresyonlar; HeLa:  $6,0563 \pm 0,2199$ , A549:  $1 \pm 0,1679$ , A375:  $2,9699 \pm 0,2326$ , MCF7:  $4,6579 \pm 0,4691$ , HCT116:  $5,9688 \pm 1,4691$ , DU145:  $7,0965 \pm 0,5741$  ve Panc1:  $8,1285 \pm 0,3769$  olarak belirlendi (Şekil - 16-A).

Elde edilen protein lizatları Western blotlama ile analiz edildi ve incelenen tüm hücrelerde PFKFB2 protein ekspresyonu saptandı (Şekil - 16-B).

#### **4.1.3. PFKFB2'nin Her İki Varyantı Kanser Hücre Hatlarında Eksprese Edilmektedir.**

PFKFB2'nin iki izoformu ve bu izoformları kodlayan iki mRNA varyantı bulunmaktadır (Şekil - 17-A). Literatürde PFKFB2 kırılma varyantları ve ekspresyon profillerine ilişkin bilgi sınırlı olduğundan PFKFB2 ekspresyonu saptanan hücre hatlarında eksprese edilen PFKFB2 varyantları incelendi. Bu varyantlar tarafından kodlanan proteinler arasında yalnızca 4 kDa fark bulunduğundan, ayırımın mRNA temelinde yapılması planlandı ve varyant spesifik primerler kullanılarak hücre hatlarında PFKFB2 varyant ekspresyonları saptandı.

Bu amaçla dizayn edilen primeler (Başlık 3.4.3), ilk olarak spesifikite ölçümü amacıyla P2-v1 ve P2-v2 kodladığı bilinen plazmidler kullanılarak test edildi. P2-v1 spesifik primer çiftinin yalnızca P2-v1 plazmidini, P2-v2 spesifik primer çiftinin ise yalnızca P2-v2 plazmidini amplifiye ettiği görüldü (Şekil - 17-B). Bu test ve doğrulama sonrası PCR reaksiyonu HeLa, A549, A375, MCF7, HCT116, DU145, Panc1 hücrelerinden elde edilmiş cDNA'lar kullanılarak gerçekleştirildi ve incelenen tüm hücre hatlarında her iki PFKFB2 varyantı ekspresyonunun gerçekleştiği saptandı (Şekil - 17-C).

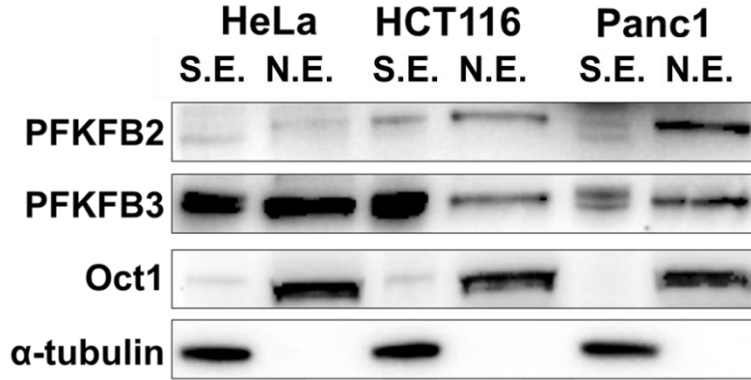
**A****B****C**

**Şekil - 17: Kanser hücre hatlarında PFKFB2'nin her iki varyantı eksprese edilmektedir. A)** PFKFB2 mRNA varyantları ekson sıralamaları. PFKFB2 varyant-1 Ekson 1'den Ekson 14'e tüm eksonları içerirken, PFKFB2 varyant-2 Ekson 14 yerine Ekson 15 içerir. **B)** Tasarlanan PFKFB2 varyant spesifik primer çiftinin kontrolü. (- : DNA içermeyen negatif kontrol.) **C)** Hücre hatlarındaki P2-v1 ve P2-v2 ekspresyonları. Yükleme kontrolü olarak β-aktin primerleri ile yapılan PCR kullanılmıştır. Markör değerleri baz çifti olarak verilmiştir.

#### 4.1.4. PFKFB2 Hücre Nükleusuna Lokalize Olmaktadır.

Kanser hücrelerinde PFKFB2 ekspresyonu saptandıktan sonra, PFKFB2'nin hücre içi lokalizasyonu incelendi. Daha önceki çalışmalar (Yalcin ve ark., 2009a; Yalcin ve ark., 2014) PFKFB3'ün nükleusa lokalize olduğunu gösterdiğinden, PFKFB2 için geçerli benzer bir durum olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla, HeLa, HCT116 ve Panc1 olmak üzere normal koşullarda büyütülmüş üç hücre hattından sitoplazma ve nükleus protein lizatları elde edildi ve Western

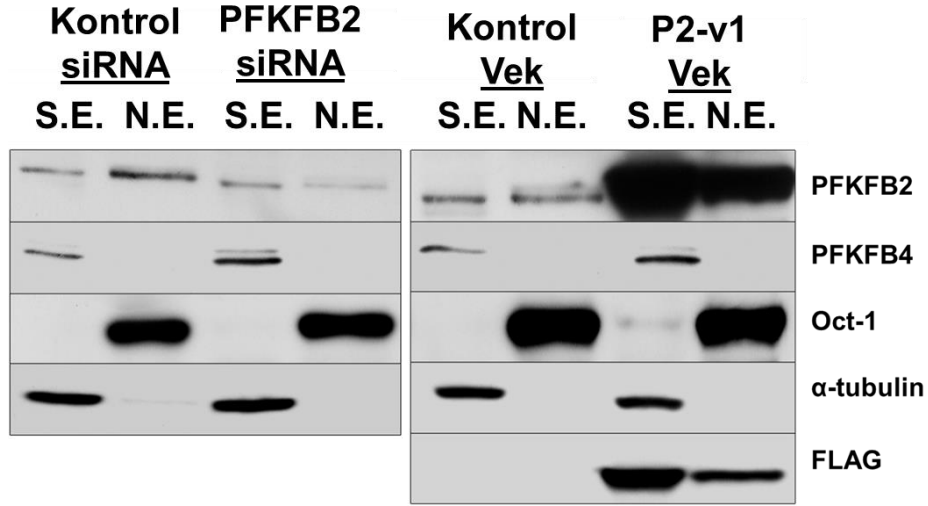
blotlama ile PFKFB2 ve PFKFB3 lokalizasyonları incelendi. Yapılan analizde endojen eksprese edilen PFKFB2'nin nükleusa lokalize olduğu görüldü (Şekil - 18).



**Şekil - 18: Endojen eksprese edilen PFKFB2; HeLa, HCT116 ve Panc1 hücrelerinde nükleusa lokalize olmaktadır. Oct1 nükleus markörü,  $\alpha$ -tubulin sitoplazma markörü olarak kullanılmıştır. S.E.: Sitoplazmik ekstrakt ve N.E.: Nükleus ekstraktı.**

Her ne kadar antikorlar ilgili proteine karşılık spesifik üretilse dahi bazı durumlarda bir antikor benzer izoformları tanıyabilir. Bu amaçla kontrol için HeLa hücrelerine kontrol siRNA, PFKFB2 spesifik siRNA, kontrol vektörü ve P2-v1 vektörü transfekte edildi. Sonrasında PFKFB2 ekspresyonu ve lokalizasyonu incelendi. Görülen bantlar kontroller ile karşılaştırıldı. PFKFB2 siRNA örneklerinde sitoplazma ve nükleus bantlarında azalma, P2-v1 over-ekspresyon örneklerinde ise PFKFB2 bantlarında artma görüldü. Böylelikle, kullanılan antikorun spesifitesi doğrulandı (Şekil - 19).

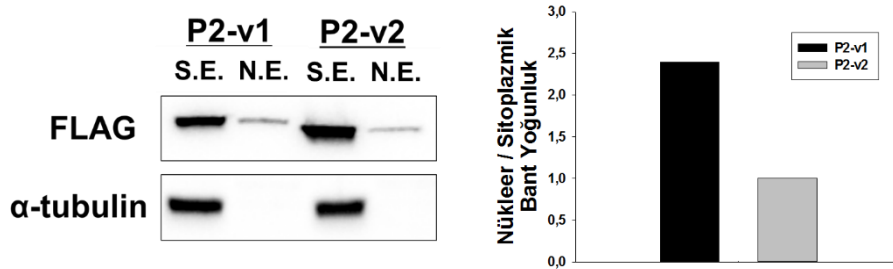




**Şekil - 19: Kullanılan PFKFB2 antikorunu, PFKFB2'ye spesifiktir.** siRNA uygulanması ile PFKFB2 protein miktarının azalması ve P2-v1 over-ekspresyonu ile PFKFB2 protein miktarının artması kullanılan antikorun spesifik olduğunu göstermektedir. Oct-1 nükleus markörü,  $\alpha$ -tubulin sitoplazmik markör olarak ve FLAG, over-ekspresyon doğrulaması amacıyla kullanılmıştır. S.E.: Sitoplazmik ekstrakt ve N.E.: Nükleus ekstraktı

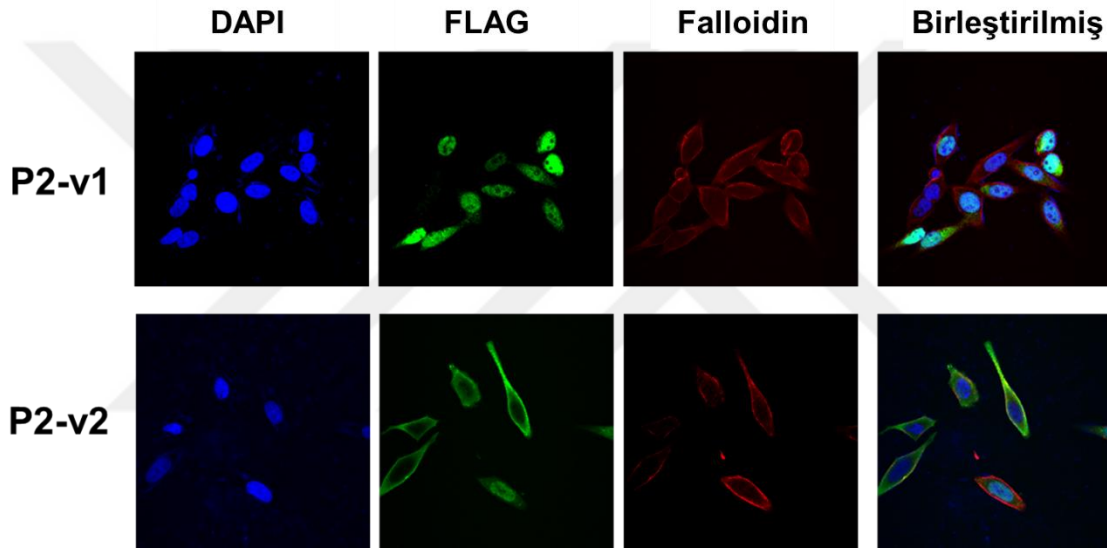
#### 4.1.5. PFKFB2 Transkript Varyant-1, Varyant-2'ye Göre Daha Yüksek Oranda Nükleusa Lokalize Olmaktadır.

PFKFB2 varyantlarının intrasellüler lokalizasyonlarının incelenmesi amacıyla Mia PaCa-2 hücrelerinde P2-v1 ve P2-v2 over-eksprese edildikten 48 saat sonra sitoplazma – nükleus ayrıştırılması yapıldı ve Western blotlama ile PFKFB2 lokalizasyonu analiz edildi. Deney sonucuna göre P2-v1'in P2-v2'ye göre ~2,5 kat daha fazla nükleusa lokalizasyon oranına sahip olduğu görüldü (Şekil - 20).



**Şekil - 20: Mia PaCa-2 hücrelerinde P2-v1, P2-v2'ye oranla 2,5 kat daha fazla nükleusa lokalize olmaktadır.** N.E. FLAG bant dansitometresi, S.E. FLAG bant dansitometresine bölünerek Nükleus Lokalizasyonu Oranı elde edildi. S.E.: Sitoplazmik ekstrakt, N.E.: Nükleus ekstraktı

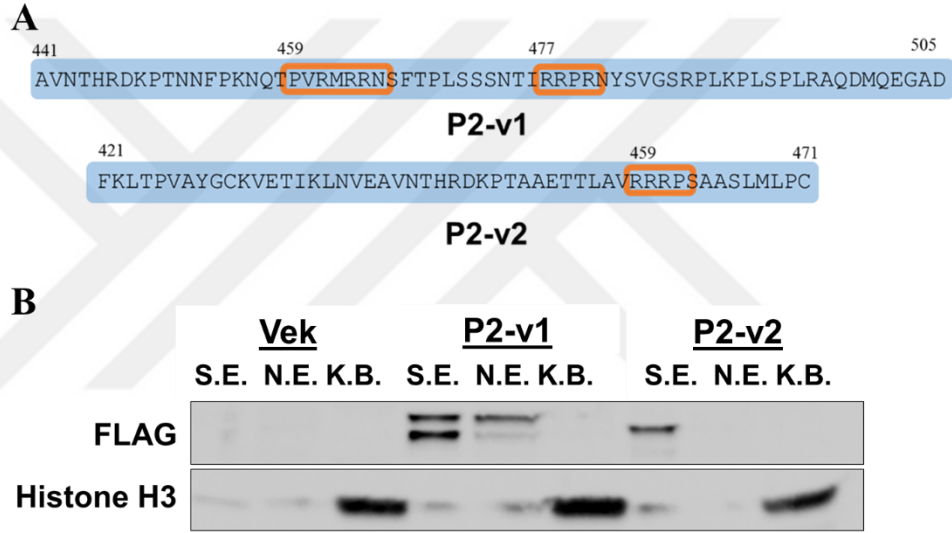
Lokalizasyon görüntülemesi amacıyla immünsitokimya kullanıldı ve bu deney için HeLa hücreleri seçildi. (İmmünflöresan deneylerde hücre şekli uygunluğu sebebi ile HeLa hücrelerinin kullanımı oldukça yaygındır.) HeLa hücrelerinde her iki PFKFB2 varyantı ayrı hücre gruplarında over-eksprese edildi ve FLAG antikoru ile immünsitokimya yapıldı. Hazırlanan slaytlar bir konfokal mikroskop ile görüntülendi ve incelemeler sonucunda P2-v1'in P2-v2'ye göre daha yüksek oranda nükleusta bulunduğu tespit edildi (Şekil - 21).



**Şekil - 21: P2-v1, P2-v2'ye oranla daha fazla nükleusa lokalizasyona sahiptir.** FLAG ile işaretlenmiş P2-v1 ve P2-v2 proteinlerini kodlayan plazmidler HeLa hücrelerinde eksprese edildi ve immünfloresan konfokal mikroskobisi ile FLAG görüntülendi. Nükleus boyaması için DAPI, sitoplazma boyaması için Falloydin kullanıldı.

PFKFB3'ün nükleusa lokalizasyonu 472. Konumda bulunan KKPR amino asitleri sayesinde olmaktadır (Li ve ark., 2018; Yalcin ve ark., 2009a). Benzeri bir nükleusa lokalizasyon sekansı açısından PFKFB2 varyantları analiz edildi ve P2-v1'de 459. Konumda PVRMRRN ve 477. Konumda RRPR olmak üzere iki nükleusa lokalizasyon sinyali bölgesi; P2-v2'de ise 459. Konumda RRRP olmak üzere bir nükleusa lokalizasyon bölgesi belirlendi (Şekil - 22-A).

Son olarak PFKFB2 varyantlarının daha detaylı lokalizasyon analizi amacıyla hücre lizatları sitoplazma/nükleus/nükleus-kromatin bağlı şeklinde ayrıştırıldı. Benzer şekilde Western blotlama ile PFKFB2 lokalizasyonu incelendi ve sonuç olarak (i) P2-v1'in nükleusa lokalizasyonu ve (ii) P2-v2'nin nükleusta görülmemesi ile P2-v1'in daha yüksek oranda nükleusa lokalizasyon gösterdiği doğrulandı. Her iki PFKFB2 varyantı da kromatin bağlı ekstraktlarda saptanmadı. PFKFB2'nin nükleusta kromatine bağlanmadığı anlaşıldı (Şekil - 22-B).

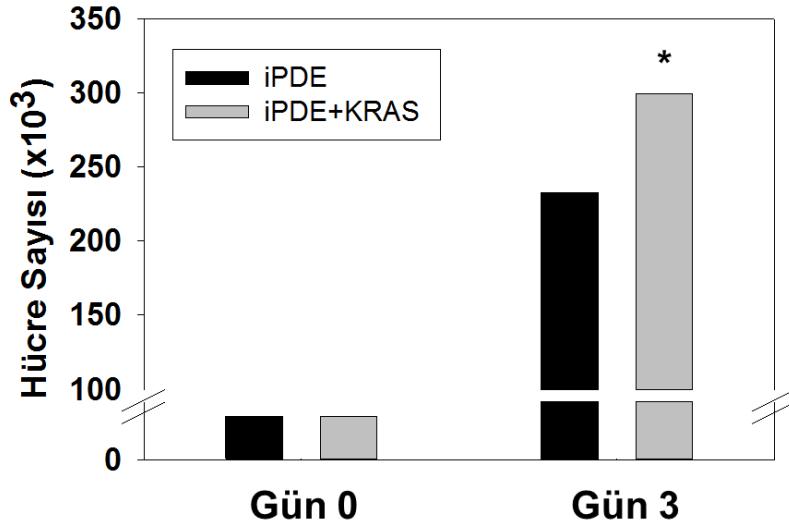


**Şekil - 22: PFKFB2 varyantları nükleusa lokalizasyon sinyali (NLS) bölgeleri içermektedir ve nükleusta kromatine bağlanmamaktadır. A) PFKFB2 varyantlarının protein sekansları gösterilmiştir. Nükleusa lokalizasyon bölgesi sekansları işaretlenmiştir. Her iki PFKFB2 varyantı NLS içermektedir. B) P2-v1 nükleusa lokalize olmaktadır, fakat kromatine bağlandığı tespit edilmemiştir. S.E.: Sitoplazmik ekstrakt, N.E.: Nükleus ekstraktı, K.B.: Kromatine bağlı nükleus ekstraktı.**

## 4.2. KRAS<sup>G12D</sup>'nin iPDE Hücrelerin Onkojenik Transformasyonuna Ve PFKFB Enzimlerine Etkileri

### 4.2.1. KRAS<sup>G12D</sup> ile iPDE Hücrelerinin Onkojenik Transformasyonu Proliferasyon, Glikoliz ve Fru-2,6-BP Miktarlarını Artırır.

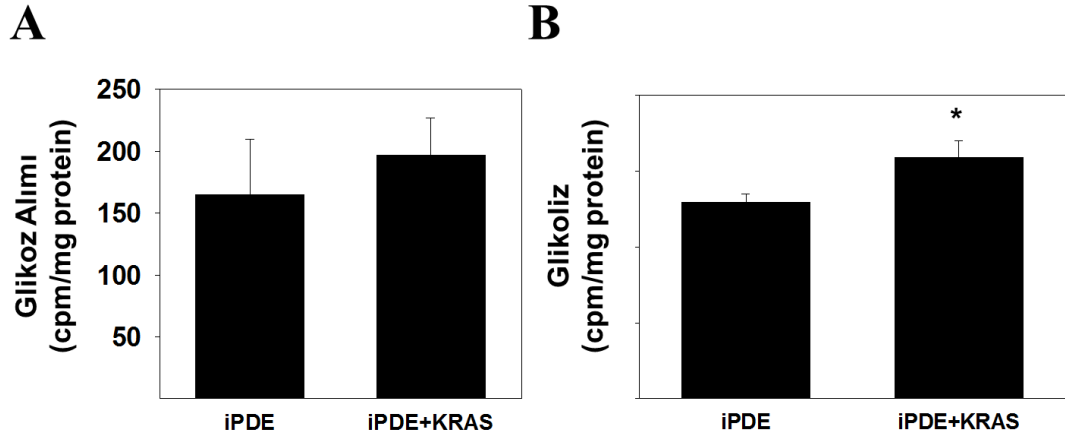
KRAS<sup>G12D</sup>'nin iPDE hücrelerde proliferasyona etkisinin anlaşılması amacıyla iPDE ve iPDE+KRAS hücreler,  $75 \times 10^3$ /kuyucuk olacak şekilde 6-kuyucuklu plakalara ekildi ve 72 saat sonra hücre sayıları hemositometrik olarak değerlendirildi. iPDE+KRAS hücrelerin, iPDE hücrelere oranla daha fazla prolife oldukları görüldü. (iPDE:  $232,2 \pm 15,7 \times 10^3$  hücre/kuyucuk; iPDE+KRAS:  $299 \times 10^4 \pm 8,9 \times 10^3$  hücre/kuyucuk;  $p=0,0065 < 0,05$ ) (Şekil - 23).



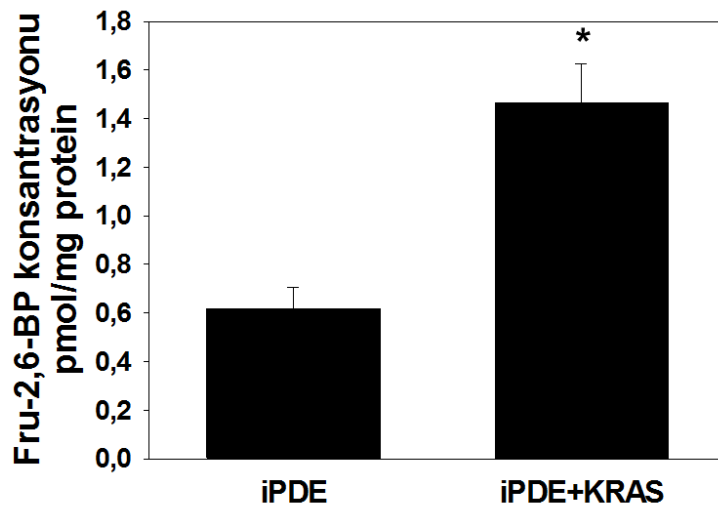
Şekil - 23: iPDE+KRAS hücrelerinin proliferasyonu, iPDE hücrelerden daha hızlı gerçekleşmektedir. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir.

KRAS<sup>G12D</sup>'nin iPDE hücrelerin glikoz alımına, glikoliz hızına ve Fru-2,6-BP konsantrasyonuna etkilerinin incelenmesi amacıyla iPDE ve iPDE+KRAS hücreleri 6-kuyucuklu plakalara ekildi ve ilgili deneyler uygun metodlar ile gerçekleştirildi. KRAS<sup>G12D</sup> ile transformasyonun glikoz alımını anlamlı oranda etkilemediğini (iPDE:  $164,798 \pm 44,71$ ; iPDE+KRAS:  $196,65 \pm 30,47$ ;

$p=0,43>0,05$ ) ve glikolitik aktiviteyi (iPDE:  $5,17 \pm 0,22$ ; iPDE+KRAS:  $6,36 \pm 0,44$ ;  $p=0,0257<0,05$ ) artırdığı görüldü (Şekil - 24). Glikoliz artışı ile doğru orantılı olacak şekilde Fru-2,6-BP konsantrasyonunun (iPDE:  $62 \pm 8,9$ , iPDE+KRAS:  $147 \pm 15,9$ ;  $p=0,003<0,05$ ) da iPDE+KRAS hücrelerde daha fazla olduğu görüldü (Şekil - 25).



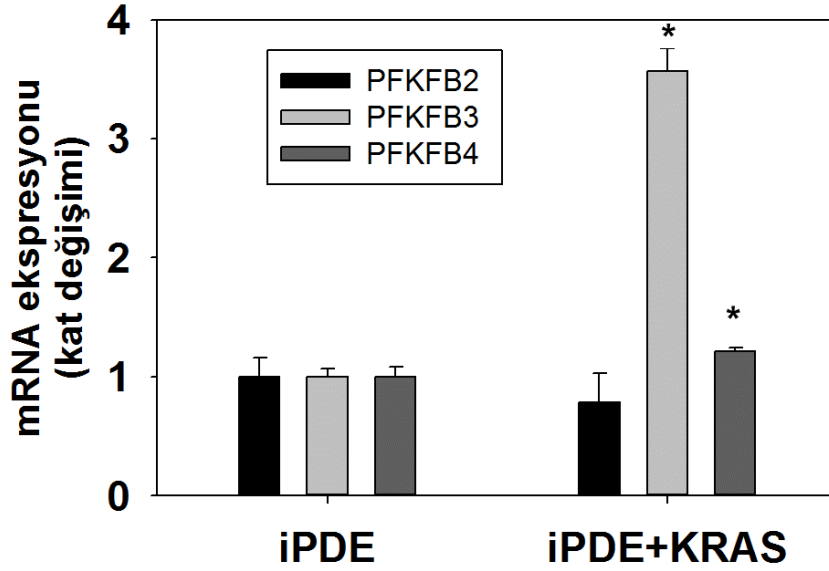
Şekil - 24: KRAS ile transformasyon pankreatik duktal hücrelerde glukoz alımını ciddi anlamda etkilemezken glikolizi artırır. Değerler protein konsantrasyonlarına normalize edilerek cpm/mg protein olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir. A) Glukoz alımı. B) Glikoliz.



Şekil - 25: iPDE+KRAS hücrelerde Fru-2,6-BP konsantrasyonu iPDE hücelere göre daha fazladır. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir.

#### 4.2.2. KRAS<sup>G12D</sup> Ekspresyonu PFKFB3 mRNA Ekspresyonunu Artırırken PFKFB2 Ekspresyonunu Azaltır.

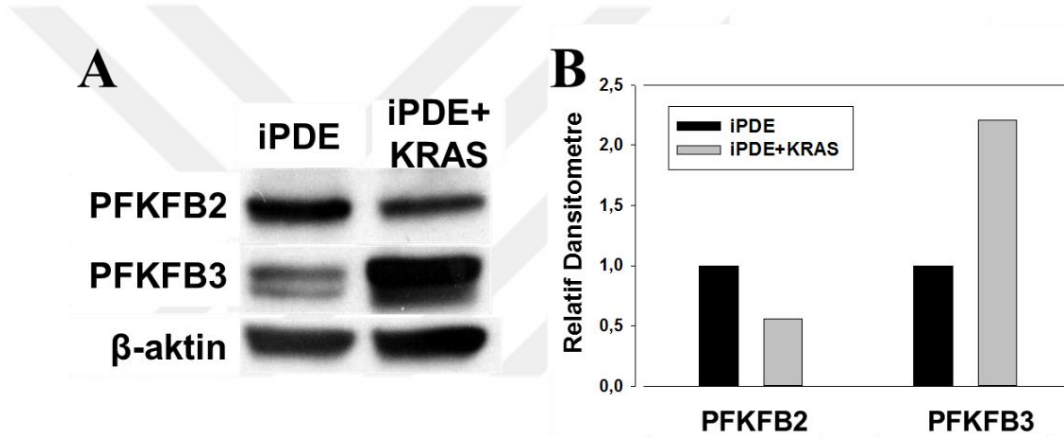
KRAS<sup>G12D</sup>'nin Fru-2,6-BP konsantrasyonunu artırması, PFKFB enzim ekspresyon ve aktiviteleri üzerine etkisinin ne olduğu sorusunu gündeme getirdi. Bu sebeple iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerden RNA lizatları elde edilerek gerçek-zamanlı qPCR ile PFKFB 1 - 4 enzim ekspresyonları incelendi. PFKFB1 ekspresyonu, her iki hücrede de tespit edilemedi. PFKFB2 mRNA ekspresyonunun iPDE+KRAS hücrelerde iPDE hücrelere oranla yaklaşık %20 daha az olduğu (iPDE:  $1 \pm 0,15$ ; iPDE+KRAS:  $0,78 \pm 0,24$   $p=0,261>0,05$ ), PFKFB3 ekspresyonunun iPDE+KRAS hücrelerde iPDE hücrelere göre yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu (iPDE:  $1 \pm 0,06$ ; iPDE+KRAS:  $3,56 \pm 0,19$   $p=0,0007<0,001$ ) ve PFKFB4 ekspresyonunun iPDE+KRAS hücrelerde % 20 oranında arttığı (iPDE  $1 \pm 0,06$  ; iPDE+KRAS:  $1,21 \pm 0,03$   $p=0,012<0,05$ ) tespit edildi (Şekil - 26).



Şekil - 26: iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerde tespit edilmiş PFKFB enzimleri mRNA ekspresyonları. Endojen kontrol olarak  $\beta$ -aktin kullanıldı ve sonuçlar iPDE hücreesindeki ekspresyonlara göre relatif olarak verildi. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir.

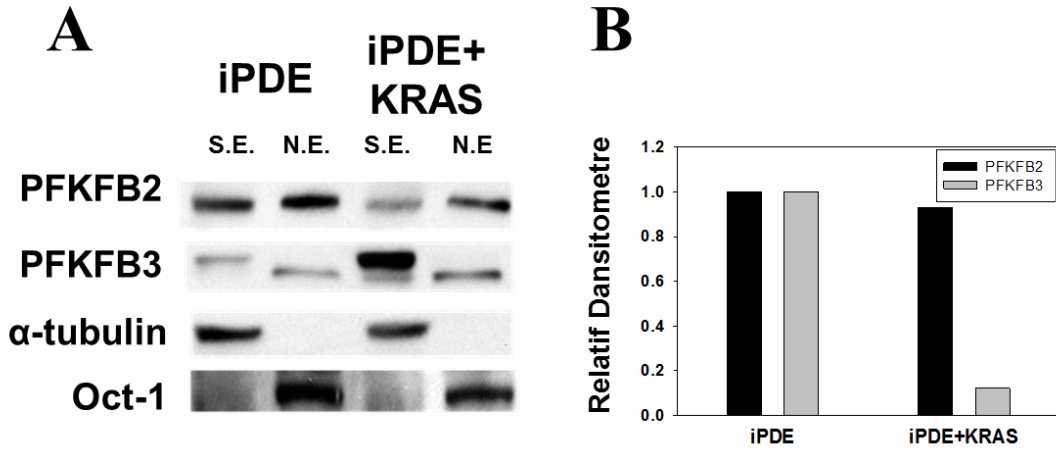
#### 4.2.3. KRAS<sup>G12D</sup> ile Onkojenik Transformasyon PFKFB2 Total Protein Miktarını Azaltırken PFKFB2'nin Nükleusa Lokalizasyonunu Etkilemez.

KRAS<sup>G12D</sup>'nin iPDE hücrelerde PFKFB2 ve PFKFB3 protein miktarlarına etkisi Western blotlama ile incelendi. mRNA sonuçları ile uyumlu bir şekilde, iPDE+KRAS hücrelerde PFKFB2 total protein miktarının azaldığı (iPDE:  $1 \pm 0,01$ ; iPDE+KRAS:  $0,55 \pm 0,02$ ,  $p=0,0089 < 0,05$ ) ve PFKFB3 total protein miktarının arttığı (iPDE:  $1 \pm 0,01$ ; iPDE+KRAS:  $2,2 \pm 0,03$ ,  $p=0,0079 < 0,05$ ) tespit edildi (Şekil- 27).



Şekil - 27: KRAS ile transformasyon sonucunda iPDE hücrelerde PFKFB2 total protein miktarı azalırken, PFKFB3 total protein miktarı artmaktadır. A) iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerden elde edilen lizatlar ile yapılan Western blot analizi. B) Western blot analizinin dansitometrik ölçümü. Dansitometreler β-aktin'e göre normalize edilmiştir.

Sonrasında, KRAS<sup>G12D</sup>'nin PFKFB2 ve PFKFB3 nükleusa lokalizasyonları üzerine etkisi incelendi. Elde edilen hücre lizatlarında sitoplazma ve nükleus ayrıştırıldı. PFKFB2 ve PFKFB3 protein miktarları incelendi. İlginç bir şekilde, KRAS<sup>G12D</sup> ile onkojenik transformasyon sonrası, PFKFB3'ün relatif nükleusa lokalizasyon oranının azaldığı (iPDE:  $1 \pm 0,03$ ; iPDE+KRAS:  $0,12 \pm 0,01$ ,  $p=0,011 < 0,05$ ), PFKFB2'nin relatif nükleusa lokalizasyon oranının ise değişmediği (iPDE:  $1 \pm 0,02$ ; iPDE+KRAS:  $0,95 \pm 0,03$ ,  $p=0,316 > 0,05$ ) saptandı (Şekil - 28).



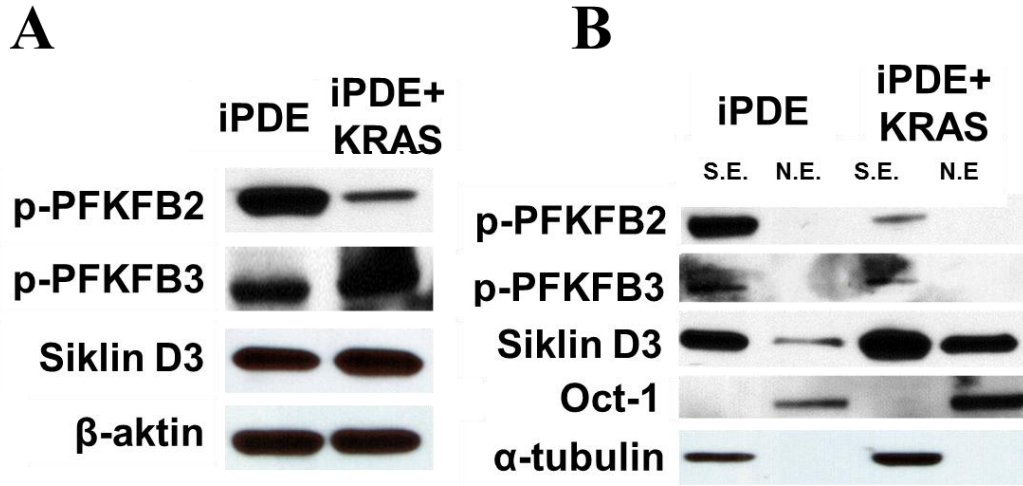
**Şekil - 28:** KRAS ile gerçekleşen transformasyon PFKFB2'nin nükleusa lokalizasyonunu etkilemezken, PFKFB3'ün nükleusa lokalizasyonunu azaltır. **A)** iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerden elde edilen sitoplazmik ve nükleus lizatları ile yapılan Western blot analizi. S.E.: sitoplazmik ekstrakt N.E.: Nükleus ekstraktı. **B)** Western blot analizinin densitometrik ölçümü. Sitoplazmik bantlar  $\alpha$ -tubulin densitometresine ve nükleus bantları Oct-1 densitometresine göre normalize edilmiştir ve nükleus bant densitometreleri sitoplazmik densitometre değerlerine bölünerek lokalizasyon oranı elde edilmiştir.

#### 4.2.4. iPDE ve iPDE+KRAS Hücrelerinde PFKFB2'nin Fosforilasyonu Nükleusa Lokalizasyon İçin Gerekli Değildir.

İlk olarak iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinden elde edilen total protein lizatlarında fosfo-Ser-488-PFKFB2 ve fosfo-Ser-461-PFKFB3 miktarları incelendi. Total PFKFB2 ve PFKFB3 ile doğru orantılı şekilde, p-PFKFB2 protein miktarının azaldığı, p-PFKFB3 miktarının arttığı görüldü (Şekil - 29-A).

Transkripsiyon faktörleri, bazı hormon reseptörleri gibi pek çok proteinin fosforilasyon ile aktivasyon sonrasında nükleusa lokalize olduğu bilinmektedir (Nardozi ve ark., 2010). Bu amaçla elde edilen sitoplazmik ve nükleus lizatlarında fosfo-Ser-488-PFKFB2 ve Ser-461-PFKFB3 lokalizasyonları incelendi. Her iki enzimin fosforlanmış proteinlerinin yalnızca sitoplazma lizatlarında bulunduğu tespit edildi (Şekil - 29-B). Siklin D3'ün hücre içi lokalizasyonu incelendiğinde, onkogenik KRAS ekspresyonundan beklendiği şekilde, iPDE+KRAS hücrelerde nükleus bantlarındaki Siklin D3'ün arttığı görüldü (Şekil - 29-B).



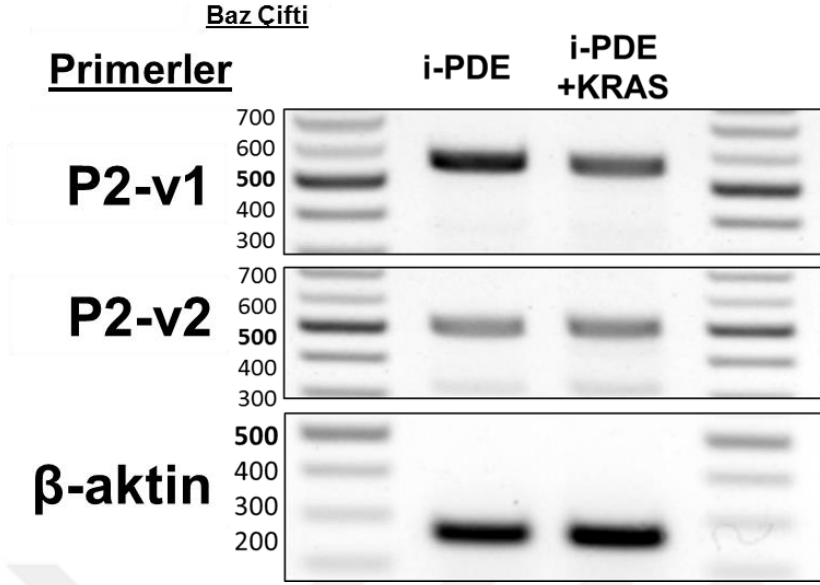


Şekil - 29: Fosforlanma ile aktivasyon, PFKFB2 ve PFKFB3'ün nükleusa lokalizasyonunu etkilemez. **A)** iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinden elde edilen total lizatlar ile yapılan Western blot analizi. **B)** iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinden elde edilen sitoplazmik ve nükleus lizatları ile yapılan Western blot analizi. S.E.: Sitoplazmik ekstrakt, N.E.: Nükleus ekstraktı.

#### 4.2.5. KRAS<sup>G12D</sup> ile Onkojenik Transformasyon PFKFB2 Transkript Varyant-1 Ekspresyonunu Azaltırken, Transkript Varyant-2 Ekspresyonunu Etkilemez.

KRAS<sup>G12D</sup> ile onkojenik transformasyonun PFKFB2 varyantları ekspresyonlarına etkisinin kontrol edilmesi için, daha önce farklı hücre hatlarına uygulanan PCR yöntemi ve agaroz jel görüntüleme (Başlık 4.1.3. ve Şekil - 17-C) uygulandı. iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerden elde edilen mRNA örnekleri ile varyant spesifik tasarlanmış PFKFB2 primer çiftleri kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Agaroz jel elektroforezi sonucunda, KRAS<sup>G12D</sup> ile transformasyonun, yalnızca P2-v1 mRNA ekspresyonunu azalttığı, P2-v2 ekspresyonunu değiştirici bir etkisi olmadığı görüldü (Şekil - 30).

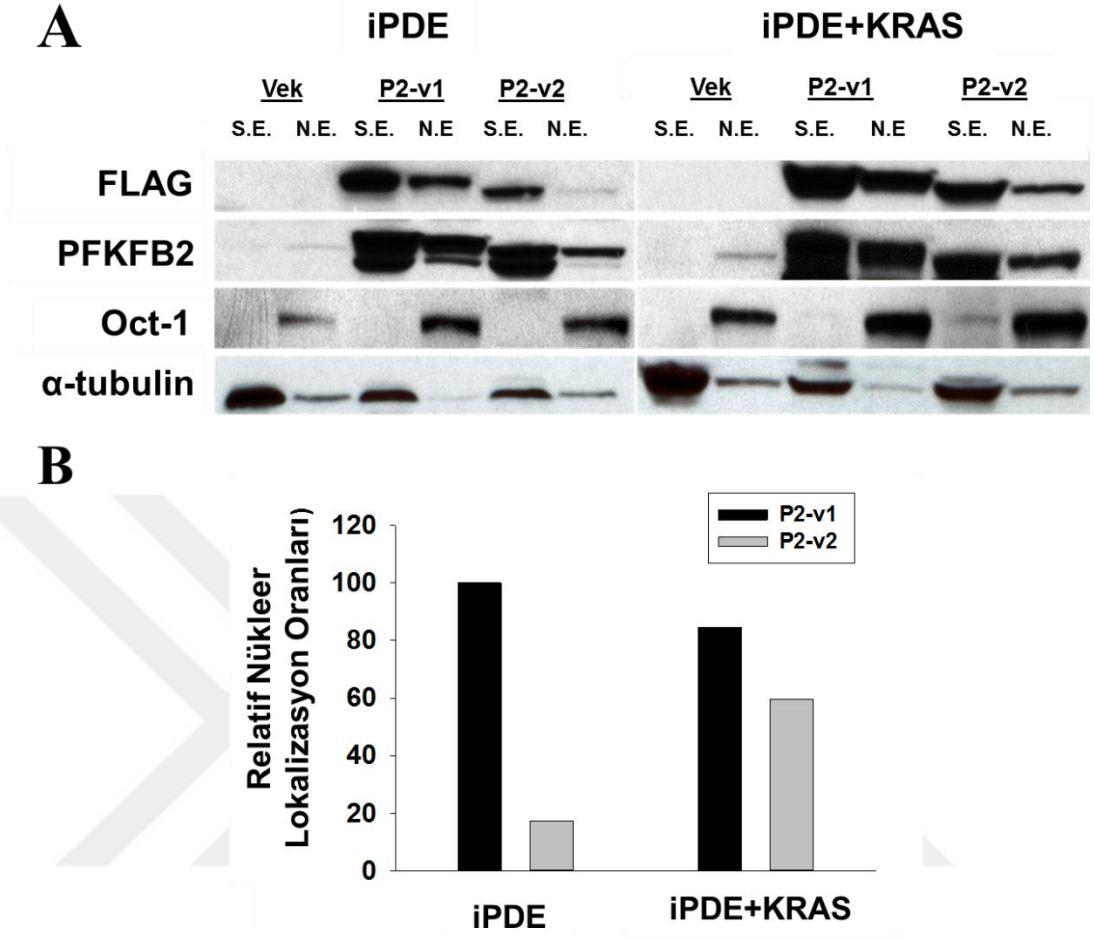


**Şekil - 30: KRAS<sup>G12D</sup> ekspresyonu iPDE hücrelerde, P2-v1 ekspresyonunu azaltırken P2-v2 ekspresyonunu etkilemez.** iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerden elde edilen mRNA'lardan sentezlenen cDNA'lar kullanılarak yapılan PCR analizleri. Kullanılan primer çifti solda belirtilmiştir. Yükleme kontrolü olarak β-aktin primerleri ile yapılan PCR kullanılmıştır. Markör değerleri baz çifti olarak verilmiştir.

#### 4.2.6. iPDE Hücrelerde PFKFB2 Transkript Varyant-2 Düşük Oranda Nükleusa Lokalizasyona Sahipken, iPDE+KRAS Hücrelerinde Yüksek Oranda Nükleusta Saptanmaktadır.

PFKFB2 varyantlarının iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerde lokalizasyonlarının incelenmesi amacıyla her iki varyantı kodlayan plazmidler kullanılarak P2-v1 ve P2-v2 over-eksprese edildi. (Kontrol amacıyla herhangi bir gen kodlamayan, fakat gen kodlayan bölge dışında aynı sekansı içeren kontrol plazmidini kullanıldı.) Elde edilen hücre pelletlerinin sitoplazma ve nükleus protein içerikleri Western blotlama ile incelendi.

Sonuçlara göre, incelenen her iki hücre hattında da P2-v1'in daha yüksek nükleusa lokalizasyon oranına sahip olduğu görüldü (iPDE: 100; iPDE+KRAS: 84,67). Fakat ilginç bir şekilde, P2-v2'nin iPDE+KRAS hücrelerde, iPDE hücrelere göre yaklaşık 3 kat daha fazla nükleusa lokalizasyon gösterdiği (iPDE: 17,37; iPDE+KRAS: 59,51) saptandı (Şekil - 31). Dansitometre analizi yapılırken iPDE hücrelerdeki P2-v1 nükleus/sitoplazmik oranı 100 kabul edilerek relatif hesaplama kullanıldı.



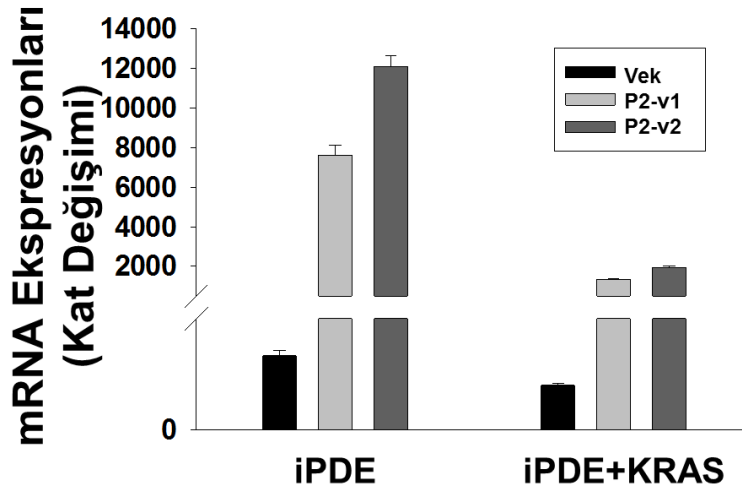
**Şekil - 31: P2-v1, iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerin her ikisinde P2-v2'ye göre daha fazla nükleusa lokalizasyon göstermektedir. A)** iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerde kontrol vektörü, P2-v1 ve P2-v2 over-eksprese edilmiştir ve sitoplazma-nükleus ayrıştırılarak Western blot analizi yapılmıştır. S.E.: Sitoplazmik ekstrakt, N.E.: Nükleus ekstraktı. **B)** Western blot analizinin dansitometrik ölçümü sonucu hesaplanmış nükleusa lokalizasyon oranları. Oranlar, iPDE hücrelerdeki P2-v1 nükleus lokalizasyon oranına göre relatif hesaplanmıştır.

### 4.3. PFKFB2 ve PFKFB3 Over-ekspresyon ve Baskılanmasının iPDE ve iPDE+KRAS Hücrelerinin Glikolitik Özelliklerine Etkileri

#### 4.3.1. iPDE ve iPDE+KRAS Hücrelerde PFKFB2 Varyantları Over-ekspresyonu

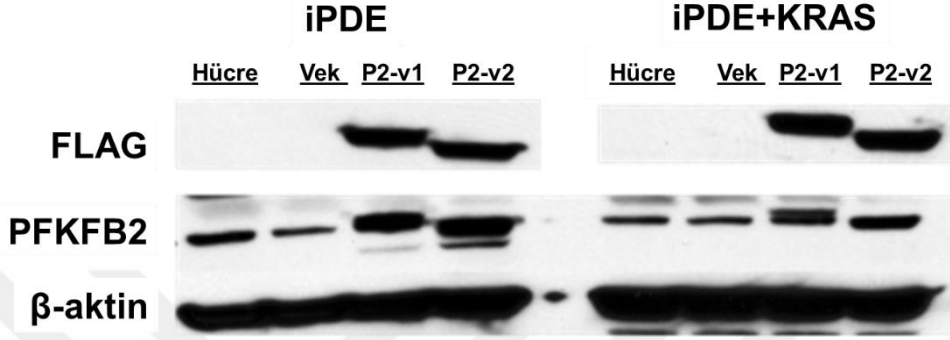
PFKFB2 varyantlarının iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinde glikolitik özelliklere etkisinin çalışılması amacıyla P2-v1 ve P2-v2 kodlayan plazmidler hücrelere transfekte edildi. Deneyler transfeksiyondan 48 saat sonra gerçekleştirildi. Elde edilen hücre pelletlerinden RNA saflaştırıldı ve cDNA sentezlendi. Gerçek zamanlı PCR ile PFKFB2 ekspresyonları kontrol edildi.

PFKFB2 mRNA ekspresyonları sırası ile: iPDE-vek:  $1 \pm 0,06$ , iPDE-P2-v1:  $7606,07 \pm 506,41$ , iPDE-P2-v2:  $12100,21 \pm 537,04$ ; iPDE+KRAS-vek:  $0,59 \pm 0,02$ , iPDE+KRAS-P2-v1:  $1326,51 \pm 30,11$  ve iPDE+KRAS-P2-v2:  $1944,19 \pm 76,62$  olarak tespit edildi (Şekil - 32).



Şekil - 32: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 ile transfekte edilmiş iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin PFKFB2 mRNA ekspresyonları.  $\beta$ -aktin endojen kontrol olarak kullanılmıştır ve değerler iPDE hücrelerdeki PFKFB2 ekspresyonuna göre relatif olarak verilmiştir.

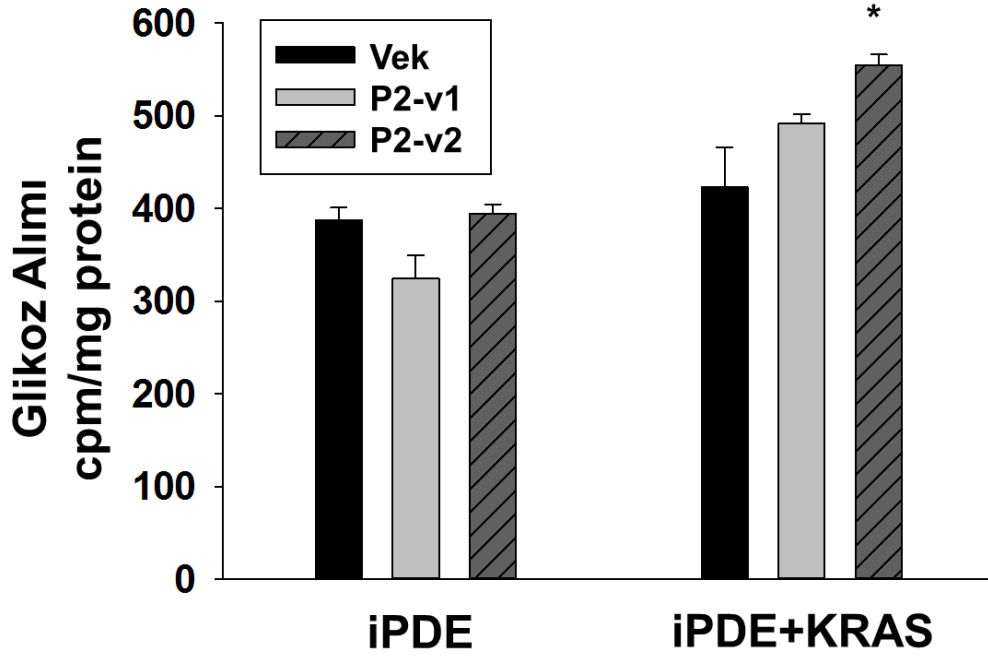
Sonrasında, benzer şekilde elde edilen pelletlerden total protein lizatları elde edildi ve Western blotlama ile protein ekspresyonu doğrulandı (Şekil - 33). Her iki hücrede, her iki varyantın over-ekspresyonunun başarılı olduğu görüldükten sonra ilgili deneyler gerçekleştirildi.



Şekil - 33: Transfekte edilmemiş hücre ve Vektör, P2-v1 ve P2-v2 ile transfekte edilmiş iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin total protein miktarları. Over-eksprese PFKFB2'nin gösterilmesi için FLAG ve yükleme kontrolü olarak β-aktin kullanılmıştır.

#### 4.3.2. P2-v1 Over-Ekspresyonunun Glikoz Alımına Etkisi Yoktur ve P2-v2 Over-ekspresyonu Yalnızca iPDE+KRAS Hücrelerde Glikoz Alımını Artırır.

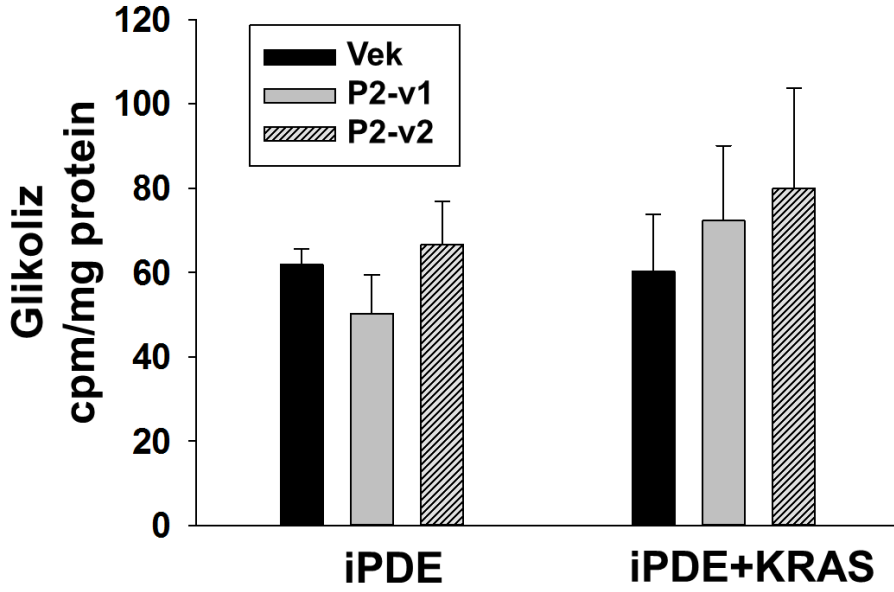
Transfekte edilen iPDE ve iPDE+KRAS hücreler ile ilk olarak glikoz alımı değerlendirildi ve PFKFB2 varyantlarının glikoz alımına etkisi ölçüldü. Hücre gruplarının glikoz alımları sırası ile; iPDE-Vek:  $387,72 \pm 13,19$ , iPDE-P2-v1:  $324,17 \pm 25,66$  ( $p=0,16 > 0,05$ ), iPDE-P2-v2:  $394,64 \pm 9,91$  ( $p=0,51 > 0,05$ ); iPDE+KRAS-Vek:  $422,80 \pm 43,49$ , iPDE+KRAS-P2-v1:  $491,47 \pm 10,11$  ( $p=0,10 > 0,05$ ) ve iPDE+KRAS-P2-v2:  $554,39 \pm 11,70$  ( $p=0,027 < 0,05$ ) olarak ölçüldü (Şekil - 34).



Şekil - 34: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 ile transfekte edilmiş iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin glüköz alımı değerleri. Ölçülen CPM değerleri hücrelerin protein konsantrasyonlarına normalize edilerek CPM/mg protein olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir.

#### 4.3.3. PFKFB2 Varyantları Over-ekspresyonu iPDE ve iPDE+KRAS Hücrelerde Glükolizi Etkilemez.

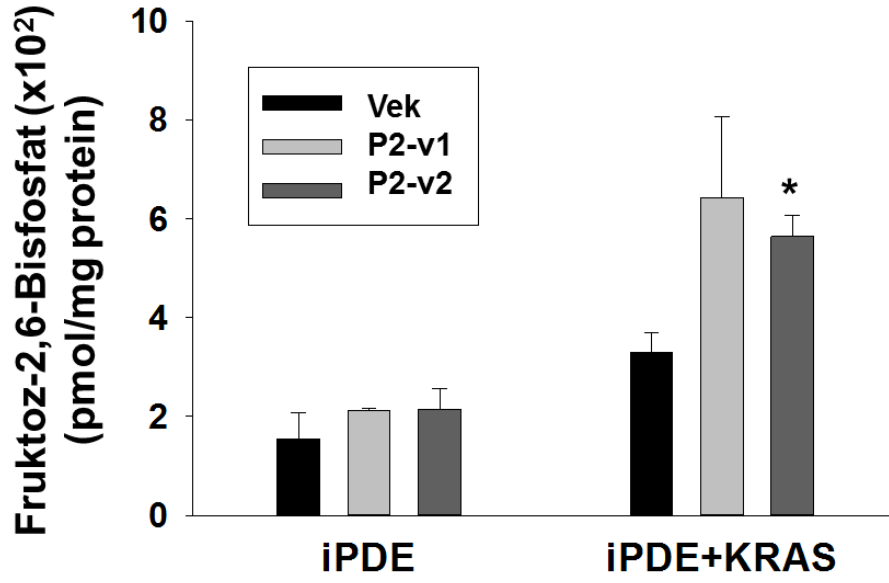
Glüköz alımı sonrasında transfekte edilmiş hücrelerin glükoliz hızları değerlendirildi ve PFKFB2 varyantlarının glükolize etkisi ölçüldü. Hücre gruplarının glükoliz değerleri sırası ile; iPDE-Vek:  $61,86 \pm 3,82$ , iPDE-P2-v1:  $50,30 \pm 29,15$  ( $p=0,56 > 0,05$ ), iPDE-P2-v2:  $66,61 \pm 10,21$  ( $p=0,51 > 0,05$ ); iPDE+KRAS-Vek:  $60,24 \pm 13,46$ , iPDE+KRAS-P2-v1:  $72,27 \pm 17,77$  ( $p=0,40 > 0,05$ ) ve iPDE+KRAS-P2-v2:  $79,98 \pm 23,67$  ( $p=0,29 > 0,05$ ) olarak ölçüldü (Şekil - 35).



Şekil - 35: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 ile transfecte edilmiş iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin glikoliz değerleri. Ölçülen CPM değerleri hücrelerin protein konsantrasyonlarına normalize edilerek CPM/mg protein olarak verilmiştir.

#### 4.3.4. PFKFB2 Over-ekspresyonu iPDE+KRAS Hücrelerinde Fru-2,6-BP Konsantrasyonunu Artırır.

P2-v1 ve P2-v2 over-eksprese eden iPDE ve iPDE+KRAS hücreleri son olarak Fru-2,6-BP miktarları açısından değerlendirildi. Hücre gruplarının Fru-2,6-BP değerleri sırası ile; iPDE-vek:  $154 \pm 53$  pmol/mg protein, iPDE-P2-v1:  $210 \pm 4$  pmol/mg protein ( $p=0,20>0,05$ ), iPDE-P2-v2:  $214 \pm 42$  pmol/mg protein ( $p=0,20>0,05$ ); iPDE+KRAS-vek:  $328 \pm 39$  pmol/mg protein, iPDE+KRAS-P2-v1:  $642 \pm 163$  pmol/mg protein ( $p=0,072>0,05$ ) ve iPDE+KRAS-P2-v2:  $564 \pm 42$  pmol/mg protein ( $p=0,002<0,05$ ) olarak ölçüldü (Şekil - 36). Sonuçlara göre, yalnızca P2-v2 over-ekspresyonunun iPDE+KRAS hücrelerde Fru-2,6-BP konsantrasyonunu anlamlı şekilde artırdığı görüldü.



Şekil - 36: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 ile transfekte edilmiş iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin hücre-içi Fru-2,6-BP değerleri. Ölçülen Fru-2,6-BP değerleri hücrelerin protein konsantrasyonlarına normalize edilerek pmol/mg protein olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir.

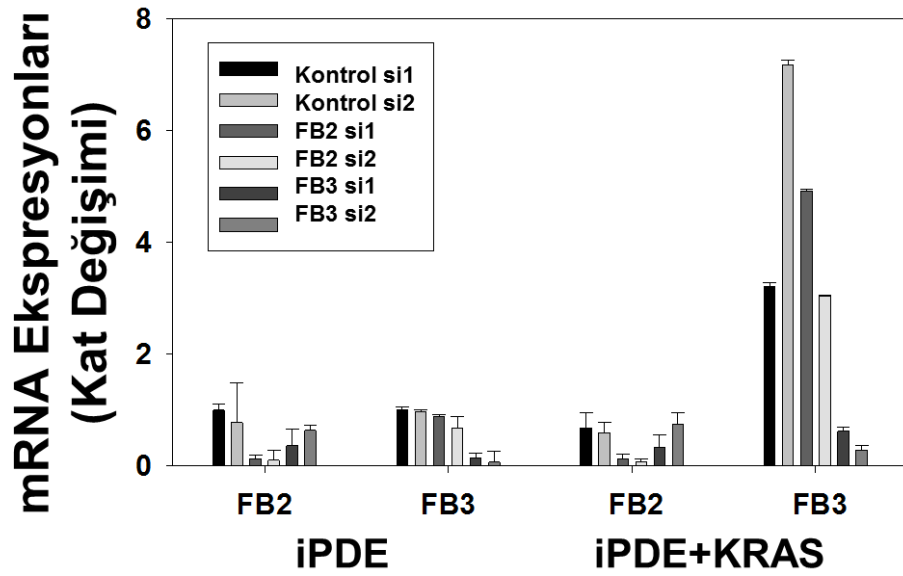
#### 4.3.5. PFKFB2 ve PFKFB3'ün iPDE ve iPDE+KRAS Hücrelerinde siRNA Aracılı Baskılanması

iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinde endojen eksprese edilen PFKFB2 ve PFKFB3'ün glikoliz ilişkili rollerinin anlaşılması amacıyla gen ekspresyonları siRNA kullanılarak baskılandı. Deneylerde 2 adet genomda karşılığı olmayan kontrol siRNA (Kontrol si1 ve Kontrol si2) ve 2 adet PFKFB2 spesifik siRNA (FB2 si1 ve FB2 si2), 2 adet PFKFB3 siRNA (FB3 si1 ve FB3 si2) kullanıldı. Deneyler siRNA transfeksiyonundan 72 saat sonra gerçekleştirildi. Gen ekspresyonlarının baskılanmasının kontrolü için gerçek zamanlı PCR kullanıldı.

PFKFB2 ekspresyonları sırası ile; iPDE-Kontrol si1:  $1 \pm 0,12$ , iPDE-Kontrol si2:  $0,78 \pm 0,71$ , iPDE-FB2 si1:  $0,13 \pm 0,06$ , iPDE-FB2 si2:  $0,10 \pm 0,18$ , iPDE-FB3 si1:  $0,37 \pm 0,30$ , iPDE-FB3 si2:  $0,64 \pm 0,09$ ; iPDE+KRAS-Kontrol si1:  $0,69 \pm 0,27$ , iPDE+KRAS-Kontrol si2:  $0,60 \pm 0,19$ , iPDE+KRAS-FB2 si1:  $0,13 \pm 0,09$ , iPDE+KRAS-FB2 si2:  $0,09 \pm 0,04$ , iPDE+KRAS-FB3 si1:  $0,33 \pm 0,23$ , iPDE+KRAS-FB3 si2:  $0,75 \pm 0,21$  olarak saptandı (Şekil - 37).



PFKFB3 ekspresyonları sırası ile; iPDE-Kontrol si1:  $1 \pm 0,06$ , iPDE-Kontrol si2:  $0,97 \pm 0,02$ , iPDE-FB2 si1:  $0,88 \pm 0,05$ , iPDE-FB2 si2:  $0,68 \pm 0,21$ , iPDE-FB3 si1:  $0,14 \pm 0,10$ , iPDE-FB3 si2:  $0,07 \pm 0,19$ ; iPDE+KRAS-Kontrol si1:  $3,21 \pm 0,07$ , iPDE+KRAS-Kontrol si2:  $7,18 \pm 0,09$ , iPDE+KRAS-FB2 si1:  $4,92 \pm 0,04$ , iPDE+KRAS-FB2 si2:  $3,04 \pm 0,02$ , iPDE+KRAS-FB3 si1:  $0,63 \pm 0,07$ , iPDE+KRAS-FB3 si2:  $0,29 \pm 0,09$  olarak saptandı (Şekil - 37). Elde edilen tüm sonuçlar iPDE-Kontrol si1 hücrelerine göre relatif olarak hesaplanmıştır.

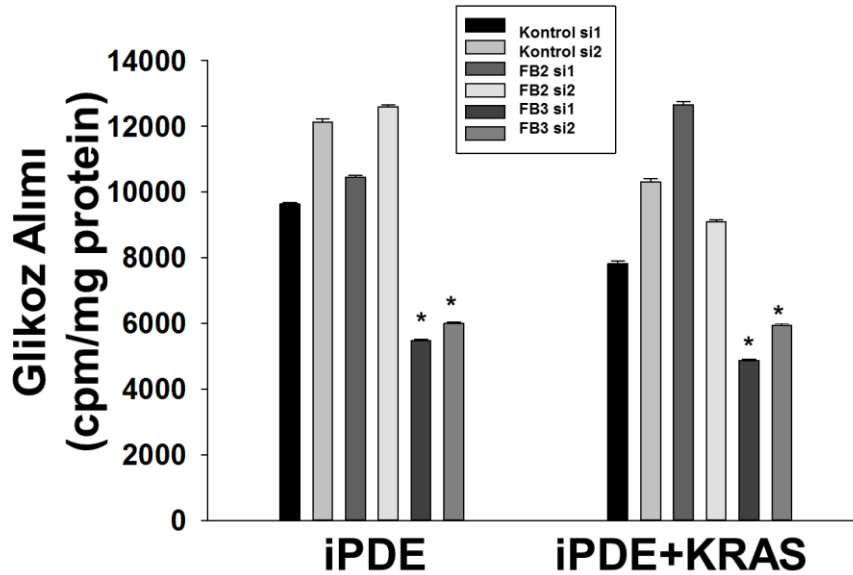


Şekil - 37: iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerde siRNA aracılı PFKFB2 ve PFKFB3 mRNA ekspresyonu baskılanmasının gerçek zamanlı PCR ile doğrulanması. Endojen kontrol olarak  $\beta$ -aktin kullanılmıştır ve ekspresyonlar iPDE-Kontrol si1 ekspresyonlarına göre relatif hesaplanmıştır.

#### 4.3.6. PFKFB2'nin siRNA Aracılı Baskılanması iPDE ve iPDE+KRAS Hücrelerinde Glikoz Alımını Etkilemezken, PFKFB3'ün Baskılanması Glikoz Alımını Azaltır.

siRNA uygulanması ile PFKFB2 ve PFKFB3 mRNA ekspresyonlarının baskılanmasının başarılı olduğu görüldükten sonra, ilk olarak elde edilen hücrelerin glikoz alımları değerlendirildi.

Hücrelerin glikoz alımları sırası ile: iPDE-Kontrol si1:  $9634,19 \pm 40,30$  cpm/mg protein, iPDE-Kontrol si2:  $12136,03 \pm 82,02$  cpm/mg protein, iPDE-FB2 si1:  $10451,58 \pm 53,03$  cpm/mg protein, iPDE-FB2 si2:  $12596,22 \pm 59,39$  cpm/mg protein, iPDE-FB3 si1:  $5479,64 \pm 43,13$  cpm/mg protein, iPDE-FB3 si2:  $5994,05 \pm 49,49$  cpm/mg protein; iPDE+KRAS-Kontrol si1:  $7820,47 \pm 78,48$  cpm/mg protein, iPDE+KRAS-Kontrol si2:  $10303,28 \pm 95,45$  cpm/mg protein, iPDE+KRAS-FB2 si1:  $12662,95 \pm 95,45$  cpm/mg protein, iPDE+KRAS-FB2 si2:  $9085 \pm 72,83$  cpm/mg protein, iPDE+KRAS-FB3 si1:  $4865,35 \pm 48,08$  cpm/mg protein, iPDE+KRAS-FB3 si2:  $5929,43 \pm 60,81$  olarak saptandı (Şekil - 38). 2 farklı PFKFB3 siRNA ile transfekte edilmiş hücrenin, 2 Kontrol siRNA grubuna göre ikili karşılaştırma istatistiksel sonuçları (t-testi) iPDE hücreleri için sırasıyla FB3si1 - Kontrol1: 0,0002, FB3si1 - Kontrol2: 0,004, FB3si2 - Kontrol2: 0,0011 ve FB3 si2 - Kontrol2: 0,008 olarak ve iPDE+KRAS hücreleri için ise sırasıyla FB3si1 - Kontrol1: 0,002, FB3si1 - Kontrol2: 0,002, FB3si2 - Kontrol2: 0,0016 ve FB3 si2 - Kontrol2: 0,03 olarak belirlendi. Yapılan tüm karşılaştırmalarda p değeri 0,05'den küçüktür. Elde edilen sonuçlara göre yalnızca PFKFB3'ün baskılanması hem iPDE hem de iPDE+KRAS hücrelerinde glikoz alımını azaltmaktadır.

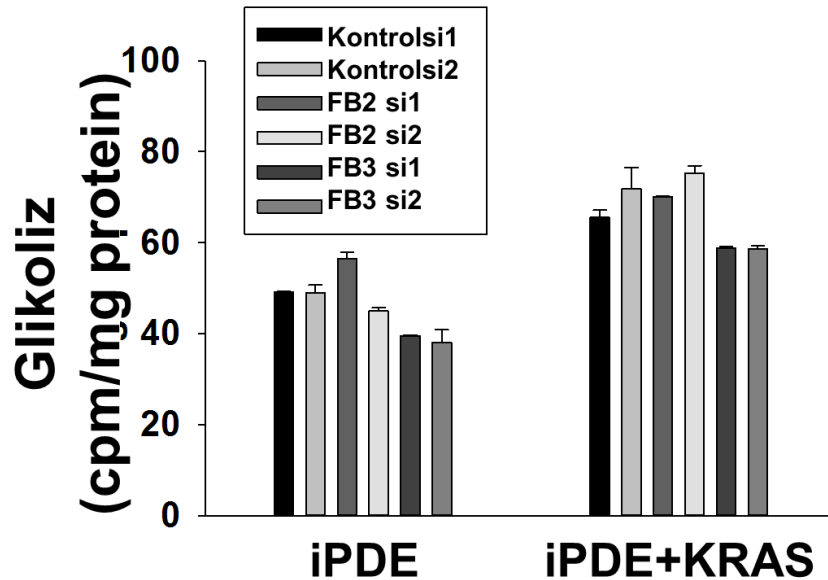


Şekil - 38: PFKFB2 ve PFKFB3 baskılanmış iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinde glikoz alım değerleri. Ölçülen CPM değerleri hücrelerin protein konsantrasyonlarına normalize edilerek glikoz alımı deneyi sonuçları CPM/mg protein olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir.

#### 4.3.7. PFKFB2'nin ve PFKFB3'ün siRNA Aracılı Baskılanmaları iPDE ve iPDE+KRAS Hücrelerinde Glikolizi Etkilemez.

Glikoz alımı ölçümünden sonra PFKFB2 ve PFKFB3 baskılanmış iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinde glikoliz ölçüldü.

Hücrelerin glikoliz oranları sırası ile: iPDE-Kontrol si1:  $49,16 \pm 0,08$  cpm/mg protein, iPDE-Kontrol si2:  $48,91 \pm 1,77$  cpm/mg protein, iPDE-FB2 si1:  $56,55 \pm 1,31$  cpm/mg protein, iPDE-FB2 si2:  $44,97 \pm 0,70$  cpm/mg protein, iPDE-FB3 si1:  $39,56 \pm 0,06$  cpm/mg protein, iPDE-FB3 si2:  $38,12 \pm 2,71$  cpm/mg protein; iPDE+KRAS-Kontrol si1:  $65,56 \pm 1,58$  cpm/mg protein, iPDE+KRAS-Kontrol si2:  $71,85 \pm 4,67$  cpm/mg protein, iPDE+KRAS-FB2 si1:  $70,13 \pm 0,03$  cpm/mg protein, iPDE+KRAS-FB2 si2:  $75,29 \pm 1,62$  cpm/mg protein, iPDE+KRAS-FB3 si1:  $58,79 \pm 0,37$  cpm/mg protein, iPDE+KRAS-FB3 si2:  $58,61 \pm 0,80$  olarak saptandı (Şekil - 39). Gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark tespit edilmedi. Sonuçlara göre her iki PFKFB izoformunun siRNA aracılı baskılanması iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinde glikoliz üzerinde anlamlı etkiye sebep olmamıştır.

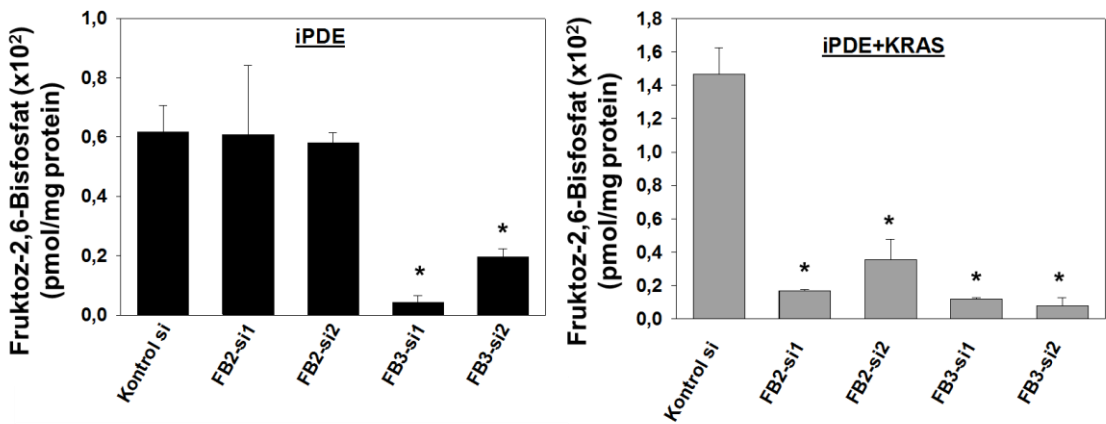


Şekil - 39: PFKFB2 ve PFKFB3 baskılanmış iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinde glikoliz değerleri. Ölçülen CPM değerleri hücrelerin protein konsantrasyonlarına normalize edilerek CPM/mg protein olarak verilmiştir.

#### 4.3.8. PFKFB3'ün siRNA Aracılı Baskılanması Her İki Hücrede Fru-2,6-BP Konsantrasyonunu Düşürürken, PFKFB2'nin siRNA Aracılı Baskılanması Yalnızca iPDE+KRAS Hücrelerde Fru-2,6-BP Konsantrasyonunu Düşürür.

Son olarak, PFKFB2 ve PFKFB3 siRNA ile transfekte edilmiş iPDE ve iPDE+KRAS hücreleri kullanılarak hücrelerin Fru-2,6-BP konsantrasyonları değerlendirildi.

Fru-2,6-BP konsantrasyonları sırası ile: iPDE-Kontrol si1:  $62 \pm 9$  pmol/mg protein, iPDE-FB2 si1:  $61 \pm 23$  pmol/mg protein ( $p=0,94>0,05$ ), iPDE-FB2 si2:  $58 \pm 3$  pmol/mg protein ( $p=0,50>0,05$ ), iPDE-FB3 si1:  $4 \pm 2$  pmol/mg protein ( $p=0,0004<0,001$ ), iPDE-FB3 si2:  $20 \pm 3$  pmol/mg protein ( $p=0,0015<0,01$ ); iPDE+KRAS-Kontrol si1:  $147 \pm 16$  pmol/mg protein, iPDE+KRAS-FB2 si1:  $17 \pm 1$  pmol/mg protein ( $p=0,00014<0,001$ ), iPDE+KRAS-FB2 si2:  $35 \pm 13$  pmol/mg protein ( $p=0,00071<0,001$ ), iPDE+KRAS-FB3 si1:  $12 \pm 1$  pmol/mg protein ( $p=0,00012<0,001$ ), iPDE+KRAS-FB3 si2:  $8 \pm 5$  pmol/mg protein ( $p=0,00013<0,001$ ) olarak saptandı (Şekil - 40). Deney sonucuna göre, ilginç bir şekilde, PFKFB3'ün baskılanması her iki hücrede de (iPDE ve iPDE+KRAS) Fru-2,6-BP miktarında azalmaya sebep oluyor olsa da, PFKFB2'nin baskılanması yalnızca iPDE+KRAS hücrelerinde Fru-2,6-BP miktarını azaltmıştır.



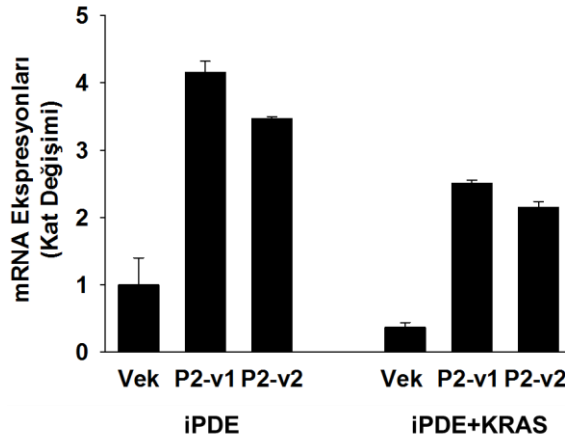
Şekil - 40: PFKFB2 ve PFKFB3 baskılanmış iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinde hücre-içi Fru-2,6-BP konsantrasyonları. Ölçülen Fru-2,6-BP değerleri hücrelerin protein konsantrasyonlarına normalize edilerek pmol/mg protein olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir.

#### 4.4. PFKFB2 Varyantları Stabil Ekspresyonunun iPDE ve iPDE+KRAS Hücrelerinde Onkojenik Potansiyele Etkileri

##### 4.4.1. iPDE ve iPDE+KRAS Hücrelerinde PFKFB2 Varyantları Stabil Over-ekspresyonu ve Proliferasyona Etkileri

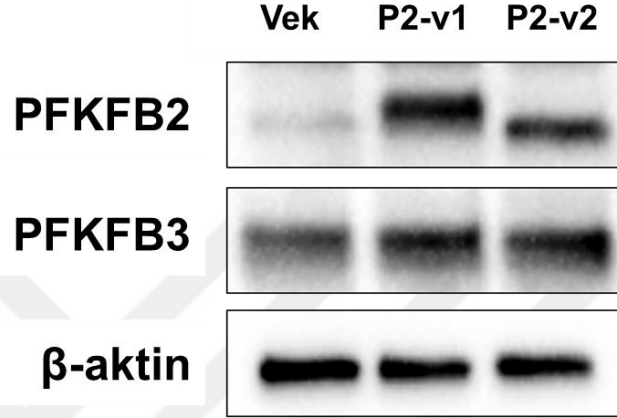
iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinde PFKFB2 varyantlarının onkojenik özelliklere etkisinin çalışılması amacı ile, P2-v1 ve P2-v2 kodlayan plazmidler (Bölüm 3.14.2’de elde edilmiş P2-v1-BSD ve P2-v2-BSD plazmidleri) iPDE ve iPDE+KRAS hücrelere transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra blastisidin ile seleksiyona başlandı ve bir hafta süreyle seleksiyon uygulandı (Bölüm 3.8.1.2.). Elde edilen hücreler büyütülerek ilk olarak ekspresyon kontrolleri gerçekleştirildi ve ilk olarak hücre gruplarından RNA saflaştırıldı ve cDNA sentezlenerek gerçek zamanlı PCR ile PFKFB2 ekspresyonları analiz edildi.

PFKFB2 mRNA ekspresyonları sırası ile: iPDE-Vek:  $1 \pm 0,4$ , iPDE-P2-v1:  $4,16 \pm 0,16$ , iPDE-P2-v2:  $3,47 \pm 0,03$ ; iPDE+KRAS-Vek:  $0,37 \pm 0,07$ , iPDE+KRAS-P2-v1:  $2,51 \pm 0,05$  ve iPDE+KRAS-P2-v2:  $2,15 \pm 0,088$  olarak tespit edildi (Şekil - 41).



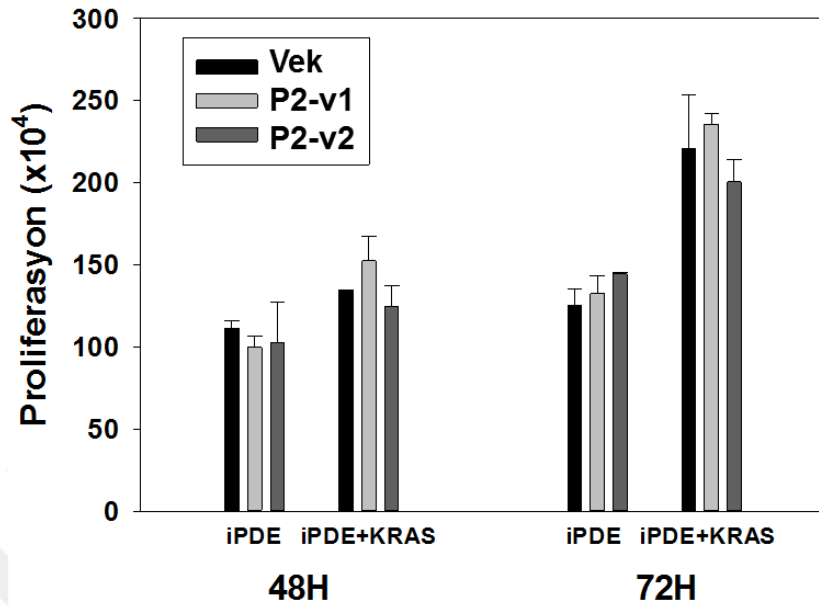
Şekil - 41: Stabil P2-v1 ve P2-v2 eksprese eden iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin PFKFB2 mRNA ekspresyonları. Endojen kontrol olarak  $\beta$ -aktin kullanılmıştır ve ekspresyonlar iPDE-Vek hücrelere göre relatif olarak hesaplanmıştır.

Sonrasında, aynı hücre grupları kullanılarak PFKFB2 protein miktarları Western blotlama ile ölçüldü ve hücrelerde PFKFB2 stabil over-ekspresyonunun başarıyla gerçekleştiği anlaşıldı (Şekil - 42). (İleri deneylerde yalnızca iPDE+KRAS hücreler kullanıldığından, Western blotlama sonucu yalnızca bu hücreler için verilmiştir.)



Şekil - 42: P2-v1 ve P2-v2 stabil over-eksprese eden iPDE+KRAS hücrelerinin PFKFB2 ve PFKFB3 protein miktarları. Yükleme kontrolü olarak β-aktin kullanılmıştır.

Stabil P2-v1 ve P2-v2 ekspresyonunun iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinde proliferasyona etkisinin değerlendirilmesi amacıyla her hücre grubu 6-kuyucuklu plakalara  $40 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. 48 saat ve 72 saat sonra hücreler tripsinize edilerek hemasitometrik olarak sayıldı. 48 saat sonra hücre sayıları: iPDE-Vek:  $111,5 \pm 4,24 \times 10^4$  hücre/kuyucuk, iPDE-P2-v1:  $99,5 \pm 7,07 \times 10^4$  hücre/kuyucuk, iPDE-P2-v2:  $102,7 \pm 24,4 \times 10^4$  hücre/kuyucuk ve iPDE+KRAS-Vek:  $134,0 \pm 0,7 \times 10^4$  hücre/kuyucuk, iPDE+KRAS-P2-v1:  $152,2 \pm 15,2 \times 10^4$  hücre/kuyucuk ve iPDE+KRAS-P2-v2:  $124,5 \pm 12,7 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olarak belirlendi. 72 saat sonra hücre sayıları ise: iPDE-Vek:  $125,0 \pm 9,89 \times 10^4$  hücre/kuyucuk, iPDE-P2-v1:  $132,5 \pm 10,60 \times 10^4$  hücre/kuyucuk, iPDE-P2-v2:  $144,5 \pm 0,7 \times 10^4$  hücre/kuyucuk ve iPDE+KRAS-Vek:  $220,5 \pm 33,23 \times 10^4$  hücre/kuyucuk, iPDE+KRAS-P2-v1:  $235,5 \pm 6,34 \times 10^4$  hücre/kuyucuk ve iPDE+KRAS-P2-v2:  $200,5 \pm 13,43 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olarak belirlendi (Şekil - 43). Deney sonucunda, hücre grupları arasında önemli bir proliferasyon farkı tespit edilmedi.



Şekil - 43: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil eksprese eden iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin proliferasyonu. Hücre proliferasyonları hematisometrik sayım ile belirlenmiştir.

#### 4.4.2. iPDE+KRAS Hücrelerinde PFKFB2 Varyantları Ekspresyonu Yumuşak Agarda Daha Az Sayıda, Fakat Daha Büyük Koloniler Oluşmasını Sağlar.

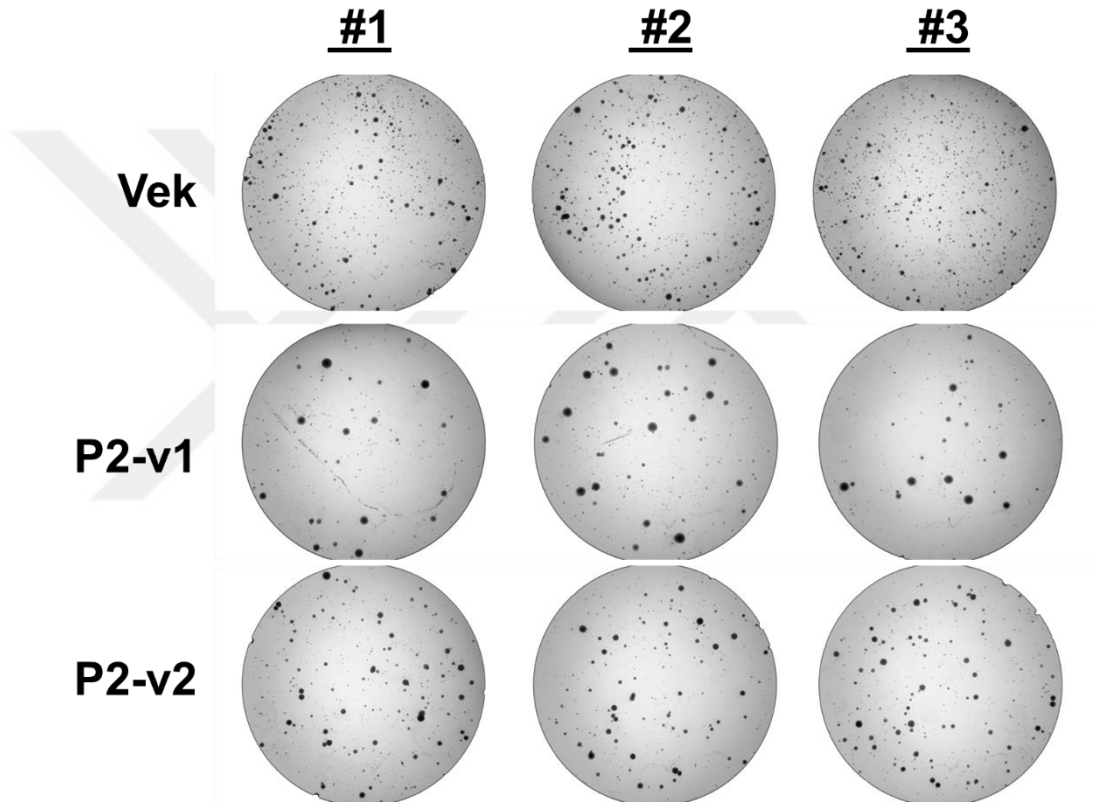
PFKFB2 varyantları stabil over-eksprese eden iPDE ve iPDE+KRAS hücreleri ile ilk olarak yumuşak agarda koloni formasyonu analizi gerçekleştirildi. Ekilen hücreler iki hafta büyütüldükten sonra makroskopik ve mikroskopik görüntüleri kaydedilerek koloni sayıları ve büyüklükleri açısından incelendi.

iPDE-Vek, iPDE-P2-v1 ve iPDE-P2-v2 hücre gruplarının yumuşak agarda koloni oluşturmadığı görüldü (Şekil olarak gösterilmemiştir.).

iPDE+KRAS hücrelerde ise hem P2-v1 ekspresyonu, hem de P2-v2 ekspresyonu sonucunda daha az sayıda, fakat daha büyük koloniler oluştuğu görüldü (Şekil - 44). Gruplardaki ortalama koloni sayıları; iPDE+KRAS-Vek:  $449,50 \pm 129,55$ ; iPDE+KRAS-P2-v1:  $144,66 \pm 76,60$  ( $p = 0,034 < 0,05$ ) ve iPDE+KRAS-P2-v2:  $197,16 \pm 26,71$  ( $p = 0,007 < 0,05$ ) olarak analiz edildi (Şekil - 45-A). Ortalama koloni büyüklükleri ise; iPDE+KRAS-Vek:  $459,803 \pm 103,523$ ;

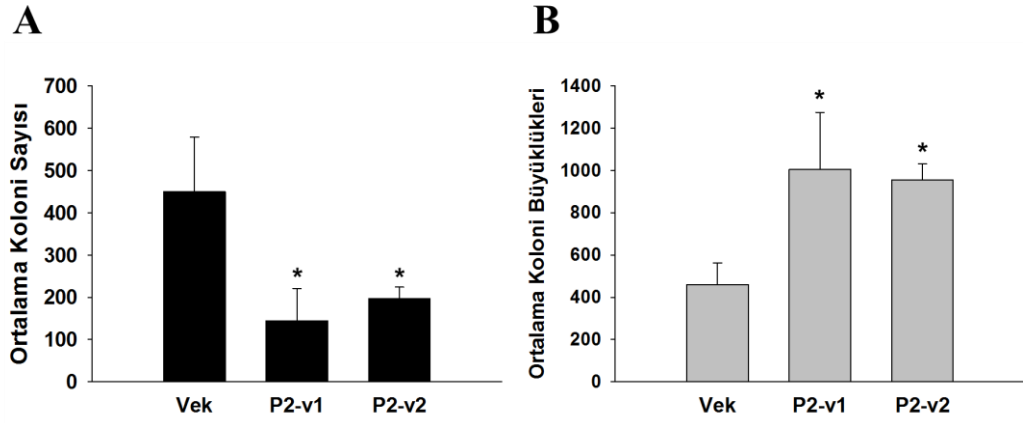
iPDE+KRAS-P2-v1:  $1005,715 \pm 269,325$  ( $p = 0,047 < 0,05$ ) ve iPDE+KRAS-P2-v2:  $955,224 \pm 76,463$  ( $p = 0,003 < 0,05$ ) olarak tespit edildi (Şekil - 45-B).

Mikroskopik görüntüleme sonrasında koloniler fikse edilerek kristal violet ile boyandı ve makroskopik görüntüler kaydedildi (Şekil - 46).

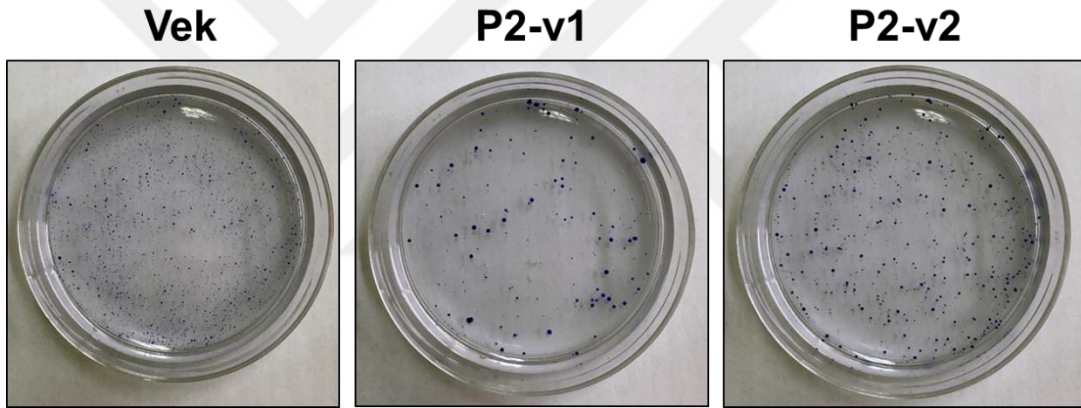


Şekil - 44: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil over-eksprese eden hücrelerin yumuşak agar kolonilerinin mikroskopik görüntüsü. Koloni görüntüleri invert mikroskop ile kaydedilmiştir. Alınan 9 görüntünün rastgele 3 tanesi sonucu yansıtmaları için eklenmiştir.





**Şekil - 45: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil over-eksprese eden hücrelerin yumuşak agar kolonilerinin analizi.** Kolonilerin mikroskopik görüntüleri ImageJ ile analiz edilmiştir. Analizde minimum 50 piksel ve 0,05 “circularity” kullanılmıştır. Sonuçlar alınan 9 görüntü kullanılarak analiz edilmiştir. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir. **A)** Ortalama Koloni Sayısı. **B)** Ortalama Koloni Büyüklüğü.

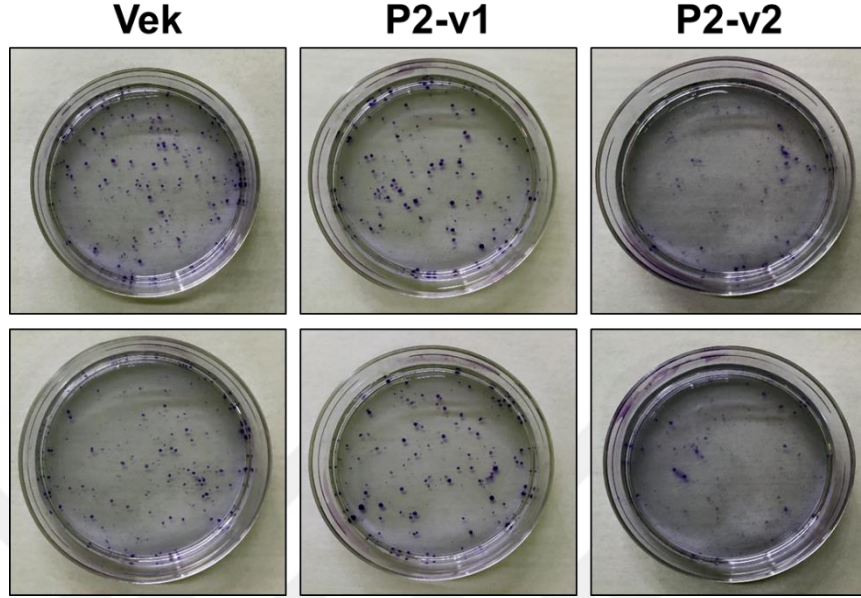


**Şekil - 46: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil over-eksprese eden iPDE+KRAS hücrelerinin yumuşak agar kolonilerinin makroskopik görüntüleri.** Koloniler metanol ile fikse edilerek kristal violet ile boyanmıştır.

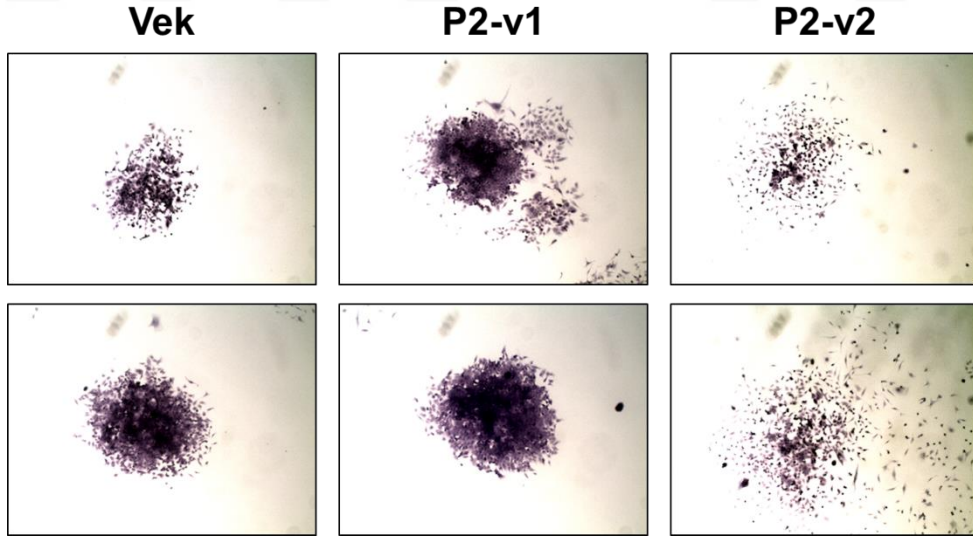
#### 4.4.3. Koloni Formasyon Deneyinde iPDE+KRAS Hücrelerinde P2-v2 Ekspresyonu Koloni Oluşturmaz, Yaygın Üreme Sağlar.

Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil eksprese eden iPDE ve iPDE+KRAS hücreleri ile koloni formasyon analizi gerçekleştirildi. Hücrelerin ekilmesinden bir hafta sonra hücrelerin makroskopik ve mikroskopik görüntüleri kaydedildi ve incelendi. P2-v1 eksprese eden hücrelerde makroskopik veya mikroskopik olarak vektöre göre önemli bir farklılık gözlenmedi. Yanısıra, P2-v2 eksprese eden hücrelerde makroskopik incelemede koloni oluşumu görülmedi (Şekil - 47).

Mikroskobik olarak incelendiğinde ise, koloni oluşturmak yerine, hücrelerin yaygın üredikleri tespit edildi (Şekil - 48).



Şekil - 47: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil over-eksprese eden iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin makroskobik koloni formasyon analizi sonucu. Vektör ve P2-v1'de makroskobik koloniler görülebilmekte iken, P2-v2'de çok az miktarda koloni saptanmıştır.



Şekil - 48: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil over-eksprese eden iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin mikroskobik koloni formasyon analizi sonucu. Vektör ve P2-v1 hücreler koloni oluşturarak ürerken P2-v2 hücreler yaygın üreme göstermektedir.

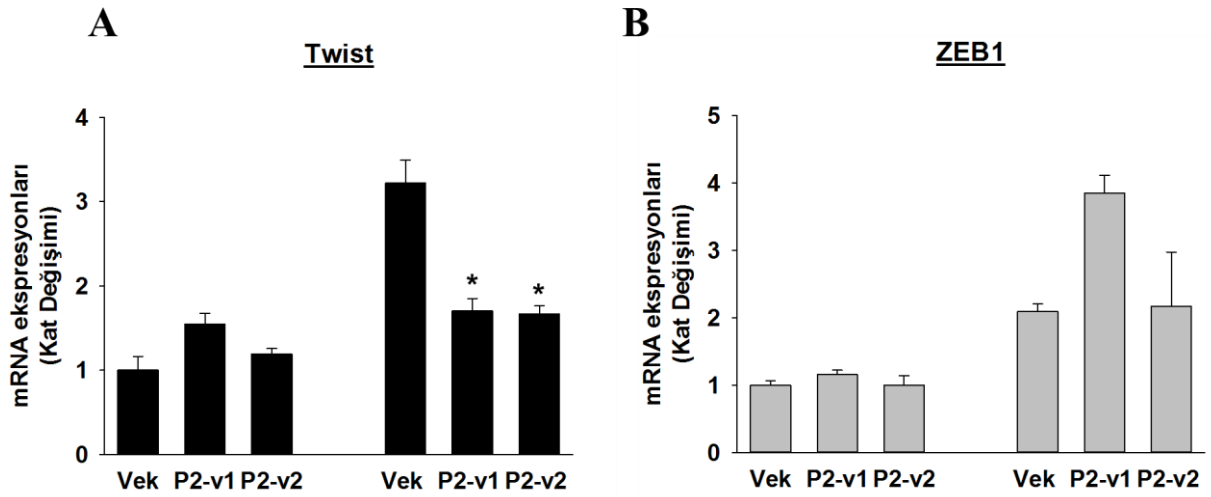
#### 4.4.4. PFKFB2 Stabil Ekspresyonu iPDE+KRAS Hücrelerinde Twist mRNA Ekspresyonunu Azaltırken Slug Ekspresyonunu Artırmaktadır.

iPDE+KRAS-P2-v2 hücrelerinde koloni formasyonu deneyinde yaygın üreme görülmesi ile EMT (Epitelyal-mezenşimal dönüşüm) markörleri incelendi. Kontrol amaçlı iPDE hücre grupları da deneye dahil edildi. Hücrelerden elde edilen lizatlardan RNA izole edilerek saflaştırıldı ve cDNA sentezlenerek gerçek zamanlı PCR analizi uygulandı. Twist, ZEB1, Snail ve Slug transkripsiyon faktörlerinin mRNA ekspresyonları incelendi.

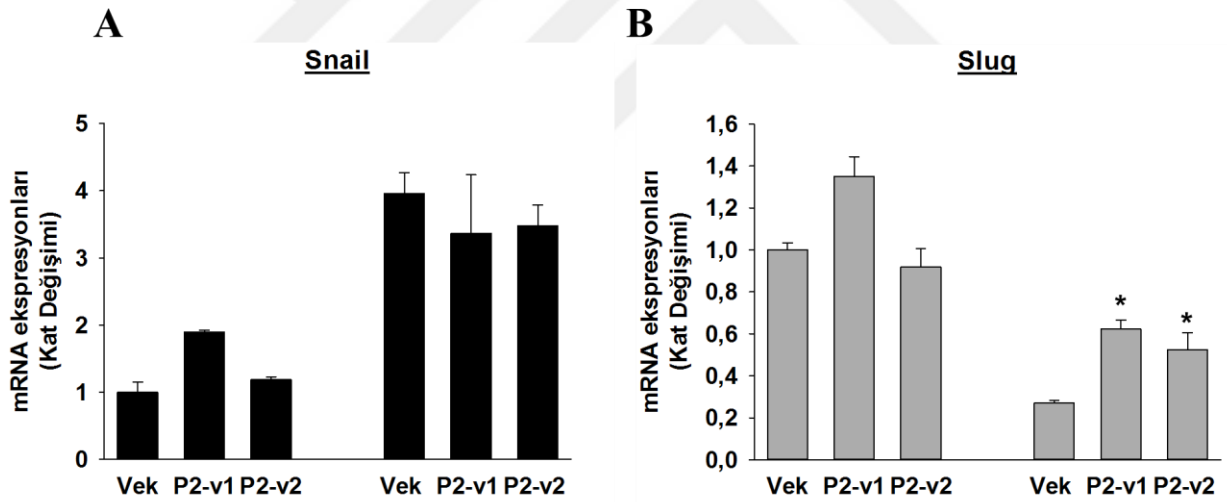
Twist ekspresyonları sırası ile; iPDE-Vek:  $1,00 \pm 0,16$ , iPDE-P2-v1:  $1,55 \pm 0,12$  ( $p=0,046 < 0,05$ ), iPDE-P2-v2:  $1,19 \pm 0,06$  ( $p=0,3 > 0,05$ ), iPDE+KRAS-Vek:  $3,21 \pm 0,27$ , iPDE+KRAS-P2-v1:  $1,70 \pm 0,14$  ( $p=0,002 < 0,05$ ) ve iPDE+KRAS-P2-v2:  $1,66 \pm 0,09$  ( $p=0,0044 < 0,05$ ) olarak belirlendi (Şekil - 49-A). ZEB1 ekspresyonları sırası ile; iPDE-Vek:  $1,00 \pm 0,06$ , iPDE-P2-v1:  $1,15 \pm 0,06$  ( $p=0,21 > 0,05$ ), iPDE-P2-v2:  $1,00 \pm 0,13$  ( $p=1$ ), iPDE+KRAS-Vek:  $2,09 \pm 0,11$ , iPDE+KRAS-P2-v1:  $3,84 \pm 0,26$  ( $p=0,059 > 0,05$ ) ve iPDE+KRAS-P2-v2:  $2,16 \pm 0,8$  ( $p=0,94 > 0,05$ ) olarak belirlendi (Şekil - 49-B).

Snail (*SNAI1*) ekspresyonları sırası ile; iPDE-Vek:  $1,00 \pm 0,15$ , iPDE-P2-v1:  $1,89 \pm 0,03$  ( $p=0,95 > 0,05$ ), iPDE-P2-v2:  $1,18 \pm 0,04$  ( $p=0,43 > 0,05$ ), iPDE+KRAS-Vek:  $3,95 \pm 0,31$ , iPDE+KRAS-P2-v1:  $3,36 \pm 0,87$  ( $p=0,61 > 0,05$ ) ve iPDE+KRAS-P2-v2:  $3,47 \pm 0,31$  ( $p=0,38 > 0,05$ ) olarak belirlendi (Şekil - 50-A). Slug (*SNAI2*) ekspresyonları sırası ile; iPDE-Vek:  $1,00 \pm 0,03$ , iPDE-P2-v1:  $1,34 \pm 0,09$  ( $p=0,13 > 0,05$ ), iPDE-P2-v2:  $0,91 \pm 0,08$  ( $p=0,45 > 0,05$ ), iPDE+KRAS-Vek:  $0,27 \pm 0,01$ , iPDE+KRAS-P2-v1:  $0,62 \pm 0,04$  ( $p=0,002 < 0,05$ ) ve iPDE+KRAS-P2-v2:  $0,52 \pm 0,08$  ( $p=0,03 < 0,05$ ) olarak belirlendi (Şekil - 50-B).

Zeb1 ve Snail mRNA ekspresyonlarında iPDE+KRAS hücrelerinde gruplar arası anlamlı bir farklılık görülmedi, fakat her iki PFKFB2 varyantının stabil over-ekspresyonunun Twist ekspresyonunu azalttığı ve Slug ekspresyonunu artırdığı görüldü (Şekil - 49 ve Şekil - 50).



**Şekil - 49: PFKFB2 varyantları ile stabil transfekte edilmiş iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin Twist ve ZEB1 mRNA ekspresyonları.** Gen ekspresyonları iPDE-Vek ekspresyonlarına göre relatif olarak hesaplanmıştır ve endojen kontrol olarak  $\beta$ -aktin kullanılmıştır. **A)** Twist ekspresyonu. **B)** ZEB1 ekspresyonu. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir.

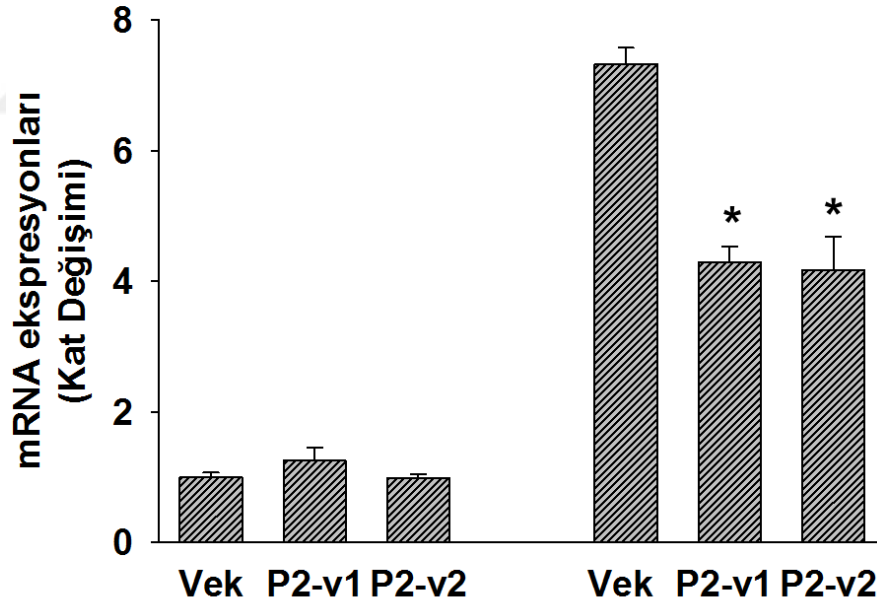


**Şekil - 50: PFKFB2 varyantları ile stabil transfekte edilmiş iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin Snail ve Slug mRNA ekspresyonları.** Gen ekspresyonları iPDE-Vek ekspresyonlarına göre relatif olarak hesaplanmıştır ve endojen kontrol olarak  $\beta$ -aktin kullanılmıştır. **A)** Snail ekspresyonu. **B)** Slug ekspresyonu. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir.

#### 4.4.5. PFKFB2 Varyantlarının Stabil Ekspresyonu iPDE+KRAS Hücrelerinde PFKFB3 mRNA Ekspresyonunu Azaltır.

PFKFB2 varyantları ile stabil transfekte edilmiş iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerin PFKFB3 mRNA ekspresyonları incelendi.

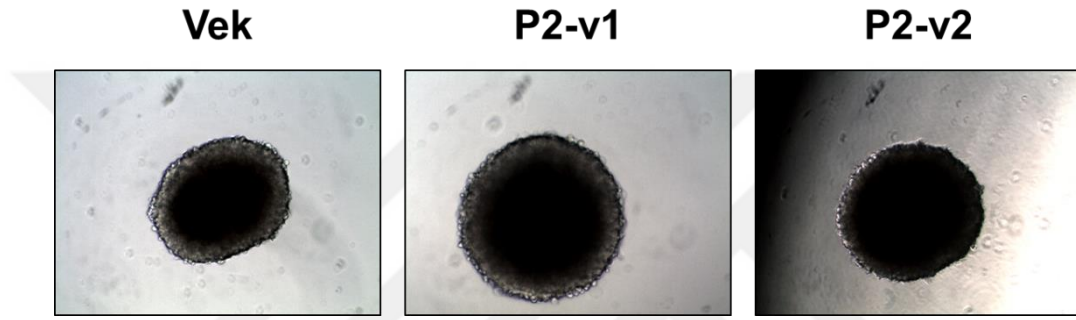
Ekspresyonlar: iPDE-Vek:  $1,00 \pm 0,07$ , iPDE-P2-v1:  $1,25 \pm 0,2$  ( $p=0,41>0,05$ ), iPDE-P2-v2:  $0,98 \pm 0,05$  ( $p=0,54>0,05$ ), iPDE+KRAS-Vek:  $7,33 \pm 0,24$ , iPDE+KRAS-P2-v1:  $4,29 \pm 0,23$  ( $p=0,011<0,05$ ) ve iPDE+KRAS-P2-v2:  $4,17 \pm 0,51$  olarak belirlendi ( $p=0,044<0,05$ ) (Şekil - 51). Sonuçlara göre iPDE+KRAS hücrelerde PFKFB2 varyantlarının uzun süreli ve stabil over-ekspresyonunun PFKFB3 ekspresyonlarını azalttığı görüldü.



Şekil - 51: PFKFB2 varyantları ile stabil transfekte edilmiş iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin PFKFB3 mRNA ekspresyonları. Gen ekspresyonları iPDE-Vek ekspresyonlarına göre relatif olarak hesaplanmıştır ve endojen kontrol olarak  $\beta$ -aktin kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir.

#### 4.4.6. PFKFB2 Varyantları Ekspresyonu iPDE+KRAS Hücrelerin Sfer Formasyonunu Etkilememektedir.

Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil eksprese eden iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin sfer oluşturma yetenekleri incelendi. Ekilen hücreler bir hafta sonra sfer şekli ve büyüklüğü açısından mikroskopik olarak incelendi. Hücreler arasında sfer oluşturma yeteneği açısından bir fark saptanmadı (Şekil - 52).

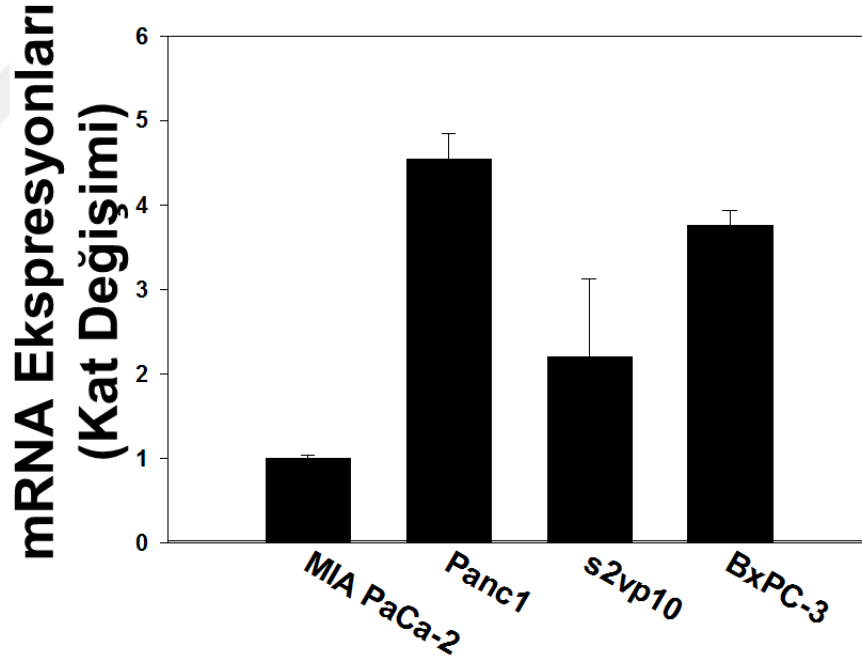


Şekil - 52: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil eksprese eden iPDE+KRAS hücrelerinin sfer formasyonu yeteneklerinde bir fark gözlenmemiştir. Görüntülemeler, hücreler ekildikten yedi gün sonra yapılmıştır.

#### 4.5. PDA (Mia PaCa-2, Panc1, s2vp10, BxPC-3) Hücrelerinde Endojen PFKFB2 Ekspresyonu ve Lokalizasyonları

##### 4.5.1. PDA Hücrelerinde PFKFB2 Eksprese Olmaktadır.

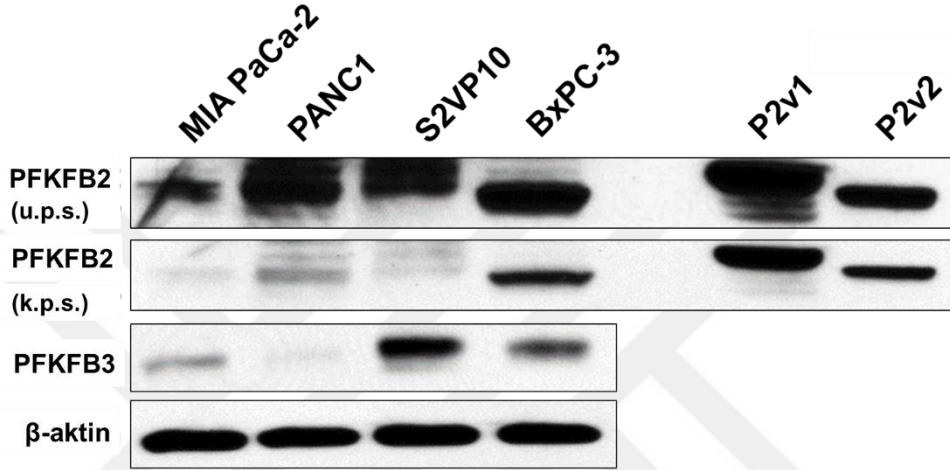
Pankreatik duktal adenokarsinoma hücreleri ile çalışmalara başlamadan önce farklı PDA hücre hatlarının PFKFB2 ekspresyonları incelendi. Bu amaçla ilk olarak Mia PaCa-2, Panc1, s2vp10 ve BxPC-3 hücrelerinden elde edilen mRNA lizatları kullanılarak cDNA sentezlendi ve gerçek zamanlı PCR ile analiz edildi. Hücre hatlarında ekspresyonlar sırasıyla; Mia PaCa-2:  $1,00 \pm 0,032$ , Panc1:  $4,54 \pm 0,298$ , s2vp10:  $2,19 \pm 0,931$  ve BxPC-3:  $3,759 \pm 0,17$  şeklinde tespit edildi (Şekil - 53).



Şekil - 53: Normal büyütülmüş PDA hücrelerindeki PFKFB2 mRNA ekspresyonları. Endojen kontrol olarak  $\beta$ -aktin kullanılmıştır ve sonuçlar en düşük ekspresyon saptanmış Mia PaCa-2 hücrelerine göre relatif verilmiştir.



Sonrasında, PDA hücre hatlarında PFKFB2 protein miktarları Western blotlama ile analiz edildi. Şekil - 54'de görüldüğü gibi mRNA ekspresyonu saptanmış tüm hücre hatlarında PFKFB2 protein ekspresyonu da saptandı. Endojen PFKFB2 ekspresyonu özellikle Panc1 ve BxPC-3 hücre hatlarında yüksek olarak değerlendirildi (Şekil - 54).



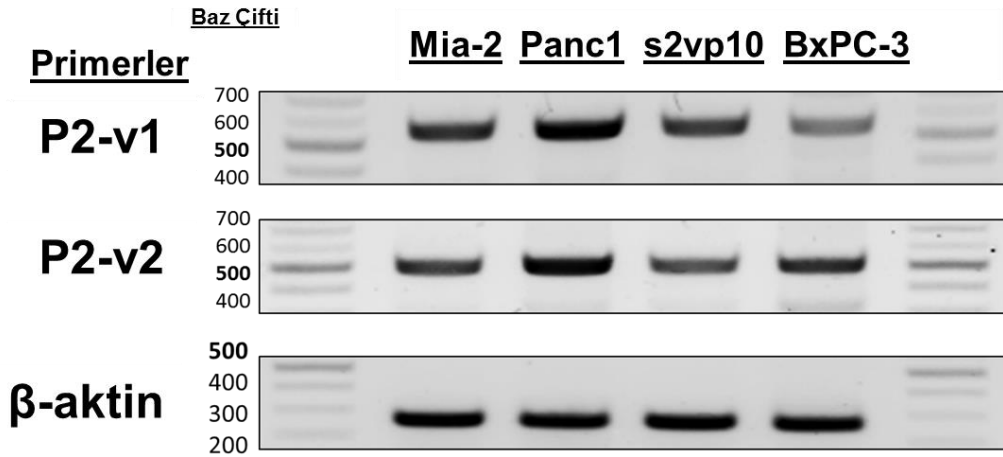
Şekil - 54: Normal büyütülmüş PDA hücrelerindeki total PFKFB2 ve PFKFB3 protein miktarları. Yükleme kontrolü olarak  $\beta$ -aktin kullanıldı ve PFKFB2 analiz edilen membrana bantların karşılaştırılabilmesi amacıyla ek olarak P2-v1 ve P2-v2 over-eksprese eden hücre protein lizatları yüklendi. u.p.s.: Uzun pozlama süresi, k.p.s.: Kısa pozlama süresi.

#### 4.5.2. PDA Hücrelerinde Her İki PFKFB2 Varyantı Eksprese Olmaktadır.

PDA hücrelerinde PFKFB2 mRNA ve protein ekspresyonu saptandıktan sonra, hücre içi PFKFB2 varyantlarının mRNA ekspresyonları PCR ve agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Normal şartlarda büyütülmüş Mia PaCa-2, Panc1, s2vp10 ve BxPC-3 hücrelerinden elde edilmiş cDNA'lar kullanılarak P2-v1 ve P2-v2 spesifik primerler ve  $\beta$ -aktin primerleri ile PCR gerçekleştirildi. %1'lik agaroz jelde elektroforez ile ayrılıp görüntülendi.

Analiz sonucunda incelenen tüm hücrelerde P2-v1 ve P2-v2 ekspresyonu saptandı. En fazla P2-v1 ve P2-v2 ekspresyonu Panc1 hücrelerinde görüldü ve özellikle BxPC-3 hücrelerinde en düşük P2-v1 ekspresyonu saptandı (Şekil - 55).

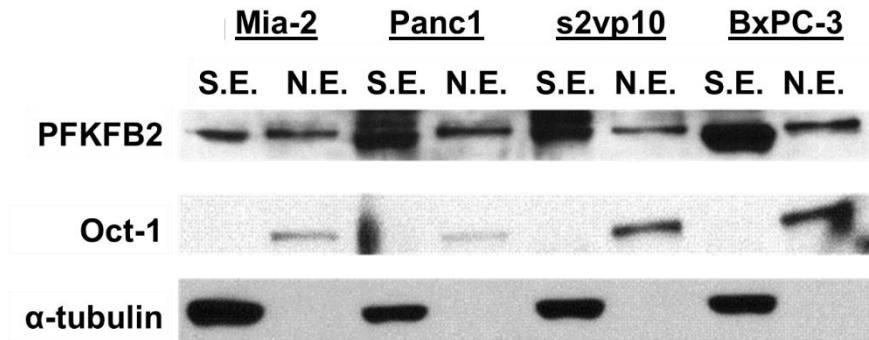




**Şekil - 55: PDA hücrelerinde P2-v1 ve P2-v2 ekspresyonları.** Hücrelerden elde edilen cDNA'lar şablon olarak kullanılarak P2-v1 ve P2-v2 primer çiftleri ile PCR uygulandı. Yükleme kontrolü olarak  $\beta$ -aktin primerleri ile yapılan PCR kullanıldı. DNA fragmentleri %1 agaroz jelde separe edildi. Markör değerleri baz çifti olarak verilmiştir.

#### 4.5.3. PDA Hücrelerinde Endojen PFKFB2 Nükleusa Lokalize Olmaktadır.

Son olarak PDA hücrelerinde endojen eksprese edilen PFKFB2'nin hücre içi lokalizasyonu incelendi. Normal koşullarda büyütülmüş hücrelerden elde edilen pelletler kullanılarak sitoplazma ve nükleus ayrılması yapıldı ve lizatlar Western blotlama ile incelendi. İncelenen tüm hücre hatlarında PFKFB2'nin nükleusa lokalizasyonu gözlemlendi (Şekil - 56).



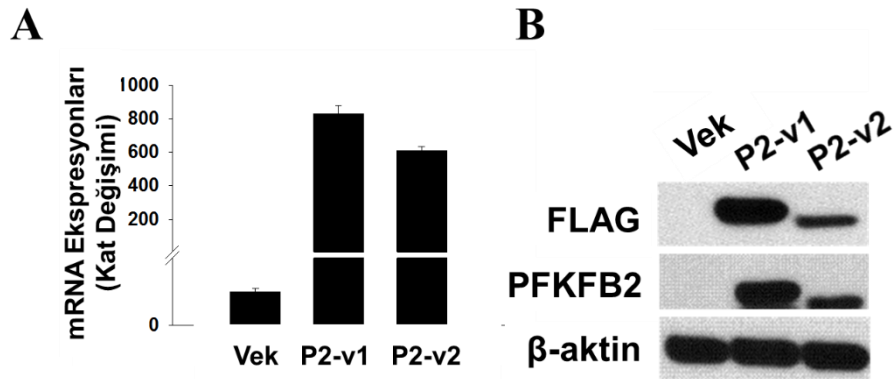
**Şekil - 56: Endojen eksprese edilen PFKFB2, PDA hücrelerinde sitoplazmanın yanısıra nükleusa da lokalize olur.** Oct-1 nükleus markörü,  $\alpha$ -tubulin sitoplazmik markör olarak kullanılmıştır. S.E.: Sitoplazmik ekstrakt, N.E.: Nükleus ekstraktı.

#### 4.6. PFKFB2 Over-ekspresyonunun PDA Hücrelerinde (Mia PaCa-2, Panc1) Glikolitik Özelliklere ve Proliferasyona Etkileri

##### 4.6.1. Mia PaCa-2 ve Panc1 Hücrelerinde PFKFB2 Varyantlarının Plazmid Aracılı Over-ekspresyonu.

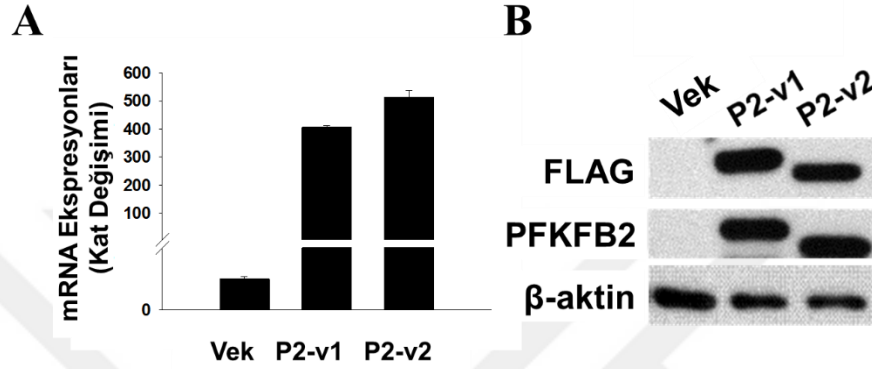
Pankreatik duktal adenokarsinom hücreleri olan Mia PaCa-2 ve Panc1 hücrelerinde PFKFB2 varyantlarının glikolitik fenotipe etkisinin çalışılması amacıyla Vektör, P2-v1 ve P2-v2 plazmidleri Mia PaCa-2 ve Panc1 hücrelerinde over-eksprese edildi. 48 saat sonra ilgili deneyler gerçekleştirildi. Deneyler yapılmadan önce over-ekspresyon doğrulaması için hücrelerden RNA ve protein lizatları elde edilerek gerçek zamanlı PCR ve Western blotlama ile over-ekspresyon doğrulandı.

Transfekte edilmiş Mia PaCa-2 hücrelerinde PFKFB2 mRNA ekspresyonları Vektör:  $1 \pm 0,08$ , P2-v1:  $829,94 \pm 48,55$  ve P2-v2:  $608,43 \pm 25,11$  olarak saptandı (Şekil - 57-A). Aynı zamanda Western blotlama yapılarak FLAG ve PFKFB2 antikoları uygulandı ve P2-v1 ve P2-v2 hücrelerinde artmış ekspresyon saptandı (Şekil - 57-B).



Şekil - 57: Mia PaCa-2 hücrelerinde PFKFB2 varyantları over-ekspresyonu. A) PFKFB2 mRNA ekspresyonları. Endojen kontrol olarak  $\beta$ -aktin kullanılmıştır ve ekspresyonlar Vektör ekspresyonununa göre relatif verilmiştir. B) PFKFB2 total protein miktarları Western blot analizi.

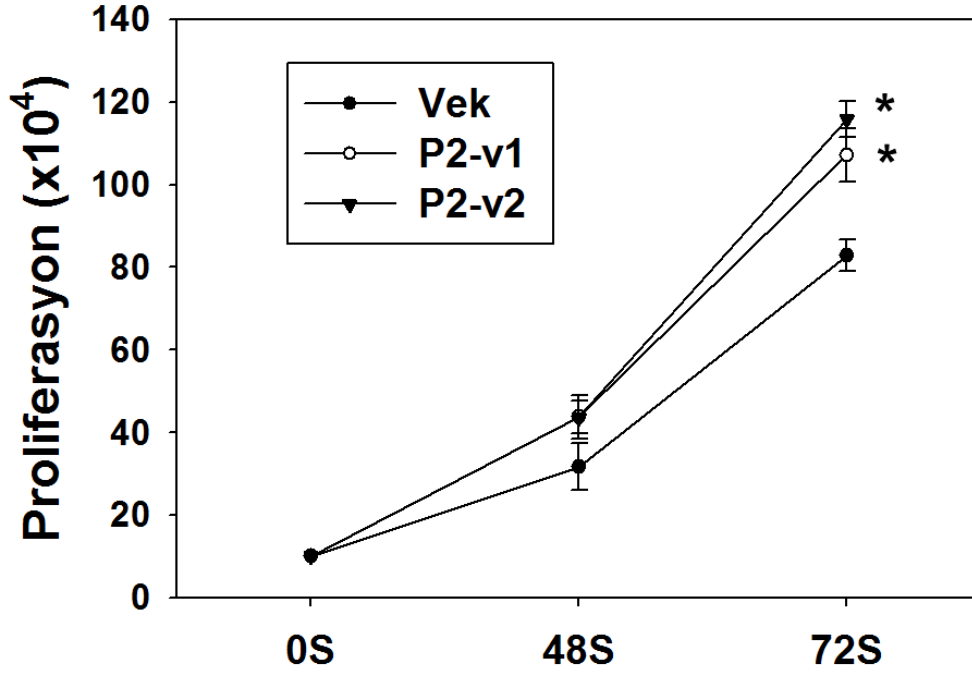
Transfekte edilmiş Panc1 hücrelerinde ise PFKFB2 mRNA ekspresyonları Vektör:  $1 \pm 0,07$ , P2-v1:  $407,00 \pm 4,17$  ve P2-v2:  $512,98 \pm 24,76$  olarak saptandı (Şekil - 58-A). Aynı zamanda Western blotlama yapılarak FLAG ve PFKFB2 antikoları uygulandı ve P2-v1 ve P2-v2 hücrelerinde artmış ekspresyon saptandı (Şekil - 58-B).



Şekil - 58: Panc-1 hücrelerinde PFKFB2 varyantları over-ekspresyonu. A) PFKFB2 mRNA ekspresyonları. Endojen kontrol olarak  $\beta$ -aktin kullanılmıştır ve ekspresyonlar Vektör ekspresyonununa göre relatif verilmiştir. B) PFKFB2 total protein miktarları Western blot analizi.

#### 4.6.2. Mia PaCa-2 Hücrelerinde PFKFB2 Varyantlarının Plazmid Aracılı Over-ekspresyonu Proliferasyonu Artırırken Panc1 Hücrelerinde Önemli Farka Yol Açmaz.

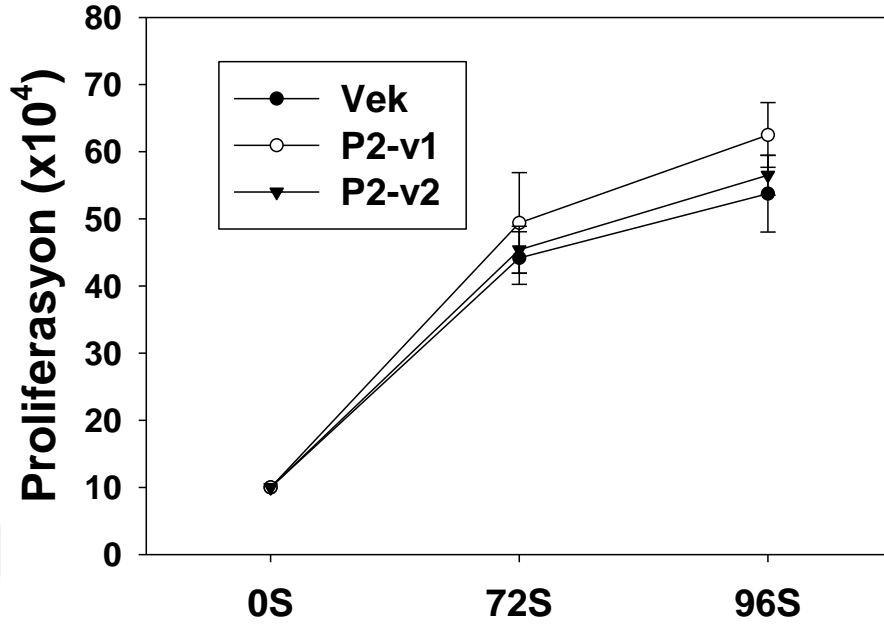
Mia PaCa-2 hücrelerinde, transfeksiyondan 24 saat sonra transfekte edilmiş hücreler tripsinize edilerek kaldırıldı ve  $10 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde sayılarak tekrar 6-kuyucuklu plakalara ekildi. 48 saat ve 72 saat sonra hücreler tekrar tripsinize edilerek hemasitometrik olarak sayılarak hücre proliferasyonları incelendi. Mia PaCa-2 hücre proliferasyonları sırası ile 48 saat sonra Vek:  $31,66 \pm 5,60 \times 10^4$  hücre/kuyucuk, P2-v1:  $43,75 \pm 5,17 \times 10^4$  hücre/kuyucuk ( $p=0,022 < 0,05$ ) ve P2-v2:  $43,65 \pm 4,00$  ( $p=0,084 > 0,05$ ) olarak; 72 saat sonra ise Vek:  $82,9 \pm 3,80 \times 10^4$  hücre/kuyucuk, P2-v1:  $107,15 \pm 6,42 \times 10^4$  hücre/kuyucuk ( $p=0,037 < 0,05$ ) ve P2-v2  $115,75 \pm 4,29 \times 10^4$  hücre/kuyucuk ( $p=0,009 < 0,05$ ) olarak belirlendi. Vektör ile karşılaştırıldığında her iki PFKFB2 varyantının Mia PaCa-2 hücrelerinin proliferasyonunu anlamlı şekilde artırdığı görüldü (Şekil - 59).



Şekil - 59: Mia PaCa-2 hücrelerinde P2-v1 ve P2-v2 transient over-ekspresyonu hücre proliferasyonunu artırır. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir.

Panc1 hücrelerinde de aynı transfeksiyon ve hücre ekim yöntemi kullanıldı. Fakat Panc1 hücreleri Mia PaCa-2 hücrelerine göre daha yavaş proliferere olduklarından, hücre proliferasyonları 72 saat ve 96 saat sonra incelendi.

Panc1 hücre proliferasyonları sırası ile 72 saat sonra Vek:  $44,16 \pm 3,90 \times 10^4$  hücre/kuyucuk, P2-v1:  $49,4 \pm 7,48 \times 10^4$  hücre/kuyucuk ( $p=0,38 > 0,05$ ) ve P2-v2:  $45,4 \pm 3,59 \times 10^4$  hücre/kuyucuk ( $p=0,19 > 0,05$ ) olarak; 96 saat sonra ise Vek:  $53,75 \pm 5,7 \times 10^4$  hücre/kuyucuk, P2-v1:  $62,5 \pm 4,82 \times 10^4$  hücre/kuyucuk ( $p=0,06 > 0,05$ ) ve P2-v2  $56,5 \pm 2,97 \times 10^4$  hücre/kuyucuk ( $p=0,49 > 0,05$ ) olarak belirlendi. Vektör ile karşılaştırıldığında PFKFB2 varyantları over-ekspresyonunun Panc1 hücrelerinin proliferasyonunu anlamlı şekilde etkilemediği görüldü (Şekil - 60).



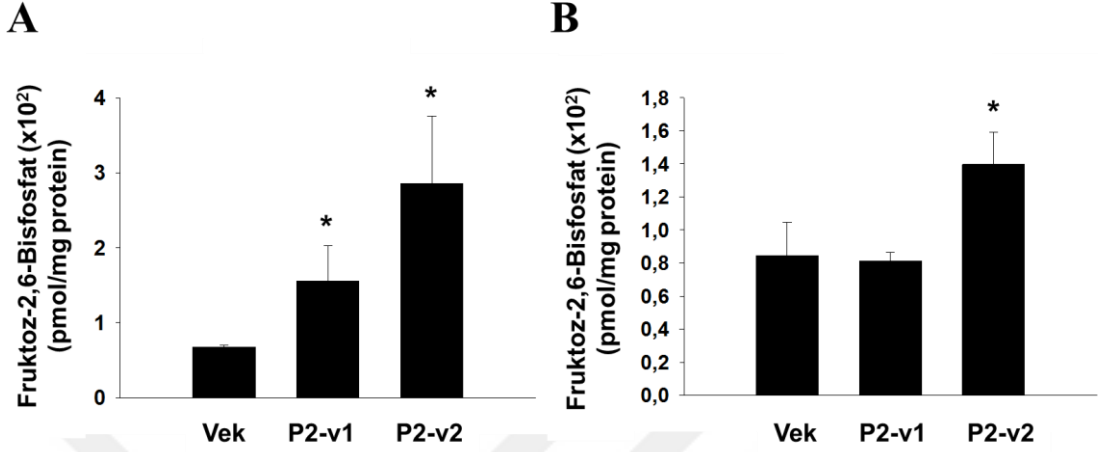
Şekil - 60: Panc1 hücrelerinde PFKFB2 varyantlarının transient over-ekspresyonu proliferasyonu anlamlı oranda etkilemez.

#### 4.6.3. PDA Hücrelerinde (Mia PaCa-2 ve Panc1) PFKFB2 Varyantları Over-ekspresyonu Fru-2,6-BP Konsantrasyonunu Artırır.

Mia PaCa-2 ve Panc1 hücrelerinin Vektör, P2-v1 ve P2-v2 ile transfeksiyonundan sonra hücre içi Fru-2,6-BP konsantrasyonları ölçüldü. Bu amaçla transfeksiyonlardan 48 saat sonra hücre pelletleri toplandı ve elde edilen pelletler -80 °C derin dondurucuda saklandı. Analiz zamanında çözündürülerek uygun lizatlar hazırlandı ve Fru-2,6-BP analizi gerçekleştirildi (Başlık 3.10). Sonuçlar hücre protein konsantrasyonlarına normalize edildi ve pmol/mg protein olarak verildi.

Mia PaCa-2 hücreleri için sonuçlar; Vek:  $67 \pm 2$  pmol/mg protein, P2-v1:  $155 \pm 46$  pmol/mg protein ( $p=0,023 < 0,05$ ) ve P2-v2:  $285 \pm 90$  pmol/mg protein ( $p=0,022 < 0,05$ ) olarak belirlendi (Şekil - 61-A). Panc1 hücrelerinde ise sonuçlar; Vek:  $84 \pm 20$  pmol/mg protein, P2-v1:  $81 \pm 5$  pmol/mg protein ( $p=0,6 > 0,05$ ) ve P2-v2:  $139 \pm 19$  pmol/mg protein ( $p=0,009 < 0,05$ ) olarak belirlendi (Şekil - 61-B). Sonuçlara göre, Mia PaCa-2 hücrelerinde her iki varyantın over-ekspresyonu Fru-

2,6-BP miktarını artırmışken, Panc1 hücrelerinde yalnızca P2-v2 over-ekspresyonu Fru-2,6-BP miktarını artırmaktadır.

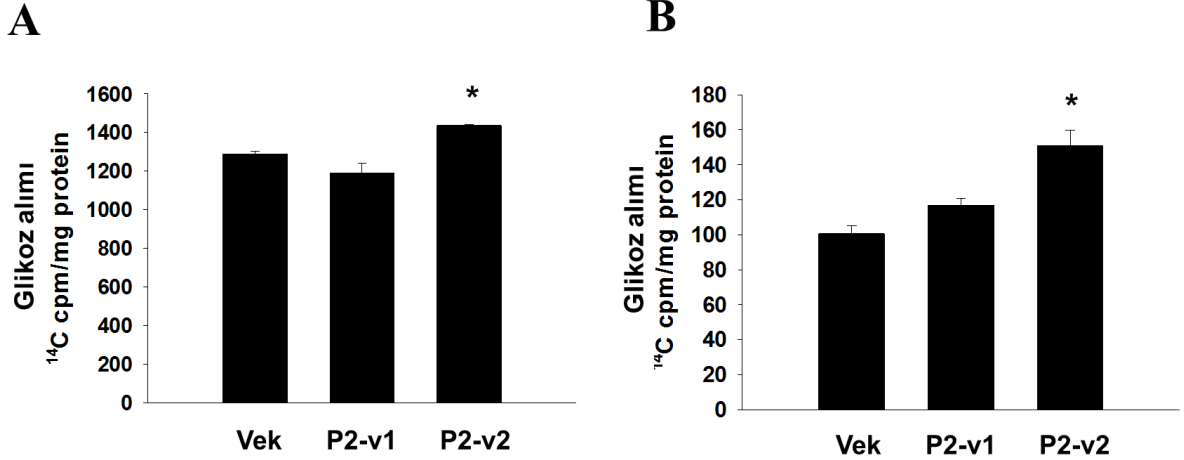


Şekil - 61: Mia PaCa-2 hücrelerinde P2-v1 ve P2-v2 Fru-2,6-BP konsantrasyonunu artırırken, Panc1 hücrelerinde yalnız P2-v2 over-ekspresyonu hücre içi Fru-2,6-BP konsantrasyonunu artırır. Ölçülen Fru-2,6-BP değerleri hücrelerin protein konsantrasyonlarına normalize edilerek pmol/mg protein olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir. A) Vek, P2-v1 ve P2-v2 ile transfekte edilmiş Mia PaCa-2 hücrelerinin Fru-2,6-BP seviyeleri. B) Vek, P2-v1 ve P2-v2 ile transfekte edilmiş Panc1 hücrelerinin Fru-2,6-BP seviyeleri.

#### 4.6.4. PDA Hücrelerinde (Mia PaCa-2 ve Panc1) P2-v2 Over-ekspresyonu Glikoz Alımını Artırır.

Sonrasında Mia PaCa-2 ve Panc1 hücrelerinde P2-v1 ve P2-v2 over-ekspresyonlarının glikoz alımına etkisi değerlendirildi. Transfekte edilmiş hücrelerde 48 saat sonra glikoz alımı deneyi gerçekleştirildi. Sonuçlar protein miktarlarına normalize edildi ve cpm/mg protein olarak verildi.

Mia PaCa-2 hücreleri için glikoz alım sonuçları; Vek:  $1287,82 \pm 13,75$  cpm/mg protein, P2-v1:  $1188,44 \pm 53,46$  cpm/mg protein ( $p=0,3 > 0,05$ ) ve P2-v2:  $1436,27 \pm 4,21$  cpm/mg protein ( $p=0,041 < 0,05$ ) olarak belirlendi (Şekil - 62-A). Panc1 hücrelerinde ise sonuçlar; Vek:  $100,49 \pm 4,71$  cpm/mg protein, P2-v1:  $116,75 \pm 4,00$  cpm/mg protein ( $p=0,12 > 0,05$ ) ve P2-v2:  $151,09 \pm 8,68$  cpm/mg protein ( $p=0,026 < 0,05$ ) olarak belirlendi (Şekil - 62-B). Sonuçlara göre, özellikle P2-v2'nin glikoz alımını her iki hücrede anlamlı şekilde artırdığı görüldü.

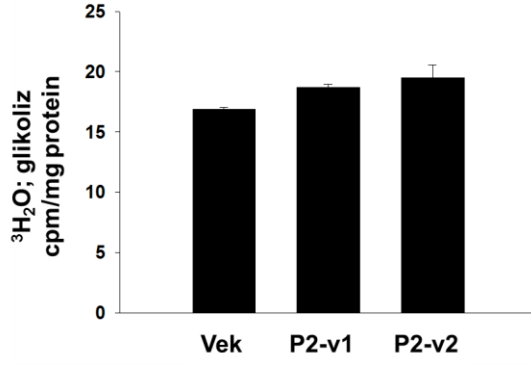
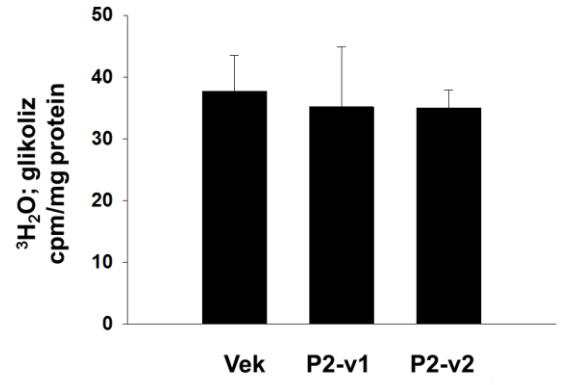


Şekil - 62: P2-v1 over-ekspresyonu Mia PaCa-2 ve Panc1 hücrelerinde glikoz alımını ciddi oranda etkilemezken, P2-v2 over-ekspresyonu her iki hücrede glikoz alımını artırır. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir. A) Mia PaCa-2 hücrelerinin glikoz alımı. B) Panc1 hücrelerinin glikoz alımı.

#### 4.6.5. PDA Hücrelerinde (Mia PaCa-2 ve Panc1) PFKFB2 Varyantları Over-ekspresyonunun Glikoliz Üzerine Önemli Etkisi Yoktur.

Son olarak geçici transfekte edilmiş Mia PaCa-2 ve Panc1 hücrelerinde P2-v1 ve P2-v2 over-ekspresyonlarının glikolize etkisi değerlendirildi. Transfekte edilmiş hücrelerde 48 saat sonra glikoliz deneyi gerçekleştirildi. Sonuçlar protein miktarlarına normalize edildi ve cpm/mg protein olarak verildi.

Mia PaCa-2 hücreleri için glikoliz sonuçları; Vek:  $16,88 \pm 0,14$  cpm/mg protein, P2-v1:  $18,7 \pm 0,26$  cpm/mg protein ( $p=0,051 > 0,05$ ) ve P2-v2:  $19,48 \pm 1,09$  cpm/mg protein ( $p=0,22 > 0,05$ ) olarak belirlendi (Şekil - 63-A). Panc1 hücrelerinde ise sonuçlar; Vek:  $37,68 \pm 5,76$  cpm/mg protein, P2-v1:  $35,12 \pm 9,68$  cpm/mg protein ( $p=0,63 > 0,05$ ) ve P2-v2:  $34,96 \pm 2,85$  cpm/mg protein ( $p=0,52 > 0,05$ ) olarak belirlendi (Şekil - 63-B). Sonuçlara göre, PFKFB2 varyantlarının glikoliz üzerine önemli bir etkisi saptanmadı.

**A****B**

Şekil - 63: PFKFB2 over-ekspresyonu Mia PaCa-2 ve Panc1 hücrelerinde glikolizi ciddi oranda etkilemez. A) Mia PaCa-2 hücrelerinin glikoliz değerleri. B) Panc1 hücrelerinin glikoliz değerleri.



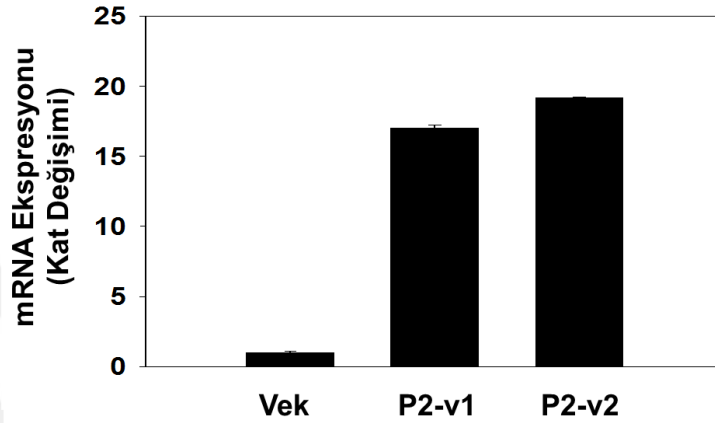
## **4.7. PFKFB2 Stabil Ekspresyonunun Mia PaCa-2 Hücrelerinde Onkojenik Özelliklere Etkileri**

### **4.7.1. PFKFB2 Varyantlarının Mia PaCa-2 Hücrelerinde Stabil Over-ekspresyonu.**

PFKFB2 varyantlarının PDA hücrelerinde onkojenik etkisinin çalışılması amacı ile stabil PFKFB2 varyantları over-eksprese eden hücreler kullanılması planlandı ve kullanılacak PDA hücre hattı olarak Mia PaCa-2 seçildi (İncelenen PDA hücre hatları arasında en düşük PFKFB2 ekspresyonu Mia PaCa-2’de saptandı. (Başlık 4.5.1)).

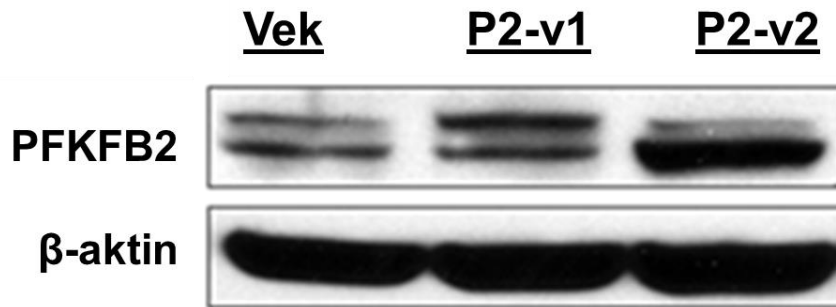
Mia PaCa-2 hücrelerinde PFKFB2’nin onkojenik özelliklere etkisinin çalışılması amacı ile, P2-v1 ve P2-v2 kodlayan plazmidler (Bölüm 3.14.2’de elde edilmiş P2-v1-BSD ve P2-v2-BSD plazmidleri) transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra blastisidin ile seleksiyona başlandı ve bir hafta süreyle seleksiyon uygulandı (Bölüm 3.8.1.2.). Elde edilen hücreler 96 kuyucuklu plakalarda büyütüldü ve büyüyen koloniler 24 kuyucuklu plakalara aktarıldı. Ekspresyon kontrolü gerçekleştirildi ve PFKFB2 ekspresyonu yüksek koloniler seçilerek 6 kuyucuklu plakalarda büyütüldü (İlk kontrol gösterilmemiştir.) Sonrasında en yüksek ekspresyona sahip P2-v1 ve P2-v2 klonları tekrar büyütülerek ikinci kez ekspresyon kontrolleri gerçekleştirildi. Bu amaçla ilk olarak hücre gruplarından RNA saflaştırıldı ve cDNA sentezlenerek gerçek zamanlı PCR ile PFKFB2 ekspresyonları analiz edildi. Elde edilen hücreler Mia-Vek, Mia-P2-v1 ve Mia-P2-v2 klonları olarak adlandırıldı ve ileri deneyler gerçekleştirildi.

PFKFB2 mRNA ekspresyonları sırası ile: Vek:  $1 \pm 0,4$ , P2-v1:  $15,16 \pm 0,86$  ve P2-v2:  $17,85 \pm 0,03$  olarak tespit edildi (Şekil - 64). Endojen kontrol olarak  $\beta$ -aktin kullanılmıştır ve sonuçlar Vektör'deki PFKFB2 ekspresyonuna relatif verilmiştir.



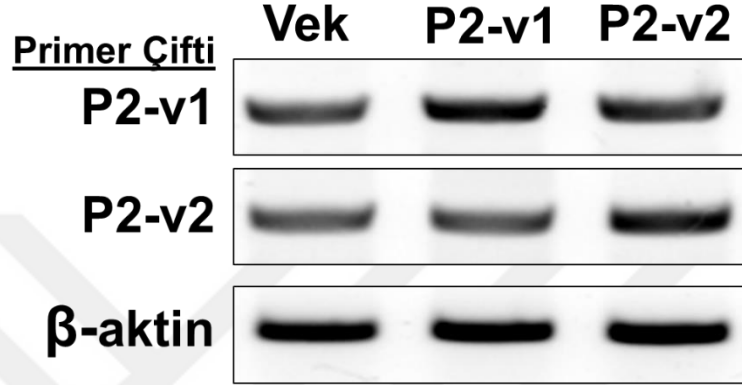
Şekil - 64: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil eksprese eden Mia PaCa-2 hücrelerinin PFKFB2 mRNA ekspresyonları. Endojen kontrol olarak  $\beta$ -aktin kullanılmıştır ve ekspresyonlar Vektör eksprese eden Mia PaCa-2 hücrelere göre relatif olarak verilmiştir.

Benzer şekilde hücrelerden elde edilen pelletlerden protein lizatları hazırlanarak Western blotlama yapıldı. P2-v1 ve P2-v2 over-eksprese eden hücrelerde Vektör'e göre PFKFB2 bant yoğunluğu artışı saptandı (Şekil - 65).



Şekil - 65: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil over-eksprese eden Mia PaCa-2 hücrelerinin Western blotlama görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

Son olarak stabil transfekte Mia PaCa-2 hücrelerinden elde edilen cDNA'lar kullanılarak PCR ile varyant ekspresyonları incelendi. Agaroz jel görüntülemesi sonucunda, P2-v1 over-eksprese eden hücrelerde P2-v1 bant yoğunluğu artışı ve P2-v2 over-eksprese eden hücrelerde P2-v2 bant yoğunluğu artışı görülerek, ekspresyonların varyantlara özgün olduğu doğrulandı (Şekil - 66).



Şekil - 66: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil over-eksprese eden Mia PaCa-2 hücrelerinin PFKFB2 varyant spesifik primerler ile PCR sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü. Yükleme kontrolü olarak β-aktin primerleri ile yapılan PCR kullanıldı. DNA fragmentleri %1 agaroz jelde ayrıştırıldı.

#### 4.7.2. PFKFB2 Varyantlarının Stabil Over-ekspresyonu Mia PaCa-2 Hücrelerinin Proliferasyonunu Artırır.

Elde edilen Mia-Vek, Mia-P2-v1 ve Mia-P2-v2 hücreleri ile ilk olarak hücre proliferasyonları değerlendirildi. Hücreler 6 kuyucuklu plakalara  $200 \times 10^3$  hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi ve 4 gün (96 saat) süreyle proliferasyonları izlendi. Her gün ilgili hücreler tripsinize edilerek hemasitometrik olarak sayıldı.

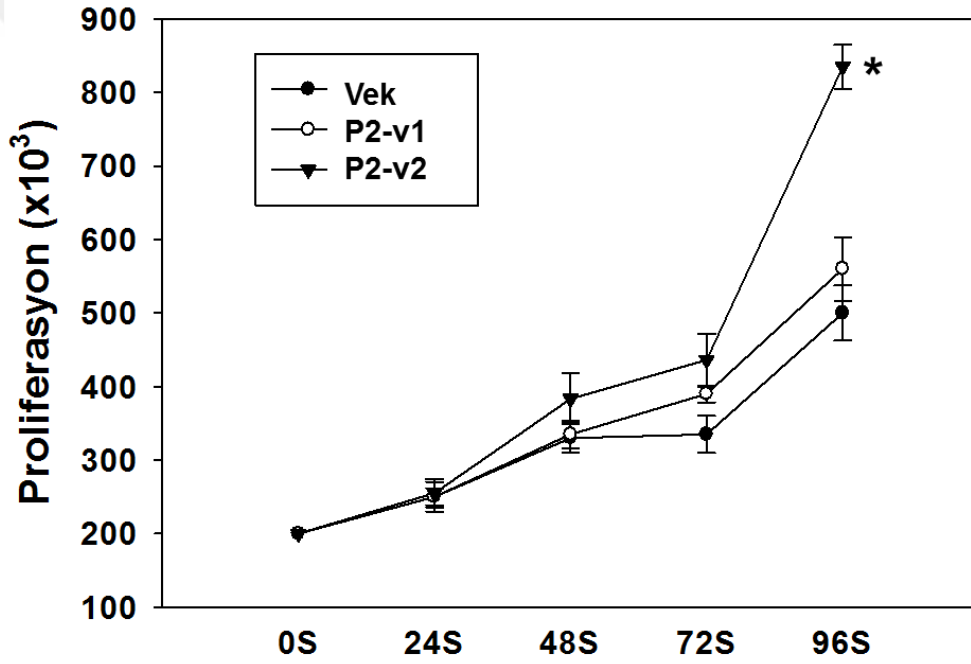
Proliferasyonlar değerlendirildiğinde, 24 saat için; Vek:  $250 \pm 11,54 \times 10^3$  hücre/kuyucuk, P2-v1:  $250 \pm 20 \times 10^3$  hücre/kuyucuk ( $p=1>0,05$ ) ve P2-v2:  $255 \pm 19,14 \times 10^3$  hücre/kuyucuk ( $p=0,62>0,05$ ) olarak saptandı.

48 saat için; Vek:  $330 \pm 20 \times 10^3$  hücre/kuyucuk, P2-v1:  $335 \pm 19,14 \times 10^3$  hücre/kuyucuk ( $p=0,10>0,05$ ) ve P2-v2:  $383 \pm 34,44 \times 10^3$  hücre/kuyucuk ( $p=0,16>0,05$ ) olarak saptandı.

72 saat için; Vek:  $335 \pm 25,16 \times 10^3$  hücre/kuyucuk, P2-v1:  $390 \pm 11,55 \times 10^3$  hücre/kuyucuk ( $p=0,15 > 0,05$ ) ve P2-v2:  $436 \pm 35,77 \times 10^3$  hücre/kuyucuk ( $p=0,06 > 0,05$ ) olarak saptandı.

Son olarak 96 saat için; Vek:  $500 \pm 37,41 \times 10^3$  hücre/kuyucuk, P2-v1:  $560 \pm 43,20 \times 10^3$  hücre/kuyucuk ( $p=0,06 > 0,05$ ) ve P2-v2:  $835 \pm 30 \times 10^3$  hücre/kuyucuk ( $p=0,014 < 0,05$ ) olarak saptandı (Şekil - 67).

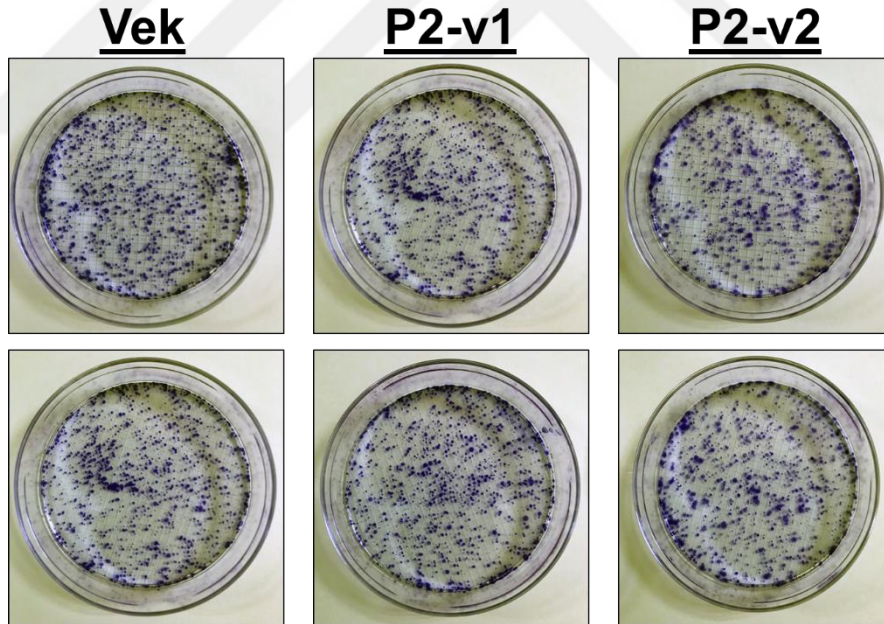
Sonuçlara göre Vektör'e göre istatistiksel anlamlı farklılık yalnızca 96. saat yapılan sayımda P2-v2 stabil over-eksprese eden hücrelerde saptandı.



Şekil - 67: P2-v2 stabil over-ekspresyonu, Mia PaCa-2 hücrelerinin proliferasyonunu ciddi oranda artırır. Stabil PFKFB2 varyantları ekspresyonu Mia PaCa-2 hücrelerinin proliferasyonunu artırmaktadır. P2-v2, P2-v1'e oranla proliferasyonu daha fazla artırır. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir.

#### 4.7.3. PFKFB2 Varyantlarının Stabil Over-Ekspresyonu Mia PaCa-2 Hücrelerinin Koloni Formasyonunu Etkilemez Fakat P2-v2 Ekspresyonu Yaygın Üreme Sağlar.

Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil eksprese eden Mia PaCa-2 hücreleri ile koloni formasyon analizi gerçekleştirildi. Hücrelerin ekilmesinden bir hafta sonra hücrelerin makroskobik ve mikroskobik görüntüleri kaydedildi ve incelendi. P2-v1 eksprese eden hücrelerde makroskobik veya mikroskobik olarak vektöre göre önemli bir farklılık gözlenmedi (Şekil - 68). Yanısıra, P2-v2 eksprese eden hücrelerde makroskobik incelemede Vektör'e göre farklılık gözlenmezken, mikroskobik olarak incelendiğinde ise, koloni oluşumunun yanısıra, hücrelerin yaygın şekilde, bölünürken birbirinden oldukça uzaklaşarak üreklere görüldü (Şekil - 69).

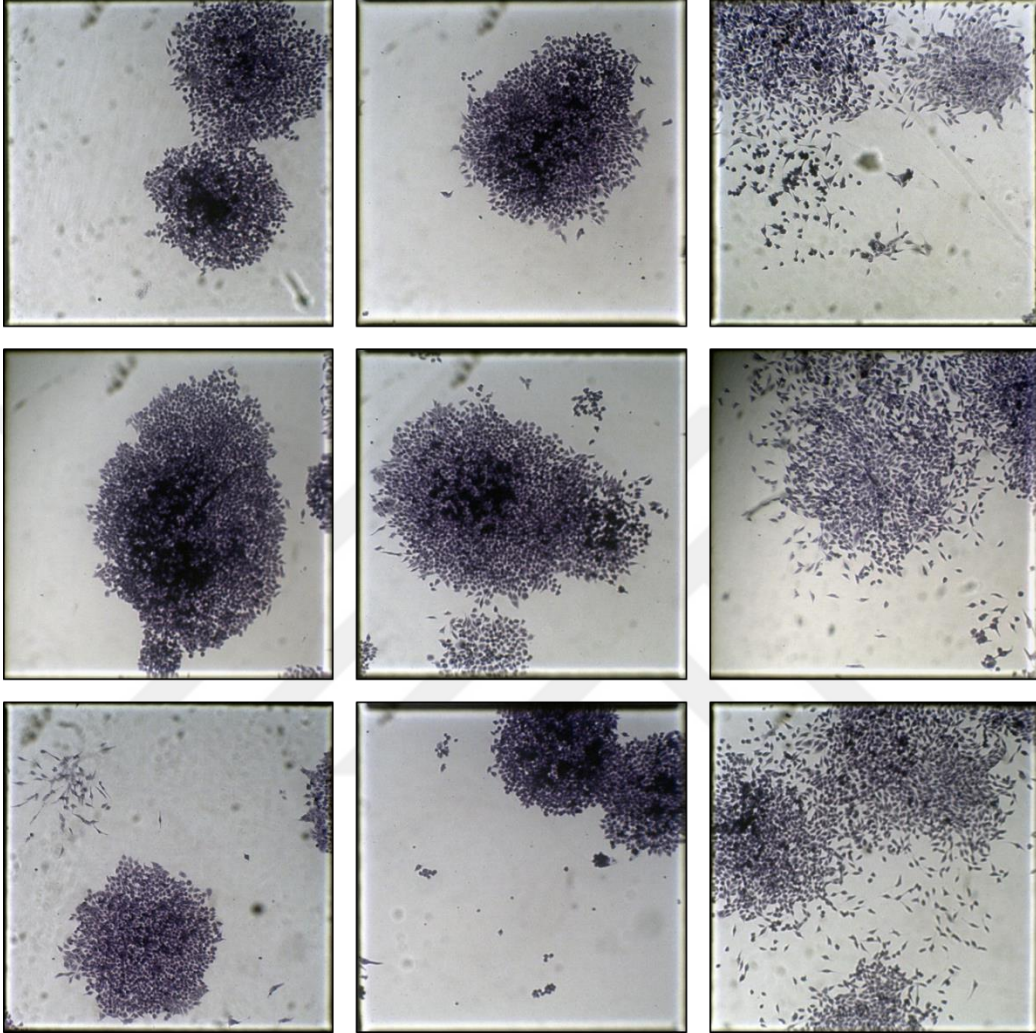


Şekil - 68: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil over-eksprese eden Mia PaCa-2 hücrelerinin makroskobik koloni formasyon analizi sonucu.

**Vek**

**P2-v1**

**P2-v2**

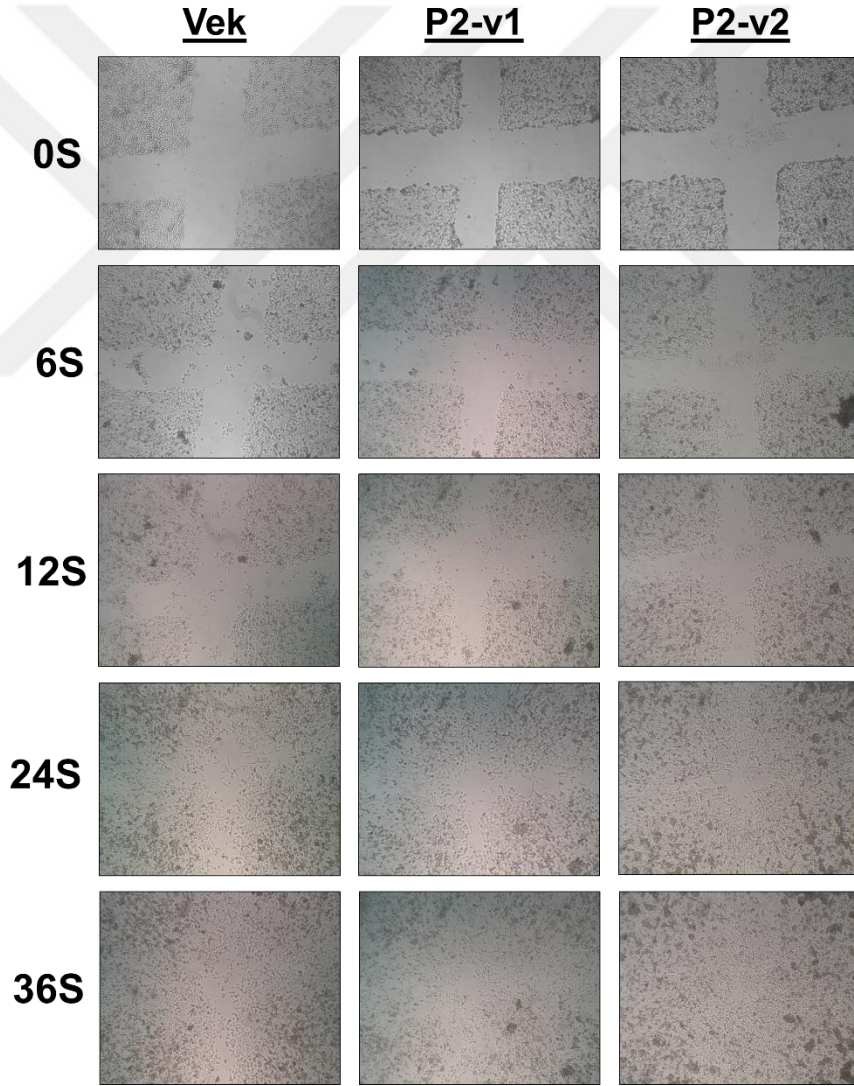


**Şekil - 69: P2-v2 stabil over-ekspresyonu Mia PaCa-2 hücrelerinde daha yaygın üreme sağlar. Koloni formasyonu analizi sonucunda mikroskobik görüntüler 10x büyütmede kaydedilmiştir.**



#### 4.7.4. Mia PaCa-2 Hücrelerinde P2-v2 Stabil Over-ekspresyonu Migrasyonu Artırır.

P2-v2 stabil over-ekspresyonunun Mia PaCa-2 hücrelerinde Vektör ve P2-v1 stabil over-ekspresyonuna göre daha yaygın üreme sağlaması gözlemlenince, P2-v2'nin hücre migrasyonunu artırmış olabileceğinden şüphelenilerek hücreler ile yara iyileşmesi deneyi yapıldı (Başlık 3.9.4.). Yara oluşturduktan 6, 12, 24 ve 36 saat sonra 10x büyütmede mikroskopik görüntüler kaydedildi. Sonuçlar incelendiğinde, P2-v2 stabil eksprese eden hücrelerin Vektör ve P2-v1'e göre oluşturulan yarayı daha hızlı kapattığı görüldü.

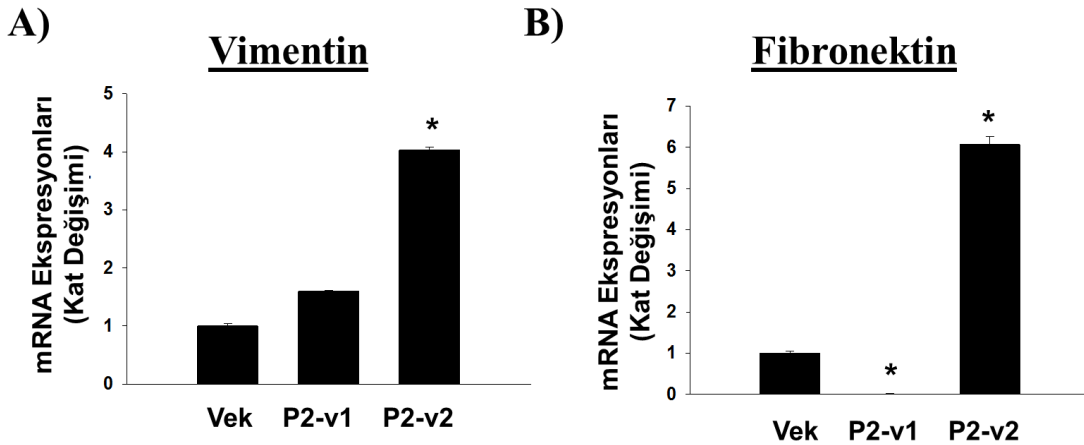


Şekil - 70: P2-v2 over-ekspresyonu Mia PaCa-2 hücrelerinde migrasyon yeteneğini artırır. Mikroskopik görüntüler 10x büyütmede ışık mikroskopunda kaydedilmiştir.

#### 4.7.5. Mia PaCa-2 Hücrelerinde PFKFB2 Varyant-2 Stabil Over-ekspresyonu Vimentin ve Fibronektin mRNA Ekspresyonlarını Artırır.

P2-v2 over ekspresyonunun Mia PaCa-2 hücrelerinde (i) koloni formasyon deneyinde yaygın üreme göstermesi ve (ii) yara iyileşmesi deneyinde yarası daha hızlı kapatması, migrasyon yeteneğinin arttığını düşündürmektedir. Migrasyon artışı, bazı hücre yüzey protein ekspresyonlarında değişim ile gerçekleşir. Bu sebeple stabil PFKFB2 varyantları eksprese eden Mia PaCa-2 hücrelerinden elde edilen cDNA'lar ile gerçek zamanlı PCR analizi gerçekleştirildi ve hücreler Vimentin ve Fibronektin ekspresyonu açısından analiz edildi. Vimentin ekspresyonları: Vek:  $1,00 \pm 0,04$ , P2-v1:  $1,59 \pm 0,02$  ( $p=0,016>0,05$ ) ve P2-v2:  $4,02 \pm 0,05$  ( $p=0,0006<0,001$ ) olarak belirlendi (Şekil - 71-A). Fibronektin ekspresyonları: Vek:  $1,00 \pm 0,04$ , P2-v1:  $0,04 \pm 0,02$  ( $p=0,008<0,05$ ), P2-v2:  $6,06 \pm 0,18$  ( $p=0,017<0,05$ ) olarak belirlendi (Şekil - 71-B).

Sonuçlara göre P2-v2 stabil over-ekspresyonu Mia PaCa-2 hücrelerinde Vimentin ve Fibronektin ekspresyonlarını artırmıştır. İlginç bir şekilde P2-v1 over-eksprese eden Mia PaCa-2 hücrelerinde ise Fibronektin ekspresyonu ciddi şekilde azalmıştır.



Şekil - 71: P2-v2 stabil over-ekspresyonu Mia PaCa-2 hücrelerinde Vimentin ve Fibronektin mRNA ekspresyonlarını artırır. Endojen kontrol olarak  $\beta$ -aktin kullanılmıştır ve sonuçlar Vektör'deki ekspresyonlara göre relatif olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir. A) Vimentin mRNA ekspresyonu. B) Fibronektin mRNA ekspresyonu.



#### **4.8. PFKFB2 Baskılanmasının PDA Hücrelerinde (Panc1 ve BxPC-3) Glikolitik ve Onkojenik Özelliklere Etkileri**

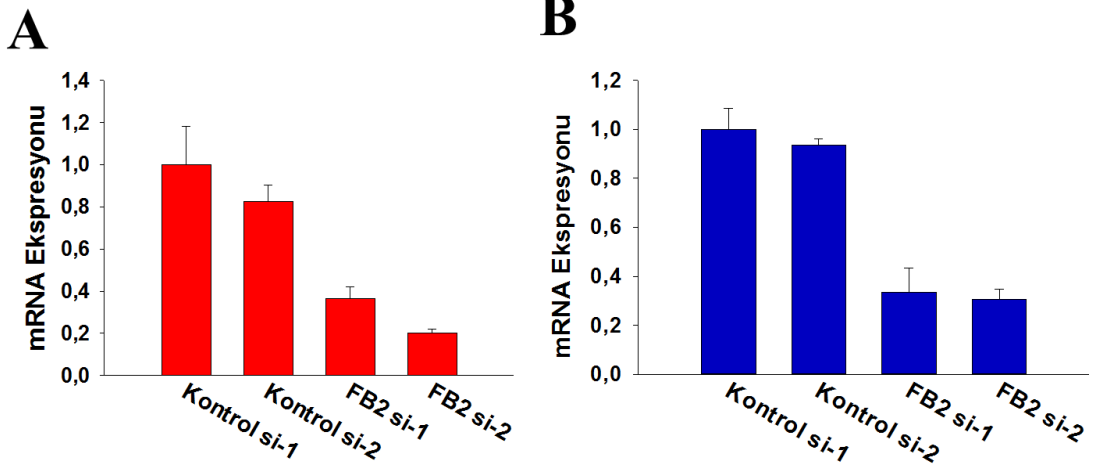
##### **4.8.1. PFKFB2'nin Panc1 ve BxPC-3 Hücrelerinde siRNA Aracılı Baskılanması**

Endojen PFKFB2'nin PDA hücrelerinde etkilerinin anlaşılması amacıyla, siRNA aracılı baskılama deneyleri için Panc1 ve BxPC-3 hücrelerinin kullanımına karar verildi (Bu hücreler, endojen PFKFB2 ekspresyonları yüksek olarak tespit edilmişlerdir (Başlık 4.5.1.)). Hücreler siRNA'lar ile transfekte edildi ve deneyler transfeksiyondan 72 saat sonra gerçekleştirildi (Başlık 3.8.2.). İlk olarak baskılama başarısının ölçümü için kontrol siRNA'lar ve PFKFB2 siRNA'lar ile transfekte edilmiş hücrelerden RNA izole edildi ve cDNA sentezlenerek gerçek zamanlı PCR analizi ile PFKFB2 mRNA ekspresyonları kontrol edildi.

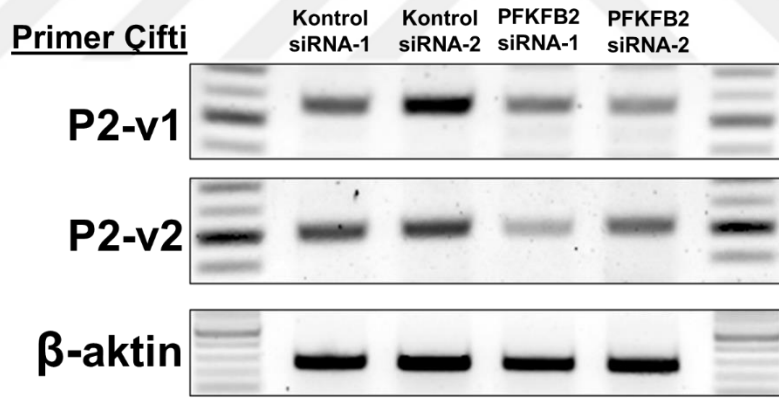
Panc1 hücrelerinde PFKFB2 mRNA ekspresyonları Kontrol si1:  $1,00 \pm 0,18$ , Kontrol si2:  $0,82 \pm 0,08$ , FB2 si1:  $0,36 \pm 0,05$  ve FB2 si2:  $0,20 \pm 0,01$  olarak belirlendi (Şekil - 72-A). BxPC-3 hücrelerinde mRNA ekspresyonları Kontrol si1:  $1,00 \pm 0,08$ , Kontrol si2:  $0,93 \pm 0,02$ , FB2 si1:  $0,33 \pm 0,09$  ve FB2 si2:  $0,30 \pm 0,04$  olarak belirlendi (Şekil - 72-B).

Total PFKFB2 mRNA ekspresyonundan sonra, siRNA'ların her bir varyantı baskılaması PCR ile incelendi. Bu amaçla, Panc1 hücrelerinden elde edilen cDNA'lar kullanılarak P2-v1 ve P2-v2 spesifik primerler ile PCR gerçekleştirildi. Agaroz jelde elektroforez ile ayrılıp görüntülendi. İki PFKFB2 siRNA molekülünün de her iki varyantın mRNA ekspresyonunu baskıladığı belirlendi (Şekil - 73).

siRNA molekülleri ile PFKFB2 mRNA ekspresyonu baskılanmasının başarılı olduğu görüldükten sonra fonksiyonel deneyler gerçekleştirildi.



**Şekil - 72: PFKFB2 spesifik siRNA uygulanması PFKFB2 mRNA ekspresyonunu azaltır.** mRNA ekspresyon kontrolü transfeksiyondan 3 gün sonra gerçekleştirildi ve  $\beta$ -aktin endojen kontrol olarak kullanıldı. Değerler Kontrol si-1 hücrelerinin PFKFB2 ekspresyonlarına göre relatif olarak verildi. **A)** Panc1 hücreleri. **B)** BxPC-3 hücreleri.

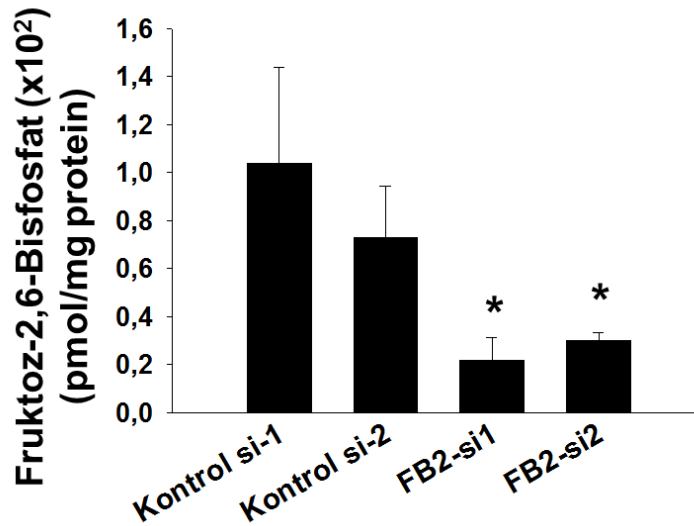


**Şekil - 73: PFKFB2 spesifik siRNA uygulaması her iki PFKFB2 transkript varyantını baskılamaktadır.** siRNA uygulanmış hücrelerden elde edilen cDNA'lar şablon olarak kullanılarak P2-v1 ve P2-v2 primer çiftleri ile PCR uygulandı. Yükleme kontrolü olarak  $\beta$ -aktin primerleri ile yapılan PCR kullanıldı. DNA fragmentleri %1 agaroz jelde separe edildi.

#### 4.8.2. Panc1 Hücrelerinde PFKFB2'nin siRNA Aracılı Baskılanması Fru-2,6-BP Konsantrasyonunu Azaltır.

siRNA moleküllerinin PFKFB2 ekspresyonunu baskılamadaki başarısı görüldükten sonra, ilk olarak Panc1 hücrelerinde PFKFB2 baskılanmasının Fru-2,6-BP konsantrasyonuna etkisi incelendi. Bu amaçla 2 kontrol ve 2 PFKFB2 siRNA molekülü ile transfekte edilen Panc1 hücrelerinden 72 saat sonra örnekler alınarak Fru-2,6-BP miktarları açısından değerlendirildi. Örnekler total proteine normalize edilerek verildi. Panc1 hücrelerinde Fru-2,6-BP miktarları Kontrol si1:  $104 \pm 39,7$  pmol/mg protein, Kontrol si2:  $73 \pm 21,6$  pmol/mg protein, FB2 si1:  $22 \pm 9,4$  pmol/mg protein ve  $30 \pm 3,4$  pmol/mg protein olarak belirlendi (Şekil - 74). İki kontrol siRNA ile iki PFKFB2 siRNA uygulanan grupların ikili istatistiklerinde p değerleri sırası ile: Kontrol si1 - FB2 si1: 0,033, Kontrol si2 - FB2 si1: 0,019, Kontrol si1 - FB2 si2: 0,09, Kontrol si2 - FB2 si2: 0,039 olarak tespit edildi ve p değerlerinin hepsinin 0,05'den küçük olduğu görüldü.

PFKFB2 mRNA ekspresyonunun siRNA aracılı baskılanmasının hücre-içi Fru-2,6-BP miktarlarının azalmasını sağladığı görüldü.

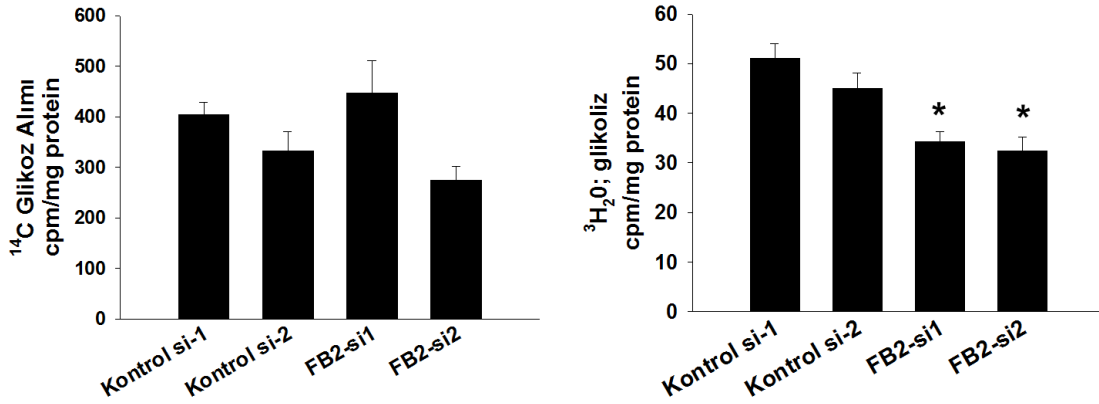


Şekil - 74: Panc1 hücrelerinde PFKFB2 mRNA ekspresyonunun siRNA aracılı baskılanması Fru-2,6-BP konsantrasyonunu azaltır. Ölçülen Fru-2,6-BP değerleri hücrelerin protein konsantrasyonlarına normalize edilerek pmol/mg protein olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir.

### 4.8.3. Panc1 Hücrelerinde PFKFB2'nin siRNA Aracılı Baskılanması Glikoz Alımını Etkilemezken Glikolizi Azaltır.

Sonrasında Panc1 hücrelerinde PFKFB2 baskılanmasının glikoliz ve glikoz alımına etkisi incelendi. Bu amaçla 2 kontrol ve 2 PFKFB2 siRNA molekülü ile transfekte edilen Panc1 hücrelerinde 72 saat sonra glikoz alımı ve glikoliz deneyleri yapıldı. Örnekler total proteine normalize edilerek cpm/mg protein olarak verildi.

Glikoz alım değerleri; Kontrol si1:  $404,5674 \pm 24,35$  cpm/mg protein, Kontrol si2:  $332,35 \pm 37,94$  cpm/mg protein, FB2 si1:  $447,11 \pm 63,28$  cpm/mg protein ( $p = 0,47$  ve  $0,13$ ) ve FB2 si2:  $273,97 \pm 28,43$  cpm/mg protein ( $p = 0,019$  ve  $0,10$ ) olarak belirlendi (Şekil - 75-A). Glikoliz değerleri ise; Kontrol si1:  $51,03 \pm 2,99$  cpm/mg protein, Kontrol si2:  $44,98 \pm 3,08$  cpm/mg protein, FB2 si1:  $34,28 \pm 2,06$  cpm/mg protein ( $p = 0,035$  ve  $0,06$ ) ve FB2 si2:  $32,41 \pm 2,80$  cpm/mg protein ( $p = 0,006$  ve  $0,01$ ) olarak belirlendi (Şekil - 75-B).

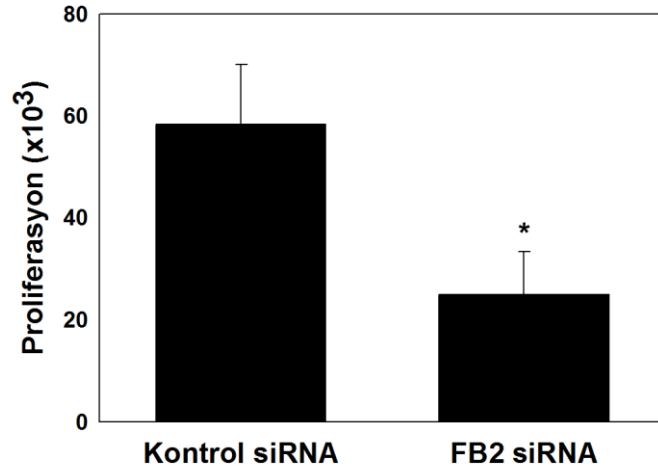


Şekil - 75: PFKFB2'nin siRNA ile baskılanması Panc1 hücrelerinde glikoz alımını etkilemezken glikolizi azaltır. Deneyler siRNA transfeksiyonundan 72 saat sonra gerçekleştirildi ve sonuçlar total proteine normalize edilerek cpm/mg protein olarak verildi. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir. A) Panc1 hücrelerinin glikoz alım değerleri. B) Panc1 hücrelerinin glikoliz değerleri.

Sonuçlara göre, glikoz alımında PFKFB2 siRNA uygulanan hücrelerde kontrol siRNA uygulanan hücelere göre anlamlı bir fark saptanmazken, PFKFB2 ekspresyonunun siRNA aracılı baskılanmasının glikolizi her iki siRNA'nın uygulanması ile anlamlı miktarda azalttığı görüldü.

#### 4.8.4. PFKFB2'nin Baskılanması Panc1 Hücrelerinde Proliferasyonu Azaltır.

PFKFB2'nin siRNA aracılı baskılanmasının Panc1 hücrelerinde proliferasyona etkisi değerlendirildi. Bu amaçla  $30 \times 10^3$  hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler 12-kuyucuklu plakalara ekilerek Kontrol siRNA'lar ve PFKFB2 siRNA'lar ile transfekte edildiler. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler tripsinize edilerek hemasitometrik olarak sayıldılar. Kontrol siRNA'ların ortalaması ve PFKFB2 siRNA'ların ortalaması hesaplanarak farklar ortaya koyuldu. Hücre sayıları Kontrol siRNA:  $58,33 \pm 11,69 \times 10^3$  ve FB2 siRNA:  $25,00 \pm 8,36 \times 10^3$  olarak ( $p=0,0033 < 0,05$ ) belirlendi (Şekil - 76). Sonuçlara göre PFKFB2 mRNA ekspresyonunun siRNA aracılı baskılanmasının Panc1 hücre proliferasyonunu azalttığı görüldü.

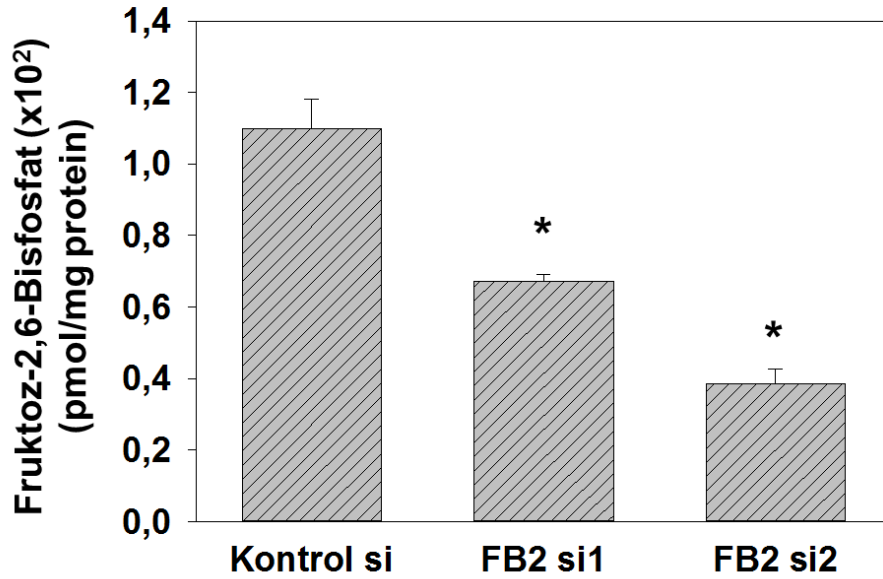


Şekil - 76: PFKFB2 ekspresyonunun siRNA aracılı baskılanması Panc1 hücrelerinde hücre proliferasyonunu azaltmaktadır. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir.

#### 4.8.5. BxPC-3 Hücrelerinde PFKFB2'nin siRNA Aracılı Baskılanması Fru-2,6-BP Konsantrasyonunu Azaltır.

Endojen PFKFB2'nin BxPC-3 hücrelerinde Fru-2,6-BP konsantrasyonuna etkisinin anlaşılması amacıyla, Kontrol si1, FB2 si1 ve FB2 si2 siRNA molekülleri ile transfekte edilen BxPC-3 hücrelerinden 72 saat sonra örnekler alınarak Fru-2,6-BP miktarları açısından değerlendirildi. Örnekler total proteine normalize edilerek verildi. BxPC-3 hücrelerinde Fru-2,6-BP miktarları Kontrol si1:  $110 \pm 8$  pmol/mg protein, FB2 si1:  $67,14 \pm 2$  pmol/mg protein ( $p=0,0011 < 0,05$ ) ve  $38,57 \pm 4$  pmol/mg protein ( $p=0,0007 < 0,001$ ) olarak belirlendi (Şekil - 77).

PFKFB2 mRNA ekspresyonunun siRNA aracılı baskılanmasının BxPC-3 hücrelerinde hücre-içi Fru-2,6-BP miktarlarının azalmasını sağladığı görüldü.

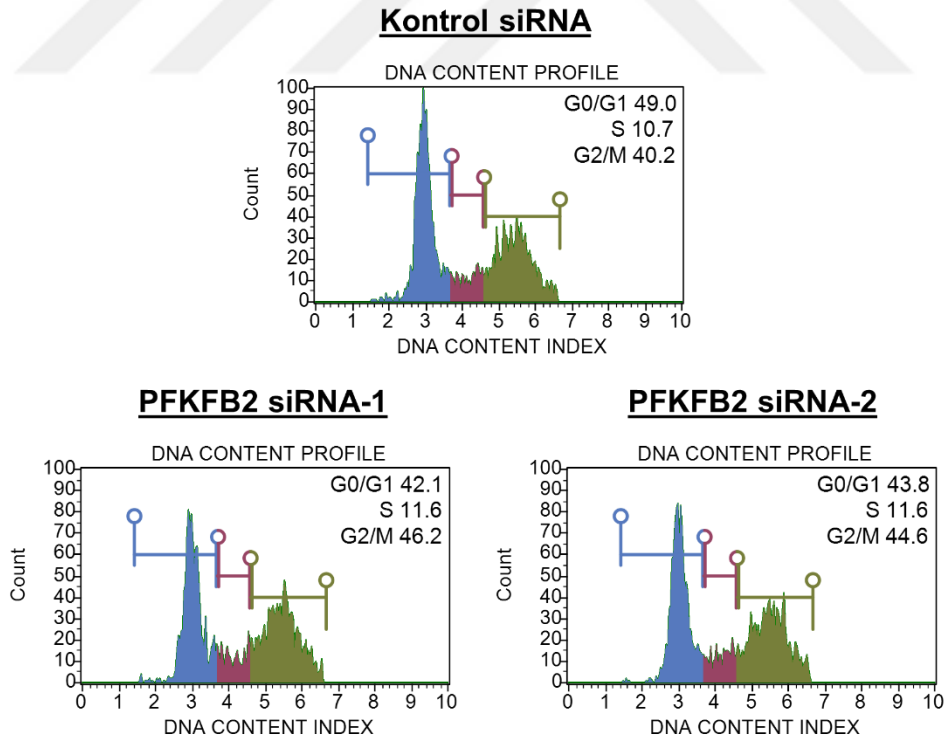


Şekil - 77: BxPC-3 hücrelerinde PFKFB2 mRNA ekspresyonunun siRNA aracılı baskılanması Fru-2,6-BP konsantrasyonunu azaltır. Ölçülen Fru-2,6-BP değerleri hücrelerin protein konsantrasyonlarına normalize edilerek pmol/mg protein olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir.

#### 4.8.6. PFKFB2'nin Baskılanması Panc1 ve BxPC-3 Hücrelerinde Hücre Siklus Fazları Dağılımını Etkilemez.

PFKFB2 baskılanmasının hücre siklusuna etkisinin çalışılması amacı ile, Kontrol siRNA, FB2 si 1 ve FB2 si2 Panc1 ve BxPC-3 hücrelerine uygulandı. 48 saat sonra hücreler kaldırılarak akış sitometride hücre siklus fazlarının dağılımı incelendi.

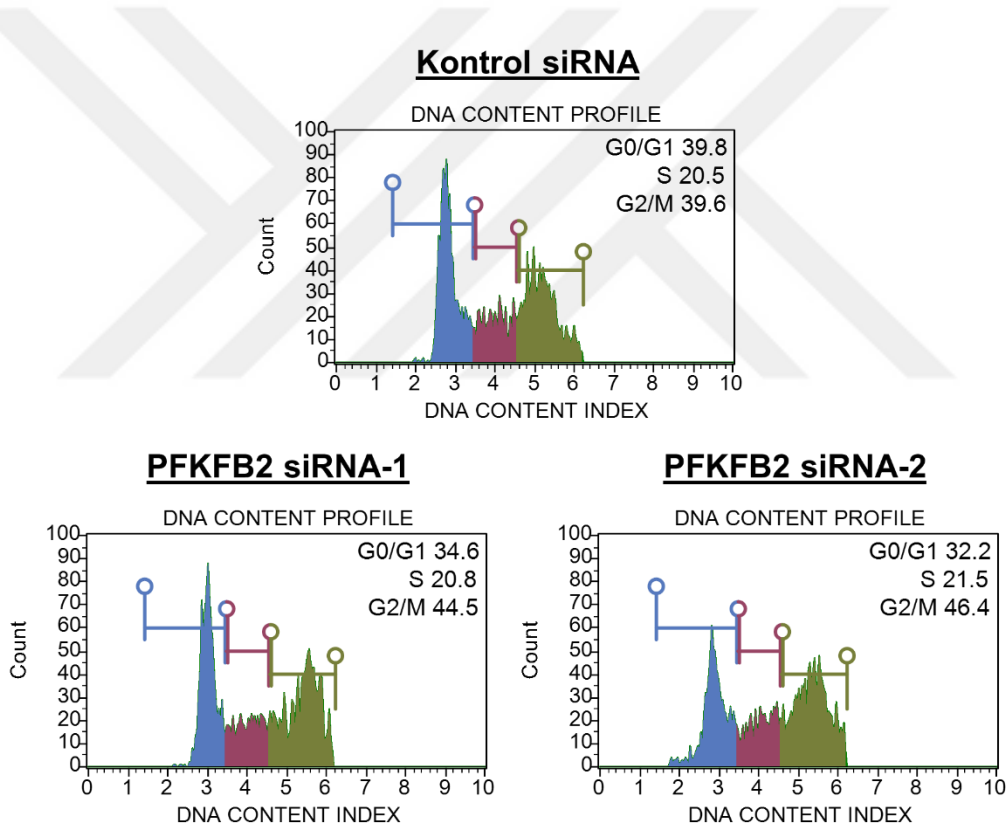
Panc1 hücreleri için; Kontrol siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde G0/G1 fazı hücre oranı % 49, S fazı hücre oranı % 10,7 ve G2/M fazı hücre oranı % 40,2 olarak; PFKFB2 siRNA 1 ile transfekte edilmiş hücrelerde G0/G1 fazı hücre oranı % 42,1, S fazı hücre oranı %11,6 ve G2/M fazı hücre oranı % 46,2 olarak ve PFKFB2 siRNA 2 ile transfekte edilmiş hücrelerde G0/G1 fazı hücre oranı % 43,8, S fazı hücre oranı % 11,6 ve G2/M fazı hücre oranı % 44,6 olarak belirlendi (Şekil - 78).



**Şekil - 78: Kontrol ve PFKFB2 siRNA'lar ile transfekte edilmiş Panc1 hücrelerinin hücre siklus dağılımları.** Grafikler MUSE analiz cihazından alınmıştır. Grafiklerin sağ üst tarafında dağılım yüzdeleri verilmiştir.

BxPC-3 hücreleri için; Kontrol siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde G0/G1 fazı hücre oranı % 39,8, S fazı hücre oranı % 20,5 ve G2/M fazı hücre oranı % 39,6 olarak; PFKFB2 siRNA 1 ile transfekte edilmiş hücrelerde G0/G1 fazı hücre oranı % 34,6, S fazı hücre oranı %20,8 ve G2/M fazı hücre oranı % 44,5 olarak ve PFKFB2 siRNA 2 ile transfekte edilmiş hücrelerde G0/G1 fazı hücre oranı % 32,2, S fazı hücre oranı % 21,5 ve G2/M fazı hücre oranı % 46,4 olarak belirlendi (Şekil - 79).

Sonuçlara göre, Panc1 ve BxPC-3 hücrelerinde PFKFB2'nin siRNA aracılı baskılanması, hücre siklus fazları dağılımını etkilememektedir.



**Şekil - 79: Kontrol ve PFKFB2 siRNA'lar ile transfekte edilmiş BxPC-3 hücrelerinin hücre siklus dağılımları.** Grafikler MUSE analiz cihazından alınmıştır. Grafiklerin sağ üst tarafında dağılım yüzdeleri verilmiştir.



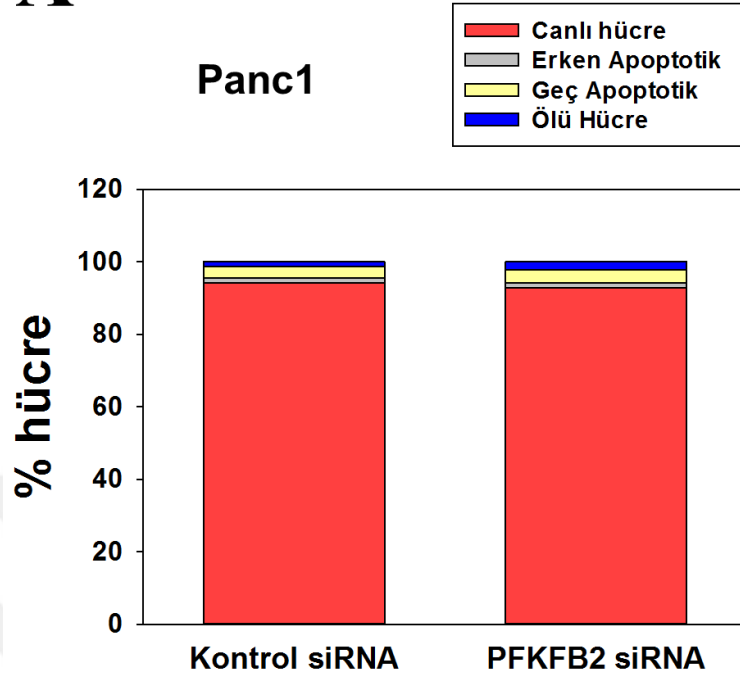
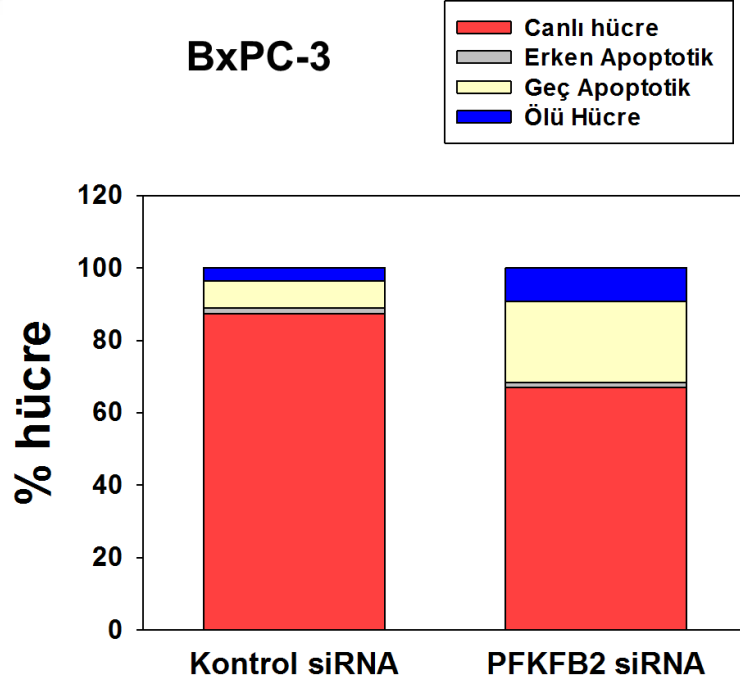
#### **4.8.7. Panc1 Hücrelerinde PFKFB2 Baskılanması Apoptozu Etkilemezken BxPC-3 Hücrelerinde Apoptotik Hücre Oranını Artırır.**

PFKFB2 baskılanmasının hücre siklusuna etkisinin çalışılması amacı ile, Panc1 ve BxPC-3 hücreleri kontrol siRNA ve PFKFB2 siRNA ile transfekte edildi ve transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler kaldırılarak akış apoptotik hücre oranları incelendi.

Panc1 hücrelerinde Kontrol siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde canlı hücre oranı: % 94,28, erken apoptotik hücre oranı: % 1,18, geç apoptotik hücre oranı: % 3,24 ve ölü hücre oranı: % 1,30 ve PFKFB2 siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde canlı hücre oranı: % 92,78, erken apoptotik hücre oranı: % 1,50, geç apoptotik hücre oranı: % 3,46 ve ölü hücre oranı: % 2,26 olarak tespit edildi (Şekil - 80-A).

BxPC-3 hücrelerinde Kontrol siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde canlı hücre oranı: % 87,40, erken apoptotik hücre oranı: % 1,60, geç apoptotik hücre oranı: % 7,48 ve ölü hücre oranı: % 3,52 ve PFKFB2 siRNA ile transfekte edilmiş hücrelerde canlı hücre oranı: % 66,92, erken apoptotik hücre oranı: % 1,52, geç apoptotik hücre oranı: % 22,30 ve ölü hücre oranı: % 9,26 olarak tespit edildi (Şekil - 80-B).

Sonuçlara göre, PFKFB2'nin siRNA aracılı baskılanması Panc1 hücrelerinde apoptozu yol açmazken, BxPC-3 hücrelerinde apoptotik hücre oranını yaklaşık 3 kat artırmıştır.

**A****B**

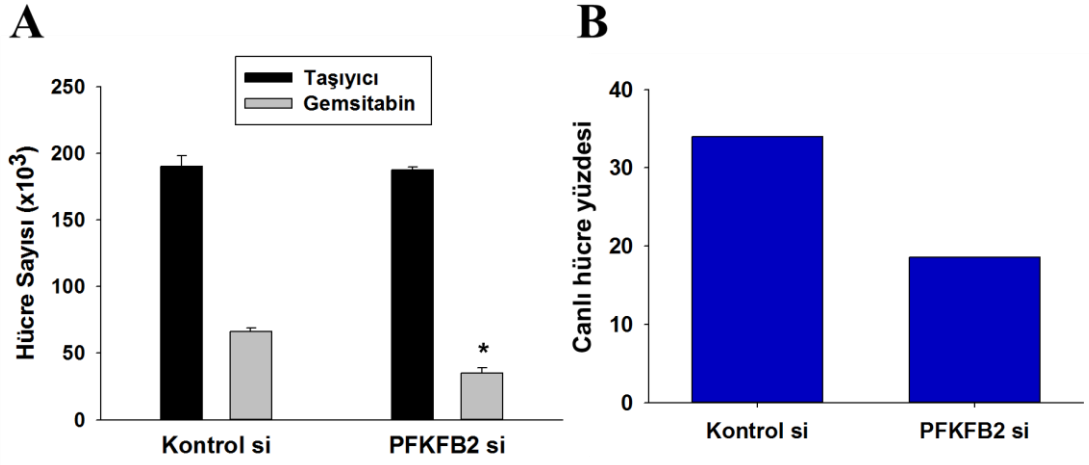
**Şekil - 80: PFKFB2'nin siRNA aracılı baskılanması Panc1 hücrelerinde apoptozu etkilemezken, BxPC-3 hücrelerinde apoptotik hücre oranını artırır. Hücre oranları % olarak verilmiştir. A) Panc1 hücrelerinde PFKFB2'nin siRNA aracılı baskılanmasının apoptoza etkisi. B) BxPC3 hücrelerinde PFKFB2'nin siRNA aracılı baskılanmasının apoptoza etkisi.**

#### 4.8.8. Panc1 ve BxPC-3 Hücrelerinde PFKFB2 Baskılanması Gemsitabine Duyarlılığı Artırır.

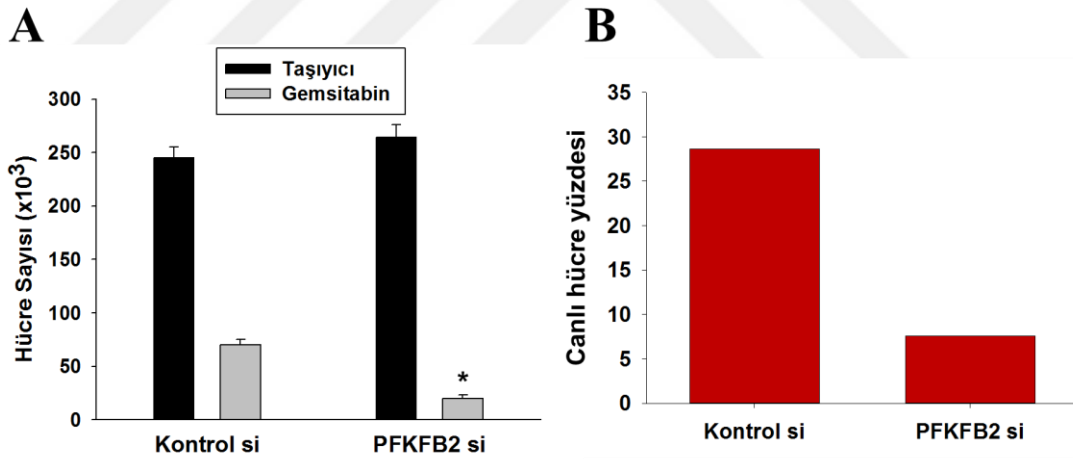
Pankreas kanser tedavisinde sıklıkla gemsitabin kullanılmaktadır ve ilaçlara direnç gelişimi kanser tedavisinde önemli bir sorundur. Hücrelerde endojen eksprese edilen PFKFB2'nin ilaç dirençliliğine etkisinin incelenmesi için Kontrol siRNA veya PFKFB2 siRNA uygulanarak PFKFB2 ekspresyonu baskılanmış Panc1 ve BxPC-3 hücrelerine gemsitabin uygulanarak hücre canlılıkları incelendi. siRNA transfeksiyonundan 1 gün sonra Panc1 hücrelerine 25 µM, BxPC3 hücrelerine 1 µM gemsitabin uygulandı ve 2 gün sonra hücreler tripsinize edilerek hemasitometrik olarak sayıldı.

Hücre sayıları Panc1 hücrelerinde Kontrol siRNA - Taşıyıcı Kontrol:  $190 \pm 8 \times 10^3$  hücre/kuyucuk, Kontrol siRNA - Gemsitabin:  $66 \pm 3 \times 10^3$  hücre/kuyucuk, PFKFB2 siRNA - Taşıyıcı Kontrol:  $187,5 \pm 2 \times 10^3$  hücre/kuyucuk ve PFKFB2 siRNA - Gemsitabin:  $35 \pm 4 \times 10^3$  hücre/kuyucuk olarak belirlendi ( $p=0,004<0,05$ ) (Şekil - 81-A). Yüzde olarak hesaplanınca Kontrol hücrelerinde gemsitabin uygulamasından sonra hücrelerin %34'ünün canlı kaldığı, PFKFB2 siRNA hücrelerinde ise gemsitabin uygulamasından sonra hücrelerin %18,6'sının canlı kaldığı görüldü (Şekil - 81-B).

BxPC-3 hücrelerinde ise Kontrol siRNA - Taşıyıcı Kontrol:  $245 \pm 10 \times 10^3$  hücre/kuyucuk, Kontrol siRNA - Gemsitabin:  $70 \pm 5 \times 10^3$  hücre/kuyucuk, PFKFB2 siRNA - Taşıyıcı Kontrol:  $264 \pm 12 \times 10^3$  hücre/kuyucuk ve PFKFB2 siRNA - Gemsitabin:  $20 \pm 3 \times 10^3$  hücre/kuyucuk olarak belirlendi ( $p<0,001$ ) (Şekil - 82-A). Yüzde olarak hesaplanınca Kontrol hücrelerinde gemsitabin uygulamasından sonra hücrelerin %28'inin canlı kaldığı, PFKFB2 siRNA hücrelerinde ise gemsitabin uygulamasından sonra hücrelerin %7,6'sının canlı kaldığı görüldü (Şekil - 82-B).



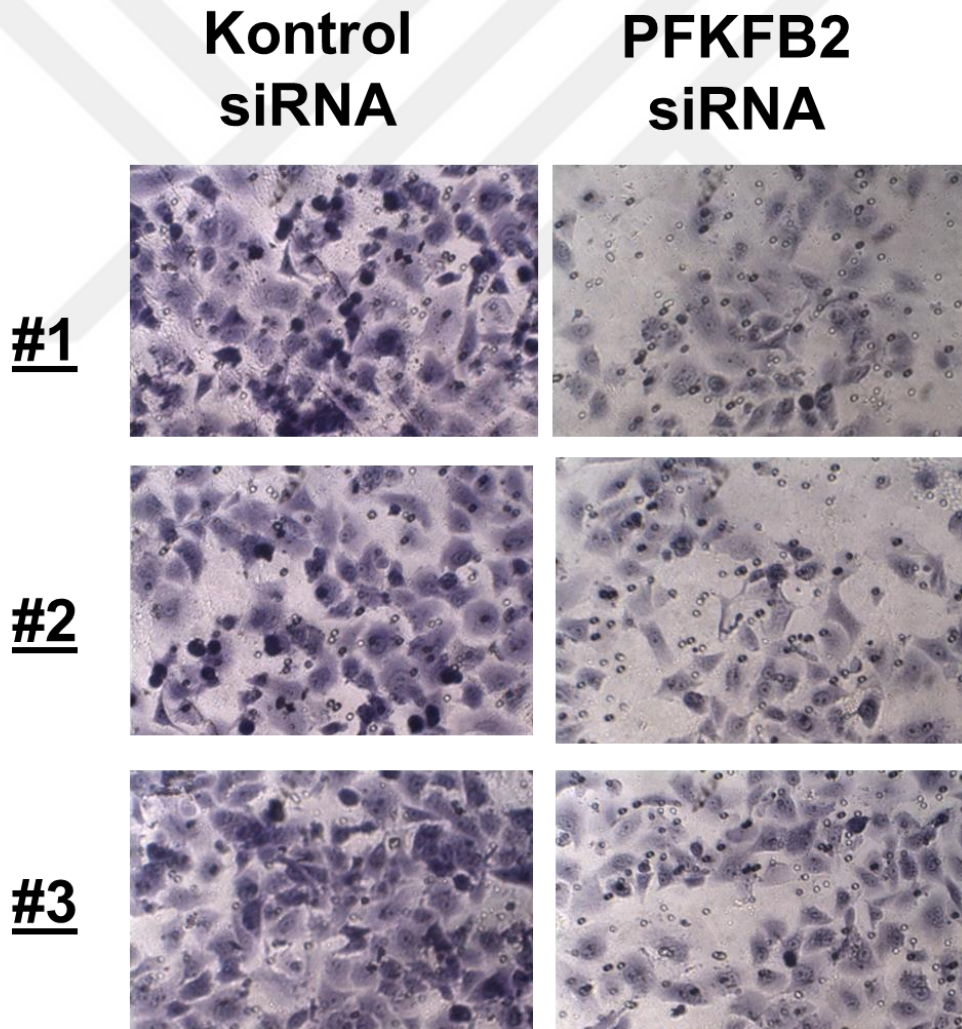
**Şekil - 81: Panc1 hücrelerinde PFKFB2'nin siRNA aracılı baskılanması gemsitabine duyarlılığı artırır. A)** Kontrol siRNA ve PFKFB2 siRNA transfekte edilmiş Panc1 hücrelerinin Taşıyıcı ve Gemsitabin uygulaması sonrası hücre sayıları. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir. **B)** Kontrol siRNA ve PFKFB2 siRNA uygulanmış hücrelerin Gemsitabin uygulaması sonrası canlı hücre yüzdeleri.



**Şekil - 82: BxPC-3 hücrelerinde PFKFB2'nin siRNA aracılı baskılanması gemsitabine duyarlılığı artırır. A)** Kontrol siRNA ve PFKFB2 siRNA transfekte edilmiş BxPC-3 hücrelerinin Taşıyıcı ve Gemsitabin uygulaması sonrası hücre sayıları. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir. **B)** Kontrol siRNA ve PFKFB2 siRNA uygulanmış hücrelerin Gemsitabin uygulaması sonrası canlı hücre yüzdeleri.

#### 4.8.9. Panc1 Hücrelerinde PFKFB2 Ekspresyonunun Baskılanması Matrijel İnvazyonunu Azaltır.

siRNA aracılı baskılama deneylerinde son olarak Kontrol siRNA ve PFKFB2 siRNA ile transfekte edilen Panc1 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 mikroskopunda görüntüledi. PFKFB2'nin siRNA aracılı baskılanmasının Panc1 hücrelerinin invazyonunu azalttığı görüldü (Şekil - 83).



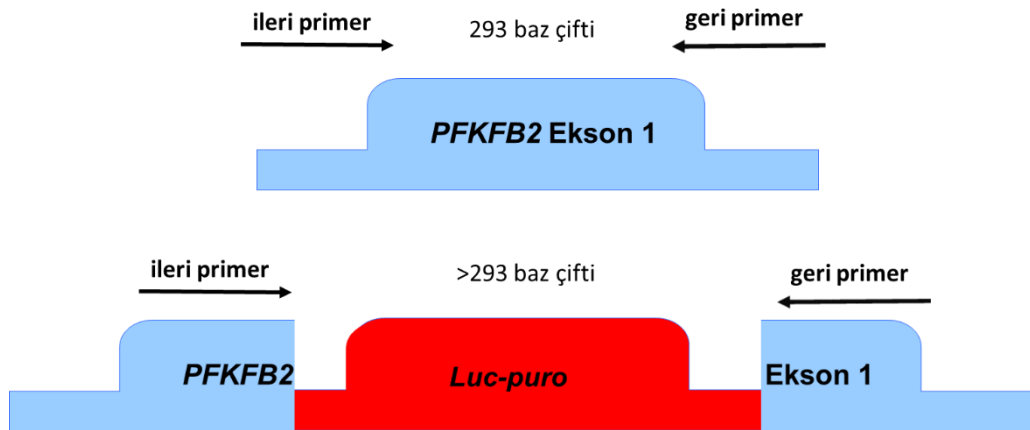
Şekil - 83: PFKFB2'nin siRNA aracılı baskılanması Panc1 hücrelerinin invazyonunu azaltır. İnvaze olan hücreler kristal violet ile boyanarak ışık mikroskopunda 10x büyütmede görüntülenerek rastgele 3 alanın görüntüsü kaydedilmiştir.

## 4.9. *PFKFB2*'nin CRISPR Aracılı İnaktivasyonunun PDA Hücrelerinde (Mia PaCa-2) Etkileri

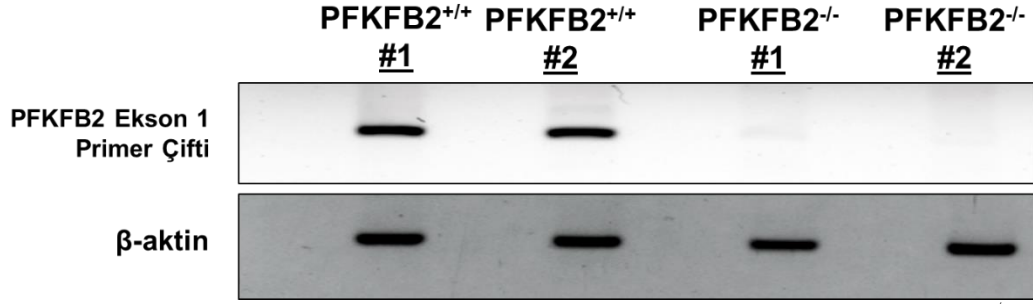
### 4.9.1. Mia PaCa-2 Hücrelerinde *PFKFB2*'nin CRISPR Aracılı İnaktivasyonu

*PFKFB2*'nin PDA hücrelerinde etkilerinin incelenmesi amacıyla son olarak Mia PaCa-2 hücrelerinde *PFKFB2*, CRISPR ile etkisiz hale getirildi. *PFKFB2* ekspresyonunun tamamen kaybının hücrelere etkisi incelendi.

Mia PaCa-2 hücreleri CRISPR plazmidleri ile transfekte edildi (Bölüm 3.8.1.3.) ve puromisin ile seleksiyon uygulandı (Bölüm 3.8.1.2). Canlı hücreler tek hücre kolonileri olarak üretildi ve *PFKFB2* protein miktarları Western blotlama ile kontrol edildi (Sonuçlar gösterilmemiştir.). 2 adet Kontrol plazmidini ile transfekte edilip seçilmiş koloni *PFKFB2*<sup>+/+</sup> Mia PaCa-2 olarak adlandırıldı. *PFKFB2* ekspresyonu olmayan 2 koloni de *PFKFB2*<sup>-/-</sup> Mia PaCa-2 olarak adlandırıldı. Tekrar kontrol amaçlı hücrelerden RNA elde edildi ve bu RNA'lerden elde edilen cDNA'lar kullanılarak PCR uygulandı (Bölüm 3.4.4. kapsamında tasarlanmış primerler kullanıldı). PCR reaksiyonunun prensibi Şekil - 84'de açıklanmıştır. PCR ürünleri, %1 agaroz jelde elektroforez uygulandı CRISPR manipülasyonu incelendi. Beklendiği gibi *PFKFB2*<sup>+/+</sup> hücrelerde 293 baz çifti büyüklüğünde bantlar görülürken *PFKFB2*<sup>-/-</sup> hücrelerde bu bantlar görülmedi (Şekil - 85).

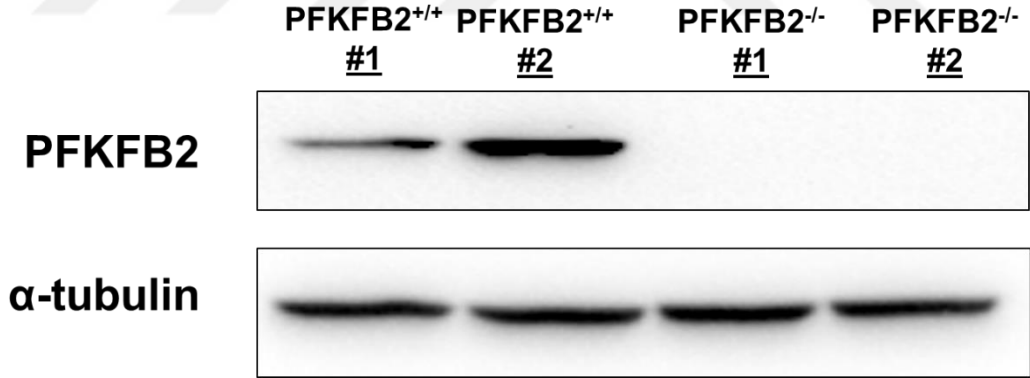


Şekil - 84: CRISPR doğrulaması için gerçekleştirilmiş PCR reaksiyonu prensibi. CRISPR aracılı bölge inaktivasyonu sonrasında homolog rekombinasyon ile kesilen bölgeye *Luc-Puro* entegre edilmiştir. Bu da tasarlanan primerler arasındaki bölgenin uzamasına sebep olmuştur. (İleri primer ve Geri primer bağlanma konumları gerçeği yansıtmamaktadır, ilüstrasyon amaçlı yerleştirilmiştir).



**Şekil - 85: CRISPR aracılı PFKFB2 geni inaktivasyonunun PCR ile kontrolü.** PFKFB2<sup>-/-</sup> Mia PaCa-2 hücrelerinde beklendiği gibi CRISPR manipülasyonu sonucunda Ekson 1 Cas9 ile kesilerek kesilen bölgeye *Luc-Puro* ekspresyon kasedi dahil olmuştur. Primerlerin çoğaltacağı baz çiftinin daha uzun olması sebebiyle bant görülmemesi ile doğrulanmıştır.

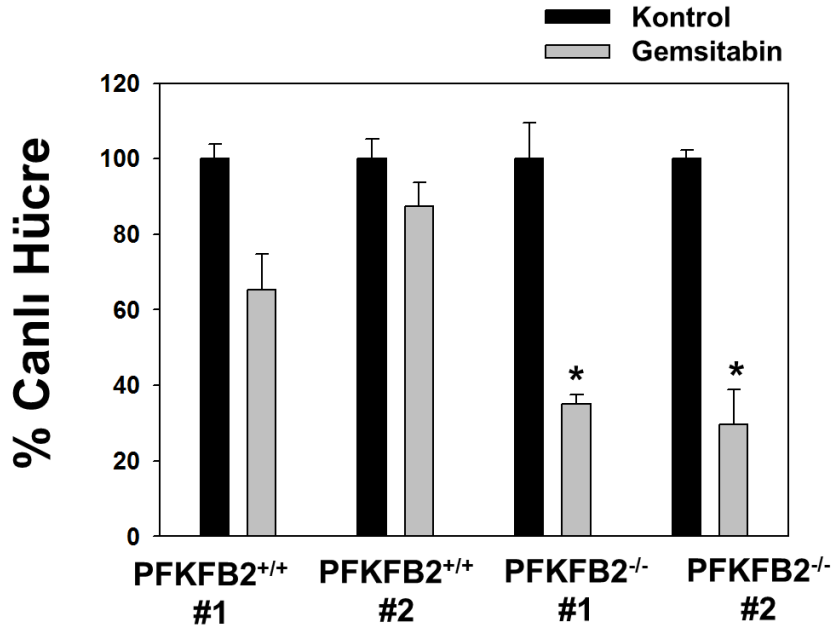
PCR doğrulaması sonrasında, doğrulama amaçlı son olarak Western blotlama kullanıldı. Hücre kolonilerinden elde edilen lizatlardan protein ekstrakte edildi ve PFKFB2 antikoru ile Western blotlama yapıldı. Beklendiği gibi PFKFB2<sup>+/+</sup> hücrelerde PFKFB2 bantları görülürken PFKFB2<sup>-/-</sup> hücrelerde bu bantlar görülmedi (Şekil - 86).



**Şekil - 86: CRISPR aracılı PFKFB2 inaktivasyonunun Western blotlama ile kontrolü.** PFKFB2<sup>-/-</sup> Mia PaCa-2 hücrelerinde beklendiği gibi PFKFB2 protein ekspresyonu gerçekleşmemektedir.

#### 4.9.2. Mia PaCa-2 Hücrelerinde CRISPR Aracılı *PFKFB2* Gen İnaktivasyonu Gemsitabine Duyarlılığı Artırır.

*PFKFB2* geni inaktivasyonunun gemsitabin ilaç duyarlılığına etkisinin test edilmesi amacıyla 2 kontrol *PFKFB2*<sup>+/+</sup> hücre klonu ve 2 *PFKFB2*<sup>-/-</sup> hücre klonu 6 kuyucuklu plakalara ekilerek taşıyıcı veya 300 nM gemsitabin uygulandı. 48 saat sonra hücreler tripsinize edilerek hemositometrik olarak sayıldı ve gemsitabin uygulanmış hücrelerin canlılığı, aynı klonun taşıyıcı uygulanmış kontrolüne göre değerlendirildi. Sonuçlar canlılık yüzdesi olarak belirtildi ve sırasıyla; *PFKFB2*<sup>+/+</sup> - 1 - Taşıyıcı:  $100 \pm 3,84$ , *PFKFB2*<sup>+/+</sup> - 1 - Gemsitabin:  $65,38 \pm 9,42$ , *PFKFB2*<sup>+/+</sup> - 2 - Taşıyıcı:  $100 \pm 5,10$ , *PFKFB2*<sup>+/+</sup> - 2 - Gemsitabin:  $87,5 \pm 6,25$ , *PFKFB2*<sup>-/-</sup> - 1 - Taşıyıcı:  $100 \pm 9,63$ , *PFKFB2*<sup>-/-</sup> - 1 - Gemsitabin:  $35,15 \pm 2,34$ , ( $p=0,028$  ve  $p=0,0026<0,05$ ) *PFKFB2*<sup>-/-</sup> - 2 - Taşıyıcı:  $100 \pm 2,22$ , *PFKFB2*<sup>-/-</sup> - 2 - Gemsitabin:  $29,62 \pm 9,13$  ( $p=0,04$  ve  $p=0,007<0,05$ ) olarak belirlendi (Şekil - 87). Sonuçlara göre *PFKFB2*'nin CRISPR aracılı inaktivasyonu, gemsitabine duyarlılığı artırmıştır.



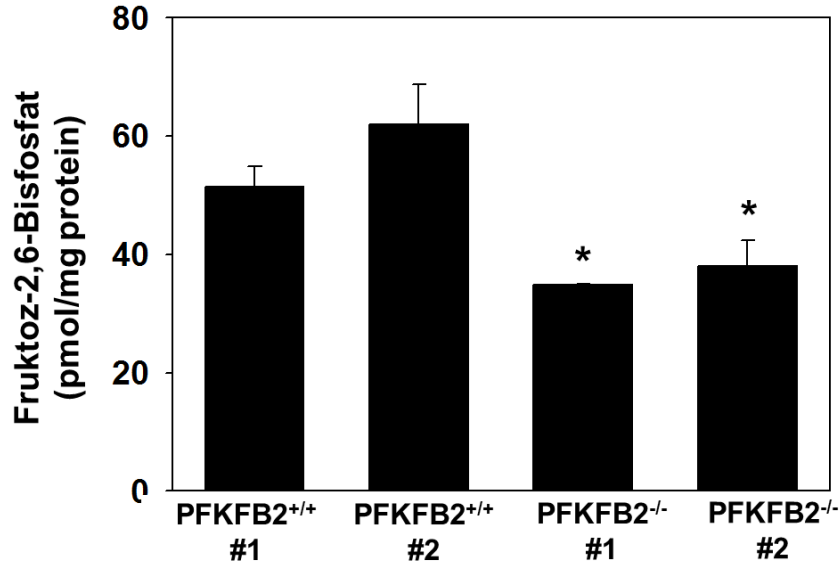
Şekil - 87: *PFKFB2* gen inaktivasyonu gemsitabine duyarlılığı artırır. Sonuçlar her klonun Taşıyıcı-Kontrol'üne göre relatif olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir.



#### 4.9.3. Mia PaCa-2 Hücrelerinde CRISPR Aracılı *PFKFB2* Gen İnaktivasyonu Hücre İçi Fru-2,6-bisfosfat Konsantrasyonunu Azaltır.

*PFKFB2*'nin CRISPR aracılı inaktivasyonunun Fru-2,6-BP konsantrasyonuna etkisinin incelenmesi amacıyla 2 kontrol *PFKFB2*<sup>+/+</sup> hücre klonu ve 2 *PFKFB2*<sup>-/-</sup> hücre klonu 6 kuyucuklu plakalarda büyütüldü ve toplanan hücrelerden Fru-2,6-BP lizatı elde edildi. Lizatlardaki Fru-2,6-BP miktarı ölçüldü ve total proteine normalize edildi. Sonuçlar sırasıyla: *PFKFB2*<sup>+/+</sup> - 1: 51,49 ± 3,36 pmol/mg protein, *PFKFB2*<sup>+/+</sup> - 2: 61,95 ± 6,85 pmol/mg protein, *PFKFB2*<sup>-/-</sup> - 1: 34,81 ± 0,14 pmol/mg protein ( $p=0,013$  ve  $p=0,02<0,05$ ) ve *PFKFB2*<sup>-/-</sup> - 2: 37,94 ± 4,40 pmol/mg protein ( $p=0,015$  ve  $p=0,01<0,05$ ) olarak belirlendi.

Sonuçlara göre *PFKFB2*'nin CRISPR aracılı inaktivasyonunun Mia PaCa-2 hücrelerinde hücre içi Fru-2,6-BP miktarını azalttığı görüldü (Şekil - 88).

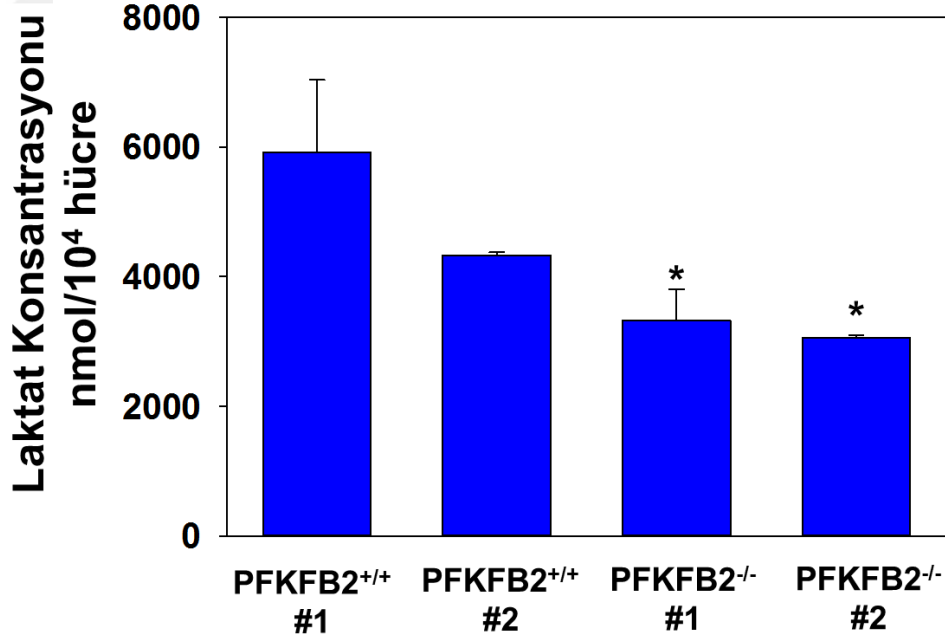


Şekil - 88: *PFKFB2*'nin CRISPR aracılı inaktivasyonu hücre içi Fru-2,6-BP miktarını azaltır. Sonuçlar total proteine normalize edilerek pmol/mg protein olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir.

#### 4.9.4. Mia PaCa-2 Hücrelerinde CRISPR Aracılı *PFKFB2* Gen İnaktivasyonu Besiyerine Salınan Laktat Miktarını Azaltır.

*PFKFB2*'nin CRISPR aracılı inaktivasyonunun hücre glikolizine etkisinin dolaylı yoldan incelenmesi amacıyla 2 kontrol *PFKFB2*<sup>+/+</sup> Mia PaCa-2 hücre klonu ve 2 *PFKFB2*<sup>-/-</sup> Mia PaCa-2 hücre klonu 6 kuyucuklu plakalarda büyütüldü ve 24 saat inkübasyondan sonra hücrelerin besiyerleri toplanarak laktat analizi yapıldı. Ölçülen laktat miktarı nmol olarak belirlenip hücre sayısına göre normalize edildi. Sonuçlar sırasıyla; *PFKFB2*<sup>+/+</sup> - 1: 5919 ± 1117 nmol/10<sup>4</sup> hücre *PFKFB2*<sup>+/+</sup> - 2: 4330 ± 43,94 nmol/10<sup>4</sup> hücre, *PFKFB2*<sup>-/-</sup> - 1: 3322 ± 477,09 nmol/10<sup>4</sup> hücre ( $p=0,04 < 0,05$  ve  $p=0,06 > 0,05$ ) ve *PFKFB2*<sup>-/-</sup> - 2: 3055 ± 38,68 nmol/10<sup>4</sup> hücre ( $p=0,04$  ve  $p=0,03 < 0,05$ ) olarak belirlendi.

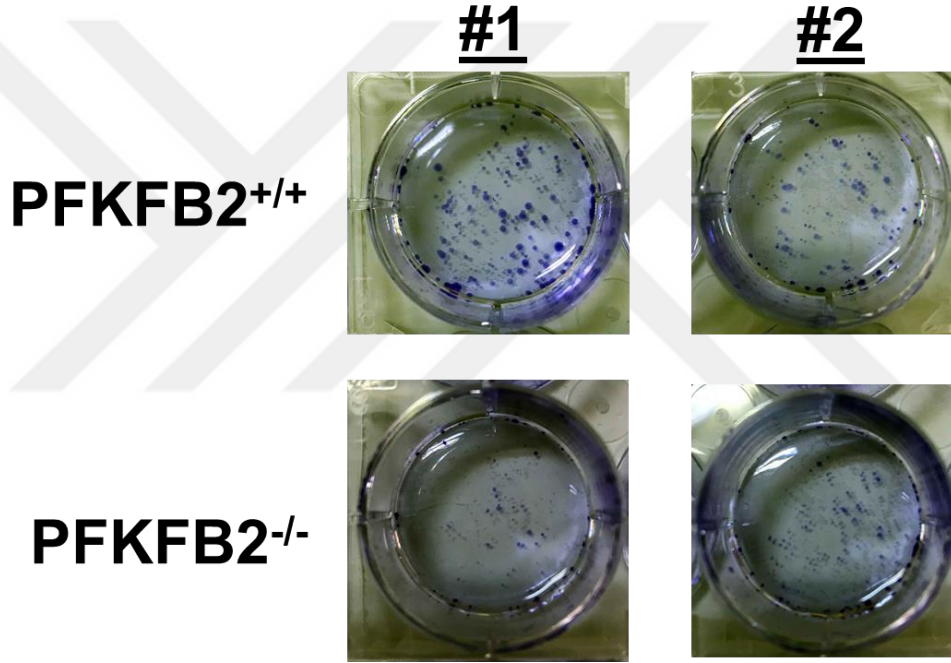
Sonuçlara göre *PFKFB2*'nin CRISPR aracılı inaktivasyonunun Mia PaCa-2 hücrelerinde hücre dışına salınan laktat miktarını azalttığı görüldü (Şekil - 89).



Şekil - 89: *PFKFB2*'nin CRISPR aracılı inaktivasyonu besiyerine salınan laktat miktarını azaltır. Sonuçlar hücre sayılarına göre normalize edilerek nmol/10<sup>4</sup> hücre olarak verilmiştir. İstatistiksel anlamlı farklılık \* ile gösterilmiştir.

#### 4.9.5. Mia PaCa-2 Hücrelerinde CRISPR Aracılı *PFKFB2* Gen İnaktivasyonu Koloni Formasyonunu Azaltır.

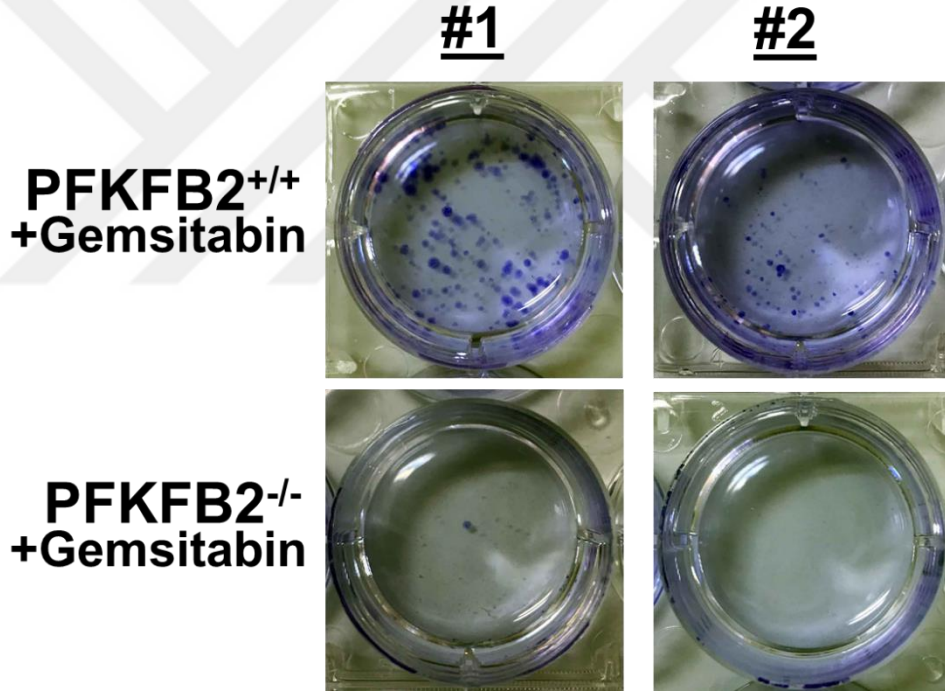
*PFKFB2*<sup>+/+</sup> ve *PFKFB2*<sup>-/-</sup> Mia PaCa-2 hücreleri kullanılarak koloni formasyon analizi gerçekleştirildi. Hücreler 500 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6-kuyucuklu plakalara ekildi ve bir hafta süreyle büyütüldükten sonra metanol ile fikse edilerek kristal violet ile boyandı. Makroskobik görüntüler kaydedilerek karşılaştırıldı. Sonuçlara göre *PFKFB2*<sup>-/-</sup> hücrelerin hem daha az sayıda, hem de daha küçük koloniler oluşturduğu görüldü (Şekil - 90).



Şekil - 90: *PFKFB2*'nin CRISPR ile inaktivasyonu Mia PaCa-2 hücrelerinin koloni formasyonunu azaltır. 2 farklı klonun görüntüleri makroskobik olarak kaydedilmiştir.

#### 4.9.6. Mia PaCa-2 Hücrelerinde CRISPR Aracılı PFKFB2 Gen İnaktivasyonu Gemsitabin Varlığında Koloni Formasyonunu Azaltır.

Son olarak PFKFB2<sup>+/+</sup> ve PFKFB2<sup>-/-</sup> Mia PaCa-2 hücrelerinin koloni formasyonu gemsitabin varlığında değerlendirildi. Hücreler 500 hücre/kuyucuk olacak şekilde 6- kuyucuklu plakalara ekildi ve bir hafta süreyle 100 nM gemsitabin varlığında büyütüldükten sonra metanol ile fikse edilerek kristal violet ile boyandı. Makroskobik görüntüler kaydedilerek karşılaştırıldı. PFKFB2<sup>+/+</sup> hücrelerin gemsitabin varlığında hayatta kalarak koloni oluşturabildikleri, fakat PFKFB2<sup>-/-</sup> hücrelerin gemsitabin varlığında koloni oluşturamadıkları görüldü (Şekil - 91).



Şekil - 91: PFKFB2'nin CRISPR ile inaktivasyonu Mia PaCa-2 hücrelerinin gemsitabin varlığında koloni formasyonunu azaltır. 2 farklı klonun görüntüleri makroskobik olarak kaydedilmiştir.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

### 5.1. Tanımlanmış İkinci Nükleusa Lokalize Olan PFKFB2 Enzimi: PFKFB2

Gerçekleştirilen bu çalışmada ilk olarak PFKFB2 izoformunun insan kanser dokularında ekspresyon artışı, daha sonra da farklı bölgelerden köken alan kanser hücre hatlarında ekspresyonu incelendi. Bugüne dek PFKFB2 fonksiyonunu inceleyen çalışmalar yapılmış olsa da, hiçbir çalışmada karşılaştırmalı olarak kanser tiplerindeki PFKFB2 mRNA ekspresyonu ve protein miktarları incelenmemiştir. Daha önce yapılan ve PFKFB2 fonksiyonunu araştıran çalışmalarda Akt, AMPK, RSK ve 14-3-3 proteinleri tarafından gerçekleşen post-translasyonel modifikasyonları (Houles ve ark., 2018; Marsin ve ark., 2000; Masters ve ark., 2002; Novellademunt ve ark., 2013; Rubio ve ark., 2003) ve aktivasyonları incelenmiştir. Benzer şekilde prostat kanser hücrelerinde androjenin AR-CAMKII-AMPK yolağı ile (Moon ve ark., 2011) ve osteosarkomalarda oldukça önemli olan SLIT2/ROBO1 faktörlerinin SRC-ERK-c-MYC yolağı ile PFKFB2 ekspresyonunu arttırdığı (Zhao ve ark., 2018) gösterilmiştir. Fakat bu çalışmalarda farklı kanser tiplerinden köken alan dokularda ve kanser hücre hatlarında PFKFB2 ekspresyonu incelenmemiştir. Tez çalışması kapsamında PFKFB2 ekspresyonunun kanser dokularında normal dokulardan daha fazla olduğu ve farklı dokulardan köken alan tümör hücre hatlarının PFKFB2 eksprese ettiği belirlendi. Daha da önemlisi bu çalışmada, kanser hücrelerinde eksprese edilen PFKFB2 mRNA varyantları incelendi ve incelenen tüm kanser hücre hatlarında her iki mRNA varyantının (P2-v1 ve P2-v2) eksprese edildiği görüldü. Bu çalışma öncesinde yalnızca akut lenfoblastik lösemi hücrelerinde P2-v1 ve P2-v2 ekspresyonu ve fonksiyonu incelenmiş ve glikokortikoid tarafından indüklenen apoptozda rolleri olduğu gösterilmiştir (Carlet ve ark., 2010).

6-Fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bisfosfataz (PFKFB) grubu enzimlerin kabul görmüş ana fonksiyonu sitoplazmada PFK-1 aracılığı ile glikolizi ve glikoneojenezi regüle etmektir (Yalcin ve ark., 2009b). Kabul görmüş bu etki enzimlerin tanımlanmış primer fonksiyonu olsa dahi, 2009 yılında yayınlanan bir araştırmada ilk defa PFKFB3'ün nükleusa lokalize olduğu ve bu lokalizasyonun hücre proliferasyonunu artırıcı etki gösterdiği gösterilmiştir (Yalcin ve ark., 2009a). PFKFB3 dışında farklı bir PFKFB izoformu için bugüne dek herhangi bir nükleus lokalizasyonu ve nükleusta farklı bir fonksiyon yayınlanmamıştır.

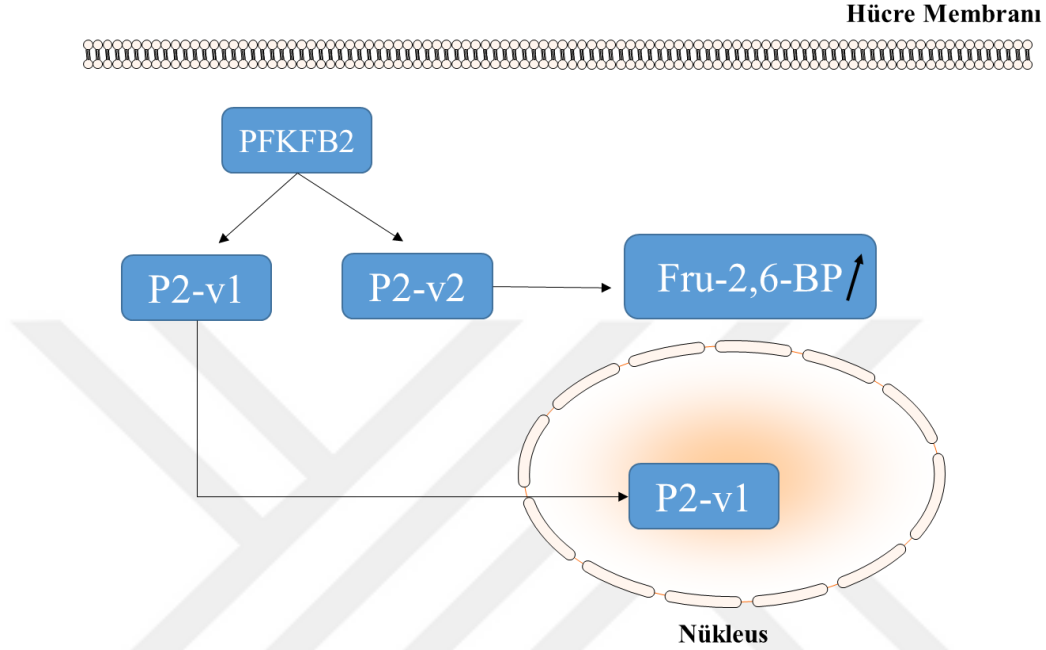
Nükleusa lokalizasyon gösteren glikolitik enzimlerin ilk raporlanmasının tarihi 1963'e kadar uzanmaktadır (McEwen ve ark., 1963) ve sonrasında 1965 yılında nükleusun enzimolojisi incelenirken nükleustaki metabolik enzimlerden bahsedilmiştir (Siebert ve Humphrey, 1965). İlk defa bir metabolik enzimin hücre nükleusunda, bilinen asıl fonksiyonundan farklı bir fonksiyonu olduğu ise, ördek lensinin yapısal proteinlerinden olan  $\epsilon$ -kristalin'in aslında metabolik enzim olan LDH olduğu anlaşılarak Hendriks ve ark. (1988) tarafından gösterilmiştir. Son yıllarda pek çok glikolitik enzimin ve sitrik asit siklusunda görevli enzimin nükleusa lokalizasyon gösterdiği belirlenmiştir (Boukouris ve ark., 2016; Kim ve Dang, 2005). Bu enzimlerden bazıları nükleusta yalnızca kendi rollerini gösterirken (Malat dehidrojenaz (MDH2) enziminin malat üretimi sağlaması (Lo ve ark., 2015)), bazı enzimlerin ise bilinen rollerine ek olarak farklı fonksiyonlar gösterdiği bildirilmiştir. Örneğin glikolitik bir enzim olan HK2, ortamda düşük glikoz bulunduğu Akt tarafından fosforlanarak nükleusa lokalize olmaktadır (Wilson, 2003) ve bu lokalizasyon sonrasında maya hücrelerinde Mig1 transkripsiyon faktörüne bağlanarak karbonhidrat metabolizması ilişkili gen ekspresyonunu regüle ettiği gösterilmiştir (Gancedo, 1992; Neary ve Pastorino, 2013; Wills, 1996). Benzer şekilde Enolaz, sitoplazmada görevi olan fosfoenolpiruvat üretimini, nükleusta da gerçekleştirmektedir. Bunun yanı sıra nükleusta 'MYC promotörüne bağlanan protein 1'e (MBP-1) bağlanarak c-Myc ekspresyonunda azalmaya yol açtığından, tümör baskılayıcı bir protein olarak kabul edilmesi önerilmiştir (Feo ve ark., 2000; Wang ve ark., 2005). Piruvat kinaz, son zamanlarda oldukça dikkat çeken nükleusta farklı fonksiyonları gösterilmiş bir glikolitik enzimdir (Boukouris ve ark., 2016). Piruvat kinaz enziminin 2. izoformunun (PKM2) 433. konumdaki

lizinin amino asidinin asetillenmesi nükleusa lokalizasyonu sağlamaktadır (Lv ve ark., 2013). Nükleusta PKM2'nin bir protein kinaz gibi davranarak gen transkripsiyonunu etkilediği (Gao ve ark., 2012), mitozun ilerleyişine katkıda bulunduğu (Jiang ve ark., 2014), Oct-4'e bağlanarak transkripsiyonel aktivitesini artırdığı (Lee ve ark., 2008) ve Histon H3'ü fosforlayarak gen transkripsiyonuna ve tümörigeneze katkıda bulunduğu (Yang ve ark., 2014) gösterilmiştir.

Yalçın ve ark. (2009) tarafından yayınlanmış çalışmalarda PFKFB3'ün 472 ve 473. konumlarında bulunan lizinin amino asitleri sayesinde nükleusa lokalize olduğu ve Cdk1, Cdc25C ve Siklin D3 ekspresyonunu artırarak, bir hücre siklus inhibitörü olan p27'yi fosforladığı ve hücre proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir (Yalçın ve ark., 2009a). Benzer şekilde PFKFB3'ün siRNA aracılı baskılanmasının HeLa hücrelerinde proliferasyonu, glikolizi, glikoz alımını azalttığı ve p27 protein ekspresyonu ile apoptozu artırdığı görülmüştür (Yalçın ve ark., 2014). PFKFB4'ün bir protein kinaz gibi davranarak SRC-3'ü aktive etmesi ise, PFKFB enzimlerinin de farklı fonksiyonları olabileceğini gösteren bulguları güçlendirmektedir (Dasgupta ve ark., 2018).

Bu doktora tez çalışmasında ise ilk defa PFKFB2 enziminin hücre nükleusuna lokalize olduğu ve protein sekansında nükleusa lokalizasyon sinyali (NLS) sekansları bulundurduğu gösterildi. Her ne kadar daha önce İnsan Protein Atlası kapsamında gerçekleştirilmiş bir çalışmada (Barbe ve ark. 2008) PFKFB2'nin nükleusta bulunduğu gösterilmiş olsa da, ilk kez fonksiyonel olarak bu sonuç doğrulandı ve PFKFB2 varyantlarının spesifik lokalizasyonları incelendi. İlginç olarak, kanser hücrelerinde eksprese edildiği saptanan iki PFKFB2 varyantı olan P2-v1 ve P2-v2, farklı nükleusa lokalizasyon yeteneğine sahiptir. Çalışmada P2-v1 daha yüksek nükleusa lokalizasyon gösteren varyant olarak saptanırken, P2-v2'nin daha fazla sitoplazmik lokalizasyona sahip olduğu görüldü. Endojen eksprese edilen PFKFB2'nin nükleusa lokalizasyonu HeLa, HCT116, Mia PaCa-2, Panc1, s2vp10, BxPC-3, iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinde görüldü ve varyantların lokalizasyon farkları HeLa, Mia PaCa-2, iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerde görülerek doğrulandı. Bu veri ile aynı doğrultuda, Mia PaCa-2 ve Panc1 hücrelerinde her iki varyant over-eksprese edildiğinde, P2-v2 over-ekspresyonunun daha fazla Fru-2,6-BP artışı sağladığı gözlemlendi. Sadece P2-v2'nin, iPDE+KRAS,

Mia PaCa-2 ve Panc1 hücrelerinde glikoz alımını anlamlı oranda etkilediği tespit edildi. Bu bulgular topluca ele alındığında, P2-v2'nin asıl fonksiyonunu sitoplazmada gösterdiğini ve P2-v1'in nükleusta fonksiyonları olduğunu düşündürmektedir. Bu doğrultuda hazırlanan model, Şekil - 92'de görülmektedir.



**Şekil - 92: PFKFB2 mRNA varyantlarının hücre-içi lokalizasyon modeli.** Modele göre, PFKFB2'nin iki transkript varyantı kanser hücrelerinde eksprese edilmektedir ve P2-v1, P2-v2'ye oranla daha yüksek oranda nükleusa lokalizasyona sahipken, P2-v2 daha yüksek oranda sitoplazmada bulunmaktadır. P2-v2, sitoplazmada Fru-2,6-BP oluşumunu katalize ederek glikoz metabolizmasını regüle ederken, P2-v1 nükleusa lokalize olarak alternatif bir fonksiyon görebilir.

## 5.2. Pankreas Kanseri Yeni Bir Moleküler Hedef Olarak PFKFB2

Yüksek mortaliteye sahip pankreatik kanserlerin tedavisi için yeni ilaç hedeflerinin keşfine ve yeni ilaç hedeflerinin keşfi için de pankreas kanserlerinin oluşum sürecinin daha iyi anlaşılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (Baines ve ark., 2011; Bournet ve ark., 2013a; Hezel ve ark., 2006). 1970'lerden günümüze pankreas kanserleri konusunda bilginimiz gelişmiş olsa dahi günümüzde tedavi seçenekleri hala sınırlı kalmaktadır. Pankreas kanserlerinde (ve pek çok diğer kanser tipinde de) 'kansere başlatıcı olay' olarak nitelendirilmiş (Lohr ve ark., 2005) Ras aktivasyonu, tedavi için moleküler bir hedef olarak değerlendirilmiş olsa da, günümüzde hala etkin ve klinikte kullanıma sahip bir Ras inhibitörü



keşfedilememiştir. *RAS* genleri, %33 mutasyon oranıyla insan kanserlerinde en sık görülen mutasyonlardan biridir (Karnoub ve Weinberg, 2008). Mutant Ras proteinleri sürekli GTP bağlı aktif halde kalır ve Ras inhibitörü geliştirilmesi için ilk hedeflenen nokta, genellikle protein kinazlarda ATP bağlanmasının küçük moleküllerle inhibisyonu gibi, Ras-GTP bağlanmasının bozulması olarak düşünülmüş, fakat GTP'nin Ras proteinlerine bağlanma afinitesinin yüksek olması (pikomolar düzeyde) bu girişimlerin başarısızlıkla sonuçlanmasına sebep olmuştur (Baines ve ark., 2011).

İlk zamanlarda Ras proteinlerinin yalnızca hücre membranında bulunduğu düşünülüyorken, zamanla Ras'ın golgi, mitokondri, endoplazmik retikulum gibi membrana sahip tüm hücre organellerinin membranlarında bulunduğu görülmüştür (Fehrenbacher ve ark., 2009). Bu geniş konumlanma, Ras'ın pek çok farklı hücre fonksiyonunda rol almasını açıklamaktadır. Ras proteinlerinin membrana lokalizasyonu için post-translasyonel lipid modifikasyonu önemlidir ve Ras proteinleri C-terminal pozisyonda CAAX motifi (C: Sistein- A: Alifatik amino asit ve X: terminal amino asit) içermektedir. Bu motif Farnesil transferaz (FTaz) enzimleri tarafından tanınarak farnesil izoprenoid lipid eklenir (Baines ve ark., 2011; Basso ve ark., 2006; Fehrenbacher ve ark., 2009). Ras'ın membran ilişkisinin ve fonksiyonunun bozulması amacıyla pek çok FTaz inhibitörleri sentezlenmiş (CAAX epidomimetikleri, peptidomimetikler, farnesil difosfat analogları vs.) ve klinik öncesi çalışmalarda hücre kültürü (James ve ark., 1993) ve fare modellerinde (Kohl ve ark., 1993; Kohl ve ark., 1995) başarılı olsalar da klinik anlamda 'Ras inhibitörü' olarak başarısız olmuşlardır (Baines ve ark., 2011; Rowinsky, 2006). Bunun iki ana sebebi bulunmaktadır; birincisi, her ne kadar FTaz inhibitörlerinin HRAS fonksiyonunu inhibe etmekte başarılı olduğu bulunmuş olsa dahi, KRAS ve NRAS fonksiyonlarına etkisinin zayıf olduğu gösterilmiştir (James ve ark., 1996). Bunun nedeni ise, FTaz inhibe edildiğinde, alternatif bir enzim olan Geranilgeranil transferaz (GGTaz) ile prenilasyon sayesinde KRAS ve NRAS, FTaz inhibisyonunun sonuçlarından kurtulmakta ve fonksiyonuna devam etmektedir (Whyte ve ark., 1997). İkinci neden ise, her ne kadar FTaz inhibitörleri 'Ras inhibitörü' olarak düşünülmüş olsa da, hücre içerisinde bu enzimlerin pek çok farklı substratı bulunmaktadır (Basso ve ark., 2005). Dolayısıyla etki gözlenmiş

çalışmalarındaki tümör inhibisyonunun nedeni, diğer farnesillenmiş proteinlerin fonksiyonlarının inhibisyonu sebebi olabilir (Baines ve ark., 2011). Bir diğer Ras inhibisyonu yaklaşımında, farnesillenmiş Ras proteinlerinin membrana lokalizasyonunu inhibe etme amaçlı farnesil izoprenoid içeren küçük moleküller sentezlenmiş ve özellikle bunlardan salirasib, Ras'ın membrana bağlanmasını engellemekte başarılı olmuştur (Blum ve ark., 2008). Salirasib, Ras'ın membrana bağlanmasını sağlayan Ras eskort proteinlerinden Galektin ile kompetisyona girerek Ras'ın membrana bağlanmasını engellemektedir (Blum ve ark., 2008; Paz ve ark., 2001). Salirasib şu an faz-II klinik çalışmalarda denenmektedir.

Bunların yanısıra son zamanlarda Ras'ın efektör moleküllerinin inhibisyonu dikkat çekmektedir. Ras'ın inhibisyonunun zorluğu, araştırmacıları efektör yollarını inhibe ederek Ras'ın biyolojik etkilerini engellemeyi düşünmek durumunda bırakmıştır (Baines ve ark., 2011). Ras özellikle, Raf-MEK-ERK-MAPK sinyal yolağı, PI3K-AKT-mTOR sinyal yolağı, RalGEF-Ral yolağı gibi ana sinyal yollarını etkilediğinden bu yollarda bulunan proteinlerin inhibisyonu için küçük moleküller sentezlenerek klinik öncesi ve klinik çalışmalarda denenmektedir (Baines ve ark., 2011; Berg ve Soreide, 2012; Campbell ve ark., 2007; Fehrenbacher ve ark., 2009). Ras, aynı zamanda hücrelerin glikoliz gibi metabolik fonksiyonlarını da arttırarak glikolitik pek çok enzimin ekspresyon ve fonksiyonunu regüle etmektedir (Chesney ve Telang, 2013; Pylayeva-Gupta ve ark., 2011). Onkojenik Ras'ın HIF-1 $\alpha$  artışı ile GLUT1 (glikoz transport proteini) ekspresyonunu arttırarak hücrelere daha fazla glikoz girişi sağladığı (Chen ve ark., 2001) ve HK, PFK1 ve LDH gibi önemli glikolitik enzimlerin (Kole ve ark., 1991; Rarnanathan ve ark., 2005) ekspresyonunu ve aktivitesini artırdığı gösterilmiştir (Bryant ve ark., 2014). Benzer şekilde akciğer fibroblastlarının Ras ile transformasyonunun PFKFB3 protein miktarını ve hücre-içi Fru-2,6-BP konsantrasyonunu artırdığı gösterilen bir çalışmada (Telang ve ark., 2006) Ras ile transforme olmuş PFKFB3<sup>+/+</sup> hücreler yumuşak agarda koloni oluşturabilmişlerken, Ras ile transforme olmuş PFKFB3<sup>+/-</sup> hücreler koloni oluşturamamıştır. Bu durum Ras ekspresyonunun hücrelere sağladığı onkojenik özelliklerin PFKFB3 gerektirdiğini göstermektedir (Telang ve ark., 2006).

Bu çalışmada ilk olarak KRAS<sup>G12D</sup>'nin (buradan sonra yalnızca KRAS olarak kullanılacaktır.) iPDE hücrelerinde glikolitik özelliklere ve PFKFB enzimlerine etkisi incelendi. KRAS ekspresyonunun iPDE hücrelerinde proliferasyonu, glikoz alımını ve glikolizi artırdığı saptandı. Özellikle PFKFB3 mRNA ekspresyonunu ve protein miktarını önemli oranda artırdığı görüldü. PFKFB4 ekspresyonunda önemli değişime yol açmadığı ve PFKFB2 mRNA ekspresyonunu ve protein miktarını azalttığı görüldü. İlginç olarak, PFKFB2 varyantları incelendiğinde P2-v1 mRNA ekspresyonunun azaldığı, P2-v2 ekspresyonunun değişmediği saptandı. PFKFB2 ve PFKFB3 enzimlerinin her iki hücrede nükleusa lokalizasyonu incelendiğinde ise, her iki enzimin de hem iPDE, hem de iPDE+KRAS hücrelerinde nükleusa lokalizasyona sahip olduğu gözlemlendi. Fakat ilginç bir şekilde, iPDE+KRAS hücrelerinde PFKFB3 ekspresyonu artmış olsa dahi, PFKFB3'ün nükleusa lokalizasyon oranının KRAS ile transformasyondan sonra azaldığı görüldü. PFKFB2'nin ise iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinde nükleusa lokalizasyon oranı benzer olarak saptandı. Bu veriler ilk defa KRAS ile gerçekleşen onkogenik transformasyonun PDA hücrelerinde PFKFB3 mRNA ekspresyonunu ve protein miktarını artırdığını gösterdi. Her ne kadar Telang ve ark. (2006) tarafından daha önce Ras'ın PFKFB3 protein miktarını artırdığı gösterilmiş olsa dahi, (i) çalışmada akciğer fibroblast hücreleri kullanılmış ve (ii) çalışmada incelenen etki mutant HRAS<sup>V12</sup> ekspresyonu ile elde edilmişti.

iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinde gerçekleştirilen over-ekspresyon çalışmalarında iPDE hücrelerinde PFKFB2 varyantları over-ekspresyonu glikoz alımı, glikoliz ve Fru-2,6-BP konsantrasyonlarında anlamlı değişikliklere sebep olmadı. iPDE+KRAS hücrelerde ise her iki varyantın over-ekspresyonu Fru-2,6-BP konsantrasyonunu arttırsa da, yalnızca P2-v2 over-ekspresyonu glikoz alımını anlamlı oranda yükselttiği gözlemlendi. Glikolizde ise her iki varyantın over-ekspresyonunda bir değişiklik saptanmamıştır. P2-v2 over-ekspresyonu glikoz alımını artırırken P2-v1 over-ekspresyonunun artırmaması nükleusa lokalizasyonu ile ilişkili olabilirken, iPDE hücrelerde fenotipik bir değişikliğin görülmemesi, onkogenik KRAS'ın aktive ettiği sinyal yolları ile PFKFB2'nin aktivitesini artırdığını gösteriyor olabilir. Her ne kadar iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinde yapılan analizde endojen eksprese edilen total PFKFB2'nin fosforlanmış miktarı da

azalıyor gibi gözükse de, çalışmada incelenen tek fosforilasyon noktası 488. serin amino asididir ve bu fosforilasyon yalnızca P2-v1'de gerçekleşmektedir (P2-v2 izoformu 476 amino asit içermektedir.). Bu sebeple KRAS ekspresyonunun PFKFB2 izoformlarının aktivitesine (Serin 466 fosforilasyonu vb.) etkileri ileri çalışmalarda daha detaylı incelenmelidir.

iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinde PFKFB2 ve PFKFB3 enzimlerinin siRNA aracılı baskılanmasının glikolizi etkilemediği görüldü. PFKFB2'nin baskılanması glikoz alımını etkilemezken, PFKFB3'ün baskılanması glikoz alımını azalttı. İlginç olarak PFKFB3'ün her iki hücrede baskılanması Fru-2,6-BP konsantrasyonunu azaltırken, PFKFB2'nin baskılanmasının iPDE hücrelerde bir etkiye neden olmazken, iPDE+KRAS hücrelerde Fru-2,6-BP konsantrasyonunu azalttığı görüldü. Yalnızca bu etkiye bakarak, belki de PFKFB2'nin sentezlenecek küçük moleküller ile inhibisyonunun PFKFB3 inhibisyonuna göre mutant KRAS taşıyan kanserler için daha seçici olabileceği düşünülebilir. Bu durumun sebepleri daha iyi araştırılmalıdır.

Yumuşak agarda koloni formasyonu transforme hücrelerin seçici bir özelliğidir ve bazı çalışmalarda yüksek tümörjenik özellikteki hücrelerin seçimi için kullanıldığı raporlanmıştır (Gajdosik ve ark., 2018). Bu sebeple yapılmış yumuşak agar çalışmalarında iPDE hücreler koloni oluştururken, iPDE+KRAS hücrelerin koloni oluşturabilmesi beklenen bir sonuçtur. Fakat PFKFB2 varyantları over-eksprese eden iPDE+KRAS hücrelerinin daha az sayıda olsa da daha büyük koloniler oluşturması, PFKFB2'nin onkojenik özelliklere katkısını göstermesi açısından önemlidir. ONCOMINE veritabanı pankreatik kanser verilerinde saptanan PFKFB2 mRNA ekspresyon artışı ve insan pankreas doku arrayinde saptanan PFKFB2 protein miktarı artışı ile birleştirildiğinde elde edilen yumuşak agar koloni formasyonu sonucu, pankreas kanserlerinde PFKFB2'nin onkojeniteye katkıda bulunan bir enzim olduğunu göstermektedir.

PDA hücre hatları olan Mia PaCa-2 ve Panc1 hücrelerinde yapılan over-ekspresyon çalışmalarında iPDE+KRAS hücrelerine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Mia PaCa-2 hücrelerde her iki varyantın over-ekspresyonu proliferasyonu ve Fru-2,6-BP miktarını artırmışken yalnızca P2-v2 over-

ekspresyonu glikoz alımını artırmıştır. Panc1 hücrelerinde ise proliferasyonda Vektör'e göre bir fark görülmezken, Fru-2,6-BP miktarı ve glikoz alımı yalnızca P2-v2 over-ekspresyonu ile artmıştır. Her iki hücre hattında P2-v1 ve P2-v2 over-ekspresyonu glikolizi ciddi anlamda etkilememiştir. (Deneylerden elde edilen sonuçlar bir arada Tablo 8'de görülmektedir.) PFKFB2 varyantları over-ekspresyonu, proliferasyonu yalnızca Mia PaCa-2 hücre hattında artırmıştır. Bunun sebebi olarak, Mia PaCa-2 hücrelerinin endojen PFKFB2 ekspresyonunun düşük olması ve dolayısıyla over-ekspresyonun etkilerinin Panc1 hücrelerine göre daha iyi saptanabileceği olarak düşünülmüştür. P2-v2 over-ekspresyonu her iki hücrede de Fru-2,6-BP ve glikoz alımını artırmıştır. Bu sonuçlar iPDE+KRAS hücreleri ile benzerdir. Mia PaCa-2 hücrelerinde P2-v1 over-ekspresyonu da Fru-2,6-BP miktarını anlamlı oranda artırmış gözükse de P2-v2'deki artış çok daha belirgindir. (P2-v1: ~2 kat; P2-v2: ~4 kat)

**Tablo 8:** PDA Hücrelerinde PFKFB2 Over-ekspresyon Deneylerinin Sonuçları. (“↑” işareti ilgili parametrede artış olduğunu ve “-” işareti ilgili parametrede istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadığını ifade etmektedir.)

	<b>Denev Adı</b>	<b>P2-v1</b>	<b>P2-v2</b>
<b>Mia PaCa-2</b>	Proliferasyon	↑	↑
	Fru-2,6-BP	↑	↑
	Glikoz Alımı	-	↑
	Glikoliz	-	-
<b>Panc1</b>	Proliferasyon	-	-
	Fru-2,6-BP	-	↑
	Glikoz Alımı	-	↑
	Glikoliz	-	-

Glikoliz analizi Enolaz reaksiyonundan açığa çıkan  $^3\text{H}_2\text{O}$  miktarını ölçmektedir ve bu reaksiyon fosfoenolpiruvatın sentezlendiği reaksiyondur. PFKFB2 over-eksprese eden iPDE+KRAS, Mia PaCa-2 ve Panc1 hücrelerinde glikoz alımının ve Fru-2,6-BP miktarının artışı görülürken glikolizin değişmemesi, birim zamanda gerçekleşen enolaz aktivitesinin gruplar arasındaki benzerliğini

göstermektedir. Pentoz fosfat geçidi ve serin biyosentezi gibi diğer biyosentetik yollar glikoliz ile ilişki içerisindedir ve glikoliz artışı görülmemesi, glikoz moleküllerinin bu yollarda değerlendiriliyor olabileceğini düşündürmektedir. Kesin bir yargıda bulunabilmek için ileri çalışmalarda PFKFB2'nin diğer biyosentetik yollara etkileri incelenmelidir. Aynı zamanda, Yalçın ve ark. (2009), HeLa hücrelerinde PFKFB3 over-ekspresyonunun glikolizi etkilemeden proliferasyonu artırdığını ve Fru-2,6-BP'nin hücre içerisinde p27'nin fosforilasyonu gibi farklı amaçlarla kullanılabileceğini göstermiştir (Yalçın ve ark., 2009a) ve bilinmeyen benzer bir durum PFKFB2 over-ekspresyonu sonucu sentezlenen Fru-2,6-BP için geçerli olabilir. Son olarak, hücre içi Fru-2,6-BP miktarlarından dört farklı PFKFB enzimi sorumludur ve PFKFB2 dengeli bir kinaz:fosfataz aktivitesine sahiptir. iPDE+KRAS hücrelerinde PFKFB2 stabil over-eksprese edildiğinde PFKFB3 mRNA ekspresyonunun azaldığı tespit edildi. Bu durum göz önünde bulundurulursa, yalnızca PFKFB2 enziminin hücre içi miktarının artması glikoliz artışı için yeterli olmayabilir ve/veya kompenzatif mekanizmalar ile diğer PFKFB enzimlerinin ekspresyonlarının ve/veya aktivitelerinin azalması glikoliz hızını dengede tutuyor veya değiştiriyor olabilir.

Klonojenik analiz (Koloni formasyon analizi), deneye tabi hücrelerin, tek bir hücreden koloni oluşturabilme potansiyelini gösteren bir onkojenik analizdir (Tueni, 1989). PFKFB2'nin hücrelerde uzun süreli stabil ekspresyonunun etkilerinin ve onkojenik özelliklere katkısının incelenmesi amacıyla iPDE+KRAS ve Mia PaCa-2 hücrelerinde P2-v1 ve P2-v2 stabil eksprese eden hücreler elde edilerek koloni formasyonu deneyi gerçekleştirildi. İlginç bir şekilde P2-v2 over-eksprese eden iPDE+KRAS hücrelerinin ve Mia PaCa-2 hücrelerinin koloni oluşturmak yerine yayılarak üredikleri görüldü. Bunun üzerine iPDE+KRAS hücrelerinde EMT transkripsiyon faktörleri olan Twist, ZEB1, Snail ve Slug mRNA ekspresyonları incelendi ve PFKFB2 over-eksprese eden hücrelerde Slug ekspresyonunun arttığı tespit edildi. P2-v2 stabil over-eksprese eden Mia PaCa-2 hücrelerinde ise Vimentin ve Fibronektin mRNA ekspresyonlarının arttığı tespit edildi. Buna ek olarak, Mia PaCa-2 hücrelerinde yara iyileşmesi deneyi uygulandı ve P2-v2 over-eksprese eden hücrelerin migrasyonlarının arttığı görüldü. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada (Zhao ve ark., 2017) glikolizin kanser hücrelerinde

EMT fenotipini artırdığı gösterilmiştir. Yapılan deneylerde bu bulgu ile örtüşecek şekilde P2-v2 ekspresyonunun pankreas hücrelerinde EMT yüzey markörleri olan Vimentin ve Fibronektin mRNA ekspresyonlarını ve migrasyonu artırdığı, iPDE+KRAS hücrelerinde PFKFB2 over-ekspresyonunun Slug transkripsiyon faktörü ekspresyonunu artırdığı görülmüştür. P2-v1 over-eksprese eden hücrelerde bu etkinin görülmemesi, varyanta özgü bir etki olduğunu düşündürmektedir.

PDA hücrelerinde endojen eksprese edilen PFKFB2'nin etkilerinin çalışılması amacıyla Panc1 ve BxPC-3 hücrelerinde siRNA aracılı baskılama ve Mia PaCa-2 hücrelerinde CRISPR aracılı gen inaktivasyonu kullanıldı. PFKFB2'nin siRNA aracılı baskılanmasının Panc1 hücrelerinde Fru-2,6-BP miktarını, proliferasyonu, glikolizi ve hücrelerin matrijel invazyon yeteneğini azalttığı görüldü. BxPC-3 hücrelerinde ise yalnızca Fru-2,6-BP konsantrasyonu incelendi ve Panc1 hücrelerine benzer şekilde PFKFB2 siRNA'larının Fru-2,6-BP miktarını azalttığı saptandı. CRISPR aracılı gen inaktivasyonu uygulanmış Mia PaCa-2 hücrelerinde ise, PFKFB2 ekspresyonunun kaybının, Fru-2,6-BP konsantrasyonunu ve hücrelerden salınan laktat miktarını azalttığı görüldü. Bu sonuçlar endojen eksprese edilen PFKFB2'nin Fru-2,6-BP sentezlediğini ve glikolitik fenotipe katkıda bulunduğunu göstermektedir. Diğer yandan, PFKFB2'nin CRISPR aracılı inaktivasyonu, klonojenik analizde oluşan koloni sayısını ve boyutlarını azaltmıştır. Bu sonuç da, endojen PFKFB2'nin onkojeniteye katkısını göstermektedir.

Yapılmış bir çalışmada PFKFB3'ün HeLa hücrelerinde siRNA aracılı baskılanmasının G1/S fazı geçişinde duraklamaya neden olduğu ve hücrelerde apoptozu artırdığı gösterilmiştir (Yalcin ve ark., 2014). Bu doğrultuda PFKFB2 baskılanmasının hücre siklusuna ve apoptoza etkisi Panc1 ve BxPC-3 hücrelerinde değerlendirildi. PFKFB2 baskılanmasının hücre siklusuna etkisi tespit edilemedi, fakat BxPC-3 hücrelerinde PFKFB2 baskılanmasının geç apoptotik hücre oranında yaklaşık 3 kat artışa neden olduğu görüldü.

Yakın zamanda gerçekleştirilmiş bir çalışmada gemsitabine direnç kazanmakta olan pankreatik kanserlerde glikolizin arttığı gösterilmiştir (Shukla ve ark., 2017). Bu çalışmada gerçekleştirilen ilk deneylerden birinde gemsitabine

direnç kazandırılmış ve dirençsiz G3M4 pankreas kanser hücrelerinde glikolitik genlerin ekspresyonu karşılaştırılmıştır ve PFKFB2 mRNA ekspresyonunun gemcitabine dirençli hücrelerde 2 katına çıktığı görülmüştür (Shukla ve ark., 2017). Bu sonuç doğrultusunda, tez çalışmasında PFKFB2'nin ilaç direncine etkileri incelendi ve pankreas kanserlerinde en sık kullanılan ve sıklıkla direnç gelişimi görülen (Kim ve Gallick, 2008) ilaç olan gemcitabin seçildi.

Panc1 ve BxPC-3 hücrelerinde PFKFB2'nin siRNA aracılığıyla baskılanması ve gemcitabin uygulanmasının, kontrol siRNA ile transfekte edilmiş ve gemcitabin uygulanmış hücrelere göre daha fazla hücrenin ölümünü sağladığı görülmüştür. Benzer şekilde gemcitabinin PFKFB2<sup>-/-</sup> Mia PaCa-2 hücrelerinde PFKFB2<sup>+/+</sup> Mia PaCa-2 hücrelerine göre daha fazla hücre ölümüne neden olduğu ve gemcitabin varlığında klonojenik analiz yapıldığında koloni oluşmadığı (PFKFB2<sup>+/+</sup> Mia PaCa-2 hücrelerinde koloni oluşmuştur.) görülmüştür. Bu bulgular topluca, PFKFB2'nin gemcitabin direnç mekanizmasına katkıda bulunduğunu göstermektedir ve bu durumun mekanizması detaylı incelenmelidir.

Elde edilen bulgular topluca ele alındığında, bu tez çalışmasında (i) PFKFB2'nin pek çok farklı kanser hücre tipinde eksprese olduğu, (ii) PFKFB2'nin PDA hücrelerinde glikolize ve onkojenik özelliklere katkıda bulunduğu ve (iii) PFKFB2'nin mutant KRAS taşıyan PDA'larda yeni bir ilaç hedefi olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.



## 6. KAYNAKLAR

Almeida A, Bolanos JP, Moncada, S (2010) E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 accounts for the Warburg effect by linking glycolysis to cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 738-741.

Almoguera C, Shibata D, Forrester K et al (1988) Most Human Carcinomas of the Exocrine Pancreas Contain Mutant C-K-Ras Genes. *Cell* 53, 549-554.

Atsumi T, Chesney J, Metz C et al (2002) High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers. *Cancer Research* 62, 5881-5887.

Baines AT, Xu D, Der CJ (2011) Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues. *Future Medicinal Chemistry* 3, 1787-1808.

Bando H, Atsumi T, Nishio T et al (2005) Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. *Clinical Cancer Research* 11, 5784-5792.

Barbe L, Lundberg E, Oksvold P et al (2008) Toward a confocal subcellular atlas of the human proteome *Molecular Cellular Proteomics*. 7, 499-508.

Bartrons R, Hue L, Van Schaftingen E et al (1983) Hormonal control of fructose 2,6-bisphosphate concentration in isolated rat hepatocytes. *The Biochemical Journal* 214, 829-837.

Bartrons R, Caro, J (2007) Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *Journal Of Bioenergetics And Biomembranes* 39, 223-229.

Bartrons R, Simon-Molas H, Rodriguez-Garcia A et al (2018) Fructose 2,6-bisphosphate in cancer cell metabolism. *Frontiers in Oncology* 8, 331.

Basso AD, Mirza A, Liu G et al (2005) The farnesyl transferase inhibitor (FTI) SCH66336 (lonafarnib) inhibits Rheb farnesylation and mTOR signaling. Role in FTI enhancement of taxane and tamoxifen anti-tumor activity. *Journal of Biological Chemistry* 280, 31101-31108.

Basso AD, Kirschmeier P, Bishop WR (2006) Lipid posttranslational modifications. Farnesyl transferase inhibitors. *Journal Of Lipid Research* 47, 15-31.

Basturk O, Hong SM, Wood LD et al (2015) A revised classification system and recommendations from the baltimore consensus meeting for neoplastic precursor lesions in the pancreas. *American Journal of Surgical Pathology* 39, 1730-1741.

Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA et al (2006) TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 126, 107-120.

Berg M, Soreide K (2012) EGFR and downstream genetic alterations in KRAS/BRAF and PI3K/AKT pathways in colorectal cancer: implications for targeted therapy. *Discovery Medicine* 14, 207-214.

Blum R, Cox AD, Kloog Y (2008) Inhibitors of chronically active ras: potential for treatment of human malignancies. *Recent Patents On Anti-Cancer Drug Discovery* 3, 31-47.

Bobarykina AY, Minchenko DO, Opentanova IL et al (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, 789-799.

Bos, JL (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Research* 49, 4682-4689.

Boukouris AE, Zervopoulos SD, Michelakis ED (2016) Metabolic enzymes moonlighting in the nucleus: metabolic regulation of gene transcription. *Trends in Biochemical Sciences* 41, 712-730.

Bournet B, Dufresne M, Selves J et al (2013a) Kras oncogene and pancreatic cancer: thirty years after. *Medecine Sciences :M/S* 29, 991-997.

Bournet B, Muscari F, Guimbaud R et al (2013b) KRAS mutations and their correlation with survival of patients with advanced pancreatic cancer. *Pancreas* 42, 543-544.

Bryant KL, Mancias JD, Kimmelman AC et al (2014) KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends in Biochemical Sciences* 39, 91-100.

Campbell PM, Groehler AL, Lee KM et al (2007) K-Ras promotes growth transformation and invasion of immortalized human pancreatic cells by Raf and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Cancer Research* 67, 2098-2106.

Campbell PM, Lee KM, Ouellette MM et al (2008) Ras-driven transformation of human nestin-positive pancreatic epithelial cells. *Methods in Enzymology* 439, 451-465.

Cantelmo AR, Conradi LC, Brajic A et al (2016) Inhibition of the glycolytic activator pfkfb3 in endothelium induces tumor vessel normalization, impairs metastasis, and improves chemotherapy. *Cancer Cell* 30, 968-985.

Carlet M, Janjetovic K, Rainer J et al (2010) Expression, regulation and function of phosphofructo-kinase/fructose-biphosphatases (PFKFBs) in glucocorticoid-induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells. *BMC Cancer* 10, 638.

Chang CH, Qiu J, O'Sullivan D et al (2015a) Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* 162, 1229-1241.

Chang CH, Qiu J, Pearce E (2015b) Metabolic competition in the tumor microenvironment determines cancer progression. *Journal of Immunology* 194.

Chang EH, Gonda MA, Ellis RW et al (1982) Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 4848-4852.

Chen CH, Pore N, Behrooz A et al (2001) Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1 - Interaction between H-ras and hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* 276, 9519-9525.

Chesney J, Mitchell R, Benigni F et al (1999) An inducible gene product for 6-phosphofructo-2-kinase with an AU-rich instability element: role in tumor cell glycolysis and the Warburg effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3047-3052.

Chesney J, Telang S, Yalcin A et al (2005) Targeted disruption of inducible 6-phosphofructo-2-kinase results in embryonic lethality. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331, 139-146.

Chesney J (2006) 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis. *Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic Care* 9, 535-539.

Chesney J, Telang S (2013) Regulation of glycolytic and mitochondrial metabolism by ras. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 14, 251-260.

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

Cheung ST, Wong SY, Leung KL et al (2004) Granulin-epithelin precursor overexpression promotes growth and invasion of hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research* 10, 7629-7636.

Clem BF, Telang S, Clem A et al (2008) Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth. *Molecular Cancer Therapeutics* 7, 110-120.

Clem BF, O'Neal J, Tapolsky G et al (2013) Targeting 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) as a therapeutic strategy against cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 12, 1461-1470.

Cordero-Espinoza L, Hagen T (2013) Increased concentrations of Fructose-2,6-bisphosphate contribute to the Warburg effect in PTEN-deficient cells. *Journal of Biological Chemistry* 288, 36020-36028.

Culmsee C, Mattson MP (2005) p53 in neuronal apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331, 761-777.

Curi R, Newsholme P, Newsholme EA (1988) Metabolism of pyruvate by isolated rat mesenteric lymphocytes, lymphocyte mitochondria and isolated mouse macrophages. *Biochemical Journal* 250, 383-388.

Dang CV, Kim JW, Gao P et al (2008) The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nature Reviews Cancer* 8, 51-56.

- Dasgupta S, Rajapakshe K, Zhu BK et al (2018) Metabolic enzyme PFKFB4 activates transcriptional coactivator SRC-3 to drive breast cancer. *Nature* 556, 249-254.
- De Nicola GM, Karreth, FA, Humpton TJ et al (2011) Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 475, 106-128.
- DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E et al (2007) Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 19345-19350.
- DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G et al (2008) The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metabolism* 7, 11-20.
- DeFeo D, Gonda MA, Young HA et al (1981) Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 3328-3332.
- Deprez J, Vertommen D, Alessi DR et al (1997) Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *Journal of Biological Chemistry* 272, 17269-17275.
- Deramaudt T, Rustgi AK (2005) Mutant KRAS in the initiation of pancreatic cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1756, 97-101.
- Eagle H (1955) Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 122, 501-514.
- Estrella V, Chen TA, Lloyd M et al (2013) Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion. *Cancer Research* 73, 1524-1535.
- Fehrenbacher N, Bar-Sagi D, Philips M (2009) Ras/MAPK signaling from endomembranes. *Molecular Oncology* 3, 297-307.
- Feo S, Arcuri D, Piddini E et al (2000) ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1). *FEBS Letters* 473, 47-52.
- Feramisco JR, Gross M, Kamata T et al (1984) Microinjection of the oncogene form of the human H-ras (T-24) protein results in rapid proliferation of quiescent cells. *Cell* 38, 109-117.
- Filmus J, Robles AI, Shi W et al (1994) Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene* 9, 3627-3633.
- Fridman R, Giaccone G, Kanemoto T et al (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, 6698-6702.

- Gaglio D, Metallo CM, Gameiro PA et al (2011) Oncogenic K-Ras decouples glucose and glutamine metabolism to support cancer cell growth. *Molecular Systems Biology* 7, 523.
- Gajdosik MS, Hixson DC, Brilliant KE et al (2018) Soft agar-based selection of spontaneously transformed rat prostate epithelial cells with highly tumorigenic characteristics. *Experimental and Molecular Pathology* 105, 89-97.
- Gancedo JM (1992) Carbon catabolite repression in yeast. *European Journal of Biochemistry* 206, 297-313.
- Gao X, Wang H, Yang JJ et al (2012) Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase. *Molecular Cell* 45, 598-609.
- Gatenby RA, Gillies RJ (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer* 4, 891-899.
- Gillies RJ, Gatenby RA (2007) Adaptive landscapes and emergent phenotypes: why do cancers have high glycolysis? *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 39, 251-257.
- Green DR, Chipuk JE (2006) p53 and metabolism: Inside the TIGAR. *Cell* 126, 30-32.
- Grutzmann R, Pilarsky C, Ammerpohl O et al (2004) Gene expression profiling of microdissected pancreatic ductal carcinomas using high-density DNA microarrays. *Neoplasia* 6, 611-622.
- Guppy M, Greiner E, Brand K (1993) The role of the crabtree effect and an endogenous fuel in the energy-metabolism of resting and proliferating thymocytes. *European Journal of Biochemistry* 212, 95-99.
- Haase VH (2009) The VHL tumor suppressor: master regulator of HIF. *Current Pharmaceutical Design* 15, 3895-3903.
- Hamilton JA, Callaghan MJ, Sutherland RL et al (1997) Identification of PRG1, a novel progestin-responsive gene with sequence homology to 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Molecular Endocrinology* 11, 490-502.
- Han J, Meng Q, Xi QL et al (2016) Interleukin-6 stimulates aerobic glycolysis by regulating PFKFB3 at early stage of colorectal cancer. *International Journal of Oncology* 48, 215-224.
- Han J, Meng Q, Xi Q et al (2017) PFKFB3 was overexpressed in gastric cancer patients and promoted the proliferation and migration of gastric cancer cells. *Cancer Biomarkers* 18, 249-256.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Heine-Suner D, Diaz-Guillen MA, Lange AJ et al (1998) Sequence and structure of the human 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase heart isoform gene (PFKFB2). *European Journal of Biochemistry* 254, 103-110.

Hendriks W, Mulders JW, Bibby MA et al (1988) Duck lens epsilon-crystallin and lactate dehydrogenase B4 are identical: a single-copy gene product with two distinct functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 7114-7118.

Hensley CT, Wasti AT, DeBerardinis RJ (2013) Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *The Journal of Clinical Investigation* 123, 3678-3684.

Hers HG, Van Schaftingen E (1982) Fructose 2,6-bisphosphate 2 years after its discovery. *The Biochemical Journal* 206, 1-12.

Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ et al (2006) Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Development* 20, 1218-1249.

Horton P, Nakai K (1997) Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. *Proceedings International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology* 5, 147-152.

Houles T, Gravel SP, Lavoie G et al (2018) RSK Regulates PFK-2 Activity to Promote Metabolic Rewiring in Melanoma. *Cancer Research* 78, 2191-2204.

Hsu PP, Sabatini DM (2008) Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134, 703-707.

Hue L, Rider MH (1987) Role of fructose 2,6-bisphosphate in the control of glycolysis in mammalian tissues. *The Biochemical Journal* 245, 313-324.

Hue L, Beauloye C, Marsin AS (2002) Insulin and ischemia stimulate glycolysis by acting on the same targets through different and opposing signaling pathways. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 34, 1091-1097.

Imbert-Fernandez Y, Clem BF, O'Neal J et al (2014) Estradiol stimulates glucose metabolism via 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3). *Journal of Biological Chemistry* 289, 9440-9448.

James GL, Goldstein JL, Brown MS (1993) Benzodiazepine peptidomimetics: potent inhibitors of Ras farnesylation in animal cells. *Science* 260, 1937-1942.

James GL, Goldstein JL, Brown MS (1996) Resistance of K-RasBV12 proteins to farnesyltransferase inhibitors in Rat1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 4454-4458.

Ji D, Lu ZT, Li YQ et al (2014) MACC1 expression correlates with PFKFB2 and survival in hepatocellular carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 15, 999-1003.

Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ et al (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell growth & Differentiation: the Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 12, 363-369.

Jiang YH, Li XJ, Yang WW et al (2014) PKM2 Regulates Chromosome Segregation and Mitosis Progression of Tumor Cells. *Molecular Cell* 53, 75-87.

- Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M et al (2014) In vitro cell migration and invasion assays. *Journal of visualized experiments: JoVE*.
- Kanda M, Matthaei H, Wu J et al (2012) Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* 142, 730-733 e739.
- Karnoub AE, Weinberg RA (2008) Ras oncogenes: split personalities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 517-531.
- Kessler R, Eschrich K (2001) Splice isoforms of ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase in human brain. *Molecular Brain Research* 87, 190-195.
- Kim JW, Dang CV (2005) Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends in Biochemical Sciences* 30, 142-150.
- Kim JW, Dang CV (2006) Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Research* 66, 8927-8930.
- Kim MP, Gallick GE (2008) Gemcitabine resistance in pancreatic cancer: Picking the key players. *Clinical Cancer Research* 14, 1284-1285.
- Kohl NE, Mosser SD, deSolms SJ et al (1993) Selective inhibition of ras-dependent transformation by a farnesyltransferase inhibitor. *Science* 260, 1934-1937.
- Kohl NE, Omer CA, Conner MW et al (1995) Inhibition of farnesyltransferase induces regression of mammary and salivary carcinomas in ras transgenic mice. *Nature Medicine* 1, 792-797.
- Kole HK, Resnick RJ, Van Doren M et al (1991) Regulation of 6-phosphofructo-1-kinase activity in ras-transformed rat-1 fibroblasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 286, 586-590.
- Kong B, Qia CJ, Erkan M et al (2013) Overview on how oncogenic Kras promotes pancreatic carcinogenesis by inducing low intracellular ROS levels. *Frontiers in Physiology* 4.
- Kroemer G, Pouyssegur J (2008) Tumor cell metabolism: Cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 13, 472-482.
- Kuhn HW, Harsanyi JC, Selten R et al (1996) The work of John Nash in game theory - Nobel Seminar, December 8, 1994. *Journal of Economy Theory* 69, 153-185.
- Lea MA, 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, 5889-5899.
- Lea MA, Guzman Y, Desbordes C (2016) Inhibition of growth by combined treatment with inhibitors of lactate dehydrogenase and either phenformin or inhibitors of 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase 3. *Anticancer Research* 36, 1479-1488.

- Lee J, Kim HK, Han YM et al (2008) Pyruvate kinase isozyme type M2 (PKM2) interacts and cooperates with Oct-4 in regulating transcription. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40, 1043-1054.
- Leone G, DeGregori J, Sears R et al (1997) Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. *Nature* 387, 422-426.
- Li FL, Liu JP, Bao RX et al (2018) Acetylation accumulates PFKFB3 in cytoplasm to promote glycolysis and protects cells from cisplatin-induced apoptosis. *Nature Communications* 9, 508.
- Liberti MV, Locasale, JW (2016) The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences* 41, 211-218.
- Liu H, Hu YP, Savaraj N et al (2001) Hypersensitization of tumor cells to glycolytic inhibitors. *Biochemistry* 40, 5542-5547.
- Lo YW, Lin ST, Chang SJ et al (2015) Mitochondrial proteomics with siRNA knockdown to reveal ACAT1 and MDH2 in the development of doxorubicin-resistant uterine cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 19, 744-759.
- Lohr M, Kloppel G, Maisonneuve P et al (2005) Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: A meta-analysis. *Neoplasia* 7, 17-23.
- Loiseau AM, Rider MH, Foret D et al (1988) Rat hepatoma (HTC) cell 6-phosphofructo-2-kinase differs from that in liver and can be separated from fructose-2,6-bisphosphatase. *European Journal of Biochemistry* 175, 27-32.
- Lv L, Xu YP, Zhao D et al (2013) Mitogenic and oncogenic stimulation of K433 acetylation promotes PKM2 protein kinase activity and nuclear localization. *Molecular Cell* 52, 340-352.
- Malumbres M, Pellicer A (1998) RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Frontiers in Bioscience* 3, d887-912.
- Marsin AS, Bertrand L, Rider MH et al (2000) Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Current Biology* 10, 1247-1255.
- Masters SC, Subramanian RR, Truong A et al (2002) Survival-promoting functions of 14-3-3 proteins. *Biochemical Society Transactions* 30, 360-365.
- McEwen BS, Allfrey VG, Mirsky AE (1963) Studies on energy-yielding reactions in thymus nuclei III. participation of glycolysis and the citric acid cycle in nuclear adenosine triphosphate synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 238, 2579-2586.
- Meng D, Yang S, Wan X et al (2016) A transcriptional target of androgen receptor, miR-421 regulates proliferation and metabolism of prostate cancer cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 73, 30-40.
- 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, 264-270.



- Moon JS, Jin WJ, Kwak JH et al (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. *The Biochemical Journal* 433, 225-233.
- Morgan KA, Adams DB (2010) Solid tumors of the body and tail of the pancreas. *The Surgical Clinics of North America* 90, 287-307.
- Nardozi JD, Lott K, Cingolani G (2010) Phosphorylation meets nuclear import: a review. *Cell Communication and Signaling*: 8, 32.
- Navarro-Sabate A, Manzano A, Riera L et al (2001) The human ubiquitous 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (PFKFB3): promoter characterization and genomic structure. *Gene* 264, 131-138.
- Neary CL, Pastorino JG (2013) Akt inhibition promotes hexokinase 2 redistribution and glucose uptake in cancer cells. *Journal of Cellular Physiology* 228, 1943-1948.
- Nguyen NQ, Johns AL, Gill AJ et al (2011) Clinical and immunohistochemical features of 34 solid pseudopapillary tumors of the pancreas. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 26, 267-274.
- Notta F, Hahn SA, Real FX (2017) A genetic roadmap of pancreatic cancer: still evolving. *Gut* 66, 2170-2178.
- Novellademunt L, Obach M, Millan-Arino L et al (2012) Progestins activate 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3) in breast cancer cells. *The Biochemical Journal* 442, 345-356.
- Novellademunt L, Tato I, Navarro-Sabate A et al (2013) Akt-dependent activation of the heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB2) isoenzyme by amino acids. *Journal of Biological Chemistry* 288, 10640-10651.
- Okar DA, Manzano A, Navarro-Sabate, A et al (2001) PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 30-35.
- Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G (2001) Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene* 20, 7486-7493.
- Pfeiffer T, Schuster S, aBonhoeffer S (2001) Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* 292, 504-507.
- Pisarsky L, Bill R, Fagiani E et al (2016) Targeting metabolic symbiosis to overcome resistance to anti-angiogenic therapy. *Cell Reports* 15, 1161-1174.
- Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK et al (2011) Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review. *Frontiers in Pharmacology* 2, 49.
- Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D (2011) RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer* 11, 761-774.

Racker E, Resnick RJ, Feldman R (1985) Glycolysis and methylaminoisobutyrate uptake in rat-1 cells transfected with ras or myc oncogenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 3535-3538.

Rarnanathan A, Wang C, Schreiber SL (2005) Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 5992-5997.

Rider MH, van Damme J Vertommen D (1992) Evidence for new phosphorylation sites for protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase in bovine heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *FEBS Letters* 310, 139-142.

Rider MH, Bertrand L, Vertommen D (2004) 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *The Biochemical Journal* 381, 561-579.

Riera L, Manzano A, Navarro-Sabate A et al (2002) Insulin induces PFKFB3 gene expression in HT29 human colon adenocarcinoma cells. *Molecular Cell Research* 1589, 89-92.

Rivard N, Boucher MJ, Asselin C et al (1999) MAP kinase cascade is required for p27 downregulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells. *American Journal of Physiology, Cell Physiology* 277, C652-C664.

Rodriguez LG, Wu X, Guan JL (2005) Wound-healing assay. *Methods in Molecular Biology* 294, 23-29.

Ros S, Santos CR, Moco S et al (2012) Functional metabolic screen identifies 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 as an important regulator of prostate cancer cell survival. *Cancer Discovery* 2, 328-343.

Ros S, Floter J, Kaymak I et al (2017) 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 is essential for p53-null cancer cells. *Oncogene* 36, 3287-3299.

Rowinsky EK (2006) Lately, it occurs to me what a long, strange trip it's been for the farnesyltransferase inhibitors. *Journal of Clinical Oncology* 24, 2981-2984.

Rubio MP, Peggie M, Wong BHC (2003) 14-3-3s regulate fructose-2,6-bisphosphate levels by binding to PKB-phosphorylated cardiac fructose-2,6-bisphosphate kinase/phosphatase. *EMBO Journal* 22, 3514-3523.

Sakata J, Abe Y, Uyeda K (1991) Molecular-Cloning of the DNA and expression and characterization of rat testes Fructose-6-Phosphate,2-Kinase-Fructose-2,6-bisphosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 266, 15764-15770.

Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W et al (1997) The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 277, 333-338.

Scheidig AJ, Burmester C, Goody RS (1999) The pre-hydrolysis state of p21(ras) in complex with GTP: new insights into the role of water molecules in the GTP hydrolysis reaction of ras-like proteins. *Structure* 7, 1311-1324.

Scotto L, Narayan G, Nandula SV et al (2008) Identification of copy number gain and overexpressed genes on chromosome arm 20q by an integrative genomic approach in cervical cancer: potential role in progression. *Genes, Chromosomes & Cancer* 47, 755-765.

Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 3, 721-732.

Seo M, Kim JD, Neau D et al (2011) Structure-based development of small molecule PFKFB3 inhibitors: a framework for potential cancer therapeutic agents targeting the Warburg effect. *PLOS one* 6, e24179.

Seymour AB, Hruban RH, Redston M et al (1994) Allelotype of Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Research* 54, 2761-2764.

Shi L, Pan H, Liu Z et al (2017) Roles of PFKFB3 in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2, 17044.

Shimizu K, Goldfarb M, Suard Y et al (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, 2112-2116.

Shukla SK, Purohit V, Mehla K et al (2017) MUC1 and HIF-1alpha Signaling Crosstalk Induces Anabolic Glucose Metabolism to Impart Gemcitabine Resistance to Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* 32, 71-87.

Siebert G, Humphrey GB (1965) Enzymology of the nucleus. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 27, 239-288.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2018) Cancer statistics, 2018. *CA: a Cancer Journal for Clinicians* 68, 7-30.

Stacey DW, Watson T, Kung HF et al (1987) Microinjection of transforming ras protein induces c-fos expression. *Molecular and Cellular Biology* 7, 523-527.

Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM et al (1976) DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260, 170-173.

Strohecker AM, Joshi S, Possemato R et al (2015) Identification of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase as a novel autophagy regulator by high content shRNA screening. *Oncogene* 34, 5662-5676.

Sun H, Lesche R, Li DM et al (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, 6199-6204.

Susana R, Almut S (2013) Balancing glycolytic flux: the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatases in cancer metabolism. *Cancer&Metabolism* 1.

Swietach P, Vaughan-Jones RD, Harris AL (2007) Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Reviews* 26, 299-310.

- T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu (2017) Türkiye Kanser İstatistikleri.
- Telang S, Yalcin A, Clem AL et al (2006) Ras transformation requires metabolic control by 6-phosphofructo-2-kinase. *Oncogene* 25, 7225-7234.
- Telang S, Clem BF, Klarer AC (2012) Small molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase suppresses t cell activation. *Journal of Translational Medicine* 10, 95.
- Tueni EA (1989) Human tumor clonogenic assay: what is new? *European Journal of Cancer & Clinical Oncology* 25, 1031-1033.
- Turashvili G, Bouchal J, Baumforth K et al. (2007) Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis. *BMC Cancer* 7, 55.
- Urich M, Senften M, Shaw PE et al (1997) A role for the small GTPase Rac in polyomavirus middle-T antigen-mediated activation of the serum response element and in cell transformation. *Oncogene* 14, 1235-1241.
- Van Schaftingen E, Hers HG (1980) Synthesis of a stimulator of phosphofructokinase, most likely fructose 2,6-bisphosphate, from phosphoric acid and fructose 6-phosphoric acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 96, 1524-1531.
- Van Schaftingen E, Hue L, Hers HG (1980a) Control of the fructose-6-phosphate/fructose 1,6-bisphosphate cycle in isolated hepatocytes by glucose and glucagon. Role of a low-molecular-weight stimulator of phosphofructokinase. *The Biochemical Journal* 192, 887-895.
- Van Schaftingen E, Hue L, Hers HG (1980b) Study of the fructose 6-phosphate/fructose 1,6-bi-phosphate cycle in the liver in vivo. *The Biochemical Journal* 192, 263-271.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033.
- Vizan P, Boros LG, Figueras A et al (2005) K-ras codon-specific mutations produce distinctive metabolic phenotypes in NIH3T3 mice [corrected] fibroblasts. *Cancer Research* 65, 5512-5515.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR et al (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England Journal of Medicine* 319, 525-532.
- Wang CX, Fisk BC, Wadehra M (2000) Overexpression of murine fizzy-related (fzr) increases natural killer cell-mediated cell death and suppresses tumor growth. *Blood* 96, 259-263.
- Wang WY, Wang LS, Endoh A et al (2005) Identification of alpha-enolase as a nuclear DNA-binding protein in the zona fasciculata but not the zona reticularis of the human adrenal cortex. *Journal of Endocrinology* 184, 85-94.

- Warburg O, Wind F, Negelein E (1927) The metabolism of tumors in the body. *The Journal of General Physiology* 8, 519-530.
- Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.
- Whyte DB, Kirschmeier P, Hockenberry TN et al (1997) K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 272, 14459-14464.
- Wieringa T, Vanputten JPM, Krans HMJ (1981) Atp Levels and Glucose Phosphorylation. *Eur Journal of Clinical Investigation* 11, 33-33.
- Wills C (1996) Some puzzles about carbon catabolite repression in yeast. *Research in Microbiology* 147, 566-572.
- Wilson JE (2003) Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *The Journal of Experimental Biology* 206, 2049-2057.
- Xu Y, An X, Guo X et al (2014) Endothelial PFKFB3 plays a critical role in angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34, 1231-1239.
- Yalcin A (2004) Quantification of thioredoxin mRNA expression in the rat hippocampus by real-time PCR following oxidative stress. *Acta Biochimica Polonica* 51, 1059-1065.
- Yalcin A, Clem BF, Simmons A et al (2009a) Nuclear targeting of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) increases proliferation via cyclin-dependent kinases. *Journal of Biological Chemistry* 284, 24223-24232.
- Yalcin A, Telang S, Clem B et al (2009b) Regulation of glucose metabolism by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatases in cancer. *Experimental and Molecular Pathology* 86, 174-179.
- Yalcin A, Clem BF, Imbert-Fernandez Y et al (2014) 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) promotes cell cycle progression and suppresses apoptosis via Cdk1-mediated phosphorylation of p27. *Cell Death & Disease* 5, e1337.
- Yalcin A, Solakoglu TH, Ozcan SC et al (2017) 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase-3 is required for transforming growth factor beta1-enhanced invasion of Panc1 cells in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 484, 687-693.
- Yang W, Xia Y, Hawke D (2014) PKM2 phosphorylates histone H3 and promotes gene transcription and tumorigenesis. *Cell* 158, 1210.
- Ying H, Kimmelman AC, Lyssiotis CA et al (2012) Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell* 149, 656-670.
- Yun J, Rago C, Cheong I et al (2009) Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science* 325, 1555-1559.

Zhang H, Lu CY, Fang M et al (2016) HIF-1 alpha activates hypoxia-induced PFKFB4 expression in human bladder cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 476, 146-152.

Zhang, R, Li R, Liu Y et al (2018) The Glycolytic Enzyme PFKFB3 Controls TNF-alpha-Induced Endothelial Proinflammatory Responses. *Inflammation* (in press).

Zhao H, Duan Q, Zhang Z et al (2017) Up-regulation of glycolysis promotes the stemness and EMT phenotypes in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 21, 2055-2067.

Zhao SJ, Shen YF, Li et al (2018) SLIT2/ROBO1 axis contributes to the Warburg effect in osteosarcoma through activation of SRC/ERK/c-MYC/PFKFB2 pathway. *Cell Death & Disease* 9, 390.

Zhu W, Ye L, Zhang J, et al (2016) PFK15, a Small Molecule Inhibitor of PFKFB3, induces cell cycle arrest, apoptosis and inhibits invasion in gastric cancer. *PLOS One* 11, e0163768.

## 7. SİMGELER ve KISALTMALAR

### Simgeler

### Açıklama

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\Delta$	Delta
$\epsilon$	Epsilon
$\kappa$	Kappa
$\mu$	Mikro
M	Molar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece (Celcius)
~	Yaklaşık değer

### Kısaltmalar

### Açıklama

3PO	3-(3-piridin)-1-(4-piridin)-2-propan-1-on
5MPN	5-(n-(8-metoksi-4-kinol)amino)pentil nitrat
Akt	Protein kinaz B
AMP	Adenozin monofosfat
AMPK	AMP activated protein kinase AMP tarafından aktive edilen protein kinaz
APC/C	Anafaz promote edici kompleks
AR	Androjen reseptörü
ATP	Adenozin trifosfat
BCA	Biokinkoninik asit
CAMK	Kalmodulin bağımlı protein kinaz
c-AMP	Siklik AMP
Cdc25C	M-fazı-indükleyici fosfataz 3 proteini
CDK	Cyclin dependent kinase Siklin bağımlı kinaz
CDKN2A	Cyclin dependant kinase inhibitor 2A Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A
CER	Sitoplazmik ekstraksiyon reagenti
CPM	Cintillation per minute Dakikadaki sintillasyon sayısı
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats Düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri

DMEM	Dulbecco's Modified Essential Media Dulbecco tarafından modifiye edilmiş Eagle besiyeri
dNTP	Deoksinükleotid tri fosfat
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ELK-1	ETS domeini içeren transkripsiyon faktörü
EMT	Epitelyal-mezenşimal dönüşüm
ERK	Extracellular signal related kinase Ekstraselüler sinyal ilişkili kinaz
FAK	Fökal adhezyon kinaz
FBS	Fetal bovine serum Fötal sığır serumu
FGF	Fibroblast growth factor Fibroblast büyüme faktörü
Fru-2,6-BP	Fruktoz-2,6-bisfosfataz
GAP	GTPase activating protein GTPaz aktive edici protein
GDP	Guanozin difosfat
GEF	Guanin exchange factor Guanin değişim faktörü
GLUT	Glikoz transporter proteini
gRNA	Guide RNA Hedefleyici RNA
GSK	Glikojen sentez kinaz
GTP	Guanozin trifosfat
HIF	Hipoksi tarafından indüklenen faktör
HK	Heksokinaz
IGF	İnsülin like growth factor İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-6	İnterlöykin-6
iPDE	hTERT-HPNE E6/E7/st
iPDE+KRAS	hTERT-HPNE E6/E7/st/KRAS <sup>g12d</sup>
JUN	Löysin zipper proteini
LDH	Laktat dehidrojenaz
Luc	Lusiferaz
MACC	Met transkripsiyon regülatör proteini
MAPK	Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz
MBP	MYC promotörüne bağlanan protein
MDH	Malat dehidrojenaz
MEN-1	Multiple endocrine neoplasia Çoklu endokrin neoplazisi
mTOR	Mammalian target of rapamycine Memeli rapamisin hedef proteini
MYC	Proto-onkojen c-MYC proteini
N4A	5,6,7,8-tetrahidroksi-2-(4-hidroksifenil) krom-4-on
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NCBI	National Center for Biotechnology Information, USA



	Ulusal Biyoteknoloji Bilgisi Merkezi, ABD
NER	Nükleus ekstraksiyon reagenti
NF- $\kappa$ B	Nükleer faktör $\kappa$ -B
NLS	Nükleusa lokalizasyon sinyali
NRF2	Eriotroid-2 ilişkili faktör
PanIN	Pankreatik intraepitelial neoplazi
PBS	Fosfat ile tamponlanmış salin çözeltisi
PCR	Polymerase chain reaction
	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDA	Pankreatik duktal adenokarsinoma
PDH	Piruvat dehidrojenaz
PDK	Piruvat dehidrojenaz kinaz
PFK1	Fosfofruktokinaz-1
PFKFB	6-fosfofrukto-2-kinaz/Fruktoz-2,6-bisfosfataz
PI3K	Fosfatidilinozitol 3 kinaz
PKA	Protein kinaz A
PKB	Protein kinaz B
PKM	Piruvat kinaz
PQP	1-(3-piridin)-3-(2-kinolin)-2-propan-1-on
PTEN	Fosfataz ve tensin homolog proteini
Puro	Puromisin direnç geni
PVDF	Polivinilidin florür
qPCR	Quantitative PCR
	Kantitatif PCR
RB	Retinoblastoma proteini
ROBO1	Roundabout homolog proteini 1
RPM	Rotation per minute
	Dakikadaki dönüş sayısı
RSK	Ribozomal S6 kinaz
RT	Reverse transcription
	Ters transkripsiyon
siRNA	Small interfering RNA
siRNA	Küçük interferans RNA'sı
SLIT2	Slit guidans ligandı
SOC	Super optimal broth
	Süper uygun broth besiyeri
SRC	Proto-onkojen c-SRC proteini
SRF	Serum response factor
	Seruma cevap faktörü
TAE	Tris Asetat EDTA çözeltisi
TBST	Tris ile tamponlanmış salin çözeltisi
TCA	Trikarboksilik asit siklusu
TIGAR	TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator
	TP53 tarafından indüklenen glikoliz ve apoptoz regülatör proteini
TP53	Tümör protein 53
TSC	Tuberosiz sklerosis kompleksi
VHL	von Hippel-Lindau proteini

YN1

7,8-dihidroksi-3-(4-hidroksifenil) krom-4-on



## 8. EKLER

### 8.1. Şekiller Listesi

Şekil - 1: Pankreatik adenokarsoma oluşumu art arda gerçekleşen aktive edici ve inaktive edici mutasyonlar ile gerçekleşir.....	6
Şekil - 2: Ras aktivasyonu ve deaktivasyonu GEF ve GAP enzimleri ile gerçekleşir.....	7
Şekil - 3: Ras aktivasyonu ile aktive olan bazı önemli hücre içi yollar ve hücre biyolojisine etkileri.....	8
Şekil - 4: Ras aktivasyonunun hücre proliferasyonuna ve metabolizmaya etkileri.....	10
Şekil - 5: Hızlı proliferasyon alan dokularda ve tümör dokularında Warburg etkisi görülür.....	12
Şekil - 6: Fruktoz-2,6-bisfosfat molekülünün kimyasal yapısı.....	16
Şekil - 7: PFKFB enzimleri protein domainleri ve PFKFB enzimleri tarafından katalizlenen reaksiyon.....	19
Şekil - 8: PFKFB2, PFKFB3 ve PPFKFB4 kelimeleri içeren PubMed veritabanındaki çalışmaların yıllara göre değişimi.....	21
Şekil - 9: BCA standart Absorbans / Konsantrasyon grafiği.....	37
Şekil - 10: Çalışmada kullanılan CRISPR plazmidleri diyagramı.....	41
Şekil - 11: Fruktoz-2,6-bisfosfat standart absorbans değişim hızı / Konsantrasyon grafiği.....	46
Şekil - 12: Çalışmada kullanılan ekspresyon vektörleri.....	50
Şekil - 13: PFKFB2 cDNA klonlanması.....	52
Şekil - 14: ONCOMINE veritabanından elde edilen veri setlerinde yapılan analizlere göre kanser dokularında, karşılık gelen normal dokulara göre PFKFB2 ekspresyonu önemli oranda artmaktadır.....	54
Şekil - 15: Pankreatik adenokarsinoma dokularında PFKFB2 ekspresyonu, pankreas normal dokusuna göre artmaktadır.....	55

Şekil - 16: Farklı dokulardan elde edilmiş farklı kanser hücre hatlarında PFKFB2 ekspresyonu tespit edilmiştir.....	56
Şekil - 17: Kanser hücre hatlarında PFKFB2'nin her iki varyantı eksprese edilmektedir.....	58
Şekil - 18: Endojen eksprese edilen PFKFB2; HeLa, HCT116 ve Panc1 hücrelerinde nükleusa lokalize olmaktadır.....	59
Şekil - 19: Kullanılan PFKFB2 antikoru, PFKFB2'ye spesifiktir.....	60
Şekil - 20: Mia PaCa-2 hücrelerinde P2-v1, P2-v2'ye oranla 2,5 kat daha fazla nükleusa lokalize olmaktadır.....	60
Şekil - 21: P2-v1, P2-v2'ye oranla daha fazla nükleusa lokalizasyona sahiptir.....	61
Şekil - 22: PFKFB2 varyantları nükleusa lokalizasyon sinyali (NLS) bölgeleri içermektedir ve nükleusta kromatine bağlanmamaktadır.....	62
Şekil - 23: iPDE+KRAS hücrelerinin proliferasyonu, iPDE hücrelerden daha hızlı gerçekleşmektedir.....	63
Şekil - 24: KRAS ile transformasyon pankreatik duktal hücrelerde glikoz alımını ciddi anlamda etkilemezken glikolizi artırır.....	64
Şekil - 25: iPDE+KRAS hücrelerde Fru-2,6-BP konsantrasyonu iPDE hücrelere göre daha fazladır.....	64
Şekil - 26: iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerde tespit edilmiş PFKFB enzimleri mRNA ekspresyonları.....	65
Şekil - 27: KRAS ile transformasyon sonucunda iPDE hücrelerde PFKFB2 total protein miktarı azalırken, PFKFB3 total protein miktarı artmaktadır.....	66
Şekil - 28: KRAS ile gerçekleşen transformasyon PFKFB2'nin nükleusa lokalizasyonunu etkilemezken, PFKFB3'ün nükleusa lokalizasyonunu azaltır.....	67
Şekil - 29: Fosforlanma ile aktivasyon, PFKFB2 ve PFKFB3'ün nükleusa lokalizasyonunu etkilemez.....	68
Şekil - 30: KRAS <sup>G12D</sup> ekspresyonu iPDE hücrelerde, P2-v1 ekspresyonunu azaltırken P2-v2 ekspresyonunu etkilemez.....	69
Şekil - 31: P2-v1, iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerin her ikisinde P2-v2'ye göre daha fazla nükleusa lokalizasyon göstermektedir.....	70
Şekil - 32: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 ile transfekte edilmiş iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin PFKFB2 mRNA ekspresyonları.....	71
Şekil - 33: Transfekte edilmemiş hücre ve Vektör, P2-v1 ve P2-v2 ile transfekte edilmiş iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin total protein miktarları.....	72
Şekil - 34: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 ile transfekte edilmiş iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin glikoz alımı değerleri.....	73

Şekil - 35: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 ile transfekte edilmiş iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin glikoliz değerleri.....	74
Şekil - 36: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 ile transfekte edilmiş iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin hücre-içi Fru-2,6-BP değerleri.....	75
Şekil - 37: iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerde siRNA aracılı PFKFB2 ve PFKFB3 mRNA ekspresyonu baskılanmasının gerçek zamanlı PCR ile doğrulanması.....	76
Şekil - 38: PFKFB2 ve PFKFB3 baskılanmış iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinde glikoz alım değerleri.....	77
Şekil - 39: PFKFB2 ve PFKFB3 baskılanmış iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinde glikoliz değerleri. ....	78
Şekil - 40: PFKFB2 ve PFKFB3 baskılanmış iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinde hücre-içi Fru-2,6-BP konsantrasyonları.....	79
Şekil - 41: Stabil P2-v1 ve P2-v2 eksprese eden iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin PFKFB2 mRNA ekspresyonları.....	80
Şekil - 42: P2-v1 ve P2-v2 stabil over-eksprese eden iPDE+KRAS hücrelerinin PFKFB2 ve PFKFB3 protein miktarları.....	81
Şekil - 43: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil eksprese eden iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin proliferasyonu.....	82
Şekil - 44: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil over-eksprese eden hücrelerin yumuşak agar kolonilerinin mikroskopik görüntüsü.....	83
Şekil - 45: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil over-eksprese eden hücrelerin yumuşak agar kolonilerinin analizi.....	84
Şekil - 46: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil over-eksprese eden iPDE+KRAS hücrelerinin yumuşak agar kolonilerinin makroskopik görüntüleri.....	84
Şekil - 47: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil over-eksprese eden iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin makroskopik koloni formasyon analizi sonucu.....	85
Şekil - 48: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil over-eksprese eden iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin mikroskopik koloni formasyon analizi sonucu.....	85
Şekil - 49: PFKFB2 varyantları ile stabil transfekte edilmiş iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin Twist ve ZEB1 mRNA ekspresyonları.....	87
Şekil - 50: PFKFB2 varyantları ile stabil transfekte edilmiş iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin Snail ve Slug mRNA ekspresyonları.....	87
Şekil - 51: PFKFB2 varyantları ile stabil transfekte edilmiş iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerinin PFKFB3 mRNA ekspresyonları.....	88
Şekil - 52: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil eksprese eden iPDE+KRAS hücrelerinin sfer formasyonu yeteneklerinde bir fark gözlenmemiştir.....	89

Şekil - 53: Normal büyütülmüş PDA hücrelerindeki PFKFB2 mRNA ekspresyonları.....	90
Şekil - 54: Normal büyütülmüş PDA hücrelerindeki total PFKFB2 ve PFKFB3 protein miktarları.....	91
Şekil - 55: PDA hücrelerinde P2-v1 ve P2-v2 ekspresyonları.....	92
Şekil - 56: Endojen eksprese edilen PFKFB2, PDA hücrelerinde sitoplazmanın yanı sıra nükleusa da lokalize olur.....	92
Şekil - 57: Mia PaCa-2 hücrelerinde PFKFB2 varyantları over-ekspresyonu.....	93
Şekil - 58: Panc-1 hücrelerinde PFKFB2 varyantları over-ekspresyonu.....	94
Şekil - 59: Mia PaCa-2 hücrelerinde P2-v1 ve P2-v2 transient over-ekspresyonu hücre proliferasyonunu artırır.....	95
Şekil - 60: Panc1 hücrelerinde PFKFB2 varyantlarının transient over-ekspresyonu proliferasyonu anlamlı oranda etkilemez.....	96
Şekil - 61: Mia PaCa-2 hücrelerinde P2-v1 ve P2-v2 Fru-2,6-BP konsantrasyonunu artırırken, Panc1 hücrelerinde yalnız P2-v2 over-ekspresyonu hücre içi Fru-2,6-BP konsantrasyonunu artırır.....	97
Şekil - 62: P2-v1 over-ekspresyonu Mia PaCa-2 ve Panc1 hücrelerinde glikoz alımını ciddi oranda etkilemezken, P2-v2 over-ekspresyonu her iki hücrede glikoz alımını artırır.....	98
Şekil - 63: PFKFB2 over-ekspresyonu Mia PaCa-2 ve Panc1 hücrelerinde glikolizi ciddi oranda etkilemez.....	99
Şekil - 64: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil eksprese eden Mia PaCa-2 hücrelerinin PFKFB2 mRNA ekspresyonları.....	101
Şekil - 65: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil over-eksprese eden Mia PaCa-2 hücrelerinin Western blotlama görüntüsü.....	101
Şekil - 66: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil over-eksprese eden Mia PaCa-2 hücrelerinin PFKFB2 varyant spesifik primerler ile PCR sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	102
Şekil - 67: P2-v2 stabil over-ekspresyonu, Mia PaCa-2 hücrelerinin proliferasyonunu ciddi oranda artırır.....	103
Şekil - 68: Vektör, P2-v1 ve P2-v2 stabil over-eksprese eden Mia PaCa-2 hücrelerinin makroskopik koloni formasyon analizi sonucu.....	104
Şekil - 69: P2-v2 stabil over-ekspresyonu Mia PaCa-2 hücrelerinde daha yaygın üreme sağlar.....	105
Şekil - 70: P2-v2 over-ekspresyonu Mia PaCa-2 hücrelerinde migrasyon yeteneğini artırır.....	106
Şekil - 71: P2-v2 stabil over-ekspresyonu Mia PaCa-2 hücrelerinde Vimentin ve Fibronektin mRNA ekspresyonlarını artırır.....	107

Şekil - 72: PFKFB2 spesifik siRNA uygulanması PFKFB2 mRNA ekspresyonunu azaltır.....	109
Şekil - 73: PFKFB2 spesifik siRNA uygulaması her iki PFKFB2 transkript varyantını baskılamaktadır.....	109
Şekil - 74: Panc1 hücrelerinde PFKFB2 mRNA ekspresyonunun siRNA aracılı baskılanması Fru-2,6-BP konsantrasyonunu azaltır.....	110
Şekil - 75: PFKFB2'nin siRNA ile baskılanması Panc1 hücrelerinde glikoz alımını etkilemezken glikolizi azaltır.....	111
Şekil - 76: PFKFB2 ekspresyonunun siRNA aracılı baskılanması Panc1 hücrelerinde hücre proliferasyonunu azaltmaktadır.....	112
Şekil - 77: BxPC-3 hücrelerinde PFKFB2 mRNA ekspresyonunun siRNA aracılı baskılanması Fru-2,6-BP konsantrasyonunu azaltır.....	113
Şekil - 78: Kontrol ve PFKFB2 siRNA'lar ile transfekte edilmiş Panc1 hücrelerinin hücre siklus dağılımları.....	114
Şekil - 79: Kontrol ve PFKFB2 siRNA'lar ile transfekte edilmiş BxPC-3 hücrelerinin hücre siklus dağılımları.....	115
Şekil - 80: PFKFB2'nin siRNA aracılı baskılanması Panc1 hücrelerinde apoptozu etkilemezken, BxPC-3 hücrelerinde apoptotik hücre oranını artırır.....	117
Şekil - 81: Panc1 hücrelerinde PFKFB2'nin siRNA aracılı baskılanması gempitabine duyarlılığı artırır.....	119
Şekil - 82: BxPC-3 hücrelerinde PFKFB2'nin siRNA aracılı baskılanması gempitabine duyarlılığı artırır.....	119
Şekil - 83: PFKFB2'nin siRNA aracılı baskılanması Panc1 hücrelerinin invazyonunu azaltır.....	120
Şekil - 84: CRISPR doğrulaması için gerçekleştirilmiş PCR reaksiyonu prensibi.....	121
Şekil - 85: CRISPR aracılı PFKFB2 geni inaktivasyonunun PCR ile kontrolü.....	122
Şekil - 86: CRISPR aracılı PFKFB2 inaktivasyonunun Western blotlama ile kontrolü.....	122
Şekil - 87: PFKFB2 gen inaktivasyonu gempitabine duyarlılığı artırır.....	123
Şekil - 88: PFKFB2'nin CRISPR aracılı inaktivasyonu hücre içi Fru-2,6-BP miktarını azaltır.....	124
Şekil - 89: PFKFB2'nin CRISPR aracılı inaktivasyonu besiyerine salınan laktat miktarını azaltır.....	125
Şekil - 90: PFKFB2'nin CRISPR ile inaktivasyonu Mia PaCa-2 hücrelerinin koloni formasyonunu azaltır.....	126

Şekil - 91: PFKFB2'nin CRISPR ile inaktivasyonu Mia PaCa-2 hücrelerinin gempitabin varlığında koloni formasyonunu azaltır.....127

Şekil - 92: PFKFB2 mRNA varyantlarının hücre-içi lokalizasyon modeli.....131





## 8.2. Tablolar Listesi

Tablo 1: <i>PFKFB</i> Genlerine ve Transkriptlerine Ait Bilgiler.....	18
Tablo 2: Kullanılan Kimyasallara İlişkin Bilgiler.....	26
Tablo 3: Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	27
Tablo 4: Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizinde Kullanılan Problar.....	33
Tablo 5: Tasarlanan PCR Primerlerinin Sekansları.....	34
Tablo 6: Kullanılan Antikorlara İlişkin Bilgiler.....	38
Tablo 7: Kullanılan siRNA Moleküllerine İlişkin Bilgiler.....	42
Tablo 8: PDA Hücrelerinde <i>PFKFB2</i> Over-ekspresyon Deneyleri Sonuçları.....	136



## 9. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini sıklıkla ve yorulmadan benimle paylaşan ve her konuda destek olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Abdullah YALÇIN başta olmak üzere, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Ümit POLAT, Prof. Dr. Meltem TANRIVERDİ, Prof. Dr. Nazmiye GÜNEŞ, Doç. Dr. Saime GÜZEL ve Dokt. Öğr. Üyesi Duygu UDUM'a ve Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hale ŞAMLI'ya doktora sürecimde yardımları için teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarındaki büyük yardımları ve katkıları için Yunus GÜRPINAR ve Tuğba Hazal SOLAKOĞLU'na, katkılarına ek olarak birlikte çalıştığımız kısa süreyi oldukça eğlenceli ve verimli kılan, her zaman yanımda olduğunu ve olacağını bildiğim canım dostum Başak Duygu BALABAN'a, hayatıma yaptıkları büyük katkılar için değerli arkadaşlarım Mert GÜMREN, Gülçe HEPBOSTANCI ve Buse CEVATEMRE'ye ve oldukça faydalı bilimsel tartışmalarımız için Sena ARDIÇLI'ya teşekkür ederim.

Bana laboratuvarını iki kez açan ve araştırmalarımla ilgili her türlü materyali ve sarf malzemeyi rahatlıkla tedarik etmemi sağlayan Louisville Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji ve Onkoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Jason CHESNEY ve Dr. Brian CLEM'e, her zaman laboratuvarında yaşadığım problemleri anında çözümlen Amy CLEM'e ve değerli tartışmaları ve katkıları için Yoannis IMBERT-FERNANDEZ, Sucheta TELANG ve Nadijka LYPOVA'ya teşekkür ederim.

iPDE ve iPDE+KRAS hücrelerini elde eden ve bu hücreleri laboratuvarımız ile paylaşan Dr. Paul CAMPBELL'a ve pirofosfat bağımlı PFK1 enzimini bizimle paylaşan Dr. Alberto IGLESIAS'a yardımları ve kibar paylaşımları için teşekkür ederim.

114Z496 numaralı projeyi ve 1059B141400673 numaralı 2214-A yurtdışı araştırma bursunu finanse ederek bu araştırmanın gerçekleştirilmesini sağlayan, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a ve 2017/4 numaralı araştırma projesini finanse eden Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (UÜ-BAP)'a ayrıca teşekkür ederim.

Herkesten önce eğitimimi sağlayarak beni bugünlere getiren, bana her zaman maddi ve manevi destek olan, koşulsuz sevgisi ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve benim için dünyadaki en değerli ve saygı değer insanlar olan sevgili annem Sevinç ÖZCAN, babam Vasfi Taner ÖZCAN ve kardeşim Ece ÖZCAN'a sonsuz minnetimi ve teşekkürlerimi sunarım.

## 10. ÖZGEÇMİŞ

Kocaeli’de 1989 yılında dünyaya gelen Selahattin Can Özcan, ilköğretimi ve ortaöğretimini 50. Yıl İlkokulu ve Kocaeli Koleji’nde ve lise öğrenimini Kocaeli Anadolu Lisesi’nde tamamlamıştır. 2006’da üniversite eğitimine Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nde başlamıştır ve 2011 yılında mezun olarak Veteriner Hekim ünvanını almaya hak kazanmıştır. 2012 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı’nda doktora öğrencisi olarak eğitimine başlamıştır. 2013 yılında 3 ay süreyle ve 2015-2016 yıllarında 9 ay süreyle TÜBİTAK 2214-A bursiyeri olarak Louisville Üniversitesi James Graham Brown Kanser Merkezi’nde Araştırmacı olarak görevlendirilmiş ve 2013-2018 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmıştır.

## ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

## TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	Selahattin Can ÖZCAN
Tez Adı	Pankreas Epitel Hücrelerinin Onkojenik Transformasyonunda PFKFB2'nin Rolü
Enstitü	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Veteriner Biyokimya
Bilim Dalı	
Tez Türü	Doktora Tezi
Tez Danışman(lar)ı	Abdullah Yalçın
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) İzni	<input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimin sadece içindekiler, özet, kaynakça ve içeriğinin % 10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum
Yayımlama İzni	<input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasının ertelenmesini istiyorum 1 yıl <input type="checkbox"/> 2 yıl <input type="checkbox"/> 3 yıl <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin vermiyorum

Hazırlamış olduğum tezimin yukarıda belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih: 18/10/2018

İmza: