



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI



**POLİAMİN BİYOSENTEZİ VE GLİKOLİZ YOLAKLARININ
İNHİBİSYONUNUN PANKREATİK ADENOKARSİNOMA
TEDAVİSİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

AYBIKE SARIOĞLU BOZKURT

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2024



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA
ANA BİLİM DALI



**POLİAMİN BİYOSENTEZİ VE GLİKOLİZ YOLAKLARININ
İNHİBİSYONUNUN PANKREATİK ADENOKARSİNOMA
TEDAVİSİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Aybike SARIOĞLU BOZKURT

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:
Prof.Dr. Nazmiye GÜNEŞ

DDP(V)-2020/1- UÜBAP

1649B032100139, 2211/C- TÜBİTAK

BURSA-2024

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum “**Poliamin Biyosentezi ve Glikoliz Yolaklarının İnhibisyonunun Pankreatik Adenokarsinoma Tedavisindeki Etkinliğinin Değerlendirilmesi**” 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.

Aybike SARIOĞLU BOZKURT

Tarih ve İmza

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

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

Adı Soyadı: Aybike SARIOĞLU BOZKURT

Ana Bilim Dalı: Veteriner - Biyokimya

Tez Konusu: Poliamin Biyosentezi ve Glikoliz Yolaklarının İnhibisyonunun Pankreatik Adenokarsinoma Tedavisindeki Etkinliğinin Değerlendirilmesi

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>AÇIKL.</u>
Tezin Boyutları	■	☐	
Dış Kapak Sayfası	■	☐	
İç Kapak Sayfası	■	☐	
Kabul Onay Sayfası	■	☐	
Sayfa Düzeni	■	☐	
İçindekiler Sayfası	■	☐	
Yazı Karakteri	■	☐	
Satır Aralıkları	■	☐	
Başlıklar	■	☐	
Sayfa Numaraları	■	☐	
Eklerin Yerleştirilmesi	■	☐	
Tabloların Yerleştirilmesi	■	☐	
Kaynaklar	■	☐	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Nazmiye GÜNEŞ

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak

İç Kapak

ETİK BEYANI.....II

KABUL ONAY.....III

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU.....IV

İÇİNDEKİLER.....V

TÜRKÇE ÖZET VIII

İNGİLİZCE ÖZET IX

TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA
HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ.....X

1.GİRİŞ 1

2.GENEL BİLGİLER..... 5

2.1.Tümör Gelişiminde Glikolizin Önemi 6

2.1.2. Glikolizin Anti-Tümörojenik Bir Yaklaşım Olarak Hedeflenmesi..... 9

2.1.3. Tümör Hücre Glikolizin PFKFB Enzimleri Tarafından Regülasyonu 10

2.1.4. Anti-Glikolitik ve Anti-Tümörojenik Bir Yaklaşım Olarak PFKFB
Enzimlerinin Hedeflenmesi..... 14

2.2. Tümör Gelişiminde Poliamin Biyosentez Yolağının Önemi ve Anti-Tümörojenik
Bir Yaklaşım Olarak Hedeflenmesi 16

2.3. PDAK Gelişiminde Glikolizin ve Poliamin Biyosentez Yolağının Önemi ve
Terapötik Olarak Hedeflenmesi 18

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER..... 22

3.1. Gereçler 22

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları, Kimyasal ve Sarf Malzemeleri 22

3.1.2. Protein İzolasyonu ve Western Blotlamada Kullanılan Çözeltiler 24

3.2. Yöntemler..... 25

3.2.1. Hücre Kültürü..... 25

3.3. PFKFB3 ve ODC1 mRNA Ekspresyonlarının siRNA Aracılığıyla Baskılanması
..... 25

3.4. PFKFB3 ve ODC1 Aktivitelerinin Farmakolojik Olarak İnhibisyonu 26

3.5. mRNA Ekspresyon Analizleri 26

3.5.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi..... 26

3.5.2. Gerçek-Zamanlı Kantitatif PCR Analizi 27

3.5.3. Protein İzolasyonu ve Western Blot Analizleri..... 27

3.6. Fruktoz-2,6- Bisfosfat Analizi 28

3.7. Glikoz ve Laktat ölçümü	29
3.8. Onkojenik Potansiyel Deneyleri	29
3.8.1. Hücre Proliferasyonu ve Sitotoksite Analizleri	29
3.8.2. Yumuşak Agarda Büyüme Deneyi	30
3.8.3. Koloni Oluşturma Deneyi	30
3.8.4. İnvazyon Analizi	30
3.9. İstatistiksel Analizler	31
4. BULGULAR	32
4.1. Pankreas Tümörlerinde PFKFB3 ve ODC1 Ekspresyonu Artmaktadır	32
4.2. PFKFB3 ve ODC1 Enzimlerinin siRNA Aracılı Baskılanmasının PFKFB3 ve ODC1 mRNA ve Protein Ekspresyonları Üzerine Etkisi	33
4.2.1. PFKFB3 ve ODC1'in siRNA Aracılı Baskılanması Sonrası F2,6BP Seviyeleri Üzerine Etkisi	37
4.2.2. PFKFB3 ve ODC1'in siRNA Aracılı Baskılanması Sonrası Glikolitik Aktivite Üzerine Etkisi	38
4.2.3. PFKFB3 ve ODC1'in siRNA Aracılı Baskılanmasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi	39
4.3. PFKFB3 ve ODC1 Enzimatik Aktivitelerinin PANC1 ve MIA PaCa-2 Hücrelerinde Özgün Kimyasal İnhibitörler Kullanılarak Farmakolojik Olarak İnhibe Edilmesi	41
4.3.1. PANC1 ve MIA PaCa-2 Hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1 inhibitörlerinin Etkin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	41
4.3.2. PFKFB3 ve ODC1 Enzimlerinin Farmakolojik İnhibisyonlarının PFKFB3 ve ODC1 mRNA ve Protein Ekspresyonları Üzerine Etkisi	42
4.3.3. PFKFB3 ve ODC1 Enzimlerinin Farmakolojik İnhibisyonlarının F2,6BP Seviyesi Üzerindeki Etkisi	45
4.3.4. PFKFB3 ve ODC1 Enzimlerinin Farmakolojik İnhibisyonlarının Glikolitik Aktivite Üzerine Etkisi	46
4.3.5. PFKFB3 ve ODC1 Enzimlerinin Farmakolojik İnhibisyonlarının PDAK Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi	47
4.4. PFKFB3 ve ODC1 Enzimlerinin Farmakolojik Olarak Tekli ve Kombine İnhibisyonlarının PDAK Hücrelerinin Onkojenik Potansiyelleri Üzerine Etkisi	48
4.4.1. PFKFB3 ve ODC1 Enzimlerinin Farmakolojik İnhibisyonlarının PDAK Hücrelerinin Yumuşak Agarda Tutunmadan Bağımsız Büyümesine Etkisi	48
4.4.2. PFKFB3 ve ODC1 Enzimlerinin Farmakolojik İnhibisyonlarının PDAK Hücrelerinin Koloni Oluşturma Potansiyeli Üzerine Etkisi	51
4.4.3. PFKFB3 ve ODC1 Enzimlerinin Farmakolojik İnhibisyonlarının PDAK Hücrelerinin Matrijel İnvazyonu Üzerine Etkisi	53
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	54

6.KAYNAKLAR	68
7.SİMGE VE KISALTMALAR.....	84
8.EKLER.....	87
8.1.Şekiller Listesi.....	86
8.2.TablolarListesi.....	87
9.TEŞEKKÜR	89
10.ÖZGEÇMİŞ.....	90

TÜRKÇE ÖZET

Pankreas kanserlerinde 5-yıllık sağ kalım oranı yaklaşık %6-8 dolaylarında olup yeni tedavi yaklaşımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Pankreas kanserlerinin büyük çoğunluğunu oluşturan pankreatik duktal adenokarsinom (PDAK)'ların %90'ından fazlasında KRAS geninin aktive edici mutasyonlarına rastlanmaktadır. KRAS aktivasyonu PDAK hücrelerinin özgün metabolik bağımlılıklar geliştirmesine neden olur. Yapılan çalışmalar KRAS'ın glikoliz ve poliamin biyosentezi yollarının aktivitesini arttırdığını göstermektedir. Bu tez çalışmasında; KRAS mutasyonuna sahip olan ve metabolik olarak agresif oldukları bilinen PDAK hücre modellerinde glikolitik regülatör 6-fosforukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bisfosfataz-3 (PFKFB3) ve poliamin biyosentez yolağı hız sınırlayıcı enzimi ornitin dekarboksilaz (ODC1)'ın genetik ve farmakolojik yöntemler kullanılarak tekli ve kombine inhibisyonlarının hücrelerin in vitro metabolik, proliferatif ve onkojenik potansiyelleri üzerindeki etkisi araştırıldı. Çalışmada hücre modelleri olarak PANC1 ve MIA PaCa-2; genetik baskılama yöntemi olarak siRNA ve farmakolojik hedefleme olarak PFKFB3 için AZ PFKFB3 26 (AZP3-26) ve ODC1 için diflurometilornitin (DFMO) kullanıldı. qPCR, Western blot, F2,6BP ve metabolik analizler PDAK hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1'nin birbirlerinin aktivitelerini düzenleyebildiğini gösterdi. PFKFB3 ve ODC1 aktivitelerinin siRNA ve özgün kimyasal inhibitörlerle birlikte baskılanması PDAK hücrelerinin proliferasyonunu tekli baskılamalara göre daha yüksek oranda azalttı. PFKFB3 ve ODC1 aktivitelerinin AZP3-26 ve DFMO ile inhibisyonu tekli kullanımlara göre her iki hücre hattının yumuşak agarda büyüme ve koloni oluşturma kapasitelerini önemli oranda düşürdü. Ayrıca PANC1 hücrelerinde, AZP3-26 ve DFMO'un birlikte kullanımı, tekli kullanımlara göre, hücrelerin Matrijel invazyon kapasitesini daha anlamlı olarak azalttı. Bu tez çalışması kapsamında elde edilen veriler; metabolik agresifliği ve plastisitesi ile öne çıkan PDAK tümörlerinde PFKFB3 ve ODC1 aktivitelerinin baskılanmasının in vitro olarak tekli inhibisyonlara göre daha kuvvetli anti-onkojenik etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Pankreas duktal adenokarsinomu, ODC1, PFKFB3, DFMO, AZ PFKFB3 26.

İNGİLİZCE ÖZET

INVESTIGATION OF THE EFFECTIVENESS OF POLYAMINE BIOSYNTHESIS AND GLYCOLYSIS INHIBITIONS IN THE TREATMENT OF PANCREATIC ADENOCARCINOMA

The 5-year survival rate for pancreatic cancer is approximately 6-8%, and new treatment approaches are needed. Activating mutations of the KRAS gene are found in more than 90% of pancreatic ductal adenocarcinomas (PDAC), which constitute the majority of pancreatic cancers. KRAS activation causes PDAC cells to develop unique metabolic dependencies. Studies show that KRAS increases the activity of glycolysis and polyamine biosynthesis pathways. In this thesis study; the effect of single and combined targeting the glycolytic glycolytic regulator 6-phosphoructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) and the polyamine biosynthesis pathway rate-limiting enzyme ornithine decarboxylase (ODC1) using genetic and pharmacological approaches on the metabolic, proliferative and oncogenic potential of mutant KRAS bearing PDAC cell models. PANC1 and MIA PaCa-2 were used as cell models; siRNA was used as a genetic suppression method and AZ PFKFB3 26 (AZP3-26) for PFKFB3 and difluoromethylornithine (DFMO) for ODC1 were used as pharmacological targeting. qPCR, Western blot, F2,6BP and metabolic analyzes showed that PFKFB3 and ODC1 could regulate each other's activities in PDAK cells. Co-suppression of PFKFB3 and ODC1 activities with siRNA and specific chemical inhibitors reduced the proliferation of PDAK cells more than single suppressions. Inhibition of PFKFB3 and ODC1 activities with AZP3-26 and DFMO significantly reduced the growth and colony formation capacities of both cell lines in soft agar compared to single use. Additionally, in PANC1 cells, the combined use of AZP3-26 and DFMO reduced the Matrigel invasion capacity of the cells more significantly than single use. Data obtained within the scope of this thesis study suggest that combined targeting of PFKFB3 and ODC1 activities in PDAC tumors, which are known to exhibit elevated metabolic aggressiveness and plasticity, may have a stronger anti-oncogenic effect than single inhibitions in vitro.

Key words: Pancreatic ductal adenocarcinoma, ODC1, PFKFB3, DFMO, AZ PFKFB3 26.

BUÜ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA
HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ

					
☐	☐	☒	☐	☐	☐
					
☐	☐	☐	☐	☐	☐
					
☐	☐	☐	☐	☐	☐

Doktora tezi olarak sunduğum **“Poliamin Biyosentezi ve Glikoliz Yolaklarının İnhibisyonunun Pankreatik Adenokarsinom Tedavisindeki Etkinliğinin Değerlendirilmesi”** başlıklı tez 3. Küresel Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri ile ilişkilidir.

Anahtar kelimeler: Pancreatic cancer, Anti-cancer agent, Cancer drugs.

1.GİRİŞ

Pankreas kanserlerinin büyük bir çoğunluğunu (%95) oluşturan Pankreatik Duktal Adenokarsinom (PDAK), %6-8 dolaylarında 5-yıllık sağkalım oranı ile ölümcül kanserlerin başında gelmektedir (Diab, Azmi, Mohammad, & Philip, 2019; Park, Chawla, & Reilly, 2022). Teşhiste, hastaların %80'inden fazlasında cerrahinin endike olmadığı lokal metastatik ya da ileri evre hastalık ile karşılaşılır. Gemsitabin ve albümin-bağılı paklitaksel nanopartikül kombinasyonu (GEM+nab-P) ya da 5-florourasil, lökovorin, okzaliptin ve irinotekan kombinasyonu (FOLFIRINOX), metastatik pankreas kanserlerinin standart kemoterapi seçeneklerini oluşturmaktadır (Diab ve ark., 2019). Diğer bazı kanser türlerinde başarı gösteren hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının (Baudino, 2015) henüz PDAK'da kullanımı yoktur. Bu nedenle, PDAK'a özgün moleküler hedeflerin keşfine ihtiyaç duyulmaktadır. PDAK'ların %90'ından fazlasında KRAS proto-onkogeninin aktive edici mutasyonlarına rastlanmakta olup, PDAK hücreleri onkojenik özelliklerinin devamında hiperaktif KRAS sinyalizasyonuna bağımlılık gösterir (Bryant, Mancias, Kimmelman, & Der, 2014; Kawada, Toda, & Sakai, 2017). Ancak; klinikte direkt olarak KRAS'ı inhibe etmeye yönelik girişimler (KRASG12C mutasyonu hariç) büyük oranda başarısızlıkla sonuçlanmıştır (Bryant ve ark., 2014; Diab ve ark., 2019; Mann, Ying, Juan, Jenkins, & Copeland, 2016; Strickler ve ark., 2023). Hiperaktif KRAS sinyalizasyonu ile ilişkili olan ve PDAK hücrelerinin onkojenitesi için seçici olarak gerekli "downstream" (aşağı akım) elemanların aydınlatılması PDAK'ın tedavisi için yenilikçi tedavilerin geliştirilmesine katkı sunabilir (Kawada ve ark., 2017; Liang ve ark., 2016; Mann ve ark., 2016; Perera & Bardeesy, 2015). Son zamanlarda yapılan çalışmalar; mutant KRAS'ın PDAK hücrelerinde yaygın olarak karşılaşılan metabolik yeniden programlama ile ilişkili olduğu ve PDAK hücrelerinin malin özelliklerinin devamı için bazı metabolik enzimlere bağımlılık geliştirdiğine işaret etmektedir (Suzuki ve ark., 2022). Genel olarak anti-kanser etkili yalnızca birkaç metabolizmaya dayalı ilaç geliştirilmiştir ve bunların yalnızca bir kısmı klinik deneylerde kullanılmakta olup (Stine, Schug, Salvino, & Dang, 2022); geliştirilen anti-metabolitlerin henüz PDAK'da kullanımı bulunmamaktadır.

Kanser hücrelerinde görülen en önemli metabolik değişikliklerden bir tanesi glikozun “*Warburg etkisi*” veya *aerobik glikoliz* adı verilen metabolik yolak ile metabolizmasının hızlanmasıdır (De Berardinis & Chandel, 2016; Hanahan & Weinberg, 2011). 6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bisfosfataz (PFKFB) enzim ailesi üyeleri (PFKFB1–4), glikolizin önemli bir hız sınırlayıcı reaksiyonunu katalizleyen 6-fosfofrukto-1-kinaz (PFK1)’in allosterik aktive edicisi fruktoz-2,6 bisfosfat (F2,6BP) molekülünün yapım ve yıkımından sorumludur (Chesney, 2006). PFKFB3 izoenziminin, çeşitli insan kanserlerinde aşırı eksprese edildiği bilinmektedir (Brian F. Clem ve ark., 2013). Yapılan son çalışmalar; kanserde görülen hiperglikolitik aktiviteye katkı yapan PFKFB enzimlerinin onkojenik transformasyon (Telang ve ark., 2006), kanser hücresi proliferasyonu (Abdullah Yalcin ve ark., 2009), anjiyogenez (Xu Y, An X, Guo X, Habtetsion TG, Wang Y, Xu X, Kandala S, Li Q.... Wu, C. 2013), ilaç direnci (Lu, Qiao, Sun, Ren, & Yu, 2021) ve tümör mikro ortamı (Da ve ark., 2023) dâhil olmak üzere kanserin birçok yönüyle ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu nedenle PFKFB enzimleri, antineoplastik tedavi için potansiyel bir hedef olarak görülmeye başlanmıştır (Brian F. Clem ve ark., 2013). Özellikle diğer izoenzimlere göre yüksek kinaz aktivitesine sahip olması ve tümörlerde yaygın ekspresyonu nedeniyle PFKFB3, tümör hücrelerinin hızlanmış glikoz alımı ve glikolitik aktiviteye bağımlılığının hedeflenmesi ile beraber malin özelliklerin kontrol altına alınmasında terapötik bir hedef olarak değerlendirilmektedir (Bartrons ve ark., 2018; Cantelmo ve ark., 2016; Brian F. Clem ve ark., 2013; Dasgupta ve ark., 2018). Bununla birlikte, PDAK gibi kompleks bir metabolik programlamaya ve plastisiteye (farklı şartlara adaptasyon kabiliyeti olan) sahip tümörlerde (Liang ve ark., 2016) PFKFB enzimlerinin tek başlarına hedeflenmesinin, klinikte yararının olmayacağı ya da sınırlı olacağı öngörülebilir. Bunun yerine PFKFB enzimleri ile etkileşime girebilecek yeni moleküler hedeflerin ya da mevcut anti-tümörojenik ajanların araştırılması, PDAK’a karşı umut vadeden yenilikçi tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı yapabilir.

Yapılan çalışmalar kanser hücrelerinde, glikolize ek olarak, poliamin biyosentez yolağının aktivitesinin arttığını göstermektedir (Gerner & Meyskens, 2004). Tümör hücrelerinde yoğun bir şekilde sentezlenen poliaminler (putresin, spermin ve spermidin) hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması, gelişimi, bağışıklık,

göç, gen regülasyonu, DNA stabilitesi, protein ve nükleik asit sentezi gibi birçok önemli işleve sahiptir (Moinard, Cynober, & de Bandt, 2005; Anthony E. Pegg, 2009; Yuan, Ray, Viar, & Johnson, 2001). Ornitin dekarboksilaz (ODC1), memelilerdeki poliamin biyosentez yolağının kritik bir enzimi olup hız sınırlayıcı reaksiyonunu (ornitinden putresin oluşumu) katalize etmektedir (Gerner & Meyskens, 2004). Çoğu PDAK vakalarında mutasyonu görülen onkojenik KRAS ve transkripsiyon faktörü MYC proteinleri, *ODC1* geninin transkripsiyonunu indükler (Linsalata ve ark., 2004). Yapılan bir çalışmada (Mohammed ve ark., 2014), *ODC1*'in geri dönüşümsüz inhibitörü olan diflorometilornitin (DFMO)'nin KRAS-bağımlı spontan fare pankreas kanseri modelinde tümöröjenezi engellediği gösterilmiştir. Bu çalışma KRAS-ilişkili tümörlerde *ODC1*'in bir tedavi hedefi olarak değerlendirilebileceği görüşünü desteklemektedir. Bununla birlikte tümör oluşumu gerçekleşikten sonra DFMO'nun antitümoral etkisi son derece sınırlıdır (Alexiou, Lianos, Ragos, Galani, & Kyritsis, 2017). Bu durum da tümör gelişimi ve ilerlemesi aşamasında hücrelerin alternatif metabolik yolları kullanmasından ve /veya hücre dışından poliamin alımını arttırmasından kaynaklanabilir. Bu nedenle *ODC1* ile etkileşime girebilecek farklı bir moleküler hedef ya da metabolik yolağın birlikte hedeflenmesi genel olarak kanserlerin ve özelde PDAK'ın tedavisinde umut verici bir tablo sunabilir.

Mutant KRAS taşıyan PDAK tümör hücrelerinde glikoliz ve poliamin biyosentez yollarının aktivasyonunun hücrelerin proliferasyonu ve onkojenik potansiyelleri için gerekli olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Alexiou ve ark., 2017; Hamanaka & Chandel, 2012). Bununla birlikte her iki yolağın birlikte hedeflenmesinin tümör hücreleri üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada (Ruiz-Pérez, Medina, Urdiales, Keinänen, & Sánchez-Jiménez, 2015), poliamin biyosentez yolağı ile glikolizin ilişkili olabileceği ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmada glikolizin heksokinaz adımında inhibisyonunun *ODC1* aktivitesindeki düşmeye bağlı olarak poliamin sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada, mekanistik olarak da *ODC1* inhibisyonunun bu etkiyi kısmen de olsa hücre siklusu inhibitörleri olan p21/p27 üzerinden gerçekleştirdiğine dair veriler sunulmuştur. Yalcin A. ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada tümör hücrelerinde glikolizin PFKFB3 üzerinden inhibisyonunun da p27 üzerinden tümör

hücrelerinin proliferasyonunu durdurduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen veriler; glikoliz ve poliamin sentez yolağının PFKFB3 ve ODC1 enzimleri üzerinden kombine inhibisyonları ile tümör hücreleri üzerinde daha kuvvetli bir anti-proliferatif elde edebileceği öngörüsünü desteklemektedir.

Bu doktora tez çalışmasında; KRAS mutasyonuna sahip olan ve metabolik olarak agresif oldukları bilinen iki farklı PDAK hücre modeli kullanılarak glikolitik regülatör PFKFB3 ve poliamin biyosentez yolağı hız sınırlayıcı enzimi ODC1'in genetik ve farmakolojik yöntemler kullanılarak tekli ve kombine inhibisyonlarının hücrelerin in vitro metabolik, proliferatif ve onkojenik potansiyelleri üzerindeki etkisi incelenerek elde edilen sonuçlar güncel çalışmalar ışığında tartışılarak sunuldu.

2.GENEL BİLGİLER

Kanser, tüm dünyada olduğu gibi Türkiye’de de en önemli halk sağlığı problemleri arasındadır. Hem dünyada hem de ülkemizde kanser, ölüm nedenleri içerisinde ikinci sırada yer almaktadır. Dünya genelinde yaklaşık her 6 ölümden biri, ülkemizde ise her 5 ölümden biri maalesef kanser nedeniyle olmaktadır (www.gco.iarc.fr; McGuire, 2016)). 2018 yılında dünya genelinde 18 milyon kişinin kansere yakalandığı tahmin edilirken, 2040 yılına gelindiğinde bu rakamın yaklaşık 30 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (Sung ve ark., 2021). Dünya nüfusunun artması, yaşlanması ve etiyolojik nedenlere daha çok maruz kalması sonucunda görülecek kanser insidanslarındaki artış, beraberinde artmış kanser yükünü de getirecektir (Kara, & Keskinçilic, 2017). Kanser yükünün bu hızlı artışı dünya çapında önemli bir kriz teşkil etmekte ve gelecekte kaynakları bol olan ülkeler de dahi, tanı alacak çok sayıdaki kanser hastasının tedavisi ile palyatif, destekleyici ve ölüm aşamasındaki bakımları yönünden yeterli ödenek temin edilmesi büyük bir sorun olacaktır (Sung ve ark., 2021).

Kanserlerin tedavisinde cerrahi rezeksiyon, geleneksel sitotoksik kemoterapi ve radyoterapi başvuru başlıca seçenekler arasındadır. Bunun yanında özellikle 2000’li yılların başından itibaren kanser genomunda meydana gelen değişikliklerin daha iyi anlaşılması ve omik yaklaşımlarının gelişmesi ile hedefli tedavi seçeneklerinin (ör. mutant epidermal büyüme faktörü ve Bcr-Abl füzyon proteini inhibitörleri) onkoloji kliniklerine girmesiyle bazı kanser alt gruplarının tedavisinde önemli başarılar kazanılmıştır (Min, & Lee, 2022). Ek olarak tümör mikro çevresinin ve immun sistemin tümör gelişimindeki rolünün aydınlatılması ile beraber kanser immunterapi alanındaki girişimler klinikte hedefli ve kişisel kanser tedavilerin bir parçası olmaya başlamıştır (Waldman, Fritz, & Lenardo, 2020). Bununla birlikte hedefe yönelik tedaviler ve immunoterapinin, bazı agresif kanser türlerinde ya kullanılmamakta ya da başarısı son derece kısıtlı olmaktadır (Sabnis, & Bivona, 2019). Bu nedenle, güncel çalışmalar; bir taraftan yeni moleküler hedeflerin terapötik açıdan validasyonuna odaklanırken; giderek artan sayıdaki çalışma mevcut kemoterapötik, immunoterapi ve hedefli tedaviler ile kombine edilebilecek moleküler hedeflerin ortaya çıkarılmasına yönelmiş durumdadır (Ayoub, 2021; Mokhtari ve

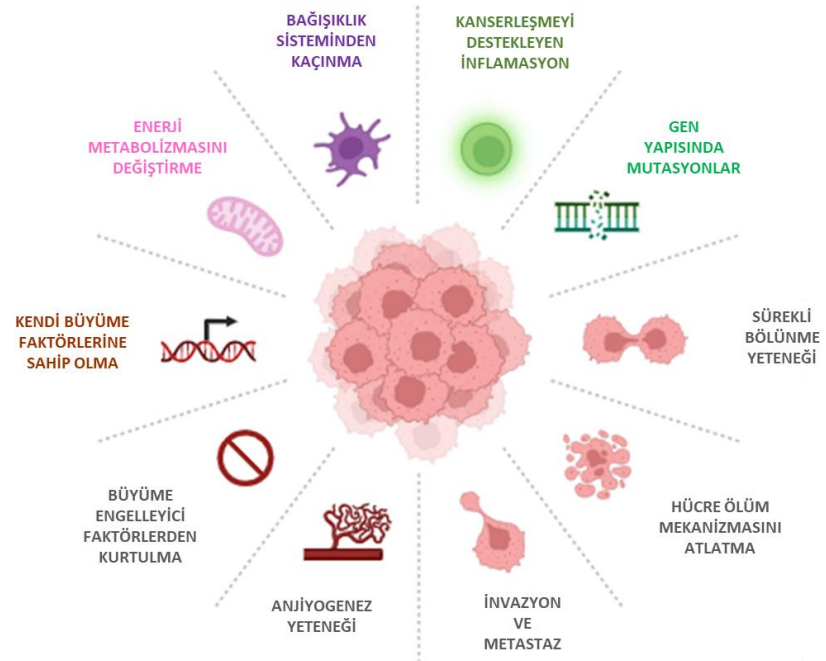
ark., 2017). Kombinasyon tedavilerin başarı şansının, özellikle tümörlerin genetik ve fenotipik plastisitesi dikkate alındığında, daha fazla olacağı değerlendirilmektedir (Boshuizen, & Peeper, 2020).

2.1.Tümör Gelişiminde Glikolizin Önemi

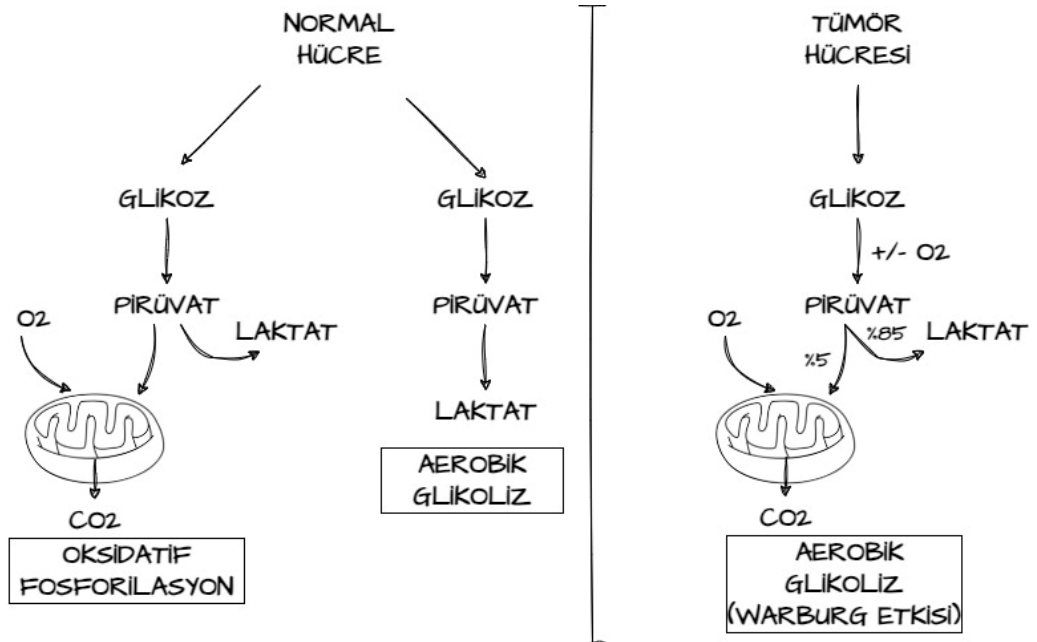
Özellikle hücreSEL enerji ve sentez yolları ile ilişkili *metabolik yeniden programlama* kanserin ayırt edici özelliklerinden birisi olarak kabul edilmektedir (Şekil-1) (De Berardinis, & Chandel, 2016; Hanahan, & Weinberg, 2011). Kanser hücreleri kontrolsüz çoğaldıkları için normal hücrelere kıyasla daha fazla enerjiye ve sentetik yollar için besin maddeleri ve bunlardan elde edilen metabolitlere ihtiyaç duyarlar (De Berardinis, & Chandel, 2016). Glikoz şekerinin hücre içerisine alınımı ve glikoliz adı verilen metabolik yolla hızlanmış metabolizması kanser hücrelerinin en belirgin metabolik özelliklerinden biridir (Lin, Xiao, Chen, Liang, & Guo, 2020). Normal hücrelerde glikoliz sonucu oluşan pirüvatın önemli bir kısmı tamamen oksitlenmek için mitokondriye girerek oksidatif fosforilasyon ile en az yaklaşık 36 ATP elde edilir (Liberti, & Locasale, 2016). Ancak onkogenik olarak transforme olan hücrelerde glikoliz sonucu oluşan pirüvatın önemli bir kısmı sitoplazma laktat dehidrojenaz (LDH) enzimi tarafından laktat molekülüne indirgenir (Şekil-2). Hatta bu işlem oksijen varlığında dahi devam eder. Yaklaşık bir asır önce Alman Bilim insanı Otto Warburg tarafından yapılan bu gözlem *aerobik glikoliz* ya da “*Warburg etkisi*” olarak bilinmektedir ve kanserin ayırt edici özelliklerinden biri olan enerji metabolizmasındaki yeniden programlanmada merkezi bir rol oynar (Schwartz, L., Supuran, C.T., & Alfarouk, K. O. (2017). Glikozun glikoliz yoluyla ile metabolizmasındaki hızlanmaya bağlı olarak kanser hücrelerinde gözlemlenen glikoz alımındaki artış klinikte birçok solid kanserin teşhis ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesine kullanılan floro-deoksiglikoz pozitron emisyon tomografi (FDG-PET) taramasının temelini oluşturur (Miles, & Williams, 2008). Glikozun aerobik glikoliz ile laktik asite fermentasyonu, pirüvik asitin mitokondride tamamen oksitlenmesi ve oksidatif fosforilasyon ile karşılaştırıldığında çok daha az sayıda ATP (2 ATP) üretir; ancak, mitokondride oksitlenme yerine pirüvik asitin laktik asit oluşumuna yönlendirilmesi glikozun glikoliz yoluyla metabolizmasının dramatik bir artışına neden olur (yaklaşık 100 kat daha hızlı) (Liberti, & Locasale, 2016).

Dolayısıyla, normalde görülen oksidatif fosforilasyon ile karşılaştırıldığında glikoz molekülü başına daha fazla ve daha hızlı ATP sentezlenir (De Berardinis, & Chandel, 2016; Hanahan, & Weinberg, 2011).

Hızlanmış glikoliz kanser hücrelerinin ihtiyaç duyduğu enerjinin hızlı temini yanında; hücre çoğalması için gerekli olan anabolik yollara ara metabolit sağlamaktadır. Örneğin glikolizin ilk hız sınırlayıcı enzimi olan hekzokinazın ürünü glikoz-6-fosfat, aynı zamanda kanser hücrelerinin önemli oranda ihtiyaç duyduğu antioksidan NADPH ve riboz-5-fosfatın kaynağı pentoz fosfat geçidi için başlatıcı bir substrattır. Diğer bir glikolitik ara ürün dihidroksi asetonfosfat, trigliserit sentezi için gerekli gliserol öncüsü olarak görev yaparken; 3-fosfogliserrattan serin amino asidi sentezlenir. Kanser hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilen LDH enzimi tarafından oluşturulan laktik asit; tümör mikro çevresinin şekillendirilmesi, invazyon ve apoptoza direnç gibi birçok malin özellikle ile ilişkilendirilmiştir (Liberti, & Locasale, 2016). Yapılan çalışmalar (Yu, Chen, Sun, Wang, & Chen, 2017); tümör hücrelerindeki glikoz metabolizmasının yeniden programlanmasının onkojenik elementler (onkogen ve tümör baskılayıcı genler) ve büyüme faktörü-ilişkili yolların kontrolü altında olduğunu göstermektedir. RAS, MYC, HIF-1 α vb. onkojenik proteinlerinin aktivasyonu ile p53 ve PTEN gibi tümör baskılayıcı proteinlerin inhibisyonu aerobik glikolizi ve laktat sentezini indükler. Diğer taraftan glikoz alımı ve aerobik glikolizde görevli birçok kritik enzim, büyüme faktörü reseptörleri ile ilişkili PI3K/AKT/mTOR ve MAPK yollarının transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel hedefleri arasındadır (Thompson, & Bielska, 2019).



Şekil-1: Kanserin ayırt edici özellikleri. (Hanahan, & Weinberg, 2011).



Şekil-2: Normal ve tümör hücrelerinde glikoz metabolizması.

Normal hücrelerde glikoliz yoluyla elde edilen pirüvatın önemli bir kısmı oksijen varlığında mitokondriye geçerek tamamen oksitlenir. Tümör hücrelerinde ise oksijen varlığında dahi pirüvat sitoplazmada laktat sentezine yönlendirilir (aerobik glikoliz) (Xia ve ark., 2021)'dan esinlenerek çizilmiştir.

2.1.2. Glikolizin Anti-Tümörojenik Bir Yaklaşım Olarak Hedeflenmesi

Yaklaşık son 20 yıl içerisinde yapılan çalışmalar ile aerobik glikolizin moleküler temellerinin RAS, HIF-1 α , MYC, PI3K/AKT/mTOR vb. onko-genetik elementler ve -sinyal yolları ile açıklanmaya başlaması ve bu fenotipin; tümör gelişimi, metastaz ve kemoterapi direnci vb. malin özellikleri için gerekliliğinin ortaya konulması, glikolitik yolağın terapötik bir hedef olarak değerlendirilmesine yönelik girişimlerin artmasına neden olmuştur (Doherty, & Cleveland, 2013). Bu amaçla, tümör hücrelerinde normal hücrelere göre daha fazla eksprese edilen/aktivite gösteren glikolizin önemli kontrol noktaları—özellikle heksokinaz (HK), pirüvat kinaz (PK) ve LDH—ile beraber kanser hücrelerine artan glikoz alımından sorumlu glikoz taşıyıcısı 1 (GLUT1)’i hedefleme girişimleri ile ilgili çalışmalar başı çekmektedir (Fortunato, Bononi, Granchi, & Minutolo, 2018). Tümör hücrelerinde yoğun bir şekilde eksprese edilen heksokinaz 2 (HK2) enzimini inhibe eden 2-deoksi-D-glikoz (2-DG), 3-bromopirüvat (3-BrPA), Genistein-27 ve Ionidamin gibi bileşikler in vitro ve prelinik modellerde kanser hücre glikolizini baskılamada ve tümör hücre proliferasyonu engellemede önemli başarı göstermektedir (Kubik, Humeniuk, Adamczuk, Madej-Czerwonka, & Korga-Plewko, 2022). Güçlü bir heksokinaz inhibitörü olan 3-BrPA, hipoksik veya mitokondriyal kusurlara sahip tümör hücrelerinde ATP konsantrasyonlarını belirgin şekilde azaltarak sitotoksositeye yol açmaktadır (Geschwind ve ark., 2004; Ko, Pedersen, & Geschwind, 2001). Anti-glikolitik ajanlar içerisinde faz çalışmalarına kadar ilerleyebilen HK inhibitörü 2-DG (NCT00633087), yarışmaya girdiği substrat olan glikozun fizyolojik olarak çok yüksek konsantrasyonlarda bulunması nedeniyle, tümör gelişimini baskılamak için gerektirdiği yüksek doz toksisiteye sebep olmaktadır (Raez ve ark., 2013; Stein ve ark., 2014). Beyin gibi enerji amaçlı glikoza bağımlı dokular ve glikozun HK enzimleri tarafından metabolize olduktan sonra glikoliz yanında normal hücresel homeostaz için gerekli birçok farklı metabolik yolağa (ör. ROS dengelenmesi için pentoz fosfat geçidi) yönlendirilmesi dikkate alındığında, glikoz alımının ve glikolizin ilk basamaklarında inhibisyonu, terapötik açıdan uygun bir strateji olmayabilir. Aerobik glikolizin son adımı olan pirüvik asitin laktik asite indirgenmesini katalizleyerek kanser hücrelerinde hızlanmış glikolitik aktiviteye önemli katkıda bulunan LDH enzimine olan ilgi, laktik asitin tümör hücrelerinde

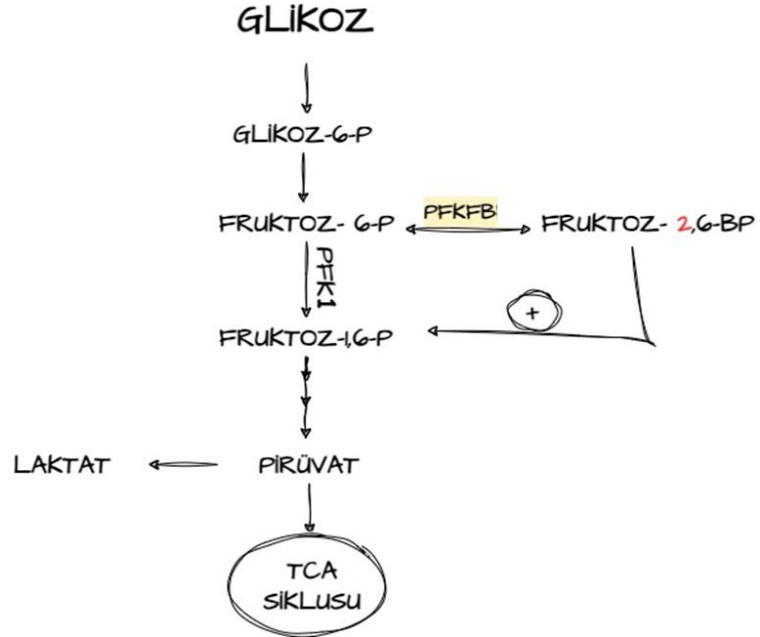
Krebs siklusunda anaplerotik bir substrat olarak kullanılması yanında tümör hücrelerinin invazyon, immun kaçış ve radyoterapiye direnç geliştirmesine katkısı nedeniyle, artarak devam etmektedir. Nitekim güncel bir çalışmada (Sharma, Sharma, Urquiza, Chastain, & Ihnat, 2023), milyonlarca küçük molekül içeren ZINC kütüphanesinin in siliko taranması sonra belirlenen potansiyel LDH ligandlarından ZINC13469319 adlı bileşiğin yüksek glikolitik aktivite gösteren pankreas adenokarsinom hücre hatları PANC1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde laktik asit oluşumunu baskıladığı ve düşük mikromolar konsantrasyonlarında hücrelere sitotoksik etki yaptığı gösterilmiştir. Tek başlarına veya farklı anti-tümörojenik moleküllerde kombine olarak özellikle in vitro tümör hücre glikolizi, hücre proliferasyonu ve invazif potansiyel vb. malin özellikleri baskılamada başarılı olan anti-glikolitik ajanlar yaygın toksisiteden dolayı preklinik testleri geçerek klinik denemelere ulaşamamıştır (Abdel-Wahab ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2022). Anti-glikolitik ajanların preklinik ve klinik modellerde rapor edilen toksisiteleri, bazı normal sağlıklı hücrelerin de (ör. kök hücreleri, nöronlar, kalp kası hücreleri vb.) glikolize ihtiyaç duymaları ile ilişkili olabilir ve bu durum direkt olarak glikolizi hedefleyen bileşiklerin terapötik dozda kullanılmasına engel olacak gibi durmaktadır (Abdel-Wahab ve ark., 2019). Glikolizi tamamen baskılamak yerine, glikolizin kritik basamaklarını kontrol eden ve farklı onkojenik yollar ile regülasyona tabi olan enzimlerin aktivitesinin baskılanarak onkojenik transformasyon ile artan glikolitik aktivitenin bazal düzeylere inmesine yönelik girişimler sistemik toksisiteye neden olmadan anti-tümörojenik olarak daha başarılı olabilir.

2.1.3. Tümör Hücre Glikolizin PFKFB Enzimleri Tarafından Regülasyonu

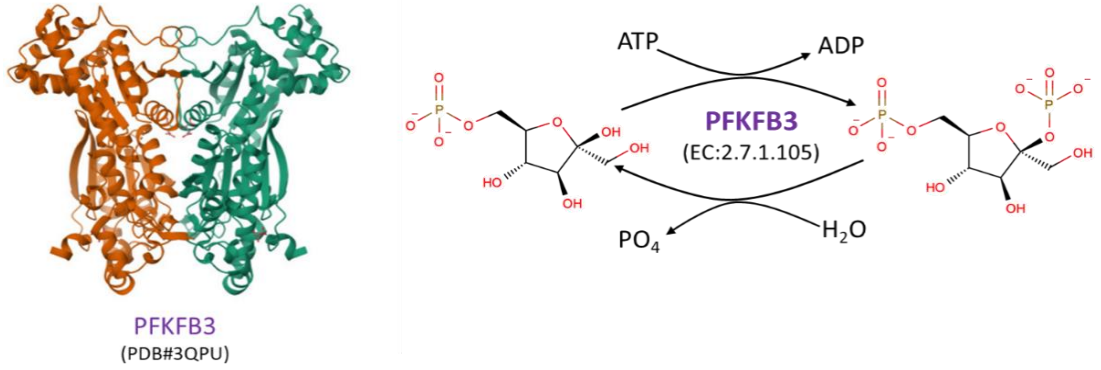
Glikolizde fruktoz 6-fosfat (F6P)'tan fruktoz 1,6-bisfosfat (F1,6BP) sentezi kritik bir kontrol noktası olup, 6-fosfofrukto-1-kinaz (PFK1) enzimi tarafından katalizlenir. PFK1'in memeli dokularında eksprese edilen kas (PFKM), karaciğer (PFKL) ve trombosit (PFKP) olmak üzere üç farklı izoformu bulunur. PFK1 ekspresyonu ve aktivitesindeki artış, tümör hücrelerindeki glikolitik aktivitenin hızlanmasına neden olur (Misuraca & Moore Hendrix Abernethy, 2013). Büyük bir tetramerik enzim olan PFK1'in aktivitesi, farklı allosterik modülatörler tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Hücre-içi sitrat ve ATP seviyesindeki artış PFK1 aktivitesini düşürür. PFK1 enzimi ürünü F1,6BP ile aynı kimyasal yapıya sahip

fruktoz-2,6-bisfosfat (F2,6BP); PFK1'in bilinen en güçlü allosterik aktivatörü olup PFK1 enziminin substratına (F6P) afinitesini arttırır ve ATP'nin PFK1 enzim aktivitesi üzerindeki baskılayıcı etkisini ortadan kaldırır (Şekil-3) (Chesney, 2006). Hücrelerdeki F2,6BP'nin sentezi ve yıkımı homodimerik 6-fosfofruko-2-kinaz/fruktoz 2,6-bisfosfaz (PFKFB) enzim ailesi tarafından gerçekleştirilir (Okar, & Lange, 1999; Pilkis, Claus, Kurland, & Lange, 1995).

Dört farklı gen tarafından kodlanan PFKFB enzimleri (PFKFB1–4) çift fonksiyonlu olup aynı polipeptit zinciri üzerindeki amino (N) ucu kinaz domeinleri ile ATP varlığında F6P'ı F2,6BP'a çevirirlerken; karboksi (C) ucu fosfazat domeinleri ile F2,6BP'ı F6P'a hidrolize ederler (Okar ve ark., 2001; Pilkis ve ark., 1995) (Şekil-4). Çekirdek katalitik bölgelerinde yüksek amino asit dizi homolojisine (~%85) sahip olan PFKFB enzimleri kinaz/fosfazat aktivite kinetikleri, doku ekspresyon profilleri ve regülasyonları açısından önemli farklılıklar sergiler (L. Li, Lin, Pilkis, Correia, & Pilkis, 1992; Rider ve ark., 2004). Üç nolu izoenzim, PFKFB3, en yüksek kinaz:fosfazat aktivite oranına sahiptir (~%85); dolayısıyla hücrelerde F2,6BP sentezinde ve PFK1'in aktivasyonunda önemli bir role sahiptir (Sakakibara ve ark., 1997). PFKFB3 ekspresyonu; mitojenik, inflamatuvar ve hipoksik uyaranlara yanıt olarak ve hücre döngüsünün DNA sentezi fazında artmaktadır (Shi, Pan, Liu, Xie, & Han, 2017).



Şekil-3: PFKFB enzimleri tarafından sentezlenen F2,6BP, glikolizin hız sınırlayıcı enzimi PFK1'i allosterik olarak aktive eder.



Şekil-4: PFKFB3 Enziminin Kristal Yapısı ve Katalizlediği Reaksiyon

PFKFB proteinlerinin farklı solid ve kan kanserlerindeki ekspresyonun arttığı bilinmektedir. Bunlardan özellikle PFKFB3 ve kısmen de PFKFB4'ün aralarında meme, pankreas, akciğer ve glioblastoma gibi agresif bazı agresif kanserlerdeki ekspresyonu artmaktadır (Kotowski ve ark., 2021). Diğer taraftan, farklı onkojenik elementler ve mitojenik faktörler tümör hücrelerinde PFKFB izoenzimlerinin ekspresyon ve aktivitesinde artışa neden olur (O. H. Minchenko, Tsuchihara, Minchenko, Bikfalvi, & Esumi, 2014). Hipoksik ortam ve buna bağlı olarak tümör

hücrelerinde stabilize olan hipoksi-ilişkili transkripsiyon faktörü 1 (HIF-1), tümör hücrelerindeki glikolitik aktivasyonun en kritik oyuncularından biri olup; bütün PFKFB genlerinin promotör bölgesi hipoksiye yanıt elemanı içerir (O. Minchenko, Opentanova, & Caro, 2003). Genel bir glikoliz aktivatörü olan HIF-1 α alt ünitesi (HIF-1 α), tümör hücrelerindeki ekspresyonu hipoksiden bağımsız olarak da artarak tümör hücre glikolizinin devamlılığında önemli bir fonksiyon görür (Semenza, 2012). Onkojenik RAS, aerobik glikolizin önemli bir aktivatörüdür (Chesney ve ark., 2014). PFKFB3 izoenziminin ekspresyonu ve aktivitesi, RAS proteinlerinin ilişkili olduğu PI3K/AKT/mTOR yolağının aktivasyonu ve HIF-1 α proteininin stabilizasyonu ile artar ve RAS-aracılı metabolik yeniden programlamada önemli bir rol oynar (Roy Blum, Jacob-Hirsch, Amariglio, Rechavi, & Kloog, 2005). Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) ekspresyonu, meme kanseri hücrelerinde PFKFB3 ekspresyonunu ve glikoz metabolizmasını artırır (O'Neal ve ark., 2016). *TP53*, *PTEN* ve diğer bazı tümör baskılayıcı genlerinin fonksiyon kaybı PFKFB3 ekspresyonu ve aktivitesini indükleyerek tümör hücre glikolizini uyarır (Cordero-Espinoza & Hagen, 2013; Zawacka-Pankau ve ark., 2011). Tümörlerde yaygın olarak ekspresyonu artan onkojenik MYC tarafından indüklenen glikolitik aktivitedeki artışta da PFKFB3 proteinin gerekli olduğu gösterilmiştir (Cargill ve ark., 2021). Transkripsiyonel ko-represör miyeloid translokasyon geni 16 (*MTG16*), glikoliz üzerinde bir fren görevi görebilir, mitokondriyal solunumu uyarabilir; PFKFB3 ve PFKFB4'ün baskılanması yoluyla hücre proliferasyonunu inhibe edebilmektedir (Kumar ve ark., 2013). Farklı mitojenik ve büyüme faktörü-ilişkili yolların transkripsiyonel ve posttranslasyonel modifikasyon yoluyla PFKFB proteinlerinin aktivitesinde artışa neden olduğu bilinmektedir. Örneğin progestin (Novellademunt ve ark., 2012) ve estradiol (Imbert-Fernandez ve ark., 2014), progesteron reseptörü (PR) ve östrojen reseptörünün (ER), PFKFB3 promotöründe bulunan kendi yanıt elemanları ile etkileşimleri yoluyla PFKFB3 ekspresyonunu indükler. İnsülin gibi büyüme faktörleri, interleukin 6 (IL-6) (Ando ve ark., 2010), lipopolisakkarit (LPS) ve adenozin gibi (Riera, Manzano, Navarro-Sabaté, Perales, & Bartrons, 2002) proinflamatuvar moleküller (Ruiz-García ve ark., 2011) veya farklı stres uyaranları (NaCl, H₂O₂, UV radyasyonu veya anizomisin) (Novellademunt ve ark., 2012), *PFKFB3* gen ekspresyon seviyelerini artırır. Diğer taraftan PFKFB3

proteinin hücresel enerji sensörü AMPK, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve MAPK bileşenlerinden ERK tarafından fosforlanarak kinaz aktivitesinin uyarılması, hücre-içi F2,6BP seviyelerinin artmasına ve glikolizin hızlanmasına neden olmaktadır (Jones, Pohlmann, Clarke, & Sengupta, 2022). PFKFB2'nin androjenler ve insülin tarafından uyarıldığı bilinmektedir (Bartrons ve ark., 2018; Novellasedemunt ve ark., 2013). PFKFB2 proteinin AKT (Novellasedemunt ve ark., 2013), AMPK (Keerthana ve ark., 2023) ve p90 ribozomal S6 kinaz (RSK) (Houles ve ark., 2018) tarafından farklı orijindeki tümörlerden elde edilen hücre hatlarında fosforlanarak kinaz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. Bütün bu çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde; onkojenik transformasyon ve mitojenik bazı uyarıların başta PFKFB3 olmak üzere PFKFB enzimlerinin transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel kinaz aktivitesini arttırarak tümör hücrelerindeki aerobik glikolizin aktivasyonuna neden olduğuna işaret etmektedir.

2.1.4. Anti-Glikolitik ve Anti-Tümörojenik Bir Yaklaşım Olarak PFKFB Enzimlerinin Hedeflenmesi

Glikolizin kritik bir kontrol noktası olan PFK1'in allosterik aktivatörü F2,6BP sentezini katalizlemeleri ve onkojenik elementler tarafından indüklenmeleri nedeniyle PFKFB enzimlerinin, tümör hücre glikolizini dolaylı olarak baskılamada yararlı bir terapötik hedef olabilecekleri değerlendirilmektedir (Brian F. Clem ve ark., 2013). Özellikle PFKFB3 izoenzimi yüksek kinaz:fosfataz aktivite oranına sahip olması (~760) ve tümörlerdeki yaygın ekspresyonu nedeniyle potansiyel bir anti-glikolitik bir hedef olarak dikkat çekmektedir (Dasgupta ve ark., 2018). Genetik ve farmakolojik olarak PFKFB3 aktivitesinin baskılandığı çok sayıdaki in vitro ve prelinik çalışma (Kotowski ve ark., 2021), bu izoenzimin hedeflenmesinin tümör hücre glikolizi ile beraber tümör hücre çoğalması, göçü, primer tümör gelişimi ve metastazının kontrol alınmasında yararlı bir anti-tümörojenik yaklaşım olabileceği öngörüsünü desteklemektedir.

PFKFB3 kinaz aktivitesini karşı geliştirilen ilk küçük kimyasal inhibitör 3-(3-piridinil)-1-(4-piridinil)-2-propen-1 (3PO) ve türevi (4-piridinil)-3-(2-kinolinil)-2-propen-1 (PFK15)'nin tümör hücrelerinde glikoz metabolizmasını yavaşlattığı ve çeşitli insan kanser zenogref modellerinde anti-tümör aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2016; H. M. Li ve ark., 2017; Zhu ve ark., 2016). PFK15'in optimizasyonu ile geliştirilen PFK-158, birçok insan ve sinerjik prelinik modelde geniş anti-tümör aktivite ve immünmodülatör etkiler sergiler (Grewal, 2017; Telang, S., Yaddanapudi, K., Grewal, J., Redman, R., Fu, S., Pohlmann, P., ... & Chesney, J. (2016)). 3PO ve türevlerinden elde edilen in vitro ve prelinik modellerdeki başarı, farklı kimyasal çatıya sahip yeni inhibitörlerin geliştirilmesine yönelik çalışmaların artmasına neden olmuştur (Brooke ve ark., 2014; Lea, Guzman, & Desbordes, 2016; Seo, Kim, Neau, Sehgal, & Lee, 2011). Ancak AstraZeneca tarafından bir çalışmada (Boyd ve ark, 2015); 3PO ve PFK158'in yüksek konsantrasyonlarda dahi PFKFB3'e bağlanmadığı; gözlemlenen F2,6BP seviyesinde ve glikolitik aktivitedeki düşmenin ikincil meydana gelen etkilerden olabileceği değerlendirilmiştir. Yine de bu öncü moleküllerle elde edilen anti-metabolik etkilerin tümör gelişimine ket vurulmasına katkısı ve daha da önemlisi PFKFB3 enziminin kanser hücrelerinin glikolizi yanında, farklı çalışmalarda (Gustafsson ve ark., 2018) gösterilen glikoz-dışı onkojenik etkileri, özel olarak PFKFB3 izoenzimine ve genel olarak PFKFB kinaz aktivitesine olan ilginin artarak devam etmesine neden olmuştur. Bilgisayar destekli yapısal biyoloji ve farmasötik kimya araçlarının etkin kullanımı son yıllarda önemli sayıda PFKFB3 inhibitörünün geliştirilmesine katkı yapmıştır (Boutard ve ark., 2019; Seo ve ark., 2011). Bunlardan özellikle Boyd ve ark. (2015) tarafından geliştirilen ve PFKFB3 izoenziminine seçicilik gösteren indol iskeletine sahip bazı inhibitörler sentezlenmiş (ör. AZ PFKFB3 26) ve glikolizi baskılama kapasiteleri test edilmiştir. Ancak, bu inhibitörlerle ilgili in vitro ya da prelinik olarak anti-tümörojenik etkinin değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Son zamanlarda Boutard ve ark. (2019) tarafından gerçekleştirilen N-aril 6-aminoquinoksalin iskeletine sahip öncü olma niteliğine ve düşük konsantrasyonlarda kanser hücrelerinde F2,6BP ve glikolitik hızı baskılayan bileşikler sentezlenmiştir. Gustafsson ve ark. (2018); PFKFB3 izoenzimine karşı seçicilik gösteren ve sub-mikromolar düzeyde etki eden fenilsülfonamido salisilik asit türevleri tanımlamışlardır. KAN0438757 adlı öncü

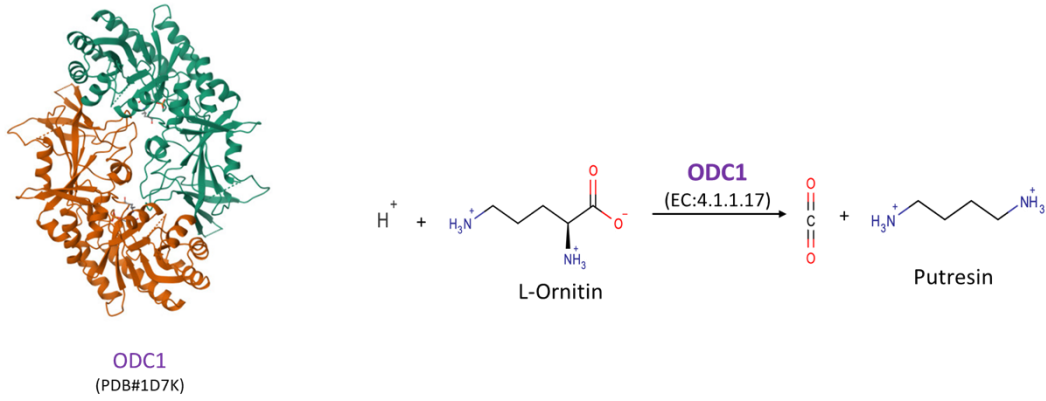
molekölün, PFKFB3'ün glikolizdeki belirgin fonksiyonuna ek olarak DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon tamirine ile ilişkili fonksiyonunu engellediği belirlenmiştir. Bu çalışma da PFKFB3'ün hedeflenmesinin kanser hücrelerinin glikoliz dışında kritik bazı hücresel fonksiyonlarının da hedeflenmesine katkı yapabileceğini göstermektedir. Ancak, pankreas kanseri gibi agresif tümörlerin metabolik plastisitesi, anti-tümörojenik bir yaklaşım olarak PFKFB inhibitörlerinin tek başlarına kullanılmasından elde edilecek yararın kısa ve kısıtlı olmasına neden olabilir. Bu nedenle, PFKFB enzimleri ile hedeflendiğinde daha güçlü anti-tümörojenik etki gösterecek kombine anti-metabolik yaklaşımların geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

2.2. Tümör Gelişiminde Poliamin Biyosentez Yolağının Önemi ve Anti-Tümörojenik Bir Yaklaşım Olarak Hedeflenmesi

Kanser alt türleri arasında yaygın olarak aktivitesi artan bir diğer metabolik yol poliamin biyosentezidir. Poliaminler, birçok canlı organizmada gerekli olan çok işlevli polikatyonlardır. Poliamin sentezi, arjinin amino asidinden ornitin amino asitinin sentezi ile başlar (Şekil-5) (Kulkarni, Anderson, Mirmira, & Tersey, 2022). Ornitin, ornitin dekarboksilaz (ODC1) enzimi tarafından dekarboksilasyonu putresin poliaminini oluşturur. Spermidin sentaz (SpdS) tarafından S-adenozilmetiyonin (SAM)'in dekarboksilasyon ürünü metil S-adenoziltiyopropilamin'in aminopropil kısmının putresine transferi ile ikinci poliamin olan spermidin sentezlenir. Son olarak spermin sentaz (SpmS) enzimi, benzer bir reaksiyon ile metil S-adenoziltiyopropilamin'in aminopropil kısmının spermidine transferi ile yolağın üçüncü ve son poliamini olan spermini sentezler. Poliaminler, hücresel büyüme ve embriyonik gelişim, farklılaşma ve çoğalma gibi birçok kritik işlev için gereklidir (Kulkarni ve ark., 2022). DNA sentezi ve stabilitesi, replikasyon, transkripsiyon ve translasyon ve ribozom biyogenezindeki fonksiyonları nedeniyle, tümör hücrelerinin poliaminlere ihtiyacı normal hücrelere göre çok daha fazladır (Gerner, & Meyskens, 2004; Moinard ve ark., 2005). Kanser hücrelerindeki poliamin biyosentez aktivitesindeki yukarı yönlü regülasyonunun, PI3K/AKT/mTOR, MYC ve RAS onkojenik yolları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bachmann, & Geerts, 2018). Poliaminlerin genetik ve farmakolojik araçlar ile inhibisyonu kanser hücre yaşlanması ve apoptozuna neden olur (Uemura,

Matsunaga, Yokota, Takao, & Furuchi, 2023). Diğer taraftan poliamin sentezindeki artışının paklitaksel ve 5-florourasil vb. kemoterapötiklere direnç ve immun tolerans ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Akyol ve ark., 2016). Tümör hücrelerinde poliamin biyosentez yolağının kritik enzimlerinin ekspresyonu artar (J. Li, Meng, Wu, & Sun, 2020). Bunlardan başlıcası poliamin biyosentez yolağının hız sınırlayıcı enzimi ODC1'dir (Şekil-6). ODC1, insan tümörlerinin yaklaşık %70'inde ekspresyonu artan MYC proteinlerinin ve RAS proteinlerinin transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel hedeflerinden biridir (Novita Sari ve ark., 2021). Büyüme faktörleri ve amino asitler tarafından aktive edilen mTOR, ODC enzimi inhibitörü antizim 1 (OAZ1) proteinin sentezinde azalmaya, dolayısıyla ODC1 stabilizasyonuna neden olur (Cohavi, Tobi, & Schreiber, 2009). İnsan ve fare PDAK hücrelerinde mutant KRAS'ın inhibisyonu, ODC1 ekspresyonun azalmasına neden olur (Wolters-Eisfeld, Hackert, & Güngör, 2023).

Şekil-5: Poliamin Biyosentez Yolağı.



Şekil-6: ODC1 enziminin kristal yapısı ve katalizlediği reaksiyon

Tümör hücre proliferasyonu ve canlılığı için poliaminlere olan gereksiniminin anlaşılması, poliamin metabolizmasının potansiyel bir antineoplastik tedavi hedefi olarak değerlendirilmesini beraberinde getirdi. Geliştirilen farmakolojik ajanların bir kısmı poliamin biyosentez yolağının kritik enzimlerini hedeflerken, bir kısmı hücrelere poliamin transportunu modüle etmeye yöneliktir (Wolters-Eisfeld ve ark., 2023). Bu inhibitörlerin tek başlarına ve farklı ajanlarla kombinasyonu farklı tümör hücrelerinde sitotoksite ile sonuçlanmakta ve prelinik modellerde tümör büyümesini baskılamaktadır (Murray-Stewart, Woster, Casero, & Author, 2016).

Diflorometilornitin (DFMO), ODC1 enzimini geri dönüşümsüz olarak inhibe eden bir molekül olarak geliştirilmiştir (Nowotarski, Woster, & Casero, 2013). DFMO'nun in vitro ortamda kullanıldığı birçok çalışmada tümör hücrelerinde putresin ve spermidinin seviyesinin etkin bir şekilde azaldığı görülmüştür. Eksojen putresin ilavesinin DFMO-ilişkili hücre çoğalmasındaki azalmayı tersine çevirmesi DFMO'nun etkisinin spesifik olarak ODC1 aktivitesinin baskılanmasıyla ortaya çıktığına işaret etmektedir (Koomoa ve ark., 2013). Diğer taraftan ODC1 inhibitörü DFMO'nun çeşitli kanserlerde MYC ile ilişkili tümör malignitesini bozduğu gösterilmiştir (Bachmann, & Geerts, 2018; Nakkina ve ark., 2021).

2.3. PDAK Gelişiminde Glikolizin ve Poliamin Biyosentez Yolağının Önemi ve Terapötik Olarak Hedeflenmesi

Kanseri teşvik eden KRAS genindeki mutasyonlar, tüm PDAK vakalarının %90'ında bulunur ve TP53 de dâhil olmak üzere diğer genlerdeki mutasyonlar sıklıkla PDAK gelişimine ve yayılmasında rol oynar. PDAK hücreleri onkojenik özelliklerinin devamında hiperaktif KRAS sinyalizasyonuna bağımlılık gösterir. Son

zamanlarda yapılan alışmalar (Bootsma, van Neerven, & Vermeulen, 2021; Suzuki ve ark., 2022); mutant KRAS'ın PDAK hücrelerinde yaygın olarak karşılaşılan metabolik yeniden progalama ile ilişkili olduğu ve PDAK hücrelerinin malin özelliklerinin devamı için bazı metabolik enzimlere bağımlılık geliştirdiğine işaret etmektedir. Diğer taraftan c-MYC, KRAS'a karşı işbirlikçi bir onkojenik faktör olarak hareket eder ve hem primer hem de metastatik PDAK tümörlerinde aşırı eksprese edilmektedir (Blandino, 2023; Nakkina ve ark., 2021). KRAS ve c-MYC PDAK hücrelerinde metabolik yeniden programlamaya neden olan önemli iki onkogendir. Yapılan alışmalar her iki onkogenin PDAK tümör hücrelerindeki metabolik yeniden programlamayı indüklediğini göstermektedir (Dey ve ark., 2020; Liu, Li, & Liu, 2023). KRAS ve c-MYC-ilişkili metabolik yeniden programlamada gerekli metabolik oyuncuların ortaya çıkarılması PDAK gibi yoğun bir metabolik plastisiteye sahip tümörlerin tedavisinde yenilikçi tedavilerin geliştirilmesine katkı yapabilir.

Genel olarak anti-kanser etkili yalnızca birkaç metabolizmaya dayalı ilaç geliştirilmiştir ve bunların yalnızca bir kısmı klinik deneylerde kullanılmakta olup (Stine ve ark., 2022); geliştirilen anti-metabolitlerin henüz PDAK'da kullanımı bulunmamaktadır. KRAS mutasyonlu PDAK hücreleri, orijin aldıkları normal hücrelere göre, hiperglikolitik bir fenotip sergilerler (Shen, Niu, & Xue, 2022). PDAK hücrelerinde glikolitik yolağın aktivasyonu; epitelyal-mezenkimal geçiş, kök hücre ve kemoterapi direnci ile ilişkilidir (Zhao ve ark., 2017). İn vitro ve preklinik alışmalar (Le ve ark., 2010; Xiao ve ark., 2013; Ying ve ark., 2012), mutant KRAS taşıyan PDAK hücrelerinin onkojenik özelliklerinin devamı için aktive olmuş glikolize ihtiyaç duyduklarını göstermektedirler. Bu alışmalar; glikolitik aktivite modifikasyonunun, PDAK'a özgün geliştirilecek rasyonel kombine tedavi modüllerinin bir parçası olabileceği yönündeki görüşü desteklemektedir (Bajpai & Shanmugam, 2018; R. Blum & Kloog, 2014; Bryant ve ark., 2014; Cohen ve ark., 2015). Ancak, direkt olarak glikolitik aktiviteyi tamamen ortadan kaldırmaya yönelik girişimlerin (r. 2-DG gibi metabolize olmayan glikoz analoğu kullanılarak), preklinik modellerdeki ciddi toksisiteden dolayı, klinikte kullanımı söz konusu değildir (B. F. Clem, O'Neal, Klarer, Telang, & Chesney, 2016; Yu, Chen, Wang, & Chen, 2016). Buna karşın glikolizin indirek regülatörü PFKFB3'n PDAK

hücrelerinde fazla miktarda eksprese edildiğini ve PDAK hücrelerinin glikolitik ve transforme edici büyüme faktörü beta 1 (TGF- β 1)-ilişkili mezenkimal fenotipinin devamındaki rolü gösteren çalışmalar (Abdullah Yalcin ve ark., 2017), PDAK glikolizinin hedeflenmesine PFKFB3'ün değerlendirilebileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte, farklı noktalardan direk ya da indirek olarak, tek başına, glikoz metabolizmasının kısmi modifikasyonunun da—tümör hücrelerinin alternatif karbon ve enerji kaynaklarına yönelme potansiyelinden dolayı—etkin bir klinik yarar sağlamayacağı açıktır. Nitekim KRAS tarafından transforme edilen pankreatik duktal epitel hücrelerinde PFKFB3'ün AZ PFKFB3 26 (AZP3-26) adlı molekül ile inhibisyonu tek başına hücre proliferasyonunu etkilemezken glutaminaz inhibitörü telaglanastat'a duyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir (Ozcan ve ark., 2021). Bu gözlem de PFKFB3 inhibisyonunun PDAK metabolizmasını hedefleyen kombine yaklaşımların bir bileşeni olabileceği öngörüsünü desteklemektedir.

PDAK hücrelerinde glikolize ek olarak poliamin biyosentez yolağının aktivasyonu görülmektedir. Özellikle PDAK hücrelerindeki KRAS ve MYC gibi onkojenik elementlerin aktivasyonun poliamin biyosentezini ODC1 enziminin ekspresyonunu yoluyla arttırdığını gösteren çalışmalar (Lee ve ark., 2023; Wolters-Eisfeld ve ark., 2023) PDAK tümörlerinde metabolik programlanmanın hedeflenmesine ODC1 enzimini kritik bir hedef haline getirmektedir. Nitekim Kras-ilişkili bir PDAK fare modelinde DFMO'nun, ODC1 aktivitesini inhibe ederek tümör ilerlemesini durdurduğu rapor edilmiştir (Mohammed ve ark., 2014). Ayrıca DFMO tedavisinin pankreas tümörlerinde onkojenik c-MYC ekspresyonunu azaltması (Bachmann & Geerts, 2018), ODC1 inhibisyonunun genel bir anti-onkojenik etkiye neden olabileceği yönündeki öngörüü desteklemektedir.

Son kanıtlar (Lee ve ark., 2023; Nose, Sugimoto, Muta, & Miura, 2023; Wolters-Eisfeld ve ark., 2023), poliamin sentezi ve ODC1 modülasyonunun, pankreas lezyonlarının erken evlerinde gerçekleştiğini ve tümörün ilerlemesi sırasında arttığını öne sürmektedir. Mohammed ve ark. (2014)'nın yapmış olduğu çalışmada pankreas kanserinde DFMO'nun p21, p27 ve p53 genlerini indükleyerek tümör hücresi proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. DFMO'nun en büyük avantajı düşük toksisite ve oral kullanım kolaylığıdır. Ancak DFMO genellikle sitostatik etkilere sahipken, uzun süre in vitro tedaviden sonra sitotoksik olabilir.

DFMO kullanımında sperminin tamamen tükenmemesi ve spermidin ile putresine geri dönüşümü mümkündür. Ayrıca dolaşım veya hücre dışı alandan poliamin alımında telafi edici artışlar gerçekleşmektedir. Bu nedenlerle DFMO'nun tek bir ajan olarak kullanımı sınırlı anti-tümöral etki göstermiştir (Alexiou ve ark., 2017). Kemoterapötiklere dirençli tümörlerin tedavisini optimize etmek için diğer anti-tümöral ajanlarla birleştirildiğinde taşıdığı potansiyel katkı ve sinerjist etkilerinin araştırılması gerektiği açıktır.

Birlikte değerlendirildiğinde; glikoliz ve poliamin biyosentezi gibi PDAK hücrelerinde aktive olan yolları kontrol eden kritik enzimlerin bu ölümcül kanser türünün kontrol altına alınmasında değerlendirilebileceğine yönelik in vitro ve prelinik kanıtlar vardır. Ancak, yoğun metabolik plastisiteye sahip olan PDAK tümörlerinde bu enzimlerin tek başlarına inhibisyonu ile elde edilecek anti-tümörojenik etkinin sınırlı ve kısa ömürlü olacağı değerlendirilebilir. Bununla birlikte; bu iki yolağın birlikte hedeflenmesinin PDAK hücrelerindeki anti-metabolik ve anti-onkojenik etkilerinin ortaya çıkarılması, bu kombine anti-metabolik yaklaşımın PDAK tedavisindeki olası potansiyelinin değerlendirilmesi açısından önemli bir adım olacaktır.

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Hatları, Kimyasal ve Sarf Malzemeleri

Bu tez çalışmasının hücre kültürü ve deneysel aşamalarında kullanılan hücre hatları, kimyasal sarf malzemeleri ve kitler birçok farklı firma aracılığıyla temin edilmiş olup, üreten firmanın talimatları doğrultusunda gereken konsantrasyonlarda hazırlanmıştır (Tablo-1). Çalışma sırasında Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı Laboratuvarında bulunan cihaz olanaklarından faydalanıldı (Tablo-2).

Tablo-1: Çalışmada kullanılan kimyasallar, malzemeler, üretici firmaları ve katalog numaraları tablo halinde sunulmuştur.

Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemeler		
Malzeme	Üretici Firma	Katalog Numarası
PANC1	ATCC	CRL-1469
MIA PaCa-2	ATCC	CRL-1420
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Besiyeri	Sigma	D-5030
Fetal Sığır Serum (FBS)	Gibco	10500064
L-Glutamin	Gibco	25030081
At Serumu	Biological Industries	4-004-1A
Penisilin streptomisin (100x)	Capricorn	PS-B
Trypsin-EDTA (%0,05)	Multicell	325-043-EL
Trypan Mavi (%0,4)	Sigma	T8154
DMSO	Biofroxx	1264ML500
PBS Stok Solüsyonu (20X)	Thermo Fisher	28344
AZ PFKFB3 26	MedChem	HY-101971
DL- α -Difluoromethylornithine (DFMO)	Cayman	16889
Trikloroasetik asit (TCA)	Sigma	76-03-9
Kristal Violet	Sigma	C3886
Sulforodamin B	Sigma	230162-1G
siRNA Transfeksiyonunda Kullanılan Malzemeler		
Malzeme	Üretici Firma	Katalog Numarası
Lipofectamine RNAiMAX	İnvitrogen	137780
Opti-MEM	Gibco	31985062
Kontrol siRNA	İnvitrogen	4390846
PFKFB3 siRNA	İnvitrogen	S10359
ODC1 siRNA	İnvitrogen	S9821

mRNA Ekspresyon Analizlerinde Kullanılan Malzemeler		
Malzeme	Üretici Firma	Katalog Numarası
GeneJet RNA Saflaştırma Kiti	Thermo Fisher	K0731
Yüksek kapasiteli cDNA Ters Transkripsiyon Kiti	Applied Biosystems	4368814
Taqman Gen Ekspresyon Master Mix	İnvitrogen	4369016
β-aktin Prob	Thermo Fisher	Hs99999903_m1
PFKFB3 Prob	Thermo Fisher	Hs00998698_m1
ODC1 Prob	Thermo Fisher	Hs00159739_m1
Protein İzolasyonu ve Western Blotlamada Kullanılan Malzemeler		
Malzeme	Üretici Firma	Katalog Numarası
Mini- PROTEAN TGX Gel	Biorad	4561043
PVDF Membran	Millipore	IPVH00010
RIPA Lizis ve Ekstraksiyon Çözeltisi	Thermo Fisher	89901
Proteaz/Fosfataz İnhibitör Karışımı (100x)	Cell-signaling Technologies	5872
10X Tris/Glisin/SDS Çözeltisi	Biorad	1610772
10X Transfer Çözeltisi	Thermo Fisher	35045
%5 Yağsız Süt Tozu	Sigma	M7409
Moleküler Biyolojik Su	Lonza	BE51200
Tris	İnvitrogen	15504020
Sodyum Klorür	Merck	1064041000
Hidroklorik Asit (%30)	Merck	1.00318.1000
Tween 20	Merck	8221840500
Luminata Forte HRP Substrat	Merck	WBLUF0500
ECL Prime	GE Healthcare	RPN2232
Sığır Serum Albumini	Sigma	A4503-100G
PFKFB3	İnvitrogen	MA5-32766
ODC1	Mybiosource	MBS7000199
β- aktin	BioUSA	3662
GAPDH	İnvitrogen	MA1-16757
HRP-konjuge sekonder anti goat-anti rabbit	Cell Signaling	7074
Matrijel	Corning	354228
Fruktoz 2,6 Bisfosfat (F2,6BP) Ölçümünde Kullanılan Malzemeler		
Malzeme	Üretici Firma	Katalog Numarası
F2,6BP Standard Solüsyonu	Sigma	47822
F6P	Sigma	F3627
Tris	Sigma	15504020
Asetik Asit	Honeywell	27225
HEPES	Merck	391340
Magnezyum Asetat	İnvitrogen	M5661
Nikotinamid dinükleotid	Sigma	N9410
PFK-1	Sigma	F6803
Aldolaz	Sigma	A2714
Gliserol-3-fosfat dehidrojenaz	Sigma	10127779001
Triozfosfat izomeraz	Sigma	T6258
Pirofosfat	Sigma	221368

Glikoz ve Laktat ölçümünde kullanılan Malzemeler		
Malzeme	Üretici Firma	Katalog Numarası
Glikoz Ölçüm Kiti	Biovision	K606-100
Laktat Ölçüm Kiti	Biovision	K607-100

3.1.2. Protein İzolasyonu ve Western Blotlamada Kullanılan Çözeltiler

TBS-T: Tris İle Tamponlanmış Salın, Tween-20 Çözeltisi

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

Hücre Lizis Çözeltisi

Hücre lizisi için 25 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodyum deoksikolat ve 0.1% SDS içeren RİPA (Thermo; Kat. No. 89900) çözeltisi kullanıldı. Kullanım öncesinde RİPA çözeltisine, proteaz ve fosfataz inhibitör karışımı (Cell Signaling Technologies; Kat. No. 5872) ilave edildi.

Western blot için bloklama ve antikor dilüsyon çözeltisi

Western blot deneylerinde bloklama ve antikor dilüsyonlarında %5 yağsız süt tozu (Sigma; Kat. No. M7409) kullanıldı. Yağsız süt tozu hazırlanırken TBS-T çözeltisi ile sulandırıldı.

Tablo-2: Çalışmalarda kullanılan cihazlar.

Cihazın Adı	Cihazın Model	Üretici Firma
Steril Kabin	Bio II Advance	Telstar
İnkübatör	Incusafe	Panasonic
İnvert Mikroskop	3032	AccuScope
Santrifüj	NF1200R	Nüve
Santrifüj	3K30	Sigma
Güç kaynağı	300 Volt	VWR
PCR Cihazı	MyGenie 96	Bioneer
Real Time Cihazı	OneStepPlus	Applied Biosystems
Hassas Terazı	CPA225D	Sartorius
Blok Isıtıcı	TS-100	Biosan
Otoklav	OT40L	Nüve
Görüntüleme Cihazı	ChemiDoc MP	Biorad

Buz Makinesi	Scotsman	AF80
Manyetik Karıştırıcı	MSH-300	Biosan
Spektrofotometre	Epoch	Biotek
Saf su Cihazı	Simplicity	Millipore

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre Kültürü

Çalışmada hücre kültürü modelleri olarak PDAK hücre hatlarından PANC1 (ATCC, Kat. No. CRL-1469) ve MIA PaCa-2 (ATCC, Kat. No. CRL-1420) kullanıldı. PANC1 hücreleri için %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin çözeltisi ve 4,5 g/L glikoz içeren DMEM besi yeri; MIA PaCa-2 hücreleri içinse %10 FBS, %2,5 at serumu, %1 penisilin/streptomisin çözeltisi ve 4,5 g/L glikoz içeren DMEM besiyeri kullanıldı. Hücreler çoğaltılırken steril hücre kültürü flask ve plakalarında 37°C ve %5 CO₂ ayarındaki nemli inkübatörde tutuldu. Hücreler pasajlama yapılırken steril 1X PBS ile nazıkçe yıkandıktan sonra Tripsin/EDTA çözeltisi ile flask tabanından kaldırıldı. En az 5 kat oranda (v/v) besiyeri eklenerek tripsin nötralize edildi ve 250 xg'de 5 dk santrifüj edilerek tripsin uzaklaştırıldı. Hücre sayımlarında hücre süspansiyonu 1:1 oranında Tripan mavisi ile karıştırılarak hemasitometre yardımıyla invert mikroskop (Accu Scope) ile sayıldı.

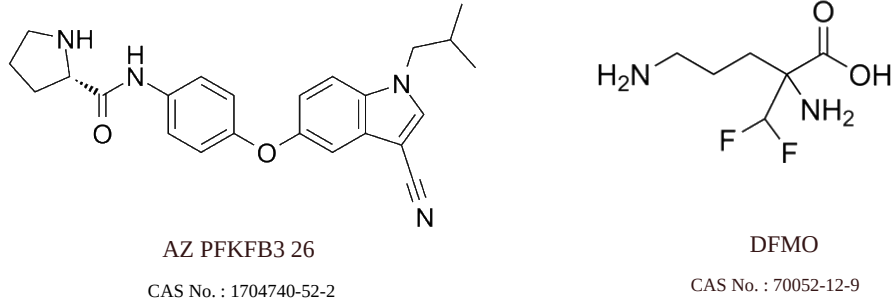
3.3. PFKFB3 ve ODC1 mRNA Ekspresyonlarının siRNA Aracılığıyla Baskılanması

Hücrelere siRNA transfeksiyonu Lipofectamine RNAiMAX® adlı kimyasal ile gerçekleştirildi. Transfeksiyon için imalatçının protokolü takip edildi. Kısaca, siRNA ve Lipofectamine RNAiMAX® Opti-MEM adlı besiyerinde sulandırıldıktan sonra siRNAlar ve Lipofectamine RNAiMAX® 1:1 oranında karıştırıldı. Elde edilen çözelti bir gün önceden ekilen ve yaklaşık %30-50 yoğunluğa ulaşmış hücrelere taze besiyeri değişiminin ardından damlatılarak uygulandı. Final siRNA konsantrasyonu olarak 20 nM kullanıldı. Transfeksiyonlarda kontrol siRNA, PFKFB3 siRNA, ODC1 siRNA ve kombine siRNA (siPFKFB3/siODC1) grupları oluşturuldu. Transfeksiyondan 48 saat sonra glikoz ve laktat ölçümleri için besiyeri toplanarak 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Hücre pelletleri total protein, Western blot ve

F2,6BP analizleri için kullanıldı. Hücre proliferasyonu, paralel olarak transfeksiyon gerçekleştirilen plakalarda kristal violet yöntemi ile belirlendi.

3.4. PFKFB3 ve ODC1 Aktivitelerinin Farmakolojik Olarak İnhibisyonu

PANC1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde PFKFB3 enziminin inhibisyonu için AZ PFKFB3-26; ODC1 enziminin inhibisyonu için DFMO kullanıldı (Şekil-7). DFMO'nun etkin doz aralığının belirlenmesi için hücreler 17,5 – 1000 μ M aralığındaki DFMO dozları ile muamele edildi. 72 saat sonra SRB yöntemi kullanılarak (bkz. 3.8.1) sitotoksite analiz edildi. Hücrelerin %50'sini öldüren doz (IC_{50}), Graphpad Prizma (Versiyon 8.3.1.) programında belirlendi. Fonksiyonel analizlerde AZ PFKFB3-26 20 μ M; DFMO ise 30 μ M konsantrasyonlarında kullanıldı. Kontrol olarak DMSO çözücüsü kullanıldı. 48 saatlik inkübasyon sonrası besiyerleri toplanarak glikoz ve laktat ölçümleri için 3000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Hücre pelletleri total protein, Western blot ve F2,6BP analizleri için kullanıldı.



Şekil-7: PFKFB3 ve ODC1 inhibitörlerinin kimyasal yapıları

3.5. mRNA Ekspresyon Analizleri

3.5.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Hücrelerden alınan pelletlerden ticari bir kit (Applied Biosystems) kullanılarak RNA izole edildi. RNA miktarı spektrofotometrik olarak 260 nm'de belirlendi. Daha sonra en düşük konsantrasyondaki örneğe göre eşitleme yapıldı. Ticari bir ters transkripsiyon kiti kullanılarak (Applied Biosystems) eşit miktardaki RNA (1 μ g) örneklerinden komplementer DNA (cDNA) sentezlendi. Kısaca, 1 μ g total RNA, oligo dT primer, deoksinükleotid trifosfat, ters transkriptaz ve RNaz

inhibitörü içeren 20 µl'lik karışım 25°C/10 dk (1. Aşama), 37°C/120 dk (2. Aşama) ve 85°C/5 dk (3. Aşama)'ya ayarlı PCR programında ters transkripsiyon (reverse transcription; RT) işlemine tabi tutuldu.

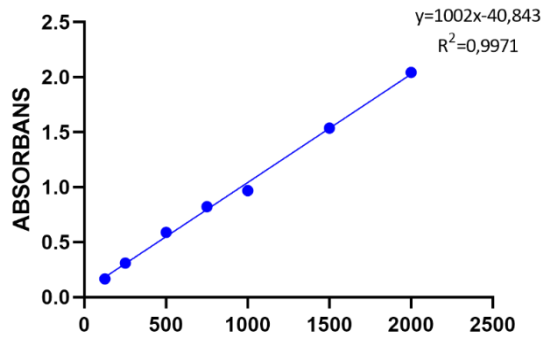
3.5.2. Gerçek-Zamanlı Kantitatif PCR Analizi

Gerçek-zamanlı kantitatif PCR (qPCR) analizi için her bir genin cDNA'sına spesifik bir çift PCR primeri ve floresan işaretli prob (FAM) içeren TaqMan sisteminden (Applied Biosystems) yararlanıldı. Kit prosedürü uygulanarak 1:20 oranında dilüe edilmiş cDNA, GoTaq Master Mix karışımı ve tespit edilecek gene ait prob içeren karışım sırasıyla 95°C/20 saniye (1. Aşama), 95°C/1 dakika (2. Aşama) ve 60°C/20 saniye (3. Aşama) programına ayarlı gerçek-zamanlı qPCR cihazında reaksiyon işlemine tabi tutuldu. İkinci ve üçüncü aşamalar 45 kere tekrarlandı. Reaksiyonlar StepOnePlus cihazı kullanılarak gerçekleştirildi ve StepOne Software versiyon 2.3 ile analiz edildi. Elde edilen amplifikasyon eğrilerinden döngü eşiği (Ct) değerleri kullanılarak hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerindeki nispi değişimler $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile hesaplandı (Livak & Schmittgen, 2001). Hesaplamalarda β-aktin probu internal amplifikasyon kontrolü olarak kullanıldı.

3.5.3. Protein İzolasyonu ve Western Blot Analizleri

siRNA ve inhibitör uygulamaları sonrası +4°C'de santrifüjedilen hücrelerden elde edilen pelletler RİPA ile karıştırıldı ve bu karışım 15 dk buz içerisinde bekletilerek hücre membranları çözündürüldü. Membran ve çözeltide erimeyen atıkların dibe çöktürülmesi amacıyla 15000xg'de, 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildi. Örneklerdeki protein total protein konsantrasyonu bikinkoninik asit (BCA) metodu ile ölçüldü. Kısaca, 5 µl hücre lizati ile 200 µl BCA solüsyonu 96 kuyucuklu plakalarda karıştırıldı. 37°C'de 30 dakika inkübasyonun ardından, mikropilaka okuyucu cihazda (BioTek) 562 nm dalga boyunda absorbanslar kaydedildi. Bovine serum albümin (BSA) ile hazırlanan standart eğri (Şekil-8) yardımı ile protein miktarları belirlendi. Eşit miktar protein içeren örnekler β-merkaptetanol içeren yükleme tamponu ile 1:1 oranında karıştırılarak 95°C'de 5 dakika süre ile denatüre edildi. Eşit miktarda protein içeren (25 µg) karışım hazır %10 Mini PROTEAN TGX (BioRad) dodesil sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) jellerine yüklenerek 100 voltluk akımda ayrıştırıldı. SDS-PAGE ile ayrıştırılan proteinler

polivinilidin florür (PVDF) membranlara transfer edildi. Transfer işlemi blotlama sisteminde tek jel için 250 voltta 1,5 saatte gerçekleştirildi. Membranlar, Western Blot bloklama çözeltisi içerisinde 1 saat oda ısısında bloklandı. Membranlar +4°C’de 1 gece boyunca primer antikor ile inkübe edildi. PFKFB3 ve ODC1 antikorları 1:500 oranında; β -aktin 1:1000 oranında seyreltilti. Membranlar 3 kez TBS-T solüsyonu ile yıkandıktan sonra 1 saat oda ısısında horse radish peroksidaz (HRP) ile konjuge sekonder antikorlar uygulandı. Sekonder antikorlar 1:10000 dilüsyonda hazırlandı. Son olarak membranlara kemiluminesan substrat (Merck; WBLUF 0500) uygulandı ve bantlar görüntüleme cihazı (BioRad; ChemiDoc MP) ile görüntülendi. Bant analizleri ve dansitometrik ölçümler İmage Lab (BioRad) yazılımı ile yapıldı.

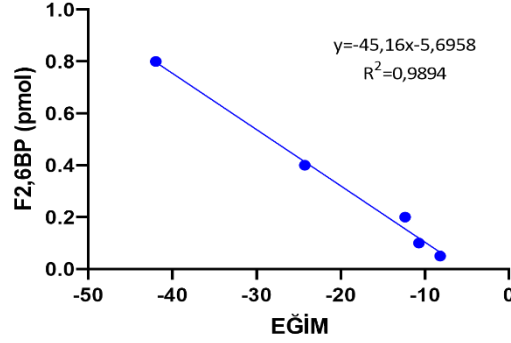


Şekil-8: BCA standard grafiği.

3.6. Fruktoz-2,6- Bisfosfat Analizi

siRNA ve inhibitör uygulamaları sonrası +4°C’de santrifüj edilen hücrelerden elde edilen pelletler soğuk PBS ile iki kez yıkandıktan sonra 100 mM NaOH-Tris asetat çözeltisinde 80°C’de 5 dk lize edildi. 1 M asetik asit ve 1 M HEPES kullanılarak lizatların pH’ları nötralize edildi. Schaftingen ve Hers (1980)’in protokolünden uyarlanan yöntem ile F2,6BP konsantrasyonları ölçüldü. Kısaca, 2 μ l örnek, 26°C’de 50 mM Tris, 2 mM Mg+2, 1mM F6P, 0,15 mM indirgenmiş nikotinamid dinükleotid (NADH), 10 kU/1 Pirofosfat-bağlı PFK1, 0,45 kU/1 aldolaz, 0,5 kU/1 tirozfosfat izomeraz ve 1,7 kU/1 gliserol-3-fosfat dehidrojenaz içeren substrat ve enzim karışımına eklendi. Ardından 0,5 mM pirofosfat ile reaksiyon başlatıldıktan sonra NADH’in NAD’e oksitlenmesi spektrofotometrik olarak 339 nm dalga boyunda ölçüldü. Okumalar dakikada bir olmak üzere 10 dk boyunca

gerçekleştirildi. Standartlarla hazırlanan bir grafik kullanılarak F2,6BP miktarları hesaplandı.



Şekil-9: F2,6BP standard grafiği.

3.7. Glikoz ve Laktat ölçümü

Besiyerindeki glikoz ve laktat seviyeleri, ticari kitler kullanılarak (Biovision) spektrofotometrik olarak belirlendi. Bu işlem için Tablo-1’de katalog numaraları verilen ölçüm kitlerinin protokolü izlendi.

3.8. Onkojenik Potansiyel Deneyleri

3.8.1. Hücre Proliferasyonu ve Sitotoksite Analizleri

PFKFB3 ve ODC1 siRNA uygulamaları sonrası hücre proliferasyonları kristal viyole yöntemi ile belirlendi (Feoktistova, Geserick, & Leverkus, 2016). Kısaca, hücreler 10 dk metanol ile fikse edildikten sonra %0,2’lik kristal viyole ile 30 dk inkübe edildi. Fazla boya PBS ile yıkanıp uzaklaştırıldıktan sonra %10 asetik ile eklenip absorbans 595 nm dalga boyunda okundu. İnhibitörlerin sitotoksik etkileri ise SRB yöntemi ile belirlendi (Kiehn & Car, 2017). Bunun için 96 kuyucuklu plakalara 3000’er hücre ekildi. Ertesi günü hücrelere DMSO, AZP3-26, DFMO ve AZP3-26/DFMO kombinasyonu triplicate olarak eklendi. Hücreler 24, 48, 72 ve 96 saat inkübe edildi. Hücre ekilmeyen fakat besiyeri içeren kuyucuklar arka plan absorbansı için kullanıldı. İnkübasyon sonunda hücreler TCA ile fikse edildi, % 0,02 SRB solüsyonu ile boyandı. %1 asetik asit ile yıkama yapıldıktan sonra 100 mM NaOH/Tris asetat tamponund (pH: 8,0) ile çözündürülen SRB-protein bileşikler 510 nm dalga boyunda okundu. Hücre içermeyen kuyucuklardan elde edilen ortalama

absorbans örnek absorbanslarından çıkarıldı. İnhibitörler konulmadan hemen önce 0. saatteki örnekler %100 kabul edilerek hücre proliferasyonlarında görece değişimler hesaplandı.

3.8.2. Yumuşak Agarda Büyüme Deneyi

Yumuşak agarda tutunmadan bağımsız büyüme kabiliyeti, tümör hücrelerin in vivo onkojenik kabiliyetini in vitro ortamda en iyi taklit eden bir göstergedir. Yumuşak agar deneyleri Fridman ve ark. (1991) tarafından tarif edilen yöntem ile gerçekleştirildi. Kısaca; 6-kuyucuklu plakalara 1,5 ml %0,6 agaroz çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Üst tabaka için kuyucuk başına 1,5 ml 7500 hücre 1,5 ml %0,3 agaroz ve besiyeri karışımı içerisinde ekildi. Ertesi günü 1 ml DMSO, 3X konsantrasyonda AZP3-26 (60 μ M), DFMO (90 μ M) ve AZP3-26/DFMO içeren besiyeri ilave edildi. Haftada bir 1 ml ilaçlı besiyeri ilaveleri yapılarak 3 hafta boyunca inkübe edildi. Koloniler %0,2 kristal viyole ile 30 dk boyandı. Fazla boya PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Boyanan kolonilerin görüntüleri kaydedildi ve Image J versiyon 1.53e (Schneider, Rasband & Eliceiri, 2012) ile sayı ve çap yönünden incelendi.

3.8.3. Koloni Oluşturma Deneyi

Hücreler 24 kuyulu hücre plakalarına, 300 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Ertesi günü DMSO, AZP3-26, DFMO ve AZP3-26/DFMO kombinasyonu dublike olarak eklendi. Her 3 günde bir ilaç içeren besiyerleri yenilenerek hücreler 10 gün büyütüldü. Kuyulardaki besiyeri uzaklaştırılarak hücreler metanol ile -20°C'de 10 dakika fiks edildi. Fiksasyon işlemi takiben, kuyulara metanolde çözünmüş %0,2 kristal viyole çözeltisi eklenerek 10 dakika boyunca bekletildi. Boya uzaklaştırıldıktan sonra kuyular PBS ile yıkandı. Kolonilerin mikroskopik ve makroskopik görüntüleri kaydedildikten sonra Image J versiyon 1.53e (Schneider ve ark., 2012) ile sayı ve çap yönünden incelendi.

3.8.4. İnvazyon Analizi

PFKFB3 ve ODC1 inhibisyonlarının hücrelerin in vitro invazyon kabiliyeti üzerindeki etkisini test etmek için modifiye Boyden hazneleri kullanılarak Matrijel invazyon analizleri gerçekleştirildi (Justus, Leffler, Ruiz-Echevarria, & Yang, 2014).

Kısaca, 1 µg/ml Matrijel (Corning) 8 µm porlu Boyden invazyon haznelerine ekilerek 2 saatlik kurumaya bırakıldı. 24 saat önceden DMSO, AZP3-26, DFMO ve AZP3-26/DFMO eklenen hücreler tripsin ile kaldırılıp %0,5 FBS ve inhibitörler içeren besiyerinde süspansiyeye edildi. Her bir kuyucuğa 500 µl içerisinde 50 bin hücre ekildi. Haznelerin alt bölmelerine ise kemoatraktan olarak 750 µl %10 FBS içeren normal besi yeri eklendi. 24 saat boyunca inkübasyon sonrası Matrijele invaze olmayan hücreler ıslatılmış Q-tip ile uzaklaştırıldıktan sonra invaze olan hücreler metanolde 2 dakika fikse edildi. Sonrasında %0,2 kristal viyole solüsyonunda 15 dk boyunca boyandı. 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.

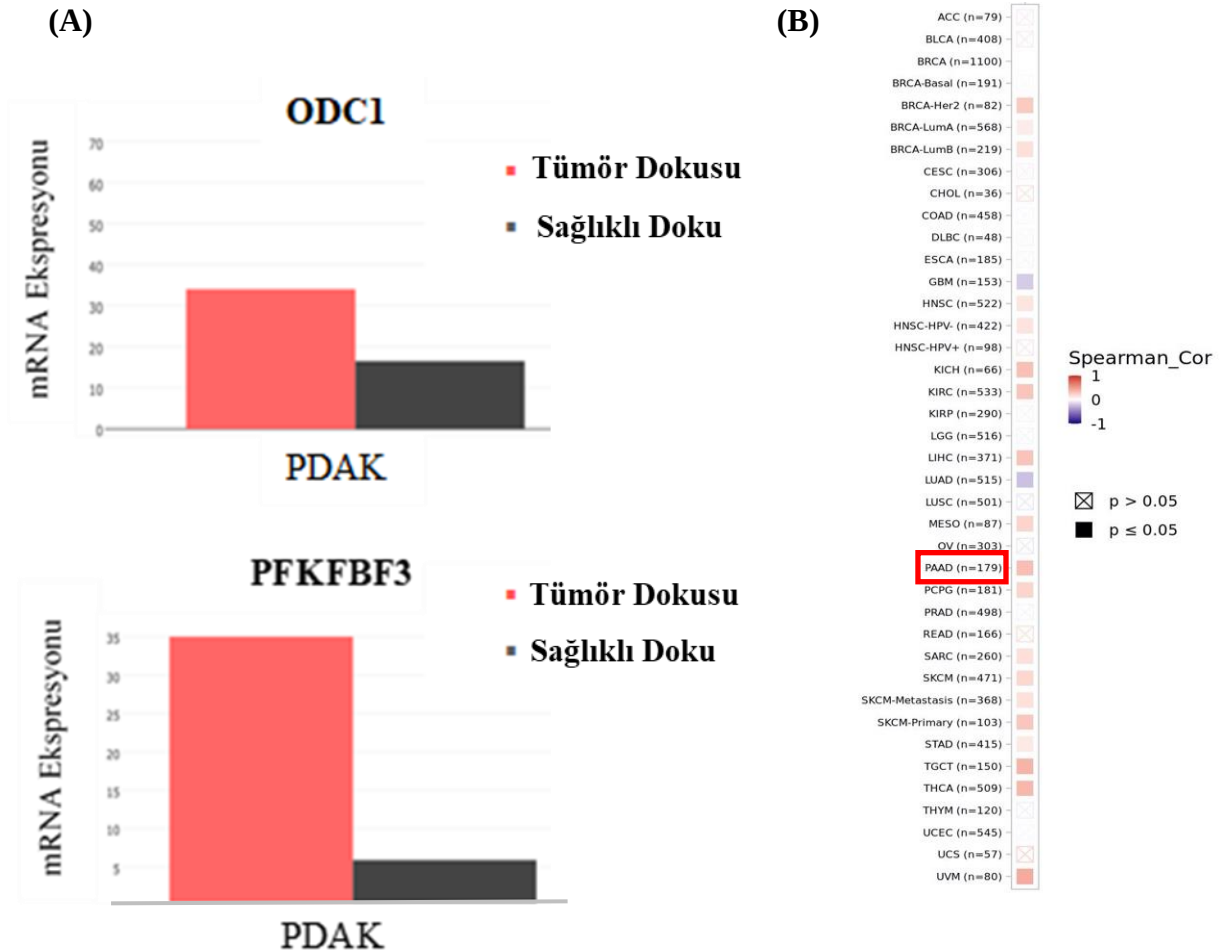
3.9. İstatistiksel Analizler

Deneyler üçlü biyolojik (n=3) tekrarlar şeklinde gerçekleştirildi ve her bir biyolojik replike 3'lü teknik replike (kristal viyole ile hücre proliferasyonu 2'li teknik replike) olarak çalışıldı. Gruplar arası farklılıkların karşılaştırılmasında çift yönlü (2-tailed) ve eşleştirilmemiş (unpaired) t-testi kullanıldı (Jones ve ark., 2022). p değerinin 0,05 altında olduğu durumlar istatistiksel açıdan önemli kabul edildi. İstatistiksel analizler Graphpad Prizma (Versiyon 8.3.1.) programında gerçekleştirildi.

4.BULGULAR

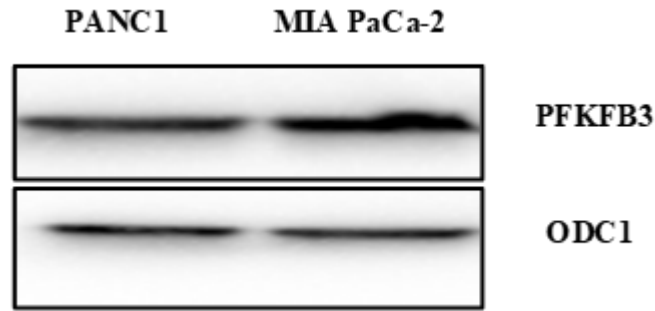
4.1. Pankreas Tümörlerinde PFKFB3 ve ODC1 Ekspresyonu Artmaktadır

PDAK olgularında PFKFB3 ve ODC1 mRNA ekspresyon seviyelerini analiz etmek için GEPIA biyoinformatik aracı kullanıldı (gepia.cancer-pku.cn). TCGA veriseti kullanılarak (n=179) yapılan analizde her iki genin mRNA seviyelerinin PDAK dokusunda normal dokuya göre arttığı gözlemlendi (Şekil-10A). Daha da önemlisi, TIMER 2.0 (timer.cistrome.org) aracı kullanılarak yapılan analizde PDAK dokularında PFKFB3 ve ODC1 mRNA ekspresyonlarının yüksek bir pozitif korelasyon gösterdiği (spearman korelasyon katsayısı= 0,322; $p < 0,001$) belirlendi (Şekil-10B).



Şekil-10: (A) PDAK dokularında PFKFB3 ve ODC1 mRNA ekspresyonları artmaktadır. **(B)** PDAK tümörlerinde PFKFB3 ve ODC1 ekspresyonları pozitif korelasyon göstermektedir. Spearman_Cor, Spearman korelasyon katsayısı.

Glikoliz ve poliamin sentez yolağı aktif olduğu bilinen ve in siliko analizlerde PFKFB3 ve ODC1 mRNA ekspresyonu arttığı gösterilen PDAK hücre hatları PANC1 ve MIA PaCa-2 çalışmada model olarak kullanıldı. Ayrıca bu hücre hatlarının, PFKFB3 ve ODC1 ekspresyonunu arttırdıkları bilinen KRAS ve c-MYC açısından hiperaktif oldukları bilinmektedir. Bu hücrelerdeki PFKFB3 ve ODC1 ekspresyonlarının protein düzeyinde doğrulanması için Western blot analizi gerçekleştirildi. Yapılan analizlerde her iki proteinin eksprese edildiği görüldü (Şekil-11).

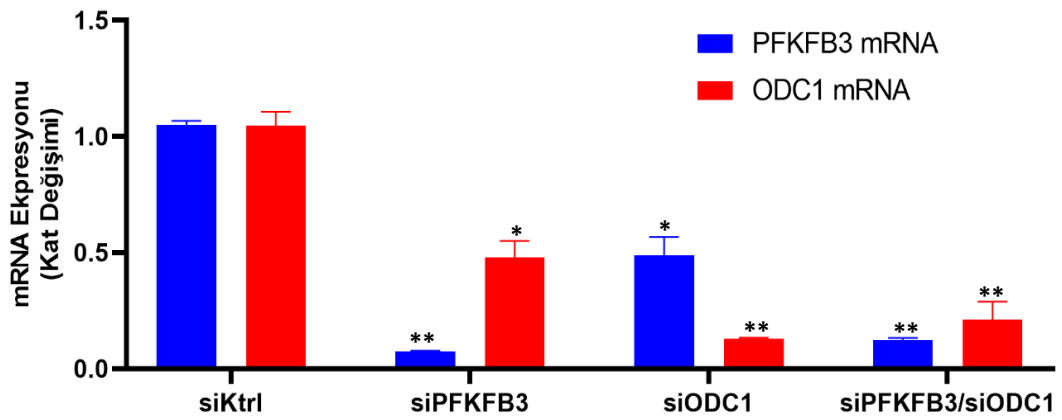


Şekil-11: PANC1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1 proteinleri eksprese edilmektedir. PANC1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinden hazırlanan total protein lizatları SDS-PAGE’de yürütüldükten sonra her bir proteine özgü antikorlar kullanılarak Western blot’a tabi tutuldu. Görüntüleme ChemiDoc MP’de yapıldı.

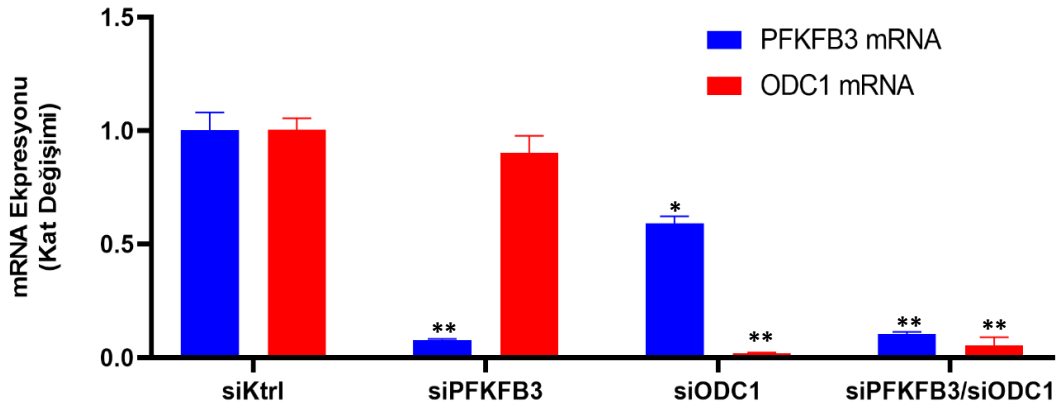
4.2. PFKFB3 ve ODC1 Enzimlerinin siRNA Aracılı Baskılanmasının PFKFB3 ve ODC1 mRNA ve Protein Ekspresyonları Üzerine Etkisi

PANC1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1 ekspresyonlarının önemini değerlendirmek için bu hücrelerdeki ilgili genlerin ekspresyonları genetik olarak siRNA yöntemi ile baskılandı. Bu amaçla, hücrelerdeki PFKFB3 ve ODC1 ekspresyonları her bir gene özgün siRNA molekülleri ile tek tek ve kombine olarak baskılandı. Gen ekspresyonlarının baskılanmasının mRNA seviyesinde kontrolü için gerçek-zamanlı qPCR kullanıldı. Bu amaçla transfeksiyondan 48 saat sonra RNA izole edilerek cDNA sentezi gerçekleştirildi. Her bir gene özgün TaqMan problemleri kullanılarak gerçek-zamanlı qPCR yapıldı. Bu analizlerde endojen kontrol geni olarak β -aktin kullanıldı. mRNA seviyelerindeki değişimlerin değerlendirilmesi için $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanıldı. Şekil-12 ve Şekil-13’de görüldüğü gibi kontrol siRNA örneği ile karşılaştırıldığında, PFKFB3 ve ODC1 siRNA moleküllerinin PFKFB3 ve ODC1 mRNA seviyelerini her iki hücre hattında %90 ve üzerindeki oranlarda

baskıladığı görüldü. Benzer oranlardaki baskılanma, siRNA'ların kombine olarak kullanıldığı örneklerde de korundu ($p<0,001$; Şekil-12, Şekil-13). Bu sonuç, siRNA yöntemi ile PFKFB3 ve ODC1 geninin mRNA düzeyinde tek tek ve kombine olarak başarılı bir şekilde baskılanabildiğini göstermektedir. İlginç olarak, her iki hücrede de ODC1'in siRNA yöntemi ile baskılanması PFKFB3 mRNA seviyelerinde azalmaya neden olurken ($p<0,01$; Şekil-12, Şekil-13); PFKFB3 baskılanması sadece PANC1 hücrelerinde ODC1 ekspresyonunda azalmaya neden oldu ($p<0,01$; Şekil-12).



Şekil-12: PANC1 hücrelerinde siRNA aracılı PFKFB3 ve ODC1 mRNA ekspresyonu baskılanmasının gerçek zamanlı qPCR ile doğrulanması. siRNA transfeksiyonundan 48 saat sonra hücreler lize edilerek total RNA izole edildi ve ters transkripsiyon ile cDNA sentezlendi. Elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak gerçek-zamanlı qPCR gerçekleştirildi. Gerçek-zamanlı qPCR analizleri StepOnePlus cihazında gene özgün FAM işaretli TaqMan problemleri kullanılarak gerçekleştirildi. Endojen kontrol olarak β -aktin kullanıldı ve ekspresyonlar kontrol siRNA (siKtrl) örneğine göre kat değişimi olarak hesaplandı (siKtrl=1). Hesaplamalarda $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanıldı. Deney 3 kez tekrarlandı (n=3). Değerler dublike olarak gerçekleştirilen temsili bir deneyin ortalama $\pm$ standart sapmasını göstermektedir. * $p<0,01$; ** $p<0,001$ siKtrl örneklerine göre.



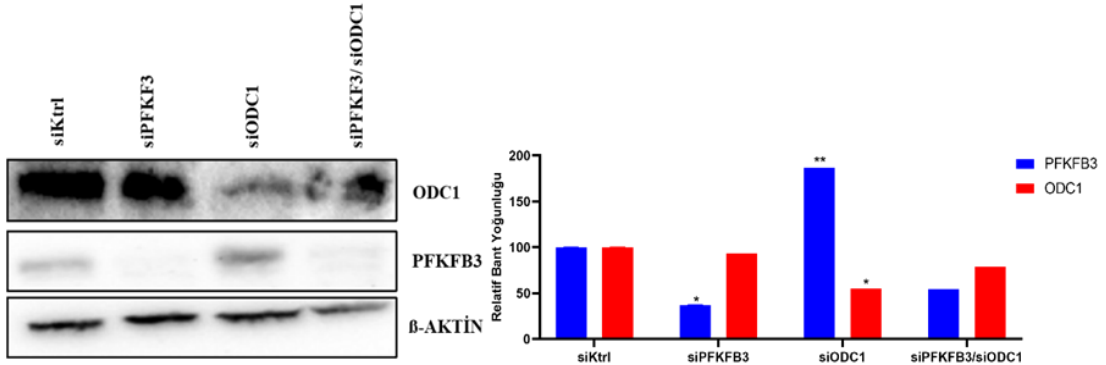
Şekil-13: MIA PaCa-2 hücrelerinde siRNA aracılı PFKFB3 ve ODC1 mRNA ekspresyonu baskılanmasının gerçek zamanlı qPCR ile doğrulanması.

siRNA transfeksiyonundan 48 saat sonra hücreler lize edilerek total RNA izole edildi ve ters transkripsiyon ile cDNA sentezlendi. Elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak gerçek-zamanlı qPCR gerçekleştirildi. Gerçek-zamanlı qPCR analizleri StepOnePlus cihazında gene özgün FAM işaretli TaqMan problemleri kullanılarak gerçekleştirildi. Endojen kontrol olarak β -aktin kullanıldı ve ekspresyonlar kontrol siRNA (siktrl) örneğine göre kat değişimi olarak hesaplandı (siktrl=1). Hesaplamalarda $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanıldı. Deney 3 kez tekrarlandı (n=3). Değerler dublike olarak gerçekleştirilen temsili bir deneyin ortalama $\pm$ standart sapma'sını göstermektedir. * $p<0,01$; ** $p<0,001$ siKtrl örneklerine göre.

Hücrelere yapılan siRNA uygulaması ile PFKFB3 ve ODC1 mRNA ekspresyonlarının baskılanmasının başarılı olduğu görüldükten sonra, mRNA seviyelerindeki baskılanmanın protein seviyelerine etkisini analiz etmek için Western blot deneyi gerçekleştirildi. Şekil-14'te görüldüğü gibi PANC1 hücrelerinde kontrol siRNA örneği ile karşılaştırıldığında siPFKFB3 molekülü uygulandığında PFKFB3 protein seviyesinde yaklaşık %50 düzeyinde bir azalmaya neden olurken (* $p<0,01$), ODC1 protein seviyesinde bir değişiklik gözlenmedi. siODC1 uygulanan PANC1 hücrelerinde ise ODC1 protein seviyesinin yaklaşık olarak %40 düzeyinde azalmaya neden olurken ($p<0,01$); PFKFB3 protein seviyesinde ise yaklaşık olarak %95 düzeyinde ekspresyon artışına neden olduğu görüldü ($p<0,001$). MIA PaCa-2 hücrelerinde ise kontrol siRNA örneği ile karşılaştırıldığında siPFKFB3 uygulamasının PFKFB3 protein seviyesinde yaklaşık %80 düzeyinde bir azalmaya neden olduğu (* $p<0,01$); kombine siRNA uygulanan örneklerde de bu etkinin korunmuş olduğu görüldü (* $p<0,01$). Buna ek olarak PFKFB3 siRNA, ODC1 protein seviyesinde ise yaklaşık olarak %90 düzeyinde bir artışa neden oldu (** $p<0,001$, Şekil-15). siODC1 uygulanan örneklerde ODC1 protein seviyesinde yaklaşık %40 düzeyinde bir azalma gözlemlendi ($p<0,01$).

(A)

(B)

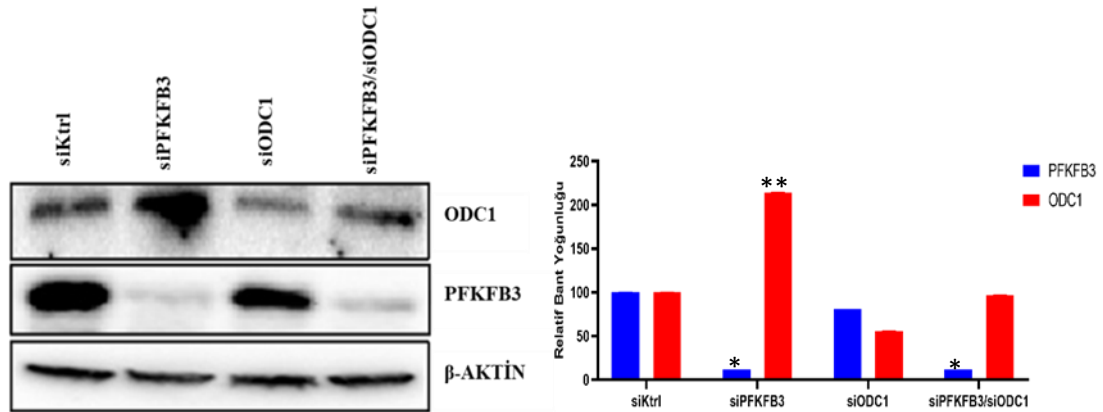


Şekil-14: PANC1 hücrelerinde siRNA aracılı PFKFB3 ve ODC1 protein ekspresyonlarının baskılanmasının Western blot ile doğrulanması.

Hücreler siRNA transfeksiyonundan 48 saat sonra hücreler RIPA tamponunda lize edildi ve protein konsantrasyonları BCA yöntemi ile analiz edilerek eşitlendi. Her bir kuyucuğa 25 μ g laemmli tamponu ile denatüre edilen protein lizati yüklendi. Proteinler SDS-PAGE’te ayrıştırılarak PVDF membranına transfer edildi. Bloklamadan sonra her bir proteine özgün antikorlar kullanılarak membranlar gece boyu bekletildi. Ertesi günü HRP-konjuge goat anti-rabbit sekonder antikorları ile oda ısısında 1 saat inkübasyon gerçekleştirildi ve membranlara ECL solüsyonu eklenerek ChemiDoc MP’de görüntüler elde edildi (A). Image J ile bantların dansitometrik analizi gerçekleştirildi. PFKFB3 ve ODC1 proteinlerinin nispi ekspresyon seviyeleri β -aktin bant yoğunluğuna oranlanarak normalize edildi. siKtrl örnekleri %100 kabul edildi (B). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ siKtrl örneğine göre.

(A)

(B)

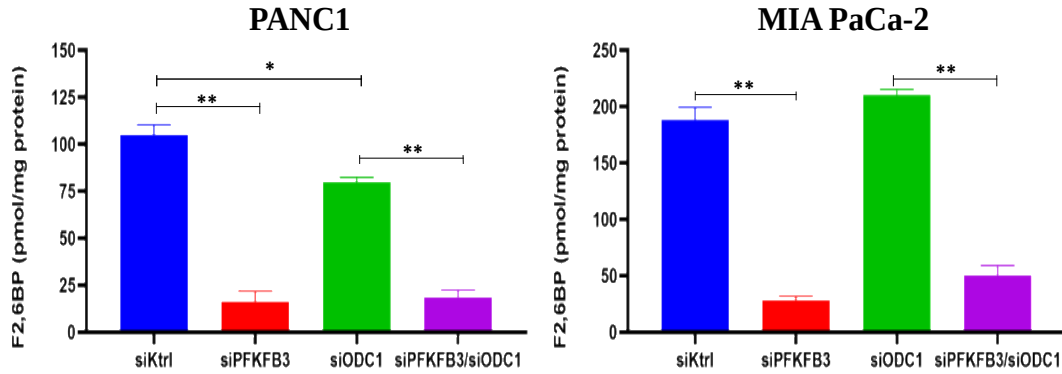


Şekil-15: MIA PaCa-2 hücrelerinde siRNA aracılı PFKFB3 ve ODC1 protein ekspresyonlarının baskılanmasının Western blot ile doğrulanması.

Hücreler siRNA transfeksiyonundan 48 saat sonra hücreler RIPA tamponunda lize edildi ve protein konsantrasyonları BCA yöntemi ile analiz edilerek eşitlendi. Her bir kuyucuğa 25 μ g yükleme tamponu ile denatüre edilen protein lizati yüklendi. Proteinler SDS-PAGE’te ayrıştırılarak PVDF membranına transfer edildi. Bloklamadan sonra her bir proteine özgün antikorlar kullanılarak membranlar gece boyu bekletildi. Ertesi günü HRP-konjuge goat anti-rabbit sekonder antikorları ile oda ısısında 1 saat inkübasyon gerçekleştirildi ve membranlara ECL solüsyonu eklenerek ChemiDoc MP’de görüntüler elde edildi (A). Image J ile bantların dansitometrik analizi gerçekleştirildi. PFKFB3 ve ODC1 proteinlerinin nispi ekspresyon seviyeleri β -aktin bant yoğunluğuna oranlanarak normalize edildi. siKtrl örnekleri %100 kabul edildi (B). * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$ siKtrl örneğine göre.

4.2.1. PFKFB3 ve ODC1'in siRNA Aracılı Baskılanması Sonrası F2,6BP Seviyeleri Üzerine Etkisi

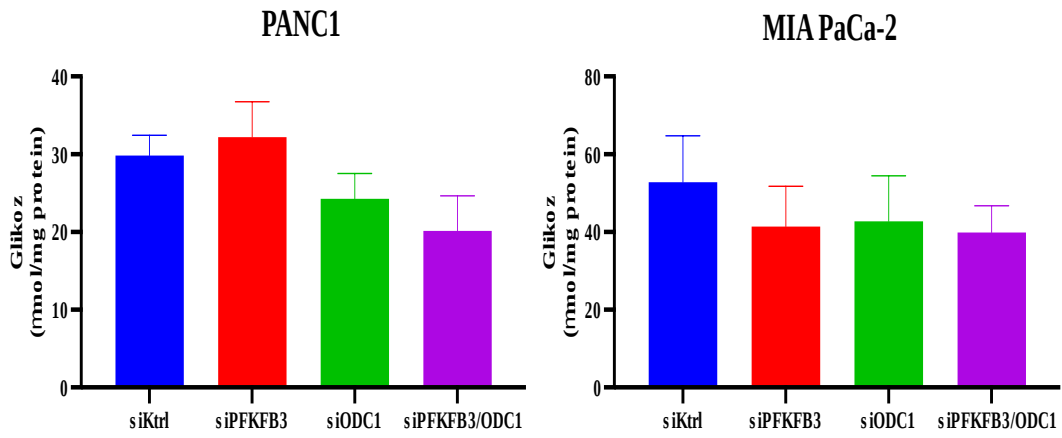
Hücrelerdeki F2,6BP yapımında ve özellikle kanser hücrelerinde bu molekülün seviyesinin artmasında PFKFB3'ün rolü bilinmektedir. Çalışma kapsamında uygulanan siRNA yöntemi ile PFKFB3 baskılanmasının F2,6BP üzerindeki etkisini analiz etmek için enzim eşleştirmeli kinetik bir yöntem kullanılarak hücre-içi F2,6BP seviyeleri spektrofotometre ile analiz edildi. Her iki hücre hattında PFKFB3 baskılanması beklendiği gibi, F2,6BP seviyesini yaklaşık 4 kat azalttı ($p<0,001$; Şekil-16). ODC1'in F2,6BP seviyeleri üzerindeki etkisi bilinmemektedir. İlginç bir şekilde; PANC1 hücrelerinde ODC1'in siRNA ile baskılanması, PFKFB3 kadar olmamakla beraber, kontrol örneğine kıyasla F2,6BP seviyelerinde yaklaşık %20 düzeyinde bir azalmaya neden oldu ($p<0,05$; Şekil-16). Kombine siRNA örneklerindeki F2,6BP seviyesi, PFKFB3'ün tek başına baskılandığı örneklere yakın oranda belirlendi ($p<0,001$; Şekil-16).



Şekil-16: PDAK hücrelerinde PFKFB3'ün baskılanması hücre-içi F2,6BP seviyesini azaltır. Hücreler kontrol siRNA (siKtrl), PFKFB3 ve ODC1 ekspresyonlarına özgün siRNA molekülleri (siPFKFB3; siODC1) ile tek tek ya da kombine (siPFKFB3/siODC1) olarak transfecte edildi. siRNA transfeksiyonundan 48 saat sonra hücreler 100 mM NaOH/Tris asetat tamponunda lize edildi. pH nötralize edildikten sonra enzim-eşleşmeli kinetik bir yöntem ile hücre-içi F2,6BP seviyesi analiz edildi. Sonuçlar, total protein değerlerine normalize edildi. Deneyler 3 kez (n=3) tekrarlandı ve her bir deney duplike olarak çalışıldı. Görseldeki değerler, temsili bir çalışmanın ortalama±standart sapmalarını göstermektedir. * $p<0,05$, ** $p<0,001$ siKtrl örneğine göre.

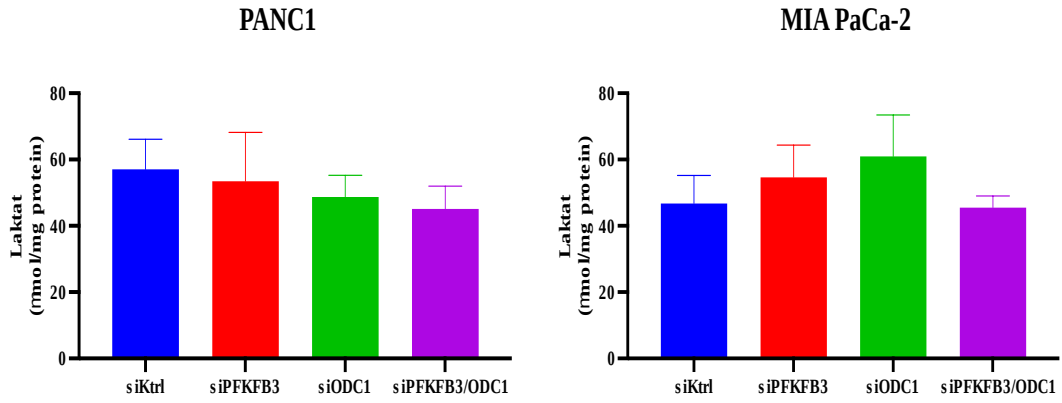
4.2.2. PFKFB3 ve ODC1'in siRNA Aracılı Baskılanması Sonrası Glikolitik Aktivite Üzerine Etkisi

PANC1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1 ekspresyonlarının tekli ve kombine bir şekilde 48 saat siRNA-aracılı baskılanmasının glikolitik aktivite üzerindeki etkisini değerlendirmek için besiyerlerindeki glikoz ve laktat seviyeleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. Elde edilen sonuçlarda PFKFB3 ve ODC1'in tek tek ya da kombine olarak 48 saat baskılanmasının hücreler tarafından glikoz alımı ve laktat salgılanmasına anlamlı bir etkisinin olmadığı görüldü (Şekil-17, Şekil-18).



Şekil-17: PDAK hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1 ekspresyonlarının siRNA yöntemi ile baskılanması glikoz tüketimini etkilememektedir.

Hücreler kontrol siRNA (siKtrl), PFKFB3 ve ODC1 ekspresyonlarına özgün siRNA molekülleri (siPFKFB3; siODC1) ile tek tek ya da kombine (siPFKFB3/siODC1) olarak transfekte edildi. 48 saat sonra besiyerlerindeki glikoz seviyeleri ölçüldü. Glikoz seviyeleri kullanılmamış besiyerindeki seviyeden çıkarılarak glikoz tüketimi hesaplandı ve total protein seviyelerine oranlandı. Deneyler 3 kez (n=3) tekrarlandı ve her bir deney duplike olarak çalışıldı. Görseldeki değerler, temsili bir çalışmanın ortalama $\pm$ standart sapmalarını göstermektedir.

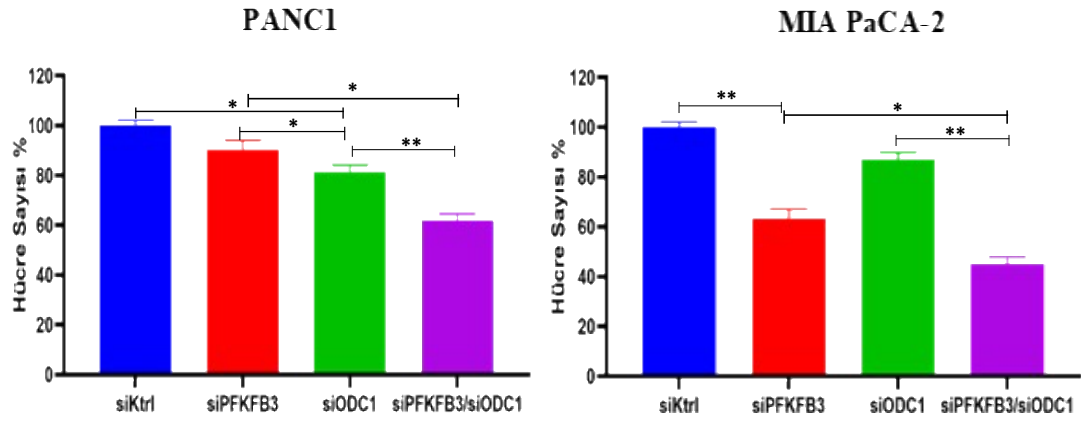


Şekil-18: PDAK hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1 ekspresyonlarının siRNA yöntemi ile baskılanması laktat salınımını etkilememektedir.

Hücreler kontrol siRNA (siKtrl), PFKFB3 ve ODC1 ekspresyonlarına özgün siRNA molekülleri (siPFKFB3; siODC1) ile tek tek ya da kombine (siPFKFB3/siODC1) olarak transfekte edildi. 48 saat sonra besiyerlerindeki laktat seviyeleri ölçüldü ve total protein seviyelerine oranlandı. Deneyler 3 kez (n=3) tekrarlandı ve her bir deney duplike olarak çalışıldı. Görseldeki değerler, temsili bir çalışmanın ortalama±standart sapmalarını göstermektedir.

4.2.3. PFKFB3 ve ODC1'in siRNA Aracılı Baskılanmasının Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

PFKFB3 ve ODC1 ekspresyonlarının tek tek ve kombine olarak siRNA ile baskılanmasının PDAK hücre proliferasyonuna etkisini test etmek için transfeksiyondan 48 saat sonra kristal viyole boyama yöntemi uygulandı. PFKFB3 siRNA MIA PaCa-2 hücrelerinin proliferasyonunu baskıarken ($p<0,01$), ODC1 siRNA'nın PANC1 hücre proliferasyonunu azalttığı gözlemlendi ($p<0,05$; Şekil-19). PFKFB3 ve ODC1'in kombine olarak baskılanması her iki PDAK hücre hattında proliferasyonuna anlamlı olarak azalttı ($p<0,05$; Şekil-19).



Şekil-19: PFKFB3 ve ODC1'in birlikte baskılanması PDAK hücre proliferasyonu azaltır.

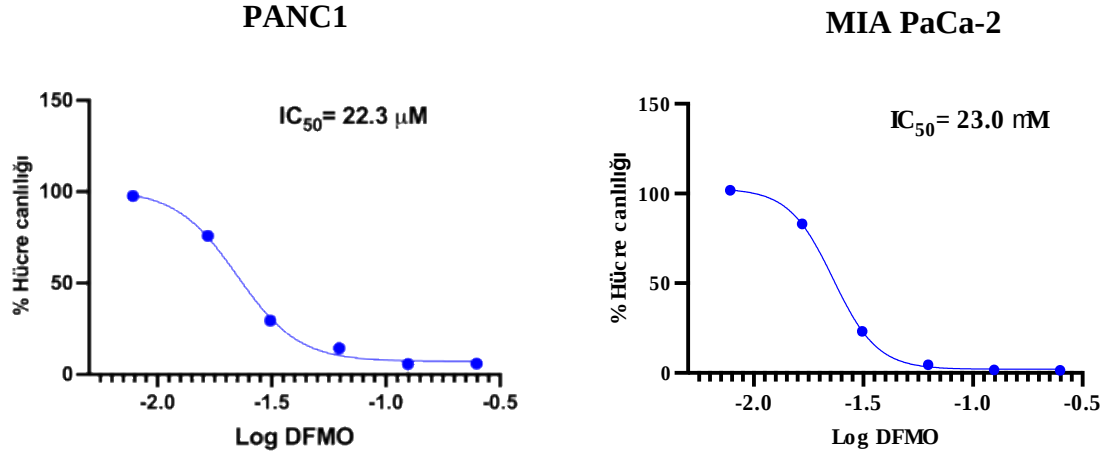
Hücreler kontrol siRNA (siKtrl), PFKFB3 ve ODC1 ekspresyonlarına özgün siRNA molekülleri (siPFKFB3; siODC1) ile tek tek ya da kombine (siPFKFB3/siODC1) olarak transfeke edildi. Hücreler siRNA uygulandıktan 48 saat sonra fiks edilip kristal viyole ile boyandı. Absorbans 595 nm'de ölçüldü. Proliferasyon siKtrl grubuna göre normalize edilerek %'lik değerlere çevrildi. Deney 3 kez tekrarlandı (n=3). Değerler dublike olarak gerçekleştirilen temsili bir deneyin ortalama $\pm$ standart sapma'sını göstermektedir. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ siKtrl örneğine göre.

4.3. PFKFB3 ve ODC1 Enzimatik Aktivitelerinin PANC1 ve MIA PaCa-2 Hücrelerinde Özgün Kimyasal İnhibitörler Kullanılarak Farmakolojik Olarak İnhibe Edilmesi

4.3.1. PANC1 ve MIA PaCa-2 Hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1 inhibitörlerinin Etkin Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Yakın zamanda AstraZeneca tarafından geliştirilen PFKFB3 inhibitörü AZP3-26'nın tümör hücre glikolizini baskılayan etkin dozlarında (Boyd ve ark., 2015), hücrelerde sitotoksisiteye neden olmadığı gösterilmiştir. Grubumuz tarafından yapılan ve bu inhibitörün ilk defa kullanıldığı güncel bir çalışmada (Ozcan ve ark., 2021); bu inhibitörün 20 μ M konsantrasyona kadar PDAK hücrelerinde F2,6BP seviyesini ve glikolizi baskılamasına rağmen hücre proliferasyonunda 72 saate kadar önemli bir etkisinin olmadığı görüldü. Bu çalışmalar referans alınarak, çalışmamızda PFKFB3 inhibitörü AZP3-26'nın 20 μ M konsantrasyonunda kullanılmasına karar verildi.

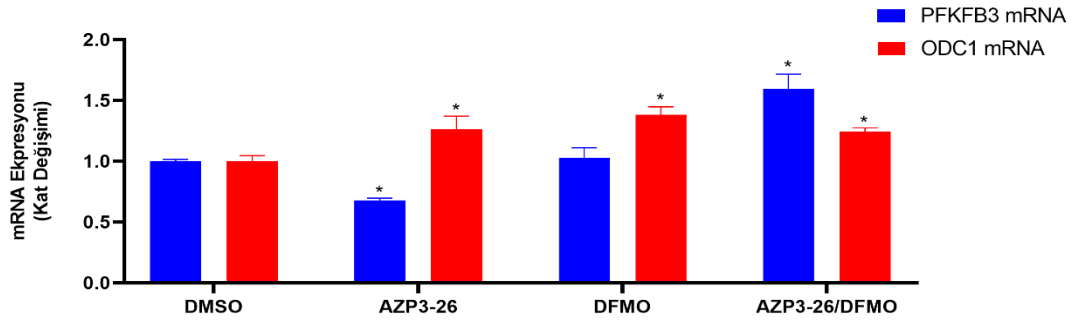
ODC1 inhibitörü DFMO (eflornitin)'nin farklı kanser hücrelerinde anti-proliferatif bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Mohammed ve ark., 2014). Ancak, PDAK hücrelerindeki etkin dozunu gösteren detaylı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle öncelikle, çalışma kapsamında kullanılan PANC1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde hücre proliferasyonunu baskılayan etkin dozun belirlenmesi hücre canlılığı testi gerçekleştirildi. Bu amaçla hücreler, 96-kuyuculu plaklara kuyucuk başına 3 bin hücre gelecek şekilde triplike olarak ekildi. Ertesi gün hücelere 17,5–1000 μ M doz aralığında DFMO eklendi. Yetmiş iki saat sonra hücreler TCA ile fikse edildi ve hücre canlılığı SRB yöntemi ile 510 nm'de spektrofotometrik olarak belirlendi. Sadece besiyeri içeren kuyucuklardan elde edilen absorbanslar, örnek absorbanslarından çıkarıldı. DFMO'nun hücre proliferasyonuna etkisi sadece DFMO çözücüsü PBS'in kullanıldığı örnekler baz alınarak % olarak ifade edildi. Hücre yoğunluğunu %50 oranında azaltan konsantrasyon (IC_{50}) GraphPad Prizma programında 4-parametrelili lineer olmayan regresyon yöntemi ile hesaplandı. PANC1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde IC_{50} değerleri sırası ile 22,3 μ M ve 23,0 μ M olarak belirlendi (Şekil-20).



Şekil-20: DFMO'nun PANC1 ve MIA PaCa-2 hücrelerindeki etkin konsantrasyon aralığının belirlenmesi. PANC1 ve MIA PaCa-2 hücreleri 96-kuyucuklu plakalara ekildi. Ertesi gün farklı konsantrasyonlarda (17,5–1000 μM) DFMO eklendi ve 72 saat edildi. Hücre canlılığı SRB yöntemi ile belirlendi. Doz-cevap eğrisi GraphPad Prizma programında çizildi ve IC_{50} değerleri 4-parametrelili lineer olmayan regresyon yöntemi ile belirlendi. Dozlar (X aksisi) logaritmik ($\log_{10}$) değerlere çevrildi.

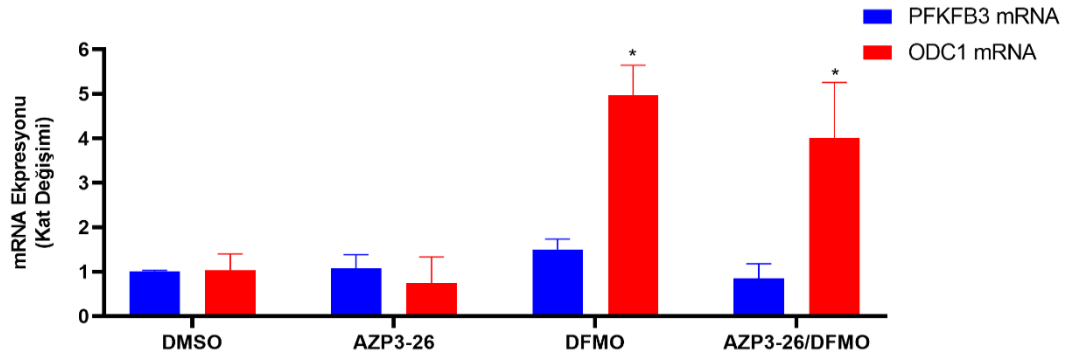
4.3.2. PFKFB3 ve ODC1 Enzimlerinin Farmakolojik İnhibisyonlarının PFKFB3 ve ODC1 mRNA ve Protein Ekspresyonları Üzerine Etkisi

PFKFB3 ve ODC1 enzim aktivitelerinin farmakolojik olarak tek tek ve kombine inhibisyonlarının PFKFB3 ve ODC1 mRNA ekspresyonlarına etkisini görmek için gerçek-zamanlı qPCR analizi gerçekleştirildi. PANC1 hücrelerinde PFKFB3 aktivitesinin AZP3-26 ile baskılanması PFKFB3 mRNA seviyesinde yaklaşık %35 düzeyinde bir azalmaya, ODC1 mRNA seviyesinde yaklaşık %30 düzeyinde bir artışa neden oldu ($p < 0,05$; Şekil-21). ODC1 enzimatif aktivitesinin DFMO ile inhibisyonu ODC1 mRNA seviyesinde yaklaşık %30 düzeyinde bir artışa neden olurken ($p < 0,05$) PFKFB3 mRNA seviyesini etkilemedi (Şekil-21). AZP3-26 ve DFMO kombine uygulaması PFKFB3 ve ODC1 mRNA düzeylerinde anlamlı bir artışa neden oldu ($p < 0,05$; Şekil-18 ve Şekil-21). MIA PaCa-2 hücrelerinde ise DFMO uygulamasının ODC1 mRNA seviyesinde artışa neden olduğu gözlemlendi ($p < 0,01$; Şekil-22).



Şekil-21: AZP3-26 ve DFMO inhibitörlerinin PANC1 hücrelerinde mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.

PANC1 hücreleri DMSO, AZP3-26 (20 μ M), DFMO (30 μ M) ve AZP3-26/DFMO kombinasyonu ile 48 saat inkübe edildi. Hücreler lize edilerek total RNA izole edildi ve ters transkripsiyon ile cDNA sentezlendi. Elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak gerçek-zamanlı qPCR gerçekleştirildi. Gerçek-zamanlı qPCR analizleri StepOnePlus cihazında gene özgün FAM işaretli TaqMan problemleri kullanılarak gerçekleştirildi. Endojen kontrol olarak β -aktin kullanıldı ve ekspresyonlar DMSO örneğine göre kat değişimi olarak hesaplandı (DMSO=1). Hesaplamalarda $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanıldı. Deney 3 kez tekrarlandı (n=3). Değerler dublike olarak gerçekleştirilen temsili bir deneyin ortalama $\pm$ standart sapmasını göstermektedir. *p<0,05 DMSO örneğine göre.

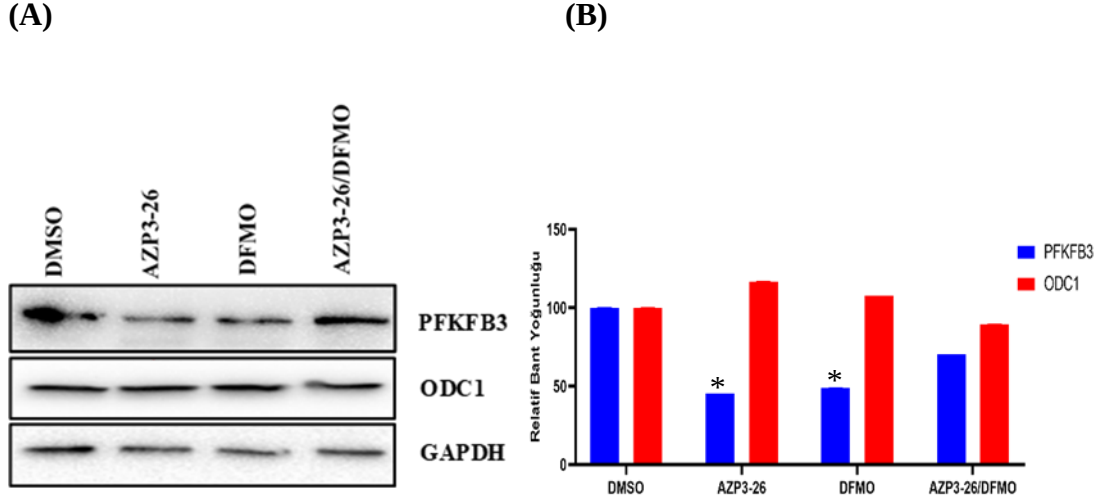


Şekil-22: AZP3-26 ve DFMO inhibitörlerinin MIAPaCa-2 hücrelerinde mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.

MIA PaCa-2 hücreleri DMSO, AZP3-26 (20 μ M), DFMO (30 μ M) ve AZP3-26/DFMO kombinasyonu ile 48 saat inkübe edildi. Hücreler lize edilerek total RNA izole edildi ve ters transkripsiyon ile cDNA sentezlendi. Elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak gerçek-zamanlı qPCR gerçekleştirildi. Gerçek-zamanlı qPCR analizleri StepOnePlus cihazında gene özgün FAM işaretli TaqMan problemleri kullanılarak gerçekleştirildi. Endojen kontrol olarak β -aktin kullanıldı ve ekspresyonlar DMSO örneğine göre kat değişimi olarak hesaplandı (DMSO=1). Hesaplamalarda $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanıldı. Deney 3 kez tekrarlandı (n=3). Değerler dublike olarak gerçekleştirilen temsili bir deneyin ortalama $\pm$ standart sapmasını göstermektedir. *p<0,01 DMSO örneğine göre.

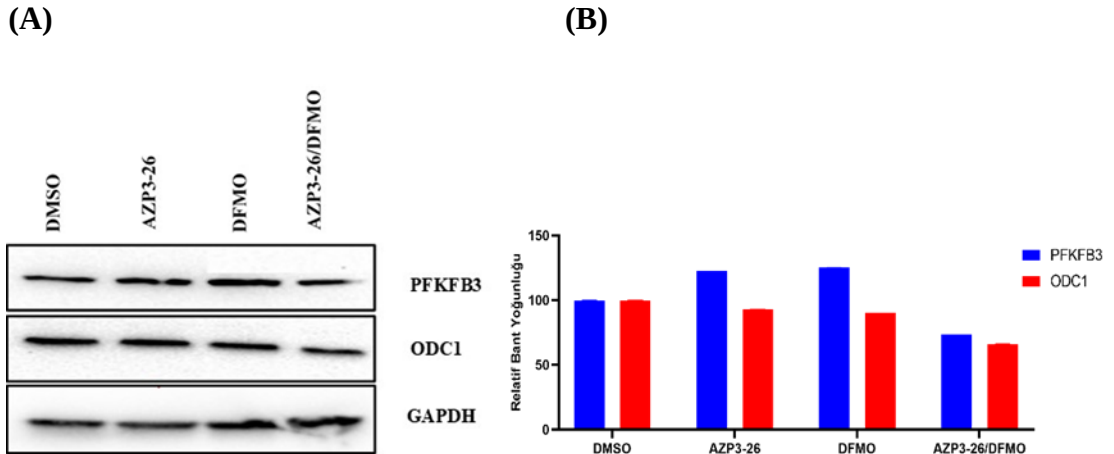
PFKFB3 ve ODC1 enzim aktivitelerinin farmakolojik olarak tek tek ve kombine inhibisyonlarının PFKFB3 ve ODC1 protein ekspresyonlarına etkisini görmek için Western blot analizi gerçekleştirildi. PANC1 hücrelerinde AZP3-26 ve DFMO, PFKFB3 protein seviyesinde yaklaşık %50 düzeyinde bir azalmaya neden olurken (*p<0,01); AZP3-26/DFMO kombinasyonunun AZP3-26'nın PFKFB3 proteini üzerindeki baskılayıcı etkisini kısmen geri çevirdiği gözlemlendi (*p<0,05;

Şekil-23). MIA PaCa-2 hücrelerinde ise inhibitörlerin tekli ya da kombine olarak PFKFB3 ve ODC1 proteinleri üzerinde anlamlı bir etkisi görülmedi (Şekil-24).



Şekil-23: PANC1 hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1 enzimlerinin özgün inhibitörler ile inhibisyonun protein ekspresyonları üzerindeki etkisi.

PANC1 hücreleri DMSO, AZP3-26 (20 μ M), DFMO (30 μ M) ve AZP3-26/DFMO kombinasyonu ile 48 saat inkübe edildi. PFKFB3 ve ODC1 protein ekspresyonları her bir proteine özgün antikorlar kullanılarak Western blot ile analiz edildi ve ChemiDoc MP'de görüntülendi (A). Image J ile bantların dansitometrik analizi gerçekleştirildi. PFKFB3 ve ODC1 proteinlerinin nispi ekspresyon seviyeleri β -aktin bant yoğunluğuna oranlanarak normalize edildi. DMSO örnekleri %100 kabul edildi (B). * $p < 0,05$ DMSO örneğine göre.

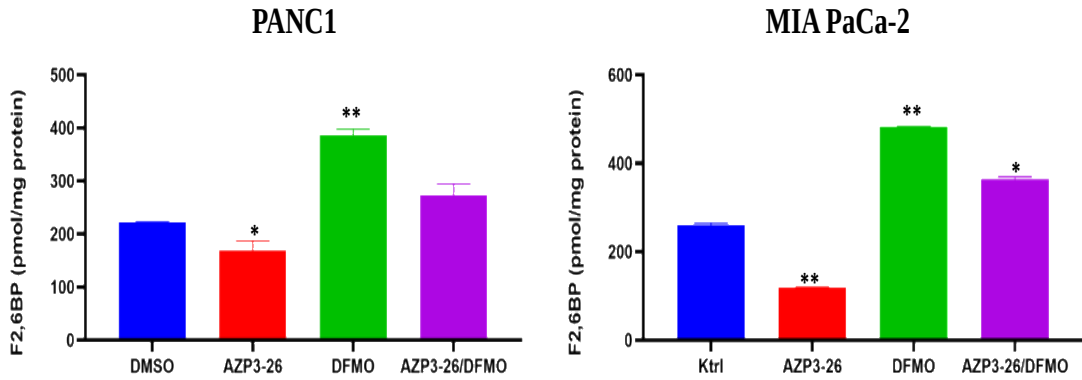


Şekil-24: MIA PaCa-2 hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1 enzimlerinin özgün inhibitörler ile inhibisyonun protein ekspresyonları üzerindeki etkisi.

PANC1 hücreleri DMSO, AZP3-26 (20 μ M), DFMO (30 μ M) ve AZP3-26/DFMO kombinasyonu ile 48 saat inkübe edildi. PFKFB3 ve ODC1 protein ekspresyonları her bir proteine özgün antikorlar kullanılarak Western blot ile analiz edildi ve ChemiDoc MP'de görüntülendi (A). Image J ile bantların dansitometrik analizi gerçekleştirildi. PFKFB3 ve ODC1 proteinlerinin nispi ekspresyon seviyeleri β -aktin bant yoğunluğuna oranlanarak normalize edildi. DMSO örnekleri %100 kabul edildi (B).

4.3.3. PFKFB3 ve ODC1 Enzimlerinin Farmakolojik İnhibisyonlarının F2,6BP Seviyesi Üzerindeki Etkisi

PDAK hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1 enzim aktivitelerinin 48 saat farmakolojik olarak tek tek ve kombine inhibisyonlarının F2,6BP seviyelerine üzerindeki etkisini test etmek enzim-eşleştirmeli kinetik bir yöntem ile spektrofotometrik olarak analiz edildi. PANC1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde PFKFB3'ün AZP3-26 ile inhibisyonu F2,6BP seviyelerinde sırasıyla yaklaşık %25 ve %55 ($p<0,05$ ve $p<0,01$; Şekil-25) düzeyinde bir azalmaya neden olurken; ODC1'in DFMO ile inhibisyonu F2,6BP seviyelerinde sırasıyla yaklaşık %75 ve %85 ($p<0,01$; Şekil-25) düzeyinde bir artışa neden oldu. Bununla birlikte AZP3-26 ve DFMO'nun birlikte kullanımı PANC1 hücrelerinde F2,6BP seviyesini değiştirmezken, MIA PaCa-2 hücrelerinde F2,6BP seviyesini %40 arttırdı ($p<0,05$; Şekil-25).

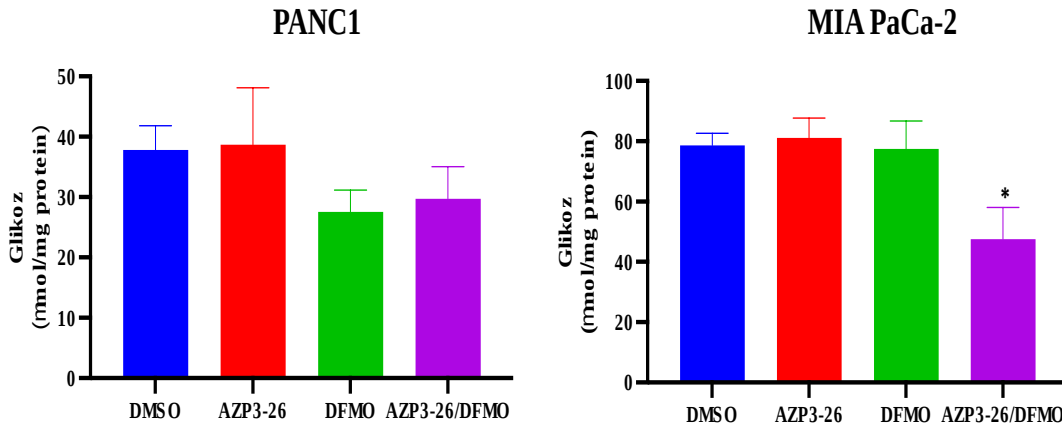


Şekil-25: PFKFB3 aktivitesinin farmakolojik inhibisyonu F2,6BP seviyesini azaltırken ODC1 aktivitesinin inhibisyonu F2,6BP seviyesini arttırmaktadır.

PANC1 ve MIA PaCa-2 hücreleri DMSO, AZP3-26 (20 μ M), DFMO (30 μ M) ve AZP3-26/DFMO kombinasyonu ile 48 saat muamele edildi. Hücreler 100 mM NaOH/Tris asetat tamponunda lize edildi. pH nötralize edildikten sonra enzim-eşleştirmeli kinetik bir yöntem ile hücre-içi F2,6BP seviyesi analiz edildi. Sonuçlar, total protein değerlerine normalize edildi. Deneyler 3 kez ($n=3$) tekrarlandı ve her bir deney duplike olarak çalışıldı. Görseldeki değerler, temsili bir çalışmanın ortalama $\pm$ standart sapmalarını göstermektedir. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ DMSO kontrol örneğine göre.

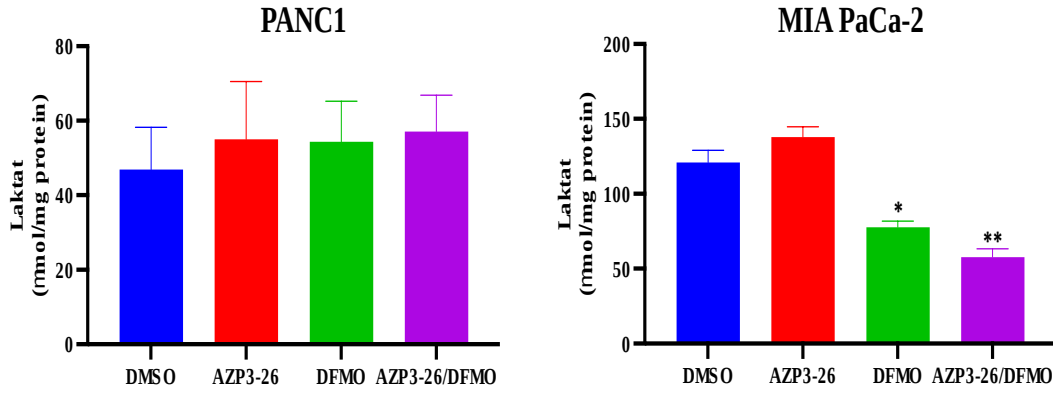
4.3.4. PFKFB3 ve ODC1 Enzimlerinin Farmakolojik İnhibisyonlarının Glikolitik Aktivite Üzerine Etkisi

PANC1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1 enzim aktivitelerinin sırasıyla AZP3-26 ve DFMO ile tek tek ve kombine olarak 48 saat süre baskılanmasının glikolitik aktivite üzerindeki etkisini değerlendirmek için besiyerlerindeki glikoz ve laktat seviyeleri spektrofotometrik olarak ölçüldü. MIA PaCa-2 hücrelerinde AZP3-26 ve DFMO'nun kombine kullanımı glikoz tüketimini %40 düzeyinde azaltırken ($p<0,05$; Şekil-26), PANC1 hücrelerinde herhangi bir etki gözlenmedi (Şekil-26). Diğer taraftan DFMO tek başına MIA PaCa-2 hücrelerinde laktat salınımını yaklaşık %35 düzeyinde azaltırken ($p<0,05$; Şekil-27), AZP3-26/DFMO kombinasyonu ise DMSO kontrole göre yaklaşık %55 ile daha fazla azalmaya neden oldu ($p<0,01$; Şekil-27).



Şekil-26: PFKFB3 ve ODC1 aktivitelerinin farmakolojik olarak birlikte inhibisyonu MIA PaCa-2 hücrelerinde glikoz tüketimini azaltmaktadır.

PANC1 ve MIA PaCa-2 hücreleri DMSO, AZP3-26 (20 μ M), DFMO (30 μ M) ve AZP3-26/DFMO kombinasyonu ile 48 saat muamele edildi. Besiyerindeki glikoz seviyesi ölçüldü ve kullanılmamış besiyerindeki seviyeden çıkarılarak glikoz tüketimi bulundu. Sonuçlar protein miktarlarına oranlandı. Deneyler 3 kez ($n=3$) tekrarlandı ve her bir deney duplike olarak çalışıldı. Görseldeki değerler, temsili bir çalışmanın ortalama $\pm$ standart sapmalarını göstermektedir. * $p<0,05$ DMSO örneğine göre.

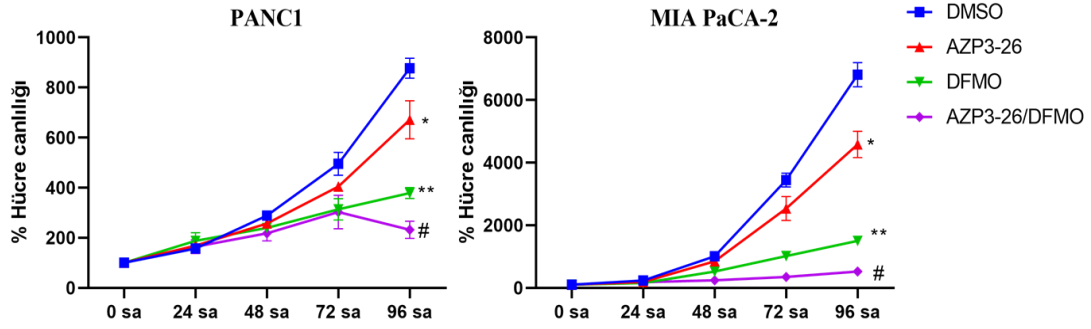


Şekil-27: PFKFB3 ve ODC1 aktivitelerinin farmakolojik olarak birlikte inhibisyonu MIA PaCa-2 hücrelerinde laktat salınımını azaltmaktadır.

PANC1 ve MIA PaCa-2 hücreleri DMSO, AZP3-26 (20 µM), DFMO (30 µM) ve AZP3-26/DFMO kombinasyonu ile 48 saat muamele edildi. Besiyerindeki laktat seviyesi ölçüldü ve protein miktarlarına oranlandı. Deneyler 3 kez (n=3) tekrarlandı ve her bir deney duplike olarak çalışıldı. Görseldeki değerler, temsili bir çalışmanın ortalama±standart sapmalarını göstermektedir. *p<0,05; **p<0,01 DMSO örneğine göre.

4.3.5. PFKFB3 ve ODC1 Enzimlerinin Farmakolojik İnhibisyonlarının PDAK Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkisi

PANC1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1 enzim aktivitelerinin sırasıyla AZP3-26 ve DFMO ile tek tek ve kombine olarak 24, 48, 72 ve 96 saat baskılanmasının hücre canlılığı üzerindeki etkisi SRB yöntemi ile belirlendi. Sonuçlar incelendiğinde; özellikle 96 saat sonrasında AZP3-26 PANC1 hücrelerinin canlılığında yaklaşık %25 (p<0,05, Şekil-28), MIA PaCa-2 hücrelerinin canlılığında %35 (p<0,05, Şekil-28) azalmaya neden olurken; DFMO, PANC1 hücrelerinin canlılığında yaklaşık %55 (p<0,01, Şekil-28), MIA PaCa-2 hücrelerinin canlılığında ise %80 (p<0,01, Şekil-28) düzeyinde bir azalmaya neden oldu. AZP3-26/DFMO kombinasyonu ise her iki hücre hattında da tekli inhibisyonlara göre hücre canlılığında daha fazla baskılanmaya neden oldu (sırasıyla %75 ve %90; Şekil-28).



Şekil-28: PFKFB3 ve ODC1 aktivitelerinin farmakolojik olarak birlikte inhibisyonu PDAK hücre proliferasyonunu azaltmaktadır.

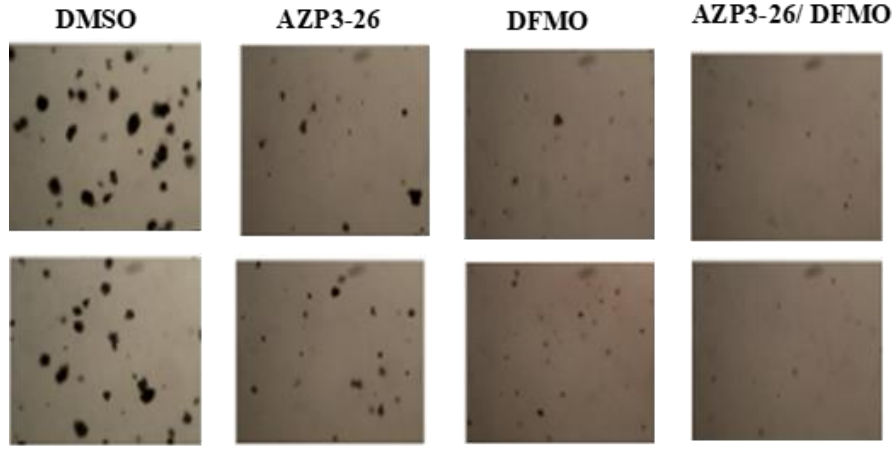
PANC1 ve MIA PaCa-2 hücreleri DMSO, AZP3-26 (20 μ M), DFMO (30 μ M) ve AZP3-26/DFMO kombinasyonu ile 24, 48, 72 ve 96 saat muamele edildi. Hücre canlılığı SRB yöntemi ile belirlendi. Hücre yoğunluğu sıfırıncı (0.) saate göre normalize edilerek %'lik değerlere çevrildi. Deney 3 kez tekrarlandı (n=3). Değerler triplike olarak gerçekleştirilen temsili bir deneyin ortalama±standart sapmasını göstermektedir. *p<0,05, **p<0,001 DMSO kontrole göre; #p<0,05 DFMO örneğine göre.

4.4.PFKFB3 ve ODC1 Enzimlerinin Farmakolojik Olarak Tekli ve Kombine İnhibisyonlarının PDAK Hücrelerinin Onkojenik Potansiyelleri Üzerine Etkisi

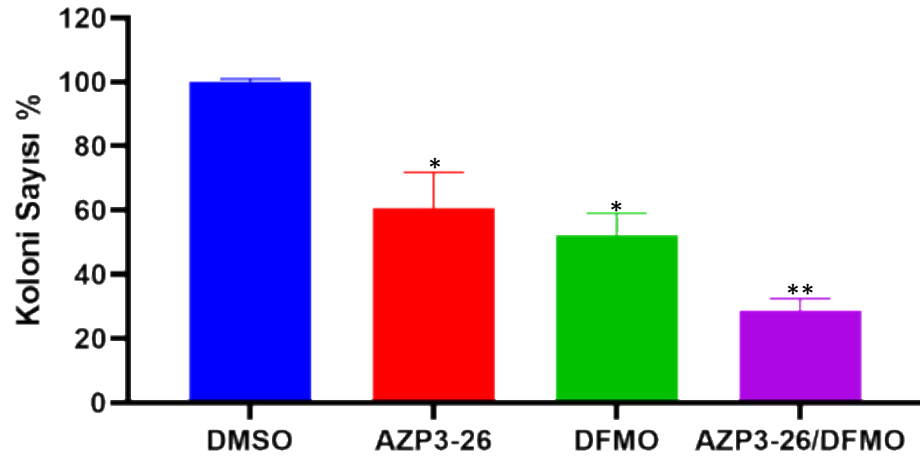
4.4.1. PFKFB3 ve ODC1 Enzimlerinin Farmakolojik İnhibisyonlarının PDAK Hücrelerinin Yumuşak Agarda Tutunmadan Bağımsız Büyümesine Etkisi

PFKFB3 ve ODC1 enzim aktivitelerinin sırasıyla AZP3-26 ve DFMO ile tek ve kombine olarak baskılanmasının PANC1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinin tutunmadan bağımsız koloni oluşturma kapasiteleri üzerine etkisini çalışmak için yumuşak agar deneyleri gerçekleştirildi. Bu amaçla hücreler %0,6 taban agar üzerine %0,3 agar içeren besiyerinde ekildi. Hücreler DMSO, AZP3-26, DFMO ve AZP3-26/DFMO kombinasyonu ile 3 hafta muamele edildi. Koloniler kristal viyole ile boyandıktan sonra resimleri çekildi ve koloni sayıları Image J programı ile analiz edildi. Şekil-29'da görüldüğü gibi PFKFB3 ve ODC1 inhibisyonları tek başlarına her iki hücre hattının yumuşak agarda koloni oluşturma kapasitesini azalttığı (p<0,05), bu etkinin inhibitörlerin birlikte uygulandığı grupta daha fazla olduğu gözlemlendi (p<0,01; Şekil-29 ve Şekil-30).

(A)



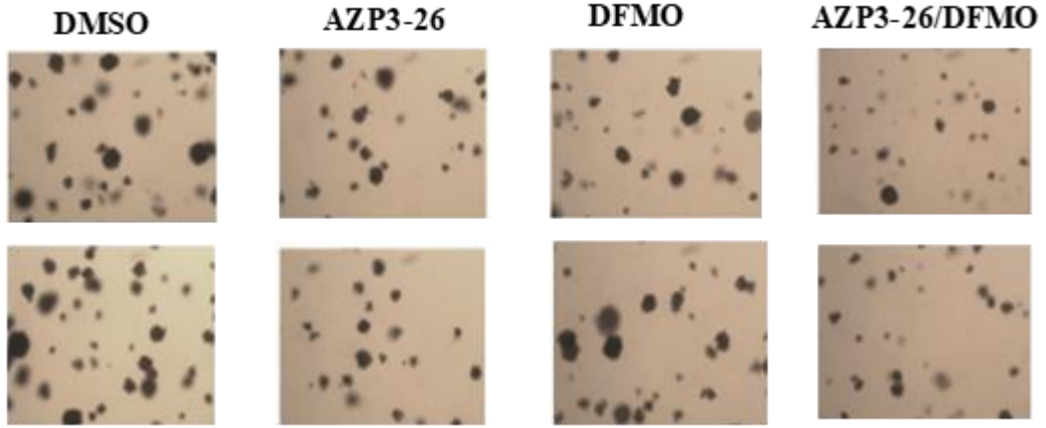
(B)



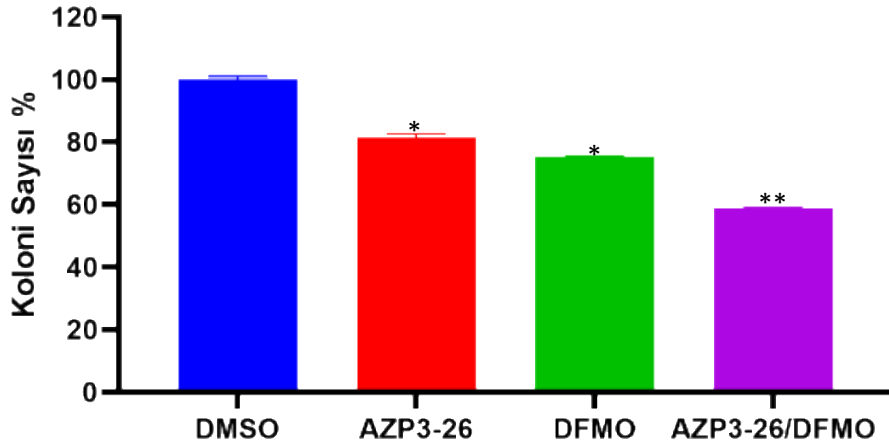
Şekil-29: PANC1 hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1'in farmakolojik olarak birlikte inhibisyonu tekli inhibisyonlara göre yumuşak agarda koloni sayısını daha fazla azaltır.

PANC1 hücreleri %0,6 alt agaroz tabakası üzerine %0,3'lük agaroz üst tabakasına ekildi. Ertesi gün DMSO, AZP3-26 (60 μ M), DFMO (90 μ M) ve AZP3-26/DFMO ilave edildi ve 3 haftada inkübe edildi. Koloniler %0,2 kristal viyole ile boyandı (A). Koloniler Image J programında sayıldı ve DMSO kontrole göre % olarak ifade edildi (B). Deney 3 kez tekrarlandı (n=3). Değerler dublike olarak gerçekleştirilen temsili bir deneyin ortalama $\pm$ standart sapmasını göstermektedir. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ DMSO kontrole göre.

(A)



(B)



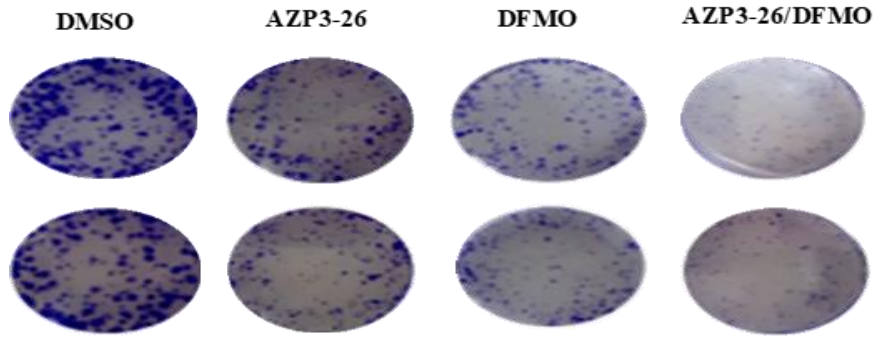
Şekil-30: MIA PaCa-2 hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1'in farmakolojik olarak birlikte inhibisyonu tekli inhibisyonlara göre yumuşak agarda kolonî sayısını daha fazla azaltır.

MIA PaCa-2 hücreleri %0,6 alt agaroz tabakası üzerine %0,3'lük agaroz üst tabakasına ekildi. Ertesi gün DMSO, AZP3-26 (60 µM), DFMO (90 µM) ve AZP3-26/DFMO ilave edildi ve 3 hafta da inkübe edildi. Koloniler %0,2 kristal viyole ile boyandı (A). Koloniler Image J programında sayıldı ve DMSO kontrole göre % olarak ifade edildi (B). Deney 3 kez tekrarlandı (n=3). Değerler dublike olarak gerçekleştirilen temsili bir deneyin ortalama±standart sapmasını göstermektedir. *p<0,05, **p<0,01 DMSO kontrole göre.

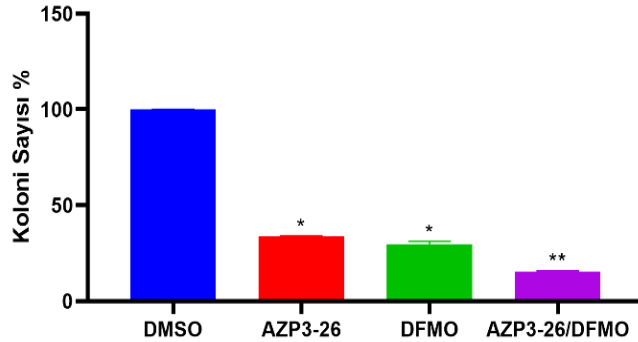
4.4.2. PFKFB3 ve ODC1 Enzimlerinin Farmakolojik İnhibisyonlarının PDAK Hücrelerinin Koloni Oluşturma Potansiyeli Üzerine Etkisi

PFKFB3 ve ODC1 enzim aktivitelerinin sırasıyla AZP3-26 ve DFMO ile tek ve kombine olarak baskılanmasının PANC1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinin koloni oluşturma kapasiteleri üzerine etkisini çalışmak için 24-kuyucuklu plakalara 300'er hücre ekildi. Ertesi gün, DMSO, AZP3-26 (20 μ M), DFMO (30 μ M) ve AZP3-26/DFMO kombinasyonu ile 3 hafta muamele edildi. Koloniler kristal viyole ile boyandıktan sonra resimleri çekildi ve koloni sayıları Image J programı ile analiz edildi. Şekil-31 ve şekil-32'de görüldüğü gibi PFKFB3 ve ODC1 inhibisyonları tek başlarına her iki hücre hattının koloni oluşturma kapasitesini azalttığı ($p<0,05$), bu etkinin inhibitörlerin birlikte uygulandığı grupta daha fazla olduğu gözlemlendi ($p<0,01$; Şekil-31, Şekil-32).

(A)



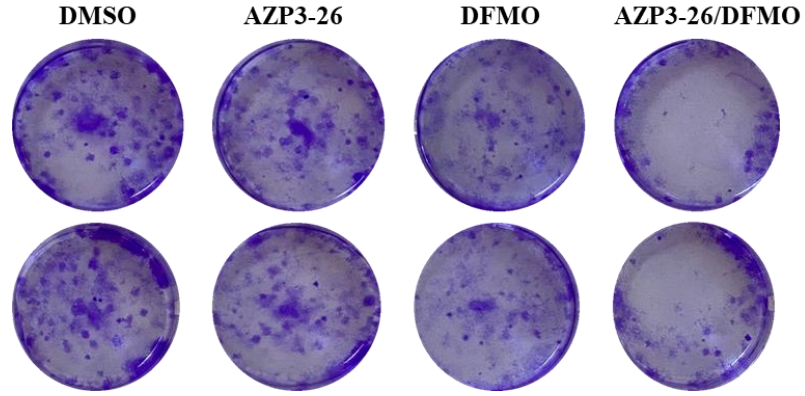
(B)



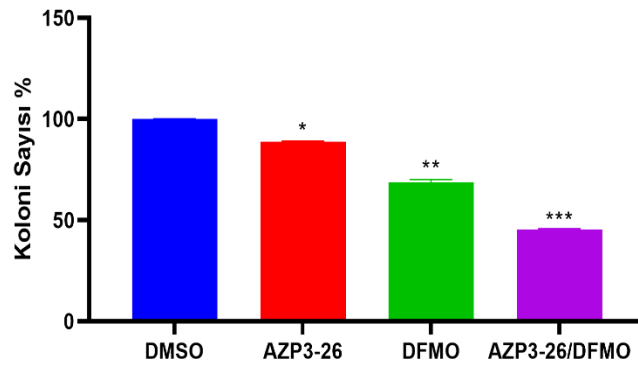
Şekil-31: PFKFB3 ve ODC1'in farmakolojik olarak birlikte inhibisyonu tekli inhibisyonlara göre PANC1 hücrelerinin koloni oluşturma kapasitelerini daha güçlü baskılar.

PANC1 hücreleri 24 kuyulu hücre plakalarına 300 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Ertesi gün DMSO, AZP3-26 (20 μ M), DFMO (30 μ M) ve AZP3-26/DFMO kombinasyonu eklendi. 10 gün sonra hücreler metanolde fikse edildive ve %0,2 kristal viyole ile boyandı ve fotoğraf görüntüleri kaydedildi (A). Koloniler Image J programında sayıldı ve DMSO kontrole göre % olarak ifade edildi (B). Deney 3 kez tekrarlandı (n=3). Değerler dublike olarak gerçekleştirilen temsili bir deneyin ortalama±standart sapmasını göstermektedir. * $p<0,01$, ** $p<0,001$ DMSO kontrole göre.

(A)



(B)

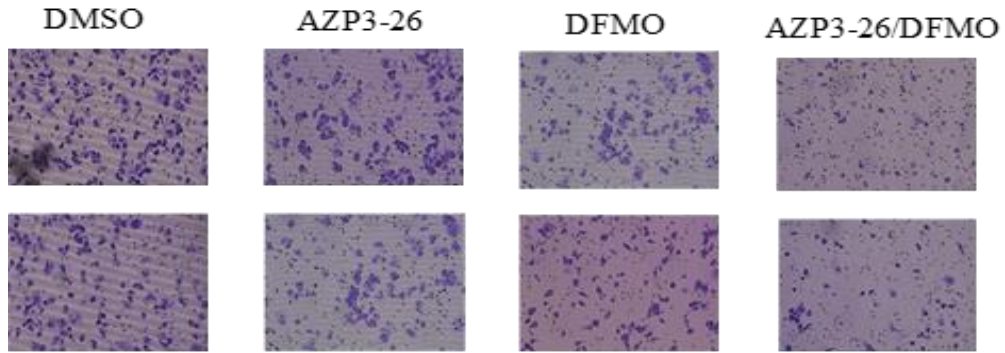


Şekil-32: PFKFB3 ve ODC1'in farmakolojik olarak birlikte inhibisyonu tekli inhibisyonlara göre MIA PaCa-2 hücrelerinin koloni oluşturma kapasitelerini daha güçlü baskılar. MIA PaCa-2 hücreleri 24 kuyulu hücre plakalarına 300 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Ertesi gün DMSO, AZP3-26 (20 μ M), DFMO (30 μ M) ve AZP3-26/DFMO kombinasyonu eklendi. 10 gün sonra hücreler metanolde fikse edildive ve %0,2 kristal viyole ile boyandı ve fotoğraf görüntüleri kaydedildi **(A)**. Koloniler Image J programında sayıldı ve DMSO kontrole göre % olarak ifade edildi **(B)**. Deney 3 kez tekrarlandı (n=3). Değerler dublike olarak gerçekleştirilen temsili bir deneyin ortalama $\pm$ standart sapmasını göstermektedir. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 DMSO kontrole göre.

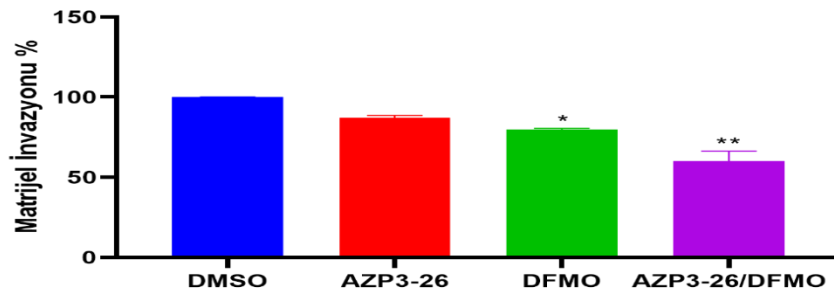
4.4.3. PFKFB3 ve ODC1 Enzimlerinin Farmakolojik İnhibisyonlarının PDAK Hücrelerinin Matrijel İnvazyonu Üzerine Etkisi

PFKFB3 ve ODC1 enzim aktivitelerinin sırasıyla AZP3-26 ve DFMO ile tek ve kombine olarak baskılanmasının PANC1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinin in vitro invazyon kapasiteleri üzerindeki etkisini değerlendirmek için Matrijel invazyon deneyi gerçekleştirildi. 24 saatlik inkübasyon sonrası AZP3-26'nın PANC1 hücrelerinin Matrijel invazyonu üzerine bir etkisinin olmadığı, DFMO'nun ise hücrelerin invazyon potansiyelini DMSO kontrole göre yaklaşık %20 düzeyinde azalttığı görüldü ($p<0,05$; Şekil-30). AZP3-26/DFMO kombinasyonu ile invazyonda yaklaşık %35 ile daha güçlü bir azalma gözlemlendi ($p<0,01$; Şekil-33). MIA PaCa-2 hücrelerinde ise uygulanan deneysel şartlarda bir invazyon gözlenmedi.

(A)



(B)



Şekil-33: PFKFB3 ve ODC1'in farmakolojik olarak birlikte inhibisyonu PANC1 hücrelerinin Matrijelde invazyon kapasitesini baskılar.

PANC1 hücreleri 24 kuyulu hücre plakalarına ekildi. Ertesi gün DMSO, AZP3-26 (20 μ M), DFMO (30 μ M) ve AZP3-26/DFMO kombinasyonu eklendi. 24 saat sonra hücreler tripsin ile kaldırıldı ve %0,5 FBS ile inhibitörleri içeren besiyerinde Matrijel ile kaplı Boyden haznelerine ekildi. Haznelerin alt bölmelerine kemoatraktan olarak %10 FBS içeren normal besi yeri eklendi. 24 saat sonra invaze olan hücreler metanolde fikse edildi ve kristal viyole ile boyandı. (A) Hücrelerin mikroskopik görüntüleri. (B) Hücreler Image J programında sayıldı ve normal şartlarda çoğalan hücrelere normalize edildi. Deney 3 kez tekrarlandı ($n=3$). Değerler dublike olarak gerçekleştirilen temsili bir deneyin ortalama $\pm$ standart sapmasını göstermektedir. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ DMSO kontrole göre.

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

PDAK, standart tedavi seçeneklerine dirençli ölümcül bir kanser türü olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle yenilikçi tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi bu ölümcül hastalığın kontrol altına alınmasında çok büyük önem arz etmektedir. Diğer bazı kanser türlerinde başarı gösteren hedefe yönelik tedavi yaklaşımlarının (Baudino, 2015) henüz PDAK'da kullanımı yoktur. PDAK olgularının neredeyse tamamında gözlemlenen onkogenik KRAS geninin aktive edici mutasyonlarının ve aktivasyonunun PDAK gelişiminin hemen her aşamasında gerekli olduğu bilinmektedir (Bryant ve ark., 2014; Kawada ve ark., 2017). Dolayısıyla, KRAS ve ilişkili sinyal yollarını modifiye etmeye yönelik yaklaşımlar PDAK gibi mutant KRAS taşıyan kanserlerde hedefe yönelik tedaviler için büyük önem teşkil etmektedir. Nitekim G12C mutasyonu (12.pozisyonundaki glisin amino asidinin sistein ile yer değiştirmesi) taşıyan KRAS proteinini özgün olarak hedefleyen bir ilaç (sotorasib) kliniğe girmiştir (Skoulidis ve ark., 2021). Ancak, G12C mutasyonunun pankreas kanserinde nadir görülmesi bu tedavinin genelleştirilmesi yönünde önemli bir engeldir. Bunun dışında KRAS-ilişkili onkogenik yollarda görevli enzimleri (ör. MEK) inhibe etmeye yönelik yaklaşımların da genel olarak pankreas kanserlerinde etkisi bulunmamaktadır (Neuzillet ve ark., 2014).

Metabolik yeniden programlanma kanserlerin ayırt edici özelliklerinden biri olarak kabul edilmektedir (De Berardinis & Chandel, 2016; Hanahan & Weinberg, 2011). Özellikle tümör hücrelerinin enerji metabolizması, proliferasyonu ve sağkalımını kontrol eden metabolik yolların aktivitesi, tümör hücrelerinin orijin aldıkları normal hücrelere göre, dramatik farklılıklar arz eder (De Berardinis & Chandel, 2016). Bununla birlikte, farklı kanser türleri geliştirdikleri metabolik fenotip ve kullandıkları enzimler açısından farklılıklar gösterirler. PDAK, sergilediği metabolik değişiklikler ve bağımlılıklar açısından son derece kötü bir üne sahiptir (Qin ve ark., 2020). Pankreas tümörleri geliştikleri doku ve mikro çevre açısından önemli farklılıklar sergiler. Yoğun stroma ve desmoplastik reaksiyonlar, solid stres ve intersitisyel sıvı basıncının yol açtığı besin açısından fakir ve hipoksik ortam pankreas tümörlerinin metabolik bağımlılık ve adaptasyonunda kritik rol oynar (LaRue ve ark., 2022). Görünürdeki bu olumsuz koşullara pankreas tümörleri üç ana yolla karşı koyarlar: (1) Glikoz, amino asit ve lipid vb. besin maddelerinin enerji

metabolizması yollarının yeniden programlanması; (2) mikro çevreden alternatif besin kaynaklarını kullanabilmesi ve (3) mikro çevredeki diğer moleküller ile metabolik alışverişlerin geliştirilmesi (Y. Li, Zhang, Xu, & Liu, 2021).

Yapılan çalışmalar, tümör hücrelerinde gözlemlenen metabolik değişikliklerin onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin kontrolü altında olduğunu göstermektedir (Alexiou ve ark., 2017; Hamanaka & Chandel, 2012). PDAK vakalarının tamamına yakınında karşılaşılan KRAS onkogeninin atkive edici mutasyonları (~%50 G12D; ~%30 G12V) ve bu KRAS proteinin hedefleri arasında bulunan c-MYC aktivasyonu PDAK'da gözlemlenen metabolik değişikliklerde etiyolojik bir rol oynamaktadır (Ala, 2022). KRAS, PDAK hücrelerinde glikoz alımı ve Warburg etkisi ile glikolizi hızlandırır (Kawada ve ark., 2017). Örneğin KRAS PDAK hücrelerinde glikoz alımında görevli GLUT1 proteini ile beraber glikolizin kritik enzimleri olan hekzokinaz 2 (HK2) ve laktat dehidrojenaz A (LDHA) enzimlerinin ekspresyonlarını artırır (Bryant ve ark., 2014). Diğer taraftan, KRAS'ın PDAK hücrelerinde makropinositozu aktive ederek PDAK hücrelerinin ihtiyaç duyduğu amino asitlerin konvansiyonel olmayan bir yolla temin edilmesini sağlar (Harris, 2022). Daha da önemlisi, gelişen metabolik değişimlerin PDAK gelişiminde ve PDAK'ın malin özelliklerinin (ör. hücre çoğalması, sağkalım, invazyon, kemoterapiye direnç vb.) devamında gerekli olduğu bilinmektedir (M. Jia, 2017). KRAS mutasyonlu PDAK hücrelerinin önemli bir kısmında gözlemlenen metabolik değişiklikler ve bu değişikliklerin direkt olarak KRAS'ın kontrolünde gerçekleştiğini gösteren kanıtlar (R. Blum & Kloog, 2014; Bryant ve ark., 2014; Ying, Kimmelman, Lyssiotis, Hua, Chu, Fletcher-Sananikone, ve ark., 2012) nedeniyle son zamanlarda bazı metabolik enzimler ve yollar potansiyel terapötik hedefler olarak değerlendirilmeye başlanmıştır (Cohen ve ark., 2015; Vaziri-Gohar, Zarei, Brody, & Winter, 2018). Ancak, PDAK'ın metabolik plastisitesi dikkate alındığında (Liang ve ark., 2016; Perera & Bardeesy, 2015) tekli metabolik hedef yerine kombinasyonların başarı şansının düşük olacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada PDAK hücrelerinde KRAS tarafından aktive edilen aerobik glikoliz ve poliamin sentez yolağının birlikte hedeflenmesinin PDAK hücrelerinin in vitro metabolik, proliferatif ve onkojenik potansiyelleri üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlandı. PDAK hücrelerinde glikolizin baskılanması için PFKFB3 izoenzimi seçildi. PFKFB3, aralarında pankreas kanserlerinin de dâhil olduğu birçok kanser türünde fazla miktarda eksprese edilmektedir (Atsumi ve ark., 2002). Ayrıca glikolizin hız sınırlayıcı enzimlerinden PFK1 enziminin önemli bir allosterik aktivatörü olan F2,6BP molekülünün yapımından sorumlu PFKFB izoenzimleri arasında en fazla kinaz aktivitesine sahip olması nedeniyle de, PFKFB3 kanser tedavisinde değerlendirilebilecek bir terapötik hedef olarak görülmektedir (Shi ve ark., 2017). Bununla birlikte PDAK hücrelerinde PFKFB3 enziminin rolünü değerlendiren az sayıda çalışma bulunmaktadır (S.C. Ozcan ve ark., 2021).

Çalışmada poliamin sentez yolağının inhibisyonu için bu yolağın hız sınırlayıcı enzimi ODC1 seçildi. Ruiz-Pérez ve ark. (2015) tarafından neuroblastoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada glikolizin glikoz analogu 2-DG yoluyla inhibisyonunun MYC-ilişkili ODC1 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Çalışmadaki bulgular bu iki yolağın tümör hücre biyolojisinde iş birliği yapabileceği ve dolayısıyla glikoliz ve poliamin sentez yolağının birlikte inhibisyonunun tümör metabolizmasının hedeflenmesinde değerlendirilebileceği öngörüsünü desteklemektedir. Nitekim başka bir çalışmada 2-DG ile ODC1'in geri dönüşümsüz inhibitörü DFMO ile birlikte kullanımının tekli ajanlara göre PDAK tümör oluşumunu daha güçlü bir şekilde baskıladığı rapor edilmiştir (Saydjari, Alexander, Barranco, Townsend, & Thompson, 1989). Bununla birlikte; farklı in vitro ve prelinik modellerde tek başına ya da farklı ajanlara kombine bir şekilde anti-tümörojenik etki gösteren 2-DG, terapötik dozlarda yaygın toksisiteye neden olmaktadır (Laussel & Léon, 2020). Bu durum, 2-DG'nin klinikte kullanımına engeldir. Bununla birlikte, PFKFB3 aktivitesinin farklı yöntemlerle baskılanmasının tümör hücrelerindeki hızlanmış glikolitik aktivitenin kontrol altına alınmasında başvurulabilecek bir anti-kanser yaklaşım olduğunu gösteren çok sayıda çalışma bulunmamaktadır (Jones ve ark., 2022).

Çalışma kapsamında yapılan in siliko analizler PFKFB3 ve ODC1 genlerinin ekspresyonlarının PDAK tümörlerinde arttığını göstermektedir. Bu bulgu Nakkina ve ark. (2021) ile Minchenko ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmalar ile uyumludur. Çalışmada model olarak seçilen ve KRAS mutasyonu taşıyan PANC1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde, bu iki genin ekspresyonları genetik olarak siRNA yöntemi ile baskılandı. qPCR sonuçları siRNA yöntemi ile her iki gen ekspresyonunun tek tek ve kombine olarak başarılı bir şekilde azaltılabildiğini göstermektedir. Ancak ilginç bir şekilde her iki hücre hattında ODC1'in tek başına susturulmasının PFKFB3 mRNA seviyesini azalttığı; PFKFB3'ün tek başına susturulmasının sadece PANC1 hücrelerinde ODC1 ekspresyonunu baskıladığı görüldü (Şekil-12). Western blot yöntemi ile analiz edilen protein düzeylerine bakıldığında ise PANC1 hücrelerinde mRNA düzeyleri ile uyumlu bir şekilde PFKFB3 susturulan örneklerde ODC1 protein düzeyinde azalma gözlemlenirken, ODC1 susturulması PFKFB3 protein düzeyinde bir azalmaya neden olmadı (Şekil-13). MIA PaCa-2 hücrelerinde ise PFKFB3 susturulması ODC1 mRNA düzeyini etkilemezken ODC1 protein düzeyinde artışa neden oldu. MIA PaCa-2 hücrelerinde ODC1 susturulması PFKFB3 protein düzeyinde, mRNA ile düzeyleri ile uyumlu bir şekilde artışa neden oldu. Bu veriler PFKFB3 ve ODC1'in karşılıklı regülasyonuna işaret etmektedir. Bununla birlikte, mRNA ve protein düzeyinde gözlemlenen kısmi uyumsuzluk bu sonuçların biyolojik önemine ilişkin yorumların dikkatli yapılmasını gerektirmektedir. Hücre içi mRNA ve protein seviyelerini kontrol eden farklı mekanizmalar dikkate alındığında, mRNA ve protein düzeylerinin görünen uyumsuzluklar her zaman beklenmeyen bir durum değildir (Schmidt, 1989). Diğer taraftan gerek qPCR ve gerekse Western blot analizlerinde kullanılan problemlerin ve antikörlerin bütün mRNA kırılma varyantlarına ve proteinlerine özgün olmaması gözlemlenen bu uyumsuzlukların diğer bir nedeni olabilir.

PFKFB3'ün baskılanmasının hücre-içi F2,6BP seviyesini düşürdüğü bilinmektedir (Shi ve ark., 2017). Bu çalışmada da beklendiği gibi, PFKFB3'ün siRNA ile susturulması her iki PDAK hücresinde F2,6BP seviyelerini önemli oranda düşürdü (Şekil-16). Elde edilen bu sonuç, PFKFB3 izoenziminin çalışılan PDAK hücrelerindeki F2,6BP seviyesinin kontrolünde kritik bir role sahip olduğu görüşünü desteklemekte olup, bu sonuç farklı kanser türlerinde yapılan çalışmalarla uyumludur

(Kotowski ve ark., 2021). PANC1 hücrelerinde ise ODC1'in siRNA ile susturulması PFKFB3 kadar olmasa da F2,6BP seviyesini önemli oranda azalttığı görüldü (Şekil-16). Bu bulgu, genel olarak poliamin sentez yolağına özel olarak ODC1 ekspresyonunu hücre-içi F2,6BP seviyeleri ile ilişkilendiren ilk gözlem olup, poliamin sentez yolağı ile glikoliz arasındaki olası bağlantıya ilişkin öngörünün mekanistik temellerine ışık tutabilir. Bununla birlikte, MIA PaCa-2 hücrelerinde bu etkinin görülmemesi ODC1 ve F2,6BP ilişkisinin hücreye özgün olabileceğine işaret etmektedir. Diğer taraftan, her ne kadar, ODC1 baskılanan hücrelerde F2,6BP seviyesindeki azalmaya PFKFB3 mRNA seviyesindeki azalma eşlik etse de ODC1'in siRNA-aracılığıyla baskılanmasının F2,6BP seviyesi üzerindeki etkisinin PFKFB3-aracılı olup olmadığının anlaşılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulacaktır. PFKFB enzimleri dışında TP53 ile İndüklenen Glikoliz ve Apoptoz Regülatör (TIGAR) proteininin fosfataz aktivitesi ile F2,6BP molekülünün F6P molekülüne hidrolizini katalizleyerek tümör hücrelerinde hücre-içi F2,6BP seviyesinin kontrolünde görev aldığı bilinmektedir (Bensaad ve ark., 2006). Diğer taraftan, enzimlerin ekspresyon seviyeleri değişmeksizin posttranslasyonel modifikasyonlarla aktivitelerinin değişebileceği dikkate alındığında (Ryšlavá, Doubnerová, Kavan, & Vaněk, 2013); ODC1 ve F2,6BP seviyeleri arasındaki ilişkinin moleküler temellerinin aydınlatılmasına yönelik ilave çalışmalar bu iki yolağın PDAK metabolizması ve gelişimindeki rollerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sunabilir.

Bu çalışmada PFKFB3'ün ve ODC1'in tek başlarına siRNA ile susturulması PDAK hücrelerinin glikoz alımı ve laktat seviyesi ile ölçülen glikolitik aktivitesinde herhangi bir etkiye neden olmadı (Şekil-17 ve Şekil-18). Özellikle PFKFB3'ün baskılanmasının glikoz alımı ve laktat salınımını etkilememesi, bu enzimin kabul gören rolü ile uyumlu olmasa da farklı kanser hücrelerinde ve özellikle de PDAK hücrelerinde Yalcin ve ark. (2009 ve 2017) tarafından yapılan çalışmalarda elde edilen bulguları desteklemektedir. Bununla birlikte bu çalışma kapsamında; PFKFB3'ün glikoz alımı ve laktat salınımına etkisinin gözlenmemesinin potansiyel sebepleri arasında; PFKFB3 baskılanması ile F2,6BP seviyesinde görülen düşmenin gözlemlenen glikolitik aktiviteyi düşürmek için yeterli olmaması gibi hücresel nedenler yanında kullanılan analitik yöntemlerin direkt olarak glikolitik aktiviteyi

değerlendirmede yetersiz kalması gibi teknik nedenler olabilir. Bilindiği gibi hücrelerde sentezlenen laktat molekülünün glikoz dışında kaynakları söz konusudur. Bunlar arasında glutamin amino asidi önemli bir yer tutmaktadır (L. Yang, Venneti, & Negrath, 2017). Bu çalışmada PFKFB3 ve ODC1 susturulması sonrası F2,6BP seviyesindeki azalma nedeniyle hücreler glutaminoliz adı verilen bir yolağın aktivitesini arttırarak glikolizdeki yavaşlamaya bağlı enerji ve metabolit kaybını telafi etme yoluna gitmiş olabilir (Wang ve ark., 2018). Nitekim glikolizin farklı noktalardan inhibisyonunun kanser hücrelerine alternatif enerji yollarını kullanmaya ittiğini gösteren çalışmalar vardır (Shiratori ve ark., 2019). PFKFB3 ve ODC1 baskılanmasının hücreler tarafından glikoz kullanımı ve glikoz-kaynaklı laktat sentezini nasıl etkilediğinin net olarak ortaya koyulabilmesi için hücrelerin izotop-ışaretle glikoz ile beslenerek glikoz kaynaklı glikolitik metabolitlerin ve laktat molekülünün nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ya da kütle-spektrofotometresi (MS) gibi ileri yöntemlerle analiz edilmesi gerekir.

Bu çalışmada PFKFB3'ün siRNA-aracılı baskılanması MIA PaCa-2 hücrelerinin proliferasyonunda bir azalmaya neden oldu. ODC1 baskılanması ise PANC1 hücrelerinin proliferasyonunu azalttı. Önemli olarak da PFKFB3 ve ODC1'in kombine olarak siRNA ile susturulması tekli baskılamalara göre her iki hücrenin proliferasyonunda daha büyük azalmaya yolaçtı (Şekil-19). PFKFB3'ün siRNA-aracılı susturulmasının kanser hücre proliferasyonunu baskıladığı bilinmektedir (Gustafsson ve ark., 2018; A. Yalcin ve ark., 2014). Yalcin ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada PFKFB3'ün kısmen kanser hücrelerinin çekirdeğine lokalize olduğunu ve bazı kanser hücrelerinin glikolitik aktivitesini etkilemeden hücre proliferasyonunu regüle ettiğini gösterilmiştir. Bu çalışmada da benzer şekilde PFKFB3'ün baskılanması glikoz alımı ve laktat salınımını etkilemeksizin PDAK hücre çoğalmasını baskıladığı gözlemlendi. Bu bulgu, PFKFB3'ün glikoliz-dışı fonksiyonları olabileceği görüşünü desteklemektedir (Alvarez, Mandal, & Chittiboina, 2021). ODC1'in siRNA ile sessizleştirilmesi PANC1 hücrelerinde PFKFB3 baskılanmasına benzer şekilde hücre proliferasyonunu azalttığı ve PFKFB3 ile ODC1'in birlikte sessizleştirilmesinin tekli baskılamalara göre her iki hücre hattının çoğalmasında daha güçlü azalmaya neden olduğu görüldü.

Bu bulgular PFKFB3 ve ODC1 enzimlerinin kombine hedeflenmesinin PDAK hücrelerinin çoğalmasının kontrolünde başarılı bir strateji olabileceği hipotezini desteklemekte olup bu iki enzimin farklı kanser türlerinde tek başlarına genetik olarak baskılanmasının anti-proliferatif ve antitümörojenik etkisini gösteren çalışmalar ile uyumludur (Calvo ve ark., 2006; Choi ve ark., 2016; Kim ve ark., 2017).

Gen ürünleri proteinlerin hücresel fonksiyonlarının çalışılmasında genetik ve farmakolojik araçlar birbirlerinin destekleyici yöntemler olarak sıklıkla birlikte kullanılmaktadır (Sattari, 2013). Çalışma kapsamında genetik yöntem olarak kullanılan siRNA ve farmakolojik yöntem olarak küçük kimyasal moleküller ile inhibisyon kısa ve çabuk etki göstermesi açısından benzerlik göstermekle birlikte, hedef-dışı etkiler, tesir (efficay) ve güç (potency) açısından farklılıklar sergileyebilir. siRNA moleküllerinin hedef-dışı etkilerinin daha düşük olduğu kabul görmektedir (Fedorov ve ark., 2006). Ancak, özellikle enzimlerin katalitik bölgesini hedefleyen kimyasal moleküllerin kullanıldığı farmakolojik yöntem tesir ve güç açısından siRNA-temelli genetik yöntemlerden üstündür (Knight & Shokat, 2007). Bu çalışmada da hem birbirlerini desteklemesi ve hem de farklı yöntemlerin avantajlarından yararlanmak açısından siRNA ve farmakolojik yöntem birlikte kullanılmıştır. PFKFB3 ile karşı geliştirilen çok sayıda inhibitör bulunmaktadır (Jones ve ark., 2022). Bunlardan 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-1 (3PO), PFKFB3'ün F6P bağlanma bölgesine karşı geliştirilen ilk PFKFB3 inhibitörü olup (Knight & Shokat, 2007), daha sonraki optimizasyon çalışmalarıyla daha aktif PFK15 ve PFK158 analogları sentezlenmiştir. Bu moleküller in vitro ve in vivo anti-glikolitik, anti-proliferatif ve anti-tümörojenik etki sergilemektedirler (Brian F. Clem ve ark., 2013). Bunlardan PFK158 bütün PFKFB3 inhibitörleri arasında faz I klinik denemelere giren (NCT02044861) ilk bileşik olmuştur. Ancak Boyd ve ark. (2015) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada 3PO ve türevlerinin PFKFB3'e in vitro çok yüksek dozlarda dahi (>100 µM) bağlanmadığını göstermiştir. Bundan hareketle sentezlenen ve optimize edilen indol türevi bazı bileşikler tanımlanmış olup, bu bileşiklerin bazılarının PFKFB3'ün ATP bağlanma bölgesine diğer izoenzimlere göre belli bir seçicilik ile bağlandığı ve akciğer kanseri hücre hattı A549'da glikolitik

aktiviteyi baskıladığı rapor edilmiştir. Bu bileşiklerden ticari olarak mevcut AZP3-26 bu çalışma kapsamında kullanılmak üzere seçilmiştir.

ODC1'in enzimatik aktivitesini inhibe etmeye yönelik geliştirilen DFMO (eflornitin)'nun poliamin sentez yolağının inhibisyonunda in vitro ve in vivo yaygın kullanımı vardır (Alexiou ve ark., 2017). DFMO, ODC1'in geri dönüşümsüz bir inhibitörüdür (Ning ve ark., 2003). Deneysel ve klinik çalışmalar DFMO'nun özellikle anaplastik glioma (Levin, Ictech, & Hess, 2018) ile neuroblastomada (Bassiri ve ark., 2015) tedavi ve kolorektal kanserde (Raj ve ark., 2013) önleyici olarak kullanılabileceğine işaret etmektedir. Bu çalışmalar baz alınarak, çalışmamızda ODC1'in farmakolojik olarak inhibisyonu amacıyla DFMO seçilmiştir. Her ne kadar enzimlerin katalitik bölgelerini hedefleyen bu inhibitörlerin hedef gen ve proteinlerinin ekspresyonunu etkilemesi beklenmese de çalışma kapsamında AZP3-26 ve DFMO'nun tekli ve kombine kullanımlarının PFKFB3 ve ODC1 mRNA ve protein ekspresyonlarına etkisi incelendi. Özellikle enzimlerin protein seviyeleri değerlendirildiğinde, AZP3-26'nın PANC1 hücrelerinde PFKFB3'ü mRNA ve protein düzeyinde azalttığı görüldü (Şekil-21). Literatürde AZP3-26'nın kanser hücrelerinde PFKFB3 ekspresyonu üzerindeki etkisini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sonuç, AZP3-26'un transkripsiyonel etkisinin de olabileceğine işaret etmektedir. İlginç olarak PANC1 hücrelerinde DFMO'nun da AZP3-26'ya benzer şekilde PFKFB3'ün protein seviyesini düşürdüğü görüldü (Şekil-23). DFMO'nun PFKFB3 ekspresyonu üzerindeki etkisinin mekanistik temelleri bu çalışma kapsamında incelenmemiştir; ancak ODC1'in poliaminler aracılığıyla c-MYC üzerinden glikolizin önemli bir kontrol enzimi olan pirüvat kinaz M2 (PKM2) ekspresyonunu indüklediğini gösteren çalışmalar (Gupta ve ark., 2018; Zeng ve ark., 2020) dikkate alındığında diğer bir c-MYC hedefi olan PFKFB3'ün de benzer bir mekanizma regüle edilip edilmediğinin araştırılması önemli olacaktır. Her ne kadar AZP3-26'nın fiziksel olarak in vitro PFKFB3'e bağlandığı bilinse de (Boyd ve ark., 2015), bu bileşiğin hücre-içi F2,6BP seviyesine etkisi bilinmemektedir. Çalışmamızda AZP3-26'nın her iki hücre hattında da siRNA kadar olmasa da F2,6BP seviyelerini düşürdüğü gözlemlendi (Şekil-25). Bu etkinin PFKFB3'ün siRNA baskılanması ile elde edilen düzeye ulaşmaması, kullanılan AZP3-26 dozu (20 µM) ile ilişkili olabilir. Ancak bu doz literatürde bu bileşiğin anti-

glikolitik aktivite göstermesi için rapor edilen dozundan (~5 µM) daha yüksektir. Dolayısıyla, AZP3-26'nın PFKFB3'ün kinaz aktivitesi üzerindeki tesiri yeterince güçlü olmayabilir.

Literatürde DFMO'nun F2,6BP üzerindeki etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada DFMO'nun PDAK hücrelerinde F2,6BP seviyesini arttırdığı gözlemlendi (Şekil-25). Bu gözlem siRNA ile yapılan genetik baskılanma deneyleri ile karşılaştırıldığında PANC1 hücrelerinden elde edilen sonuçlar ile uyumludur (Şekil-16). DFMO'nun PANC1 hücrelerinde PFKFB3 protein seviyesini düşürürken F2,6BP seviyesini arttırmasının altında iki neden olabilir: (1) DFMO PFKFB3 proteinin enzimatik aktivitesini posttranlasyonel modifikasyon yoluyla arttırıyor olabilir. Nitekim PFKFB3 proteininin özellikle fosforilasyon yoluyla kinaz:fosfataz aktivite oranının dramatik olarak değişebildiği bilinmektedir (Jones ve ark., 2022). (2) DFMO ile PFKFB3 protein seviyesindeki azalma diğer PFKFB izoenzimlerinin biri ya da birkaçının ekspresyonu/aktivitesinde telafi edici artışı tetiklemiş olabilir. AZP3-26 ve DFMO'nun kombine kullanımının her iki hücrede de F2,6BP seviyesinde düşmeye neden olmaması hatta MIA PaCa-2 hücrelerinde DMSO kontrole göre artışa yolaçması kullanılan dozlar ve/veya uygulama süresinin (48 saat) bu hücrelerde total hücre-içi total F2,6BP seviyesinin kontrol altına alınması açısından yetersiz olduğuna işaret etmektedir. F2,6BP seviyelerinde AZP3-26 ile gözlemlenen düşmenin DFMO ile gözlemlenen artış ile ortadan kalkması elde edilen sonucu açıklayabilecek en gerçekçi senaryo gibi görünmektedir. Bununla birlikte, PFKFB3'ün kısmen hücrelerin çekirdeğine lokalize olduğunu ve çekirdekteki kinaz aktivitesinin bazı hücrel fonksiyonlar (ör. proliferasyon) için gerekli olduğunu gösteren çalışma (Yalcin ve ark., 2009) dikkate alındığında, hücrelerin sitoplazma ve çekirdekteki görece F2,6BP seviyelerinin ölçülmesi F2,6BP üretimini hedef alan stratejilerin etkinliğinin değerlendirilmesi açısından daha uygun olabilir. Diğer taraftan, F2,6BP oldukça dayanıksız bir molekül olup, hücrelerdeki seviyesi hücre siklusunun fazı ve hücre yoğunluğundan etkilenmektedir (Bartrons ve ark., 2018). Çalışma kapsamında kullanılan farmakolojik yaklaşımların meydana getirdiği primer ve sekonder etkiler hücrelerdeki F2,6BP üretimini ve zamanını farklı etkilemiş olabilir. Bununla birlikte, çalışmamızda AZP3-26 ve DFMO kombinasyonunun, tekli inhibisyonlardan farklı olarak MIA PaCa-2 hücrelerinde

glukoz alımı ve laktat seviyesini düşürmesi, yine de hücre tipine bağılı olarak PDAK'da PFKFB3 ve ODC1'in birlikte inhibisyonunun glikolitik aktiviteyi kontrol etmede yararlı olabileceğine işaret etmektedir. Elde edilen bu sonuç F2,6BP seviyeleri ile uyumlu değıl gibi görünse de hücre-içi F2,6BP ölçümü ile besiyerlerinde ölçülen glukoz ve laktat seviyelerinin ölçümünün zamansal açıdan önemli bir farklılık sergilediğı gözardı edilmemelidir. F2,6BP seviyesinin ölçümü analiz esnasında anlık durumu ortaya koyarken, besiyerindeki glukoz ve laktat seviyesi ölçümü ilaç uygulamasından itibaren 48 saat boyunca meydana gelen total değışiklikleri kapsamaktadır. Bunun yerine, F2,6BP seviyelerinin tek bir süre yerine farklı aralıklarla ölçülmesi ve glukoz alımı ile glikolitik aktivitenin işaretli glukoz ile hücre-içi olarak MS ve NMR gibi yöntemlerle ölçülmesi daha doğıru ve anlamlı sonuçlar verebilir.

Glikoliz ve poliamin sentez yolaklarının farklı noktalardan farmakolojik olarak baskılanmasının kanser hücre proliferasyonu ve onkojenik özellikleri baskıladığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Gustafsson ve ark., 2018; W. Jia ve ark., 2018; A. E. Pegg, Madhubala, Kameji, & Bergeron, 1988; Anthony E. Pegg & Casero, 2011). Ancak, her iki yolağın aktivitesinin kombine olarak inhibisyonunun etkisini değıerlendiren çalışma kısıtlıdır (Koomoa ve ark., 2013; Zeng ve ark., 2020). Glikoliz ve poliamin sentez yolağı arasındaki ilişki olabileceğini gösteren bu çalışmalar dikkate alındığında, bu iki yolağın kritik enzimlerinin birlikte inhibisyonunun PDAK gibi metabolik olarak agresif bir kanserin kontrol altına alınmasında yararlı olabileceğine işaret etmektedir.

PFKFB3 ve ODC1'in kombine inhibisyonu her iki PDAK hücresinde proliferasyonu tekli inhibisyonlara göre daha kuvvetli bir şekilde baskıladı. Bu etki özellikle çalışmada kapsamında test edilen son sürede (96 saat) belirgindir (Şekil-28). Çalışmamız, AZP3-26 aracılığıyla PFKFB3 aktivitesinin baskılanmasının kanser hücre proliferasyonu üzerindeki etkisini gösteren ilk çalışma olsa da elde edilen veriler PFKFB3'ün farklı yöntemlerle tek başına inhibisyonunun kanser hücrelerinin çoğalmasına ket vurduğunu raporlayan çalışma sonuçları ile uyumludur (Jones ve ark., 2022). Benzer şekilde ODC1 ile PDAK hücrelerinde yapılan çalışmalar (Gitto ve ark., 2018) kısıtlı olsa da yine bu çalışmadan elde edilen veriler ODC1'in DFMO ile inhibisyonunun farklı kanser türlerinde anti-proliferatif olduğunu gösteren çalışmaları desteklemektedir.

Bu çalışmada PFKFB3 ve ODC1'in tek başına ve kombine hedeflenmesinin hücre proliferasyonuna ek olarak yumuşak agarda üreme, koloni oluşturma ve invazif kapasitelerinin değerlendirildiği onkojenik analizler gerçekleştirildi. AZP3-26 ve DFMO'nun tek başlarına her iki hücrenin yumuşak agarda büyümesini ve iki boyutlu ortamda koloni oluşturma kapasitelerini azalttığı görüldü (Şekil-29 ve Şekil-30). Bu sonuçlar farklı kanser hücrelerinde PFKFB3'ün farmakolojik inhibisyonunun anti-onkojenik etkisini raporlayan çalışmalardan elde edilen veriler ile uyumludur (Jiang ve ark., 2022; Lypova, Telang, Chesney, & Imbert-Fernandez, 2019). Yine ODC1'in farklı kanser hücrelerinde DFMO ile tek başına inhibisyonu koloni oluşturma potansiyellerini zayıflatmaktadır (Evageliou ve ark., 2016). Önemli olarak bu çalışma kapsamında, PFKFB3 ve ODC1'in birlikte inhibisyonları her iki PDAK hücresinde benzer şekilde yumuşak agarda büyüme ve koloni oluşturma kapasitelerini tekli inhibisyonlara göre daha kuvvetli bir şekilde baskıladığı gözlemlendi (Şekil-29—32).

Matrijel deneyleri kanser hücrelerinin in vitro göç ve invazif kapasitelerinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. EMT, kanser hücrelerinin invazif potansiyelini arttırarak metastazda önemli bir rol oynar (Heerboth ve ark., 2015). Literatür incelendiğinde PFKFB3 ve ODC1'in tek başlarına inhibisyonlarının farklı kanser hücrelerinde EMT ve invazyonu azalttığı gösterilmiştir (Manni ve ark., 2005; Sunkara, Prakash, & Rosenberger, 1982; Abdullah Yalcin ve ark., 2017).

Şekil-33'te görüldüğü gibi PANC1 ile gerçekleştirilen Matrijel invazyonu deneyinde, AZP3-26 ve ODC1 inhibitörlerinin kombine uygulamasının tekli uygulamalara göre hücrelerin invazyon kapasitesini daha fazla azalttığı gözlemlendi. PFKFB3 ve ODC1'in benzer onkojenik regülasyon mekanizmaları da dikkate alındığında bu veriler, her iki enzimin birlikte inhibisyonu ile daha kuvvetli anti-invazif etki elde edilebileceği hipotezini desteklemektedir. Ancak, çalışmada uygulanan yöntem ile kontrol MIA PaCa-2 hücrelerinde bir invazyon görülemedi. Matrijel bilindiği gibi farklı ekstrasellüler matriks bileşenleri içermekte olup, her bir tümör hücresinin invazyon kapasitesini değerlendirmeye uygun olmayabilir. Bu nedenle bazı kanser hücrelerinin in vitro invazif kapasitesinin değerlendirilmesinde seçilmiş ekstrasellüler matriks materyalleriyle hazırlanan ortamlar gerekebilir. Nitekim Ikenaga ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada sadece bazı PDAK hücrelerinin invazyon deneylerinde kollajen kullanılmıştır.

PFKFB3'ün gerek siRNA ve gerekse farmakolojik olarak birlikte inhibisyonlarının glikolitik aktiviteyi belirgin düzeyde etkilemeden hücre proliferasyonu ve onkojenik özellikleri azaltması, PDAK hücrelerinde PFKFB3 izoenziminin glikolitik aktivitesi üzerindeki etkisinin sınırlı olabileceğine ancak glikolizden bağımsız olarak bazı hücre fonksiyonları düzenleyebileceğine işaret etmektedir. Nitekim Ozcan ve ark. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada PDAK hücrelerinde PFKFB2 izoenziminin hücre içi F2,6BP seviyesinin ve glikolitik aktivitenin kontrolünde önemli olduğunu ve Yalcin ve ark. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada da PFKFB3'ün PDAK hücre glikolizine etkisinin kısıtlı olabileceğine işaret etmektedir.

Çalışma kapsamında kullanılan görece yeni bir bileşik olan ve henüz anti-kanser potansiyeli daha önce test edilmemiş olan AZP3-26'nın in vitro hücre-temelli testlerde makul bir doz olan 20 µM düzeyinde PDAK hücrelerindeki F2,6BP düzeylerine olan kısıtlı etkisi, bu hücrelerinde PFKFB3'ün bazal şartlarda glikolitik aktivite üzerindeki sınırlı etkisini gösteren çalışmalar (Abdullah Yalcin ve ark., 2017) ile uyumludur. Bununla birlikte AZP3-26 ile F2,6BP üzerinde gözlemlenen etkinin siRNA ile karşılaştırılınca daha düşük düzeyde kalması bu bileşiğin hücre-içi PFKFB3 aktivitesini baskılamada yeterince etkin olmadığına işaret etmektedir. Yine

de AZP3-26'nın kullanılan dozda in vitro anti-onkojenik olabileceğini gösteren bulgularımız, PFKFB3'ün glikoliz-dışı etkilerini akla getirmektedir. Kaldı ki, Yalcin ve ark. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada PFKFB3'ün kısmen çekirdeğe lokalize olarak glikolizdeki etkisinden bağımsız olarak kanser hücre proliferasyonunu indüklediği gösterilmiştir. Mevcut çalışmada AZP3-26 ile gözlemlenen etkinin PFKFB3'ün çekirdekteki aktivitesindeki azalmasına bağlı olarak gerçekleşip gerçekleşmediğinin anlaşılması için PFKFB3'ün çekirdeğe göçünü engelleyen mutasyonlar eşliğinde yapılan geri ekleme deneylerine ihtiyaç vardır.

DFMO ise ODC1 aktivitesinin baskılanmasında kabul görmüş bir bileşiktir. Ancak hücre içi poliamin konsantrasyonu, sadece sentezden etkilenmeyip hücreye poliamin transportuna da bağlıdır (J. Li ve ark., 2020). Özellikle PDAK mikro çevresi poliaminler açısından zengin olup, KRAS hücrelere ODC1 yanında poliamin transportunda görevli proteinlerin de ekspresyonunu uyarır (Phanstiel, 2018). Dolayısıyla ODC1'in inhibisyonu hücre-içi poliamin konsantrasyonunu azaltmakta yetersiz kalabilir. Bu nedenle son zamanlarda yapılan çalışmalarda, hücrelerde poliamin metabolizmasının baskılanmasında ODC1 ile beraber poliamin transportunun birlikte kullanıldığı yaklaşımlar gündeme gelmeye başlamıştır (Gitto ve ark., 2018; Samal ve ark., 2013). Nitekim DFMO ile poliamin transport inhibitörü kombinasyonunun pankreas kanseri hücrelerinde tekli ajanlara göre daha kuvvetli anti proliferatif etki gösterdiği rapor edilmiştir (Muth ve ark., 2014). Ayrıca böyle bir yaklaşımın poliamin metabolizmasının daha kuvvetli inhibisyonu yanında tümör mikro çevresinde anti-tümöral immün yanıtı arttırdığı gözlemlenmiştir (Nakkina, Gitto, Pandey, ve ark., 2021). Diğer taraftan yapılan bazı çalışmalar poliamin sentezinde kullanılan ornitin aminoasitinin kaynağının da kritik olduğuna işaret etmektedir. Çalışmamızın yazımı sırasında yayınlanan güncel bir çalışma da (Lee ve ark., 2023); normal dokular ve diğer birçok kanser türünde arjinin amino asidi ornitin için bir kaynak görevi görürken, pankreas tümörlerinde besiyerinde ve mikro çevrede bulunan glutamin aminositinin ornitin için daha önemli bir kaynak olduğunu ortaya koymuştur. Söz konusu çalışmada, glutaminden ornitin yapımında rol alan ornitin aminotransferaz (OAT) enziminin hedeflenmesinin PDAK hücrelerinde ODC1 inhibisyonuna ya da arjininden ornitin sentezleyen arjinaz (ARG) enziminin

inhibisyonuna göre daha kuvvetli bir anti-tümöral etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda hücre-içi ve besiyerine salgılanan glutamin, poliamin ve türevlerinin ölçülememiş olması, bu çalışma kapsamında DFMO'nun etkinliği ile ilgili bir çıkarımda bulunmamızı engellemektedir. Ancak Lee ve ark. (2023) tarafından yayınlanan güncel çalışma ve DFMO'nun zayıf farmakokinetik özellikleri (Anthony E. Pegg, 2006; Anthony E. Pegg & Casero, 2011) dikkate alındığında DFMO'nun en azından tek başına poliamin sentezinin inhibisyonu üzerinden anti-tümöral etkisinin yeterli olmayacağı değerlendirilebilir. Yapılan farklı çalışmalar DFMO'nun farklı anti-kanser ajanlar ile kombinasyonlarının başarılı olabileceğini desteklemektedir (Muth ve ark., 2014; Tangella, Gajre, Chirumamilla, & Rathhan, 2023).

Birlikte değerlendirildiğinde bu tez çalışması kapsamında elde edilen veriler; metabolik agresifliği ve plastisitesi ile öne çıkan PDAK tümörlerinde PFKFB3 ve ODC1 aktivitelerinin baskılanmasının in vitro olarak tekli inhibisyonlara göre daha kuvvetli anti-onkojenik etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte çalışmamızın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır: (1) Kullanılan genetik ve farmakolojik yaklaşımlar hedef genlerin mRNA ve protein düzeyinde bazı uyumsuzluklar sergilemiştir. (2) AZP3-26'ün F2,6BP üzerindeki etkisi sınırlı bulunmuştur. (3) DFMO'nun poliamin üretimi ve besiyerine salınımı üzerindeki etkisi değerlendirilememiştir. (4) Genetik ve farmakolojik yöntemlerin ölçülen fenotipler üzerindeki etkisinin direkt olarak ilgili protein aktivitesinden kaynaklandığının doğrulanmasına ilişkin herhangi bir deneysel yaklaşım kullanılmamıştır. (5) Glikoz alımı ve glikolitik aktivitenin ölçümünde kullanılan laktat ölçüm metodu ilgili enzimlerin tam olarak etkisini anlamada yetersiz kalabilir. Bu aşamada, MS ve NMR-tabanlı kapsamlı metabolomik analizler, PFKFB3 ve ODC1 tarafından kontrol edilen metabolik aktivitenin daha detaylı anlaşılmasına yardımcı olabilir.

6.KAYNAKLAR

- Abdel-Wahab, N., Safa, H., Abudayyeh, A., Johnson, D. H., Trinh, V. A., Zobniw, C. M., ... Diab, A. (2019). Corrections to: Checkpoint inhibitor therapy for cancer in solid organ transplantation recipients: An institutional experience and a systematic review of the literature (Journal for ImmunoTherapy of Cancer (2019) 7:106 DOI: 10.1186/s40425-019-0585-1). *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0639-4>
- Akyol, Z., Çoker-Gürkan, A., Arisan, E. D., Obakan-Yerlikaya, P., & Palavan-Ünsal, N. (2016). DENSPm overcame Bcl-2 mediated resistance against Paclitaxel treatment in MCF-7 breast cancer cells via activating polyamine catabolic machinery. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 84, 2029–2041. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.016>
- Ala, M. (2022). Target c-Myc to treat pancreatic cancer. *Cancer Biology and Therapy*, 23(1), 34–50. <https://doi.org/10.1080/15384047.2021.2017223>
- Alexiou, G. A., Lianos, G. D., Ragos, V., Galani, V., & Kyritsis, A. P. (2017). Difluoromethylornithine in cancer: New advances. *Future Oncology*, 13(9). <https://doi.org/10.2217/fon-2016-0266>
- Alvarez, R., Mandal, D., & Chittiboina, P. (2021). Canonical and non-canonical roles of pfkfb3 in brain tumors. *Cells*, 10(11), 1–24. <https://doi.org/10.3390/cells10112913>
- Ando, M., Uehara, L., Kogure, K., Asano, Y., Nakajima, W., Abe, Y., ... Tanaka, N. (2010). Interleukin 6 enhances glycolysis through expression of the glycolytic enzymes hexokinase 2 and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3. *Journal of Nippon Medical School*, 77(2), 97–105. <https://doi.org/10.1272/jnms.77.97>
- Atsumi, T., Chesney, J., Metz, C., Leng, L., Donnelly, S., Makita, Z., ... Bucala, R. (2002). High Expression of Inducible 6-Phosphofructo-2-Kinase / Fructose-2,6-Bisphosphatase. *Cancer Research*, 62, 5881–5887.
- Ayoub, N. M. (2021). Editorial: Novel Combination Therapies for the Treatment of Solid Cancers. *Frontiers in Oncology*, 11(June), 10–12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.708943>
- Bachmann, A. S., & Geerts, D. (2018). Polyamine synthesis as a target of MYC oncogenes. *Journal of Biological Chemistry*, 293(48), 18757–18769. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003336>
- Bajpai, R., & Shanmugam, M. (2018). Targeting cancer metabolism through synthetic lethality-based combinatorial treatment strategies. *Current Opinion in Oncology*, 30(5), 338–344. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000467>
- Bartrons, R., Simon-Molas, H., Rodríguez-García, A., Castaño, E., Navarro-Sabaté, À., Manzano, A., & Martínez-Outschoorn, U. E. (2018). Fructose 2,6-bisphosphate in cancer cell metabolism. *Frontiers in Oncology*, 8(SEP).

<https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00331>

- Bassiri, H., Benavides, A., Haber, M., Gilmour, S. K., Norris, M. D., & Hogarty, M. D. (2015). Translational development of difluoromethylornithine (DFMO) for the treatment of neuroblastoma. *Translational Pediatrics*, 4(3), 226–238. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2224-4336.2015.04.06>
- Baudino, T. A. (2015). Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Current Drug Discovery Technologies*, 12, 3–20.
- Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M. A., Vidal, M. N. C., Nakano, K., Bartrons, R., ... Vousden, K. H. (2006). TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. *Cell*, 126(1), 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.036>
- Blandino, G. (2023). Activated KRAS, polyamines, iASPP and TME: a multiple liaison in pancreatic cancer. *Cell Death and Differentiation*. Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01169-2>
- Blum, R., & Kloog, Y. (2014). Metabolism addiction in pancreatic cancer. *Cell Death and Disease*, 5(2), 1–13. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.38>
- Blum, Roy, Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Rechavi, G., & Kloog, Y. (2005). Ras inhibition in glioblastoma down-regulates hypoxia-inducible factor-1 α , causing glycolysis shutdown and cell death. *Cancer Research*, 65(3), 999–1006. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.999.65.3>
- Bootsma, S., van Neerven, S. M., & Vermeulen, L. (2021). Exploiting KRAS-mediated metabolic reprogramming as a therapeutic target. *Nature Genetics*, 53(1), 9–10. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00758-y>
- Boshuizen, J., & Peeper, D. S. (2020). Rational Cancer Treatment Combinations: An Urgent Clinical Need. *Molecular Cell*, 78(6), 1002–1018. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.031>
- Boutard, N., Białas, A., Sabiniarz, A., Guzik, P., Banaszak, K., Biela, A., ... Fabritius, C. H. (2019). Synthesis of amide and sulfonamide substituted N-aryl 6-aminoquinoxalines as PFKFB3 inhibitors with improved physicochemical properties. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 29(4), 646–653. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.12.034>
- Boyd, S., Brookfield, J. L., Critchlow, S. E., Cumming, I. A., Curtis, N. J., Debreczeni, J., ... Wingfield, J. (2015). Structure-based design of potent and selective inhibitors of the metabolic kinase PFKFB3. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(8), 3611–3625. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00352>
- Brooke, D. G., Van Dam, E. M., Watts, C. K. W., Khoury, A., Dziadek, M. A., Brooks, H., ... Denny, W. A. (2014). Targeting the Warburg Effect in cancer; Relationships for 2-arylpyridazinones as inhibitors of the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3). *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 22(3), 1029–1039.

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.12.041>

- Bryant, K. L., Mancias, J. D., Kimmelman, A. C., & Der, C. J. (2014). KRAS: Feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(2), 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2013.12.004>
- Calvo, M. N., Bartrons, R., Castaño, E., Perales, J. C., Navarro-Sabaté, A., & Manzano, A. (2006). PFKFB3 gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay and inhibits anchorage-independent growth in HeLa cells. *FEBS Letters*, 580(13), 3308–3314. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.093>
- Cantelmo, A. R., Conradi, L. C., Brajic, A., Goveia, J., Kalucka, J., Pircher, A., ... Carmeliet, P. (2016). Inhibition of the Glycolytic Activator PFKFB3 in Endothelium Induces Tumor Vessel Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy. *Cancer Cell*, 30(6), 968–985. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.006>
- Cargill, K. R., Stewart, C. A., Park, E. M., Ramkumar, K., Gay, C. M., Cardnell, R. J., ... Byers, L. A. (2021). Targeting MYC-enhanced glycolysis for the treatment of small cell lung cancer. *Cancer & Metabolism*, 9(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s40170-021-00270-9>
- Chen, L., Zhao, J., Tang, Q., Li, H., Zhang, C., Yu, R., ... Wu, C. (2016). PFKFB3 Control of Cancer Growth by Responding to Circadian Clock Outputs. *Scientific Reports*, 6(March), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep24324>
- Chesney, J. (2006). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 9(5), 535–539. <https://doi.org/10.1097/01.mco.0000241661.15514.fb>
- Chesney, J., Clark, J., Klarer, A. C., Imbert-Fernandez, Y., Lane, A. N., & Telang, S. (2014). Fructose-2,6-bisphosphate synthesis by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 (PFKFB4) is required for the glycolytic response to hypoxia and tumor growth. *Oncotarget*, 5(16), 6670–6686. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2213>
- Choi, Y., Oh, S. T., Won, M. A., Choi, K. M., Ko, M. J., Seo, D., ... Lee, Y. H. (2016). Targeting ODC1 inhibits tumor growth through reduction of lipid metabolism in human hepatocellular carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478(4), 1674–1681. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.002>
- Clem, B. F., O’Neal, J., Klarer, A. C., Telang, S., & Chesney, J. (2016). Clinical development of cancer therapeutics that target metabolism. *An International Journal of Medicine: QJM*, 109(6), 367–372. <https://doi.org/10.1093/qjmed/hcv181>
- Clem, Brian F., O’Neal, J., Tapolsky, G., Clem, A. L., Imbert-Fernandez, Y., Kerr, D. A., ... Chesney, J. (2013). Targeting 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) as a therapeutic strategy against cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(8), 1461–1470. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0097>

- Cohavi, O., Tobi, D., & Schreiber, G. (2009). Docking of Antizyme to Ornithine Decarboxylase and Antizyme Inhibitor using Experimental Mutant and Double-Mutant Cycle Data. *Journal of Molecular Biology*, 390(3), 503–515. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.05.029>
- Cohen, R., Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Faivre, S., de Gramont, A., & Raymond, E. (2015). Targeting cancer cell metabolism in pancreatic adenocarcinoma. *Oncotarget*, 6(19), 16832–16847. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4160>
- Cordero-Espinoza, L., & Hagen, T. (2013). Increased concentrations of fructose 2,6-bisphosphate contribute to the Warburg effect in phosphatase and tensin homolog (PTEN)-deficient cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(50), 36020–36028. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.510289>
- Da, Q., Huang, L., Huang, C., Chen, Z., Jiang, Z., Huang, F., ... Ouyang, K. (2023). Glycolytic regulatory enzyme PFKFB3 as a prognostic and tumor microenvironment biomarker in human cancers. *Aging*, 15(10), 4533–4559. <https://doi.org/10.18632/aging.204758>
- Dasgupta, S., Rajapakshe, K., Zhu, B., Nikolai, B. C., Yi, P., Putluri, N., ... Malley, B. W. O. (2018). *HHS Public Access* (C. 556). <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0018-1>. Metabolic
- De Berardinis, R. J., & Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Science Advances*, 2(5). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>
- Dey, P., Li, J., Zhang, J., Chaurasiya, S., Strom, A., Liao, W., ... Depinho, R. A. (2020). *HHS Public Access*. 10(4), 608–625. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0297>. Oncogenic
- Diab, M., Azmi, A., Mohammad, R., & Philip, P. A. (2019). Pharmacotherapeutic strategies for treating pancreatic cancer: advances and challenges. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 20(5), 535–546. <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1561869>
- Doherty, J. R., & Cleveland, J. L. (2013). Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *Journal of Clinical Investigation*, 123(9), 3685–3692. <https://doi.org/10.1172/JCI69741>
- Evageliou, N. F., Haber, M., Vu, A., Laetsch, T. W., Murray, J., Gamble, L. D., ... Hogarty, M. D. (2016). Polyamine antagonist therapies inhibit neuroblastoma initiation and progression. *Clinical Cancer Research*, 22(17), 4391–4404. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2539>
- Fedorov, Y., Anderson, E. M., Birmingham, A., Reynolds, A., Karpilow, J., Robinson, K., ... Khvorova, A. (2006). Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA*, 12(7), 1188–1196. <https://doi.org/10.1261/rna.28106>
- Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4),

343–346. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>

- Fortunato, S., Bononi, G., Granchi, C., & Minutolo, F. (2018). An Update on Patents Covering Agents That Interfere with the Cancer Glycolytic Cascade. *ChemMedChem*, 13(21), 2251–2265. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800447>
- Fridman, R., Kibbey, M. C., Royce, L. S., Zain, M., Sweeney, T. M., Jicha, D. L., ... Kleinman, H. K. (1991). Enhanced tumor growth of both primary and established human and murine tumor cells in athymic mice after coinjection with matrigel. *Journal of the National Cancer Institute*, 83(11), 769–774. <https://doi.org/10.1093/jnci/83.11.769>
- Gerner, E. W., & Meyskens, F. L. (2004). Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nature Reviews Cancer*, 4(10), 781–792. <https://doi.org/10.1038/nrc1454>
- Geschwind, J. F. H., Salem, R., Carr, B. I., Soulen, M. C., Thurston, K. G., Goin, K. A., ... Goin, J. E. (2004). Yttrium-90 microspheres for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 127(5 SUPPL.), 194–205. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.09.034>
- Gitto, S. B., Pandey, V., Oyer, J. L., Copik, A. J., Hogan, F. C., Phanstiel, O., & Altomare, D. A. (2018). Difluoromethylornithine Combined with a Polyamine Transport Inhibitor Is Effective against Gemcitabine Resistant Pancreatic Cancer. *Molecular Pharmaceutics*, 15(2), 369–376. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00718>
- Grewal, J. (2017). "Targeting the glucose metabolism of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) to stimulate cancer immunity." (2017). *Electronic Theses and Dissertations*. Paper-2667. <https://doi.org/10.18297/etd/2667>
- Gupta, A., Ajith, A., Singh, S., Panday, R. K., Samaiya, A., & Shukla, S. (2018). PAK2–c-Myc–PKM2 axis plays an essential role in head and neck oncogenesis via regulating Warburg effect. *Cell Death and Disease*, 9(8). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0887-0>
- Gustafsson, N. M. S., Färnegårdh, K., Bonagas, N., Ninou, A. H., Groth, P., Wiita, E., ... Helleday, T. (2018). Targeting PFKFB3 radiosensitizes cancer cells and suppresses homologous recombination. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06287-x>
- Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2012). Targeting glucose metabolism for cancer therapy. *Journal of Experimental Medicine*, 209(2), 211–215. <https://doi.org/10.1084/jem.20120162>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harris, J. R. (2022). *Macropinocytosis: Functions and Mechanisms*. Retrieved from <https://link.springer.com/bookseries/6515>

- Heerboth, S., Housman, G., Leary, M., Longacre, M., Byler, S., Lapinska, K., ... Sarkar, S. (2015). EMT and tumor metastasis. *Clinical and Translational Medicine*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40169-015-0048-3>
- Houles, T., Gravel, S. P., Lavoie, G., Shin, S., Savall, M., Meant, A., ... Roux, P. P. (2018). RSK regulates PFK-2 activity to promote metabolic rewiring in melanoma. *Cancer Research*, 78(9), 2191–2204. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2215>
- Ikenaga, N., Ohuchida, K., Mizumoto, K., Akagawa, S., Fujiwara, K., Eguchi, D., ... Tanaka, M. (2012). Pancreatic cancer cells enhance the ability of collagen internalization during epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040434>
- Imbert-Fernandez, Y., Clem, B. F., O’Neal, J., Kerr, D. A., Spaulding, R., Lanceta, L., ... Chesney, J. (2014). Estradiol stimulates glucose metabolism via 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3). *Journal of Biological Chemistry*, 289(13), 9440–9448. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.529990>
- Jia, M. (2017). HHS Public Access. *Physiology & behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00431-7>. Harnessing
- Jia, W., Zhao, X., Zhao, L., Yan, H., Li, J., Yang, H., ... Liu, J. (2018). Non-canonical roles of PFKFB3 in regulation of cell cycle through binding to CDK4. *Oncogene*, 37(13), 1685–1698. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0072-4>
- Jiang, Y. X., Siu, M. K. Y., Wang, J. J., Leung, T. H. Y., Chan, D. W., Cheung, A. N. Y., ... Chan, K. K. L. (2022). PFKFB3 Regulates Chemoresistance, Metastasis and Stemness via IAP Proteins and the NF-κB Signaling Pathway in Ovarian Cancer. *Frontiers in Oncology*, 12(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.748403>
- Jones, B. C., Pohlmann, P. R., Clarke, R., & Sengupta, S. (2022). Treatment against glucose-dependent cancers through metabolic PFKFB3 targeting of glycolytic flux. *Cancer and Metastasis Reviews*, 41(2), 447–458. <https://doi.org/10.1007/s10555-022-10027-5>
- Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M., & Yang, L. V. (2014). In vitro cell migration and invasion assays. *Journal of Visualized Experiments*, (88), 1–8. <https://doi.org/10.3791/51046>
- Kawada, K., Toda, K., & Sakai, Y. (2017). Targeting metabolic reprogramming in KRAS-driven cancers. *International Journal of Clinical Oncology*, 22(4), 651–659. <https://doi.org/10.1007/s10147-017-1156-4>
- Keerthana, C. K., Rayginia, T. P., Shifana, S. C., Anto, N. P., Kalimuthu, K., Isakov, N., & Anto, R. J. (2023). The role of AMPK in cancer metabolism and its impact on the immunomodulation of the tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 14(February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1114582>

- Kara F, Keskinçiliç B. Türkiye kanser istatistikleri. TR Ministry of Health General Directorate of Public Health, Ankara. 2017;19-44.
- Kiehn, O., & Car. (2017). HHS Public Access. *Physiology & behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1984>.Sulforhodamine
- Kim, H. I., Schultz, C. R., Buras, A. L., Friedman, E., Fedorko, A., Seamon, L., ... Risinger, J. I. (2017). Ornithine decarboxylase as a therapeutic target for endometrial cancer. *PLoS ONE*, 12(12), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189044>
- Knight, Z. A., & Shokat, K. M. (2007). Chemical Genetics: Where Genetics and Pharmacology Meet. *Cell*, 128(3), 425–430. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.021>
- Ko, Y. H., Pedersen, P. L., & Geschwind, J. F. (2001). Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: Characterization and targeting hexokinase. *Cancer Letters*, 173(1), 83–91. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00667-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00667-X)
- Koomoa, D. L. T., Geerts, D., Lange, I., Koster, J., Pegg, A. E., Feith, D. J., & Bachmann, A. S. (2013). DFMO/eflornithine inhibits migration and invasion downstream of MYCN and involves p27Kip1 activity in neuroblastoma. *International Journal of Oncology*, 42(4), 1219–1228. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1835>
- Kotowski, K., Rosik, J., Machaj, F., Supplitt, S., Wiczew, D., Jabłońska, K., ... Dziegiel, P. (2021). Role of pfkfb3 and pfkfb4 in cancer: Genetic basis, impact on disease development/progression, and potential as therapeutic targets. *Cancers*, 13(4), 1–29. <https://doi.org/10.3390/cancers13040909>
- Kubik, J., Humeniuk, E., Adamczuk, G., Madej-Czerwonka, B., & Korga-Plewko, A. (2022). Targeting Energy Metabolism in Cancer Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10), 1–39. <https://doi.org/10.3390/ijms23105572>
- Kulkarni, A., Anderson, C. M., Mirmira, R. G., & Tersey, S. A. (2022). Role of Polyamines and Hypusine in β Cells and Diabetes Pathogenesis. *Metabolites*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/metabo12040344>
- Kumar, P., Sharoyko, V. V., Spégel, P., Gullberg, U., Mulder, H., Olsson, I., & Ajore, R. (2013). The Transcriptional Co-Repressor Myeloid Translocation Gene 16 Inhibits Glycolysis and Stimulates Mitochondrial Respiration. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068502>
- LaRue, M. M., Parker, S., Puccini, J., Cammer, M., Kimmelman, A. C., & Bar-Sagi, D. (2022). Metabolic reprogramming of tumor-associated macrophages by collagen turnover promotes fibrosis in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(16). <https://doi.org/10.1073/pnas.2119168119>

- Laussel, C., & Léon, S. (2020). Cellular toxicity of the metabolic inhibitor 2-deoxyglucose and associated resistance mechanisms. *Biochemical Pharmacology*, 182(August), 114213. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114213>
- Le, A., Cooper, C. R., Gouw, A. M., Dinavahi, R., Maitra, A., Deck, L. M., ... Dang, C. V. (2010). Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(5), 2037–2042. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914433107>
- Lea, M. A., 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(4), 1479–1488.
- Lee, M. S., Dennis, C., Naqvi, I., Dailey, L., Lorzadeh, A., Ye, G., ... Kalaany, N. Y. (2023). Ornithine aminotransferase supports polyamine synthesis in pancreatic cancer. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05891-2>
- Levin, V. A., Ictech, S. E., & Hess, K. R. (2018). Clinical importance of eflornithine (α -difluoromethylornithine) for the treatment of malignant gliomas. *CNS Oncology*, 7(2). <https://doi.org/10.2217/cns-2017-0031>
- Li, H. M., Yang, J. G., Liu, Z. J., Wang, W. M., Yu, Z. L., Ren, J. G., ... Jia, J. (2017). Blockage of glycolysis by targeting PFKFB3 suppresses tumor growth and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 36(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0481-1>
- Li, J., Meng, Y., Wu, X., & Sun, Y. (2020). Polyamines and related signaling pathways in cancer. *Cancer Cell International*, 20(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01545-9>
- Li, L., Lin, K., Pilkis, J., Correia, J. J., & Pilkis, S. J. (1992). Hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. The role of surface loop basic residues in substrate binding to the fructose-2,6- bisphosphatase domain. *Journal of Biological Chemistry*, 267(30), 21588–21594. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)36651-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)36651-7)
- Li, Y., Zhang, J., Xu, J., & Liu, S. (2021). The Metabolism Symbiosis Between Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment. *Frontiers in Oncology*, 11(December), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.759376>
- Liang, C., Qin, Y., Zhang, B., Ji, S., Shi, S., Xu, W., ... Yu, X. (2016). Metabolic plasticity in heterogeneous pancreatic ductal adenocarcinoma. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1866(2), 177–188. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.09.001>
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? (vol 41, pg 211, 2016). *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3),

211. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>.The
- Lin, X., Xiao, Z., Chen, T., Liang, S. H., & Guo, H. (2020). Glucose Metabolism on Tumor Plasticity, Diagnosis, and Treatment. *Frontiers in Oncology*, 10(March), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00317>
- Linsalata, M., Notarnicola, M., Caruso, M. G., Di Leo, A., Guerra, V., & Russo, F. (2004). Polyamine Biosynthesis in relation to K-ras and p-53 mutations in colorectal carcinoma. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 39(5), 470–477. <https://doi.org/10.1080/0036552031008755>
- Liu, C., Li, C., & Liu, Y. (2023). The role of metabolic reprogramming in pancreatic cancer chemoresistance. *Frontiers in Pharmacology*, 13(January), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1108776>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lu, C., Qiao, P., Sun, Y., Ren, C., & Yu, Z. (2021). Positive regulation of PFKFB3 by PIM2 promotes glycolysis and paclitaxel resistance in breast cancer. *Clinical and Translational Medicine*, 11(4). <https://doi.org/10.1002/ctm.2.400>
- Lypova, N., Telang, S., Chesney, J., & Imbert-Fernandez, Y. (2019). Increased 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 activity in response to EGFR signaling contributes to non-small cell lung cancer cell survival. *Journal of Biological Chemistry*, 294(27), 10530–10543. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007784>
- Mann, K. M., Ying, H., Juan, J., Jenkins, N. A., & Copeland, N. G. (2016). KRAS-related proteins in pancreatic cancer. *Pharmacology and Therapeutics*, 168, 29–42. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.09.003>
- Manni, A., Washington, S., Hu, X., Griffith, J. W., Bruggeman, R., Demers, L. M., ... Verderame, M. F. (2005). Effects of polyamine synthesis inhibitors on primary tumor features and metastatic capacity of human breast cancer cells. *Clinical and Experimental Metastasis*, 22(3), 255–263. <https://doi.org/10.1007/s10585-005-8480-1>
- McGuire, S. (2016). International Agency for Research on cancer. World Health Organization. World cancer report 2014. World cancer Report 2014. Advances in nutrition, 7, 418–419. <https://doi.org/10.3945/an.116.012211>.Genesis
- Miles, K. A., & Williams, R. E. (2008). Warburg revisited: Imaging tumour blood flow and metabolism. *Cancer Imaging*, 8(1), 81–86. <https://doi.org/10.1102/1470-7330.2008.0011>
- Min, H. Y., & Lee, H. Y. (2022). Molecular targeted therapy for anticancer treatment. *Experimental and Molecular Medicine*, 54(10), 1670–1694. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00864-3>

- Minchenko, O. H., Tsuchihara, K., Minchenko, D. O., Bikfalvi, A., & Esumi, H. (2014). Mechanisms of regulation of PFKFB expression in pancreatic and gastric cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, 20(38), 13705–13717. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i38.13705>
- Minchenko, O., Opentanova, I., & Caro, J. (2003). Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6- biphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Letters*, 554(3), 264–270. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01179-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01179-7)
- Mohammed, A., Janakiram, N. B., Madka, V., Ritchie, R. L., Brewer, M., Biddick, L., ... Rao, C. V. (2014). Eflornithine (DFMO) prevents progression of pancreatic cancer by modulating ornithine decarboxylase signaling. *Chest*, 146(6), 1198–1209. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0176>
- Moinard, C., Cynober, L., & de Bandt, J. P. (2005). Polyamines: Metabolism and implications in human diseases. *Clinical Nutrition*, 24(2), 184–197. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.11.001>
- Mokhtari, R. B., Homayouni, T. S., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Das, B., & Yeger, H. (2017). Combination therapy in combating cancer SYSTEMATIC REVIEW: COMBINATION THERAPY IN COMBATING CANCER BACKGROUND. *Oncotarget*, 8(23), 38022–38043. Retrieved from www.impactjournals.com/oncotarget
- Murray-Stewart, T. R., Woster, P. M., Casero, R. A., & Author, B. J. (2016). Targeting polyamine metabolism for cancer therapy and prevention HHS Public Access Author manuscript. *Biochemical Journal*, 473(19), 2937–2953. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160383>.Targeting
- Muth, A., Madan, M., Archer, J. J., Ocampo, N., Rodriguez, L., & Phanstiel, O. (2014). Polyamine transport inhibitors: Design, synthesis, and combination therapies with difluoromethylornithine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(2), 348–363. <https://doi.org/10.1021/jm401174a>
- Nakkina, S. P., Gitto, S. B., Beardsley, J. M., Pandey, V., Rohr, M. W., Parikh, J. G., ... Altomare, D. A. (2021). Dfmo improves survival and increases immune cell infiltration in association with myc downregulation in the pancreatic tumor microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24). <https://doi.org/10.3390/ijms222413175>
- Nakkina, S. P., Gitto, S. B., Pandey, V., Parikh, J. G., Geerts, D., Maurer, H. C., ... Altomare, D. A. (2021). Differential expression of polyamine pathways in human pancreatic tumor progression and effects of polyamine blockade on tumor microenvironment. *Cancers*, 13(24). <https://doi.org/10.3390/cancers13246391>
- Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., De Mestier, L., Cros, J., Faivre, S., & Raymond, E. (2014). MEK in cancer and cancer therapy. *Pharmacology and Therapeutics*, 141(2), 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.10.001>

- Ning, Q. U., Ignatenko, N. A., Yamauchi, P., Stringer, D. E., Levenson, C., Shannon, P., ... Gerner, E. W. (2003). Inhibition of human ornithine decarboxylase activity by enantiomers of difluoromethylornithine. *Biochemical Journal*, 375(2), 465–470. <https://doi.org/10.1042/BJ20030382>
- Nose, D., Sugimoto, M., Muta, T., & Miura, S.-I. (2023). Salivary Polyamines Help Detect High-Risk Patients with Pancreatic Cancer: A Prospective Validation Study. *International journal of molecular sciences*, 24(3), 2998. <https://doi.org/10.3390/ijms24032998>
- Novellademunt, L., Obach, M., Millán-ariño, L., Manzano, A., Ventura, F., Rosa, J. L., ... Bartrons, R. (2012). Progestins activate 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3) in breast cancer cells. *Biochemical Journal*, 442(2), 345–356. <https://doi.org/10.1042/BJ20111418>
- Novellademunt, L., Tato, I., Navarro-Sabate, A., Ruiz-Meana, M., Méndez-Lucas, A., Perales, J. C., ... Luis Rosa, J. (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(15), 10640–10651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.455998>
- Novita Sari, I., Setiawan, T., Seock Kim, K., Toni Wijaya, Y., Won Cho, K., & Young Kwon, H. (2021). Metabolism and function of polyamines in cancer progression. *Cancer Letters*, 519(May), 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.06.020>
- Nowotarski, S. L., Woster, P. M., & Casero, R. A. (2013). Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. *Expert Reviews In Molecular Medicine*, 15(February), 1–21. <https://doi.org/10.1017/erm.2013.3>
- O’Neal, J., Clem, A., Reynolds, L., Dougherty, S., Imbert-Fernandez, Y., Telang, S., ... Clem, B. F. (2016). Inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) suppresses glucose metabolism and the growth of HER2+ breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 160(1), 29–40. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3968-8>
- Okar, D. A., & Lange, A. J. (1999). Fructose-2,6-bisphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes. *BioFactors*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1002/biof.5520100101>
- Okar, D. A., Lange, A. J., Manzano, À., Navarro-Sabatè, A., Riera, L., & Bartrons, R. (2001). PFK-2/FBPase-2: Maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1), 30–35. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01699-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01699-6)
- Ozcan, S.C., Mutlu, A., Altunok, T. H., Gurpinar, Y., Sarioglu, A., Guler, S., ... Yalcin, A. (2021). Simultaneous inhibition of PFKFB3 and GLS1 selectively kills KRAS-transformed pancreatic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 571. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.07.070>

- Ozcan, S.C., Sarioglu, A., Altunok, T. H., Akkoc, A., Guzel, S., Guler, S., ... Yalcin, A. (2020). PFKFB2 regulates glycolysis and proliferation in pancreatic cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 470(1–2). <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03751-5>
- Ozcan, Selahattin C., Mutlu, A., Altunok, T. H., Gurpinar, Y., Sarioglu, A., Guler, S., ... Yalcin, A. (2021). Simultaneous inhibition of PFKFB3 and GLS1 selectively kills KRAS-transformed pancreatic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 571, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.07.070>
- Park, W., Chawla, A., & O'Reilly, E. M. (2021). *Pancreatic Cancer: A Review*. *JAMA*, 326(9), 851–862. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.13027>
- Pegg, A. E., Madhubala, R., Kameji, T., & Bergeron, R. J. (1988). Control of ornithine decarboxylase activity in α -difluoromethylornithine-resistant L1210 cells by polyamines and synthetic analogues. *Journal of Biological Chemistry*, 263(22), 11008–11014. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)38070-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)38070-0)
- Pegg, Anthony E. (2006). Regulation of ornithine decarboxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(21), 14529–14532. <https://doi.org/10.1074/jbc.R500031200>
- Pegg, Anthony E. (2009). Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*, 61(9), 880–894. <https://doi.org/10.1002/iub.230>
- Pegg, Anthony E., & Casero, R. A. (2011). Current Status of the Polyamine Research Field. İçinde *Methods in Molecular Biology* (C. 720). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-034-8_1
- Perera, R. M., & Bardeesy, N. (2015). Pancreatic cancer metabolism: Breaking it down to build it back up. *Cancer Discovery*, 5(12), 1247–1261. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0671>
- Phanstiel, O. (2018). An overview of polyamine metabolism in pancreatic ductal adenocarcinoma. *International Journal of Cancer*, 142(10), 1968–1976. <https://doi.org/10.1002/ijc.31155>
- Pilkis, S. J., Claus, T. H., Kurland, I. J., & Lange, A. J. (1995). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: A metabolic signaling enzyme. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 799–835. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.004055>
- Qin, C., Yang, G., Yang, J., Ren, B., Wang, H., Chen, G., ... Zhao, Y. (2020). Metabolism of pancreatic cancer: Paving the way to better anticancer strategies. *Molecular Cancer*, 19(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01169-7>
- Raez, L. E., Papadopoulos, K., Ricart, A. D., Chiorean, E. G., Dipaola, R. S., Stein, M. N., ... Lampidis, T. J. (2013). A phase i dose-escalation trial of 2-deoxy-d-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 71(2), 523–530.

<https://doi.org/10.1007/s00280-012-2045-1>

- Raj, K. P., Zell, J. A., Rock, C. L., McLaren, C. E., Zoumas-Morse, C., Gerner, E. W., & Meyskens, F. L. (2013). Role of dietary polyamines in a phase III clinical trial of difluoromethylornithine (DFMO) and sulindac for prevention of sporadic colorectal adenomas. *British Journal of Cancer*, 108(3), 512–518. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.15>
- Rider, M. H., Bertrand, L., Vertommen, D., Michels, P. A., Rousseau, G. G., & Hue, L. (2004). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: Head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochemical Journal*, 381(3), 561–579. <https://doi.org/10.1042/BJ20040752>
- Riera, L., Manzano, A., Navarro-Sabaté, A., Perales, J. C., & Bartrons, R. (2002). Insulin induces PFKFB3 gene expression in HT29 human colon adenocarcinoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1589(2), 89–92. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(02\)00169-6](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(02)00169-6)
- Ruiz-García, A., Monsalve, E., Novellasedemunt, L., Navarro-Sabaté, Á., Manzano, A., Rivero, S., ... Díaz-Guerra, M. J. M. (2011). Cooperation of adenosine with macrophage toll-4 receptor agonists leads to increased glycolytic flux through the enhanced expression of PFKFB3 gene. *Journal of Biological Chemistry*, 286(22), 19247–19258. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.190298>
- Ruiz-Pérez, M. V., Medina, M. Á., Urdiales, J. L., Keinänen, T. A., & Sánchez-Jiménez, F. (2015). Polyamine metabolism is sensitive to glycolysis inhibition in human neuroblastoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 290(10), 6106–6119. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.619197>
- Ryšlavá, H., Doubnerová, V., Kavan, D., & Vaněk, O. (2013). Effect of posttranslational modifications on enzyme function and assembly. *Journal of Proteomics*, 92, 80–109. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.03.025>
- Sabnis, A. J., & Bivona, T. G. (2019). Principles of Resistance to Targeted Cancer Therapy: Lessons from Basic and Translational Cancer Biology. *Trends in Molecular Medicine*, 25(3), 185–197. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.12.009>
- Sakakibara, R., Kato, M., Okamura, N., Nakagawa, T., Komada, Y., Tominaga, N., ... Fukasawa, M. (1997). Characterization of a human placental fructose-6-phosphate, 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Journal of Biochemistry*, 122(1), 122–128. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021719>
- Samal, K., Zhao, P., Kendzicky, A., Yco, L. P., McClung, H., Gerner, E., ... Sholler, G. (2013). AMXT-1501, a novel polyamine transport inhibitor, synergizes with DFMO in inhibiting neuroblastoma cell proliferation by targeting both ornithine decarboxylase and polyamine transport. *International Journal of Cancer*, 133(6), 1323–1333. <https://doi.org/10.1002/ijc.28139>
- Sattari, M. (2013). 乳鼠心肌提取 {HHS} {Public} {Access}. *Journal of pediatrics*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.1002/jcp.24791>

- Saydjari, R., Alexander, R. W., Barranco, S. C., Townsend, C. M., & Thompson, J. C. (1989). The effects of 2-deoxy-d-glucose and a-difluoromethylornithine on the growth of pancreatic cancer in vivo. *Pancreas*, 4(1), 38–43. <https://doi.org/10.1097/00006676-198902000-00006>
- Schmidt, H. (1989). The role of mRNA expression. *The FASEB Journal*, 3(12), 2360–2370. Retrieved from. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2676679>
- Semenza, G. L. (2012). Targets for cancer therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(4), 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.01.005>. Hypoxia-inducible
- Seo, M., Kim, J. Do, Neau, D., Sehgal, I., & Lee, Y. H. (2011). Structure-based development of small molecule PFKFB3 inhibitors: A framework for potential cancer therapeutic agents targeting the Warburg effect. *PLoS ONE*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024179>
- Sharma, H., Sharma, P., Urquiza, U., Chastain, L. R., & Ihnat, M. A. (2023). Exploration of a Large Virtual Chemical Space: Identification of Potent Inhibitors of Lactate Dehydrogenase-A against Pancreatic Cancer [Research-article]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 63(3), 1028–1043. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.2c01544>
- Shen, X., Niu, N., & Xue, J. (2022). Oncogenic KRAS triggers metabolic reprogramming in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Translational Internal Medicine*. <https://doi.org/10.2478/jtim-2022-0022>
- Shi, L., Pan, H., Liu, Z., Xie, J., & Han, W. (2017). Roles of PFKFB3 in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, C. 2. Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.44>
- Shiratori, R., Furuichi, K., Yamaguchi, M., Miyazaki, N., Aoki, H., Chibana, H., ... Aoki, S. (2019). Glycolytic suppression dramatically changes the intracellular metabolic profile of multiple cancer cell lines in a mitochondrial metabolism-dependent manner. *Scientific Reports*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55296-3>
- Skoulidis, F., Li, B. T., Dy, G. K., Price, T. J., Falchook, G. S., Wolf, J., ... Govindan, R. (2021). CodeBreak : 第二相. *New England Journal of Medicine*, 384(25), 2371–2381. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2103695>. Sotorasib
- Stein, M., Lin, H., Jeyamohan, C., Dvorzhinski, D., Bray, K., Eddy, S., ... Robert, S. (2014). *NIH Public Access*. 70(13), 1388–1394. <https://doi.org/10.1002/pros.21172>. TargetingTumor
- Stine, Z. E., Schug, Z. T., Salvino, J. M., & Dang, C. V. (2022). Targeting cancer metabolism in the era of precision oncology. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(2), 141–162. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00339-6>
- Strickler, J. H., Satake, H., George, T. J., Yaeger, R., Hollebecque, A., Garrido-Laguna, I., ... Hong, D. S. (2023). Sotorasib in KRAS p.G12C–Mutated

- Advanced Pancreatic Cancer . *New England Journal of Medicine*, 388(1), 33–43. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2208470>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Sunkara, P. S., Prakash, N. J., & Rosenberger, A. L. (1982). An essential role for polyamines in tumor metastases. *FEBS Letters*, 150(2), 397–399. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(82\)80775-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)80775-8)
- Suzuki, T., Kishikawa, T., Sato, T., Takeda, N., Sugiura, Y., Seimiya, T., ... Koike, K. (2022). Mutant KRAS drives metabolic reprogramming and autophagic flux in premalignant pancreatic cells. *Cancer Gene Therapy*, 29(5), 505–518. <https://doi.org/10.1038/s41417-021-00326-4>
- Tangella, A. V., Gajre, A. S., Chirumamilla, P. C., & Rathhan, P. V. (2023). Difluoromethylornithine (DFMO) and Neuroblastoma: A Review. *Cureus*, 15(4). <https://doi.org/10.7759/cureus.37680>
- Telang, S., Yalcin, A., Clem, A. L., Bucala, R., Lane, A. N., Eaton, J. W., & Chesney, J. (2006). Ras transformation requires metabolic control by 6-phosphofructo-2-kinase. *Oncogene*, 25(55), 7225–7234. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209709>
- Thompson, C. B., & Bielska, A. A. (2019). Growth factors stimulate anabolic metabolism by directing nutrient uptake. *Journal of Biological Chemistry*, 294(47), 17883–17888. <https://doi.org/10.1074/jbc.AW119.008146>
- Uemura, T., Matsunaga, M., Yokota, Y., Takao, K., & Furuchi, T. (2023). Inhibition of Polyamine Catabolism Reduces Cellular Senescence. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17). <https://doi.org/10.3390/ijms241713397>
- Vaziri-Gohar, A., Zarei, M., Brody, J. R., & Winter, J. M. (2018). Metabolic Dependencies in Pancreatic Cancer. *Frontiers in Oncology*, 8(DEC). <https://doi.org/10.3389/FONC.2018.00617>
- Waldman, A. D., Fritz, J. M., & Lenardo, M. J. (2020). A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nature Reviews Immunology*, 20(11), 651–668. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0306-5>
- Wang, L., Li, J. J., Guo, L. Y., Li, P., Zhao, Z., Zhou, H., & Di, L. J. (2018). Molecular link between glucose and glutamine consumption in cancer cells mediated by ctbp and sirt4. *Oncogenesis*, 7(3). <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0036-8>
- Wolters-Eisfeld, G., Hackert, T., & Güngör, C. (2023). Unmasking metabolic dependencies in pancreatic cancer: aberrant polyamine synthesis as a promising new therapeutic target. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 1–2.

<https://doi.org/10.1038/s41392-023-01662-7>

- Xia, L., Oyang, L., Lin, J., Tan, S., Han, Y., Wu, N., ... Liao, Q. (2021). The cancer metabolic reprogramming and immune response. *Molecular Cancer*, 20(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01316-8>
- Xiao, H., Li, S., Zhang, D., Liu, T., Yu, M., & Wang, F. (2013). Phosphoglucose and concurrent use of 2-deoxy-D-glucose and 3-bromopyruvate in pancreatic cancer cells. *Oncology Reports*, 29(1), 329–334. <https://doi.org/10.3892/or.2012.2085>
- Xu Y, An X, Guo X, Habtetsion TG, Wang Y, Xu X, Kandala S, Li Q, Li H, Zhang C, Caldwell RB, Fulton DJ, Su Y, Hoda MN, Zhou G, Wu C, H. Y. (2013). Endothelial 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) plays a critical role in angiogenesis. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.303041>.Endothelial
- Yalcin, A., Clem, B. F., Imbert-Fernandez, Y., Ozcan, S. C., Peker, S., O’Neal, J., ... Chesney, J. (2014). 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) promotes cell cycle progression and suppresses apoptosis via Cdk1-mediated phosphorylation of p27. *Cell Death and Disease*, 5(7), 1–10. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.292>
- Yalcin, Abdullah, Clem, B. F., Simmons, A., Lane, A., Nelson, K., Clem, A. L., ... Chesney, J. (2009). Nuclear targeting of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) increases proliferation via cyclin-dependent kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 284(36), 24223–24232. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.016816>
- Yalcin, Abdullah, Solakoglu, T. H., Ozcan, S. C., Guzel, S., Peker, S., Celikler, S., ... Chesney, J. A. (2017). 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase-3 is required for transforming growth factor β 1-enhanced invasion of Panc1 cells in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 484(3), 687–693. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.178>
- Yang, C., & Tang, D. (2000). Patient-Specific Carotid Plaque Progression Simulation. *Cmes-Computer Modeling in Engineering & Sciences*, 1(2), 119–131. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>.Secreted
- Yang, L., Venneti, S., & Nagrath, D. (2017). Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 19, 163–194. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044546>
- Ying, H., Kimmelman, A. C., Lyssiotis, C. A., Hua, S., Chu, G. C., Fletcher-Sananikone, E., ... Depinho, R. A. (2012). Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*, 149(3), 656–670. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.01.058>
- Ying, H., Kimmelman, A. C., Lyssiotis, C. A., Hua, S., Chu, G. C., Fletcher-sananikone, E., ... Wang, Y. A. (2012). *NIH Public Access*. 149(3), 656–670. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.058>.Ying
- Yu, L., Chen, X., Sun, X., Wang, L., & Chen, S. (2017). The glycolytic switch in

- tumors: How many players are involved? *Journal of Cancer*, 8(17), 3430–3440. <https://doi.org/10.7150/jca.21125>
- Yu, L., Chen, X., Wang, L., & Chen, S. (2016). The sweet trap in tumors: Aerobic glycolysis and potential targets for therapy. *Oncotarget*, 7(25), 38908–38926. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7676>
- Yuan, Q., Ray, R. M., Viar, M. J., & Johnson, L. R. (2001). Polyamine regulation of ornithine decarboxylase and its antizyme in intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 280(1 43-1), 130–138. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.280.1.g130>
- Zawacka-Pankau, J., Grinkevich, V. V., Hüntén, S., Nikulenkov, F., Gluch, A., Li, H., ... Selivanova, G. (2011). Inhibition of glycolytic enzymes mediated by pharmacologically activated p53: Targeting Warburg effect to fight cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 286(48), 41600–41615. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.240812>
- Zeng, Z., Lan, J., Lei, S., Yang, Y., He, Z., Xue, Y., & Chen, T. (2020). Simultaneous inhibition of ornithine decarboxylase 1 and pyruvate kinase M2 exerts synergistic effects against hepatocellular carcinoma cells. *OncoTargets and Therapy*, 13, 11697–11709. <https://doi.org/10.2147/OTT.S240535>
- Zhang, Y., Li, Q., Huang, Z., Li, B., Nice, E. C., Huang, C., ... Zou, B. (2022). Targeting Glucose Metabolism Enzymes in Cancer Treatment: Current and Emerging Strategies. *Cancers*, 14(19). <https://doi.org/10.3390/cancers14194568>
- Zhao, H., Duan, Q., Zhang, Z., Li, H., Wu, H., Shen, Q., ... Yin, T. (2017). Up-regulation of glycolysis promotes the stemness and EMT phenotypes in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(9), 2055–2067. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13126>
- Zhu, W., Ye, L., Zhang, J., Yu, P., Wang, H., Ye, Z., & Tian, J. (2016). PFK15, a small molecule inhibitor of PFKFB3, induces cell cycle arrest, apoptosis and inhibits invasion in gastric cancer. *PLoS ONE*, 11(9), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163768>

7.SİMGE VE KISALTMALAR

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta
μ	Mikro
M	Molar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece (Celcius)
~	Yaklaşık değer

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açılımı</u>
2-DG	2-Deoksi-D-glikoz
3-BRPA	3-Bromopirüvat
ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
ARG	Arjinaz
AMPK	Aktive edici protein kinaz
AZP3-26	AstraZeneca tarafından üretilen PFKFB3 enzim inhibitörü
BCA	Bikinkoninik asit
Denspm	N1, N11-dietilnorspermin
DFMO	ODC1 enzim inhibitörü
DMEM	Dulbecco tarafından modifiye edilmiş Eagle Besiyeri
EDTA	Etilendiamin tetrasetik asit
F6P	Fruktoz 6-fosfat
F1,6BP	Fruktoz 1,6-bisfosfat
F2,6BP	Fruktoz 2,6-bisfosfat
FBS	Fötal sıgır serumu
FDG-PET	Floro-deoksiglikoz pozitron emisyon tomografi
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
GEM+NAB-P	Gemsitabin ve albümin-bağlı paklitaksel nanopartikül kombinasyonu
GLUT1	Glukoz Transporter 1
GTP	Guanozin-5'-trifosfat
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit
HIF-1 α	Hipoksi ile İndüklenen faktör 1-alfa
HK	Hekzokinaz
HRP	Bayır Turpu Peroksidazı
K-RAS	Kirsten Rat Sarkoma
LDH	Laktat Dehidrojenaz
mTORC1	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi kompleks 1
MYC	Protoonkogen
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
OAT	Ornitin Aminotransferaz

ODC1	Ornitin Dekarboksilaz
OAZ1	Ornitin dekarboksilaz antizimi
P27	Protein 27
PAO	N1-asetilpoliamin oksidaz
PBS	Fosfat ile tamponlanmış salin çözeltisi
PDAK	Pankreas Duktal Adenokarsinom
PFK-1	Fosfofruktokinaz-1
PFKFB	6-fosfofrukto-2-kinaz/Fruktoz-2,6-bisfosfataz
PVDF	Polivinilidin florür
RT	Ters transkripsiyon
RT-qPCR	Ters transkripsiyon kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SAM	S-adenozilmetiyonin
SAM-DC	S-adenozilmetiyonin dekarboksilaz
SDS	Sodyum dodesil sülfat
siKTRL	Genomda karşılığı bulunmayan kontrol siRNA uygulanan deney grubu
SMO	Spermin oksidaz, SMO
siODC1	siRNA aracılığıyla ODC1 baskılanan deney grubu
siPFKFB3	siRNA aracılığıyla PFKFB3 baskılanan deney grubu
SPDS	Spermidin sentaz
SPMS	Spermin sentaz
SSAT	Spermin/Spermidin N1-asetiltransferaz
siRNA	Küçük interferans RNA'sı
TBS-T	Tris tamponlu tuz-Tween 20
TIGAR	TP53 ile İndüklenen Glikoliz ve Apoptoz Regülatör proteini
TGFβ-1	Transforme edici büyüme faktörü beta 1

8.EKLER

8.1. Şekiller Listesi

Şekil-1: Kanserin ayırt edici özellikleri.	8
Şekil-2: Normal ve tümör hücrelerinde glikoz metabolizması	8
Şekil-3: PFKFB enzimleri tarafından sentezlenen F2,6BP, glikolizin kilit enzimi PFK1'i allosterik olarak aktive eder.	12
Şekil-4: PFKFB3 Enziminin Kristal Yapısı ve Katalizlediği Reaksiyon.....	12
Şekil-5: Poliamin Biyosentez Yolağı.	17
Şekil-6: ODC1 enziminin kristal yapısı ve katalizlediği reaksiyon	18
Şekil-7: PFKFB3 ve ODC1 inhibitörlerinin kimyasal yapıları.....	26
Şekil-8: BCA standard grafiğı.....	28
Şekil-9: F2,6BP standard grafiğı.....	29
Şekil-10 : (A) PDAK dokularında PFKFB3 ve ODC1 mRNA ekspresyonları artmaktadır. (B) PDAK tümörlerinde PFKFB3 ve ODC1 ekspresyonları pozitif korelasyon göstermektedir.	32
Şekil-11: PANC1 ve MIA PaCa-2 hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1 proteinleri eksprese edilmektedir.....	33
Şekil-12: PANC1 hücrelerinde siRNA aracılı PFKFB3 ve ODC1 mRNA ekspresyonu baskılanmasının gerçek zamanlı qPCR ile doğrulanması.....	34
Şekil-13: MIA PaCa-2 hücrelerinde siRNA aracılı PFKFB3 ve ODC1 mRNA ekspresyonu baskılanmasının gerçek zamanlı qPCR ile doğrulanması	35
Şekil-14: PANC1 hücrelerinde siRNA aracılı PFKFB3 ve ODC1 protein ekspresyonlarının baskılanmasının Western blot ile doğrulanması.	36
Şekil-15: MIA PaCa-2 hücrelerinde siRNA aracılı PFKFB3 ve ODC1 protein ekspresyonlarının baskılanmasının Western blot ile doğrulanması.	36
Şekil-16: PDAK hücrelerinde PFKFB3'ün baskılanması hücre-içi F2,6BP seviyesini azaltır.....	37
Şekil-17: PDAK hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1 ekspresyonlarının siRNA yöntemi ile baskılanması glikoz tüketimini etkilememektedir.	38
Şekil-18:PDAK hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1 ekspresyonlarının siRNA yöntemi ile baskılanması laktat salınımını etkilememektedir	38
Şekil-19: PFKFB3 ve ODC1'in birlikte baskılanması PDAK hücre proliferasyonu azaltır.....	39
Şekil-20: DFMO'nun PANC1 ve MIA PaCa-2 hücrelerindeki etkin konsantrasyon aralığının belirlenmesi.....	41
Şekil-21: AZP3-26 ve DFMO inhibitörlerinin PANC1 hücrelerinde mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.	42
Şekil-22: AZP3-26 ve DFMO inhibitörlerinin MIA PaCa-2 hücrelerinde mRNA ekspresyonları üzerine etkisi.	42

Şekil-23: PANC1 hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1 enzimlerinin özgün inhibitörler ile inhibisyonun protein ekspresyonları üzerindeki etkisi.....	43
Şekil-24: MIA PaCa-2 hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1 enzimlerinin özgün inhibitörler ile inhibisyonun protein ekspresyonları üzerindeki etkisi.....	43
Şekil-25: PFKFB3 aktivitesinin farmakolojik inhibisyonu F2,6BP seviyesini azaltırken ODC1 aktivitesinin inhibisyonu F2,6BP seviyesini arttırmaktadır.....	44
Şekil-26: PFKFB3 ve ODC1 aktivitelerinin farmakolojik olarak birlikte inhibisyonu MIA PaCa-2 hücrelerinde glikoz tüketimini azaltmaktadır.	45
Şekil-27: PFKFB3 ve ODC1 aktivitelerinin farmakolojik olarak birlikte inhibisyonu MIA PaCa-2 hücrelerinde lakta salınımını azaltmaktadır.....	46
Şekil-28: PFKFB3 ve ODC1 aktivitelerinin farmakolojik olarak birlikte inhibisyonu PDAK hücre proliferasyonunu azaltmaktadır.	47
Şekil-29: PANC1 hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1'in farmakolojik olarak birlikte inhibisyonu tekli inhibisyonlara göre yumuşak agarda koloni sayısını daha fazla azaltır.....	48
Şekil-30: MIA PaCa-2 hücrelerinde PFKFB3 ve ODC1'in farmakolojik olarak birlikte inhibisyonu tekli inhibisyonlara göre yumuşak agarda koloni sayısını daha fazla azaltır.....	49
Şekil-31: PFKFB3 ve ODC1'in farmakolojik olarak birlikte inhibisyonu tekli inhibisyonlara göre PANC1 hücrelerinin koloni oluşturma kapasitelerini daha güçlü baskılar.	50
Şekil-32: PFKFB3 ve ODC1'in farmakolojik olarak birlikte inhibisyonu tekli inhibisyonlara göre MIA PaCa-2 hücrelerinin koloni oluşturma kapasitelerini daha güçlü baskılar.	51
Şekil-33: PFKFB3 ve ODC1'in farmakolojik olarak birlikte inhibisyonu PANC1 hücrelerinin Matrijelde invazyon kapasitesini baskılar.....	52

8.2. Tablolar Listesi

Tablo-1: Çalışmada kullanılan kimyasallar, malzemeler, üretici firmaları ve katalog numaraları tablo halinde sunulmuştur.	22
Tablo-2: Çalışmalarda kullanılan cihazlar.	24

9.TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca her zaman arkamda olduğunu hissettiğim sadece tez çalışmam için değil akademik ilerleme kaydedebilmem için her anlamda desteğini ve bilgi birikimini eksik etmeyen sevgili danışman hocam Prof. Dr. Nazmiye GÜNEŞ'e,

Tezimde çalışmak istediğim konuyu katkıları ve maddi manevi destekleri ile bambaşka bir boyuta getirmemi sağlayıp, birçok projesinde bana yer veren birlikte çalışmaktan gurur ve onur duyduğum sayın hocam Prof. Dr. Abdullah YALÇIN'a

Doktora sürecimde yaşadığım tüm aksilikler ve kayıplarda her birinin desteğini sonsuz hissettiğim üzerimde emeği geçen çok değerli bölüm hocalarım Prof. Dr. Meltem TANRIVERDİ, Prof. Dr. Ümit POLAT, Prof. Dr. Saime GÜZEL, Doç. Dr. Duygu UDUM ve Dr. Öğretim Üyesi Hatibe KARA'ya

Lisans öğrenciliğimden beri çok sevip saygı duyduğum gerek malzeme gerekse moral ihtiyacımı gideren sevgili Doç. Dr. Sabire GÜLER'e

Laboratuvara geldiğim ilk yıllarımda oryante olmamı çabuklaştıran sevgili Süleyman Can ÖZCAN, Tuğba Hazal ALTUNOK, Yunus GÜRPINAR, Aydan MUTLU ve Mehmet Yaşar TEMİZ'e

Doktoramın son yıllarına yetişen tez çalışmamdaki emeklerini asla es geçemeyeceğim, çalışma arkadaşından ziyade dost olabildiğimiz sevgili laboratuvar arkadaşlarım Öner SÖNMEZ ve Elif BAYRAM'a

Tüm bu süreci beraber yaşayıp, bütün stresimi ve nazımı çeken, maddi manevi desteğini asla esirgemeyen sevgili eşim Nihat Can BOZKURT ve ailesine,

Doktoraya başlamam konusunda beni yüreklendirip her anlamda destek olan, akademiye çok güzel ilerleyeceğimi düşünen, maalesef Dr. ünvanını almamı göremeyen; 2 yıl kadar önce kanserden kaybettiğim canım babama, bugünkü Aybike olmamı sağlayan üzerimde sayamayacağım kadar emekleri olan sevgili abim Sungur Alp SARIOĞLU ve canım annem Saadet SARIOĞLU'na,

Burada isimlerine yer vermeyi atladığım hayatıma dokunmuş tüm akraba ve arkadaşlarıma,

1649B032100139 başvuru numaralı BİDEB 2211-C Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında doktora sürecimde finansal olarak destek gördüğüm Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK), DDP(V)-2020/1 numaralı araştırma projesinin finansmanını sağlayan Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (BUÜ-BAP) ve Moleküler Farmakoloji ve İlaç Geliştirme öncelikli alanı 100/2000 bursu için Yükseköğretim Kurulu'na (YÖK) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

10.ÖZGEÇMİŞ

Aybike SARIOĞLU BOZKURT ilköğretim ve ortaöğretimini Eskişehir Fatih Sultan Mehmet İlköğretim okulunda, lise öğrenimini ise Eskişehir 19 Mayıs Anadolu Lisesi'nde tamamlamıştır. 2012 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazanmış, 2017 yılında buradaki lisans eğitimini başarıyla tamamlayarak Veteriner Hekim ünvanı almaya hak kazanmıştır. Aynı yıl Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda doktora eğitimine kabul edilmiştir. 2021 yılının Eylül ayında Nihat Can BOZKURT ile hayatını birleştirmiştir.

Doktora süresi boyunca önce 100/2000 Yök bursunu Moleküler Farmakoloji ve İlaç Geliştirme öncelikli alanında almaya hak kazanmış, daha sonra içerisinde bulunduğu yayınlar ve tez önerisi ile 2211-C öncelikli alanlar doktora bursunu kazanarak çift bursiyer olma şansı elde etmiştir. Bununla beraber DDP(V)/2020-1 numaralı proje kapsamında tez önerisi BUÜ BAP birimi tarafından desteklenmiştir. Ayrıca TÜBİTAK bünyesinde Ardeb-1001 projeleri kapsamında 119S794 numaralı projede de bursiyer olarak yer almıştır. Yine TÜBİTAK bünyesinde 2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı kapsamında üst üste 3 dönem boyunca en yüksek puan toplamıyla burs desteği kazanmıştır. Çalışmalarına 123Z324 numaralı Ardeb-1001 (TÜBİTAK) projesinde doktora sonrası araştırmacı olarak devam edecektir.