TUĞBA HAZAL ALTUNOK

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

TRANSFORME EDİCİ BÜYÜME FAKTÖRÜ-β1 TARAFINDAN İNDÜKLENEN EPİTEL-MEZENKİMAL DÖNÜŞÜMDE 6-FOSFOFRUKTO-2-KİNAZ/FRUKTOZ-2,6-BİSFOSFATAZ ENZİMLERİNİN ROLÜ

TUĞBA HAZAL ALTUNOK

DOKTORA TEZİ

BURSA-2020

TUĞBA HAZAL ALTUNOK

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2020

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

TRANSFORME EDİCİ BÜYÜME FAKTÖRÜ-β1 TARAFINDAN İNDÜKLENEN EPİTEL-MEZENKİMAL DÖNÜŞÜMDE 6-FOSFOFRUKTO-2-KİNAZ/FRUKTOZ-2,6-BİSFOSFATAZ ENZİMLERİNİN ROLÜ

Tuğba Hazal ALTUNOK

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:
Prof. Dr. Abdullah YALÇIN

2211/A – TÜBİTAK
119S017 – TÜBİTAK (1002)
119S794 – TÜBİTAK (1001)
2017/3 – U Ü BAP

BURSA-2020

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak sunduğum

"Transforme Edici Büyüme Faktörü-β1 Tarafından İndüklenen Epitel-Mezenkimal Dönüşümde 6-Fosfofrukto-2-Kinaz/Fruktoz-2,6-Bisfosfataz Enzimlerinin Rolü" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Tuğba Hazal Altunok

01.06.2020

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Uludağ Üniversitesi Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi Tuğba Hazal Altunok tarafından hazırlanan Transforme Edici Büyüme Faktörü-β1 Tarafından İndüklenen Epitel-Mezenkimal Dönüşümde 6-Fosfofrukto-2-Kinaz/Fruktoz-2,6-Bisfosfataz Enzimlerinin Rolü konulu Doktora tezi 26/06/2020 günü, 10:00 – 11:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	**İmza**
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Abdullah YALÇIN	
Üye	Prof. Dr. Serap ÇELİKLER KASIMOĞULLARI	
Üye	Doç. Dr. Saime GÜZEL	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Deniz BELENLİ	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Damla ARSLAN ACARÖZ	

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

Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

01/06/2020

Adı Soyadı: Tuğba Hazal Altunok

Anabilim Dalı: Biyokimya

Tez Konusu: Transforme Edici Büyüme Faktörü-β1 Tarafından İndüklenen Epitel-Mezenkimal Dönüşümde 6-Fosfofrukto-2-Kinaz/Fruktoz-2,6-Bisfosfataz Enzimlerinin Rolü

ÖZELLİKLER	**UYGUNDUR**	**UYGUN DEĞİLDİR**
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. Abdullah YALÇIN

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak

İç Kapak

ETİK BEYAN ii

KABUL ONAY iii

TEZ KONTROL BEYAN FORMU iv

İÇINDEKİLER v

TÜRKÇE ÖZET viii

İNGİLİZCE ÖZET ix

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 4

2.1. Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm (EMT) 4

2.2. Transforme edici büyüme faktörü β (TGFβ) 7

2.2.1. TGFβ Sinyal Yolakları 8

2.2.2. TGFβ'nın Kanserde Çift Yönlü Etkisi 10

2.2.3. EMT Sürecinde TGFβ 11

2.3.Kanser Hücrelerinde Enerji Metabolizması 14

2.3.1 Warburg Etkisi 14

2.3.2. Kanserde Glikoliz Regülasyonu 18

2.4. Kanserde Metabolik Yeniden Programlanma ve EMT İlişkisi 21

3. GEREÇ VE YÖNTEM 24

3.1. Gereç 24

3.1.1. Kimyasal Malzemeler 24

3.1.2. Cihazlar 25

3.1.3. Çözeltiler 26

3.2. Yöntem 27

3.2.1. Hücre Kültürü 27

3.2.1.1. Yedeklenen Hücrelerin Çözdürülmesi 27

3.2.1.2. Kültürlenen Hücrelerin Pasajlanması 27
3.2.1.3. Hücre Sayımı 28
3.2.1.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması 28
3.2.2. siRNA Transfeksiyonu 28
3.2.3. TGFβ Uygulaması 29
3.2.4. mRNA Ekspresyon Analizi 29
3.2.4.1. RNA İzolasyonu 29
3.2.4.2. cDNA Sentezi 30
3.2.4.3. Real-Time Kantitatif PCR (qPCR) 30
3.2.5. Protein İzolasyonu ve Western Blotlama 31
3.2.5.1. Total Protein Eldesi 31
3.2.5.2. Protein Konsantrasyon Ölçümü 31
3.2.5.3. SDS-PAGE ve Western Blotlama 32
3.2.5.4. Bloklama, Antikor İnkübasyonu ve Görüntüleme 32
3.2.6. Hücre Proliferasyon Analizi 33
3.2.7. Fruktoz-2,6-Bisfosfat (F2,6BP) Analizi 33
3.2.8. Glukoz Analizi 34
3.2.9. Laktat Analizleri 35
3.2.10. Transwell İnvazyon Analizi 35
3.2.11. İmmünfloresan (IF) Boyama 36
3.2.12. İstatistiksel Analiz 36
4. BULGULAR 37
4.1. Panc1 Hücrelerinde TGFβ ile İndüklenen EMT'de PFKFB Enzimlerinin Rolü 37
4.1.1. Panc1 Hücrelerinde TGFβ ile EMT'nin İndüklenmesi 37
4.1.2. Panc1 Hücrelerinde TGFβ'nın F2,6BP ve Glikolize Etkisi 38
4.1.3. Panc1 Hücrelerinde TGFβ ile PFKFB Ekspresyonlarındaki Değişim 40
4.1.4. Panc1 Hücrelerinde TGFβ ile Artan PFKFB3'ün Hücre Fenotipine Etkisi 41
4.1.5. Panc1 Hücrelerinde TGFβ ile İndüklenen EMT'de PFKFB3'ün EMT'ye Etkisi. 45

4.1.6. Panc1 Hücrelerinde TGFβ ile İndüklenen EMT'de PFKFB3'ün F2,6BP, Glukoz Alımı ve Glikolitik Aktiviteye Ekisi 50

4.1.7. Panc1 Hücrelerinde TGFβ ile İndüklenen EMT'de PFKFB3'ün Hücre Proliferasyonuna Etkisi 51

4.1.8. Panc1 Hücrelerinde PFKFB3 Enziminin TGFβ ile İndüklenen EMT'de İnvazyona Etkisi 52

4.2. A549 Hücrelerinde TGFβ ile İndüklenen EMT'de PFKFB Enzimlerinin Rolü 54

4.2.1. A549 Hücrelerinde TGFβ ile EMT'nin İndüklenmesi 54

4.2.2. A549 Hücrelerinde TGFβ'nın F2,6BP ve Glikolize Etkisi 56

4.2.3. A549 Hücrelerinde TGFβ ile PFKFB Ekspresyonlarındaki Değişim 57

4.2.4 A549 Hücrelerinde TGFβ ile Artan PFKFB4'ün Hücre Fenotipine Etkisi 59

4.2.5. A549 Hücrelerinde TGFβ ile İndüklenen EMT'de PFKFB3'ün EMT'ye Etkisi . 62

4.2.6. A549 Hücrelerinde TGFβ ile İndüklenen EMT'de PFKFB3'ün F2,6BP, Glukoz Alımı ve Glikolitik Aktiviteye Ekisi 64

4.2.7. A549 Hücrelerinde TGFβ ile İndüklenen EMT'de PFKFB4'ün Hücre Proliferasyonuna Etkisi 66

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 67

6. KAYNAKLAR 78

7. SİMGELER ve KISALTMALAR 92

8. EKLER 95

8.1. Şekiller Listesi 95

8.2. Tablolar Listesi 96

9. TEŞEKKÜR 97

10. ÖZGEÇMİŞ 98

TÜRKÇE ÖZET

Transforme edici büyüme faktörü-β (TGFβ) tümör hücrelerindeki malign özelliklerin edinimi için gerekli olan güçlü bir epitelyal mezenkimal dönüşüm (EMT) aktivatörüdür. Son çalışmalar, tümör hücrelerinde EMT'nin metabolik yeniden programlanma ile ilişkili olduğunu ve TGFβ'nın birden fazla primer hücre hattında glikolizi uyardığını göstermiştir; ancak, TGFβ'nın glukoz metabolizması üzerindeki etkisi hakkında çok az şey bilinmektedir. 6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bisfosfatazlar (PFKFBs) ailesine ait enzimler, glikolizdeki fosfofruktokinaz-1 (PFK-1) enziminin kuvvetli bir aktivatörü olan fruktoz-2,6-bisfosfat (F2,6BP)'ın yapım ve yıkımından sorumludurlar.

Bu çalışma ile ilk kez, TGFβ'nın, PFKFB3 ekspresyonunu indükleyerek pankreatik kanser hücre hattı Panc1'de glikolizi artırdığı ve PFKFB3'ün TGFβ aracılı Panc1 hücrelerinin invazyonu için gerekli olduğu gözlendi. Ayrıca, TGFβ'nın Snail üzerindeki artırıcı etkisinin PFKFB3'ün baskılanması ile büyük ölçüde azaldığı görüldü. Elde edilen bulgularla, Panc1 hücrelerinde PFKFB3'ün, TGFβ ile Snail'in indüklenmesi, invazif ve glikolitik bir fenotip edinilmesinde rol oynadığının anlaşılması sağlandı. Panc1 hücrelerinin aksine, TGFβ ile indüklenen EMT'nin, akciğer tümörü hücre hattı A549'da glikolizi azaltıcı yönde etki ettiği belirlendi. Ayrıca, TGFβ ile ekspresyonu artan PFKFB4'ün glikolizdeki yavaşlamaya bir etkisinin olmadığı; fakat TGFβ ile A549 hücre hattında gözlenen mezenkimal fenotipin PFKFB4'ün baskılanmasıyla kısmen azaldığı belirlenmiş oldu.

Sonuç olarak elde edilen veriler, PFKFB izoenzimlerinin TGFβ-ilişkili hücresel süreçlerde önemli olabileceğine işaret etmekte olup; farklı hücrelerde TGFβ ile etkileşime giren farklı PFKFB izoenzimlerinin özgün metabolik fenotiplere neden olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm (EMT), Transforme Edici Büyüme Faktörü-β (TGFβ), Glikoliz, 6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bisfosfataz (PFKFB).

İNGİLİZCE ÖZET

Transforming growth factor-β (TGFβ) is a potent activator of Epithelial-mesenchymal transition (EMT) that is essential for the acquisition of malignant properties in tumor cells. Although recent studies suggest that the EMT in tumor cells is associated with reprogramming energy metabolism and TGFβ has been shown to stimulate glycolysis in multiple primary cell lines, little is known about TGFβ's effect on glucose metabolism. The 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB) enzyme family comprises of bifunctional enzymes that control the levels of fructose-2,6-bisphosphate (F2,6BP), a potent allosteric activator of phosphofructokinase-1 (PFK-1).

We found that, for the first time, TGFβ increases glycolysis in the pancreatic cancer cell line Panc1 by inducing PFKFB3 expression and that PFKFB3 is required for TGFβ mediated invasion of Panc1 cells in vitro. Furthermore, we demonstrated that the effect of TGFβ on Snail induction is largely reduced by PFKFB3 silencing. These findings suggest that PFKFB3 is involved in the regulation of Snail and acquisition of an invasive and glycolytic phenotype by TGFβ in Panc1 cells. In contrast with Panc1 cells, we showed that TGFβ-induced EMT reduces glycolysis in the lung cancer cell line A549. In addition, we determined that PFKFB4, whose expression increased with TGFβ, had no effect on the slowdown in glycolysis, but the mesenchymal phenotype observed in the A549 cell line with TGFβ decreased partially by suppression of PFKFB4.

In conclusion these data suggest that PFKFB enzymes may have important roles in TGFβ-associated cellular processes and that different PFKFB isozymes that interact with TGFβ may contribute to distinct metabolic phenotypes in different tumor cells.

Keywords: Transforming growth factor-beta (TGFβ), epithelial-mesenchymal transition (EMT), glycolysis, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (PFKFB).

1. GİRİŞ

Kanserli hücrenin birincil tümör dokusundan ayrılıp, bazal membranı aşarak dolaşım sistemine geçmesi ve farklı dokulara ulaşarak ikincil bir tümör oluşturması şeklinde özetleyebileceğimiz metastaz, kanserden ölümlerin temel nedenidir (Yang, Mani ve Weinberg, 2006). Kanserden ölümlerdeki bu önemli etkisine rağmen metastazın temelini oluşturan invazyon ve göçe ait moleküler mekanizmalar bilinmezliğini korumaktadır. Kanserli hücrelerin birincil tümör dokusundan kaçışı, normal fizyolojik süreçte, embriyogenez ve yara iyileşmesi gibi temel işlevlere sahip epitelyal mezenkimal dönüşüm (Epithelial Mesenchymal Transition; EMT) olarak adlandırılan, hücrelerarası bağlantı proteinlerinin azalması ve mezenkimal fenotip kazanımı ile artan göç potansiyeli ile ilişkilidir (Thiery, 2002). Epitel fenotip belirteci E-kaderindeki azalma, kanser hücrelerinde EMT'nin varlığının anlaşılmasına yönelik meydana gelen en temel değişimdir. EMT süreci, başlıca Snail, Twist ve Zeb ailesi olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörleri aracılığıyla gerçekleşir. Transkripsiyon faktörlerinin EMT'deki rolleri, temelde E-kaderin, N-kaderin, β-katenin, vimentin ve fibronektin gibi çeşitli proteinlerin regülasyonu ve hücrelerarası sıkı bağlantıları baskılamalarıyla olur (Zheng ve Khang, 2014). EMT sürecinin başlatılmasında, fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast Growth Factor; FGF), wnt ve notch proteinleri gibi çeşitli büyüme ve farklılaşma faktörleri yer alır. Bu faktörler arasında EMT'nin önemli bir indükleyicisi olması dolayısıyla transforme edici büyüme faktörü β (Transforming Growth Factor β; TGFβ), kanser çalışmalarında büyük oranda yer almaktadır (Yang ve Weinberg, 2008).

TGFβ, tüm doku ve hücrelerce eksprese edilebilen, embriyogenez, yara iyileşmesi ve bağışıklık gibi fizyolojik süreçlerde yer alan çok yönlü etkileri olan bir sitokindir. Kanser başlangıcında proliferasyonu inhibe ederek ve apoptozu indükleyerek tümörü baskılayıcı etki gösteren TGFβ, tümör gelişiminde ise destekleyici bir faktör olarak etki göstermektedir (Massagué, 2008). TGFβ1, TGFβ2 ve TGFβ3 olmak üzere üç izoformu vardır. EMT'nin indüklenmesiyle alakalı çalışmalarda yoğun şekilde kullanılan TGFβ1 izoformunun, birçok tümör çeşidinde aşırı ekspresyon gösterdiği ve tümör hücrelerinde artan metastatik potansiyel ile ilişki olduğu bilinmektedir (Derynck ve diğerleri, 2000; Ohshio ve diğerleri, 2013).

Kanser hücrelerinin çoğalmaları için gerekli olan besin ve enerji desteği, metastatik sürecin tamamlanabilmesi için de gereklidir (Vanharanta ve Massagué, 2013). Kanser hücrelerinin normal hücrelere kıyasla farklı bir metabolik profile sahip olması, Otto Warburg'un yaklaşık 100 yıl önceki glukoz metabolizmasıyla alakalı gözlemlerine dayanmakta ve kanserdeki metabolik değişim, günümüzde genel bir kanser özelliği olarak kabul edilmektedir. Normal hücrelerde, oksijen varlığında glikoliz yolağının son ürünü pirüvat büyük oranda trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne girip, mitokondride oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) ile karbondioksite metabolize olurken, kanserli hücrelerdeki yüksek oranda glukoz tüketimi ve tüketilen glukozun, glikoliz yoluyla büyük oranda laktata dönüşümü 'Warburg etkisi' olarak adlandırılmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2011; Warburg, Wein ve Negelein, 1923). EMT ile kanserde metabolik yeniden programlanma arası etkileşime yönelik giderek artan sayıdaki çalışma, metabolik değişimin, EMT sürecinin gerçekleşmesi için bir gereklilik olabileceğini göstermektedir (Morandi, Taddei, Chairugi ve Giannoni, 2017). Örneğin; EMT transkripsiyon faktörü Snail, glikoneojenezin kontrol noktalarından birini katalize eden fruktoz-1,6-bisfosfataz 1 (FBPaz1)'i baskılayarak dolaylı olarak glikolizin aktivasyonunu ve karbonhidrat duyarlı element bağlayıcı protein (ChREBP)'i baskılayarak yağ asidi sentaz (FASN) ve asetil-KoA karboksilaz (ACC) enzimlerinin inhibisyonuna neden olmaktadır (Dong ve diğerleri, 2013; Jiang, Deberardinis ve Boothman, 2015). Diğer taraftan, agresif ve EMT sürecinin aktif olduğu bazı kanser türlerinde, mitokondriyal metabolizma ile ilgili gen ekspresyonlarının azaldığı ve Warburg fenotipinin hakim olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (Gaude ve Frezza, 2016). Bununla birlikte, güçlü bir EMT indükleyicisi olan TGFβ ve glukoz metabolizması arasındaki ilişkiyi detaylı olarak değerlendiren bir çalışma yoktur (Naber, Drabsch, Snaar-Jagalska, ten Dijke ve van Laar, 2013). TGFβ'nın EMT'nin indüklenmesindeki önemi, EMT'nin kanserden ölümlerin temelinde yatan, metastaza aracılık eden ana mekanizma olması ve metabolik yeniden programlanmanın kanserli hücrelere ait özelliklerin sürdürülmesi için elzem oluşu göz önünde bulundurulduğunda, bu üç faktör arası ilişkinin çözümlenmesinin birçok kanser türünde önemli tedavi seçenekleri sunması kuvvetle muhtemeldir. Bu amaçla tasarlanan tez çalışmamız, TGFβ tarafından indüklenen EMT ve metabolik yeniden programlanma arası ilişkinin, en temel metabolik yolak olan glikolizin en önemli hız sınırlayıcı basamağını regüle eden

PFKFB enzim ailesi ile ilişkisi yönünden incelenmesini ve muhtemel mekanizmaların ortaya konulmasını amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

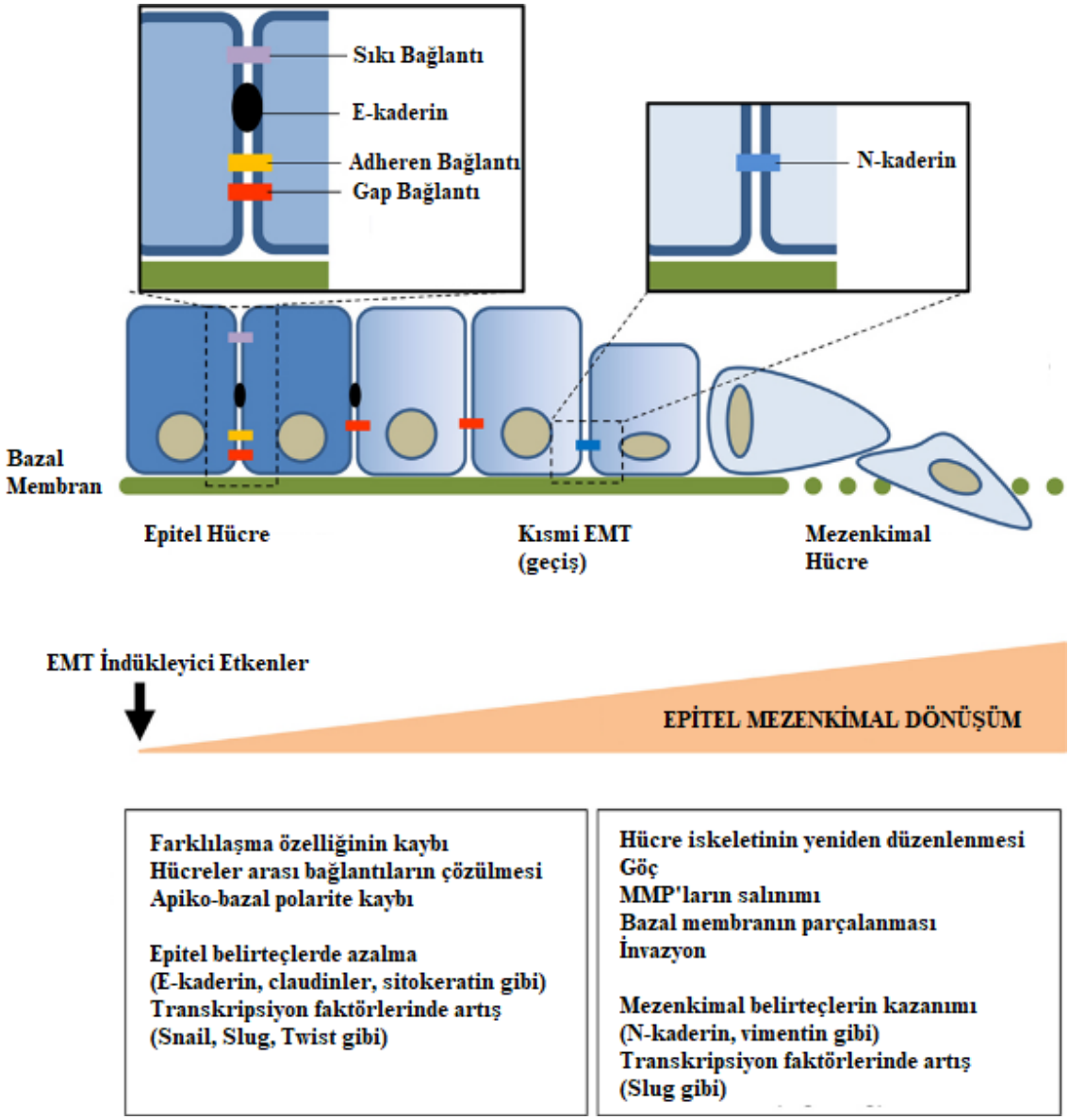
2.1. Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm (EMT)

Epitel hücreler, sıkı bağlantılar (tight junctions), adheren bağlantılar, desmozomlar ve geçit bağlantıları (gap junctions) gibi özelleşmiş membran proteinlerinin düzenli bir şekilde etkileşimi ile istiflenmiş yapılar oluştururlar. Bazal lamina ve aktin hücre iskeleti ile apikal-bazolateral polarizasyon özelliği sergilerler. Epitel hücrelerin aksine mezenkimal hücreler, düzenli bir yapıya ve apikal-bazolateral polarizasyona sahip değillerdir. Epitel hücreler kübik morfolojiye sahipken mezenkimal hücreler ince, uzun, fibroblast benzeri yapıya sahiptirler (Thiery, 2002).

İlk kez 1980'lerde Betty Hay tarafından tanımlanan EMT, embriyo oluşumu, yara iyileşmesi ve kanser metastazı gibi süreçlerde rol oynayan, polarize epitel hücrelerin çeşitli hücresel ve moleküler değişimler geçirerek mezenkimal fenotip kazanması sürecidir (Şekil – 1) (Zavadil, Haley, Kalluri, Muthuswamy ve Thompson, 2008). EMT, biyolojik etki mekanizmasına göre üç sınıfa ayrılmıştır. Tip 1 EMT, implantasyon, embriyo oluşumu ve organ gelişimi aşamalarında yer alan EMT türüdür. Bu EMT türüyle oluşan mezenkimal hücreler, mezenkimal epitel dönüşüm (MET) yoluyla sekonder epitel hücreleri oluşturma potansiyelindedirler. Böylelikle farklı hücre türlerinin oluşumu sağlanmış olur. Yara iyileşmesi, doku yenilenmesi ve organ fibrozisi ile ilişkili EMT, ikinci tür EMT'dir. Tip 2 EMT'de inflamasyon oluşumu gözlenir. Bu süreçte transforme edici büyüme faktörü- β 1 (Transforming Growth Factor β1; TGFβ1) ve interleukinler (ILs) gibi inflamatör sitokin ve kemokinler, kronik inflamasyon oluşumundaki temel unsurlardandır. Onarımın tamamlanması ve inflamasyondaki azalma ile Tip 2 EMT sona erer. Tip 3 EMT, özellikle klonal büyümeyi ve lokalize tümör gelişimini destekleyen genlerde meydana gelen genetik ve epigenetik değişimlerle kanser hücrelerinde görülen, onkogen ve tümör baskılayıcı genler üzerinde etkisi olan EMT türüdür. Tümör hücreleri için, invazyon ve metastaza yatkınlık sağlaması yönüyle büyük önem teşkil etmektedir (Singh, Yelle, Venugopal ve Singh, 2018).

EMT'nin ilk aşaması, epitel hücreler arasındaki bütünlüğün bozulması şeklinde gelişir. Hücre-matriks bağlantısı ve hücrelerarası bağlantılar kaybolmaya başlar. Hücre

iskelet moleküllerinin bileşimlerinde ve düzenlenmelerindeki değişimlerin de etkisiyle hücrelerde polarite kaybı gözlenir (Macara ve LcCaffrey, 2013). Polarite kaybına uğrayan ve birbirlerinden ayrışan hücreler için EMT'deki bir sonraki aşama ekstraselüler matriks (ECM) boyunca göç özelliğinin kazanımıdır. Bu aşamadaki hücrelerin ön kısımlarında uzun, aktin bakımından zengin membran çıkıntıları (lamellipodia) ve sivri uçlu uzantılar (filopodia) mevcuttur. Bu membran çıkıntıları hücre-matriks adezyonu sağlayarak ECM ile etkileşim sağlarlar. Hücre hareketi, fokal adezyonlardaki birleşme ve ayrışma mekanizması ile ön-arka çekme kuvveti sayesinde lamellipodia, filopodia ve invadopodia oluşturularak sağlanır. Bu aşamada, Rho GTPazlar, miyozin kinazlar gibi bazı proteinlerin aktivasyonu ve α5β1 integrinlerinin ekspresyonu gibi bazı önemli değişimler söz konusudur (Yilmaz ve Christofori, 2009). EMT sürecinin son aşaması bazal membranın aşılması ve invazif özellik kazanımı şeklinde gerçekleşir. Bazal membran bileşenlerinin parçalanması için matriks metalloproteinazların (MMPs) salınımı bu süreçte büyük önem taşır. Ayrıca, kollajen tip 1 ve fibronektin gibi ECM bileşenlerinin hücrelerce üretimi ve salınımı da ECM'in yeniden düzenlenmesini sağlayarak göç ve invazyonu kolaylaştırıcı etki gösterir (Tsai ve Yang, 2013).



Şekil - 1: Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm (EMT)'ün Genel Özellikleri. Sıkı istiflenmiş, polar epitel hücrelerin polarite özelliğini kaybetmiş mezenkimal hücrelere dönüşümü, EMT sürecinin tanınmasını da sağlayan bir dizi değişim gösterir. Bunlardan epitel belirteç E-kaderinin, transkripsiyonel E-kaderin baskılayıcılarındaki (Snai1, Twist, Slug ve Zeb1 gibi) artış ile kaybı en temel EMT özelliklerinden biridir (Onder ve diğerleri, 2008). N-kaderin ve vimentin gibi mezenkimal belirteçlerdeki artış da mezenkimal fenotip oluşumunu destekler (Simeone ve diğerleri, 2019) (Morandi ve diğerleri, (2017)'dan Türkçeleştirilerek alınmıştır).

EMT'nin indüklenmesi, TGFβ, FGF, Hepatosit büyüme faktörü (Hepatocyte Growth Factor; HGF) ve Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü (Platelet Derived Growth Factor; PDGF), Wnt ve Notch proteinleri gibi reseptör tirozin kinazlar yoluyla etki eden büyüme faktörleri dâhil olmak üzere çeşitli büyüme ve farklılaşma faktörleri ile gerçekleşir (Moustakas ve Heldin, 2007). Bunlar arasında TGFβ, kanserle alakalı ölümlerin büyük bölümünün temelinde yatan metastaz sürecine aracılık eden EMT'nin

en önemli indükleyicilerinden olması dolayısıyla kanserde EMT'nin indüklenmesi ile ilgili çalışmalarda büyük oranda yer almaktadır (Hua, Dijke, Kostidis, Giera ve Hornsveld, 2019).

2.2. Transforme Edici Büyüme Faktörü β (TGFβ)

TGFβ, aktivinler, miyostatin, kemik morfogenetik proteinler gibi otuzdan fazla üyesi bulunan TGFβ ailesinin en bilinen üyesidir. TGFβ ailesi, embriyonik gelişimden doku homeostazisine kadar birçok biyolojik sürecin düzenlenmesinde yer alır ve TGFβ sinyalindeki herhangi bir aksaklık birçok hastalığın oluşumunu beraberinde getirir. TGFβ'nın TGFβ1, 2 ve 3 olmak üzere üç izoformu mevcuttur ve tümör oluşumunda yüksek ekspresyonu belirlenen TGFβ1, çoğu kanser çalışmasının temelinde yer alan izoformdur (Chin, Boyle Parsons ve Coman, 2004). Yara iyileşmesi ve tümör metastazına yönelik yakın zamanda bazı etkileri belirlenmiş olan TGFβ2'ye kıyasla TGFβ1'in, erişkin dokulardaki ekspresyonunun 10 – 100 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. TGFβ2 ekspresyonu ise embriyonik dokularda daha yüksektir (Flanders ve diğerleri, 2016). Dolayısıyla TGFβ1'in erişkin dokularda, TGFβ2'nin ise embriyonik dokularda homeostazisi sağlamada önemli olduğu söylenebilir.

İnaktif halde TGFβ, gecikme ile ilişkili peptid (Latency Associated Protein, LAP) olarak adlandırılan N-terminal kısım ve aktif sitokin monomeri içeren kısa bir C-terminal kısmından ibarettir. TGFβ'nın aktivasyonu spesifik proteazlar ve hücre yüzey integrinlerince oluşturulan mekanik kuvvet yoluyla hücre yüzey reseptörlerine bağlanabilen biyoaktif TGFβ molekülünün serbest hale geçişiyle olur (Shi ve diğerleri, 2016). Biyoaktif TGFβ ligandının, serin/treonin kinaz ve tirozin kinaz aktivitesine sahip TGFβ hücre yüzey reseptörleri tip 1 (TGFβRI) ve tip 2 (TGFβRII)'ye bağlanmasıyla TGFβ hücre içi sinyal iletimi başlatılır. TGFβRI ve TGFβRII reseptörleri ekstraselüler kısımlarında disülfit bağları oluşturmak üzere sistin kalıntıları bulunan ve hücre içi kısımlarında serin/treonin kinaz domaini taşıyan, yapısal olarak benzer reseptörlerdir. Betaglikan (BG) olarak da bilinen TGFβRIII reseptör proteini TGFβ ligandının TGFβRII'ye bağlanmasını kolaylaştırmak açısından oldukça önemlidir. BG aracılığıyla öncelikle TGFβRII'ye ardından TGFβRI'e bağlanan TGFβ, reseptörlerle tetramerik bir kompleks oluşturur. Ardından TGFβRII, kinaz domaini TGFβRI'i glisin/serin

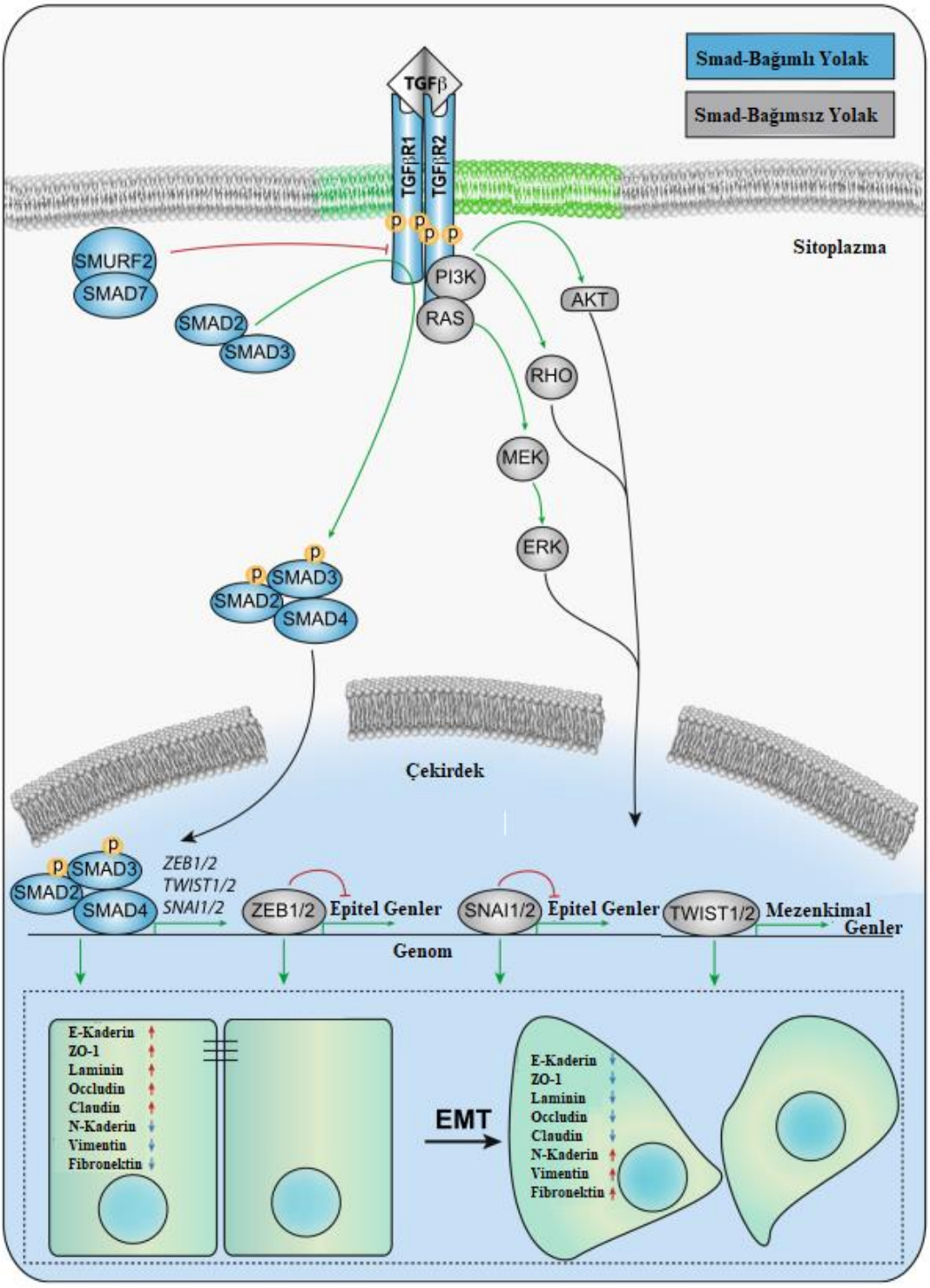
bölgesindeki serin ve treonin aminoasitlerinden fosforlar ve TGFβRI aktivasyonu gerçekleşmiş olur (Derynck ve Budi, 2019).

2.2.1. TGFβ Sinyal Yolakları

EMT indükleyici faktörler arasında TGFβ, kanserde görülen EMT'deki önemli rolleri ve hücre kültürü için kuvvetli bir EMT indükleyicisi olması gibi nedenlerle üzerinde yoğun şekilde çalışılan en önemli EMT indükleyicisi konumundadır. EMT'nin TGFβ ile indüklenmesinde yer alan Smad'lar EMT ilişkili transkripsiyon faktörlerini (EMT-TF) doğrudan aktive edebilir ve sonrasında hedef genlerin kontrolünde yer alırlar (Derynck, Muthusamy ve Saeteurn, 2015).

TGFβ ligandı ile aktive edilen TGFβRI kinaz, R-Smad'ları (TGFβ için Smad2 ve Smad3) fosforlar ve fosforlanan Smad'ların co-Smad (Smad4) ile birleşmesiyle oluşturulan kompleks çekirdeğe geçerek çeşitli genlerin ekspresyonlarının regülasyonunda yer almak üzere DNA'ya bağlanır (Miyazono, Katsuno, Koinuma, Ehata ve Morikawa, 2018). Smad proteinlerinin DNA'ya bağlanması, Smad-bağlanma elementi (SBE) olarak bilinen CAGAC sekansı veya GC yönünden zengin sekanslar üzerinden gerçekleşir. Smad proteinlerinin DNA'ya karşı afiniteleri düşük olduğundan yüksek afiniteli bağlanma için çeşitli kofaktörler gereklidir. Ayrıca Smad kompleksi ile birleşen transkripsiyonel koaktivatörler veya korepressörler ile hedef genin indüklenmesi ve baskılanması sağlanmış olur (Neel, Humbert ve Lebrun, 2012). İnhibitör Smad'lar olarak bilinen Smad6 ve Smad7 ise R-Smad'ların aktivasyonlarını inhibe ederek TGFβ sinyalinin negatif kontrolünü sağlar (Massagué, 2008).

TGFβ, Smad bağımlı yolaktan daha düşük seviyede olsa da Smad'dan bağımsız olarak mitojen ile aktive olan kinaz (MAPK), Rho GTPaz ve PI3K-Akt-mTOR gibi yolaklar aracılığı ile de aktivite gösterebilir. Bu yolaklar, EMT sürecinde Smad aracılı gen ekspresyonu ile etkileşirler ve Smad'ların aktivitelerini ve stabilitelerini doğrudan regüle edebilirler (Şekil – 2) (Moustakas ve Heldin, 2005).



Şekil - 2: TGFβ ile indüklenen Epitel-Mezenkimal Dönüşüm. Smad bağımlı yolak ile meydana gelen sinyal iletim sürecinde reseptöre bağlanan TGFβ ligandı ile aktive olan TGFβRII, TGFβRI'i fosforlar. Aktive olan TGFβRI'in R-Smad'lar olarak bilinen Smad2 ve Smad3'ü fosforlaması ve devamında fosforlanarak aktif hale gelen R-Smad'ların Smad4 transkripsiyon faktörü ile kompleks oluşturarak çekirdeğe geçişi ve DNA'ya tutunarak koaktivatörler ve korepressörler eşliğinde bir dizi genin regülasyonunda yer alması şeklinde gerçekleşir. TGFβ ile indüklenen Smad-bağımsız yolaklar da EMT sürecinde etkilidirler (Zhang, 2009) (Hua ve diğerleri (2019)'dan türkçeleştirilerek alınmıştır)**.**

2.2.2. TGFβ'nın Kanserde Çift Yönlü Etkisi

TGFβ, tümör oluşumunda ve gelişiminde, tümör baskılayıcı ve tümörü destekleyici olmak üzere iki farklı rol üstlenmektedir. Kanser hücrelerinde meydana gelen çeşitli mutasyonlar TGFβ sinyal yolağında değişimlere yol açarak TGFβ'nın tümör baskılayıcı mekanizmasının bozularak tümör gelişimini destekleyici etki göstermesine neden olmaktadır. Kanserin ilk gelişim sürecinde hücrenin G1 fazına girişini önleyerek tümör baskılayıcı etki gösteren TGFβ, siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörlerini artırarak ve hücre büyümesi ve bölünmesi için temel bir bileşen olan c-myc genini baskılayarak hücre döngüsünün ilerleyişini yavaşlatmaktadır (Massagué, 2008; Reddy, Hocevar, Howe, 1994). Ölüm İlişkili Protein Kinaz (DAPK), Fas, Aktivatör Protein 1 (AP-1) gibi apoptoz ilişkili faktörlerin regülasyonlarını artırarak ve Bcl-2 ve Bcl-xL gibi anti-apoptotik faktörlerin regülasyonlarını azaltarak apoptozu desteklemesi TGFβ'nın normal hücrelerde görülen bir diğer tümör baskılayıcı etkisidir (Schuster ve Krieglstein, 2002).

TGFβ'nın kanser gelişimi üzerindeki en önemli etkilerinden biri proliferasyon artışı üzerinedir. Çeşitli kanser hücrelerinde TGFβ'nın sitostatik etkisinin giderilmesine yönelik TGFβ reseptörlerinde ve Smad4'de mutasyon belirlenmiştir (Akhurst ve Derynck, 2001). TGFβ'nın bazı mitojenik büyüme faktörleri ve reseptörlerinin üretimini artırıcı etkisi proliferasyon artışındaki muhtemel nedenlerden biridir (Ishikawa, LeRoy ve Trojanowska, 1990). Ras-Raf-MAPK gibi, Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ve FGF gibi çeşitli büyüme faktörlerine aracılık eden, Smad bağımsız yolakların TGFβ tarafından aktive edilmesi, TGFβ'nın, kanserde proliferasyon artışıyla alakalı bir diğer etkisidir (Chapnick, Warner, Bernet, Rao ve Liu, 2011).

Kanser hücrelerinin büyüyüp gelişebilmesi için bir diğer gereksinim büyük oranda besin ve oksijen desteğidir. Proanjiojenik faktör olarak TGFβ, sinyal sürecinde Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF), PDGF ve Temel Fibroblast Büyürme Faktörü (bFGF) ile birlikte etki gösterir ve Glioblastoma (GBM) ve Hepatoselüler Karsinom (HCC) gibi yüksek vaskülariteye sahip tümörlerde TGFβ seviyesinin arttığı belirlenmiştir (Guerrero, 2017).

Hücre yüzeyinde tümör ilişkili antijenlerin ekspresyonu, tümör hücrelerinin immün sistem tarafından tanınmasını ve yok edilmesini sağlar. Çoğu kanser hücresi, bu immün saldırıdan çeşitli mekanizmalar sayesinde kaçabilme özelliğine sahiptir. İmmün hücrelerin oluşumunda ve faaliyetlerinin düzenlenmesinde rol alan TGFβ sinyalindeki bozukluklar, fibrotik hastalıklara, immün regülasyon bozukluğuna ve kansere yol açabilmektedir. Tümör gelişim sürecinde TGFβ sinyali, adaptif veya doğuştan gelen immün yanıtlar için temel bir baskılayıcı işlev görürken, ilerleyen evrelerde ise tümör hücrelerinin immün kaçışı için önemli bir etki mekanizması sağlar (Batlle ve Massagué, 2019).

Göç, invazyon ve metastaz, tümör agresifliği ile ilişkili unsurlardır ve TGFβ bazı kanser türlerinin bu özellikleri edinmesinde gerekli bileşenlerden biridir. EMT'nin en önemli indükleyicilerinden biri olması dolayısıyla TGFβ'nın kanserde invazyon, metastaz ve göç üzerindeki etkisi ayrıntılı şekilde ele alınacaktır.

2.2.3. EMT Sürecinde TGFβ

Kanser hücreleri, belirgin şekilde epitel veya mezenkimal fenotipe kıyasla daha tümörjenik ve kemodirençli olabilen epitel-mezenkimal fenotip arası (kısmi EMT) bir fenotip sergilemektedirler (Loh ve diğerleri, 2019). EMT sürecinde meydana gelen transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, hücre yüzey proteinlerinin ekspresyonlarındaki değişimler, hücre iskelet proteinlerinin yeniden düzenlenmesi ve ECM yıkım enzimlerinin üretimi gibi EMT ile ilişkili faktörler kanser çalışmalarında biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Kalluri ve Weinberg, 2009). EMT oluşum sürecinde yer alan çok sayıdaki moleküler mekanizma arasında EMT-TF'leri, sürecinin anlaşılmasında önemli bir yer teşkil eder (Tsubakihara ve Moustakas, 2018). TGFβ'nın EMT regülasyonundaki rolü temelde, Snail, Slug, Zeb, Twist gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin yer aldığı genlerde meydana gelen aktivite değişimleri yoluyla gerçekleşir.

EMT sürecinde meydana gelen en önemli değişim E-kaderin proteinindeki azalmadır. Adheren bağlantılarının temel bileşeni olan E-kaderinin hücrelerdeki varlığı epitel fenotipin temel özelliklerinden biridir. E-kaderin molekülü komşu hücredeki E-kaderinle kalsiyum bağımlı homofilik bağ oluşturarak hücrelerin birbirlerine sıkı şekilde tutunmasını sağlar. E-kaderin aracılı hücre-hücre adezyon kompleksleri, E-kaderinin

sitoplazmik domaini, β-katenin ve α-katenin üzerinden hücre iskeletine bağlanarak aktin iskeletinin düzenlenmesinde ve hücre polaritesinin oluşumunda önemli rol oynar (Yilmaz ve Christofori, 2009). E-kaderin ekspresyonundaki azalma esas olarak, farklı transkripsiyon faktörlerinin E-kaderin geninin CDH1 promotöründeki E-box'lara bağlanmasıyla transkripsiyonel baskılanma şeklinde olur. Bu transkripsiyon faktörlerinden en önemlileri Snail ailesi üyeleri; Snail ve Slug, Zeb ailesi üyeleri; Zeb1 ve Zeb2 ve dolaylı olarak Twist'dir (Díaz, Vinas-Castells ve De Herreros, 2014). E-kaderin protein seviyesindeki azalma veya fonksiyon kaybı mezenkimal fenotip ve metastatik potansiyel artışı ile ilişkilidir (Onder ve diğerleri, 2008). Tümörlerde E-kaderin ekspresyonundaki azalma zayıf prognoz ile ilişkili olduğundan E-kaderin baskılayıcıları malignite belirteci olarak kabul edilir ve anti-invazif ilaçlar için hedef teşkil eder (Nieto, 2002).

EMT sürecini gösterir bir belirteç de kaderinler arası geçiş, yani E-kaderin azalırken N-kaderin artışıdır. N-kaderin'deki artış, invazyon, göç ve düşük sağ kalım oranı ile ilişkilidir. Büyüme faktörleri ile EMT'de yüksek ekspresyonu gözlenen N-kaderin'in pankreatik hücrelerde göç ve invazyon ile ilişkisi saptanmış, küçük hücreli dışı akciğer kanseri (Non Small Cell Lung Carcinoma; NSCLC) hücrelerinde ise TGFβ ile aktive edilen Smad3/4 kompleksi yoluyla ekspresyonunun artırdığı belirlenmiştir (Loh ve diğerleri, 2019; Nakajima ve diğerleri, 2004).

Snail ailesi, omurgalılarda Snail (Snai1), Slug (Snai2) ve Snai3 olmak üzere üç üyesi belirlenmiş olan, transkripsiyonel baskılama fonksiyonuna sahip ve zinc-finger domaini ve N-terminal SNAG domaini üzerinden aktivite gösteren proteinlerden oluşur. Snail ve Slug proteinleri, üzerinde en fazla çalışılmış Snail ailesi üyeleridir. EMT sürecinde bu genler, E-kaderin, VE-kaderin, Occludin, Claudin, Sitokeratin gibi epitel belirteçlerin ekspresyonlarını baskılayıcı etki gösterirken, mezenkimal fenotip ile ilişkili fibronektin, vimentin, MMP'lar gibi mezenkimal belirteçlerin ekspresyonlarını indüklerler (Barrallo-Gimeno ve Nieto, 2005). Snail aile üyelerinin in vivo ve in vitro olarak EMT'yi indükledikleri bilinmektedir. Çeşitli epitel hücre türlerinde Snail yüksek ekspresyonunun EMT'yi indüklemek için tek başına yeterli olduğu belirlenmiştir (Cicchini ve diğerleri, 2006). TGFβ'nın tümörü destekleyici rolünde önemli rol oynayan Snail'in aktivitesi hem MAPK ve PI3K gibi Smad bağımsız yolaklar üzerinden hem de

özellikle tümör gelişiminin son evrelerinde Smad bağımlı olarak gerçekleşmektedir. TGFβ'nın, Smad yolağı üzerinden birçok önemli E-kaderin baskılayıcılarının ekspresyonlarını regüle eden HMGA2'nin ekspresyonunu indüklediği bilinmektedir. Smadlar ve HMGA2'nin birlikte Snail geninin promotörüne bağlanması yoluyla da Snail ekspresyonu indüklenir. TGFβ ile indüklenen EMT'de, Snail'in Smad3/4 ile oluşturduğu transkripsiyonel olarak baskılayıcı kompleks, E-kaderin, CAR ve occludin gibi hücrelerarası bağlantı proteinlerini kodlayan genlerdeki E-box'ları ve Smad-bağlantı elementlerini hedefleyerek baskılanmalarına yol açar (Thuault ve diğerleri, 2006; Wang, Shi, Chai, Ying ve Zhou, 2014). Snail, EMT için gerekli apiko-bazal polarite kaybına yönelik Crumbs3 ekspresyonunu baskılar ve Crumbs proteinlerinin seviyesini düşürerek hücre polaritesini azaltıcı etki gösterir (Whiteman, Liu, Fearon ve Margolis, 2008). Zeb1 protein seviyesini hem transkripsiyonel hem post-transkripsiyonel olarak artıran Snail'in, Twist stabilitesini de artırdığı bilinmektedir. Zeb2 ekspresyonunun regülasyonunda ise miR-200'ün baskılanması yoluyla Zeb2 ekspresyon düzeyini artırır (Sánchez-Tilló ve diğerleri, 2012).

Snail'e kıyasla daha zayıf olsa da, Slug ekspresyonu çoğunlukla diğer E-kaderin baskılayıcıları üzerinden etki göstererek E-kaderin'in baskılanmasında yer alır. Slug, Zeb1 aktivitesini doğrudan Zeb1 geninin promotörüne bağlanarak artırırken, Twist aktivasyonu için Slug'ın transkripsiyonel olarak indüklenmesi gerekir. Dolayısıyla Slug'ı kodlayan genin silinmesi, E-kaderin'in Twist tarafından baskılanmasını ve EMT sürecini büyük oranda durdurabilmektedir (Casas ve diğerleri, 2011). TGFβ ile artan Slug ekspresyonu, oral skuamöz hücreli karsinom (SCC)'da MMP9 ekspresyon artışı ile invazyonu artıcı etki göstermektedir (Joseph ve diğerleri, 2009).

TGF-β, Zeb ailesinin, Zeb1 (δEF1) ve Zeb2 (SIP1), iki üyesini de indüklemektedir. Zeb1, Smad-bağımlı transkripsiyonu aktive ederken Zeb2 baskılamaktadır (Postigo, Depp, Taylor ve Kroll, 2003). Zeb1 ve Zeb2 miR-200 ailesince baskılanırken, miR-200 aile üyeleri ise Zeb proteinlerince baskılanabilmektedirler. Dolayısıyla hücrelerin epitel ve mezenkimal durumlarıyla alakalı bir regülasyon döngüsü gibi etki gösterirler (Bracken ve diğerleri, 2008). Zeb1, E-kaderin ekspresyonunu baskılamasının yanında bazı polarite belirteçleri ve bazal

membran bileşenlerini azaltıcı etkisiyle de mezenkimal fenotip oluşumunu, dolayısıyla metastazı destekleyici yönde etki gösterir (Aigner ve diğerleri, 2007).

Twist, E-kaderin ve bazı kateninlerin ekspresyonlarını azaltarak ve mezenkimal belirteç artışı yönünde etki göstererek EMT'yi destekler. Metastazın ilk aşaması olan intravazasyon ile ilişkili olduğu ve metastatik hücre hatlarında yüksek ekspresyon gösterdiği belirlenmiştir (Yang ve diğerleri, 2004). SCC fare modeliyle yapılan çalışmalarda, Twist'in karsinom hücrelerinin EMT geçirmeleri ve kan dolaşımına geçmeleri için yeterli olduğu görülmüştür (Tsai, Donaher, Murphy, Chau ve Yang, 2012). TGF-β1 ile indüklenen EMT'ye yönelik çalışmalarda, ilk 24 saatlik süreçte Twist1 ekspresyonu azalırken, Snail ekspresyonunun arttığı, 24 saatin sonrasında ise Snail ekspresyonunun azalarak Twist ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Bu sonuç Snail'in EMT'nin indüklenmesini başlatmadaki önemini, Twist'in ise EMT'nin devamlılığını sağlamaya yönelik rolünü destekler niteliktedir (Tran, Corsa, Biswas, Aft ve Longmore, 2011).

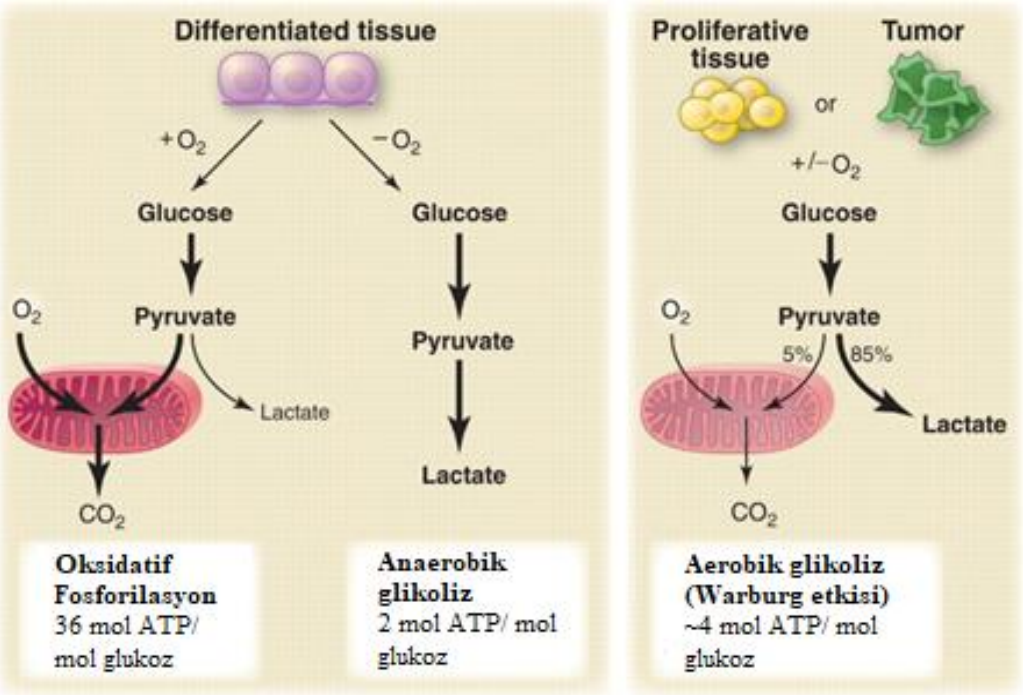
2.3.Kanser Hücrelerinde Enerji Metabolizması

2.3.1 Warburg Etkisi

Kanser hücreleri, nükleik asit, protein ve lipit gibi temel bileşenlerin teminini de kapsayan anabolik reaksiyonlardan dolayı yüksek oranda besin ve enerji gerektirir. Glikoliz, tüm canlılarda var olan ve insan vücudundaki tüm hücrelerde kullanılan temel enerji yolağıdır. Normal hücrelerde, glikoliz ile pirüvata dönüştürülen glukozun büyük bölümü mitokondriye geçer. Pirüvat, aerobik hücrelerin mitokondrilerinde Krebs döngüsü ve oksidatif fosforilasyon işlemlerinden geçerek karbondioksit ve su oluşturmak üzere tamamen yükseltgenir. Böylelikle fazla miktarda enerji elde edilmiş olur (Vazquez ve diğerleri, 2016). Bu durumun kanserli hücrelerde farklı olduğu fikri yaklaşık yüz yıl önceki Otto Warburg'un gözlemlerine dayanmaktadır. Otto Warburg, kanserli hücrelerin yüksek oranlarda glukoz alımı ve laktat salınımı yaptıklarını gözlemlemiş, normal hücrelere kıyasla yeterli oksijen varlığında bile büyük oranda aerobik glikolize yöneldiklerini belirlemiştir (Warburg ve diğerleri, 1923). Günümüzde kanser hücrelerinde görülen bu farklı fenotip 'Warburg etkisi' olarak adlandırılmakta ve kanser çalışmalarında giderek artan bir oranda yer almaktadır (Şekil – 3). Ayrıca kanser

hücrelerinin fazla miktarda glukoz tükettiğinin belirlenmesi, klinik olarak solid tümörlerin saptanmasında ^{18}F-deoksiglukoz pozitron emisyon tomografisi (^{18}FDG-PET)'nin kullanımını sağlamış ve bu yaygın kullanımla çoğu kanser türünde glikolitik fenotipin gözlendiği kanıtlanmıştır (Wu ve Zhao, 2013).

Normal hücrelerde glukozun oksidatif fosforilasyon yoluyla yıkımından ATP üretimi bakımından daha fazla enerji elde edilebiliyorken (38 ATP), kanserli hücrelerin daha az enerjili glikoliz yolağını (2 ATP) seçmesi yönünde elde edilen bulgular ışığında bazı muhtemel nedenler ileri sürülmüştür. Mitokondrideki bir bozukluktan dolayı kanser hücrelerinin aerobik glikolize bağımlı oldukları fikri Otto Warburg tarafından tümör hücrelerinin glikolizi tercih etmelerinin nedeni olarak öne sürülmüşse de daha sonra yapılan çalışmalar içerisinde bu hipotezi destekleyen kanıt sayısı oldukça azdır (Koppenol, Bounds ve Dang, 2011). Kanser hücrelerinin mitokondri aktivitesinin normal hücrelere kıyasla düşük olması, yüksek ATP üretiminin fosfofruktokinaz-1 (PFK-1) gibi bazı glikolitik enzimler üzerindeki inhibe edici rolünü ortadan kaldırarak proliferasyonu destekleyici bir etki oluşturmaktadır (Scholnicki, Lang ve Racker, 1973). Ayrıca glikolitik yolağın aynı sayıda ATP üretimi yönünden oksidatif fosforilasyona kıyasla daha hızlı olduğunun belirlenmesi, prolifere olan hücreler için ATP eldesinin hız sınırlayıcı bir faktör olmadığının anlaşılmasını sağlamıştır (Shestov ve diğerleri, 2014).



Şekil - 3: Oksidatif fosforilasyon, anaerobik glikoliz ve Warburg etkisi arasındaki temel farklılığın şematik gösterimi. Normal hücrelerde oksijen varlığında oksidatif fosforilasyonla fazla miktarda enerji üretilirken, kanser hücreleri oksijen varlığında 'Warburg etkisi' olarak adlandırılan aerobik glikolizi tercih ederler (Vander Heiden, Cantley ve Thompson (2009)'dan türkçeleştirilmiştir).

Aerobik glikoliz ile ilişkilendirilmesi dolayısıyla mitokondri üzerinde yapılan çok sayıdaki çalışma ile mitokondrinin, enerji üretimi rolünden başka reaktif oksijen türlerinin (ROS) ana kaynağı olduğu ve programlanmış hücre ölümü (apoptoz) gibi biyolojik süreçlerde önemli roller üstlendiği ortaya konulmuştur (Gwangwa, Joubert ve Visagie, 2018). Warburg etkisi ile kanser hücrelerinin mitokondri etkinliklerinin kısıtlanması, apoptotik uyaranların azaltılması yoluyla bir kanser özelliği olan apoptozdan kaçışta önemli bir etkendir (Archer ve diğerleri, 2007). Kanser hücrelerindeki artan proliferasyon ve yüksek glikolitik aktivite dolayısıyla ROS üretiminde artış meydana gelir. ROS'deki artış, proliferasyon, anjiogenez ve anormal metabolik aktivitelerle ilişkili sinyal yolaklarını destekleyerek tümörogenez açısından elverişli bir ortam sağlar. ROS'lerinin bir diğer etkisi ise Hipoksi ile İndüklenen Faktör (HIF)'ün aktif hale getirilmesi yönündedir. Aerobik glikolizle artan laktat salınımı asidik ve hipoksik bir mikroçevre oluşumunu beraberinde getirir (Gwangwa ve diğerleri, 2018).

Kanser hücrelerinde glikolizle üretilen pirüvatın büyük çoğunluğu laktat dehidrojenaz (LDH) enzimi ile laktata dönüştürülmektedir. Hücre içi asidifikasyonu ve

ölümü önlemek için glikolizle oluşturulan laktat, monokarboksilik taşıyıcılar (MCTs) aracılığıyla hücreden uzaklaştırılır. Ekstraselüler asidifikasyon ise katepsinler ve MMP'lar gibi ECM ve bazal membranı parçalama etkisi olan enzimlerin pH-bağımlı aktivasyonlarını sağlayarak invazyon ve metastazı (Kroemer ve Pouyssegur, 2008), VEGF ve IL-8 ekspresyonlarını artırıcı etkisiyle de anjiogenezi destekleyerek tümör gelişimine katkı sağlar (Zuazo-Gaztelu ve Casanovas, 2018).

Kanserli hücrelerdeki yüksek bölünme hızı, anjiogenezin tümör büyümesine ayak uyduramaması dolayısıyla tümörlerde hipoksik bir ortam oluşturur. Vasküler geçirgenlik faktörü (VPF) olarak da bilinen VEGF, hipoksiyle indüklenen en güçlü anjiogenik faktördür. Yeni damar oluşumu ile kanserli hücrelerin besin ve oksijene erişimini mümkün kılar. VEGF'den başka PDGF, FGF, EGF ve TGF-β gibi faktörler de hipoksi ile indüklenebilen ve anjiogenezi destekleyen faktörlerdir ve bu sinyal moleküllerinin çoğu tümör büyümesini ve proliferasyonunu destekleyici etki gösterir (Daruwalla ve Christophi, 2006). Kanserde hipoksik adaptasyon için, bazı glukoz taşıyıcıları ve glikolitik enzimleri kodlayan genlerin ekspresyonlarında artış gözlenmiştir. Hipoksik koşullarda, glikolitik enzim ekspresyonlarındaki artışla ters şekilde oksidatif fosforilasyonda yer alan enzimlerin ekspresyonları azalmaktadır. İnsan tümörlerinde glukoz taşıyıcıları GLUT-1 ve GLUT-3'de aşırı ifadelenme olduğu gözlenmiş, HIF-1 etkisiyle ise glikolizdeki ilk enzim hekzokinaz ekspresyonunda artış olduğu görülmüştür (Daruwalla ve Christophi, 2006). HIF-1 seviyesindeki artış, fosfatidilinozitol-3-kinaz (PI3K) ile Akt aktivasyonu yoluyla Warburg etkisinin oluşumunda yer alır. HIF-1 yoluyla pirüvat dehidrojenaz kinaz-1 (PDK-1) upregülasyonu, pirüvat dehidrojenazın (PDH) fosforlanarak inhibisyonuna, böylelikle pirüvattan asetil-KoA oluşumunun inhibe edilmesiyle TCA döngüsünün baskılanmasını sağlayarak mitokondri aktivitesini azaltıcı etkiye sahiptir. TCA enzimlerinden fumarat ve süksinat dehidrojenazın tümör baskılayıcı etki göstermeleri, kanser hücrelerinin gelişimi açısından mitokondri aktivitesinin kısıtlanmasının önemini gösteren bir diğer etkendir (Weljie ve Jirik, 2011).

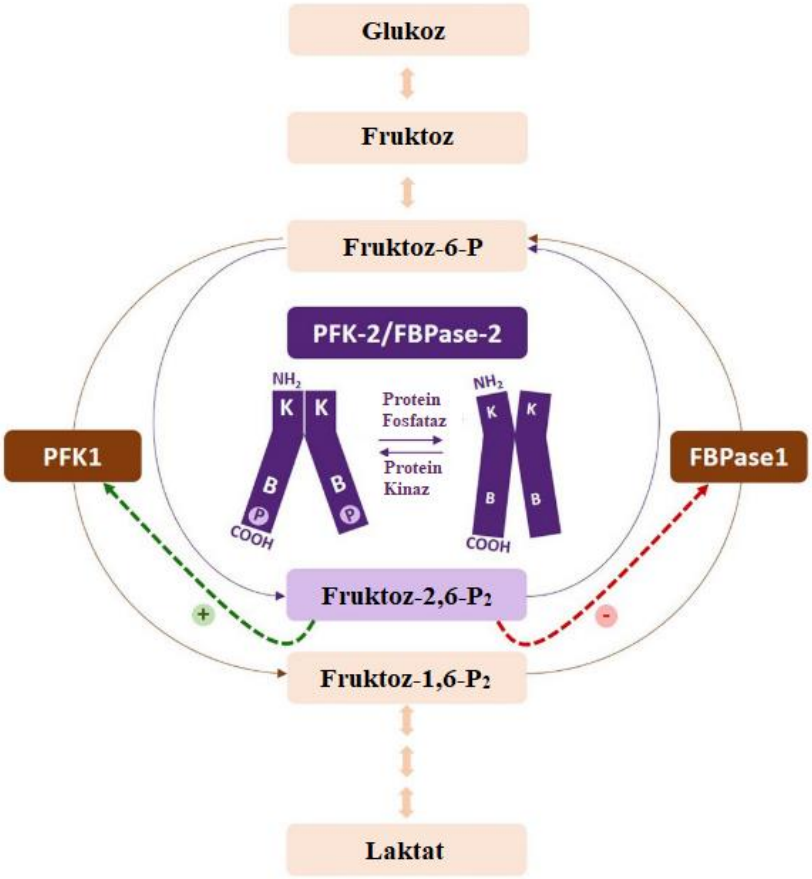
Prolifere olan hücreler için en temel ihtiyaçlardan biri de hücre bölünmesi için gerekli nükleotid, aminoasit ve lipit gibi bileşenlerin sağlanmasıdır. Glukozun tam oksidasyonla CO_2'e dönüştürülmesi maksimum oranda ATP sağlarken, bölünme için

gerekli bileşenler sağlanamayacaktır. Bu bağlamda glukozun, yağ asidi oluşumu için asetil-KoA'ya, esansiyel olmayan aminoasitlerin sentezi için glikolitik ara ürünlere ve nükleotidler için riboza dönüşümü gibi makromoleküler öncüllerin sağlanmasında etkisi büyüktür. Çoğu memeli hücre kültüründe yüksek miktarda glukoz ve glutamin kullanıldığının belirlenmesi, bunların hücre büyümesi ve bölünmenin desteklenmesinde gerekli karbon, nitrojen ve enerji gibi temel bileşenlerin sağlanmasındaki önemini göstermektedir (Vander Heiden ve diğerleri, 2009).

2.3.2. Kanserde Glikoliz Regülasyonu

Glukozun hücreye girişi, tümörlerde genel olarak regülasyonu artan, dokuya özgü glukoz taşıyıcıları aracılığıyla olur. Glukoz metabolizması, glukozun hekzokinaz enzimiyle glukoz-6-P (G6P) oluşturmak üzere fosforlanmasıyla başlar. Hekzokinazın farklı dokularca eksprese edilen beş farklı izoformu olsa da yalnızca HIF1α ve c-myc gibi kanserle ilgili transkripsiyon faktörlerinin bir hedefi olan hekzokinaz 2 (HK2) izoformunun, çeşitli tümör dokularında regülasyonunun arttığı belirlenmiştir (Luo, Li, Yuan ve Zuo, 2019).

Glikolizin ikinci ve en önemli hız sınırlayıcı basamağı, PFK-1 enzimi ile fruktoz-6-P (F6P)'dan fruktoz-1,6-bisfosfat (F1,6BP) oluşumudur. ATP, güçlü bir PFK-1 inhibitörüdür ve oksidatif fosforilasyonun glikoliz üzerindeki inhibisyon etkisinde ATP'nin PFK-1'i inhibe edici rolü büyük önem taşır. Fruktoz-2,6-bisfosfat (F2,6BP), hız sınırlayıcı enzim PFK-1'in en güçlü allosterik aktivatörüdür ve ATP'nin PFK-1 üzerindeki inhibe edici etkisini ortadan kaldırır. F2,6BP'ın hücre içi konsantrasyonu farklı dokularca eksprese edilen dört farklı gen ile kodlanan çift fonksiyonlu 6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bisfosfataz (PFKFB) enzim ailesince kontrol edilmektedir. PFKFB enzimleri PFK-1 ile aynı substrat üzerinde etki gösterir ve kinaz domaini ile F6P'yi fosforlayarak F2,6BP oluştururken, fosfataz domaini ile F2,6BP'nin F6P'ye defosforilasyonunu sağlar (Şekil – 4). PFKFB enzim ailesi, dört PFKFB izoformunu (PFKFB1, 2, 3 ve 4) kapsar. PFKFB3 izoformu; mitojenik, inflamatör ve hipoksik uyarılarla aktive edilmesi ve yüksek kinaz aktivite göstermesi itibariyle (kinaz:fosfataz oranı ~740:1) diğer izoformlarından ayrılmaktadır (Yalcin ve diğerleri, 2009).



Şekil – 4: Fruktoz-6-P/ Fruktoz-1,6-BP çift yönlü reaksiyonun enzimatik regülasyonunun gösterimi. F6P'den F1,6BP oluşumu PFK-1 enzimi aracılığıyla meydana gelir. F1,6BP'nin F6P'ye dönüşümü ise FBPaz1 enzimi ile olur. PFK-1 glikolitik hız sınırlayıcı enziminin en güçlü aktivatörü olan F2,6BP, FBPaz1 enzimini inhibe edici etki gösterir. F2,6BP oluşumu ise dört izoformu bulunan, kinaz ve fosfataz aktivitesi gösteren, 6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bisfosfataz (PFKFB; PFK-2/FBPaz2) enzim ailesince kontrol edilmektedir (Bartrons ve diğerleri (2018)'den Türkçeleştirilmiştir).

PFKFB1 izoenzimi, kanserli hücreler üzerinde belirgin bir etki veya yüksek ekspresyon gösterdiğinin belirlenmemesi dolayısıyla üzerinde en az çalışılan PFKFB izoformudur (Bartrons ve diğerleri, 2018). Yüksek düzeyde kalp tarafından eksprese edilen PFKFB2 izoformu, kalpte glikoliz regülasyonu için gereklidir. Bununla birlikte tümörlerde ve farklı dokularda diğer PFKFB izoformlarıyla birlikte eksprese edildiği belirlenmiştir (Rider ve diğerleri, 2004). Kanserli hücrelerde, yüksek F2,6BP seviyesinin genel olarak PFKFB3 ve PFKFB4 izoformlarıyla ilişkili olduğu bilinmekle beraber, bazı kanser hücre hatlarında yüksek kinaz/fosfataz aktivitesi gösteren PFKFB2'nin de kanser gelişiminde rol alabildiğine yönelik bulgular mevcuttur (Moon ve diğerleri, 2011).

PFKFB3, daha önce belirtildiği gibi yüksek kinaz/fosfataz aktivitesine sahip, çeşitli kanser türlerinde yüksek mRNA ve protein ekspresyonu belirlenmiş, kanserle ilişkisi dolayısıyla üzerinde en fazla çalışılan PFKFB izoformudur. PFKFB3 mRNA'sının 3'untranslated bölgesinde (3'UTR) çok sayıda AUUUA sekansı mevcuttur. 3'UTR'deki AU yönünden zengin bileşenlerin (AREs), mRNA stabilitesini düşürdüğü ve translasyonel aktiviteyi artırdığı, ayrıca AUUUA sekansının, protoonkogenlerde ve proinflamatuar sitokinlerde karakteristik bir özellik olduğu bilinmektedir (Chesney ve diğerleri, 1999). Birçok kanser türünde PFKFB3 proteininde meydana gelen fosforlanmanın kinaz aktivitesini artırdığı ve çeşitli kanser hücre hatlarında artan proliferasyon ile ilişkili olduğu görülmüştür (Bando ve diğerleri, 2005). PFKFB3 izoformu, hipoksi cevap elementi (HRF) içermesi dolayısıyla HIF-1α'nın transkripsiyonel hedeflerinden biridir ve HIF-1α (-/-) hücrelerde PFKFB'ün büyük oranda baskılandığı görülmüştür. PFKFB3 gen ekspresyonunun, hipoksiden başka proinflamatuar moleküller ve insülin gibi çeşitli uyaranlarla da arttığı bilinmektedir (Bartrons ve diğerleri, 2018). PFKFB3 enziminin tümörogenezdeki rolü temelde glikolizin regülasyonu üzerine olsa da sitoplazmadaki bu rolünden başka karbon uç domaini sayesinde çekirdekte lokalize olarak siklin bağımlı kinaz 1 (Cdk1) ile p27 proteininin yıkımını sağlayarak hücre döngüsünün G1-S geçişini kolaylaştırarak apoptozun engellenmesinde de rol oynadığı belirlenmiştir. Ayrıca PFKFB3'ün çekirdekteki varlığının glikolizi etkilemeksizin hücresel proliferasyonu artırıcı etki gösterdiği ortaya konulmuştur (Yalcin ve diğerleri, 2009). PFKFB3'ün, VEGF tarafından indüklenerek temel kanser özelliklerinden anjiogenezin desteklenmesinde de rol aldığı bilinmektedir (De Bock ve diğerleri, 2013). Meme kanseri ve gastrik kanser hücrelerinde yüksek ekspresyonu belirlenen PFKFB3'ün baskılanmasının proliferasyon, göç ve invazyonu baskıladığı görülmüştür (Han, Meng, Xi, Wang ve Wu, 2017; Peng ve diğerleri, 2018). Kanserdeki önemli etkileri dolayısıyla geliştirilen PFK15 ve PFK158 gibi PFKFB3 inhibitörleri klinik olarak deneme aşamasındadır (Shi, Pan, Liu Xie ve Han, 2017).

PFKFB3 gibi PFKFB4 izoenziminin de HIF-1 ile indüklendiği ve normal dokulara kıyasla çeşitli kanser türlerinde aşırı ekspresyon gösterdiği bilinmektedir (Minchenko ve diğerleri, 2005). Farklı kanser hücre hatları üzerinde yapılan deneylerle, PFKFB4 izoenziminin kinaz aktivitesinin fosfataz aktivitesine kıyasla 4,3 kat büyük

olduğu ve yüksek kinaz aktivitesinin F2,6BP seviyesini, glukoz alımını ve glikolitik ATP üretimini artırarak glikolitik fenotipe katkı sağladığı belirlenmiştir (Chesney ve diğerleri, 2014). PFKFB4'ün hücresel ihtiyaca göre kinaz ve bisfosfataz aktivitesinin değiştiği yönündeki diğer bir grup çalışmada ise kısmen yüksek bisfosfataz aktivitesinin, glikolizin baskılanması sonucu glukozun pentoz fosfat yolağına (PPP) yönlendirilmesi ile NADPH üretiminin artırılarak ROS'lerinin detoksifikasyonunda rol aldığına işaret etmektedir (Ros ve diğerleri, 2017; Strohecker ve diğerleri, 2015). Çeşitli metastatik prostat kanser hücre hatları üzerinde yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda, PFKFB4'ün F2,6BP seviyesini azaltarak glikolitik akışı inhibe ettiği ve lipid sentezi ve glutatyonun yenilenmesi için gerekli NADPH'i sağlayarak kanserli hücre sağ kalımında etki gösterdiği belirlenmiştir (Ros ve diğerleri, 2012).

2.4. Kanserde Metabolik Yeniden Programlanma ve EMT İlişkisi

Warburg etkisi, tümör gelişimi için gerekli enerji ve metabolitleri sağlamanın yanında metastatik süreci kolaylaştıran temel bir etkendir. Kanser hücrelerinin aerobik glikolize yönelmeleriyle mitokondri etkinliğinin azalması kanserli hücrelerin temel bir özelliğidir ve artan agresiflik ve metastaz potansiyeli ile ilişkilidir (Chen, 2012). Hücrelerin matriksden ayrılması ROS'lerinin büyük oranda üretilmesi ve anoikis olarak bilinen hücre ölümüyle sonuçlanır. Warburg etkisi ile mitokondri kaynaklı ROS'nin üretiminin sınırlanması, artan glikoliz ve PPP yoluyla üretilen NADPH ile hücresel oksidatif stres azaltılmaktadır. Bu durum hücrelerde anoikis direnci ve metastazın desteklenmesini sağlar (Lu, 2019). Çeşitli kanser hücreleri ile yapılan çalışmada, klinik açıdan en kötü sonuçlar, EMT ile ilişkili olarak mitokondri ilişkili gen düzeylerinde azalma olan kanser türlerinde görülmüştür (Gaude ve Frezza, 2016). Mitokondriyal metabolizmanın inhibe edildiği deneylerde meme kanseri hücrelerinde Snail, Slug ve Twist gibi EMT-TF'lerinin ekspresyonlarının ve bazı MMP'lerin arttığı ve E-kaderinin baskılandığı, akciğer hücrelerinde ise EMT'de yer alan bazı genlerde artış olduğu gözlenmiştir (Guha ve diğerleri, 2014). Aerobik glikoliz ile üretilen ATP ise metastatik süreçte hücre sağ kalımı için temel kaynak teşkil etmesi yönüyle EMT'yi destekleyici bir etkendir (Morandi ve diğerleri, 2017).

Warburg etkisi ile ekspresyonu artan HIF-1α, MMP'ler ile Snail, Slug ve Twist gibi bazı EMT ilişkili transkripsiyon faktörlerinin regülasyonunu sağlar (Jiang, Tang ve

Liang, 2011; Lin, Wang, Lee, Liang ve Lin, 2008). EMT'nin Pankreatik Duktal Adenokarsinoma (Pancreatic Ductal Adenocarcinoma; PDAC) ve akciğer gibi epitel kanserlerde hipoksi ile indüklendiği bilinmektedir (Liu ve diğerleri, 2014; Shaikh ve diğerleri, 2012). Glukoz taşıyıcıları, Glukoz Taşıyıcısı 1 (GLUT1) ve GLUT3 de HIF-1 ile transkripsyonel olarak indüklenmektedir (Zhao ve Zhang, 2016). GLUT1 yüksek ekspresyonunun MMP2 aktivitesini ve kanser invazifliğini artırdığı, GLUT3 ekspresyonunun ise NSCLC hücrelerinde EMT belirteçleri ve glukoz alımı ile ilişkili olduğu görülmüştür (Ito, 2002; Masin ve diğerleri, 2014).

Aerobik glikolize yönelen kanser hücrelerinde görülen bir diğer özellik olan yüksek laktat seviyesi, çeşitli kanser hücrelerinde metastazı destekleyici etki göstermektedir (Walenta ve Mueller-Klieser, 2004). Yüksek laktat ile ilişkili olarak tümör dokusunun çevresi düşük pH özelliği sergiler ve bu asidik çevrenin invazyon ve metastazla ilişkisi bilinmektedir (Gatenby, Gawlinski, Gmitro, Kaylor ve Gillies, 2006). Warburg etkisiyle oluşturulan bu asidik çevre, çevreleyen hücreleri (fibroblastlar ve makrofajlar) indükleyerek ECM yıkımı için katepsin ve MMP'lar gibi proteolitik enzimlerin salınımını destekler (Kato ve diğerleri, 2007; Rozhin, Sameni, Ziegler ve Sloane, 1994). En önemli EMT indükleyicisi olan TGFβ'nın, yapılan in vivo uygulamada laktat tarafından indüklenebildiği görülmüştür (Ahmed ve Tsuchiya, 2004). Laktat döngüsü bileşenleri olan monokarboksilik taşıyıcıların (MCT1 ve MCT4) inhibisyonunun ise çeşitli kanser hücrelerinde göç ve invazyonu azalttığı belirlenmiştir (De Saedeleer ve diğerleri, 2014; Gallagher, Castorino, Wang ve Philp, 2007; Izumi ve diğerleri, 2011; Zhao ve diğerleri, 2014).

EMT sürecindeki kanser hücreleri, enerji üretimi ve biyosentez öncülleri gibi temel hücresel ihtiyaçlarını karşılamak için metabolik olarak değişime uğrarlar. Bu durum, EMT ile artış gösteren glikolitik kapasiteyi makul kılar. Tümör büyümesi ve metastazı destekleyici bir etken olarak glikolitik fenotip, kanser tedavisi için potansiyel bir terapötik hedef teşkil etmektedir. Warburg etkisinin tersinir oluşu, bu etkinin sağlanmasını ve sürdürülmesini sağlayan önemli noktalarda yapılabilecek değişiklikler yoluyla oksidatif metabolizmanın aktivasyonunu sağlayabilecek, böylelikle kanser hücrelerinin metastatik potansiyeli azaltılabilecektir (Lu ve diğerleri, 2015). Son yıllara ait çalışmalar EMT-TF'lerinin glikolitik enzimleri hedefleyerek glukoz

metabolizmasının regülasyonunu değiştirebildiğini göstermektedir. Örneğin, bazal tipli meme kanserinde ve gastrik kanser hücrelerinde glikolizi inhibe eden ve OXPHOS'u artıran FBPaz1'in Snail ekspresyonu ile baskılandığına dair sonuçlar, glukoz metabolizmasını hızlandırıcı bir etken olarak Snail'in, EMT'nin ve artan glikolizin önlenmesinde önemli bir hedef teşkil edebileceğini düşündürmektedir (Dong ve diğerleri, 2013; Yu ve diğerleri, 2017). Kolon kanseri hücrelerinde, Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) enziminin Zeb1 ile fiziksel olarak etkileşerek Snail ekspresyonunu artırdığı ve böylelikle EMT ve hücre göçünü desteklediği bildirilmiştir (Liu ve diğerleri, 2017). Bir diğer EMT-TF'ü Twist'in aşırı ekspresyonunun, meme kanseri hücrelerinde LDHA, pirüvat kinaz M2 (PKM2), HK2 ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) enzimlerinin up-regülasyonlarına yol açarak kanserde glukoz metabolizmasının yeniden programlanmasına katkı sağladığı görülmüştür (Yang ve diğerleri, 2015).

Kanserde artan GLUT1 ekspresyonu, E-kaderin ve vimentin gibi EMT belirteçleri ile ilişkilidir. Meme kanseri ve PDAC hücrelerinde TGFβ ile indüklenen EMT'de GLUT1 ekspresyonu artış göstermiştir (Lee ve Song, 2013; Liu ve diğerleri, 2016). Zeb1'ın transkripsiyonel bir hedefi olarak bilinen GLUT3 ekspresyonunun ise TGFβ ile indüklenen EMT'de arttığı ve epitel hücrelere kıyasla mezenkimal NSCLC hücrelerinde daha fazla eksprese edildiği görülmüştür (Masin ve diğerleri, 2014). GBM hücrelerinde TGFβ1'in, HK2 gen ekspresyon regülasyonunu artırdığı, glukoz alımı, glikolitik aktivite ve laktat üretimini tetiklediği saptanmıştır (Rodríguez-García ve diğerleri, 2017). SCC'da, EMT sürecinde görülen invadopodia ve lamellipodia oluşum sürecinde yüksek PFKFB3 ekspresyonu belirlenmiştir. Dolayısıyla PFKFB3'ün hücresel çıkıntı (protrüzyon) oluşumunu stimüle ederek ve göç için ATP desteği sağlayarak kanserli hücre hareketini desteklediği söylenebilir (Li ve diğerleri, 2017). TGFβ1 uygulanan Panc-1 hücrelerinde artan aldolaz A (ALDOA) ekspresyonunun metastatik potansiyel artışı ile ilişkili olduğu, ALDOA'nın baskılanmasıyla proliferasyon ve göç azalırken, E-kaderin seviyesinin arttığı ve N-kaderin ve vimentin mezenkimal belirteçlerinde azalma olduğu belirlenmiştir (Ji ve diğerleri, 2016).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Tez çalışması için kullanılan kimyasal malzemeler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: Çalışmalarda kullanılan kimyasallar.

Kimyasal Adı	Üretici Firma	Katolog Numarası
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) Besiyeri	Sigma	D-5030
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Besiyeri	Gibco	12633
Fötal Sığır Serumu (FBS)	Gibco	10500064
Penisilin-Streptomisin/Amfoterisin B	PAN-Biotech	P06-07300
Tripsin-EDTA (% 0,05)	Gibco	25300054
Tripan Mavisi	Sigma	T8154
TGFβ	PeproTech	AF-100-21C
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen	137780
GeneJET RNA Purification Kit	Thermo	K0731
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Invitrogen	4368814
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo	23225
Opti-MEM	Gibco	31985062
Agaroz	Invitrogen	16520050
Luria Agar	Sigma	L2025
Miller's LB Broth	Sigma	L3022
Tris	Invitrogen	15504020
Sodyum Klorür	Sigma	433209
Tween-20	Sigma	P9416
Hidroklorik Asit (%37)	Sigma	435570
Paraformaldehit	Pierce	28906
Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi	Thermo	70011044
Sodyum bikarbonat	Fischer	S200
Sodyum Dodesil Sülfat	Sigma	436143
SDS Yürütme Tamponu	BioRad	1610772
Transfer Tampon Çözeltisi	Thermo	35045
Sığır Serum Albumini	Sigma	A2058
Keçi serumu	Cell Signaling Technologies	5425
RIPA	Thermo	89900

2X Laemmli örnek tamponu	Sigma	S3401-10VL
% 12'lik SDS-PAGE Hazır Jel	BioRad	4561043
ECL™ Prime Western Blotting Sistemi Görüntüleme Solüsyonu	Sigma	RPN2232
Immobilon Forte Western HRP Substrate Görüntüleme Solüsyonu	Merck	WBLUF0500
Proteaz ve Fosfataz İnhibitör Kokteyli	Cell Signaling	5872
Sodyum Dodesil Sülfat	Sigma	436143
Yağsız Süt Tozu	Sigma	M7409
Kristal Violet	Sigma	C3886
HEPES	Merck	391340
Triton-X	Merck	108643
Etanol	Merck	100983
Nikotinamid dinükleotid (NAD)	Sigma	N9410
Fosfofruktokinaz-1	Sigma	F6803
Aldolaz	Sigma	A2714
Triozfosfat izomeraz	Sigma	T6258
Gliserol-3-fosfat dehidrojenaz	Sigma	10127779001
Pirofosfat	Sigma	221368
Fruktoz-2,6-bisfosfat	Sigma	47822
Fruktoz-6-fosfat	Sigma	F3627
Glukoz analiz kiti II	Eton Boscience	1200071002
L-Lactate analiz kiti II	Eton Boscience	1200051002
Boyden invazyon haznesi	Corning	354578
Matrijel	Corning	354234

3.1.2. Cihazlar

Tez sürecinde kullanılan cihazlar Tablo 2 ile gösterilmektedir.

Tablo 2: Çalışmalarda kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Cihaz Modeli	Cihaz Adı
Steril Kabin	BioII Advance, Telstar	Steril Kabin
İnkübatör	Incusafe, Panasonic	İnkübatör
İnvert mikroskop	3032, AccuScope	İnvert mikroskop
Santrifüj	NF1200R, Nüve	Santrifüj
Santrifüj	3K30, Sigma	Santrifüj
Blok ısıtıcı	TS-100, Biosan	Blok ısıtıcı
PCR Cihazı	MyGenie96, Bioneer	PCR Cihazı

Realtime	OneStepPlus, Applied Biosystems	Realtime
Görüntüleme cihazı	ChemiDoc MP, Biorad	Görüntüleme cihazı
Güç kaynağı	300 Volt, VWR	Güç kaynağı
Spektrofotometre	Epoch, Biotek	Spektrofotometre
Manyetik Karıştırıcı	MSH-300, Biosan	Manyetik Karıştırıcı
Otoklav	OT40L, Nüve	Otoklav
Hassas Terazi	CPA225D, Sartorius	Hassas Terazi
Saf su cihazı	Simplicity, Millipore	Saf su cihazı

3.1.3. Çözeltiler

Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS): 10X PBS çözeltisi (pH = 7,4), distile su ile 1X'e seyreltilip otoklavlanarak sterilize edildi. Çoğunlukla hücrelerin yıkanması için kullanıldı.

Protein Lizis Tampon Çözeltisi: Hücrelerin parçalanıp proteinlerin eldesi için 25 mM TrisHCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, % 1 NP-40, % 1 sodyum deoksikolat, % 0,1 SDS içeren RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay) tamponu kullanıldı. Proteinleri parçalanmasını ve defosforilasyonunu önlemek için RIPA çözeltisine proteaz ve fosfataz inhibitörleri karışımı (Cell Signaling Technologies; Kat. No. 5872) ilave edildi.

SDS Yürütme Tamponu: 10X SDS yürütme tamponu ultra saf su ile 10 kat seyreltilerek kullanıldı.

Transfer Tamponu: Transfer tamponu olarak, Thermo western blotlama transfer tamponu (10X çözelti), ultra saf su ile 1X oranında seyreltilerek kullanıldı.

Tris Tamponlu Tuz – Tween-20 Çözeltisi (TBST): 10X TBST çözeltisi 200 mM Tris (pH 7,5), 1,5 M NaCl ve % 1 Tween-20 içermekte olup antikor dilüsyonlarının hazırlanması ve membranların yıkanmasında kullanıldı. Ultra saf su ile 10 kat seyreltilerek kullanıma hazır hale getirildi.

Membran Bloklama Çözeltisi: Antikorun membranla yapacağı nonspesifik bağlanmaları önlemek amaçlı % 5 yağsız süt tozu içeren TBST çözeltisi kullanıldı.

Birincil antikor dilüsyon çözeltisi: Birincil antikorların dilüsyonu için, çoğunlukla antikor için üretici önerisi dikkate alınmak üzere % 5 sığır serum albümini (BSA) veya

% 5 yağsız süt tozu TBST çözeltisinde hazırlandı. Koruyucu olarak sodyum azid (NaN_3) eklendi.

İkincil antikor dilüsyon çözeltisi: İkincil antikorlar, % 2,5 yağsız süt tozu içeren TBST çözeltisinde hazırlandı.

İmmünfloresan bloklama çözeltisi: İmmünfloresan deneylerinde bloklama için PBS içerisinde % 5 keçi serumu ve % 0,3 Triton-X içeren çözelti kullanıldı.

İmmünfloresan antikor dilüsyon çözeltisi: İmmünfloresan deneylerinde kullanılan antikorların hazırlanması için % 1 sığır serum albümini PBS içerisinde çözdürüldü ve % 0,3 Triton-X eklendi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. Yedeklenen Hücrelerin Çözdürülmesi

Dondurucudan (-80°C) alınan hücre yedeklerinin 37°C'deki su banyosunda hızlı biçimde çözülmesi sağlandı. Çözdürülen yedek 9 ml besiyeri içeren 15 ml'lik falcon tüpe alınarak 500 xg'de 5 dakika santrifüj edilerek pellet oluşumu sağlandı. Üstteki sıvı kısım uzaklaştırılıp, taze besiyeri eklenip pipetajlanan hücrelerin T75 veya T25'lik flaska ekimi sağlanarak, 37°C'ye ayarlı % 5 CO_2 içeren nemli inkübatörde çoğalması sağlandı. Panc-1 hücreleri için % 10 FBS ve % 1 Penisilin-Streptomisin içeren DMEM besiyeri; A549 hücre hattı için ise % 10 FBS ve % 1 Penisilin-Streptomisin içeren RPMI besiyeri kullanıldı. İki günde bir besiyerlerinin değişimi sağlandı.

3.2.1.2. Kültürlenen Hücrelerin Pasajlanması

Besiyeri tamamen uzaklaştırıldıktan sonra, flasklar PBS ile iki kez yıkandı. Flask yüzeyini kaplayacak şekilde % 0,05'lik Tripsin-Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) eklenerek enzim aktivasyonu için uygun sıcaklığı sağlamak üzere inkübatörde maksimum 5 dk süre ile hücrelerin yüzeyden ve birbirlerinden ayrılmaları sağlandı. Ardından % 10 FBS içeren besiyeri eklenip, pipetajlandı. Hücre sayımının ardından deney planlamasına göre ekim yapıldı.

3.2.1.3. Hücre Sayımı

Tripsin ile kaldırılan, besiyeri eklenip pipetajlanan hücrelerden 100 µl alınarak eşit hacimde tripan mavisi ile karıştırıldı. Hücrelerin boyayı almasını sağlamak amaçlı yaklaşık 1 dakika beklendi ve hücre canlılığını yitirmenin bir göstergesi olarak membranları zarar görmüş hücrelerin mavi renge boyanması sağlandı. Thoma lamı kullanılarak, 10'ar µl olarak eklenen hücreler, mikroskop yardımıyla sayıldı ve uygulanan dilüsyon hesaba katılarak hücre sayısı belirlendi.

3.2.1.4. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Flask yüzeyini yaklaşık % 80 oranında kaplayan hücrelerin daha önce belirtildiği şekilde tripsin ile kaldırılması sağlandı. Santrifüj edilen hücre pelleti % 5 DMSO ve % 10 FBS içeren 1 ml besiyeri ile süspanse edilip cryo tüpe aktarılarak izopropanol içeren hücre dondurma kabı ile dondurucuya (-80°C) kaldırıldı. Uzun süreli saklama için hücreler -140 °C'de bekletildi.

3.2.2. siRNA Transfeksiyonu

siRNA'ya dayalı gen ifadelenmesinin baskılanması amaçlı Lipofectamin RNAiMAX kullanıldı. Üretici tarafından önerilen protokole göre uygulanan transfeksiyonda; Lipofectamin ve siRNA ayrı tüplerde OptiMEM içinde seyreltildi ve bunların ayrı bir tüpte bire bir karıştırılması ve 5 dakika bekletilmesiyle 30 nM siRNA içeren transfeksiyon karışımı hazır hale getirildi. Bir gün önce ekimi yapılan yaklaşık % 50 yoğunluktaki hücrelere, besiyeri değişiminin ardından damla damla uygulandı. Deneylerde kullanılan siRNA molekülleri Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3: Kullanılan siRNA'lar ve katalog numaraları.

siRNA Adı	Katalog Numarası
Kontrol siRNA-1	4390843
Kontrol siRNA-2	4390846
PFKFB2	4390824 – s10356
PFKFB3	4390824 – s10359
PFKFB4	4390824 – s10361

3.2.3. TGFβ Uygulaması

Liyofilize haldeki rekombinant TGFβ1, 2 mg/ml BSA konsantrasyonu içeren PBS çözeltisi ile seyreltildi. Final TGFβ1 konsantrasyonu olarak Panc-1 hücrelerine 10 ng/mL, A549 hücrelerine 5 ng/mL olacak şekilde eklendi.

3.2.4. mRNA Ekspresyon Analizi

3.2.4.1. RNA İzolasyonu

Deney sonrası RNA izolasyonu için hazır haldeki hücreler PBS ile yıkanıp, tripsin ile kaldırıldı. Besiyeri ile pipetajlanıp 15 ml'lik tüplere aktarılan besiyeri içindeki hücrelerin santrifüj ile pellet halinde çökmesi sağlandı. Besiyerinin uzaklaştırılması ve 1 ml PBS eklenerek 1,5 ml'lik ependorfa aktarım işleminden sonra tekrar santrifüj edilen ve pellet olarak çöktürülen hücrelerle "GeneJET RNA Purification Kit" RNA izolasyon kiti kullanılarak RNA izolasyonu işlemine geçildi. Kit'de önerilen protokol doğrultusunda aşağıda belirtildiği şekliyle işlemlere devam edildi.

Liziz tampon çözeltisine 1000 µl'ye 20 µl olacak şekilde β-merkaptoetanol eklenip karışması sağlandı. Her bir örnek için hazırlanan liziz tamponundan 600 µl eklendi ve pelletin çözünmesi sağlandı. Üzerine eklenen 360 ml % 96'lık etanol ile RNA'nın çökmesi sağlandı. Kit içerisindeki filtreli kolonlar, toplayıcı tüplere geçirildikten sonra etanol-liziz karışımı bu kolonlara aktarıldı ve 12000 xg'de 1 dakika santrifüj ile RNA'nın lizat tamponundan ve diğer hücre bileşenlerin ayrılması sağlandı. Birinci yıkama tamponundan kolona 700 µl eklendi ve 12000 xg'de santrifüj edildi. İkinci yıkama tamponundan sırayla 600 µl eklenerek 12000 xg'de 1 dakika ve 250 µl eklenerek 12000 xg'de 2 dakika santrifüj edildi. Tüm bu santrifüj aşamalarında toplama tüpleri değiştirildi. Kolonlardaki RNA'nın çözdürülmesi için son olarak göre 50–100 µl RNAz ari ultra saf su eklendi. Toplayıcı tüp 1,5 ml'lik steril RNAz ari ependorfla değiştirildi ve 12000 xg'de 1 dakika santrifüj'den sonra RNA içeren örnekler buza alındı ve RNA ölçümüne geçildi. RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı 260 nm dalga boyunda UV-Vis spektrofotometre cihazı ile ölçülerek belirlendi.

3.2.4.2. cDNA Sentezi

Hücrelerden izole edilen RNA örneklerinden ters transkripsiyon (Reverse Transcription; RT) yöntemiyle cDNA sentezi için "High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" kullanıldı. Her bir örnek için toplamda 20 µl olacak şekilde 1 µg RNA, oligo dT primer, dNTP, reverse transkriptaz ve RNaz inhibitörü içeren karışım PCR cihazında sırayla 25 ^{o}C'de 10 dakika, 37 ^{o}C'de 120 dakika, 85 ^{o}C'de 5 dakika boyunca inkübe edildi.

3.2.4.3. Real-Time Kantitatif PCR (qPCR)

Real-time qPCR yöntemi, kontrol ve TGFβ1 uygulanan örnekler arasındaki PFKFB izoenzimlerine göre bazı EMT belirteçlerindeki ekspresyon değişimlerinin belirlenmesi ve transfeksiyon yönteminin doğrulanması gibi amaçlar doğrultusunda kullanıldı. Kantitasyon için endojen referans genleri olarak β-Aktin veya GAPDH kullanıldı. Amplifikasyon için "TaqMan® Gene Expression Master Mix (Kat. No. 1707289)" expressyon kiti kullanıldı. qPCR reaksiyonu için 96 kuyulu plaka kullanıldı ve dublike olarak analizi yapılan her bir örnek için, 5 ng su ile seyreltilen cDNA, 200 nM gen-spesifik primer, 250 nM gen-spesifik TaqMan prob, dNTP ve Taq polimeraz enzimi içeren 10 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlandı. Real-time qPCR analizi için StepOnePlus (Applied Biosystems) cihazı kullanıldı. Süre ve ısı ayarları, firmanın önerdiği protokol doğrultusunda 50 °C/2 dk (Aşama 1), 95 °C/20 sn (Aşama 2; ilk denatürasyon), 95 °C/1 sn (Aşama 3; denatürasyon) ve 60 °C/20 sn (Aşama 4; yapışma, uzama ve deteksiyon) olarak, üçüncü ve dördüncü aşama 40 kez tekrar edecek şekilde ayarlandı. İlgili genler arası mRNA ekspresyon düzeyindeki değişimler, döngü eşiği (Ct) değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduna göre hesaplandı (Rao ve diğerleri, 2013). Applied Biosystems firmasından temin edilen problar Tablo 4'de yer almaktadır.

Tablo 4: Gerçek Zamanlı qPCR analizinde kullanılan problar.

Prob Adı	Katalog No.
PFKFB1	Hs00997227_m1
PFKFB2	Hs01015408_m1
PFKFB3	Hs00998700_m1
PFKFB4	Hs00894606_m1
ACTB	Hs01060665_g1

GAPDH	Hs03929097_g1
Vimentin (VIM)	Hs00958111_m1
Fibronectin(FN1)	Hs01549976_m1
Twist	Hs01675818_s1
Snail (SNAI1)	Hs00195591_m1
Slug (SNAI2)	Hs00161904_m1
Zeb1	Hs0023738_m1

3.2.5. Protein İzolasyonu ve Western Blotlama

3.2.5.1. Total Protein Eldesi

Daha önce anlatıldığı gibi tripsin ile kaldırılan ve santrifüj ile elde edilen hücre pelletinin büyüklüğüne göre protein lizis tampon çözeltisi eklendi. Pelletin pipetajlanarak homojen dağılımının sağlandığı karışım, 15-20 dk süreyle buzda bekletildi. Yüksek hızda (15000 xg) 10 dk santrifüj edilerek çözünür proteinlerin lizis tamponunda kalması, diğer hücre bileşenlerinin ise pellet halinde çökmesi sağlandı. Sıvı kısım, önceden buzda tutulan 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı ve protein ölçümüne geçildi.

3.2.5.2. Protein Konsantrasyon Ölçümü

Örneklerin protein konsantrasyonlarının ölçümü için "Pierce™ BCA Protein Assay Kit" kullanıldı. Her bir örnek için 96 kuyucuklu plakada 200 µl BCA çözeltisi üzerine standart için 25 µl lizis tamponu, örnekler için 20 µl lizis tamponu ve 5 µl protein çözeltisi eklenerek ikişerli olarak hazırlanan protein - BCA karışımı, 37 ºC'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası mikroplaka ölçüm cihazında 562 nm dalga boyu kullanılarak yapılan ölçüm ile elde edilen absorbans değerleri, konsantrasyonu bilinen standartlarla oluşturulan konsantrasyon-absorbans grafiğine göre konsantrasyona çevrildi. En düşük konsantrasyonlu örnek temel alınarak, örnekler arası protein konsantrasyonlarının, protein lizis tamponu ile seyreltilerek eşitlenmesi sağlandı. Konsantrasyonu eşitlenen örneklere hacimce eşit miktarda yükleme tamponu (2X Laemmli örnek tamponu) eklendi. Yükleme tamponu, örneğin jeldeki örnek yükleme kuyularına oturmasını sağlamak amaçlı gliserol, protein örneklerinin jel içerisinde göçlerinin gözlenebilmesi için bromofenol mavisi, proteinlerin üç boyutlu yapılarının bozulması ve eksi (-) yük ile yüklenmelerini sağlamak için ise

sodyumdodesil sülfat (SDS) içermektedir. Yükleme tamponu eklenen protein örnekleri, 95 ºC'de 5 dk ısı bloğunda bekletildi ve elektroforez için hazır hale getirildi.

3.2.5.3. SDS-PAGE ve Western Blotlama

Hazırlık aşamasının ardından protein örneklerini, ağırlıklarına göre ayırmak üzere SDS-PAGE (Sodyumdodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) yönteminden yararlanıldı. Bu yöntem, negatif yüklü proteinlerin elektrik alanda pozitif elektroda hareketlerinin, kütleye bağlı olarak farklı hızlarda meydana gelmesi temel prensibine dayanmaktadır. Dolayısıyla jel içindeki porlardan düşük moleküler ağırlıktaki küçük moleküller daha hızlı geçerken, büyük moleküller daha yavaş bir ilerleme gösterecektir. Görüntülenmesi amaçlanan proteinlere uygun olarak jel elektroferezi için, % 4–12'lik hazır jel kullanıldı. Protein standardı, örnekler ve biotin yüklemesi yapılan jel, SDS yürütme tamponu içerisinde, 100V akım uygulanarak 1–1,5 saat elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforez işleminin bitiminde 45 sn. metanol ile ıslanması sağlanan polivinilidin florür (PVDF) membran, eksi (-) kutuptan artı (+) kutuba doğru sırayla sünger, filtre kağıdı, jel, PVDF membran, filtre kağıdı, sünger şeklinde dizilime tabi tutuldu. Jel ve membran arası hava kabarcığı oluşumunu önlemek amaçlı sünger ve filtre kağıtlarıyla jel ve membranın sıkıştırılması sağlandı. İki saat süreyle 250 mA akım uygulanarak eksi yüklü proteinlerin artı yöndeki membrana geçişleri sağlanmış oldu.

3.2.5.4. Bloklama, Antikor İnkübasyonu ve Görüntüleme

Blotlama sonrası hedef proteinin belirlenmesi uygun antikorlar sayesinde ve üç aşamalı olarak gerçekleştirildi:

- Membran yüzeyindeki proteinlere bağlanarak antikorun spesifik olmayan tutunmasını önleme amaçlı bloklama işlemi: Bu işlem 1X TBST içerisinde hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu çözeltisi ile oda sıcaklığında 1 saat süreli düşük ayarda dairesel sallanma ile gerçekleştirildi.
- Hedef proteine uygun birincil ve ikincil antikor uygulanması: Süt tozu ile bloklanan membran, birincil antikorun membran yüzeyindeki proteinlere tutunması amacıyla, antikor için önerilen konsantrasyon ve çözelti (süt tozu veya BSA çözeltisi) kullanılarak 4 ºC'de yaklaşık bir gün süreyle düşük ayarda çalkalandı. Ertesi gün 4 kez 10'ar dakika TBST ile yıkanan membran 1 saat süre

ile birincil antikor için uygun ikincil antikor (birincil antikor tavşanda üretilmiş ise anti-Rabbit; birincil antikor farede üretilmiş ise anti-Mouse) ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 3 kez 10'ar dakika TBST ile yıkanan membran ile görüntüleme işlemine geçildi.

- Görüntüleme işlemi için "ECL™ Prime Western Blotting System" veya "Immobilon Forte Western HRP substrate" görüntüleme solüsyonları membran yüzeyini kaplayacak şekilde eklendi ve 3-5 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra, oluşan kemiluminesans sinyal, görüntüleme cihazı (BioRad; ChemiDoc MP) ile kaydedildi. Bant analizleri Image J programı ile gerçekleştirildi.

Tablo 5: Western Blotlama yönteminde kullanılan antikorlara ilişkin bilgiler.

Antikor Adı	Firma	Katalog Numarası
PFKFB2	Cell Signaling	13020S
PFKFB3	Proteintech	13763-1-AP
PFKFB4	Abcam	Ab128348
E-kaderin	Cell Signaling	14472S
Snail	Cell Signaling	3879S
Slug	Cell Signaling	9585P
Anti – Rabbit IgG	Cell Signaling	7074S
Anti – Mouse IgG	Cell Signaling	7076
Anti – Biotin HRP	Cell Signaling	7075P5
Anti – α – Tubulin	Cell Signaling	3873
Anti – β – Aktin	Cell Signaling	3700

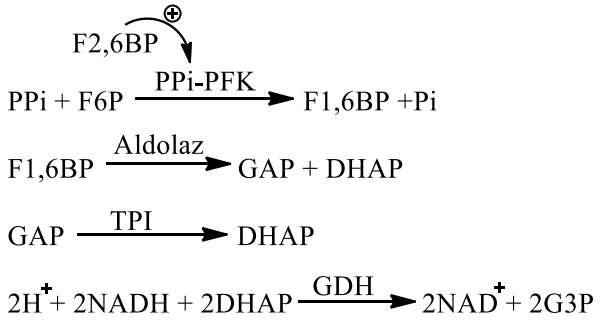
3.2.6. Hücre Proliferasyon Analizi

Hücrelerin proliferasyon hızında meydana gelen değişimler 1:1 tripan mavisi kullanılarak hemasitometri yöntemi yöntemi ile Thoma lamında invert mikroskop yardımı ile belirlendi.

3.2.7. Fruktoz-2,6-Bisfosfat (F2,6BP) Analizi

F2,6BP analizinde Schaftingen ve diğerleri (1982) tarafından ortaya konan yöntemden yararlanıldı (Schaftingen ve diğerleri, 1982). Deney sonrası tripsin ile kaldırılan ve santrifüjle elde edilen hücre pelletinin PBS ile yıkanması sağlandı. Pellet büyüklüğüne göre 50-100 µl arasında 1:1 oranında 50 mM Tris-asetat ve 100 mM

NaOH çözeltisi eklendi ve 80 °C'de 5 dk 800 rpm'de karışması ve hücrelerin parçalanması sağlandı. 1 M asetik asit ve 0,1 M HEPES kullanılarak pH'ın 7-7,5 olarak ayarlanmasından sonra maksimum hızda 5 dk santrifüj edilen örneklerden sıvı kısım temiz bir tüpe aktarılarak analiz için hazır hale getirildi. F2,6BP konsantrasyonu, birim zamanda NADH absorbansındaki değişimin, spektrofotometrik yöntemle 339 nm dalga boyunda kinetik olarak ölçülmesi yoluyla belirlendi. Birim zaman-absorbans grafiği ile elde edilen eğriye ait eğim katsayısı, konsantrasyonu bilinen standart grafiğinde karşılık geldiği konsantrasyon değerinin belirlenmesi ve toplam protein konsantrasyonuna oranlanmasıyla konsantrasyonun pmol/mg protein cinsinden hesaplanması sağlanmış oldu. 96 kuyulu UV plaka ile dublike olarak hazırlanan karışım, su ile seyreltilmiş F2,6BP örneği içeren çözelti (35 µl), enzim karışımı (10 µl), substrat karışımı (50 µl) ve PP_i (5 µl) olmak üzere toplamda 100 µl olarak hazırlandı. PP_i'ın eklenmesiyle reaksiyon başladığından hemen ölçüme geçildi. Enzim karışımı, aldolaz (45 U/ml), GDH (85 U/ml), TPI (500 U/ml), PFK (1 U/ml), % 2 BSA çözeltisi ve su içerirken; substrat karışımı, tris asetat (1 M), Mg Asetat (100 mM), F6P (100 mM), β-NADH (1 mg/ml) ve sudan oluşmaktadır. F2,6BP analizinin mantığı şekil – 5'de sıralı reaksiyonlar şeklinde verilmiştir. Buna göre; F2,6BP'ın PFK enzimini indüklemesiyle başlayan reaksiyon silsilesi NADH'in oksitlenmesi ile son bulmakta ve NADH konsantrasyonundaki azalmanın 339 nm dalga boyunda kinetik ölçümü ile F2,6BP konsantrasyonunun dolaylı olarak tayini mümkün olmaktadır.



Şekil – 5: F2,6BP analiz reaksiyonları.

3.2.8. Glukoz Analizi

Hücrelerce tüketilen glukozun belirlenmesi için "Glucose Assay Kit II" kolorimetrik glukoz analiz kiti kullanıldı. Glukoz analiz kitinde bulunan glukoz oksidaz enzimi ile glukoz, D-Glukonik asit'e yükseltgenirken; O_2, H_2O_2'ye indirgenir. Oluşan

H_2O_2'in prob (1:1 oranında) ile oluşturduğu kompleksin 570 nm dalga boyundaki ölçümü, örneklerdeki glukoz absorbansını elde etmemizi sağlar. Kitin önerdiği protokol doğrultusunda yapılan ölçümlerle elde edilen glukoz absorbanslarının, glukoz standartları kullanılarak oluşturulan eğride karşılık geldiği değerlerin hesaplanması ve kullanılan besiyerindeki glukoz konsantrasyon değerinden çıkarılması yoluyla hücrelerce kullanılan glukoz konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.9. Laktat Analizleri

Hücrelerden salınan laktat seviyesinin belirlenmesi için "L-Lactate Assay Kit II" adlı kolorimetrik laktat analiz kiti kullanıldı. Besiyeri örneklerindeki laktat, kitte bulunan laktat oksidaz enzimi ile pirüvata yükseltgenirken; O_2, H_2O_2'e indirgenir. Oluşan H_2O_2'nin prob (1:1 oranında) ile oluşturduğu kompleksin 570 nm dalga boyundaki ölçümü, örneklerdeki laktat absorbansını elde etmemizi sağlar. Kitin önerdiği protokol doğrultusunda yapılan ölçümlerle elde edilen laktat absorbanslarının, laktat standartları kullanılarak oluşturulan eğride karşılık geldiği değerlerin hesaplanması ile besiyerindeki laktat konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.10 Transwell İnvazyon Analizi

TGFβ uygulamasıyla ve PFKFB ekspresyonlarındaki değişimle hücrelerin invazyon yeteneğinde meydana gelebilecek değişimler 24 kuyulu Boyden invazyon haznelerinin (Corning; Kat. No. 354578) kullanımıyla incelendi. Bazal laminayı in vitro taklit eden Matrijel (Corning; Kat. No. 354234), analiz öncesi 1 µg/ml konsantrasyona seyreltilip Boyden haznelerinin iç kısmına eklenerek 37 °C'deki iki saat süre ile inkübe edildi. Planlanan deneysel işlemlere tabi tutulan, tripsin ile kaldırılıp % 1 FBS içeren besiyerinde seyreltilen hücreler, her bir kuyu için 500 µl besiyeri içinde 30000 hücre olacak şekilde fazla matrijelin uzaklaştırıldığı haznelere ekildi. Haznelerin yerleştirildiği kuyulara ise 750 µl % 10 FBS içeren besiyeri eklendi ve bir gün süreyle 37 °C'de % 5 CO_2 içeren inkübatörde bekletildi. Ertesi gün hazne içi besiyeri uzaklaştırılıp PBS ile yıkanan ve üst kısmındaki hücrelerin pamuk çubuk ile uzaklaştırıldığı Boyden hazneleri, invaze olan hücrelerin fiksasyonu için metanol, hücrelerin boyanması içinse % 0,2 kristal viole solüsyonuna tabi tutuldu. Fazla kristal violenin PBS ile yıkanarak uzaklaştırıldığı hazneler, kurumaması için PBS içeren temiz kuyulara yerleştirildi ve

invert ışık mikroskobunda 20X'lik objektifte rastgele 5 farklı alanın fotoğraflanmasıyla sonlandırıldı. Elde edilen invazyon görüntülerinin "Image J" programı ile analizi yapıldı ve sonuçlar yüzdelik değişimler olarak oluşturulan grafikler şeklinde sunuldu.

3.2.11. İmmünfloresan (IF) Boyama

Planlanan deneysel işlemlere tabi tutulan hücreler, lamellerin yerleştirildiği 24 kuyulu plakalara 5 x 10^4 yoğunlukta ekildi. 24 saat sonra % 4'lük paraformaldehit 15 dk süre ile uygulanarak hücrelerin fiksasyonu sağlandı. Fikse edilen hücrelerin, immünfloresan bloklama solüsyonu uygulanarak 1 saat süre ile bloklanması sağlandı. Bloklama işlemi sonrası kuyulara anti-E-kaderin primer antikoru (Cell Signaling; Kat. No. 14472) eklendi ve +4 ^oC'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün fazla antikorun uzaklaştırılması amaçlı 3 kez PBS ile yıkanan kuyulara, Alexa-488 işaretli sekonder antikor (Cell Signaling; Kat. No. 4408) uygulandı. Üç kez daha PBS ile yıkama sonrası çekirdeklerin boyanması amacıyla DAPI içeren "Prolong Gold anti-fade" (Cell Signaling; Kat. No. 9071) mounting media eklendikten sonra bir lamel ile kapatıldı. Karanlıkta bir gece beklenmesinin ardından EVOS Cell Imaging sistemi (Thermofisher, A.B.D.) ile görüntü alındı.

3.2.12. İstatistiksel Analiz

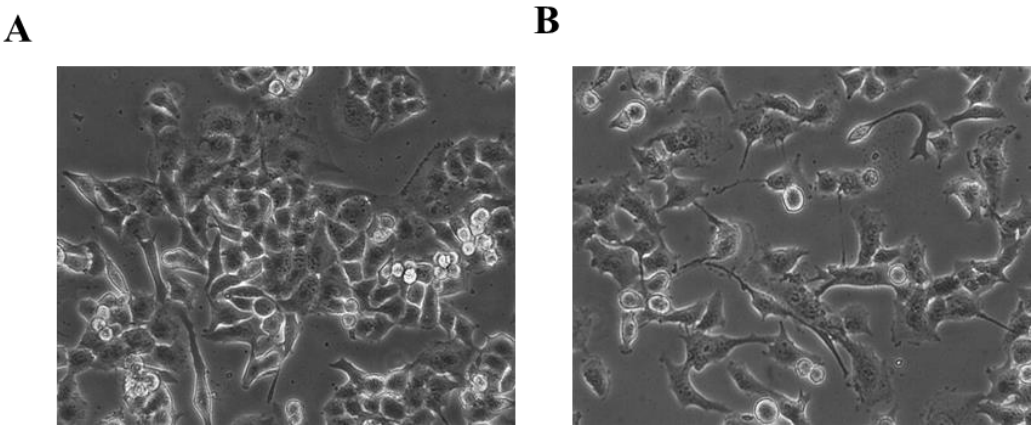
Deneysel olarak elde edilen tüm değerler ortalama ve standart sapma olarak ifade edildi. İstatistiksel analizlerin gerçekleştirildiği bütün analizler en az üçer kez (n=3) gerçekleştirildi. İki grup arası matematiksel farkın değerlendirildiği istatistiksel analizlerde t-testi kullanıldı. Elde edilen p değerleri bulgular ile beraber sunuldu ve $p<0,05$ olarak belirlenen veriler anlamlı olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Panc1 Hücrelerinde TGFβ ile İndüklenen EMT'de PFKFB Enzimlerinin Rolü

4.1.1. Panc1 Hücrelerinde TGFβ ile EMT'nin indüklenmesi

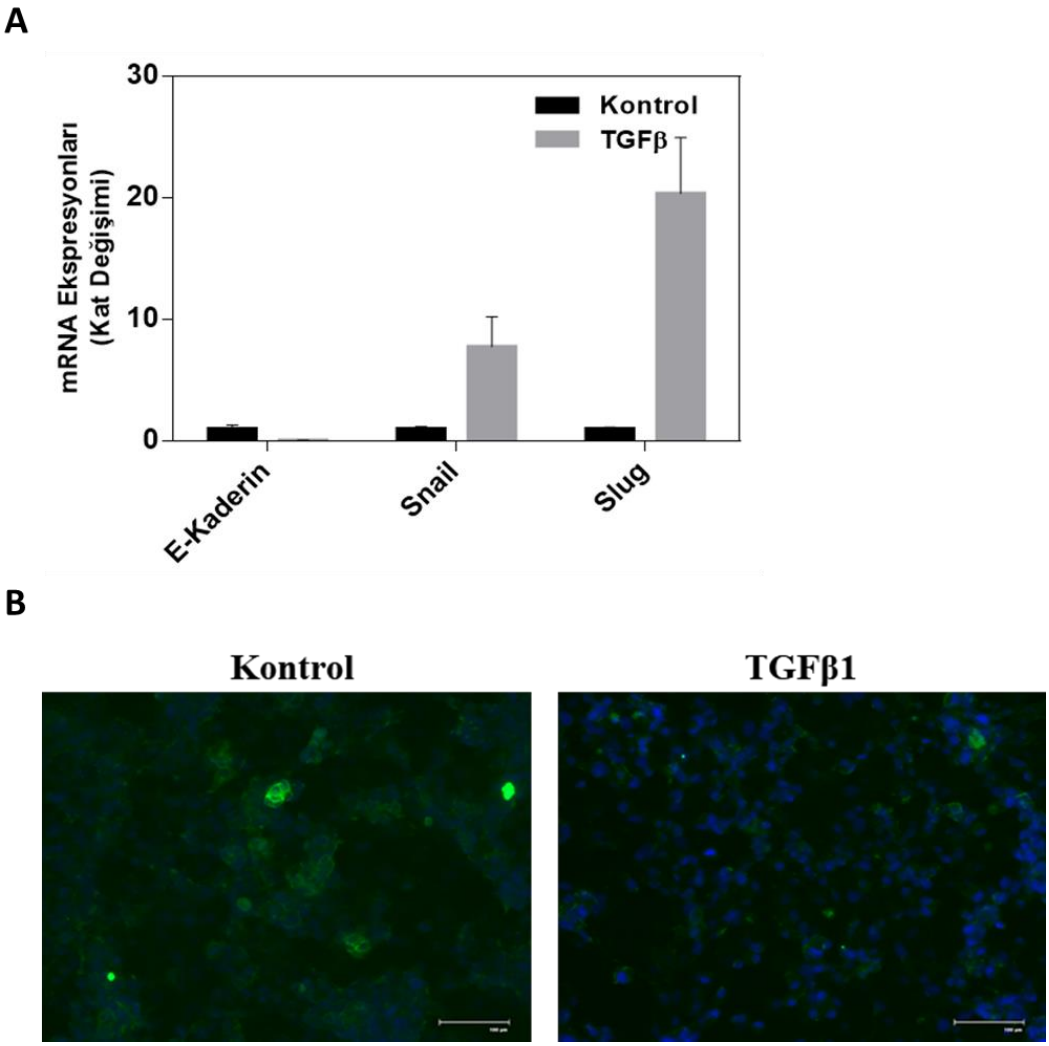
TGFβ ekspresyonunun pankreas kanserinde belirgin oranda artış gösterdiği bilinmektedir (Shen ve diğerleri, 2017; Radke ve diğerleri, 2016). Daha önce değinildiği gibi TGFβ'nın önemli bir EMT indükleyicisi olduğu bilindiğinden, ilk olarak Panc1 hücrelerine TGFβ uygulanarak EMT'nin indüklenmesi amaçlandı (Yang ve Weinberg, 2008). Bu amaçla Panc1 hücrelerine 10 ng/ml TGFβ1 uygulandı ve 48 saatin sonunda mikroskop görüntüleri karşılaştırıldı. Kontrol hücrelerinin daha sıkı istiflenmiş ve yuvarlak yapılı olduğu; TGFβ uygulanan örneklerin ise mezenkimal ve çıkıntılı olduğu gözlendi (Şekil – 6).



Şekil – 6: Panc1 hücrelerinde TGFβ mezenkimal fenotipi indükler. 6 kuyulu plakaya hücre ekiminden bir gün sonra 10 ng/ml TGFβ1 uygulandı. 48 saat sürenin sonunda invert mikroskopla görüntülenen **A)** kontrol hücreleri sıkı istiflenmiş, yuvarlak yapılı hücrelerden oluşurken, **B)** TGFβ uygulanan hücrelerin daha mezenkimal bir görünüme sahip oldukları gözlendi.

Panc1 hücrelerinde TGFβ etkisiyle önemli EMT belirteçlerinde meydana gelen değişimleri belirlemek amacı ile örneklerden izole edilen RNA'lardan cDNA sentezlenmesi sonrası real-time qPCR analizleri gerçekleştirildi. Bu analizlerde, kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, TGFβ uygulanan hücrelerde bir epitel belirteç olan E-kaderin ekspresyonunun yaklaşık 20 kat azaldığı; E-kaderin baskılayıcı mezenkimal transkripsiyon faktörlerinden Snail ekspresyonunun yaklaşık 8 kat ve Slug ekspresyonunun ise yaklaşık 20 kat arttığı belirlendi (Şekil – 7/A, $p<0,001$). E-kaderin protein lokalizasyonu ve ekspresyonundaki değişim IF yöntemiyle de teyit edildi (Şekil

– 7/B). Kontrol örneklerine göre kat değişimi şeklinde hesaplanan mRNA ekspresyon değerleri: E-kaderin, Kontrol: 1 ± 0,30; TGFβ: 0,05 ± 0,01; Snail, Kontrol: 1 ± 0,17; TGFβ: 7,77 ± 2,44; Slug, Kontrol: 1 ± 0,13; TGFβ: 20,36 ± 4,61.

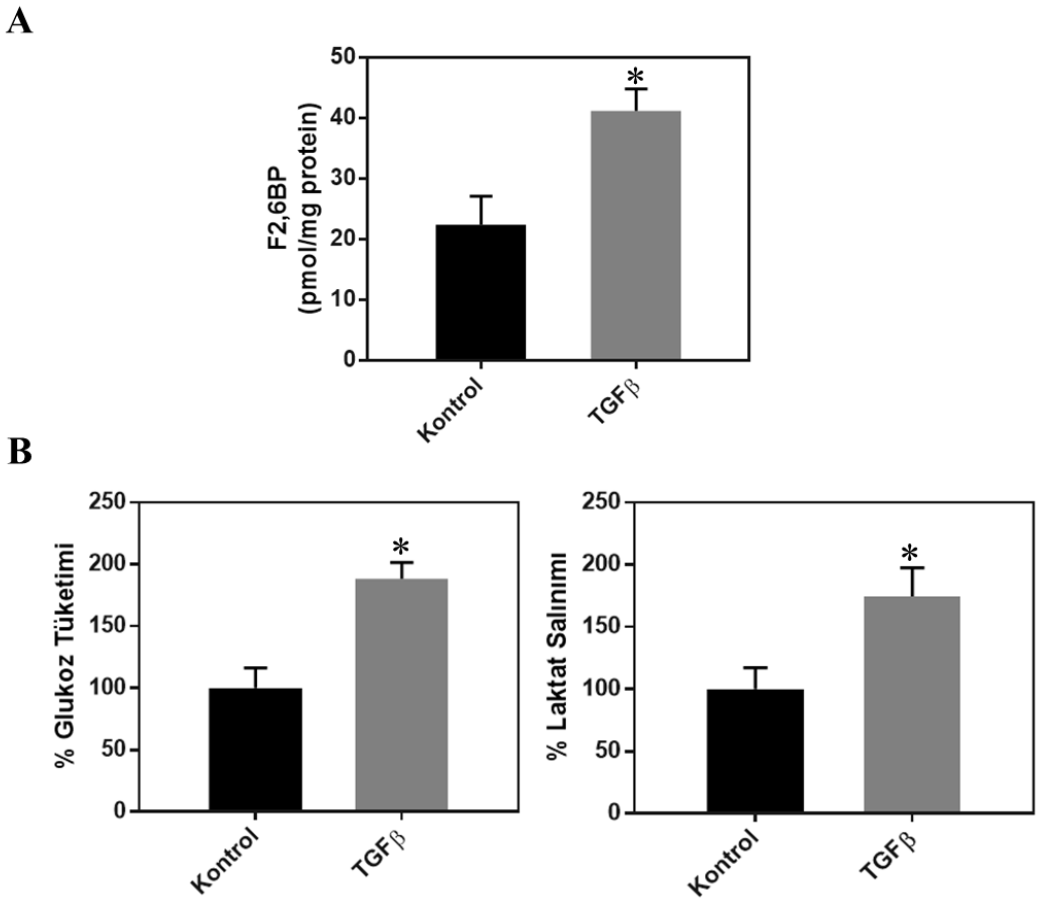


Şekil – 7: Panc1 hücrelerinde TGFβ ile EMT indüklenmektedir. A) Kontrol ve TGFβ uygulanan örneklerdeki mRNA ekspresyonları real-time qPCR yöntemiyle değerlendirildi. Epitel belirteç E-kaderin ekspresyonu büyük oranda azalırken, mezenkimal transkripsiyon faktörleri Snail ve Slug ekspresyonlarının önemli oranda arttığı belirlendi. **B)** E-kaderin'in protein lokalizasyonu ve ekspresyonundaki değişim IF yöntemiyle teyit edildi.

4.1.2. Panc1 Hücrelerinde TGFβ'nın F2,6BP ve Glikolize Etkisi

EMT ile indüklenen hücrelerin metabolik olarak yeniden programlamaya yönelebileceğine dair çeşitli çalışmalar mevcuttur (Hua ve diğerleri, 2019; L. Jiang ve diğerleri, 2015). Diğer taraftan, yapılan bazı çalışmalar, bazı tümör hücrelerinde gözlemlenen mezenkimal dönüşüme glikolitik fenotipin eşlik ettiğini göstermektedir

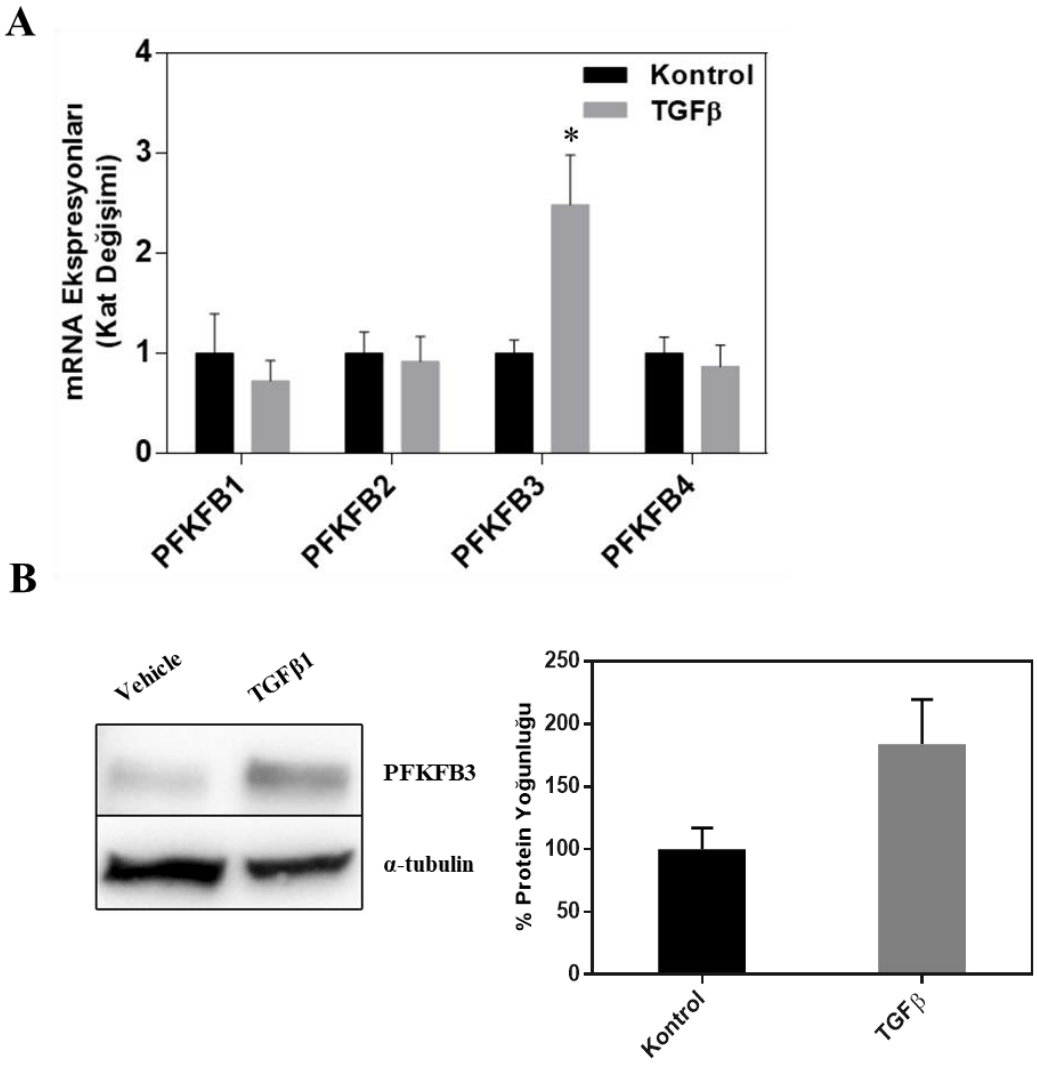
(Kang ve diğerleri, 2019). Bununla birlikte; TGFβ'nın Panc1 hücrelerindeki glikolitik fenotipe etkisi bilinmemektedir. F2,6BP'nin tümör hücrelerinde gözlemlenen glikoliz artışındaki rolü iyi bilindiğinden öncelikle, kontrol ve TGFβ uygulanan Panc1 hücrelerinde F2,6BP seviyeleri analiz edildi (Yalcin ve diğerleri, 2009). Yapılan ölçümler sonucunda, kontrol hücrelerine kıyasla TGFβ uygulanan örneklerdeki F2,6BP konsantrasyonunun yaklaşık iki kat daha fazla olduğu belirlendi (Şekil – 8/A; kontrol: 22,4 ± 4,7; TGFβ: 41,2 ± 3,6; p<0,001). TGFβ ile glukoz alımı ve laktat salınımında artış olduğu görüldü (Şekil – 8/B; Glukoz %: kontrol, 100 ± 16,4; TGFβ,188,4 ± 13,2; p<0,001; Laktat %: 100 ± 17,1; TGFβ, 174,5 ± 23; p<0,001). Bu sonuçlar, Panc1 hücrelerinde TGFβ'nın F2,6BP sentezini ve glukoz alımı ile beraber glikolitik aktiviteyi artırdığını göstermektedir.



Şekil – 8: Panc1 hücrelerinde TGFβ, F2,6BP konsantrasyonunu, glukoz tüketimini ve laktat salınımını artırmaktadır. 48 saatlik TGFβ uygulaması deneyi sonrası **A)** elde edilen örneklerle yapılan F2,6BP analizinde TGFβ uygulanan örneğin kontrol örneğine kıyasla daha yüksek F2,6BP konsantrasyonuna sahip olduğu belirlendi. **B)** Deney sonrası alınan örneklere ait besiyerlerinin kullanılmasıyla yapılan glukoz ölçümü ve laktat salınımı analizlerinde, TGFβ'nın glukoz tüketimini ve laktat salınımını kontrol örneğine kıyasla yaklaşık iki kat artırdığı görüldü. * p<0,001 (kontrole göre).

4.1.3. Panc1 Hücrelerinde TGFβ ile PFKFB Ekspresyonlarındaki Değişim

PFKFB enzimlerinin F2,6BP yapımı ile glukoz alımı ve glikolizi düzenledikleri bilindiğinden, kontrol ve TGFβ uygulanan hücrelerdeki PFKFB izoenzimlerinin mRNA ekspresyonlarındaki olası değişimler real-time qPCR ile analiz edildi (Chesney, 2006). β-aktin endojen refererans olarak analiz edildi. TGFβ etkisiyle PFKFB1, 2 ve 4 izoenzimlerinde belirgin bir fark gözlenmezken, PFKFB3 izoenziminin 2,5 kat artış gösterdiği saptandı (Şekil – 9/A; PFKFB3, kontrol: 1 ± 0,13, TGFβ: 2,48 ± 0,49, $p<0,01$). Daha sonra Western blotlama analizi gerçekleştirilerek PFKFB3 protein ekspresyonu incelendi. Şekil – 9/B'de görüldüğü gibi, kontrol örneğine kıyasla, TGFβ uygulanan örnekte PFKFB3 protein seviyesinin belirgin olarak arttığı saptandı.

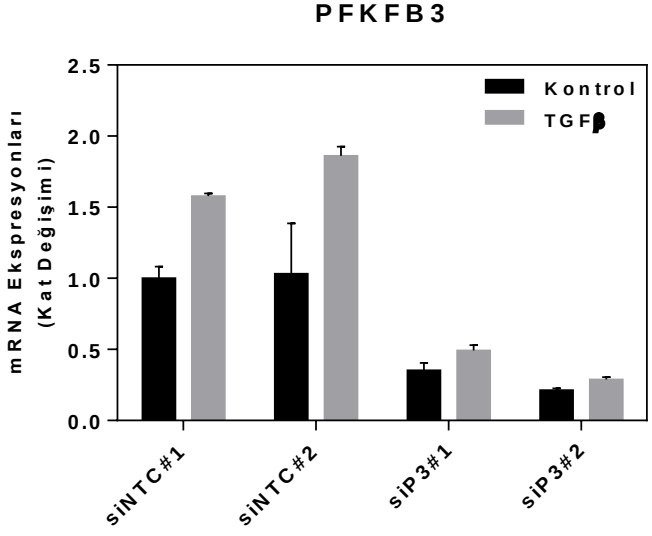


Şekil – 9: TGFβ Panc1 hücrelerinde PFKFB3 ekspresyonunu indüklemektedir. Panc1 hücreleri 48 saat süre ile TGFβ (10 ng/ml) muamele edildi. Kontrol olarak hücrelere TGFβ'nin eklendiği solüsyon ilave edildi. **A)** Real-time qPCR ile PFKFB1, 2, 3 ve 4 mRNA seviyeleri analiz edildi. **B)** (sol panel) Western blotlama ile PFKFB3 protein ekspresyonu analizi; (sağ panel) PFKFB3 dansitometri *p<0,01 (kontrole göre).

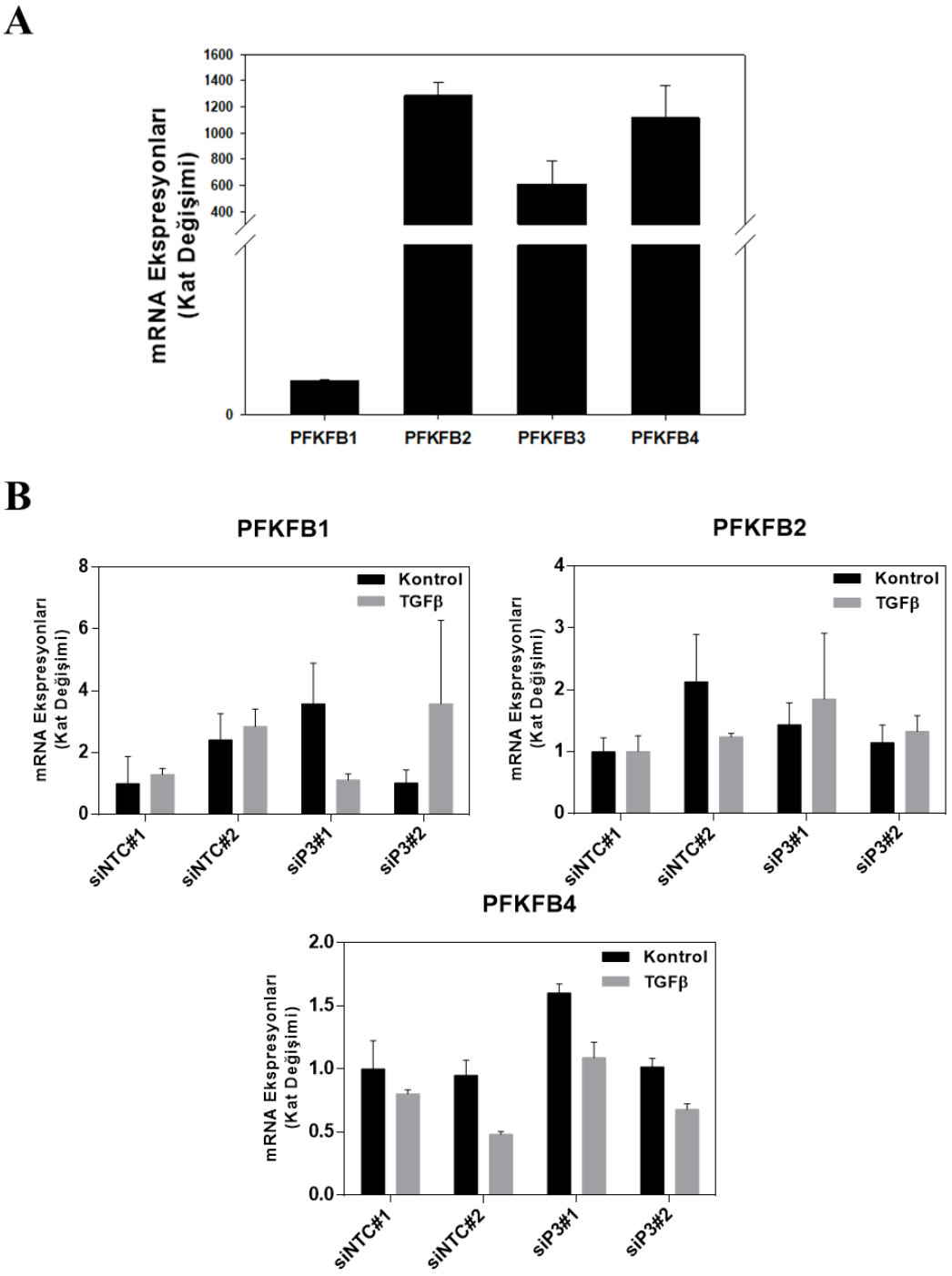
4.1.4. Panc1 Hücrelerinde TGFβ ile artan PFKFB3'ün Hücre Fenotipine Etkisi

Panc1 hücrelerinde TGFβ ile EMT oluşumunda, bir sonraki aşama olarak TGFβ ile arttığı belirlenen PFKFB3'ün hücre fenotipi ve EMT belirteçleri üzerine etkileri incelendi. Bu amaçla PFKFB3 ekspresyonu siRNA yöntemi kullanılarak baskılandı. Öncelikle Panc1 hücreleri, yöntem kısmında belirtildiği gibi 6-kuyucuklu plakalara ekildikten 24 saat sonra, PFKFB3'e özgün iki farklı siRNA (siP3#1 ve siP3#2) ya da kontrol olarak insan genomunda homolojisi bulunmayan iki farklı siRNA molekülünden (siNTC#1 ve siNTC#2) biri ile transfekte edildi. 24 saat sonra, hücrelere TGFβ ya da

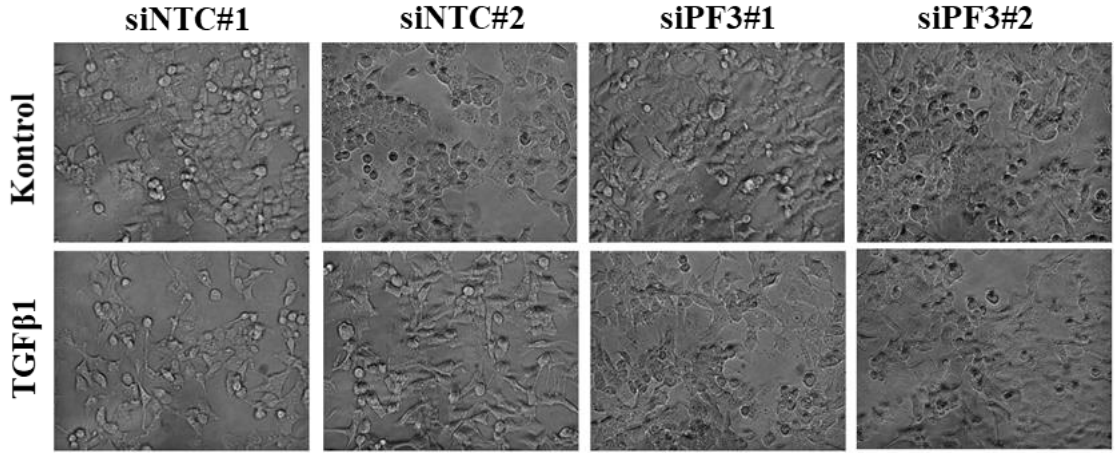
kontrol olarak TGFβ'nın dilüsyonu için kullanılan 2 mg/ml BSA içeren PBS çözeltisi uygulandı. 48 saat sonra real-time qPCR gerçekleştirilerek PFKFB3 mRNA ekspresyonunundaki azalma doğrulandı (Şekil – 10). β-aktin endojen refererans olarak analiz edildi. Şekil – 10'da görüldüğü gibi, her iki PFKFB3 siRNA molekülü uygulanan örneklerde PFKFB3 mRNA düzeylerinde belirgin bir baskılanma gözlemlendi. Kontrole göre nispi eskpresyon kat değişimleri: kontrol, siNTC#1: 1 ± 0,8; siP3#1: 0,35 ± 0,05; siNTC#2: 1,03 ± 0,35; siP3#2: 0,21 ± 0,01; TGFβ, siNTC#1: 1,58 ± 0,02; siP3#1: 0,49 ± 0,04; siNTC#2: 1,86 ± 0,06; siP3#2: 0,29 ± 0,02. Diğer taraftan, PFKFB3'deki baskılanmanın Panc1 hücrelerinde düşük ekspresyon gösteren PFKFB1 ve yüksek oranda eksprese edilen PFKFB2 ve 4 izoenzimlerinde değişime sebep olup olmadığının incelenmesine yönelik, PFKFB3 siRNA uygulanan kontrol ve TGFβ örneklerindeki PFKFB izoenzim ekspresyonları, mRNA düzeyinde incelendi. PFKFB3 siRNA uygulamasının Panc1 hücrelerinde belirgin oranda eksprese edilen PFKFB2 ve PFKFB4 mRNA düzeylerinde önemli bir değişime neden olmadığı görüldü (Şekil – 11). Daha sonra invert mikroskopta hücrelerin fenotipleri incelendi. Hücre görünümleri incelendiğinde, PFKFB3 baskılanan hücrelerde, TGFβ ile indüklenen mezenkimal fenotipin kısmen de olsa azaldığı görüldü (Şekil – 12).



Şekil – 10: Panc1 hücrelerine uygulanan iki farklı PFKFB3 siRNA molekülü ile PFKFB3 geninde mRNA düzeyinde baskılama sağlanmıştır. İki farklı kontrol siRNA (siNTC#1 ve siNTC#2) ve iki farklı PFKFB3 siRNA (siP3#1 ve siP3#2)'nın uygulandığı örnekler, bir gün sonra 10 ng/ml TGFβ1 ile muamele edildi. 48 saat sonra PFKFB3 mRNA real-time qPCR ile analiz edildi. β-aktin endojen refererans olarak kullanıldı.



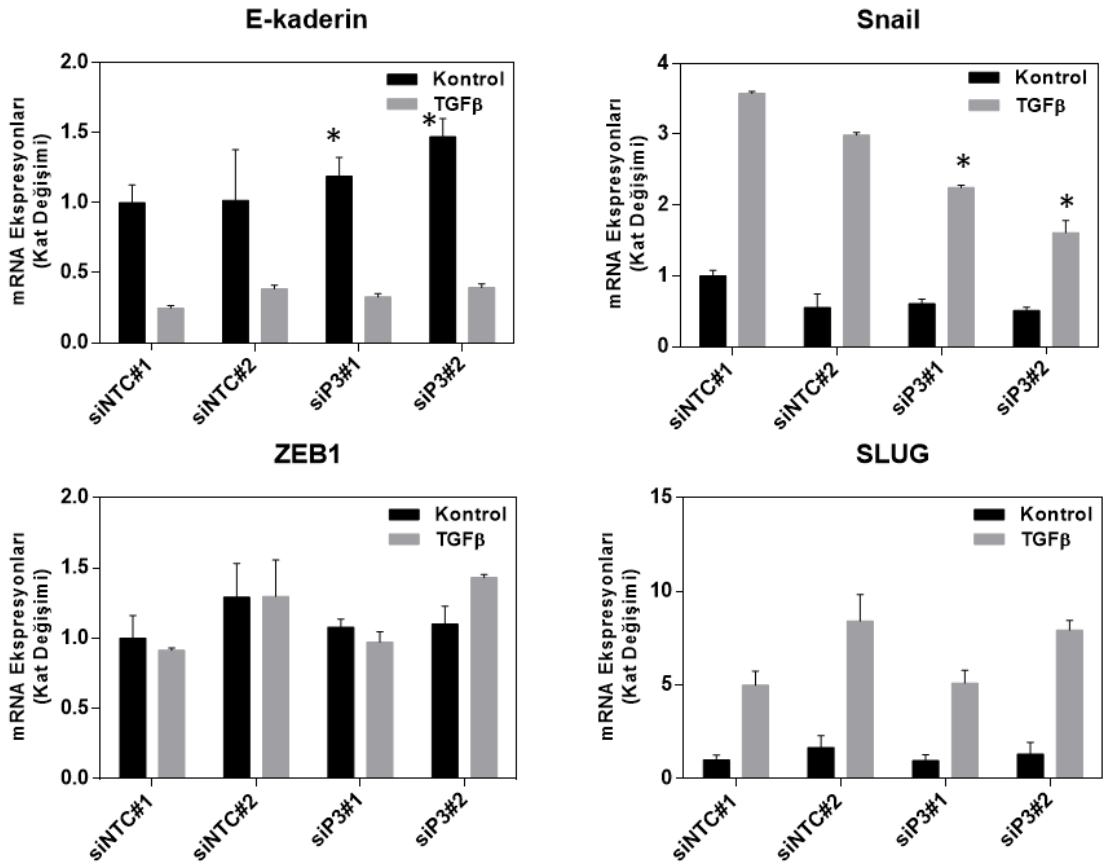
Şekil – 11: Panc1 hücrelerinde TGFβ ile indüklenen PFKFB3'ün baskılanması, PFKFB2 ve PFKFB4 mRNA düzeylerinde önemli bir değişime sebep olmamaktadır. A) Panc1 hücrelerindeki PFKFB1-4 izoenzimlerinin mRNA ekspresyonları Realt-time qPCR yöntemiyle belirlendi. **B)** İki farklı kontrol siRNA (siNTC#1 ve siNTC#2) ve iki PFKFB3 siRNA (siP3#1 ve siP3#2) uygulanan Panc1 hücrelerine 24 saat sonra 10 ng/ml TGFβ1 uygulandı. TGFβ uygulamasından 48 saat sonra elde edilen örneklerde real-time qPCR ile PFKFB1, 2 ve 4 izoenzim mRNA ekspresyon düzeyleri analiz edildi.



Şekil – 12: PFKFB3 siRNA uygulanan kontrol ve TGFβ örneklerine ait hücre fenotip görüntüleri. Hücre ekiminden bir gün sonra 2 farklı kontrol ve 2 farklı PFKFB3 siRNA uygulanan hücrelere 24 saat sonra 10 ng/ml TGFβ1 solüsyonu eklendi. TGFβ uygulamasından 48 saat sonra örnekler arası fenotipik değişim invert ışık mikroskobu kullanılarak fotoğraflandı.

4.1.5. Panc1 Hücrelerinde TGFβ ile İndüklenen EMT'de PFKFB3'ün EMT'ye Etkisi

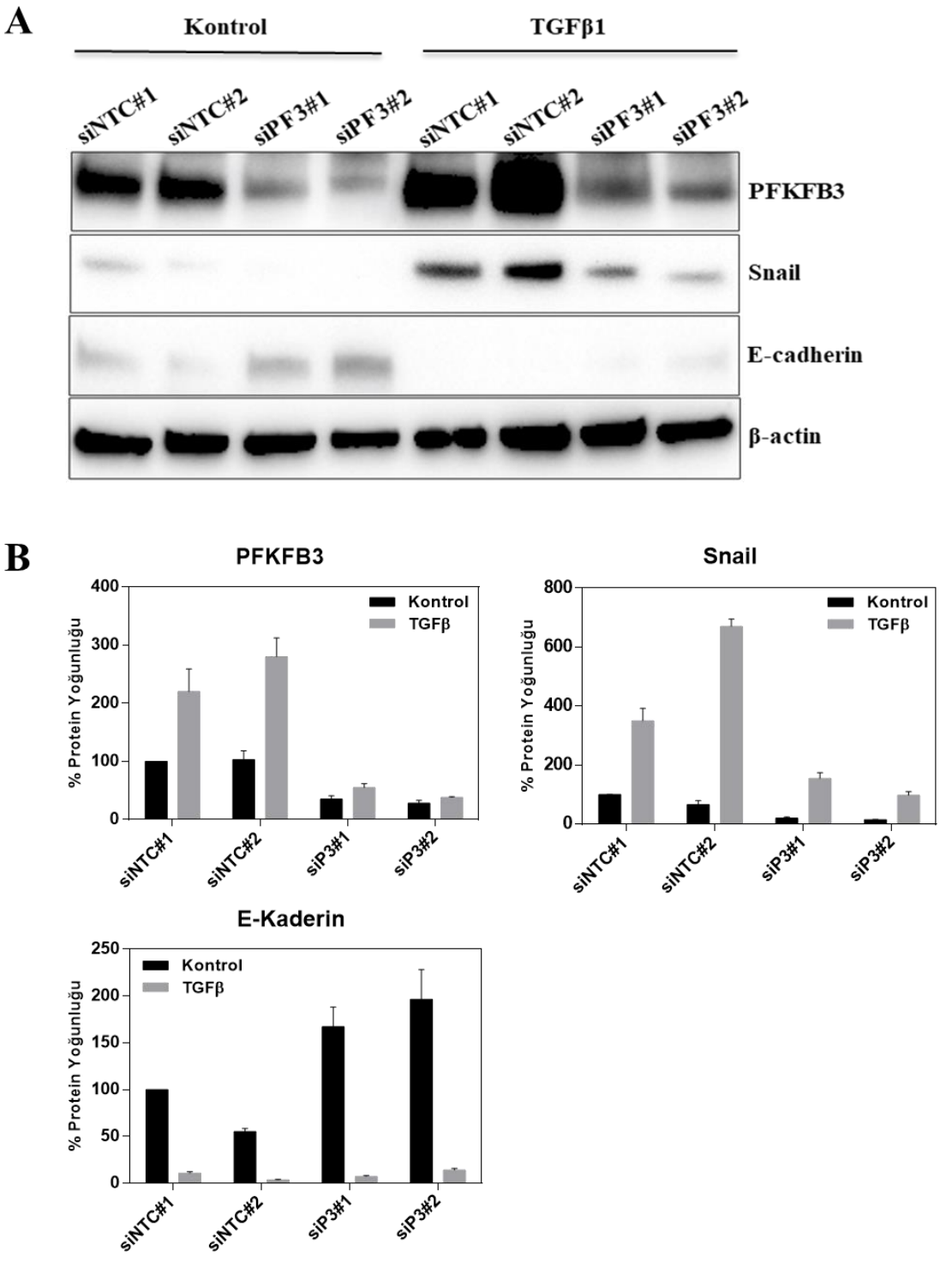
Panc1 hücrelerinde TGFβ ile indüklenen EMT'de PFKFB3'ün rolü olup olmadığını değerlendirmek için, PFKFB3 ekspresyonu baskılanan kontrol hücreleri ve TGFβ uygulanan hücrelerdeki E-kaderin, Snail, Slug ve Zeb1 ekspresyonları çalışıldı. Bu analizlerde, PFKFB3 siRNA'nın; TGFβ tarafından indüklenen Zeb1 ve Slug mezenkimal transkripsiyon faktörleri ile TGFβ tarafından baskılanan E-kaderin epitel belirtecinin mRNA ekspresyonları üzerinde bir etkisinin olmadığı; ancak, TGFβ ile indüklenen Snail mRNA ekspresyonunu azalttığı gözlendi (Şekil – 13). Bununla birlikte, kontrol örneklerinde sadece PFKFB3 siRNA uygulamasının E-kaderin mRNA ekspresyonunu artırdığı belirlendi. Kontrole göre nispi eskpresyon kat değişimleri: E-kaderin, kontrol: siNTC#1, 1 ± 0,13; siP3#1, 1,19 ± 0,13; siNTC#2, 1,02 ± 0,36; siP3#2, 1,47 ± 0,13; TGFβ: siNTC#1, 0,25 ± 0,02; siP3#1, 0,33 ± 0,02; siNTC#2, 0,38 ± 0,02; siP3#2, 0,39 ± 0,03; Snail, kontrol: siNTC#1, 1 ± 0,8; siP3#1, 0,6 ± 0,06; siNTC#2, 0,55 ± 0,19; siP3#2, 0,51 ± 0,05; TGFβ: siNTC#1, 3,58 ± 0,02; siP3#1, 2,25 ± 0,03; siNTC#2, 2,99 ± 0,04; siP3#2, 1,61 ± 0,17, p<0,001; ZEB1, kontrol: siNTC#1, 1 ± 0,16; siP3#1, 1,08 ± 0,06; siNTC#2, 1,29 ± 0,24; siP3#2, 1,1 ± 0,13; TGFβ: siNTC#1, 0,91 ± 0,02; siP3#1, 0,97 ± 0,07; siNTC#2, 1,3 ± 0,26; siP3#2, 1,43 ± 0,02; Slug, kontrol: siNTC#1, 1 ± 0,26; siP3#1, 0,97 ± 0,31; siNTC#2, 1,67 ± 0,62; siP3#2, 1,31 ± 0,62; TGFβ: siNTC#1, 4,99 ± 0,75; siP3#1, 5,11 ± 0,68; siNTC#2, 8,42 ± 0,41; siP3#2, 7,93 ± 0,52.



Şekil – 13: Panc1 hücrelerinde PFKFB3, TGFβ ile Snail'in indüklenmesi için gereklidir. Hücre ekiminden bir gün sonra 2 farklı kontrol (siNTC#1 ve siNTC#2) ve 2 farklı PFKFB3 (siP3#1 ve siP3#2) siRNA uygulanan hücrelere 24 saat sonra 10 ng/ml TGFβ1 eklendi. TGFβ uygulamasından 48 saat sonra örneklerden elde edilen mRNA'lardan sentezlenen cDNA'lerin kullanımıyla real-time qPCR analizi gerçekleştirildi. *p<0,001 (kontrol örneğine kıyasla).

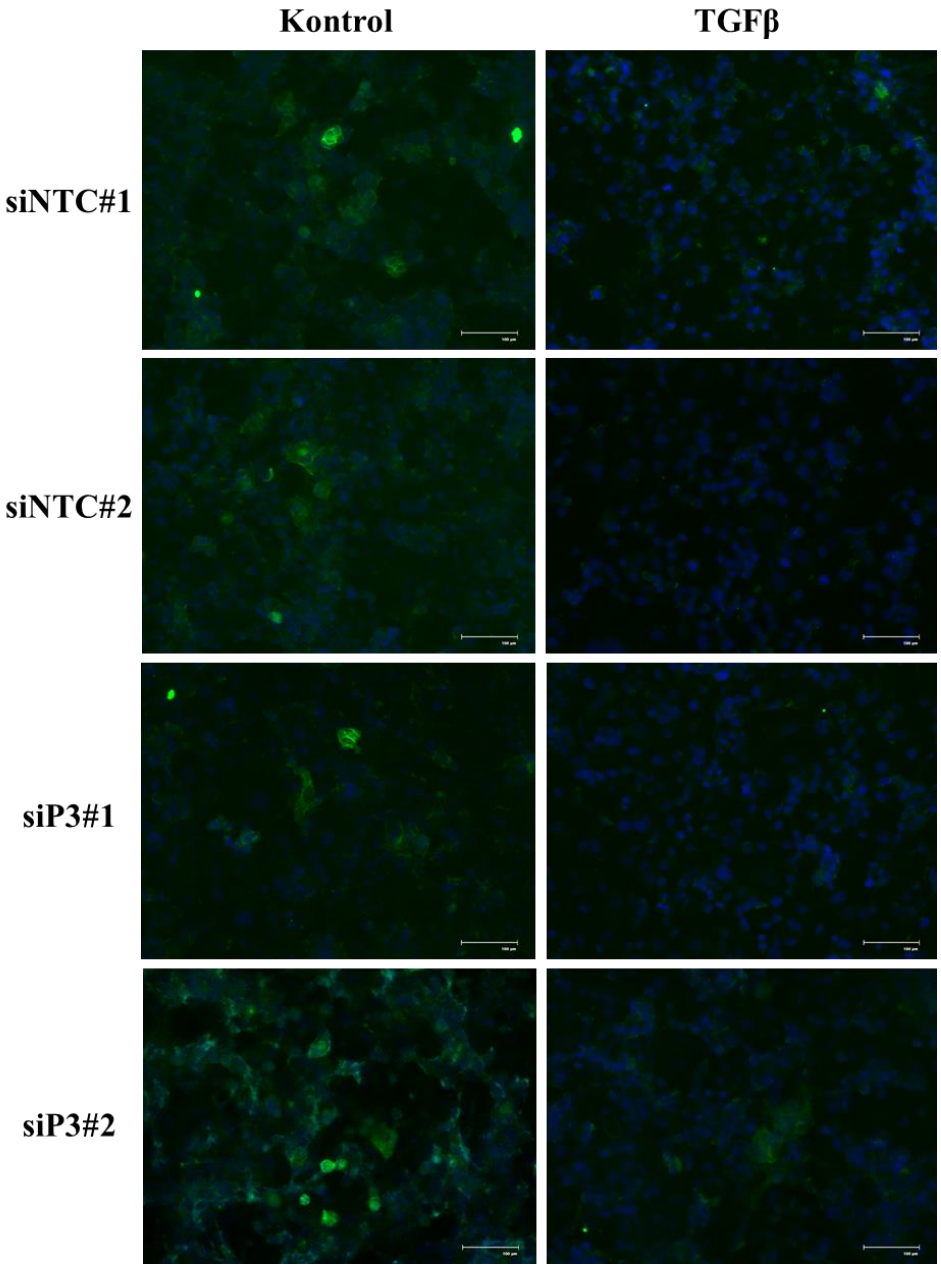
Real-time qPCR sonuçlarını destekler şekilde protein düzeyinde de PFKFB3'ün TGFβ etkisiyle arttığı ve siRNA ile hem kontrol hem de TGFβ örneklerinde PFKFB3 proteininin büyük oranda azaldığı görüldü (Şekil – 14/A). Protein bantlarının dansitometrik olarak analizleri sonucu kontrol siNTC#1 örneğine göre yüzdelik değişimleri: kontrol: siNTC#1, 100 ± 0,1; siP3#1, 35 ± 6; siNTC#2, 103 ± 15,3; siP3#2, 28 ± 5; TGFβ: siNTC#1, 220 ±38,85; siP3#1, 55 ± 6,75; siNTC#2, 280 ± 32; siP3#2, 38 ± 1,43. Yapılan dansitometrik analizlerde real-time qPCR sonuçları ile uyumlu olarak, PFKFB3 siRNA'nın tek başına kontrol örneklerinde E-kaderin proteininde artışa ve TGFβ tarafından indüklenen Snail protein miktarında düşüşe neden olduğu gözlemlendi (Şekil – 14/B). Protein bantlarının dansitometrik olarak analizleri sonucu kontrol siNTC#1 örneğine göre yüzdelik değişimler: Snail, kontrol: siNTC#1, 100 ± 0,02; siP3#1, 20 ± 4; siNTC#2, 66 ± 13,95; siP3#2, 15 ± 0,71; TGFβ: siNTC#1, 350 ± 42;

siP3#1, 155 ± 19; siNTC#2, 670 ± 25; siP3#2, 98 ± 12; E-kaderin, kontrol: siNTC#1, 100 ± 0,01; siP3#1, 167,21 ± 21; siNTC#2, 55 ± 3,53; siP3#2, 196,5 ± 32; TGFβ: siNTC#1, 10,71 ± 1,5; siP3#1, 7,21 ± 1; siNTC#2, 3,5 ± 0,6; siP3#2, 14 ± 2.



Şekil – 14: Panc1 hücrelerinde PFKFB3 siRNA TGFβ tarafından Snail proteininin indüklenmesini baskılamaktadır. Kontrol siRNA (siNTC#1 ve siNTC#2) veya PFKFB3 siRNA (siP3#1 ve siP3#2) uygulanan örneklere 24 saat sonra 10 ng/ml TGFβ1 eklendi. TGFβ uygulamasından 48 saat sonra örneklerden elde edilen hücre pelletlerinden izole edilen proteinlerle yapılan western blotlama işlemi ile elde edilen **A)** PFKFB3, E-kaderin ve Snail proteinlerine ait görüntüler, **B)** Image J programında analiz edildi ve endojen kontrol β-Aktin'e oranlanarak kontrol örneğine kıyasla yüzdelik değişim grafikleri elde edildi.

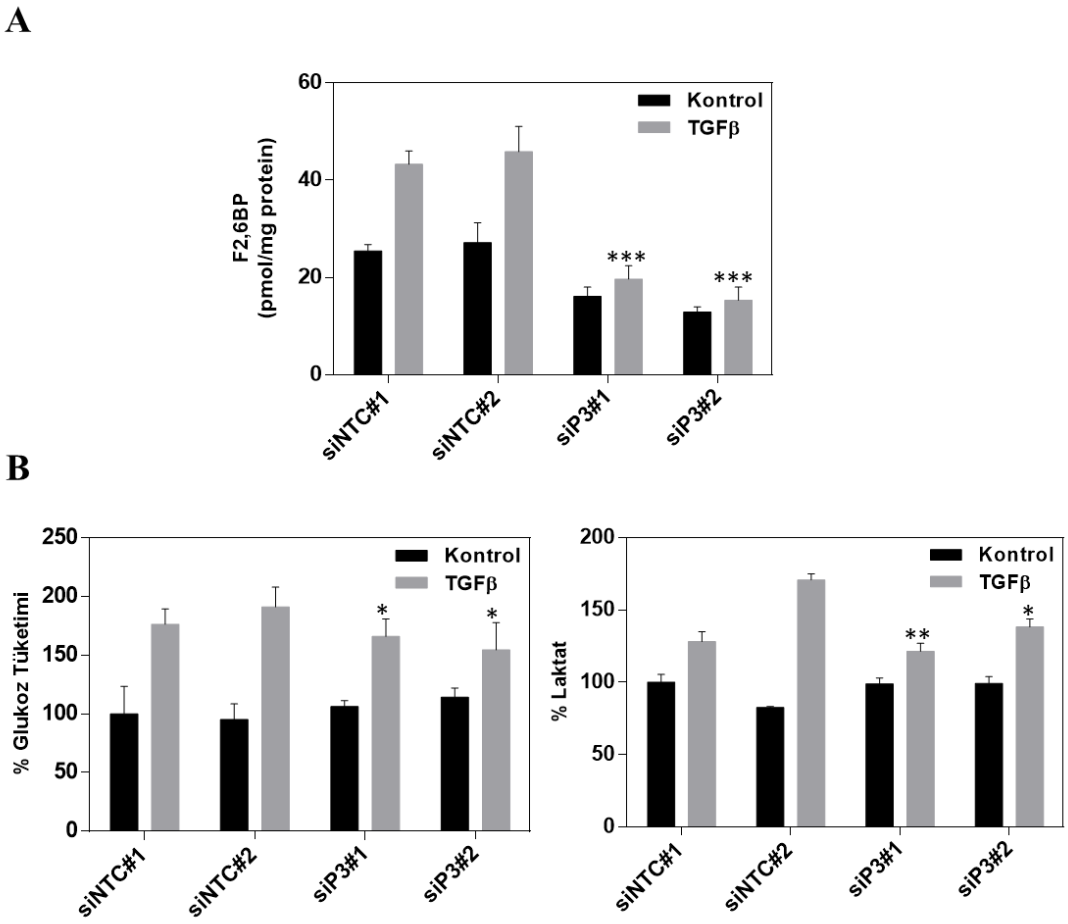
EMT'de E-kaderin total protein ekspresyonundaki değişimden bağımsız olarak hücre içi lokalizasyonda değişim gözlenebilmektedir. Bu nedenle, Western blotlamaya ek olarak immünfloresan analizi gerçekleştirildi. Western blotlama analizi ile uyumlu şekilde, PFKFB3 siRNA'nın TGFβ tarafından baskılanan E-kaderin proteininin miktarında ve lokalizasyonda bir değişime neden olmadığı görüldü (Şekil – 15).



Şekil – 15: Panc1 hücrelerinde PFKFB3 siRNA, TGFβ ile baskılanan E-kaderin protein miktarında ve lokalizasyonunda bir değişime neden olmamaktadır. Kontrol siRNA (siNTC#1 ve siNTC#2) veya PFKFB3 siRNA (siP3#1 ve siP3#2) uygulanan örneklere 24 saat sonra 10 ng/ml TGFβ1 eklendi. TGFβ uygulamasından 48 saat sonra örneklerdeki E-kaderin proteinin IF yöntemiyle görüntülenmesi sağlandı.

4.1.6. Panc1 Hücrelerinde TGFβ ile İndüklenen EMT'de PFKFB3'ün F2,6BP, Glukoz Alımı ve Glikolitik Aktiviteye Ekisi

TGFβ'nın Panc1 hücrelerindeki F2,6BP konsantrasyonu, glukoz alımı ve glikolitik aktiviteyi artırıcı etkisini gözlemledik (Şekil – 8). TGFβ'nın glukoz metabolizmasını atırıcı bu etkisi üzerinde yine TGFβ ile artan PFKFB3 enziminin etkili olup olmadığının belirlenmesi amacıyla, daha önce belirtildiği şekilde PFKFB3 siRNA ve TGFβ uygulaması yapıldı. TGFβ eklendikten 48 saat sonra hücre içi F2,6BP seviyesi, besiyerindeki glukoz ve laktat konsantrasyonları ölçüldü. PFKFB3'ün baskılandığı ve TGFβ uygulanan örneklerde, TGFβ uygulanan kontrol grubuna kıyasla glikoliz indükleyicisi F2,6BP konsantrasyonunda büyük oranda azalma gözlenirken, glukoz alımı ve laktat salınımında da azalma olduğu görüldü (Şekil – 16). F2,6BP (pmol/mg protein): kontrol, siNTC#1, 25,49 ± 1,29; siP3#1, 16,12 ± 1,9; siNTC#2, 27,17 ± 4,12; siP3#2, 12,91 ± 1,07; TGFβ, siNTC#1, 43,27 ± 2,78; siP3#1, 19,67 ± 2,78; siNTC#2, 45,89 ± 5,19; siP3#2, 15,32 ± 2,71, p<0,001. Glukoz tüketimi (%): kontrol, siNTC#1, 100 ± 23,73; siP3#1, 106,43 ± 4,85; siNTC#2, 95,23 ± 13,51; siP3#2, 114,3 ± 7,82; TGFβ, siNTC#1, 176,55 ± 13,21; siP3#1, 166,13 ± 14,95; siNTC#2, 191,34 ± 16,91; siP3#2, 154,72 ± 23,35, p<0,05. Laktat salınımı (%): kontrol, siNTC#1, 100,04 ± 5,29; siP3#1, 98,85 ± 4,03; siNTC#2, 82,57 ± 0,69; siP3#2, 99,29 ± 4,68; TGFβ, siNTC#1, 128,04 ± 6,9; siP3#1, 121,47 ± 5,38, p<0,01; siNTC#2, 170,81 ± 4,18; siP3#2, 138,18 ± 5,54, p<0,05.

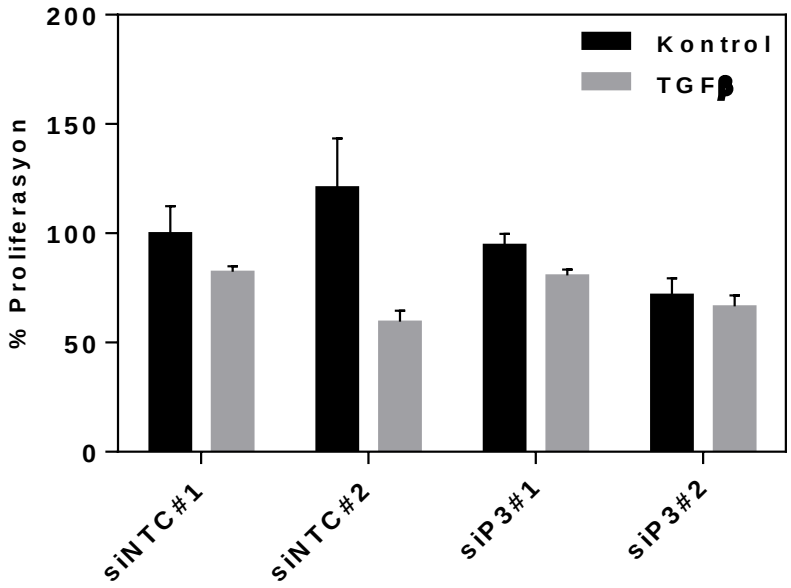


Şekil – 16: Panc1 hücrelerinde PFKFB3'ün baskılanması F2,6BP konsantrasyonunu büyük oranda azaltırken, glukoz tüketimi ve laktat salınımını da kısmen azaltıcı etki göstermiştir. Kontrol siRNA (siNTC#1 ve siNTC#2) veya PFKFB3 siRNA (siP3#1 ve siP3#2) uygulanan örneklere 24 saat sonra 10 ng/ml TGFβ1 eklendi. TGFβ uygulamasından 48 saat sonra **A)** örneklerden elde edilen hücre pelletleriyle yapılan F2,6BP analizi yapıldı. **B)** Deney sonrası örneklerden alınan besiyerleri ile glukoz tüketimi ve laktat salınımları ölçüldü. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 (kontrol örneğine kıyasla).

4.1.7. Panc1 Hücrelerinde TGFβ ile İndüklenen EMT'de PFKFB3'ün Hücre Proliferasyonuna Etkisi

TGFβ'nin bazı tümör hücreleri üzerinde onkojenik aşamaya bağlı olarak anti-proliferatif ya da pro-proliferatif etki gösterdiği bilinmektedir (Lu ve diğerleri, 2004; Massagué, 2008). Çalışmamızda, TGFβ uygulanan hücrelerin kontrol hücrelere göre daha yavaş çoğaldığı görüldü (Şekil – 17). PFKFB3 siRNA uygulanan hücreler incelendiğinde özellikle siP3#2'nin bazal olarak Panc1 çoğalmasını baskıladığı ve TGFβ uygulamasının ek bir azalmaya neden olmadığı gözlemlendi. Kontrole göre hücre sayıları (%): kontrol, siNTC#1, 100 ± 12,4; siP3#1, 94,74 ± 4,96; siNTC#2, 121,05 ±

22,33; siP3#2, 71,93 ± 7,44; TGFβ, siNTC#1, 82,46 ± 2,48; siP3#1, 80,7 ± 2,78; siNTC#2, 59,65 ± 4,96; siP3#2, 66,67 ± 4,96.

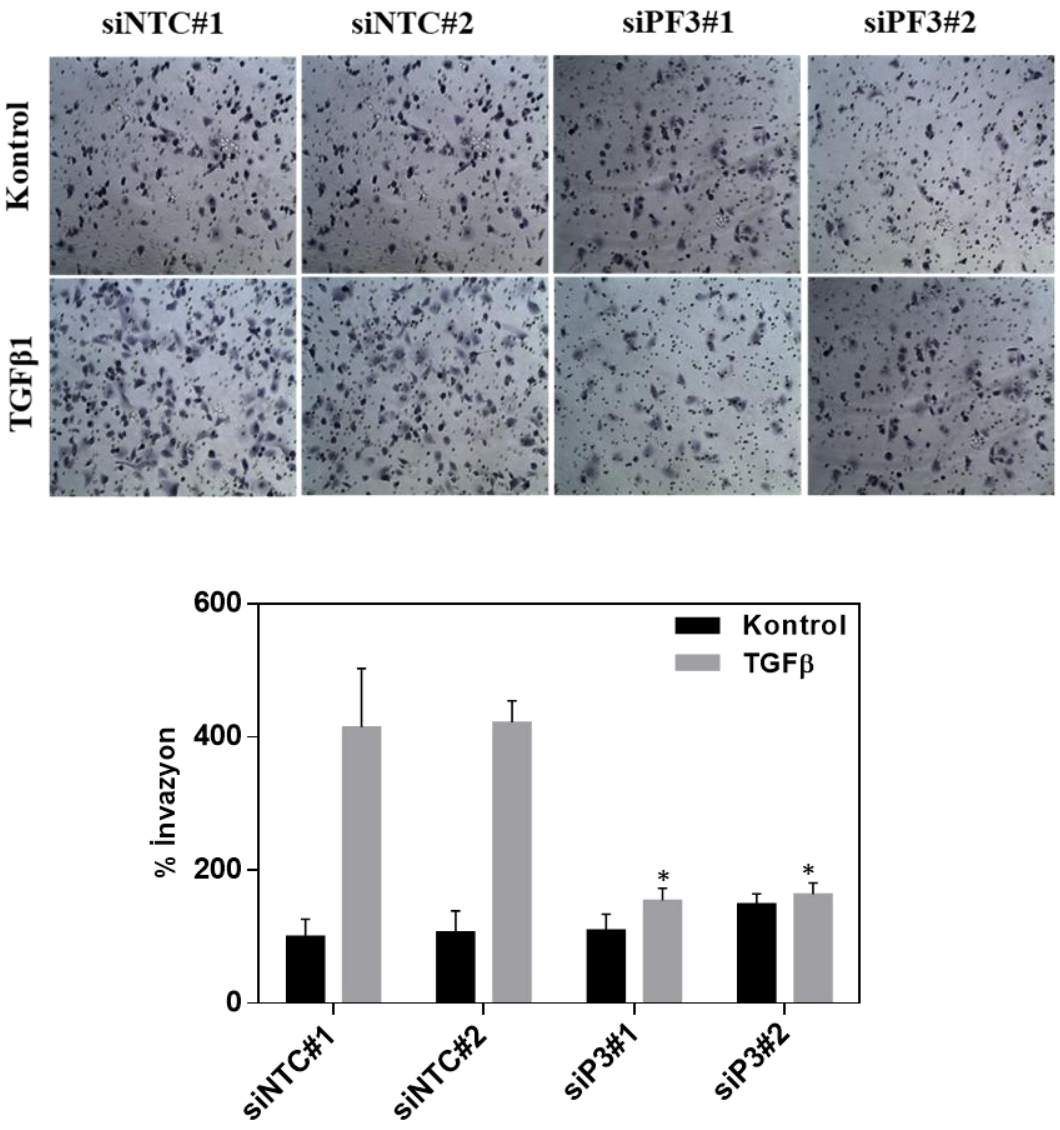


Şekil – 17: Panc1 hücrelerinde PFKFB3, TGFβ etkisiyle azalan proliferasyona etki etmemektedir. Kontrol siRNA (siNTC#1 ve siNTC#2) veya PFKFB3 siRNA (siP3#1 ve siP3#2) uygulanan örneklere 24 saat sonra 10 ng/ml TGFβ1 eklendi. TGFβ uygulamasından 48 saat sonra hücre sayımı gerçekleştirildi. Değerler siNTC#1 kontrol örneğine göre % değişim olarak ifade edildi.

4.1.8. Panc1 Hücrelerinde PFKFB3 enziminin TGFβ ile İndüklenen EMT'de İnvazyona Etkisi

TGFβ ile indüklenen EMT'nin tümör hücrelerinde artan invazif özellik ile ilişkisi bilindiğinden (Heldin ve diğerleri, 2012) ve PFKFB3'ün TGFβ ile Snail'in indüklenmesi için gerekli olduğunun anlaşılması dolayısıyla, Panc1 hücrelerinde PFKFB3 baskılanmasının TGFβ tarafından indüklenen in vitro invazif özelliklere etkisi incelendi. Bu amaçla kontrol ve PFKFB3 siRNA uygulanan örneklere 24 saat sürenin ardından 10 ng/ml TGFβ1 uygulandı. TGFβ1 eklenmesinden 24 saat sonra matrijel invazyon analizine tabi tutuldu. Kontrol siRNA uygulanan kontrol ve TGFβ örnekleri arasında, TGFβ uygulanan örneklerde matrijelden geçen hücre sayısının kontrol örneklerine kıyasla büyük oranda artış gösterdiği görüldü. PFKFB3 siRNA uygulanan örnekler incelendiğinde, TGFβ etkisiyle artan invazif potansiyelin PFKFB3'deki baskılanmayla büyük oranda azaldığı görüldü (Şekil – 18). Kontrol örneğine göre invazyon değerleri (%): kontrol, siNTC#1, 100 ± 26,29; siP3#1, 109,9 ± 23,99;

siNTC#2, 106,5 ± 32,17; siP3#2, 149,1 ± 15,15; TGFβ, siNTC#1, 414,9 ± 87,82; siP3#1, 154,2 ± 18,35; siNTC#2, 421,8 ± 32,59; siP3#2, 163,6 ± 17,08, p<0,001.

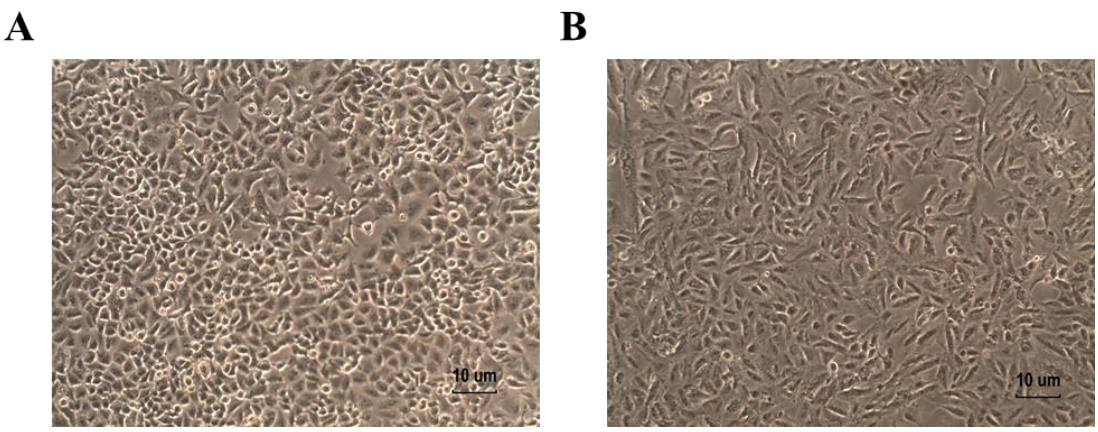


Şekil – 18: Panc1 hücrelerinde PFKFB3'deki baskılama TGFβ ile artan invazif potansiyeli azaltmaktadır. Kontrol siRNA (siNTC#1 ve siNTC#2) veya PFKFB3 siRNA (siP3#1 ve siP3#2) uygulanan örneklere 24 saat sonra 10 ng/ml TGFβ1 uygulandı. TGFβ uygulamasından bir gün sonra invazyon deneyi gerçekleştirildi. En az beş farklı alandan alınan fotoğrafların analizi sonucu siNTC#1 kontrol örneğine kıyasla örneklere ait invazyon yüzdeleri verildi. *p<0,001 (kontrol siNTC#1 örneğine kıyasla).

4.2. A549 Hücrelerinde TGFβ ile İndüklenen EMT'de PFKFB Enzimlerinin Rolü

4.2.1. A549 Hücrelerinde TGFβ ile EMT'nin indüklenmesi

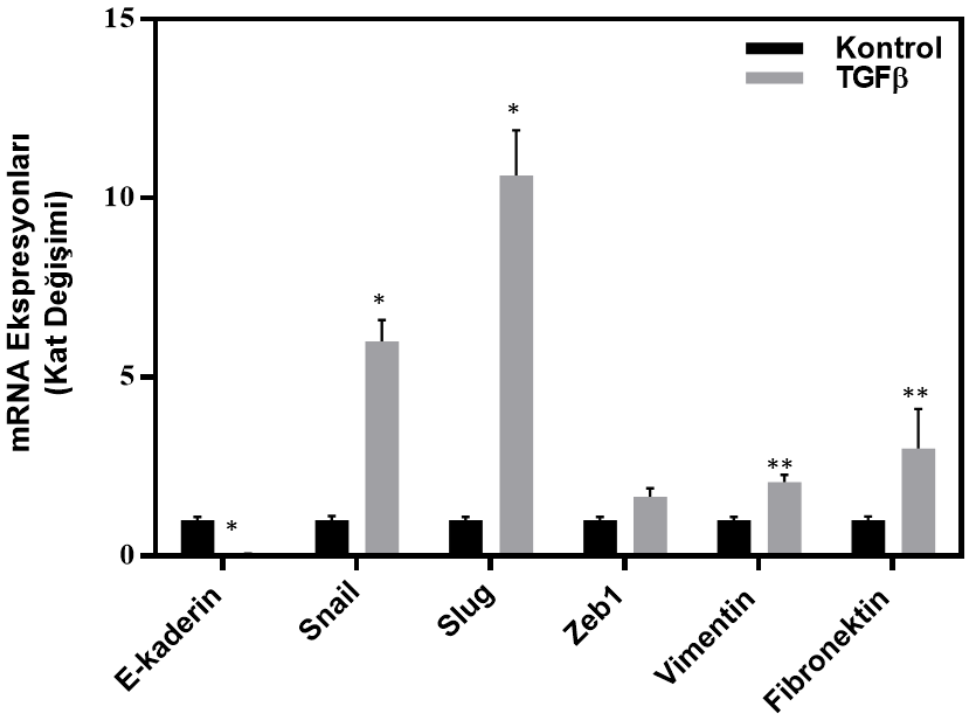
Normal akciğer dokusuna kıyasla NSCLC'de TGFβ1 ekspresyonunun önemli ölçüde yüksek olduğu ve TGFβ1 proteinindeki aşırı ekspresyonun akciğer kanser gelişimi ve metastazla ilişkili olduğu bilinmektedir (Huang ve diğerleri, 2014; Xu ve diğerleri, 2011). EMT, tümörlerin metastaz kabiliyeti kazanmasında önemli bir etken olup; daha önce de ifade edildiği gibi TGFβ, EMT'nin önemli bir aktivatörüdür. Bu noktadan hareketle, öncelikle TGFβ sinyal yolağının aktif olduğu bilinen NSCLC hücre hattı A549'da EMT'nin indüklenmesi hedeflendi. Bu amaçla; A549 hücrelerine 5 ng/ml TGFβ1 uygulandı ve 48 saatin sonunda mikroskop görüntüleri karşılaştırıldı. Mikroskobik incelemede; kontrol hücrelerinin daha sıkı istiflenmiş ve yuvarlak yapılı olduğu; TGFβ uygulanan örneklerin ise mezenkimal ve çıkıntılı olduğu gözlendi (Şekil – 19).



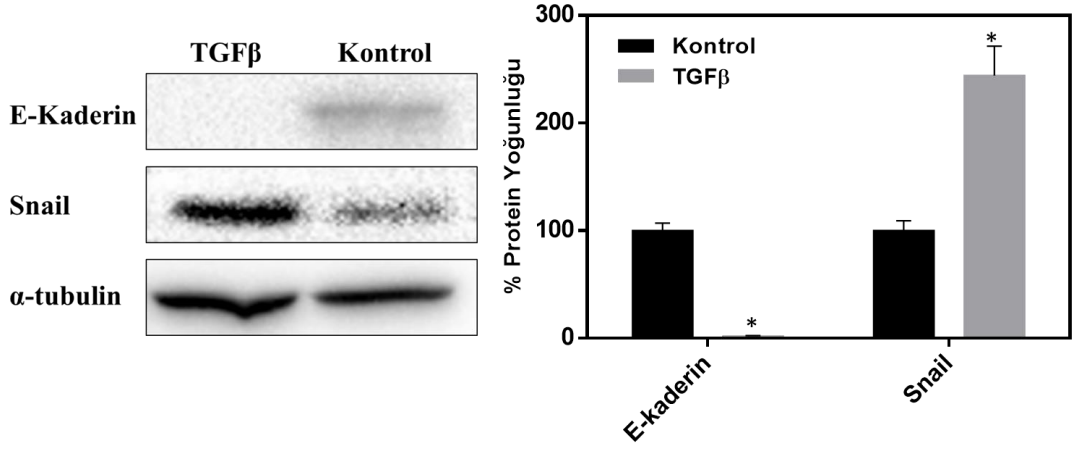
Şekil – 19: A549 hücrelerinde TGFβ, mezenkimal fenotipi indüklemektedir. A549 hücre ekiminden bir gün sonra 5 ng/ml TGFβ1 uygulanan hücrelerin 48 saat sonra invert ışık mikroskobunda fenotipik incelenmesiyle elde edilen **A)** Kontrol örneklerine ve **B)** TGFβ uygulanan örneklere ait hücre görüntüleri.

A549 hücrelerinde TGFβ etkisiyle önemli EMT belirteçlerinde meydana gelen değişimleri belirlemek amacı ile örneklerden izole edilen RNA'lardan cDNA sentezlenmesi sonrası real-time qPCR analizleri gerçekleştirildi. Bu analizlerde, kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, TGFβ uygulanan hücrelerde epitelyal belirteç olan E-kaderin ekspresyonun 20 kat azaldığı ve mezenkimal belirteç olan Vimentin ekspresyonunun yaklaşık 2 kat artış gösterdiği belirlendi. Diğer taraftan; kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, TGFβ uygulanan hücrelerde, E-kaderin baskılayıcısı

EMT transkripsiyon faktörlerinden Snail, Slug ve Zeb1'in sırası ile 6, 10 ve 1,6 kat artış arttığı görüldü (Şekil – 20). Kontrol örneklerine göre kat değişimi şeklinde hesaplanan mRNA ekspresyon değerleri: E-kaderin, Kontrol: 1 ± 0,09; TGFβ: 0,05 ± 0,01; p<0,001; Vimentin, Kontrol: 1 ± 0,09; TGFβ: 2,06 ± 0,2; p<0,01; Snail, Kontrol: 1 ± 0,12; TGFβ: 5,99 ± 0,6; p<0,001; Slug, Kontrol: 1 ± 0,09, TGFβ: 10,63 ± 1,27; p<0,001; Zeb1, Kontrol: 1 ± 0,09, TGFβ: 1,66 ± 0,23; p<0,05; Fibronektin, kontrol: 1 ± 0,11; TGFβ: 3 ± 1,1; p<0,01. Ayrıca, Western blotlama analizi gerçekleştirilerek TGFβ eklenen hücrelerdeki Snail protein ekspresyonu doğrulandı (Şekil – 21).



Şekil – 20: A549 hücrelerinde TGFβ, epitel belirteç E-kaderin ekspresyonunu azaltırken, Vimentin ve Fibronektin mezenkimal belirteçlerinde ve Snail, Slug ve Zeb1 transkripsiyon faktörlerinde artışa neden olmaktadır. A549 hücrelerine, hücre ekiminden bir gün sonra 5 ng/ml TGFβ1 uygulandı ve 48 saatin sonunda yapılan real-time qPCR analizi ile çeşitli belirteç ve transkripsiyon faktörlerindeki değişimler kontrol örneklerine kıyasla kat değişimi şeklinde belirlendi.. *p<0,001, **p<0,01 (kontrole göre).

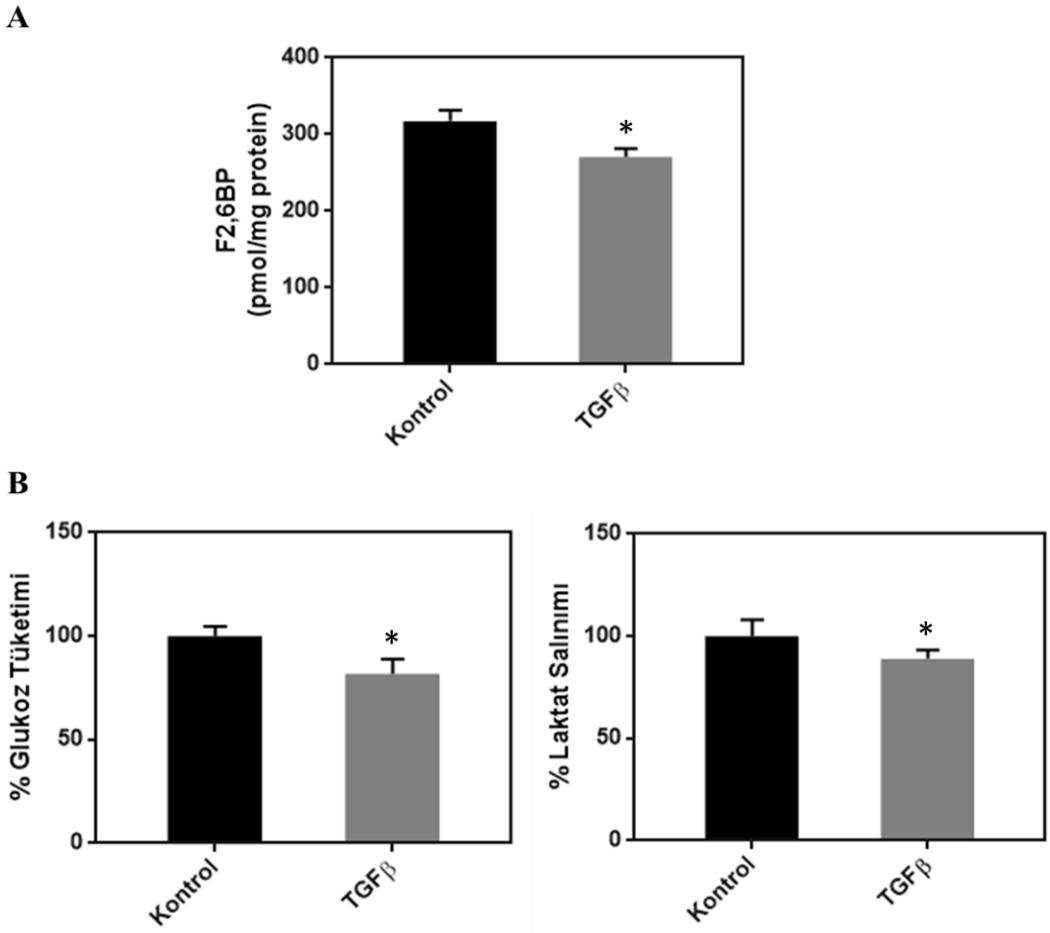


Şekil – 21: A549 hücrelerinde TGFβ E-kaderin protein ekspresyonunu azaltırken Snail protein ekspresyonunu artırmaktadır. A549 hücrelerine, hücre ekiminden bir gün sonra 5 ng/ml TGFβ1 uygulandı ve 48 saatin sonunda Western blotlama yöntemi ile E-kaderin ve Snail oranlarının belirlenmesi sağlandı. *p<0,01 (Kontrol örneğine kıyasla).

4.2.2. A549 Hücrelerinde TGFβ'nın F2,6BP ve Glikolize Etkisi

EMT'nin hücrelerin enerji metabolizmasında değişikliklere neden olabileceğini gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (Hua ve diğerleri, 2019). Diğer taraftan, yapılan bazı çalışmalar, bazı tümör hücrelerinde gözlemlenen mezenkimal dönüşüme glikolitik fenotipin eşlik ettiğini göstermektedir (Morandi ve diğerleri, 2017; Sciacovelli ve Frezza, 2017). Bununla birlikte; TGFβ ile EMT'nin uyarıldığı A549 hücrelerindeki glukoz alımı ve glikolitik aktivitedeki olası değişimlere dair yeterince çalışma bulunmamaktadır. F2,6BP'nin glukoz alımı ve glikolitik aktivite üzerinde rolünü gösteren çalışmalar mevcuttur (Atsumi ve diğerleri, 2002; Chesney ve Lane, 2014). Buradan hareketle, kontrol ve 48 saat TGFβ uygulanan A549 hücrelerinde F2,6BP seviyeleri analiz edildi. Bulgular analiz edildiğinde; kontrol hücrelerine kıyasla TGFβ uygulanan örneklerdeki F2,6BP konsantrasyonunun kısmen azaldığı görüldü. F2,6BP konsantrasyonları (pmol/mg protein): Kontrol, 317,52 ± 13,96 ve TGFβ, 270,43 ± 11,28; p<0,05 (Şekil – 22/A). Ayrıca, 48 saatlik TGFβ uygulaması sonucu alınan besiyeri örneklerinde glukoz ve laktik asit konsantrasyonları ölçüldü. Elde edilen bulgulara göre; kontrol hücrelerine kıyasla TGFβ uygulanan hücrelerdeki glukoz alımının yaklaşık olarak % 20, laktik asitin üretiminin yaklaşık % 10 azaldığı gözlemlendi. (Şekil – 22/B; Glukoz tüketimi %: kontrol, 100 ± 5; TGFβ, 81,87 ± 7,1; p <0,05; Laktat %: 100 ± 8,1; TGFβ, 89,2 ± 4,1; p<0,05). Bu sonuçlar, Panc1 hücrelerinin

aksine, A549 hücrelerinde TGFβ uygulamasının F2,6BP sentezini, glukoz alımını ve laktik asit üretimini azaltarak glikolitik aktiviteyi düşürdüğüne işaret etmektedir.

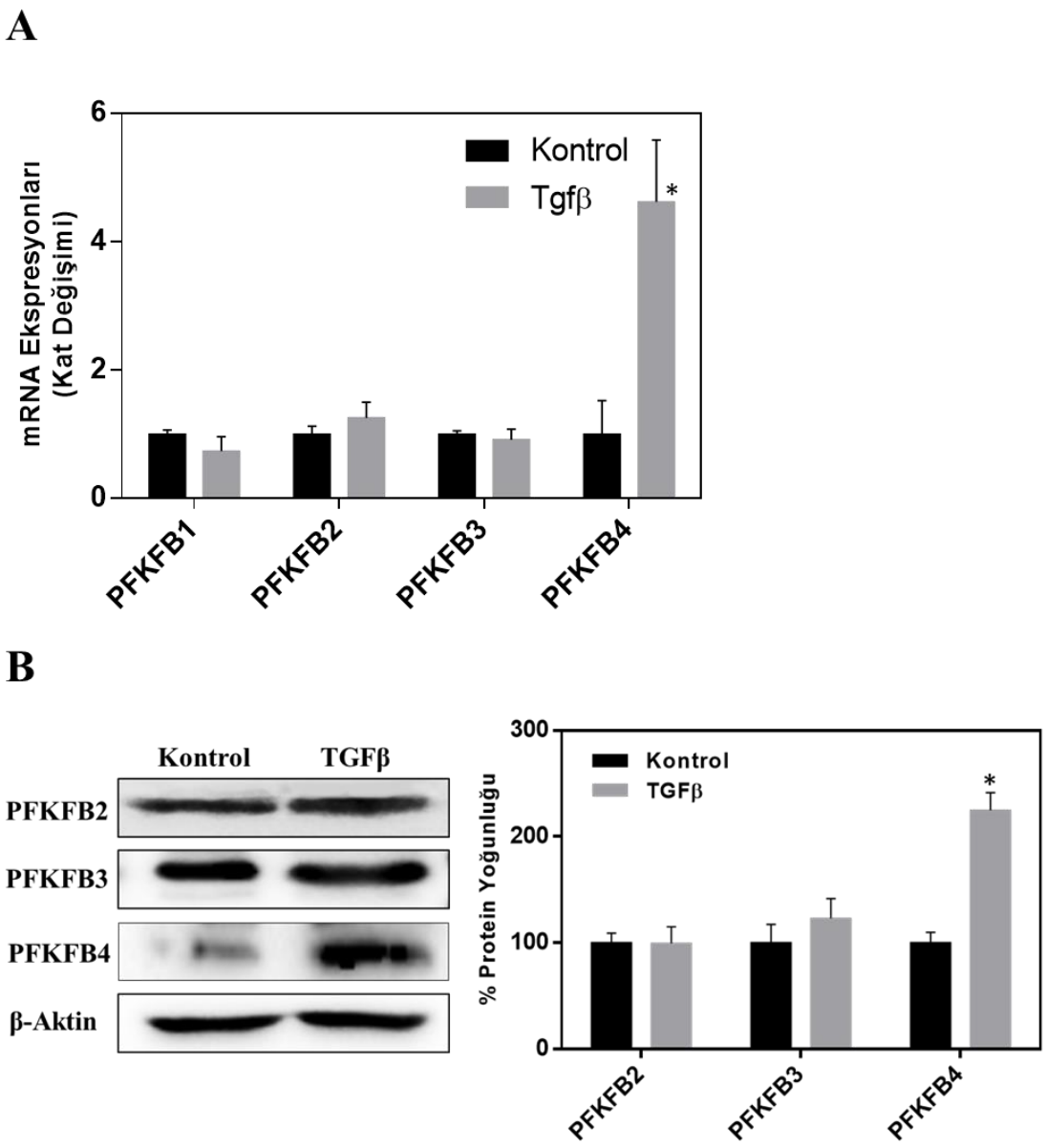


Şekil – 22: A549 hücrelerinde TGFβ ile F2,6BP konsantrasyonu, glukoz tüketimi ve laktat salınımı azalmaktadır. Hücre ekiminden bir gün sonra TGFβ uygulaması yapılan örneklerle **A)** hücre pelletleri kullanılarak F2,6BP analizi ve **B)** deney sonrası örneklerden alınan besiyerleriyle glukoz ve laktat ölçümleri gerçekleştirildi. Değişimler kontrol örneğine kıyasla % değişimler şeklinde sunuldu. *p<0,05 (Kontrol örneğine kıyasla).

4.2.3. A549 Hücrelerinde TGFβ ile PFKFB Ekspresyonlarındaki Değişim

Tümör hücrelerinde PFKFB enzimleri glukoz alımı ve glikolitik aktivitenin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (Ros ve Schulze, 2013). Bu nedenle, A549 hücrelerinde TGFβ tarafından indüklenen mezenkimal fenotipe PFKFB izoenzim ekspresyonlarında bir değişimin eşlik edip etmediğini değerlendirmek için, kontrol ve TGFβ uygulanan A549 hücrelerinde PFKFB izoenzimlerinin mRNA seviyeleri real-time qPCR ile analiz edildi. β-aktin endojen refererans olarak analiz edildi. Analizler sonucunda; TGFβ uygulanan hücrelerde PFKFB4 izoenziminin kontrol hücrelere göre

yaklaşık 5 kat arttığı gözlemlendi. Kontrol ve TGFβ örnekleri karşılaştırıldığında diğer izoenzimlerin mRNA seviyelerinde anlamlı bir değişim saptanmadı. (Şekil – 23/A; PFKFB4, kontrol: 1 ± 0,09, TGFβ: 4,62 ± 0,96, p<0,001). Daha sonra Western blotlama analizleri gerçekleştirilerek PFKFB izoenzimleri protein seviyesinde incelendi. Sonuçlar incelendiğinde; qPCR ile analizleri ile uyumlu olacak şekilde, TGFβ uygulanan hücrelerdeki PFKFB4 protein seviyesinin kontrol hücrelerindekine kıyasla belirgin derecede arttığı gözlemlendi. Diğer izoenzimlerin protein seviyesinde önemli bir değişiklik görülmedi (Şekil – 23/B).

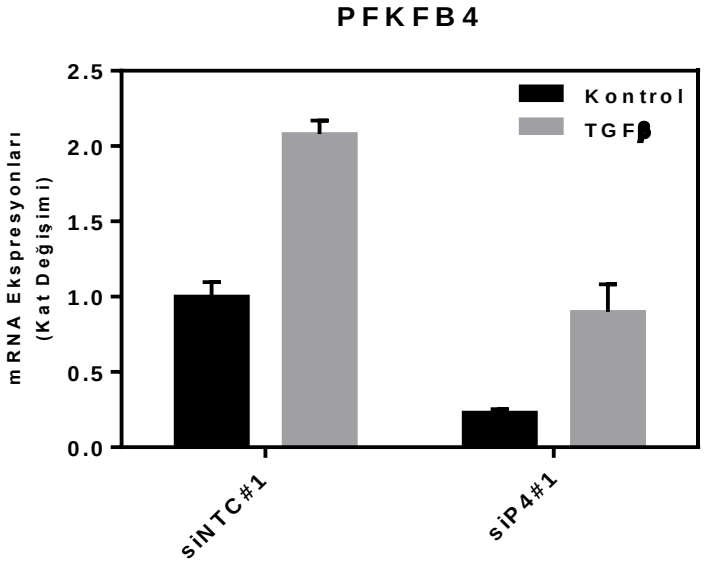


Şekil – 23: A549 hücre hattında TGFβ, PFKFB izoenzimlerinden PFKFB4'ü indüklemektedir. **A)** PFKFB izoenzimlerinin real-time qPCR analiz sonuçları; **B)** PFKFB2, 3 ve 4 izoenzimlerinin Western blot ile protein seviyeleri. **p*<0,001 (Kontrol örneğine kıyasla).

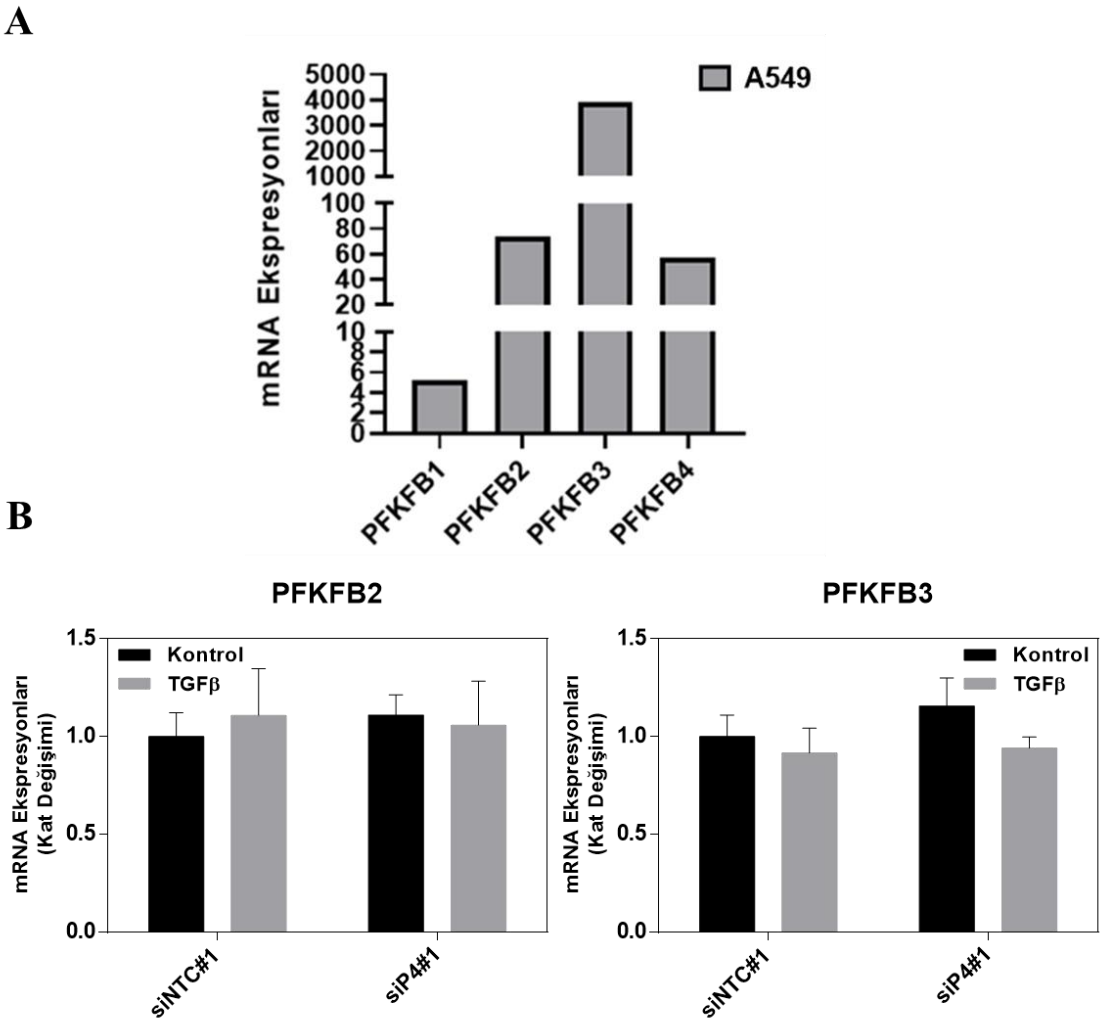
4.2.4 A549 Hücrelerinde TGFβ ile artan PFKFB4'ün Hücre Fenotipine Etkisi

A549 hücrelerinde TGFβ ile EMT oluşumunda, bir sonraki aşama olarak TGFβ ile arttığı belirlenen PFKFB4'ün hücre fenotipi ve EMT belirteçleri üzerine etkileri incelendi. Bu amaçla PFKFB4 ekspresyonu siRNA yönteminden yararlanılarak baskılandı. Öncelikle A549 hücreleri yöntemde belirtildiği gibi 6-kuyucuklu plakalara ekildikten 24 saat sonra hücreler yaklaşık % 30 yaygınlıkta iken PFKFB4'e özgün bir siRNA (siP4) ya da kontrol olarak insan genomunda homolojisi bulunmayan siRNA

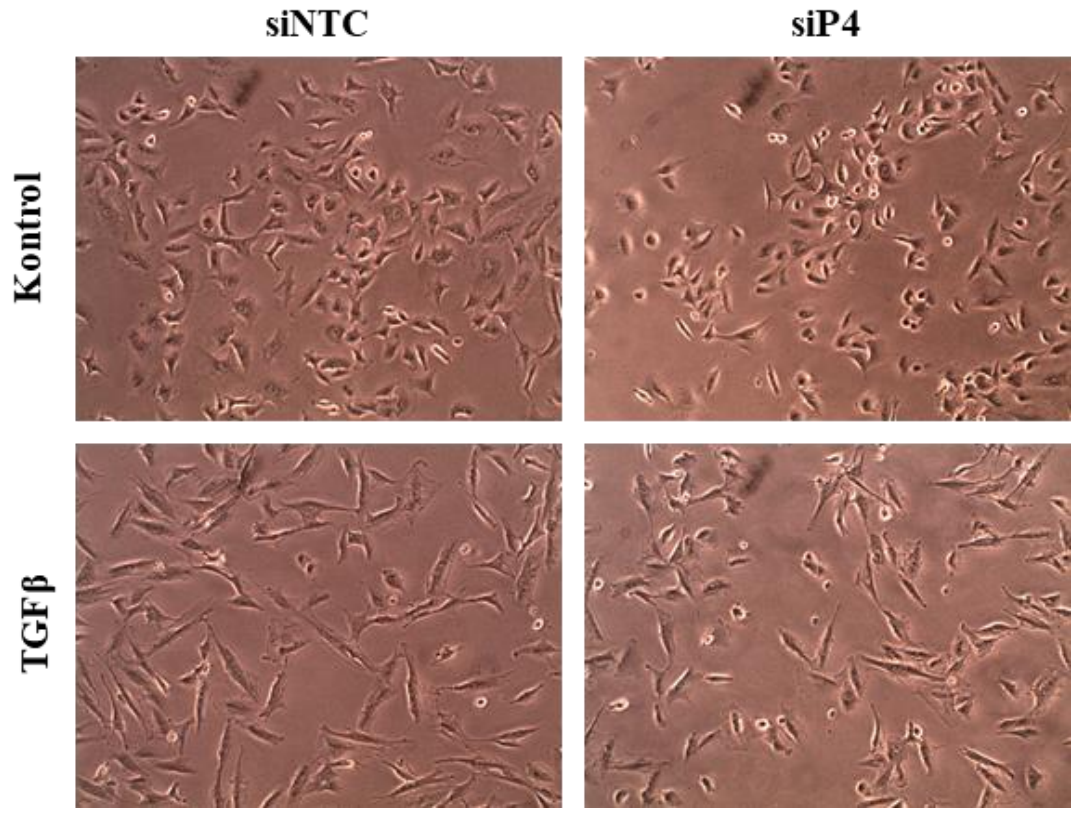
molekülü (siNTC) ile lipofectamine RNAiMAX kimyasalı kullanılarak transfekte edildi. Yirmidört saat sonra hücrelere TGFβ ya da kontrol olarak TGFβ'nın dilüsyonu için kullanılan 2 mg/ml BSA içeren PBS çözeltisi uygulandı. Kırksekiz saat sonra real-time qPCR gerçekleştirildi ve PFKFB4 mRNA seviyesinde yaklaşık % 75'lik bir azalma gözlendi (Şekil – 24: kontrol, siNTC: 1 ± 0,1; siP4: 0,23 ± 0,02; TGFβ, siNTC: 2,08 ± 0,09; siP4: 0,9 ± 0,18; p<0,01). Bu transfeksiyonlarda uygulanan siRNA'nın diğer PFKFB izoenzimlerinin ekspresyonları üzerinde hedef dışı bir etkisinin olup olmadığını anlamak için A549 hücrelerinde PFKFB4 ile beraber yüksek oranda eksprese edilen PFKFB2 ve PFKFB3 izoenzimlerinin de mRNA seviyeleri real-time qPCR ile analiz edildi. Analizler sonucunda PFKFB4 siRNA'nın bu izoenzimler üzerinde istatiksel açıdan anlamlı bir değişime neden olmadığı doğrulandı (Şekil – 25). Daha sonra invert mikroskopta hücrelerin fenotipleri incelendi. Bu anlamda incelediğimiz PFKFB4 siRNA uygulanan örneklerden kontrol grubunun, normal görünümlü yuvarlak yapılı hücrelerden oluştuğu, TGFβ uygulanan hücrelerde ise belirgin biçimde uzama ve yayılma görüldüğü ve PFKFB4'deki baskılanmanın, TGFβ'nın bu etkisini kısmen azalttığı görüldü (Şekil – 26).



Şekil – 24: A549 Hücrelerinde siRNA yöntemiyle PFKFB4'de mRNA düzeyinde elde edilen baskılanma real-time qPCR yöntemiyle ortaya konmuştur. A549 hücre ekiminden bir gün sonra kontrol siRNA (siNTC) ve PFKFB4 siRNA (siP4) uygulaması yapılan örneklere, siRNA uygulamasından 24 saat sonra 5 ng/ml TGFβ1 verildi. TGFβ uygulamasının üzerinden geçen 48 saatlik sürenin sonunda real-time qPCR yöntemiyle PFKFB4 mRNA ekspresyonları belirlendi. Endojen referans olarak GAPDH kullanıldı.



Şekil – 25: A549 hücrelerinde PFKFB4 genindeki baskılama, TGFβ etkisiyle PFKFB2 ve PFKFB3 izoformlarının ekspresyonları üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. A549 hücre ekiminden bir gün sonra kontrol siRNA (siNTC) ve PFKFB4 siRNA (siP4) uygulanan örneklere, siRNA uygulamasından 24 saat sonra 5 ng/ml TGFβ1 verildi. TGFβ uygulamasının üzerinden geçen 48 saatlik sürenin sonunda **A)** daha önce A549 hücrelerindeki mRNA ekspresyonları belirlenen PFKFB1-4 izoenzimlerinden **B)** yüksek ekspresyonu belirlenen PFKFB2 ve PFKFB3 izoenzimlerindeki mRNA ekspresyon değişimleri real-time qPCR yöntemiyle analiz edildi.

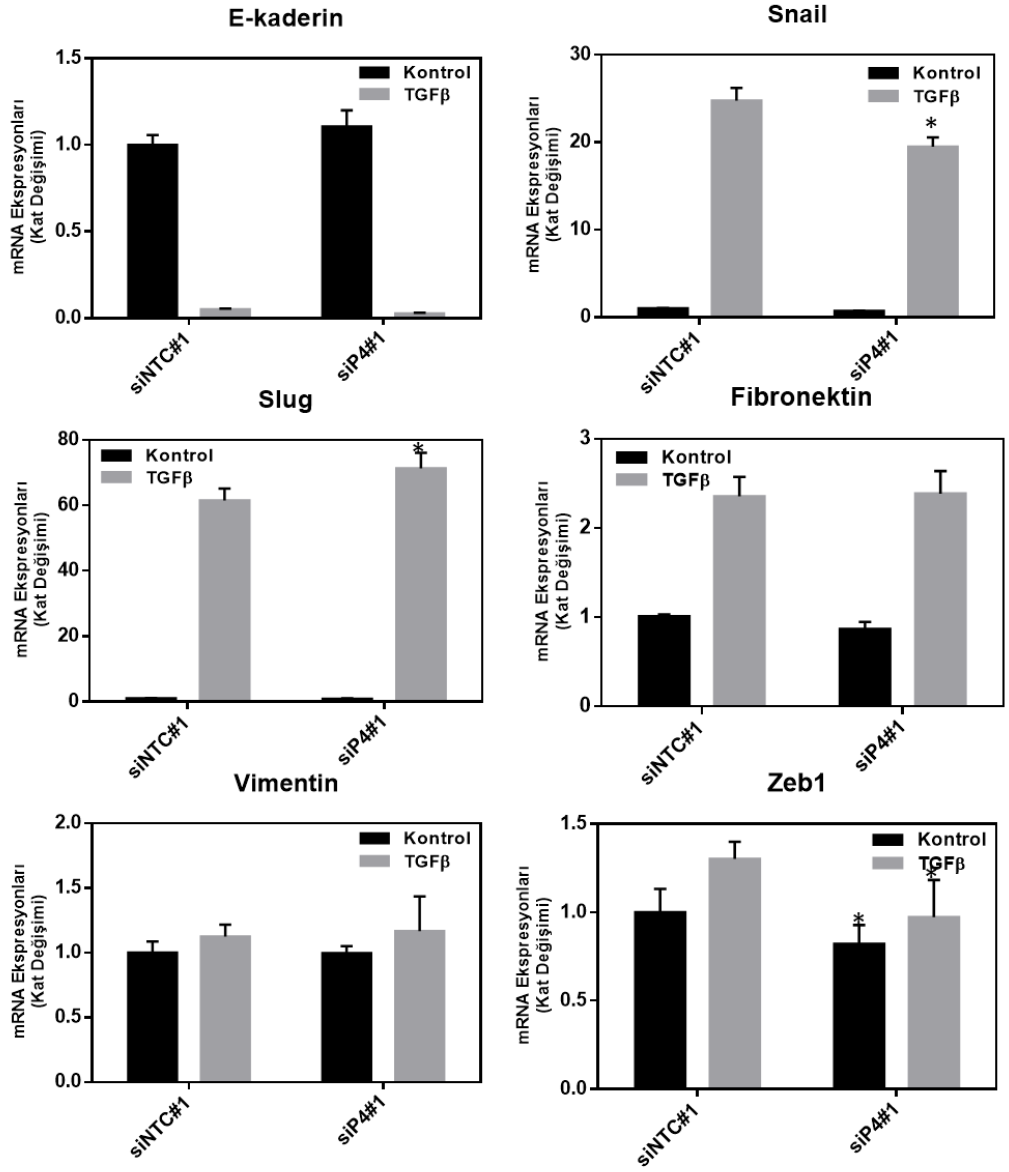


Şekil – 26: A549 kontrol ve hücrelerinde TGFβ ile indüklenen mezenkimal fenotip PFKFB4 enziminin baskılanmasıyla kısmen azalmaktadır. A549 hücre ekiminden bir gün sonra kontrol siRNA (siNTC) ve PFKFB4 siRNA (siP4) uygulanan örneklere, siRNA uygulamasından 24 saat sonra 5 ng/ml TGFβ1 eklendi. TGFβ uygulamasının üzerinden geçen 48 saatlik sürenin sonunda invert ışık mikroskobu ile örnekler fotoğraflandı.

4.2.5. A549 Hücrelerinde TGFβ ile İndüklenen EMT'de PFKFB3'ün EMT'ye Etkisi

A549 hücrelerinde TGFβ ile indüklenen EMT'de PFKFB4'ün rolü olup olmadığını değerlendirmek için, PFKFB4 siRNA ile transfekte edilen kontrol ve TGFβ uygulanan hücrelerindeki E-kaderin, Fibronektin, Vimentin, Snail, Slug ve Zeb1 mRNA ekspresyonlarını belirlemek için real-time qPCR analizleri gerçekleştirildi. Bu analizlerde, PFKFB4 siRNA'nın; TGFβ-ilişkili E-kaderin, Fibronektin ve Vimentin ekspresyonlarında herhangi bir değişikliğe neden olmadığı; ancak, TGFβ tarafından indüklenen Snail ve Zeb1 mRNA ekspresyonlarını azaltırken, Slug mRNA ekspresyonunu artırdığı görüldü (Şekil – 27). Kontrole göre nispi ekspresyon kat değişimleri: E-kaderin, kontrol, siNTC: 1 ± 0,06; siP4: 1,11 ± 0,09; TGFβ, siNTC: 0,05 ± 0,01; siP4: 0,03 ± 0,01; Snail, kontrol, siNTC: 1 ± 0,05; siP4: 0,72 ± 0,05, TGFβ, siNTC: 24,76 ± 1,46; siP4: 19,47 ± 1,08; $p<0,05$; Slug, kontrol, siNTC: 1 ± 0,1, siP4:

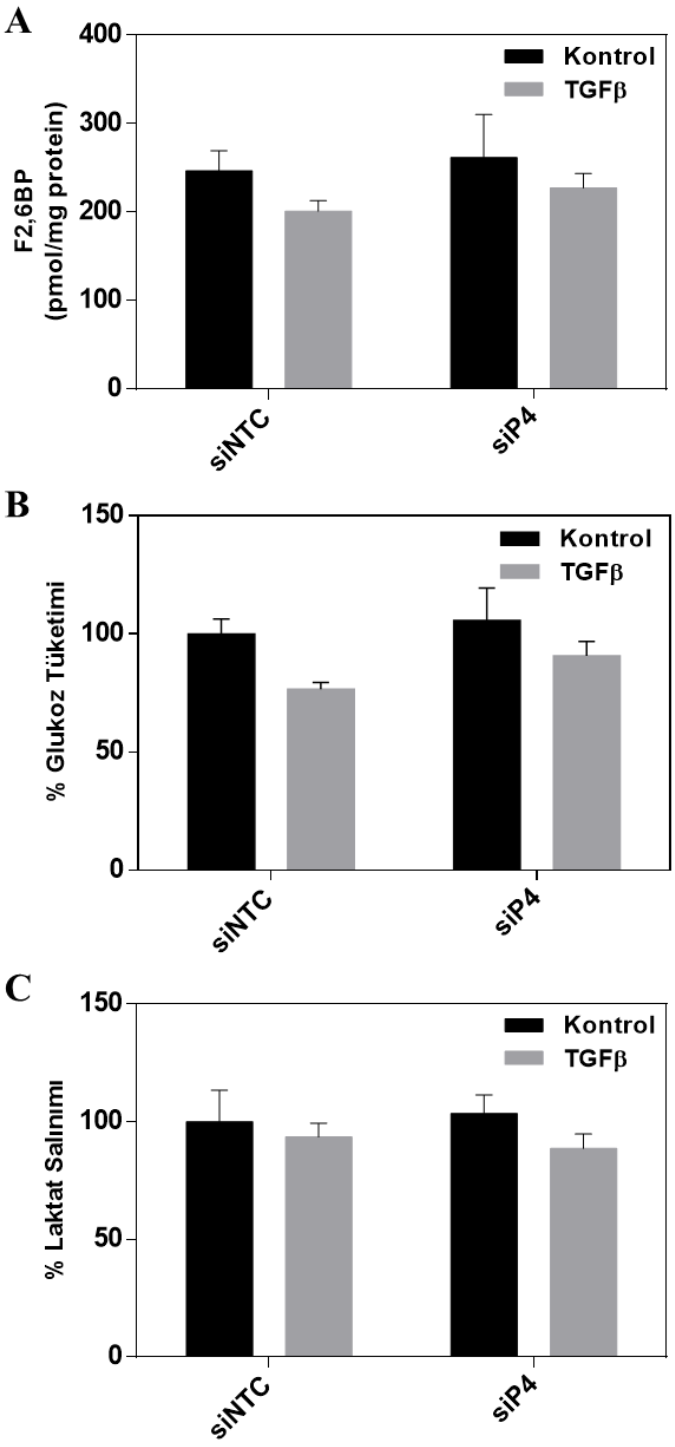
0,89 ± 0,16, TGFβ, siNTC: 61,49 ± 3,6; siP4: 71,29 ± 4,72; p<0,05; Zeb1, kontrol, siNTC: 1 ± 0,13; siP4: 0,82 ± 0,11; TGFβ, siNTC: 1,30 ± 0,09; siP4: 0,97 ± 0,21; p<0,05 ve Vimentin, kontrol, siNTC: 1 ± 0,09; siP4: 0,99 ± 0,05; TGFβ, siNTC: 1,12 ± 0,09; siP4: 1,17 ± 0,27, Fibronektin, kontrol, siNTC: 1 ± 0,02; siP4: 0,87 ± 0,08; TGFβ, siNTC: 2,36 ± 0,22; siP4: 2,39 ± 0,25.



Şekil – 27: A549 hücrelerinde TGFβ ile indüklenen Snail ve Zeb1 mRNA ekspresyonları PFKFB4 enziminin baskılanmasıyla kısmen azalırken, Slug mRNA ekspresyonu artmaktadır. A549 hücre ekiminden bir gün sonra kontrol siRNA (siNTC) ve PFKFB4 siRNA (siP4) uygulaması yapılan örneklere, siRNA uygulamasından 24 saat sonra 5 ng/ml TGFβ verildi. TGFβ uygulamasının üzerinden geçen 48 saatlik sürenin sonunda PFKFB4 enziminin baskılandığı örneklerde E-kaderin epitel belirtecinde, Fibronektin ve Vimentin mezenkimal belirteçlerinde ve Snail, Slug ve Zeb1 transkripsiyon faktörlerindeki değişimler siNTC kontrol örneğine kıyasla kat değişimi şeklinde belirlendi. *p<0,05 (kontrol örneklerine kıyasla).

4.2.6. A549 Hücrelerinde TGFβ ile İndüklenen EMT'de PFKFB3'ün F2,6BP, Glukoz Alımı ve Glikolitik Aktiviteye Ekisi

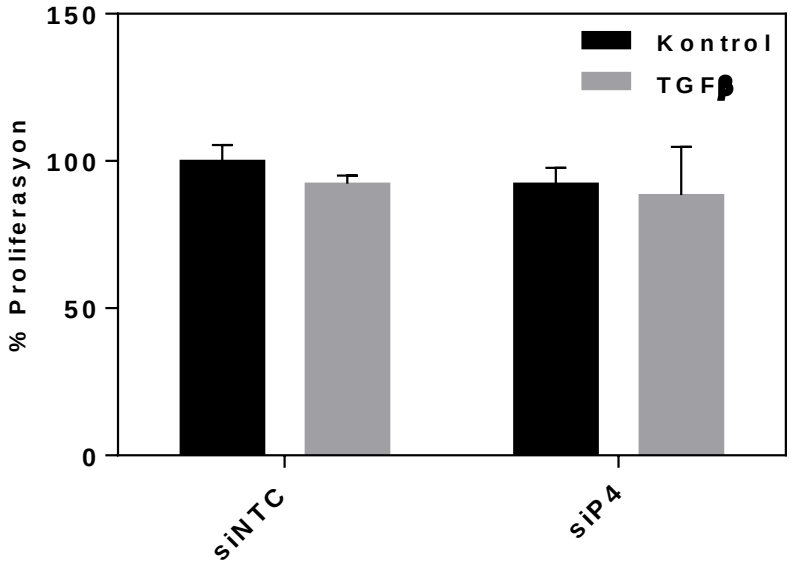
Kontrol siRNA ve PFKFB4 siRNA uygulanan hücrelere 24 saat sonra TGFβ uygulandı ve 48 saat inkübe edildi. Daha sonra besiyerinde glukoz ve laktik asit konsantrasyonları; hücre pelletlerinden, hücre içi F2,6BP seviyeleri ölçüldü. Sonuçlar değerlendirildiğinde; PFKFB4 siRNA'nın, A549 hücrelerinde TGFβ etkisi ile F2,6BP, glukoz alımı ve laktat salınımında meydana gelen azalmalara herhangi bir etkisinin olmadığı gözlendi (Şekil – 28). F2,6BP (pmol/mg protein): kontrol siNTC: 246,88 ± 22,54, siP4: 261,77 ± 48,82, TGFβ siNTC: 201,28 ± 11,93, siP4: 227,47 ± 16,52; kontrol örneğine göre % değişim olarak hesaplanan glukoz tüketim oranları, kontrol siNTC: 100 ± 6,29; siP4: 105,67 ± 13,8; TGFβ siNTC: 76,56 ± 2,9; siP4: 90,72 ± 6,04; laktat salınımları, kontrol siNTC: 100 ± 13,47; siP4: 103,58 ± 7,8; TGFβ, siNTC: 93,56 ± 5,9; siP4: 88,7 ± 6,09.



Şekil – 28: A549 hücrelerinde kontrol örneklerine göre TGFβ ile F2,6BP konsantrasyonunda, glukoz alımı ve laktat salınımında gözlenen kısmi azaltıcı etki, PFKFB4'deki baskılanma ile değişmemektedir. A549 hücre ekiminden bir gün sonra kontrol siRNA (siNTC) ve PFKFB4 siRNA (siP4) uygulaması yapılan örneklere, siRNA uygulamasından 24 saat sonra 5 ng/ml TGFβ verildi. TGFβ uygulamasının üzerinden 48 saat geçtikten sonra, **A)** F2,6BP konsantrasyonları, **B)** Glukoz tüketimindeki ve **C)** Laktat salınımlarındaki kontrol örneğine kıyasla % değişim oranları analiz edildi.

4.2.7. A549 Hücrelerinde TGFβ ile İndüklenen EMT'de PFKFB4'ün Hücre Proliferasyonuna Etkisi

TGFβ'nin bazı tümör hücreleri üzerinde onkojenik aşamaya bağlı olarak anti-proliferatif ya da pro-proliferatif etki gösterdiği bilinmektedir (Lu ve diğerleri, 2004; Massagué, 2008). A549 hücre proliferasyonu üzerinde PFKFB4'ün etkisinin değerlendirilmesi amaçlı PFKFB4 siRNA uygulanan ve 48h süreyle TGFβ uygulanan hücrelerin thoma lamı ile sayılmasıyla elde edilen sonuçlar kontrol siRNA örneğine göre yüzde değişim olarak kıyaslandığında, PFKFB4'ün baskılanmasının kontrol ve TGFβ uygulanan örneklerde anlamlı bir değişime neden olmadığını göstermektedir (Şekil – 29). Örnekler arası % proliferasyon değişimine ait değerler, kontrol, siNTC: 100 ± 5,44; siP4: 92,31 ± 5,43; TGFβ, siNTC: 92,3 ± 2,72; siP4: 88,46 ± 16,32.



Şekil – 29: A549 kontrol ve TGFβ örneklerinde PFKFB4 enziminin proliferasyon üzerinde bir etkisi saptanmamıştır. A549 hücre ekiminden bir gün sonra kontrol siRNA (siNTC) ve PFKFB4 siRNA (siP4) uygulaması yapılan örneklere, siRNA uygulamasından 24 saat sonra 5 ng/ml TGFβ verildi. TGFβ uygulamasının üzerinden geçen 48 saatlik sürenin sonunda yapılan hücre sayımından elde edilen değerler, kontrol siNTC örneğine kıyasla % değişim olarak belirlendi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tümör lezyonlarının insan vücudundan cerrahi yöntemlerle tamamiyle uzaklaştırılmasının önündeki en önemli engel olan metastaz kabiliyeti, kanserden ölümlerin temel nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır (Yang ve diğerleri, 2006). Normalde embriyonik dönemde ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik süreçlerde görülen EMT, kanserli hücrenin vücutta yayılımının gerçekleşmesindeki ana mekanizma olması dolayısıyla kanser metastazıyla alakalı çalışmalara temel teşkil etmektedir (Gillies ve diğerleri, 2008). EMT sürecinin başlatılmasında rol oynayan FGF, Wnt, Notch gibi çeşitli faktörler arasında, EMT'nin önemli bir indükleyicisi olması dolayısıyla TGFβ ayrı bir önem arzetmekte ve çoğu epitel orijinli kanser türünde EMT'yi indüklediği bilindiğinden kanser çalışmalarında EMT'nin indüklenmesi amacıyla yoğun şekilde kullanılmaktadır (Bellomo ve diğerleri, 2016; Saitoh ve Miyazawa, 2012).

'Warburg Etkisi' olarak da bilinen kanserli hücrelerde görülen en önemli metabolik değişim, tümör hücrelerinin normal hücrelere kıyasla yüksek oranda glikolize bağımlı hale gelmeleridir. Tümör hücrelerinde glikoliz, yeterli oksijen varlığında bile inhibe olmamakta; glikolizin son ürünü pirüvatın laktata dönüşümü devam etmektedir (aerobik glikoliz; Warburg etkisi) (Warburg ve diğerleri, 1923). Kanserli hücrelerde çoğunlukla aerobik glikolizin görülmesi, hızlı ATP üretimi, glukozun PPP gibi çeşitli biyosentez yolaklarına yönlendirilmesi ve hücresel redoks dengesinin korunması gibi proliferasyon için gerekli temel ihtiyaçların karşılanması dolayısıyladır (Martinez-Outschoorn ve diğerleri, 2017). Aerobik glikolizin, EMT sürecine desteğiyle alakalı yakın zamanda elde edilen birçok kanıt mevcuttur fakat bu desteğin tam olarak nasıl gerçekleştiği bilinmezliğini korumaktadır (Dong ve diğerleri, 2013; Walenta ve Mueller-Klieser, 2004).

TGFβ'nın EMT sürecini destekleyici rolüne ilişkin ortaya konulan çok sayıdaki çalışma ve kanserdeki metabolik yeniden düzenlenmenin EMT sürecinin gerçekleşmesinde etkili olduğunu gösteren kanıtlara rağmen, TGFβ ile indüklenen EMT'ye kanserdeki metabolik yeniden programlanmanın etkisine dair oldukça az sayıda çalışma mevcuttur (Guo, 2017; Masin ve diğerleri, 2014; Rodríguez-García ve diğerleri, 2017). Bu çalışma ile TGFβ ile indüklenen EMT'de glikolizin regülasyonunda yer alan PFKFB enzim ailesinin rolünün anlaşılması amaçlanmıştır.

TGFβ ile indüklenen EMT'deki rolünü araştırdığımız PFKFB enzim ailesi, kanser hücrelerin temel enerji yolağı olan glikolizin en önemli hız sınırlayıcı basamağı olan F6P'dan F1,6BP oluşumunu katalizleyen PFK-1 enzimini regüle etmektedir (Jason Chesney, 2006). Tek bir polipeptit üzerinde hem kinaz hem fosfataz domaini içeren bu enzim ailesinin, PFKFB1, PFKFB2, PFKFB3 ve PFKFB4 (PFKFB1-4) olmak üzere dört izoformu bulunmaktadır. Enzimlerin kinaz aktivitesi, F6P'dan F2,6BP oluşumunu katalizlerken; fosfataz aktivitesi F2,6BP'ın F6P'a dönüşümünü katalizlemektedir. Kanser hücrelerinde F2,6BP, PFK-1 enziminin en kuvvetli allosterik aktivatörüdür ve genel olarak F2,6BP konsantrasyonu onkojenik transformasyon ile artmaktadır (Kole ve diğerleri, 1991; Ros ve Schulze, 2013; Van Schaftingen ve diğerleri, 1982). PFKFB izoenzimleri arasında PFKFB3, yüksek kinaz aktivitesi (~740:1) ile diğer enzim izoformlarından ayrılmaktadır (Yalcin ve diğerleri, 2009). Total PFKFB kinaz aktivitesinin baskın olduğu hücrelerde ya da durumlarda glikolik aktivite artarken, total PFKFB fosfataz aktivitesinin fazla olduğu hücrelerde glikolitik hızda azalma olmaktadır.

PDAC, prognozu son derece kötü bir kanser türü olup, metastaza son derece yatkındır. PDAC, çoğunlukla metastatik evrede yakalanabilmektedir ve önümüzdeki on yıl içinde kanserden ölümlerde üçüncü sırayı alacağı öngörülmektedir (Alvarez ve diğerleri, 2019; Yang ve diğerleri, 2020). Genel olarak hipovasküler bir tümör olarak bilinir ve bu durum kanser hücreleri için gerekli biyosentez bileşenlerinin edinilememesi ve enerji krizine yol açar. PDAC hücreleri, enerji metabolizmalarındaki değişimle, 'Warburg Etkisi' olarak bilinen metabolik yeniden programlanmaya yöneldiklerinden yüksek oranda glikolize bağımlılardır (Hsu ve Sabatini, 2008). Pankreas kanserlerinin tümünde TGFβ sinyal yolağında yer alan genlerden en az birinin mutasyona uğradığı ve TGFβ ekspresyonunun belirgin oranda arttığı bilinmektedir. TGFβ'daki bu artış, pankreatik kanser türlerinde düşük sağ kalım oranı ve metastaz ile ilişkilendirilmektedir (Jones ve diğerleri, 2008; Shen ve diğerleri, 2017). TGFβ sinyalinin aktif olduğu bu kanser türünde EMT, in vivo ve in vitro PDAC'nin önde gelen özelliklerinden biridir ve pankreatik kanserlerde invazif özelliğin EMT ile ilişkili olduğu görülmüştür (Wang ve diğerleri, 2017).

Çalışmada kullanılan modellerden biri olan Panc1 hücre hattı, pankreas tümörlerinin % 85'inden fazlasını oluşturan PDAC tümörlerinden elde edilmiş olup, TGFβ ile indüklenen EMT modeli olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Wang ve diğerleri, 2012). Ayrıca, uygun şartlarda yüksek göç ve invazif kapasite kazanabildiği bilinmektedir (Deer ve diğerleri, 2010). EMT indükleyicisi olarak TGFβ'nın, E-kaderin gibi epitel belirteçlerin kaybı ve N-kaderin, Vimentin gibi mezenkimal belirteçlerin kazanımını sağladığı bilinmektedir (Bellam ve Pasche, 2010). Ayrıca, mezenkimal fenotipi indükleyen ve E-kaderin, Occludin gibi epitel proteinleri baskılayan Snail, Slug, Twist ve Zeb1 gibi EMT sürecine aracılık eden transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarının TGFβ ile indüklenen EMT sürecinde arttığı bilinmektedir (Miyazawa ve Saitoh, 2012). EMT sürecinde rol oynayan belirteç ve transkripsiyon faktörlerindeki değişimlerle hücrelerarası bağlantı proteinlerinde ve hücre iskelet proteinlerinde meydana gelen farklılaşmanın bir sonucu olarak hücre fenotipinde değişimler meydana gelmektedir. EMT sürecinde hücrelerarası bağlantı proteinlerindeki azalma ve değişen hücre iskelet yapısıyla, epitel hücre özelliği olan sıkı istiflenmiş, polar hücre yapısı; ince, uzun, çıkıntılı ve yayılmış görünümlü mezenkimal fenotipe dönüşmektedir (Nalluri ve diğerleri, 2015). EMT sürecindeki bu temel değişimler doğrultusunda, pankreas hücre hattı Panc1'da TGFβ uygulaması sonrası EMT'nin indüklenmesine dair, hücre fenotipi ve epitel/mezenkimal belirteç ve transkripsiyon faktörlerindeki değişimler analiz edildi. Invert ışık mikroskobuyla elde edilen hücre görüntülerinde, kontrol hücrelerine kıyasla TGFβ uygulanan hücrelerde, ince, uzun, çıkıntılı hücre yapısının hâkim olduğu görüldü. TGFβ uygulanan örneklerde; epitelyal belirteç E-kaderin ekspresyonunda önemli oranda azalma olduğu, E-kaderin geninin (CDH1) promotörüne bağlanarak transkripsiyonunu baskılayan Snail ve Slug transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarında da artış olduğu görüldü. Kontrol ve TGFβ örneklerinde, IF yöntemiyle elde edilen görüntülerde E-kaderin protein yoğunluğunun, TGFβ uygulamasıyla kontrol örneğine kıyasla neredeyse kaybolduğu gözlendi. Elde edilen veriler, Panc1 hücrelerine 48 saat süre ile 10 ng/ml TGFβ1 uygulanmasının EMT'yi indüklediği göstermektedir.

EMT sürecinde kanserli hücrelerin temel gereksinimlerini karşılamak amaçlı metabolik olarak yeniden programlanabildiğine yönelik ve glikolitik olarak daha aktif olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (Dong ve diğerleri, 2013; Halldorsson ve diğerleri, 2017; Kim ve diğerleri, 2017). TGFβ tarafından indüklenen EMT'nin Panc1 hücrelerindeki metabolik yeniden programlanma yönünde bir değişime sebep olup olmayacağının belirlenmesi amaçlı, TGFβ uygulanmayan kontrol hücreleri ve TGFβ uygulanan hücreler arasındaki F2,6BP konsantrasyonları, glukoz tüketimleri ve laktat salınımları incelendi. TGFβ uygulamasıyla F2,6BP konsantrasyonunun, glukoz alımının ve laktat üretiminin, kontrol örneklerine kıyasla yaklaşık 2 kat artış gösterdiği, dolayısıyla TGFβ ile EMT'nin indüklenmesinin Panc1 hücrelerinde glikolitik akışı hızlandırıcı etki oluşturduğu saptandı.

TGFβ ile glikolitik akıştaki durumun belirlenmesinin ardından, hücrelere TGFβ uygulanmasının, F2,6BP miktarının regüle edilmesinden sorumlu enzim ailesi PFKFB'nin mRNA ve protein düzeylerinde bir değişikliğe yol açıp açmadığının belirlenmesi amaçlandı. Kontrol örnekleri ve TGFβ uygulanan örneklerdeki PFKFB enzimlerinin mRNA seviyeleri real-time qPCR yöntemiyle analiz edildi. Kontrol örneklerine kıyasla TGFβ uygulanan örneklerde PFKFB1, 2 ve 4 izoenzim mRNA ekspresyonlarında önemli bir değişim gözlenmezken, PFKFB3 mRNA ekspresyonunun yaklaşık 2,5 kat arttığı görüldü. Western blotlama yöntemiyle protein düzeyindeki değişimi incelenen PFKFB3 proteininin, PFKFB3 mRNA ekspresyonundaki artış ile paralel şekilde artış gösterdiği belirlendi. Bir önceki aşamada, deneysel olarak elde edilen F2,6BP konsantrasyonundaki artış, PFKFB enzimlerinden bir veya birkaçının artan kinaz aktivitesine işaret etmekte ve yüksek kinaz aktivitesi bilinen PFKFB3 ekspresyonundaki artışla bu ihtimalin doğrulanması, Panc1 hücrelerinde TGFβ ile indüklenen EMT'deki glikolitik artışa PFKFB3 enziminin aracılık edebileceğini göstermektedir.

Panc1 hücrelerinde TGFβ ile artan PFKFB'ün metabolik yeniden programlanma ve EMT'ye yönelik etkilerinin anlaşılması amacıyla iki farklı kontrol siRNA ve PFKFB3 siRNA uygulanan örneklere, bir gün sonra TGFβ uygulaması yapıldı. ECM'in yıkımında ve metastaz sürecinde rol alan hücresel çıkıntıların bazı glikolitik enzimlerle ilişkisi bilindiğinden, PFKFB3'ün baskılanmasının, Panc1 hücrelerinde TGFβ ile

indüklenen hücre fenotipinde bir değişime yol açıp açmadığı incelendi (Attanasio ve diğerleri, 2011). TGFβ etkisiyle hücrelerde görülen çıkıntı oluşumlarının ve mezenkimal fenotipteki ince, uzun hücre görüntüsünün, PFKFB3'ün baskılandığı, TGFβ uygulanan örneklerde azaldığı görüldü. Böylelikle, Panc1 hücrelerinde TGFβ ile EMT'nin indüklenmesiyle elde edilen fenotipik değişimde PFKFB3'ün rolünün olabileceği saptanmış oldu.

Tümör hücrelerinin onkojenik aşamalarına göre proliferasyonu önleyici veya destekleyici etkileri bilinen TGFβ'nın, Panc1 hücrelerinde proliferatif etkisi incelendiğinde kontrol hücrelerine kıyasla TGFβ uygulanan hücrelerin daha yavaş çoğaldığı, TGFβ ile artan PFKFB3 ekspresyonunun baskılanmasıyla kontrol hücrelerinde proliferasyonun azaldığı görülürken; TGFβ uygulanmasının ek bir azalmaya neden olmadığı görüldü (Massagué, 2008).

Panc1 hücrelerinde TGFβ ile indüklenen EMT'de PFKFB3'ün EMT belirteç ve transkripsiyon faktörleri özelinde bir etkiye sahip olup olmadığının belirlenmesi amaçlı hücrelerdeki E-kaderin, Snail, Slug ve Zeb1 ekspresyonları analiz edildi. Bu analizlerde, PFKFB3'ün baskılanmasının TGFβ tarafından indüklenen Zeb1 ve Slug transkripsiyon faktörleri ile TGFβ tarafından baskılanan E-kaderin epitel belirtecinin mRNA ekspresyonları üzerinde bir etkisinin olmadığı; ancak, TGFβ ile indüklenen Snail mRNA ekspresyonunu önemli oranda azalttığı görüldü. PFKFB3'deki baskılanmanın Snail'i azaltıcı etkisinin protein düzeyinde de gerçekleştiği belirlendi. TGFβ ile indüklenen Snail'de PFKFB3'ün baskılanmasıyla protein düzeyinde görülen azalmanın (yaklaşık % 80), mRNA ekspresyon düzeyindeki azalmaya (yaklaşık % 50) kıyasla daha yüksek olduğu görüldü. mRNA ve protein düzeyindeki değişkenlik, birçok faktörün etki edebileceği ve sıkça rastlanılabilen olası bir durumdur. Bununla birlikte, PFKFB3 proteini veya PFKFB3 ile oluşturulan F2,6BP'nin, Snail proteini üzerinde posttranslasyonel modifikasyonlar gibi protein stabilizasyonunu artırıcı yöndeki bir etkisi olasılıklar dâhilindedir (Zhou ve diğerleri, 2004). PFKFB3'deki azalma ile Snail ekspresyonundaki baskılanmaya rağmen, Snail transkripsiyon faktörünce ekspresyonunun baskılandığı bilinen E-kaderin düzeyinde artış görülmemesinin, yine E-kaderin'i baskılayıcı etki gösterebilen Slug ve Zeb1 transkripsiyon faktörlerinin etkili olabileceği göz önünde bulunduruldu. Bu hipotezden yola çıkarak, TGFβ ile yüksek

mRNA ekspresyonu belirlenen Slug'da PFKFB3'deki baskılanma ile azalma olmaması, E-kaderin seviyesinde bir değişim görülmemesini açıklayabilir (Lamouille ve diğerleri, 2014; Peinado ve diğerleri, 2007).

Panc1 hücrelerinde TGFβ ile EMT'nin indüklenmesine eşlik eden glikolitik akıştaki artışa PFKFB3'ün etkisinin değerlendirilmesine yönelik, PFKFB3 ekspresyonu siRNA yöntemi ile baskılanan ve TGFβ uygulanan hücrelerdeki F2,6BP seviyesi ile glukoz tüketimi ve laktat üretimi karşılaştırıldı. F2,6BP konsantrasyonundaki artışın PFKFB3'ün baskılanmasıyla yaklaşık olarak kontrol seviyesine gerilemesi, bu etkinin yüksek oranda PFKFB3 aracılığıyla gerçekleştiğinin anlaşılmasını sağlamıştır. EMT ile glukoz alımı ve laktat salınımındaki artışların, PFKFB3 siRNA uygulanan örneklerde kısmen azalmış olması, artan glukoz alımı ve laktat salınımında PFKFB3'ün etkisinin varlığını, ancak başka faktörlerin de bu artışta yer aldığını göstermektedir. Panc1 hücrelerinde artan glikolitik akış için PFKFB3'ün gerekliliği kesin gibi görünse de, radyoaktif işaretli bir glukoz analoğu kullanılarak NMR veya LS/MS yöntemleriyle sağlaması yapılabilir. F2,6BP seviyesinde belirlenen önemli orandaki düşüşe rağmen glikolitik akışta PFKFB3'deki azalmayla kısmen daha düşük oranda bir yavaşlama gözlenmiştir. Panc1 hücrelerinde belirlenen yüksek F2,6BP seviyesinin (~25 pmol/mg protein), literatürde bildirilen çoğu transforme olmuş hücre hattında belirlenen F2,6BP konsantrasyonlarına (ör: Hela= ~3,5 pmol/mg protein; MCF-7= ~3,5 pmol /mg protein; H460= ~8 pmol/mg protein) kıyasla oldukça yüksek olması, PFK-1'in maksimum allosterik aktivasyonu için gerekli konsantrasyonu aşacak düzeyde olduğunu işaret edebilir. Dolayısıyla, F2,6BP seviyesinde görülen azalmanın, glikolitik hıza yansıması daha az olmuş olabilir (Chesney ve diğerleri, 2014; Imbert-Fernandez ve diğerleri, 2014; Yalcin ve diğerleri, 2014).

EMT süreci, kanserden ölümlerin en önemli nedeni olan invazyon ve göç mekanizmalarının temelinde yer almaktadır ve TGFβ ile indüklenen EMT'nin artan invazif özellikle ilişkisi bilinmektedir (Heldin ve diğerleri, 2012; Yang ve Weinberg, 2008). Epitel belirteç E-kaderin protein miktarındaki azalmanın ve EMT transkripsiyon faktörlerinin tek başlarına bile kanser hücrelerinde invazyon sürecini başlatabildiğine dair çalışmalar mevcuttur (Joseph ve diğerleri, 2009; Naber ve diğerleri, 2013; Onder ve diğerleri, 2008). Tüm bu etkilerden yola çıkarak, Panc1 hücre hattında, PFKFB3

aracılığıyla gerçekleşen metabolik değişim ve artan Snail ekspresyonunun TGFβ ile indüklenen EMT'deki invazif özellik ile ilişkisinin anlaşılması amaçlı matrijel invazyon analizi uygulandı. Analiz edilen invazyon sonuçlarında, kontrol siRNA uygulanan hücre grubundaki TGFβ uygulanan örneklerde TGFβ uygulanmayan örneklere kıyasla yaklaşık 4 kat daha fazla hücrenin matrijelden geçtiği, PFKFB3 siRNA uygulanan örneklerde ise TGFβ etkisiyle oluşan bu etkinin neredeyse kontrol seviyesine kadar gerilediği görüldü.

Elde edilen sonuçlardan hareketle, Panc1 hücrelerinde, TGFβ ile PFKFB3 artışının Snail ekspresyonu artırdığı ve glikolitik akıştaki artışta rol aldığı belirlendi. TGFβ ile indüklenen EMT ile artan invazyona PFKFB3'ün etkisinin incelenmesiyle, PFKFB3'deki baskılanmanın, artan invazyonu neredeyse tamamen ortadan kaldırdığı görüldü. İnvazyon artışının elimine edilmesinde Snail'in indüklenmesinde rol aldığı belirlenen PFKFB3'ün baskılanmasının, TGFβ etkisiyle meydana gelen Snail artışını ortadan kaldırması dolayısıyla rolü olabileceği belirlendi. Böylelikle, Panc1 hücresinde TGFβ ile EMT'nin indüklenmesine yönelik etkileri belirlenen PFKFB3 enzimi ile kanserdeki metabolik yeniden programlanmanın, kanserli hücrelerin temel metabolik ihtiyaçlarının karşılanmasından daha öte; bu çalışma ile PFKFB3'ün TGFβ-ilişkili invazyon ve metastazı destekleyecek düzeyde etkileri olabileceği görülmüş oldu.

Akciğer kanseri, gelişmiş ülkelerin çoğunda kansere bağlı mortalitenin önde gelen nedenidir ve akciğer kanser türleri arasında NSCLC, yaklaşık % 80 gibi bir oranla en fazla görülen adenokarsinom kanser türüdür. Metastaz ve tümörün tekrar nüksetmesi dolayısıyla 5 yıllık sağ kalım oranı % 15'in altındadır (Bian ve diğerleri, 2017). TGFβ1 ekspresyonunun normal akciğer dokusuna kıyasla NSCLC'de önemli ölçüde yüksek olduğu ve TGFβ1 proteinindeki aşırı ekspresyonun akciğer kanser gelişimi ve metastazla ilişkili olduğu bilinmektedir. Düşük TGFβ1 ekspresyonu belirlenen hastalarda 5 yıllık sağ kalım oranının yüksek TGFβ1 ekspresyonu belirlenen hastalara kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür (Huang ve diğerleri, 2014). TGFβ sinyal yolağının baskılanmasının akciğer adenokarsinomunda hücre proliferasyonu, invazyon ve metastazı azalttığı rapor edilmiştir (Xu ve diğerleri, 2011).

Çalışmada yer verilen diğer bir hücre hattı olan A549, NSCLC tümörlerinden izole edilmiş olup, TGFβ-ilişkili EMT modeli olarak çalışmalarda kullanılmıştır (Jiang

ve diğerleri, 2015). A549 hücrelerinde TGFβ ile EMT'deki indüklenme, ilk aşamada kontrol hücrelerindeki sıkı istiflenmiş, yuvarlak hücre yapısının, uygulanan TGFβ ile yayılmış, hücresel çıkıntıları gözlenen, ince, uzun hücrelere dönüşümüyle fenotipik olarak belirlendi. EMT sürecinde arttığı veya azaldığı bilinen önemli belirteç ve transkripsiyon faktörlerinin gen ekspresyon düzeyindeki analizleriyle: epitel belirteç E-kaderin'in mRNA ekspresyonunda 20 kat azaldığı, mezenkimal belirteçler vimentin ve fibronektin mRNA ekspresyonlarının sırayla 2 ve 3 kat arttığı ve snail, slug ve zeb1 transkripsiyon faktörlerinin sırayla 6, 10 ve 1,6 kat artış gösterdiği belirlendi. Bu kapsamda snail ve E-kaderin'deki değişimler protein düzeyinde incelendiğinde, kontrol örneğine kıyasla TGFβ örneğinde E-kaderin protein düzeyinin büyük oranda azaldığı ve Snail'in arttığı görüldü. Böylelikle TGFβ ile A549 hücrelerinde EMT sürecinin indüklendiği kanıtlanmış oldu.

TGFβ ile indüklenen EMT sürecinin A549 hücrelerinde, glikoliz özelinde metabolik olarak bir değişime neden olup olmadığının anlaşılması için kontrol ve TGFβ ile indüklenen hücrelerde glukoz alımı, laktat salınımı ve F2,6BP konsantrasyonu analiz edildi. TGFβ ile Panc1 hücrelerinde artan glikolitik akıştakinin aksine, F2,6BP konsantrasyonunda yaklaşık % 15, glukoz tüketiminde yaklaşık % 20 ve laktat salınımında da yaklaşık % 10'luk bir azalma olduğu saptandı. Elde edilen bu sonuçlar ilk olmakla beraber; Xu ve Lu tarafından yapılan araştırmada, benzer şekilde TGFβ'nın A549 hücrelerinin invazyon ve göç kapasitesini artırdığı ve bu fenotip için mitokondriyal fonksiyon ve OXPHOS'daki artışın gerekli olduğu gösterilmiştir. TGFβ ile elde edilen bu etkinin, EMT süreci için gerekli artan enerji gereksinimini karşılamak amaçlı olabileceği üzerinde duruldu (Lu ve Xu, 2015). TGFβ'nın A549 hücreleri özelindeki bu etkisi, yani TGFβ ile EMT'nin indüklenmesiyle oluşan mitokondriyal solunuma yönelim, yapılan analizlerle elde edilen glikolitik aktivitedeki yavaşlama ile uyumludur ve A549 hücrelerindeki metabolik değişimin anlaşılmasını sağlamaya yardımcı olabilir. Ayrıca elde edilen bu veriler, TGFβ ile indüklenen EMT'nin farklı hücrelerde farklı metabolik fenotiplere neden olabileceğine işaret etmektedir.

A549 hücrelerinde, TGFβ ile glikolitik akıştaki yavaşlamanın belirlenmesinin ardından, F2,6BP miktarının regüle edilmesinden sorumlu PFKFB izoenzimlerinde, TGFβ etkisiyle oluşabilecek değişimler, mRNA ve protein düzeylerinde incelendi.

Kontrol örneklerine kıyasla, TGFβ uygulanan örneklerde, PFKFB1-3 izoenzim ekspresyonlarında ve protein düzeylerinde önemli bir değişim gözlenmezken, PFKFB4 izoenziminin hem mRNA ve hem de protein düzeyinde önemli oranda arttığı görüldü.

A549 hücrelerinde PFKFB4'ün baskılanmasının, F2,6BP miktarını ve glikolitik akışı azalttığı; PFKFB4 aşırı ekspresyonunun ise F2,6BP konsantrasyonunu ve glikolizi artırdığı 2014 yılında Chesney ve grubu tarafından yayınlanan bir makaleyle ortaya konulmuştur (Chesney ve Lane, 2014). Ancak, Ros ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; PFKF4'ün tümör hücrelerinde artan F2,6BP konsantrasyonuna katkıda bulunmadığı; hatta PFKFB4'ün siRNA ile azaltılmasının prostat kanseri hücrelerinde F2,6BP konsantrasyonunu artırdığı gösterilmiştir (Ros ve diğerleri, 2012). Bu bulgu da; PFKFB4'ün kinaz aktivitesinin tümör hücrelerinde baskın olmayabileceği görüşünü desteklemekte olup, çalışmamızda elde edilen veriler kısmen de olsa bu çalışma ile uyumludur.

Chesney ve Lane (2014) tarafından yapılan çalışmanın aksine, bu çalışmada PFKFB4'ün baskılanmasının F2,6BP konsantrasyonunu etkilemediği görüldü (Chesney ve Lane, 2014). İki çalışma arasında gözlemlenen bu farklılık, kullanılan farklı siRNA'lardan ya da farklı pasajlardaki hücrelerin kullanılmasından kaynaklanabilir. Ancak yine de; söz konusu çalışmada rapor edilen yüksek kinaz aktivitesi (4,3:1) belirlenen PFKFB4 enziminin, A549 hücrelerinde TGFβ etkisiyle nispi kinaz aktivitesinde azalma meydana gelmiş olabilir (Chesney ve Lane, 2014). Bu durum da, TGFβ ile PFKFB4 proteininin posttranslasyonel modifikasyonundaki olası bir değişim ile ilişkili olabilir. Örneğin, PFKFB2 izoenzimin AKT ve p90 ribozomal S6 kinaz tarafından posttranslasyonal modifikasyona uğrayarak kinaz aktivitesinin arttığı bilinmektedir (Houles ve diğerleri, 2018; Novellasdemunt ve diğerleri, 2013). Ayrıca, yayınlanan kinaz/fosfataz aktivite değerlerinin in vitro bakterilerde sentezlenen ve dolayısı ile posttranslasyonel modifikasyonu olmayan rekombinant enzimler ile elde edildiği düşünüldüğünde, her bir izoenzimin gerçek kinaz/fosfataz aktivite değerleri ve hücre içi F2,6BP konsantrasyonuna katkıları kontrollü genetik deneylerle değerlendirilmelidir. İlerleyen çalışmalarda; TGFβ ile PFKFB4'ün posttranslasyonel modifikasyonunda değişim olup olmadığı ve bu nedenle PFKFB4'ün nispi

kinaz/fosfataz aktivite oranının değişip değişmediği immünpresipitasyon, kütle spektrometresi ve in vitro kinaz analizleri ile belirlenmesi gerekmektedir.

Diğer taraftan bu tez çalışmasında ve son zamanlarda grubumuz tarafından yayınlanan bir çalışmada; birçok tümör hücresinde PFKFB2, PFKFB3 ve PFKFB4 izoenzimlerinin birlikte eksprese edildiği gösterildi (Ozcan ve diğerleri, 2020). Bu veriler; tümör hücrelerinde PFKFB izoenzimlerinin farklı fonksiyonları olabileceği görüşünü desteklemektedir. Örneğin; yapılan çalışmalarda, PFKFB3'ün tümör hücrelerinin çekirdeğine lokalize olduğu, hücre siklüsünü hızlandırdığı ve tümör hücrelerinin canlılığı için gerekli olduğu gösterilmiştir (Yalcin ve diğerleri, 2009; Yalcin ve diğerleri, 2014). PFKFB4'ün ise; hızla çoğalan tümör hücreleri için gerekli olan metabolitlerin ve anti-oksidan NADPH'nin temini için esansiyel olan pentoz fosfat geçidinin aktivitesini artırdığı rapor edilmiştir (Ros ve diğerleri, 2012). A549 hücrelerinde TGFβ ile mitokondriyal aktivitenin ve OXPHOS'un arttığını gösteren çalışma ile uyumlu olarak, tez çalışmamızda gözlemlenen PFKFB4 ekspresyonundaki artış pentoz fosfat geçidinin aktivitesini artırmış olabilir (Lu ve Xu, 2015). Bu da, F2,6BP konsantrasyonunda azalmayı ve dolayısı ile glikolitik geçitin hızında yavaşlamayı gerekli kılabilir. Bu hipotez, çalışmamızda elde edilen TGFβ ile F2,6BP seviyesi, glukoz alımı ve laktat üretiminde görülen azalmayı açıklayabilir. Bilindiği gibi, OXPHOS'un hızlanması ve mitokondriyal solunum, hücrelerde ROS oluşumunda artışa neden olmaktadır (Liemburg-Apers ve diğerleri, 2015). ROS, EMT ve tümör hücrelerinin malign özelliklerinin devamı için gerekli olmakla beraber, fazla miktarda oluşan ROS, tümör hüclerinin sağ kalımını olumsuz yönde etkilemektedir. ROS ile oluşan harabiyeti engellemek için tümör hücrelerinin pentoz fosfat geçidinin aktivitesini artırdığı bilinmektedir (Liemburg-Apers ve diğerleri, 2015).

A549 hücrelerinde PFKFB4'ün baskılanması, TGFβ tarafından indüklenen Snail üzerinde ılımlı bir düzeyde etki göstermiştir. Ancak, ilginç bir şekilde A549 hücrelerinde, PFKFB4 siRNA, TGFβ'nın Slug üzerindeki etkisini daha da artırmıştır. Hem Snail ve hem de Slug'ın E-kaderin ekspresyonunu baskıladığı dikkate alındığında, PFKFB4 siRNA'nın TGFβ tarafından baskılanan E-kaderin mRNA ekspresyonundaki azalmaya bir etkisinin olmaması, PFKFB4'ün Snail ve Slug üzerindeki farklı yönlerdeki etkisinden kaynaklanabilir.

Sonuç olarak; bu çalışma ile TGFβ'nın PFKFB izoenzimlerinin ekspresyonu üzerindeki etkileri ilk defa ortaya konulmuştur. Özetle; TGFβ'nın, Panc1 hücrelerinde PFKFB3; A549 hücrelerinde ise PFKFB4 ekspresyonunu önemli derecede artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, Panc1 hücrelerinde; TGFβ'nın glikolitik aktiviteyi artırdığı ve PFKFB3'ün TGFβ tarafından indüklenen Snail ekspresyonu, F2,6BP seviyesi, glikolitik aktivite ve invazyonda gerekli olduğu gösterilmiştir. A549 hücrelerinde ise; TGFβ'nın F2,6BP seviyesi, glukoz alımı ve glikolitik aktiviteyi kısmen azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca, elde edilen veriler; A549 hücrelerinde, PFKFB4'ün TGFβ tarafından indüklenen EMT fenotipi için kısmen de olsa gerekli olduğunu göstermektedir. Bu veriler, PFKFB izoenzimlerinin TGFβ-ilişkili hücresel proseslerde önemli olabileceğine işaret etmekte olup; farklı hücrelerde TGFβ ile etkileşime giren farklı PFKFB izoenzimlerinin, özgün metabolik fenotiplere neden olabileceğini göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

Ahmed S, T Tsuchiya (2004) Novel Mechanism of Tumorigenesis: Increased Transforming Growth Factor-B1 Suppresses the Expression of Connexin 43 in BALB/CJ Mice after Implantation of Poly-L-Lactic Acid. Journal of Biomedical Materials Research - Part A vol. 70 no. (2): pp. 335–340., doi:10.1002/jbm.a.30090.

Aigner K, B Dampier, L Descovich et al. (2007) The Transcription Factor ZEB1 (ΔEF1) Promotes Tumour Cell Dedifferentiation by Repressing Master Regulators of Epithelial Polarity. Oncogene vol. 26 no. (49): pp. 6979–6988., doi:10.1038/sj.onc.1210508.

Akhurst RJ, R Derynck, RJ Akhurst (2001) Pii: S0962-8924(01)02130-4. vol. 11 no. (11): pp. 44–51., http://tcb.trends.com.

Alvarez MA, JP Freitas, S Mazher Hussain et al. (2019) TGF-β Inhibitors in Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Journal of Gastrointestinal Cancer, Journal of Gastrointestinal Cancer207–213, doi:10.1007/s12029-018-00195-5.

Archer SL, J Allalunis-turner, A Haromy et al. (2007) Article A Mitochondria-K + Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth., no. January pp. 37–51., doi:10.1016/j.ccr.2006.10.020.

Atsumi T, J Chesney, C Metz et al. (2002) High Expression of Inducible 6-Phosphofructo-2-Kinase / Fructose-2 , 6-Bisphosphatase. Ambio5881–5887.

Attanasio F, G Caldieri, G Giacchetti et al. (2011) Novel Invadopodia Components Revealed by Differential Proteomic Analysis. European Journal of Cell Biology vol. 90 no. (2–3):, Germany pp. 115–127., doi:10.1016/j.ejcb.2010.05.004.

Bando H, T Atsumi, T Nishio et al. (2005) Phosphorylation of the 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose 2,6-Bisphosphatase/PFKFB3 Family of Glycolytic Regulators in Human Cancer. Clinical Cancer Research vol. 11 no. (16): pp. 5784–5792., doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0149.

Barrallo-Gimeno A, MA Nieto (2005) The Snail Genes as Inducers of Cell Movement and Survival: Implications in Development and Cancer. Development vol. 132 no. (14): pp. 3151–3161., doi:10.1242/dev.01907.

Bartrons R, H Simon-Molas, A Rodríguez-García et al. (2018) Fructose 2,6-Bisphosphate in Cancer Cell Metabolism. Frontiers in Oncology vol. 8 no. (SEP):, doi:10.3389/fonc.2018.00331.

Batlle E, J Massagué (2019) Transforming Growth Factor-β Signaling in Immunity and Cancer. Immunity vol. 50 no. (4): pp. 924–940., doi:10.1016/j.immuni.2019.03.024.

Bellam N, B Pasche (2010) Tgf-Beta Signaling Alterations and Colon Cancer. Cancer Treatment and Research vol. 155 , United States pp. 85–103., doi:10.1007/978-1-4419-6033-7_5.

Bellomo C, L Caja, A Moustakas (2016) Transforming Growth Factor b as Regulator of Cancer Stemness and Metastasis., no. August, Nature Publishing Group pp. 761–769., doi:10.1038/bjc.2016.255.

Bian T, D Jiang, J Liu et al. (2017) MiR-1236-3p Suppresses the Migration and Invasion by Targeting KLF8 in Lung Adenocarcinoma A549 Cells. Biochemical and Biophysical Research Communications vol. 492 no. (3):, Elsevier Ltd pp. 461–467., doi:10.1016/j.bbrc.2017.08.074.

Bracken CP, PA Gregory, N Kolesnikoff et al. (2008) A Double-Negative Feedback Loop between ZEB1-SIP1 and the MicroRNA-200 Family Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition. Cancer Research vol. 68 no. (19): pp. 7846–7854., doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1942.

Casas E, J Kim, A Bendesky et al. (2011) Snail2 Is an Essential Mediator of Twist1-Induced Epithelial Mesenchymal Transition and Metastasis. Cancer Research vol. 71 no. (1): pp. 245–254., doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2330.

Chapnick DA, L Warner, J Bernet et al. (2011) Partners in Crime: The TGFβ and MAPK Pathways in Cancer Progression. Cell and Bioscience vol. 1 no. (1):, BioMed Central Ltd p. 42., doi:10.1186/2045-3701-1-42.

Chen EI (2012) Mitochondrial Dysfunction and Cancer Metastasis. Journal of Bioenergetics and Biomembranes vol. 44 no. (6): pp. 619–622., doi:10.1007/s10863-012-9465-9.

Chesney J, R Mitchell, F Benigni et al. (1999) An Inducible Gene Product for 6-Phosphofructo-2-Kinase with an AU-Rich Instability Element: Role in Tumor Cell Glycolysis and the Warburg Effect. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America vol. 96 no. (6): pp. 3047–3052., http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10077634%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC15892.

Chesney Jason (2006) 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase and Tumor Cell Glycolysis. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care vol. 9 no. (5): pp. 535–539., doi:10.1097/01.mco.0000241661.15514.fb.

Chesney Jason, J Clark, AC Klarer et al. (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 vol. 5 no. (16):, doi:10.18632/oncotarget.2213.

Chesney Jason, AN Lane (2014) Fructose-2 , 6-Bisphosphate Synthesis by Required for the Glycolytic Response to Hypoxia and Tumor Growth. vol. 4 .

Chin D, GM Boyle, PG Parsons et al. (2004) What Is Transforming Growth Factor-Beta (TGF-β)?. British Journal of Plastic Surgery vol. 57 no. (3): pp. 215–221., doi:10.1016/j.bjps.2003.12.012.

Cicchini C, D Filippini, S Coen et al. (2006) Snail Controls Differentiation of Hepatocytes by Repressing HNF4α Expression. Journal of Cellular Physiology vol. 209 no. (1): pp. 230–238., doi:10.1002/jcp.20730.

Daruwalla J, C Christophi (2006) Hyperbaric Oxygen Therapy for Malignancy : A Review., no. November pp. 2112–2131., doi:10.1007/s00268-006-0190-6.

De Bock K, M Georgiadou, S Schoors et al. (2013) Role of PFKFB3-Driven Glycolysis in Vessel Sprouting. Cell vol. 154 no. (3): pp. 651–663., doi:10.1016/j.cell.2013.06.037.

De Saedeleer CJ, PE Porporato, T Copetti et al. (2014) Glucose Deprivation Increases Monocarboxylate Transporter 1 (MCT1) Expression and MCT1-Dependent Tumor Cell Migration. Oncogene vol. 33 no. (31): pp. 4060–4068., doi:10.1038/onc.2013.454.

Deer EL, J González-Hernández, JD Coursen et al. (2010) Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines. Pancreas, doi:10.1097/MPA.0b013e3181c15963.

Derynck R, EH Budi (2019) Specificity , Versatility , and Control of TGF- b Family Signaling.

Derynck R, D V Goeddel, A Ullrich et al. (2000) Synthesis of Messenger RNAs for Transforming Growth Factors a and ÃŸ and the Epidermal Growth Factor Receptor by Human Tumors. vol. 6 pp. 707–712.

Derynck R, BP Muthusamy, KY Saeteurn et al. (2015) Nihms-662177.Pdf., no. 2 pp. 56–66., doi:10.1016/j.ceb.2014.09.001.Signaling.

Díaz VM, R Viñas-Castells, AG De Herreros (2014) Regulation of the Protein Stability of EMT Transcription Factors. Cell Adhesion and Migration vol. 8 no. (4): pp. 418–428., doi:10.4161/19336918.2014.969998.

Dong C, T Yuan, Y Wu et al. (2013) Loss of FBP1 by Snail-Mediated Repression Provides Metabolic Advantages in Basal-like Breast Cancer. Cancer Cell vol. 23 no. (3):, Elsevier Inc. pp. 316–331., doi:10.1016/j.ccr.2013.01.022.

Flanders KC, Y an Yang, M Herrmann et al. (2016) Quantitation of TGF-β Proteins in Mouse Tissues Shows Reciprocal Changes in TGF-B1 and TGF-B3 in Normal vs Neoplastic Mammary Epithelium. Oncotarget vol. 7 no. (25): pp. 38164–38179., doi:10.18632/oncotarget.9416.

Gallagher SM, JJ Castorino, D Wang et al. (2007) Monocarboxylate Transporter 4 Regulates Maturation and Trafficking of CD147 to the Plasma Membrane in the Metastatic Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231. Cancer Research vol. 67 no. (9): pp. 4182–4189., doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3184.

Gatenby RA, ET Gawlinski, AF Gmitro et al. (2006) Acid-Mediated Tumor Invasion: A Multidisciplinary Study. Cancer Research vol. 66 no. (10): pp. 5216–5223., doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4193.

Gaude E, C Frezza (2016) Tissue-Specific and Convergent Metabolic Transformation of Cancer Correlates with Metastatic Potential and Patient Survival. Nature Communications vol. 7 , Nature Publishing Group pp. 1–9., doi:10.1038/ncomms13041.

Gillies RJ, I Robey, RA Gatenby (2008) Causes and Consequences of Increased Glucose Metabolism of Cancers. vol. 49 no. (6): pp. 24–43., doi:10.2967/jnumed.107.047258.

Guerrero PA (2017) TGF-β Activation and Signaling in Angiogenesis., ed. Joseph H McCarty ED1 - Dan Simionescu ED2 - Agneta Simionescu, Rijeka: IntechOpen, p. Ch. 1, doi:10.5772/66405.

Guha M, S Srinivasan, G Ruthel et al. (2014) Mitochondrial Retrograde Signaling Induces Epithelial-Mesenchymal Transition and Generates Breast Cancer Stem Cells. Oncogene vol. 33 no. (45):, Nature Publishing Group pp. 5238–5250., doi:10.1038/onc.2013.467.

Guo Q (2017) Changes in Mitochondrial Function during EMT Induced by TGF β - 1 in Pancreatic Cancer.1575–1580, doi:10.3892/ol.2017.5613.

Gwangwa MV, AM Joubert, MH Visagie (2018) Crosstalk between the Warburg Effect , Redox Regulation and Autophagy Induction in Tumourigenesis., Cellular & Molecular Biology Letters1–19.

Halldorsson S, N Rohatgi, M Magnusdottir et al. (2017) Metabolic Re-Wiring of Isogenic Breast Epithelial Cell Lines Following Epithelial to Mesenchymal Transition. vol. 396 pp. 117–129., doi:10.1016/j.canlet.2017.03.019.

Han J, Q Meng, Q Xi et al. (2017) PFKFB3 Was Overexpressed in Gastric Cancer Patients and Promoted the Proliferation and Migration of Gastric Cancer Cells. Cancer Biomarkers vol. 18 , IOS Press pp. 249–256., doi:10.3233/CBM-160143.

Hanahan D, RA Weinberg (2011) Hallmarks of Cancer: The next Generation. Cell vol. 144 no. (5): pp. 646–674., doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

Heldin CH, M Vanlandewijck, A Moustakas (2012) Regulation of EMT by TGFβ in Cancer. FEBS Letters vol. 586 no. (14): pp. 1959–1970., doi:10.1016/j.febslet.2012.02.037.

Houles T, SP Gravel, G Lavoie et al. (2018) RSK Regulates PFK-2 Activity to Promote Metabolic Rewiring in Melanoma. Cancer Research vol. 78 no. (9): pp. 2191–2204., doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2215.

Hsu PP, DM Sabatini (2008) Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. Cell vol. 134 no. (5): pp. 703–707., doi:10.1016/j.cell.2008.08.021.

Hua W, D Sarantos, K Martin et al. (2019) TGFβ - Induced Metabolic Reprogramming during Epithelial - to - Mesenchymal Transition in Cancer. Cellular and Molecular Life Sciences, no. 0123456789, Springer International Publishing, doi:10.1007/s00018-019-03398-6.

Huang A, S Liu, W Qi et al. (2014) TGF-B1 Protein Expression in Non-Small Cell Lung Cancers Is Correlated with Prognosis. vol. 15 pp. 8143–8147.

Imbert-Fernandez Y, BF Clem, J O'Neal et al. (2014) Estradiol Stimulates Glucose Metabolism via 6-Phosphofructo-2-Kinase (PFKFB3). Journal of Biological Chemistry vol. 289 no. (13): pp. 9440–9448., doi:10.1074/jbc.M113.529990.

Ishikawa O, EC LeRoy, M Trojanowska (1990) Mitogenic Effect of Transforming Growth Factor B1 on Human Fibroblasts Involves the Induction of Platelet-derived Growth Factor α Receptors. Journal of Cellular Physiology vol. 145 no. (1): pp. 181–186., doi:10.1002/jcp.1041450124.

Ito S (2002) Coexpression of Glucose Transporter 1 and Matrix Metalloproteinase-2 in Human Cancers. CancerSpectrum Knowledge Environment vol. 94 no. (14): pp. 1080–1091., doi:10.1093/jnci/94.14.1080.

Izumi H, M Takahashi, H Uramoto et al. (2011) Monocarboxylate Transporters 1 and 4 Are Involved in the Invasion Activity of Human Lung Cancer Cells. Cancer Science vol. 102 no. (5): pp. 1007–1013., doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01908.x.

Ji S, B Zhang, J Liu et al. (2016) ALDOA Functions as an Oncogene in the Highly Metastatic Pancreatic Cancer. Cancer Letters vol. 374 no. (1):, Elsevier Ireland Ltd pp. 127–135., doi:10.1016/j.canlet.2016.01.054.

Jiang J, YL Tang, XH Liang (2011) EMT: A New Vision of Hypoxia Promoting Cancer Progression. Cancer Biology and Therapy vol. 11 no. (8): pp. 714–723., doi:10.4161/cbt.11.8.15274.

Jiang L, L Xiao, H Sugiura et al. (2015) Metabolic Reprogramming during TGFβ1-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition. Oncogene vol. 34 no. (30):, Nature Publishing Group pp. 3908–3916., doi:10.1038/onc.2014.321.

Jones S, X Zhang, DW Parsons et al. (2008) Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancer Revealed. Science vol. 321 no. (5897): pp. 1801–1806., doi:10.1126/science.1164368.Core.

Joseph MJ, S Dangi-Garimella, MA Shields et al. (2009) Slug Is a Downstream Mediator of Transforming Growth Factor-B1-Induced Matrix Metalloproteinase-9 Expression and Invasion of Oral Cancer Cells. Journal of Cellular Biochemistry vol. 108 no. (3): pp. 726–736., doi:10.1002/jcb.22309.

Kalluri R, RA Weinberg (2009) Review Series The Basics of Epithelial-Mesenchymal Transition. vol. 119 no. (6):, doi:10.1172/JCI39104.1420.

Kang H, H Kim, S Lee et al. (2019) Role of Metabolic Reprogramming in Epithelial – Mesenchymal Transition (EMT).

Kato Y, S Ozawa, M Tsukuda et al. (2007) Acidic Extracellular PH Increases Calcium Influx-Triggered Phospholipase D Activity along with Acidic Sphingomyelinase Activation to Induce Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Mouse Metastatic Melanoma. FEBS Journal vol. 274 no. (12): pp. 3171–3183., doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05848.x.

Kim NH, YH Cha, J Lee et al. (2017a) Snail Reprograms Glucose Metabolism by Repressing Phosphofructokinase PFKP Allowing Cancer Cell Survival under Metabolic Stress. Nature Communications vol. 8 no. (May 2016):, Nature Publishing Group, doi:10.1038/ncomms14374.

Kim NH, YH Cha, J Lee et al. (2017b) Snail Reprograms Glucose Metabolism by Repressing Phosphofructokinase PFKP Allowing Cancer Cell Survival under Metabolic Stress. Nature Communications vol. 8 no. (May 2016):, Nature Publishing Group pp. 1–12., doi:10.1038/ncomms14374.

Kole HK, RJ Resnick, M Van Doren et al. (1991) Regulation of 6-Phosphofructo-1-Kinase Activity in Ras-Transformed Rat-1 Fibroblasts. Archives of Biochemistry and Biophysics vol. 286 no. (2): pp. 586–590., doi:https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90084-V.

Koppenol WH, PL Bounds, C V. Dang (2011) Otto Warburg's Contributions to Current Concepts of Cancer Metabolism. Nature Reviews Cancer vol. 11 no. (5): pp. 325–337., doi:10.1038/nrc3038.

Kroemer G, J Pouyssegur (2008) Review Tumor Cell Metabolism : Cancer ' s Achilles ' Heel., doi:10.1016/j.ccr.2008.05.005.

Lamouille S, J Xu, R Derynck (2014) Molecular Mechanisms of Epithelial-Mesenchymal Transition. Nature Reviews Molecular Cell Biology vol. 15 no. (3):, Nature Publishing Group pp. 178–196., doi:10.1038/nrm3758.

Lee YH, GG Song (2013) Increased 18F-FDG Uptake and Expression of Glut1 in the EMT Transformed Breast Cancer Cells Induced by TGF-β. Neoplasma vol. 60 no. (5): pp. 607–616., doi:10.4149/neo.

Li H, J Yang, Z Liu et al. (2017) Blockage of Glycolysis by Targeting PFKFB3 Suppresses Tumor Growth and Metastasis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.1–12, doi:10.1186/s13046-016-0481-1.

Liemburg-Apers DC, PHGM Willems, WJH Koopman et al. (2015) Interactions between Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Cellular Glucose Metabolism. Archives of Toxicology vol. 89 no. (8):, Springer Berlin Heidelberg pp. 1209–1226., doi:10.1007/s00204-015-1520-y.

Lin JL, MJ Wang, D Lee et al. (2008) Hypoxia-Inducible Factor-1α Regulates Matrix Metalloproteinase-1 Activity in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. FEBS Letters vol. 582 no. (17): pp. 2615–2619., doi:10.1016/j.febslet.2008.06.033.

Liu K, Z Tang, A Huang et al. (2017) Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Promotes Cancer Growth and Metastasis through Upregulation of SNAIL Expression. International Journal of Oncology vol. 50 no. (1): pp. 252–262., doi:10.3892/ijo.2016.3774.

Liu L, A V. Salnikov, N Bauer et al. (2014) Triptolide Reverses Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition and Stem-like Features in Pancreatic Cancer by NF-KB Downregulation. International Journal of Cancer vol. 134 no. (10): pp. 2489–2503., doi:10.1002/ijc.28583.

Liu M, L Quek, G Sultani et al. (2016) Epithelial-Mesenchymal Transition Induction Is Associated with Augmented Glucose Uptake and Lactate Production in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Cancer & Metabolism, Cancer & Metabolism1–14, doi:10.1186/s40170-016-0160-x.

Loh, Chai, Tang et al. (2019) The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges Cells.

Lu J (2019) The Warburg Metabolism Fuels Tumor Metastasis. vol. 13 no. (April):, Cancer and Metastasis Reviews pp. 157–164.

Lu J, M Tan, Q Cai (2015) The Warburg Effect in Tumor Progression: Mitochondrial Oxidative Metabolism as an Anti-Metastasis Mechanism. Cancer Letters vol. 356 no. (2):, Elsevier Ireland Ltd pp. 156–164., doi:10.1016/j.canlet.2014.04.001.

Lu SL, D Reh, AG Li et al. (2004) Overexpression of Transforming Growth Factor B1 in Head and Neck Epithelia Results in Inflammation, Angiogenesis, and Epithelial Hyperproliferation. Cancer Research vol. 64 no. (13): pp. 4405–4410., doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1032.

Luo F, Y Li, F Yuan et al. (2019) Hexokinase II Promotes the Warburg Effect by Phosphorylating Alpha Subunit of Pyruvate Dehydrogenase. Chinese Journal of Cancer Research vol. 31 no. (3): pp. 521–532., doi:10.21147/j.issn.1000-9604.2019.03.14.

Macara IG, L Mccaffrey, IG Macara (2013) Cell Polarity in Morphogenesis and Metastasis.1–6.

Martinez-Outschoorn UE, M Peiris-Pagés, RG Pestell et al. (2017) Cancer Metabolism: A Therapeutic Perspective. Nature Reviews Clinical Oncology vol. 14 no. (1): pp. 11–31., doi:10.1038/nrclinonc.2016.60.

Masin M, J Vazquez, S Rossi et al. (2014) GLUT3 Is Induced during Epithelial-Mesenchymal Transition and Promotes Tumor Cell Proliferation in Non-Small Cell Lung Cancer. Cancer & Metabolism vol. 2 no. (1): p. 11., doi:10.1186/2049-3002-2-11.

Massagué J (2008) TGFβ in Cancer. Cell vol. 134 no. (2): pp. 215–230., doi:10.1016/j.cell.2008.07.001.

Matthew G. Vander Heiden, Lewis C. Cantley, Craig B. Thompson (2009) Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. Science vol. 324 no. (may): pp. 1029–1033., doi:10.1126/science.1160809.Understanding.

Minchenko OH, A Ochiai, IL Opentanova et al. (2005) Overexpression of 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase-4 in the Human Breast and Colon Malignant Tumors. Biochimie vol. 87 no. (11): pp. 1005–1010., doi:10.1016/j.biochi.2005.04.007.

Miyazono K, Y Katsuno, D Koinuma et al. (2018) Intracellular and Extracellular TGF-β Signaling in Cancer: Some Recent Topics. Frontiers of Medicine vol. 12 no. (4): pp. 387–411., doi:10.1007/s11684-018-0646-8.

Moon JS, WJ Jin, JH Kwak et al. (2011) Androgen Stimulates Glycolysis for de Novo Lipid Synthesis by Increasing the Activities of Hexokinase 2 and 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6- Bisphosphatase 2 in Prostate Cancer Cells. Biochemical Journal vol. 433 no. (1): pp. 225–233., doi:10.1042/BJ20101104.

Morandi A, ML Taddei, P Chiarugi et al. (2017) Targeting the Metabolic Reprogramming That Controls Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Aggressive Tumors. Frontiers in Oncology vol. 7 no. (MAR): pp. 1–19., doi:10.3389/fonc.2017.00040.

Moustakas A, C Heldin (2005) Non-Smad TGF- β Signals., no. I, doi:10.1242/jcs.02554.

Moustakas A, CH Heldin (2007) Signaling Networks Guiding Epithelial-Mesenchymal Transitions during Embryogenesis and Cancer Progression. Cancer Science vol. 98 no. (10): pp. 1512–1520., doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00550.x.

Naber HPH, Y Drabsch, BE Snaar-Jagalska et al. (2013) Snail and Slug, Key Regulators of TGF-β-Induced EMT, Are Sufficient for the Induction of Single-Cell Invasion. Biochemical and Biophysical Research Communications vol. 435 no. (1):, Elsevier Inc. pp. 58–63., doi:10.1016/j.bbrc.2013.04.037.

Nakajima S, R Doi, E Toyoda et al. (2004) N-Cadherin Expression and Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Carcinoma. Clinical Cancer Research vol. 10 no. (12 I): pp. 4125–4133., doi:10.1158/1078-0432.CCR-0578-03.

Nalluri SM, JW O'Connor, EW Gomez (2015) Cytoskeletal Signaling in TGFβ-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. Cytoskeleton vol. 72 no. (11): pp. 557–569., doi:10.1002/cm.21263.

Neel J-C, L Humbert, J-J Lebrun (2012) The Dual Role of TGFβ in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. ISRN Molecular Biology vol. 2012 pp. 1–28., doi:10.5402/2012/381428.

Nieto MA (2002) The Snail Superfamily of Zinc-Finger Transcription Factors. Nature Reviews Molecular Cell Biology vol. 3 no. (3): pp. 155–166., doi:10.1038/nrm757.

Novellasdemunt L, I Tato, A Navarro-Sabate et al. (2013) Akt-Dependent Activation of the Heart 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2, 6-Bisphosphatase (PFKFB2) Isoenzyme by Amino Acids. Journal of Biological Chemistry vol. 288 no. (15): pp. 10640–10651., doi:10.1074/jbc.M113.455998.

Ohshio Y, K Teramoto, M Hashimoto et al. (2013) Inhibition of Transforming Growth Factor-β Release from Tumor Cells Reduces Their Motility Associated with Epithelial-Mesenchymal Transition. Oncology Reports vol. 30 no. (2): pp. 1000–1006., doi:10.3892/or.2013.2505.

Onder TT, PB Gupta, SA Mani et al. (2008) Loss of E-Cadherin Promotes Metastasis via Multiple Downstream Transcriptional Pathways., no. 10 pp. 3645–3655., doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2938.

Otto Warburg B, F Wind, N Negelein (1923) The Metabolism of Tumours in the Body. Biochem. Z. Biochem. Z. Biochem. Z.. Biol. Chem vol. 309 no. (2): pp. 397–519.

Ozcan SC, A Sarioglu, TH Altunok et al. (2020) PFKFB2 Regulates Glycolysis and Proliferation in Pancreatic Cancer Cells. Molecular and Cellular Biochemistry vol. 470 no. (1):, Springer US pp. 115–129., doi:10.1007/s11010-020-03751-5.

Peinado H, D Olmeda, A Cano (2007) Snail, Zeb and BHLH Factors in Tumour Progression: An Alliance against the Epithelial Phenotype?. Nature Reviews. Cancer vol. 7 no. (6):, England pp. 415–428., doi:10.1038/nrc2131.

Peng F, Q Li, J Sun et al. (2018) PFKFB3 Is Involved in Breast Cancer Proliferation , Migration , Invasion and Angiogenesis.945–954, doi:10.3892/ijo.2018.4257.

Postigo AA, JL Depp, JJ Taylor et al. (2003) Regulation of Smad Signaling through a Differential Recruitment of Coactivators and Corepressors by ZEB Proteins. EMBO Journal vol. 22 no. (10): pp. 2453–2462., doi:10.1093/emboj/cdg226.

Radke DI, H Ungefroren, O Helm et al. (2016) Negative Control of TRAIL-R1 Signaling by Transforming Growth Factor B1 in Pancreatic Tumor Cells Involves Smad-Dependent down Regulation of TRAIL-R1. Cellular Signalling vol. 28 no. (11):, Elsevier Inc. pp. 1652–1662., doi:10.1016/j.cellsig.2016.07.016.

Rao X, X Huang, Z Zhou et al. (2013) An Improvement of the 2ˆ(-Delta Delta CT) Method for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Data Analysis. Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics vol. 3 no. (3): pp. 71–85., http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25558171%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4280562.

Reddy KB, BA Hocevar, PH Howe (1994) Inhibition of G1 Phase Cyclin Dependent Kinases by Transforming Growth Factor B1. Journal of Cellular Biochemistry vol. 56 no. (3):, John Wiley & Sons, Ltd pp. 418–425., doi:10.1002/jcb.240560318.

Rodríguez-García A, P Samsó, P Fontova et al. (2017) TGF-B1 Targets Smad, P38 MAPK, and PI3K/Akt Signaling Pathways to Induce PFKFB3 Gene Expression and Glycolysis in Glioblastoma Cells. FEBS Journal vol. 284 no. (20): pp. 3437–3454., doi:10.1111/febs.14201.

Ros S., J Flöter, I Kaymak et al. (2017) 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase 4 Is Essential for P53-Null Cancer Cells. Oncogene vol. 36 no. (23): pp. 3287–3299., doi:10.1038/onc.2016.477.

Ros Susana, CR Santos, S Moco et al. (2012) Functional Metabolic Screen Identifies 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2, 6-Biphosphatase 4 as an Important Regulator of Prostate Cancer Cell Survival. Cancer Discovery vol. 2 no. (4): pp. 328–343., doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0234.

Ros Susana, A Schulze (2013) Balancing Glycolytic Flux: The Role of 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose 2,6-Bisphosphatases in Cancer Metabolism. Cancer & Metabolism vol. 1 no. (1): p. 1., doi:10.1186/2049-3002-1-8.

Rozhin J, M Sameni, G Ziegler et al. (1994) Pericellular PH Affects Distribution and Secretion of Cathepsin B in Malignant Cells. Cancer Research vol. 54 no. (24): pp. 6517–6525.

Saitoh M, K Miyazawa (2012) Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation in TGF-β-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition. Journal of Biochemistry vol. 151 no. (6): pp. 563–571., doi:10.1093/jb/mvs040.

Sánchez-Tilló E, Y Liu, O De Barrios et al. (2012) EMT-Activating Transcription Factors in Cancer: Beyond EMT and Tumor Invasiveness. Cellular and Molecular Life Sciences vol. 69 no. (20): pp. 3429–3456., doi:10.1007/s00018-012-1122-2.

Scholnick P, D Lang, E Racker (1973) In Carbohydrate., no. 14 pp. 5175–5182.

Schuster N, K Krieglstein (2002) Mechanisms of TGF-β-Mediated Apoptosis. Cell and Tissue Research vol. 307 no. (1): pp. 1–14., doi:10.1007/s00441-001-0479-6.

Sciacovelli M, C Frezza (2017) Metabolic Reprogramming and Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. vol. 284 pp. 3132–3144., doi:10.1111/febs.14090.

Shaikh D, Q Zhou, T Chen et al. (2012) CAMP-Dependent Protein Kinase Is Essential for Hypoxia-Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition, Migration, and Invasion in Lung Cancer Cells. Cellular Signalling vol. 24 no. (12):, Elsevier Inc. pp. 2396–2406., doi:10.1016/j.cellsig.2012.08.007.

Shen W, G Tao, Y Zhang et al. (2017) TGF - β in Pancreatic Cancer Initiation and Progression : Two Sides of the Same Coin. Cell & Bioscience, BioMed Central1–7, doi:10.1186/s13578-017-0168-0.

Shestov AA, X Liu, Z Ser et al. (2014) Quantitative Determinants of Aerobic Glycolysis Identify Flux through the Enzyme GAPDH as a Limiting Step.1–18, doi:10.7554/eLife.03342.

Shi L, H Pan, Z Liu et al. (2017) Roles of PFKFB3 in Cancer. Signal Transduction and Targeted Therapy vol. 2 no. (April):, The Author(s) pp. 1–10., doi:10.1038/sigtrans.2017.44.

Shi M, J Zhu, R Wang et al. (2016) Latent TGF-β Structure and Activation. vol. 474 no. (3): pp. 343–349., doi:10.1038/nature10152.Latent.

Simeone P, M Trerotola, J Franck et al. (2019) The Multiverse Nature of Epithelial to Mesenchymal Transition. vol. 58 no. (November 2018): pp. 1–10., doi:10.1016/j.semcancer.2018.11.004.

Singh M, N Yelle, C Venugopal et al. (2018) EMT: Mechanisms and Therapeutic Implications. Pharmacology and Therapeutics vol. 182 no. (August 2017): pp. 80–94., doi:10.1016/j.pharmthera.2017.08.009.

Strohecker AM, S Joshi, R Possemato et al. (2015) Identification of 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase as a Novel Autophagy Regulator by High Content ShRNA Screening. Oncogene vol. 34 no. (45):, Nature Publishing Group pp. 5662–5676., doi:10.1038/onc.2015.23.

Thiery JP (2002) Epithelial–Mesenchymal Transitions in Tumour Progression. Nature Reviews Cancer vol. 2 no. (6): pp. 442–454., doi:10.1038/nrc822.

Thuault S, U Valcourt, M Petersen et al. (2006) Transforming Growth Factor- β Employs HMGA2 to Elicit Epithelial–Mesenchymal Transition. vol. 174 no. (2): pp. 175–183., doi:10.1083/jcb.200512110.

Tran DD, CAS Corsa, H Biswas et al. (2011) Temporal and Spatial Cooperation of Snail1 and Twist1 during Epithelial-Mesenchymal Transition Predicts for Human Breast Cancer Recurrence. Molecular Cancer Research vol. 9 no. (12): pp. 1644–1657., doi:10.1158/1541-7786.MCR-11-0371.

Tsai JH, JL Donaher, DA Murphy et al. (2012) Spatiotemporal Regulation of EMT Is Essential for Squamous Cell Carcinoma Metastasis. Changes vol. 29 no. (6): pp. 997–1003., doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.

Tsai JH, J Yang (2013) Epithelial – Mesenchymal Plasticity in Carcinoma Metastasis.2192–2206, doi:10.1101/gad.225334.113.2192.

Tsubakihara Y, A Moustakas (2018) Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis under the Control of Transforming Growth Factor β. International Journal of Molecular Sciences vol. 19 no. (11): pp. 1–30., doi:10.3390/ijms19113672.

VAN SCHAFTINGEN E, B LEDERER, R BARTRONS et al. (1982) A Kinetic Study of Pyrophosphate: Fructose-6-Phosphate Phosphotransferase from Potato Tubers: Application to a Microassay of Fructose 2,6-Bisphosphate. European Journal of Biochemistry vol. 129 no. (1): pp. 191–195., doi:10.1111/j.1432-1033.1982.tb07039.x.

Vanharanta S, J Massagué (2013) Origins of Metastatic Traits. Cancer Cell vol. 24 no. (4): pp. 410–421., doi:10.1016/j.ccr.2013.09.007.

Vazquez A, JJ Kamphorst, EK Markert et al. (2016) Cancer Metabolism at a Glance. Journal of Cell Science vol. 129 no. (18): pp. 3367–3373., doi:10.1242/jcs.181016.

VERTOMMEN D, MH RIDER, L BERTRAND et al. (2004) 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase: Head-to-Head with a Bifunctional Enzyme That Controls Glycolysis. Biochemical Journal vol. 381 no. (3): pp. 561–579., doi:10.1042/bj20040752.

Walenta S, WF Mueller-Klieser (2004) Lactate: Mirror and Motor of Tumor Malignancy. Seminars in Radiation Oncology vol. 14 no. (3): pp. 267–274., doi:10.1016/j.semradonc.2004.04.004.

Wang HUI, J Wu, YE Zhang et al. (2012) Transforming Growth Factor β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition Increases Cancer Stem-like Cells in the PANC-1 Cell Line.229–233, doi:10.3892/ol.2011.448.

Wang S, S Huang, YL Sun (2017) Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer : A Review. vol. 2017 , Hindawi, doi:10.1155/2017/2646148.

Wang Y, J Shi, K Chai et al. (2014) The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. Current Cancer Drug Targets vol. 13 no. (9): pp. 963–972., doi:10.2174/15680096113136660102.

Weljie AM, FR Jirik (2011) Hypoxia-Induced Metabolic Shifts in Cancer Cells: Moving beyond the Warburg Effect. International Journal of Biochemistry and Cell Biology vol. 43 no. (7): pp. 981–989., doi:10.1016/j.biocel.2010.08.009.

Whiteman EL, CJ Liu, ER Fearon et al. (2008) The Transcription Factor Snail Represses Crumbs3 Expression and Disrupts Apico-Basal Polarity Complexes. Oncogene vol. 27 no. (27): pp. 3875–3879., doi:10.1038/onc.2008.9.

Wu W, S Zhao (2013) Metabolic Changes in Cancer: Beyond the Warburg Effect. Acta Biochimica et Biophysica Sinica vol. 45 no. (1): pp. 18–26., doi:10.1093/abbs/gms104.

Xu CC, LM Wu, W Sun et al. (2011) Effects of TGF-β Signaling Blockade on Human A549 Lung Adenocarcinoma Cell Lines. Molecular Medicine Reports vol. 4 no. (5): pp. 1007–1015., doi:10.3892/mmr.2011.530.

Xu Y, S Lu (2015) Transforming Growth Factor-B1-Induced Epithelial to Mesenchymal Transition Increases Mitochondrial Content in the A549 Non-Small Cell Lung Cancer Cell Line. Molecular Medicine Reports vol. 11 no. (1): pp. 417–421., doi:10.3892/mmr.2014.2678.

Yalcin A., BF Clem, Y Imbert-Fernandez et al. (2014) 6-Phosphofructo-2-Kinase (PFKFB3) Promotes Cell Cycle Progression and Suppresses Apoptosis via Cdk1-Mediated Phosphorylation of P27. Cell Death and Disease vol. 5 no. (7): pp. 1–10., doi:10.1038/cddis.2014.292.

Yalcin Abdullah, BF Clem, A Simmons et al. (2009) Nuclear Targeting of 6-Phosphofructo-2-Kinase (PFKFB3) Increases Proliferation via Cyclin-Dependent Kinases. Journal of Biological Chemistry vol. 284 no. (36): pp. 24223–24232., doi:10.1074/jbc.M109.016816.

Yalcin Abdullah, Y Imbert-Fernandez, A Clem et al. (2014) Fructose-2,6-Bisphosphate Links Glucose to Survival and Growth. Cancer & Metabolism vol. 2 no. (Suppl 1):, BioMed Central Ltd p. O5., doi:10.1186/2049-3002-2-s1-o5.

Yalcin Abdullah, S Telang, B Clem et al. (2009) Regulation of Glucose Metabolism by 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatases in Cancer. Experimental and Molecular Pathology vol. 86 no. (3): pp. 174–179., doi:10.1016/j.yexmp.2009.01.003.

Yang Jing, SA Mani, JL Donaher et al. (2004) Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis. Cell vol. 117 no. (7): pp. 927–939., doi:10.1016/j.cell.2004.06.006.

Yang Jing, SA Mani, RA Weinberg (2006) Exploring a New Twist on Tumor Metastasis. Cancer Research vol. 66 no. (9): pp. 4549–4552., doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3850.

Yang Jing, RA Weinberg (2008) Review Epithelial-Mesenchymal Transition : At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis., doi:10.1016/j.devcel.2008.05.009.

Yang Jinshou, B Ren, G Yang et al. (2020) The Enhancement of Glycolysis Regulates Pancreatic Cancer Metastasis. Cellular and Molecular Life Sciences vol. 77 no. (2):, Springer International Publishing pp. 305–321., doi:10.1007/s00018-019-03278-z.

Yang L, Y Hou, J Yuan et al. (2015) Twist Promotes Reprogramming of Glucose Metabolism in Breast Cancer Cells through PI3K / AKT and P53 Signaling Pathways. vol. 6 no. (28):.

Yilmaz M, G Christofori (2009) EMT, the Cytoskeleton, and Cancer Cell Invasion. Cancer and Metastasis Reviews vol. 28 no. (1–2): pp. 15–33., doi:10.1007/s10555-008-9169-0.

Yu J, J Li, Y Chen et al. (2017) Snail Enhances Glycolysis in the Epithelial-Mesenchymal Transition Process by Targeting FBP1 in Gastric Cancer. Cellular Physiology and Biochemistry vol. 43 no. (1): pp. 31–38., doi:10.1159/000480314.

Zavadil J, J Haley, R Kalluri et al. (2008) Epithelial-Mesenchymal Transition. Cancer Research vol. 68 no. (23): pp. 9574–9577., doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2316.

Zhang YE (2009) Non-Smad Pathways in TGF- β Signaling. vol. 19 no. (1): pp. 128–139., doi:10.1038/cr.2008.328.

Zhao M, Zhenyu zhang (2016) Glucose Transporter Regulation in Cancer: A Profile and the Loops. Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression vol. 26 January, doi:10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2016016531.

Zhao Z, M si Wu, C Zou et al. (2014) Downregulation of MCT1 Inhibits Tumor Growth, Metastasis and Enhances Chemotherapeutic Efficacy in Osteosarcoma through Regulation of the NF-KB Pathway. Cancer Letters vol. 342 no. (1):, Elsevier Ireland Ltd pp. 150–158., doi:10.1016/j.canlet.2013.08.042.

Zheng H, Y Kang (2014) Multilayer Control of the EMT Master Regulators. Oncogene vol. 33 no. (14):, Nature Publishing Group pp. 1755–1763., doi:10.1038/onc.2013.128.

Zhou BP, J Deng, W Xia et al. (2004) Dual Regulation of Snail by GSK-3beta-Mediated Phosphorylation in Control of Epithelial-Mesenchymal Transition. Nature Cell Biology vol. 6 no. (10):, England pp. 931–940., doi:10.1038/ncb1173.

Zuazo-Gaztelu I, O Casanovas (2018) Unraveling the Role of Angiogenesis in Cancer Ecosystems. Frontiers in Oncology vol. 8 no. (JUL): pp. 1–13., doi:10.3389/fonc.2018.00248.

7. SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler	Açıklamaları
α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta
δ	Delta
ε	Epsilon
μ	Mikro
M	Molar
˚C	Santigrat derece (Celcius)
~	Yaklaşık değer

Kısaltmalar	Açılımları
3'UTR	3'Untranslated Region
^{18}FDG-PET	^{18}F-deoksiglukoz pozitron emisyon tomografisi
ACC	Asetil-KoA (Koenzim A) karboksilaz
Akt	Protein kinaz B
ALDOA	Aldolaz A
AP-1	Aktivatör Protein-1
ATP	Adenozin Trifosfat
BCA	Biokinkoninik asit
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor (Temel Fibroblast Büyüme Faktörü)
BG	Betaglikan
BSA	Bovine Serum Albumin (Sığır Serum Albümini)
CDK	Cyclin Dependent Kinase (Siklin Bağımlı Kinaz)
cDNA	Complementary DNA (Tamamlayıcı DNA)
ChREBP	Carbohydrate Responsive Element Binding Protein (Karbonhidrat Duyarlı Element Bağlayıcı Protein)
DAPK	Death Associated Protein Kinase (Ölüm İlişkili Protein Kinaz)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DHAP	Dihidroksi Aseton Fosfat
DMEM	Dulbecco's Modified Essential Media (Dulbecco tarafından modifiye edilmiş Eagle besiyeri)
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinüleotid Trifosfat
ECM	Extracellular Matrix (Ekstraselüler Matriks)
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EGF	Epidermal Growth Factor (Epidermal Büyüme Faktörü)
EMT	Epithelial Mesenchymal Trasition (Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm)
F1,6BP	Fruktoz-1,6-bisfosfat
F2,6BP	Fruktoz-2,6-bisfosfat
F6P	Fruktoz-6-fosfat

FASN	Fatty Acid Synthase (Yağ Asidi Sentaz)
FBPaz1	Fruktoz-1,6-bisfosfataz 1
FBS	Fetal Bovine Serum (Fötal Sığır Serumu)
FGF	Fibroblast Growth Factor (Fibroblast Büyüme Faktörü)
G6P	Glukoz-6-fosfat
G6PD	Glukoz-6-fosfat Dehidrojenaz
GAP	Gliseraldehit Fosfat
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat Dehidrojenaz
GBM	Glioblastoma
GDH	Gliserofosfat Dehidrojenaz
GLUT	Glukoz Taşıyıcısı
HCC	Hepatocellular Carcinoma (Hepatoselüler Karsinom)
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansülfonik asit
HGF	Hepatocyte Growth Factor (Hepatosit Büyüme Faktörü)
HIF	Hypoxia Inducible Factor (Hipoksi ile İndüklenen Faktör)
HK2	Heksokinaz 2
HMGA2	High Mobility Group AT-Hook 2
ILs	Interleukins (İnterlökinler)
LDH	Laktat Dehidrojenaz
MAPK	Mitojenler Tarafından Aktive Edilen Protein Kinaz
MCT	Monocarboxylic Transporter (Monokarboksilik Taşıyıcı)
MET	Mesenchymal Epithelial Transition (Mezenkimal Epitelyal Dönüşüm)
MMP	Matriks Metalloproteinaz
mTOR	Mammalian Target of Rapamycine (Memeli Rapamisin Hedef Proteini)
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NSCLC	Non-Small Cell Lung Carcinoma (Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri)
OXPHOS	Oxidative Phosphorylation (Oksidatif Fosforilasyon)
PBS	Fosfat ile tamponlanmış salin çözeltisi
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PDAC	Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (Pankreatik Duktal Adenokarsinom)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor (Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
PDH	Pirüvat Dehidrojenaz
PDK-1	Pirüvat Dehidrojenaz Kinaz-1
PI3K	Fosfatidilinozitol-3-kinaz
PFK-1	Fosfofruktokinaz-1
PFKFB	6-Fosfofrukto-2-Kinaz/Fruktoz-2,6-Bisfosfataz
PK	Pirüvat Kinaz
PPP	Pentose Phosphate Patway (Pentoz Fosfat Yolağı)
PVDF	Polivinilidin florür
qPCR	Quantitative PCR (Kantitatif PCR)
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
RNA	Ribonükletik asit

ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SBE	Smad-Bağlanma Elementi
SCC	Squamous Cell Carcinoma (Skuamöz Hücreli Karsinom)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
siNTC	Silencing Non Targeting Control (Hedefi olmayan kontrol siRNA)
siRNA	Small interfering RNA (Küçük interferans RNA'sı)
TBST	Tris Buffered Salin with Tween (Tris ile Tamponlanmış Salin Çözeltisi)
TCA	Tricarboxylic Acid Cycle (Trikarboksilik Asit Döngüsü)
TGFβ	(Transforming Growth Factor β) Transforme Edici Büyüme Faktörü β
TGFβR	Transforme Edici Büyüme Faktörü β Reseptörü
TPI	Triosephosphate Isomerase (Trioz Fosfat İzomeraz)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)
VPF	Vascular Permeability Factor (Vasküler Geçirgenlik Faktörü)

8. EKLER

8.1. Şekiller Listesi

Şekil – 1: Epitelyal-Mezenkimal Dönüşüm (EMT)'ün Genel Özellikleri. 6

Şekil – 2: TGFβ ile indüklenen Epitel-Mezenkimal Dönüşüm..... 9

Şekil – 3: Oksidatif fosforilasyon, anaerobik glikoliz ve Warburg etkisi arasındaki temel farklılığın şematik gösterimi 16

Şekil – 4: Fruktoz-6-P/ Fruktoz-1,6-BP çift yönlü reaksiyonun enzimatik regülasyonunun gösterimi. 19

Şekil – 5: F2,6BP analiz reaksiyonları 34

Şekil – 6: Panc1 hücrelerinde TGFβ mezenkimal fenotipi indükler. 37

Şekil – 7: Panc1 hücrelerinde TGFβ ile EMT indüklenmektedir. 38

Şekil – 8: Panc1 hücrelerinde TGFβ, F2,6BP konsantrasyonunu, glukoz tüketimini ve laktat salınımını artırmaktadır. 39

Şekil – 9: TGFβ Panc1 hücrelerinde PFKFB3 ekspresyonu indüklemektedir. 41

Şekil – 10: Panc1 hücrelerine uygulanan iki farklı PFKFB3 siRNA molekülü ile PFKFB3 geninde mRNA düzeyinde baskılama sağlanmıştır 42

Şekil – 11: Panc1 hücrelerinde TGFβ ile indüklenen PFKFB3'ün baskılanması, PFKFB2 ve PFKFB4 mRNA düzeylerinde önemli bir değişime sebep olmamaktadır .. 43

Şekil – 12: PFKFB3 siRNA uygulanan kontrol ve TGFβ örneklerine ait hücre fenotip görüntüleri. 44

Şekil – 13: Panc1 hücrelerinde PFKFB3, TGFβ ile Snail'in indüklenmesi için gereklidir. 46

Şekil – 14: Panc1 hücrelerinde PFKFB3 siRNA TGFβ tarafından Snail proteininin indüklenmesini baskılamaktadır.. 48

Şekil – 15: Panc1 hücrelerinde PFKFB3 siRNA, TGFβ ile baskılanan E-kaderin protein miktarında ve lokalizasyonunda bir değişime neden olmamaktadır. 49

Şekil – 16: Panc1 hücrelerinde PFKFB3'ün baskılanması F2,6BP konsantrasyonunu büyük oranda azaltırken, glukoz tüketimi ve laktat salınımını da kısmen azaltıcı etki göstermiştir..... 51

Şekil – 17: Panc1 hücrelerinde PFKFB3, TGFβ etkisiyle azalan proliferasyona etki etmemektedir..... 52

Şekil – 18: Panc1 hücrelerinde PFKFB3'deki baskılama TGFβ ile artan invazif potansiyeli azaltmaktadır 53

Şekil – 19: A549 hücrelerinde TGFβ, mezenkimal fenotipi indüklemektedir..... 54

Şekil – 20: A549 hücrelerinde TGFβ, epitel belirteç E-kaderin ekspresyonunu azaltırken, Vimentin ve Fibronektin mezenkimal belirteçlerinde ve Snail, Slug ve Zeb1 transkripsiyon faktörlerinde artışa neden olmaktadır. 55

Şekil – 21: A549 hücrelerinde TGFβ ile epitel belirteç E-kaderindeki azalma ve Snail transkripsiyon faktöründeki artış protein seviyesinde de belirlenmiştir. 56

Şekil – 22: A549 hücrelerinde TGFβ ile F2,6BP konsantrasyonu, glukoz tüketimi ve laktat salınımı azalmaktadır. 57

Şekil – 23: A549 hücre hattında TGFβ, PFKFB izoenzimlerinden PFKFB4'ü indüklemektedir..... 59

Şekil – 24: A549 Hücrelerinde siRNA yöntemiyle PFKFB4'de mRNA düzeyinde elde edilen baskılanma real-time qPCR yöntemiyle ortaya konmuştur..... 60

Şekil – 25: A549 hücrelerinde PFKFB4 genindeki baskılama, TGFβ etkisiyle PFKFB2 ve PFKFB3 izoformlarının ekspresyonları üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. 61

Şekil – 26: A549 kontrol ve hücrelerinde TGFβ ile indüklenen mezenkimal fenotip PFKFB4 enziminin baskılanmasıyla kısmen azalmaktadır 62

Şekil – 27: A549 hücrelerinde TGFβ ile indüklenen Snail ve Zeb1 mRNA ekspresyonları PFKFB4 enziminin baskılanmasıyla kısmen azalırken, Slug mRNA ekspresyonu artmaktadır 63

Şekil – 28: A549 hücrelerinde kontrol örneklerine göre TGFβ ile F2,6BP konsantrasyonunda, glukoz alımı ve laktat salınımında gözlenen kısmi azaltıcı etki, PFKFB4'deki baskılanma ile değişmemektedir..... 65

Şekil – 29: A549 kontrol ve TGFβ örneklerinde PFKFB4 enziminin proliferasyon üzerinde bir etkisi saptanmamıştır 66

8.2. Tablolar Listesi

Tablo 1: Çalışmalarda kullanılan kimyasallar..... 24

Tablo 2: Çalışmalarda kullanılan cihazlar..... 25

Tablo 3: Kullanılan siRNA'lar ve katalog numaraları..... 28

Tablo 4: Gerçek Zamanlı qPCR analizinde kullanılan problar..... 30

Tablo 5: Western Blotlama yönteminde kullanılan antikorlara ilişkin bilgiler..... 33

9. TEŞEKKÜR

Doktara eğitimi için başvurduğum ilk günden bu yana, birikim ve tecrübesiyle yardıma ihtiyaç duyduğum her an desteğini büyük şükranlıkla hissettiğim, özverisi, çalışma disiplini, öğrencilerine karşı diğergam tutumu, cömertliği, kısaca iyi bir bilim adamı olması ve insani yönü ile örnek alacağım ve katkılarından dolayı bir ömür müteşekkir olacağım çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Abdullah YALÇIN'a,

Çalışmalarım süresince tecrübe ve deneyimlerinden ihtiyaç duyduğum her an yararlanma imkânı bulduğum, güler yüzü ve anlayışlı yapısıyla çok kez arkadaşça sohbet etme, hatta dertleşme imkânı bulduğum sevgili hocam Doç. Dr. Saime GÜZEL'e,

Bilgi ve birikimlerinden faydalandığım, güler yüzleri dolayısıyla müteşekkir olduğum değerli hocalarım, Prof. Dr. Meltem TANRIVERDİ'ye, Prof. Dr. Ümit POLAT'a, Prof. Dr. Nazmiye GÜNEŞ'e ve Dr. Ögr. Üyesi Duygu UDUM'a,

Tez çalışmalarımla alakalı yardıma ihtiyaç duyduğum konularda sıkılmadan bilgi ve birikimlerinden faydalanabildiğim değerli arkadaşlarım, Yunus GÜRPINAR'a ve Selahattin Can ÖZCAN'a, tecrübelerinden ve laboratuvar imkânlarından yararlandığım, güler yüzünü ve yardımını esirgemeyen Dr. Ögr. Üyesi Sabire PEKER'e ve doktora sürecimin herhangi bir zamanında desteklerini görüdüğüm ve birlikte çalışma imkânı bulduğum adlarını burada sayamayacağım tüm arkadaşlarıma ve hocalarıma,

Bideb 2211-A Yurt İçi Doktora Burs Programı, 119S017 nolu 1002-Hızlı Destek Programı ve 119S794 nolu 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı ile doktora sürecimde finansal olarak destek gördüğüm Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'a ve DDP(V)-2017/3 numaralı araştırma projesini finanse eden Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (UÜ-BAP)'a,

Üzerimdeki emeklerini buraya sığdıramayacağım, maddi ve manevi ihtiyaçlarımı karşılayıp, eğitimimle alakalı her türlü desteği sağlamalarının ötesinde iyi bir insan olmam için güzel örneklik sunan en değerlilerim; yakın zamanda kaybettiğim canım babam Kamil ALTUNOK'a ve hayata ve insanlığa karşı duruşuyla takdir ettiğim ve bu anlamda örnek aldığım güzel annem Zehra ÖZEL'e; sevgili ablam Yasemin Merve ŞAHİN ve ailesi, kardeşim Taha Yasin ALTUNOK ve ailesi, Elif Sena ALTUNOK, Sueda ALTUNOK ve Yaser Ebrar ALTUNOK olmak üzere her biri birbirinden değerli kardeşlerime, Bursa'da bulunduğum sürece desteklerini esirgemeyen SOLAKOĞLU ailesine, burada adını yazamayacağım üzerimde hakkı olan tüm yakınlarıma ve dostlarıma, son olarak da 5 yaşını doldurmuş olan ve adeta tezimle birlikte büyüyen, bu süreçte bana yoldaşlık eden gözümün nuru kızım Meryem SOLAKOĞLU'na teşekkür ederim.

10. ÖZGEÇMİŞ

İstanbul'da 1988 yılında dünyaya gelen Tuğba Hazal ALTUNOK, 2007 yılında girdiği Fatih Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünden 2011 yılında birincilikle mezun olmuş, yüksek lisans eğitimini ise 2012 yılında başladığı Fatih Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya alanında 2014 yılında tamamlamıştır. Doktora eğitimine 2014 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda başlamış, doktora sürecinin ilk 4 yılı 2211-A programından, son 2 yıllık süreçte ise 119S017 nolu 1002-Hızlı Destek Programı ve 119S794 nolu 1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı ile TÜBİTAK tarafından bursiyer olarak desteklenmiştir.