



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



KANSER KÖK HÜCRELERİNDE PFKFB İZOENZİMLERİNİN ROLÜ

Yunus GÜRPINAR

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2021





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



KANSER KÖK HÜCRELERİNDE PFKFB İZOENZİMLERİNİN ROLÜ

Yunus GÜRPINAR

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Doç.Dr. Saime GÜZEL

1649B031903408, 2211/C –TÜBİTAK

DDP(V)-2018/5, B.U.Ü.B.A.P.

BURSA-2021

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

ETİK BEYANI

Doktora tezi olarak sunduğum “Kanser Kök Hücrelerinde PFKFB İzoenzimlerinin 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.

Yunus GÜRPINAR

Tarih ve İmza

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak

İç Kapak

ETİK BEYANI	II
KABUL ONAY	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
İÇİNDEKİLER	III
TÜRKÇE ÖZET	VIII
İNGİLİZCE ÖZET	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Meme Kanseri	4
2.1.2. Pankreas Kanseri	6
2.2. Tümör Heterojenitesi	8
2.2.1. Klonal Evrim Modeli	9
2.2.2. Kanser Kök Hücre Modeli	9
2.2.3. Kanser Kök Hücre Kavramının Ortaya Çıkışı	10
2.3. Kanser Kök Hücreleri Ayırmaya Yarayan Belirteçler	12
2.3.1. Aldehit Dehidrojenaz Aktivitesi	13
2.3.2. Yan Popülasyon	13
2.3.3 Farklılaşma Kümeleri	13
2.3.3.1. CD24	13
2.3.3.2. CD44	14
2.3.3.3. Meme ve Pankreas Kanseri Hücre Hatlarında Farklılaşma Kümeleri	15
2.3.4. Kök Hücre Belirteçleri	15
2.3.5. Küre Oluşturma Kabiliyeti	16
2.4. Kanser Kök Hücrelerde Etkin Sinyal Yolakları	17
2.5. Warburg Etkisi ve Oksidatif Fosforilasyon	18
2.6. Kanser Kök Hücrelerinde Enerji Metabolizması	19
2.7. Glikoliz	21
2.8. Glikolizin kontrol basamakları ve F2,6BP	21
2.9. PFKFB İzoenzimleri	22

2.10. Kanser Kök Hücrelerde PFKFB İzoenzimleri	24
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	26
3.1. Gereçler.....	26
3.1.1. Hücre Kültürü İçin Kullanılan Malzemeler	26
3.1.2. siRNA Transfeksiyonu İçin Kullanılan Malzemeler.....	26
3.1.3. Protein İzolasyonu ve İmmünoiblotlamada Kullanılan Malzemeler	27
3.1.4. mRNA Ekspresyon Analizlerinde Kullanılan Malzemeler.....	28
3.1.5. Flow Sitometride Kullanılan Malzemeler.....	29
3.1.6. Fruktoz 2,6 Bisfosfat(F2,6BP) Ölçümünde Kullanılan Malzemeler	29
3.1.7. Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	29
3.2. Yöntemler.....	30
3.2.1. Hücre Kültürü.....	30
3.2.1.1. Adherent Hücre Kültürü.....	30
3.2.1.2. Yüzen Hücre Kültürü	30
3.2.2. siRNA Transfeksiyonu.....	31
3.2.3. mRNA Ekspresyon Analizleri	31
3.2.4. Protein İzolasyonu ve Western Blotlama.....	32
3.2.4.1. Total Protein İzolasyonu	32
3.2.4.2. Western Blotlama.....	33
3.2.5. Flow Sitometri.....	33
3.2.6. Fruktoz-2,6-Bisfosfat Ölçümü	34
3.2.7. Yumuşak Agarda Koloni Formasyonu	35
3.2.8. Klonojenik Analiz	35
3.2.9. İnvazyon Analizi	36
3.2.10. Küre Oluşturma.....	36
3.2.11. ONCOMINE Analizi	37
3.2.12. İstatistiksel Analizler.....	37
4. BULGULAR	38
4.1. Yüzen ve Adherent Hücre Kültürlerinde PFKFB İzoenzim Ekspresyonlarının Kıyaslanması.....	38
4.2. Yüzen ve Adherent Hücre Kültürlerinde F2,6BP Seviyelerinin Kıyaslanması ..	42
4.3. Yüzen ve Adherent Hücre Kültürlerinde KKH Özelliği Gösteren Hücre Miktarlarının Kıyaslanması.....	42

4.3.1. Hücre kültürlerinin KKH ile Karakterize Yüzey Reseptör Ekspresyonları Yönünden Kıyaslanması	43
4.3.2. Hücre Kültürlerinin Pluripotentlik Markör Ekspresyonları Yönünden Kıyaslanması	46
4.4. PFKFB4'ün siRNA Aracılı Baskılanmasının, KKH Özelliği Gösteren Hücre Miktarına Etkisi.....	49
4.4.1. PFKFB4'ün siRNA Aracılı Baskılanmasının, KKH İle Karakterize Yüzey Reseptör Ekspresyonlarına Etkisi	50
4.4.2. PFKFB4'ün siRNA Aracılı Baskılanmasının, Pluripotentlik Markör Ekspresyonlarına Etkisi.....	54
4.4.3. PFKFB4'ün siRNA Aracılı Baskılanmasının Onkojenik Potansiyel Üzerine Etkisi	56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	65
6. KAYNAKLAR	70
7. SİMGE VE KISALTMALAR.....	85
8. EKLER.....	87
8.1. Şekiller Listesi.....	87
8.2. Tablolar Listesi.....	89
9. TEŞEKKÜR	90
10. ÖZGEÇMİŞ.....	91

TÜRKÇE ÖZET

Kanser kök hücre (KKH)'ler, tümör oluşumunu başlattığı ve mevcut tümör dokusunun oldukça küçük bir bölümünü oluşturduğu düşünülen, yenilenme kabiliyeti yüksek hücrelerdir. Normal kök hücrelerle benzer yüzey belirteçleri ve pluripotentlik markörlerine sahip olan ve bu özellikleri sayesinde tümör dokusunun kalanından ayrılabilen bu hücre topluluğu; radyoterapi ve kemoterapiye karşı yüksek direnç göstermekte, tedavi sürecinde yok edilemediklerinde tümörün yeniden şekillenmesine neden olmaktadır. KKH enerji metabolizması üzerine yapılan çalışmalar, birtakım belirteçlere göre profilendirilmiş KKH'ler hakkında bilgi verse de profilleme işleminin belirli bir standardı olmadığından, henüz kesin bir sonuca varmak mümkün olmamıştır.

Glikoliz spesifik hız sınırlayıcı basamak olan PFK-1 enziminin aktivatörü olan fruktoz 2,6 bisfosfat'ın yapım ve yıkımı, 6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bisfosfataz izoenzimleri (PFKFB1-4) tarafından gerçekleştirilmektedir. Tümör hücrelerinde; tümör tipine göre değişen seviyelerde eksprese edilen bu izoenzimlerin; KKH ile tümör kitlesini oluşturan farklılaşmış hücrelerdeki ekspresyonlarının farklı seviyelerde olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, meme kanseri hücre hattı MCF-7 ve pankreatik duktal adenokarsinom hücre hatları PANC-1 ve Mia PaCa-2'de; PFKFB izoenzimlerinin hücre popülasyonundaki KKH miktarı ile oranları belirlendi ve PFKFB baskılanmasının, KKH popülasyonu değişimi üzerindeki etkileri incelendi. Elde edilen bulgulara göre, PANC-1 ve Mia PaCa-2 hücre hatlarında KKH popülasyonu yüksek hücre gruplarında PFKFB1 ve PFKFB4 izoenzimi ekspresyonunun arttığı ve PFKFB4 baskılanması sonucu PANC-1 hücre hattında KKH popülasyonunun azaldığı görüldü. Baskılamanın, bütün hücre hatlarında onkojenik potansiyel üzerinde negatif yönde etkiye neden olmadığı tespit edildi.

Elde edilen verilere göre; PFKFB4 izoenziminin, KKH'lerin idenfikasyonunda yol gösterici olabileceği ve ilerideki çalışmalar için moleküler bir ilaç hedefi olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Kanser kök hücre (KKH), 6-fosfofrukto-2-kinaz /fruktoz 2,6-bisfosfataz (PFKFB), kanser metabolizması

İNGİLİZCE ÖZET

Cancer stem cells (CSC) are subset of tumor cells with high regenerative ability that are thought to initiate tumor formation; yet constitute a very small part of the existing tumor tissue. This rare cell population shares features with normal stem cells like cell surface markers and pluripotency factors, and can be separated from the rest of the tumor tissue by those features. CSCs shows high resistance to radiotherapy and chemotherapy, and if they could not be destroyed during the treatment process, tumor relapse might occur. There are some studies about energy metabolism gives information about metabolic profile of CSCs in different tissues and tumors. Still, there is no consensus about these metabolic profiles beacuse identification of CSCs differs a lot between different types of tissues and lacks standardization.

Fructose 2,6 bisphosphate is an activator of glycolysis specific rate limiting enzyme PFK-1. Its formation and degradation is carried out by 6-phosphofructo-2-kinase / fructose-2,6-bisphosphatase isoenzymes (PFKFB1-4). These isoenzymes expressed in tumor cells at varying levels depending on the tumor type and their expression in CSCs and differentiated tumor cells are dissimilar.

In this study, rates of PFKFB isoenzymes and CSC percentage in the cell populations was examined in breast cancer cell line MCF-7 and pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines PANC-1 and Mia PaCa-2, to identify a possible correlation. Also, effects of PFKFB suppression on CSC population were examined. Results indicate that expression of PFKFB1 and PFKFB4 isoenzymes increased in the cell groups with high CSC population in PANC-1 and Mia PaCa-2 cell lines, and CSC population decreased in PANC-1 cell line as a result of PFKFB4 suppression. It was found that suppression did not cause any negative effects on the oncogenic potential in all cell lines.

According to the data obtained; It is thought that difference in PFKFB4 isoenzyme levels could be a marker of CSCs. Also, PFKFB4 might be selected as a molecular drug target for future studies.

Keywords: Cancer stem cell (CSC), 6-phosphofructo-2-kinase / fructose-2,6-bisphosphatase isoenzymes (PFKFB), cancer metabolism

1. GİRİŞ

Kanser, modern dünyada insanlığın en büyük sorunlarından biri haline gelmiştir. 2020 yılında dünyada 19.292.789 yeni kanser vakası kaydedilmiş, mevcut kanser vakalarının 9.958.133 tanesi ölümle sonuçlanmıştır (Global Cancer Observatory [GLOBOCAN], 2020). Kanser oluşumuyla ilgili bugüne kadar birçok farklı düşünce ortaya koyulmuştur. Bunlardan bir tanesi de kanser kök hücre (KKH) teorisidir. KKH; tümör oluşumunu başlattığı ve mevcut tümör dokusunun küçük bir bölümünü oluşturduğu düşünülen, yüksek yenilenme kabiliyetine sahip hücrelere verilen isimdir. Konservatif tedavi yöntemlerine epey dirençli olan bu hücre grubunun, nüks ve metastaz oluşumundan sorumlu olduğu düşünülmektedir; bu nedenle bu hücrelerin eliminasyonuna yönelik tedavi çalışmaları yakın zamanda oldukça önem kazanmıştır. KKH'ler, proliferasyon ve farklılaşma kabiliyeti yüksek, kök hücre benzeri yapılardır. Sadece sahip oldukları özellikler yönünden değil; yüzey reseptörleri, enzim aktiviteleri ve çeşitli proteinlerin ekspresyonları yönünden de kök hücrelere benzerlik göstermektedir.

Kanser sağaltımı esnasında uygulanan tedavi prosedürleri kanserli dokunun büyük kısmının eliminasyonunu sağlasa da çoğu zaman konservatif tedavi yöntemlerine dirençli bu küçük hücre grubuna karşı yetersiz kalmaktadır. Hayatta kalan KKH'ler ise yüksek proliferasyon kabiliyetleri sayesinde yeni bir tümör kitlesi oluşturmakta ve kanser tedavisinde rastlanan nüks ve metastaz gibi sorunları ortaya çıkarmaktadır.

KKH'ler ile ilgili yapılan çalışmalarda incelenen hücre hattına göre enerji metabolizmalarının glikolitik veya oksidatif ağırlıklı olacak şekilde değişkenlik gösterebildiği görülmüştür (Sancho, Barneda, & Heeschen, 2016). Her bir hücre hattında, KKH olarak tanımlanan hücreler, bulundurdıkları yüzey markörleri, çeşitli enzim aktiviteleri veya aktif transport kabiliyetleri bakımından, tümör kitlesinin kalanını oluşturan hücrelerden ayrılabilir, ancak aynı kanser tipinde KKH olarak tanımlanabilecek birden fazla grup bulunabilmektedir ve bu grupların her zaman birbirleriyle tamamen kesişmeleri mümkün olmamaktadır (Da Cruz Paula & Lopes, 2017; Klonisch et al., 2008). Bu sebeple, KKH metabolik profilleri üzerinde

yapılan çalışmalar, henüz herhangi bir tedavi protokolüne öncü olacak kadar yeterli değildir.

Glikoliz; glikozun piruvata parçalanması sonucu adenozin trifosfat (ATP) üretiminin yanında, ara metabolit üretimine katkı yönünden, proliferasyon kabiliyeti yüksek hücreler için elzem bir yoldur. Kanseri dokularda enerji ihtiyacının karşılanmasında önemli bir role sahip olan glikolizin üç adet kontrol basamağı vardır. Bu basamaklardan ikincisini, fruktoz 6-fosfat (F6P) ve ATP'nin, fruktoz 1,6-bisfosfat (F1,6BP) ve adenozin difosfat (ADP)'ye dönüşümünden sorumlu olan fosfofruktokinaz-1 (PFK-1) enzimi katalizlemektedir. PFK-1'i düzenleyen etkenlerden biri de bu enzimin allosterik regülatörü olan fruktoz 2,6-bisfosfat'tır (F2,6BP). F2,6BP üretimi, 6-fosfofrukto-2-kinaz /fruktoz 2,6-bisfosfataz (PFKFB) izoenzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Glikolitik aktivite kontrolünün yanı sıra, embriyonik gelişim, hücre proliferasyonu/sağ kalımı ve hücre farklılaşması ile ilgili rolleri de olan PFKFB izoenzimlerinden PFKFB3'ün, KKH'lerde farklılaşmış kanser hücrelerine kıyasla ekspresyonunun yüksek olduğu bulunmuştur (Cieřlar-Pobuda et al., 2015; Gu et al., 2020). KKH'ler ve farklılaşmış kanser hücrelerinde PFKFB ekspresyonlarının kıyaslanması; KKH'leri farklılaşmış kanser hücrelerinden ayırmada yol gösterici olarak yeni bir metodun öncüsü olabileceği ve KKH'lerde enerji metabolizmasındaki moleküler mekanizmaların açıklığa kavuşturulmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

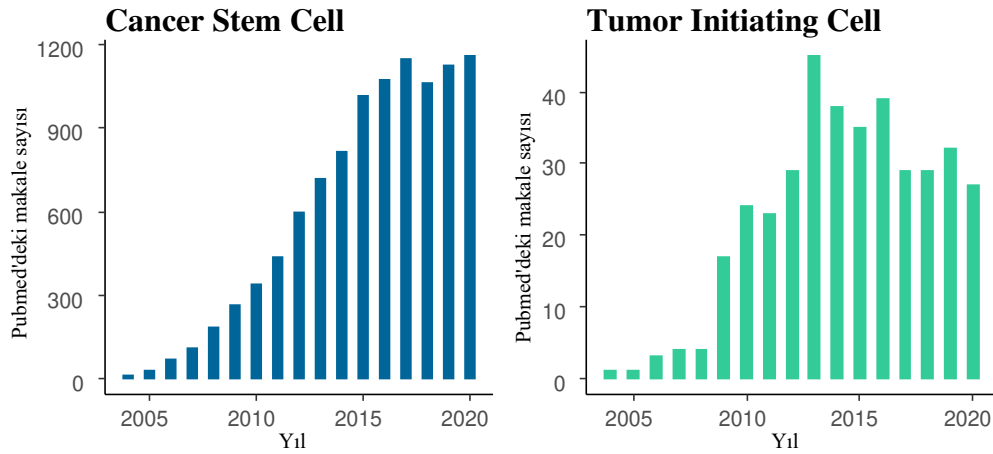
Bu doktora tez çalışmasında; pankreas ve meme kanseri hücre hatlarında, adherent ve yüzen kültür şeklinde üretilen hücrelerde, farklı kriterlere göre KKH olarak kabul edilen hücre miktarları belirlendi. KKH yüzdesine bağlı değişimlerin daha belirgin tespit edilebilmesi açısından yapılan bu çalışmanın ardından, KKH ve farklılaşmış tümör hücreleri arasında bazal ekspresyonları açısından fark tespit edilen PFKFB izoenzim seviyeleri inhibisyon ile değiştirilerek, PFKFB ekspresyonunun KKH yüzdesi değişimine olası etkisinin incelenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, modern tıbbi teknikler sayesinde teşhis edilebildiği günden bu yana, insanlığın en büyük sorunlarından biri olarak kabul edilen bir hastalıklar kompleksidir. Kanserin tanısını, tedavisini ve nüks etmesinin önlenmesini bu kadar zor yapan şeylerden biri de kanserin aynı anda birden fazla savunma mekanizmasını eş zamanlı olarak kendi lehine kullanabilmesidir. Bugüne kadar hücre biyolojisi alanında yapılan, kanserin çalışma prensibini çözmeye yönelik çalışmalar, kanseri kanser yapan temel özellikler hakkında fikir sahibi olmamızı sağlamıştır. Kanserin mihenk taşları olarak kabul edebileceğimiz bu özellikler; dış uyaranlardan bağımsız olarak kendi büyüme faktörlerini üretebilme, büyüme durdurucu faktörlere karşı duyarsızlık, bağımsız hücre sinyalizasyonu ile anjiyogenezin sürdürülebilmesi, apoptozu tetikleyen yolların baskılanması, kanserli dokunun sağlıklı dokulara yaptığı metastaz, metastaz sonucu sağlıklı dokulara invazyonla birlikte yeni tümörlerin oluşumu ve sınırsız üreyebilme potansiyelidir. 2000’li yıllardan sonra yapılan çalışmalar sonucu elde edilen bulgular sayesinde bugün, bu özelliklerin arasına immün yıkımdan kaçış, tümör gelişimine katkıda bulunan yangı oluşumu, genom instabilitesi/mutasyon ve tümör enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesi de eklenmiştir (Hanahan & Weinberg, 2011).

Konvansiyonel yöntemlerle tedavi edilen kanser vakalarının bazılarında yeniden tümör oluşumu gözlenmesi, kanserli dokularda tedavi direncine ve yüksek üreme kabiliyetine sahip küçük bir popülasyonun bu durumdan sorumlu olabileceği düşüncesini akıllara getirmiş ve her şeyi başlatan bu küçük popülasyonun kaynağının bulunabilmesiyle alakalı sayısız çalışma yapılmıştır (Şekil - 1).

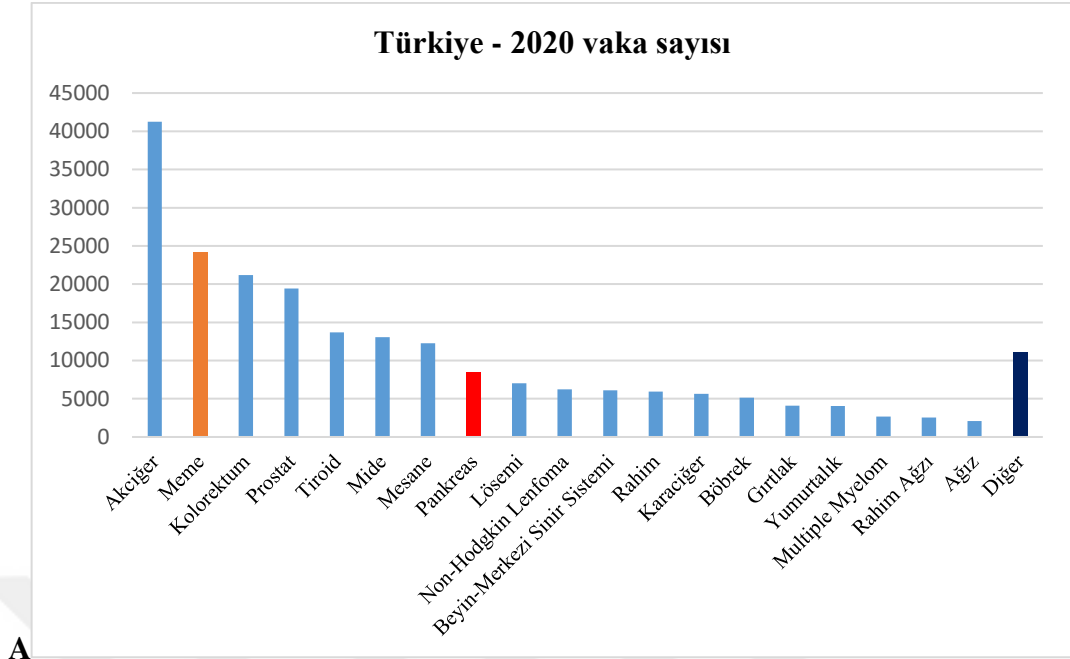


Şekil - 1: PubMed veritabanında "*cancer stem cell*"(kanser kök hücre) ve "*tumor initiating cell*" (tümör başlatıcı hücre) kelime gruplarıyla yapılan arama sonucu tespit edilen çalışmaların yıllara göre değişimi.

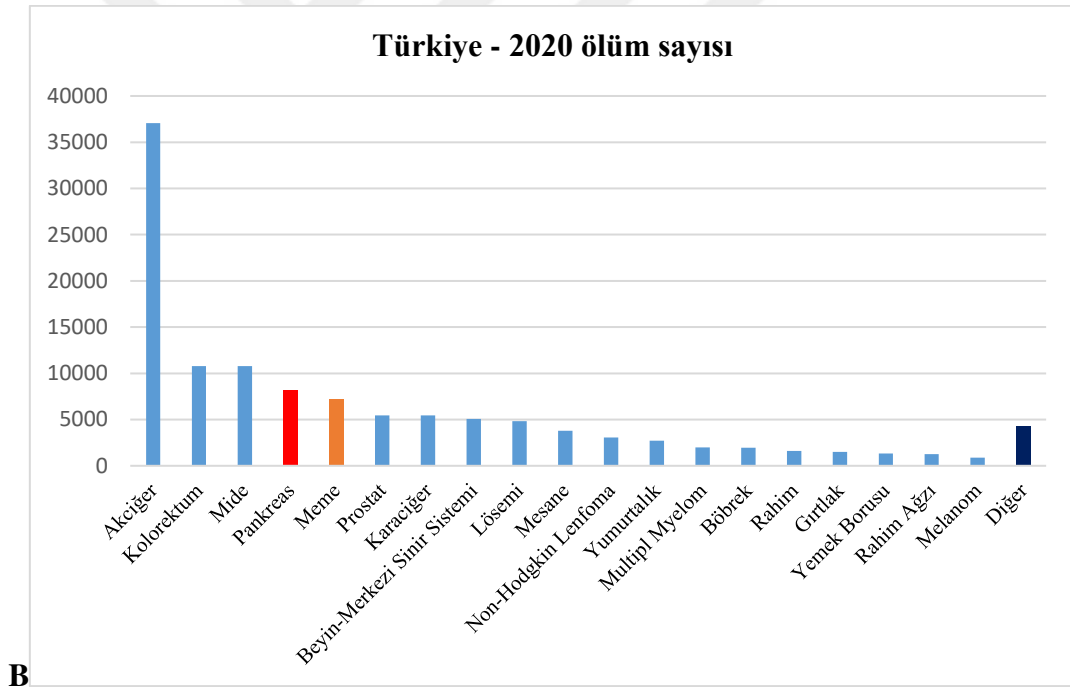
2.1.1. Meme Kanseri

Meme kanseri genellikle lobullerde (lobuler karsinoma) ve kanallarda (duktal karsinoma) gelişir. 2020 yılında Türkiye'deki 233.834 kanser vakasından 24.175 tanesi meme kanseridir (Şekil - 2 A/B). Dünyada ise 2.261.419 yeni meme kanseri vakası görülmüştür ve 684 996 vaka ölümle sonuçlanmıştır (GLOBOCAN, 2020).

Meme kanseri gelişimindeki yatkınlık faktörleri arasında yaş, vücut kitle indeksinin yüksek olması, fiziksel aktivite eksikliği, alkol, anormal seviyede radyasyona maruz kalma, ilk adet kanamasının erken yaşta görülmesi, ilk gebeliğin orta yaş üstünde gerçekleşmesi ve ailede meme kanseri geçmişi yer almaktadır (Veronesi, Boyle, Goldhirsch, Orecchia, & Viale, 2005). Ayrıca, östrojen ve projesteron seviyelerinin yüksek olması da bir risk faktörü olarak gösterilmektedir (Tian, Ran, Zhang, Yan, & LI, 2018).



A



B

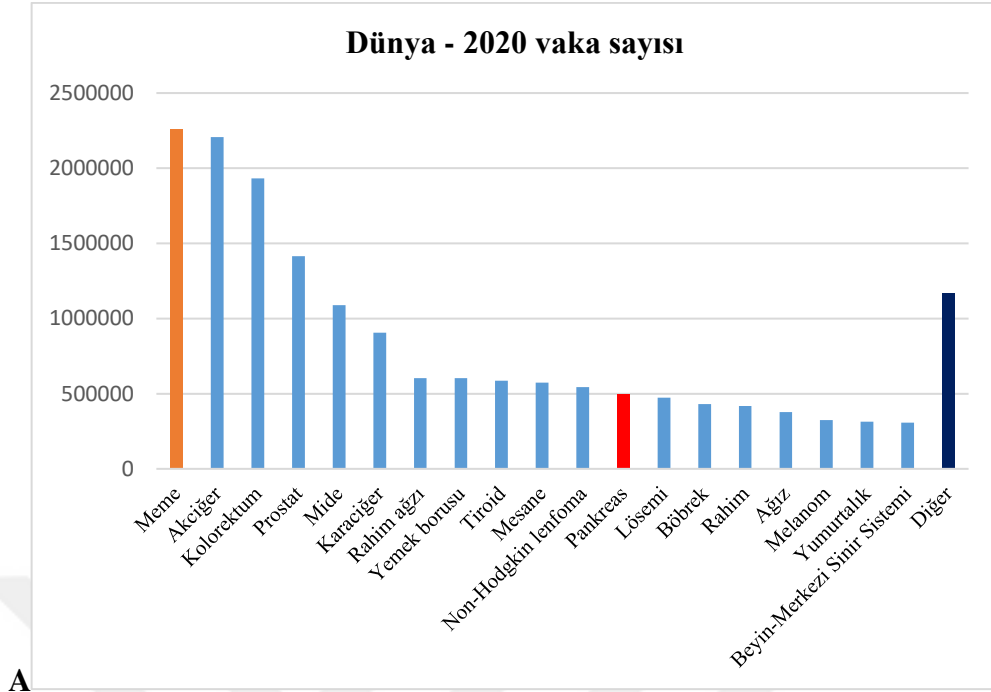
Şekil - 2: 2020 yılında Türkiye'deki kanser vaka sayısının (A) ve kansere bağlı ölümlerin (B) kanser türüne göre dağılımları. GLOBOCAN'dan elde edilen veriler doğrultusunda hazırlanmıştır.

Belirtiler arasında; bölgede yumru, şekil değişikliği, cildin çukurlaşması veya renginin değişmesi, ve akıntı yer alır. Memenin fiziksel muayenesi ve mamografi en sık kullanılan teşhis yöntemleridir. Muayene ve görüntülemenin teşhis için yetersiz kaldığı durumlarda biyopsiye başvurulur. Tedavi seçenekleri arasında; memenin cerrahi operasyonla kısmen ve tamamen uzaklaştırılması (mastektomi), östrojen ve progesteron reseptörlerinin ilaç yoluyla inhibisyonu (Burstein et al., 2019), kemoterapi -antrasiklinler ve taksanlar- (von Minckwitz, 2007) ve radyasyon yer almaktadır.

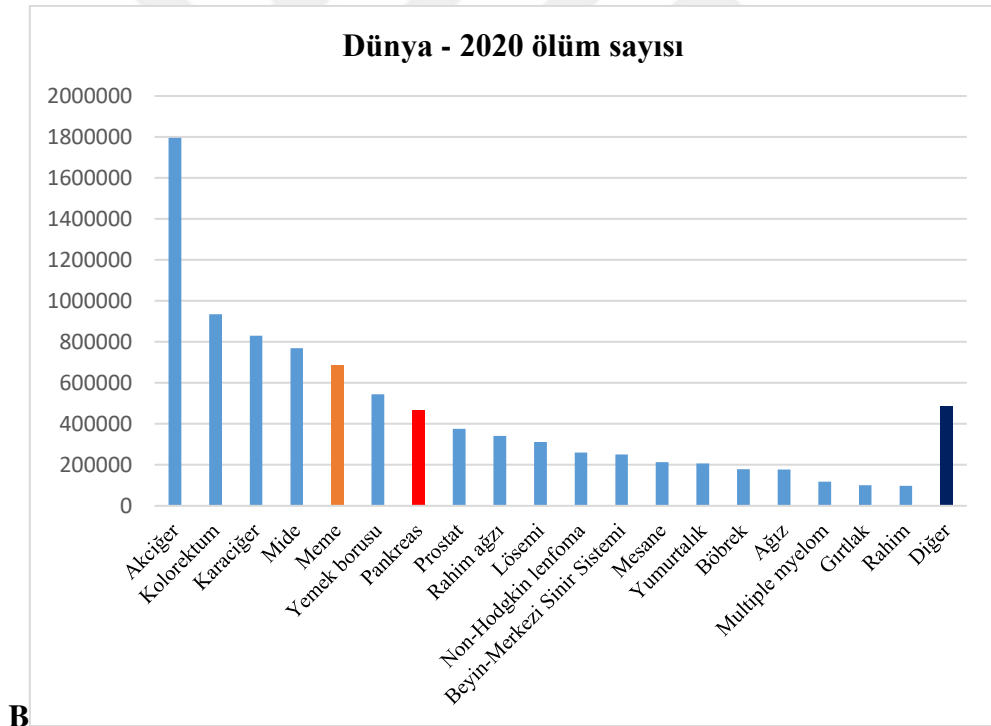
2.1.2. Pankreas Kanseri

Pankreas kanseri; diğer kanser türlerine kıyasla daha nadir görülse de yüksek mortalite oranıyla kanser nedenli ölümlerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. 2020 yılında, 495.773 yeni pankreas kanseri vakası görülmüş (Şekil - 3A), pankreas kanserine bağlı olarak 466.003 ölüm gerçekleşmiştir (GLOBOCAN, 2020) (Şekil - 3B). Diğer başlıca kanser türleri için sağkalım oranlarındaki önemli artışa rağmen, pankreas kanseri sağkalım oranları 1960'lardan beri nispeten değişmemiştir (Ansari et al., 2016).

Pankreas kanserindeki en önemli çevresel yatkınlık faktörü, çoğu diğer kanser türünde olduğu gibi sigara kullanımıdır. Epidemiyolojik çalışmalar, sigarayı pankreas kanseri için geçerli bir risk faktörü olarak kabul etmektedir (Weiss & Benarde, 1983). Ayrıca tip 2 diyabet, obezite, kronik pankreatit, *Helicobacter pylori* enfeksiyonu ve Hepatit C de bilinen risk faktörleri arasındadır (McGuigan et al., 2018).



A



B

Şekil - 3: 2020 yılında dünyadaki kanser vaka sayısının (A) ve kansere bağlı ölümlerin (B) kanser türüne göre dağılımları. GLOBOCAN'dan elde edilen veriler doğrultusunda hazırlanmıştır.

Pankreas kanserinin tanısı çoğu zaman ileri safhalarda konulabilmektedir ve bu noktaya gelinceye kadar, tümörle doğrudan ilişkilendirilemeyecek belirtiler gösterir veya hiç belirti göstermez. Kilo kaybı, sırt bölgesine uzanan epigastrik ağrı ve sarılık, pankreas kanserinde sık görülen belirtilerdir (Kleeff et al., 2016).

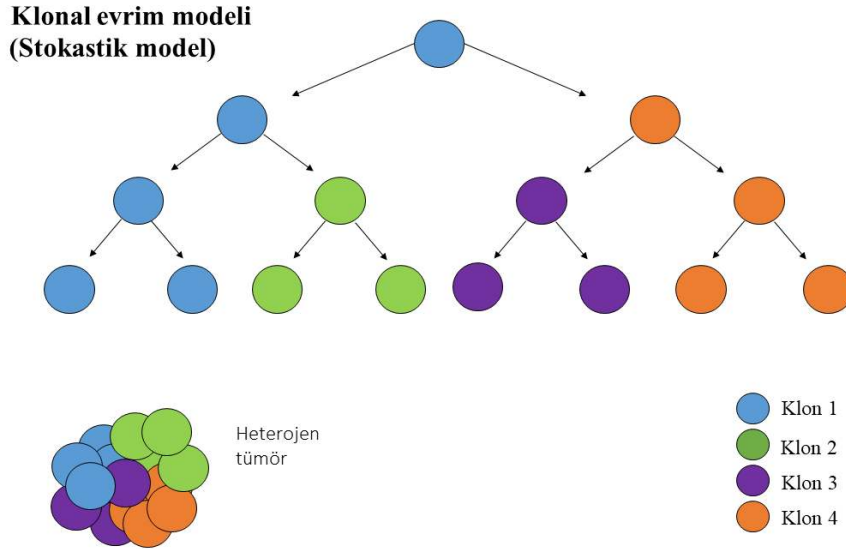
Hastalık şüphesinde (özellikle sarılıkla seyreden durumlarda) ve tanı koyma aşamasında ilk kullanılan görüntüleme tekniği ultrasonografidir, ancak çok dedektörlü bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme gibi metotlarla daha kesin sonuçlar alınabilmektedir (Frampas et al., 2016). Pankreas kanserinin sağaltımı; oluşan tümör dokusunun büyüklüğü veya metastatik durumuna göre, pankreatektomi ile tümörün uzaklaştırılması ve/veya kemoterapotik ajanların kullanımı ile gerçekleşmektedir. Kemoterapotik tedavi standartları, seneler içerisinde değişiklik göstermiştir. Bir pirimidin antagonisti olan, meme, ovaryum ve mesane kanserlerinin tedavisinde de kullanılan gempitabin adlı antimetabolit tedavi standardı iken; metastatik pankreas kanserinde kullanılmak üzere geliştirilmiş bir ilaç kombinasyonu olan folinik asit, florourasil, irinotekan ve oksaliplatin; gempitabine göre etkinliği kanıtlanarak yeni standart haline gelmiştir (Caparello et al., 2016).

2.2. Tümör Heterojenitesi

Aynı tümör içerisindeki hücreler; hücre morfolojileri, belirli genlerin ekspresyonu, metabolizma, proliferasyon ve metastaz kabiliyeti gibi çeşitli özellikleri yönünden farklılık göstermektedir. Tümör heterojenitesi olarak adlandırılan bu kavram, bütün tümörlerin tek bir tipteki hücreden oluştuğu kabul edilen uzun bir dönemin ardından bilim dünyasına sunulmuş bir kavramdır. Tümör heterojenitesi denildiği zaman kastedilen şey, tümör kitlesi içerisindeki normal stromal hücre ve farklı genetik kompozisyondaki tümör hücre grupları olabileceği gibi primer tümör doku ile metastatik tümör dokusu arasındaki hücre grupları arasındaki fark da olabilir. Tümör heterojenitesi oluşumuyla ilgili ortaya atılan fikirler genel olarak klonal evrim ve kanser kök hücre modeli şeklinde iki başlık altında toplanmaktadır.

2.2.1. Klonal Evrim Modeli

Klonal evrim modeli (stokastik model), 1976'da Peter Nowell tarafından ortaya atılmıştır. Bu model, tümör başlangıcını sağlayacak olan hücre grubunun spontan bir mutasyonla ortaya çıktığını ve bu mutant gruptan zamanla farklı mutant grupların oluştuğunu savunmaktadır (Nowell, 1976). Daha detaylı anlatacak olursak; bu modelde tümör kitlesinin oluşumu, seleksiyondan kurtulmayı başarabilecek derecede başarılı bir mutasyon silsilesine bağlıdır. Mutasyonların tamamı tümörün yararına değildir; aksine mutant hücrelerin çok azı seleksiyondan kurtulmayı başarır ve kendi hattını oluşturur. Tümör kitlesi, bu tesadüfi ancak başarılı mutasyonların birikimi sonucu oluşan birden fazla mutant hücre grubunun bir araya gelmesinden oluşmaktadır (Marusyk & Polyak, 2010). Bölünmekte olan her bir hücre, köken aldığı hücreden genotipik olarak yavaşça uzaklaşmakta; tümörün her iki ucu arasındaki hücre popülasyonu, komşusu olduğu hücre popülasyonundan farklılık göstermektedir (Şekil - 4).

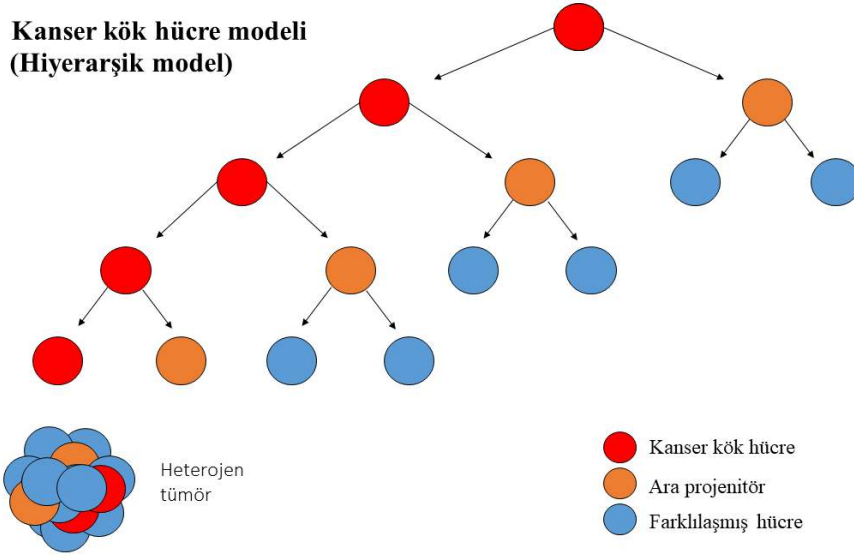


Şekil - 4: Klonal Evrim Modeli'nde farklılaşmamış bütün hücrelerin tümörojenik potansiyeli eşittir.

2.2.2. Kanser Kök Hücre Modeli

Hiyerarşik model olarak da bilinen KKH modeli, daimi olarak çoğalma ve farklılaşma özelliğine sahip olan bir grup hücreyi, tümörü oluşturan kitle içerisinde zirveye koyar. Birtakım mutasyonların ardından kök hücre benzeri özellikler kazanmış

bir hücre grubunda (KKH) oluşan mutasyonlar, zamanla bölünmeye devam eden az sayıda hücre ve farklılaşmış çok sayıda hücreyi içeren kendi alt popülasyonlarını oluşturmaktadır (Şekil - 5). KKH'leri tanımlayan üç temel özellik; artmış proliferasyon kapasitesi, uzun vadeli kendini yenileyebilme kabiliyeti ve farklılaşarak KKH karakterinden uzaklaşmış tümör kitlesini oluşturabilme kabiliyetidir (Schatten, Frank, & Frank, 2009). KKH her bölünmenin ardından kendi kimliğini koruduğu iki hücreye veya farklılaşarak bildiğimiz anlamdaki tümör kitlesini oluşturan iki hücreye dönüşebileceği gibi (Simetrik bölünme), biri kendini yenileyen, biri farklılaşmış iki farklı hücreye de dönüşebilir (asimetrik bölünme). Dahası, farklılaşmış hücreler de tek yönlü değildir, bu hücreler de zaman içerisinde değişim göstererek yeniden KKH'ye dönüşebilir (W. Wang et al., 2014).



Şekil - 5: Kanser Kök Hücre Modeli'nde tümorojenik potansiyel yalnızca "kanser kök hücre" olarak adlandırılan ve tümör kitlesindeki oranı çok küçük olan bir hücre grubunda mevcuttur.

2.2.3. Kanser Kök Hücre Kavramının Ortaya Çıkışı

KKH'ye dair ilk somut kanıtlar 1997 yılında ortaya çıkmıştır. Bonnet ve Dick'in akut miyeloid lösemi üzerine yaptığı çalışmalar sonucu yüzey markörleri olan CD34 yönünden pozitif, CD38 yönünden negatif bir alt popülasyon izole edilmiş; bu popülasyonun non-obez diyabetik/ağır kombine immün yetmezlikli fareye

enjeksiyonu sonucu histolojik olarak donördekine benzer yapıların olduğu gözlenmiştir (Bonnet & Dick, 1997). İlerleyen zamanlarda, meme, pankreas, beyin, prostat, kolon, melanoma, karaciğer ve ovaryum kanserlerinden de KKH izole edilmiştir (Tablo – 1).

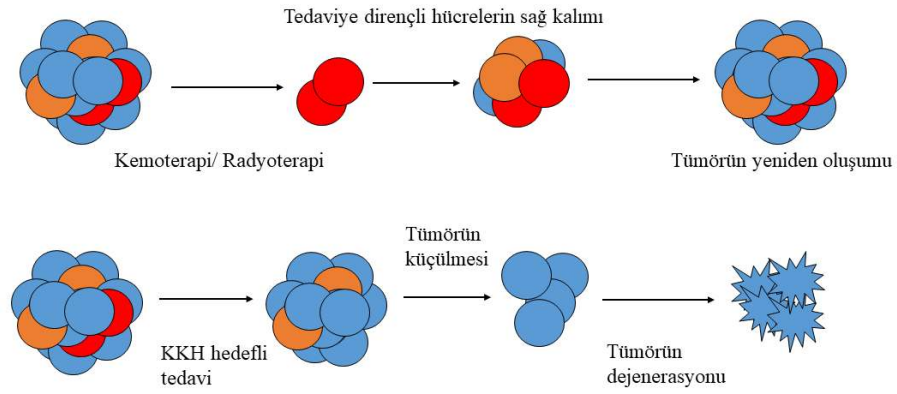
Organ	Hücre ayırtırmada kullanılan belirteç	KKH profilini oluşturan hücre grubu
Beyin	Farklılaşma kümeleri	CD133 ⁺ (Singh et al., 2004)
Prostat	Farklılaşma kümeleri	CD44 ⁺ /α2β1 ^{high} /CD133 ⁺ (Collins, Berry, Hyde, Stower, & Maitland, 2005)
Melanoma	Farklılaşma kümeleri	CD20 ⁺ (Fang et al., 2005)
Kolon	Farklılaşma kümeleri	CD133 ⁺ (O'Brien, Pollett, Gallinger, & Dick, 2007)
Kolon	Farklılaşma kümeleri	CD133 ⁺ /CD45 ⁻ (Ricci-Vitiani et al., 2007)
Pankreas	Farklılaşma kümeleri	CD44 ⁺ /CD24 ⁺ /ESA ⁺ (C. Li et al., 2007) CD24 ⁻ /CD44 ⁺ (Gradiz, Silva, Carvalho, Botelho, & Mota-Pinto, 2016) CD24 ⁺ /CD44 ⁺ (Yin et al., 2011)
Baş ve boyun	Farklılaşma kümeleri Tümörijeniz belirteci gen	CD44 ⁺ B lenfoma Mo-MLV ilave bölge 1 (BMI-1 ⁺) (Prince et al., 2007)
Meme	Farklılaşma kümeleri	CD24 ^{-low} /CD44 ⁺ (Al-Hajj, Wicha, Benito-Hernandez, Morrison, & Clarke, 2003)
Ovaryum	Kök hücre belirteci Hoechst 33342 ile yan popülasyon tayini	Oct 3/4 ^{high} SP ⁺ (Gao, Geng, Kvalheim, Gaudernack, & Suo, 2009)
Karaciğer	Farklılaşma kümeleri	CD133 ⁺ /CD45 ⁻ (Rountree, Ding, He, & Stiles, 2009)
Karaciğer	Farklılaşma kümeleri Kök hücre belirteci	CD133 ⁺ /CD90 ⁺ Oct 3/4 ^{high} , CXCR4 ^{high} (Tomuleasa et al., 2010)
Karaciğer	Hoechst 33342 ile yan popülasyon tayini/Farklılaşma kümeleri	SP ⁺ /CD44 ⁺ /CD133 ⁺ (Hayashi, Fujita, Matsumoto, Akita, & Satomi, 2011)

Tablo - 1: Kanser kök hücrelerinin izole edildikleri yerler ve izolasyon yöntemleriyle ilgili detaylar.

KKH oluşumunun muhtemel sebeplerine dair değişik hipotezler arasında gelişmekte olan kök veya projenitör hücrelerdeki mutasyonlar (Y. Wang et al., 2009), yetişkin kök veya projenitör hücrelerdeki mutasyonlar (López-Lázaro, 2015,2018) ve kök özelliği kazanmış mutant farklılaşmış hücreler (Nouri et al., 2017) yer almaktadır. Bu hipotezler çoğunlukla hücre kökenine yoğunlaşmıştır.

KKH'leri tümör için bu kadar önemli yapan şeylerden biri kemoterapiye son derece dirençli olmalarıdır. ATP bağlayıcı kaset (ABC) protein adı verilen proteinler, hücre içinden hücre dışına ksenobiyotik madde transportunda görev alarak, çoklu ilaç direncine sebep olmaktadır (Gottesman, Fojo, & Bates, 2002). KKH'lerdeki ABC proteinleri, farklılaşmış hücrelere kıyasla daha fazladır. Bu sayede kemoterapötik ajanları çok hızlı bir şekilde hücre dışına çıkarmayı başarırlar (Begicevic & Falasca, 2017). Radyasyona maruz kalmış KKH'ler ile tümör kitlesi hücrelerinin eşit derecede zarar gördüğü, ancak KKH markörleri yönünden pozitif olan hücrelerde DNA

onarımının daha fazla olduğu, dolayısıyla daha düşük seviyede apoptoza uğradığı gösterilmektedir. Bu bağlamda, KKH'lerin radyoterapiye de dirençli olduğunu söyleyebiliriz (Rich, 2007). Kanser tedavisinde sitotoksik ilaç veya radyoterapi uygulamasının ardından görülen tümör küçülmesi, heterojenik bir tümör içerisindeki dirençsiz subklonal popülasyonların yok olmasıdır. Tedavi, tümör dokusunu ortadan kaldırma yönünde başarılı olsa da; bu durum, çoğu zaman yalnızca dirençli bir klonun sağ kalıp daha agresif bir şekilde çoğalarak, ilaca dirençli diğer alt klonları oluşturmaya neden olmaktadır (Şekil - 6). Bahsi geçen durumdaki alt klonlar, çoğunlukla kanser kök hücre gruplarıdır (Murayama & Gotoh, 2019).



Şekil - 6: Kanser Kök Hücre Modeli'ne göre farklı tedavi protokollerinin heterojen tümör üzerindeki etkileri.

2.3. Kanser Kök Hücreleri Ayırmaya Yarayan Belirteçler

KKH'ler; hücre içi enzim/taşıyıcı molekül aktivitesi, hücre yüzey reseptörleri ve transkripsiyon faktörleri gibi birtakım özellikler sayesinde, tümör kitlesinden alınan veya hücre kültürü olarak yetiştirilen hücrelerde tespit edilebilir ve bu gruplardan ayrıştırılabilirler. KKH'lerin izolasyonu için kullanılan belirteçler genellikle normal kök hücreleri tanımlamak için kullanılanlardır. KKH'leri tanımlama ve izolasyonda en sık kullanılan markörler CD133, CD24, CD44, Aldehit dehidrojenaz 1A1 ve epitelyal hücre adhezyon molekülü (ESA)'dır (Y. S. Kim, Kaidina, Chiang, Yarygin, & Lupatov, 2017).

2.3.1. Aldehit Dehidrojenaz Aktivitesi

Aldehitleri karboksilik asitlere oksitleyen aldehit dehidrojenaz (ALDH) enziminin aktivitesi, proliferasyon kabiliyeti yüksek olan hücrelerde fazla olduğu için normal veya malignant kök hücre markörü olarak kullanılabilir (Moreb, 2008; Toledo-Guzmán, Hernández, Gómez-Gallegos, & Ortiz-Sánchez, 2019). ALDH enzim aktivitesine göre KKH tanımlama/ayırıştırma testlerinde; hücre içine difüzyon kabiliyeti yüksek, floresan özellikli ALDH substratları, enzim tarafından parçalanır ve bunun sonucunda hücre dışına çıkamayan ürünler oluşur. KKH profilindeki hücrelerde ürün birikiminin fazla olması sonucu hücre içi floresans artar ve bu hücreler flow sitometri ile ayrıştırılabilir hale gelir.

2.3.2. Yan Popülasyon

KKH'ler sahip oldukları ABC proteinleri sayesinde ksénobiyotikleri hücre dışına yüksek oranda çıkarabildikleri için, hücre boyama işlemlerinde çok az boya almaktadırlar. Hoechst boyama olarak bilinen prosedür sayesinde, hücreler flow sitometri ile incelenir ve az boyanan hücreler yan popülasyon adıyla ayrıştırılarak KKH yüzdesi yüksek bir popülasyon elde edilmiş olur (Hadrnagy, Gaboury, Beaulieu, & Balicki, 2006).

2.3.3 Farklılaşma Kümeleri

Monoklonal antikorlar üzerine yapılan çalışmalarda, bulunan yeni antikorlar nedeniyle oluşabilecek karışıklığının önüne geçilmesi amacıyla, benzer antijenlere yanıt veren antikorlar aynı kümelere dahil edilmiş, bunun sonucunda farklılaşma kümeleri (*Cluster of Differentiation*, CD) denilen sistem ortaya çıkmıştır (Chan, Ng, & Hui, 1988). CD'ler; genellikle reseptör veya ligand olarak çalışan, çoğunlukla protein veya glikoprotein yapıdaki hücre yüzey molekülleridir. Bu moleküller, antijen-antikor etkileşimini baz alan sistemlerden yardım alınarak hedeflenen hücrelerin tespitini sağlar. İmmünofenotipleme olarak adlandırılan bu yöntem, KKH'lerin tanımlanması ve/veya ayrıştırılmasında belirteç olarak kullanılır.

2.3.3.1. CD24

CD24, 1970'lerin sonunda farelerde keşfedilmiş bir membran lipid glikoproteinidir. Hematopoetik hücre alt popülasyonlarında, özellikle B lenfosit, eritrosit, nötrofil granülositlerde ve timositlerde eksprese edildiği görülen bu

glikoprotein, ısıyla bozunmaması nedeniyle ısı dayanıklı antijen (*heat stable antigen*) olarak da adlandırılır. Hücre membranına glikozilfosfatidilinozitol ile bağlı olan bu glikoprotein; hücre proliferasyonu ve hücre-hücre etkileşimini düzenler (Kristiansen, Sammar, & Altevogt, 2003). Ayrıca, nöral gelişimi düzenleyen sinyal yollarıyla da etkileşim halindedir (Pruszek, Menon, & Pruszek, 2017).

Meme, dişi genital kanal, gastrointestinal kanal, safra kanalı ve pankreas, üriner sistem, prostat ve deri kanseri vakalarının çoğunda CD24 ekspresyonu görülmüştür. Bu vakalardaki CD24 ekspresyonu, her bir kanser tipindeki iyi huylu tümörlere kıyasla malign tümörlerde daha yüksektir. CD24 ekspresyonu ayrıca lenf nodülü metastazı ve kötü prognoz ile de ilişkilidir (Lee, Kim, Lee, & Kim, 2009). İleri safhadaki pankreatik adenokarsinomalarda, başlangıç safhasına kıyasla daha yüksek CD24 ekspresyonu gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu durum, CD24'ün hastalığın ilerleme süreciyle ilgili bir belirteç olarak kullanılabileceğini de göstermektedir (Jacob et al., 2004).

2.3.3.2. CD44

CD44, tek zincirli glikoprotein yapıda bir yüzey adhezyon molekülüdür. CD44, hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks (ESM) etkileşimi, büyüme sinyallerinin iletimi ve hyaluronik asidin (HA) hücre içine alımı ve yıkılmasından sorumludur (Naor, Sionov, & Ish-Shalom, 1997). Primer ligandı HA'dır; ancak kollajen, fibronectin, laminin, kondroitin sülfat ve osteopontin ile de etkileşime girebilir (Ponta, Sherman, & Herrlich, 2003). HA; sülfatlanmamış, dallanmamış bir glikozaminoglikandır. Tekrarlayan disakkarit ünitesi, D-glukoronik asit ve N-asetil-D-glikozaminden oluşur.

HA ve diğer ESM bileşenleri için bir reseptör vazifesi gören CD44, çevresel değişiklikleri fark ederek kök hücre özelliklerini tetikleyen sinyal iletimini sağlar. Örneğin: CD44'ün HA ve metastatik nişin ana bileşeni olan ESM molekülü osteopontine bağlanması; Nanog- sinyal transdüseri ve aktivatörü 3, oktomer bağlayıcı dönüştürücü faktör 4 (Oct4) - cinsiyet belirleyici bölge Y – kutusu 2 (SOX2) - Nanog veya c-Src yolağını aktive ederek, tümör baskılayıcı proteinlerin inhibisyonunu sağlayan mikroRNA 21 ekspresyonunu tetikler. Bu sürecin sonucu olarak hücrenin apoptoza girişi engellenir ve kemoterapi direnci oluşur (Bourguignon,

Spevak, Wong, Xia, & Gilad, 2009; Y. Yan, Zuo, & Wei, 2015). CD44, KKH özelliklerinin sürdürülmesi açısından önemlidir. CD44 baskılandığında Oct4, BMI-1 ve β -Catenin gibi kök hücre genlerinde de baskılanma görülmüştür (Du et al., 2008). Kolon kanseri hücre hatlarında, CD44⁺ olarak ayrıştırılmış hücrelerde CD44⁻ hücrelere kıyasla; CD44 overeksprese edilmiş hücrelerde ise vektör kontrole kıyasla, kök hücre belirteçleri olan OCT4, SOX2, Nanog ve Kruppel benzeri faktör 4 (KLF4) ekspresyonunun belirgin derecede yüksek çıktığı görülmüştür (Ju, Chiou, & Su, 2014).

2.3.3.3. Meme ve Pankreas Kanseri Hücre Hatlarında Farklılaşma Kümeleri

KKH popülasyonların tanımlayabilmek adına, belirli yüzey reseptörlerinin yoğunluğu ve kök hücre benzeri faaliyetler arasındaki korelasyon incelenerek hücre kimliklendirme çalışmaları yapılmıştır. Bu sayede, günümüzde çoğu doku veya hücre hattında bulunan kanser kök hücre potansiyeline sahip hücre toplulukları tespit edilebilmektedir. Meme kanserinde profil oluşumu ile ilgili yapılan ilk çalışmada (Al-Hajj et al., 2003), dokuz hastadan alınan tümör örneklerinin sekizindeki KKH popülasyonu CD44⁺/CD24⁻ olarak belirlenmiştir. Pankreas kanseri üzerine yapılan çalışmada ise on hastadan alınan tümör örneklerinde CD44⁺/CD24⁺/ESA⁺ yüzey markörü profiline sahip yüksek derecede tümorojenik bir hücre grubu tespit edilmiştir (C. Li et al., 2007).

2.3.4. Kök Hücre Belirteçleri

OCT4, SOX2, KLF4 ve c-MYC, fare fibroblastlarından kök hücre oluşturulmak için kullanılmış belirteçlerdir. Bu belirteçler, farklılaşmış hücrelerden kök hücre eldesi için ilk kullanan kişinin adına ithafen Yamanaka faktörleri olarak da adlandırılırlar. Bu faktörlerin fibroblastlardaki ekspresyonu tetiklendiğinde, hücreler morfolojik ve metabolik olarak embriyonik kök hücre özellikleri göstermeye başlamıştır. İndüklenmiş pluripotent kök hücre (iPSC) olarak adlandırılan bu hücreler, subkutan enjekte edildiğinde tümör oluşturmuş, blastositlere enjekte edildiğinde ise fare embriyonik gelişiminin bir parçası olmuştur (Takahashi & Yamanaka, 2006). İlerleyen çalışmalarda yukarıdaki faktörlere ilave olarak Nanog'un da pluripotentliği tetikleme amacıyla kullanılabileceği görülmüştür (Yu et al., 2007).

OCT4, POU5F1 adlı gen tarafından kodlanan bir transkripsiyon faktörüdür (Niwa, Miyazaki, & Smith, 2000). SOX2, DNA bağlayıcı yüksek mobilite grubu

(HMG) domaine sahip transkripsiyon faktörlerini üreten ve embriyonik gelişime katkıda bulunan, cinsiyet belirleyici bölge Y ilişkili HMG box geni ailesinin bir üyesidir (Kamachi, Uchikawa, & Kondoh, 2000). Nanog, farklılaşmamış insan embriyonik kök hücrelerin çoğalmasını ve pluripotentliğin indüklenmesini yöneten homeodomain transkripsiyon faktörüdür (Chambers et al., 2003). KLF4; bağırsak, deri ve timus epitelinde bulunan bir çinko parmak içeren transkripsiyon faktörüdür (Dang, Pevsner, & Yang, 2000). OCT4, iPSC'lerde nukleusa lokalize iken çoğu kanser hücre hattında sitoplazmaya lokalizedir. SOX2 ve Nanog'un hem nukleusa hem de sitoplazmaya lokalize olduğu görülmüştür. KLF4, iPSC'de nukleusa lokalize iken kanser tiplerinde nukleus ve sitoplazmada lokalizasyon görülmüştür (Van Schaijik, Davis, Wickremesekera, Tan, & Itinteang, 2018).

KKH'lerin, embriyonik kök hücrelerle olan bir diğer benzerliği, pluripotentlik markörleri yönündendir. Embriyonik kök hücrelerde tespit edilmiş olan SOX2 ve OCT4 genlerinin ekspresyonunun farklılaşma yönünden zayıf kanserli hücre topluluklarında (Ben-Porath et al., 2008) yüksek düzeylerde olduğu gözlenmiştir (Schoenhals et al., 2009). OCT4 ve SOX2, pankreatik duktal adenokarsinomada (PDAK) (Herreros-Villanueva, Bujanda, Billadeau, & Zhang, 2014); OCT4 ve Nanog ise meme kanserinde kötü prognoza işaret etmektedir (Gwak, Kim, Kim, Jang, & Park, 2017; D. Wang et al., 2014). SOX2 yönünden baskılanan meme kanseri hücrelerinde, küre oluşturma kabiliyetinin kontrol grubuna kıyasla azaldığı görülmüştür (Schaefer et al., 2015). Bu bulgular, embriyonik kök hücre markörleri taşıyan kanser hücrelerinin, KKH olarak sınıflandırılabilmesine dair kanıtlar sunmaktadır.

2.3.5. Küre Oluşturma Kabiliyeti

Malignant kök hücre içeren bir hücre topluluğu; yüzey tutunma özelliği olmayan plakalarda (*ultra low attachment*, ULA) serum içermeyen, büyüme faktörleriyle desteklenmiş besi yerlerinde çoğaltıldıkları zaman yüzen küre formunda yapılar oluştururlar. Bu kürelerin büyük kısmı, kök hücre özelliğine sahip hücrelerden oluşur (Fujii et al., 2009). Pankreas (Gou et al., 2007) ve meme (Ponti et al., 2005) kanser hücre hatları da total popülasyonlarında bulunan KKH sayesinde, serumsuz ve büyüme faktörüyle desteklenmiş besi yerinde çoğaltıldığında küre oluşturabilmektedir. Küre oluşturma deneyi, KKH zenginleştirilmesinde ve KKH

içeren bir hücre topluluğuna yapılan manipölasyonlar sonrası KKH ile ilgili kalitatif ve kantitatif ölçümlerde kullanılmaktadır.

2.4. Kanser Kök Hücrelerde Etkin Sinyal Yolakları

K-Ras, Ras süperfamilyası veya Ras-benzeri GTPazlar olarak da bilinen küçük guanozin-5'-trifosfat (GTP) bağlayıcı proteinler sınıfına aittir (Jančík, Drábek, Radzioch, & Hajdúch, 2010). 1982'de Harvey ve Kirsten Rat Sarkoma virüslerinden, hücrelerde transformasyona neden olan p21 proteinini kodlayan gen sekansları (HA-RAS ve K-RAS) insan genomunda tespit edilmiştir (Chang, Gonda, Ellis, Scolnick, & Lowy, 1982; Der, Krontiris, & Cooper, 1982). Doğal tip K-RAS çoğu kanser tipinde, kanser oluşumu esnasında yok olan tümör baskılayıcı bir gendir (Z. Zhang et al., 2001). Normal K-Ras'ın görevinin sonlanması GTP'nin hidrolizi ile gerçekleşirken, tek nokta mutasyonu ile onkogenik hale gelen K-Ras'ta GTPaz aktivitesi düşer ve sürekli aktif durumda kalır (Kranenburg, 2005).

Pankreas kanserinde oldukça sık görülen bu mutasyon nedeniyle GTP-bağlı konumda aktif kalan protein; Raf/mitojenlerce aktive edilen protein kinaz kinaz/ekstrasellüler sinyal ilişkili kinaz (Raf/MEK/ERK) ve fosfoinozitol 3-fosfat/fosfataz ve tensin homolog/viral Protein Kinaz B (Akt) homolog/rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi kompleks 1/glikojen sentaz kinaz-3 (PI3K/PTEN/Akt/mTORC1/GSK-3) yolaklarını sürekli tetikleyecek konumda kalır. Bu durum durdurulamayan hücre büyümesi, apoptozdan kaçış ve kemoterapotik etkenlere direnç gibi durumlar ortaya çıkarır (Fitzgerald et al., 2015; Maertens & Cichowski, 2014). (D. Li et al., 2002)'ın çalışmasında K-RAS mutasyonu, pankreas kanseri vakalarının %80'inden fazlasında, özellikle 12. kodonda guaninden timine dönüşüm şeklinde görülmüştür. Meme kanseri hastaları üzerine yapılan bir çalışmada incelenen vakaların %13'ünde K-RAS mutasyonu ortaya koyulmuştur (Hollestelle, Elstrodt, Nagel, Kallemeijn, & Schutte, 2007). Sanger Kanser Somatik Mutasyon Kataloğu veri tabanı 27/08/2021 güncelleme tarihli 92. versiyonunda ise mutasyon oranları PDAK için %70,03 ,meme duktal karsinoma için %1.45 olarak görülmektedir ("Sanger", t.y.). Buradan da anlaşılacağı üzere, meme kanserinde RAS mutasyonları son derece düşüktür. Ancak, Ras'ın negatif regülatörü olan Ras GTPaz aktive edici protein geni RASAL2'nin meme kanserinde mutasyona uğradığı/baskılandığı ve bu

durumun tümör gelişimi ve metastazında rol oynadığı tespit edilmiştir (McLaughlin et al., 2013).

K-RAS mutasyonu ve bununla bağlantılı yolaklardaki değişikliklerin tümör içerisinde KKH özelliği gösteren hücrelerde daha yüksek seviyede olabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmektedir. (C. F. B. Kim et al., 2005)'ın çalışmasında bronşioalveolar kök hücrelerin onkojenik K-RAS'a yanıt verme potansiyelinin yüksek olması ve bu hücrelerin mutant K-RAS'a bağlı uyarılmasının, tümör gelişimine katkıda bulunduğu görülmüştür. Pankreatik kanserlerde K-RAS inhibisyonu, bir mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz (MAPK) alt grubu olan c-Jun NH2-terminal kinaz yolağının baskılanmasına ve buna bağlı olarak pankreatik KKH'lerde kendini yenileme ve tümör oluşturma kabiliyetlerinde azalmaya neden olmuştur (Okada et al., 2014). MAPK/ERK yolağının baskılanması bazal benzeri meme kanseri hücre hatlarındaki CD44⁺/CD24⁻ hücreleri (Balko et al., 2013) ve MCF-7 hücre hattındaki ALDH⁺ hücreleri (Xu et al., 2015) azaltmış ve KKH ile ilintili özelliklerin kaybolmasına neden olmuştur.

2.5. Warburg Etkisi ve Oksidatif Fosforilasyon

Kanser hücreleri gibi yüksek proliferasyon kabiliyetine sahip hücrelerde glikozun laktata dönüşümü son derecede yüksektir. Üstelik bu hücreler, oksijen varlığında mevcut glikoz kaynaklarını karbondioksit ve suya parçalayarak daha fazla enerji elde edebilme ihtimallerine rağmen, glikolizi tercih ederler. Bu durum, aerobik glikoliz veya Warburg etkisi olarak adlandırılmaktadır (Liberti & Locasale, 2016; Vander Heiden, Cantley, & Thompson, 2009; Warburg, 1925). Kanser hücrelerinde Warburg etkisini açıklamak için çeşitli teoriler ortaya atılmıştır. Bu teorilere göre aerobik glikolize yönelim mitokondriyal fonksiyon bozukluğu (Warburg, 1956) veya hücre proliferasyonunun maksimum kapasitede sürdürebilmesi gibi sebeplerden olabilir. Bir diğer düşünce, aerobik glikolizin tümör tarafından bir kimyasal silah olarak kullanıldığını ve tümörün, bu silahın yan etkisi olarak oluşabilecek düşük oksijen ortamına uyum sağlamasına yardım ettiğini savunmaktadır.

Kanser hücrelerinin enerji eldesi için böyle bir yol tercih etmesinin ardında, enerji yönünden maksimum faydayı sağlamak yerine hücre popülasyonunun ve hakimiyet alanının sürdürülebilirliği gibi nedenler yatmaktadır. Zira, kısıtlı bir enerji

kaynağı içeren bir ortamda, düşük verimli olmasına rağmen yüksek derecede enerji metabolizmasına sahip olan bir hücre grubu, muadillerine göre rekabette üst sıralara geçecektir. Yüksek kapasiteli ancak düşük verimli ATP üretimi, kısıtlı ve ortak kaynakların kullanımında tümör dokusunun çevre dokulara kıyasla avantajlı çıkmasını sağlayabilir. Enerji eldesi için glikolizin kullanımı, ATP eldesinde kayba sebep olsa dahi, büyüme oranını sabit tutarak gerekli enerjinin teminini kolaylaştıracaktır. Zira yüksek enerji eldesini sağlayan aerobik respirasyon, aynı zamanda yüksek enerji talep etmektedir çünkü hücresel yıkımlanmanın önüne geçebilmek için süreç esnasında oluşan reaktif oksijen türlerinin detoksifiye edilmesi gerekir. Oksijen kullanımının düşmesiyle birlikte azalan oksidatif strese yönelik savunma mekanizmalarında küçülmeye gidilmesi, enerjinin efektif bir şekilde kütleli artışa yönlendirilmesinde etkili olmakta ve tümörün kaynaklardan mümkün olan en iyi şekilde yararlanmasını sağlamaktadır (Slavov, Budnik, Schwab, Airoidi, & van Oudenaarden, 2014).

Glikolizin kaynakları özelleştirmenin yanında rakip elemeye yönelik bir yanı olduğunu düşünen yaklaşımlar da mevcuttur. Bu teoriye göre, tümör bölgesindeki eksik vaskülerizasyon, oksijen saturasyonunda azalma meydana getirir. Azalan oksijenle negatif ilişkili olarak artan glikoliz, beraberinde laktat artışını da getirir. Mikroçevrede birikmeye başlayan ve yine dolaşım bozukluğu nedeniyle uzaklaştırılamayan laktat, tümör çevresinin pH seviyesinde ciddi bir düşüşe neden olur ve çevredeki dokuları yıkımlayarak tümör invazyonunu kolaylaştırır. Bu durum, tümör gelişiminin sürdürülebilirliği için enerji kaynaklarından belirli bir düzeyde feragat olarak da görülebilir (Estrella et al., 2013).

2.6. Kanser Kök Hücrelerinde Enerji Metabolizması

Warburg hipotezinin geliştirilmesiyle elde edilen veriler sayesinde, bugün glikoz alımı ve laktat üretimi yüksek hücreler kanserli hücre profilinde kabul edilmektedir. Tümör içi heterojenite kavramının ortaya çıkışıyla birlikte, tümörü oluşturan hücrelerin metabolik profillerinin detaylı incelenmesi önem kazanmıştır. Kanser hücrelerindeki enerji metabolizması yönünden yapılan çalışmalar, KKH'lerin keşfi ve tanımlanması ile değişik bir yöne gitmeye başlamıştır. "Sürekli bölünerek tümör kitlesini oluşturan, yani çalışma prensibi tümör kitlesinin geri kalanından farklı olan bir tümör hücresi topluluğunun ihtiyaçları – dolayısıyla metabolizması- tümör

kitlesinden farklı olabilir mi?” sorusuna aranan cevaplar, kanser metabolizması ile ilgili yeni bilgiler edinmemizi sağlamıştır.

Bugüne kadar yapılan KKH metabolik profilendirme çalışmaları, farklı organlarda şekillenen tümörlerin KKH’lerinin metabolik profillerinin de farklı olduğunu göstermiştir. (Sancho et al., 2015)’ın çalışmasında, hastalardan elde edilen PDAK hücreleri, yüzen hücre kültürü ve CD133⁺ olarak ayrıştırılan hücre grubu şeklinde KKH gruplarına ayrılmış, bu grupların metabolik profili oksidatif olarak belirlenmiştir. (Ciavardelli et al., 2014)’ın yaptığı çalışmada hastalardan alınan tümör dokusundan elde edilen meme kanseri hücrelerinin yüzen kültür olarak çoğaltılmış ve CD24⁻ olarak ayrıştırılmış hücreler, KKH olarak belirlenmiştir. Bu hücrelerde glikolitik aktivite, geri kalan hücrelere göre yüksek çıkmış; glikolizin baskılanması ise KKH popülasyonunun azalmasına neden olmuştur. Ancak; aynı kanser tipindeki farklı hücre hatları üzerinde farklı zamanlarda yapılan çalışmalarda, metabolik profillerin birbirine zıt bir şekilde çıkabilmektedir. Örneğin; laktat ve keton yönünden zenginleştirilmiş besi yerinde adherent çoğaltılan MCF-7 hücrelerinde kök hücre benzeri hücre sayısında, ayrıca kötü prognoz, nüks, ve metastaz ile ilgili markörlerde artış gözlenmiştir. Oksidatif metabolizma baskılanmasının; laktat ve keton sayesinde kök hücre özelliği kazandığı düşünülen hücrelerin yok edilmesinde işe yarayabileceği öne sürülmüştür (Martinez-Outschoorn et al., 2011). Sonuç olarak; hücre kökenlerinin farklı oluşu ve KKH profili olarak belirlenen gruplardaki hücrelerin, birbirleriyle tamamen aynı küme içerisinde bulunmamaları, çalışmaların bir örneği yönünden sorun teşkil etmektedir. Bugün çoğu hücre hattındaki KKH’lerin metabolik profilleri hakkında fikir sahibi olursa da nihai sonuçla ilgili bir mutabakata varılmamıştır.

Tümör yapısında, vaskülarizasyonun zayıf olduğu hipoksik çekirdekte bulunan anaerobik fermentasyon sonucu üretilen laktatın, dolaşımın mevcut olduğu tümör bölgesindeki hücrelere oksidatif solunum ara ürünü olarak kullanıldığı bir “tümör simbiyozu” düşüncesi de mevcuttur (Nakajima & Van Houten, 2013). KKH metabolik profillerinin oksidatif olarak tespit edildiği hücre hatlarında bu durum, aerobik KKH’ler ile anaerobik tümör kitlesi arasında bir etkileşim olarak da düşünülebilir. Bahsi geçen ihtimalde glikolitik aktivitenin durması, tümör kitle dokusunun küçülmesini sağlayacağı gibi, bu dokuyla iş birliği halinde çalışan KKH aktivitesinin azalmasına da sebep olacaktır.

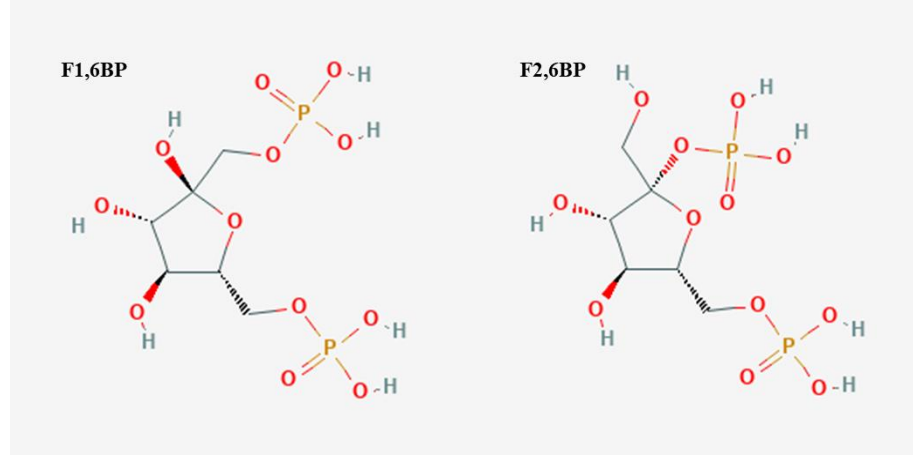
2.7. Glikoliz

Glikoliz, toplamda 10 enzim tarafından katalizlenen, glikozun piruvata dönüşümü sonucu ortaya çıkan enerji ile ATP ve nikotinamid adenin dinükleotit eldesinin sağlandığı metabolik bir yoldur. Glikoliz, enerji eldesi yönünden bakıldığında oksidatif fosforilasyona kıyasla verimsizdir, ancak süreç boyunca ortaya çıkan ara metabolizma ürünleri, farklı moleküllerin sentezlendiği yollara destek sağlamaktadır. 1890'da maya ekstraktı kullanılarak glikozdan etanole dönüşümü sağlayan Eduard Buchner, glikolizin hücre dışında da gerçekleşebilecek bir yolak olduğunu kanıtlamış ve yolların yapay koşullarda oluşturularak detaylı bir şekilde incelenebileceğini de herkese göstererek, bugün bildiğimiz anlamdaki biyokimyasal yolak çalışmalarının öncüsü olmuştur (Kohler, 1971). 20. yüzyılın başlarında ise Harden ve Young, ATP'nin düzenleyici etkisini ortaya çıkarmış ve F1,6BP'nin yolaktaki rolünü keşfetmişlerdir (Cornish-Bowden, 1997). Glikoliz yolağının tamamen çözümlenmesi ise 1940'lı yıllarda gerçekleşmiştir (Kresge, Simoni, & Hill, 2005).

2.8. Glikolizin Kontrol Basamakları ve F2,6BP

Glikolizin 3 adet hız sınırlayıcı basamağı bulunur. Bunlardan ilki, hücreye giren glikozu glikoz 6 fosfata çevirerek hücre dışına çıkışını engelleyen hekzokinaz enzimidir. PFK-1 enzimi aracılığıyla F6P ve ATP'den F1,6BP ve ADP'nin elde edildiği basamak, ikinci hız sınırlayıcı kontrol noktasıdır. PFK-1 glikolize has tek hız sınırlayıcı basamak olduğu için büyük önem arz etmektedir. Son kontrol basamağı olan fosfoenolpiruvat ve ADP'den piruvat ve ATP eldesinin gerçekleştiği reaksiyonda ise piruvat kinaz enzimi rol almaktadır.

F2,6BP, PFK-1'in bilinen en kuvvetli allosterik aktivatörüdür. 1980'de PFK üzerine yapılan bir çalışmada, glukagon hormonunun hepatositlerde PFK üzerinde oluşturduğu baskılayıcı etkinin, jel filtrasyonundan geçmiş karaciğer ekstratlarında kaybolduğu fark edilmiş; ultrafiltrasyonla elde edilen düşük moleküler ağırlığa sahip bir fraksiyonun bu etkiden sorumlu olduğu keşfedilmiştir (Van Schaftingen, Hue, & Hers, 1980a). PFK stimülatörü bu molekülün, alkali fosfatazla ve dilüe asitle parçalanabildiği; ayrıca F1,6BP'ye çok yakın bir moleküler ağırlığa sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil - 7). Bu çalışmaların ardından, keşfedilen molekül F2,6BP olarak tanımlanmıştır (Van Schaftingen, Hue, & Hers, 1980b).



Şekil - 7: F1,6BP (National Center for Biotechnology Information, 2021b) ve F2,6BP (National Center for Biotechnology Information, 2021a) moleküllerinin iki boyutlu yapıları.

2.9. PFKFB İzoenzimleri

F2,6BP molekülünün yapım ve yıkımı PFKFB gen ailesine ait enzimler tarafından kontrol edilmektedir. Çift fonksiyonlu olarak görev yapan bu enzimler, birbirinden bağımsız olarak çalışan iki farklı domaine sahiptir (Rider et al., 2004). Enzimin bir ucu kinaz domaini, diğer ucu da fosfataz domaini olarak faaliyet göstermektedir (Hasemann, Istvan, Uyeda, & Deisenhofer, 1996). Kinaz domaini enzimin N-terminalinde (Kurland, Chapman, Lee, & Pilgis, 1995), fosfataz domaini ise C-terminalinde bulunmaktadır (L. Li, Lin, Pilgis, Correia, & Pilgis, 1992). PFKFB izoenzimleri PFKFB1-4 genleri tarafından kodlanmaktadır. Karaciğer, kalp ve fetal izoenzimleri PFKFB1 (Olson, Uyeda, & McBride, 1989), kalp izoenzimi PFKFB2 (Hilliker et al., 1991), plasental izoenzim PFKFB 3 (Manzano et al., 1998; Nicholl, Hamilton, Sutherland, Sutherland, & Watts, 1997) ve testis izoenzimi PFKFB4 (Manzano et al., 1999) geni tarafından kodlanmaktadır.

Kanser türlerinde PFKFB1 izoenziminin etkisi üzerine fazla çalışma bulunmamakla birlikte, kanser hücrelerinde PFKFB1 overekspresyonu gözlenmemiştir (Bartrons et al., 2018). Yine de, bütün PFKFB izoenzimleri, belirli kanser tiplerine göre değişen bazal seviyelerde eksprese edilmekte ve in vivo ortamda hipoksiye değişik seviyelerde yanıt vermektedir (O. Minchenko, Opentanova, & Caro, 2003).

PFKFB2 izoenzimi meme, pankreas, serviks ve akciğer kanseri hücre hatlarında mRNA ve protein seviyesinde eksprese edilmektedir. Pankreatik adenokarsinomalarda F2,6BP seviyesinin korunması, glikolitik aktivite ve proliferasyon için PFKFB2 ekspresyonu gereklidir (Ozcan et al., 2020). (Novellasdemunt et al., 2013)'ın yaptığı çalışmada amino asitler tarafından stimüle edilen Akt'nin PFKFB2 fosforilasyonu ile F2,6BP sentezini uyardığı gözlenmiştir. Ayrıca, ovaryum ve meme kanserinde, tümör baskılayıcı protein 53 (TP53)'ün mutasyona uğramamış hali bulunan hücrelerde PFKFB2'nin baskılanması, kemoterapötik ajan olan paklitaksel duyarlılığı artırmıştır (Yang et al., 2019).

Kinaz/fosfataz aktivite oranı en yüksek izoenzim olan PFKFB3 (Sakakibara et al., 1997; S. Yan et al., 2019), kanser enerji metabolizmasında üzerine en çok çalışılmış olan izoenzimdir. Meme kanseri (Peng et al., 2018), tiroit ve ovaryum karsinomu (Atsumi et al., 2002) akciğer adenokarsinomu (X. Li et al., 2018) ve gastrik kanser (J. Han, Meng, Xi, Wang, & Wu, 2017) tiplerinde yüksek miktarda PFKFB3 ekspresyonu görülmüştür. Ayrıca; prostat (J. Wang et al., 2019), kolon (S. Yan et al., 2019), meme (O'Neal et al., 2016) gibi farklı kanser tiplerinde, PFKFB3'ün terapötik hedef olarak alındığı çalışmalar mevcuttur.

PFKFB3, enerji metabolizmasını düzenlemenin yanısıra; hücre siklusunu, apoptozu ve malignant transformasyon belirteci olan tutunma bağımsız büyümeyi kontrol eder (Calvo et al., 2006). PFKFB3 inhibisyonu, apoptozu tetikleyen protein 27'nin (p27), hücre siklusu döngüsünde görevli enzim siklin bağımlı kinaz 1 tarafından fosforilasyonunu azaltır. Artan p27, G1 fazından S fazına geçişin bloklanmasına ve apoptozun indüklenmesine neden olur (Yalcin et al., 2014).

PFKFB3 embriyogenez aşamasının başarıyla tamamlanmasında önemli role sahiptir. Fare embriyogenezi esnasında PFKFB3'ün genetik olarak inhibisyonu sonucu oluşan fonksiyon kaybı; diğer izoenzimler tarafından telafi edilememekte ve embriyonik ölüm gerçekleşmektedir (Chesney et al., 2005).

PFKFB3 ekspresyonu baskılanmasının, uygulanan diğer tedavi yöntemlerinin etkisini artırabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Tümör endotelial hücrelerde yüksek miktarda tespit edilen PFKFB3 ekspresyonunun baskılanması; tümör içi vaskülerizasyonun normalleşmesine, buna bağlı olarak kemoterapinin

etkisinin artmasına ve metastazın azalmasına neden olmaktadır (Cantelmo et al., 2016).

Hipoksi ile indüklenen faktör 1 - alfa ile indüklenen PFKFB4 (O. H. Minchenko et al., 2005; H. Zhang et al., 2016), çeşitli kanser hücre hatlarında enerji metabolizmasını kontrol eden bir diğer izoenzimdir. Akciğer, pankreas, meme, prostat ve kolon hücre hatlarını kapsayan bir çalışmada, PFKFB4'ün küçük interferans RNA'sı (siRNA) ile baskılanması, yedi hücre hattının altısında intraselüler F2,6BP'i azaltmış; PFKFB4 overekspresyonu ise incelenen bütün hücre hatlarında F2,6BP seviyesini artırmıştır (Chesney et al., 2014). PFKFB4 ekspresyon artışının, belirli kanser türlerinde kötüye gitmeye meyilli prognozla da ilişkili olduğu görülmüştür (Trojan, Piwowar, Ostrowska, Laidler, & Kocemba-Pilarczyk, 2018; G. Wang, Li, Xue, & Dong, 2020).

Farklı kanser türlerinde yapılan çalışmalarda PFKFB4 baskılanmasının tümör gelişimine negatif etkide bulunduğu tespit edilmiştir. Tiroit kanser hücrelerinde, mRNA ekspresyonu artışı gözlenen PFKFB4'ün baskılanması durumunda hücrelerde canlılık ve koloni oluşturma kabiliyetinde azalma görülmüştür (Lu et al., 2020). Akut monositik lösemide PFKFB4 baskılanması, hücre büyümesini inhibe etmiş ve ilaçla indüklenen apoptoza hassasiyeti artırmıştır (G. Wang et al., 2020).

PFKFB4 aktif glikolitik tümörlerde bir protein kinaz olarak da faaliyet gösterebilmektedir. PFKFB4, meme tümörlerinde onkojenik steroid reseptör koaktivatör 3'ü fosforilasyon ile aktive eder ve glikolitik akışı purin sentezine yönlendirir (Dasgupta et al., 2018).

2.10. Kanser Kök Hücrelerde PFKFB İzoenzimleri

PFKFB mRNA ekspresyon analizleri, kanser hücreleri ve KKH'ler arasında ilginç bir model ortaya koymaktadır. KKH'ler, kanser hücreleriyle karşılaştırıldığında PFKFB3 ekspresyonunda birkaç kat artış olduğu gözlenmiştir. Kanser hücreleri ve KKH'lerdeki PFKFB3 ekspresyon profilindeki farklılıkların, kanser hücrelerinin kök hücre benzeri veya farklılaşmış hücre fenotiplerinden kaynaklandığı ve kanser hücrelerini KKH'lerden ayırmanın bir yolunu içerdiği düşünülmektedir (Cieślak-Pobuda et al., 2015).

Gliomalarda RNA interferans yöntemiyle yapılan çalışmalarda, KKH'lerde PFKFB4 mRNA ekspresyonu, normal beyin dokusuna kıyasla 10 kat daha yüksek bulunmuş, PFKFB4 baskılanması beyin KKH canlılığını, laktat ve ATP üretimini azaltmıştır. Tümör örneklerinde PFKFB4 mRNA ekspresyonları yüksek bulunan glioblastoma hastalarının hayatta kalma sürelerinin, düşük bulunan gruba kıyasla belirgin derecede daha kısa olduğu tespit edilmiştir(Goidts et al., 2012).



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Hücre Kültürü İçin Kullanılan Malzemeler

Adherent hücre kültürlerinde kullanılan besi yerleri, katkı maddeleri ve manipülasyonlar esnasında kullanılan solüsyonlar, üretici firmaları ve katalog numaraları ile Tablo - 2’de gösterilmektedir.

Kimyasal	Üreten firma	Ürün menşei	Katalog no
Dulbecco tarafından modifiye edilmiş Eagle Medyum (DMEM)	Capricorn Scientific	Almanya	DMEM-HA
Fötal Sığır Serum (FBS)	PAN-Biotech	Almanya	P30-3306
At Serumu	Biological Industries	İsrail	4-004-1A
Tripsin – Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (0.25 % -- 2.21 mM)	Multicell	Kanada	325-043-EL
Tripan Mavisi (0.4%)	Gibco	A.B.D.	15250-061
Etanol	Merck	Almanya	1009832511
Penisilin Streptomisin (100x)	Capricorn	Almanya	PS-B
PBS Stock Solution (20X)	Thermo	A.B.D.	28344

Tablo - 2: Adherent hücre kültüründe kullanılan malzemeler.

Yüzen hücre kültürlerinde KKH üretimi amacıyla besiyeri ve ilave malzemeler, üretici firmalar ve katalog numaraları ile Tablo - 3’te gösterilmektedir

Kimyasal	Üreten firma	Ürün menşei	Katalog no
DMEM – F12 (1: 1) (1X)	Gibco	A.B.D.	11320-033
İnsan Epidermal büyüme faktörü (EGF)	BioVision	A.B.D.	4022-500
İnsan Fibroblast büyüme faktörü (FGF-2)	BioVision	A.B.D.	4037-50
B27	Gibco	A.B.D.	17504-044
İnsan insulini	Humulin		
Heparin (0.2%)	Stemcell Technologies	Kanada	7980
Penisilin Streptomisin (100x)	Capricorn	Almanya	PS-B

Tablo - 3: Yüzen hücre kültüründe kullanılan malzemeler.

Hücrelerin yıkanmasında kullanılan fosfat tamponlu tuz (PBS) çözeltisi, 20X PBS çözeltisi distile su ile 20 kat sulandırılıp otoklavda sterilize edilerek hazırlandı.

3.1.2. siRNA Transfeksiyonu İçin Kullanılan Malzemeler

Gen ekspresyonunu siRNA transfeksiyonu ile baskılamada lipofeksiyon işlemine başvuruldu ve taşıt olarak Lipofectamine RNAiMAX kullanıldı. Transfeksiyon işleminde kullanılan siRNA molekülleri Tablo - 4’te gösterilmektedir.

siRNA	Üreten firma	Ürün menşei	Katalog no
Kontrol siRNA	Thermo	A.B.D.	4390847
PFKFB4	Thermo	A.B.D.	4390824

Tablo - 4: Transfeksiyon işleminde kullanılan siRNA’lar.

3.1.3. Protein İzolasyonu ve İmmünoiblotlamada Kullanılan Malzemeler

Protein lizasyonunda Radyoimmünopresipitasyon analizi (RIPA) çözeltisi (25mM TrisHCl (pH 7.6), 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodyum deoksikolat, 0.1% sodyum dodesil sülfat (SDS)) kullanıldı. Kullanım öncesinde RIPA çözeltisine, proteaz ve fosfataz inhibitör karışımı 1: 100 dilüsyon kullanılarak ilave edildi. Protein konsantrasyonu, kolorimetrik bir yöntem olan bikinkoninik asit metodu ile (BCA), imalatçı protokolü takip edilerek ölçüldü (Thermo, Kat. No: 23227).

Tris tamponlu tuz, Tween 20 (TBS-T) çözeltisi; 200 mM Tris, 1,5 M Sodyum klorür ve %1 Tween-20 ve pH dengeleme amacıyla hidroklorik asit kullanılarak 10X depo solüsyon şeklinde hazırlandı. Kullanım için 1X olacak şekilde 10 kat dilüsyon uygulandı. Western Blot protein yürütme çözeltisi, 10x Tris/Glycine/SDS Buffer solüsyonuna 10 kat dilüsyon uygulanarak kullanıldı. Western Blot protein transfer çözeltisi, Transfer Buffer çözeltisi; 10X Tris /Glycine Buffer depo solüsyonundan alınan 1 birim, 7 birim distile su ve 2 birim metanol ile 10 kat dilüe edildi. Western Blot bloklayıcı çözeltisi olarak %0,1 TBS-T'de çözündürülmüş %5 yağsız süt tozu kullanıldı. Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve diğer immünoiblotlama gereçleri; üretici firmaları ve katalog numaraları ile Tablo - 5'te gösterilmektedir.

Kimyasal	Üreten firma	Ürün menşei	Katalog no:
RIPA Lysis and Extraction Buffer	Thermo	A.B.D.	89901
Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	Cell Signaling Technologies	A.B.D.	5872
Tris	Invitrogen	A.B.D.	15504020
Sodyum Klorür	Merck	Almanya	1064041000
Tween 20	Merck	Almanya	8221840500
Hidroklorik asit (%30)	Merck	Almanya	1.00318.1000
10x Tris/Glycine/SDS Buffer	Bio-Rad	A.B.D.	1610772
10x Transfer Buffer	Thermo	A.B.D.	35045
Mini – PROTEAN TGX Gel	Bio – Rad	A.B.D.	4561043
PVDF membran	Millipore	A.B.D.	IPVH00010
%5 Yağsız süt tozu	Sigma	A.B.D.	M7409
Molecular Biology Water	Lonza	İsviçre	BE51200
Luminata Forte HRP Substrate	Merck	Almanya	WBLUF0500
ECL Prime	GE Healthcare	A.B.D.	RPN2232

Tablo - 5: Western Blot analizlerinde kullanılan kimyasallar.

Western Blot analizinde kullanılan antikorlar, üretici firmaları ve katalog numaraları ile Tablo - 6'da gösterilmektedir.

Antikor	Üreten Firma	Ürün menşei	Katalog no
PFKFB2	Bioss	A.B.D.	bs-5005R
PFKFB3	Proteintech	A.B.D.	13763-1-AP
PFKFB4	Abgent	A.B.D.	AP8154C
β-aktin	Cell Signaling	A.B.D.	8H10D10
GAPDH	Cell Signaling	A.B.D.	14C10
CD24	ABclonal	A.B.D.	A17444
CD44	Novusbio	A.B.D.	NBP1-47386SS
HRP-konjuge sekonder goat-anti rabbit	Cell Signaling	A.B.D.	7074S
HRP-konjuge sekonder goat-anti mouse	Cell Signaling	A.B.D.	7076

Tablo - 6: Western Blot analizinde kullanılan antikorlar.

3.1.4. mRNA Ekspresyon Analizlerinde Kullanılan Malzemeler

Toplanan hücrelerden, GeneJet RNA Purification Kit kullanılarak ve imalatçı protokolü takip edilerek RNA'lar izole edildi (Thermo, Kat No: K0731). Ters transkripsiyon (*reverse transcription*, RT) metodu ile Komplementer DNA (cDNA) eldesi High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 4368814, A.B.D.) ile, imalatçı protokolü takip edilerek gerçekleştirildi.

Ters transkripsiyon kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ile mRNA ekspresyonu analizi için, TaqMan sistemi kullanıldı (Heid, Stevens, Livak, & Williams, 1996). Bu sistem, hedef gen için üretilen komplementer DNA (cDNA) 'ya spesifik bir çift PCR primer ve floresan ile işaretlenmiş probdan oluşmaktadır. cDNA amplifikasyonu; TaqMan Gen Ekspresyon Master Mix (Invitrogen; Kat. No. 4369016) kullanılarak gerçekleştirildi.

RT-qPCR işleminde kullanılan problar ve katalog numaraları Tablo - 7'de gösterilmektedir. Probların tamamı Applied Biosystems (A.B.D.)'dan temin edildi.

Prob	Katalog no
PFKFB1	Hs00997227_m1
PFKFB2	Hs01015408_m1
PFKFB3	Hs00998700_m1
PFKFB4	Hs00894603_m1
OCT4	Hs04260367_gH
SOX2	Hs01053049_s1
NANOG	Hs02387400_g1
KLF4	Hs00358836_m1
GAPDH	Hs02786624_g1

Tablo - 7: RT-qPCR'da kullanılan problar.

3.1.5. Flow Sitometride Kullanılan Malzemeler

Hücreler, analiz işlemi için IsoFlow (Beckman Coulter; Kat. No: 8547008) isimli izotonik bir çözeltide çözdürüldü. Flow sitometride kullanılan antikorlar ve katalog numaraları Tablo - 8’de gösterilmektedir. Antikorların tamamı BD (A.B.D.)’den temin edildi.

Antikor	Katalog no:
APC anti-human CD44	559942
PE anti-human CD24	555428

Tablo - 8: Flow sitometri ölçümlerinde kullanılan antikorlar.

3.1.6. Fruktoz 2,6 Bisfosfat(F2,6BP) Ölçümünde Kullanılan Malzemeler

Ölçümde kullanılan kimyasallar, üretici firmaları ve katalog numaraları ile Tablo - 9’da gösterilmektedir.

Kimyasal	Üreten firma	Ürün menşei	Katalog no
Asetik asit	Honeywell	A.B.D	27225
4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit (HEPES)	Merck	Almanya	391340
Tris	Invitrogen	A.B.D.	15504020
Magnezyum asetat	Sigma	A.B.D.	M5661
F6P	Sigma	A.B.D.	F3627
Nikotinamid dinükleotid	Sigma	A.B.D.	N9410
PFK-1	Sigma	A.B.D.	F6803
Aldolaz	Sigma	A.B.D.	A2714
Gliserol-3-fosfat dehidrojenaz	Sigma	A.B.D.	10127779001
Triozfosfat izomeraz	Sigma	A.B.D.	T6258
Pirofosfat	Sigma	A.B.D.	221368
F2,6BP standard solüsyonu	Sigma	A.B.D.	47822

Tablo - 9: F2,6BP ölçümünde kullanılan kimyasallar.

3.1.7. Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Çalışmalarda kullanılan cihazlar Tablo - 10’da gösterilmektedir.

Cihaz adı	Marka/model	Üretici firma	Menşei
Steril kabin	Bio II Advance	Telstar	İspanya
Santrifüj	NF1200R	Nüve	Türkiye
Santrifüj	3K30	Sigma	A.B.D.
Otoklav	OT40L	Nüve	Türkiye
Otomatik Isı Bloğu	MyGenie96	Bioneer	Güney Kore
RT-qPCR cihazı	Applied Biosystems	StepOne Plus	A.B.D.
UV Görüntüleme cihazı	ChemiDoc MP	BioRad	A.B.D.
Güç kaynağı(300 Volt)	VWR	Avantor	A.B.D.
Spektrofotometre	Epoch	Biotek	A.B.D.
Manyetik Karıştırıcı	MSH 300	Biosan	Türkiye
Hassas Terazı	CPA225D	Sartorius	Almanya
Saf Su Cihazı	Simplicity	Millipore	A.B.D.
Blok Isıtıcı	TS-100	Biosan	Türkiye
İnvert Mikroskop	3032	AccuScope	A.B.D.
İnkübatör	Incusafe	Panasonic	Japonya

Tablo - 10: Çalışmalarda kullanılan cihazlar.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. Adherent Hücre Kültürü

Çalışmada model olarak PDAK (PANC-1, ATCC, Kat. No. CRL-1469; Mia PaCa-2, ATCC, Kat. No. CRL-1420) ve meme (MCF-7, ATCC, Kat. No. CRL-3435) hücre hatları kullanıldı. PANC-1 hücreleri %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin çözeltisi ve 4,5 g/L glikoz içeren DMEM besi yerinde; Mia PaCa 2 hücreleri %10 FBS, %2,5 at serumu, %1 penisilin/streptomisin çözeltisi ve 4,5 g/L glikoz içeren DMEM besi yerinde çoğaltıldı. MCF-7 hücrelerinin çoğaltılmasında ise %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin çözeltisi ve 4,5 g/L glikoz içeren DMEM besi yeri kullanıldı. Deneyler sırasında hücreler, steril hücre kültürü flask ve plakalarında 37°C ve %5 CO₂'ye ayarlı nemli inkübatörde tutuldu. Pasajlama için, hücreler steril 1X PBS ile yıkandı ve Tripsin/EDTA ile flaskların tabanından kaldırıldı.

3.2.1.2. Yüzen Hücre Kültürü

Yüzen hücre kültürü oluşturularak elde edilen küreler, KKH özelliğine sahip hücre popülasyonu açısından zengindir (Ponti et al., 2005). Bu nedenle, PANC-1, Mia – PaCa 2 ve MCF-7 hücre hatlarında adherent olarak üretilen hücrelerin bir kısmının, KKH içeren popülasyonun total popülasyona oranını artırmak amacıyla ULA plakalarda, küre oluşturarak üremesi sağlandı. Hücre kültüründe pasajlama esnasında tripsinle kaldırılan hücrelerin bir kısmı ayrılıp santrifüj edilerek besi yeri uzaklaştırıldı ve KKH besiyeri olarak hazırlanan %2 B27 Serumsuz Katkı, 20 ng/ml EGF Rekombinant İnsan Protein solüsyonu, 10 ng/ml FGF Rekombinant İnsan Protein Solüsyonu, %1 penisilin/streptomisin solüsyonu ve 2 µg/ml %0,2 Heparin içeren 1: 1 DMEM-F12'de çözdürüldü. Hücre süspansiyonunu 300xg'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantı uzaklaştırıldı. Pellet 3 ml hacimde KKH besi yeri içerisinde çözdürüldü. Hücreler Thoma lamında sayıldıktan sonra, süspansiyon hacmi mililitrede 1×10^6 hücre olacak şekilde yeniden ayarlandı. Hücreler, mililitrede 1×10^4 hücre olacak şekilde, 6 kuyulu ULA plakanın her bir kuyusuna, 4 ml KKH besi yeri süspansiyonu içerecek şekilde ekildi. 7 gün inkübe edilen hücrelere, ekimin 3. gününde 2 mililitre KKH besi yeri eklendi.

Küreler, 7. günün sonunda 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Kürelerin yerçekimi ile çökmeleri için santrifüj tüpü oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.

Süpernatant, tüpün dibinde yaklaşık 200 µl besiyeri kalıncaya kadar uzaklaştırıldı. Tüpe 7 ml PBS eklenip 10 dakika bekletildikten sonra süpernatant, tüpün dibinde yaklaşık 200 µl PBS kalıncaya kadar uzaklaştırıldı. Tüpe 1 ml Tripsin –EDTA eklenerek 2 dakika, oda sıcaklığında bekletildi. Tripsin ile muamele etme aşamasında 30 saniyede bir pipetaj yapılarak küreler süspanse halde tutuldu. Tekli hücre süspansiyonu oluşturmak için 1000 µl lik pipet ucuyla kürelere pipetaj yapıldı. Pipetaj işlemi sonrası KKH besi yeriyle tripsin nötralize edildi. Hücre sayısı ve canlılık oranı belirlendikten sonra, hücre süspansiyonu 300×g’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra 1x10⁶ hücre/ml olacak şekilde KKH besi yeri ile yeniden süspanse edildi. Hücreler ULA plakaya, 1x10⁴ hücre/ml olacak şekilde 4 ml KKH besi yeri süspansiyonu şeklinde yeniden ekildi.

3.2.2. siRNA Transfeksiyonu

Transfeksiyon işleminde lipofeksiyon taşıtı olan Lipofecatamine RNAiMAX, imalatçı protokolü uygulandı. DMEM kullanılarak farklı tüplerde seyreltilen siRNA ve taşıt, yeni bir tüpte 1: 1 oranında karıştırıldı ve siRNA (30 nM) transfeksiyon çözeltisi elde edildi. Bu karışım, yaklaşık %50 yaygınlığa sahip hücrelere besi yeri değişiminin ardından bütün yüzeye eşit şekilde damlatılarak uygulandı.

3.2.3. mRNA Ekspresyon Analizleri

Hücre örneklerinden RNA saflaştırma kiti kullanılarak izole edilen toplam RNA miktarı, 260 nm’de spektrofotomerik ölçümle belirlendi. RNA’daki mRNA fraksiyonundan cDNA eldesi cDNA ters transkripsiyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA’lar ilgili genlerin ekspresyonlarının kantitasyonu için gerçekleştirilecek RT-qPCR analizinde alıp olarak kullanıldı. 1 µg total RNA, oligo dT primer, deoksinükleotid trifosfat, ters transkriptaz ve RNaz inhibitörü içeren 20 µl’lik karışım 25°C/10 dakika (Aşama 1), 37°C/120 dakika (Aşama 2) ve 85°C/5 dakika (Aşama 3)’ ya ayarlı PCR programında RT işlemine tabi tutuldu.

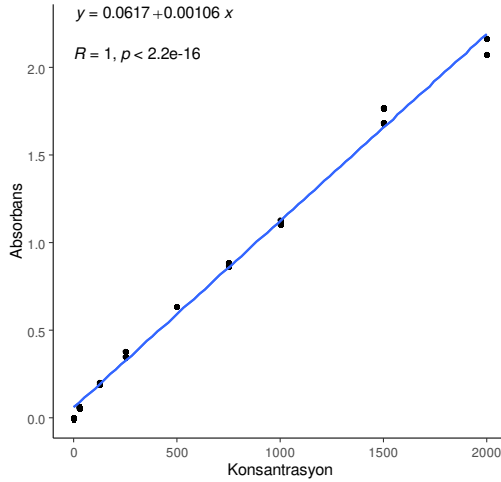
1: 20 oranında dilüe edilmiş cDNA, GoTaq Master Mix karışımı ve tespit edilecek gene ait prob içeren karışım, 95°C/20 saniye (Aşama 1), 95°C/1 dakika (Aşama 2) ve 60 °C/20 saniye (Aşama 3) programına ayarlı RT-qPCR cihazında reaksiyona tabi tutuldu. İkinci ve üçüncü aşamalar, 45 kere tekrarlandı. Reaksiyonlar StepOnePlus cihazı kullanılarak gerçekleştirildi ve StepOne Software versiyon 2.3 ile

analiz edildi. Elde edilen amplifikasyon eğrilerinden döngü eşiği (Ct) değerleri kullanılarak hedef genlerin mRNA ekspresyon düzeylerindeki nispi değişimler $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu ile hesaplandı (Livak & Schmittgen, 2001). Hesaplamalarda gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH) probu internal amplifikasyon kontrolü olarak kullanıldı.

3.2.4. Protein İzolasyonu ve Western Blotlama

3.2.4.1. Total Protein İzolasyonu

Adherent hücre gruplarında, hücreler tripsin ile kaldırıldıktan sonra +4° C’de santrifüj edilerek hücre pelleti elde edildi. Küre hücrelerinde ise, küreler dibe çöktürüldükten sonra tripsinizasyon ve pipetaj uygulanarak parçalandı; elde edilen hücre süspansiyonu +4° C’de santrifüj edilerek hücre pelleti elde edildi. Pelletlere protein lizis çözeltisi eklenerek çözelti içinde çözünene kadar pipetaj uygulandı. Elde edilen protein çözeltileri 15 dakika buzda bekletildikten sonra, membran ve çözeltide erimeyen atıkların dibe çöktürülmesi için 15000×g’de, 4 C’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, total protein lizatı olarak ayrıştırıldı. Örnekler arasında total protein konsantrasyonu yönünden fark oluşmaması amacıyla, protein eldesinin ardından protein konsantrasyonu, BCA metodu ile ölçüldü. 30 dakika 37°C’de inkübasyonun ardından, mikrolaka okuyucu cihazda 562 nm dalga boyu kullanılarak optik absorbans değerleri elde edildi. Bu sonuçlar, standart grafiğine göre konsantrasyon değerlerine çevrilerek örneklerin protein konsantrasyonları lizis çözeltisi ile eşitlendi (Şekil - 8). Ardından Western blot analizi için SDS- Poliakrilamid Jel Elektroforezi yükleme tamponu ile 1: 1 oranında karıştırılarak 95°C’de 5 dakika süreyle denatüre edildi.



Şekil - 8: Protein konsantrasyon ölçümünde referans olarak kullanılan BCA standart solüsyonunun absorbans/konsantrasyon grafiği.

3.2.4.2. Western Blotlama

Eşit miktarda protein içeren (25 µg) örnekler, %10 Mini – PROTEAN TGX poliakrilamid jellere yüklendi. Elektroforezin ardından jeller, polivinilidin florür (PVDF) membranlara transfer edildi. Transfer sonrasında membranlar Western Blot bloklama çözeltisi ile 1 saat süreyle bloklandı. Membran üzerindeki ilgili proteinler spesifik primer antikorlar ve Bayır Turpu Peroksidazı (HRP)-konjuge sekonder goat-anti rabbit veya goat-anti mouse IgG ile inkübe edilip kemilüminesans ayıraç ile muamele edildikten sonra görüntüleme cihazında analiz edildi. Primer antikorlarda 1/500-1000 dilüsyon kullanıldı. Sekonder antikor için dilüsyon oranı 1/5000-30000 olarak belirlendi. Membranlar primer antikorlarda +4°C'de gece boyu, sekonder antikorlarda ise oda ısısında 1 saat bekletildi. Antikor inkübasyonlarından sonra membranların yıkanması TBS-T ile yapıldı.

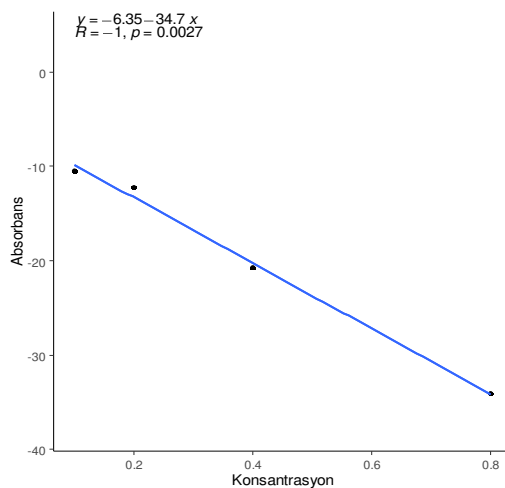
3.2.5. Flow Sitometri

Ayrıştırılarak tek hücre süspansiyonu haline getirilen adherent ve yüzen hücreler, 1×10^6 /1 ml yoğunlukta olacak şekilde, çoğaltılmaları esnasında kullanılan besi yerlerinde çözdürüldü. Her hücre grubu için iki farklı tüp oluşturuldu. Hazırlanan hücre süspansiyonundan iki ayrı tüpe 100 µl eklendi. İlk tüp, hücre kontrolü olarak kullanılmak üzere boş bırakıldı. İkinci tüpe, allofikosianin (APC) anti-mouse CD44 ve fikoeritrin (PE) anti-mouse CD24 antikorları sırasıyla 1: 200/1: 20 konsantrasyonda eklendi ve oda sıcaklığında, karanlık ortamda 15 dakika bekletildi. İnkübasyonun

ardından 500xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edilen hücrelerin süpernatantları uzaklaştırılarak, 1 ml İzoflow çözeltisi içinde yeniden çözündürüldü ve flow sitometri cihazında analiz edildi (Beckman Coulter Navios EX). Cihazdan alınan veri Kaluza Analysis versiyon 2.1 ile işlendi. Çalışmada, KKH profili olarak MCF-7 hücre hattı için CD24⁺/CD44⁺ (Al-Hajj et al., 2003), MIA PaCa-2 hücre hattı için CD24⁺/CD44⁺ (Gradiz et al., 2016), PANC-1 hücre hattı için de CD24⁺/CD44⁺ (Yin et al., 2011) yüzey markörü profili kullanıldı.

3.2.6. Fruktoz-2,6-Bisfosfat Ölçümü

Hücreler soğuk PBS ile iki kez yıkandıktan sonra 100 mM NaOH solüsyonunda 80 °C'de 5 dk lize edildi. 1 M asetik asit ve 1 M HEPES kullanılarak lizatların pH'sı 7.2 olacak şekilde ayarlandı. Örneklerin Fru-2,6-BP konsantrasyonu, (Schaftingen & Hers, 1980)'in protokolünden uyarlanan yöntemle kinetik spektrofotometrik olarak belirlendi. Kısaca, örnekler 25 °C'de 10 dakika boyunca; 50 mM Tris, 2mM Mg⁺², 1 mM Fruktoz-6-fosfat, 0,15 mM nikotinamid dinükleotid, 10 kU/l Pirofosfat-bağlı PFK-1, 0,45 kU/l aldolaz, 0,5 kU/l tirozfosfat izomeraz, 1,7 kU/l gliserol-3-fosfat dehidrojenaz ve 0,5 mM pirofosfat bulunan ortamda inkübe edildi. 0,5 mM pirofosfat eklenmesiyle başlatılan reaksiyon boyunca dakikada bir 339 nanometre dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Örneklerin Fru-2,6-BP konsantrasyonları, ölçülen standartlara göre hazırlanmış grafiğe göre hesaplandı (Şekil - 9) ve total protein düzeylerine normalize edildi.



Şekil - 9: Fru-2,6-BP standart absorbans değişim hızı/konsantrasyon grafiği.

3.2.7. Yumuşak Agarda Koloni Formasyonu

Yumuşak agar deneyleri, hücrelerin yüzeye tutunmadan yarı katı bir ortamda 3 boyutlu üreyerek koloni oluşturma potansiyellerinin değerlendirildiği çalışmalardır. Koloni oluşumu sonucu gözlemlenen klonojenik aktivite, deney grubundaki KKH popülasyonunun bir indikatörü olarak görülebilir (Rajendran & Jain, 2018).

6 kuyulu hücre kültürü plakasına, %0,6 yoğunlukta agaroz içeren besiyerinden 1,5 ml olacak şekilde eklendi ve oda sıcaklığında katılaşmaya kadar bekletildi. Ardından, %0,3 konsantrasyonda agaroz ve 7500 hücre/kuyu yoğunluğunda hücre içeren besiyeri hazırlandı. Agaroz-hücre karışımı, donmuş %0,6 agaroz-besiyeri içeren her bir kuyuya 1,5 ml eklendi. Hücreler 45 dakika oda ısısında bırakıldıktan sonra inkübatörde 3 hafta boyunca çoğaltıldı. Kuyulara haftada bir kez besi yeri ilavesi yapıldı. 3 haftanın ardından, kuyulardaki sıvı besi yeri uzaklaştırıldı ve %0.2 kristal viole çözeltisi eklendi. Yarım saat sonra boya uzaklaştırıldı ve kuyular PBS ile yıkandı. Boyanan kolonilerin görüntüleri kaydedildi; koloniler Image J versiyon 1.53e (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012) ile sayı ve çap yönünden incelendi.

3.2.8. Klonojenik Analiz

Tümör hücrelerinde onkojenik potansiyelin tespiti amacıyla yönelik bir diğer deney de klonojenik analizdir. Yumuşak agar koloni formasyonundan farklı olarak bu deneyde, hücre kültürü plakalarına adherent olarak ekilen hücrelerin koloni oluşturma potansiyeli gözlenmektedir.

Hücreler 24 kuyulu hücre plakalarına, 300 hücre/kuyu olacak şekilde ekilerek 7 gün boyunca inkübatörde çoğaltıldı. Hücrelerin besi yerleri en az 3 günde bir değiştirildi. Bir haftalık inkübasyonun ardından, kuyulardaki besi yeri uzaklaştırılarak hücreler metanol ile -20° C'de 10 dakika süreyle fikse edildi. Fiksasyon işlemini takiben, kuyulara metanolde çözünmüş %0.2 kristal viole çözeltisi eklenerek 10 dakika boyunca bekletildi. Boya uzaklaştırıldıktan sonra kuyular PBS ile yıkandı. Kolonilerin mikroskopik ve makroskopik görüntüleri kaydedildi; koloniler Image J versiyon 1.53e (Schneider et al., 2012) ile sayı ve çap yönünden incelendi.

3.2.9. İnvazyon Analizi

İnvazyon kabiliyeti, KKH'ler için ayırıcı olan özelliklerden biridir (Mani et al., 2008; Thomas et al., 2016). Bu analizde; in vitro ortamda bazal lamina koşullarını oluşturabilen Matrigel (Corning; Kat. No. 354234) ve 24 kuyulu, 8 µm Polietilen tereftalat membran bulunduran Boyden invazyon hazneleri (Corning; Kat. No. 354578) kullanılarak, hücrelerin invazyon kabiliyeti kıyaslandı.

İnvazyon haznelerinin tabanı, 1 µg/ml konsantrasyona seyreltilmiş olan Matrigel ile kaplandı ve 2 saat süreyle inkübe edildi. Tripsinizasyon ile kaldırılan ve %0,5 FBS içeren besi yerinde çözündürülen hücreler, 500 µl besi yerinde 50000 hücre olacak şekilde seyreltilerek, invazyon haznelerinin üst bölmelerine aktarıldı. Haznelerin alt bölmelerine, kemoatraktan olarak 750 µl %10 FBS içeren besi yeri eklendi ve hücreler 37 °C'de % 5 CO₂ içeren ortamda 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, insertlerin içerisindeki besi yerleri uzaklaştırıldı. Haznenin üst kısmında kalan hücrelerin temizlenmesi amacıyla, PBS ile ıslatılmış pamuklu çubuk kullanılarak haznelerin iç kısmı PBS ile yıkandı. İnvaze olan hücreler metanolde 5 dakika fikse edilerek %0.2 kristal viole ile 15 dakika boyandı. Boyanan hücreler, ışık mikroskopunda 20X'lik objektif altında, en az 3 sahadan fotoğraflandı. Elde edilen fotoğraflardan, ImageJ versiyon 1.53e (Schneider et al., 2012) ile hücre sayımı yapıldı ve sonuçlar yüzdelik değişim olarak hesaplandı.

3.2.10. Küre Oluşturma

Hücrelerdeki KKH içeriğinin kantitatif kıyaslanması amacıyla yapılan deneyde; hücre flasklarında iki boyutlu olarak üretilen hücreler tripsin ile kaldırıldıktan sonra, KKH besi yeri kullanılarak 25000 hücre/ml olacak şekilde seyreltilerek ULA plakalara ekildi ve 37°C'de % 5 CO₂ içeren ortamda 7 gün boyunca çoğaltıldı.. Oluşan poliklonal küreler, ışık mikroskopunda fotoğraflanarak Micrometrics SE Premium versiyon 4.5.1 ile alanları ölçüldü. Küreler, sayı ve alan yönünden incelendi.

3.2.11. ONCOMINE Analizi

ONCOMINE; çeşitli hücre hatları ve kanser tiplerinden elde edilen mikro array verilerinin toplandığı, veri madenciliğine müsait formda işlendiği ve görselleştirildiği, kamuya açık bir platformdur ("ONCOMINE", t.y.). Kanserli dokularda PFKFB1 ve PFKFB4 ekspresyonlarının normal dokulara kıyaslanması amacıyla ONCOMINE veritabanı araştırması yapıldı. Pankreas kanseri için "Ishikawa" (Ishikawa et al., 2005), meme kanseri için "Curtis"(Curtis et al., 2012) olarak adlandırılan veri setleri kullanıldı.

3.2.12. İstatistiksel Analizler

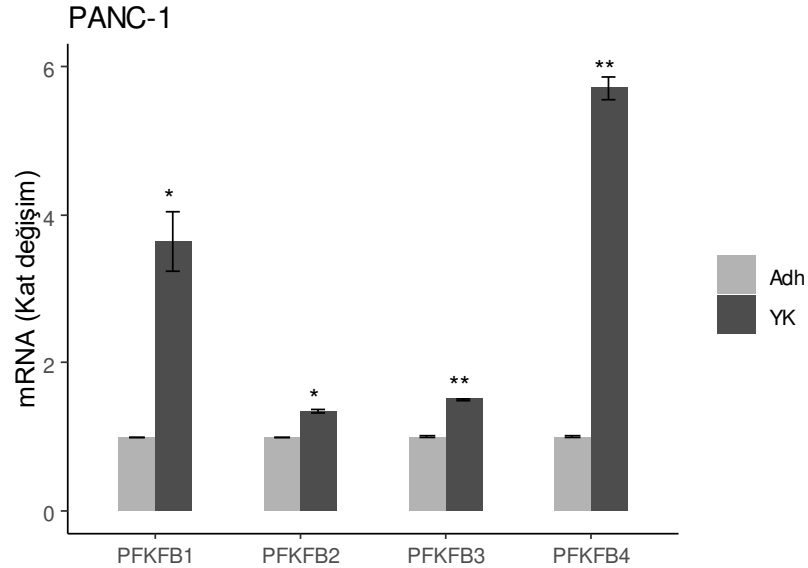
Kantitatif veriler; normal dağılım gösteren gruplarda "ortalama $\pm$ standart sapma", normal dağılım göstermeyen gruplarda "ortalama $\pm$ standart sapma (medyan, çeyrekler açıklığı (IQR))" olarak ifade edildi. RT-qPCR istatistiksel analizlerinde $\Delta\Delta C_t$, RT-qPCR grafiklerinde mRNA ekspresyonu kat değişim ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) verileri kullanıldı. İstatistiksel analizlerde, varyansları eşit olmayan iki grubun, çift kuyruklu parametrik testi (Welch test) veya non-parametrik testi (Mann-Whitney) kullanıldı. p değerinin 0.05`den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analizler ve veri görselleştirme R versiyon 4.0.3 (R Core Team, 2020) ile yapıldı. Grafiklerin oluşturulmasında tidyverse (Wickham et al., 2019), ggpubr (Alboukadel Kassambara, 2020) ve ggpmisc (Pedro J. Aphalo, 2021) kütüphanelerinden yararlanıldı. Grafiklerdeki istatistiksel farklılıklar "*" ile işaretlenerek gösterildi. p değerinin 0,05`ten 0.01`e kadar olduğu durumlarda "**", p değerinin 0,01`den 0,001`e kadar olduğu durumlarda "***", 0,001`den küçük olduğu durumlarda "****" işareti kullanıldı. Aralarında anlamlı bir farklılık bulunmayan değerler üzerinde işaretleme yapılmadı.

4. BULGULAR

4.1. Yüzen ve Adherent Hücre Kültürlerinde PFKFB İzoenzim Ekspresyonlarının Kıyaslanması

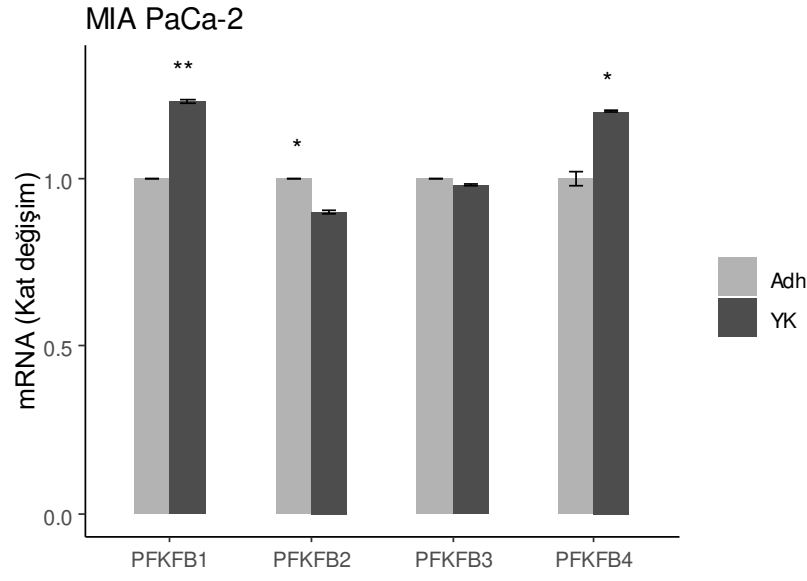
Farklı metotlarla üretilen hücre hatlarındaki bazal PFKFB izoenzim seviyeleri mRNA ve protein düzeyinde incelendi. PANC-1, Mia PaCa-2 ve MCF-7 hücre hatlarından, hücre kültürü plakalarında adherent (Adh) ve ULA plakalarda yüzen kültür (YK) olarak çoğaltılan iki deney grubu oluşturuldu. Gruplardan izole edilen mRNA protein örnekleri; PFKFB1, PFKFB2, PFKFB3 ve PFKFB4 ekspresyonu yönünden RT-qPCR ile kıyaslandı. Bütün hücre hatlarında adherent hücre gruplarının ekspresyonu 1 kabul edilerek yüzen kültürlerdeki kat değişim miktarları, adherent gruplara göre relatif olarak hesaplandı.

Ekspresyonlar PANC-1 hücre hattında PFKFB1 Adh: $1 \pm <0,001$, YK: $3,64 \pm 0,4$ ($p=0,038$), PFKFB2 Adh: $1 \pm 0,0002$, YK: $1,34 \pm 0,0188$ ($p=0,021$), PFKFB3 Adh: $1 \pm 0,0092$, YK: $1,5 \pm 0,0205$ ($p=0,002$), PFKFB4 Adh: $1 \pm 0,0087$, YK: $5,71 \pm 0,155$ ($p=0,003$) olarak belirlendi (Şekil - 10). PANC-1 hücre hattında, yüzen hücre kültüründe bütün PFKFB izoenzimlerinin mRNA ekspresyonu kat değişiminde artış görüldü.



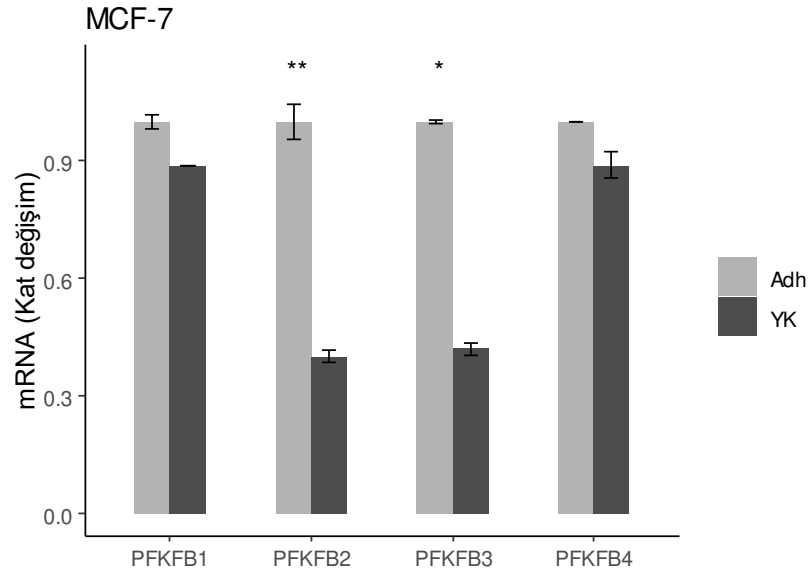
Şekil - 10: PANC-1 hücre hattında Adh ve YK hücrelerin PFKFB izoenzim mRNA ekspresyonları. β -aktin endojen kontrol olarak kullanıldı.

MIA PaCa-2 hücre hattında PFKFB1 Adh: $1 \pm 0,0004$, YK: $1,23 \pm 0,0038$ ($p=0,006$), PFKFB2 Adh: $1 \pm 0,0004$, YK: $0,9 \pm 0,0031$ ($p=0,014$), PFKFB3 Adh: $1 \pm 0,001$, YK: $0,98 \pm 0,0031$ ($p=0,06$), PFKFB4 Adh: $1 \pm 0,201$, YK: $1,2 \pm 0,0041$ ($p=0,045$) olarak belirlendi (Şekil - 11). Mia PaCa-2 hücre hattında, yüzen hücre kültüründe, adherent hücelere kıyasla PFKFB2 izoenziminde azalma, PFKFB1 ve PFKFB4 izoenzimlerinde artış görüldü.



Şekil - 11: MIA PaCa-2 hücre hattında Adh ve YK hücrelerin PFKFB izoenzim mRNA ekspresyonları. GAPDH endojen kontrol olarak kullanıldı.

MCF-7 hücre hattında PFKFB1 Adh: $1 \pm 0,0175$, YK: $0,89 \pm <0,001$ ($p=0,069$), PFKFB2 Adh: $1 \pm 0,0465$, YK: $0,4 \pm 0,0164$ ($p=0,002$), PFKFB3 Adh: $1 \pm 0,0045$, YK: $0,42 \pm 0,0158$ ($p=0,018$), PFKFB4 Adh: $1 \pm <0,001$, YK: $0,89 \pm 0,0331$ ($p=0,137$) olarak belirlendi (Şekil - 12). MCF-7 hücre hattında, yüzen hücre kültüründeki PFKFB2 ve PFKFB3 izoenzim mRNA kat değişiminin, adherent kültüre göre daha düşük olduğu gözlemlendi. Diğer izoenzimlerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi.

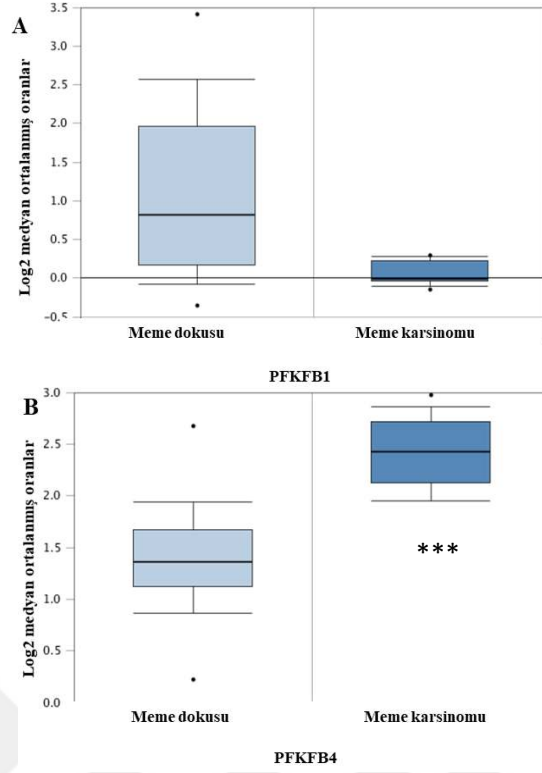


Şekil - 12: MCF-7 hücre hattında Adh ve YK hücrelerin PFKFB izoenzim mRNA ekspresyonları. GAPDH endojen kontrol olarak kullanıldı.

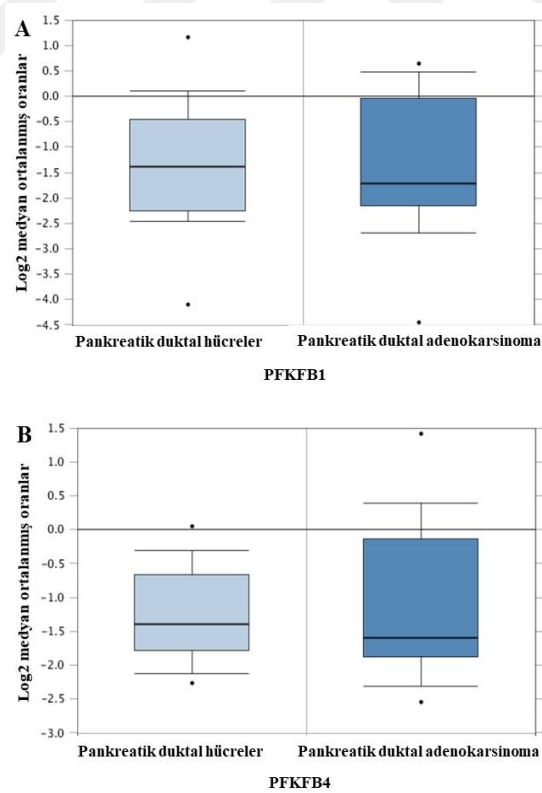
RT-qPCR deneyinde gözlemlenen PFKFB1 ve PFKFB4 artışının ardından, odaklanılacak izoenzimin seçiminde ONCOMINE veritabanı analizine başvuruldu. Meme ve pankreas dokusunda kanserli dokularla normal dokular arasındaki PFKFB1 ve PFKFB4 kat değişimlerini gösteren iki çalışma seçildi.

İncelenen çalışmalarda meme karsinomunda, meme dokusuna kıyasla PFKFB1 mRNA ekspresyonunun 2,04 kat azaldığı ($p=1$) (Şekil - 13A) ; PFKFB4 ekspresyonunun ise 2,006 kat arttığı ($p<0,001$) (Şekil - 13B) belirlendi. Pankreatik duktal hücrelerde, PDAK hücrelerine kıyasla PFKFB1 mRNA ekspresyonunun 1,002 kat arttığı ($p=0,498$) (Şekil - 14A); PFKFB4 ekspresyonunun ise 1,115 kat arttığı belirlendi ($p=0,28$) (Şekil - 14B). Meme kanserinde PFKFB4 ekspresyonunun normal dokuya kıyasla anlamlı derecede arttığı görüldü. Pankreas kanserinde ise PFKFB1 ve PFKFB4 ekspresyonlarında normal dokulara kıyasla anlamlı bir farklılık olmadığı, ancak PFKFB4 kat değişiminin PFKFB1'e nispeten daha yüksek olduğu görüldü.

Yapılan çalışma sonucunda, PFKFB4 izoenzimi seviyesinde yapılacak değişikliklerin olası etkilerinin gözlenmesine karar verildi.



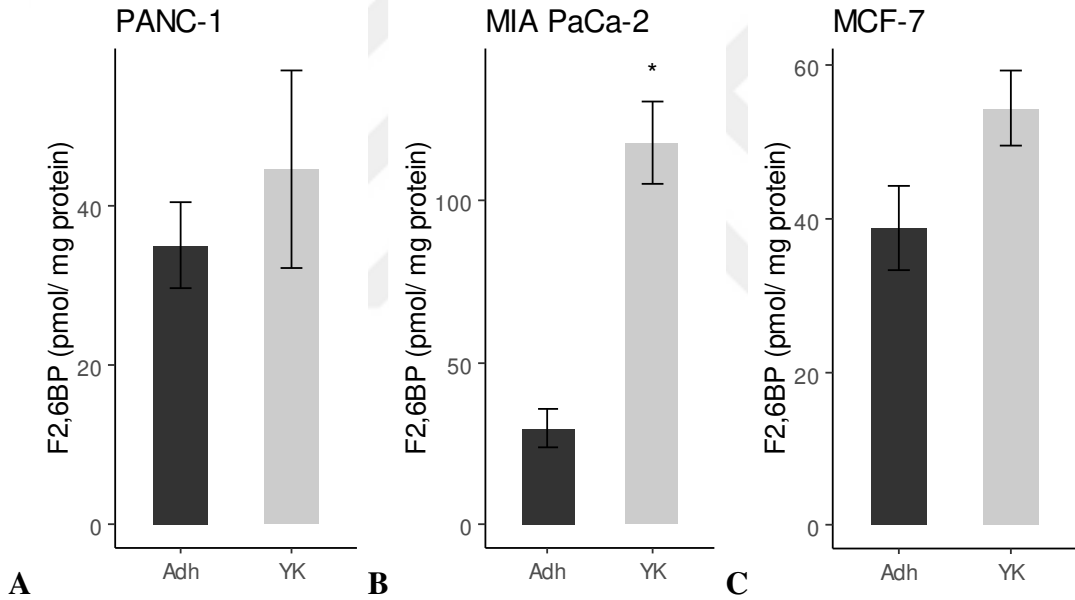
Şekil - 13: ONCOMINE meme veri setinde PFKFB1 (A) ve PFKFB4 (B) mRNA ekspresyonları.



Şekil - 14: ONCOMINE pankreas veri setinde PFKFB1 (A) ve PFKFB4 (B) mRNA ekspresyonları.

4.2. Yüzen ve Adherent Hücre Kültürlerinde F2,6BP Seviyelerinin Kıyaslanması

PANC-1, MIA PaCa-2 ve MCF-7 hücre hatlarında adherent ve yüzen kültür olarak çoğaltılan deney grupları, F2,6BP miktarları açısından kıyaslandı. Hücre gruplarının Fru-2,6-BP değerleri, PANC-1 hücre hattında Adh: $35,05 \pm 5,37$ pmol/mg protein, YK: $44,59 \pm 12,36$ pmol/mg protein ($p=0,3$) (Şekil - 15A), MIA PaCa-2 hattında Adh: $29,6 \pm 5,89$ pmol/mg protein, YK: $117,85 \pm 12,77$ pmol/mg protein ($p=0,033$) (Şekil - 15B), MCF-7 hücre hattında Adh: $38,76 \pm 5,42$ pmol/mg protein, YK: $54,29 \pm 4,89$ pmol/mg protein ($p=0,187$) (Şekil - 15C) olarak belirlendi. MIA PaCa-2 hücre hattında yüzen hücre kültüründe F2,6BP seviyesinde artış görüldü. Diğer hücre hatlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi.



Şekil - 15: PANC-1 (A), MIA PaCa 2 (B) ve MCF-7 (C) hücre hatlarında Adh ve YK hücrelerin hücre içi F2,6BP değerleri. Ölçülen değerler hücrelerin protein konsantrasyonlarına normalize edildi ve pmol/mg protein olarak gösterildi.

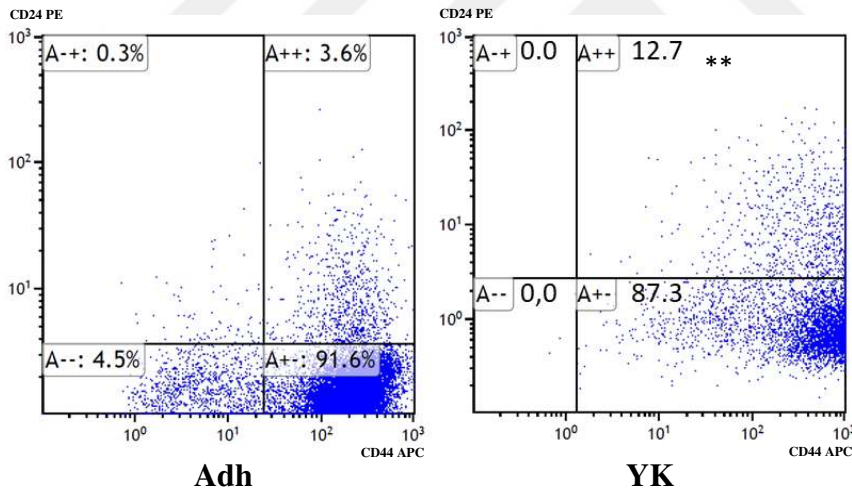
4.3. Yüzen ve Adherent Hücre Kültürlerinde KKH Özelliği Gösteren Hücre Miktarlarının Kıyaslanması

PANC-1, MIA PaCa-2 ve MCF-7 hücre hatlarında adherent ve yüzen kültür olarak çoğaltılan deney grupları, içerdikleri KKH profiline uyan hücreler yönünden kıyaslandı.

4.3.1. Hücre Kültürlerinin KKH İle Karakterize Yüzey Reseptör Ekspresyonları Yönünden Kıyaslanması

CD'lerin eksprese edilme miktarına göre profil oluşturma, herhangi bir hücre hattı veya dokudan elde edilen hücre süspansiyonundaki KKH'leri ayırmanın yollarından birisidir. PANC-1, MIA PaCa-2 ve MCF-7 hücre hatlarında adherent ve yüzen kültür olarak çoğaltılan deney gruplarındaki hücreler, tripsin ve mekanik ayrıştırma ile tek hücre süspansiyonu haline getirildi ve CD24 ve CD44 yüzey markörleri ekspresyonları yönünden flow sitometri ile incelendi.

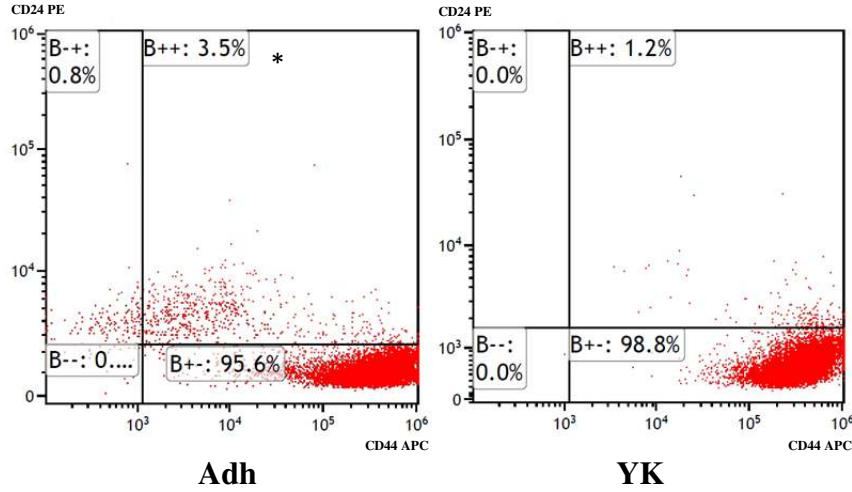
PANC-1 hücre hattında yüzey markör ekspresyonlarının, kapı alınan hücrelerdeki yüzde cinsinden miktarı: Adh CD24⁺: % 3,9, YK CD24⁺: %12,7 (p=0,001), Adh CD44⁺: %95,2, YK CD44⁺: %100 (p=0,004), Adh CD24⁺/CD44⁺: %3,6, YK CD24⁺/CD44⁺: %12,7 (p=0,001) (Şekil - 16). PANC-1 hücre hattında, yüzen hücre kültüründe KKH markörü olan 24⁺/44⁺ hücrelerin, adherent hücre kültürüne kıyasla fazla olduğu görüldü.



Şekil - 16: CD24 ve CD44 yüzey markörlerinin; PANC-1 hücre hattında Adh ve YK hücrelerdeki miktarının yüzde olarak ifadesi.

A-+: CD44-/CD24+ , A--: CD44-/CD24-, A+-: CD44+/CD24-, A++: CD44+/CD24+.

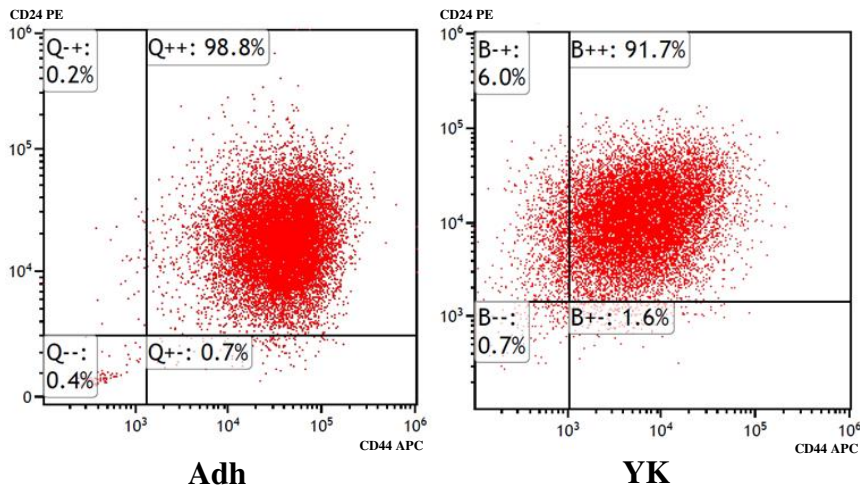
MIA PaCa-2 hücre hattında yüzey markör ekspresyonlarının, kapı alınan hücrelerdeki yüzde cinsinden miktarı: Adh CD24⁺: %4,3, YK CD24⁺: 1,2 % (p=0,017), Adh CD44⁺: %99,1, YK CD44⁺: 100 % (p=0,138), Adh CD24⁺/CD44⁺: %3,5, YK CD24⁺/CD44⁺: %1,2 (p=0,03). MIA PaCa-2 hücre hattında yüzen hücre kültüründe 24⁺/44⁺ hücre sayısında azalma görüldü (Şekil - 17).



Şekil - 17: CD24 ve CD44 yüzey markörlerinin; MIA PaCa-2 hücre hattında Adh ve YK hücrelerdeki miktarının yüzde olarak ifadesi.

B-+: CD44-/CD24+, B--: CD44-/CD24-, B+-: CD44+/CD24-, B++: CD44+/CD24+.

MCF-7 hücre hattında yüzey markör ekspresyonlarının, kapı alınan hücrelerdeki yüzde cinsinden miktarı: Adh CD24⁺: %99, YK CD24⁺: % 97,7 (p=0,09), Adh CD44⁺: % 99,5, YK CD44⁺: % 93,3 % (p=0,004), Adh CD24⁻/CD44⁺: %0,7, YK CD24⁻/CD44⁺: %1,6 (p=0,157). MCF-7 hücre hattında, yüzen kültürde 24-/44+ hücre sayısında artış görüldü ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (Şekil - 18).

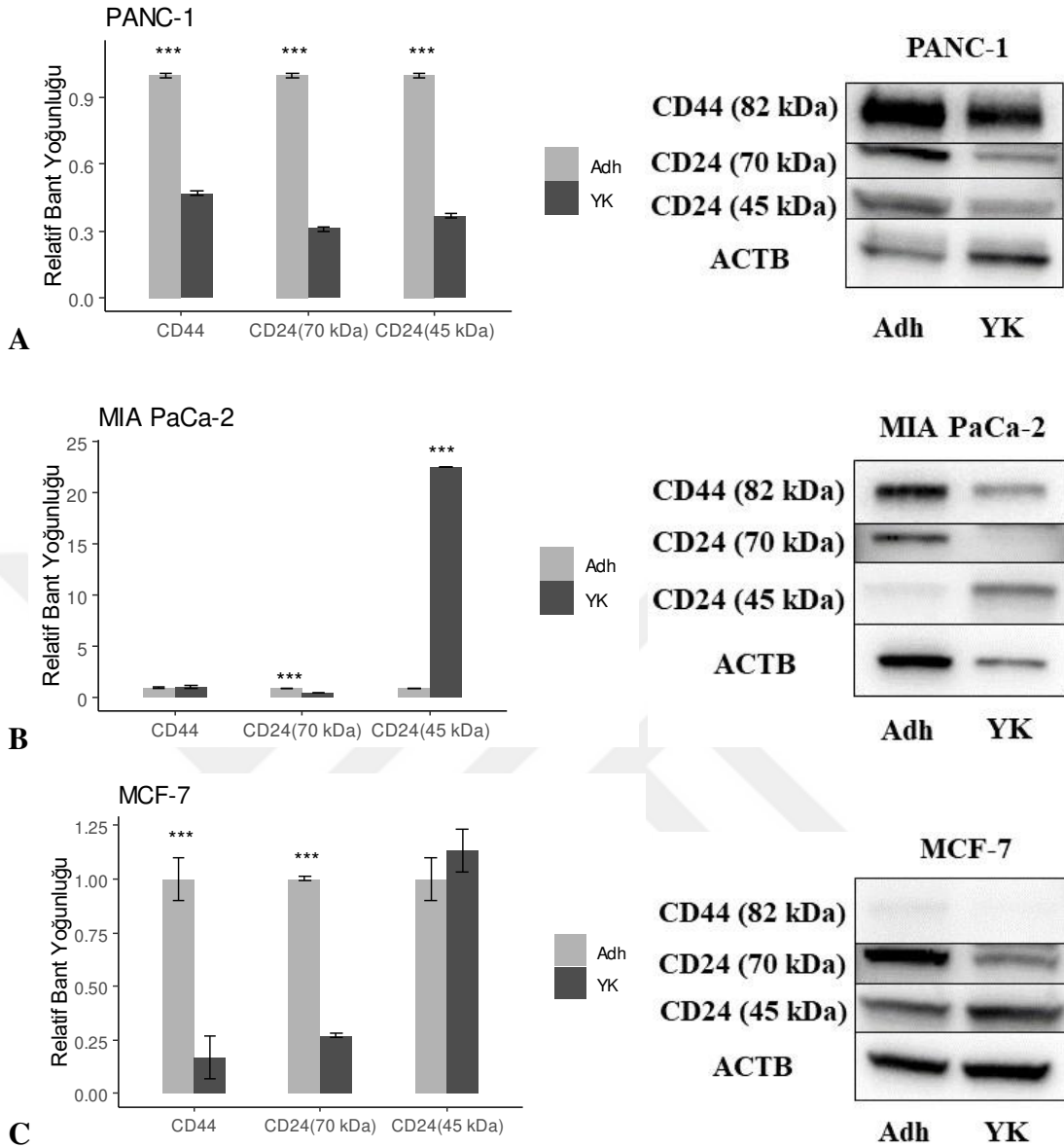


Şekil - 18: CD24 ve CD44 yüzey markörlerinin; MCF-7 hücre hattında Adh ve YK hücrelerdeki miktarının yüzde olarak ifadesi.

B-+: CD44-/CD24+, B--: CD44-/CD24-, B+-: CD44+/CD24-, B++: CD44+/CD24+.

Flow sitometri ile yapılan hücre profili oluşturma işleminin ardından, yüzey reseptörlerinin protein seviyesindeki incelenmesi Western Blot analizi ile yapıldı. Relatif kantitasyon hesaplanmasında, bütün hücre hatlarında adherent hücre kültürü kontrol grubu olarak belirlendi ve ekspresyonları 1 kabul edildi. Ekspresyonlar PANC-1 hücre hattında CD44 Adh: $1 \pm 0,01$, YK: $0,47 \pm 0,01$ ($p<0,001$), CD24 (70 kDa) Adh: $1 \pm 0,01$, YK: $0,31 \pm 0,01$ ($p<0,001$), CD24 (45 kDa) Adh: $1 \pm 0,01$, YK: $0,37 \pm 0,01$ ($p<0,001$) (Şekil - 19A), MIA PaCa-2 hücre hattında CD44 Adh: $1 \pm 0,1$, YK: $1,08 \pm 0,01$ ($p=0,616$), CD24 (70 kDa) Adh: $1 \pm 0,01$, YK: $0,54 \pm 0,01$ ($p<0,001$), CD24 (45 kDa) Adh: $1 \pm 0,01$, YK: $22,57 \pm 0,01$ ($p<0,001$) (Şekil - 19B), MCF-7 hücre hattında CD44 Adh: $1 \pm 0,01$, YK: $0,17 \pm 0,01$ ($p<0,001$), CD24 (70 kDa) Adh: $1 \pm 0,01$, YK: $0,27 \pm 0,01$ ($p<0,001$), CD24 (45 kDa) Adh: $1 \pm 0,1$, YK: $1,13 \pm 0,1$ ($p=0,537$) olarak belirlendi (Şekil - 19C).

Panc1 hücre hattı yüzen kültürde CD24 ve CD44 protein seviyelerinde azalma görüldü. MIA PaCa-2 hücre hattında yüzen kültürde CD24 (45 kDa) protein seviyesinde artış, CD24 (70 kDa) seviyesinde azalma görüldü. MCF-7 hücre hattı yüzen kültürde CD24 (45 kDa) seviyesinde istatistiksel önemi olmayan bir artış; CD24 (70 kDa) ve CD44 protein seviyelerinde azalma görüldü.



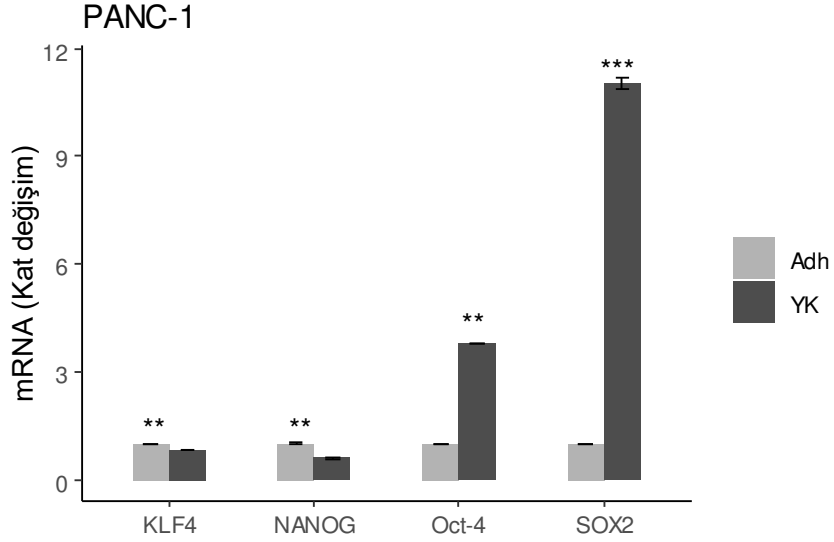
Şekil - 19: PANC-1 (A), MIA PaCa-2 (B) ve MCF-7(C) hücre hatlarında Adh ve YK hücrelerin Western blotlama görüntüsü ve elde edilen görüntüden yapılan relatif dansitometrik ölçüm. Sonuçlar adherent hücrelerin protein ekspresyonuna göre relatif olarak gösterilmektedir. Görüntülemeye yükleme kontrolü olarak β -aktin kullanılmıştır.

4.3.2. Hücre Kültürlerinin Pluripotentlik Markör Ekspresyonları Yönünden Kıyaslanması

PANC-1, MIA PaCa-2 ve MCF-7 hücre hatlarında adherent ve yüzen kültür olarak çoğaltılan deney grupları, pluripotentlik markörleri olan KLF4, NANOG, OCT4 ve SOX2 mRNA ekspresyonları yönünden karşılaştırıldı. PANC-1 hücre hattında KLF4 Adh: $1 \pm 0,01$, YK: $0,84 \pm 0,01$ ($p=0,006$), NANOG Adh: $1 \pm 0,0173$,

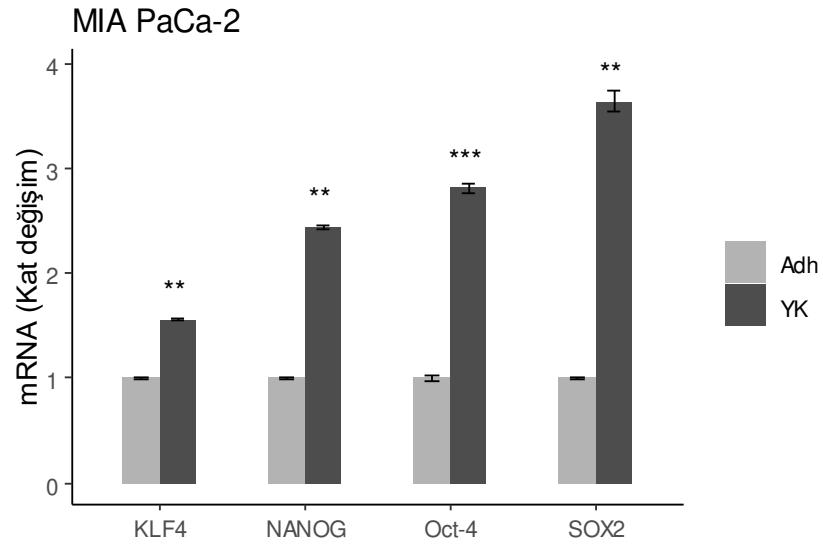
YK: $0,6 \pm 0,0082$ ($p=0,001$), OCT4 Adh: $1 \pm 0,0074$ YK: $3,8 \pm 0,001$ ($p=0,002$), SOX2 Adh: $1 \pm 0,013$ YK: $11 \pm 0,1582$ ($p<0,001$) olarak belirlendi (Şekil - 20).

Yüzen hücre kültüründe, adherent hücre kültürüne kıyasla OCT4 ve SOX2 markörleri mRNA ekspresyonu kat değişiminde artış görüldü.



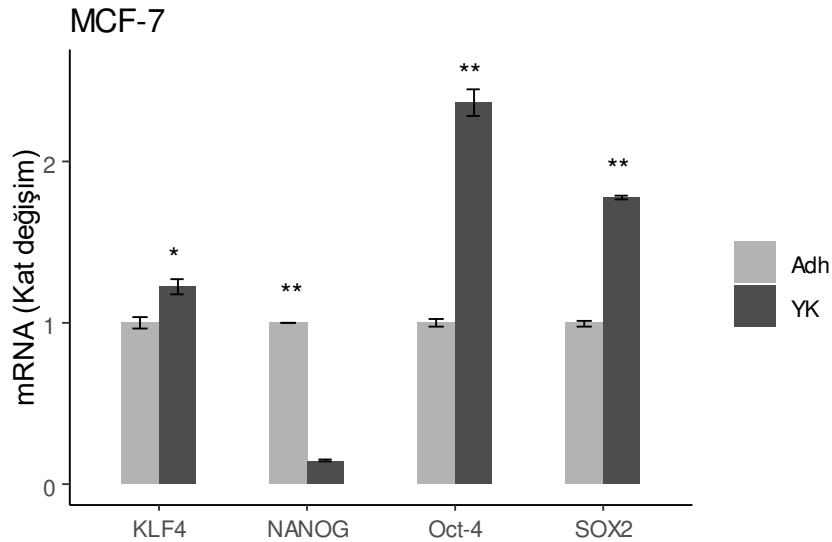
Şekil - 20: PANC-1 hücre hattında Adh ve YK hücrelerde pluripotenslik markörlerinin mRNA ekspresyonu yönünden incelenmesi. GAPDH endojen kontrol olarak kullanıldı.

MIA PaCa-2 hücre hattında KLF4 Adh: $1 \pm 0,0015$, YK: $1,56 \pm 0,0116$ ($p=0,005$), NANOG Adh: $1 \pm 0,0109$, YK: $2,44 \pm 0,0123$ ($p=0,001$), OCT4 Adh: $1 \pm 0,021$, YK: $2,81 \pm 0,05$ ($p<0,001$), SOX2 Adh: $1 \pm 0,0037$, YK: $3,64 \pm 0,102$ ($p=0,009$) olarak belirlendi. Yüzen hücre kültüründe, adherent hücre kültürüne kıyasla incelenen bütün markörlerde mRNA ekspresyonu kat değişiminde artış görüldü (Şekil - 21).



Şekil - 21: MIA PaCa-2 hücre hattında Adh ve YK hücrelerde pluripotential markörlerinin mRNA ekspresyonu yönünden incelenmesi. GAPDH endojen kontrol olarak kullanıldı.

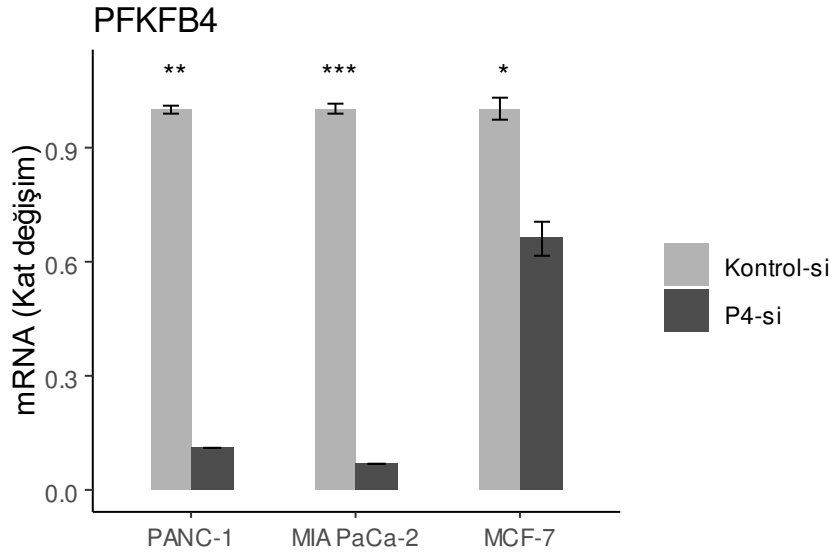
MCF-7 hücre hattında KLF4 Adh: $1 \pm 0,0312$, YK: $12 \pm 0,045$ ($p=0,03$), NANOG Adh: $1 \pm <0,001$, YK: $0,14 \pm 0,005$ ($p=0,008$), OCT4 Adh: $1 \pm 0,0183$, YK: $2,37 \pm 0,086$ ($p=0,005$), SOX2 Adh: $1 \pm 0,0176$, YK: $1,78 \pm 0,013$ ($p=0,005$) olarak belirlendi (Şekil - 22). Yüzen hücre kültüründe, adherent hücre kültürüne kıyasla OCT4, SOX2 ve KLF4 markörleri mRNA ekspresyonu kat değişiminde artış görüldü.



Şekil - 22: MCF-7 hücre hattında Adh ve YK hücrelerde pluripotential markörlerinin mRNA ekspresyonu yönünden incelenmesi. GAPDH endojen kontrol olarak kullanıldı.

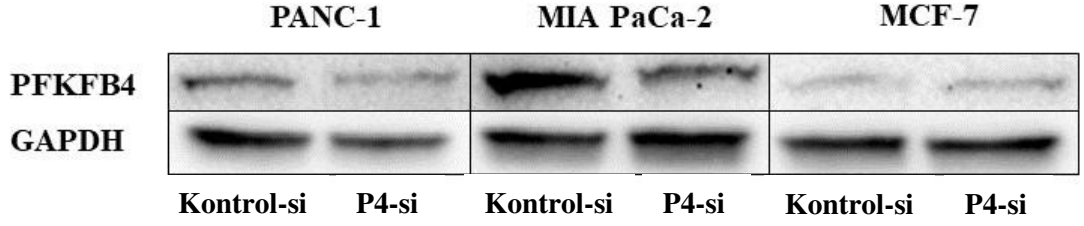
4.4. PFKFB4'ün siRNA Aracılı Baskılanmasının, KKH Özelliği Gösteren Hücre Miktarına Etkisi

PANC-1, MIA PaCa-2 ve MCF-7 hücre hatlarında, siRNA baskılanmasının ispatı olarak; siRNA aracılığıyla PFKFB4 baskılanan (P4-si) ve genomda karşılığı bulunmayan kontrol siRNA uygulanan (Kontrol-si) deney grupları, PFKFB4 mRNA ekspresyonları yönünden karşılaştırıldı. PANC-1 hücre hattında Kontrol-si: $1 \pm 0,001$, P4-si: $0,11 \pm <0,001$ ($p=0,002$), MIA PaCa-2 hücre hattında Kontrol-si: $1 \pm 0,015$, P4-si: $0,07 \pm 0,001$ ($p<0,001$), MCF-7 hücre hattında Kontrol-si: $1 \pm 0,03$, P4-si: $0,66 \pm 0,045$ ($p=0,041$) olarak belirlendi (Şekil - 23). Bütün hücre hatlarında PFKFB4 geninin baskılanmasıyla, PFKFB4 mRNA ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeylerde düşüş gözlemlendi.



Şekil - 23: PANC-1, MIA PaCa 2 ve MCF-7 hücre hatlarında siRNA transfeksiyonu ile PFKFB4 inhibisyonunun PFKFB4 mRNA ekspresyonu seviyelerine etkisi. İnternal kontrol olarak GAPDH kullanıldı.

Transfeksiyon işlemi uygulanan gruplar PFKFB4 protein ekspresyonu yönünden Western Blot analizi ile karşılaştırıldı (Şekil - 24). PFKFB4 geninin baskılanmasıyla PANC-1 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarında PFKFB4 protein seviyeleri azalırken, MCF-7 hücre hattında ise anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

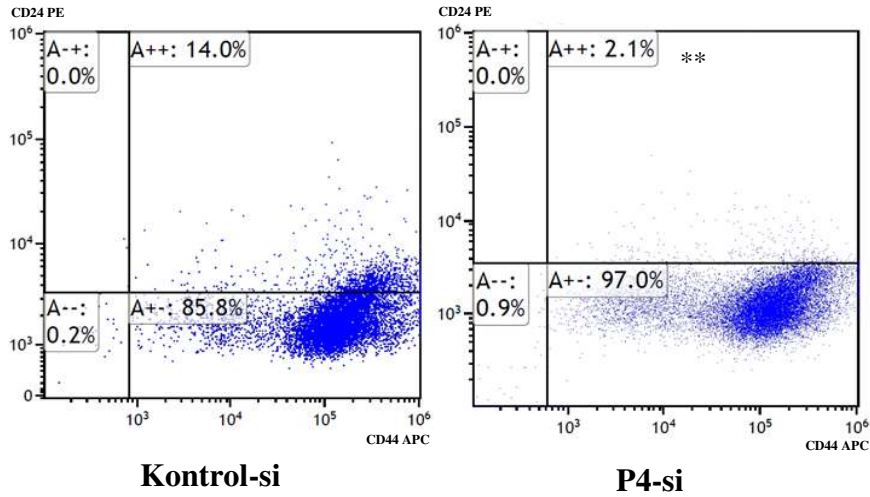


Şekil - 24: PANC-1, MIA PaCa 2 ve MCF-7 hücre hatlarında siRNA transfeksiyonu ile PFKFB4 inhibisyonunun PFKFB4 protein ekspresyonu seviyelerine etkisi. Yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanıldı.

4.4.1. PFKFB4'ün siRNA Aracılı Baskılanmasının, KKH İle Karakterize Yüzey Reseptör Ekspresyonlarına Etkisi

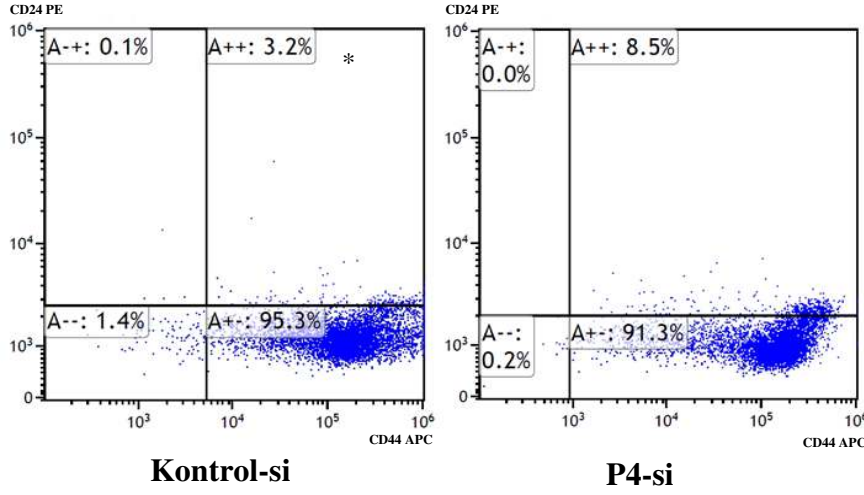
Kontrol grubundaki ve PFKFB4 baskılanan gruptaki hücreler, CD24 ve CD44 yüzey markörleri ekspresyonları yönünden flow sitometri ile incelendi.

PANC-1 hücre hattında yüzey markörleri ekspresyonlarının, kapı alınan hücrelerdeki yüzde cinsinden miktarı: Kontrol-si CD24⁺: %14, P4-si CD24⁺: %2,1 (p=0,001), Kontrol-si CD44⁺: %99,8, P4-si CD44⁺: %99,1 (p=0,226), Kontrol-si CD24⁺/CD44⁺: %14, P4-si CD24⁺/CD44⁺: 2,1 % (p=0,001) (Şekil - 25). PFKFB4 baskılanan hücrelerde, KKH profili olan 24⁺/44⁺ hücre sayılarında azalma tespit edildi.



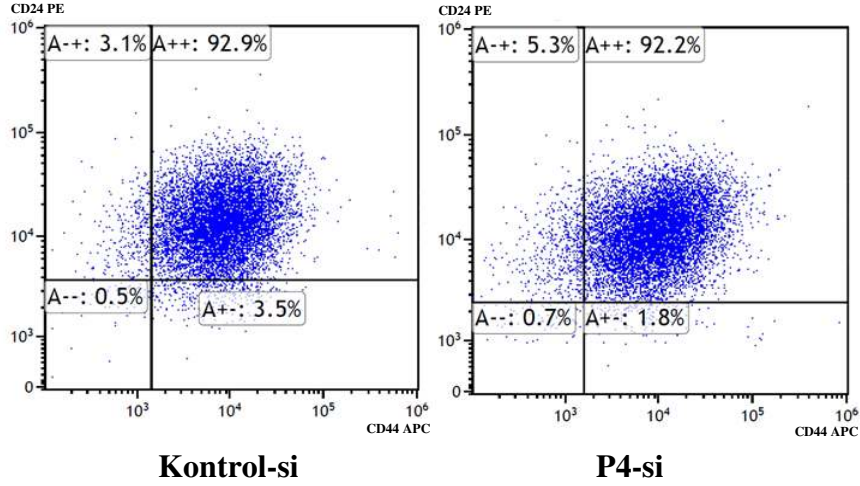
Şekil - 25: PANC-1 hücre hatlarında; Kontrol-si ve P4-si hücrelerde CD24 ve CD44 yüzey markörlerinin yüzde olarak ifadesi. A-+: CD44⁻/CD24⁺, A--: CD44⁻/CD24⁻, A+-: CD44⁺/CD24⁻, A++: CD44⁺/CD24⁺.

MIA PaCa-2 hücre hattında yüzey markörleri ekspresyonlarının, kapı alınan hücrelerdeki yüzde cinsinden miktarı: Kontrol-si CD24⁺: %3,3, P4-si CD24⁺: 8,5 % (p=0,046), Kontrol-si CD44⁺: %98,5, P4-si CD44⁺: %99,8 (p=0,395), Kontrol-si CD24⁺/CD44⁺: %3,2, P4-si CD24⁺/CD44⁺: %8,5 (p=0,045) (Şekil - 26). KKH profili olan 24+/44+ hücre sayısında, PFKFB4 baskılanan hücrelerde kontrol grubuna göre artış tespit edildi.



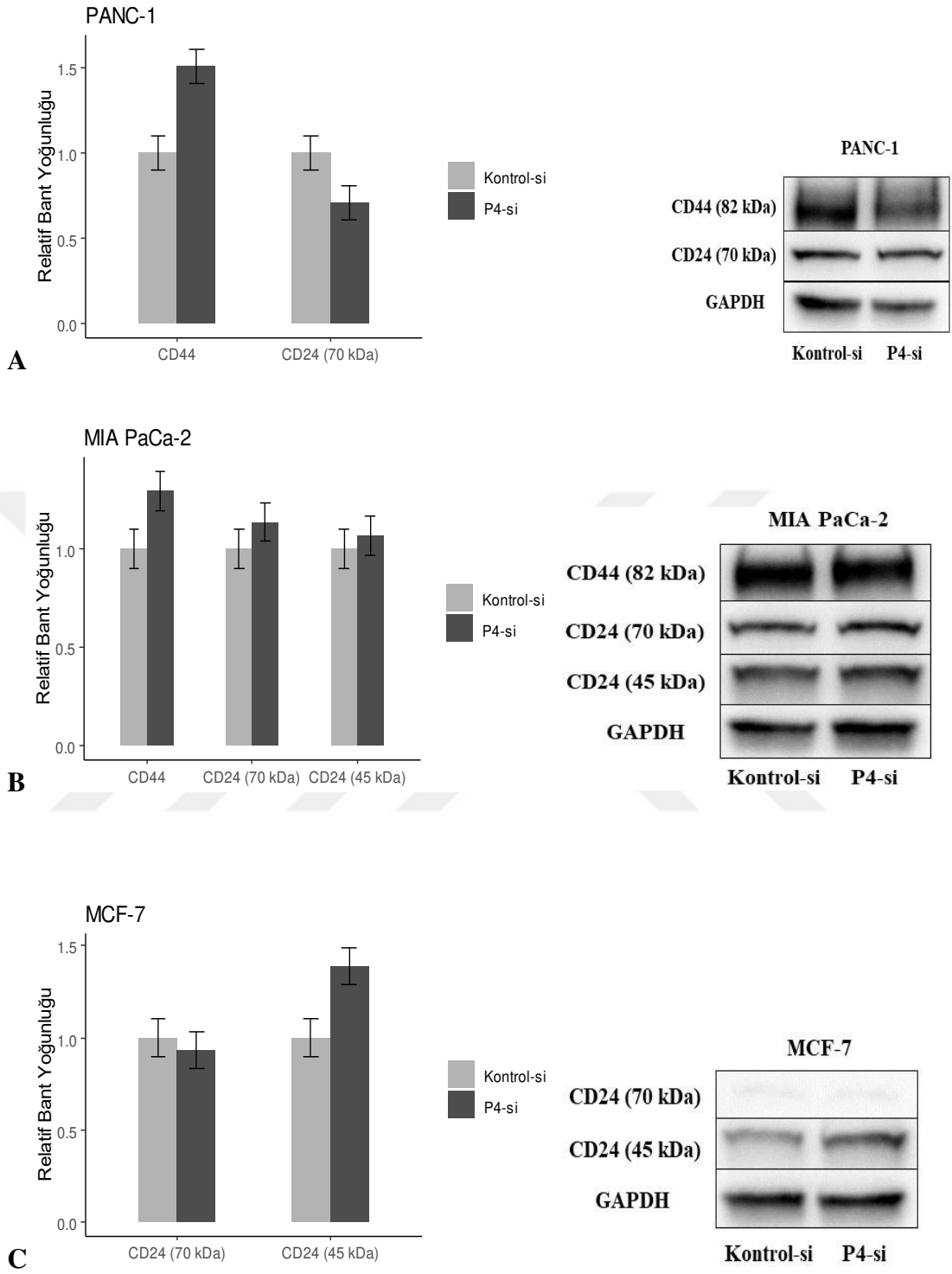
Şekil - 26: MIA PaCa 2 hücre hatlarında; Kontrol-si ve P4-si hücrelerde CD24 ve CD44 yüzey markörlerinin yüzde olarak ifadesi. A-+: CD44-/CD24+, A--: CD44-/CD24-, A+-: CD44+/CD24-, A++: CD44+/CD24+.

MCF-7 hücre hattında yüzey markörleri ekspresyonlarının, kapı alınan hücrelerdeki yüzde cinsinden miktarı: Kontrol-si CD24⁺: %96, P4-si CD24⁺: %97,5 (p=0,168), Kontrol-si CD44⁺: %96,4, P4-si CD44⁺: %94 (p=0,082), Kontrol-si CD24⁺/CD44⁺: %3,5, P4-si CD24⁺/CD44⁺: %1,8 (p=0,15) (Şekil - 27). PFKFB4 baskılanan hücrelerde, 24-/44+ hücre sayısında azalma görüldü; ancak gruplar arası anlamlı bir farklılık tespit edilmedi.



Şekil - 27: MCF-7 hücre hatlarında; Kontrol-si ve P4-si hücrelerde CD24 ve CD44 yüzey markörlerinin yüzde olarak ifadesi. A-+: CD44-/CD24+, A--: CD44-/CD24-, A+-: CD44+/CD24-, A++: CD44+/CD24+.

Kontrol grubunda ve PFKFB4 baskılanan gruptaki hücrelerde, KKH profilini oluşturan yüzey reseptörleri protein seviyesinde incelendi. Relatif kantitasyon hesaplanmasında, bütün hücre hatlarında Kontrol-si kontrol grubu olarak belirlendi ve ekspresyonları 1 kabul edildi. Ekspresyonlar PANC-1 hücre hattında CD44 Kontrol-si: $1 \pm 0,1$, P4-si: $1,51 \pm 0,1$ ($p=0,069$), CD24 (70 kDa) Kontrol-si: 1, P4-si: 0,71 ($p=0,179$) (Şekil - 28A), MIA PaCa-2 hücre hattında CD44 Kontrol-si: $1 \pm 0,1$, P4-si: $1,3 \pm 0,1$ ($p=0,167$) (Şekil - 28B), CD24 (70 kDa) Kontrol-si: $1 \pm 0,1$, P4-si: $1,14 \pm 0,1$ ($p=0,426$), CD24 (45 kDa) Kontrol-si: $1 \pm 0,1$, P4-si: $1,07 \pm 0,1$ ($p=0,684$), MCF-7 hücre hattında CD24 (70 kDa) Kontrol-si: $1 \pm 0,1$, P4-si: $0,93 \pm 0,1$ ($p=0,679$), CD24 (45 kDa) Kontrol-si: $1 \pm 0,1$, P4-si: $1,39 \pm 0,1$ ($p=0,109$) (Şekil - 28C) olarak belirlendi. Bütün hücre hatlarında, gruplar arası protein seviyelerinde anlamlı bir farklılık tespit edilmedi.

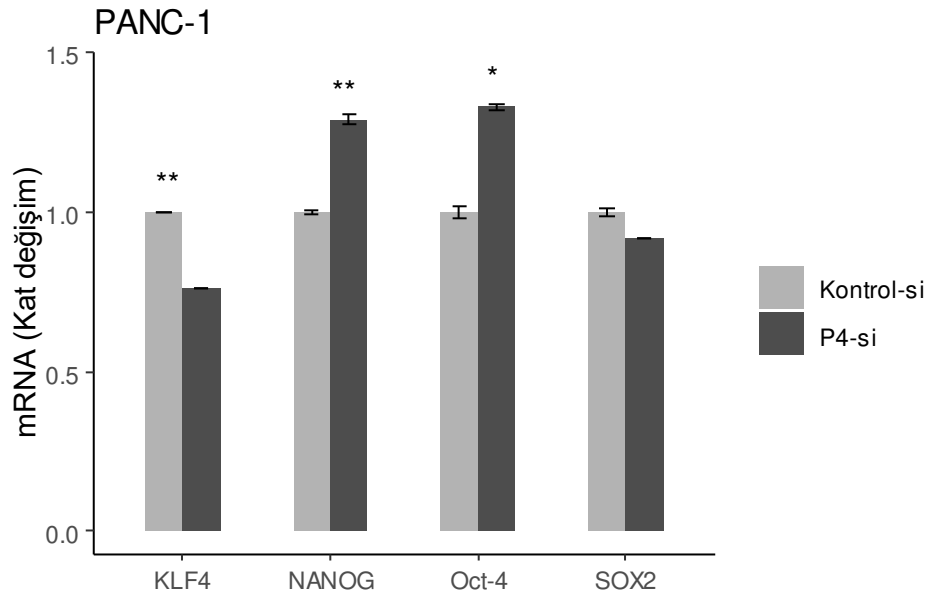


Şekil - 28: PANC-1 (A), MIA PaCa 2 (B) ve MCF-7 (C) hücre hatlarında Kontrol-si ve P4-si hücrelerin Western blotlama görüntüsü ve elde edilen görüntüden yapılan relatif dansitometrik ölçüm.

4.4.2. PFKFB4'ün siRNA Aracılı Baskılanmasının, Pluripotentlik Markör Ekspresyonlarına Etkisi

Kontrol grubundaki ve PFKFB4 baskılanan gruptaki hücreler, pluripotentlik markörleri olan KLF4, NANOG, OCT4 ve SOX2 mRNA ekspresyonları yönünden karşılaştırıldı.

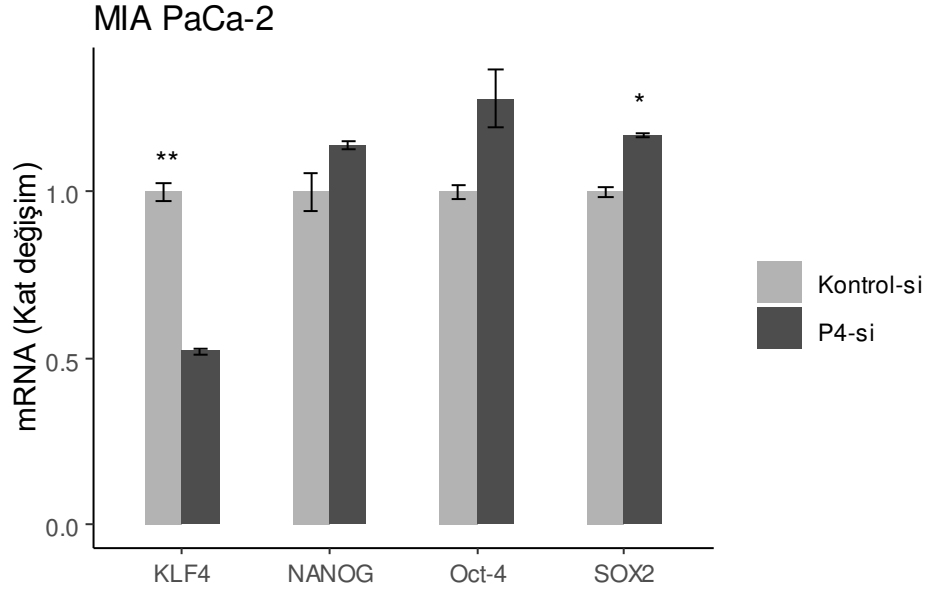
PANC-1 hücre hattında KLF4 Kontrol-si: $1 \pm 0,001$, P4-si: $0,76 \pm <0,001$ ($p=0,002$), NANOG Kontrol-si: $1 \pm 0,009$, P4-si: $1,29 \pm 0,0017$ ($p=0,003$), OCT4 Kontrol-si: $1 \pm 0,0184$, P4-si: $1,33 \pm 0,007$ ($p=0,02$), SOX2 Kontrol-si: $1 \pm 0,01$, P4-si: $0,92 \pm <0,001$ ($p=0,052$) olarak belirlendi. PFKFB4 baskılanan grupta, kontrol grubuna kıyasla KLF4 markörünün mRNA ekspresyonlarında azalma görüldü. OCT4 ve NANOG markörlerinde artış, KLF4 marköründe azalma görülürken; SOX2 marköründe anlamlı bir farklılık tespit edilmedi (Şekil - 29).



Şekil - 29: PANC-1 hücre hatlarında; Kontrol-si ve P4-si hücrelerin, pluripotentlik markörleri KLF4, NANOG, OCT4 ve SOX2 mRNA ekspresyonları. GAPDH endojen kontrol olarak kullanıldı.

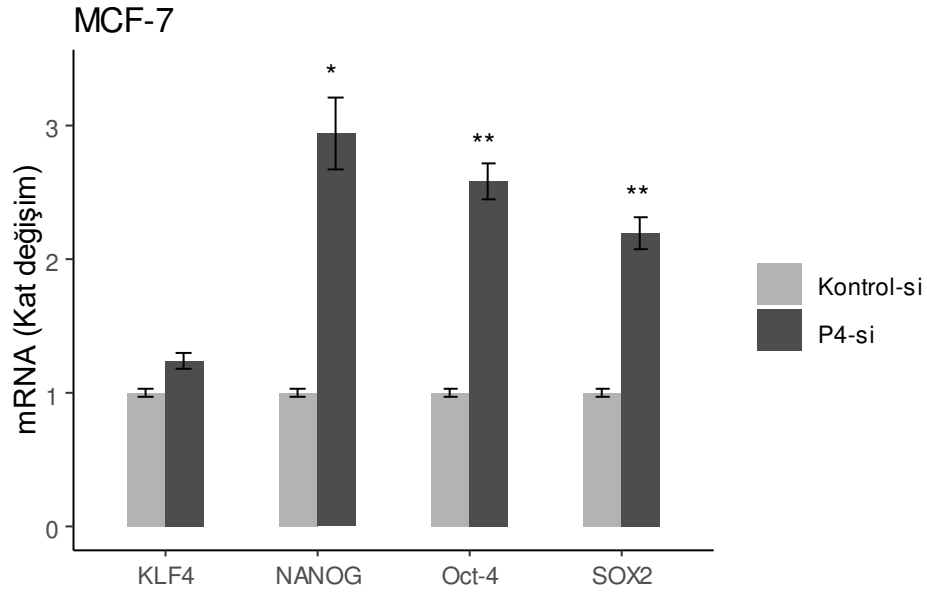
MIA PaCa-2 hücre hattında KLF4 Kontrol-si: $1 \pm 0,025$, P4-si: $0,52 \pm 0,009$ ($p=0,002$), NANOG Kontrol-si: $1 \pm 0,056$, P4-si: $1,14 \pm 0,01$ ($p=0,181$), OCT4 Kontrol-si: $1 \pm 0,02$, P4-si: $1,28 \pm 0,085$ ($p=0,1$), SOX2 Kontrol-si: $1 \pm 0,0147$, P4-si: $1,17 \pm 0,008$ ($p=0,017$) olarak belirlendi. PFKFB4 baskılanan grupta, kontrol grubuna kıyasla KLF4 markörünün mRNA ekspresyon seviyelerinde azalma görüldü. SOX2

marköründe artış görülürken, OCT4 ve NANOG'da anlamlı bir farklılık tespit edilmedi (Şekil - 30).



Şekil - 30: MIA PaCa-2 hücre hatlarında; Kontrol-si ve P4-si hücrelerin, pluripotential markörleri KLF4, NANOG, OCT4 ve SOX2 mRNA ekspresyonları. GAPDH endojen kontrol olarak kullanıldı.

MCF-7 hücre hattında KLF4 Kontrol-si: $1 \pm 0,027$, P4-si: $1,24 \pm 0,064$ ($p=0,06$), NANOG Kontrol-si: $1 \pm 0,027$, P4-si: $2,93 \pm 0,267$ ($p=0,025$), OCT4 Kontrol-si: $1 \pm 0,028$, P4-si: $2,58 \pm 0,134$ ($p=0,006$), SOX2 Kontrol-si: $1 \pm 0,028$, P4-si: $2,19 \pm 0,113$ ($p=0,009$) olarak belirlendi. PFKFB4 baskılanan grupta, kontrol grubuna kıyasla OCT4, NANOG ve SOX2'da artış görülürken, KLF4'da anlamlı bir farklılık tespit edilmedi (Şekil - 31).

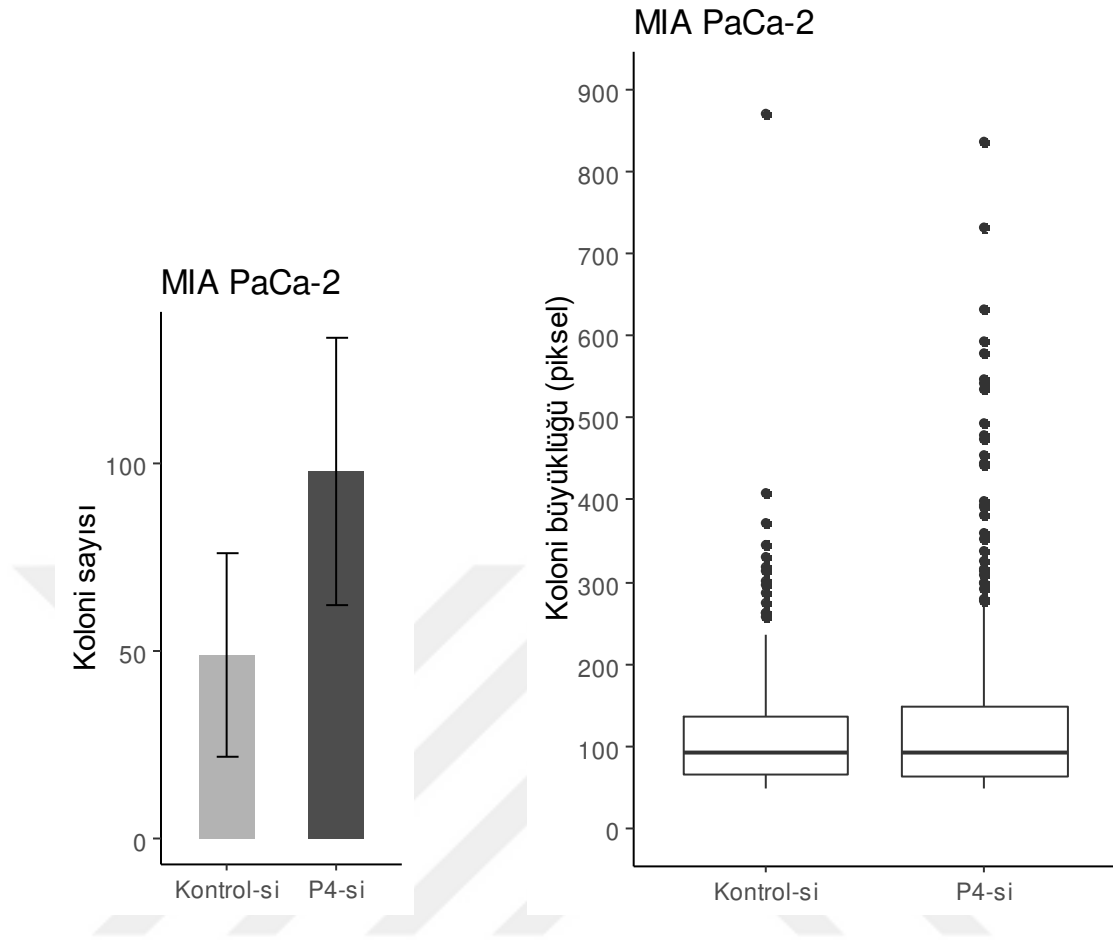


Şekil - 31: MCF-7 hücre hatlarında; Kontrol-si ve P4-si hücrelerin, pluripotentlik markörleri KLF4, NANOG, OCT4 ve SOX2 mRNA ekspresyonları. GAPDH endojen kontrol olarak kullanıldı.

4.4.3. PFKFB4'ün siRNA Aracılı Baskılanmasının Onkojenik Potansiyel Üzerine Etkisi

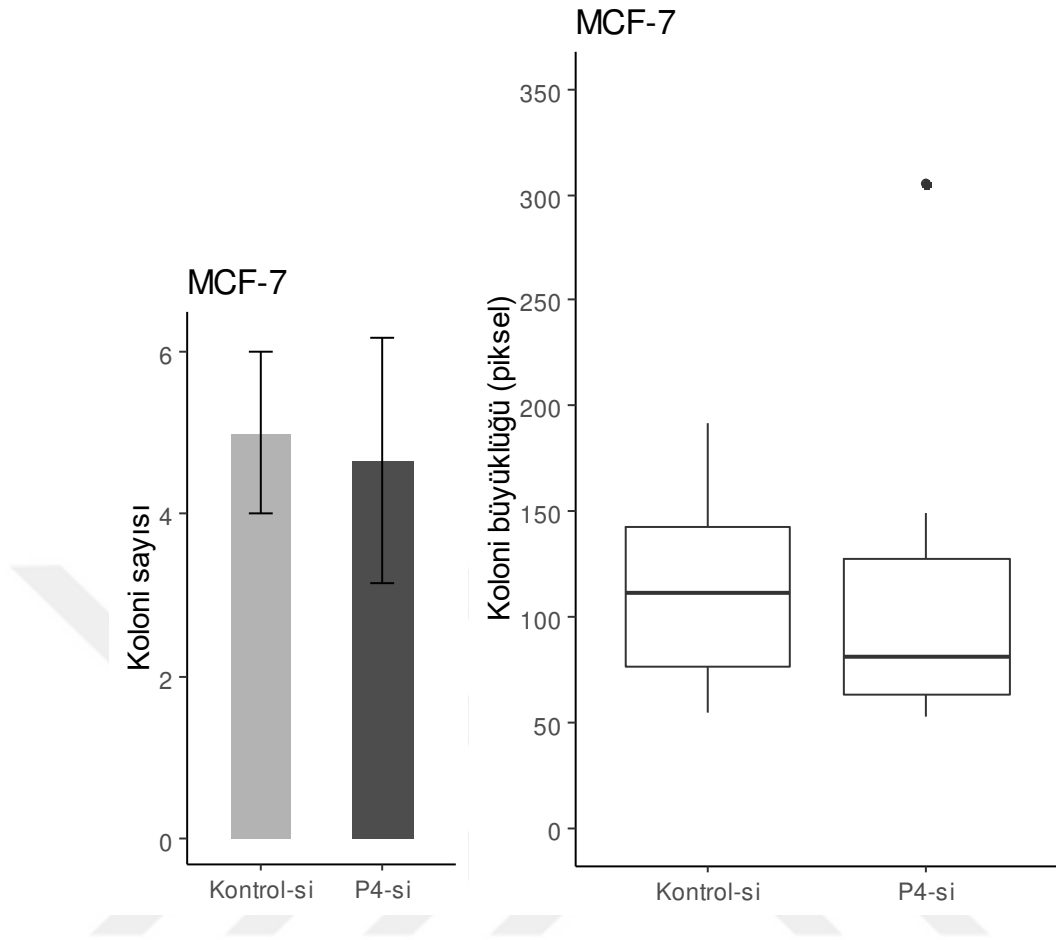
MIA PaCa-2 ve MCF-7 hücre hattında, kontrol grubundaki ve PFKFB4 baskılanan gruptaki hücreler ile yumuşak agarda koloni formasyon deneyi yapıldı. ImageJ ile yapılan analizde alt sınır 50 piksel, dairesellik ise "0,00- 1" olarak belirlendi.

MIA PaCa-2 hücre hattında, gruptaki ortalama koloni sayıları, Kontrol-si: $49 \pm 27,07$, P4-si: $98 \pm 35,59$ ($p=0,136$). Gruptaki ortalama koloni büyüklükleri, Kontrol-si: $123,21 \pm 97,26$ (Medyan: 92,IQR: 71), P4-si: $136,89 \pm 121,27$ (Medyan: 92,IQR: 85,5) ($p=0,728$) (Şekil - 32).



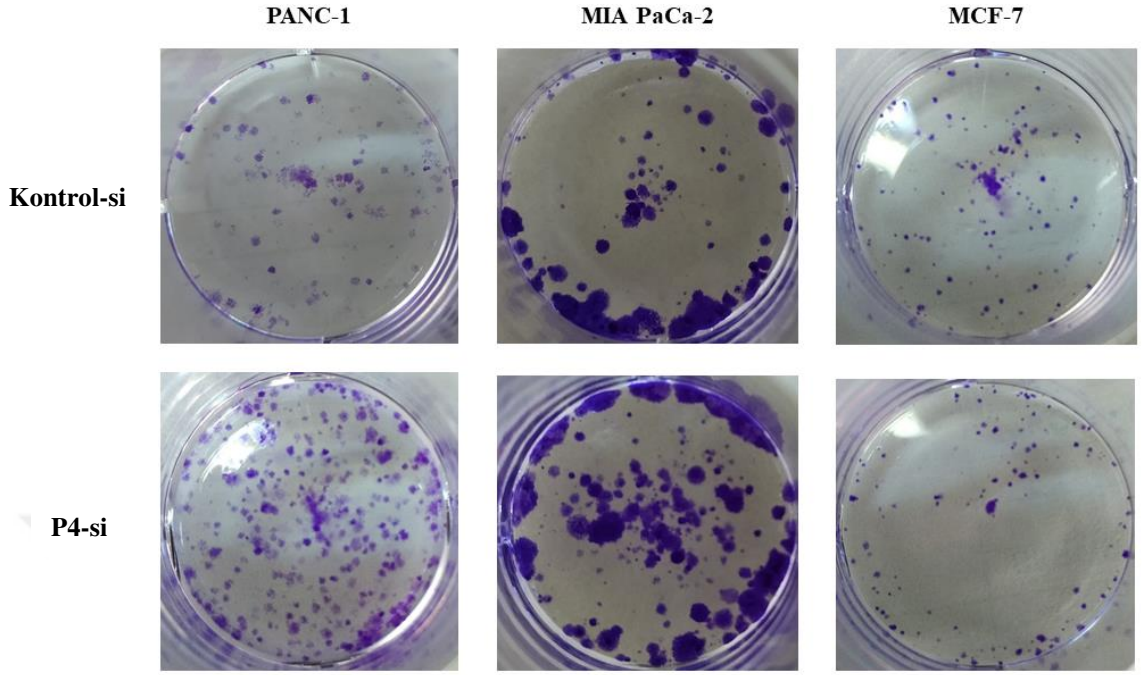
Şekil - 32: MIA PaCa 2 hücre hattında Kontrol-si ve P4-si hücrelerin yumuşak agar koloni formasyon analizi.

MCF-7 hücre hattında ortalama koloni sayıları: Kontrol-si: 5 ± 1 , P4-si: $4,66 \pm 1,52$ ($p=0,77$). Gruplardaki ortalama koloni büyüklükleri, Kontrol-si: $110,73 \pm 42,64$ (Medyan: 112, IQR: 66), P4-si: $103,36 \pm 66,27$ (Medyan: 81 , IQR: 64) ($p=0,305$) (Şekil - 33). PFKFB4 baskılanan hücrelerde, yumuşak agarda koloni büyüklüğü ve sayıları yönünden anlamlı bir farklılık tespit edilmedi.

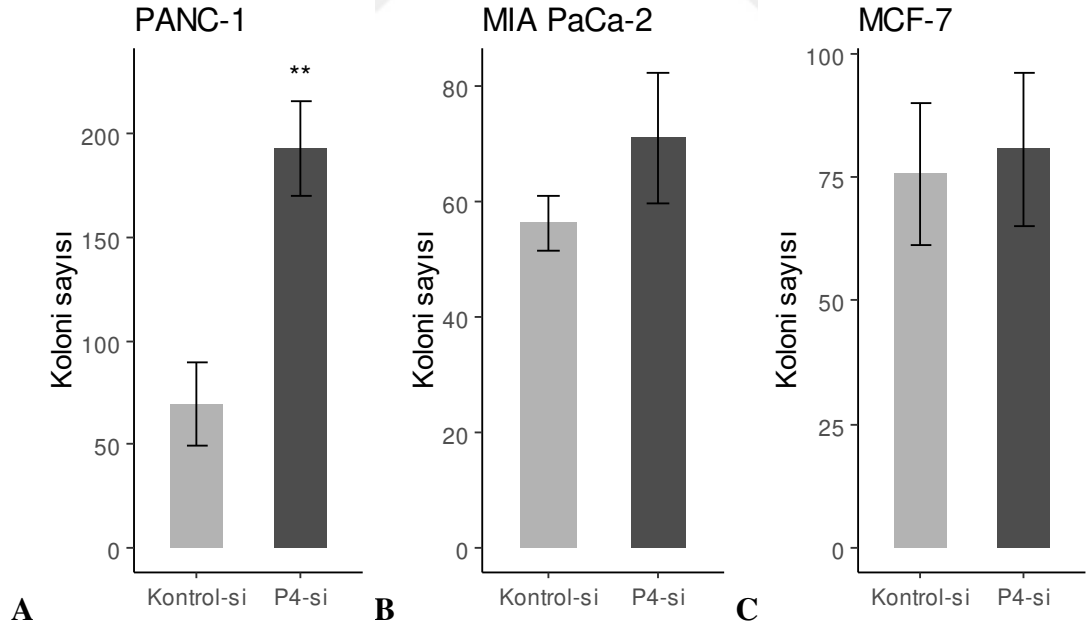


Şekil - 33: MCF-7 hücre hattında Kontrol-si ve P4-si hücrelerin yumuşak agar koloni formasyon analizi.

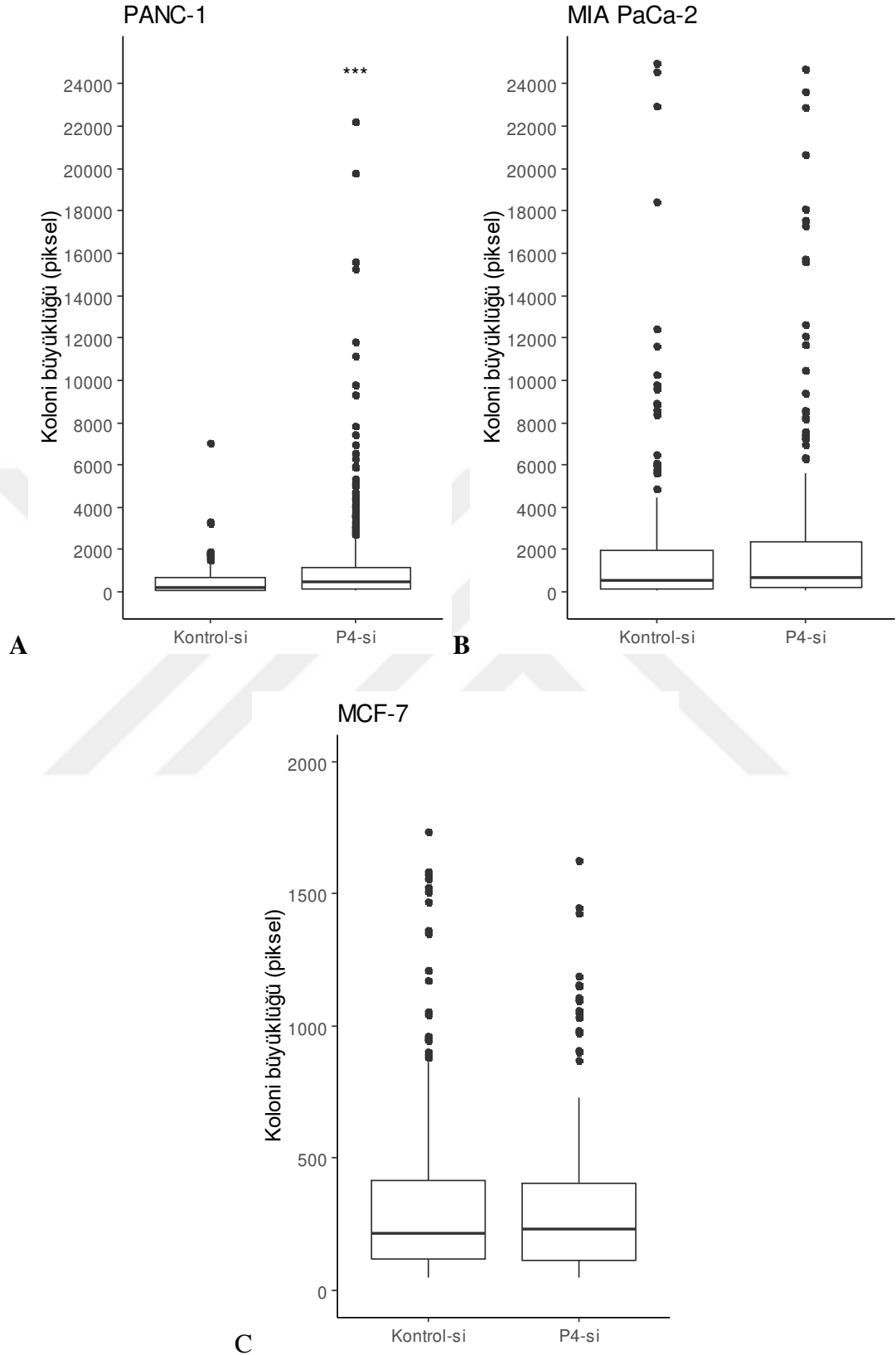
Kontrol grubundaki ve PFKFB4 baskılanan gruptaki hücreler ile klonojenik analiz yapıldı (Şekil - 34). ImageJ ile yapılan analizde alt sınır 50 piksel, dairesellik ise "0,00-1" olarak belirlendi. Gruplardaki ortalama koloni sayıları, PANC-1 Kontrol-si: 69.67 ± 20.13 , P4-si: 193.00 ± 23.07 ($p=0.002$) (Şekil - 35A), MIA PaCa-2 Kontrol-si: 56.33 ± 4.73 , P4-si: 71 ± 11.36 ($p=0.142$) (Şekil - 35B), MCF-7 Kontrol-si: 75.67 ± 14.22 , P4-si: 80.67 ± 15.57 ($p=0.703$) (Şekil - 35C). Gruplardaki ortalama koloni büyüklükleri, PANC-1 Kontrol-si: 475.49 ± 708.03 (Medyan: 200, IQR: 575), P4-si: 1204.34 ± 3034.87 (Medyan: 464, IQR: 1021,5) ($p<0.001$) (Şekil - 36A), MIA PaCa-2 Kontrol-si: 2688.7 ± 6080.37 (Medyan: 545, IQR: 1946), P4-si: 3418.52 ± 8510.45 (Medyan: 664, IQR: 2455) ($p=0.4$) (Şekil - 36B), MCF-7 Kontrol-si: 443.85 ± 912.65 (Medyan: 219, IQR: 322), P4-si: 347.22 ± 454.21 (Medyan: 237,5 IQR: 298,5) ($p=0.31$) (Şekil - 36C).



Şekil - 34: PANC-1, MIA PaCa 2 ve MCF-7 hücre hatlarında, Kontrol-si ve P4-si hücrelerinden oluşturulan koloniler.



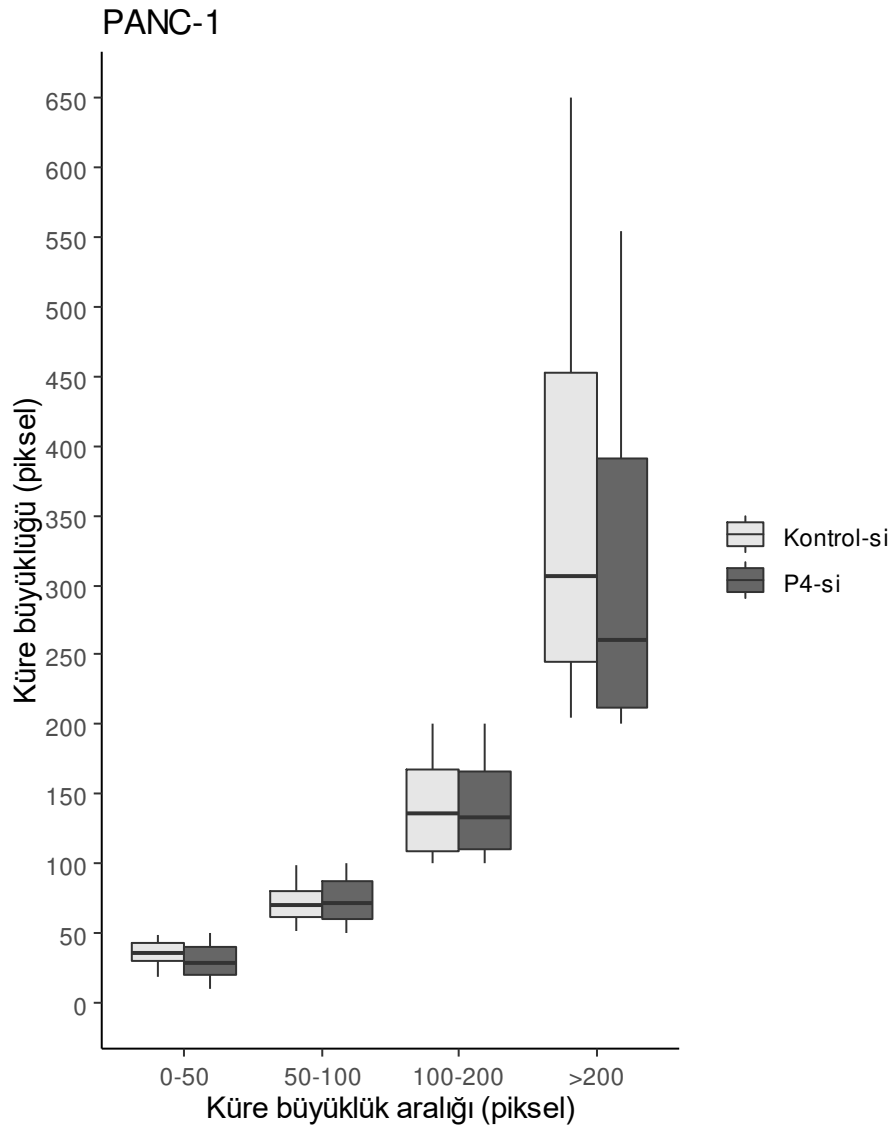
Şekil - 35: PANC-1 (A), MIA PaCa 2 (B) ve MCF-7 (C) hücre hatlarında, Kontrol-si ve P4-si hücrelerinden oluşturulan kolonilerin sayıları.



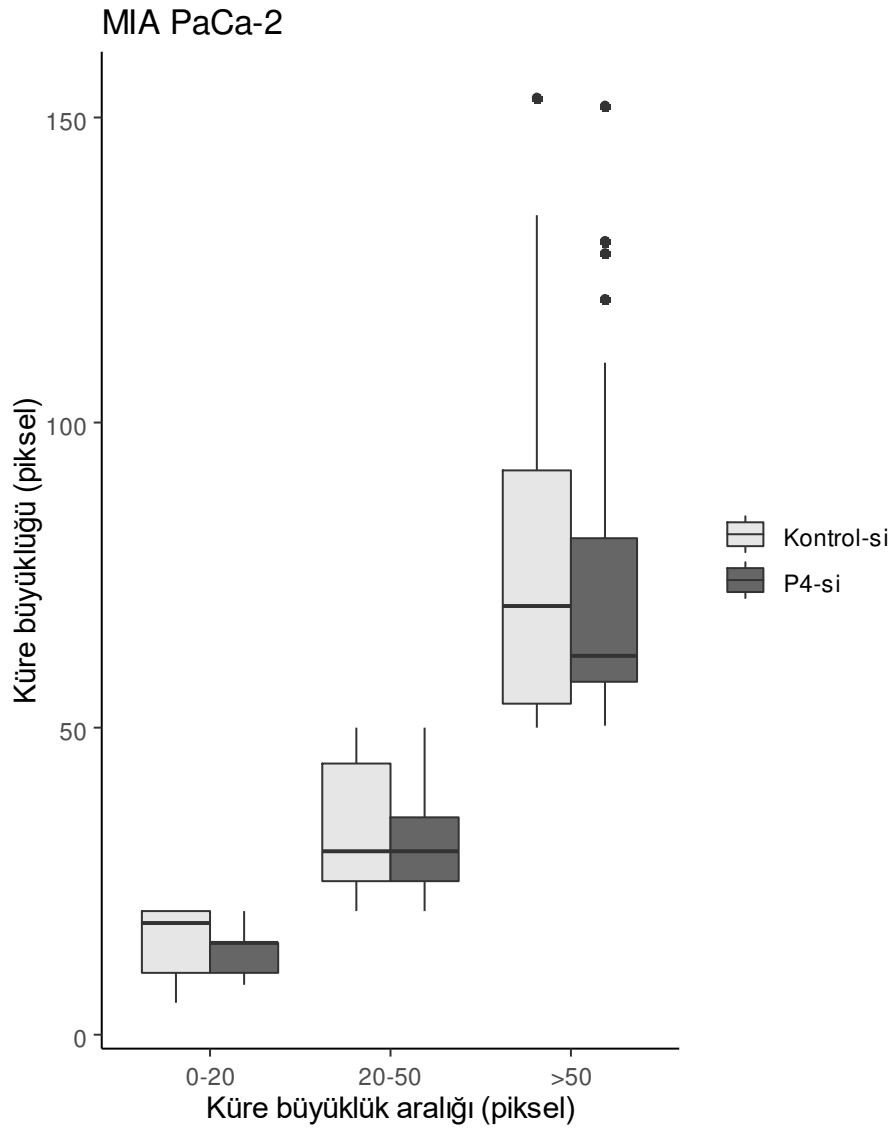
Şekil - 36: PANC-1 (A), MIA PaCa 2 (B) ve MCF-7 (C) hücre hatlarında, Kontrol-si ve P4-si hücrelerinden oluşturulan kolonilerin büyüklük dağılımları.

PANC-1 hücre hattında PFKFB4 baskılanan hücrelerde, kontrol grubuna kıyasla koloni büyüklüğü ve sayıları yönünden artış tespit edildi. MIA PaCa-2 ve MCF-7 hücre hattında PFKFB4 baskılanan hücrelerde, koloni büyüklüğü ve sayıları yönünden anlamlı bir farklılık tespit edilmedi.

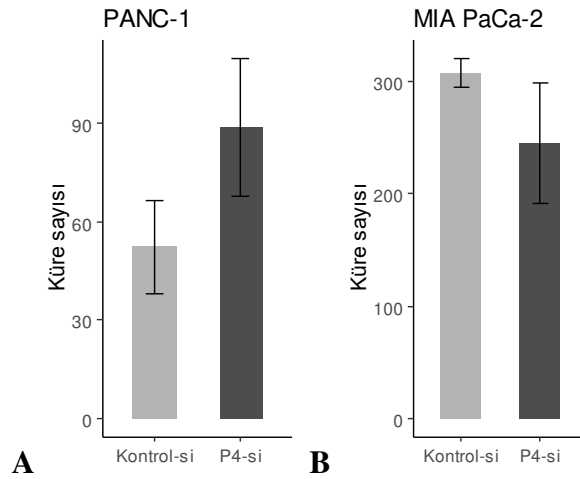
PANC-1 ve MIA PaCa-2 hücre hatlarında, kontrol grubundaki ve PFKFB4 baskılanan gruptaki hücreler ile küre oluşturma deneyi yapıldı. Micrometrics SE Premium ile yapılan analizde alt sınır 10 μ m olarak belirlendi. Gruplardaki ortalama küre büyüklükleri, PANC-1 Kontrol-si: $119,71 \pm 114,75$ (Medyan: 79,96, IQR: 91,02) PANC-1 P4-si: $110,94 \pm 174,86$ (Medyan: 73,97, IQR: 76,01) ($p=0,033$) (Şekil - 37), MIA PaCa-2 Kontrol-si: $25,43 \pm 17,68$ (Medyan: 20, IQR: 13,16), MIA PaCa-2 P4-si: $25,61 \pm 17,31$ (Medyan: 20,42 , IQR: 15) ($p=0,39$) (Şekil - 38). Gruplardaki ortalama küre sayıları, PANC-1 Kontrol-si: $52,33 \pm 14,29$, PANC-1 P4-si: 89 ± 21 ($p=0,075$) (Şekil - 39A), MIA PaCa-2 Kontrol-si: $307,6 \pm 13,2$, MIA PaCa-2 P4-si: $245 \pm 54,14$ ($p=0,177$) (Şekil - 39B). PANC-1 hücre hattında PFKFB4 baskılanan hücrelerde, kontrol grubuna kıyasla küre büyüklüğü yönünden azalma görüldü. Küre sayıları arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. MIA PaCa-2 hücre hattında ise PFKFB4 baskılanan hücrelerde, kontrol grubuna kıyasla küre büyüklüğü ve küre sayıları arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi.



Şekil - 37: PANC-1 hücre hatlarında, Kontrol-si ve P4-si hücrelerinden oluşturulan kürelerin büyüklükleri.

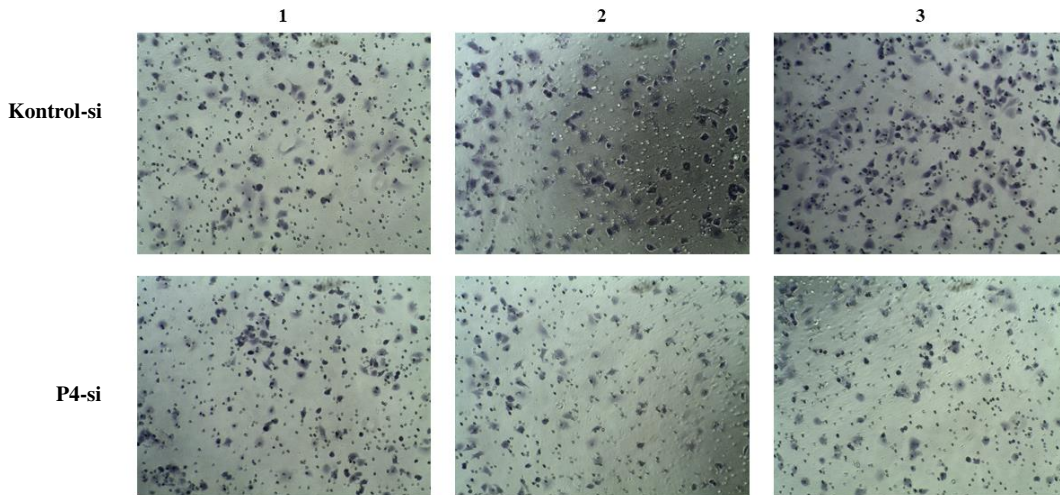


Şekil - 38: MIA PaCa 2 hücre hatlarında, Kontrol-si ve P4-si hücrelerinden oluşturulan kürelerin büyüklükleri.



Şekil - 39 PANC-1 (A) ve MIA PaCa 2(B) hücre hatlarında, Kontrol-si ve P4-si hücrelerinden oluşturulan kürelerin sayıları.

PFKFB baskılanmasının invazyon kabiliyetine olası etkisinin incelenmesi için, PANC-1 hücre hattında, kontrol grubundaki ve PFKFB4 baskılanan gruptaki hücreler ile invazyon deneyi yapıldı (Şekil - 40). Relatif invazyon hesaplanmasında Kontrol-si kontrol grubu olarak belirlendi ve invazyon oranı %100 kabul edildi. İnvazyon yüzdeleri Kontrol-si: 100.00 ± 40.96 , P4-si: 58.48 ± 11.32 ($p=0.056$). PFKFB4 baskılanan hücrelerde, kontrol grubuna kıyasla invazyon kabiliyetinde azalma görüldü, ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi.



Şekil - 40: PANC-1 hücre hattında Kontrol-si ve P4-si gruplarında invazyon kabiliyetinin incelenmesi. Işık mikroskopunda 10X büyütmeyle alınan görüntüler ImageJ ile analiz edildi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Cerrahi müdahale ve kemoterapi/radyoterapiye yanıt vermeyen kanser olguları, kanser tedavisindeki en büyük problemlerden biridir. Tümör kitlesinin operatif müdahaleyle uzaklaştırılması ve çoğu zaman bununla kombine olarak kemoterapotik ajanların kullanılmasına rağmen varlığını sürdürebilen kanserli hücre toplulukları; kitleyi yeniden oluşturabilmekte, tedaviye yönelik bütün kazanımları yok edebilmektedir. Pankreas kanseri vakalarının %35.6'sında (Nishio et al., 2017), meme kanseri vakalarının yaklaşık %30 unda (Colleoni et al., 2016) tedavi sonrası nüks görülmektedir. Son 20 yıl içerisinde bu durumun önüne geçilmesine yönelik çalışmalar artmış; nükse sebep olabilen azınlık hücre topluluğunun yok edilmesine yönelik tedavi modeli denemeleri sayıca çoğalmıştır.

Tümör kitlesi oluşumuna yönelik oluşturulan modellemelerden biri olan kanser kök hücre modeli; sağlıklı kök hücrelere benzer şekilde, sürekli olarak bölünebilme ve farklılaşmış hücreleri oluşturabilme kabiliyetine sahip bir grup hücreyi tümör hiyerarşisinde zirveye koyar. Bu düşünce benimsenerek yapılan çalışmalarda; tümör hücre grubundaki kök hücre benzeri hücrelerin tespiti için, operatif yollarla elde edilen tümör dokusundan, kök hücre adayı olarak belirlenen hücre markörlerine göre ayrıştırılmış hücreler, immün baskılanmış farelere transplante edilmiş ve tümorojenik kabiliyetleri gözlenerek, bugün bildiğimiz anlamdaki kanser kök hücre markörleri belirlenmiştir (Schatton et al., 2009).

Bu tez çalışmasında, meme ve pankreas kanserinde, KKH tanımlama çalışmaları sonucu oluşturulmuş profillerden yararlanıldı ve PFKFB baskılanmasının KKH proliferasyonu üzerine olası etkileri incelenerek, enerji metabolizmasının değiştirilmesine dayalı alternatif bir tedavi metoduna öncü olmaya çalışıldı.

Pankreas KKH'lerinin metabolik olarak oksidatif fosforilasyona daha yatkın olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Sancho et al., 2015; Viale et al., 2014). Bununla birlikte, MIA PaCa-2 hücre hattında yüzen kültürdeki F2,6BP seviyesinin adherent kültüre kıyasla anlamlı derecede yüksek çıkması, glikolitik aktivitesi yüksek bir KKH grubunun varlığı ihtimalini akla getirmektedir. PDAK üzerine yapılan bir çalışmada, gemsitabin direncine sahip KKH ve ALDH⁺/CD133⁺ KKH olarak tanımlanmış iki farklı KKH grubunun farklı metastatik potansiyellere sahip olduğu ve

karaciğer metastazında gliko-oksidatif , akciğer metastazında oksidatif metabolizmaya sahip olduğu gözlenmiştir (Nimmakayala et al., 2020). KKH'lerin ortam spesifik kolonizasyon ve metabolik adaptasyon kabiliyetine sahip olduğunu gösteren bu çalışma, in vitro ortamda yüzen kültür olarak üretilen MIA PaCa-2 hücre hattındaki KKH'lerin, çoğaltıldığı ortama adaptasyon göstererek glikolitik ağırlıklı bir profile geçtiği ihtimalini düşündürmektedir. PFKFB izoenzimlerinin baskılanmasının KKH gelişimine etkisini in vivo olarak incelemek; baskılama işlemi uygulanan hücrelerin metastatik kabiliyetini, enjeksiyon bölgesindeki ve (varsa) metastatik bölgelerdeki KKH miktarını ve bu bölgelerdeki KKH'lerin metabolik profilleri arasındaki olağan değişimi gözlemlememize yardımcı olabilir.

PANC-1 ve MIA PaCa-2 hücre hattında PFKFB izoenzimlerinin mRNA yönünden kıyaslanmasında, yüzen kültürde PFKFB1'in yanında PFKFB4 izoenziminde artış gözlemlendi. Ayrıca, bütün hücre hatlarındaki yüzen kültürlerde belirli pluripotentlik markörlerinin mRNA ekspresyonunda artış görülmesi nedeniyle, bu yöntemle üretilen hücrelerde KKH olarak nitelendirilebilecek hücre miktarının fazla olabileceği sonucuna varıldı. Bu deneylerin sonucu, bize artan KKH oranının PFKFB izoenzim seviyesiyle korele olabileceğini düşündürdü.

PANC-1 hücre hattında en büyük değişimin, PFKFB4 izoenziminde gözlenmesinin yanında ONCOMINE sonuçlarının da PFKFB4'ü işaret etmesi, siRNA ile baskılamada bu izoenzime yönelmemize neden oldu. "PFKFB4 izoenzim baskılanması, KKH popülasyonunda negatif etkiye neden olur mu?" sorusunu cevaplama amacıyla, PANC-1, MIA PaCa-2 ve MCF-7 hücre hatlarında, Kontrol-si ve P4-si grupları, içerdikleri kanser kök hücre profiline uyan hücreler yönünden kıyaslandı.

Flow sitometri analizinde, PANC-1 yüzen kültürlerde hipotezimizi doğrular nitelikte, KKH profili olarak belirlediğimiz hücre gruplarının adherent kültüre kıyasla yüksek çıktığı, siRNA transfeksiyonunda ise PFKFB4 baskılanan grupta KKH miktarının azaldığı gözlemlendi. Benzer etkilerin MCF-7 hücre hattında da görüldü, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi. Onkojenik potansiyelin incelendiği deneylerde, PANC-1 hücre hattında, deney grupları arasında invazyon kabiliyeti farkı istatistiksel olarak anlamlı boyutlara ulaşmadı; baskılama sonucu küre büyüklüğünde

azalma görülse de sayı yönünden anlamlı farklılık bulunmadı. MIA PaCa-2 hücre hattında küre oluşturma deneyinde, klonojenik analiz ve yumuşak agar deneyinde de çalışılan bütün hücre hatlarında, baskılamanın koloni/küre büyüklüğüne ve sayısına negatif etkisi gözlenmedi. Elde edilen sonuçların, siRNA transfeksiyonunun etkinliğiyle alakalı olduğu düşünülmektedir. Kanserin köken aldığı organ ve hatta aynı organ içerisindeki farklı hücre hatları arasında bile siRNA transfeksiyonunun etkinliği yönünde fark görmek mümkündür. Lipofeksiyon taşıtı olarak kullanılan Lipofectamine RNAiMAX, muadillerine kıyasla etkili bir transfeksiyon ajanı olsa da (Zhao et al., 2008); siRNA, uygulandıktan sonraki 24-96 saat arasında ideal ölçüde etkinlik göstermekte, bu sürenin ötesine geçildiğinde baskılanmada azalma görülebilmektedir. Ayrıca, daha etkili siRNA sekansları oluşturma amacıyla yapılan gelişmelere rağmen, yaklaşık olarak sadece dört siRNA'dan biri %80'in üzerinde etkinlik gösterebilmektedir (H. Han, 2018). Transfeksiyon doğrulama amacıyla yaptığımız RT-qPCR deneyinde mRNA seviyelerindeki dramatik düşüşe rağmen protein seviyelerinin pek değişmemesi bunu doğrular niteliktedir.

Küre kültür oluşumu minimum 7 gün sürmekte ve belirli durumlarda pasajlama işlemi gerektirmektedir. Bu nedenle baskılama deneyleri adherent kültür üzerinden yürütülmek zorunda kaldı ve nispeten düşük sayıdaki KKH'nin relatif kıyaslamaları üzerinden değerlendirme yapıldı.

Karaciğerde, kanserli dokularla sağlıklı dokular arasında yapılan KKH markörü protein ekspresyonları kıyaslamasında, KKH markörleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamış, markör protein ekspresyonları tümör dokuları arasında farklılıklar göstermiştir (Wilson et al., 2013). Altı farklı kolon kanseri hücre hattında yapılan KKH markörü protein ekspresyonu incelemesinde kullanılan markörler, hücre hatlarının tamamında aynı anda gözlenememiş, tespit edilen markörlerde de hücre hatları arasında da belirgin farklılıklar görülmüştür (C. Wang et al., 2012). Tez çalışmasında kullanılan hücre hatlarında olası bir protein düzeyinde ekspresyon değişimini gözleyebilmek adına CD24 ve CD44 protein ekspresyonları incelendi. Western blot analizlerinde; yüzen kültürlerde yalnızca MIA PaCa-2'de CD24 (40 kDa) bandında artış görüldü; diğer hücre hatlarının yüzen kültürlerinde ise CD24 ve CD44 protein düzeylerinde adherent kültüre kıyasla azalma görüldü. PFKFB4 baskılanan gruplarda da kontrol grubuna kıyasla protein seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık

bulunmadı. Bu durumda, yüzey markörü CD24 ve CD44 protein ekspresyonu artışının, çalışılan hücre hatlarında KKH miktarının tespiti yönünden tek başına bir anlam ifade etmediğini düşünülebilir. Konuyu açığa kavuşturmak için; Panc1, MIA PaCa-2 ve MCF-7 hatları üzerinde, adherent ve yüzen kültürlerde, pankreas ve meme hücre hatlarında KKH belirteci olarak kullanılmış diğer yüzey markörlerinin protein ekspresyonları da incelenerek (PDAK hücre hatları için ESA (C. Li et al., 2007), meme ve PDAK hücre hattı için CD133 (Hermann et al., 2007; Wright et al., 2008)), yüzen kültürde adherente görece artış olup olmadığı incelenebilir.

Normal kök hücrelerde pluripotentlik göstergesi olan bazı markörler, kanserli dokularda bulunan KKH'ler için de bir belirteç olarak kabul edilmektedir (W. T. Kim & Ryu, 2017). Bu düşünceyle, PFKFB4 baskılanan gruplar ve kontrol grupları arasında OCT4, SOX2, NANOG ve KLF4 markörü mRNA ekspresyonu yönünden kıyaslama yapıldı. Flow sitometri analizinden alınan sonuçların aksine, bütün hücre hatlarında baskılama sonucunda pluripotentlik markörleri mRNA seviyelerindeki azalma değişkenlik gösterdi; hatta baskılanan gruplarda bazı markör mRNA seviyelerinde artış görüldü. Hücrenin pluripotentliğiyle ilişkilendirilmiş olan OCT4, SOX2 ve NANOG; PI3K/Akt ve RAS/RAF/MEK/Erk yolları aracılığıyla düzenlenmektedir. Apoptozu önleme ve hücrenin kendini yenilemesi konusunda önemli bir rolü olan Akt aktivitesi, kurbağa embriyolarında PFKFB4'ün baskılanmasıyla sekteye uğramış ve apoptoz gerçekleşmiştir (Pegoraro et al., 2015). Benzer bir baskılayıcı etkiyi kanser hücre hatlarında da beklendi ancak bahsi geçen yollar, birden fazla etken tarafından kontrol edildiğinden, salt PFKFB baskılanması nihai sonuca etki etmemiş olabilir. PFKFB baskılanmasının farklı bir etken tarafından kompanze edilmesi sonucu, markör ekspresyonunda azalma görülmemesi ihtimaller dahilindedir. Yine kanser hücre hatlarında K-RAS ve bununla ilintili yollar hakkında yaptığımız yorumlar, önceki çalışmalarla kendi yaptığımız çalışmaların karşılaştırılması sonucu yaptığımız çıkarımlardan oluşmaktadır. İncelenen hücre hatlarında KKH profiline uyan hücrelerde PFKFB ile K-RAS ve/veya Akt arası korelasyonu incelemek bu durumla ilgili daha isabetli yorum yapabilmemizi sağlayacaktır.

Onkogenik Ras transforme fare akciğer fibroblastlarında PFKFB3 geninin silinmesinin, F26BP üretimini ve glikolitik akış baskıladığı, ve Ras ekspresyonunun

PFKFB3 olmadan hücrelere onkojenik özellik kazandıramadığı gösterilmektedir (Telang et al., 2006). K-RAS ile onkojenik transformasyon sonucu PDAK hücrelerinde PFKFB3 mRNA ekspresyonunun ve protein miktarının arttığı gözlenmiştir (Özcan, 2018). Bu durumda PFKFB izoenzimleri ile ilgili yapılacak bir baskılama, Ras ve ilintili yolların baskılanmasını sağlayarak, KKH popülasyonunda azalmaya neden olabilir.

KKH profilleri üzerine bir diğer düşünce de yüzey markörleri ve enzimatik aktivite üzerinden belirlenmiş birden fazla KKH profili ile çalışıp, metabolik profillerinin ne ölçüde kesiştiğini gözlemlenmesi gerektiğidir. KKH markörlerinin tek başına veya farklı kombinasyonlar halinde kullanılması sonucu ayrıştırılan hücrelerin farklı biyolojik karakterlere sahip olabileceği gerçeği göz önüne alındığında (Shao, Fan, Ma, & Wu, 2016), KKH grupları ve PFKFB arasında kurulan ilintinin kendi içindeki tutarlılığı, çalışmanın geçerliliği açısından önem teşkil etmektedir.

Elde edilen bulgular doğrultusunda, PFKFB enzim seviyelerinin olası bir KKH markörü olarak kullanılabileceği ve PANC-1 hücre hattında PFKFB4 baskılanmasıyla KKH profilindeki hücrelerin azaldığı gösterilmektedir. CRISPR gibi kalıcı bir transfeksiyon sistemi kullanılarak PFKFB4 geninin silinmesiyle yapılacak kalıcı baskılama ile uzun vadede izoenzim noksanlığının oluşturacağı etkiler gözlemlenerek bu çalışmada elde edilen verilerin pekiştirilmesi, olası bir destekleyici sonuçta in vivo ortamda yapılacak testler ile enzim etkinliğinin doğrulanması, PFKFB'nin yeni bir KKH markörü olarak yerini sağlamlaştıracaktır.

6. KAYNAKLAR

- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3983–3988. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>
- Alboukadel Kassambara. (2020). *ggpubr: “ggplot2” Based Publication Ready Plots* (R package version 0.4.0). <https://cran.r-project.org/package=ggpubr>
- Ansari, D., Tingstedt, B., Andersson, B., Holmquist, F., Stureson, C., Williamsson, C., ... Andersson, R. (2016). Pancreatic cancer: yesterday, today and tomorrow. *Future Oncology*, 12(16), 1929–1946. <https://doi.org/10.2217/fon-2016-0010>
- Atsumi, T., Chesney, J., Metz, C., Leng, L., Donnelly, S., Makita, Z., ... Bucala, R. (2002). High expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase / fructose-2,6-bisphosphatase (iPFK-2; PFKFB3) in human cancers. *Cancer Research*, 62, 5881–5887.
- Balko, J. M., Schwarz, L. J., Bhola, N. E., Kurupi, R., Owens, P., Miller, T. W., ... Arteaga, C. L. (2013). Activation of MAPK Pathways due to DUSP4 Loss Promotes Cancer Stem Cell-like Phenotypes in Basal-like Breast Cancer. *Cancer Research*, 73(20), 6346–6358. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1385>
- Bartrons, R., Simon-Molas, H., Rodríguez-García, A., Castaño, E., Navarro-Sabaté, À., Manzano, A., & Martínez-Outschoorn, U. E. (2018). Fructose 2,6-bisphosphate in cancer cell metabolism. *Frontiers in Oncology*, 8(SEP). <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00331>
- Begicevic, R.-R. R., & Falasca, M. (2017). ABC transporters in cancer stem cells: Beyond chemoresistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11). <https://doi.org/10.3390/ijms18112362>
- Ben-Porath, I., Thomson, M. W., Carey, V. J., Ge, R., Bell, G. W., Regev, A., & Weinberg, R. A. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature Genetics*, 40(5), 499–507. <https://doi.org/10.1038/ng.127>
- Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3(7), 730–737. <https://doi.org/10.1038/nm0797-730>
- Bourguignon, L. Y. W., Spevak, C. C., Wong, G., Xia, W., & Gilad, E. (2009). Hyaluronan-CD44 interaction with protein kinase C ϵ promotes oncogenic signaling by the stem cell marker nanog and the production of microRNA-21, leading to down-regulation of the tumor suppressor protein PDCD4, anti-apoptosis, and chemotherapy resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 284(39), 26533–26546. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.027466>
- Burstein, H. J., Lacchetti, C., Anderson, H., Buchholz, T. A., Davidson, N. E., Gelmon, K. A., ... Griggs, J. J. (2019). Adjuvant Endocrine Therapy for

- Women With Hormone Receptor–Positive Breast Cancer: ASCO Clinical Practice Guideline Focused Update. *Journal of Clinical Oncology*, 37(5), 423–438. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.01160>
- Calvo, M. N., Bartrons, R., Castaño, E., Perales, J. C., Navarro-Sabaté, A., & Manzano, A. (2006). PFKFB3 gene silencing decreases glycolysis, induces cell-cycle delay and inhibits anchorage-independent growth in HeLa cells. *FEBS Letters*, 580(13), 3308–3314. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.093>
- Cantelmo, A. R., Conradi, L.-C., Brajic, A., Goveia, J., Kalucka, J., Pircher, A., ... Carmeliet, P. (2016). Inhibition of the Glycolytic Activator PFKFB3 in Endothelium Induces Tumor Vessel Normalization, Impairs Metastasis, and Improves Chemotherapy. *Cancer Cell*, 968–985. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.10.006>
- Caparello, C., Meijer, L. L., Garajova, I., Falcone, A., Le Large, T. Y., Funel, N., ... Giovannetti, E. (2016). FOLFIRINOX and translational studies: Towards personalized therapy in pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(31), 6987–7005. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i31.6987>
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., & Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113(5), 643–655. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00392-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00392-1)
- Chan, J. K. C., Ng, C. S., & Hui, P. K. (1988). A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies. *Histopathology*, 12(5), 461–480. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1988.tb01967.x>
- Chang, E. H., Gonda, M. A., Ellis, R. W., Scolnick, E. M., & Lowy, D. R. (1982). Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(16), 4848–4852. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.16.4848>
- Chesney, J., Clark, J., Klarer, A. C., Imbert-Fernandez, Y., Lane, A. N., & Telang, S. (2014). Fructose-2,6-bisphosphate synthesis by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 (PFKFB4) is required for the glycolytic response to hypoxia and tumor growth. *Oncotarget*, 5(16), 6670–6686. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2213>
- Chesney, J., Telang, S., Yalcin, A., Clem, A., Wallis, N., & Bucala, R. (2005). Targeted disruption of inducible 6-phosphofructo-2-kinase results in embryonic lethality. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(1), 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.02.193>
- Ciavardelli, D., Rossi, C., Barcaroli, D., Volpe, S., Consalvo, A., Zucchelli, M., ... Urbani, A. (2014). Breast cancer stem cells rely on fermentative glycolysis and are sensitive to 2-deoxyglucose treatment. *Cell Death and Disease*, 5(7), 1–12. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.285>
- Cieślak-Pobuda, A., Jain, M. V., Kratz, G., Rzeszowska-Wolny, J., Ghavami, S., &

- Wiechec, E. (2015). The expression pattern of PFKFB3 enzyme distinguishes between induced-pluripotent stem cells and cancer stem cells. *Oncotarget*, 6(30), 29753–29770. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4995>
- Colleoni, M., Sun, Z., Price, K. N., Karlsson, P., Forbes, J. F., Thürlimann, B., ... Goldhirsch, A. (2016). Annual hazard rates of recurrence for breast cancer during 24 years of follow-up: Results from the international breast cancer study group trials I to V. *Journal of Clinical Oncology*, 34(9), 927–935. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.3504>
- Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J., & Maitland, N. J. (2005). Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells. *Cancer Research*, 65(23), 10946–10951. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2018>
- Cornish-Bowden, A. (1997). Harden and Young's Discovery of Fructose 1,6-Bisphosphate. In A. Cornish-Bowden (Ed.), *New Beer in an Old Bottle: Eduard Buchner and the Growth of Biochemical Knowledge*. Universitat de València. http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=HFrBP8S7my4C&oi=fnd&pg=PA135&dq=Harden+and+Young%27s+discovery+of+fructose-1,+6-bisphosphate&ots=gJrTnvOizd&sig=vCOcN-aI4QxBmwuBu_-dKf94vmQ
- Curtis, C., Shah, S. P., Chin, S.-F., Turashvili, G., Rueda, O. M., Dunning, M. J., ... Aparicio, S. (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 486(7403), 346–352. <https://doi.org/10.1038/nature10983>
- Da Cruz Paula, A., & Lopes, C. (2017). Implications of different cancer stem cell phenotypes in breast cancer. *Anticancer Research*, 37(5), 2173–2183. <https://doi.org/10.21873/anticancer.11552>
- Dang, D. T., Pevsner, J., & Yang, V. W. (2000). The biology of the mammalian Krüppel-like family of transcription factors. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 32(11–12), 1103–1121. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(00\)00059-5](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(00)00059-5)
- Dasgupta, S., Rajapakshe, K., Zhu, B., Nikolai, B. C., Yi, P., Putluri, N., ... O'Malley, B. W. (2018). Metabolic enzyme PFKFB4 activates transcriptional coactivator SRC-3 to drive breast cancer. *Nature*, 556(7700), 249–254. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0018-1>
- Der, C. J., Krontiris, T. G., & Cooper, G. M. (1982). Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(11), 3637–3640. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.11.3637>
- Du, L., Wang, H., He, L., Zhang, J., Ni, B., Wang, X., ... Chen, Q. (2008). CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clinical Cancer Research*, 14(21), 6751–6760. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1034>
- Estrella, V., Chen, T., Lloyd, M., Wojtkowiak, J., Cornnell, H. H., Ibrahim-Hashim, A., ... Gillies, R. J. (2013). Acidity Generated by the Tumor Microenvironment

- Drives Local Invasion. *Cancer Research*, 73(5), 1524–1535.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2796>
- Fang, D., Nguyen, T. K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, A. N., Hotz, S., ... Herlyn, M. (2005). A Tumorigenic Subpopulation with Stem Cell Properties in Melanomas. *Cancer Research*, 65(20), 9328–9337.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1343>
- Fitzgerald, T. L., Lertpiriyapong, K., Cocco, L., Martelli, A. M., Libra, M., Candido, S., ... McCubrey, J. A. (2015). Roles of EGFR and KRAS and their downstream signaling pathways in pancreatic cancer and pancreatic cancer stem cells. *Advances in Biological Regulation*, 59, 65–81.
<https://doi.org/10.1016/j.jbior.2015.06.003>
- Frampas, E., David, A., Regenet, N., Toucheffeu, Y., Meyer, J., & Morla, O. (2016). Pancreatic carcinoma: Key-points from diagnosis to treatment. *Diagnostic and Interventional Imaging*, 97(12), 1207–1223.
<https://doi.org/10.1016/j.diii.2016.07.008>
- Fujii, H., Honoki, K., Tsujiuchi, T., Kido, A., Yoshitani, K., & Takakura, Y. (2009). Sphere-forming stem-like cell populations with drug resistance in human sarcoma cell lines. *International Journal of Oncology*, 34, 1381–1386.
https://doi.org/10.3892/ijo_00000265
- Gao, Q., Geng, L., Kvalheim, G., Gaudernack, G., & Suo, Z. (2009). Identification of Cancer Stem-like Side Population Cells in Ovarian Cancer Cell Line OVCAR-3. *Ultrastructural Pathology*, 33(4), 175–181.
<https://doi.org/10.1080/01913120903086072>
- Goidts, V., Bageritz, J., Puccio, L., Nakata, S., Zapatka, M., Barbus, S., ... Radlwimmer, B. (2012). RNAi screening in glioma stem-like cells identifies PFKFB4 as a key molecule important for cancer cell survival. *Oncogene*, 31(27), 3235–3243. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.490>
- Gottesman, M. M., Fojo, T., & Bates, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. In *Nature Reviews Cancer*.
<https://doi.org/10.1038/nrc706>
- Gou, S., Liu, T., Wang, C., Yin, T., Li, K., Yang, M., & Zhou, J. (2007). Establishment of Clonal Colony-Forming Assay for Propagation of Pancreatic Cancer Cells With Stem Cell Properties. *Pancreas*, 34(4), 429–435.
<https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e318033f9f4>
- Gradiz, R., Silva, H. C., Carvalho, L., Botelho, M. F., & Mota-Pinto, A. (2016). MIA PaCa-2 and PANC-1 - Pancreas ductal adenocarcinoma cell lines with neuroendocrine differentiation and somatostatin receptors. *Scientific Reports*, 6(February), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep21648>
- Gu, Y., Ji, F., Liu, N., Zhao, Y., Wei, X., Hu, S., ... Ji, J. (2020). Loss of miR-192-5p initiates a hyperglycolysis and stemness positive feedback in hepatocellular carcinoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 39(1), 1–19.
<https://doi.org/10.1186/s13046-020-01785-7>

- Gwak, J. M., Kim, M., Kim, H. J., Jang, M. H., & Park, S. Y. (2017). Expression of embryonal stem cell transcription factors in breast cancer: Oct4 as an indicator for poor clinical outcome and tamoxifen resistance. *Oncotarget*, 8(22), 36305–36318. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16750>
- Hadnagy, A., Gaboury, L., Beaulieu, R., & Balicki, D. (2006). SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. *Experimental Cell Research*, 312(19), 3701–3710. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.08.030>
- Han, H. (2018). RNA Interference to Knock Down Gene Expression. In *Physiology & behavior* (Vol. 176, Issue 10, pp. 293–302). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7471-9_16
- Han, J., Meng, Q., Xi, Q., Wang, H., & Wu, G. (2017). PFKFB3 was overexpressed in gastric cancer patients and promoted the proliferation and migration of gastric cancer cells. *Cancer Biomarkers*, 18(3), 249–256. <https://doi.org/10.3233/CBM-160143>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hasemann, C. A., Istvan, E. S., Uyeda, K., & Deisenhofer, J. (1996). The crystal structure of the bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase reveals distinct domain homologies. *Structure*, 4(9), 1017–1029. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00109-8](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00109-8)
- Hayashi, S., Fujita, K., Matsumoto, S., Akita, M., & Satomi, A. (2011). Isolation and identification of cancer stem cells from a side population of a human hepatoblastoma cell line, HuH-6 clone-5. *Pediatric Surgery International*, 27(1), 9–16. <https://doi.org/10.1007/s00383-010-2719-x>
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986–994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>
- Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., ... Heeschen, C. (2007). Distinct Populations of Cancer Stem Cells Determine Tumor Growth and Metastatic Activity in Human Pancreatic Cancer. *Cell Stem Cell*, 1(3), 313–323. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.06.002>
- Herrerros-Villanueva, M., Bujanda, L., Billadeau, D. D., & Zhang, J. S. (2014). Embryonic stem cell factors and pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 20(9), 2247–2254. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i9.2247>
- Hilliker, C. E., Darville, M. I., Aly, M. S., Chikri, M., Szpirer, C., Marynen, P., ... Cassiman, J. J. (1991). Human and Rat Chromosomal Localization of Two Genes for 6-Phosphofructo-2-kinase/Fructose-2,6-bisphosphatase by Analysis of Somatic Cell Hybrids and in Situ Hybridization. *Genomics*, 10, 867–873. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90174-D](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90174-D)
- Hollestelle, A., Elstrodt, F., Nagel, J. H. A., Kallemeijn, W. W., & Schutte, M. (2007). Phosphatidylinositol-3-OH Kinase or RAS Pathway Mutations in Human Breast Cancer Cell Lines. *Molecular Cancer Research*, 5(2), 195–201.

<https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0263>

- Ishikawa, M., Yoshida, K., Yamashita, Y., Ota, J., Takada, S., Kisanuki, H., ... Mano, H. (2005). Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells. *Cancer Science*, 96(7), 387–393. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2005.00064.x>
- Jacob, J., Bellach, J., Grützmann, R., Alldinger, I., Pilarsky, C., Dietel, M., & Kristiansen, G. (2004). Expression of CD24 in adenocarcinomas of the pancreas correlates with higher tumor grades. *Pancreatology*, 4(5), 454–460. <https://doi.org/10.1159/000079824>
- Jančík, S., Drábek, J., Radzioch, D., & Hajdúch, M. (2010). Clinical Relevance of KRAS in Human Cancers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010(June), 1–13. <https://doi.org/10.1155/2010/150960>
- Ju, S. Y., Chiou, S. H., & Su, Y. (2014). Maintenance of the stemness in CD44+ HCT-15 and HCT-116 human colon cancer cells requires miR-203 suppression. *Stem Cell Research*, 12(1), 86–100. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.09.011>
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., & Kondoh, H. (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends in Genetics*, 16(4), 182–187. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(99\)01955-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01955-1)
- Kim, C. F. B., Jackson, E. L., Woolfenden, A. E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., ... Jacks, T. (2005). Identification of Bronchioalveolar Stem Cells in Normal Lung and Lung Cancer. *Cell*, 121(6), 823–835. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.03.032>
- Kim, W. T., & Ryu, C. J. (2017). Cancer stem cell surface markers on normal stem cells. *BMB Reports*, 50(6), 285–298. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2017.50.6.039>
- Kim, Y. S., Kaidina, A. M., Chiang, J.-H., Yarygin, K. N., & Lupatov, A. Y. (2017). Cancer Stem Cell Molecular Markers Verified in vivo. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 11(1), 43–54. <https://doi.org/10.1134/S1990750817010036>
- Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C. D., Biankin, A. V., ... Neoptolemos, J. P. (2016). Pancreatic cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 2(April), 1–23. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.22>
- Klonisch, T., Wiechec, E., Hombach-Klonisch, S., Ande, S. R., Wesselborg, S., Schulze-Osthoff, K., & Los, M. (2008). Cancer stem cell markers in common cancers - therapeutic implications. *Trends in Molecular Medicine*, 14(10), 450–460. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.08.003>
- Kohler, R. (1971). The background to Eduard Buchner's discovery of cell-free fermentation. *Journal of the History of Biology*, 4(1), 35–61. <https://doi.org/10.1007/BF00356976>
- Kranenburg, O. (2005). The KRAS oncogene: Past, present, and future. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1756(2), 81–82.

<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2005.10.001>

- Kresge, N., Simoni, R. D., & Hill, R. L. (2005). Otto Fritz Meyerhof and the Elucidation of the Glycolytic Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 280(4), e3. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)76366-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)76366-0)
- Kristiansen, G., Sammar, M., & Altevogt, P. (2003). Tumour Biological Aspects of CD24, A Mucin-Like Adhesion Molecule. *Journal of Molecular Histology*, 35(3), 255–262. <https://doi.org/10.1023/B:HIJO.0000032357.16261.c5>
- Kurland, I., Chapman, B., Lee, Y. H., & Pilkis, S. (1995). Evolutionary Reengineering of the Phosphofructokinase Active Site: ARG-104 Does Not Stabilize the Transition State in 6-Phosphofructo-2-Kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 213(2), 663–672. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2183>
- Lee, J.-H., Kim, S.-H., Lee, E.-S., & Kim, Y.-S. (2009). CD24 overexpression in cancer development and progression: A meta-analysis. *Oncology Reports*, 22(05). https://doi.org/10.3892/or_00000548
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., ... Simeone, D. M. (2007). Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cancer Research*, 67(3), 1030–1037. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2030>
- Li, D., Firozi, P. F., Zhang, W., Shen, J., DiGiovanni, J., Lau, S., ... Abbruzzese, J. L. (2002). DNA adducts, genetic polymorphisms, and K-ras mutation in human pancreatic cancer. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 513(1–2), 37–48. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00291-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00291-1)
- Li, L., Lin, K., Pilkis, J., Correia, J. J., & Pilkis, S. J. (1992). Hepatic 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. The role of surface loop basic residues in substrate binding to the fructose-2,6-bisphosphatase domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(30), 21588–21594. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1328239>
- Li, X., Liu, J., Qian, L., Ke, H., Yao, C., Tian, W., ... Zhang, J. (2018). Expression of PFKFB3 and Ki67 in lung adenocarcinomas and targeting PFKFB3 as a therapeutic strategy. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 445(1–2), 123–134. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3258-8>
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, 41(3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- López-Lázaro, M. (2015). The migration ability of stem cells can explain the existence of cancer of unknown primary site. Rethinking metastasis. *Oncoscience*, 2, 467. <https://doi.org/10.18632/oncoscience.159>
- López-Lázaro, M. (2018). The stem cell division theory of cancer. *Critical Reviews*

- in Oncology/Hematology*, 123, 95–113.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.01.010>
- Lu, H., Chen, S., You, Z., Xie, C., Huang, S., & Hu, X. (2020). PFKFB4 negatively regulated the expression of histone acetyltransferase GCN5 to mediate the tumorigenesis of thyroid cancer. *Development Growth and Differentiation*, 62(2), 129–138. <https://doi.org/10.1111/dgd.12645>
- Maertens, O., & Cichowski, K. (2014). An expanding role for RAS GTPase activating proteins (RAS GAPs) in cancer. *Advances in Biological Regulation*, 55, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.04.002>
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., ... Weinberg, R. A. (2008). The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell*, 133(4), 704–715.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>
- Manzano, A., Pérez, J. ., Nadal, M., Estivill, X., Lange, A., & Bartrons, R. (1999). Cloning, expression and chromosomal localization of a human testis 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene. *Gene*, 229(1–2), 83–89. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00037-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00037-2)
- Manzano, A., Rosa, J. L., Ventura, F., Pérez, J. X., Nadal, M., Estivill, X., ... Bartrons, R. (1998). Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of a ubiquitously expressed human 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene (PFKFB3). *Cytogenetics and Cell Genetics*, 83(3–4), 214–217. <https://doi.org/10.1159/000015181>
- Martinez-Outschoorn, U. E., Prisco, M., Ertel, A., Tsirigos, A., Lin, Z., Pavlides, S., ... Lisanti, M. P. (2011). Ketones and lactate increase cancer cell “stemness,” driving recurrence, metastasis and poor clinical outcome in breast cancer. *Cell Cycle*, 10(8), 1271–1286. <https://doi.org/10.4161/cc.10.8.15330>
- Marusyk, A., & Polyak, K. (2010). Tumor heterogeneity: Causes and consequences. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1805(1), 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.11.002>
- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., & McCain, R. S. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 24, Issue 43, pp. 4846–4861). <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i43.4846>
- McLaughlin, S. K., Olsen, S. N., Dake, B., De Raedt, T., Lim, E., Bronson, R. T., ... Cichowski, K. (2013). The RasGAP Gene, RASAL2, Is a Tumor and Metastasis Suppressor. *Cancer Cell*, 24(3), 365–378.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.004>
- Minchenko, O. H., Opentanova, I. L., Ogura, T., Minchenko, D. O., Komisarenko, S. V., Caro, J., & Esumi, H. (2005). Expression and hypoxia-responsiveness of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 in mammary gland malignant cell lines. *Acta Biochimica Polonica*, 52(4), 881–888.
- Minchenko, O., Opentanova, I., & Caro, J. (2003). Hypoxic regulation of the 6-

- phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Letters*, 554(3), 264–270. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01179-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01179-7)
- Moreb, J. S. (2008). Aldehyde Dehydrogenase as a Marker for Stem Cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 3(4), 237–246. <https://doi.org/10.2174/157488808786734006>
- Murayama, T., & Gotoh, N. (2019). Drug resistance mechanisms of cancer stem-like cells and their therapeutic potential as drug targets. *Cancer Drug Resistance*, 457–470. <https://doi.org/10.20517/cdr.2019.36>
- Nakajima, E. C., & Van Houten, B. (2013). Metabolic symbiosis in cancer: Refocusing the Warburg lens. *Molecular Carcinogenesis*, 52(5), 329–337. <https://doi.org/10.1002/mc.21863>
- Naor, D., Sionov, R. V., & Ish-Shalom, D. (1997). CD44: Structure, Function and Association with the Malignant Process. In *Advances in Cancer Research* (pp. 241–319). [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)60101-3](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)60101-3)
- National Center for Biotechnology Information. (2021a). *PubChem Compound Summary for CID 105021, Fructose-2,6-diphosphate*. Retrieved March 22, 2021 from. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fructose-2_6-diphosphate
- National Center for Biotechnology Information. (2021b). *PubChem Compound Summary for CID 445557, Fructose 1,6-bisphosphate*. Retrieved March 22, 2021 from. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fructose-1_6-bisphosphate
- Nicholl, J., Hamilton, J. A., Sutherland, G. R., Sutherland, R. L., & Watts, C. K. W. (1997). The third human isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose -2,6 bisphosphatase (PFKFB3) Map position 10p14-15. *Chromosome Research*, 5(8), 150. <https://doi.org/10.1023/A:1018482511456>
- Nimmakayala, R. K., Leon, F., Rachagani, S., Rauth, S., Nallasamy, P., Marimuthu, S., ... Ponnusamy, M. P. (2020). Metabolic programming of distinct cancer stem cells promotes metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01518-2>
- Nishio, K., Kimura, K., Amano, R., Yamazoe, S., Ohnira, G., Nakata, B., ... Ohira, M. (2017). Preoperative predictors for early recurrence of resectable pancreatic cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12957-016-1078-z>
- Niwa, H., Miyazaki, J. I., & Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*, 24(4), 372–376. <https://doi.org/10.1038/74199>
- Nouri, M., Caradec, J., Lubik, A. A., Li, N., Hollier, B. G., Takhar, M., ... Buttyan, R. (2017). Therapy-induced developmental reprogramming of prostate cancer cells and acquired therapy resistance. *Oncotarget*, 8(12). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14850>

- Novellasedemunt, L., Tato, I., Navarro-Sabate, A., Ruiz-Meana, M., Méndez-Lucas, A., Perales, J. C., ... Luis Rosa, J. (2013). Akt-dependent activation of the heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase (PFKFB2) isoenzyme by amino acids. *Journal of Biological Chemistry*, 288(15), 10640–10651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.455998>
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194(4260), 23–28. <https://doi.org/10.1126/science.959840>
- O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., & Dick, J. E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445(7123), 106–110. <https://doi.org/10.1038/nature05372>
- O'Neal, J., Clem, A., Reynolds, L., Dougherty, S., Imbert-Fernandez, Y., Telang, S., ... Clem, B. F. (2016). Inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) suppresses glucose metabolism and the growth of HER2+ breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 160(1), 29–40. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3968-8>
- Okada, M., Shibuya, K., Sato, A., Seino, S., Suzuki, S., Seino, M., & Kitanaka, C. (2014). Targeting the K-Ras - JNK axis eliminates cancer stem-like cells and prevents pancreatic tumor formation. *Oncotarget*, 5(13), 5100–5112. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2087>
- Olson, S., Uyeda, K., & McBride, O. W. (1989). Localization of fructose 6-P₂-kinase:fructose 2,6-bisphosphatase to human chromosome X. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 15(6), 617–621. <https://doi.org/10.1007/BF01534922>
- ONCOMINE™ Research Edition. (n.d.). <https://www.oncomine.org>
- Özcan, S. C. (2018). *Pankreas epitel hücrelerinin onkojenik transformasyonunda PFKFB2'nin rolü* [Yayınlanmamış doktora tezi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü]. <http://hdl.handle.net/11452/959>
- Ozcan, S. C., Sarioglu, A., Altunok, T. H., Akkoc, A., Guzel, S., Guler, S., ... Yalcin, A. (2020). PFKFB2 regulates glycolysis and proliferation in pancreatic cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 470(July 2020), 115–129. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03751-5>
- Pedro J. Aphalo. (2021). *ggpmisc: Miscellaneous Extensions to “ggplot2”* (R package version 0.3.8-1). <https://cran.r-project.org/package=ggpmisc>
- Peng, F., Li, Q., Sun, J. Y., Luo, Y., Chen, M., & Bao, Y. (2018). PFKFB3 is involved in breast cancer proliferation, migration, invasion and angiogenesis. *International Journal of Oncology*, 52(3), 945–954. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4257>
- Ponta, H., Sherman, L., & Herrlich, P. A. (2003). CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(1), 33–45. <https://doi.org/10.1038/nrm1004>
- Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., ... Daidone, M. G. (2005). Isolation and In vitro Propagation of Tumorigenic

- Breast Cancer Cells with Stem/Progenitor Cell Properties. *Cancer Research*, 65(13), 5506–5511. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0626>
- Prince, M. E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G. T., Kaplan, M. J., Dalerba, P., ... Ailles, L. E. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3), 973–978. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610117104>
- Pruszek, J., Menon, V., & Pruszek, J. (2017). The CD24 surface antigen in neural development and disease. *Neurobiology of Disease*, 99, 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.12.011>
- R Core Team. (2020). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Rajendran, V., & Jain, M. V. (2018). In vitro tumorigenic assay: colony forming assay for cancer stem cells. *Methods in Molecular Biology*, 1692, 89–95. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7401-6_8
- Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., & De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445(7123), 111–115. <https://doi.org/10.1038/nature05384>
- Rich, J. N. (2007). Cancer stem cells in radiation resistance. *Cancer Research*, 67(19), 8980–8984. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0895>
- Rider, M. H., Bertrand, L., Vertommen, D., Michels, P. A., Rousseau, G. G., & Hue, L. (2004). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochemical Journal*, 381(3), 561–579. <https://doi.org/10.1042/BJ20040752>
- Rountree, C. B., Ding, W., He, L., & Stiles, B. (2009). Expansion of CD133-Expressing Liver Cancer Stem Cells in Liver-Specific Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10-Deleted Mice. *Stem Cells*, 27(2), 290–299. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0332>
- Sakakibara, R., Kato, M., Okamura, N., Nakagawa, T., Komada, Y., Tominaga, N., ... Fukasawa, M. (1997). Characterization of a human placental fructose-6-phosphate, 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *Journal of Biochemistry*, 122(1), 122–128. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021719>
- Sancho, P., Barneda, D., & Heeschen, C. (2016). Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *British Journal of Cancer*, 114(12), 1305–1312. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.152>
- Sancho, P., Burgos-Ramos, E., Tavera, A., Bou Kheir, T., Jagust, P., Schoenhals, M., ... Heeschen, C. (2015). MYC/PGC-1 α Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cell Metabolism*, 22(4), 590–605. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.015>
- Sanger. (n.d.). *COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*.

<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>

- Schaefer, T., Wang, H., Mir, P., Konantz, M., Pereboom, T. C., Paczulla, A. M., ... Lengerke, C. (2015). Molecular and functional interactions between AKT and SOX2 in breast carcinoma. *Oncotarget*, 6(41), 43540–43556. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6183>
- Schaftingen, E. Van, & Hers, H. G. (1980). Synthesis of a stimulator of phosphofructokinase, most likely fructose 2,6-bisphosphate, from phosphoric acid and fructose 6-phosphoric acid. *Topics in Catalysis*. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(80\)91347-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(80)91347-9)
- Schatton, T., Frank, N. Y., & Frank, M. H. (2009). Identification and targeting of cancer stem cells. *BioEssays*, 31(10), 1038–1049. <https://doi.org/10.1002/bies.200900058>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. In *Nature Methods* (pp. 671–675). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schoenhals, M., Kassambara, A., Vos, J. De, Hose, D., Moreaux, J., & Klein, B. (2009). Embryonic stem cell markers expression in cancers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 383(2), 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.02.156>
- Shao, J., Fan, W., Ma, B., & Wu, Y. (2016). Breast cancer stem cells expressing different stem cell markers exhibit distinct biological characteristics. *Molecular Medicine Reports*, 14(6), 4991–4998. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5899>
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., ... Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432(7015), 396–401. <https://doi.org/10.1038/nature03128>
- Slavov, N., Budnik, B. A., Schwab, D., Airolidi, E. M., & van Oudenaarden, A. (2014). Constant Growth Rate Can Be Supported by Decreasing Energy Flux and Increasing Aerobic Glycolysis. *Cell Reports*, 7(3), 705–714. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.057>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Telang, S., Yalcin, A., Clem, A. L., Bucala, R., Lane, A. N., Eaton, J. W., & Chesney, J. (2006). Ras transformation requires metabolic control by 6-phosphofructo-2-kinase. *Oncogene*, 25(55), 7225–7234. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209709>
- Thomas, D., Thiagarajan, P. S., Rai, V., Reizes, O., Lathia, J., & Egelhoff, T. (2016). Increased cancer stem cell invasion is mediated by myosin IIB and nuclear translocation. *Oncotarget*, 7(30), 47586–47592. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9896>
- Tian, J.-M., Ran, B., Zhang, C.-L., Yan, D.-M., & LI, X.-H. (2018). Estrogen and

- progesterone promote breast cancer cell proliferation by inducing cyclin G1 expression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 51(3). <https://doi.org/10.1590/1414-431x20175612>
- Toledo-Guzmán, M. E., Hernández, M. I., Gómez-Gallegos, A. A., & Ortiz-Sánchez, E. (2019). ALDH as a Stem Cell Marker in Solid Tumors. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 14(5), 375–388. <https://doi.org/10.2174/1574888x13666180810120012>
- Tomuleasa, C., Soritau, O., Rus-Ciucă, D., Pop, T., Todea, D., Mosteanu, O., ... Irimie, A. (2010). Isolation and characterization of hepatic cancer cells with stem-like properties from hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases : JGLD*, 19(1), 61–67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20361077>
- Trojan, S. E., Piwowar, M., Ostrowska, B., Laidler, P., & Kocemba-Pilarczyk, K. A. (2018). Analysis of malignant melanoma cell lines exposed to hypoxia reveals the importance of PFKFB4 overexpression for disease progression. *Anticancer Research*, 38(12), 6745–6752. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13044>
- Van Schaftingen, E., Hue, L., & Hers, H. G. (1980a). Control of the fructose 6-phosphate/fructose 1,6-bisphosphate cycle in isolated hepatocytes by glucose and glucagon. Role of a low-molecular-weight stimulator of phosphofructokinase. *Biochemical Journal*, 192(3), 887–895. <https://doi.org/10.1042/bj1920887>
- Van Schaftingen, E., Hue, L., & Hers, H. G. (1980b). Fructose 2,6-bisphosphate, the probably structure of the glucose- and glucagon-sensitive stimulator of phosphofructokinase. *Biochemical Journal*, 192(3), 897–901. <https://doi.org/10.1042/bj1920897>
- Van Schaijik, B., Davis, P. F., Wickremesekera, A. C., Tan, S. T., & Itinteang, T. (2018). Subcellular localisation of the stem cell markers OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 and c-MYC in cancer: A review. *Journal of Clinical Pathology*, 71(1), 88–91. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204815>
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Veronesi, U., Boyle, P., Goldhirsch, A., Orecchia, R., & Viale, G. (2005). Breast cancer. *Lancet*, 365(9472), 1727–1741. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66546-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66546-4)
- Viale, A., Pettazoni, P., Lyssiotis, C. A., Ying, H., Sánchez, N., Marchesini, M., ... Draetta, G. F. (2014). Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature13611>
- von Minckwitz, G. (2007). Docetaxel/anthracycline combinations for breast cancer treatment. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 8(4), 485–495. <https://doi.org/10.1517/14656566.8.4.485>
- Wang, C., Xie, J., Guo, J., Manning, H. C., Gore, J. C., & Guo, N. (2012).

- Evaluation of CD44 and CD133 as cancer stem cell markers for colorectal cancer. *Oncology Reports*, 28(4), 1301–1308. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1951>
- Wang, D., Lu, P., Zhang, H., Luo, M., Zhang, X., Wei, X., ... Liu, C. (2014). Oct-4 and Nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget*, 5(21), 10803–10815. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2506>
- Wang, G., Li, S., Xue, K., & Dong, S. (2020). PFKFB4 is critical for the survival of acute monocytic leukemia cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 526(4), 978–985. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.03.174>
- Wang, J., Li, X., Xiao, Z., Wang, Y., Han, Y., Li, J., ... Wen, X. (2019). MicroRNA-488 inhibits proliferation and glycolysis in human prostate cancer cells by regulating PFKFB3. *FEBS Open Bio*, 9(10), 1798–1807. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12718>
- Wang, W., Quan, Y., Fu, Q., Liu, Y., Liang, Y., Wu, J., ... Wang, Y. (2014). Dynamics between Cancer Cell Subpopulations Reveals a Model Coordinating with Both Hierarchical and Stochastic Concepts. *PLoS ONE*, 9(1), e84654. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084654>
- Wang, Y., Yang, J., Zheng, H., Tomasek, G. J., Zhang, P., McKeever, P. E., ... Zhu, Y. (2009). Expression of Mutant p53 Proteins Implicates a Lineage Relationship between Neural Stem Cells and Malignant Astrocytic Glioma in a Murine Model. *Cancer Cell*, 15(6), 514–526. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.04.001>
- Warburg, O. (1925). The Metabolism of Carcinoma Cells. *The Journal of Cancer Research*, 9(1), 148–163. <https://doi.org/10.1158/jcr.1925.148>
- Warburg, O. (1956). On the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123(3191), 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Weiss, W., & Benarde, M. A. (1983). The temporal relation between cigarette smoking and pancreatic cancer. *American Journal of Public Health*, 73(12), 1403–1404. <https://doi.org/10.2105/AJPH.73.12.1403>
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., ... Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Wilson, G. S., Hu, Z., Duan, W., Tian, A., Wang, X. M., McLeod, D., ... Qiao, L. (2013). Efficacy of using cancer stem cell markers in isolating and characterizing liver cancer stem cells. *Stem Cells and Development*, 22(19), 2655–2664. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0703>
- Wright, M. H., Calcagno, A. M., Salcido, C. D., Carlson, M. D., Ambudkar, S. V., & Varticovski, L. (2008). Brca1 breast tumors contain distinct CD44+/CD24- and CD133+ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Research*, 10(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/bcr1855>
- Xu, C., Sun, X., Qin, S., Wang, H., Zheng, Z., Xu, S., ... Ren, H. (2015). Let-7a

- regulates mammosphere formation capacity through Ras/NF- κ B and Ras/MAPK/ERK pathway in breast cancer stem cells. *Cell Cycle*, 14(11), 1686–1697. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1030547>
- Yalcin, A., Clem, B. F., Imbert-Fernandez, Y., Ozcan, S. C., Peker, S., O’Neal, J., ... Chesney, J. (2014). 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) promotes cell cycle progression and suppresses apoptosis via Cdk1-mediated phosphorylation of p27. *Cell Death and Disease*, 5(7), e1337. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.292>
- Yan, S., Zhou, N., Zhang, D., Zhang, K., Zheng, W., Bao, Y., & Yang, W. (2019). PFKFB3 inhibition attenuates oxaliplatin-induced autophagy and enhances its cytotoxicity in colon cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21). <https://doi.org/10.3390/ijms20215415>
- Yan, Y., Zuo, X., & Wei, D. (2015). Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *STEM CELLS Translational Medicine*, 4(9), 1033–1043. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0048>
- Yang, H., Shu, Z., Jiang, Y., Mao, W., Pang, L., Redwood, A., ... Lu, Z. (2019). 6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase-2 Regulates TP53-Dependent Paclitaxel Sensitivity in Ovarian and Breast Cancers. *Clinical Cancer Research*, 25(18), 5702–5716. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3448>
- Yin, T., Wei, H., Gou, S., Shi, P., Yang, Z., Zhao, G., & Wang, C. (2011). Cancer Stem-Like Cells Enriched in Panc-1 Spheres Possess Increased Migration Ability and Resistance to Gemcitabine. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(3), 1595–1604. <https://doi.org/10.3390/ijms12031595>
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., ... Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), 1917–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1151526>
- Zhang, H., Lu, C., Fang, M., Yan, W., Chen, M., Ji, Y., ... Xiao, J. (2016). HIF-1 α activates hypoxia-induced PFKFB4 expression in human bladder cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 476(3), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.026>
- Zhang, Z., Wang, Y., Vikis, H. G., Johnson, L., Liu, G., Li, J., ... You, M. (2001). Wildtype Kras2 can inhibit lung carcinogenesis in mice. *Nature Genetics*, 29(1), 25–33. <https://doi.org/10.1038/ng721>
- Zhao, M., Yang, H., Jiang, X., Zhou, W., Zhu, B., Zeng, Y., ... Ren, C. (2008). Lipofectamine RNAiMAX: An efficient siRNA transfection reagent in human embryonic stem cells. *Molecular Biotechnology*, 40(1), 19–26. <https://doi.org/10.1007/s12033-008-9043-x>

7. SİMGE VE KISALTMALAR

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

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açılım</u>
ABC	ATP bağlayıcı kaset proteini
Adh	Adherent
ADP	Adenozin difosfat
Akt	Protein kinaz B
ALDH	Aldehit dehidrojenaz
APC	Allofikosiyanin
ATP	Adenozin trifosfat
BCA	Bikinkoninik asit
BMI-1	B lenfoma Mo-MLV ilave bölge 1
CD	Farklılaşma kümeleri
DMEM	Dulbecco tarafından modifiye edilmiş Eagle besiyeri
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ERK	Ekstrasellüler sinyal ilişkili kinaz
ESA	Epitelyal hücre adhezyon molekülü
ESM	Ekstrasellüler matriks
F6P	Fruktoz 6-fosfat
F1,6BP	Fruktoz-1,6-bisfosfat
F2,6BP	Fruktoz-2,6-bisfosfat
FBS	Fötal sıgır serumu
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz
GSK	Glikojen sentaz kinaz
GTP	Guanozin-5'-trifosfat
HA	Hyaluronik asit
HA-RAS	Harvey Rat Sarkoma
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansulfonik asit
HMG	Yüksek mobilite grubu
HRP	Bayır Turpu Peroksidazı
iPSC	İndüklenmiş pluripotent kök hücre
KKH	Kanser Kök Hücre

KLF4	Kruppel benzeri faktör 4
Kontrol-si	Genomda karşılığı bulunmayan kontrol siRNA uygulanan deney grubu
K-RAS	Kirsten Rat Sarkoma
MAPK	Mitojenler tarafından aktive edilen protein kinaz
MEK	Mitojenlerce aktive edilen protein kinaz kinaz
mTORC1	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi kompleks 1
Oct4	Oktamer bağlayıcı dönüştürücü faktörü 4
P4-si	siRNA aracılığıyla PFKFB4 baskılanan deney grubu
P27	Protein 27
PBS	Fosfat ile tamponlanmış salin çözeltisi
PE	Fikoeritrin
PFK-1	Fosfofruktokinaz-1
PFKFB	6-fosfofrukto-2-kinaz/Fruktoz-2,6-bisfosfataz
PI3K	Fosfatidilinozitol 3 kinaz
PTEN	Fosfataz ve tensin homolog
PVDF	Polivinilidin florür
RIPA	Radyoimmünopresipitasyon analizi
RT	Ters transkripsiyon
RT-qPCR	Ters transkripsiyon kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
siRNA	Küçük interferans RNA'sı
Sox2	Cinsiyet belirleyici bölge Y – kutucuk 2
TBS-T	Tris tamponlu tuz, Tween 20
ULA	Ultra low attachment (Yüzey tutunma özelliği olmayan kuyucuklara sahip plakalara verilen ad)
YK	Yüzen kültür

8. EKLER

8.1. Şekiller Listesi

Şekil - 1: PubMed veritabanında " <i>cancer stem cell</i> "(kanser kök hücre) ve " <i>tumor initiating cell</i> " (tümör başlatıcı hücre) kelime gruplarıyla yapılan arama sonucu tespit edilen çalışmaların yıllara göre değişimi.	4
Şekil - 2: 2020 yılında Türkiye'deki kanser vaka sayısının (A) ve kansere bağlı ölümlerin (B) kanser türüne göre dağılımları.....	5
Şekil - 3: 2020 yılında dünyadaki kanser vaka sayısının (A) ve kansere bağlı ölümlerin (B) kanser türüne göre dağılımları.	7
Şekil - 4: Klonal Evrim Modeli'nde farklılaşmamış bütün hücrelerin tümorojenik potansiyeli eşittir	9
Şekil - 5: Kanser Kök Hücre Modeli'nde tümorojenik potansiyel yalnızca "kanser kök hücre" olarak adlandırılan ve tümör kitlesindeki oranı çok küçük olan bir hücre grubunda mevcuttur.	10
Şekil - 6: Kanser Kök Hücre Modeli'ne göre farklı tedavi protokollerinin heterojen tümör üzerindeki etkileri.	12
Şekil - 7: F1,6BP (National Center for Biotechnology Information, 2021b) ve F2,6BP (National Center for Biotechnology Information, 2021a) moleküllerinin iki boyutlu yapıları.....	22
Şekil - 8: Protein konsantrasyon ölçümünde referans olarak kullanılan BCA standart solüsyonunun absorbans/konsantrasyon grafiği.....	33
Şekil - 9: F2,6BP standart absorbans değişim hızı/konsantrasyon grafiği.....	34
Şekil - 10: PANC-1 hücre hattında Adh ve YK hücrelerin PFKFB izoenzim mRNA ekspresyonları. β -aktin endojen kontrol olarak kullanıldı.	38
Şekil - 11: MIA PaCa-2 hücre hattında Adh ve YK hücrelerin PFKFB izoenzim mRNA ekspresyonları. GAPDH endojen kontrol olarak kullanıldı.	39
Şekil - 12: MCF-7 hücre hattında Adh ve YK hücrelerin PFKFB izoenzim mRNA ekspresyonları. GAPDH endojen kontrol olarak kullanıldı.	40
Şekil - 13: ONCOMINE meme veri setinde PFKFB1 (A) ve PFKFB4 (B) mRNA ekspresyonları.	41
Şekil - 14: ONCOMINE pankreas veri setinde PFKFB1 (A) ve PFKFB4 (B) mRNA ekspresyonları.	41
Şekil - 15: PANC-1 (A), MIA PaCa 2 (B) ve MCF-7 (C) hücre hatlarında Adh ve YK hücrelerin hücre içi F2,6BP değerleri.	42
Şekil - 16: CD24 ve CD44 yüzey markörlerinin; PANC-1 hücre hattında Adh ve YK hücrelerdeki miktarının yüzde olarak ifadesi.	43

Şekil - 17: CD24 ve CD44 yüzey markörlerinin; MIA PaCa-2 hücre hattında Adh ve YK hücrelerdeki miktarının yüzde olarak ifadesi.	44
Şekil - 18: CD24 ve CD44 yüzey markörlerinin; MCF-7 hücre hattında Adh ve YK hücrelerdeki miktarının yüzde olarak ifadesi.	44
Şekil - 19: PANC-1 (A), MIA PaCa-2 (B) ve MCF-7(C) hücre hatlarında Adh ve YK hücrelerin Western blotlama görüntüsü ve elde edilen görüntüden yapılan relatif dansitometrik ölçüm.	46
Şekil - 20: PANC-1 hücre hattında Adh ve YK hücrelerde pluripotentlik markörlerinin mRNA ekspresyonu yönünden incelenmesi. GAPDH endojen kontrol olarak kullanıldı.	47
Şekil - 21: MIA PaCa-2 hücre hattında Adh ve YK hücrelerde pluripotentlik markörlerinin mRNA ekspresyonu yönünden incelenmesi. GAPDH endojen kontrol olarak kullanıldı.	48
Şekil - 22: MCF-7 hücre hattında Adh ve YK hücrelerde pluripotentlik markörlerinin mRNA ekspresyonu yönünden incelenmesi. GAPDH endojen kontrol olarak kullanıldı.	48
Şekil - 23: PANC-1, MIA PaCa 2 ve MCF-7 hücre hatlarında siRNA transfeksiyonu ile PFKFB4 inhibisyonunun PFKFB4 mRNA ekspresyonu seviyelerine etkisi. İnternal kontrol olarak GAPDH kullanıldı.	49
Şekil - 24: PANC-1, MIA PaCa 2 ve MCF-7 hücre hatlarında siRNA transfeksiyonu ile PFKFB4 inhibisyonunun PFKFB4 protein ekspresyonu seviyelerine etkisi. Yükleme kontrolü olarak GAPDH kullanıldı.	50
Şekil - 25: PANC-1 hücre hatlarında; Kontrol-si ve P4-si hücrelerde CD24 ve CD44 yüzey markörlerinin yüzde olarak ifadesi.	50
Şekil - 26: MIA PaCa 2 hücre hatlarında; Kontrol-si ve P4-si hücrelerde CD24 ve CD44 yüzey markörlerinin yüzde olarak ifadesi.	51
Şekil - 27: MCF-7 hücre hatlarında; Kontrol-si ve P4-si hücrelerde CD24 ve CD44 yüzey markörlerinin yüzde olarak ifadesi.	52
Şekil - 28: PANC-1 (A), MIA PaCa 2 (B) ve MCF-7 (C) hücre hatlarında Kontrol-si ve P4-si hücrelerin Western blotlama görüntüsü ve elde edilen görüntüden yapılan relatif dansitometrik ölçüm.	53
Şekil - 29: PANC-1 hücre hatlarında; Kontrol-si ve P4-si hücrelerin, pluripotentlik markörleri KLF4, NANOG, OCT4 ve SOX2 mRNA ekspresyonları. GAPDH endojen kontrol olarak kullanıldı.	54
Şekil - 30: MIA PaCa-2 hücre hatlarında; Kontrol-si ve P4-si hücrelerin, pluripotentlik markörleri KLF4, NANOG, OCT4 ve SOX2 mRNA ekspresyonları.	55
Şekil - 31: MCF-7 hücre hatlarında; Kontrol-si ve P4-si hücrelerin, pluripotentlik markörleri KLF4, NANOG, OCT4 ve SOX2 mRNA ekspresyonları.	56
Şekil - 32: MIA PaCa 2 hücre hattında Kontrol-si ve P4-si hücrelerin yumuşak agar koloni formasyon analizi.	57

Şekil - 33: MCF-7 hücre hattında Kontrol-si ve P4-si hücrelerin yumuşak agar koloni formasyon analizi.	58
Şekil - 34: PANC-1, MIA PaCa 2 ve MCF-7 hücre hatlarında, Kontrol-si ve P4-si hücrelerinden oluşturulan koloniler.	59
Şekil - 35: PANC-1 (A), MIA PaCa 2 (B) ve MCF-7 (C) hücre hatlarında, Kontrol-si ve P4-si hücrelerinden oluşturulan kolonilerin sayıları.	59
Şekil - 36: PANC-1 (A), MIA PaCa 2 (B) ve MCF-7 (C) hücre hatlarında, Kontrol-si ve P4-si hücrelerinden oluşturulan kolonilerin büyüklük dağılımları.	60
Şekil - 37: PANC-1 hücre hatlarında, Kontrol-si ve P4-si hücrelerinden oluşturulan kürelerin büyüklükleri.	62
Şekil - 38: MIA PaCa 2 hücre hatlarında, Kontrol-si ve P4-si hücrelerinden oluşturulan kürelerin büyüklükleri.	63
Şekil - 39 PANC-1 (A) ve MIA PaCa 2(B) hücre hatlarında, Kontrol-si ve P4-si hücrelerinden oluşturulan kürelerin sayıları.....	64
Şekil - 40: PANC-1 hücre hattında Kontrol-si ve P4-si gruplarında invazyon kabiliyetinin incelenmesi.	64

8.2. Tablolar Listesi

Tablo - 1: Kanser kök hücrelerinin izole edildikleri yerler ve izolasyon yöntemleriyle ilgili detaylar.	11
Tablo - 2: Adherent hücre kültüründe kullanılan malzemeler.	26
Tablo - 3: Yüzen hücre kültüründe kullanılan malzemeler.....	26
Tablo - 4: Transfeksiyon işleminde kullanılan siRNA'lar.	26
Tablo - 5: Western Blot analizlerinde kullanılan kimyasallar.	27
Tablo - 6: Western Blot analizinde kullanılan antikorlar.....	28
Tablo - 7: RT-qPCR'da kullanılan proplar.	28
Tablo - 8: Flow sitometri ölçümlerinde kullanılan antikorlar.....	29
Tablo - 9: F2,6BP ölçümünde kullanılan kimyasallar.	29
Tablo - 10: Çalışmalarda kullanılan cihazlar.	29

9. TEŞEKKÜR

Doktora süreci boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Saime GÜZEL'e,

Tez çalışmalarım süresince bilgi birikimiyle tezime önemli katkıda bulunan hocam Sayın Prof. Dr. Abdulah YALÇIN'a,

Doktora eğitimim boyunca üzerimde emeği geçen değerli hocalarım Prof. Dr. Meltem TANRIVERDİ, Prof. Dr. Ümit POLAT, Prof. Dr. Nazmiye GÜNEŞ ve Doç. Dr. Duygu UDUM'a,

Flow Cytometry analizleri için sağladığı imkanlardan dolayı Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmunoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ferah BUDAK'a ve yardımlarından dolayı Deniz GÜLKAYA'ya,

Doktoraya başladığımda laboratuvar çalışmalarına adaptasyon konusunda bana yardımcı olan Deniz KARAKÇI'ya ve Selahattin Can ÖZCAN'a,

Tez öneri döneminde yaptığım ön çalışmalara katkılarından dolayı Başak Duygu BALABAN'a ve Buse CEVATEMRE'ye,

Laboratuvar çalışmalarındaki yardımlarından dolayı başta Tuğba Hazal ALTUNOK, Aybike SARIOĞLU ve Aydan MUTLU olmak üzere Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki bütün çalışma arkadaşlarıma, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı'ndan Sabire PEKER'e ve Ece ÇERÇİ'ye,

1649B031903408 başvuru numaralı BİDEB 2211-C Yurt İçi Doktora Burs Programı ile doktora sürecimde finansal olarak destek gördüğüm Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK), DDP(V)-2018/5 numaralı araştırma projesini finanse eden Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (BUÜ-BAP) ve Moleküler Onkoloji alanı 100/2000 bursu için Yükseköğretim Kurulu'na (YÖK) teşekkür ederim.

10. ÖZGEÇMİŞ

İlköğretimi ve ortaöğretimi Bursa Emek İlköğretim Okulu'nda, lise öğrenimini Bursa Nilüfer Milli Piyango Anadolu Lisesi'nde tamamlamıştır. 2008 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde başladığı üniversite eğitimini 2014 yılında tamamlayarak Veteriner Hekim ünvanını almaya hak kazanmıştır. 2015 yılında Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora öğrencisi olarak eğitimine başlamıştır. Doktora süreci boyunca; 3001 programında 116Z570 nolu projede ve 2211/C programında 1649B031903408 no'lu projede bursiyer olarak TÜBİTAK tarafından, DDP(V)-2018/5 Nolu projede B.U.Ü. Bilimsel Araştırma Proje birimi tarafından ve Moleküler Onkoloji alanı 100/2000 bursu ile YÖK tarafından desteklenmiştir.

