



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

**Farklı Meme Kanseri Hücre Hatlarında *PFKFB1* Gen
Ekspresyonlarının Glukoz Metabolizmasındaki Rolünün
Araştırılması**

Yüksek Lisans Tezi

Emine Sena Doğan

Eylül 2024



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

Farklı Meme Kanseri Hücre Hatlarında *PFKFB1* Gen
Ekspresyonlarının Glukoz Metabolizmasındaki Rolünün
Araştırılması

Yüksek Lisans Tezi

Emine Sena Doğan

Danışman

Prof. Dr. Berna Tan

Eş Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Gülden Budak

Eylül 2024

TEZ JÜRİSİ ONAYI

Emine Sena Doğan tarafından hazırlanan "Farklı Meme Kanseri Hücre Hatlarında *PFKFB1* Gen Ekspresyonlarının Glukoz Metabolizmasındaki Rolünün Araştırılması" başlıklı bu Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Berna Tan
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Eş Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Gülden Budak
İstanbul Sağlık ve Teknoloji Üniversitesi

Üyeler:

Doç.Dr. Burcu Yücel
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Doç.Dr. Birsen Elibol Yücesoy
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Ebru Hacıosmanoğlu Aldođan
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Tez Savunma Tarihi: 19/09/2024

BEYANLAR

Yazım ve Kaynak Gösterme Kılavuzu Beyanı

Danışmanlığımda yazılan bu tezin APA yazım ve kaynak gösterme kılavuzunda belirtilen kurallara uygun olarak yapılandırıldığı ve bu kılavuzun APA kaynak gösterme standartlarının bu tezde tutarlı olarak uygulandığı tarafımdan incelenerek teyit edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Berna Tan

Etik İkelere Sadakat Beyanı

Hazırladığım bu tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

İmza

Emine Sena Doğan

ÖZET

Farklı Meme Kanseri Hücre Hatlarında *PFKFB1* Gen Ekspresyonlarının Glukoz Metabolizmasındaki Rolünün Araştırılması

Doğan, Emine Sena

Yüksek Lisans Tezi, Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Berna Tan

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gülden Budak

Eylül 2024

Meme kanseri dünya genelinde kadınları etkileyen en yaygın kanser türlerinden biridir. Meme kanseri de dahil olmak üzere tüm kanser türlerinde değişen metabolizma ayırt edici özellikler arasındadır. Meme kanserindeki metabolik değişiklikleri anlamak için kanser hücrelerinde en yaygın olarak kullanılan katabolit olan glukozun metabolize edilme yolları araştırılmaya devam edilmektedir. Kanser hücreleri metabolik ihtiyaçlarını karşılamak ve hayatta kalmak için oksijen varlığında bile aerobik glikolizi tercih etmekte, diğer yandan bazı kanser hücreleri ise özellikle belirli koşullar altında, ATP üretmek ve biyosentetik ihtiyaçları desteklemek için oksidatif fosforilasyon yapmaktadır. Bu çalışmada, aerobik glikoliz yolağında önemli bir hız sınırlayıcı enzim olan PFK-1'in aktivatörü olan F2,6BP'nin seviyesini düzenleyen *PFKFB1*'in ekspresyon seviyelerinin farklı meme kanseri hücre hatlarında araştırılması hedeflenmiştir. Aynı zamanda glikolizde ve OXPHOS'ta görev alan önemli genlerin ekspresyon seviyeleri tespit edilmiş olup glukozun az ve fazla olduğu ortamlarda hücrelerin proliferasyonu incelenmiştir. Bulgularımız, *PFKFB1*'in farklı moleküler alt tipteki meme hücre hatlarında düşük seviyelerde eksprese olduğunu göstermiştir. Düşük glukozlu ortamda yüksek glukozlu ortama göre yarı yarıya hücre canlılığı sergileyen hücre hattında *PKM2* geninin az eksprese olması bu durumla ilişkilendirilmiş olup, düşük glukozlu ortamda bile yüzde yüze yakın canlılık sergileyen hücre hattının ise enerji kaynağı olarak glukoz yerine glutamini tercih ettiği fikrini ortaya koymuştur ve düşük glukozda daha az hücre ölümü gerçekleşen hücre hatlarında ise literatürdeki bulunan çalışmalar doğrultusunda aktiflenmiş mitokondriyal aktiviteyle ilişkilendirilmiştir. Kanser hücrelerinin çevre koşullarına adapte olup metabolizma profillerini yeniden düzenleyebilmesini; glukozu ulaşılabilirliği, farklı besin kaynaklarını kullanabiliyor olması, glikoliz ile OXPHOS arasında geçiş yapabilmesi ve bu

yolaklarda sorumlu olan bir enzimin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler etkilemektedir.

Anahtar Kelimeler: Meme Kanseri, Kanser Metabolizması, Aerobik Glikoliz, OXPHOS, Glukoz, PFKFB1

ABSTRACT

Investigation Of The Role Of *PFKFB1* Gene Expression In Glucose Metabolism In Different Breast Cancer Cell Lines

Doğan, Emine Sena

Master's Thesis, Department of Molecular Medicine

Supervisors:

Prof. Dr. Berna Tan

Asst. Prof. Gülden Budak

September 2024

Breast cancer is one of the most common types of cancer affecting women worldwide. Deregulating cellular metabolism is a hallmark of all cancer types, including breast cancer. To understand the metabolic changes in breast cancer, the ways in which glucose, the most widely used catabolite in cancer cells, is metabolized continues to be investigated. Cancer cells prefer aerobic glycolysis even in the presence of oxygen to meet their metabolic needs and survive, whereas some cancer cells, especially under certain conditions, use oxidative phosphorylation to generate ATP and support biosynthetic needs. In this study, we aimed to investigate the expression levels of *PFKFB1*, which regulates the level of F2,6BP, an activator of PFK-1, an important rate-limiting enzyme in the aerobic glycolysis pathway, in different breast cancer cell lines. At the same time, the expression levels of important genes involved in glycolysis and OXPHOS were determined and the proliferation of cells was examined in glucose deficient and excessive environments. Our results showed that *PFKFB1* was expressed at low levels in breast cell lines of different molecular subtypes. In the cell line that exhibited half the cell viability in the low glucose environment compared to the high glucose environment, the low expression of the *PKM2* gene was associated with this situation. It was suggested that the cell line that exhibited almost one hundred percentage viability even in the low glucose environment preferred glutamine instead of glucose as an energy source. In the cell lines that experienced less cell death in low glucose, it was associated with activated mitochondrial activity according to the studies in the literature. The ability of cancer cells to adapt to environmental conditions and rearrange their metabolic profiles is affected by glucose accessibility, the ability to use different nutrient sources, the ability to switch between glycolysis and OXPHOS, and changes in the expression levels of an enzyme responsible for these pathways.

Keywords: Breast Cancer, Cancer Metabolism, Aerobic Glycolysis, OXPHOS, Glucose, PFKFB1

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım boyunca bilimsel ve akademik alanda; teorikte ve pratikte gelişmemi sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Berna TAN'a, eş danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Gülden BUDAK'a; sevgili hocam Doç. Dr. Burcu YÜCEL'e

Laboratuvarında çalışmaya başladığım günden beri bana her konuda yardımcı olan, aksiliklerde ve zorluklarda yol gösteren Tıbbi Biyokimya ABD. Arş. Gör. Dr. Saniye KOÇ ADA'ya

Deneylerimde benden yardımını esirgemeyen İpek BEDİR'e

Her düşüşümde bana kim olduğumu hatırlatan, bana hep inanan ve destek olan sevgili arkadaşlarım Ceren Aleyna KEÇECİ'ye, Eda Sultan DURSUN'a, İlknur Bahar YİĞİT'e ve Nisa ÇETİNKAYA'ya

Elini hep omzumda hissettiğim, İstanbul'a geldiğimden beri en büyük destekçim, sevgili abim Kudret DOĞAN'a

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, bana her türlü imkânı sunan sevgili babam Aydın DOĞAN'a, annem Selame DOĞAN'a, ablalarım Tevhide Beyza DOĞAN'a ve Elif Feyza DOĞAN'a ve başarılarımla ve azmimle her zaman örnek olmak isteyeceğim kardeşlerim Nursera DOĞAN'a ve Gül Esmâ DOĞAN'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	15
2. GENEL BİLGİLER	17
2.1.Kanser.....	17
2.1.1. Meme Kanseri	18
2.2. Glukoz Metabolizması	19
2.3. Kanser Hücre Metabolizması	22
2.3.1. Aerobik Glikoliz	22
2.3.2. Oksidatif Fosforilasyon	23
2.4. PFKFB1.....	23
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	25
3.1.Gereçler	25
3.1.1.Kimyasallar.....	25
3.1.2.Kitler	26
3.1.3.Cihazlar	26
3.1.4.Sarf Malzemeler	27
3.1.5.Solüsyonlar	27
3.1.5.1. Western Blotlama Solüsyonları	27
3.2.Yöntem	30
3.2.1.Hücre Kültürü	30
3.2.2.Hücre Sayımı.....	30
3.2.3. DeneYlerde Kullanılan Düşük Glukoz ve Yüksek Glukoz Besiyerlerinin Hazırlanışı	30
3.2.4. Hücre Canlılığının ATP Seviyesinin Ölçülmesi ile Belirlenmesi.....	31
3.2.5. Hücre Proliferasyonu.....	31
3.2.6.RNA İzolasyonu	31
3.2.7.cDNA Sentezi	32
3.2.8. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR)	32
3.2.9.Protein İzolasyonu.....	32
3.2.10.Western Blotlama.....	34

3.2.11. İstatiksel Hesaplamalar.....	34
4. BULGULAR	35
4.1. MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 Hücre Hatlarında <i>PFKFB1</i> Geninin Ekspresyonunun qRT-PCR ile Belirlenmesi	35
4.2. MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 Hücre Hatlarında <i>PFKFB1</i> Protein Sentezi	36
4.3. Düşük ve Yüksek Glukozlu Besiyerinde MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 Hücre Hatlarının Proliferasyonunun Belirlenmesi.....	36
4.4. MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 Hücre Hatlarında Glikolizde ve Oksidatif Fosforilasyonda Rol Alan Genlerin Ekspresyonlarının qRT-PCR ile Belirlenmesi.....	37
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	43
7. KAYNAKÇA	44

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATP	Adenozin trifosfat
cDNA	Tamamlayıcı DNA
DCIS	Duktal karsinoma in situ
DHAP	Dihidroksiaseton fosfat
DMEM	Dulbecco'nun modifiye edilmiş Eagle medyumu
DMSO	Dimetilsülfoksit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ER+	Östrojen Reseptörü Pozitif
F2,6BP	Fruktoz-2,6-bisfosfat
FADH ₂	Flavin adenin dinükleotit
FBS	Fetal bovin serum
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
HR+	Hormon Reseptörü Pozitif
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IBC	İnflamatuar meme kanseri
LCIS	Lobüler karsinoma in situ
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotit
NS	Non-significant
OXPHOS	Oksidatif Fosforilasyon
PEP	Fosfoenolpiruvat
PFK-1	Fosfofruktokinaz-1
PFKFB1	6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bifosfataz 1
PR+	Progesteron Reseptörü Pozitif
RNA	Ribonükleik Asit
TCA Döngüsü	Trikarboksilik Asit Döngüsü
TNBC	Üçlü-Negatif Meme Kanseri

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmada kullanılan Kimyasallar.....	22
Tablo 2. Çalışmada kullanılan Kitler	25
Tablo 3. Çalışmada kullanılan Cihazlar	26
Tablo 4. Çalışmada kullanılan Sarf Malzemeler	26
Tablo 5. %10 IGEPAL CA-630 (100 ml).....	27
Tablo 6. 0,5 M EDTA (100 ml, pH 8,0).....	27
Tablo 7. 0,5 M HEPES (500 ml, pH 7,4).....	27
Tablo 8. RIPA protein izolasyonu lizis solüsyonu (250 ml)	27
Tablo 9. 5x Protein yükleme boyası (22.5 ml, pH 6,8).....	28
Tablo 10. 10X SDS jel yürütme solüsyonu (1 L)	28
Tablo 11. 10X TBS-T yıkama solüsyonu (1 L, pH 7,6)	28
Tablo 12. Transfer tampon solüsyonu (1,5 L).....	29
Tablo 13. Bloklama & antikor dilüsyon solüsyonu (200 ml)	29
Tablo 14. Membran yeniden kazanım solüsyonu (50 ml)	29
Tablo 15. Çalışmada kullanılan Hücre Hatları	29
Tablo 16. Genomik DNA eliminasyon karışımı.....	31
Tablo 17. Ters transkripsiyon karışımı.....	31
Tablo 18. qRT-PCR primer listesi.....	32
Tablo 19. qRT-PCR için kullanılan kitin protokolü	33
Tablo 20. qRT-PCR Koşulları	33

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1.** Kanserin ayırt edici özellikleri (Hanahan, 2022)..... 18
- Şekil 2.** Meme kanseri için moleküler sınıflandırma şeması. PAM50 testi meme kanserlerini beş ayrı alt tipe ayırır: luminal A, luminal B, normal benzeri, bazal ve HER2 ile zenginleştirilmiş, ayrıca ayrı klodin-düşük alt tipi (Prat et al., 2010). Aynı zamanda, TNBC alt tipi dört ayrı alt tipe tanımlanmıştır: bazal benzeri 1 (BL1), bazal benzeri 2 (BL2), mezankimal (M) ve luminal androjen reseptörü (LAR). ER, östrojen reseptörü; HER2, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2; PAM50, mikrodizi 50'nin tahmin analizi; PR, progesteron reseptörü; TNBC, üçlü negatif meme kanseri (Turner et al., 2021) 19
- Şekil 3.** Glikoliz basamakları (Werner et al., 2016) 21
- Şekil 4.** TCA döngüsü ve oksidatif fosforilasyon şeması (Martínez-Reyes & Chandel, 2020) 21
- Şekil 5.** PFKFB1 tarafından PFK-1'in düzenlemesi. (Bartrons et al., 2018; Yi et al., 2019) 24
- Şekil 6.** MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 hücre hatlarında *PFKFB1* gen ekspresyonunun rölatif mRNA kat değişimleri. 35
- Şekil 7.** MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 hücre hatlarında PFKFB1 proteininin immüno blotlanması. Housekeeping protein olarak Beta-Aktin kullanıldı. 36
- Şekil 8.** MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 hücre hatlarının düşük glukozlu (5 Mm) ve yüksek glukozlu (25 Mm) besiyerinde hücre canlılığı grafiği. (Data mean±SEM olarak sunuldu, * p<0.05, *** p<0.001) 37
- Şekil 9.** MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 hücre hatlarının düşük glukozlu (5 Mm) ve yüksek glukozlu (25 Mm) besiyerinde çoğalma grafiği. (Data mean±SEM olarak sunuldu, * p<0.05, *** p<0.001). 37
- Şekil 10.** MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 hücrelerinde glikolizde rol alan *HK1*, *HK2*, *PKM2*, *PFKL* ve *PFKP* gen ekspresyonlarının belirlenmesi (Data mean±SEM olarak sunuldu, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001). 38
- Şekil 11.** MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 hücrelerinde oksidatif fosforilasyonda rol alan *SDHD*, *COX7B*, *ATP5A1*, *NDUFB8* ve *UQCRB* gen ekspresyonlarının belirlenmesi (Data mean±SEM olarak sunuldu, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001) 38

1. GİRİŞ

Meme kanseri, meme dokusundaki hücrelerin düzensiz büyümesi ve proliferasyonu sonucu meydana gelen, insidans oranı dünya genelinde artmaya devam eden bir kanser türüdür (Richie & Swanson, 2003). Meme kanseri, her biri farklı biyolojik ve klinik özelliklere sahip çeşitli alt tipleri olan heterojen bir hastalıktır. Meme tümörlerinin alt sınıflandırılmaları, hücresel farklılaşma derecesi, histolojik ve biyolojik özellikleri ve belirli reseptörlerin ekspresyonuna göre belirlenmektedir. Hormon Reseptörü ve HER2 durumuna göre bakıldığında; Hormon Reseptörü Pozitif (HR+) grubundan olan Östrojen Reseptörü Pozitif (ER+) ve Progesteron reseptör pozitif (PR+) tümör büyümesini destekleyen östrojen/progesteron reseptörlerine sahip kanser hücrelerini ifade etmektedir. HER2-Pozitif (HER2+), hücre büyümesini destekleyen bir protein olan insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2'yi (HER2) aşırı eksprese eden kanser hücreleri ifade ederken; Üçlü-Negatif Meme Kanseri (TNBC) ise östrojen reseptörlerinden, progesteron reseptörlerinden yoksun, HER2'yi aşırı eksprese etmeyen kanser hücrelerini ifade etmektedir (Makki, 2015).

Kanser metabolizması, kanser hücrelerinin hızlı büyümelerini, hayatta kalmalarını ve çoğalmalarını desteklemek için metabolik süreçlerini değiştirdikleri ayırt edici yolları ifade eder. Normal hücrelerin aksine, kanser hücreleri genellikle Warburg etkisi göstererek oksijen varlığında bile oksidatif fosforilasyon yerine aerobik glikolizi tercih eder. Bununla birlikte, birçok kanser hücresi, özellikle belirli koşullar altında, ATP üretmek ve biyosentetik ihtiyaçları desteklemek için oksidatif fosforilasyon yapar. Bu metabolik yeniden programlama, glukoz alımının ve laktat üretiminin artmasına neden olarak hem enerji hem de biyosentez için yapı taşları sağlar. Ayrıca kanser hücreleri, artan taleplerini karşılamak için glutaminoliz ve lipid metabolizması gibi diğer metabolik yolları da değiştirir (Pavlova & Thompson, 2016).

Glikolizinin düzenlenmesinde rol oynayan PFKFB1 enzimi hem kinaz hem de fosfataz aktivitelere sahiptir (Cosin-Roger et al., 2013). Glikolizin temel düzenleyici enzimi olan fosfofruktokinaz-1'in (PFK-1) güçlü bir aktivatörü olan fruktoz-2,6-bisfosfatın (F2,6BP) sentezini ve yıkımını katalize eder. PFKFB1'in kinaz alanı, F2,6BP üretmek için fruktoz-6-fosfatı fosforile ederken, fosfataz alanı F2,6BP'yi fruktoz-6-fosfata geri hidrolize eder ve böylece hücrel enerji ihtiyaçlarına ve metabolik durumlara yanıt olarak glikoliz hassas bir şekilde ayarlanabilir (Bartrons et al., 2018). Kanser hücreleri metabolik strese uyum sağlayabilirler. Bu esneklik, kanserdeki metabolik yolların daha derinlemesine anlaşılmasına duyulan ihtiyacı vurgulamaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı glikolizin önemli bir kontrol basamağı olan PFK-1 enziminin aktivitesini kontrol eden F2,6BP'nin seviyesini düzenleyen PFKFB1 enziminin MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 kanser hücre hatlarındaki mRNA ekspresyon seviyelerini kantitatif gerçek zamanlı ters transkripsiyon

polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile ve PFKFB1 protein sentezini ise immüno blotlanma ile belirleyerek glikoliz yolağındaki etkisini/fonksiyonunu incelemektir. Proteinimizin varlığının etkisinin hücre proliferasyonuna yansımalarına bakmak için, düşük ve yüksek glukozlu besiyerinde MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 kanser hücre hatlarının sağkalımı; CellTiter Glo assay ve hücre sayımı ile tespit edilmiştir. Bilinmektedir ki kanser hücreleri oksijen varlığında bile oksidatif fosforilasyona göre daha az enerji üreten ve glukozu daha hızlı parçalayan glikolizi tercih etmektedir. Bu bilgi doğrultusunda *PFKFB1* geninin yanında, glikoliz yolağında görev alan *HK1*, *HK2*, *PKM2*, *PFKP*, *PFKL* genlerinin ve oksidatif fosforilasyonda görev alan *NDUFB8*, *UQCRB*, *SDHD*, *COX7B*, *ATP5A1* genlerinin bu kanser hücre hatlarındaki mRNA seviyelerinin qRT-PCR ile belirlenip glikoliz ve oksidatif fosforilasyonun bu hücre hatlarında devam edilebilirliği gözlenmek istenmiştir.

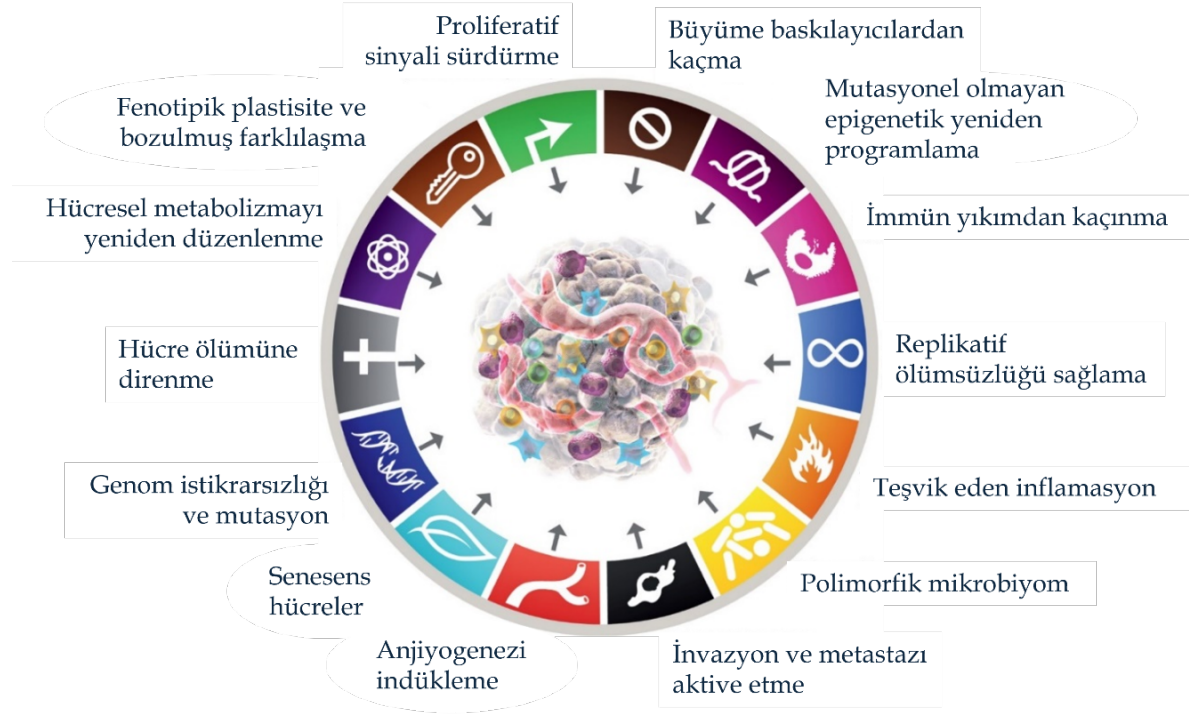
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, vücuttaki anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılması ile karakterize heterojen bir hastalık grubudur (Knudson, 2002) ve akciğer, kolon, meme, deri, kemik veya sinir dokusu gibi hemen hemen her organ veya dokuda gelişebilir. 100'den fazla farklı kanser türü vardır ve her biri başlangıçta etkilenen hücre türüne göre sınıflandırılır (Piña-Sánchez et al., 2021). Nisan 2024'te Dünya Sağlık Örgütü/Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC), Cancer Journal for Clinicians'da 2022 küresel kanser istatistiklerini yayınladı ve bu rapora göre dünya genelinde 2022 yılında 19,96 milyon yeni kanser vakası ve 9,74 milyon kanser ölümü olduğu tahmin edilmektedir ve akciğer kanseri 2022 yılında en sık teşhis edilen kanser olurken, bunu kadın meme kanseri takip etmiştir (Bray Bsc et al., 2024)

Moleküler açıdan baktığımızda, normal hücrelerin kötü huylu hücrelere dönüşümünü sağlayan genetik ve hücresel seviyelerdeki karmaşık ve çok yönlü değişiklikler kanser oluşumuna neden olmaktadır. Bu dönüşüm, hücre büyümesini, bölünmesini ve ölümünü kontrol eden normal düzenleyici mekanizmaları bozan genetik mutasyonların ve epigenetik değişikliklerin bir sonucudur. Onkogen oluşumu, kromozomal translokasyon, nokta mutasyonu, delesyon, amplifikasyon ve insersiyon aktivasyonu kanser gelişiminde rol oynayan temel moleküler süreçler ve mekanizmalardır (Knudson, 2002; Ponder, 2001).

Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran mekanizmaların kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlamak ve tümörlerin gelişimi ve ilerlemesi sırasında kanser hücreleri tarafından edinilen temel özellikleri ve yetenekleri tanımlamak için 2000 yılında Douglas Hanahan ve Robert Weinberg tarafından "Kanserin ayırt edici özellikleri" kavramı tanıtılmıştır (Hanahan & Weinberg, 2000) ve 2011 (Hanahan & Weinberg, 2011) ve son olarak 2022 yılında (Hanahan, 2022) bu kavram genişletilmiştir. Bu ayırt edici özellikleri, proliferatif sinyali sürdürme, büyüme baskılayıcılardan kaçma, hücre ölümüne direnme, replikatif ölümsüzlüğü sağlama, immün yıkımdan kaçınma, hücre metabolizmayı yeniden düzenlenme, anjiyogenezi indüklemeye ve invazyon ve metastazı aktive etmeyle birlikte bu özelliklerin edinilmesini hızlandıran genetik çeşitliliği oluşturan genom istikrarsızlığı ve teşvik eden inflamasyon oluşturmaktadır (Hanahan & Weinberg, 2011). Son olarak ise fenotipik plastisite ve bozulmuş farklılaşma, mutasyonel olmayan epigenetik yeniden programlama, polimorfik mikrobiyom ve senesens hücreler eklenmiştir (Hanahan, 2022).



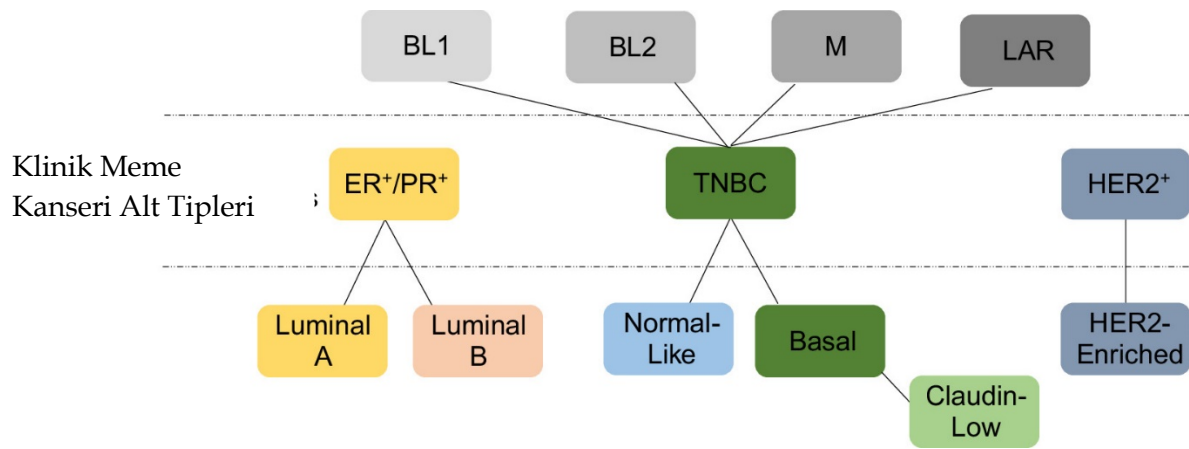
Şekil 1. Kanserin ayırt edici özellikleri (Hanahan, 2022)

2.1.1. Meme Kanseri

Meme kanseri, meme dokusundaki hücrelerin düzensiz büyümesi ve proliferasyonu sonucu meydana gelen, kadınlar arasında insidans oranı dünya genelinde artmaya devam eden bir kanser türüdür (Arnold et al., 2022). Meme, lobüller (süt üreten bezler), kanallar (sütü meme ucuna taşıyan tüpler) ve bağ dokusundan oluşur ve çoğu meme kanseri kanallarda (duktal karsinomlar) veya lobüllerde (lobüler karsinomlar) başlar (Makki, 2015).

Meme kanserinin her biri kendine özgü özelliklere sahip, çeşitli alt tipleri vardır (Şekil 2.). Ana alt tipler, östrojen ve progesteron hormonları tarafından yönlendirilen hormon reseptörü pozitif (HR+) meme kanserini içerir. Bu tür östrojen reseptörü pozitif (ER+) ve progesteron reseptörü pozitif (PR+) olarak ikiye ayrılır. Diğer bir alt tip ise HER2-pozitif meme kanseridir ve kanser hücresi büyümesini destekleyen HER2 proteininin aşırı ekspresyonu ile karakterize edilir. Üçlü negatif meme kanseri (TNBC) ise, östrojen reseptörleri, progesteron reseptörleri ve HER2 proteinini içermeyen daha agresif bir alt tiptir. İnflamatuvar meme kanseri (IBC), kanser hücrelerinin meme derisindeki lenf damarlarını tıkayarak kızarıklık ve şişmeye neden olduğu nadir ve agresif bir formdur. İnvaziv olmayan meme kanseri formları arasında duktal karsinoma in situ (DCIS) ve lobüler karsinoma in situ (LCIS) bulunur. DCIS kanallarla sınırlıdır ve çevre dokuya yayılmamıştır, LCIS ise lobüllerde bulunur ve invaziv kanser gelişme riskinin daha yüksek olduğunu gösterir. Evre IV meme kanseri olarak da bilinen metastatik meme kanseri, kanserin memenin ötesinde kemikler, karaciğer, akciğerler veya beyin gibi vücudun diğer bölgelerine yayıldığında ortaya çıkar.

Meme kanseri ayrıca Luminal A, Luminal B, HER2 ile zenginleştirilmiş ve Bazal benzeri alt tipler dahil olmak üzere gen ekspresyon profillerine dayalı moleküler alt tipler halinde sınıflandırılabilir (Johnson et al., 2021; Orrantia-Borunda et al., 2022; Prat et al., 2015; Richie & Swanson, 2003; Turner et al., 2021). Meme kanserinde tümörleri moleküler alt tiplere sınıflandırmak için kullanılan bir gen ifadesi profillemesi testi olan PAM50, kanseri alt tipten birine kategorize etmek için bir meme kanseri tümör örneğindeki 50 genin ifade seviyelerini inceler. Bu teste göre moleküler alt sınıflandırma (Şekil 2); Luminal A, Luminal B, HER2 ile zenginleştirilmiş, Bazal benzeri ve Normal benzeri şeklindedir (Dank et al., 2023; Pu et al., 2020; Wallden et al., 2015).



Şekil 2. Meme kanseri için moleküler sınıflandırma şeması. PAM50 testi meme kanserlerini beş ayrı alt tipe ayırır: luminal A, luminal B, normal benzeri, bazal ve HER2 ile zenginleştirilmiş, ayrıca ayrı klodin-düşük alt tipi (Prat et al., 2010). Aynı zamanda, TNBC alt tipi dört ayrı alt tipe tanımlanmıştır: bazal benzeri 1 (BL1), bazal benzeri 2 (BL2), mezankimal (M) ve luminal androjen reseptörü (LAR). ER, östrojen reseptörü; HER2, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2; PAM50, mikrodizi 50'nin tahmin analizi; PR, progesteron reseptörü; TNBC, üçlü negatif meme kanseri. (Turner et al., 2021)

2.2. Glukoz Metabolizması

Glukoz metabolizması, hücresel işlevler için enerji üretmek üzere glukozun parçalanmasını ve kullanılmasını içeren glikoliz, glukoneogenez, glikojenoliz ve glikojenez dahil olmak üzere birden fazla mekanizmayı kapsayan kritik bir biyolojik süreçtir. Glukoz metabolizması glikolizle başlar. Altı karbonlu glukoz molekülü, sitozolde üç karbonlu iki pirüvat molekülüne parçalanır. Bu süreç, ATP (adenozin trifosfat) ve NADH (nikotinamid adenin dinükleotit) şeklinde az miktarda enerji üretir (Chaudhry & Varacallo, 2018).

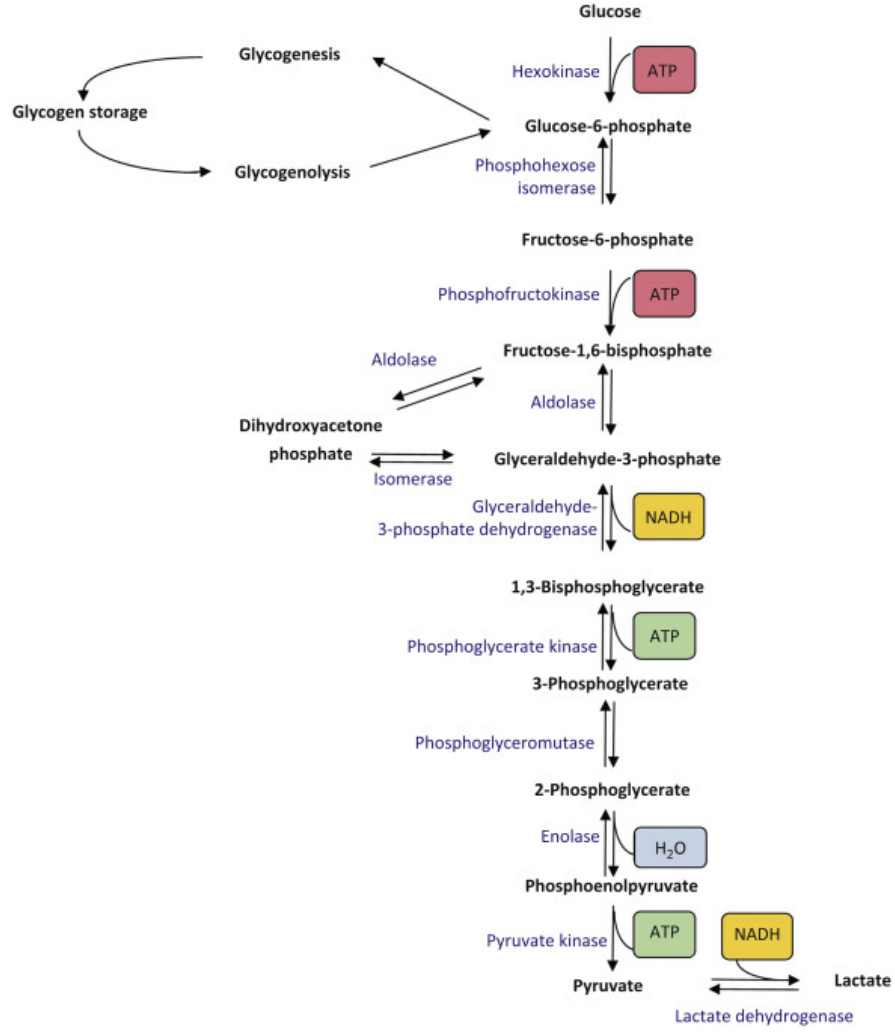
Glukoz ilk önce heksokinaz tarafından ATP ve bir fosfat grubu kullanılarak glukoz-6-fosfata dönüştürülür. Glukoz 6-fosfat daha sonra fosfoglukoz izomeraz tarafından fruktoz-6-fosfata dönüştürülür. Fosfofruktoz kinaz daha sonra başka

bir ATP molekülü kullanarak fruktoz-1,6-bisfosfat üretir. Daha sonra fruktoz-1,6-bisfosfattan; dihidroksiaseton fosfat (DHAP) ve gliseraldehit 3-fosfat, fruktoz bisfosfat aldolaz tarafından oluşturulur. DHAP, izomeraz tarafından gliseraldehit-3-fosfata dönüştürülür ve iki gliseraldehit-3-fosfat molekülü oluşmuş olarak süreç devam eder. Gliseraldehit-3-fosfat, ekzergonik bir reaksiyonda 1,3-bisfosfogliserata oksitlenir ve bir NAD⁺ molekülünü NADH ve H⁺'ya indirger. 1,3-bisfosfogliserat daha sonra fosfogliserat kinazın yardımıyla, glikolizden ilk ATP molekülünün üretimi ile 3-fosfogliserata dönüşür. 3-fosfogliserat daha sonra fosfogliserat mutazın yardımıyla 2-fosfogliserata dönüşür. Bir H₂O molekülünün salınmasıyla enolaz, 2-fosfogliserattan fosfoenolpiruvat (PEP) oluşumunu sağlar. PEP'in kararsız durumu nedeniyle, pirüvat kinaz glikolizde ikinci ATP'yi oluşturmak için bir fosfat grubunun kaybını kolaylaştırır. Böylece, PEP daha sonra pirüvata dönüşür (Şekil 3.) (Chandel, 2021).

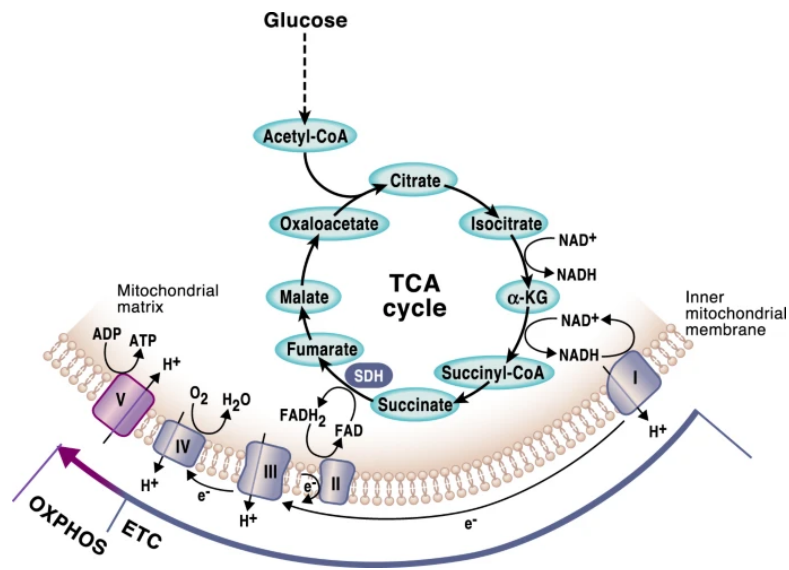
Oksijen yokluğunda (anaerobik koşullar) veya kırmızı kan hücreleri (eritrositler) gibi mitokondrisi olmayan hücrelerde ATP üretilen tek yol anaerobik glikolizdir. Bu durumlarda pirüvat, sitoplazmada laktat dehidrogenaz A (LDH-A) tarafından laktata indirgenir ve daha sonra laktat, monokarboksilat taşıyıcıları (MCT'ler) aracılığıyla hücre dışı boşluğa atılır (Chandel, 2021; Chaudhry & Varacallo, 2018).

Oksijen varlığında glikoliz, ATP üretmek için mitokondri içinde bulunan TCA döngüsüne (sitrik asit döngüsü veya Krebs döngüsü olarak da adlandırılır) giren pirüvat üretir. Pirüvat, sitrik asit döngüsünde önemli bir ara madde olan asetil-CoA'ya dönüştürülür. Asetil-CoA daha fazla oksitlenir ve ek ATP, NADH ve FADH₂ (flavin adenin dinükleotit) üretimine yol açar (Alabduladhem & Bordoni, 2022; Fernie et al., 2004). Bu yüksek enerjili moleküller daha sonra iç mitokondriyal zarda bulunan bir dizi protein kompleksi olan elektron taşıma zincirine girer. Burada, NADH ve FADH₂'den gelen enerji, oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) yoluyla büyük miktarda ATP üretimini yönlendirmek için kullanılır (Şekil 4) (Smeitink et al., 2001).

Glukoneogenez, karaciğerde karbonhidrat dışı kaynaklardan (laktat, gliserol ve glukojenik aminoasitler) glukoz sentezini içeren bir diğer glukoz metabolizması sürecidir. Bu süreç, uzun süreli açlık veya yoğun egzersiz sırasında kan glukoz seviyelerini korumak için önemlidir. İnsülin ve glukagon, glukoz metabolizmasını düzenleyen temel hormonlardır; insülin, glukoz alımını ve depolanmasını teşvik ederken; glukagon, karaciğerden glukoz salınımını uyarır (EA et al., 2019; Hatting et al., 2018). Uzun açlık periyotlarında pankreas ise glikojenolizi başlatan glukagon salgılar. Glikojenolizde, glukozun depolanmış hali olan glikojen, glukoz olarak salınır. Glikojen sentezleme süreci ise glikojenez olarak adlandırılır ve karaciğerde aşırı karbonhidrat bulunduğu meydana gelir (Paredes-Flores et al., 2024). Tüm bu süreçler, glukoz metabolizmasının enerji homeostazını korumak ve çeşitli hücrel aktivite için desteklemek için gereklidir.



Şekil 3. Glikoliz basamakları (Werner et al., 2016)



Şekil 4. TCA döngüsü ve oksidatif fosforilasyon şeması (Martínez-Reyes & Chandel, 2020).

2.3. Kanser Hücre Metabolizması

Normal hücrelere göre kanser hücrelerinde metabolik faaliyetler değişiklik göstererek malign özelliklerin kazanılmasını ve sürdürülmesini desteklemektedir. Bazı değişmiş metabolik özellikler birçok kanser hücresi türünde genel olarak gözlemlendiğinden, yeniden programlanmış metabolizma kanserin ayırt edici özelliği olarak kabul edilir (Pavlova & Thompson, 2016). Değiştirilmiş metabolik aktivite, besin açısından zengin koşullarda anabolik büyümeyi, besin kısıtlaması sırasında hücrenin hayatta kalmasını desteklemek için katabolizmayı ve onkogen aktivasyonu, tümör baskılayıcı kaybı ve diğer streslerin metabolik etkilerine karşı koymak için redüksiyon-oksidasyon (redoks) homeostatik sistemlerinin güçlendirilmesini sağlar (Boroughs & Deberardinis, 2015).

Kanser hücrelerinin katabolitlere olan yüksek ihtiyacı, ATP üretmek, redoks dengesini korumak ve biyokütle üretmek içindir. Hücreler, ATP üretmek için en yaygın olarak bulunan katabolit olan glukozu kullanır. Glukoz, sitoplazmada glikoliz yoluyla laktata dönüşür veya glikolizin ilk adımlarından sonra pirüvat, TCA döngüsü ve mitokondride OXPHOS yoluyla daha fazla metabolize edilir (Martinez-Outschoorn et al., 2016). Normal koşullarda, hücre metabolizmasının tükettiği enerjinin %70'i OXPHOS tarafından sağlanır. Ancak hipoksi durumunda, glikoliz OXPHOS'un zayıflamış işlevini telafi etmek için artar. Bu nedenle, glikoliz ve OXPHOS hücresel enerji dengesini korumak için iş birliği yapar (Cairns et al., 2011). Aslında normal farklılaşmış hücreler enerjiyi esas olarak mitokondriyal oksidatif fosforilasyonla üretirken, kanser hücreleri ATP üretmek için daha az verimli bir süreç olan ancak ATP'ye ek olarak nükleotidler, amino asitler ve lipitlerin üretilmesine izin veren ve böylece hücreyi bölünmeye hazırlayan aerobik glikolizi tercih eder (Gatenby & Gillies, 2004).

2.3.1. Aerobik Glikoliz

1931 Nobel Tıp ve Fizioloji Ödülü'nü kazanan Otto Warburg (Koppenol et al., 2011), normal dokularla karşılaştırıldığında, kanser dokularının in vitro oksijen varlığında bile laktat üretmek için bol miktarda glukoz kullandığını gözlemlemiştir ve adını bu bilim insanından alan Warburg Etkisi ya da aerobik glikoliz terimi ortaya çıkmıştır (Martínez-Reyes & Chandel, 2021). Glikoliz tarafından üretilen pirüvat, oksijen varlığında bile TCA döngüsüne girmek yerine büyük ölçüde laktata dönüştürülür. Bu laktat üretimi indirgen eşdeğerlerin dengelenmesine yardımcı olur ve kanser hücrelerinin glikolize devam etmesini sağlar. Warburg etkisi devam ederken, üretilen ATP'nin yanında laktat ise tümör invazyonu, metastaz, anjiyogenez, immünosupresif hücreleri ve molekülleri indüklemek gibi immünosupresif işlevlere de sahiptir, böylece tümör gelişimini ve kaçışını teşvik eder (Brown & Ganapathy, 2020; Hayes et al., 2021; Z. Li et al., 2023).

Glukoz başına aerobik glikoliz, oksidatif fosforilasyonla elde edilen miktara kıyasla ATP üretmenin verimsiz bir yoludur. Bununla birlikte, aerobik glikoliz yoluyla glukoz metabolizması hızı daha yüksektir, öyle ki glukozdan laktat

üretimi, mitokondride glukozun tamamen oksidasyonundan 10-100 kat daha hızlı gerçekleşmektedir (Liberti & Locasale, 2016). Tümör mikro ortamları sınırlı glukoz varlığına sahiptir ve tümör hücreleri, stromal hücreler ve immün kompartman ile besinler için rekabete girer. Warburg etkisinin nedeni tam olarak bilinmemektedir ancak ATP üretim hızı daha yüksek ancak verimi daha düşük olan hücrelerin, paylaşılan ve sınırlı enerji kaynakları için rekabet ederken seçici bir avantaj elde edebileceği hipotezi bir neden olabilir (Slavov et al., 2014). Yapılan bir çalışmada ise, kanser hücrelerinde ATP'ye bağımlı membran pompalar değiştirilerek ATP talebi büyük ölçüde artırılmıştır ve bu durumda aerobik glikolizin hızla arttığını ve oksidatif fosforilasyonun sabit kaldığını gösterilmiştir (Epstein et al., 2014).

2.3.2. Oksidatif Fosforilasyon

Normal hücrelerde metabolik aktivitelerde tüketilen enerji, esas olarak glikolizden daha verimli olan ve daha fazla adenozin trifosfat (ATP) üreten mitokondriyal oksidatif fosforilasyondan (OXPHOS) sağlanır (Smeitink et al., 2001). Glikolizin son ürünü olan pirüvat, OXPHOS için bir yakıttır. Aerobik koşullar altında pirüvat, oksaloasetat ile birleşerek trikarboksilik asit (TCA) döngüsünü ve 36 ATP üretebilen OXPHOS'u başlatan asetil CoA'ya oksitlenmek üzere mitokondriye girer (Solaini et al., 2011). OXPHOS, elektronları transfer eden ve adenozin trifosfat (ATP) sentezini yönlendirmek için bir elektrokimyasal proton gradyanı oluşturan beş çok proteinli kompleksten (kompleks I-V) oluşur. Elektronlar, kompleks I veya II aracılığıyla NADH veya süksinattan ubikinona (Q) transfer edilir; ardından, elektronlar bir proton gradyanı oluşturmak için kompleks III'te QH₂'den çıkarılır. Kompleks IV'te, elektronlar terminal elektron alıcısı oksijene (O₂) transfer edilir. Kompleks I, III ve IV tarafından zarlar arası boşluğa pompalanan tüm protonlar, ATP sentaz (kompleks V) tarafından ATP üretimini kolaylaştıran bir proton gradyanı oluşturur (Şekil 4) (Xu et al., 2020).

Kanser hücrelerinde oksijen varlığında bile bir önceki başlıkta bahsedilen Warburg etkisi olarak bilinen aerobik glikolize yatkınlığı, hızlı enerji üretimine olanak tanınması ve çoğalan hücrelerin biyosentetik taleplerini desteklemesi için tercih edilen bir yol olarak kabul edilmiştir (Liberti & Locasale, 2016). Ancak, son çalışmalar OXPHOS'un lösemiler, lenfomalar, pankreas duktal adenokarsinomu, melanom ve endometriyal karsinom dahil olmak üzere belirli kanserlerde upregüle olduğu ve bunun aktif glikoliz durumunda bile meydana gelebileceğini göstermiştir (Fantin et al., 2006; Suganuma et al., 2010; Zu & Guppy, 2004). Enerji üretimini ve hayatta kalmayı optimize etmek için glikoliz ve OXPHOS arasında geçiş yapabilmek tümör hücrelerinin değişen mikroçevre koşullarına uyum sağlamasını, terapötik müdahalelere direnmesini ve kanser ilerlemesine ve metastazına katkıda bulunmasını sağlar (Cadassou & Jordheim, 2023).

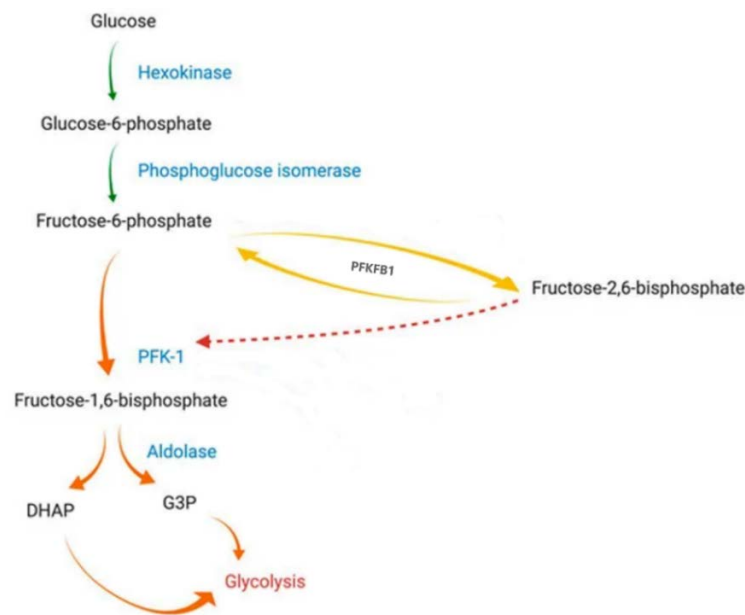
2.4. PFKFB1

Fosfofruktokinaz (PFK-1), glikolitik yol üzerinden glukoz akışını kontrol eden temel düzenleyici enzimdir. Fruktoz-2,6-bisfosfat (F-2,6-BP), PFK-1'in en güçlü

allosterik aktivatördür (Cosin-Roger et al., 2013). F2,6BP seviyelerinin kontrolünde rol oynayan iki işlevli enzim olan 6-fosfofrukto-2-kinaz/fruktoz-2,6-bisfosfataz (6PFK2/FBP2) en az altı farklı izoformu tanımlanmıştır ve *PFKFB1*, *PFKFB2*, *PFKFB3*, *PFKFB4* tarafından kodlanmaktadır (Okar et al., 2001).

PFKFB1 (6-Fosfofrukto-2-Kinaz 1/Fruktoz-2,6-Bisfosfataz 1) proteini, glikolizin bir düzenleyicisi olan fruktoz-2,6-bisfosfat (F2,6BP) seviyelerinin kontrolünde rol oynayan iki işlevli bir enzimdir. PFKFB1 enziminin iki farklı aktivitesi vardır: fruktoz-6-fosfat ve ATP'den F2,6BP sentezleyen bir kinaz aktivitesi ve F2,6BP'yi fruktoz-6-fosfat ve inorganik fosfata parçalayan bir bifosfataz aktivitesi. Bu iki aktivite arasındaki denge glikoliz ve glukoneogenezin düzenlenmesi için önemlidir, çünkü F2,6BP glikolizdeki anahtar enzim olan fosfofruktokinaz-1'i (PFK-1) aktive eder (Ros & Schulze, 2013). PFK-1, glikolizde kritik bir adımı katalize eder ve bu da onu glukoz metabolizmasının hızını kontrol eden en önemli enzimlerden biri yapar. PFK-1, Fru-6-P ve ATP'nin fruktoz 1,6-bisfosfat ve ADP'ye dönüşümünü katalize eder. Dolayısıyla artan Fru-2,6-P2 seviyeleri, PFK-1 aktive ederek hücrelerin yüksek bir glikolitik akıyı sürdürmesine izin verebilmektedir (Okar et al., 2001).

F2,6BP, PFK-1'in substratı olan fruktoz-6-fosfata olan afinitesini artıran ve böylece glikolizi teşvik eden güçlü bir aktivatör olmasıyla beraber, AMP ve ADP'nin varlığı da hücredeki düşük enerji seviyelerini göstererek glikolizi ve ATP üretimini artırmak için PFK-1'i aktive eder. ATP ve sitrat ise hücrenin yeterli enerjiye ve metabolik ara maddelere sahip olduğunu işaret ederek PFK-1'i inhibe eder (Mor et al., 2011) .



Şekil 5. PFKFB1 tarafından PFK-1'in düzenlenmesi. (Bartrons et al., 2018; Yi et al., 2019)

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. GEREÇLER

3.1.1. Kimyasallar

Tablo 1. Çalışmada kullanılan Kimyasallar

ÜRÜN	MARKA
İzopropanol (C ₃ H ₈ O)	Merck
Etanol (C ₂ H ₅ O)	Merck
Metanol	Merck
Fetal Bovin Serum	Gibco
Penisilin/Streptomisin	Gibco
DMSO	BioShop
Tris Baz	Roche
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Fisher Bioreagents
Sodyum Klorür (NaCl)	Merck
Tris	Roche
Tween 20	Sigma
Süt Tozu (yağsız)	Enka
CAPS	Sigma
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck
Gliserol	Fisher Bioreagents
2-merkaptoetanol	Sigma
Tris-HCl	Sigma
Bromfenol Mavisi	Sigma
RT ² SYBR Green ROX Fast Mastermix	Qiagen
Hidroklorik asit (HCl)	Merck
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Sigma
HEPES	Sigma
SureCast APS	Invitrogen
SureCast Stacking Buffer	Invitrogen
SureCast Resolving Buffer	Invitrogen
SureCast Acrylamide Solution (%40)	Invitrogen
SureCast TEMED	Invitrogen
cOmplete, Mini, EDTA-free Proteaz Inhibitor Cocktail	Roche
Anti-PFKFB1 Antibody, rabbit (ab155564)	Abcam
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (7074S)	Cell Signaling
Antikor Beta Aktin (8H10D10), mouse	Cell Signaling
Antikor Anti-Mouse	Cell Signaling
319-062 CL - DMEM 1X with Sodium Bicarbonate & Phenol Red w/o Glucose, Sodium Pyruvate and L-Glutamine 500ml	Wisent Inc.

3.1.2. Kitler

Tablo 2. Çalışmada kullanılan Kitler

ÜRÜN	MARKA
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen
RT2 First Strand Kit (50)	Qiagen
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
CellTiter GLO Luminescent Reagent	Promega

3.1.3. Cihazlar

Tablo 3. Çalışmada kullanılan Cihazlar

CİHAZ	MARKA
Distile Su cihazı	Millipore Elix
Nanodrop	Denovix DS-11
Thermal Cycler	BioRad
Real-Time PCR cihazı	Qiagen Rotor Q
Kar-Buz makinesi	Brema
Laminer FLOW Kabin Class II	Thermo Scientific
Etüv	Memmert
Santrifüj Allegra X-15R	Beckman Coulter
Santrifüj MicroCL21R	Thermo Scientific
Derin dondurucu -86°	Thermo Scientific
No frost Buzdolabı (+4, -20)	Beko
Tartı	SHIMADZU
Vortex	WiseMix
Otoklav	VWR
Su banyosu	VWR
pH metre	Thermo Scientific
PipetAid	Eppendorf
Elektroforez Güç Kaynağı	Biorad
Poşet Kapatıcı (Sealer)	Brother
Jel Görüntüleme Sistemi	Azure Biosystems

3.1.4. Sarf Malzemeler

Tablo 4. Çalışmada kullanılan Sarf Malzemeler

MALZEME	MARKA
Serolojik Pipetler (5, 10, 25 ml)	SPL Life sciences
Falkon Tüpleri (15, 50 ml)	SPL Life sciences
Hücre Kültür Flaskları (T25)	SPL Life sciences
Well Plate (6)	SPL Life sciences

Mikropipet Uçları (10, 200, 1000µl)	Axygen
Mikro Santrifüj Tüpleri (1,5 ml)	Axygen
Pudrasız Eldiven (S)	Dolphin
Solüsyon Rezervuarı (50 ml)	Isolab
Kriyojenik tüp (2ml)	Corning
Nitroselüloz Membran- 0.45	Millipore
Whatmann Kağıtları	BioRad

3.1.5. Solüsyonlar

3.1.5.1 Western Blotlama Solüsyonları

Tablo 5. %10 IGEPAL CA-630 (100 ml)

Kimyasal	Miktar	Final Konsantrasyon
IGEPAL CA-630	10 ml	%10

10 ml IGEPAL CA-630 80 ml dH₂O içerisinde, 42°C su banyosunda çözüldü ve son hacim 100 ml'e dH₂O ile tamamlandı (Tablo 5). Solüsyon oda sıcaklığında saklandı. Disodyum EDTA 70 ml dH₂O'da 4 saat çalkalanarak çözüldü. Solüsyonun pH'ı 8,0'a ayarlandı ve son hacim distile su ile 100 ml'e tamamlandı (Tablo 7).

Tablo 6. 0,5 M EDTA (100 ml, pH 8,0)

Kimyasal	Miktar	Final Konsantrasyon
EDTA.2Na.2H ₂ O	18,612 g	0,5 M

Disodyum EDTA 70 ml dH₂O'da 4 saat çalkalanarak çözüldü. Solüsyonun pH'ı 8,0'a ayarlandı ve son hacim distile su ile 100 ml'e tamamlandı (Tablo 6).

Tablo 7. 0,5 M HEPES (500 ml, pH 7,4)

Kimyasal	Miktar	Final Konsantrasyon
HEPES	59,575 g	0,5 M

400 ml dH₂O içerisine tablo 7'de belirtilen miktarda HEPES eklendi ve pH 7,4'e ayarlandı. Son hacim dH₂O ile 500 ml'e tamamlandı. Solüsyon oda sıcaklığında saklandı.

Tablo 8. RIPA protein izolasyonu lizis solüsyonu (250 ml)

Kimyasal	Miktar	Final Konsantrasyon
HEPES (0.5 M)	25 ml	50 mM
NaCl (2 M)	37,5 ml	150 mM
%10 IGEPAL CA-630	25 ml	%1
%10 SDS	2,5 ml	%0,1
EDTA (0.5 M)	1 ml	2 mM

1 ml enjeksiyonlu suda yarım tablet proteaz inhibitör (Sigma) çözdürüldü. 5 tüpe 200 ul olarak alıktlandı ve -20'ye kaldırıldı. RIPA lizis solüsyonu için tablo 8' de belirtilen kimyasallar 159 ml dH₂O içerisinde çözüldü. Solüsyon +4°C' de saklandı. 2 ml RIPA lizis solüsyonu içerisine 200 ul proteaz inhibitörü eklenerek lizis solüsyonu hazırlandı.

Tablo 9. 5x Protein yükleme boyası (22.5 ml, pH 6,8)

Kimyasal	Miktar	Final Konsantrasyon
%20 SDS	11,25 ml	%10
2-Merkaptoetanol	5,625 ml	%25
Tris-HCl	0,84 g	240 mM
%100 Gliserol	5,625 ml	%25
Bromofenol mavisi	12,5 mg	830 µM

%20 SDS için 2,25 g SDS dH₂O içerisinde çözüldü ve son hacim dH₂O ile 11,25 ml'e tamamlandı. Hazırlanan SDS solüsyonu içerisine tablo 9' da belirtilen miktarlarda 2-merkaptoetanol, gliserol, Tris-HCl eklendi ve pH 6.8'e ayarlandı. Hazırlanan karışıma en son 12,5 mg bromofenol mavisi eklendi ve nihai karışım laminar air-flow kabininde 0,20 µM por çapına sahip filtreden geçirilerek steril edildi. Sterilizasyonu takiben, solüsyon, 2 ml mikro santrifüj tüplere alıktlanarak -20°C' de saklandı.

Tablo 10. 10X SDS jel yürütme solüsyonu (1 L)

Kimyasal	Miktar	Final Konsantrasyon
Tris baz	30 g	250 mM
Glisin	144 g	1.9 M
SDS	10 g	35 mM

SDS-PAGE stok yürütme solüsyonu için tablo 10' da belirtilen kimyasallar 750 ml dH₂O içerisinde çözüldü ve son hacim 1 L'ye dH₂O ile tamamlandı. Solüsyon oda sıcaklığında saklandı.

Tablo 11. 10X TBS-T yıkama solüsyonu (1 L, pH 7,6)

Kimyasal	Miktar	Final Konsantrasyon
NaCl	80,063 g	1.37 M
Tris baz	4,954 g	40 mM
Tris-HCl	25,06 g	159 mM
Tween-20	10 ml	%1

10X TBS-T solüsyonu hazırlamak için tablo 11' de belirtilen kimyasallar 700 ml dH₂O içerisinde çözüldü ve pH 7,6'ya ayarlandı. Son hacim dH₂O ile 1 L'ye tamamlandı. Solüsyon oda sıcaklığında saklandı.

Tablo 12. Transfer tampon solüsyonu (1,5 L)

Kimyasal	Miktar	Final Konsantrasyon
NaOH	1,14 g	19 mM
CAPS	3,32 g	10 mM
Etanol	150 ml	%10

Yaklaşık 5 tablet NaOH ve tablo 12’de belirtilen miktarda CAPS ile etanol 1,2 L dH₂O içerisinde, manyetik karıştırıcıda çözüldü. Son hacim distile su ile 1,5 L’ye tamamlandı. Solüsyon oda sıcaklığında saklandı.

Tablo 13. Bloklama & antikor dilüsyon solüsyonu (200 ml)

Kimyasal	Miktar	Final Konsantrasyon
Süt tozu	10 g	%5

Bloklama ve çalışmada kullanılan antikorların dilüsyonu için tablo 13’de belirtildiği gibi 10 g süt tozu 200 ml 1X TBS-T içerisinde çözüldü. Solüsyon +4 °C’de saklandı.

Tablo 14. Membran yeniden kazanım solüsyonu (50 ml)

Kimyasal	Miktar	Final Konsantrasyon
2-Merkaptoetanol	350 µl	%0.7
%20 SDS	5 ml	%2
1 M Tris HCl pH 6,8	3.125 ml	62,5 mM

Stripping solüsyonu hazırlamak için 2-merkaptoetanol, %20 SDS ve 1 M Tris pH 6,8 50 ml distile suda çözüldü. Solüsyon oda sıcaklığında saklandı (Tablo 14).

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 hücre hatları için, %10 FBS (Gibco), %1 penisilin/streptomisin (Gibco), 2mM L-glutamin içeren DMEM besiyeri kullanılmıştır. Hücreler 37°C’de %5 CO₂’li ortamda kültüre edilmiştir. Çalışmada kullanılan hücre hatları listesi tablo 15’te verilmiştir.

Tablo 15. Çalışmada kullanılan Hücre hatları

Hücre Hattı	Moleküler Alt Tip
MCF-7	Östrojen reseptörü pozitif (ER+)
MDA-MB-453	HER2 pozitif
SK-BR-3	HER2 pozitif
MDA-MB-231	Üçlü negatif

3.2.2. Hücre Sayımı

Çalışmada kullanılan tüm hücreler, hücre canlılık deneyinde, RNA izolasyonları için hücre ekimleri deneylerinde Thoma lamı ile sayıldı. Sayım için hücreler toplandı, 1250 rpm'de 5 dakika santirifüj edilip üzerindeki süpernatant atıldı, pelet 1ml taze besiyeri ile sulandırıldıktan sonra içinden homojen olacak şekilde 50 µl bir ependorf tüpe alındı. Sayım için Thoma lamının iki sayım bölgesine ayrı ayrı 10 µL+10 µL hacimlerde hücre eklendi. Yoğunluğu fazla olan hücrelere dilüsyon yapıldı. Thoma lamının her iki tarafındaki hücrelerin ortalaması alınıp aşağıdaki formülde yerine yazılıp hücre sayıları hesaplandı.

$$\text{Hücre sayısı (ml)} = \text{Sayılan partikül sayısı} \times 10^4 \times (\text{dilüsyon kat sayısı})$$

3.2.3. Deneylerde Kullanılan Düşük Glukoz ve Yüksek Glukoz Besiyerlerinin Hazırlanışı

Düşük glukozlu (5 mM) besiyeri hazırlamak için sodyum bikarbonat ve fenol kırmızısı içeren, glukoz, sodyum pirüvat ve L-glutamin içermeyen DMEM'den 43.75 ml, 50 ml'lik falkona alındı. Üzerine 5 ml FBS, 500 µL penisilin/streptomisin, 500 ul L-glutamin (1:100) ve 250 ul glukoz (1:100) eklendi. Yüksek glukozlu besiyeri (25 mM) hazırlamak için 4.5 g/L D-glukoz ve L- glutamin, ve pirüvat içeren yüksek glukozlu (25 mM) DMEM'den 44,5 ml 50 ml'lik falkona alındı. Üzerine 5 ml FBS ve 500 µL penisilin/streptomisin eklendi.

3.2.4. Hücre Canlılığının ATP Seviyesinin Ölçülmesi ile Belirlenmesi

Hücrelerin yukarıda belirtilen 2 farklı besiyerinde hücre canlılıkları CellTiter GLO Luminescent Reagent (Promega) kiti kullanılarak ölçüldü. Bunun için ml'sinde 25.000 hücre hazırlanıp, bundan her bir kuyuya 200 µL olacak şekilde 96 kuyucuklu plate'e, beşli tekrarlar halinde ekildi. Hücre sayımı aşamasında düşük glukozlu besiyeri kullanıldı. Daha sonra yüksek ve düşük glukozlu olarak ayrı tüplerde ml'sinde 25.000 hücre olacak şekilde hazırlandı. Plate ekim sonrası 96 saat 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi ve plate inkübatörden alınıp 30 dakika oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Her bir kuyucuğa oda sıcaklığına getirilmiş 40 µL Cell TiterGLO solüsyonu eklendikten sonra plate 5 dakika, 800 rpm'de mikropilaya çalkalayıcıda çalkalandı. Plate 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyon sonrası lüminesans miktarı multimod mikropilaya okuyucuda belirlendi. Hücre canlılığı rölatif olarak Microsoft Office Excel programında hesaplandı. Grafik GraphPad Prism 9 (GraphPAD software inc, ABD) programında oluşturuldu.

3.2.5. Hücre Proliferasyonu

Her bir hücre hattı 3 kuyu düşük glukozlu ve 3 kuyu yüksek glukozlu besiyerinde 2 ml'de 50.000 hücre olacak şekilde six-wellere ekildi. 96 saat 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Daha sonra hücre sayımı protokolüne göre sayım yapıldı ve GraphPad Prism 9 (GraphPAD software inc, ABD) programında grafik oluşturuldu.

3.2.6. RNA İzolasyonu

4 hücre hattı ml'de 300 bin hücre olacak şekilde 6'lı well plate'e ekim yapıldı, 96 saat inkübasyondan sonra hücreler toplandı, 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant atıldı ve hücre peletleri 1 ml soğuk PBS ile resüspanse edilip, tekrar aynı devir ve sürede santrifüj edildi. Santrifüj sonrası PBS tamamen uzaklaştırıldı. Hücre hatlarından elde edilen hücre peletlerinden RNA izolasyonu RNeasy Plus Mini Kit'in (Qiagen) protokolüne uygun yapıldı. Hücre peletlerinin üzerine 350 µl RLT lizis buffer ve 350 µl %70 Etanol eklendi. Yavaşça birkaç defa pipetaj yapılarak pellet çözüldü. Süspansiyon, kit ile verilen kolonlara transfer edildi. 9000 g'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolonlar yeni toplama tüplerine transfer edildikten sonra üzerlerine 700 µl RW1 yıkama solüsyon eklendi. 9000 g'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüplerindeki sıvı atık uzaklaştırıldı. Kolonlar tekrar aynı toplama tüplerine yerleştirildi ve üzerine 500 µl RPE buffer eklendi ve 9000 g'de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüplerindeki sıvı atık uzaklaştırıldı. Kolonlar tekrar aynı toplama tüplerine yerleştirildi ve üzerine ikinci kez 500 µl RPE buffer eklendi ve 9000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Toplama tüplerindeki sıvı atık uzaklaştırıldı. Kolonlar membranın kuruması için 14000 g'de 1 dakika santrifüj edildi ve sonra kolonlar RNase-free mikrosantrifüj tüplere transfer edilerek üzerine 30 µl RNase-free su konuldu ve 9000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra içerisinde RNA bulunan mikrosantrifüjler buz üzerine alındı ve konsantrasyonları nanodropla ölçüldü. Elde edilen RNA'lar daha sonra cDNA sentezinde kullanıldı.

3.2.7. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lardan cDNA eldesi RT2 First Strand Kit (Qiagen) kullanılarak protokole uygun yapıldı. Bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. İlk olarak genomik DNA eliminasyonu Tablo 16'ya göre yapıldı ve Thermal Cycler' da 5 dakika 42°C'de, ardından da 1 dakika buz üzerinde inkübe edildi. Ardından Tablo 17'ye göre ters transkripsiyon karışımı hazırlandı ve üzerlerine eklendi. 42°C 'de 15 dakika, 95°C'de 5 dakika inkübe edildi. İnkübasyon tamamlanınca cDNA'lar 1:8 oranında nükleaz içermeyen su ile dilüe edilerek qRT-PCR için kullanılmak üzere -20°C' ye kaldırıldı.

Tablo 16. Genomik DNA eliminasyon karışımı

Karışım Bileşenleri	1X (Hacim)
RNA (1 µg/µl olacak şekilde örnek hacmi alındı.)	1 µg (-µl?)
Buffer GE	2 µl
Nükleaz içermeyen su (Steril enjeksiyonluk su kullanıldı)	- µl
Total	10 µl

Tablo 17. Ters transkripsiyon karışımı

Karışım Bileşenleri	1X (Hacim)
5x Buffer BC3	4 µl
Control P2	1 µl

RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 µl
RNase-free water	3 µl
Total	20 µl

3.2.8. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR)

PFKFB1 ve glikoliz yolağında görev alan HK1, HK2, PKM2, PFKP, PFKL, PKM2 ve oksidatif fosforilasyonda görev alan NDUFB8, UQCRB, SDHD, COX7B, ATP5A1 ve house-keeping gen olarak RPLP0 için primerler tasarlandı (Tablo 18). cDNA'ları elde edilen hücre hatlarında RT² SYBR Green ROX Fast Master Mix protokolü uygulanarak (Tablo 19) Qiagen Rotor Gene Q cihazında Tablo 20'da belirtilen koşullar ayarlanarak bu genlerin ekspresyon seviyeleri tespit edildi. Gen ifadesi düzeyindeki farklılıklar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ile hesaplandı.

Tablo 18. qRT-PCR primer listesi

Gen		Primer Dizisi
PFKFB1	Forward	CCAGGAACATTACCCTGAAGAA
	Reverse	CCTGTCGTTCTAGCTCCATTATC
HK1	Forward	ACATTGTCTCCTGCATCTCTG
	Reverse	GCCTTAAAACCCTTTGTCCAC
HK2	Forward	GGGACAATGGATGCCTAGATG
	Reverse	GTTACGGACAATCTCACCCAG
PKM2	Forward	AAGTGTGACGAGAACATCCTG
	Reverse	ACCATTTTCCACCTCCGTC
PFKP	Forward	CATCGACAATGATTTCTGCGG
	Reverse	CCATCACCTCCAGAACGAAG
PFKL	Forward	AACGAGAAGTGCCATGACTAC
	Reverse	GTCCCATAGTTCCGGTCAAAG
RPLP0	Forward	AGCATCTACAACCCTGAAGTG
	Reverse	AGCAAGTGGGAAGGTGTAATC
NDUFB8	Forward	GAAGACTACGAACCTTACCCG
	Reverse	CATGACATGCCAAGAAACAGG
UQCRB	Forward	AAGTGGCTGGATGGTATTCG
	Reverse	TTTGGTCCACTGCTCTTTAGG
SDHD	Forward	ACATACACTTGTCACCGAGC
	Reverse	AAGGCATCCCCATGAACATAG
COX7B	Forward	TCACCTTCACGATGTTTCCC
	Reverse	ACAGGTTCCATTCTATTCCGAC
ATP5A1	Forward	TGGAATTGGCTCAGTATCGTG
	Reverse	TTGTAATCTTGCTGGGCTCC

Tablo 19. qRT-PCR için kullanılan kitin protokolü

Karışım Bileşenleri	1X (Hacim)
RT2 SYBR Green ROX Fast Master Mix	12,5 µl
cDNA	1 ul
Primer Forward (10 µm)	0,5 µl
Primer Reverse (10 µm)	0,5 µl
RNase-free water	10,5 µl
Total	25 µl

Tablo 20. qRT-PCR Koşulları

qPCR Koşulları		
95°C	10 dakika	1 döngü
95°C	15 saniye	40 döngü
60°C	60 saniye	
72°C	15 saniye	1 döngü

3.2.9. Protein İzolasyonu

Her bir hücre hattı T25 flasklarda %10 FBS (Gibco), %1 penisilin/streptomisin (Gibco) 2mM L-glutamin içeren DMEM besiyeri içinde 37°C'de %5 CO₂'li ortamda çoğaltıldıktan sonra, 1 ml %0,25 Trypsin-EDTA yardımıyla 15 ml falkona toplandı ve 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Oluşan pelletler 500 ul soğuk PBS ile yıkandı ve tekrar 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. PBS tamamen uzaklaştırıldıktan sonra, her bir hücre pelleti üzerine proteaz inhibitörü eklenmiş 200 ul RIPA lizis solüsyonu eklendi ve buz üzerinde 10 dakika bekletildi. Süre dolduktan sonra iyi bir pipetaj ile hücreler mikrosantrifüj tüplere transfer edildi ve 4°C 'de 12000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar pelletler dağıtılmadan yeni mikrosantrifüj tüplere alındı. Protein konsantrasyonları Bicinchoninic Acid (BCA) Assay kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol uygulanarak ölçüldü. BCA solüsyonu örnek sayısına göre gereken miktarda Reagent A ile Reagent B'nin 50:1 oranında karıştırılması ile elde edildi (2 ml için; 2 ml Reagent A, 40 µL Reagent B). 96 kuyucuklu platelere konsantrasyonu belirlenecek lizatlardan 20 µL dağıtıldı. Üzerlerine 200 µL BCA solüsyonu konuldu. Plate 37 °C'de 30 dk karanlıkta çalkalayıcıda inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plate-reader'da 562 nm'de absorbanslar ölçüldü. Örneklerdeki protein miktarları RIPA lizis solüsyonu kullanılarak eşitlendi.

3.2.10. Western Blotlama

Western Blotlama için protein örneklerinin konsantrasyonları 1 mg/ml'ye son hacim 135 µL olacak şekilde ayarlandı. Üzerlerine 5X protein yükleme tamponundan 33,75 µL eklendi. Örneklerden 20 µL %12'lik Tris-Glisin jellere yüklenerek SDS-PAGE jel elektroforezi yapıldı. Elektroforez sonrası jeller ıslak

transfer yöntemi ile 0,45 µm por çapına sahip PVDF membrana transfer edildi. Transfer sonrası membran 1 saat 1X'lik TBS-T solüsyonu ile hazırlanmış %5 yağsız süt tozu içerisinde çalkalayıcı üzerinde bloklandı. Bloklanan membranlar 1:1000 konsantrasyonda birincil antikor (Anti-PFKFB1 antibody) ile bir gece +4 °C'de bırakıldı. Ertesi gün 15 dakikada 1 olmak üzere 3 kere 1X TBS-T ile yıkayıp, 1:2000 konsantrasyonda ikincil antikor (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody) ile oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Sonrasında membran aynı şekilde tekrar 3 kez yıkandı. Proteinlerin kemilüminesans görüntülenebilmesi için membran 3 dakika, ECL solüsyonu (Pierce ECL, ThermoScientific, USA) ile muamele edildi. Görüntüler Azure C300 cihazında alındı. Housekeeping proteinlerin tespiti için membranlara yeniden kazanım (stripping) yapıldı. Membranlar 5 ml stripping solüsyonunda 30 dakika 60 °C su banyosunda inkübe edildi. Ardından 3 kez 5'er dk. çalkalayıcıda su ile yıkandı. Bloklama, antikor muameleleri, yıkama ve diğer aşamalar tekrar edilerek görüntü elde edildi.

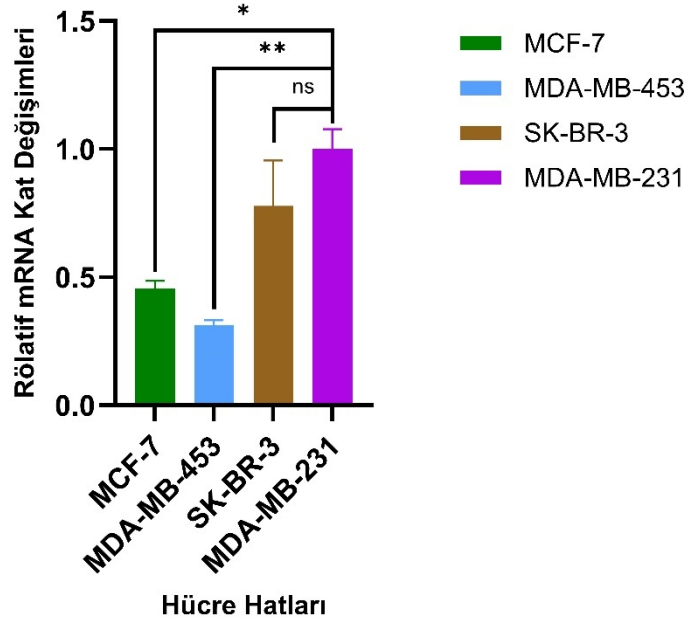
3.2.11. İstatiksel Hesaplamalar

Elde edilen veriler için istatistiksel hesaplamalar Ortalama ± Standart Sapma şeklinde yapılmıştır. Farklı gruplar arasında ve içinde anlamlı fark olup olmadığını değerlendirmek için Student's t-test yöntemi kullanıldı. Verilerin analizi ve görselleştirilmesi için GraphPad PrismV9 yazılımı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 Hücre Hatlarında Glikolizde Rol Alan *PFKFB1* Geninin Ekspresyonunun qRT-PCR ile Belirlenmesi

MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'lar ile qRT-PCR'da, *PFKFB1* geninin ekspresyonu belirlendi (Şekil 6). Diğer hücre hatlarına göre MDA-MB 231'de mRNA seviyesinin yüksek; MDA-MB 453'te ise mRNA seviyesinin düşük olduğu gözlemlendi. MDA-MB 231 hücre hattında *PFKFB1* mRNA ekspresyon seviyesi 1 kat iken, MCF-7'de 0,45 kat olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). MDA-MB 453'te MDA-MB 231'e göre 0,30 kat eksprese olup istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$). SKBR-3'te ise MDA-MB 231'e göre 0,77 kat eksprese olmuştur ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

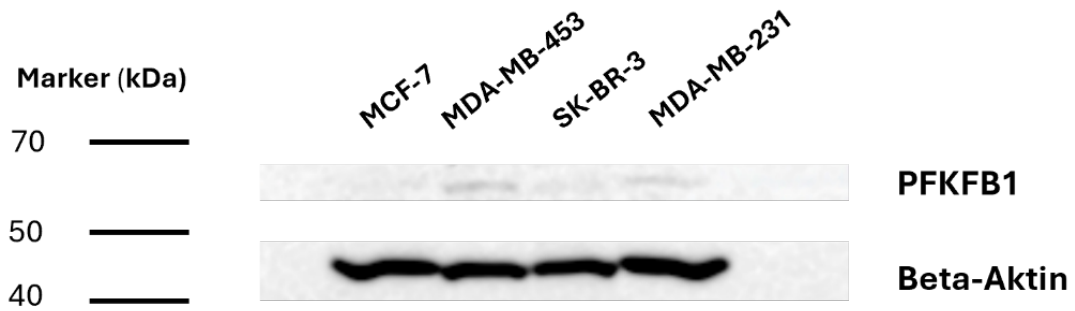


Şekil 6. MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 hücre hatlarında *PFKFB1* gen ekspresyonunun rölatif mRNA kat değişimleri. (Data mean±SD olarak sunuldu, * $p<0.05$, ** $p<0.01$)

4.2. MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 Hücre Hatlarında PFKFB1 Protein Sentezi

MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 hücre hatlarında PFKFB1 protein sentezine western blot yöntemiyle bakıldı (Şekil 7). Housekeeping protein olarak Beta-Aktin kullanıldı.

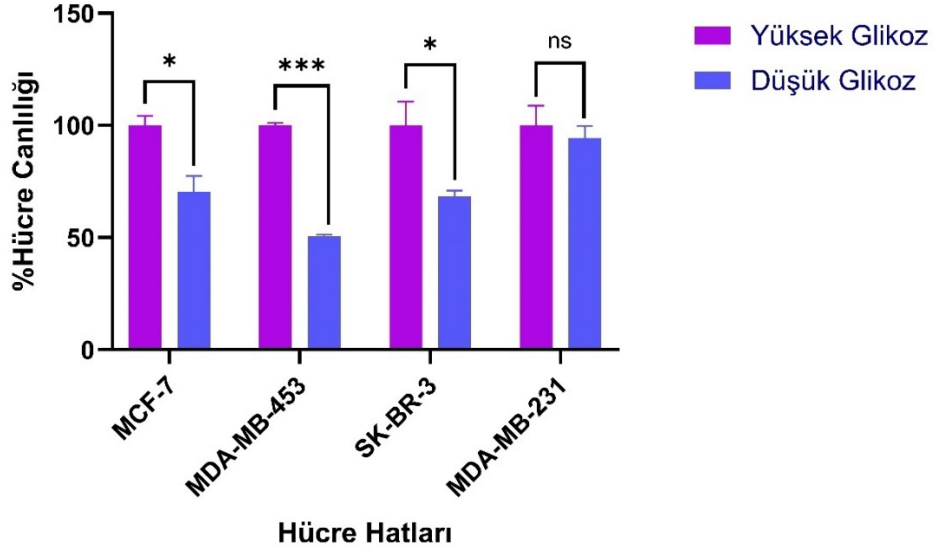
MDA-MB 453 hücre hattında, mRNA ekspresyon seviyesi düşük olmasına karşın protein seviyesinin diğer hücre hatlarına göre fazla olduğu ve MDA-MB 231 hücre hattında mRNA ekspresyon seviyesi yüksek olmasına rağmen protein seviyesinin az olduğu gözlemlendi.



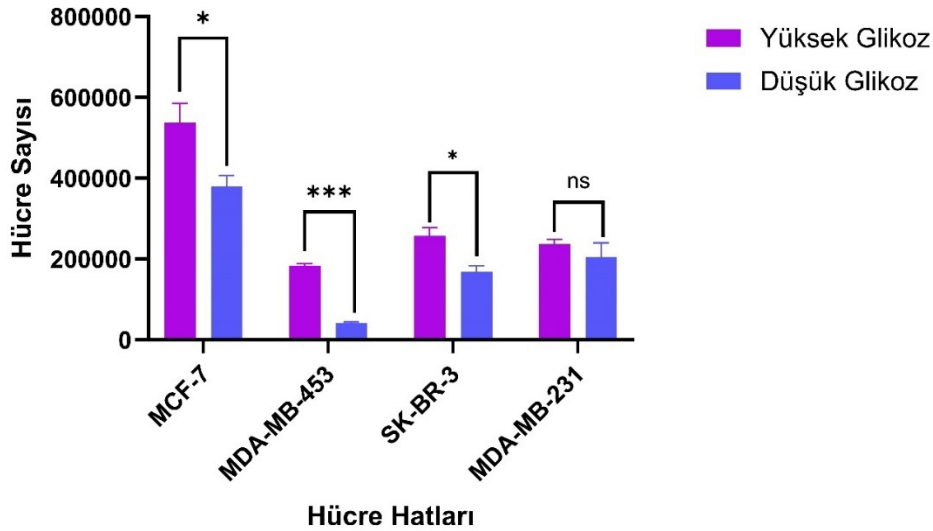
Şekil 7. MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 hücre hatlarında PFKFB1 proteininin immünoblotlanması. Housekeeping protein olarak Beta-Aktin kullanıldı.

4.3. Düşük ve Yüksek Glukozlu Besiyerinde MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 Hücre Hatlarının Proliferasyonunun Belirlenmesi

Düşük glukozlu (5 Mm) ve yüksek glukozlu (25 Mm) besiyerinde kültürlenmiş MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 hücrelerinde hücre canlılığı CellTiter Glo Assay kullanılarak belirlendi. MDA-MB 231 hücre hattında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmezken düşük glukozda MCF-7 %70, MDA-MB- 453 %50, SKBR-3 %68 oranında canlılık gösterdi ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$) (Şekil 8). Aynı zamanda düşük ve yüksek glukozlu ortamda ml başına 25000 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı ve 96 saat sonra hücreler sayıldı. Hücre sayımında istatistiksel olarak CellTiter Glo Assay sonuçlarıyla aynı anlamlı sonuçlar elde edildi (Şekil 9).



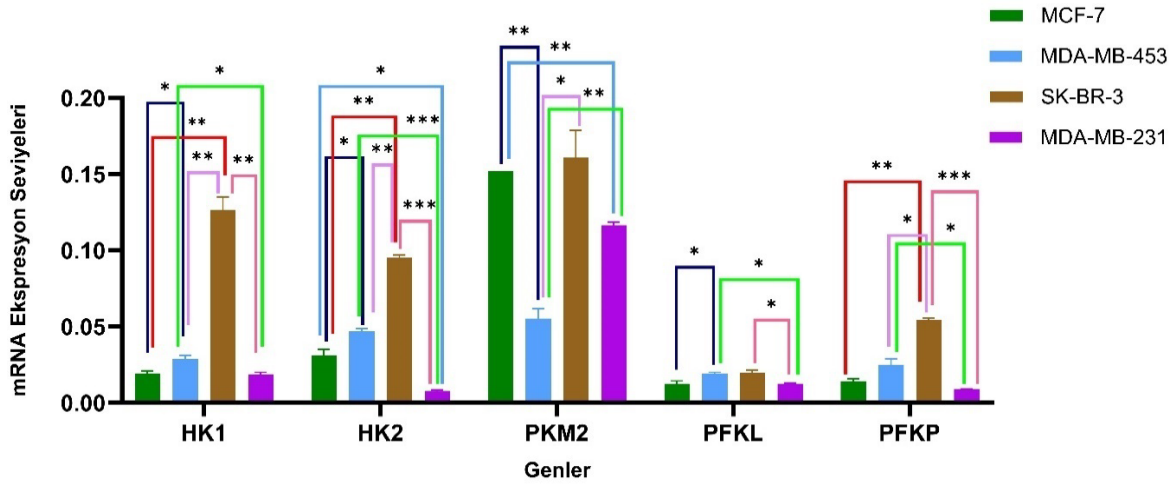
Şekil 8. MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 hücre hatlarının düşük glukozlu (5 Mm) ve yüksek glukozlu (25 Mm) besiyerinde hücre canlılığı grafiği. (Data mean±SD olarak sunuldu, * p<0.05, *** p<0.001).



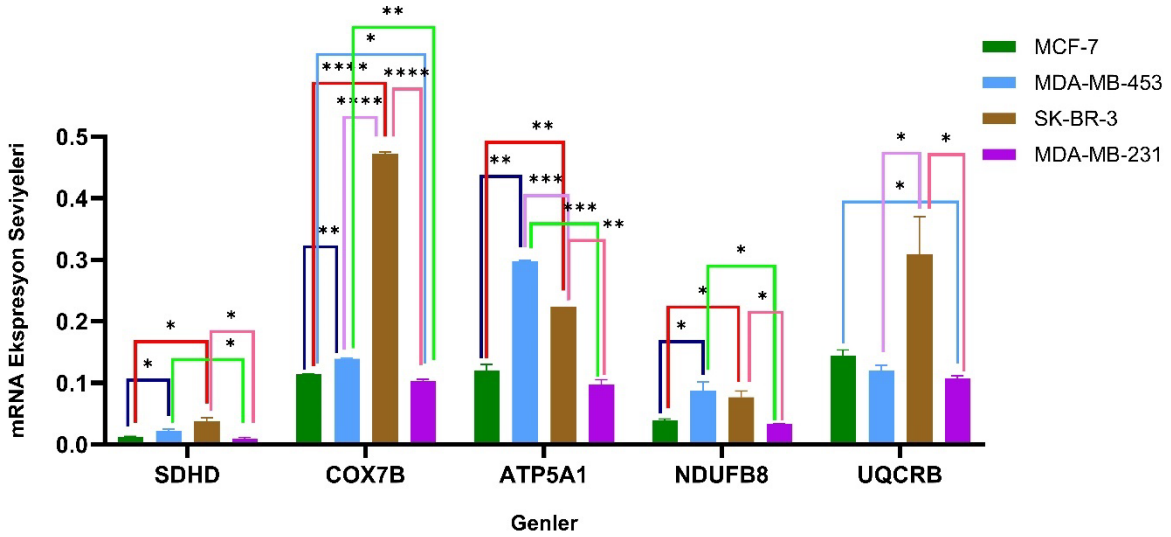
Şekil 9. MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 hücre hatlarının düşük glukozlu (5 Mm) ve yüksek glukozlu (25 Mm) besiyerinde çoğalma grafiği. (Data mean±SD olarak sunuldu, * p<0.05, *** p<0.001).

4.4. MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 Hücre Hatlarında Glikolizde ve Oksidatif Fosforilasyonda Rol Alan Genlerin Ekspresyonlarının qRT-PCR ile Belirlenmesi

MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'lar ile qRT-PCR'da, glikolizde rol alan *HK1*, *HK2*, *PKM2*, *PFKL* ve *PFKP* ile oksidatif fosforilasyonda rol alan *SDHD*, *COX7B*, *ATP5A1*, *NDUFB8* ve *UQCRB* genlerin ekspresyonları belirlendi (Şekil 10) (Şekil 11).



Şekil 10. MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 hücrelerinde glikolizde rol alan *HK1*, *HK2*, *PKM2*, *PFKL* ve *PFKP* gen ekspresyonlarının belirlenmesi (Data mean±SD olarak sunuldu, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, önemsiz olanlar (ns) gösterilmemiştir.).



Şekil 11. MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 hücrelerinde oksidatif fosforilasyonda rol alan *SDHD*, *COX7B*, *ATP5A1*, *NDUF8* ve *UQCRB* gen ekspresyonlarının belirlenmesi (Data mean±SD olarak sunuldu, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001, önemsiz olanlar (ns) gösterilmemiştir.).

5. TARTIŞMA

Dünya genelinde ikinci ölüm nedeni olan kanser, kontrolsüz hücre bölünmesiyle karakterize, genlerde meydana gelen bir dizi değişimle bağlantılı anormal hücrelerin çoğalmasıyla meydana geldiği dokuya göre sınıflandırılan bir hastalıktır (Knudson, 2002). Kadınlar arasında en sık görülen ve insidans oranı dünya genelinde artmaya devam eden bir kanser türü olan meme kanseri heterojen bir hastalıktır (Arnold et al., 2022) ve çeşitli alt tiplere kategorize edilmiştir. Bu ana alt tipler östrojen ve progesteron hormonları tarafından yönlendirilen hormon reseptörü pozitif (HR+) meme kanseri, HER2-pozitif meme kanseri ve üçlü negatif meme kanseri (TNBC) 'dir (Johnson et al., 2021).

Tümör oluşumu, gelişimi ve ilerlemesi, tümör hücrelerinin heterojenliği, kanserin ayırt edici özellikleriyle anlaşılır hale getirilmiştir (Hanahan, 2022). Bu ayırt edici özelliklerden enerji metabolizmasının yeniden düzenlenmesi, kanser hücrelerinin hayatta kalmasına ve çevreye uyum sağlamasına imkân vermektedir (Pavlova & Thompson, 2016). Normal hücreler ATP üretmek için glukozu kullanmaktadır. Oksijen yokluğunda glikoliz ile glukoz laktata dönüştürülür (Chaudhry & Varacallo, 2018). Oksijen varlığında ise glukoz pirüvata dönüştürüldükten sonra, TCA döngüsü ve mitokondride OXPHOS yoluyla daha fazla metabolize edilir (Martínez-Reyes & Chandel, 2020). Normal farklılaşmış hücreler enerjiyi esas olarak mitokondriyal oksidatif fosforilasyonla üretirken, kanser hücreleri ATP üretmek için daha az verimli bir süreç olan aerobik glikolizi tercih eder (Gatenby & Gillies, 2004). Warburg etkisi olarak da bilinen bu süreçte kanser hücreleri oksijen varlığında bile glikolizle üretilen pirüvata TCA döngüsüne sokmak yerine laktata dönüştürmektedir (Koppenol et al., 2011). Biyolojik temeli hala iyi anlaşılammış olsa da tümör hücrelerinin sınırlı enerji kaynakları için rekabet edebilmesi, glikolizde OXPHOS'a göre daha hızlı ATP üretilmesi Warburg etkisini açıklayabilecek nedenler arasında olabilir (Liberti & Locasale, 2016). Yapılan bir çalışmada, farklı normal ve tümör hücre hatlarında membran aktivitesindeki bozulmaları takiben glukoz metabolizmasındaki değişiklikler incelenmiş ve hücre membranındaki pompaların inhibisyonunun ve aktivasyonunun sırasıyla glikolizde azalmaya ve artışa yol açtığı, oksidatif fosforilasyonun ise değişmeden kaldığı gözlemlenmiştir (Epstein et al., 2014).

Her kanserin kendine özgü metabolik özellikleri vardır ve çeşitli koşullar altında aerobik glikoliz ve OXPHOS arasında geçiş yapılabilirler (Jose et al., 2011). Örneğin normal oksijen koşulları altında (normoksi), bazı kanser hücreleri enerjiyi verimli bir şekilde üretmek için OXPHOS'u kullanabilir; hızla büyüyen tümörlerde yaygın olan düşük oksijen ortamlarında (hipoksi) ise, kanser hücreleri enerji ihtiyaçlarını hızla karşılamak için sıklıkla aerobik glikoliz yapar. Diğer yandan lösemik hücreler kan dolaşımında çoğu normal dokudaki hücrelerden daha yüksek oksijen ortamında bulunmasına rağmen (Elstrom et al., 2004; Gottschalk et al., 2004) ve benzer şekilde, akciğer tümörlerinin oluşumu sırasında bu tümör hücrelerinin

oksijene maruz kalmasına rağmen aerobik glikoliz sergilemesi (Nolop et al., n.d.), tümör hipoksisinin kanser hücrelerinin aerobik glikolize geçişinde önemli bir katkıda bulunmayan veya geç gerçekleşen bir olay olduğunu göstermektedir.

Ortamda glukoz bol olduğunda, kanser hücreleri hızlı ATP üretimi ve biyokütle üretimi için glikolizi tercih edebilirken; glukoz kıtsa, kanser hücreleri OXPHOS'u upregüle edip, yağ asitleri ve amino asitler gibi alternatif substratları kullanarak mitokondriyal solunum yoluyla enerji üretebilir. Tümör mikroçevresindeki değişiklikler kanser hücrelerinin glikolize mi yoksa OXPHOS'a mı yöneleceğini etkileyebilir (Ashton et al., 2018; Cadassou & Jordheim, 2023; Solaini et al., 2011; Xu et al., 2020).

Glukoz metabolizmasına bakıldığında ilk basamak olan glikolizde bulunan glikolitik enzimlerin aktiviteleri çeşitli negatif ve pozitif geri bildirim düzenleyici mekanizmalarla kontrol edilir ve kanser hücreleri, anabolik taleplerini karşılamak ve bunları kullanarak biyosentetik ihtiyaçlarını sürdürmek için bu mekanizmaların üstesinden gelir (Hay, 2016). Az veya çok üretilen glikolitik enzimler tümör oluşumunu yönlendirir ve böylece aerobik glikolize doğru metabolik bir geçiş sağlar (Ediriweera & Jayasena, 2023).

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda glikolizde önemli bir enzim olan fosfofruktokinaz-1'in (PFK-1) güçlü bir aktivatörü olan fruktoz-2,6-bisfosfat üretimini sağlayan PFKFB enzim ailesinden PFKFB1'in MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 hücre hatlarında qRT-PCR ile mRNA seviyelerine bakıldı, rölatif olarak grafiği oluşturuldu (Şekil 6). *PKFB1* bu dört hücre hattında az eksprese olmaktadır ve bu dört hücre hattından en fazla MDA-MB 231 'de; en az MDA-MB 453'te mRNA ekspresyon seviyesi gözlemlendi. Western sonuçlarına göre PFKB1 protein seviyesi ise bu hücre hatlarından MDA-MB 453'te en fazla olacak şekilde gözlemlendi (Şekil 7). Bu sonuçlara göre MDA-MB 231 hücre hattında translasyon basamağındaki bir değişiklik/bozukluk sonucu mRNA proteine dönüşemiyor olabilir ve MDA-MB 435'te düşük mRNA seviyesine karşın westernde gözlemlenen protein, artmış protein translasyonunu gösterebilir. Literatürde PFKFB enzim ailesinden *PFKFB3* ve *PFKFB4*'ün aşırı ekspresyonu meme kanserinde daha kapsamlı bir şekilde belgelenmiştir ve glikoliz ve tümör büyümesinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Minchenko et al., 2005; O'Neal et al., 2016). Renal hücreli karsinom hücre hatlarında (ACHN, Caki-2, A498, 786-0, OS-RC-1) PFKFB3 mRNA ekspresyon seviyesi upregüle olarak bulunmuştur ve *PFKFB3* 'ün susturulması bu hücre hatlarında glikolizi inhibe etmiştir (J. Li et al., 2022).

2021 yılında yapılan bir çalışmada ise PFKFB1 mRNA seviyesi, normal meme dokusuyla karşılaştırıldığında meme tümörlerinde önemli ölçüde daha düşük miktarlarda olduğu gösterilmiştir (Mamoor, 2021) ancak bir diğer doku çalışmasında; mide kanseri dokusunda, PFKFB1 mRNA ekspresyonunun normal dokuya göre arttığı gözlemlenmiştir (Minchenko et al., 2014). Literatürde *PFKFB1*

geninin meme kanserindeki rolü, *PFKFB3* ve *PFKFB4* kadar belirgin bir şekilde farklı kanser hücre hatlarında incelenmemiştir. Ancak yakın bir tarihte yayınlanan bir makalede, multipl miyelomun (MM) hücre hatlarında (ARP-1, OPM-2 ve LP-1) yüksek oranda eksprese edilen; hücre çoğalmasını ve metabolizmasını teşvik eden *LILRB4*'in hücrelerde baskılanmasıyla *PFKFB1*'in ekspresyonunun azaldığı ve bu hücrelerde *PFKFB1*'in overeksprese edilmesi MM hücrelerinde çoğalma yeteneğini önemli ölçüde artırdığı belirtilmiş olup çalışmanın devamında *STAT3*'ün *PFKFB1*'i transaktive ettiği gözlemlenmiş ve *PFKFB1*'in farklı yollarla düzenlenebileceği gösterilmiştir (Xie et al., 2024).

Bu tez çalışmasında MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 hücre hatlarının düşük glukozlu ve yüksek glukozlu besiyerindeki hücre canlılıkları CellTiter Glo Assay ve hücre sayımı ile belirlendi (Şekil 8), (Şekil 9). Paralelinde ise qRT-PCR ile glikolizde rol alan *HK1*, *HK2*, *PKM2*, *PFKL* ve *PFKP* genleri ile oksidatif fosforilasyonda rol alan *SDHD*, *COX7B*, *ATP5A1*, *NDUFB8* ve *UQCRB* genlerinin MCF-7, MDA-MB 453, SKBR-3, MDA-MB 231 hücre hatlarındaki ekspresyon seviyelerine bakıldı (Şekil 10), (Şekil 11).

qRT-PCR ve hücre canlılık sonuçlarını yorumladığımızda; düşük glukozda canlılığı %50 oranında azalan MDA-MB 453 hücre hattında *PKM2* geni, diğer hücre hatlarına göre düşük ekspresyon seviyelerinde bulunmaktadır. *PKM2*, glikolizin son adımını katalize eden, fosfoenolpirüvati pirüvata dönüştüren ve ATP üreten hız sınırlayıcı bir enzim olan pirüvat kinazın izoformlarından biridir (Zhang et al., 2019). Yapılan bir çalışmada insan akciğer kanseri hücre hattı H1299'da *PKM2*'nin baskılanması, glukoz metabolizması oranlarının azalmasına ve hücre çoğalmasının azalmasına yol açtığı gözlemlenmiştir (Christofk et al., 2008). 2020 yılında yapılan bir başka çalışmada, MDA-MB-231 ve MCF-7 hücrelerinde siRNA tarafından *PKM2*'nin devre dışı bırakılması, hücrelerin invazyon ve metastaz özelliklerini azalmasına neden olmuştur (Xiao et al., 2020). *PKM2* kanser metabolizmasında ve tümör ilerlemesinde önemli bir rol oynayarak meme kanser hücrelerinde yüksek glikolitik akışı sürdürerek hücrelerin çoğalma kapasitesini destekleyebilmektedir (Ishfaq et al., 2022; Xiao et al., 2020; Zhao et al., 2016). Bu nedenle MDA-MB 453'ün düşük glukozda daha fazla ölmesini *PKM2* enziminin düşük seviyede olmasıyla ilişkilendirebiliriz.

HK2, glikolizin ilk adımını katalizleyen glukozun glukoz-6-fosfata (G6P) fosforilasyonunu gerçekleştiren dört heksokinaz izoformundan biridir ve birçok kanser hücresinde yüksek oranda ifade edilmektedir (Ishfaq et al., 2022). Ancak qRT-PCR sonucunda MDA-MB 231 hücre hattında *HK2* mRNA ekspresyon seviyesi diğer hücre hatlarına göre düşük gözlemlenmiştir (Şekil 10). Ayrıca literatürde MDA-MB 231 hücre hattının agresif, metastatik ve glikolitik bir hücre hattı olduğu belirtilmektedir (Farhadi et al., 2022). *HK2*'nin glikolizde kritik bir rol oynadığı düşünüldüğünde, MDA-MB 231'de *HK2*'nin düşük ekspresyonunun olmasına rağmen düşük glukozda hücre canlılığını koruması, bu hücrelerin enerji

üretimi için glikolize daha az güvendiğini ve potansiyel olarak glutamini kullanarak OXPHOS'a yöneldiğini gösterebilir. Yapılan güncel bir çalışmada bir lösemi hücre hattı olan HL-60'ın hücre canlılığı, düşük ve yüksek glukoz ve glutamin miktarlarıyla incelenmiş olup, sadece düşük glutaminde yüksek oranda hücre ölümü gözlemlenmiştir (Yücel & Ada, 2022). Meme kanseri hücre hatlarında yapılan bir çalışmada ise, bazal tip meme kanseri hücrelerinin lüminal tip meme kanseri hücrelerine kıyasla glutamine daha bağımlı oldukları ve MDA-MB 231 hücre hattının 48 saat glutamin yoksunluğunda hücre canlılığının önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (Kung et al., 2011); bir diğer çalışmada da beyin metastazını araştırmak için MDA-MB 231 hücre hattından beyin arayan varyant modelleri oluşturulmuş ve bu hücrelerdeki OXPHOS'un glutamin (%52) ve yağ asitleri (%48) tarafından neredeyse eşit şekilde desteklendiği, glukoz tarafından desteklenmediği gösterilmiştir ((Blackman et al., 2022). Tüm bunlar glutaminin, glukoz varlığında bile MDA-MB 231 hücre büyümesi için gerekli olduğunu göstermektedir.

Yapılan bir çalışmada SKBR-3 hücre hattı MCF-10A hücreleriyle karşılaştırıldığında, oksidatif yol aracılığıyla önemli miktarda ATP ürettiği gösterilmiştir (Martin & McGee, 2019). COX7B'nin diğer hücre hatlarına göre SKBR-3'te anlamlı bir şekilde fazla eksprese olması da SKBR-3'ün düşük glukoz koşullarında OXPHOS'a yönelerek sınırlı hücre ölümü göstermesini açıklayabilir. Çünkü OXPHOS'un son aşamasında sitokrom c'nin oksidasyonunu ve moleküler oksijenin suya indirgenmesini katalize eden kompleks IV'in bir parçası olan COX7B'nin yüksek ifadesinin OXPHOS'u tetiklediği ve OXPHOS indükleyicisi olduğu ifade edilmiştir (Blackman et al., 2022).

Aynı şekilde MCF-7'de düşük glukozlu ortamda canlılığını sürdürmeye devam edebilmektedir. 2022 yılındaki bir çalışmada, MCF-7 hücreleri ve ardından MDA MB-231 hücreleri, MCF-10A hücrelerinden sonra en fazla mitokondriyal aktiviteye sahip hücreler olarak belirtilmiştir (Farhadi et al., 2022). Artan bu mitokondriyal aktivite, düşük glukozun verimliliği için telafi edici bir yol gibi görünmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonucunda,

1. qRT-PCR sonucunda PKFB1 dört hücre hattında az eksprese olmaktadır. PFKB1'in glikoliz yolağındaki rolünü daha detaylı anlamak için The Human Protein Atlas'daki in silico veride, PFKB1'in HCC2218 hücre hattında en fazla eksprese olduğu gösterilmiştir, bu veriye dayanarak bu hücre hattında *PFKB1*'in susturulmasıyla ileri deneyler yapılabilir.

2. Hücre canlılığı ve hücre sayımı deneylerinde MDA- MB 453' ün düşük glukozlu ortamda yüksek glukozlu ortama göre yarı yarıya azalması, glikolizde görev alan PKM2'nin düşük mRNA ekspresyon seviyesiyle ilişkilendirilmiştir.

3. MCF-7 ve SKBR-3 hücre hatlarının yüksek ve düşük glukozda hayatta kalabildiği gözlemlenmiştir. qRT-PCR sonuçlarına baktığımızda OXPHOS genlerinin eksprese ediliyor oluşuyla, bu hücre hatlarının glukozu verimli kullanabilmek için OXPHOS'u aktifleyebildiği düşünülmüştür. Sonuçlarımızı desteklemek açısından düşük glukozda bu hücre hatlarında OXPHOS'un aktifliğinin ölçülmesi için Oxygen Consumption Assay yapılabilir.

4. qRT-PCR sonucunda, MDA-MB 231 hücre hattında HK2 mRNA seviyesinin diğer hücre hatlarına göre düşük olması ve hücre canlılığı deneylerinde düşük ve yüksek glukozlu ortamda anlamlı bir farkın elde edilmemiş olmasını, MDA-MB 231'in glutamine bağımlı olan bir hücre hattı olabilmesi açıklayabilir. Glutaminazı (GLS1) inhibe edip bu sistemdeki glutaminin rolünü test ederek, glutaminolizin düşük glukolizi telafi edip etmediğini gözlemleyebiliriz.

5. Bu hücre hatlarının kısıtlı glikozu verimli bir şekilde kullanmak için OXPHOS'a yönelip yönelmediğini anlamak için düşük glukozlu ortamda OXPHOS genlerinin mRNA seviyelerine bakılabilir.

6. Meme tümörleri, sınıflandırmalar içinde bile büyüme ve metabolizma açısından büyük ölçüde heterojendir. Sonuçlarımız farklı meme kanseri moleküler alt tiplerinde anlamlı bir farkın olduğunu gösterecek yeterli bir veri sağlamamıştır. Her grup için daha fazla hücre hatlarıyla çalışılabilir.

7. KAYNAKÇA

- Alabduladhem, T. O., & Bordoni, B. (2022). Physiology, Krebs Cycle. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556032/>
- Arnold, M., Morgan, E., Rungay, H., Mafra, A., Singh, D., Laversanne, M., Vignat, J., Gralow, J. R., Cardoso, F., Siesling, S., & Soerjomataram, I. (2022). Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *The Breast*, 66, 15–23. <https://doi.org/10.1016/J.BREAST.2022.08.010>
- Ashton, T. M., Gillies McKenna, W., Kunz-Schughart, L. A., & Higgins, G. S. (2018). Oxidative phosphorylation as an emerging target in cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 24(11), 2482–2490. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3070/274584/AM/OXIDATIVE-PHOSPHORYLATION-AS-AN-EMERGING-TARGET-IN>
- 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), 406236. <https://doi.org/10.3389/FONC.2018.00331/BIBTEX>
- Blackman, M. C. N. M., Capeloa, T., Rondeau, J. D., Zampieri, L. X., Benyahia, Z., Van de Velde, J. A., Fransolet, M., Daskalopoulos, E. P., Michiels, C., Beauloye, C., & Sonveaux, P. (2022). Mitochondrial Protein Cox7b Is a Metabolic Sensor Driving Brain-Specific Metastasis of Human Breast Cancer Cells. *Cancers*, 14(18), 4371. <https://doi.org/10.3390/CANCERS14184371/S1>
- Boroughs, L. K., & Deberardinis, R. J. (2015). Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nature Cell Biology* 2015 17:4, 17(4), 351–359. <https://doi.org/10.1038/ncb3124>
- Bray Bsc, F., Laversanne, | Mathieu, Hyuna, |, Phd, S., Ferlay, J., Siegel Mph, R. L., Soerjomataram, I., Ahmedin, |, & Dvm, J. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229–263. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21834>
- Brown, T. P., & Ganapathy, V. (2020). Lactate/GPR81 signaling and proton motive force in cancer: Role in angiogenesis, immune escape, nutrition, and Warburg phenomenon. *Pharmacology & Therapeutics*, 206, 107451. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2019.107451>
- Cadassou, O., & Jordheim, L. P. (2023). OXPPOS inhibitors, metabolism and targeted therapies in cancer. *Biochemical Pharmacology*, 211, 115531. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2023.115531>

- Cairns, R. A., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer* 2011 11:2, 11(2), 85–95. <https://doi.org/10.1038/nrc2981>
- Chandel, N. S. (2021). Glycolysis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(5), a040535. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A040535>
- Chaudhry, R., & Varacallo, M. (2018). Biochemistry, Glycolysis. *StatPearls*. <http://europepmc.org/books/NBK482303>
- Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Harris, M. H., Ramanathan, A., Gerszten, R. E., Wei, R., Fleming, M. D., Schreiber, S. L., & Cantley, L. C. (2008). The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 2008 452:7184, 452(7184), 230–233. <https://doi.org/10.1038/nature06734>
- Cosin-Roger, J., Vernia, S., Alvarez, M. S., Cucarella, C., Boscá, L., Martin-Sanz, P., Fernández-Alvarez, A. J., & Casado, M. (2013). Identification of a novel Pfkfb1 mRNA variant in rat fetal liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 431(1), 36–40. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2012.12.109>
- Dank, M., Mühl, D., Pölhös, A., Csanda, R., Herold, M., Kovacs, A. K., Madaras, L., Kulka, J., Palhazy, T., Tokes, A. M., Toth, M., Ujhelyi, M., Szasz, A. M., & Herold, Z. (2023). The Prediction Analysis of Microarray 50 (PAM50) Gene Expression Classifier Utilized in Indeterminate-Risk Breast Cancer Patients in Hungary: A Consecutive 5-Year Experience. *Genes*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/GENES14091708/S1>
- EA, M., E, A., & MP, S. (2019). Physiology, Gluconeogenesis. *StatPearls*. <http://europepmc.org/books/NBK541119>
- Ediriweera, M. K., & Jayasena, S. (2023). The Role of Reprogrammed Glucose Metabolism in Cancer. *Metabolites* 2023, Vol. 13, Page 345, 13(3), 345. <https://doi.org/10.3390/METABO13030345>
- Elstrom, R. L., Bauer, D. E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M. H., Plas, D. R., Zhuang, H., Cinalli, R. M., Alavi, A., Rudin, C. M., & Thompson, C. B. (2004). Akt Stimulates Aerobic Glycolysis in Cancer Cells. *Cancer Research*, 64(11), 3892–3899. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2904>
- Epstein, T., Xu, L., Gillies, R. J., & Gatenby, R. A. (2014). Separation of metabolic supply and demand: aerobic glycolysis as a normal physiological response to fluctuating energetic demands in the membrane. *Cancer & Metabolism* 2014 2:1, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-7>
- Fantin, V. R., St-Pierre, J., & Leder, P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor

- maintenance. *Cancer Cell*, 9(6), 425–434.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.04.023>
- Farhadi, P., Yarani, R., Valipour, E., Kiani, S., Hoseinkhani, Z., & Mansouri, K. (2022). Cell line-directed breast cancer research based on glucose metabolism status. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 146, 112526.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2021.112526>
- Fernie, A. R., Carrari, F., & Sweetlove, L. J. (2004). Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(3), 254–261.
<https://doi.org/10.1016/J.PBI.2004.03.007>
- Gatenby, R. A., & Gillies, R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer* 2004 4:11, 4(11), 891–899.
<https://doi.org/10.1038/nrc1478>
- Gottschalk, S., Anderson, N., Hainz, C., Eckhardt, S. G., & Serkova, N. J. (2004). Imatinib (STI571)-Mediated Changes in Glucose Metabolism in Human Leukemia BCR-ABL-Positive Cells. *Clinical Cancer Research*, 10(19), 6661–6668.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0039>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- 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/ATTACHMENT/68024D79-3A9C-46C4-930B-640934F11E2E/MMC1.PDF>
- Hatting, M., Tavares, C. D. J., Sharabi, K., Rines, A. K., & Puigserver, P. (2018). Insulin regulation of gluconeogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1411(1), 21–35. <https://doi.org/10.1111/NYAS.13435>
- Hay, N. (2016). Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nature Reviews Cancer* 2016 16:10, 16(10), 635–649.
<https://doi.org/10.1038/nrc.2016.77>
- Hayes, C., Donohoe, C. L., Davern, M., & Donlon, N. E. (2021). The oncogenic and clinical implications of lactate induced immunosuppression in the tumour microenvironment. *Cancer Letters*, 500, 75–86.
<https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2020.12.021>
- Ishfaq, M., Bashir, N., Riaz, S. K., Manzoor, S., Khan, J. S., Bibi, Y., Sami, R., Aljahani, A. H., Alharthy, S. A., & Shahid, R. (2022). Expression of HK2,

- PKM2, and PFKM Is Associated with Metastasis and Late Disease Onset in Breast Cancer Patients. *Genes*, 13(3), 549. <https://doi.org/10.3390/GENES13030549/S1>
- Johnson, K. S., Conant, E. F., & Soo, M. S. (2021). Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Review for Breast Radiologists. *Journal of Breast Imaging*, 3(1), 12–24. <https://doi.org/10.1093/JBI/WBAA110>
- Jose, C., Bellance, N., & Rossignol, R. (2011). Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: A tumor's dilemma? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(6), 552–561. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2010.10.012>
- Knudson, A. G. (2002). Cancer genetics. *American Journal of Medical Genetics*, 111(1), 96–102. <https://doi.org/10.1002/AJMG.10320>
- Koppenol, W. H., Bounds, P. L., & Dang, C. V. (2011). Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer* 2011 11:5, 11(5), 325–337. <https://doi.org/10.1038/nrc3038>
- Kung, H. N., Marks, J. R., & Chi, J. T. (2011). Glutamine Synthetase Is a Genetic Determinant of Cell Type-Specific Glutamine Independence in Breast Epithelia. *PLOS Genetics*, 7(8), e1002229. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1002229>
- Li, J., Zhang, S., Liao, D., Zhang, Q., Chen, C., Yang, X., Jiang, D., & Pang, J. (2022). Overexpression of PFKFB3 promotes cell glycolysis and proliferation in renal cell carcinoma. *BMC Cancer*, 22(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S12885-022-09183-2/FIGURES/5>
- Li, Z., Wang, Q., Huang, X., Yang, M., Zhou, S., Li, Z., Fang, Z., Tang, Y., Chen, Q., Hou, H., Li, L., Fei, F., Wang, Q., Wu, Y., & Gong, A. (2023). Lactate in the tumor microenvironment: A rising star for targeted tumor therapy. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1113739. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2023.1113739/BIBTEX>
- 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>
- Makki, J. (2015). Diversity of Breast Carcinoma: Histological Subtypes and Clinical Relevance. *Clinical Medicine Insights. Pathology*, 8(1), 23. <https://doi.org/10.4137/CPATH.S31563>
- Mamoor, S. (2021). Differential expression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 1 in cancers of the breast. <https://doi.org/10.31219/OSF.IO/VQ7BD>

- Martin, S. D., & McGee, S. L. (2019). A systematic flux analysis approach to identify metabolic vulnerabilities in human breast cancer cell lines. *Cancer & Metabolism*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S40170-019-0207-X/FIGURES/6>
- Martinez-Outschoorn, U. E., Peiris-Pagés, M., Pestell, R. G., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2016). Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2016 14:1, 14(1), 11–31. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.60>
- Martínez-Reyes, I., & Chandel, N. S. (2020). Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature Communications* 2020 11:1, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>
- Martínez-Reyes, I., & Chandel, N. S. (2021). Cancer metabolism: looking forward. *Nature Reviews Cancer* 2021 21:10, 21(10), 669–680. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00378-6>
- Minchenko, O. H., Ochiai, A., Opentanova, I. L., Ogura, T., Minchenko, D. O., Caro, J., Komisarenko, S. V., & Esumi, H. (2005). Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors. *Biochimie*, 87(11), 1005–1010. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2005.04.007>
- Minchenko, O. H., Tsuchihara, K., Minchenko, D. O., Bikfalvi, A., & Esumi, H. (2014). Mechanisms of regulation of PFKFB expression in pancreatic and gastric cancer cells. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(38), 13705. <https://doi.org/10.3748/WJG.V20.I38.13705>
- Mor, I., Cheung, E. C., & Vousden, K. H. (2011). Control of Glycolysis through Regulation of PFK1: Old Friends and Recent Additions. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 76, 211–216. <https://doi.org/10.1101/SQB.2011.76.010868>
- Nolop, K. B., Rhodes, C. G., Brudin, L. H., Beaney, R. P., Krausz, T., Jones, T., & Hughes, J. M. B. (n.d.). *Glucose Utilization In Vivo by Human Pulmonary Neoplasms*. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19871201\)60:11](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19871201)60:11)
- Okar, D. A., Lange, A. J., Manzano, À., Navarro-Sabatè, A., Riera, L., & Bartrons, R. (2001). PFK-2/FBPase-2: Maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1), 30–35. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01699-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01699-6)
- O’Neal, J., Clem, A., Reynolds, L., Dougherty, S., Imbert-Fernandez, Y., Telang, S., Chesney, J., & 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/FIGURES/9>
- Orrantia-Borunda, E., Anchondo-Nuñez, P., Acuña-Aguilar, L. E., Gómez-Valles, F. O., & Ramírez-Valdespino, C. A. (2022). Subtypes of Breast Cancer. *Breast Cancer*, 31–42. <https://doi.org/10.36255/EXON-PUBLICATIONS-BREAST-CANCER-SUBTYPES>
- Paredes-Flores, M. A., Rahimi, N., & Mohiuddin, S. S. (2024). Biochemistry, Glycogenolysis. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554417/>
- Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*, 23(1), 27–47. <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2015.12.006>
- Piña-Sánchez, P., Chávez-González, A., Ruiz-Tachiquín, M., Vadillo, E., Monroy-García, A., Montesinos, J. J., Grajales, R., Gutiérrez de la Barrera, M., & Mayani, H. (2021). Cancer Biology, Epidemiology, and Treatment in the 21st Century: Current Status and Future Challenges From a Biomedical Perspective. *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center*, 28, 1–21. <https://doi.org/10.1177/10732748211038735>
- Ponder, B. A. J. (2001). Cancer genetics. *Nature* 2001 411:6835, 411(6835), 336–341. <https://doi.org/10.1038/35077207>
- Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., He, X., & Perou, C. M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 12(5), 1–18. <https://doi.org/10.1186/BCR2635/FIGURES/7>
- Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., Díez, M., Viladot, M., Arance, A., & Muñoz, M. (2015). Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *The Breast*, 24, S26–S35. <https://doi.org/10.1016/J.BREAST.2015.07.008>
- Pu, M., Messer, K., Davies, S. R., Vickery, T. L., Pittman, E., Parker, B. A., Ellis, M. J., Flatt, S. W., Marinac, C. R., Nelson, S. H., Mardis, E. R., Pierce, J. P., & Natarajan, L. (2020). Research-based PAM50 signature and long-term breast cancer survival. *Breast Cancer Research and Treatment*, 179(1), 197. <https://doi.org/10.1007/S10549-019-05446-Y>
- Richie, R. C., & Swanson, J. O. (2003). Breast Cancer: A Review of the Literature. *Journal of Insurance Medicine J Insur Med*, 35, 85–101.
- Ros, S., & Schulze, A. (2013). Balancing glycolytic flux: the role of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatases in cancer metabolism. *Cancer & Metabolism* 2013 1:1, 1(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/2049-3002-1-8>

- Slavov, N., Budnik, B. A., Schwab, D., Airoidi, 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>
- Smeitink, J., Van Den Heuvel, L., & DiMauro, S. (2001). The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nature Reviews Genetics* 2001 2:5, 2(5), 342–352. <https://doi.org/10.1038/35072063>
- Solaini, G., Sgarbi, G., & Baracca, A. (2011). Oxidative phosphorylation in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(6), 534–542. <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2010.09.003>
- Suganuma, K., Miwa, H., Imai, N., Shikami, M., Gotou, M., Goto, M., Mizuno, S., Takahashi, M., Yamamoto, H., Hiramatsu, A., Wakabayashi, M., Watarai, M., Hanamura, I., Imamura, A., Mihara, H., & Nitta, M. (2010). Energy metabolism of leukemia cells: glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Leukemia & Lymphoma*, 51(11), 2112–2119. <https://doi.org/10.3109/10428194.2010.512966>
- Turner, K. M., Yeo, S. K., Holm, T. M., Shaughnessy, E., & Guan, J. L. (2021). Heterogeneity within molecular subtypes of breast cancer. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 321(2), C343–C354. https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00109.2021/ASSET/IMAGES/LARGE/AJPCELL.00109.2021_F003.JPEG
- Wallden, B., Storhoff, J., Nielsen, T., Dowidar, N., Schaper, C., Ferree, S., Liu, S., Leung, S., Geiss, G., Snider, J., Vickery, T., Davies, S. R., Mardis, E. R., Gnant, M., Sestak, I., Ellis, M. J., Perou, C. M., Bernard, P. S., & Parker, J. S. (2015). Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. *BMC Medical Genomics*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12920-015-0129-6/FIGURES/10>
- Werner, C., Doenst, T., & Schwarzer, M. (2016). Metabolic Pathways and Cycles. *The Scientist's Guide to Cardiac Metabolism*, 39–55. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802394-5.00004-2>
- Xiao, H., Zhang, L., Chen, Y., Zhou, C., Wang, X., Wang, D., & Liu, Z. (2020). PKM2 Promotes Breast Cancer Progression by Regulating Epithelial Mesenchymal Transition. *Analytical Cellular Pathology*, 2020(1), 8396023. <https://doi.org/10.1155/2020/8396023>
- Xie, L., Chen, C., Zhang, T., Yang, W., Zheng, D., Cao, L., Yuan, J., Xu, Y., Zhang, Y., Liu, L., Liang, A., Yu, Z., & Zheng, J. (2024). LILRB4 regulates multiple myeloma development through STAT3-PFKFB1 pathway. *Cell Death & Disease* 2024 15:7, 15(7), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-024-06883-4>

- Xu, Y., Xue, D., Bankhead, A., & Neamati, N. (2020). Why All the Fuss about Oxidative Phosphorylation (OXPHOS)? *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(23), 14276–14307.
https://doi.org/10.1021/ACS.JMEDCHEM.0C01013/SUPPL_FILE/JM0C01013_SI_001.PDF
- Yi, M., Ban, Y., Tan, Y., Xiong, W., Li, G., & Xiang, B. (2019). 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 and 4: A pair of valves for fine-tuning of glucose metabolism in human cancer. *Molecular Metabolism*, 20, 1–13.
<https://doi.org/10.1016/J.MOLMET.2018.11.013>
- Yücel, B., & Ada, S. (2022). Leukemia Cells Resistant to Glutamine Deprivation Express Glutamine Synthetase Protein. *Turkish Journal of Hematology*, 39(1), 22.
<https://doi.org/10.4274/TJH.GALENOS.2021.2021.0054>
- Zhang, Z., Deng, X., Liu, Y., Liu, Y., Sun, L., & Chen, F. (2019). PKM2, function and expression and regulation. *Cell & Bioscience* 2019 9:1, 9(1), 1–25.
<https://doi.org/10.1186/S13578-019-0317-8>
- Zu, X. L., & Guppy, M. (2004). Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(3), 459–465.
<https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2003.11.136>