



T.C.

İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Lösemi Hücre Hatlarında Glukoz Kısıtlamasında STAT3 Gen
Ekspresyonlarının Araştırılması**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEDEF ALTUNDAĞ KARA

ŞUBAT-2019



T.C.

İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**Lösemi Hücre Hatlarında Glukoz Kısıtlamasında STAT3 Gen
Ekspresyonlarının Araştırılması**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Sedef ALTUNDAĞ KARA

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. MUSTAFA BAKİ ÇEKMEN

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ BURCU YÜCEL

ŞUBAT-2019

**Proje No:1109 (Bu tez İstanbul Medeniyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projesi Birimi tarafından desteklenmiştir.**

I.BİLDİRİM

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

Öğrencinin adı soyadı

Sedef ALTUNDAĞ KARA

Danışmanlığını yaptığım işbu tezin tamamen öğrencinin çalışması olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığını taahhüt ederim.

Danışmanın Ünvanı Adı Soyadı

Prof. Dr. Mustafa Baki ÇEKMEN

II. İMZA SAYFASI

Sedef ALTUNDAĞ KARA tarafından hazırlanan “Lösemi Hücre Hatlarında Glukoz Kısıtlamasında STAT3 Gen Ekspresyonlarının Araştırılması” başlıklı bu yüksek lisans, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

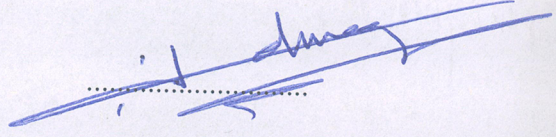
JÜRİ ÜYELERİ

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. Mustafa Baki ÇEKMEN

Kurumu:İstanbul Medeniyet Üniversitesi

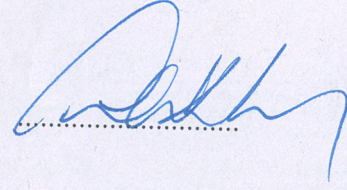
İMZA



Üyeler:

Prof. Dr. Ferruh Kemal İŞMAN

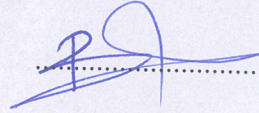
Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi



Dr. Öğr. Üyesi Burcu YÜCEL

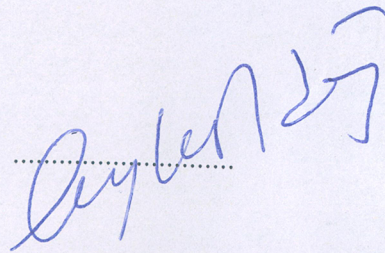
Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi

(İkinci Tez Danışmanı)



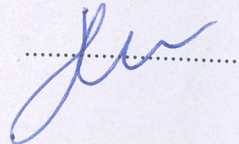
Dr. Öğr. Üyesi F. Ceyla ERALDEMİR

Kurumu: Kocaeli Üniversitesi



Dr. Öğr. Üyesi Hayriye ERMAN

Kurumu: İstanbul Medeniyet Üniversitesi



Tez Savunma Tarihi: 05/ 02/ 2019

III.TEŞEKKÜR

Hedeflenen doğrultuda ilerlemek ve kazanılan birikimleri hedefe ulaşan yolda kullanabilmeyi başarmak; zaman, sabır ve emek ister. Sadece başarmak için değil bilimsel etiğe uygun bir şekilde bilime katkıda bulunmayı istemek çok büyük bir erdem gerektirir.

Bunların farkına varmamı sağlayan ve tez çalışmam süresince kendisine ne zaman danışsam bana zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle beni dinleyen, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Mustafa Baki ÇEKMEN' e

İlk öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, bana hem akademik hem de hayat öğretileriyle ışık tutan, değerli bilgilerini benimle paylaşan, bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan Dr. Öğr. Üyesi Burcu YÜCEL' e,

Tez çalışmasını 1109 nolu proje ile maddi olarak desteklediği için İstanbul Medeniyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimine,

Ayrıca çalışmalarım süresince aynı laboratuvar ortamını paylaştığımız ve benden hiçbir desteğini esirgemeyen sayın hocalarım Uzm. Dr. Şükrü Sadık ÖNER' e ve Doç. Dr. Berna Demircan TAN' a,

Yüksek lisansa başladığım günden itibaren hem ders hem de tez dönemi süresince benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen çok sevgili arkadaşım Tıbbi Biyokimya ABD. Arş. Gör. Saniye ADA' ya,

Yüksek lisansa başladığımdan beri hem akademik hem de sosyal ortamları paylaşarak aile gibi olduğumuz çok sevgili asistan arkadaşlarım Arş. Gör. Burcu ÇAYKARA' ya, Arş. Gör. Hava BEKTAŞ' a, Arş. Gör. Nurgül BULUT' a ve Dr. Fatıma TEMEL'e,

Hayatımda desteğini her an kalbimde hissettiğim sevgili eşim Ali Ergin KARA' ya,
Bugüne kadar beni hiç yalnız bırakmayan, eğitim hayatım boyunca bana sürekli moral ve güç katan, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, kendileriyle her zaman gurur duyduğum canım AİLEME, teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

IV.ÖZET

LÖSEMİ HÜCRE HATLARINDA GLUKOZ KISITLAMASINDA STAT3 GEN EKSPRESYONLARININ ARAŞTIRILMASI

ALTUNDAĞ KARA Sedef,

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa Baki ÇEKMEN

İkinci Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Burcu YÜCEL

Şubat 2019, 57 sayfa

Kanser, normal hücrelerde anormal ve kontrolsüz hücre büyümesiyle oluşan ve diğer dokulara da yayılabilen genetik bir hastalıktır. Kanser hücreleri de normal hücreler gibi vital ihtiyaçlarını karşılayabilmek için besine ihtiyaç duyarlar. Besinlerin enzimler aracılığıyla enerjiye dönüşümü metabolik yollarda gerçekleşir. Kanser hücrelerinin normal hücrelere oranla, artan biyosentez ihtiyaçları bulunur. Metabolik yolların yeniden programlanması artmış metabolit kullanımı düzenler. Glukoz ise kanser hücrelerinin tükettiği metabolitlerin başında gelmektedir.

Çalışmamızda düşük ve yüksek glukozlu besiyeri ortamında seçtiğimiz 3 lösemi hücre hattı üzerinden glukoz metabolizmasının kanser için terapötik etkisini araştırmayı hedefledik.

Kanser hücrelerinde; glukozun kısıtlandığı durumlarda glukoz taşıyıcı GLUT3 ve onkojenik bir transkripsiyon faktörü olan STAT3’ te paralel olarak ekspresyon değişimi belirledik. Ayrıca glikolizde yer alan PKM2 gen ekspresyonlarında da değişimler olduğunu tespit ettik.

Bulgularımız kanser metabolizmasının düzenlenmesinde STAT3 geninin rolü olduğunu ve ileride yapılacak çalışmalar için de ön veriler oluştuğunu belirtmektedir.

Anahtar Sözcükler: Glukoz; Lösemi; STAT3; Kanser Metabolizması

V.ABSTRACT

EXPLOITING STAT3 GENE EXPRESSIONS OF LEUKEMIA CELL LINES TO GLUCOSE LIMITATIONS

ALTUNDAG KARA Sedef,

Master Thesis in Department of Biochemistry, School of Medicine

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa Baki ÇEKMEN

Second Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Burcu YÜCEL

February 2019, 57 pages

Cancer is a genetic disease caused by abnormal and uncontrolled cell growth in normal cells and spreading to other tissues. Cancer cells, like normal cells, need nutrients to fulfill their vital needs. The transformation of nutrients into energy through enzymes occurs in metabolic pathways. Cancer cells have increased biosynthesis needs compared to normal cells. The reprogramming of metabolic pathways regulates the use of increased metabolites. Glucose is one of the metabolites consumed by cancer cells.

In our study, we aimed to investigate the therapeutic effect of glucose metabolism on cancer through 3 leukemia cell lines in low and high glucose medium.

In cancer cells; we found a change in the expression of glucose in GLUT3 and an oncogenic transcription factor STAT3. We have also found changes in PKM2 gene expression in glycolysis.

Our findings indicate that the STAT3 gene plays a role in the regulation of cancer metabolism and that preliminary data are generated for future studies.

Key Words: Glucose; Leukemia; STAT3; Cancer Metabolism

VI.İÇİNDEKİLER

I.BİLDİRİM	i
II.JÜRİ ÜYELERİNİN İMZA SAYFASI	ii
III.TEŞEKKÜR	iii
IV.ÖZET	iv
V.ABSTRACT	v
VI.İÇİNDEKİLER	vi-vii
VII. SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
VIII. ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
IX.TABLolar DİZİNİ	x
X.RESİMLER DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.Kanser	3
2.1.1.Kanser Genetiği	3
2.1.1.1.Proto-onkogenler	4
2.1.1.2.Tümör Baskılayıcı Genler	5
2.1.2.STAT3	5
2.2.Kanser Metabolizması	6
2.3.Glukoz Metabolizması	7
2.3.1.Glukoz Taşıyıcıları	9
2.3.2.Kanser Hücresinde Glukoz Metabolizması	10
2.4.Lösemi	11
3.GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1.Gereçler	13
3.1.1.Kimyasallar	13
3.1.2.Kitler	14
3.1.3.Cihazlar	14
3.1.4.Sarf Malzemeler	15
3.2.Yöntem	15
3.2.1.Hücre Kültürü	15
3.2.1.1.Düşük Glukozlu Hücre Kültürü	16

3.2.2.Hücre Sayımı	16
3.2.3.Wst-1	16
3.2.4.Real-time PCR	17
3.2.4.1.RNA İzolasyonu	17
3.2.4.2.Cdna Sentezi	18
3.2.4.3. qRT-PCR	19
3.2.5.Glukoz Tüketimi	20
3.2.8.İstatistiksel Hesaplamalar	21
4.BULGULAR	22
4.1.Düşük Glukozlu Ortamda Hücre Proliferasyonu	22
4.2.Düşük Glukozlu Ortamda Hücre Canlılığı	23
4.3. Lösemi Hücre Hatlarının Glukoz Tüketimi	24
4.4. Düşük Glukozlu Ortamda Gen Ekspresyonları	25
4.4.1. GLUT3 Gen Ekspresyonları	25
4.4.2. PKM2 Gen Ekspresyonları	25
4.4.3. STAT3 Gen Ekspresyonları	26
5.TARTIŞMA	27
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	31
KAYNAKLAR	33
EKLER	40
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
AML	Akut miyeloid lösemi
APL	Akut premyeloid lösemi
ALL	Akut lenfoblastik lösemi
C/EBPA	CCAAT Enhanser Bağlayıcı Protein Alfa
C-KIT	Kit proto-onkogen reseptör tirozin kinaz
CML	Kronik miyeloid lösemi
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ETZ	Elektron taşıma zinciri
FBS	Fetal bovin serum
FAD	Flavin adenin dinükleotid
F-18DG	Fluro-18- deoksiglukoz
FLT3	FMS ilişkili Tirozin kinaz 3
GLUT	Glukoz taşıyıcı protein
HIF1-A	Hipoksi indükleyici faktör 1-A
HMIT	H ⁺ /miyoinositol taşıyıcı protein
IFN	İnterferon
JAK	Janus kinaz protein
NAD⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid
NA⁺	Sodyum elementinin kimyasal simgesi
NPM	Nükleofosmin
MLL	Lizin Metiltransferaz

P53	Tümör protein P53
PKM2	Piruvat kinaz
RNA	Ribo nükleik asit
RPLP0	Büyük ribozomal protein P0
RAS	Ras onkogeni
RUNX1	Runt ilişkili transkripsiyon faktörü
STAT	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
SH2	Trikarboksilik Asit Siklusu
TCA	Src- homoloji bölgesi
WE	Warburg Efektı (Aerobik Glikoliz)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Kanserin özellikleri	4
Şekil 2.	Warburg etkisi	7
Şekil 3.	Glikoliz reaksiyonları	8
Şekil 4.	Elektron Taşıma Sistemi	9
Şekil 5.	10 mM (Yüksek) ve 1 mM (Düşük) Glukoz içeren besiyerlerinde hücre proliferasyonu.	23
Şekil 6.	Düşük glukozun hücre canlılığına etkisi.	24
Şekil 7.	Hücre hatlarının günlük glukoz tüketimleri	24
Şekil 8.	Düşük glukozlu besiyerinde GLUT3 mRNA ekspresyonlarının analizi.	25
Şekil 9.	Düşük glukozlu besiyerinde PKM2 mRNA ekspresyonlarının analizi.	26
Şekil 10.	Düşük glukozlu besiyerinde STAT3 mRNA ekspresyonlarının analizi.	26

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1.	Glukoz taşıyıcı ailesi ve eksprese oldukları dokular	10
Tablo 2.	Çalışmada kullanılan Kimyasallar	13
Tablo 3.	Çalışmada kullanılan Kitler	14
Tablo 4.	Çalışmada kullanılan Cihazlar	14
Tablo 5.	Çalışmada kullanılan Sarf Malzemeler	15
Tablo 6.	Çalışmada kullanılan Hücre hatları	16
Tablo 7.	Düşük ve normal (yüksek) glukozlu besiyeri hazırlanması	16
Tablo 8.	WST-1 Cell Proliferation Assay kit protokolü	16
Tablo 9.	cDNA sentezi için kullanılan kitin protokolü	18
Tablo 10.	qRT-PCR için kullanılan kitin protokolü	19
Tablo 11.	qRT-PCR Koşulları	19
Tablo 12.	qRT-PCR primer listesi	19

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.	10 mM (Yüksek) ve 1 mM (Düşük) Glukoz içeren besiyerlerinde K-562 hücrelerinin proliferasyonu.	22
Resim 2.	10 mM (Yüksek) ve 1 mM (Düşük) Glukoz içeren besiyerlerinde NB-4 hücrelerinin proliferasyonu.	22
Resim 3.	10 mM (Yüksek) ve 1 mM (Düşük) Glukoz içeren besiyerlerinde HL-60 hücrelerinin proliferasyonu.	23

1.GİRİŞ

Kanser hücreleri kontrolsüz çoğalma ile karakterize olup normal hücrelerden; hücrenin büyümesini sürdürmesi, büyümeyi baskılayıcı faktörlerden kaçınması, apoptoza karşı direnci, immortal şekilde çoğalmayı başlatması, anjiyogenezi uyarması ve invazyon ile metastazı aktif hale getirmesi özellikleriyle ayrılır. (1, 2) (Şekil 1). Bu özelliklerin dışında, kanserli hücrelerin (kendi) enerji metabolizmalarını yeniden programlamaları ve bağışıklıktan sisteminden etkilerinden kaçınmaları da oldukça önem kazanmıştır. Kanser hücrelerinin normal hücrelere oranla daha fazla glukoz kullandığı ve hızlanmış bir glikolitik metabolizmaya sahip oldukları Otto Warburg tarafından 1920'li yıllarda gösterilmiştir (3). Aerobik glikolizin Warburg efekti olarak da adlandırılan bu fenomende aslında ortamda glukoz fazlasıyla yeterlidir; fakat hızlanmış glikoliz nedeniyle normal TCA siklusu çok az (~%5) kullanılır. Özellikle hızlı büyüyen ve gelişen kontrolsüz çoğalmalarda, Warburg efekti diye adlandırılan (totalde substrat düzeyinde 4 ATP sentezi olan) aerobik şartlardaki anaerobik glikoliz hakimdir. Bu durum sonraki yıllarda farklı araştırmacılar tarafından da doğrulanmıştır (4). Bu tezde aerobik glikoliz olarak kastettiğimiz süreç Warburg efekti olarak adlandırılan durumu belirtmektedir. Bilindiği gibi kontrolsüz çoğalmalarda glukoz ihtiyacı artmaktadır. Bu hücreler büyüme ve sağkalım için aerobik glikolizi (WE) tercih etmektedirler. Gerekli enerjinin aerobik glikolizden (WE) karşılanması şu şekilde açıklanmaktadır; kanser hücreleri, ortamdaki glukozun sınırsız olması nedeniyle kısa sürede enerji ürettiği (4 ATP) glikolizi tercih eder. Çünkü gerçek aerobik glikoliz (TCA) hem daha fazla zaman gerektirir hem de oksidatif fosforilasyon (ETZ) işlemlerine ihtiyaç duyar. Bu nedenle bu hücreler yüksek enerji elde edilse de TCA+ETZ işlemlerini tercih etmemektedir (5). Az enerji elde edilen ama çok daha hızla gerçekleşen glikolizi kullanmaktadır.

Artan glukoz kullanımıyla birlikte, hücrelerin çoğalmasında veya inhibisyonunda görevli sinyaller metabolik yolların da düzenlenmesinde görev alır (6). Hücre çoğalması veya inhibisyonu ile ilgili genlerdeki mutasyonlar sonucu bazı hastalıklar gelişebilir (7). Akut Myeloid Lösemi (AML) bu hastalıklardan birisidir ve kan hücrelerinin anormal üretimi ile karakterizedir. AML gelişiminde Flt3, Ras, c-Kit, JAK2, RUNX1, C/EBP α , p53, NPM ve MLL genlerinde mutasyon olduğu

gösterilmiştir (8). Bu genlerden bazıları hücre çoğalması ve inhibisyonunda yer alırken, bazıları ise metabolik yollardaki işlemlerle ilgilidir. Glukoz metabolizmasında yer alan genlerin AML' de hücre proliferasyonunda etkili oldukları bilinmektedir (9). Buna örnek olarak, glikolizde yer alan ve piruvat kinaz enzimini kodlayan PKM2 genini gösterebiliriz. Tümörigenez sırasında, PKM2 geninde normal dışı (genellikle indüksiyon) aktivasyon gözlenmektedir (10).

Glukozun kanser hücrelerine alınması normal hücrelerde olduğu gibi özel taşıyıcı proteinlerle gerçekleşir. Bu proteinler GLUT protein ailesidir (11). GLUT ailesinin on dört üyesinden, GLUT1 ve GLUT3 kanser hücrelerinde en fazla eksprese olan taşıyıcılardır (12). Glukoz taşıyıcı proteinlerin ve özellikle GLUT3'ün kanser hücrelerinde artmış ekspresyonları gösterilmiştir (13). Ancak kanser hücrelerinde GLUT3 ekspresyonunu düzenleyen p53, HIF1a, AKT ve myc gibi genler üzerinde araştırmalar yapılmıştır fakat üzerinde henüz yeterince çalışılmamış birçok gen de bulunmaktadır (14,15).

STAT proteinlerinin tümör proliferasyonu ve sağkalımına ek olarak, kanser metabolizmasında da merkezi bir rol oynadığına dair çalışmalar mevcuttur (16,17). STAT proteinleri, Interferon (IFN) sinyal yollarının anahtar bileşenleri olarak tanımlanan transkripsiyon faktörleri ailesindendir (18). Tirozin kinaz üzerinden uyarılarak fosforile olan STAT, dimer oluşturarak STAT-DNA yanıt elemanlarına bağlanır, böylece gen ekspresyonunu doğrudan düzenler (19). STAT proteinlerinde biri olan STAT3'ün mutant formunun kanserlerdeki artmış ekspresyon ile onkogeneze rol oynayan proteinlerden biri olduğu gösterilmiştir (19).

Bu tez çalışmasının amacı, düşük glukoz konsantrasyonlarında NB-4, K-562, HL-60 hücre hatlarının, hücre çoğalması ve canlılıkları ile GLUT3, PKM2 ve STAT3 gen ekspresyonlarındaki değişimin araştırılmasıdır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Kanser

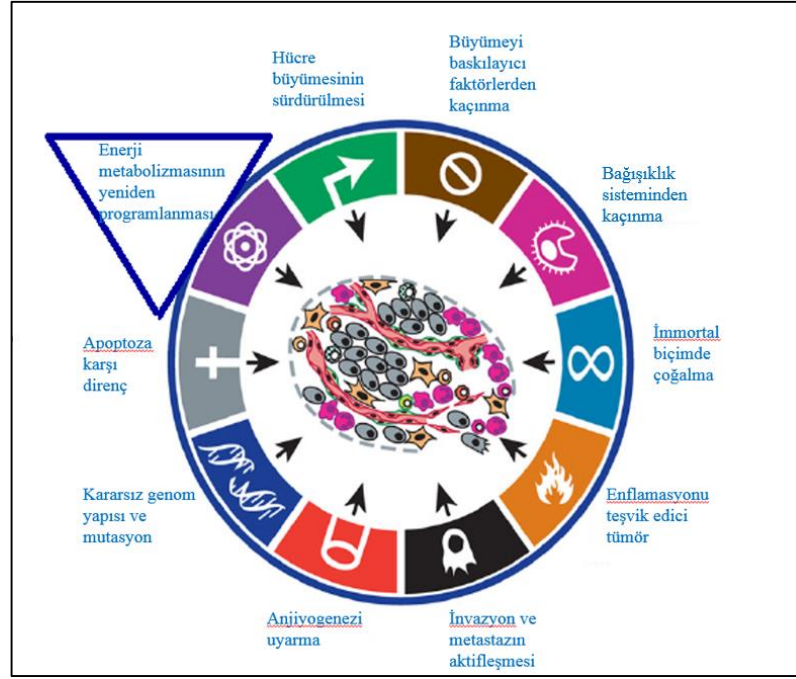
Kanser, somatik hücrelerde meydana gelen kontrolsüz hücre bölünmesi ve büyümesini içeren genetik bir hastalıktır (1, 21). Hücrelerde, hücre döngüsünün kritik kontrol mekanizmalarından birisi olan DNA replikasyonunun S fazı sırasında, oldukça fazla ve sürekli aralıklarla gerçekleşen kontrol seviyelerine rağmen hatalar meydana gelebilir (22). Bu hatalar, kromozomal kırıklar, translokasyonlar ve delesyonlar olabilir. Mutasyon olarak adlandırılan bu değişimlere kimyasal ajanlar, X-ray ve UV ışınlarını içeren radyasyon gibi faktörler de neden olabilmektedir (1, 21). Kanser daha çok edinsel olarak oluşmaktadır; kalıtsal olarak mutasyon aktarımı ilginç bir şekilde %5 civarında bildirilmektedir (23).

Proto-onkogenler, DNA tamir genleri ve tümör süpresör genlerde meydana gelen mutasyonlar kanser oluşuma neden olabilir (24). Proto-onkogenler, normal büyüme ve farklılaşmayı da sağlayan genlerdir. Bu genler mutasyon sonucunda onkogenlerine dönüşerek hücrenin kontrolsüz büyümesine ve çoğalmasına neden olur (24, 25). Tümör süpresör genler ise hücre bölünmesini baskılar ve transkripsiyonu, hücre farklılaşmasını, apoptoz süreçlerini düzenleyen sinyal iletim yollarını düzenler (24). Mutasyon sonucunda tümör süpresör genler inaktif hale gelebilirler.

2.1.1.Kanser Genetiği

Genetik değişiklikler sonucu meydana gelen mutasyonlar normal hücrelerin gelişim ve hücre farklılaşma süreçlerinde regülasyon bozukluklarına yol açarak hücrelerde maligniteye neden olabilir. Kanser oluşumundaki somatik mutasyonların çoğu onkogenlerde ve tümör süpresör genlerde gerçekleşir. Proto-onkogenler, değişerek (aşırı uyarılma, mutasyon vb. sonucunda) aktifleşir ve onkogenine dönüşürler.

Kanser oluşumunda, tümör süpresör genlerin işlevlerini yitirmelerine sebep olan mutasyonlar da rol almaktadır. (25, 21).



Şekil 1. Kanserin özellikleri (Hanahan, 2011, 668)

2.1.1.1. Proto-onkogenler

Proto-onkogenler normal hücrelerde büyüme ve proliferasyonu düzenleyen genleri içeren sinyal yollarında yer alan genlerdir. Proto-onkogenlerin fonksiyonlarını kaybedecek mutasyonlara uğramasıyla, onkogenler aktif hale gelir. Proto-onkogenler, bir hücrenin kanserli olmasına neden olabilir. Bu mutasyonlar çoğu durumda, DNA dizisinin değişmesi sonucunda oluşan bozuk fonksiyonlu bir protein (işlevsiz, az işlevli vb.) üretimine neden olur. Sonuçta bu durum hücreye zararlıdır ve olasılıkla hücrenin hücre döngüsünü tamamlamasını önler. Bununla birlikte, mutasyonun yerine, şekline ve ortaya çıkış özelliklerine göre organizma zarar görmeyebilir. Bir hücre üremezse, mutasyon yayılmaz ve hasar minimum düzeydedir. Bununla birlikte, nadiren, bir gen mutasyonu, bir pozitif regülasyonun aktivitesini artıran bir değişikliğe neden olur. Hücre döngüsü düzenlemesinde yer alan bir protein olan Cdk'nin, hücre döngüsünü ilerletebilmesi için etkinleştirilmesine izin veren bir mutasyon buna örnektir. Cdk örneği proto-onkogen olarak kabul edilen birçok genden sadece biridir. Ayrıca en çok bilinen proto-onkogenlerden Ras ve Myc genleri hücrelerde sinyal iletimi ve proliferasyonda rol oynar (22).

2.1.1.2.Tümör Süpresör Genler

Tümör süpresör genler, normal hücrelerde bölünmeyi baskılayan bir grup genden oluşur. Bu genlerdeki işlev kayıpları kontrolsüz hücre bölünmesiyle birlikte tümör oluşumuna neden olur. En bilinen tümör süpresör gen protein bozukluğu olan, retinoblastoma hastalığında; RB1 proteini, p53 ve p21'in ortak etkileri sonucunda, belirli olaylar tamamlanıncaya kadar hücre döngüsünün ilerlemesi durdurulmaktadır. Tümör süpresör genlerinden biri mutasyona uğramış bir hücre, hücre döngüsünü durduramayabilir. Mutasyona uğramış p53 genleri, tüm insan tümör hücrelerinin yarısından fazlasında tanımlanmıştır. P53 geni, hücre döngüsünü durduran (DNA onarımı için zamana izin veren) genleri, DNA onarımına katılan genleri veya DNA hasarı onarılamadığında hücre ölümünü başlatan genleri aktive eder (22).

2.1.2.STAT3

STAT transkripsiyon faktörlerinin, ilk olarak 1990'ların başında, interferon uyarısından sonra, transkripsiyona aracılıkta rol aldıkları gösterilmiştir. 1990' lardan itibaren tanımlanan JAK-STAT' lar olarak bilinen sinyal yolunda görev alan 4 JAK proteini (JAK 1-3, TYK2) ile sitoplazmada bulunan 7 adet STAT geni (STAT 1-4, STAT5a, STAT5b, STAT6) belirlenmiştir (12, 26).

STAT proteinleri sitoplazmik sinyal proteinleri ve nükleer transkripsiyon faktörleri olarak 2 şekilde işlev görürler (18). Normal hücrelerde STAT proteinleri, hücre transmembran reseptörüne bağlanan ligandın çeşidine göre ligand ile nükleus arasında doğrudan iletişimi sağlayarak hedef gen ekspresyonunu artırır veya inhibe ederler (27). STAT proteinleri kanser gelişiminde rol oynayan çeşitli genlerin aktivasyonunu sağlamasıyla onkojenik özellik kazanır. Onkojen STAT proteinlerinin sürekli aktivasyonu kanser hücrelerinin proliferasyonunu, büyümesini ve sağkalımını doğrudan etkiler (18).

STAT proteinleri taşıdıkları 6 ayrı domain yardımıyla hem kendi aktivasyonlarını hem de hedef molekül aktivasyonunu sağlarlar. Bu yapılar sırasıyla dimerizasyonun gerçekleştiği N-terminal domaini, sarmal bobin domaini, DNA bağlanma domaini, reseptör bağlanma dimerizasyon bölgesi olan SH2 (Src-homoloji) domaini, C-terminal domaini ve transaktivasyon domainlerini içerir (26). STAT' ların normal ve kanser hücrelerinde yapısal olarak aktif hale gelmesinde, JAK proteinleri aracılı fosforilasyonları ve dimerizasyonları söz konusudur (28). Sitokinler ve büyüme

hormonları gibi ligandlar, hücre yüzeyi transmembran proteinlerine bağlanarak, JAK proteinlerinin fosforilasyonu sağlarlar. Bu fosforilasyon JAK proteinlerinin aktivasyon bölgesi üzerinden tirozin rezidülerinde gerçekleşir (12, 18, 26). Bu fosforilasyon STAT proteinlerinin SH2 (Src-Homoloji domain 2) domaini için bağlanma bölgelerini oluşturur (26). SH2 domaini ilgili bölgelere bağlandıktan sonra, STAT monomerleri dimer haline gelir. Oluşan STAT dimerleri sitoplazmadan nukleusa translokasyon yaparlar. Ardından bu STAT dimerleri, nükleer lokalizasyon sinyal (sarmal bobin) domainleri ile DNA üzerindeki yanıt elemanlarına (HYE:palindromik yapı) bağlanırlar. Bu bağlanma yerleri promotor bölgeye çok yakındır. Transaktivasyon domaini ile C terminal domainininin Serin-727 pozisyonunda fosforilasyonu ile birlikte, hedef genlerin transkripsiyon uyarılır (28, 18).

Özellikle STAT3' ün Serin-727 fosforilasyonu ile hücrelerde enerji metabolizmasını düzenleyerek çoğu durumda hücrenin hayatta kalmasını, çoğalmasını ve maligniteyi teşvik ettiği bilinmektedir (26).

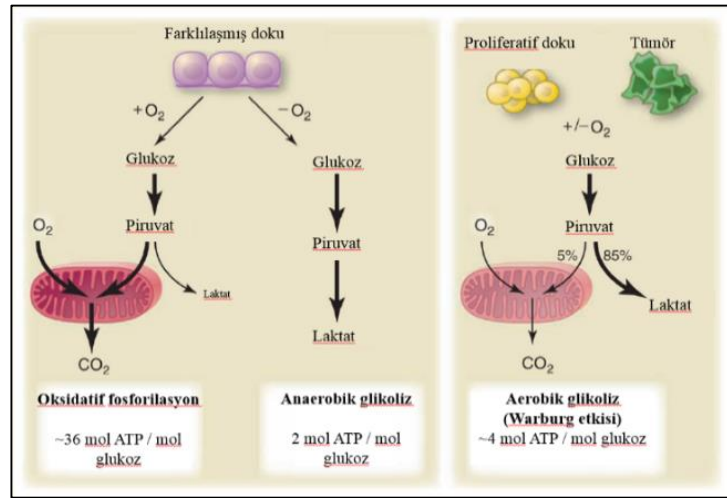
2.2.Kanser Metabolizması

Kanser hücreleri; hücrenin büyümesini sürdürmesi, büyümeyi baskılayıcı faktörlerden kaçınması, apoptoza karşı direnci, immortal şekilde çoğalmayı başlatması, anjiyogenezi uyarması ve invazyon ile metastaz oluşturması gibi kendilerini normal hücrelerden ayıran özelliklere sahiptirler. Bu özelliklerin yanısıra bağışıklık sisteminden kaçınma ve hücresel metabolizmalarını yeni ortam koşullarına adapte edebilmeleri özellikleri vardır (2).

Kanser metabolizması hakkındaki ilk çalışma 1920' lerde Alman Fizyolog Otto Warburg tarafından yapılmıştır (29, 30, 6). Yaptığı çalışmalarda tümörlerin, ortamdaki O₂' ye maruz kalmasına rağmen, fazla miktarda glukoz tüketerek, laktat sekresyonunu gerçekleştirdiği ve normal oksidatif fosforilasyondan yararlanmadığını göstererek; ilaveten bu hücrelerin mitokondrilerindeki hasarlardan dolayı az verimli olan glikolizi seçtiğini öne sürmüştür (31, 17, 32, 33). Daha sonra yapılan çalışmalarda, "Warburg etkisi" olarak adlandırılan aerobik glikolizin hakim olma nedeninin, oksidatif fosforilasyondaki (mitokondri) bozukluktan ziyade, artan

biyosentez ihtiyacının hızlı bir şekilde giderilmesi amacıyla olduğu gösterilmiştir (31, 34, 35, 36, 37) (Şekil 2).

İleriki yıllarda yapılan diğer çalışmalarda da çoğu tümör hücresinde oksidatif fosforilasyonun kusurlu olmadığı ancak hücrelerin yine de aerobik glikolizi tercih ettiği gösterilmiştir (15, 37, 38, 39). Kanser hücrelerinin bu metabolik değişimi, onkojenlerin hem doğrudan hem de dolaylı etkisi sonucunda ortaya çıkabilir (31).



Şekil 2. Warburg etkisi (Vander Heiden, 2009, 10)

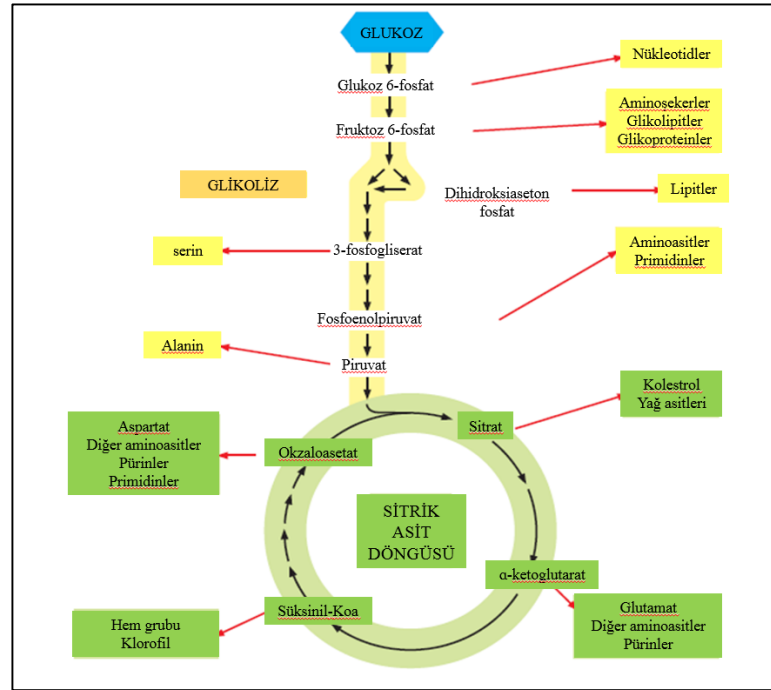
2.3. Glukoz Metabolizması

Glikoliz, hücre metabolizmasına enerji sağlamak için glukozun hücre içine, alınarak piruvata dönüşmesine yol açan tek bir olaylar zinciri olarak tasvir edilmesine rağmen bir dizi glikolitik ara ürünle farklı biyosentetik öncüller üreten bir yoldur (31).

Anaerobik koşullarda ise glukoz piruvat üzerinden laktata dönüşür. Esasen glukozdan piruvat oluşuncaya kadarki reaksiyonlar anaerobik koşullarda ve aerobik koşullarda aynıdır. Glikoliz sırasında, altı karbonlu bir glukoz molekülü, her biri üç karbon atomu içeren iki piruvat molekülüne dönüştürülür. Her glukoz molekülü için, 2 ATP molekül başlangıç aşamalarını yönlendirerek enerji sağlamak üzere hidrolize edilir, ancak sonraki adımlarda 4 ATP molekülü üretilir. Glikolizde moleküler oksijen kullanılmamasına rağmen, oksidasyon meydana gelir. Bu elektronlar NAD^+

(NADH üreten) tarafından glukoz molekülünden türetilen bazı karbonlardan sağlanır (21).

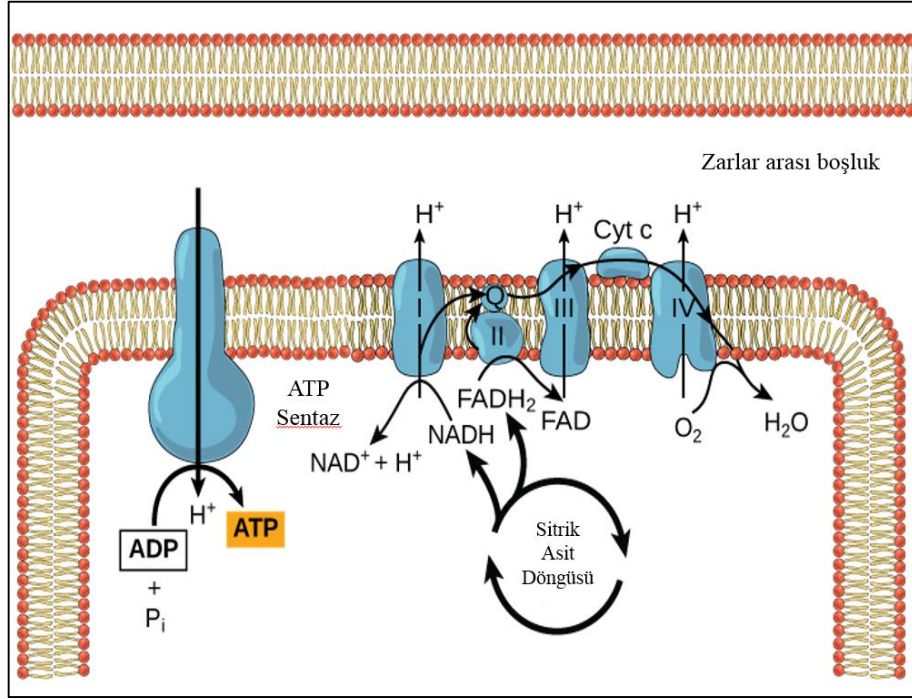
Glikolizin sonunda üretilen piruvat molekülleri, mitokondri içine taşınır. Mitokondride, piruvat, koenzim A (CoA) tarafından toplanacak olan iki karbon asetil grubuna (bir karbon dioksit molekülü çıkarılarak) dönüştürülecektir. Sonucunda elde edilen Asetil CoA bileşiği hücre tarafından çeşitli şekillerde kullanılabilir, ancak asıl işlevi, glukoz katabolizmasında piruvattan türetilen asetil grubunu sitrik asit döngüsüne iletmektir. Piruvatın asetil CoA'ya dönüşümü gibi, sitrik asit döngüsü de mitokondri matrisinde gerçekleşir (22).



Şekil 3. Glikoliz ve Oksidatif Fosforilasyon reaksiyonları (Alberts, 2015, s:85, 98)

Glikoliz ve sitrik asit döngüsü sırasında substrat düzeyinde ATP az miktarda üretilirken, ATP' nin çoğu sitrik asit döngüsü sırasında oluşan NADH VE FADH₂ moleküllerindeki hidrojen atomlarının protonları ve yüksek enerjili elektronlarının bir seri kimyasal reaksiyondan sonra son elektron alıcısı oksijene geçmesiyle başlayan bir süreçten kaynaklanır. Oksidatif fosforilasyon olarak adlandırılan bu olay

mitokondrinin iç zarında yerleşik halde bulunan protein komplekslerinde gerçekleşir. Elektron taşınımını sağlayan bu komplekslerin tamamına Elektron Taşıma Sistemi denir (22) (Şekil 3).



Şekil 4. Elektron Taşıma Sistemi (Fawler et al, 2013, s:112)

2.3.1. Glukoz Taşıyıcıları

Çoğu memeli hücresi, canlılıklarını ve metabolizmalarını sürdürebilmek sürekli olarak glukozu ihtiyaç duyar (11).

Glukoz hidrofilik bir bileşiktir; basit difüzyon ile lipit çift tabakasından geçemez ve bu nedenle sitosol içine spesifik taşınması için özel taşıyıcı proteinler gerektirir. İnce bağırsak lümeninde ve böbreğin proksimal tübüllerinde polarize epitelyal hücrelerde enerji bağımlı bir Na^+ /glukoz (GLUT 2) ko-transporter bulunur. Sadece yukarıda sözü edilen hücrelerde bu transporter, glukoz alımını sağlamak için Na^+ 'nın elektro-kimyasal gradyanından faydalanır. Yaygın bir glukoz taşıma sistemi de mevcuttur. Tüm memeli hücreleri, GLUT olarak adlandırılan proteinlerden, bir veya daha fazla üyesini içerir (40). İnsanlarda farklı genler tarafından kodlanan, glukoz ve diğer

heksoz taşıyıcıları için farklı afinitelere sahip 14 glukoz taşıyıcı izoform 3 farklı grupta incelenir;

1-I. Grup: GLUT1, GLUT 2, GLUT 3, GLUT 4, GLUT 14

2-II.Grup: GLUT 5, GLUT 7, GLUT 9, GLUT 11

3.III.Grup: GLUT 6, GLUT 8, GLUT 10, GLUT 12, GLUT 13 (HMIT) (41).

Her bir glukoz taşıyıcısı, dokuya spesifik ekspresyon, metabolik ve hormonal regülasyona cevap bakımından birbirinden farklı zar proteinleridir.

Tablo 1. Glukoz taşıyıcı ailesi ve eksprese oldukları dokular

Glukoz Taşıyıcı Protein Tipi	Ekprese olduğu doku
GLUT1	Bütün dokularda (Beyin ve eritrositlerde daha yüksek ekspresyon)
GLUT2	Karaciğer, Pankreas, Retina
GLUT3	Beyin
GLUT4	İskelet Kası, Yağ, Kalp
GLUT5	İnce bağırsak, Testis, Böbrek
GLUT6	Dalak, Lökosit Hücreleri, Beyin
GLUT7	İnce Bağırsak, Prostat
GLUT8	Testis, Beyin
GLUT9	Karaciğer, Böbrek
GLUT10	Karaciğer, Pankreas
GLUT11	Kalp, Yağ
GLUT12	Kalp, İskelet Kası
GLUT13 (HMIT)	-
GLUT14	-

2.3.2.Kanser Hücresinde Glukoz Metabolizması

Normal hücreler proliferasyonları ve büyümeleri için lipidler, proteinler ve nükleotidler gibi yapı taşlarının biyosentezini karşılamak amacıyla besinlere ve enerjiye ihtiyaç duyarlar. Glukoz, karbon iskeletinin kontrollü oksidasyonu ile NADH ya da FADH₂ formunda, elektronların elektron taşıma zinciri (ETZ) geçişi ile

ATP oluşumu sağlayarak gerekli enerji üretilmesinde önemlidir (31,42,43). Ayrıca glukozun piruvata dönüşümü sırasında üretilen ara maddeler normal hücre proliferasyonunu destekler (17, 44, 14). Normal hücrelerde glukoz esas olarak glikoliz ile katabolize olarak piruvat üretilir (33, 45). Hipoksik durumda bu piruvat üretimi laktata dönüşür. (46). Fakat kanser hücreleri hem hipoksik hem de hipoksik olmayan ortamlarda, enerji üretimi az olan glikolizi (aerobik glikoliz WE) seçerler. Buradaki amaç hızla artan hücre kitlesinin ihtiyaçlarını kısa sürede karşılamaktır (6, 47, 36).

Tümör hücresi proliferasyonu sırasında lipitler, proteinler ve nükleotidler gibi makromoleküllerin hızlı sentezi gerekir (48, 49). Gereken makromolekül sentezi için farklı kanser hücreleri aminoasitleri, nükleotidleri ve yağ asitleri gibi molekülleri besin olarak kullanır (17, 33). Normal hücrelerde olduğu gibi kanser hücrelerinin proliferasyonları ve sağkalımları için yüksek enerji gerekir (50,51). Kanser hücreleri ihtiyaçları olan enerjinin karşılanabilmesi için kullanılan aerobik glikoliz (WE), oksidatif fosforilasyondan çok daha az verimlidir ve 36 ATP yerine sadece net 2 ATP üretir (52, 14). Bu ATP' ler kanser hücrelerinin metabolik olarak değişen şartlara göre programlanmasını ve yaşamsal ihtiyaçlarını karşılamaları için kullanılır. Aerobik glikoliz (WE), normal glikoliz ve TCA+ETZ' de üretilmeyen ATP eksikliğini telafi etmek için, gerekli glukoz alımını ve glikolitik enzimleri kodlayan genleri regüle eder ve hücre içine glukoz alımı artmış olur (53).

Kanser hücrelerinin artmış glukoz kullandığı bilgisinden yola çıkılarak; kanserin teşhisinde glukoz analogu olan Flor-18 işaretli florodeoksiglukoz (F-18DG) yöntemi geliştirilmiştir (54, 55 ,56, 57).

2.4.Lösemi

Kanda ve kemik iliğinde bulunan kan hücrelerinin yapımı (hematopoiezis) sırasında progenitör hücrelerin (blast) DNA' larında oluşan bir hasar neticesinde ortaya çıkan blastların olgunlaşma süreçlerinde meydana gelen bozunma lösemi olarak tanımlanmaktadır (8, 1). Blastlar (progenitör hücreler) kontrolsüz olarak çoğalarak lösemi hücrelerini oluştururlar ve işlevsizdirler. Lösemi hücreleri kontrolsüz çoğalarak, normal lökositlerin yerini alır; kanda ve kemik iliğinde birikirler. Oluşan

lösemi tipleri kaynaklanan hücreye ve patofizyolojisine göre birbirinden farklı olabilir (58, 59).

Lösemi ve lenfomalarda farklı formlarda oldukça spesifik kromozom translokasyonları belirlenmiştir (1). Bu translokasyonlar, blastların yenilenme ve farklılaşmalarıyla ilgili genleri içerir (8, 7).

Lösemilerin 4 ana tipi vardır;

1-AML (Akut miyeloblastik lösemi): Lökositlerden, graülosit (bazofil, nötrofil, eozinofil) ve monositlerin progenitör hücrelerinde genetik mutasyon sonucu ortaya çıkar (58,59). Kromozom t(22;9) translokasyonu (Phidelpia kromozomu) ve kromozom 5 ve 7 delesyonları sonucu oluşabilir (60, 61).

2-APL (Akut premyoblastik lösemi): AML' ye göre daha az progenitör hücre mutasyona uğrar.

3-ALL (Akut lenfoblastik lösemi): Lenfositlerin progenitör hücrelerinde genetik mutasyon sonucu ortaya çıkar (59).

-B-prekürsör Lenfoma (%75)

-T- prekürsör Lenfoma (%20)

-Burkitt Lenfoma (%5)

4-CML (Kronik miyeloblastik lösemi): Özellikle granülösitlerin progenitör hücrelerinde kromozom t(22;9) translokasyonu (Phidelpia kromozomu) ile oluşur (61).

Normal fonksiyon göremeyen (undiferensiye) lenfosit ve lökositlerden dolayı immün sistem bozulur; organizma enfeksiyonlara karşı savunmasız kalır. Kemik iliğinde artan lösemi hücreleri nedeniyle, kemik iliğindeki normal eritrosit ve trombositler baskı altına alınır yapılarında bozulma görülebilir (58).

Alkilleyici ajanlar, kimyasal ajanlar, Topoizomeraz II inhibitörleri, benzen, iyonize radyasyon, ve viral ajanlar da lösemilere neden olabilmektedir (1).

Akut lösemilerin, kompleks ve heterojen yapıları, terapötik tedavilerinin geliştirilmesinde zorluklara neden olabilmektedir (7, 58).

Lösemi hücrelerinin yüksek glikolitik metabolizması, bu hücrelerin genel anlamda metabolik regülasyon çalışmaları için uygun deney modelleri haline getirmektedir (9, 1).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

“Lösemi hücre hatlarında glukoz kısıtlamasında STAT3 gen ekspresyonlarının araştırılması” isimli çalışmamız İstanbul Medeniyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Birimi (Proje No:1109) tarafından desteklenmiştir.

3.1.Gereçler

3.1.1.Kimyasallar

Tablo 2. Çalışmada kullanılan Kimyasallar

Ürün	Marka
Tris-HCl	Fisher
Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Fisher
DMSO	Fisher
RPMI1640 w/o L-glutamin, glukoz	PAN Biotech
Glukoz Solüsyonu	Gibco
RPMI 1640 w/o L-glutamin	Gibco
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) w/o Mg ⁺² Ca ⁺²	Gibco
Fetal Bovin Serum (FBS)	Sigma
Penisilin/Streptomisin	Sigma
L-glutamin	Gibco
SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
Etanol (C ₂ H ₅ O)	Merck

3.1.2.Kitler

Tablo 3. Çalışmada kullanılan Kitler

Ürün	Marka
Amplex (R) Red Glukoz Ölçüm Kiti (500)	Invitrogen
RNeasy Plus Mini Kit (50)	Qiagen
WST-1 Hücre canlılığı kiti (500)	İntron Biotechnology
QuantiTect Rev. Transcription Kit (50)	Qiagen
High-Capacity RNA-to-Cdna Kit (50)	Applied Biosystems

3.1.3.Cihazlar

Tablo 4. Çalışmada kullanılan Cihazlar

Cihaz	Marka
Distile Su cihazı	Millipore Elix
Qubit florometre	Invitrogen
Real-Time PCR cihazı	Qiagen Rotor Gene Q
Nanodrop	Denovix DS-11
MultiSkanGo Plate Reader	Thermo Scientific
Kar-Buz makinesi	Brema
Laminer FLOW Kabin Class II	Thermo Scientific
CO ₂ İnkübatör	Thermo Scientific
Santrifüj	Beckman Coulter
Santrifüj	Hettich MIKRO 120
İnvert Mikroskop	Zeiss
Derin dondurucu -86°	Panasonic
No frost Buzdolabı (+4,-20)	Bosch
PipetAİd	Eppendorf
Thermal Cyclers	BioRad

3.1.4.Sarf Malzemeler

Tablo 5. Çalışmada kullanılan Sarf Malzemeler

Malzeme	Marka
Serolojik Pipetler (5, 10, 25 ml)	SPL Life sciences
Falkon Tüpleri (15, 50 ml)	CAPP®
Hücre Kültür Flaskları (T25, T75)	SPL Life sciences
Petri Kapları (100mm)	
Well Plate (6, 12,96)	SPL Life sciences
Mikropipet Uçları (10, 200, 1000µl)	
Mikro Santrifüj Tüpleri (1,5 ml)	
Pudrasız Eldiven (S, M, L)	
Solüsyon Rezervuarı (50 ml)	
80-well Mikro Santrifüj Tüp Rakları	
96-well Pcr tüp Rakları	
Kriyojenik tüp (2ml)	Corning
8-stripli Pcr Tüpleri	Thermo Scientific

3.2.Yöntem

3.2.1.Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan bütün hücre hatlarına, %10 FBS (Sigma), %1 penisilin/streptomisin (Sigma), %1 L-glutamin içeren RPMI 1640 (Gibco) besiyeri kullanılmıştır.Hücreler %5 CO₂'li ortamda kültüre edilmiştir. Çalışmada kullanılan hücre hatları listesi tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan Hücre hatları

Hücre Hattı	Hücre Tipi
K-562	Lösemi
Nb-4	Lösemi
HL-60	Lösemi

3.2.1.1.Düşük Glukozlu Hücre Kültürü

Tablo 7. Düşük ve normal (yüksek) glukozlu besiyeri hazırlanması

1 mM Glukoz İçeren Besiyeri	10 mM Glukoz İçeren Besiyeri
RPMI 1640 besiyeri (glukoz ve glutamin içermeyen)	RPMI 1640 besiyeri (glukoz ve glutamin içermeyen)
%10 FBS	%10 FBS
%1 pen/strep	%1 pen/strep
%1 L-glutamin	%1 L-glutamin
1 mM Glukoz (1M Stok solüsyonu)	10 mM Glukoz (1M Stok solüsyonu)

3.2.2.Hücre Sayımı

Lösemi hücre hatlarında deneyler için hücre ekimi ile düşük ve yüksek glukozlu besiyerlerinde hücre proliferasyonunu gözlemlemek için manuel olarak Thoma lamı ile hücre sayımı yapıldı.Hücrelerden sayım için homojen şekilde 500 µl alınarak 20 µl Thoma lamına yüklenerek sayılacaktır. Alınan partikül sayısından mililitredeki hücre sayısı aşağıdaki gibi hesaplandı.

Hücre sayısı (mL)= Sayılan partikül sayısı× 10⁴ x (dilüsyon kat sayısı)

3.2.3.Wst-1 ile Hücre Canlılığı Ölçümü

Hücre canlılığı ölçümü için WST-1 Cell Proliferation Assay kit (İntron Biotechnology) kullanıldı. Protokol aşağıda verilmiştir.

Tablo 8. WST-1 Cell Proliferation Assay kit protokolü

Kit Bileşenleri	Hacim
Wst-1 Reagent	1 ml
Electro Containing Solution	100 µl

Hücrelerin kontrol ve deney grupları için uygun besiyerinde 20.000 hücre/ml olacak şekilde hazırlandı. 96 kuyucuklu platelere her kuyucuğa 100 µl hücre süspansiyonlarından ekim yapıldı.

Plate 3 gün 37°C’de, %5 CO₂’li etüvde inkübe edildi. 3. günün sonunda kitin protokolüne uygun 10 µl WST-1 solüsyon karışımından her bir kuyucuğa eklendi. 37°C’de %5 CO₂’li etüvde 2 saat inkübe edildikten sonra MultiSkanGo Plate Reader kullanılarak 440nm’ de absorbans ölçümü yapıldı. Rölatif canlılık değerleri hesaplanarak GraphPad Prism version6 ile grafik çizimleri yapıldı.

3.2.4.Real-time PCR

Glukoz taşıyıcı GLUT3 ve transkripsiyon faktörü STAT3 ile house-keeping gen olarak RPLP0 için primerler Primer3 programı ile dizayn edildi. Düşük ve yüksek glukozlu besiyerinde 3 gün inkübasyondan sonra hücreler toplanarak Real-time pcr ile gen ekspresyonları kontrol edildi.

3.2.4.1.RNA İzolasyonu

K-562, Nb-4 ve HL-60 hücre hatlarından RNA izolasyonu RNeasy Plus Mini Kit’ in protokolüne uygun yapıldı.

- ✚ Hücreler toplandıktan sonra 1500 rpm’ de 4 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra atık besiyeri uzaklaştırıldı.PBS ile yıkanarak tekrar 1500 rpm’ de 4 dk santrifüj edildi ve atık PBS uzaklaştırıldı.
- ✚ Pelletin üzerine 350 µl RLT lizis buffer ve 350 µl %70 Etanol eklendi. Yavaş bir şekilde birkaç defa pipetaj yapılarak pellet çözüldü.
- ✚ 700 µl Lizat RNeasy mini spin kolonun içinde bulunduğu toplama tüplerine transfer edildi. 13000 rpm’ de 15 sn santrifüj edildi.
- ✚ Kolonlar yeni toplama tüplerine transfer edilerek üzerlerine 700 µl RW1 wash buffer eklendi. 13000 rpm’ de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüplerindeki atık uzaklaştırıldı.
- ✚ Kolonlar tekrar aynı toplama tüplerine yerleştirildi ve üzerine 500 µl RPE buffer eklendi. 13000 rpm’ de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüplerindeki atık uzaklaştırıldı.
- ✚ Kolonlar tekrar aynı toplama tüplerine yerleştirildi ve üzerine ikinci kez 500 µl RPE buffer eklendi. 13000 rpm’ de 2 dk santrifüj edildi. Toplama tüplerindeki atık uzaklaştırıldı.

- ✚ Kolonlar yeni toplama tüpüne yerleştirilerek membranın kuruması için 13000 rpm’ de 1 dk tekrar santrifüj edildi.
- ✚ Kolonlar RNase-free mikrosantrifüj tüplere transfer edilerek üzerine 30 µl RNase-free su konuldu ve 13000 rpm’ de 1 dk santrifüj edildi.
- ✚ Santrifüjden sonra buz üstüne alındı ve konsantrasyonları nanodropla ölçüldü. Elde edilen Rna’ lar daha sonra Cdna sentezi için kullanılmak üzere -80°C’ ye kaldırıldı.

3.2.4.2.cDNA Sentezi

Elde edilen RNA’ lar High-Capacity RNA-to-Cdna Kit (Applied Biosystems) kullanılarak protokole uygun sentezlendi. Bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.

Tablo 9. cDNA sentezi için kullanılan kitin protokolü

Karışım Bileşenleri 1X (Hacim)	
2X RT Buffer Mix	10µl
20X RT Enzyme Mix	1µl
RNA Örneği	(1 µg/µl olacak şekilde hesaplama yapıldı.)
Nüklease-free su	
Total	20µl

Rna hacimleri üzerine total hacim 20 µl’ ye tamamlanarak Thermal Cycler’ da önce 37°C’ de 60 dk, sonra 95°C 5 dk inkübe edildi. İnkübasyon tamamlanınca Cdna’ lar 1:8 oranında Nüklease-free su ile dilüe edilerek qRT-PCR için kullanılmak üzere -20°C’ ye kaldırıldı.

3.2.4.3.qRT-PCR

qRT-PCR reaksiyonu SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) ile Qiagen Rotor Gene Q cihazı kullanılarak yapıldı. Çalışmada kullanılan primerler Tablo 9’ da verilmiştir.

Tablo 10. qRT-PCR için kullanılan kitin protokolü

qRT Karışım Bileşenleri	1X (Hacim)
SYBR® Green PCR Master Mix	10 µl
Primer Forward (10 µm)	0,5 µl
Primer Reverse (10 µm)	0,5 µl
cDNA	3 µl
dH ₂ O	6 µl
Total	20 µl

Tablo 11. qRT-PCR Koşulları

qRT Pcr Koşulları		
Başlangıç denatürasyonu	95°C	10 dk
Denatürasyon	95°C	15 sn
Bağlanma	60°C	60 sn
Sentez	72°C	15 sn
Bekleme	4°C	∞

Tablo 12. qRT-PCR primer listesi

Gen	Primer Yönü (5'3')	Primer Dizisi
RPLP0	Forward	AGCATCTACAACCCTGAAGTG
	Reverse	AGCAAGTGGGAAGGTGTAATC
GLUT3	Forward	TTCAAGAGCCCATCTATGCC
	Reverse	GACCAAGATAGCCCCAATACAG
STAT3	Forward	GACTACACTGGCAGAGAACTC
	Reverse	CTCCCGCTCCTTACTGATAAAG
PKM2	Forward	AAGTGTGACGAGAACATCCTG
	Reverse	ACCATTTTCCACCTCCGTC

3.2.5.Glukoz Tüketimi

Glukoz tüketimi Amplex (R) Red Glukoz Ölçüm Kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Protokol aşağıda verilmiştir.

1-Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

10 mM Amplex Red Reagent Solüsyonu

Kit içinde bulunan 5 tüp amplex red reagenttan 1 tüpünü ve DMSO' u oda sıcaklığına getirdik. 1 tüp reagent 60 µl DMSO kullanılarak çözüldü.

1X Reaction Buffer

5X Reaction buffer' dan 4 ml alınarak 16 ml dH₂O ile 1X buffer hazırlandı.
(10 ml stok solüsyonlarının hazırlanması, 10 ml örneklerde kullanım)

10 U/l Hrp Stok Solüsyonu

Hrp 1 ml 1X reaction buffer kullanılarak çözüldü. (-20°C' de saklandı.)

100 U/l Glukoz Oksidaz Stok Solüsyonu

Glukoz oksidaz 1ml 1X reaction buffer kullanılarak çözüldü.

400 mM (72 mg/ml) Glukoz Stok Solüsyonu

72 mg glukoz tartılarak 1ml 1X reaction buffer kullanılarak çözüldü.

2-Glukoz Tüketiminin Ölçümü

Glukoz Standart Eğrisinin Hazırlanması

Standart eğri için 0 µm,25 µm,50 µm,100 µm ve 200 µm glukoz konsantrasyonları kullanıldı.

Working Solüsyonu

Total 2.5 ml olacak şekilde 50 örneklik working solüsyonu hazırlandı.

-25 µl 10 mM Amplex Red Reagent Solüsyonu

-50 µl 10 U/l Hrp Stok Solüsyonu

-50 µl 100 U/l Glukoz Oksidaz Stok Solüsyonu

-2.375 ml 1X Reaction Buffer

Standartların ve örneklerin yüklenmesi

Örnekler her kuyucukta 50 µl olacak şekilde 1X reaction buffer kullanılarak 1:10 şeklinde dilüe edildi.

Standartlar ve örnekler well plate' in her kuyucuğuna 50 µl olarak yüklendi.

Üzerlerine 50 µl working solüsyonundan eklenerek 30 dakika oda

sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonundan ardından MultiSkanGo Plate Reader ile 560 nm’ de ölçüm yapıldı.

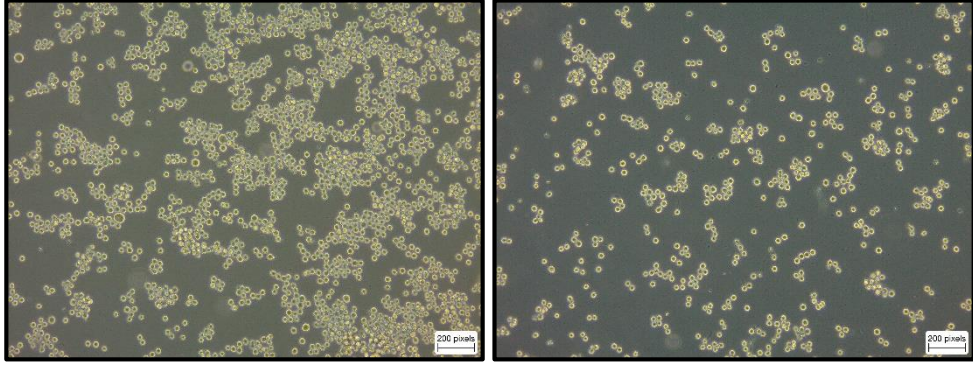
3.2.6.İstatistiksel Hesaplamalar

Elde edilen sonuçlardan her biri veri için Ortalama $\pm$ Standart Sapma olarak ifade edilmiştir. Farklı gruplar içinde ve arasında anlamlı bir fark olup olmadığını analiz etmek için Student’s t-test uygulanmıştır. Bütün analizler ve grafikler GraphPad Prism V6 programı kullanılarak yapılmıştır.

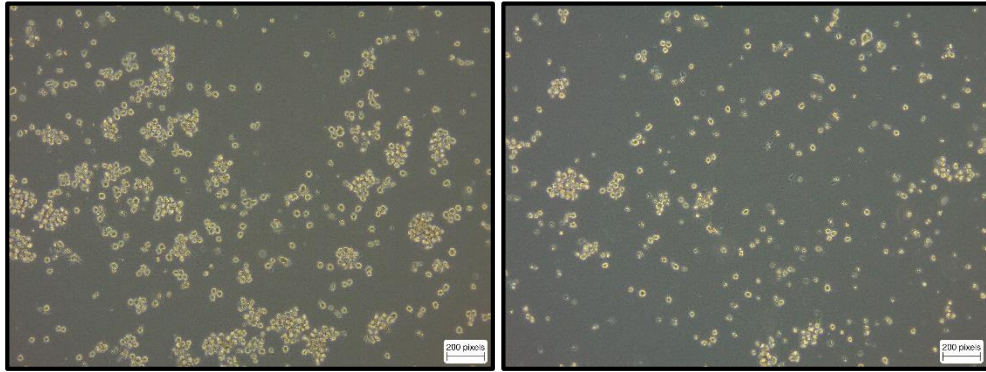
4.BULGULAR

4.1.Düşük Glukozlu Ortamda Hücre Proliferasyonu

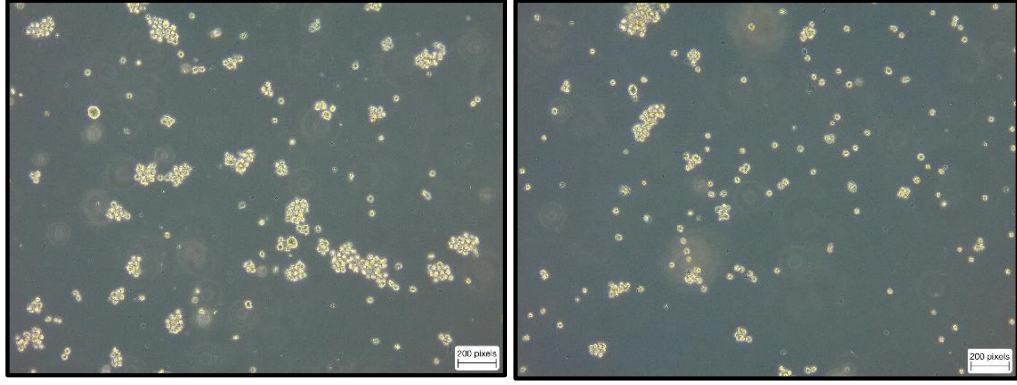
K-562, NB-4 ve HL-60 lösemi hücreleri, 10 mM (yüksek) ve 1 mM (düşük) glukoz içeren besiyerlerinde 72 saat inkübe edildi. Hücre proliferasyonları hücre sayım yöntemi ile belirlendi. Düşük glukozlu ortamda K-562 ve NB-4 hücre hatlarında hücre çoğalmasının azaldığı belirlendi ve istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.001$). HL-60 hücre hattında hücre sayısında azalma görülse de bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($^{ns}p \geq 0.05$) (Şekil 5).



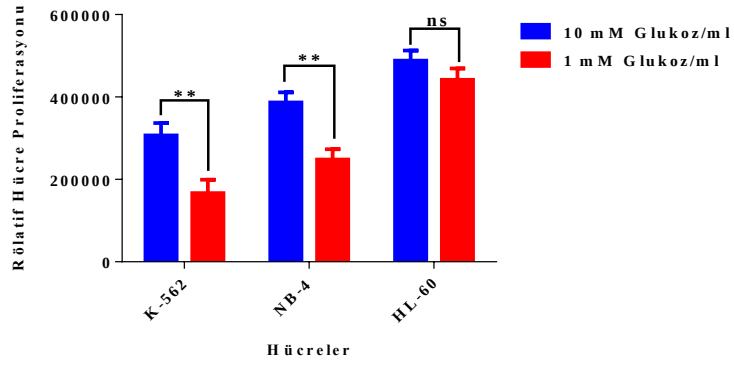
Resim 1. 10 mM (Yüksek) ve 1 mM (Düşük) Glukoz içeren besiyerlerinde K-562 hücrelerinin proliferasyonu.



Resim 2. 10 mM (Yüksek) ve 1 mM (Düşük) Glukoz içeren besiyerlerinde NB-4 hücrelerinin proliferasyonu.



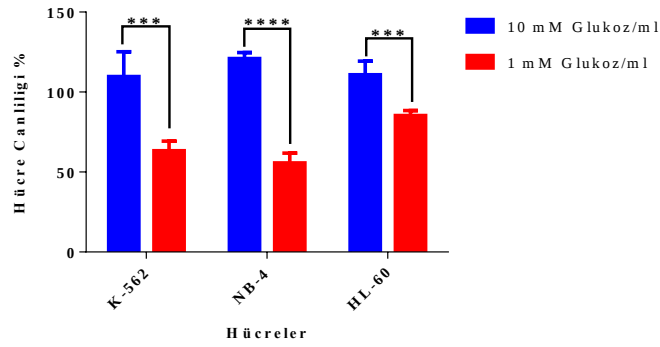
Resim 3. 10 mM (Yüksek) ve 1 mM (Düşük) Glukoz içeren besiyerlerinde HL-60 hücrelerinin proliferasyonu.



Şekil 5. 10 mM (Yüksek) ve 1 mM (Düşük) Glukoz içeren besiyerlerinde hücre proliferasyonu. 20000 hücre/ml şeklinde 72 saat inkübe edildiler. (** $p < 0.01$, $^{ns}p \geq 0.05$.)

4.2.Düşük Glukozlu Ortamda Hücre Canlılığı

K-562, NB-4 ve HL-60 lösemi hücrelerinin düşük glukozlu ortamda hücre canlılıkları WST-1 hücre canlılık testi ile ölçüldü. Düşük glukozda K-562 hücrelerinde canlılık oranı %100'den %58.36' ya, NB-4 hücrelerinde %46.21' ya ve HL-60 hücrelerinde %77.30' a düştüğü tespit edildi. Her üç hücre hattının düşük glukozlu ortamda hücre canlılıklarının azaldığı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$) (Şekil 6).

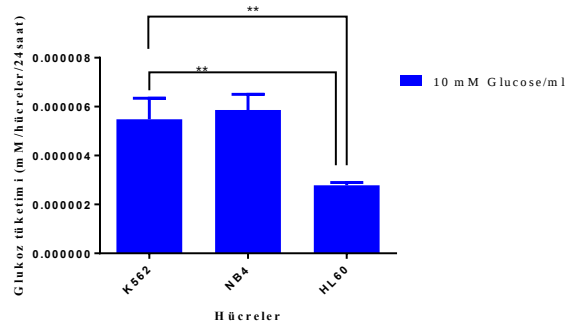


Şekil 6. Düşük glukozun hücre canlılığına etkisi. 20000 hücre/ml şeklinde 72 saat inkübe edildiler. (****p<0,0001, ***p < 0.001)

4.3.Lösemi Hücre Hatlarının Glukoz Tüketimi

K-562, NB-4 ve HL-60 lösemi hücrelerinin günlük glukoz tüketimleri Amplex (R) Red Glukoz Ölçüm Kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Hücrelerin 72 saatlik proliferasyonlarına göre hücre başına düşen günlük glukoz tüketim miktarları aşağıdaki şekilde hesaplandı (Şekil 7).

$$\text{Günlük Glukoz tüketimi (mM/hücreler/24saat)} = \frac{\text{Başlangıç glukoz miktarı (mM)} - \text{72 saat sonunda besiyerinde kalan glukoz miktarı (mM)}}{\frac{\text{Başlangıç hücre miktarı} + \text{72 saat sonunda sayılan hücre miktarı}}{3 \text{ Gün (72 saat)}}}$$

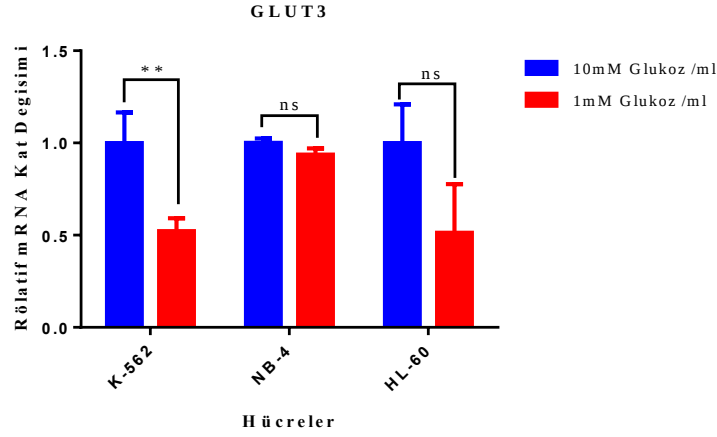


Şekil 7. Hücre hatlarının günlük glukoz tüketimleri. 20000 hücre/ml şeklinde 72 saat inkübe edildiler. (**p < 0.01)

4.4. Düşük Glukozlu Ortamda GLUT3, PKM2 ve STAT3 mRNA Ekspresyonları

4.4.1. GLUT3 mRNA Ekspresyonları

K-562, NB-4 ve HL-60 lösemi hücrelerinin düşük glukozlu ortamda GLUT3 mRNA ekspresyonlarına qPCR yöntemiyle bakıldı. K-562 hücrelerinde düşük glukozda azalış hesaplandı. İstatistiksel olarak da anlamlı bulundu (**p < 0.01). NB-4 ve HL-60 hücre hücrelerinde ise azalış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı (^{ns}p ≥ 0.05) (Şekil 8).

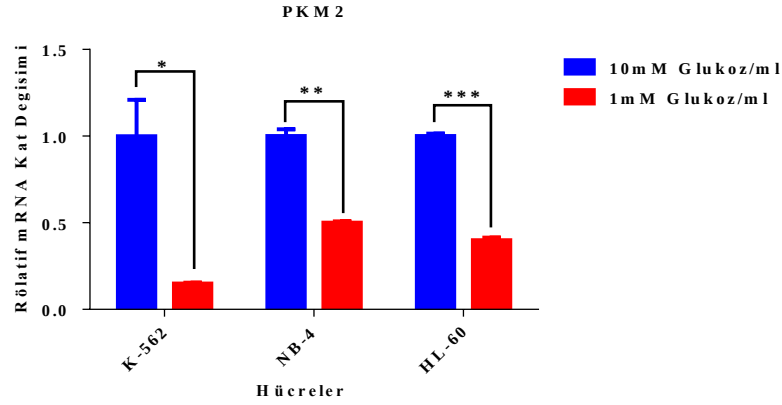


Şekil 8. Düşük glukozlu besiyerinde GLUT3 mRNA ekspresyonlarının analizi. 20000 hücre/ml şeklinde 72 saat inkübe edildiler. (**p < 0.01, ^{ns}p ≥ 0.05.)

4.4.2. PKM2 mRNA Ekspresyonları

K-562, NB-4 ve HL-60 lösemi hücrelerinin glikolizde yer alan piruvat kinaz M2 (PKM2) geninin düşük glukozlu ortamda mRNA ekspresyonlarına qPCR yöntemiyle bakıldı.

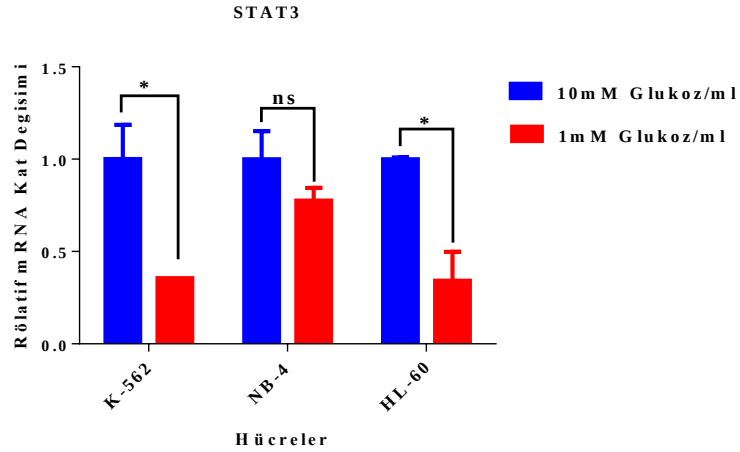
PKM2 geninde; K-562, NB-4 ve HL-60 hücrelerinde düşük glukozda azalış hesaplandı. Hücre hatlarında istatistiksel olarak anlamlılık bulundu (***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05) (Şekil 9).



Şekil 9. Düşük glukozlu besiyerinde PKM2 mRNA ekspresyonlarının analizi. 20000 hücre/ml şeklinde 72 saat inkübe edildiler (***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05)

4.4.3. STAT3 mRNA Ekspresyonları

K-562, NB-4 ve HL-60 lösemi hücrelerinin düşük glukozlu ortamda STAT3 mRNA ekspresyonlarına qPCR yöntemiyle bakıldı. K-562 ve HL-60 hücrelerinde STAT3 ekspresyonunda düşük glukozda azalış hesaplandı. Bu azalış istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (p<0.005). NB-4 hücrelerinde ise azalış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı (^{ns}p ≥ 0.05) (Şekil 10).



Şekil 10. Düşük glukozlu besiyerinde STAT3 mRNA ekspresyonlarının analizi. 20000 hücre/ml şeklinde 72 saat inkübe edildiler. (*p < 0.05, ^{ns}p ≥ 0.05.)

5.TARTIŞMA

Kanser, hücrelerde genetik değişiklikler sonucu kontrolsüz hücre bölünmesi ve büyümesinin olduğu hastalıklar grubudur (62). Normal hücrelerde olduğu gibi kanser hücreleri de hayatta kalmak ve çoğalmak için enerjiye ihtiyaç duyarlar (37). Bu enerjiyi glukoz, glutamin ve yağ asitleri gibi besin maddeleri üzerinden sağlarlar. Kanser hücrelerinde artmış glukoz kullanımı vardır ve ortamdaki oksijen miktarından bağımsız olarak glukozu glikoliz ile yıkarak enerji elde ederler (3). Aerobik glikoliz ya da Warburg etkisi olarak da bilinen bu fenomen kanser hücre metabolizmasının temel mekanizmalarından biridir (54). Kanser hücrelerinin bu artmış besin ihtiyaçları sonucu tümör mikroçevresinde de azalmış makromolekül seviyelerinin bulunduğu önerilmiştir (63). Kanser hücrelerinin az besin bulunan ortamda yaşama ve çoğalmalarını devam ettirmek için nasıl adaptif mekanizmalar gerçekleştirdiklerinin bilinmesi yeni ilaç hedeflerinin belirlenmesinin yanı sıra teşhis ve tedaviye de katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Ancak in vivo koşullardaki ortamın in vitro hücre kültüründe sağlanması oldukça güçtür.

Hepatokarsinom hücre hatlarında yapılan bir çalışmada düşük glukozlu ortamda hücrelerin glukoz tüketimlerinin daha fazla olduğu belirlenmiştir (47).

Adenokarsinom hücrelerinde yapılan bir çalışmada düşük glukozlu ortamda hücre canlılıklarının azaldığı gösterilmiş, ayrıca glikolizin inhibisyonu ile glukoz tüketimlerinin azaldığı belirtilmiştir (33). Adenokarsinom hücrelerinde yapılan diğer çalışmada da düşük glukozlu ortamda hücre proliferasyonlarında azalma belirtilmiştir (64).

Glioblastoma hücre hatları ile yapılan bir çalışmada da yine düşük glukozlu ortamda hücre canlılıklarının azaldığı belirlenmiştir (65).

Biz bu çalışmamızda K-562, NB-4 ve HL-60 lösemi hücre hatlarını düşük (1mM) ve normal (10mM) glukoz içeren besiyerinde çoğalttık. K-562 ve NB-4 hücrelerinin düşük glukozlu ortamda hücre çoğalmalarının azaldığı istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Düşük glukozlu ortamda hücrelerin canlılıkları wst-1 yöntemi ile ölçüldü ve K-562 ve NB-4 hücrelerinin hücre canlılıklarının azaldığını belirledik. HL-60 hücrelerinde ise hücre canlılığındaki azalma diğer hücrelere kıyasla daha az bulundu. Wst-1 deney sonucunda hücrelerin canlılık değerleri K-562 hücrelerinde %100'den

%58.36' ya, NB-4 hücrelerinde %46.21' ya ve HL-60 hücrelerinde %77.30' a düştüğü belirlendi.

Lösemi hücre hatları ile yapılan bir çalışmada NB-4 ve HL-60 hücre hatlarının glukoz azlığına karşı duyarlılıkları çalışılmıştır. NB-4 ve HL-60 hücre hatlarında glikolizin baskılanması ile hücre canlılıklarında azalma tespit edilmiştir. Glukoz tüketimlerinin ise NB-4 hücre hattının HL-60' a göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. NB-4 hücre hatlarında glukozsuz ortamda hücre canlılıklarının azaldığı durumda, ortama glukoz eklenmesi ile canlılığın 2 katına ulaştığı gösterilmiştir (65).

Glukozun hücre içine alınmasında rol oynayan spesifik glukoz taşıyıcılarının artmış ekspresyonları çoğu tümörde belirlenmiştir. Glukoz taşıyıcılarından GLUT1' in meme, GLUT2' nin pankreas ve mide, GLUT4' ün akciğer ve pankreas, GLUT5' in ise akciğer kanserlerinde artmış bir ekspresyona sahip olduğu bilinmektedir (11). GLUT3' ün ise artmış ekspresyonları glioma, meme, akciğer, retinoblastoma, kolon ve birçok kanserde gözlenmiştir (11). Literatürde ise endometrial ve meme kanserli hastalarda GLUT3 ekspresyonunun hem mRNA hem de protein düzeyinde ekspresyonları gösterilmiştir (67). Glioblastoma hücrelerinin bir alttipinde artmış GLUT3 ekspresyonu ile birlikte glukoz tüketimlerinin de oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir (68). Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı dirençli Xenograflar ile yapılan bir çalışmada düşük glukozlu ortamda GLUT3 mRNA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. (69). Başka bir çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalarda GLUT3 ekspresyonunun hastalığın seyri ile ilgili bir belirleyici olabileceği öne sürülmüştür (70). Farklı lösemi hücre hatlarında GLUT3 ekspresyonunun baskılanması ile hücrelerin apoptoza uğradığını, aynı zamanda bu hücrelerin kemoterapiye karşı dirençsiz hale geldiği gösterilmiştir (71).

GLUT3 ekspresyonunun kanserde yüksek oranlarda görülmesi çalışmamızda özellikle bu glukoz taşıyıcı molekülü seçmemize neden olmuştur.

Çalışmamızda düşük glukozlu ortamda GLUT3 mRNA ekspresyonlarının K-562 ve HL-60 hücrelerinde azaldığı, NB-4 hücrelerinde ise değişmediği belirlendi. Bu azalma sadece K-562 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Piruvat kinaz kas tipi (PKM2) enzimi PKM geni tarafından kodlanır ve glikolizin son basamağını katalizler. Bu basamak glikolizde 'sınırlayıcı' aşamalardan biri olup geri dönüşümsüzdür. Kanser hücrelerinin büyük çoğunluğunda PKM2 ekspresyonunun

artmış olması onun anti-kanser tedaviler için bir hedef olup olamayacağını düşündürmüştür (72). PKM2'nun tümör metabolizması ve büyümesindeki görevine dair etkileştiği ve birlikte görev aldığı proteinler de önem kazanmıştır. Başka bir çalışmada hastalardan elde edilen glioblastoma hücre hattında GLUT3' ün siRNA ile baskılanması sonucunda PKM2 mRNA ekspresyonunda azalma görülmüştür (68). PKM2 genini eksprese eden küçük hücreli akciğer kanser hücrelerinin enjekte edildiği fare xenograflarında tümör oluşumu görülmüştür (73).

Pankreatik kanser hücrelerinde yapılan bir çalışmada normal glukozlu ortamda PKM2 ekspresyonunun baskılanması hücre büyümesi ve çoğalmasını etkilemezken, düşük glukozlu (0.5mM) ortamda PKM2 ekspresyonunun baskılanması hücre canlılığını artırmıştır (74).

Akciğer kanser hücrelerinde yapılan çalışmada düşük glukozlu ortamda PKM2 mrna ekspresyonları serin aminoasit metabolizmasını artırarak hücre proliferasyonlarını arttırdığı belirlenmiş (75).

Çalışmamızda kullandığımız hücre hatlarında düşük glukozda PKM2 ekspresyonlarında azalış tespit edildi ve bu azalış istatistiksel olarak da anlamlı bulundu.

STAT3 bir transkripsiyon faktörüdür. STAT protein ailesi, hücresel proliferasyon, apoptoz, anjiyogenez ve immün sistem yanıtını düzenleyen, STAT1-4, STAT5a, STAT5b ve STAT6 olarak 7 genden oluşur (27,49). JAK-STAT sinyal yolağında yer alan bu transkripsiyon faktörleri Jak proteinlerine gelen büyüme faktörleri ve sitokin sinyalleri doğrultusunda fosforile edilerek aktif hale gelirler (1,26). STAT3 ayrıca bir onkogendir. Onkogenik STAT3 geni enerji metabolizmasını düzenleyen bir mekanizmanın merkezinde, çoğu durumda hücrenin hayatta kalmasını, çoğalmasını ve malignitesini teşvik eder (76). Literatürde glikolitik aktivitenin ise Ras, Myc gibi onkogenler ile ilişkili olduğu çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarla onkogenlerin ekspresyonlarının metabolik değişiklikleri nasıl düzenlediği gösterilmiştir (77,17). Böylece kanserde besinlerin fazla tüketiminin onkogenik sinyal yollarını düzenlediği öne sürmektedir (17,3,78). Yapılan bir çalışmada STAT3' ü eksprese eden fare embriyo fibroblastlarında glukozun kısıtlandığı durumlarda STAT3 mRNA ekspresyonunda azalma gösterilmiştir (13). Diğer bir çalışmada lösemi hücrelerinde STAT3 inhibisyonu hücrelerin apoptozuna ve kemoterapiye direncinin

azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (59). Diğer bir çalışmada ise prostat kanserlerinde STAT3 inhibisyonunun hücrelerde apoptozu indüklendiğini tespit edilmiştir (79).

Biz de alışmamızda K-562 ve HL-60 hücrelerinde glukoz kısıtlandığında STAT3 mRNA ekspresyonlarının azaldığını istatistiksel olarak anlamlı bulduk. NB-4 hücrelerinde ise ekspresyon seviyesinde azalma görülse bile istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında lösemi hücre hatları K-562, NB-4 ve HL-60'ın glukozu yüksek oranlarda tükettiği, glukoz az bulunan ortamda ise hücre canlılıklarının ve proliferasyonlarının azaldığını, GLUT3 ve PKM2 gen ekspresyonlarının azaldığını belirledik. STAT3 mRNA ekspresyonunun da azalması bize, lösemi hücrelerinin düşük glukozlu ortamda metabolizmanın STAT3 tarafından düzenlenmiş olabileceğini düşündürdü.

Böylece, STAT3 inhibisyonu ile birlikte glukozun kısıtlanmasının birlikte kullanıldığı tedaviler kanserlerde terapötik bir yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonucunda;

1-Düşük glukozlu ortamda K-562, NB-4 ve HL-60 lösemi hücre hatlarının hücre proliferasyonu belirlendi. K-562 ve NB-4 hücrelerinin düşük glukozlu ortamda hücre çoğalmalarının azaldığı istatistiksel olarak anlamlı bulduk. HL-60 hücrelerinde ise azalma belirlenen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulmadık.

HL-60 hücrelerinin 1 mM' dan daha düşük glukozlu ortamda hücre proliferasyonları incelenmelidir.

2-Düşük glukozlu ortamda K-562, NB-4 ve HL-60 lösemi hücre hatlarının hücre canlılığı belirlendi.

K-562, NB-4 ve HL-60 hücrelerinin hücre canlılıklarının azaldığını belirledik ve istatistiksel olarak da anlamlı bulduk.

3- K-562, NB-4 ve HL-60 lösemi hücre hatlarının günlük glukoz tüketimleri belirlendi. HL-60 hücre hattının glukozu diğer iki hücre hattına kıyasla daha az tükettiğini belirledik.

Hücrelerin düşük glukoz konsantrasyonlarındaki glukoz tüketimleri de belirlenmelidir.

4-a. Düşük glukozlu ortamda hücrelerin GLUT3 mRNA ekspresyonlarına bakıldı.

Glut3 mRNA ekspresyonlarının K-562 ve HL-60 hücrelerinde azaldığı, NB-4 hücrelerinde ise değişmediği belirledik. Bu azalma sadece K-562 hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bulduk.

4-b. Düşük glukozlu ortamda STAT3 mRNA ekspresyonlarına bakıldı.

K-562 ve HL-60 hücrelerinde glukoz kısıtlandığında Stat3 mRNA ekspresyonlarının azaldığını istatistiksel olarak anlamlı bulduk. NB-4 hücrelerinde ise ekspresyon seviyesinde azalma görülse bile istatistiksel olarak anlamlı bulmadık.

4-c. Düşük glukozlu ortamda PKM2 mRNA ekspresyonlarına bakıldı.

Hücre hatlarının tümünde düşük glukozda PKM2 ekspresyonlarında azalış tespit edildi ve bu azalış istatistiksel olarak da anlamlı bulduk.

Sonuç olarak, düşük glukoz konsantrasyonunda GLUT3 ve PKM2 ile birlikte STAT3 gen ekspresyonlarının azalması, lösemi hücrelerinde STAT3 onkogeninin düşük glukozlu ortamda hücresel yanıtın oluşmasında rolü olabileceğini düşündürdü. Bunu

doğrulamak için STAT3 aktivasyonuna western blot yöntemi ile de bakılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Knowles M, Selby P. Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. 4. Oxford University Press, United States; 2005.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 2011; 144: 646-674.
3. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB . Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. Science 2009;324: 1029-1033.
4. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. Science 1956;124: 269- 270.
5. Birsoy K, Sabatini DM, Possemato R. Untuning the tumor metabolic machine: Targeting cancer metabolism: a bedside lesson. Nat Med 2012;18: 1022-1023.
6. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. Cell 2008;134: 703-707.
7. Chen J, Odenike O, Rowley JD. Epigenetics and Genetics: Leukaemogenesis: more than mutant genes. Nature Reviews Cancer 2010;10:23-36.
8. Altucci L, Clarke N, Nebbioso A, Scognamiglio A, Gronemeyer H. Medicine in focus:Acute myeloid leukemia: Therapeutic impact of epigenetic drugs. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2005;37:1752– 1762.
9. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. Cell Metabolism 2008;7: 11-20.
10. Mazurek S, Boschek CB, Hugo F, Eigenbrodt E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. Seminars in Cancer Biology 2005;15:300–308.
11. Joost HG, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. Molecular Membrane Biology 2001;18: 247-256.
12. Medina PA, Owen GI. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. Biological Research 2002;35:1.

13. Krzeslak, A., Wojcik-Krowiranda K, Forma E, Jozwiak P, Romanowicz H, Bienkiewicz A et al., Expression of GLUT1 and GLUT3 Glucose Transporters in Endometrial and Breast Cancers. *Pathology Oncology Research*, 2012;18(3):721-728.
14. Erdamar H, Hacıevliyagil Kazancı F, Gök S .Biochemical Changes in Cancer. *Journal of Clinical and Analytical Medicine* 2015.
15. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer* 2011;11:85-95.
16. Demaria, M, Giorgi C, Lebedzinska M, Esposito G, D'Angeli L, Bartoli A, Gough DJ et al., A STAT3-mediated metabolic switch is involved in tumour transformation and STAT3 addiction. *Aging (Albany NY)* 2010;2(11):823-842.
17. Poli, V. and A. Camporeale, STAT3-Mediated Metabolic Reprograming in Cellular Transformation and Implications for Drug Resistance. *Frontiers in Oncology*. 2015;5:121.
18. Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins. *Science* 2012;264:1415-1421.
19. Yu H, Jove R. The stats of cancer — New molecular targets come of age. *Nature Reviews Cancer* 2004;4:97-105.
20. Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nature Reviews Cancer* 2014;14:736-746.
21. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 5. Garland Science, United States; 2008.
22. Fowler S, Roush R, Wise C. *Concepts of Biology*. Rice University, 2013.
23. Rahner R, Steinke V. Hereditary Cancer Syndromes. *Dtsch Arztebl Int* 2008;105(41): 706–14 712.
24. Knudson AG. Cancer genetics. *American Journal of Medical Genetics* 2002; 111: 96-102.

25. Wong KM, Hudson TJ, McPherson JD. Unraveling the genetics of cancer: genome sequencing and beyond. *Annual review of genomics and human genetics* 2011; 12: 407-430.
26. Decker T, Müller M editors. *Jak-Stat Signaling: From Basics to Disease*. Vienna, Austria, 2012.
27. Shahmarvand N, Nagy A, Shahryari J, Ohgami RS. Mutations in the signal transducer and activator of transcription family of genes in cancer. *Cancer Science* 2018;1-8.
28. Mitchell TJ, John S. Signal transducer and activator of transcription (STAT) signalling and T-cell lymphomas. *Immunology* 2005;114:301–312.
29. Witney TH, James ML, ShenB, Chang E, Pohling C, Arksey N et al. PET imaging of tumor glycolysis downstream of hexokinase through noninvasive measurement of pyruvate kinase M2. *Cancer* 2015; 7,310.
30. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 325-337.
31. Pavlova N, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism* 2016;23:27-47.
32. Yuneva MO, Fan TWM, Allen TD, Higashi RM, Ferraris DV, Tsukamoto T et al. The Metabolic Profile of Tumors Depends on Both the Responsible Genetic Lesion and Tissue Type. *Cell Metabolism* 2012; 15: 157-170.
33. Wang L, Li JJ, Guo L, Li P, Zhao Z, Zhou H et al. Molecular link between glucose and glutamine consumption in cancer cells mediated by CtBP and SIRT4. *Oncogenesis* 2018;7:26.
34. Liberti MV, Dai Z, Wardell SE, Baccile JA, Liu X, Gao X et al. A Predictive Model for Selective Targeting of the Warburg Effect through GAPDH Inhibition with a Natural Product. *Cell Metabolism* 2017; 26,:1–12.
35. McKeehan WL. Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation. *Cell Biology International Reports* 1982;6:635-650.
36. Hofmann P. Cancer and Exercise: Warburg Hypothesis, Tumour Metabolism and High-Intensity Anaerobic Exercise. *Sports* 2018;6, 10.
37. Ward PS, Thompson CB. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell* 2012; 21:297-308.

38. Schulze A, Harris AL. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature* 2012; 491:364-373.
39. Frezza C, Gottlieb E. Mitochondria in cancer: Not just innocent bystanders. *Seminars in Cancer Biology* 2009;19:4–11.
40. Hay N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nature Reviews Cancer* 2016;16:635-649.
41. Bauer DE, Harris MH, Plas DR, Lum JJ, Hammerman PS, Rathmell JC et al. Cytokine stimulation of aerobic glycolysis in hematopoietic cells exceeds proliferative demand. *The FASEB Journal* 2004.
42. Fernandez-de-Cossio-Diaz JA, Vazquez A. Limits of aerobic metabolism in cancer cells. *Scientific Reports*;7, 13488.
43. Wang L, Li JJ, Guo L, Li P, Zhao Z, Zhou H et al. Molecular link between glucose and glutamine consumption in cancer cells mediated by CtBP and SIRT4. *Oncogenesis* 2018;7:26.
44. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* 1956;123:309-314.
45. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.* 2016; 2 : 1600200.
46. Zhang HL, Wang M, Zhou X, Qin C, Fu G, Tang L et al. Blocking preferential glucose uptake sensitizes liver tumor-initiating cells to glucose restriction and sorafenib treatment. *Cancer Letters* 2017; 388:1-11.
47. Venneti S, Dunphy MP, Zhang Z, Pitter KL, Zanzonico P, Campos C et al. Glutamine-based PET imaging facilitates enhanced metabolic evaluation of gliomas in vivo. *Cancer* 2015;7,274.
48. Moreno-Sa´ nchez R, Rodrı´guez-Enrı´quez S, Mari´n-Herna´ndez A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS Journal* (2007);274:1393–1418.
49. Akiyama Y, Iizuka A, Kume A, Komiyama M, Urakami K, Ashizawa T et al. Effect of STAT3 Inhibition on the Metabolic Switch in a Highly STAT3-activated Lymphoma Cell Line. *CANCER GENOMICS & PROTEOMICS* 2015;12: 133-142.
50. Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nature reviews-Drug discovery* 2011;11:671-684.

51. Chen H, Chan DC. Mitochondrial Dynamics in Regulating the Unique Phenotypes of Cancer and Stem Cells. *Cell Metabolism* 2017;26.
52. Dong G, Mao Q, Xia W, Xu Y, Wang J, Xu L et al. PKM2 and cancer: The function of PKM2 beyond glycolysis. *ONCOLOGY LETTERS* 2016;11: 1980-1986.
53. Cantor JR, Sabatini DM. Cancer Cell Metabolism: One Hallmark, Many Faces. *Cancer Discovery* 2012; 2(10):881-98.
54. Woo CC, Kaur K, Chan WX, Teo XQ, Lee THP. Inhibiting glycine Decarboxylase suppresses Pyruvate-to-lactate Metabolism in lung cancer cells. *Frontiers in Oncology* 2018; 8,196.
55. Rodriguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, Gallardo-Perez JC, Carretero-Fuentes L, Moreno-Sanchez R. Targeting of cancer energy metabolism. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009;53:29 – 48.
56. Sengupta D, Pratz G. Imaging metabolic heterogeneity in cancer. *Molecular Cancer* 2016;15:4.
57. Zhang C, Chen G. Hypoxia-HIF-1 α -C/EBP β /Runx1 signaling in leukemic cell differentiation. *Pathophysiology* 2009;16:297–303.
58. Kanna R, Choudhary G, Ramachandra N, Steidl U, Verma A, Shastri A. STAT3 inhibition as a therapeutic strategy for leukemia. *LEUKEMIA & LYMPHOMA*, 2017.
59. Gleixner KV, Schneeweiss M, Eisenwort G, Berger D, Herrmann H, Blatt K et al. Combined targeting of STAT3 and STAT5: a novel approach to overcome drug resistance in chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2017;102(9):1519-1529.
60. Gottschalk S, Anderson N, Hainz C, Eckhardt SG, Serkova N. Imatinib (STI571)-Mediated Changes in Glucose Metabolism in Human Leukemia BCR-ABL-Positive Cells. *Clinical Cancer Research*; 2004;10:6661-6668.
61. Wong KM, Hudson TJ, McPherson JD. Unraveling the genetics of cancer: genome sequencing and beyond. *Annual review of genomics and human genetics* 2011; 12: 407-430.

62. Chan CH, J Qiu, O'Sullivan D, Schreiber RD, Pearce EJ, Pearce EL et al. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* 2015;162:1–13.
63. Hou Y, Zhou M, Xie J, Chao P, Feng Q, Wu J. High glucose levels promote the proliferation of breast cancer cells through GTPases. *Breast Cancer - Targets and Therapy* 2017;9:429–436.
64. Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR et al. Akt Stimulates Aerobic Glycolysis in Cancer Cells. *CANCER RESEARCH* 2004;64:3892–3899.
65. Suganuma K, Miwa H, Imai N, Shikami M, Gotou M, Goto M et al. Energy metabolism of leukemia cells: glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Leukemia & Lymphoma*, November 2010; 51(11): 2112–2119.
66. Cosset E, Ilmj arv S, Dutoit V, Weis SM, Mischel PS, Cheresch DA et al. Glut3 Addiction Is a Druggable Vulnerability for a Molecularly Defined Subpopulation of Glioblastoma. *Cancer Cell* 2017;32:1–13.
67. Kuang R, Jahangiri A, Mascharak S, Nguyen A, Chandra A, Flanigan PM et al. GLUT3 upregulation promotes metabolic reprogramming associated with antiangiogenic therapy resistance. *JCI Insight* 2016.
68. Younes M, Brown RW, Stephenson M, Gondo M, Cagle PT. Overexpression of Glut1 and Glut3 in Stage I Non-small Cell Lung Carcinoma Is Associated with Poor Survival. *American Cancer Society* 1997;1046-1051.
69. Zhuang Y, Zhao J, Xu X, Bi L. Downregulation of GLUT3 Promotes Apoptosis and Chemosensitivity of Acute Myeloid Leukemia Cells via EGFR Signaling. *Arch Iran Med*. February 2018;21(2):73-78.
70. Saunier E, AntonioS, Regazzetti A, Auzeil N, Lapr v te O, Shay JW et al. Resveratrol reverses the Warburg effect by targeting the pyruvate dehydrogenase complex in colon cancer cells. *Scientific Reports* 2017;7:6954.
71. Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R et al. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 2008; 452:230-233.

72. Li X, Deng s, Liu M, Jin Y, Zhu S, Deng S et al. The responsively decreased PKM2 facilitates the survival of pancreatic cancer cells in hypoglucose. *Cell Death and Disease* 2018; 9:133.
73. Kung C, Hixon J, Choe S, Marks K, Gross S, Murphy E et al. Small Molecule Activation of PKM2 in Cancer Cells Induces Serine Auxotrophy. *Chem Biol.* 2012; 19(9): 1187–1198.
74. Camporeale A, Demaria M, Monteleone E, Giorgi C, Wieckowski MR, Pinton P et al. STAT3 Activities and Energy Metabolism: Dangerous Liaisons. *Cancers* 2014;6:1579-1596.
75. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff Y, Wehrli S et al. Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *PNAS* 2007; 104:19345-19350.
76. Mora LB, Buettner R, Seigne J, Diaz D, Ahmad N, Garcia R et al. Constitutive Activation of Stat3 in Human Prostate Tumors and Cell Lines: Direct Inhibition of Stat3 Signaling Induces Apoptosis of Prostate Cancer Cells. *CANCER RESEARCH* 2001; 62: 6659–6666.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Sedef ALTUNDAĞ KARA

Uyruğu: T.C.

Doğum Tarihi ve Yeri: 20.03.1990 / Kadıköy

E-Posta: saltundag1@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Kurum	Mezuniyet Yılı
Lisans	Pamukkale Üniversitesi, Biyoloji	2013
Yüksek Lisans	İstanbul Medeniyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya ABD.	-

MESLEKİ DENEYİM BİLGİLERİ

Tarih	Kurum	Görev
03.2014-05.2015	Roche Diagnostics	Biyolog

YABANCI DİLLER

İngilizce-YÖKDİL(2017) Sağlık Bilimleri: 77,5

YAYINLAR

PROJE

Araştırmacı : Lösemi Hücre Hatlarında Glukoz Kısıtlamasında STAT3 Gen Ekspresyonlarının Araştırılması IMUBAP 1109 nolu genel araştırma projesi

BİLDİRİLER

Yazılı Bildiriler

-**Kara A.S.**, Kılınçarslan Ö. ,Demir G., Arslan Ş., Şen A., Atmaca P., Terzioğlu G. Investigation of the antidiabetic effects of *Hibiscus sabdariffa*, *Teucrium polium* and *Myrtus communis* in HEPG2 cells line” 41st FEBS Congress, Kuşadası, Turkey, September 3-8, 2016.

-Demircan B., Yucel B., **Altındag S.**, Yılmaz S. Epigenetic alterations in glioma, 5th World Congress on Epigenetics and Chromosome, Istanbul, Turkey, November 15-16, 2018.

Sözlü Bildiriler

-**Kara A.S.**, Kılınçarslan Ö. ,Demir G., Arslan Ş., Şen A., Atmaca P., Terzioğlu G. *Hibiscus sabdariffa, Teucrium polium ve Myrtus communis*'in hepg2 hücre hattında antidiyabetik etkilerinin araştırılması, III. Yaşam Bilimleri Kongresi, Kayseri, Türkiye 23-24 Şubat 2018.

Turan T., Demircan B., Yucel B., **Altındag S.**, Yılmaz S., Yıldırım A. Relationship between prostate cancer and MGMT, SOCS3, RSSF1 and PTEN mutations, 8th Eurasian Uro-oncology Congress, Tbilisi, Georgia ,June 28- July 1, 2018.

Poster

-**Kara A.S.**, Kılınçarslan Ö. ,Demir G., Arslan Ş., Şen A., Atmaca P., Terzioğlu G. *Hibiscus sabdariffa, Teucrium polium ve Myrtus communis*'in hepg2 hücre hattında antidiyabetik etkilerinin araştırılması. III. Yaşam Bilimleri Kongresi, Kayseri, Türkiye 23-24 Şubat 2018.

Sertifikalar

- Ule2009-Uluslararası Kentleşme,Arazi Kullanımı,Arazi Bozulması ve Çevre Çalıştayı, Tübitak-Pamukkale Üniversitesi, 2009
- ISSMET 2011-Sekonder Metabolitler-Kimyasal,Biyolojik ve Biyoteknolojik Özellikleri, Pamukkale Üniversitesi, 2011
- 2. Uluslararası Öğrenci Kök Hücre Kongresi-Kanser Kök Hücreleri, TÜRK-KÖK, 2012
- 4.Kök Hücre Sempozyumu, Marmara Üniversitesi, 2013
- Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Marmara Üniversitesi-DEHAMER, 2016
- 5.Kök Hücre Sempozyumu, Marmara Üniversitesi, 2016
- Mitokondrial DNA Dizi Analizi-Boğaziçi Üniversitesi, 2016
- 2.Tıp Öğrenci Kongresi, İstanbul Medeniyet Üniversitesi, 2017
- Nadir Hastalıklar Sempozyumu, İstanbul Medeniyet Üniversitesi, 2017
- 6.Kök Hücre Sempozyumu, Marmara Üniversitesi, 2017
- 5th International Congress of the Molecular Biology Association of Turk, Boğaziçi Üniversitesi-Moleküler Biyoloji Derneği, 2017

- International ITU Molecular Biology and Genetics Student Congress'17, Istanbul Technical University-Molecular Biology and Genetics, 2017
- Uygulamalı Giriřimcilik Kursu, KOSGEB, 2017
- Eppendorf Hücre Kültürü Semineri, İNCEKARALAR, 2017
- Mikrodizi DNA Kanseri Veri Madencilięi-İstinye Üniversitesi, 2017
- ACUGEN 1. Yaşam Bilimleri Kongresi, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi-ACUGEN,2018
- 3.Yaşam Bilimleri Kongresi, Abdullah Gül Üniversitesi, 2018
- Biyobilim Akademisi Semineri, MERCK-R&D SIGMA ALDRICH, 2018
- Biyoinformatik Forumu, Gebze Teknik Üniversitesi, 2018