

OZET

KANSER İÇİN PROGNOZ BELİRTECİ VE SPESİFİK HEDEF OLARAK KULLANIM İÇİN HEKZOKİNAZ 1 İZOFORMU

Mevcut buluş prognoz belirteci ve kanser tedavisinde spesifik hedef olarak kullanıma
5 uygun hegzokinaz 1 (HK1) izoformlarına, özellikle hegzokinaz 1b (HK1b) izoformuna
ilişkindir.

İSTEMLER

1. Bir canlıda kanserin tespit edilmesi veya teşhis edilmesi için bir yöntem olup, söz konusu yöntem canlıdan alınan bir biyolojik numune içerisindeki HK1b izoformu ifadesinin seviyesinin belirlenmesini içerir, ki burada söz konusu HK1b izoformunun normal kontrol seviyesine kıyasla daha yüksek olması söz konusu canlının kanserden muzdarip olduğunu ifade eder.
5
2. İstem 1'e göre bir metot olup, HK1b izoformu ifadesi; immüno blotlamayı takiben, oluşan bant intensitelerinin dansitometriyle nicelleştirilmesiyle belirlenir.
3. İstem 1-2'ye göre bir metot olup, bir canlıdan alınan numunede HK1b izoformunun ifadesinde en az %10 veya daha fazla artış, normal seviyeye kıyasla yüksek seviyede olarak kabul edilir.
10
4. İstem 1-3'e göre bir metot olup, canlıdan alınan numune biyopsi numunesi, tükürük, balgam, kan, serum, plazma, plevral efüzyon veya idrar içerisinde seçilir.
5. İstem 1-4'e göre bir metot olup kanser, küçük hücreli olmayan akciğer kanseridir (NSCLC).
15
6. Kanser tedavisinde veya hücre büyümesinin durdurulmasında kullanıma uygun bir aday maddenin taranmasında kullanılacak bir metot olup (Metot 1), söz konusu metot;
 - a. Test edilecek aday maddenin HK1b izoformu (SEQ ID No: 7 ve SEQ ID No:8) veya HK1b izoformunun fonksiyonel bir eşdeğeriyle temas ettirilmesi;
20
 - b. Test edilen aday maddeyle HK1b izoformu (SEQ ID No: 7 ve SEQ ID No:8) veya HK1b izoformunun fonksiyonel bir eşdeğeri arasındaki bağlanma aktivitesinin belirlenmesi; ve
 - c. HK1b izoformu ((SEQ ID No: 7 ve SEQ ID No:8) veya HK1b izoformunun fonksiyonel bir eşdeğerine bağlanan aday maddenin seçilmesi adımlarını içerir.
25
7. Kanser tedavisinde veya hücre büyümesinin durdurulmasına kullanıma uygun bir aday maddenin taranmasında kullanılacak bir metot olup (Metot 2), söz konusu metot;

- a. Test edilecek aday maddenin HK1b izoformu (SEQ ID No: 7 ve SEQ ID No:8) veya HK1b izoformunun fonksiyonel bir eşdeğeriyle temas ettirilmesi;
- b. a) adımından sonra elde edilen HK1b izoformu (SEQ ID No: 7 ve SEQ ID No:8) veya HK1b izoformunun fonksiyonel bir eşdeğerinin biyolojik aktivitesinin belirlenmesi; ve^[1]_{SEP}
- c. HK1b izoformu (SEQ ID No: 7 ve SEQ ID No:8) veya HK1b izoformunun fonksiyonel bir eşdeğerinin biyolojik aktivitesini test maddesinin ortamda olmadığı duruma göre azaltan test maddesinin seçilmesi adımlarını içerir.
8. İstem 7'ye göre bir metot olup biyolojik aktivite glikolizdir.
- 10 9. Bir hücreye konulduğunda HK1b ekspresyonunu inhibe eden, bir yolcu dizi ve bir rehber dizi içeren çift sarmallı moleküller olup, yolcu dizi SEQ ID No:1'e karşılık gelen nükleotit sekansını ve rehber dizi SEQ ID No:4'e karşılık gelen nükleotit sekansını içerir.
- 15 10. Bir hücreye konulduğunda HK1b ekspresyonunu inhibe eden, bir yolcu dizi ve bir rehber dizi içeren çift sarmallı moleküller olup, yolcu dizi SEQ ID No:2'ye karşılık gelen nükleotit sekansını ve rehber dizi SEQ ID No:5'e karşılık gelen nükleotit sekansını içerir.
- 20 11. Bir hücreye konulduğunda HK1b ekspresyonunu inhibe eden, bir yolcu dizi ve bir rehber dizi içeren çift sarmallı moleküller olup, yolcu dizi SEQ ID No:3'e karşılık gelen nükleotit sekansını ve rehber dizi SEQ ID No:6'ya karşılık gelen nükleotit sekansını içerir..
12. İlaç olarak kullanılmak üzere istem 9-11'e göre çift sarmallı molekül.
13. Kanser tedavisi ve/veya profilaksisinde kullanılmak üzere İstem 9-11'e göre çift sarmallı molekül.
- 25 14. Kanser tedavisi ve/veya profilaksisinde cisplatin, karboplatin, oksaliplatinde seçilen bir kemoterapi ajanıyla kombine olarak kullanıma uygun istem 9-11'e göre çift sarmallı molekül.

15. İstem 9-11'e göre bir çift sarmallı molekül ve en az bir farmasötik olarak kabul edilebilir ekspiyan içeren farmasötik kompozisyon.

5

10

15

20

KANSER İÇİN PROGNOZ BELİRTECİ VE SPESİFİK HEDEF OLARAK KULLANIM İÇİN HEKZOKİNAZ 1 İZOFORMU

TARİFNAME

5 Teknik Alan

Mevcut buluş prognoz belirteci ve kanser tedavisinde spesifik hedef olarak kullanıma uygun heksokinaz 1 (HK1) izoformlarına, özellikle heksokinaz 1b (Hk1b) izoformuna ilişkindir.

Tekniğin Bilinen Durumu

- 10 Kanser genel olarak hücrelerin kontrolsüz büyümesi olarak tanımlanır. Kanser en önemli belirteçlerinden birisi metabolik yeniden programlamadır (1). Kanser hücreleri bu yetenekleri sayesinde, normal hücrelerden farklı olarak, büyümek ve yayılmak için artan glikolitik akıştan destek alır ve bu durum onları glikoz metabolizmasının bozulmasına daha hassas hale getirir (2). Her ne kadar değişen glikoz metabolizmasını hedefleyen yeni
- 15 terapilerin geliştirilmesi ön klinik çalışmalarda başarı göstermiş olsa da, görülen klinik başarı oluşan yan etkilerden dolayı sınırlı kalmıştır (3).

Glikolizin düzensizleşmesi küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) yaygın görülen bir olgudur (4). p53'ün önemli düzenleyici görevlerinden biri glikoz ve oksijen seviyesine bağlı olarak glikolizi arttırmak için heksokinazları (HK) aktive ederek

20 hücrel metabolizma yolağını kontrol etmektir(5, 6). Heksokinazlar (HK) glikoz metabolizmasının temel olarak geri döndürülemeyen ilk adımı olan glikozu fosforlayarak glukoz-6-fosfata (G-6-P) çevirme adımını katalize eder.

HK enzimleri HK1, HK2, HK3 ve HK4 olarak adlandırılan dört genle kodlanır. HK1 hemen hemen tüm memeli dokularında yer almaktayken, HK2 normalde adipoz doku,

25 iskelet doku veya kardiyak kaslar gibi insüline duyarlı dokularda ifade edilir. HK3 genelde düşük miktarlarda ifade edilir ve HK4 ifadesi pankreas ve karaciğerle sınırlıdır (7). Bunlardan HK1, HK2 ve HK3 glikoz için düşük Km değerine sahiptir, bu durum bunların HK4'e göre daha yüksek glikoz afinitesi olduğunu ifade etmektedir. Ancak, HK1 inorganik fosfat varlığında kendi ürünü olan G6P tarafından azaltılmış inhibisyon

gösteren tek izoformdur. Bu nedenle, yüksek enerji ihtiyacı olan, Pi'nin hücreler arası konsantrasyonunun arttığı ve G6P konsantrasyonunun azaldığı, dönemlerde HK1 aktivitesi artarak HK1 tarafından daha fazla glikozun fosforlanması ve enerji üretimi için aşağı akım metabolizmasına girmesi sağlanmaktadır. HK1 esas olarak mitokondri ile ilişkili iken, HK2 hem mitokondri hem de sitoplazmik bölmelerle ilişkilidir (8, 9 ve 10)

Sadece bir transkripti olan HK2 geninden farklı olarak, HK1 geninin alternatif zincirleşme nedeniyle birkaç transkripti vardır. Her ne kadar RNA dizileme teknolojilerinin ortaya çıkmasıyla transkript yapıları hakkında daha fazla bilgiye sahip olsak da, transkriptomun tam kapsamını tanımlamaktan hala uzaktayız. Bilinen birden fazla gen ek açıklama veritabanı bulunmaktadır ancak bunların hepsi birbiriyle tutarlı değildir. Burada transkript tanımları için en büyük kaynaklardan biri olan RefSeq gen açıklamalarını kullanıyoruz. RefSeq gen açıklamalarına göre, HK1 geninin 10 farklı izoformu vardır. Bu izoformların yarısı testis dokusuna özgüdür ve diğer dokularda görülmezler (11, 12). HK1a, HK1b ve HK1c olmak üzere yüksek sekans ve yapısal homolojiyi paylaşan HK1'in geri kalan izoformlarının üçünün diferansiyel ekspresyon kalıpları incelenmemiştir ve NSCLC ve diğer kanserlerde tümörigenez, hücre sağ kalımı ve ilaç yanıtındaki rolleri hala net olarak bilinmemektedir.

Burada buluşçular kanser hücresinin glikoz metabolizmasında etkili izoform spesifik katılımcıları tanımlamayı hedeflemektedir. Söz konusu izoform spesifik katılımcılar normal hücredeki sistemik homeostaz veya buna karşılık gelen metabolik fonksiyonlardan taviz vermeden seçici olarak kanser hücrelerini elimine etmeyi sağlayacağından, bunun kanser tedavisinde ilgi çekici bir yaklaşım olacağı düşünülmektedir.

Buluşun Özeti

Mevcut buluş HK1b'ye ve onun tümörigenezdeki rolüne ilişkindir. Özel olarak, mevcut buluş kanserin, özellikle küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin (NSCLC) tedavisi/önlenmesi için bir yöntemle ilişkindir.

Mevcut buluş temel olarak HK1'in üç izoformundan, özellikle HK1b ve HK1c'den sadece HK1b'nin ağırlıklı olarak A549 hücrelerinde ve NSCLC hastalarında ifade edildiği buluşuna dayanmaktadır. Bu durum NSCLC hücrelerini çevre dokudaki normal akciğer

hücrelerinden ayırmakta ve HK1b düşük hasta sağ kalımı ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca, buluşçular p53 durumuna göre HK1b ifadesinin değiştiğini p53 içermeyen (p53 null) ve p53 içeren (p53WT) küçük olmayan hücreli akciğer kanseri (NSCLC) hücreleri kullanarak göstermişlerdir. HK1b'nin p53 ile kontrol edilmesinin mekanizmasının belirlenmesinde, CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak insan NSCLC A5549 hücrelerinde p53 ve HK1b izoformu silindi ve sonuçta p53 pozitif şekilde HK1b'yi kontrol ettiği gösterildi. HK1b nakavt edilmiş insan A549 hücrelerinde yapılan deneyler (A549 HK1b -/-), HK1b'nin NSCLC hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiğini ve in vivo tümör büyümesini durdurduğunu gösterdi.

10 HK1b nakavt hücreleri hazırlamak için, SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2 veya SEQ ID No: 3'e karşılık gelen bir yolcu dizi ve sırasıyla SEQ ID No: 4, SEQ ID No:5 veya SEQ ID No:6'ya karşılık gelen bir rehber dizi içeren çift sarmallı moleküller hazırlandı. Ayrıca, bu yolcu dizi ve rehber diziler çift sarmallı yapıyı oluşturmak için birbiriyle hibridize edildi. Örneğin, SEQ ID No:1 içeren yolcu dizi, SEQ ID No: 4 içeren rehber dizi ile hibridize edildi (çift sarmallı molekül 1); SEQ ID No:2 içeren yolcu dizi, SEQ ID No: 5 içeren rehber dizi ile hibridize edildi (çift sarmallı molekül 2); SEQ ID No:3 içeren yolcu dizi, SEQ ID No: 6 içeren rehber dizi ile hibridize edildi (çift sarmallı molekül 3).

Bir açıdan, buluşun bir amacı, bir hücreye girdiğinde HK1b'yi nakavt eden ve sonuç olarak glikoliz ve proliferasyon ve kanser hücrelerinin, özellikle de NSCLC hücrelerinin büyümesini inhibe eden izole çift sarmallı moleküller sağlamaktır.

Buluşun bir başka amacı ilaç olarak, tercihen kanser, özellikle NSCLC tedavisi için bir yöntemde kullanılmak üzere izole çift sarmallı moleküller sağlamaktır.

Buluşun bir başka amacı kanser gibi, özellikle NSCLC gibi HK1b ilintili hastalıkların engellenmesinde ve/veya tedavisinde kullanım için bileşimler geliştirmek olup, söz konusu bileşimler çift sarmallı moleküller 1, 2 veya 3'ten en az bir tanesini içerir.

Buluşun bir diğer amacı, bir canlıdaki HK1b izoformu ifadesini indeks olarak kullanarak kanserin, özellikle NSCLC'nin teşhis edilmesi veya saptanması için bir metot sağlamaktır. Özellikle, bir canlıdan alınan biyolojik numunede test edilen izoformun kontrol seviyesine kıyasla daha yüksek seviyede HK1b olması canlıda kanserin varlığını veya canlının kanserden muzdarip olduğunu ifade eder.

Buluşun bir başla amacı, kanser, özellikle NSCLC gibi HK1b ilintili hastalıkların tedavisi ve/veya önlenmesinde kullanım için bir aday maddenin taranmasında kullanım için bir tarama yöntemi sağlamaktır. Bu bağlamda, aday madde belirli bir indeks kullanılarak; (i) HK1b izoformuna bağlanma aktivitesine göre veya (ii) HK1b izoformunun biyolojik aktivitesine karşı inhibitör aktivitesine göre veya (iii) HK1b izoformunun ifadesine karşı baskılayıcı aktivitesine göre seçilebilir. Buluşa uygun tarama metodu için özellikle ilgi çekici olan HK1b izoformu biyolojik aktivitesi glikolizi içerir.

Yukarıda bir dizi amaç sıralanmıştır. Buluşun ilgili alanında uzman kişi tarafından anlaşılacağı gibi buluşun bir veya daha fazla uygulaması bazı amaçları tek başına veya diğerleriyle kombine olarak karşılayabilir.

Şekillerin Kısa Açıklaması

Şekil 1-7 klinik küçük olmayan hücreli akciğer kanserinde (NSCLC) HK1'in fazla eksprese edildiğini göstermektedir. Şekil 1 ve Şekil 2 toplam 13 NSCLC hastası tümör vakasında ve 10 bitişğinde tümör yer almayan normal akciğer dokusunda iki farklı western blot analizinde HK1b seviyelerini gösterir. Şekil 3, NSCLC tümöründe (n = 13) ve normal akciğer örneklerinde (n=10) HK1 düzeylerinin miktarının belirlenmesini göstermekte olup HK1 ekspresyonunun anlamlı olarak yükseldiği görülmektedir ($p < 0.0001$). Şekil 4, immünohistokimya testini kullanarak HK1'in in situ ifadesini göstermektedir. Kanserli olmayan tüm epitel doku zayıf HK1 boyaması verirken, tümör hücreleri orta derece ile güçlü derecede boyama vermektedir. Şekil 5, p53 gen imza ekspresyonuna (p53 WT ve p53 mutant) dayanan gen seti zenginleştirme analizi (GSEEA) kullanılarak GSE31210 veri kümesindeki NSCLC ve normal numuneler arasındaki karşılaştırma analizini göstermekte olup, burada mutant p53'e sahip hastaların daha yüksek HK1 seviyelerini ifade ettiğini görülmektedir. Şekil 6'da, evre I ve II hastalarının gen seti zenginleştirme analizi (GSEEA) kullanılarak GSE31210 veri kümesindeki NSCLC ve normal numuneler arasındaki karşılaştırma analizini göstermekte olup, evre II hastalarının sadece p53 WT grubunda daha yüksek HK1 ekspresyonuna sahip olduğu görülmektedir. Şekil 7'de, daha yüksek HK1 ekspresyonunun azalmış relapsız/nüks etmeden sağ kalım ile ilişkili olduğunu gösteren sağ kalım analizini göstermektedir

(P=0.01), burada daha yüksek HK1 ekspresyonunun hastalık ilerlemesi ile ilişkili olduğunu görülmektedir. İstatistiksel analiz için öğrenci t-testi (**p < 0.05) yapıldı.

Şekil 8-10 RefSeq HK1 gen transkript varyantlarını, HK2 gen transkriptini ve HK1b izoformunun yapısal farklarını gösteren moleküler dinamik simülasyonlarını göstermektedir. Şekil 8, dokuya özgü diferansiyel üç HK1 izoformunun; HK1a, HK1b ve HK1c'nin ve HK2 geninin bir transkriptinin RefSeq gen anotasyonunu göstermektedir. Hk1a transkripti 5' ucunda farklı ekzonlar taşıdığından bu transkripti ayırt etmek mümkündür. Hem HK1b hem de HK1a izoformları bir ekstra ekzona, ekzon 8'e, sahip olup, bu ekzon HK1c izoformunda eksiktir. Şekil 9, HK1b ve HK1c modellerinin kristal yapıları arasındaki yapısal uyumu göstermektedir. Şekilde maviyle gösterilen HK1b'de yer alan ekstra ekzon, N-ucunun alt alanının bir parçası olan 32 aminoasit uzunluğundaki alfa sarmalını kodlamaktadır. Konuyu basitçe açıklamak için sadece bir monomer gösterilmektedir. Şekil 10 HK1b, HK1c izoformları ve HK2 eğrileri kullanılarak gerçekleştirilen kök ortalama kare değişim değerlerini göstermekte olup, burada HK1b izoformunun N-alanının stabilitesini sağlayan özgün sekanslar içerdiği görülmektedir.

Şekil 11-14 NSCLC hastalarında HK1b izoformu upregülasyonunu göstermektedir. Şekil 11, HK1 izoformları, HK2 ve p53'ün H1299 ve A549 hücrelerinde temsili semi q-PCR amplifikasyon sonuçlarını göstermektedir. Şekil 12, HK1 ve HK2'nin A549 ve H1299 hücrelerindeki immüno blot analizini göstermektedir. Şekil 13, NSCLC hasta tümörlerinde (n=3) HK1 izoformları, HK2 ve p53'ün temsili semi q-PCR amplifikasyon sonuçlarını göstermektedir. Şekil 14, NSCLC hastalarının normal akciğer dokusu ve tümör numunelerinden ekstrakte edilen RNA'ları göstermekte olup, HK1b, HK1c, HK2 (normal n=6, tümör n=6) ve p53 (normal n=7, tümör n=7) seviyeleri qRT-PCR ile belirlenmiştir. mRNA seviyeleri ACTB mRNA'ya göre normalize edilmiştir. Veriler iki veya üç bağımsız deneyden üç tekrarla elde edilmiş olup student's t-test kullanılarak ortalama +/-ortalamanın standart hatası olarak sunulmuştur.

Şekil 15-17 HK1b izoformunun ifade edilmesindeki/ekspresyonundaki artışın kanser genom atlası hasta verilerinde kötü prognoz ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Şekil 15,

kanser genom atlası topluluğundan hastalarının TCGA adenokarsinom numuneleri ve normal numuneler arasındaki HK1b izoformu yüksek ekspresyonu ilişkisini gösteren Kaplan-Meier grafiğini göstermektedir. Şekil 16 adenokarsinom (n= 501) için Kaplan-Meier sağ kalım eğrilerini göstermektedir. Şekil 17 skuamöz hücreli karsinom (n=489) için Kaplan-Meier sağ kalım eğrilerini göstermektedir. Bu testler için hastalar düşük veya yüksek HK1b ifadesine/ekspresyonuna göre gruplandırılmıştır. P değerleri, log-sıralama (Mantel-Cox) testini kullanarak sağ kalım eğrilerinin karşılaştırılmasından elde edilen anlamlılık seviyelerini gösterir

Şekil 18-20 genetik olarak HK1b izoformunun uzaklaştırılmasının NSCLC hücrelerinin metabolizması ve tümörigenez üzerindeki etkilerini göstermektedir. Burada CRISPR/Cas9 sistemi ve aynı CRISPR sekansının siRNA'yla ifadesinin azaltılması kullanılmıştır. Şekil 18, A549 p53 -/- hücrelerinde HK1b, HK1c, HK2 ve p53'ün qRT-PCR seviyelerini göstermektedir. Hata çubukları ortalama +/- standart ölçüm hatasını (n=3) gösterir ve p53 KO immünoiblot analizi A549 hücrelerinde yapılmıştır. Şekil 19 HK1b, HK1c, HK2 ve p53'ün A549 hücrelerindeki qRT-PCR seviyelerini göstermektedir. Hata çubukları ortalama +/- standart ölçüm hatasını (n=3) gösterir ve HK1b KO immünoiblot analizi A549 hücrelerinde yapılmıştır. Şekil 20, A549 WT ve A549 HK1b-/- hücrelerinin HK1 antikoru kullanarak yapılan immünofloresans ve immünoiblot analizlerini göstermekte olup endojen nHK1 proteininin tamamen eksik olduğunu ve endojen p53 proteininin seviyesinde bir değişiklik olmadığını göstermektedir.

Şekil 21-23'te Seahorse metabolik analiz cihazı kullanılarak NSCLC hücrelerinin glikoza bağımlı olduğu ve HK1b'nin NSCLC hücrelerinin glikolitik aktivitesi için elzem olduğunu göstermektedir. Şekil 21, HK1b nakavtı (Knockout/KO) sonrası mitokondriyal solunumun analiz sonuçlarını göstermekte olup, burada oksijen tüketim oranında (OCR) ve solunumda kayda değer bir değişiklik olmadığı görülmektedir. Şekil 22, XF glikoliz testiyle hücre dışı asidifikasyon oranı (ECAR) ölçümü sonuçlarını göstermektedir. XF glikolitik oran analizi kontrol hücrelerine (A549 WT) kıyasla HK1b izoformunun kaybı durumunda (A549 HK1b -/-) A549 hücrelerinin glikolitik aktivitesinde önemli azalma

olduğunu göstermektedir. Şekil 23, proliferasyon belirteci olan Ki-67'nin in vitro akış sitometrisi analizi sonuçlarını göstermekte olup burada A549 -/- hücrelerinin yaklaşık %35 düşük Ki-67 seviyesine sahip olduğu görülmektedir.

5 Şekil 24 ve 25 HK1b nakavtının A549 hücrelerinin tümör oluşması üzerindeki etkisini göstermektedir. Şekil 24'te A549 WT veya A549 HK1b-/- hücreleri immün yetmezliğine sahip NSG erkek farelere trake içerisinden verilmesiyle alınan veriler bulunmaktadır. Sol taraftaki grafikler A549 WT (kontrol) ve A549 HK1b -/- verilen farelerdeki (her biri için n=7) tümör hacmini göstermekte olup, çıkarılan tümörlerin görüntüleri de solda verilmektedir. Tümör hacimleri ortalama +/- standart ölçüm hatası ile gösterilmekte olup 10 çift kuyruk eşleştirilmemiş t-testi uygulanmıştır. Şekil 25, HK1 ifadesinin/ekspresyonunun immünohistokimyasal boyamasını ve temsili A549WT tümörü fare ksenograftı (sol) ve A 549 HK1b-/- tümöründe hematoksin ve eozin(H&E) boyamasını göstermektedir. Görüntüler 40X büyütmeyle, küçük resimler 200X büyütmeyle hazırlanmıştır. Ölçü çubukları, 100 µm boyutundadır.

15 Şekil 26, A549 WT ve A549 HK1b -/- hücrelerinin cisplatin tedavisi sonrası mitokondriyal solunum oranının analizini göstermektedir. Analiz sonucunda bazal solunum oranında kayda değer değişiklik olmadığı görülmektedir.

Şekil 27, A549 WT ve A549 HK1b -/- hücrelerinin cisplatin tedavisi sonrası XF glikoliz stres testiyle hücre dışı asidifikasyon oranı (ECAR) ölçümü sonuçlarını göstermektedir. 20 Sonuçlara bakıldığında kayda değer olmasa da bazal glikoliz ve glikolitik kapasitenin azaldığı ve cisplatin tedavisi uygulanan A549 HK1b -/- hücrelerinde glikolitik rezervin tamamen eksik olduğu görülmektedir. Sonuçlar 3 bağımsız deneyin +/- standart sapmasıdır (SD). P-değerleri Student's t-test kullanılarak hesaplanmıştır (***, P < 0.001).

Şekil 28, hücre canlılığı deneyinin sonuçlarını göstermekte olup, A549 WT HK1b -/- 25 hücreleri A549 WT kontrol grubuna (75µM) göre belirgin şekilde daha düşük (47µM) IC50 değerine sahiptir.

Şekil 29, propidyum iyodür (PI) boyamayla ölçülen hücre ölümünün akış sitometrik kantifikasyon analizini göstermekte olup, HK1b silinmesinin ve cisplatinin sinerjik etki göstererek A549 HK1b -/- hücrelerde belirgin şekilde hücre ölümünü arttırdığı 30 görülmektedir.

Şekil 30, apoptotik yolağın immünoblot analizini rapamisin kontrol tedavi yöntemi olarak kullanılmasıyla göstermektedir. Burada, sadece cisplatin tedavisinin PARP ve Kaspaz 3 kırılmasını arttırdığı ancak A549 HK1b -/- hücrelerinde bu kırılmanın daha belirgin olduğu görülmektedir.

5 Şekil 31 HK1 ve Bcl*'nin immünoblot analizini göstermektedir. Anti-beta-aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

Şekil 32, HK1b ablasyonu ve cisplatin kullanımının sinerjik etkisinin p53 -aracılı apoptotik hücre ölümünü arttırdığını göstermektedir. Cisplatin (sırasıyla 75µM ve 47 µM) veya rapamisin (sırasıyla 100µM ve 47 µM) ile muamele edilen hücrelerin immünoblot analizleri ve p53 ve H2AXB'nin immünoblot analizleri verilmektedir. Ayrıca, apoptosis karakteristiklerini gösteren temsili geçirim elektron mikroskopu (TEM) mikrografları verilmiş olup, görüntüler bağımsız iki deneyi göstermektedir. Burada ölçü çubuğu solda 1µm (left) ve sağda 400 nm'dir.

Şekil 33, otofajik sinyal yolağının immünoblot analizini göstermektedir. LC3II oluşumunun A549 HK1b -/- hücrelerinde belirgin şekilde yüksek olması nedeniyle HK1b eliminasyonu glukoz yokluğuna cevap olarak otofaji oluşumunu hafifletmektedir. HK1b silinmesi ve cisplatin A549 HK1b -/- hücrelerinde mTOR fosforilasyonunu belirgin şekilde inhibe etmektedir. Bu etkinin AMPK aracılığıyla oluşturulmadığı oldukça açıktır.

Şekil 34'de otofaji karakteristiklerini gösteren temsili geçirim elektron mikroskopu (TEM) mikrografları verilmiş olup, görüntüler bağımsız iki deneyi göstermektedir. Burada ölçü çubuğu solda 2 µm ve sağda 400 nm'dir. Kırmızı oklar otofajik kesecileri, siyah yıldızlar myelinoid cisimcikleri ve n çekirdek parçalarına işaret etmektedir.

Şekil 35, mTOR aktivasyonunun akış sitomerisi analizini göstermekte olup, HK1b silinmesi ve cisplatinin mTOR fosforilasyonunu belirgin şekilde inhibe ettiği görülmektedir (p=0.001). Sonuçlar 3 bağımsız deneyin +/- standart sapmasıdır (SD). P-değerleri Student's t-test kullanılarak hesaplanmıştır (***, P < 0.001).

Şekil 36, Sanger sekanslama analizi sonuçlarını göstermektedir. HK1b izoformuna spesifik sgRNA'lar sadece insan HK1 geninin sekizinci eksonunu hedeflemek için tasarlandı. sgHK1b ifade eden/ekspres eden GFP sıralaması yapılmış tek hücre

klonlarının ifadesi/ekspresyonu HK1b izoform eliminasyonu ve hedef alanlardaki spesifik indel mutasyonlar için PCR ile gözden geçirildi ve Sanger sıralaması ve HK1b hedef DNA'daki 14bp nükleotitlerin silindiğini gösterdi.

5 **Buluşun Detaylı Açıklaması**

Buluşun bir unsuru bir canlıda kanserin tespit edilmesi veya teşhis edilmesi için bir yöntem olup, söz konusu yöntem canlıdan alınan bir biyolojik numune içerisindeki HK1b izoformu ifadesinin seviyesinin belirlenmesini içerir, ki burada söz konusu HK1b izoformunun normal kontrol seviyesine kıyasla daha yüksek olması söz konusu canlının kanserden muzdarip olduğunu ifade eder. Burada ifade/ekspresyon seviyesi immünoablota ve arkasından dansitometriyle bant intensitesinin kantifiye edilmesiyle belirlenir. Dansitometri metotları tekniğin bilinen durumunda uzman kişilerce bilinmekte olup, örneğin dansitometri için ImageJ veya Quantity One gibi bir yazılım kullanılabilir.

Buluşun tercih edilen bir uygulamasında, bir canlıdan alınan numunede HK1b izoformunun ifadesinde en az %10 veya daha fazla artış, normal seviyeye kıyasla yüksek seviyede olarak kabul edilir.

Buluşun tercih edilen bir uygulamasında, canlıdan alınan numune biyopsi numunesi, tükürük, balgam, kan, serum, plazma, plevral efüzyon veya idrar içerisinde seçilir.

Buluşun tercih edilen bir uygulamasında kanser, küçük hücreli olmayan akciğer kanseridir (NSCLC).

Buluşun bir diğer uygulaması kanserin tedavisinde veya hücre büyümesinin durdurulmasına kullanıma uygun bir aday maddenin taranmasında kullanılacak bir metot olup (Metot 1), söz konusu metot;

a. Test edilecek aday maddenin HK1b izoformu (SEQ ID No: 7 ve SEQ ID No:8) veya HK1b izoformunun fonksiyonel bir eşdeğeriyle temas ettirilmesi;

b. Test edilen aday maddeyle HK1b izoformu (SEQ ID No: 7 ve SEQ ID No:8) veya HK1b izoformunun fonksiyonel bir eşdeğeri arasındaki bağlanma aktivitesinin belirlenmesi; ve^[1]_{SEP}

c. HK1b izoformu ((SEQ ID No: 7 ve SEQ ID No:8) veya HK1b izoformunun fonksiyonel bir eşdeğerine bağlanan aday maddenin seçilmesi adımlarını içerir.

Buluşun bir diğer uygulaması, kanserin tedavisinde veya hücre büyümesinin durdurulmasına kullanıma uygun bir aday maddenin taranmasında kullanılacak bir metot olup (Metot 2), söz konusu metot;

a. Test edilecek aday maddenin HK1b izoformu (SEQ ID No: 7 ve SEQ ID No:8) veya HK1b izoformunun fonksiyonel bir eşdeğeriyle temas ettirilmesi;

b. a) adımından sonra elde edilen HK1b izoformu (SEQ ID No: 7 ve SEQ ID No:8) veya HK1b izoformunun fonksiyonel bir eşdeğerinin biyolojik aktivitesinin belirlenmesi;

c. (c) HK1b izoformu (SEQ ID No: 7 ve SEQ ID No:8) veya HK1b izoformunun fonksiyonel bir eşdeğerinin biyolojik aktivitesini test maddesinin ortamda olmadığı duruma göre azaltan test maddesinin seçilmesi.

Metot 2'de bahsi geçen biyolojik aktivite glikolizdir.

15 Buluşun bir diğer uygulamasında mevcut buluş bir hücreye konulduğunda HK1b ekspresyonunu inhibe eden, bir yolcu dizi ve bir rehber dizi içeren çift sarmallı moleküllere ilişkin olup, yolcu dizi SEQ ID No:1'e karşılık gelen nükleotit sekansını ve rehber dizi SEQ ID No:4'e karşılık gelen nükleotit sekansını içerir ve burada bahsi geçen yolcu dizi ve rehber dizi çift sarmallı bir yapı oluşturmak üzere birbiriyle hibridize olur ve söz konusu çift sarmallı yapı HK1b İfade/eksprese eden bir hücreye konulduğunda

20 HK1b izoformunun ifadesini/ekspresyonunu inhibe eder.

Buluşun bir diğer uygulamasında mevcut buluş bir hücreye konulduğunda HK1b ekspresyonunu inhibe eden, bir yolcu dizi ve bir rehber dizi içeren çift sarmallı moleküllere ilişkin olup, yolcu dizi SEQ ID No:2'ye karşılık gelen nükleotit sekansını ve rehber dizi SEQ ID No:5'e karşılık gelen nükleotit sekansını içerir ve burada bahsi geçen yolcu dizi ve rehber dizi çift sarmallı bir yapı oluşturmak üzere birbiriyle hibridize olur ve söz konusu çift sarmallı yapı HK1b İfade/eksprese eden bir hücreye konulduğunda

25 HK1b izoformunun ifadesini/ekspresyonunu inhibe eder.

Buluşun bir diğer uygulamasında mevcut buluş bir hücreye konulduğunda HK1b ekspresyonunu inhibe eden, bir yolcu dizi ve bir rehber dizi içeren çift sarmallı moleküllere ilişkin olup, yolcu dizi SEQ ID No:3'e karşılık gelen nükleotit sekansını ve rehber dizi SEQ ID No:6'ya karşılık gelen nükleotit sekansını içerir ve burada bahsi geçen yolcu dizi ve rehber dizi çift sarmallı bir yapı oluşturmak üzere birbiriyle hibridize olur ve söz konusu çift sarmallı yapı HK1b ifade/eksprese eden bir hücreye konulduğunda HK1b izoformunun ifadesini/ekspresyonunu inhibe eder.

Bir canlıda kanserin önlenmesi ve/veya tedavi edilmesi için bir metot söz konusu canlıya HK1b izoformuna karşı etkili çift sarmallı molekülün farmasötik olarak etkin bir miktarının verilmesini içerir.

Buluşun bir başka unsuru ilaç olarak, tercihen kanserin önlenmesinde ve/veya tedavisinde kullanım için SEQ ID No: 1 yolcu dizisini ve SEQ ID No: 4 rehber dizisini içeren çift sarmallı moleküldür.

Buluşun bir başka unsuru ilaç olarak, tercihen kanserin önlenmesinde ve/veya tedavisinde kullanım için SEQ ID No: 2 yolcu dizisini ve SEQ ID No: 5 rehber dizisini içeren çift sarmallı moleküldür.

Buluşun bir başka unsuru ilaç olarak, tercihen kanserin önlenmesinde ve/veya tedavisinde kullanım için SEQ ID No: 3 yolcu dizisini ve SEQ ID No: 6 rehber dizisini içeren çift sarmallı moleküldür.

Bir canlıda kanserin önlenmesi ve/veya tedavi edilmesi için bir metot söz konusu canlıya HK1b izoformuna karşı etkili çift sarmallı molekülün farmasötik olarak etkin bir miktarının cisplatin, karboplatin okzalipatinden seçilen bir kemoterapi ajanıyla kombine olarak verilmesini içerir.

Buluşun bir diğer unsuru aktif ajan olarak HK1b ifade eden/ekspresyonu yapan bir hücreye verildiğinde glikolizi ve HK1b izoformu ifadesini/ekspresyonunu inhibe eden SEQ ID No:1 yolcu dizisi ve SEQ ID No: 4 rehber dizisi içeren bir çift sarmallı molekül veya SEQ ID No:2 yolcu dizisi ve SEQ ID No: 5 rehber dizisi içeren bir çift sarmallı molekül veya SEQ ID No:3 yolcu dizisi ve SEQ ID No: 6 rehber dizisi içeren bir çift

sarmallı molekül ve en az bir farmasötik olarak kabul edilebilir ekspiyan içeren farmasötik bileşimdir.

5 Tanımlar:

Metinde geçen "bir", ifadesi buradaki anlamıyla aksi net şekilde belirtilmedikçe "en az bir" anlamına gelmektedir.

"Amino asit" terimi, doğal olarak oluşan ve sentetik amino asitlerin yanı sıra, doğal olarak oluşan amino asitlere benzer şekilde işlev gören amino asit analogları ve amino asit mimetiklerini ifade eder.

Amino asitler, burada yaygın olarak bilinen üç harfli sembolleri veya Iupac-IUB biyokimyasal isimlendirme komisyonu tarafından önerilen tek harfli sembollerle ifade edilebilir.

"Gen", "polinükleotidler", "oligonükleotid", "Nükleik Asitler" ve "nükleik asit molekülleri" terimleri, aksi spesifik olarak belirtilmediği sürece birbirinin yerine kullanılır ve amino asitlere benzer şekilde, yaygın olarak kabul edilen tek harfli kodlarla ifade edilir. Amino asitlere benzer şekilde, hem doğal olarak oluşan hem de doğal olmayan nükleik asit polimerlerini kapsarlar. Polinükleotid, oligonükleotid, nükleotidler, nükleik asitler veya nükleik asit molekülleri DNA, RNA veya bunların bir kombinasyonundan oluşabilir.

Bu buluş bağlamında, "HK1b izoform" ifadesi, insan HK1 izoformunu veya insan HK1b izoformunun işlevsel eşdeğerlerinden herhangi birini kodlayan polinükleotidleri kapsar. Bu buluşta HK1b izoformu veya fonksiyonel bir eşdeğeri, doğal olarak oluşan proteinler olarak doğadan geleneksel klonlama yöntemleri veya seçilen nükleotid dizisine dayanan kimyasal sentez yoluyla elde edilebilir (örn. SEQ ID No: 7 ve SEQ ID No: 8)

Bir madde (örneğin, polipeptit, antikor, polinükleotid, vb.) için kullanılan "izole edilmiş" veya "saflaştırılmış" terimleri, maddenin orijinal ortamından (örneğin, doğal olarak meydana gelirse, doğal ortamdan) uzaklaştırıldığını ve böylece doğal durumundan değiştirildiğini belirtir.

"İzole edilmiş" veya "saflaştırılmış" bir antikör büyük ölçüde hücre materyalinden, örneğin protein (antikörün) elde edildiği kaynak hücre veya dokudaki karbonhidrat, lipid veya diğer kontamine edici proteinlerden, arındırılmış antikörlere, veya kimyasal olarak elde edildiyse kimyasal başlangıç maddeleri veya diğer kimyasallardan arındırılmış antikörleri ifade eder.

Burada kullanıldığı şekliyle, "biyolojik örnek" terimi, tüm organizmayı veya dokularının, hücrelerinin veya bileşen parçalarının bir alt kümesini (örneğin, kan, mukus, lenfatik sıvı, sinovyal sıvı, beyin omurilik sıvısı, tükürük, amniyotik sıvı, amniyotik kordon kanı, idrar, vajinal sıvı ve semen dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere vücut sıvılarını) ifade eder. "Biyolojik örnek" ayrıca bir bütün organizmadan veya hücrelerinin, dokularının veya bileşen parçalarının bir alt kümesinden veya bir fraksiyonundan veya bir kısmından hazırlanan bir homojenat, lizat, ekstrakt, hücre kültürü veya doku kültürünü ifade eder. Son olarak, "biyolojik örnek", örneğin, proteinler veya polinükleotitler gibi hücre bileşenleri içeren bir organizmanın yayıldığı bir besin suyu veya jel gibi bir ortamı ifade eder. Bu buluş bağlamında, biyolojik bir örnek, tercihen akciğer, serviks, mesane, yemek borusu veya prostat veya osteosarkom veya yumuşak doku tümöründen çıkarılan dokuları veya hücreleri içerebilir. [S&P]

Aksi belirtilmedikçe "kanser" terimi, HK1b izoformunu aşırı ifade eden kanserlere işaret eder.

Burada "profilaksi" terimi, hastalık kaynaklı ölüm veya morbiditeyi azaltan herhangi bir aktiviteyi ifade eder. Profilaksi, bir hastalığın ilerlemesinin önlenmesi ve hastalığın ilerlemesinin profilaksisine ve önlenmesine ve semptomların ortaya çıkmasının önlenmesine yönelik faaliyetlerin yanı sıra, fonksiyonu restore ederek ve hastalığa bağlı komplikasyonları azaltarak zaten varolan bir hastalığın olumsuz etkisini azaltmaya yönelik faaliyetleri kapsar. Alternatif olarak, önleme ve profilaksi, belirli bir hastalığın şiddetini hafifletmeyi amaçlayan çok çeşitli profilaktik terapileri içerebilir, örneğin tümörlerin proliferasyonunu ve metastazını azaltmak

Mevcut buluş bir açıdan kanser tedavisi ve/veya profilaksisine ve/veya ameliyat sonrası nüksetmenin engellenmesine yönelik metotlara ilişkin olup, söz konusu metot aşağıdaki adımlardan herhangi birini içerebilir: hücrelerin ameliyatla çıkarılması, kanser

hücrelerinin büyümesinin inhibe edilmesi, tümörün küçülmesi veya geri çekilmesi, remisyonun başlaması ve kanserin oluşumunun baskılanması, tümör regresyonu ve metastazın azaltılması veya inhibisyonu. Etkili tedavi ve/veya kanserin profilaksisi mortaliteyi azaltır ve kanserli bireylerin prognozunu geliştirir, kandaki tümör belirteçlerini azaltır ve kansere eşlik eden saptanabilir semptomları hafifletir. Bir tedavi, HK1b izoformunun ekspresyonunda azalma veya konuyla ilgili kanserin boyutu, prevalansı veya metastatik potansiyelinde azalma gibi klinik faydaya yol açarsa "etkili" olarak kabul edilebilir.

10 Bir açıdan çift sarmallı bir molekülün SEQ ID No:1 olarak adlandırılan yolcu dizisi şu dizilime sahiptir; AAGCGAUUUAAGCGAGCGGAUU

Bir açıdan çift sarmallı bir molekülün SEQ ID No:2 olarak adlandırılan yolcu dizisi şu dizilime sahiptir; AAAGCGAUUUAAGCGAGCGGUU.

Bir açıdan çift sarmallı bir molekülün SEQ ID No:3 olarak adlandırılan yolcu dizisi şu dizilime sahiptir; GCGAUUUAAGCGAGCGGAGUU.

15 Bir açıdan çift sarmallı bir molekülün SEQ ID No:4 olarak adlandırılan rehber dizisi şu dizilime sahiptir; UCCGCUCGCUUUAUCGCUUUU.

Bir açıdan çift sarmallı bir molekülün SEQ ID No:5 olarak adlandırılan rehber dizisi şu dizilime sahiptir; CCGCUCGCUUUAUCGCUUUUU.

20 Bir açıdan çift sarmallı bir molekülün SEQ ID No:6 olarak adlandırılan rehber dizisi şu dizilime sahiptir; AAAGCGAUUUAAGCGAGCGGUU.

Bir uygulamada, çift sarmallı bir molekül olan HK1b izoformunun SEQ ID No:7 olarak adlandırılan yolcu dizisi şu amino asit dizilimine sahiptir; GCGATTTAAAGCGAGCGGAG

25 Bir uygulamada, çift sarmallı bir molekül olan HK1b izoformunun SEQ ID No:8 olarak adlandırılan rehber dizisi şu amino asit dizilimine sahiptir; GCGATTTAAAGCGAGCGGAG

Buluş şimdi, mevcut buluşun kapsamını örneklemek için verilen aşağıdaki örneklerle açıklanacaktır, bu nedenle mevcut buluşun belirli şekil, boyut, malzeme, metodoloji,

protokol vb. ile sınırlı olmadığı anlaşılmalıdır. Burada açıklananlar, bu rutin deneme ve optimizasyona uygun olarak değişebilir.

Ayrıca, tanımlamada kullanılan terminolojinin yalnızca belirli versiyonları veya düzenlemeleri tanımlamak amacıyla olduğu ve yalnızca istemlerle sınırlı olacak olan
5 mevcut buluşun kapsamını sınırlamak için tasarlanmadığı anlaşılmalıdır.

Bu tarifnamede belirtilen her yayın, patent veya patent başvurusu özellikle bütünüyle burada referans yoluyla dahil edilmiştir.

Aksi belirtilmedikçe, burada kullanılan tüm teknik ve bilimsel terimler, mevcut buluşun ait olduğu teknik alandaki sıradan becerilere sahip biri tarafından yaygın olarak anlaşılan
10 anlama sahiptir Burada tarif edilenlere benzer veya eşdeğer olan yöntem ve malzemeler, bu buluşun uygulanması veya test edilmesinde kullanılabilir, ancak uygun yöntem ve malzemeler aşağıda açıklanmıştır.

Buna ek olarak, malzemeler, yöntemler ve örnekler sadece açıklayıcı ve sınırlayıcı olması amaçlanmamıştır.

15 **Örnekler:**

1) Malzeme Ve Yöntem

A) Hücre Kültürü

A549, H1299 dahil olmak üzere insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (NSCLC) hücre hatları, Dr. Engin Ulukaya'nın (İstinye Üniversitesi) laboratuvarından elde edildi ve
20 RPMI 1640'da %10 FBS, %1 penisilin–streptomisin ve %1 l–glutamin ile desteklenmiş tek tabakalı kültürde çoğaltıldı. Tüm hücreler 37C'DE %5 CO2 içeren nemlendirilmiş bir atmosferde muhafaza edildi. Tüm hücre hatları mycoplasma için rutin olarak her 3 ayda bir mycoprobe Mycoplasma algılama Kiti (Ar-Ge sistemleri) kullanılarak test edildi. Tüm hücre hatları 10 pasaj penceresi arasında kullanıldı.

B) Akciğer Kanseri Hücrelerinde Gen Nakavtı ve Gen Çıkarımı

A549-HK 1b izoform-nakavt hücreleri CRISPR/ Cas9 genom düzenleme sistemi kullanılarak üretildi. Kısaca, HK1b izoformuna özgü sgRNA'lar sadece insan HK1 geninin sekizinci eksonunu hedeflemek için tasarlandı. Addgene'den GFP seçim

işaretleyicili pX458 vektörü daha önce de açıklandığı gibi [19], Cas9 ve hedef hücrelere HK1b (yani sgHK1b) hedefleyen bir sgRNA iletmek için kullanıldı.

HK1b'yi hedef alan CRISPR kılavuz dizileri;

Yolcu: GCGATTTAAAGCGAGCGGAG

5 Rehber: CTCCGCTCGCTTTAAATCGC

SgHK1b'yi ifade eden GFP sıralanmış tek hücreli klonların ekspresyonu p53 veya HK1b izoform eliminasyonu için tarandı ve hedef lokuslarda spesifik indel mutasyonları PCR, DNA parçalanma analizleri ve Sanger sekanslama ile doğrulandı

10 SiRNA aracılı gen çıkarımı için, H1b'yi hedefleyen üç farklı siRNA oligosu, insan HK1 geninin sekizinci eksonunu aşağıdaki gibi hedeflemek için tasarlandı. Söz konusu siRNA'lar şu şekildedir:

siRNA#1

Yolcu: AAGCGAUUUAAGCGAGCGGAUU

Rehber: UCCGCUCGCUUAAAUCGCUUUU

15 **siRNA#2**

Yolcu: AAAGCGAUUUAAGCGAGCGGUU

Rehber: CCGCUCGCUUAAAUCGCUUUU

siCRISPR (siRNA#3)

Yolcu: GCGAUUUAAGCGAGCGGAGUU

20 Rehber: CUCCGCUCGCUUAAAUCGCUU

Fonksiyonel ablasyon deneylerinde, eşit sayıda hücre (1x10⁵) kaplandı ve geçici çıkarım için, Lipofectoamine RNAiMAX (Life Technologies) kullanılarak ters transfeksiyon yöntemi ile hücreler siRNA dupleksleri ile transfekte edildi. Hücreler transkripsiyonel analiz için qRT-PCR için 48 saat sonra hasat edildi.

25 C) Hastadan Doku Toplama ve İmmünohistokimyasal Boyama

Bu çalışma İstanbul Medipol Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. İstanbul Medipol Üniversitesine bağlı Hastaneden (İstanbul, Türkiye) klinik ve immünohistolojik olarak doğrulanmış 18 vakadan tüm hastaların kabulüyle NSCLC primer tümör ve normal akciğer dokusu toplandı. Hastaların nitelikleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Kesitler belirtilen 5 antikörlerle boyandı ve HK1, p53 ve Ki-67'nin boyanması, pozitif hücrelerin yüzdesine ve boyama yoğunluğuna bağlı olarak patologlarca ölçüldü. Hastaların klinik özellikleri Tablo 1'de listelenmiştir

Hasta No	Cinsiyet	Yaş (yıl)	Histolojik Tip	Evre	Aşama	P53	Kullanılan Deney
1	Erkek	64	ADC	2	pT2aN1	Positif (%95)	WB
2	Erkek	67	ADC	3	pT3N0	Negatif (% 1)	WB
3	Kadın	75	ADC	2	pT1bN0	Negatif (% 1)	WB
4	Erkek	68	ADC	3	pT2bN1	Positif (% 90)	WB, q-PCT
5	Kadın	53	ADC	1	pT2aN0	Negatif (% 1)	IHC, WB, q-RT
6	Erkek	54	ADC	3	pT2aN2	Negatif (% 0)	IHC, WB, q-RT
7	Erkek	54	ADC	3	pT3N0	Negatif (% 1)	WB, q-RT
8	Erkek	62	Solid ADC	3	ypT2bN0	Positif (% 95)	IHC, WB
9	Erkek	66	Enteric type ADC	2	pT1aN1	Negatif (% 0)	IHC, WB
10	Erkek	65	Invasive mucinous ADC	1	pT4N1	Negatif (% 0)	IHC, WB
11	Erkek	66	Enteric type ADC	2	pT2bN0	Positif (% 95)	IHC, WB
12	Erkek	72	Acinar dominant type ADC	2	pT2N1	Positif (% 90)	WB
13	Erkek	68	Solid ADC	3	pT2N1	Positif (% 90)	IHC, WB, qRT
14	Kadın	76	Acinar dominant type ADC	2	pT2aN0	Negatif (% 0)	WB
15	Erkek	48	Enteric type ADC	2	pT2aN1	Negatif (% 0)	IHC, WB, qRT
16	Erkek	62	Basaloid SCC	2	pT3N0	Positif (% 100)	WB, q-RT
17	Erkek	40	SCC	3	pT2aN2	Negatif (% 1)	WB, q-RT
18	Erkek	69	Solid SDC	3	pT2aN1	Negatif (% 0)	IHC

Tablo 1

D) Kanser Genomu Atlası NSCLC Kohort Analizleri

10 Kamuya açık Kanser Genom Atlası (TCGA) adenokarsinom (n=511) ve SCC (n=501) RNA-seq datası adenokarsinom ve SCC arasındaki DEG'leri doğrulamak için harici kohort olarak ve normal ve TCGA akciğer adenokarsinom numuneleri (RefSeq id NM_001322366) arasındaki HK1b izoformu ekspresyonu/ifadesini analiz etmek için kullanıldı. Akciğer adenokarsinom projesi, GTEx Projesinden 602 normal akciğer dokusu 15 ile eşleşen 426 RNA akciğer tümör doku dizilimini içerir Her veritabanı için RSEM yazılım paketi kullanılarak oluşturulan beklenen transkript okuma sayıları karşılaştırma için kullanılır. Okuma sayıları DESeq2 varyans stabilize normalleştirme yöntemi kullanılarak normalleştirilir.

E) RNA İzolasyonu ve Kantitatif PCR

RNA, üreticinin talimatlarına göre trizol reaktifinde (Invitrogen) homojenizasyon ile insan NSCLC hücrelerinden ve insan klinik NSCLC tümöründen ve normal örneklerden izole edildi ve ardından bir RNeasy kolonunda (Qiagen) saflaştırma yapıldı RNA saflığı Thermo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) tarafından $a_{260}/a_{280} \leq 1.8$ ve $a_{260}/a_{230} \leq 1.5$ olarak standart absorbans oranları ile değerlendirildi. Tamamlayıcı DNA'lar, RevertAid First Strand cDNA sentez Kiti (Thermo Fisher Scientific, Inc.) kullanılarak toplam RNA'nın 2 μ g'ından sentezlendi. Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR (RT-qPCR) sonuçları Bio-Rad'ın itaq Universal SYBR Green Supermix ile elde edildi. Bireysel reaksiyonlar için eşik döngüsü (BT) iCycler IQ dizi analiz yazılımı (Bio-Rad) kullanılarak tanımlanmıştır. Verilerin normalleştirilmesi için β -aktin kullanıldı. Tüm deneyler üç kopya halinde gerçekleştirildi.

Bu çalışmada aşağıdaki dizilime sahip aşağıdaki primerler kullanılmıştır:

HK1a izoformu:

Fwd., 5' TGCCAAGCCCTGTTCTATGC 3',

15 Rev., 5' CTGGGTCTTGAACGCACTG3';

HK1b izoformu:

Fwd., 5' CGCTGAAGACCCAGATTGACA 3',

Rev, 5' GCACCCGCAGAATTCGAAAG 3';

HK1c izoformu:

20 Fwd, 5' GCTGAGTGCCTGGGAGATTT 3',

Rev., 5' TGGCATCATAGTCCTCATCTATTT 3',

HK2:

Fwd, 5' CAACTTCCGTGTGCTTTGGG 3',

Rev., 5' TGAGACCAGGAACTCTCGT 3',

25 p53

Fwd, 5' GGAGCACTAAGCGAGCACTG 3',

Rev., 5' TCTCGGAACATCTCGAAGCG 3',

H₂O₂-aktin

Fwd, 5' AGAGCTACGAGCTGCCTGAC 3'

Rev., 5' AGCACTGTGTTGGCGTACAG 3'.

F) Reaktifler ve Antikorlar

- 5 HK1 (C35C4), HK2 (C64G5), Phospho-Akt (Ser 473), total Akt, Phospho-STAT3(Tyr705), total STAT3, Kırılmış PARP (Asp214) (D64E10), PARP (46D11), Kırılmış Kaspaz-3 (Asp175) (5A1E), Kaspaz-3 (D3R6Y), Fosfo-GSK-3 β (Ser9) (D85E12), Toplam GSK-3 β (D5C5Z), Fosfo-p53 (Ser15), Fosfo-mTOR (Ser2448) (D9C2), Fosfo-AMPK α (Thr172) (D4D6D), toplam AMPK α (D63G4), Atg13 (E1Y9V),
10 β -Aktin (13E5), and yaban turpu peroksidaz (HRP)-konjuge tavşan and fare sekonder antikorlarına karşı tavşan monoklonal primer antikorları Cell Signaling Technologies (USA) firmasından satın alındı. p53 (DO-1), Bcl-2 (C-2), MAP LC3 β (G-2), and BECN1 antikorlarına (G-11) karşı fare monoklonal antikorları Santa Cruz Biotechnologies (USA) firmasından satın alındı. Cisplatin (50 mg/100mL) Koçak Farma'dan satın alındı.

15 G) Hücre Canlılığı Testi

- Hücrelerin 96 kuyulu plakaya ekiminden (15.000 hücre/kuyu) 24 saat sonra A549 ve A549 HK1b -/- hücreleri (%70-%80 birbirine karışmış olarak/konflüent) taşıyıcıyla (PBS/Salin) veya 0–100 μ M/ml arasında değişen konsantrasyona sahip cisplatinle 48 saat daha inkübe edildi. Hücre canlılığı, üreticinin talimatlarına ve 595 nm'de bir mikropilaya
20 okuyucu (model 3550, Bio-Rad Laboratories, CA, USA) ile ölçülen absorbansa göre CellTiter-Blue assay kit (Promega) kullanılarak belirlendi. IC₅₀, negatif kontrole göre absorbansta %50 azalmaya neden olan konsantrasyon olarak tanımlandı. IC₅₀, Graphpad Prism V8 (Graphpad Software, CA, USA) kullanılarak doğrusal olmayan regresyon analizi ile belirlendi.

- 25 A549 (75 μ M) ve A549 HK1b-/- (47 μ M) cisplatin IC₅₀ konsantrasyonları kullanıldı ve 48 saatlik uygulamanın ardından hücreler triprinizasyon ile hasat edildi, santrifüj ile toplandı ve bir kez 1 ml PBS ile yıkandı ve propidyum iyodür ile (BD Biosciences) üreticinin prosedürüne göre boyandı ve floresant aktif hücre sıralayıcıyla ölü hücrelerin sayısı belirlendi.

H) FACS Analiziyle Hücre Proliferasyonu Analizi

A549 ve A549 HK 1b -/- hücreleri tripsinize edildi ve %50 - %70 konflüans ile hasat edildi. Hücreler, vorteks yaparken damla damla buz soğukluğunda %70'lik etanol ile sabitlendi ve en az 24 saat için eksi 20 derecede inkübe edildi Sabitlenen hücreler
5 pelletlendi ve PBS ile iki kez yıkandı. Anti-insan Ki-67, FITC kiti, üreticinin protokolüne (BD Biosciences) göre hücreleri boyamak için kullanıldı, hücreler bir FACS AriaII akış sitometresi ile analiz edildi ve FlowJo yazılımı kullanılarak işlendi.

I) Western Blot Analizi

Hücreler hasat edildi ve PBS çözeltisi içinde yıkandı, toplandı ve daha sonra proteinaz
10 inhibitörü kokteyli ve fosfataz inhibitörü kokteyli (Roche) içeren RIPA tamponunda lizise tabi tutuldu. Lizatlar, 20 dakika boyunca 4c'de 10.000 g santrifüj işlemine tabi tutuldu ve süpernatantlar uzaklaştırıldı. Toplam protein (50 µg) %10 SDS-PAGE ile fraksiyone edildi ve elektroforetik olarak İmmobilon-FL PVDF membranlarına aktarıldı. Membran, oda sıcaklığında 1 saat boyunca bloklama tamponu (Li-Cor) ile bloke edildi ve
15 daha sonra gece boyunca 4 °C'de uygun primer antikor ile inkübe edildi. % 0.05 Tween 2 içeren PBS (PBST) ile yıkandıktan sonra, membran oda sıcaklığında 2 saat boyunca 1:2500 seyreltmeyle uygun sekonder antikor ile inkübe edildi. Membran tekrar PBST ile yıkandı ve immünoaktif bantların gelişimi için Pierce ECL Western Blotting substrat (Thermo Scientific) kullanıldı. Doku örneklerinin immünooblotlanması için, proteinler,
20 insan NSCLC hastalarından toplanan tümör ve komşu tümör dışı akciğer örneklerinden ekstre edildi, sıvı azot içinde donduruldu ve -80 °C'de saklandı. Daha sonra protein lizis tamponu (yukarıda tarif edilen) örneklerle eklendi. Numuneler vorteksledi, homojenize edildi ve kuru buzda üç donma / çözülme döngüsüne tabi tutuldu, santrifüjlendi ve süpernatant toplandı ve daha sonraki immünooblotlama için -80 °C'de saklandı.

J) Oksijen Tüketim Oranı ve Hücre Dışı Asitlenme Oranlarının Ölçülmesi

Seahorse Xfe96 deneyleri için, seahorse XF-96-well plakalarına önceden optimize edilmiş 1.5×10^4 hücre/kuyu son konsantrasyonunda hücreler ekildi ve glikolitik hız, glikoliz stresi ve mito stres testleri üreticinin spesifikasyonuna göre yapıldı (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA). Her veri üç kopya halinde minimal olarak belirlendi.
30 OCR ve ECAR mutlak oranlar (OCR için pmoles/dak ve ECAR için mpH/dak) olarak

rapor edildi veya hücre sayımına karşı normalleştirildi veya temel oksijen tüketiminin bir yüzdesi olarak ifade edildi.

K) In Vivo Ortotopik Xenograft Tümörigenez Testi

NSG fareleri Jackson Laboratuvarından satın alındı ve deneyler İstanbul Medipol 5 Üniversitesi'nde yapıldı. Tüm fareler belirli bir patojensiz tesiste muhafaza edildi ve tüm hayvan deneyleri İstanbul Medipol Üniversitesi kurumsal hayvan bakım ve kullanım komiteleri tarafından onaylanan protokollere uygun olarak gerçekleştirildi. A549 WT ve A549 HK 1b/- hücreleri, ortotopik NSCLC tümör modelini indüklemek için immün yetersiz NSG erkek farelere ortotopik olarak enjekte edildi. Göreceli/Rölatif tümör 10 hacmi, implantasyondan sonraki 8 hafta içinde ölçüldü ve aşağıdaki gibi hesaplandı: $(\text{uzunluk} \times \text{genişlik} \times \text{yükseklik}) \times \pi / 6$. Son noktalara ulaşıldı ve tümör boyutu 2 cm ölçüldüğünde fareler öldürüldü.

L) İmmünofloresans ve Mikroskopi

Hücreler 8-kuyu odası kültür slaytlarında (Lab-tek II, Thermo Fisher Scientific) ekildi. 15 Uygun uygulama veya transfeksiyondan sonra, hücreler oda sıcaklığında 20 dakika boyunca %4 paraformaldehit (Wako) ile sabitlendi ve 15 dakika boyunca PBS tamponunda %0.5 Triton-X100 ile permeabilize edildi. Hücreler, 4 °C'de, HK1, %3 BSA ile PBS'te seyreltilmiş p53 için primer antikorlarla gece boyunca inkübe edildi. PBS'de üç adet 10 dakikalık yıkamadan sonra, hücreler oda sıcaklığında florokrom konjuge 20 sekonder antikorlarla 60 dakika inkübe edildi. Kültür slaytları PBS'de 10 dakika boyunca üç kez yıkandı. Görüntüleme için, hücreler DAPI (H1500, vektör Laboratuvarları) ile Vectashield katılmış gömme ortamında saklandı. Hücre görüntüleme FV-1000 konfokal mikroskop (Olympus) ile gerçekleştirildi.

M) Yapı Hazırlama

25 HK1b (PDB ID: 1QHA) ve HK2 (PDB ID: 2nzt) kristal yapıları kullanıldı, HK1c ise İsviçre-homoloji-modelleme-yazılımı kullanılarak modellendi. Kristal yapıların çözülmemiş kısımları Swiss-Modeller'la modellendi ve döngü bölgelerinin ince ayarı ModLoop ile yapıldı. Kalıntıların protonasyon durumları PROPKA kullanılarak

belirlendi. Beta konformasyonunda glikoz kullanıldı. ATP ve Mg^{2+} , her bir sisteme Glukokinazın kristal yapısından (PDB ID: 3FGU) çevrildi.

N) Moleküler Dinamik Simülasyonları

MD simülasyonları GROMACS 5.1.4 ile CHARMM36 kuvvet alanı kullanılarak gerçekleştirildi. Sistemler, konjugat gradyan algoritması kullanılarak en aza indirildi. Tüm sistemlerde, bi tür optimizasyon algoritması olan dik iniş (steepest-descent) yöntemiyle 1000 adımda enerji azaltılması sağlandı. Sistemler Berendsen algoritması ile NVT grubu kullanılarak dengelendi. Son yapılar 1 atm basınç ve 310 K sıcaklıkta NPT grubunda işlendi. MD simülasyonları 300-ns süresince çalıştırıldı. Tüm koordinatlar analiz için 2-ps aralıklarla kaydedildi. Uzun menzilli elektrostatik kuvvetler PME kullanılarak ele alındı ve Van der Waals kuvvetleri 0.9 nm eşik değeriyle muamele edildi. Su molekülleri TIP3P modeli ile modellenmiştir.

O) İstatistiksel Analiz

Aksi belirtilmedikçe, veriler ortalama \pm SEM (standart ölçüm hatası) olarak ifade edilir. Grafik ve istatistiksel analiz için GraphPad Prism 8 yazılımı kullanıldı. Normalite Shapiro-Wilk testi ile hesapladıktan sonra iki örneği karşılaştırmak için Student t veya Mann-Whitney testi kullanıldı.Çoklu grup karşılaştırmaları için tek yönlü ANOVA analizi ve ardından Tukey'in çoklu karşılaştırma testleri kullanıldıN'nin kesin değeri de dahil olmak üzere istatistik parametreler istatistiksel test ve anlamlılık dşekil ve şekil lejandlarında bildirilmiştir. $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

2) Sonuçlar

A) HK1 Ekspresyonu insan NSCLC'de Upregüledir ve Hastalarda Zayıf Klinik Sonuçlarla İlişkilidir

İnsan NSCLC'DE HK1'in spesifik upregülasyonunu doğrulamak için, insan NSCLC tümör dokularını ve tümöre komşu olmayan akciğer dokuları HK2 ve p53 ile birlikte HK1 ekspresyonu için analiz edildi. Hastaların küçük bir kohortunda immünoiblottlama ile yapılan analizlerde, HK1, HK2 ve p53'ün NSCLC tümör dokularında aynı hastalardan gelen normal akciğer dokusuna kıyasla upregüle edildiğini bulduk (Şekil 1 ve 2). Bununla birlikte, HK 1 ve HK2 bant yoğunluklarının nicelleştirilmesi, insan NSCLC tümörlerinin

HK1 ekspresyonunun HK2'den önemli ölçüde daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 3), bu durum HK1'in küçük örneklem boyutuna rağmen NSCLC'de HK2'den daha fazla ifade edildiğini düşündürmektedir. Bu çalışmada NSCLC hücrelerindeki HK1 in situ ekspresyonu immünohistokimya ile değerlendirildi. Tüm kanserli olmayan epitel doku HK1 için zayıf boyama gösterirken, tümör hücreleri HK1 için orta-güçlü boyama göstermektedir (Şekil 4). Verileri genişletmek için TCGA RNA-Seq verilerinde NSCLC ve normal örnekler arasında karşılaştırma yapıldı. Hastalar daha önce tarif edildiği gibi p53 gen imzasının ekspresyonuna dayanarak p53 WT ve mutant olarak ayrıldı. Analizde mutant p53 olan hastaların daha yüksek seviyede HK1 eksprese ettiği/ifade ettiği saptandı (Şekil 5). Ayrıca evre II hastalarında sadece p53 WT grubunda HK1 ekspresyonunun daha yüksek olduğu görülmekte olup (Şekil 6), bu durum HK1 ekspresyonunun NSCLC'deki tümör derecesi ve hastalık evresi ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Son olarak; sağkalım analizi, HK1'in daha yüksek ekspresyonunun azalmış relapsız (hastalığın nüksetmediği) sağkalım ile ilişkili olduğunu gösterdi ($p = 0.01$; şek. 7), bu durum daha yüksek HK1 ekspresyonunun hastalık ilerlemesi ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

B) İnsan NSCLC Hücreleri Ağırlıklı Olarak HK1 İzofomlarından Sadece Birini İfade Eder - Zayıf Bir Prognostik Faktör Olarak Heksokinaz1b (HK 1b)

HK1 geni yaklaşık 131 kb'ye kadar uzanır ve 25 ekzondan oluşur. RefSeq gen ek açıklamalarına göre, HK1 geninin 5' ucunda alternatif şekilde zincirleşmesi, farklı hücre tiplerinde farklı transkriptler üretir. Testis spesifik ekzonlar, eritroid spesifik ekzon R'nin yaklaşık 15 kb yukarısında bulunur. HK-I geninin ilk 5 ekzonu testise özgü dizileri kodlar. 6. ekson, eritroid spesifik ekson R'dir [10]. Bu dokuya özgü transkriptleri hariç tuttuğumuzda, odaklandığımız 3 adet transkriptimiz bulunmaktadır bunlar: HK1a, HK1b ve HK1c. Öte yandan HK2 geninin RefSeq gen ek açıklamalarında bir adet transkripti vardır (Şekil 8). Testis spesifik transkriptler [11] üzerinde birkaç çalışma olmasına rağmen, farklı dokularda (kanser dokuları dahil) HK1 geninin bu üç izoformunun diferansiyel ifadesi ve işlevleri gösterilmemiştir. HK1 transkriptlerini analiz ettiğimizde, bunları diferansiyel olarak kullanılan ekzonlar sayesinde ayırt etmek mümkündür. HK1a

transkripti 5' ucunda farklı eksonlar içerir ve bu nedenle bu transkripti ayırt etmek mümkündür. HK1b ve HK1c izoformlarını ayırt etmek, aralarındaki yüksek oranda ortak olan eksonlar nedeniyle daha zordur. Hem HK1b hem de HK1a izoformları, HK1c izoformunda eksik olan bir ekstra ekson olan, ekzon 8'e sahiptir. Ekzon 8 etrafındaki bu ekzon-ekzon bağlantı noktalarını kullanarak, HK1b ve HK1c izoformlarını ayırt etmek için özel genomik problemler tasarlayabildik. Bu nedenle, bu eksonları hedeflemek, bu transkriptlerin farklı dokulardaki ifadesini ölçmemizi sağlayacaktır.

NSCLC'NİN tedavisi için yeni, HK1 izoform spesifik metabolik hedef tanımlamak için, önce NSCLC adenokarsinom hücre hatlarında (p53 WT-A549 ve p53 null-H1299) HK2 ve p53 ile birlikte HK1 izoformları (HK1a, HK1b ve HK1c) analiz edildi. Hem A549 hem de H1299 hücrelerinin yarı qPCR verileri, HK1a izoformunun ifadesinin/ekspresyonunun olmaması nedeniyle bu izoformun NSCLC'ye özgü olmadığını gösterdi. HK1b izoformu ağırlıklı olarak p53WTA549 hücrelerinde ifade edilmekte olup, p53-/-H1299 hücrelerinde ifade edilmemektedir. Bununla birlikte, A549 ve H1299 hücreleri arasındaki HK1 ve HK2 ifadelerinin düzeylerinde hiçbir fark gözlemlenmedi (Şekil 11). HK1 izoformlarını tespit etmek için mevcut izoform spesifik antikor olmadığından, hem A549 hem de H1299 hücrelerindeki ekspresyon seviyesini tespit etmek için HK1 antikoru kullanıldı. Bu nedenle, immüno blot analizi ile HK1 protein ekspresyonunun A549 hücrelerinde H1299 hücrelerinden daha yüksek olduğunu ve her iki hücrede de HK2 ekspresyon düzeylerinin değişmediğini göstererek (Şekil 12) PCR sonuçlarını doğruladık bu durum, HK1b ifadesinin a549 hücrelerine özgü olduğunu göstermektedir. İnsan NSCLC kanserinde HK1b upregülasyonunun klinik ilişkisini değerlendirmek için NSCLC hastalarından tümörler ve komşu tümör dışı örnekler üzerinde yarı q-PCR ve qRT-PCR analizleri yaptık. Özellikle HK1b'nin, NSCLC tümöründe, tümöre bitişik normal dokuya kıyasla HK2 transkriptinden ($p=0.03$) daha fazla upregüle ($p = 0.005$) olduğu görüldü (Şekil 13 ve Şekil 14). HK1c izoformunun ekspresyonu/ifadesi anlamlı değildi, bu durum da HK1b'nin HK1c izoformu ve HK2 ile karşılaştırıldığında benzersiz bir şekilde upregüle olduğu görüşünü desteklemektedir. İlginç şekilde, p53 gen ekspresyonu da HK1b'ye benzer şekilde artmıştır ($p=0.005$). A549 NSCLC hücrelerine benzer şekilde, NSCLC hasta tümör hücrelerinde de HK1a izoformunun ekspresyonu/ifadesi görülmemektedir (Şekil 13 ve Şekil 14). NSCLC adenokarsinom ve normal akciğer

dokuları arasındaki HK1b izoformlarının artan ekspresyonunu bir kez daha doğrulamak için, en kapsamlı kamu veri tabanları olan TCGA (Kanser Genom Atlası) Projesi ve GTEx (genotip-doku ekspresyonu) projesini birleştirdik. TCGA akciğer adenokarsinomu projesi, akciğer tümör dokularının 426 RNA dizilimini içerir. Bu tümör örnekleri GTEx Projesinden 602 normal akciğer dokusu ile eşleştirildi. Her veritabanı için RSEM yazılım paketi kullanılarak oluşturulan beklenen transkript okuma sayıları karşılaştırma için kullanıldı. Okuma sayıları DESeq2 varyans stabilize normalleştirme yöntemi kullanılarak normalleştirildi. RT-PCR analizleri ile uyumlu olarak, normal ve TCGA akciğer adenokarsinom örnekleri (RefSeq id NM_001322366) arasında HK1b izoformunun (transkript varyantı-8) ekspresyonu karşılaştırıldığında, NSCLC tümör dokularında HK1b'nin normal akciğer dokularına kıyasla önemli derecede upregüle olduğu görüldü ($P=1.85 \cdot 10^{-7}$). Bir arada değerlendirildiğinde bu veriler, normal akciğer dokularıyla kıyaslandığında çok çeşitli akciğer kanseri hastası olmasına rağmen yüksek HK1b ekspresyonunun NSCLC'ye özgü olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, HK1b izoformunun daha yüksek ekspresyonu, her ne kadar ikincisindeki sağ kalım oranı çok kaydedeğer olmasa da (sırasıyla $p=2.69 \cdot 10^{-2}$, $p=9.5 \cdot 10^{-2}$), NSCLC'nin türlerinden hem adenokarsinomun (Şekil 16) hem de skuamöz hücreli karsinomun (Şekil 17) sağkalım olasılığının azalması ile ilişkilidir. Toplu olarak, verilerimiz, NSCLC'de çekici bir metabolik hedef olarak kullanılabilir HK1b izoformunun özgüllüğü için ikna edici kanıtlar sunmaktadır.

C) HK1b Eksikliğinin NSCLC Hücrelerinde Metabolizma, Proliferasyon ve Tümörigenez Üzerine Etkisi.

HK1 ve HK2'nin N-terminalinin genel olarak enzime stabilite sağlamaktan ve dış mitokondriyal membrana bağlanmadan sorumlu olduğu bilinmektedir. HK1a, b, c ve HK2 yapısal benzerliklere sahip olsa da, N-terminal dizisindeki farklılıklar onları benzersiz kılar ve bu da metabolizmada değişime ve dolayısıyla tümörigeneze önemli ölçüde yansır. Burada HK1b izoformunun N-bölgesinin stabilitesini sağlayan kendine özgü sekanslar içerdiğini destekleyen yapısal farklılıklar bulunduğunu bulduk, bu durum kök ortalama kare değişim analizi ile gösterilmektedir (Şekil 10). Bu yapısal farklılıklar mitokondri ile HK1b arasındaki etkileşimin gücünü arttırmaktadır.

Hep birlikte değerlendirildiğinde bu veriler, HK1b'nin glikolizde ve dolayısıyla NSCLC tümörünezinde önemli bir role sahip olabileceğini göstermektedir. Proliferasyon, sağkalım ve tümörünezde HK1b izoformunun fonksiyonel rolünü ve mekanizmasını anlamak için HK1b izoform eksikliğini metabolik sonuçları analiz edildi. Seahorse metabolik analizörü kullanılarak HK1b'nin silinmesinden sonra glikoliz ve solunumdaki değişiklikler ölçüldü. HK1b nakavtı (KO) sonrası mitokondriyal solunum hızı analiz edildiğinde, oksijen tüketim oranı (OCR) ve solunumda önemli bir değişiklik görülmemesi (Şekil 21), HK1b ablasyonunun mitokondri kaynaklı OXPHOS bakımını başlattığı düşündürmektedir. Bununla birlikte, XF glikoliz stres testi ve XF glikolitik hız testi kullanılarak hücre dışı asitlenme oranı (ECAR) ölçüldüğünde, HK1b izoform kaybının (A549 HK1B-/-) A549 hücrelerindeki glikolitik aktivitede kontrol hücrelerine (A549 WT) kıyasla önemli azalmalar görülmesine neden olduğu görüldü (sırasıyla $p=0.0001$ ve $p=0.002$) (Şekil 22). Ayrıca, daha sonra A549 WT ve A549 HK 1b-/- hücrelerinin metabolik yakıt bağımlılıkları ve kapasiteleri belirlendi. A549 HK1b-/- hücrelerinin önemli derecede düşük glikoz bağımlılıklarına ($p=0.006$) sahip olduğu ve A549 WT hücrelerine kıyasla glikoz kapasitelerinde veya glutamin bağımlılıklarında ve kapasitelerinde önemli bir değişiklik olmadığı görüldü. Bu bulgular, A549'un glutamin yerine glikozu tercih ettiğini ve HK1b'nin bir glikolitik regülatör olarak işlev gördüğünü ve glikoz metabolizmasında geniş bir rol oynadığını göstermektedir. İlginç şekilde, HK1b'nin silinmesi, yağ asidi bağımlılıklarını ($p < 0.0001$) ve yağ asidi kapasitelerini önemli ölçüde artırmıştır ($p=0.03$). Gerçekten de, önceki çalışmalardan kanser hücrelerinin besin tükenmiş koşullarda mitokondriyal yağ asidi oksidasyonuna giderek daha fazla bağımlı hale geldiği görülmektedir.

Azaltılmış glikolizin in vitro proliferasyon üzerindeki etkisini değerlendirmek için proliferasyon için bir işaret olan Ki67'nin akış sitometri analizleri yapıldı ve A549 HK1b - / - hücreleri Ki-67 seviyesinde yaklaşık %35 azalma gösterdi (Şekil 23). Onemli olarak, HK1b'nin in vivo potansiyel tümörjenik rolünü test etmek için, A549 WT ve A549 HK1b -/- hücreleri ortotopik olarak, ortotopik NSCLC tümör modelini indüklemek için immün yetersiz NSG erkek farelere enjekte edildi. İmplantasyon sonrası 8 hafta içinde relatif tümör hacmi ölçüldü. A549 HK 1b -/- hücreleri taşıyan farelerde tümör boyutu %35 oranında belirgin şekilde azaldı ($p = 0.01$) (Şekil 24). Histopatoloji ksenograftların

A549 WT veya A549HK1b -/- hücrelerinden karakterizasyonu, her ikisinin de NSCLC akciğer adenokarsinomu olduğunu gösterdi. Tümör dokusunun HK1 ile boyanması, A549 HK1b-/- verilen farelerden gelen tümörde, A549 WT verilen farelerinden gelen tümörlere kıyasla HK1 ekspresyonunun gözlenmediğini doğruladı (Şekil 24). Tümör dokularındaki Ki67'nin immünohistokimyasal analizi, HK1b-/- olan tümörlerin WT tümörlerle karşılaştırıldığında Ki67 boyamalarının anlamlı derecede düşük olduğunu göstermiştir (p=0.001) (Şekil 25), bu durum HK1b nakavt (KO) hücrelerinin daha az çoğalma kabiliyetine sahip olduğunu göstermektedir. Tüm bu veriler, HK1b'nin inhibisyonunun, NSCLC'de glikolizi hafifleterek hücre proliferasyonunu ve tümör büyümesini azalttığını göstermektedir.

D) NSCLC Hücrelerinde HK1b KO ve Cisplatin Tedavisinin Metabolizma, İlaç Etkisi ve Sağkalım Yolu Üzerine Etkisi

NSCLC için tedavi seçenekleri esas olarak çeşitli faktörlere dayanır, ancak genel olarak kemoterapi NSCLC hastaları için ilk uygulanan tedavilerinden biridir. Cisplatin, NSCLC'nin tedavisinde yaygın olarak kullanılan biraz daha etkili bir platindir. Ancak, cisplatinin daha fazla yan etki ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, metabolik değişiklikleri hedefleyen inhibitörler potansiyel bir terapötik olarak geliştirilmiştir ve birkaç tanesi erken evre klinik çalışmalarda bulunmaktadır, ancak ilaçların olumsuz yan etkisi nedeniyle şimdiye kadar yapılan çalışmalar başarılı olamamıştır. Bu nedenle, NSCLC hastalarında sağkalımı iyileştirmek ve hastalığa bağlı advers olayları azaltmak için kanser hücrelerinde kesin ve etkili metabolik terapötik hedef için klinik olarak henüz karşılanmayan bir ihtiyaç vardır. Biz ilk olarak HK1b eliminasyonunun glikolizde azalmaya neden olması nedeniyle, HK1b eliminasyonu ve cisplatinin sinerjik etki göstererek glikolizi daha da azaltarak NSCLC için terapötik özellik gösterebileceği hipotezini geliştirdik. Bazal glikoliz ve glikolitik kapasitenin önemli olmasa da daha fazla azaldığını ve cisplatin ile tedavi edilen A549 HK1b-/- hücreleri üzerinde glikolitik rezervin toplam yokluğunu gözlemledik (Şekil 21). Cisplatin ile tedavi edilen A549 WT ve A549 HK1b -/- hücreleri arasında bazal solunum hızında belirgin bir değişiklik gözlenmedi. Bununla birlikte, cisplatin ile tedavi edilen A549 WT hücrelerinde sadece yedek solunum kapasitesi azalmıştır (P = 0.02) (Şekil 26-27).

Daha sonra HK1b delesyonunun NSCLC hücrelerini cisplatin tedavisine duyarlı hale getirip getiremeyeceğini araştırdık ve cisplatinin HK1b ablasyonu ile veya HK1b ablasyonu olmadan ilaç etkisini değerlendirdik. Hücre canlılığı testi yapıldı ve A549 HK1b -/- hücrelerinin IC50 değeri (47µM), A549 WT kontrol grubuna (75µM) göre anlamlı olarak düşük bulundu (Şekil 28). Hücre ölümünün akış sitometrisi ölçümü propidyum iyodür (PI) ile yapıldı. HK1b'nin silinmesi ve cisplatinin sinerjik etkisi, A549 HK1b -/- hücrelerinde hücre ölümünü önemli ölçüde artırmaktadır (Şekil 29). Ayrıca, sadece cisplatin tedavisinin PARP ve Caspase 3'ün kırılmasına neden olduğunu, ancak A549 HK1b-/- hücrelerinde kırılma indüksiyonunun anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 30). Rapamisin tedavisini kontrol olarak kullanarak rapamisinin değil cisplatinin apoptozu başlattığını gördük (Şekil 30) ve HK1b eliminasyonu ile beraber cisplatin kullanımının, daha fazla cisplatin kaynaklı hücrel apoptozu teşvik ettiği tespit edildi. İlginçtir ki, HK1b silme işlemi, ilaç uygulanmayan A549 HK 1 B-/- hücrelerinde Bcl-2 ekspresyonunun aşağı regülasyonunu hafifçe başlatır ve Bcl-2 ekspresyonunun aşağı regülasyonunun cisplatin tedavisi ile belirgin olduğu görülmüştür (Şekil 31). Gerçekten de, HK 1 veya HK2, mitokondri ile doğrudan etkileşim yoluyla mitokondriyal düzenlenmiş apoptozise karşı korunmada açık bir rol oynar. Şaşırtıcı bir şekilde, HK2 değil ancak HK1'in ekspresyonunun/ifadesinin, cisplatin ile tedavi edilen A549 WT hücrelerinde önemli ölçüde upregüle olduğu görülmektedir (Şekil 31), bu da HK1'in (temel olarak HK1b izoformunun) NSCLC'ye özgü olduğunu göstermektedir. Ayrıca cisplatin ile tedavi edilen A549 HK1b -/- hücrelerinde HK2 ekspresyonunun azaldığı gözlemlendi (Şekil 31). Bu sonuçlar, HK1b kaybının NSCLC hücrelerinde apoptozu indüklemek için NSCLC hücrelerini cisplatine duyarlı hale getirdiğini göstermektedir.

HK1b delesyonunun ve cisplatin tedavisinin apoptozun sinerjik indüksiyonu üzerindeki etkilerinin altında yatan mekanizmayı belirlemek için proliferasyon ve sağkalım sinyal yollarını incelendi. HK1b'nin susturulması üzerine, AKT aktivasyonunun ve aşağı akım hedefi GSK3β'nin aktive edildiğini gözlemlendi, ancak HK1b'nin susturulması ile cisplatin tedavisi kombinasyon halinde olduğunda bunun tamamen inhibe edildiği görüldü.

HK1b'nin silinmesi ve cisplatinle birlikte mTOR'un fosforilasyonunu (Şekil. 33) ve STAT3 transkripsiyon faktörünü (Şekil 32) önemli ölçüde inhibe etti. Bir arada

değerlendirildiğinde bu sonuçlar HK1b ablasyonunun ve cisplatinin PI3-kinaz ve NSCLC hücrelerindeki STAT yolları gibi çeşitli onkojenik kaskadları aşağı doğru düzenlediğini göstermekte olup, kanser hücresi çoğalması, sağkalım ve tümör büyüme yollarının inhibisyonunun arkasındaki altta yatan mekanizmayı ortaya koymaktadır.

5 E) HK1b Çıkarımı/Ablasyonu ve Cisplatin Kombinasyonu Sinerjik Olarak hem Apoptotik hem de Otofajik Hücre Ölümünü Arttırır

HK1b çıkarımının/silinmesinin cisplatine duyarlılaştırdığını ve bununla birlikte daha fazla sayıda apoptotik hücre indüklediği tespit edildi. Hücre ölümünün altında yatan mekanizmayı araştırmak için A549 WT ve A549 HK1b -/- hücrelerinin cisplatin veya rapamisin tedavisi ile farklı hücre ölüm yolları incelendi. Ayrıca, HK1b ablasyonu ve cisplatinin apoptozu p53'ün hem aktivasyonu hem de yüksek ekspresyonu ile arttırdığı gösterildi. Son çalışmalar otofaji ve apoptoz arasında karmaşık ve çok yönlü bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır. Dahası, glikoz yoksunluğu tipik olarak enerji homeostazını korumak için otofaji indüksiyonuna neden olur. HK1b çıkarımı ve cisplatin kombinasyonunun A549 hücrelerinde otofajinin aktivasyonuna neden olup olmadığını belirlemek için, rapamisin tedavisini kontrol olarak kullanarak otofajik sinyalizasyon yolu incelendi. Beklendiği gibi, HK1b eliminasyonu, glikoz yoksunluğuna yanıt olarak otofaji indüksiyonunu azaltır bu A549 HK1b-/- hücrelerinde LC3II oluşumu önemli ölçüde yükselmesinden anlaşılmaktadır. Ayrıca, cisplatin veya rapamisin tedavisi ile HK1b eliminasyonu/silinmesi, A549 HK1b - / - hücrelerinde daha fazla otofajiye neden olur. HK 1b silinmesi ve cisplatin, A549 HK1b -/- hücrelerinde mTOR'un fosforilasyonunu önemli ölçüde inhibe eder (Şekil 33). Bu noktada dikkati çeken bir unsur da bu etkilere AMPK tarafından aracılık edilmemesidir, bu enzimin aktivitesi HK1b seviyelerinin eliminasyonundan etkilenmediğinden, AMPK fosforilasyonunda değişiklik olmamıştır. Ayrıca, cisplatin veya rapamisin tedavisi üzerine, AMPK fosforilasyonunun A549 WT hücrelerinde azaldığı, ancak fosforilasyonun A549 HK1b -/- hücrelerinde tamamen inhibe olduğu görüldü (Şekil 33). Her ne kadar cisplatin veya rapamisin ile tedavi edilen A549 HK1b-/- hücrelerinde daha yüksek LC3II ekspresyon seviyesi gözlemlense de, hem A549 WT, hem de A549 HK1b - / - hücrelerinde diğer otofaji indikatörleri olan beclin-1 ve ATG13 ekspresyon/ifade düzeylerinin aşağı regüle olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, rapamisin tedavisi ile birlikte beclin-1 ve ATG13 seviyeleri

değişmedi. Ayrıca, HK1b silinmesi ve cisplatinin, elektron mikroskopuyla (EM) da gösterildiği gibi önemli sayıda otofajik vezikül ve miyelinoit cisimlerini indüklediği gösterilmektedir. Tüm veriler ele alındığında; otofajinin temel olarak glikoliz azaltılmasıyla ve apoptotik hücre ölümünün büyük oranda cisplatinle başlatıldığını gösterildi. Bu veriler, HK1b silme işleminin cisplatin ile kombinasyonunun, apoptotik ve otofajik yolların aktivitesini artırarak daha fazla hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir.

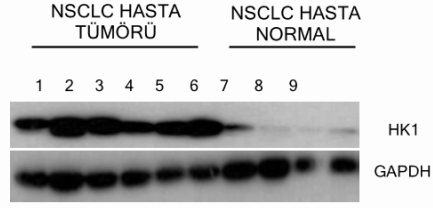
Referanslar:

1. Douglas Hanahan & Robert Weinberg, Cell, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, Volume 144, Issue 5, 4 March 2011, Pages 646-674
2. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation, Science, 2009 May 22; 324(5930): 1029–1033. doi:10.1126/science.1160809
3. Targeting Metabolism for Cancer Therapy, Cell, Alba Luengo.
- 15 4. Goodwin, J., et al., The distinct metabolic phenotype of lung squamous cell carcinoma defines selective vulnerability to glycolytic inhibition. Nat Commun, 2017. 8: p. 15503.
5. Anna M. Puzio-Kuter. Genes & Cancer. 2011; 2(4), 385-391
6. Vousden, K and Ryan, K. Nature Reviews Cancer. 2009; 9, 691-700
- 20 7. Mathupala, et al. Oncogene. 2006; 25, 4777-4786
8. Subcellular Localization of Hexokinases I and II Directs the Metabolic Fate of Glucose-Plos one
9. Robey RB, Hay N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. Oncogene 2006;25(34):4683-96 doi 10.1038/sj.onc.1209595.
- 25 10. Rose IA, Warms JV. Mitochondrial hexokinase Release, rebinding, and location., Journal of biological chemistry 1967;242(7):1635-45.
11. Testis-Specific Expression of mRNAs for a Unique Human Type 1 Hexokinase Lacking the Porin-Binding Domain

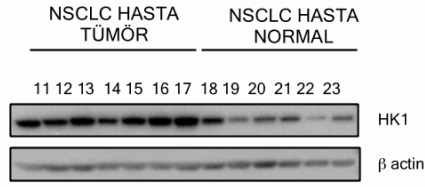
12. Mori C, Welch JE, Fulcher KD, O'Brien DA, Eddy EM (1993): Unique hexokinase messenger ribonucleic acids lacking the porin-binding domain are developmentally expressed in mouse spermatogenic cells. *Biol Reprod* 49:191-203.

5

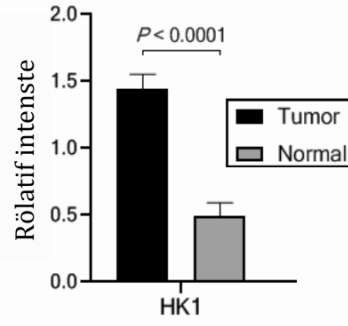
10



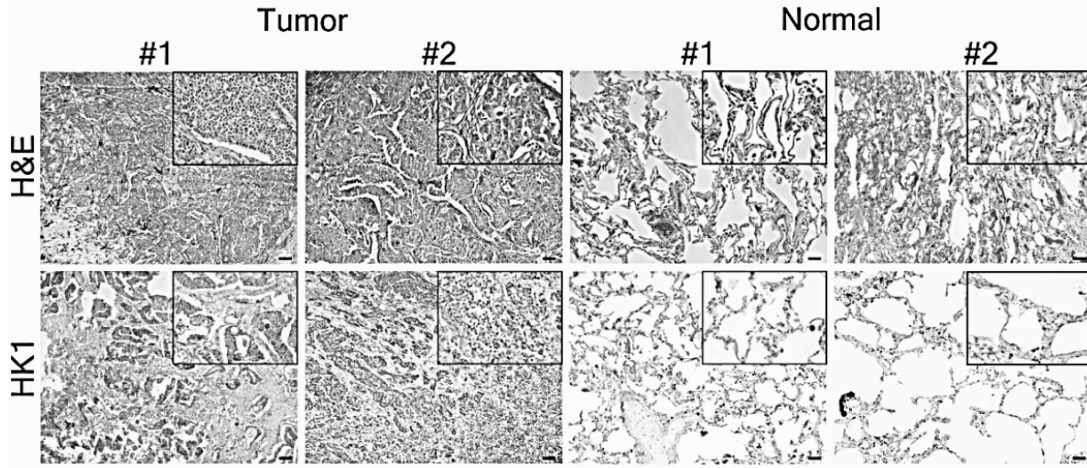
Şekil 1



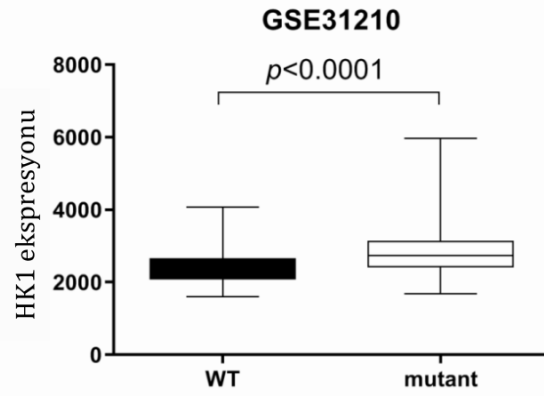
Şekil 2



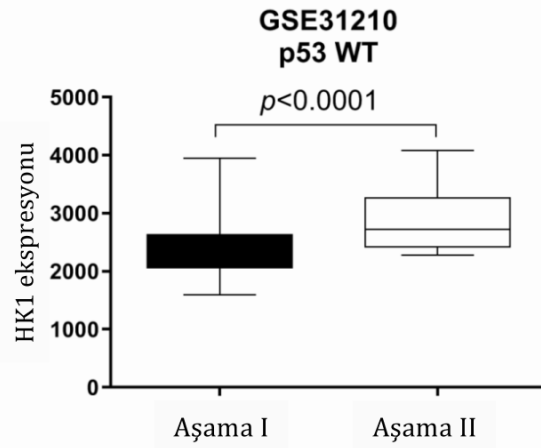
Şekil 3



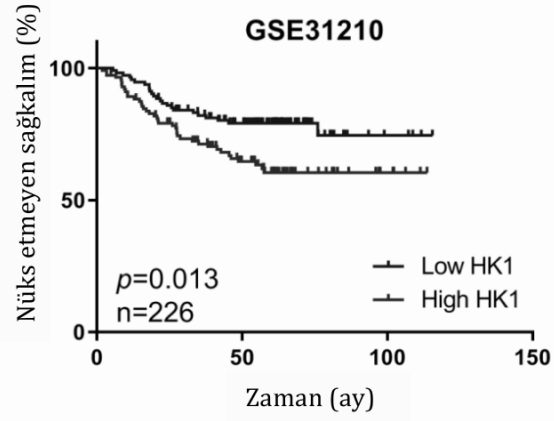
Şekil 4



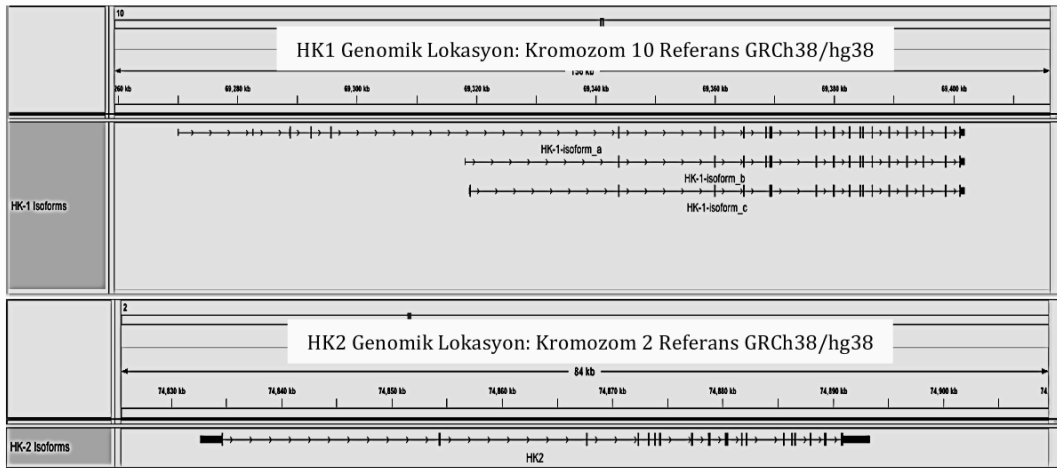
Şekil 5



Şekil 6



Şekil 7

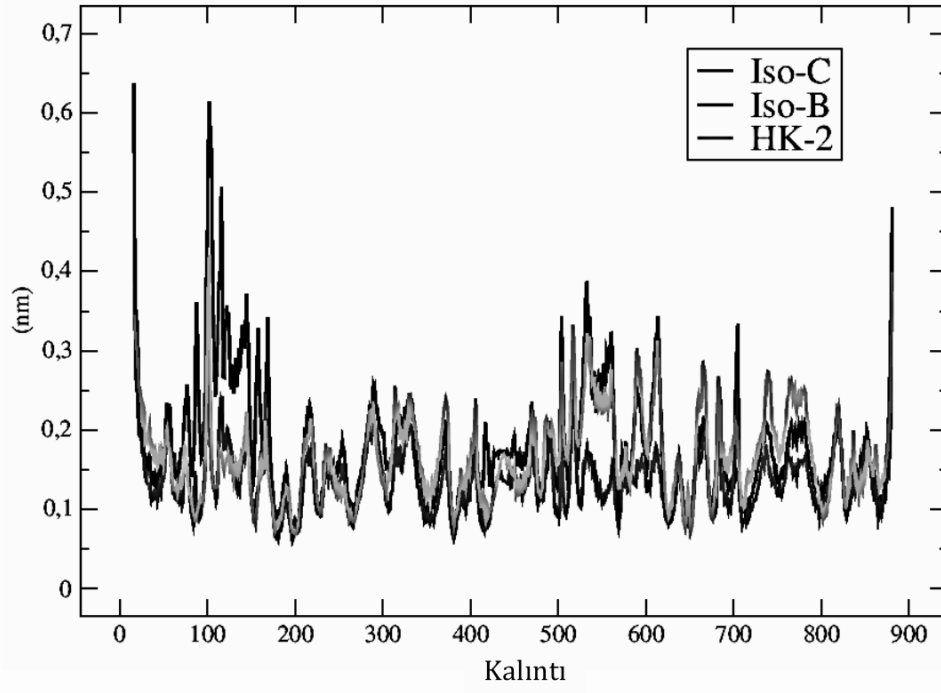


Şekil 8

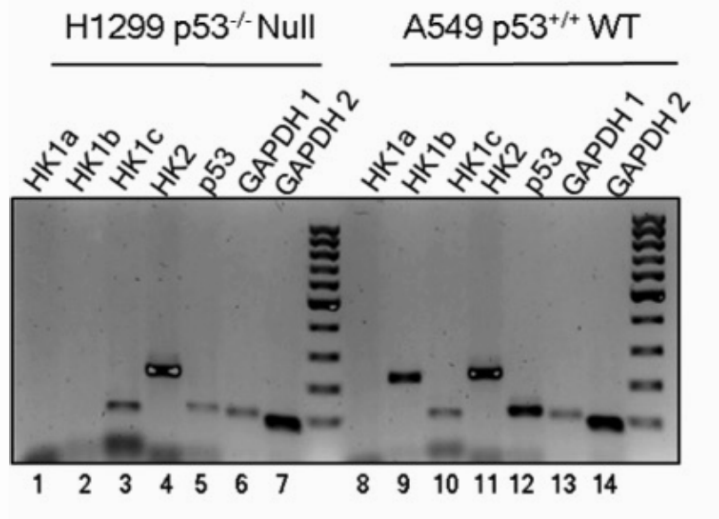


Şekil 9

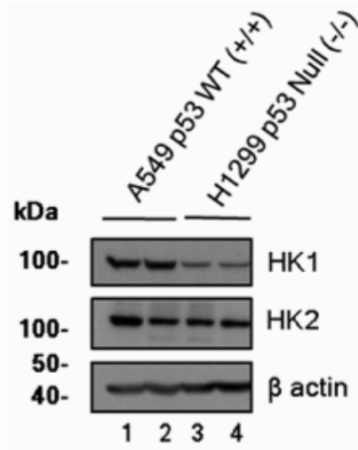
RMS dalgalanması



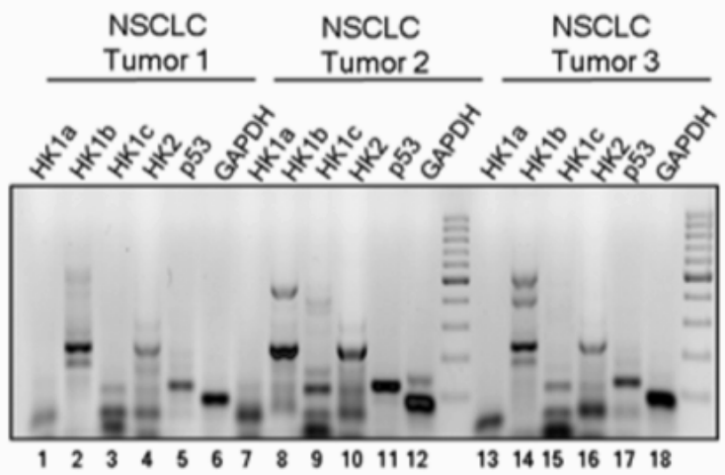
Şekil 10



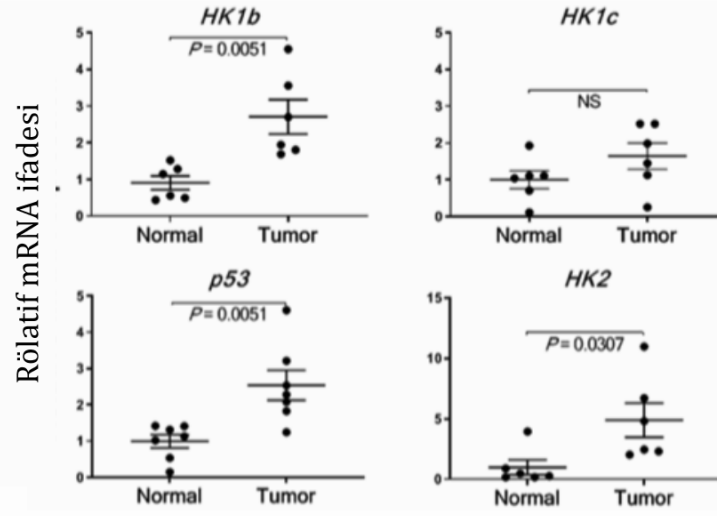
Şekil 11



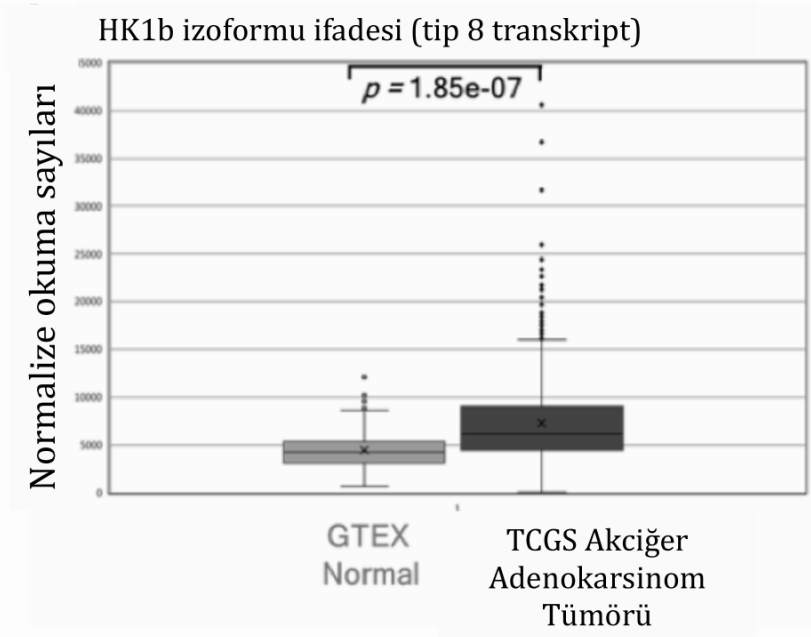
Şekil 12



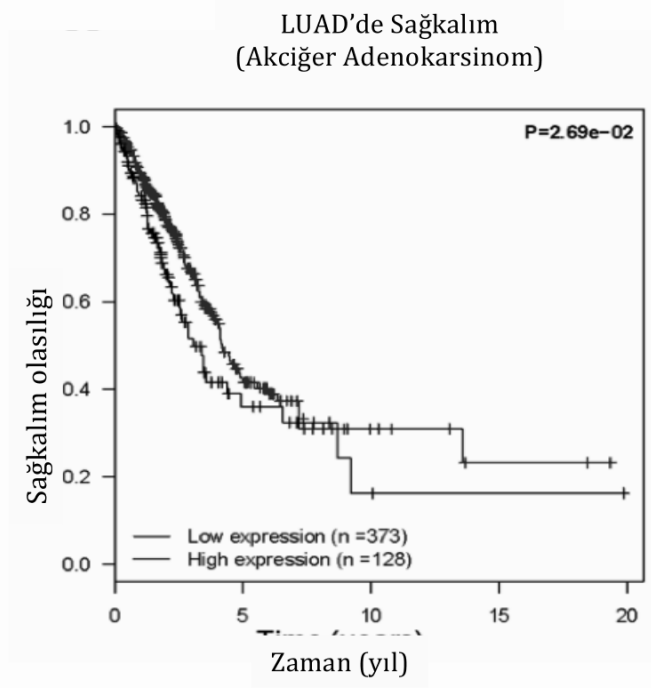
Şekil 13



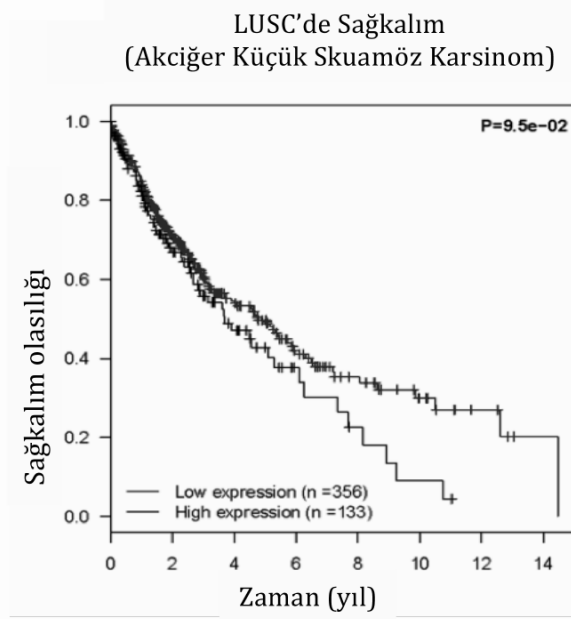
Şekil 14



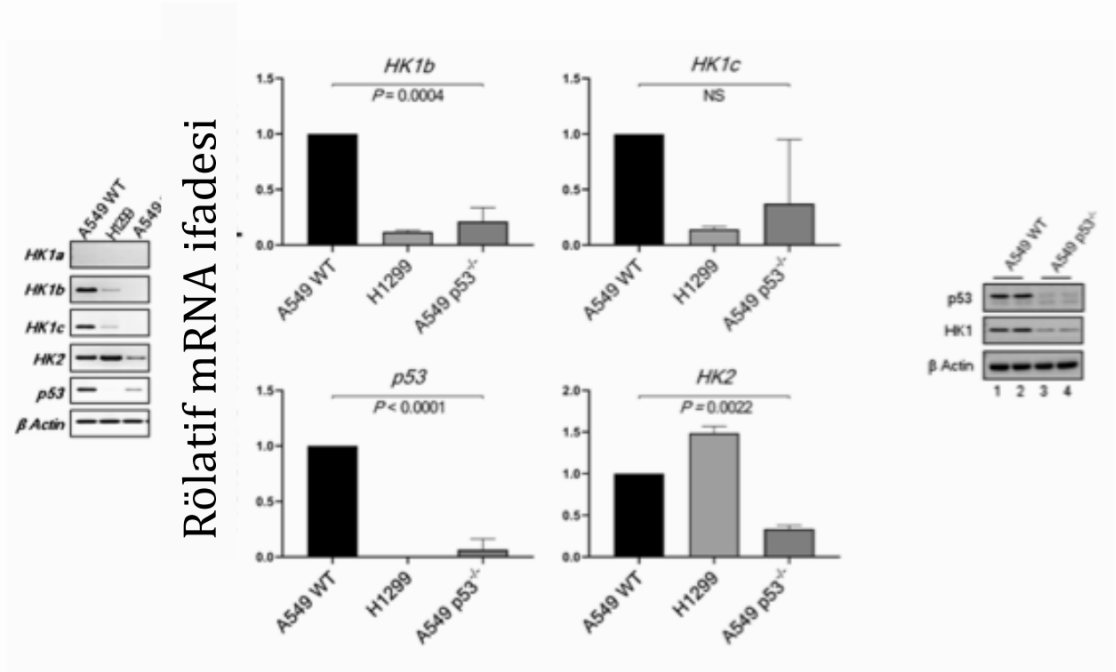
Şekil 15



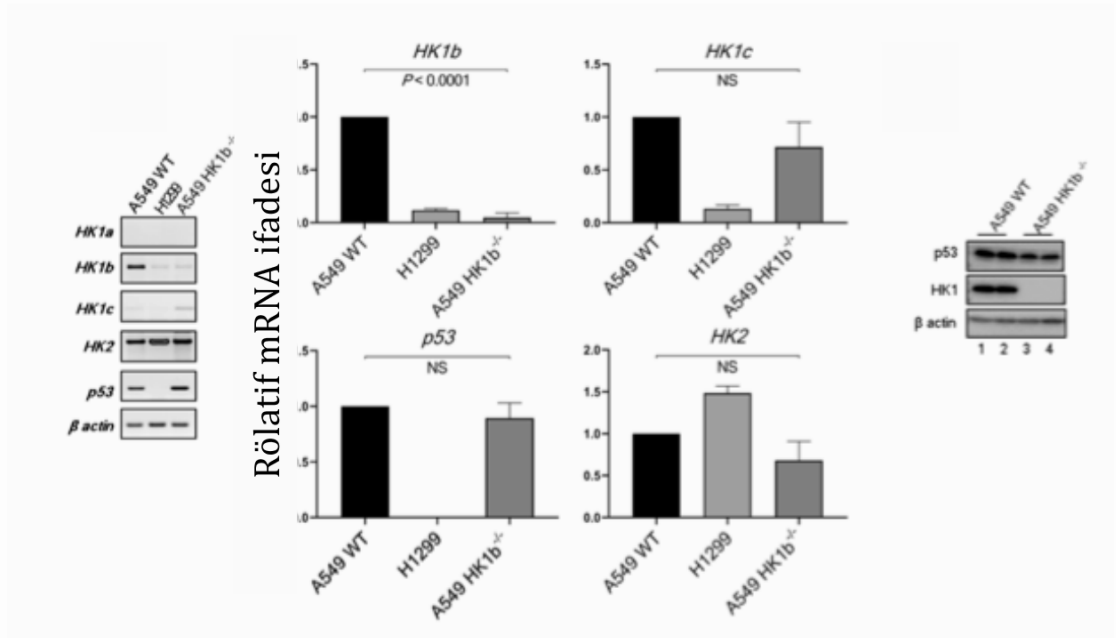
Şekil 16



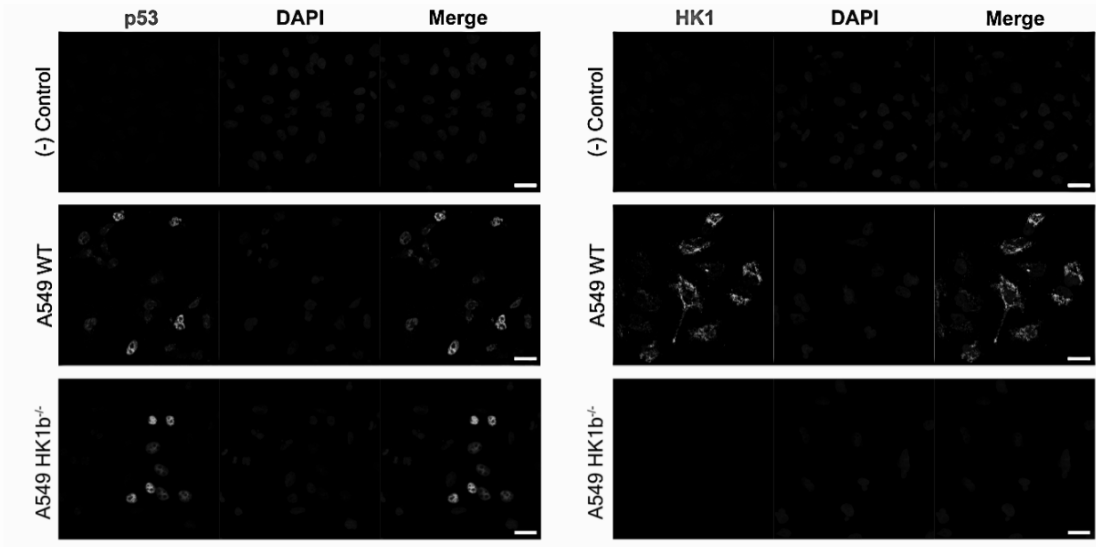
Şekil 17



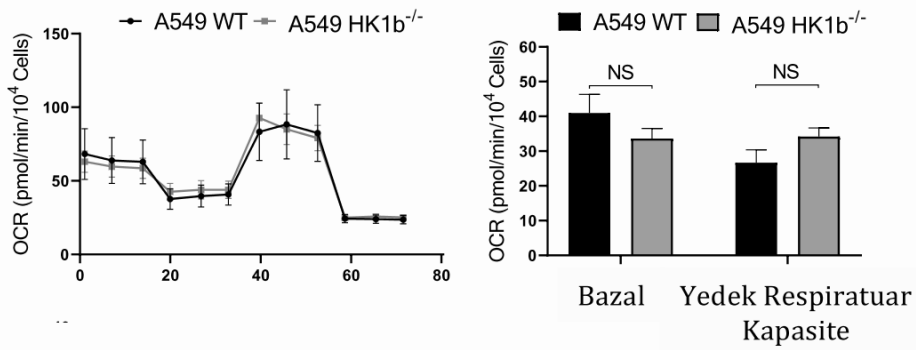
Şekil 18



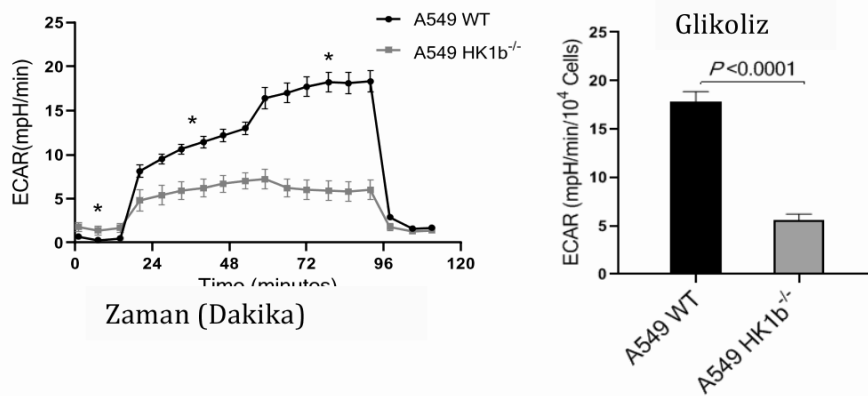
Şekil 19



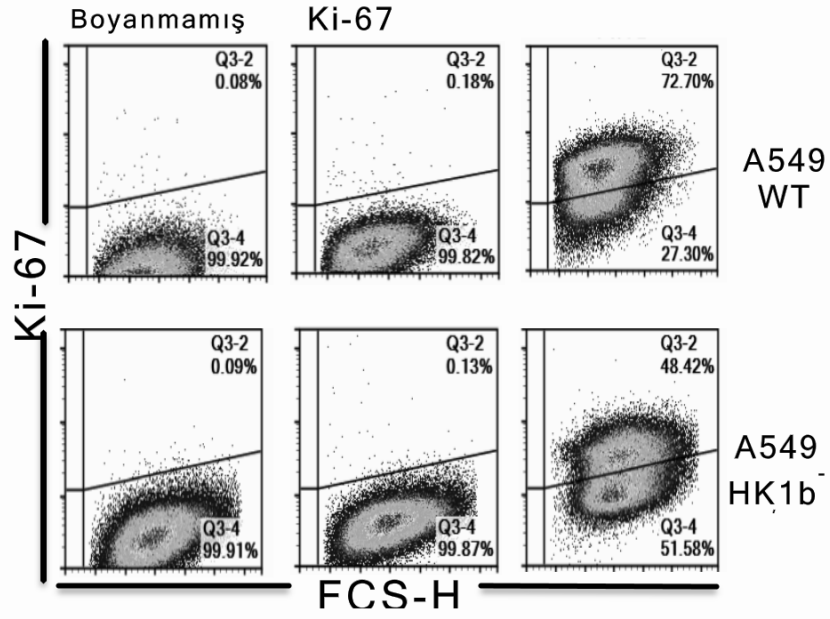
Şekil 20



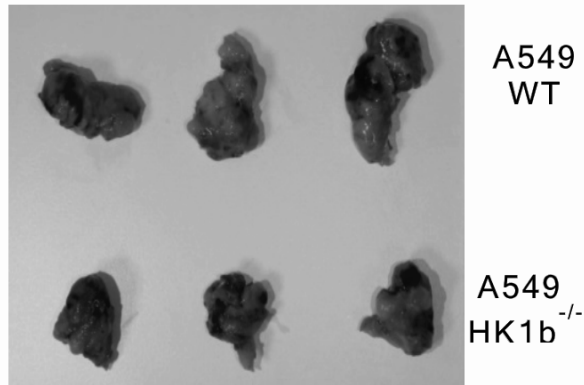
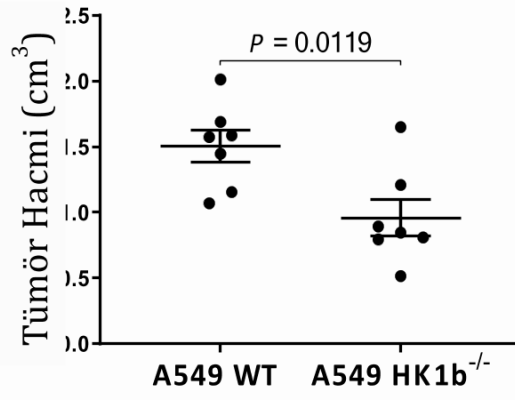
Şekil 21



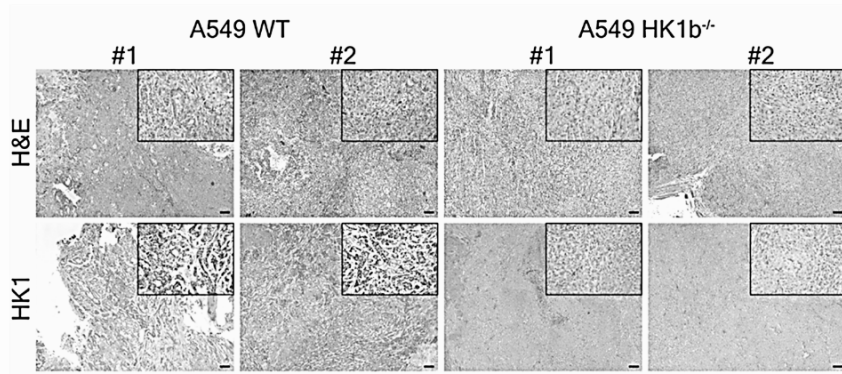
Şekil 22



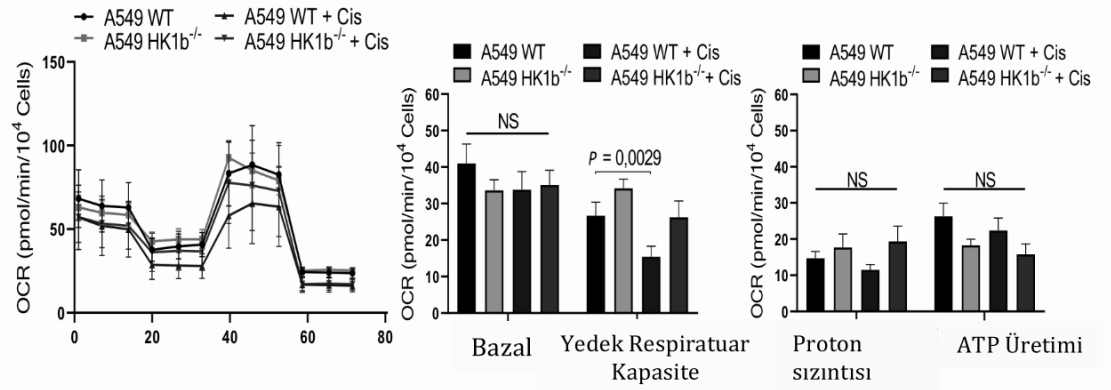
Şekil 23



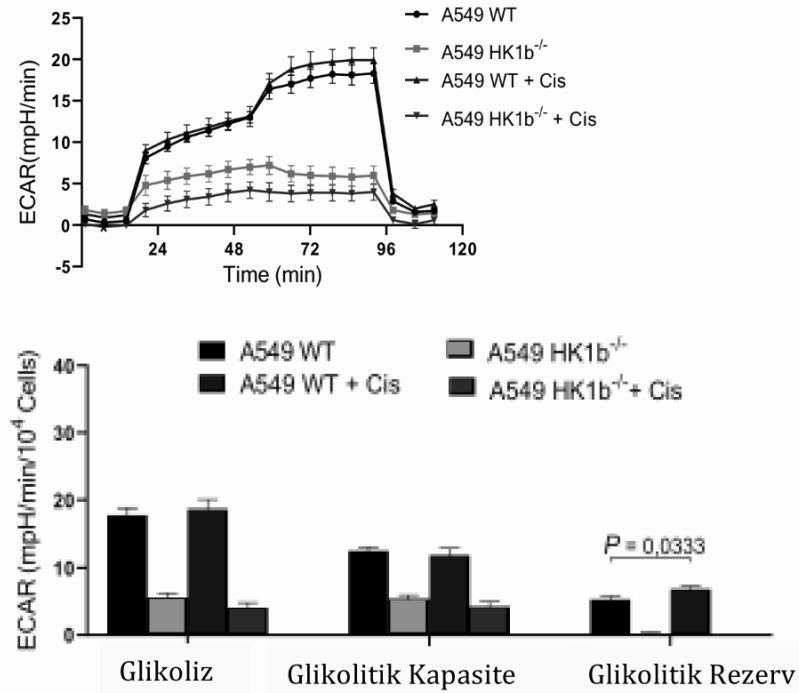
Şekil 24



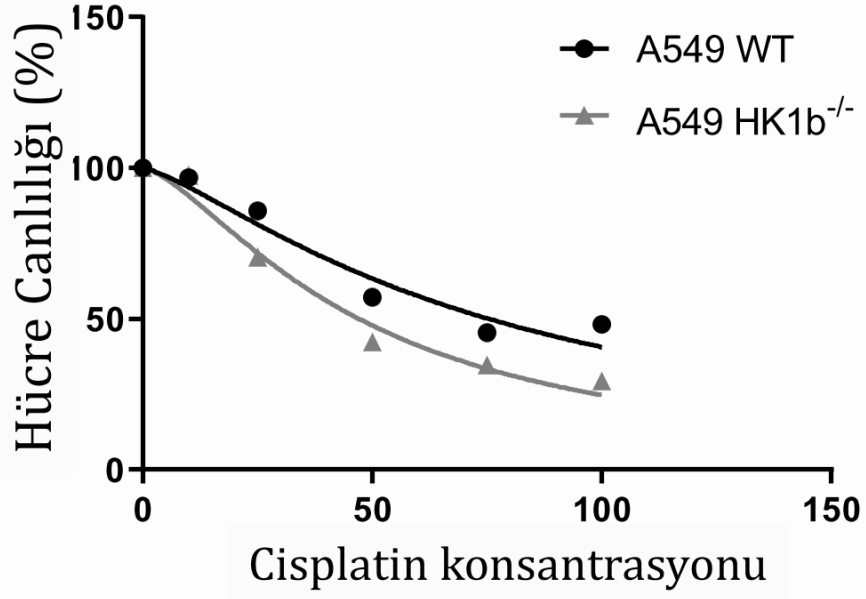
Şekil 25



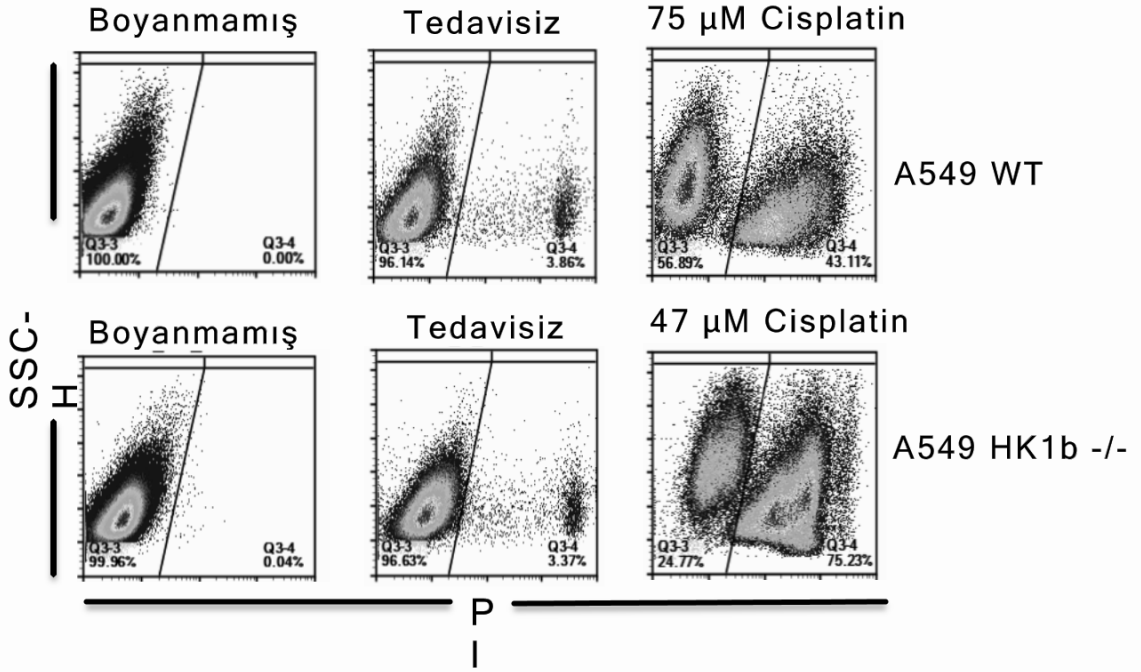
Şekil 26



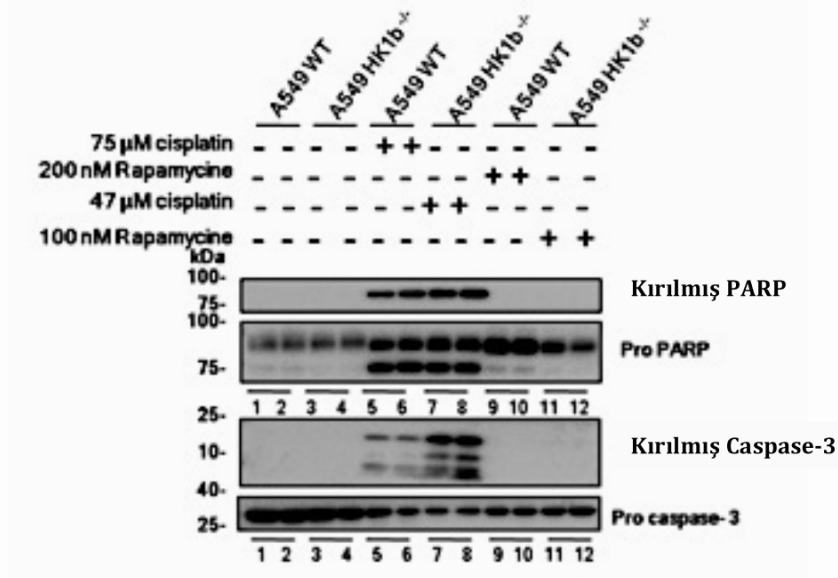
Şekil 27



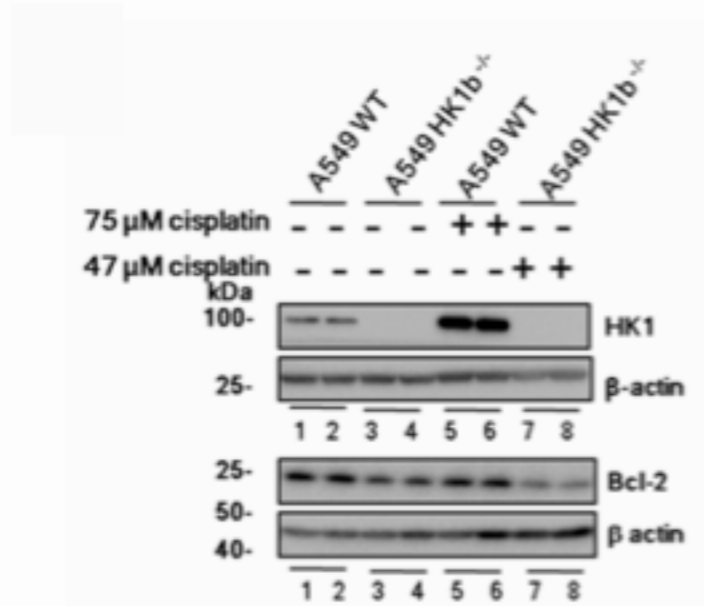
Şekil 28



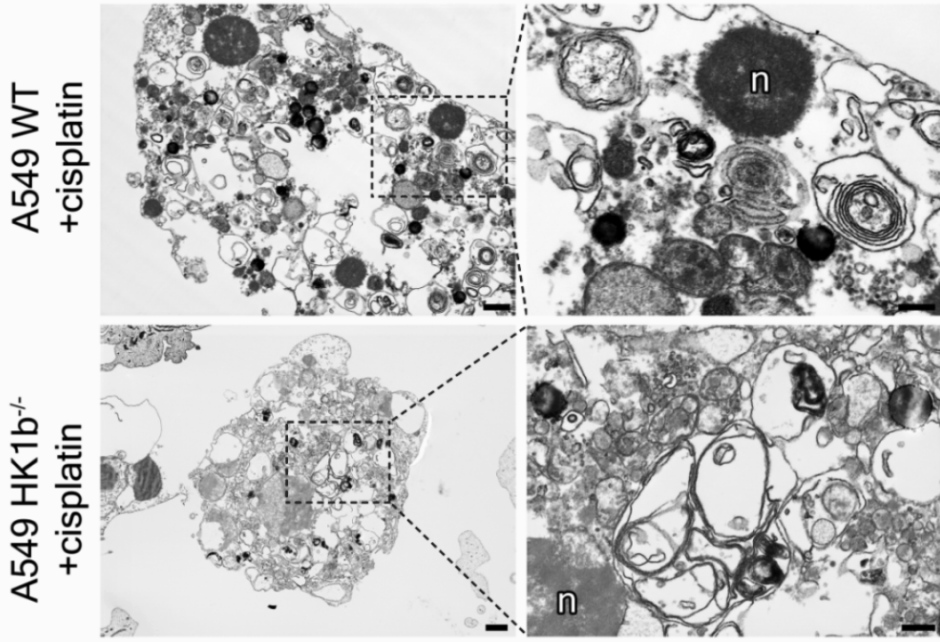
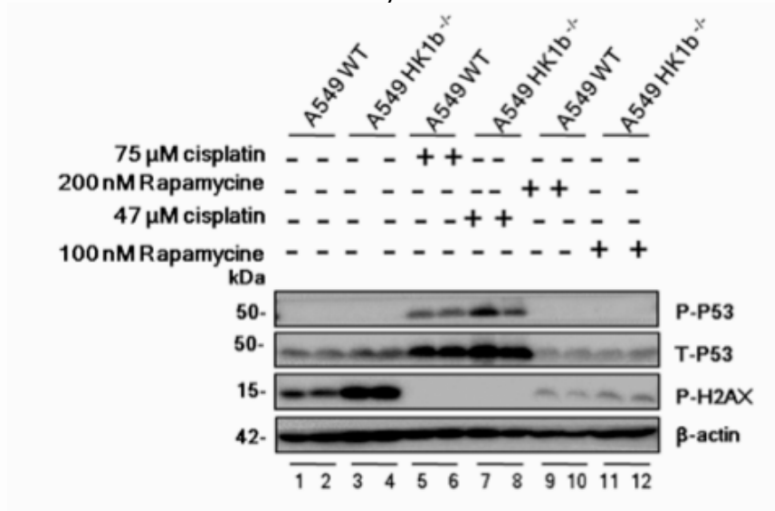
Şekil 29



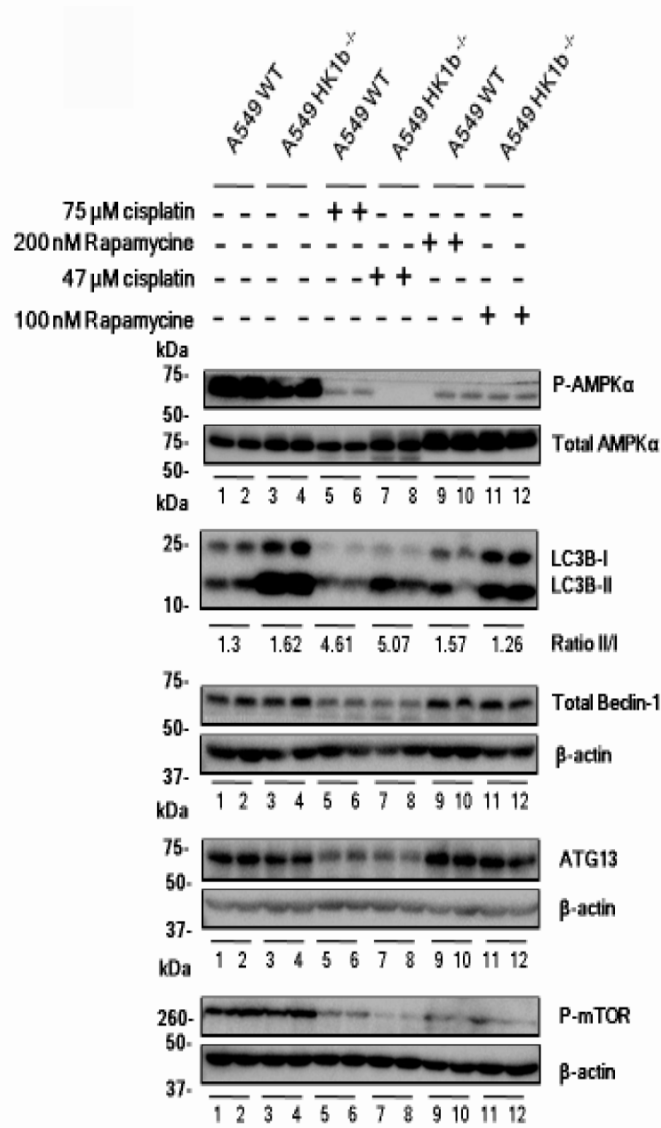
Şekil 30



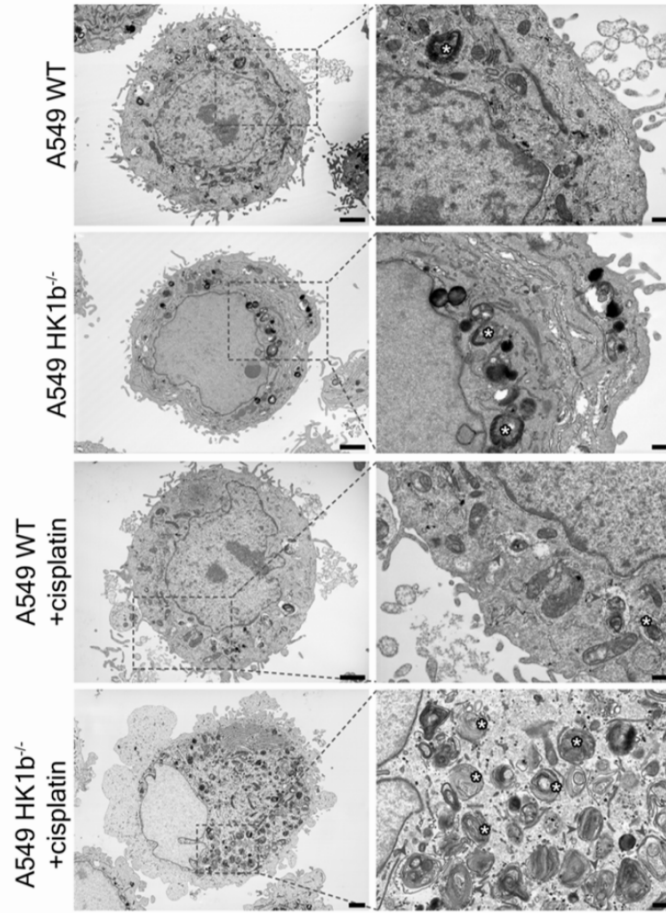
Şekil 31



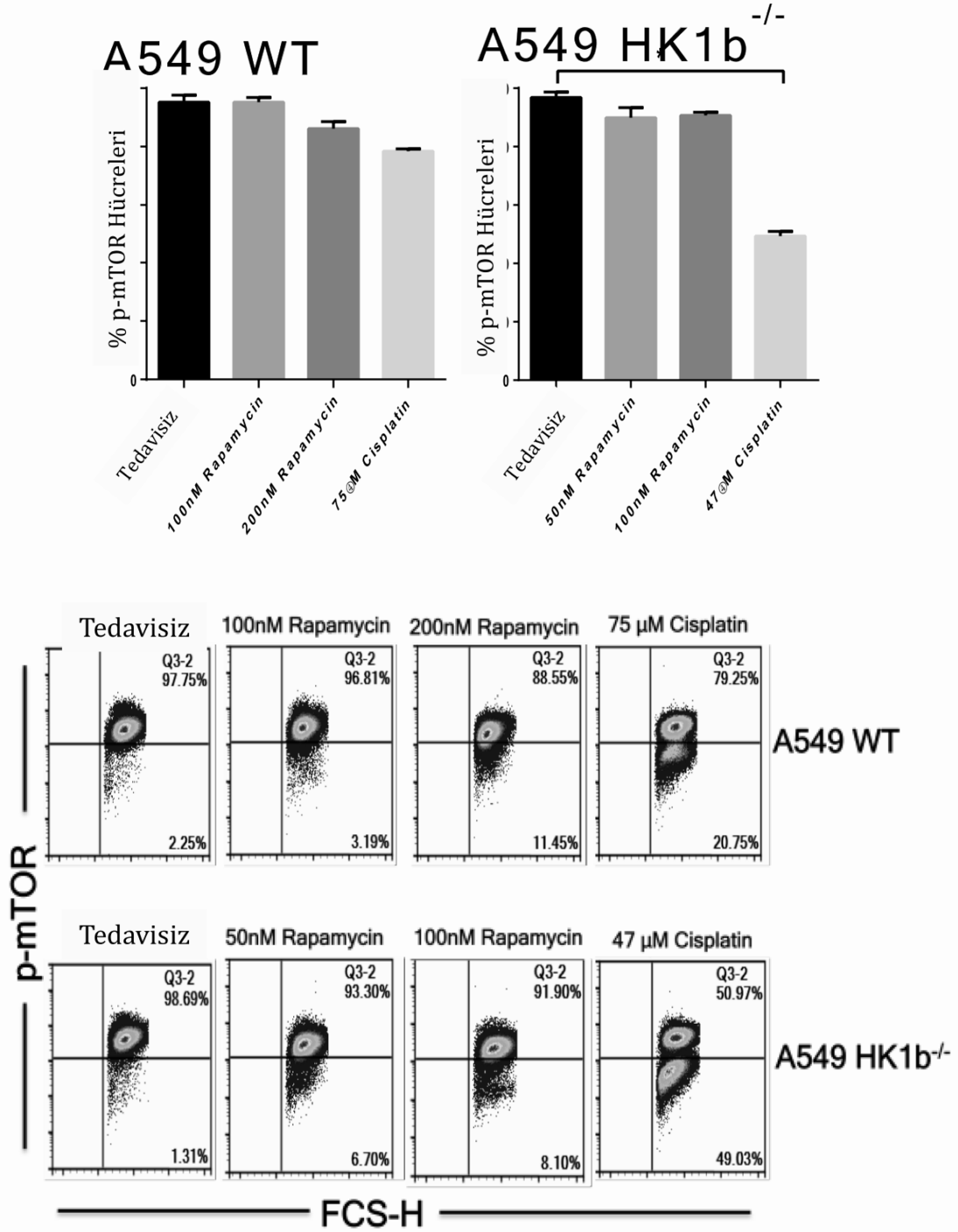
Şekil 32



Şekil 33



Şekil 34



Şekil 35

