



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KANSERDE P21-AKTİVE KİNAZ 4 (PAK4)'ÜN
HİPOKSİ SİNYAL MEKANİZMASINDAKİ
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

Feyza KOSTAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Haziran-2022
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KANSERDE P21-AKTİVE KİNAZ 4 (PAK4)'ÜN HİPOKSİ SİNYAL MEKANİZMASINDAKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Feyza KOSTAK

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

2022, 66 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Hasibe VURAL

Doç. Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Gülcihan GÜLSEREN

Kanserde hücrel sinyal mekanizmalarının aydınlatılması terapötik hedeflerin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir. Bu yollarındaki defektler kanser progresyonunu tetikleyebilmektedir. p-21 aktive kinaz 4 (PAK4) bu sinyal mekanizmalarında rol alan önemli onkogenlerden biridir. Literatürde endojen PAK4 ifadesinin artışı tümör gelişimini desteklediği bilinmektedir. Fonksiyonel olarak PAK4, Ras, NFκB, AKT, gibi pek çok kanser sinyal yollarında rol oynayarak kanser hücrelerinin sağkalımını, çoğalmasını ve metastazını teşvik eder. Tümör büyümesi ile beraber doku içerisinde hipoksi gelişir. Hipoksik ortamda, kanser sürecinin ilerlemesini destekleyen hipoksi ile indüklenebilir faktör 1α (HIF1α) aktive olur. Normoksik koşullarda hücre içinde HIF1α hızlı bir şekilde yıkılır. Ancak, normoksik şartlarda dahi HIF1α'nın stabilite kazanabildiği ve bu sayede kanser progresyonunu destekleyebildiğini kanıtlayan çalışmalar mevcuttur.

Tez projemizde, p21-aktive kinaz 4 (PAK4) enzimini endojen olarak yüksek düzeyde ifade eden metastatik MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde normoksik şartlarda PAK4 aktivasyonuna bağlı olarak PAK4 ile HIF1α arasındaki fiziksel ilişkiyi, aktivasyon durumunu ve buna bağlı olarak kanser gelişimini destekleyip desteklemediğini *in vitro* olarak araştırmayı amaçladık. Bunun için, MDA-MB-231 hücreleri PDGF-BB ile uyatarak PDGFRβ aracılı PAK4 aktivasyonu ve PF-3758309 ajanı ile muamele edilerek PAK4 inhibisyonu sağlandı. PDGFRβ aracılı PAK4 aktivasyon zamanı belirlendikten sonra, PDGF-BB, PF-3758309 ve PDGF-BB ile PF-3758309 beraber muamele edilen hücrelerde kontrole kıyasla proliferasyon ve migrasyon oranları belirlendi. Ayrıca elde ettiğimiz hücre lizatları ile PDGFRβ-PAK4 ve HIF1α-PAK4 interaksyonları immünpresipitasyon deneyi ile doğrulandı. Western blot deneyi ile HIF1α stabilizasyonu, p21 ifade düzeyi, bazı epitelyal-mezenkimal transisyon (EMT), apoptotik ve immünmodülatör belirteçlerin düzeyleri muamele edilen hücrelerde incelendi. Buna ilave olarak, HIF1α hedefi olduğu düşünülen Rantes geninin mRNA seviyesinde ifade değişimleri de araştırıldı.

Çalışma sonucunda; PAK4'ün PDGFRβ fosforilasyonu ile birlikte aktive olarak HIF1α'ya fiziksel olarak bağlandığı ve normoksik şartlarda HIF1α stabilizasyonunun desteklendiği gösterildi. Ayrıca PDGFRβ-PAK4-HIF1α aktivasyonuna bağlı olarak MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde HIF1α miktar artışı ile birlikte proliferasyon ve migrasyon düzeylerinin arttığı, EMT sürecinin desteklendiği ve HIF1α hedefi olarak öngördüğümüz Rantes ifadesinin arttığı saptandı. Ayrıca, PAK4 inhibisyonunun apoptoza direci düşürdüğü ve immünmodülasyonu desteklediği belirlendi. Sonuç olarak, PDGFRβ-PAK4-HIF1α aksisinin meme kanseri gelişimini desteklediği ve tedavi açısından önemli bir hedef olabileceği ileri sürülebilir.

Anahtar Kelimeler: HIF1α, Kanser, PAK4, PDGF-BB

ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION OF THE ROLE OF p21-ACTIVE KINASE 4 (PAK4) IN THE HYPOXIA SIGNAL MECHANISM IN CANCER

Feyza KOSTAK

**Necmettin Erbakan University Institute of Science and Technology
Department of Molecular Biology and Genetics**

Advisor: Assoc.Prof.Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

2022, 66 Pages

Jury

Prof. Dr. Hasibe VURAL

Assoc. Prof. Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

Asst. Prof. Dr. Gülcihan GÜLSEREN

The evaluation of the cellular signaling mechanisms in cancer is very important in terms of determining specific therapeutic targets. Defects in these pathways can trigger cancer progression. p-21 activated kinase 4 (PAK4) is one of the important oncogenes involved in these signaling mechanisms. It is known in the literature that increased endogenous PAK4 expression promotes tumor development. As function, PAK4 promotes the survival, proliferation and metastasis abilities of cancer cells by playing important roles in many cancer signaling pathways such as Ras, NF κ B, AKT. Parallel to tumor growth, hypoxia develops in the tissue. In the hypoxic environment, hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α) is become activated, which promotes the cancer progression. Its well-known that HIF1 α is rapidly degraded in normoxic conditions. However, there are many studies showing that HIF1 α could gains stability and triggers cancer progression even under normoxic conditions.

In our thesis project, we aimed to investigate the physical relationship between PAK4 and HIF1 α dependence on the activation of PAK4 under normoxic conditions in metastatic MDA-MB-231 breast cancer cells, which endogenously express the p21-activated kinase 4 (PAK4) at high level. Also, whether PAK4 supports the activation status of HIF1 α and accordingly cancer development. Here, we showed PDGFR β -mediated activation of PAK4 by treating MDA-MB-231 cells with PDGF-BB and PAK4 inhibition by PF3758309. After time-course study of PDGFR β -mediated PAK4 activation, we dinvestigated proliferation and migration rates of the cells treated with PDGF-BB, PF-3758309 and PDGF-BB+PF3758309 compared to control. In addition, we confirmed the interaction of PDGFR β -PAK4 and HIF1 α -PAK4 by immunoprecipitation assay. Then, we investigated the HIF1 α stabilization, p21 level, levels of some epithelial-mesenchymal transition (EMT), apoptotic and immunomodulatory markers by Western blot assay. In addition, we showed the mRNA expression changes of the Rantes gene, which was considered as a potential HIF1 α target.

As a result of the study, we showed that PAK4 could activated by PDGFR β activation, physically could in interaction with HIF1 α and promoting HIF1 α stabilization under normoxic conditions. In addition, due to the activation of PDGFR β -PAK4-HIF1 α axis, the proliferation and migration levels elevated of MDA-MB-231 breast cancer cells. Also, the intracellular HIF1 α amounts increased, the EMT process was supported, and the Rantes expression was enhanced. Consequently, we showed that PAK4 inhibition reduces resistance to apoptosis and promotes immunomodulation. As a result, we suggest that the PDGFR β -PAK4-HIF1 α axis could triggers breast cancer progression and be considered as an important target for treatment.

Keywords: Cancer, HIF1 α , PAK4, PDGF-BB

ÖNSÖZ

Bu çalışmada ‘Kanserde P21-Aktive Kinaz 4 (PAK4)’ün Hipoksi Sinyal Mekanizmasındaki Rolünün Araştırılması’ başlıklı tezimden elde ettiğim bilgileri dikkatinize sunmaktayım.

Kuşkusuz, akademide yer edinen her bireyin hayatında danışman hocasının izleri bulunur. Ben de, ilk adımını büyük bir mücadele ile neticelendirebildiğim akademik yolculuğumda; yolumdan bilgi, birikim ve tecrübeleriyle ışığını hiç eksik etmeyen, çalışkanlığını, akademik duruşunu ve adaletli yaklaşımını örnek aldığım, gösterdiği samimi, özverili ve sabırlı tutumundan dolayı birlikte çalışmaktan onur duyduğum kıymetli danışman hocam sayın Doç. Dr. Suray PEHLİVANOĞLU’na sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca en stresli ve yoğun günlerimde bana her anlamda destek olup motivasyonumu yüksek tutmamı sağlayan hem ev hem laboratuvar arkadaşım Gizem YILMAZ’a ve her koşulda yanımda olan sevgili dostum Nursena TUNCER’e içtenlikle teşekkür ederim.

Öğrenim hayatımın ilk gününden bugüne kadar maddi, manevi destek ve sevgileri ile beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan çok değerli ailem... İlk ve en kutsal mektebim... Beni sevgi, güven ve huzurun temel aldığı o mektepte nitelikli şekilde yetiştirip bu günlere getiren güzel meleğim annem Fazilet KOSTAK’a, canımın içi babam Ahmet KOSTAK’a ve birtanecik abim Salih KOSTAK’a sonsuz sevgi ve minnetlerimi sunarım.

Feyza KOSTAK
KONYA-2022



Aileme...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. p21-Aktive Kinaz 4 (PAK4) ve Kanserdeki Rolü	1
1.2. Hipoksi ve Kanser	1
1.3. Kanserde Hipoksi ve PAK4 İlişkisi	2
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Kanser	3
2.1.1. Meme Kanseri.....	4
2.2. Hücre Sinyalizasyonu	5
2.2.1. Büyüme Faktörleri ve Hücre Reseptörleri.....	5
2.2.1.1. Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF) ve Reseptörü (PDGFR).....	6
2.4.1.1.1. PDGF-BB / PDGFR β Sinyalizasyonunun Kanserdeki Rolü	7
2.3. Hipoksi ile Kanser Arasındaki İlişki.....	8
2.3.1. Hipoksi Sinyal Mekanizması.....	8
2.3.1.1. HIF1 α Protein Yapısı	9
2.3.1.2. HIF1 α Proteinin Fonksiyonu ve Aktivasyon Mekanizması	10
2.3.1.3. Normoksik Koşulda HIF1 α Stabilizasyonunun Moleküler Mekanizması	11
2.3.2. Kanserde Hipoksinin Rolü	13
2.3.2.1. Meme Kanserinde Hipoksi	14
2.4. p21 Aktive Kinaz (PAK) Ailesi	14
2.4.1. p21 Aktive Kinaz 4 (PAK4)	15
2.4.1.1. PAK4 Gen Yapısı	15
2.4.1.2. PAK4 Protein Yapısı.....	16
2.4.1.3. PAK4 Aktivasyon Mekanizması.....	17
2.4.1.4. PDGF Aracılı PAK4 Aktivasyonu	18
2.4.1.5. PAK4 İlişkili Sinyal Yolakları.....	18
2.4.2. Kanserde PAK4	19
2.4.2.1. PAK4' ün Kanser Hücrelerinin Çoğalmasındaki Rolü	19
2.4.2.2. PAK4'ün Kanser Hücrelerinin Göçü, İnvazyonu ve Metastazında Rolü.....	20
2.4.2.3. PAK4 ve Apoptoz Mekanizması	20
2.4.2.4. PAK4'ün Kanserde İnflamatuvar Etkileri	21
2.4.2.5. Meme Kanserinde PAK4.....	21

2.4.2.6. Kemoterapötik Olarak PAK4 İnhibitörlerinin Kullanımı	21
2.4.3. PAK4'ün Hipoksi İle İlişkisi	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1. Hücre Kültürü.....	23
3.1.1. Hücrelerin PDGF-BB ve PF3758309 Ajanı İle Muamele Edilmesi.....	23
3.2. Hücre Proliferasyon Deneyi	23
3.3. Hücre Migrasyon Deneyi	24
3.4. Western Blot.....	24
3.4.1. Hücre Lizatlarının Hazırlanması.....	24
3.4.2. Bradford Yöntemi	25
3.4.3. Poliakrilamid Jelin Hazırlanması.....	25
3.4.4. Poliakrilamid Jel Elektrophorezi	25
3.4.5. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi.....	26
3.4.6. İmmünblotlama	26
3.4.7. Görüntüleme	26
3.5. İmmünpresipitasyon Deneyi	26
3.6. qRT-PCR (kantitatif gerçek zamanlı PCR) Yöntemi	27
3.6.1. RNA İzolasyonu ve Kantitasyonu	27
3.6.2. cDNA Eldesi.....	28
3.6.3. Primer Tasarımı	28
3.6.4. qRT-PCR ve Analizi	29
3.6.5. Agaroz Jel Elektrophorezi ve Görüntüleme Sistemi	29
3.7. İstatistiksel Analiz	30
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	31
4.1. Araştırma Sonuçları	31
4.1.1. Çeşitli Kanser Hücre Hatlarında Endojen PAK4 İfadesinin Belirlenmesi....	31
4.1.2. PDGF-BB Faktörü ve PF3758309 Ajanının MDA-MB-231 Hücre Morfolojisine Etkisi	32
4.1.3. PDGF-BB ve PF3758309 Muamelesinin MDA-MB-231 Hücre Proliferasyonuna Etkisi.....	33
4.1.4. MDA-MB-231 Hücrelerinde PDGF-BB Uyarımına Bağlı Olarak PDGFR β , PAK4 ve AKT Aktivasyon Seviyeleri ile HIF1 α Protein Miktarının Belirlenmesi	34
4.1.5. PAK4-PDGFR β ve PAK4-HIF1 α Arasındaki Fiziksel İnteraksiyonun İmmünpresipitasyon Deneyi ile Gösterilmesi	36
4.1.6. HIF1 α -PDGFR β ve HIF1 α -PAK4 Arasındaki Fiziksel İnteraksiyonun İmmünpresipitasyon Deneyi ile Gösterilmesi	37
4.1.7. MDA-MB-231 Hücrelerinin PDGF-BB ve PF3758309 ile Muamelesinin PAK4 Fosforilasyonu Üzerindeki Etkisi	38
4.1.8. MDA-MB-231 Hücrelerinde PAK4'ün PDGFR β -aracılı Aktivasyonu ve PF3758309-aracılı İnhibisyonunun P21 Fosforilasyon Düzeyine Etkisi.....	39
4.1.9. MDA-MB-231 Hücrelerinde PAK4'ün PDGFR β -aracılı Aktivasyonu ve PF3758309-aracılı İnhibisyonunun HIF-1 α Protein Düzeyine Etkisi	40
4.1.10. MDA-MB-231 hücrelerinde PAK4'ün PDGFR β -aracılı Aktivasyonu ve PF3758309-aracılı İnhibisyonunun IL-6, IL-8 ve TGF- β Üretim Düzeyleri Üzerindeki Etkisi	40

4.1.11. MDA-MB-231 hücrelerinde PAK4'ün PDGFR β -aracılı Aktivasyonu ve PF3758309-aracılı İnhibisyonunun Apoptotik Belirteçler Olan Kaspaz3, Bax ve p53 Üzerindeki Etkileri.....	43
4.1.12. MDA-MB-231 hücrelerinde PAK4'ün PDGFR β -aracılı Aktivasyonu ve PF3758309-aracılı İnhibisyonunun EMT Belirteçleri Üzerindeki Etkisi	44
4.1.13. MDA-MB-231 hücrelerinde PAK4'ün PDGFR β -aracılı Aktivasyonu ve PF3758309-aracılı İnhibisyonunun Hücre Migrasyon Kabiliyeti Üzerindeki Etkisi	45
4.1.14. MDA-MB-231 hücrelerinde PAK4'ün PDGFR β -aracılı Aktivasyonu ve PF3758309-aracılı İnhibisyonunun Rantes (CCL5) mRNA İfadesi Üzerindeki Etkisi	46
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	55
5.1 Sonuçlar	55
5.2 Öneriler	56
6. KAYNAKLAR.....	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	:	alpha
β	:	beta
γ	:	gama
κ	:	kappa

Kısaltmalar

AID	:	Otoinhibitör Bölge (Auto Inhibitor Domain)
APS	:	Amonyum Persülfat (Amonium Persulfate)
ATP	:	Adenozin Trifosfat (Adenosine Triphosphate)
bHLH	:	bazik Heliks Loop Heliks (basic Helix-Loop-Helix)
CDC	:	Hücre Bölünmesi Kontrolü (Cell Division Control)
CDK	:	Siklin Bağımlı Kinaz (Cyclin Dependent Kinase)
CXCL	:	Kemokin (CXC motifi) ligandı (Chemokine (C-X-C motif) Ligand)
CXCR	:	Kemokin (CXC motifi) Reseptörü (Chemokine (C-X-C motif) Receptor)
DISC	:	Ölüme Neden Olan Sinyal Kompleksi (Death Inducing Signaling Complex)
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
cDNA	:	Komplementer DNA (complementary DNA)
DNA	:	Deoksiribo Nükleik asit (Deoxy-Ribonucleic Acid)
EDTA	:	Etilendiamin Tetraasetik Asit (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid)
EGF	:	Epitelyal Büyüme Faktörü (Epithelial Growth Factor)
EMT	:	Epitelyal Mezenkimal Geçiş (Epithelial Mesenchymal Transition)
FBS	:	Fetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum)
HGF	:	Hepatosit Büyüme Faktörü (Hepatocyte Growth Factor)
HIF1	:	Hipoksi İndüklü Faktör 1 (Hypoxia Inducible Factor 1)
HRE	:	Hipoksi Yanıt Elementi (Hypoxia Response Element)
IGF	:	İnsülin Büyüme Faktörü (Insulin Growth Factor)
IL	:	İnterlökin (Interleukin)
IRF	:	İnterferon Düzenleyi Faktör (Interferon Regulatory Factor)
IP	:	İmmünpresipitasyon
KD	:	Kinaz Bölgesi (Kinase Domain)
MAPK	:	Mitojen Aktive Protein Kinaz (Mitogen-Activated Protein Kinase)
MMP	:	Matriks Metalloproteinaz (Matrix Metalloproteinase)
MT1-MMP	:	Membran Tip1-Matriks Metalloproteinaz (Membrane Type1-Matrix Metalloproteinase)
mTOR	:	Rapamisin'in Memeli Hedefi (Mammalian Target of Rapamycin)
MTT	:	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NF κ B	:	Nükleer Faktör Kappa B (Nuclear Factor kappa B)
NGF	:	Nöron Büyüme Faktörü (Neuron Growth Factor)
NLS	:	Nükleer Lokalizasyon Sinyali (Nuclear Localization Signal)

NO	:	Nitrik Oksit
ODDD	:	Oksijen Bağımlı Parçalanma Bölgesi (Oxygen Dependent Degradation Domain)
PAGE	:	Poliakrilamid jel elektroforezi (Polyacrylamide gel electrophoresis)
PAK	:	p-21 Aktive Kinaz (p-21 Aktive Kinase)
PBD	:	Protein Bağlanma Bölgesi (Protein Binding Domain)
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
PCR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PDGF	:	Trombosit kökenli büyüme faktörü (Platelet-derived growth factor)
PDGFR	:	Trombosit kökenli büyüme faktörü reseptörü (Platelet-derived growth factor Receptor)
PHD	:	Prolil Hidroksilaz Bölgesi (Prolyl Hydroxylase Domain)
PI3K	:	Fosfatidilinositol 3-kinaz (Phosphatidil Inositol 3 Kinase)
PKB	:	Protein Kinaz B
PIP	:	Fosfatidilinositol fosfat (Phosphatidylinositol phosphate)
PS	:	Yalancı Substrat (Pseudo Substrate)
PVDF	:	Poliviniliden diflorid (Polyvinylidene difluoride)
PVHL	:	p Von-Hippel Lindau Tümör Baskılayıcı Geni
RAC1	:	Ras ile ilişkili C3 Botulinum Toksin Substratı 1 (Ras- Associated C3 Botulinum Toxin Substrate)
ROS	:	Reaktif Oksijen Türevleri (Reactive Oxygen Species)
RTK	:	Reseptör Tirozin Kinaz (Receptor Tyrosine Kinase)
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat
SH	:	Src Homoloji
STAT3	:	Transkripsiyon Sinyal Aktivatörü ve Transdüseri (Signal transducer and activator of transcription 3)
TAD	:	Transaktivasyon Bölgesi (Transactivation Domain)
TEMED	:	N,N,N,N-tetrametiletilendiamin
TGF	:	Tümör Büyüme Faktörü (Tumour Growth Factor)
TNF	:	Tümör Nekroz Faktör (Tumour Necrosis Factor)
VEGF	:	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)
4E-BP	:	eIF4E Bağlanma Proteini (eIF4E-Binding Protein)
bç	:	baz çifti
dk	:	dakika
kDa	:	kilo dalton
MA	:	moleküler ağırlık
mg	:	miligram
mL	:	mililitre
mM	:	milimolar
ng	:	nanogram
rpm	:	dakikadaki dönüş sayısı
sn	:	saniye
µl	:	mikrolitre
µg	:	mikrogram

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL	SAYFA
2.1. PDGF Reseptör Dimerizasyonu ve Aktivasyonu.	7
2.2. HIF-1 α Proteininin Moleküler Yapısı.	9
2.3. HIF-1 α Proteininin Prolil Hidroksilasyon ve Proteozomal Bozunma ile Düzenlenmesi.	10
2.4. Büyüme Faktörlerinin PI3K/MAPK Sinyal Yolları ile Normoksik Koşullarda HIF-1 α Sentezini Arttırması.	12
2.5. HIF-1 α Hedef Genleri.	13
2.6. PAK'ların Grup I ve II Yapısının Şematik Gösterimi.	15
2.7. PAK4 Gen Yapısı.	16
2.8. PAK4 Protein Yapısının Şematik Gösterimi.	17
2.9. PAK4 Proteininin 3 Boyutlu Kristal Yapısı.	17
2.10. PAK4 Aktivasyon Modelleri.	18
2.11. PAK4 İlişkili Sinyal Yolları.	19
2.12. PAK4'ün Hipoksik Koşullar Altında Akt-mTOR-4E-BP1 Yolu Aracılığıyla HIF-1 α Translasyonu Üzerine Etkisi.	23
4.1. Çeşitli İnsan Hücre Hatlarında endojen PAK4 Protein Düzeylerinin Gösterilmesi.	33
4.2. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinin 48. Saat Sonunda Oluşan Morfolojilerinin Mikroskop Görüntüleri.	34
4.3. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinin 48 Saatlik Proliferasyon Oranları.	35
4.4. MDA-MB-231 Hücrelerinde PDGF-BB Uyarımına Bağlı Olarak PDGFR β , PAK4 ve AKT Fosforilasyon Durumlarının ve HIF1 α İfadesinin Zamana Bağlı Değişimi. ...	36
4.5. İmmünpresigütasyon Deneyi ile PAK4'ün HIF1 α ve PDGFR β 'ya Fiziksel Olarak Bağlanmasının Gösterilmesi	37
4.6. İmmünpresigütasyon Deneyi ile HIF-1 α 'ın PAK4 ve PDGFR β ' ile Fiziksel Olarak Bağlanmasının Gösterilmesi.	38

4.7. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinde PAK4 ve p-PAK4 İfade Düzeylerinin Western blot ile Gösterilmesi.	39
4.8. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinde p21 ve p-p21 İfade Düzeylerinin Western blot ile Gösterilmesi.	40
4.9. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinde HIF1α İfade Düzeylerinin Western blot ile Gösterilmesi.	41
4.10. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinde IL-6 İfade Düzeylerinin Western blot ile Gösterilmesi.	42
4.11. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinde IL-8 İfade Düzeylerinin Western blot ile Gösterilmesi.	43
4.12. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinde TGF-β İfade Düzeylerinin Western blot ile Gösterilmesi.	43
4.13. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinde Kaspaz3, Bax ve p53 İfade Düzeylerinin Western blot ile Gösterilmesi..	44
4.14. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinde Vimentin, N-Kaderin ve E-Kaderin İfade Düzeylerinin Western blot ile Gösterilmesi.	45
4.15. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinin Migrasyon Görüntüleri.	46
4.16. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinin Migrasyon Oranlarının Gösterilmesi.	47
4.17. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinin Rantes ve beta-Aktin (ACTB) mRNA Dizilerine Ait Amplifikasyon Eğrileri.	47
4.18. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerine Ait Rantes (CCL5) mRNA İfade Düzeylerinin Göreceli Kat Değişimleri.....	48
4.19. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerine Ait Rantes ve beta-Aktin (ACTB) cDNA Amplifikasyon Düzeyleri (%2 Agaroz Jel).	48

TABLÖLAR DİZİNİ

TABLO	SAYFA
3.1. Poliakrilamid Jel Konsantrasyonları.	26
3.2. cDNA Reaksiyonu İçin Gerekli MasterMix İçeriği.	29
3.3. Rantes (CCL5) ve β -Aktin (ACTB) Primer Dizileri.	30
3.4. qRT-PCR Protokolü.	30

1. GİRİŞ

1.1. p21-Aktive Kinaz 4 (PAK4) ve Kanserdeki Rolü

p21-aktive kinaz (PAK) ailesi, serin/treonin kinazlar sınıfında bulunur. PAK'lar; hücre iskeleti organizasyonu, hücre sinyalizasyonu, hücre proliferasyonu ve sağkalımında önemli rollere sahiptir. Dizi homolojilerine göre iki gruba ayrılırlar. PAK4 bu sınıflandırmanın ikinci grubunda yer alır. PAK4; CDC42 ve Rac gibi Rho GTPaz'lar ile birlikte birçok sinyal yolağında görev almaktadır. PAK4, embriyonik gelişimdeki önemli rollerinin yanı sıra normal dokularda yüksek düzeyde ifadenmesi durumunda tutunma bağımsız büyüme, sağkalımın artması, göç, invazyon ve metastaz gibi kanserle ilişkili birçok ayırt edici özelliğe sebebiyet verdiği için genellikle kanserle ilişkilendirilmiştir.

1.2. Hipoksi ve Kanser

Hipoksi, kanser mikroçevresinin tartışmasız ilk bilinen ayırt edici özelliğidir ve tümörlerde bulunan hemen hemen tüm hücrel popülasyonları etkiler. Hipoksi hücrede gen ekspresyonlarını değiştirerek, apoptozu engelleyerek, epitelyal-mezenkimal geçişi (EMT) uyararak, anjiyogenezi arttırarak ve metastaz olayına olanak sağlayarak kanserleşmeyi teşvik eder. Tüm bunlara ek olarak tümörlerin agresifliğini arttırarak ve bağışıklık sistemini zayıflatarak tedavide anti-tümör yanıtın azalmasına katkıda bulunur. Hipoksi; tümör hücreleri üzerinde, hipoksi indüklenabilir faktör (HIF) ailesi ile etki göstermektedir. Normoksik koşullarda yani ortamda oksijen kaynağı yeterli olduğunda, HIF1 α alt birimi prolin rezidülerinden hidroksillenir. Bu hidroksilasyon ile HIF1 α , Von Hippel Lindau (pVHL) tümör baskılayıcıya bağlanarak ubiquitin-proteazom aracılığıyla degrade olur. Hipoksik koşullar altında ise azalmış oksijen konsantrasyonu nedeniyle bu hidroksilasyon gerçekleşmez. Sonuç olarak HIF1 α alt birimleri çekirdeğe göç ederek heterodimerler oluşturmak üzere HIF1 β alt birimleriyle birleşirler. Oluşan HIF1 heterodimeri, hipoksi hedef genlerini indükleyerek transkripsiyonel aktivitelerini arttırır. Normoksik koşullarda çabuk degrade olan HIF1 α 'nın stabilizasyonunu arttıran büyüme faktörleri vardır. Buna trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) örnek verilebilir. PDGF aracılı HIF1 α stabilizasyonu; PDGF ve tirozin kinaz reseptörünün bağlanmasıyla Ras/Raf/MAPK ve PI3K/Akt/mTOR gibi yolların aktive olması esasına dayanır.

1.3.Kanserde Hipoksi ve PAK4 İlişkisi

Kanserde hem hipoksinin hem de PAK4'ün çok önemli rolleri olduğu çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır. Fakat hipoksi ve PAK4 arasındaki ilişkiyi açıklayan mevcut çalışma çok kısıtlıdır. Literatürde yalnızca bir çalışma PAK4 aşırı ekspresyonunun hipoksik kanser hücrelerindeki HIF1 α protein seviyesi üzerinde stabilize edici bir etkisi olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada; PAK4 yıkımının, hipoksi kaynaklı HIF1 α birikimini azalttığı da gösterilmiştir.

Tüm bu literatür bilgileri doğrultusunda; kanser hücrelerini PDGF gibi spesifik büyüme faktörleri ile muamele ederek hem PDGF aracılı PAK4 aktivasyonunu hem de normoksik koşullarda HIF1 α stabilizasyonunu sağlamayı hedefledik. Diğer bir yandan aynı hücre hattında PAK4 inhibitörü uygulayarak hücrelerde PAK4 sinyalini baskılamayı hedefledik. Bu şekilde normoksik koşullarda PDGF-BB aracılı PAK4 ifadesinin HIF1 α stabilizasyonunu arttıracak ve buna bağlı olarak hücre çekirdeğine göç edip hedef genlerin transkripsiyonunu indükleyerek hem hücre proliferasyonunu destekleyeceğini hem de ilgili sinyal yollarını aktive ederek kanser hücrelerinin apoptozdan kaçmasını, migrasyon ve metastazına teşvik edeceğini öngörerek çalışmamızı gerçekleştirdik. Araştırmalarımıza göre HIF1 α protein dizisinde PAK4 hedefi olabilecek diziler saptadık. Olası bu dizilerin; PAK4 aktivasyonu ve inhibisyonuna bağlı olarak PAK4-hipoksi ile indüklenen faktör-1 alfa (HIF1 α) protein-protein etkileşimine göre ve PAK4'ün HIF1 α aktivasyonu üzerindeki etkisine göre HIF-1 α 'nın PAK4 açısından fonksiyonel olup olmadığını belirleyerek HIF1 α ilişkili kanserlerde PAK4 hedefli inhibitörlerin tedavideki yerini aydınlatmayı amaçlamaktayız.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kanser

Kanser; ciddi ve tedavi açısından zorlayıcı bir hastalık veya hastalıklar kümesidir. Bu hastalık çok hücreli canlıları 200 milyon yıldan daha fazla, modern insanı ise atalarından bu yana 1 milyon yıldan daha uzun süredir etkilemektedir (Hausman, 2019). Kanser, dünya çapında insan ölümünün ikinci önde gelen nedenidir (Bray ve ark., 2018). 2020 kanser istatistiklerine göre, dünyada 1 yıl içinde 19,3 milyon yeni kanser vakası görülmektedir ve kansere bağlı 10 milyon civarında ölüm gerçekleşmektedir. Türkiye’de ise yılda 233.834 kişi yeni kanser tanısı alırken 126.335 kişi kanserden ölmektedir (Cancer, 2020).

Kanser, bulaşıcı hastalıklardan, parazitlerden ve birçok çevresel hastalıklardan farklı olarak, yabancı kaynaklardan meydana gelmeyip bizzat kendi hücrelerimizden oluşmaktadır (Hausman, 2019). Yani organizmanın kendi hücrelerinde meydana gelen DNA hasarları ve gen mutasyonlarından kaynaklı normal fonksiyonun bozulması ve kontrolsüz çoğalma durumudur. Mutasyona uğradığında kanserleşmeyi teşvik eden gen ailelerine temel olarak proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genler örnek verilebilir. Proto-onkogenler; hücrenin sağkalım ve proliferasyonu gibi yaşamsal faaliyetlerini kontrol ederek, transkripsiyon, büyüme faktörleri, apoptozun baskılanması ve hücre içi sinyal mekanizmalarında rol alırlar. Tümör baskılayıcı genler ise; hücre çoğalmasının baskılanmasını ve hücre döngüsünün kontrolünü sağlayarak herhangi bir anormaliteye karşı hücreyi apoptoza teşvik ederler.

Kas ve sinir hücreleri haricindeki sağlıklı vücut hücreleri bölünebilme yeteneğine sahiptirler. Fakat bu bölünebilme yetenekleri de sınırlıdır. Sağlıklı bir hücre bölünmesi gereken yeri ve zamanı iyi bilirken aynı zamanda ölmesi gereken durumu, yeri, zamanı da iyi bilir. Bu duruma ‘apoptoz’ adı verilir. Fakat kanser hücreleri, bu bilinçli çoğalma ve ölme özelliğini kaybederek kontrolsüz bir şekilde bölünmeye başlar ve çoğalırlar. Kanser hücreleri çoğaldıkça birikir ve tümörleri (kitleleri) oluştururlar. Bu kümelenmiş hücre oluşumları (kitleler/tümörler) normal dokuları sıkıştırabilirler, dokuların içine sızabilirler ya da dokuları tahrip edebilirler. Eğer kanser hücreleri oluşturdukları tümörden ayrılırsa, kan ya da lenf dolaşımı aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine taşınabilirler. Gittikleri yerlerde tekrar çoğalarak tümör kolonileri oluşturur ve büyümeye devam ederler. Kanserin bu şekilde vücudun diğer bölgelerine yayılması olayına ‘metastaz’ adı verilir. Metastaz; kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenidir

(Welch & Hurst, 2019). Tümör dokusu incelendiğinde kümelenmiş kanser hücreleri gözlenir. Bu kümelenmenin nedeni DNA'sında hasarlar birikmiş olan kanser hücresinin kontrolsüz çoğalmasdır. Fakat kanser durumu sadece bundan ibaret değildir. Kanser hücreleri kendisine uygun ortam sağlamak için etrafındaki komşu hücreleri ve yapıları rahatlıkla manipüle ederek değişikliğe uğratar. Kanser hücrelerinin etrafındaki komşu hücreleri etkileyerek oluşturduğu bu ortama 'tümör mikroçevresi' denir. Bu mikroçevre; tümör hücreleri tarafından üretilen ve salınan moleküller de dahil olmak üzere kanserleşmemiş (sağlıklı) hücreleri ve bileşenleri belirtir. Tümör hücreleri ve tümör mikroçevresi arasındaki sürekli etkileşimler, tümör oluşumunun başlangıcında, ilerlemesinde, metastazında ve tedavilere yanıtta belirleyici rol oynar (Xiao & Yu, 2021). Bu tümör mikroçevresinin 3 ana özelliği vardır. Bunlar; inflamasyonlu ortam, hipoksik ortam ve asidoz durumudur (Frances & Balwill, 2012), (Johanna ve ark., 2010).

2.1.1. Meme Kanseri

T.C. Sağlık Bakanlığı verilerine göre, Türkiye'de her yıl tüm yaş gruplarındaki erkeklerde görülen kanser türlerinde ilk üç yüzde sıralaması şu şekildedir; %25.8 kısmında trakea, akciğer, bronş kanserleri ilk sırada yer alırken, 2. Sırada %14.6'lık kısmında prostat kanseri ve 3. Sırada %9'luk kısmında kolorektal kanseri ortaya çıkmaktadır. Kadın hastalarda ise bu yüzde sıralaması şu şekilde değişmektedir; kadınların % 23.9'luk kısmında meme kanseri ilk sırada yerini alırken, 2. Sırada %10.9'luk oranla tiroid kanseri ve 3. Sırada %9.1'lik oranla kolorektal kanseri gelmektedir (Türkiye Kanser İstatistikleri, 2020). Dünya çapında meme kanseri kadınları etkileyen en yaygın kanserdir ve insidans / ölüm oranlarının her yıl önemli ölçüde arttığı bilinmektedir (Anastasiadi ve ark., 2017). Erkeklerle oranla kadınlarda meme kanserine yakalanma riski çok daha fazladır. Bunun nedeni ise erkek meme dokusu ile kadın meme dokusunun birbirinden farklı olduğudur. Kadınlarda meme dokusu her yaşta fizyolojik değişikliğe uğrayan dinamik bir yapıdır. Kadın meme dokusu; süt depolama bezleri, epitel hücrelerinden oluşan süt kanalları, yağ dokusu ve stromal doku gibi çeşitli bileşenlerden oluşur (Nazari & Mukherjee, 2018). Bu bileşenlerden oluşan dokunun lezyon oluşturma eğilimi erkek meme dokusuna oranla çok daha yüksektir. Fizyolojik yapıya ek olarak beslenme ve genetik koşullar da kansere yakalanma riskini etkilemektedir (Kosova & Arı, 2008). Meme kanserinin genetik yatkınlığından sorumlu tutulan birçok gen ve/veya gen ailesi bulunmaktadır. Farklı

kromozomlar üzerinde lokalize olan bu çok çeşitli genlerin her biri aynı hücresel mekanizmada rol alsa da kullandıkları sinyal yolları birbirinde farklıdır.

2.2. Hücre Sinyalizasyonu

Hücreler kendi içlerinde veya birbirleriyle sürekli iletişim halindedir. Bu iletişim olayının geneline sinyal mekanizması adı verilir. Hücre sinyalizasyonundan görevli yüzlerce gen bulunmaktadır. Bu genler sayesinde meydana gelen sinyal mekanizmaları normal hücrelerin yaşam fonksiyonlarını ve metabolizmalarını düzenlemekten sorumludur. Bu regülatör sistemlerin en az bir tanesinin, bir mutasyon sonucu aktive olması kanserleşmeyi teşvik edebilmektedir (Obeng, 2021), (SenGupta ve ark., 2021), (Hernández ve El-Deiry, 2021). Farklı gen lokuslarında meydana gelen bu mutasyonlar, aynı sinyal yolağının anormal aktivasyonuna sebep olarak farklı kanser türlerinin oluşumuna da katkı sağlayabilmektedir. Hücre içi sinyal yollarına temel olarak; MAPK, PI3K, NF κ B, JAK/STAT, TP53, RB, TGF- β , WNT, SHH, NOTCH sinyal yolları örnek verilebilir.

2.2.1. Büyüme Faktörleri ve Hücre Reseptörleri

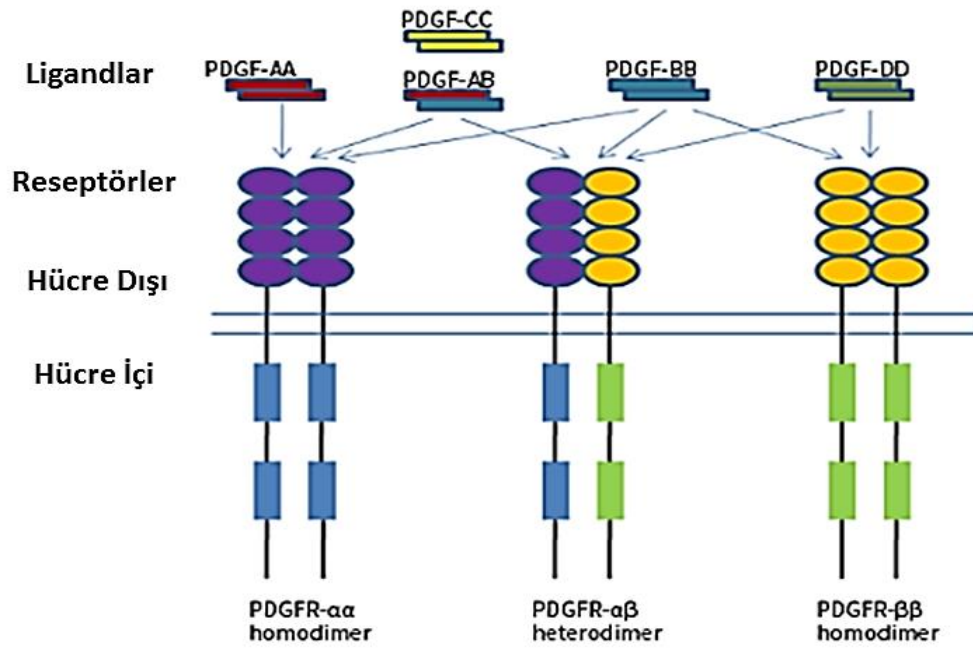
Hücrelerdeki sinyalizasyonun ana karakterleri; sinyal molekülleri (ligand) ve reseptörlerdir. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), nöron büyüme faktörü (NGF), epitelyal büyüme faktörü (EGF), insülin büyüme faktörü (IGF) gibi çok çeşitli büyüme faktörleri ve hormonlar sinyal moleküllerine örnek verilebilir (Ren ve ark., 2020). Bir hücrenin ürettiği sinyal molekülleri, diğer bir hücre içerisinde üretilen ilgili spesifik reseptörlere bağlanarak hedef hücrelerde metabolik, çoğalma, sağ kalım, farklılaşma gibi çok çeşitli biyolojik yanıt meydana getirir (Ren ve ark., 2020).

Hayvan hücresi büyümesini ve farklılaşmasını kontrol eden birçok büyüme faktörü bulunmaktadır. Büyüme faktörleri yapılarında çok çeşitli sinyal moleküllerini içermektedir (Ren ve ark., 2020). Hücreler, bu büyüme faktörlerine bağlanan ve fizyolojik bir yanıt başlatan reseptör adı verilen proteinlere sahiptir (Cooper, 2000). Reseptörler genellikle hücre dışındaki büyüme faktörlerine bağlanarak oluşturduğu sinyali bir dizi moleküler anahtar yoluyla ilişkili diğer sinyal yollarına ileten transmembran proteinlerdir. Hücrelerde yüzlerce farklı reseptör tipi vardır ve değişen hücre tipleri, farklı lokalizasyon ve farklı reseptör popülasyonlarına sahiptirler

(Cooper 2000). Buna ek olarak tüm reseptörler farklı sinyal molekülleri ve büyüme faktörleri için spesifik olup sadece ilgili ligandı bağlarlar.

2.2.1.1. Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF) ve Reseptörü (PDGFR)

Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri (PDGF), ilk olarak plateletlerin α granüllerinden izole edilmiştir. Günümüzde ise, fibroblastlar, kondrositler, glia hücreleri, makrofajlar, düz kas hücreleri, astrositler, endotel hücreleri, megakaryositler, blastosit gibi hücrelerin yanı sıra, mesane kanseri, glioma, meme kanseri, lösemi, hepatoma, kolon kanseri gibi hücrelerde de varlığı saptanmıştır. PDGF, embriyonik ve yetişkin dönemde hücre proliferasyonu ve farklılaşması, kemotaksi ve apoptozisi düzenleme gibi işlevsellikleri olması bakımından oldukça önem kazanmış bir büyüme faktörüdür. PDGF sinyalinde herhangi bir işlev bozukluğu veya kaybı; kanser başta olmak üzere fibroz, ateroskleroz ve nörolojik hastalıklar gibi birçok farklı patolojik durumlara sebebiyet vermektedir (Papadopoulos & Lennartsson, 2018). PDGF, dört adet gen ile kodlanan, dört ayrı polipeptid zincir bulunduran 30 kDa ağırlığında bir proteindir. PDGF zincirleri homo ve heterodimer alt birimlerinden oluşmuştur. Bunlar; PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, PDGF-DD olmak üzere beş farklı izoform üyeleridir. Klasik PDGF zincirleri, PDGF-A, PDGF-AB ve PDGF-B'dir. Bunlara nispeten daha yeni tanımlanmış olan PDGF'ler ise, PDGF-C ve PDGF-D'dir (Fredriksson ve ark., 2004). Sözü edilen bu beş izoform, PDGFR- α ve PDGFR- β olarak adlandırılan ve tirozin kinaz aktivitesi gösteren iki farklı PDGF reseptörü ile bağlanır ve aktive edilir (Uutela, 2004).



Şekil 2.1. PDGF Reseptör Dimerizasyonu ve Aktivasyonu.

İnsan *PDGFR-β* geni, 5. kromozom üzerinde lokalizedir (Yarden ve ark., 1986). Yapısında 110 aminoasit içerir ve 180 kDa moleküler ağırlığına sahiptir (Heldin & Westermark, 1999). Bu reseptör insan endotel hücreleri tarafından salınır ve sadece PDGFBB ve PDGF-DD'yi bağlayarak aktifleşmelerini sağlar. Hücre göçü, çok hücreli organizmaların uygun organizasyonunu kurması ve sürdürebilmesi açısından önemlidir. Yetişkin bir organizmada, hücre göçü, uygun immün yanıt, yara onarımı ve doku homeostazisi için gereklidir (Heldin & Westermark, 1999).

2.4.1.1.1. PDGF-BB / PDGFRβ Sinyalizasyonunun Kanserdeki Rolü

PDGFRβ sinyal yolağının çeşitli patolojilerde anormal hücre göçü meydana getirdiği kanıtlanmıştır (Trepate ve ark., 2012). Kanserde hücre göçü de bu anormalitenin bir örneğidir. Artan epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), hücrelerin göç ve invazyon yetenekleri, kanserin metastatik sürecinde önemli roller oynamaktadır (Hwang ve ark., 2016). Epitelyal hücrelerden mezenkimal hücrelere dönüşümün fenotipik bir süreci olan epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT), tümör hücrelerinin infiltrasyon ve metastaz özellikleri kazanmasını sağlar (Lu ve ark., 2021). Meme kanseri de duktal veya lobüler kökenli malign epitelyal bir tümördür. Meme kanseri, kadınlarda en sık teşhis edilen invaziv kanser olmaya devam etmekte ve buna bağlı olarak dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir.

2.3. Hipoksi ile Kanser Arasındaki İlişki

Oksijen; canlıların birçok hücresinde meydana gelecek metabolik faaliyetlerde gerekli ATP üretimini sağlayan önemli bir moleküldür. Yaşamını sürdürebilmesi için oksijen tüketme zorunluluğuna sahip hücre veya dokuların yeterince oksijen alamaması koşulunda ortaya çıkan yetmezlik durumu ‘hipoksi’ olarak isimlendirilmektedir. Bu yetmezlik insan doku ve hücrelerine hasar vererek, kanser, diyabet, yaşlanma, felç, iskemi, akciğer hastalıkları, kalp ve dolaşım bozukluğu hastalıkları gibi birçok patolojik duruma sebep olabilirken bunun aksine insan fizyolojisi ve embriyonal gelişimi içinde oldukça önemlidir.

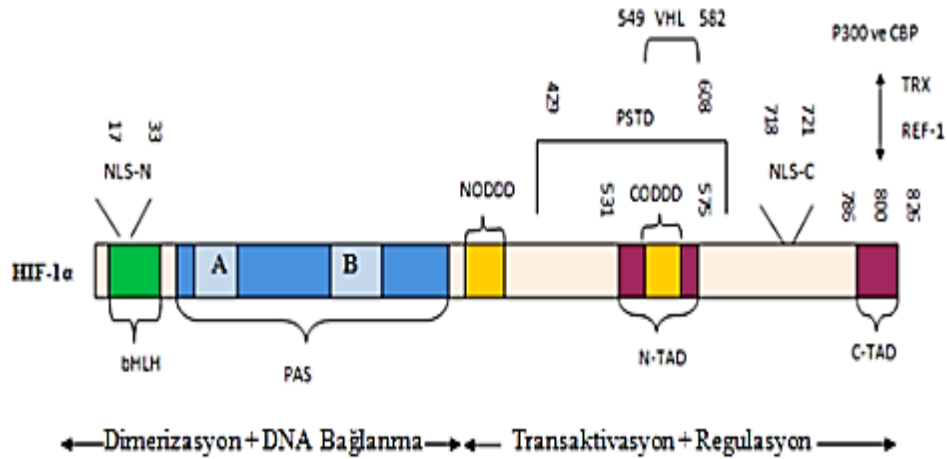
Birçok organizma, birtakım homeostatik genlerin aktive veya inaktive olması temeline dayanan mekanizmalarla oksijen seviyesindeki değişime adaptasyon sağlayarak hücre ve doku kaybını önlemektedir (Iver ve ark.,1998). Hipoksi mekanizmasında, homeostatik rol oynayan ve hipoksi ile indüklenebilir faktör (*HIF*) olarak adlandırılan bir gen ailesi bulunur. İnsanlarda *HIF* ailesi üyeleri *HIF1*, *HIF2* ve *HIF3*'ü içerir. Bu üyelerin her biri, hipokside farklı rollere sahiptir. *HIF1*, hipokside hücre sağkalımını desteklemek için birkaç genin ekspresyonunu indükler. *HIF2*, normoksi veya hipokside eritropoietin üretimi gibi diğer işlevleri düzenler. *HIF3*'ün hipoksi ile indüklenebilir gen ekspresyonunun negatif düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir. Bu gen ailesi üyelerinden en önemlisi *HIF1* genidir. *HIF1*; dokuların gelişimi ve damar oluşumu (anjyogenez) olaylarının modülasyonu için bazı transkripsiyon faktörleri ve/veya enzimlerle etkileşim oluşturabilir. *HIF1*; birçok genin transkripsiyon mekanizmasını düzenlemekle kalmayıp hücre dediferansiyasyonu, damarlanma, otokrin etkili büyüme faktörlerinin üretimi ile hücre çoğalması, invazyonu ve metastazını destekler. Aynı zamanda metabolik yeniden programlanma ve tümör hacmini arttırmak gibi olaylarda da önemli etkilere sahiptir.

2.3.1. Hipoksi Sinyal Mekanizması

Hipoksi; nekrotik hücre ölümü ve inflamasyonu beraberinde getirir. Ardından makrofajların ve monositlerin dokuya infiltrasyonundan sonra tümör nekroz faktörünün (*TNF-α*) salgılanmasına aracılık eden hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 (*HIF1*) gibi karmaşık bir hücre sinyal ağını uyarır. *HIF1*, memeli hücrelerinde oksijen algılama mekanizmasının anahtarıdır. Hipoksi ile indüklenebilir faktörler (*HIF*'ler); *HIF1α* (veya analogları *HIF2α* / *HIF3α*) ve *HIF1β*'dan oluşan heterodimerik yapıda olup hücresel ortamdaki azalan oksijen seviyelerine yanıt veren transkripsiyon faktörleridir. Hipoksi

ile indüklenabilir faktör 1-alfa (HIF1 α); memeli hücrelerinde sürekli olarak ifade edilir (Wang & Semenza, 1993). Hipoksik koşullarda HIF1 α stabilize edilip HIF1 β ile heterodimerize olabilmektedir. Ayrıca HIF1 α transkripsiyonu, hipoksik koşullar altında önemli ölçüde artmakta ve daha sonra çekirdekteki hipoksi yanıt elemanlarına (HRE'ler) bağlanabilme özelliği kazanmaktadır (Ziello ve ark, 2007). Normoksik koşullarda ise HIF1 α yapısal olarak kopyalanır ve O₂ konsantrasyonundan bağımsız olarak sentezlenir ancak normoksik koşullar altında HIF1 α hidroksilasyonu gerçekleşir ve ardından proteazomda bozunmaya yol açan E3 ubiquitin ligaz tarafından işaretlenerek hızla degradasyona uğramaktadır (Yin ve ark., 2018).

2.3.1.1. HIF1 α Protein Yapısı



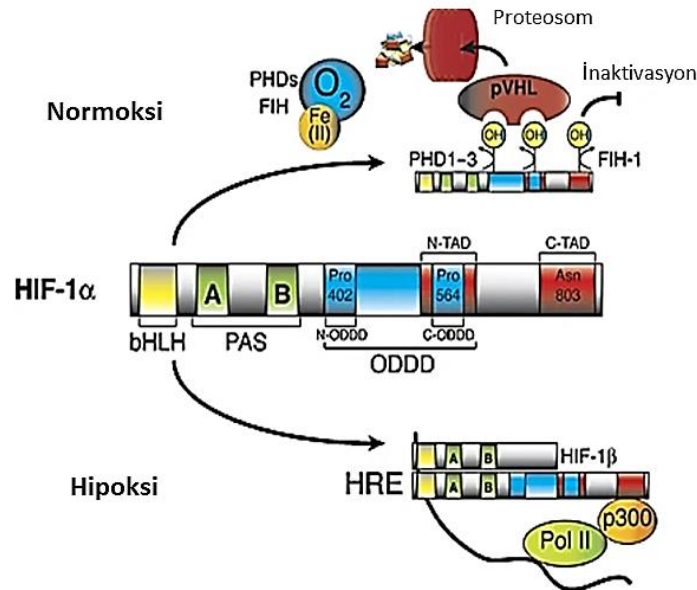
Şekil 2.2. HIF1 α Proteininin Moleküler Yapısı (Calapoğlu, 2016).

HIF1; yapısında sürekli eksprese olan HIF1 α ve ekspresyonu sıkıca düzenlenen HIF-1 β alt ünitelerini barındıran bir heterodimerdir. HIF1'in bir alt ünitesi olan HIF1 α ; 15 adet ekzon ile kodlanan, toplamda 826 aminoasit içeren, 120 kDa büyüklüğünde bir proteindir. N- terminal ucu bazik heliks loop heliks (bHLH) ve PAS alanlarını bulundurur (Calapoğlu, 2016). DNA bağlanması için bazik alan, HIF1 α ve HIF1 β dimeri oluşumu için ise HLH-PAS alanı gereklidir. Yapısında iki tane transaktivasyon bölgesi (TAD) bulunur. Bir tanesi N-ucu TAD 531-575 aminoasitlerinde konum alırken diğeri C-ucu TAD 786-826 aminoasitlerinde konumlanmaktadır. C-ucunun son kısmındaki 718-721 aminoasitleri, nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) dizilerini kapsamaktadır. HIF1 α 'nın merkez kısmında (401- 603aa. Arası) Prolin-Serin-Threonin miktarının çok olduğu oksijen bağımlı parçalanma bölgesi (ODDD) bulunmaktadır.

HIF1 heterodimeri DNA da 5'-(A/G)CGTG-3' konsensus dizisine bağlanır (Calapoğlu, 2016).

2.3.1.2. HIF1 α Proteinin Fonksiyonu ve Aktivasyon Mekanizması

Normoksik koşullar altında, HIF1 α alt birimlerinin yarılanma ömürleri çok kısadır. Hücreler sürekli olarak HIF1 α proteinini sentezler ve yıkıma uğratar (Jewell ve ark., 2001). Bununla birlikte, azalan oksijen ile oluşan hipoksik ortam altında, HIF1 α 'nın degradasyonu gecikir (Jiang ve ark., 1996). Oksijen ve HIF1 α alt birimi arasındaki arayüz, α -alt birimlerinin oksijene bağlı bozunma alanında (ODDD) iki prolil rezidüsünün (insan HIF1 α da Pro402 ve Pro564) hidroksilasyonu gibi farklı enzimatik reaksiyonlarla sağlanır. Bu oksijene bağımlı hidroksilasyon, von Hippel-Lindau tümör baskılayıcı protein (pVHL) ile etkileşimi düzenler (Epstein ve ark., 2001). pVHL, ubiquitin-proteazom yolu ile proteoliz için HIF1 α 'nın N-terminal transaktivasyon alanını (N-TAD) hedefleyen bir E3 ubiquitin ligaz kompleksinin tanıma bileşenidir (Ivan ve ark., 2001), (Maxwell ve ark., 1999). Kompleksin diğer bileşenleri, E3 ubiquitin ligaz komplekslerine de katılan elongin B, elongin C, Rbx1 ve Cul2'dir. Hipoksik koşullar altında prolil hidroksilasyonu baskılanarak HIF1 α proteini proteazomal yıkımdan kaçır ve birikebilir. Biriken HIF1 α çekirdeğe göç eder ve HIF1 β ile dimerize olur. HIF kompleksi daha sonra hedef genlerin promotor veya güçlendirici dizilerinde heterodimerik transaktive edici kompleks HRE'ye bağlanır.



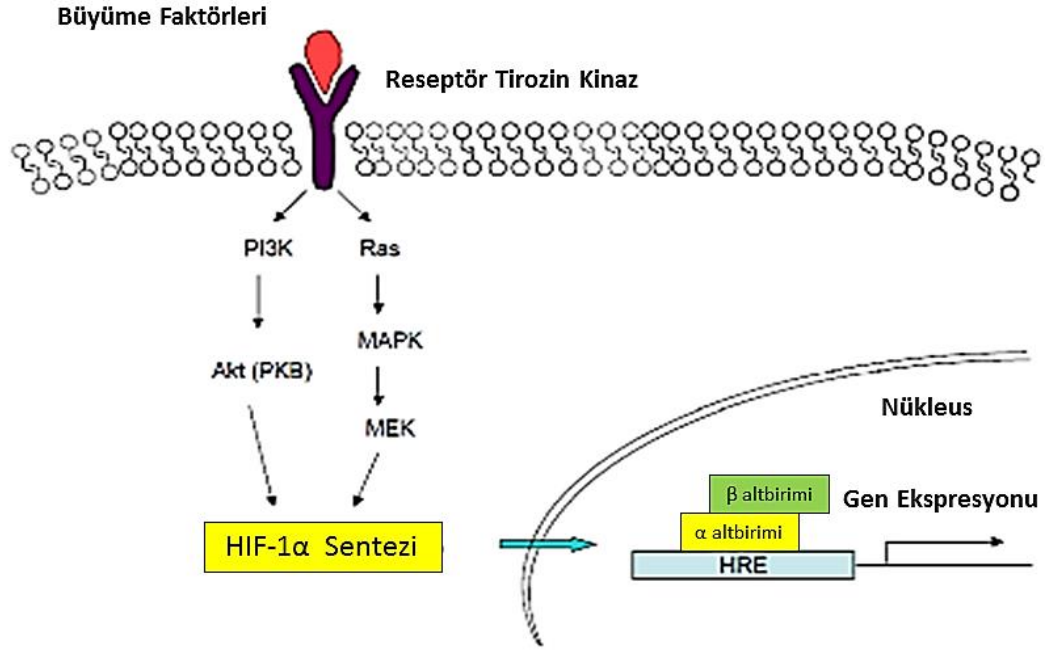
Şekil 2.3. HIF1 α proteininin prolil hidroksilasyon ve proteasomal bozunma ile düzenlenmesi (Weidemann & Johnson, 2008).

HIF1 α alt birimi yapısında; oksijene bağılı bozunma alanında (ODDD) iki prolil rezidüsü ve C-terminal transaktivasyon alanında (C-TAD) bir asparajinil rezidüsü olmak üzere toplamda üç hidroksilasyon bölgesi barındırır. Oksijen varlığında prolil hidroksilasyon Fe(II)-, oksijen- ve 2-oksoglutarat bağımlı prolil hidroksilaz alanı (PHD) tarafından katalize edilir (Epstein ve ark., 2001). Hidroksillenmiş prolil rezidüleri HIF-1 α 'nın stabil tutulmasına olanak sağlar (Bruick & McKnight, 2001). Von Hippel-Lindau proteini (pVHL) ise ubiquitinasyon ve hemen ardından proteosomal bozulmaya yol açar (Jaakkola ve ark., 2001). Asparajin hidroksilasyon, C-TAD'deki tek bir bölgede faktör inhibe edici HIF (FIH) olarak adlandırılan bir enzim tarafından katalize edilir. Bu hidroksilasyon, kofaktör alımını önler. Hipoksi veya PHD inhibisyonuna bağılı hidroksilasyonun yokluğunda, HIF1 α çekirdeğe göç ederek HIF1 β ile heterodimerize olur ve hedef genlerin düzenleyici bölgelerindeki hipoksi yanıt elemanlarına (HRE'ler) bağlanır.

2.3.1.3. Normoksik Koşulda HIF1 α Stabilizasyonunun Moleküler Mekanizması

Trombosit Türevi Büyüme Faktörleri (PDGF), İnsülin Benzeri Büyüme Faktörleri (IGF), Epidermal Büyüme Faktörleri (EGF), İnterlökin-1 β gibi birçok büyüme faktörü ve sitokin; normoksik koşullarda HIF1 α 'yı stabilize etmektedir (Zelzer ve ark., 1998). Yapılan bazı çalışmalarda, nitrik oksitin de normoksik koşullarda HIF-1 α 'yı stabilize ettiğine dair bulgular yer almaktadır (Palmer ve ark., 2000).

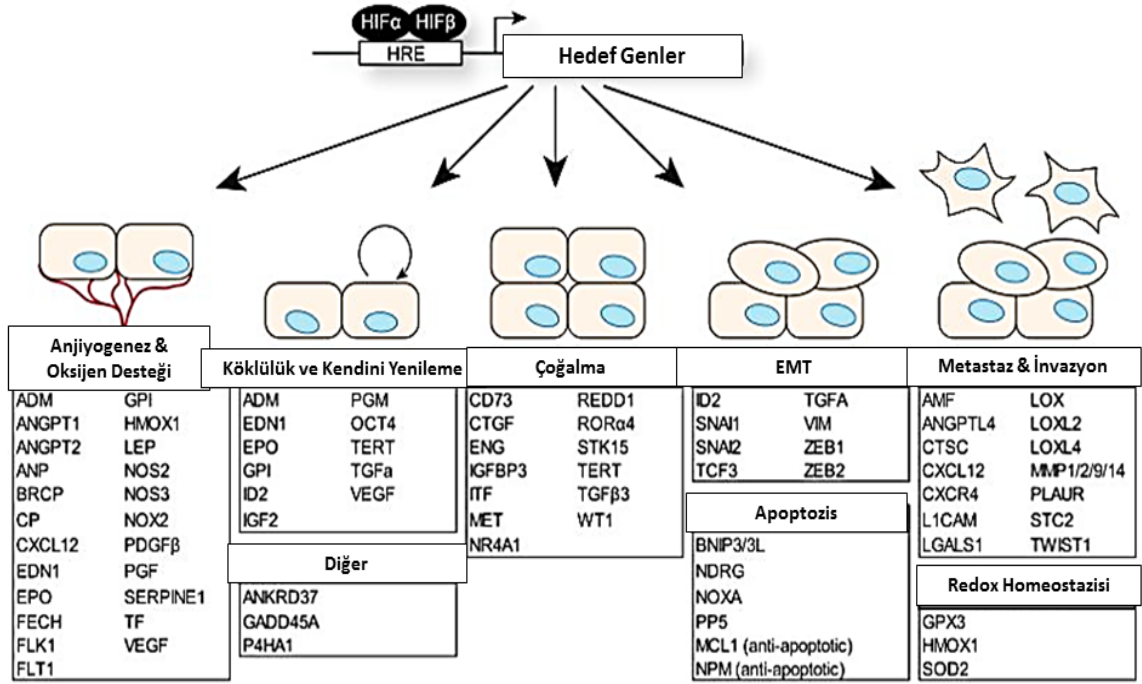
Büyüme faktörleri hipoksiye bağımlı olmaksızın protein translasyonuna neden olur. Oysa hipoksi HIF1 α degradasyon miktarındaki düşüş ile ilişkilidir. Bu oksijenden bağımsız HIF1 α stabilizasyonu Ras/Raf/MAPK ve PI3K/Akt/mTOR gibi ortak bir hücrel kinaz yolu ile meydana gelmektedir (Zhong, 2000). Büyüme faktörü, spesifik reseptör tirozin kinaza bağlanarak fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) ve mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyal yollarını idüklemesiyle protein kinaz B (PKB) olarak da bilinen Akt'yi de aktive etmiş olur (Calapoğlu, 2016). MAPK sinyal yolağında bulunan büyüme faktörü ise Ras sinyal yolağındaki aktivasyon silsilesini oluşturur. MAPK yolağının aktivasyonu sadece HIF1 α sentezi değil bunun yanı sıra HIF'ın transkripsiyonel aktivitesinide arttırmaktadır (Zundel ve ark., 2000).



Şekil 2.4. Büyüme Faktörlerinin PI3K / MAPK Sinyal Yolları ile Normoksik Koşulda HIF1α Sentezini Arttırması (Zundel ve ark., 2000).

HIF1α Hedef Genleri

HIF'ler, çeşitli biyolojik yollarda hedef genleri düzenler. En belirgin ve iyi karakterize edilmiş hedeflerin çoğu, anjiyogenez ve metabolik yeniden programlama yoluyla oksijen temini ve kullanımının düzenlenmesinde yer alır. HIF'ler hücre tarafından oksijenin en verimli kullanımını koordine etmek için, enerji bağımlılığını yüksek oksijen ihtiyacından glikolize doğru kaydıran metabolik bir yeniden programlamanın merkezinde yer alan genleri aktive eder (Dengler ve ark., 2014). Temel olarak tüm glikolitik enzimleri kodlayan genlerin ifadesi, HIF'ler tarafından doğrudan indüklenir. HIF'ler ayrıca anjiyogenez, köklülük ve kendini yenileme, hücre çoğalması, redox homeostazisi, EMT, metastaz, invazyon ve apoptoz gibi çeşitli hücresel faaliyetleri düzenleyen genlere de etki etmektedir.



Şekil 2.5. HIF1α Hedef Genleri (Dengler ve ark., 2014).

2.3.2. Kanserde Hipoksinin Rolü

Kanser oluşumu özellikle katı tümörler, hipoksiden çok fazla etkilenmektedir (Wigerup ve ark., 2016). Kanserde hipoksi; gen ekspresyonunda değişiklik, apoptozun engellenmesi veya otofajinin desteklenmesi, epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) uyarılması, anjiyogenez / vaskülogenezde artış, metastaz, artan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve DNA hasar onarım yollarındaki değişiklikler nedeniyle genomik kararsızlıklar gibi bir çok olayla ilişkilendirilmektedir (Wigerup ve ark., 2016). Hipoksi ayrıca tümörlerin agresifliğini arttırmakta ve bağışıklık sistemini etkileyerek anti-tümör cevabın azalmasına katkıda bulunur. Hipoksinin tümör hücreleri üzerindeki etkilerine büyük ölçüde hipoksi indüklenebilir faktör (HIF) ailesi aracılık etmektedir (Semenza, 2007). Ortamda oksijen kaynağı yeterli olduğunda, HIF1α alt birimi, oksijene bağımlı enzim aktivitesi yoluyla prolin hidroksilaz alanı (PHD) içeren proteinler tarafından prolin rezidülerinden hidroksillenir. HIF1α prolin bölgelerinin hidroksilasyonu ile Von Hippel Lindau tümör baskılayıcı (pVHL)'ya bağlanarak ubiquitin-proteozom sistemi yoluyla bozunmaya uğrar. Hipoksik koşullar altında ise azalmış oksijen konsantrasyonu nedeniyle PHD katalizli hidroksilasyon gerçekleşmez. Hidroksillenmemiş HIF1α alt birimleri çekirdeğe göç ederek heterodimerler oluşturmak üzere HIF1β alt birimleriyle birleşirler. Oluşan HIF1 heterodimeri, büyüme faktörleri gibi hipoksi hedef genlerini

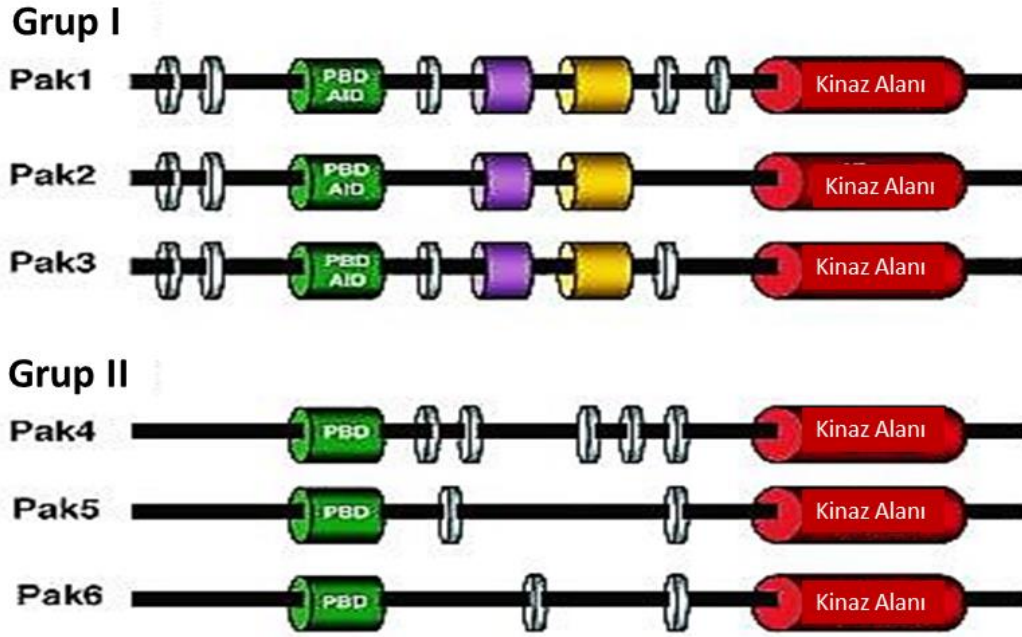
indükleyerek transkripsiyonel aktivitelerini artırır (Emami Nejad ve ark., 2021). HIF-1 indüklü genlere; vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), eritropoietin, transferrin ve transferrin reseptörleri, glikoliz için gerekli enzimler, anti-apoptotik faktörler, trombosit kaynaklı büyüme faktörü-B (PDGF-B) örnek verilebilir (Emami Nejad ve ark., 2021), (Vaupel & Harrison, 2004). Aslında azalan oksijen miktarını telafi etmek için üretilen bu faktörleri; hipoksik kanser hücreleri sağ kalım, anormal anjiyogenez, aşırı hücre büyümesi ve metastazı artırmak için çok daha fazla eksprese ederler (Emami Nejad ve ark., 2021).

2.3.2.1. Meme Kanserinde Hipoksi

Meme dokusunun büyük bir kısmını yağ dokusu kapsar. Yağ dokusunu oluşturan adipositler, tümör hücreleri için uygun ortam olan hipoksiyi teşvik eder (Linda ve ark., 2017). Bu sebeple, meme kanseri hücrelerinin gelişimi de hipoksi ile bağlantılıdır. Hipoksi aynı zamanda meme kanseri hücrelerinde östrojen reseptörlerinin kaybına yol açarak tedaviye yanıtı azaltırken hipoksi ile indüklenen faktör-1α (HIF-1α) da yeni damar oluşumu (neovaskülarizasyon) yoluyla metastazı etkiler (Linda ve ark., 2017).

2.4. p21 Aktive Kinaz (PAK) Ailesi

Serin/Treonin sınıfına ait olan P21 ile aktive edilen kinazlar (PAK'lar); ilk olarak 1994 yılında, aktin polimerizasyonunu düzenleyen küçük (21kDa) GTPazların bağlayıcı proteinleri olarak keşfedilmiştir. Fakat bu keşiften kısa bir süre sonra sağkalım, hücre iskeleti dinamikleri, motilite, hücre döngüsü, MAP Kinaz kaskadları yolu ile gen transkripsiyonu, apoptoz ve hormon sinyali (Arias-Romero & Chernoff, 2008) gibi farklı hücresel süreçlerin yürütülmesi ve/veya düzenlenmesi için gerekli sinyal yollarında (Bagrodia ve ark., 1998) temel rol oynayan Cdc42 ve Rac1 adındaki Rho GTPaz'lar ile birlikte efektif olmaktadır (Sells & Chernoff, 1997), (Manser ve ark., 1994). PAK'lar altı üyeden oluşan bir ailedir ve bu üyeler kendi içerisinde yapısal farklılıklar ve dizi homolojilerine göre iki gruba ayrılır. Grup I PAKlar; PAK1, PAK2 ve PAK3 üyelerini kapsarken, Grup II PAKlar; PAK4, PAK5 ve PAK6 üyelerini kapsamaktadır (Sells & Chernoff, 1997).



Şekil 2.6. PAK'ların Grup I ve II Yapısının Şematik Gösterimi. (PBD: P21 Bağlanma Bölgesi, AID: Otoinhibitör Bölge, Gri Halkalar: Prolince Zengin Bölgeler, Mor Halkalar: Asidik Bölge, Sarı Halkalar: PIX Bağlanma Bölgesi (Radu ve ark., 2010).

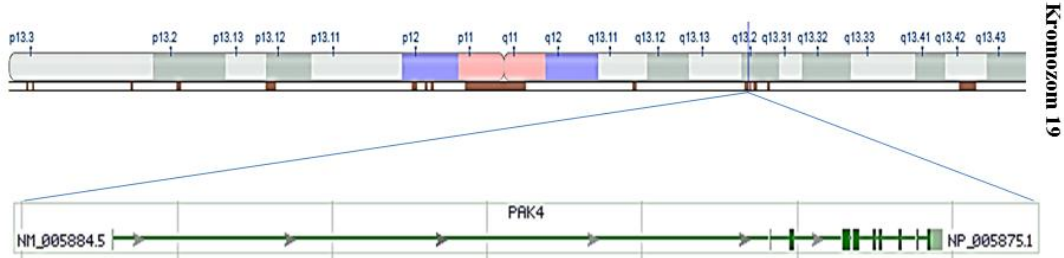
2.4.1. p21 Aktive Kinaz 4 (PAK4)

PAK4, Grup II de yer alan PAK'lar arasındaki ilk klonlanan PAK üyesidir (Wells & Jones, 2010). PAK4, hem dizilim hem de işlev açısından PAK ailesinin diğer üyelerinden farklıdır (Qu ve ark., 2001). Embriyonik gelişim ile ilişkili, her yerde eksprese edilmekte bir protein olup aktin proteini aracılığıyla hücre iskeleti dinamiklerini regüle ettiği bulunmuştur. 19. Kromozomun q kolunun 13.2 lokusunda yer alır ve Ras ile ilişkili C3 botulinum toksin substratı 1 (Rac1) ve hücre bölünmesi kontrol proteini 42 homologu (CDC42)'nin downstream efektörü olduğu gösterilmiştir (Vaughan & Jat, 2011). PAK4 çoğunlukla perinükleer bölgede bulunurken, aktif Cdc42 ile birlikte ifadelendiğinde golgiye gider (Baldassa ve ark., 2010). Diğer PAK'ların aksine, PAK4, efektör hücre döngüsü mutantı CDC42C40 ile etkileşime girer. Bunların yanı sıra PAK4; hem embriyonik canlılık hem de doku gelişiminde kayda değer bir role sahiptir fakat yetişkin dokularda bu proteinin ifadesinin azaldığı bilinmektedir (Bokoch, 2003).

2.4.1.1. PAK4 Gen Yapısı

Grup II'nin kurucu üyesi olan PAK4'ün, 1998 yılında Minden A. ve arkadaşları tarafından Jurkat hücrelerinden cDNA kütüphanesi oluşturulmuştur. PAK4 geni bu cDNA kütüphanesi kullanılarak PCR bazlı bir strateji ile klonlanıp tanımlanmıştır (Abo

ve ark., 1998). Grup II PAK'lar, grup I PAK'lara kıyasla daha az kodlama eksonuna sahiptir, bu durum iki grupta yer alan PAK üyeleri arasındaki yapısal ve fonksiyonel farklılıkları oluşturur. *PAK4*; 19. Kromozomun q13.2 bölgesinde yer alan ve protein kodlayan bir gendir. İnsan *PAK4*'ü yapısında 13 ekson barındırır ve yaklaşık 57 kb uzunluğundadır.

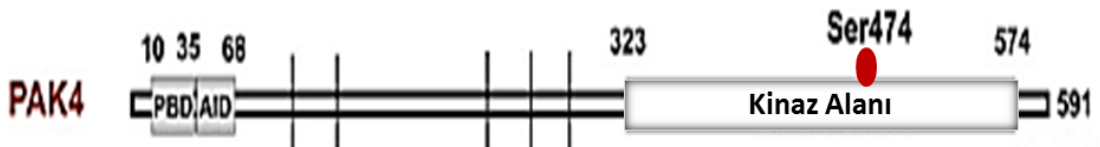


Şekil 2.7. *PAK4* Gen Yapısı.

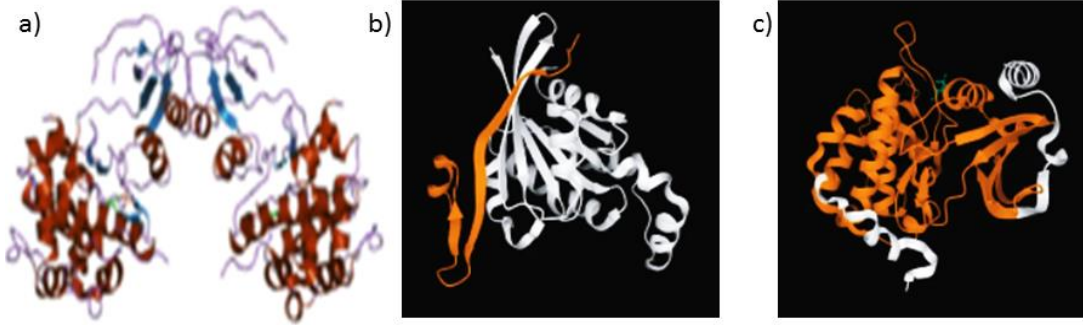
Bu gen için farklı izoformları kodlayan çoklu transkript varyantları bulunmuştur. *PAK4* totalde 12 transkript üretmektedir. Bunlardan 10 tanesinin yaklaşık 438 ila 591 amino asit uzunluğunda olan proteinleri kodladığı bilinmektedir. Kalan iki transkript ise doğası gereği protein kodlamamaktadır (Kumar ve ark., 2017).

2.4.1.2. *PAK4* Protein Yapısı

PAK4 proteinleri yapısında; korunmuş bir N-terminal p21-bağlama alanı (PBD), bir C-terminal kinaz alanı (KD) (Ha ve ark., 2012), yeni tanımlanan bir oto inhibitör alanı (AID) veya bir AID benzeri sahte substrat sekans (PS) alanı içermektedir (Won ve ark., 2019).



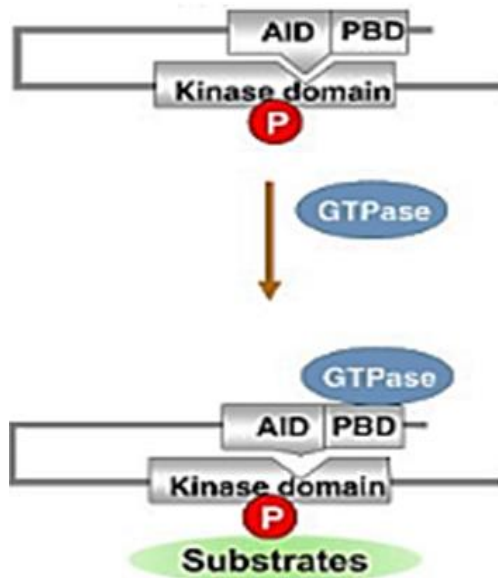
Şekil 2.8. *PAK4* Protein Yapısının Şematik Gösterimi. Rakamlar, çeşitli alt bölümlerdeki rezidü numaralarını tanımlamaktadır. N-terminali oto-düzenleyici bölge (10-68aa) ve kinaz alanı (323-574aa) gösterilmiştir. PBD (p21-bağlama alanı) ve AID (otomatik engelleyici alan) dahil olmak üzere otomatik düzenleyici bölgenin yapısı gösterilmektedir. | ise prolin açısından zengin bölgeyi belirtmektedir (Kumar ve ark., 2017).



Şekil 2.9. PAK4 Proteininin 3 Boyutlu Kristal Yapısı, b)PAK4'te bulunan P21 Bağlanma Alanının 3 boyutlu kristal yapısı, c)Kinaz Alanının 3 boyutlu kristal yapısı (Zhang ve ark., 2022).

2.4.1.3. PAK4 Aktivasyon Mekanizması

PAK4 normalde *N*- terminal alanındaki otomatik engelleyici alan (AID) aracılığıyla inaktif halde tutulur. İnaktif formdaki PAK4; büyüme faktörü reseptörleri veya aktif CDC42 ve RAC1 gibi Rho GTPaz'lar başta olmak üzere çeşitli efektörlerin (Aspenstrom ve ark., 2004) P21 Bağlanma Alanına (PBD) bağlanmasıyla yapısında konformasyonel bir değişiklik oluşturur. Böylece AID aracılı inhibisyon serbest bırakılır ve birkaç serin ve/veya treonin rezidüsü üzerinde yapısal olarak bir otofosforilasyon meydana gelir. Tüm bunların sonucunda kinaz artık tamamen aktive olmuş olur (Eswaran ve ark., 2008). Aktive olan kinaz ise hücre büyümesi ve hayatta kalmasının düzenlenmesi ile ilişkili bir dizi biyokimyasal substratı fosforile eder.

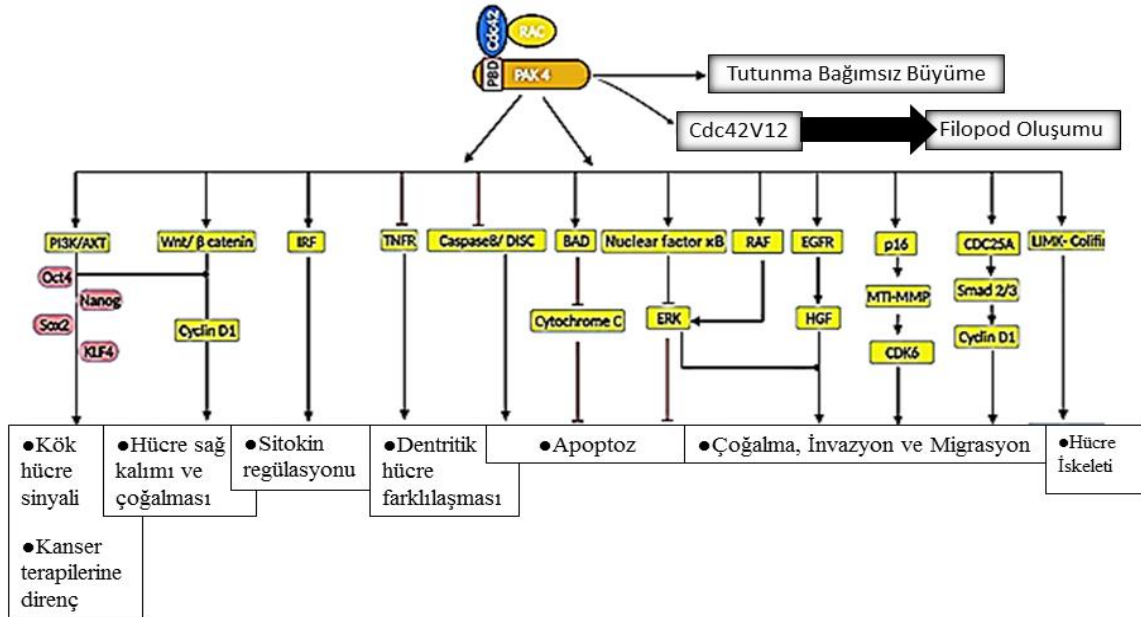


Şekil 2.10. PAK4 Aktivasyon Modeli (Kumar ve ark., 2017), (HA ve ark., 2012).

2.4.1.4. PDGF Aracılı PAK4 Aktivasyonu

PDGF serum faktörlerinin PAK'ı aktive ettiği bilinmektedir (Li ve ark., 2000). Hücre proliferasyonu, farklılaşması, yara iyileşmesi ve tümör hücresi metastazı gibi migrasyonla ilişkili süreçlerin kontrolünde önemli roller oynayan PDGF, spesifik reseptörüne bağlandığında reseptörün dimerizasyonunu ve onun tirozin kinaz aktivitesini indükler. Aktive olan PDGF reseptörü (PDGFR), fibroblastların hücre göçünü uyarmak için epidermal büyüme faktörü (EGF) reseptörünü (ErbB1) transaktive eder (Li ve ark., 2000). Bu transaktivasyon, kemotaktik olarak görev alan PDGF'in p21 ile aktive olan kinaz (PAK) ailesi kinazlarını indüklemesi için gereklidir (Li ve ark., 2000), (He ve ark., 2001). Bu bağlamda yapılan çalışmalar; PDGF ailesi ligandlarından gelen sinyalin PAK'ı aktive etmesi için önce EGF reseptörünü transaktive etmesi gerektiğini göstermektedir (He ve ark., 2001).

2.4.1.5. PAK4 İlişkili Sinyal Yolakları



Şekil 2.11. PAK4 İlişkili Sinyal Yolları (Naïja ve ark., 2021).

Fosforillenmiş PAK4, tutunma bağımsız büyümeyi düzenler (Qu ve ark., 2001). PAK4 aşırı ekspresyonu gösterilen sinyal yollarına ek olarak; Akt gibi birçok sinyal yolunun ekspresyonunu düzenler ve hücre çoğalmasını, invazyonunu ve göçünü destekler. PAK4, hücre sağ kalımı ve çoğalmasında etkili olan bu PI3K/AKT sinyal yollarının aktivasyonu ile kanser hücrelerine tedavilere direnç kazandırır (Kuijl ve ark., 2007). Bazı durumlarda, fosforile edilmiş PAK4; kaspaz3, bax, p53 gibi molekülleri düzenleyerek diğer sinyal yollarını da etkiler (Kesanakurti ve ark., 2012). PAK4 aşırı

ekspresyonu, Vimentin ve N-Kaderin'i uyararak hücre iskeleti organizasyonunu ve hücre yapışma kabiliyetini değiştirir (Edwards ve ark., 1999). PAK4 mitokondrinin sitokrom c salınımını önleyen BAD'ı fosforile ederek veya kaspaz8' in DISC kompleksine bağlanmasına engel olarak apoptozu baskılayabilir (Gnesutta ve ark., 2001). Cdc42V12'nin ifadesi ile birlikte PAK4, membranöz stoplazmik çıkıntı (filopod) oluşumuna katılır. PAK4, ayrıca bağışıklık sisteminde rol oynayan IL-6, IL-8, TGF- β ve TNF-a ekspresyon seviyelerini de düzenler (Kuijl ve ark., 2007).

2.4.2. Kanserde PAK4

Çoğalmayı, apoptozu ve invazyonu düzenleyen genlerdeki mutasyonlar normal hücrelerin kanserleşmesine sebebiyet vermektedir. Bunun yanısıra mutasyon olmadan sinyal yollarındaki aksaklıklar veya anormallikler de kansere sebep olmaktadır (Ye & Field 2012). Bu duruma PAK'lar örnek verilebilir. Çünkü bu kinazlar; mutasyona uğramasada, çeşitli insan tümörlerinde aşırı düzeyde ifade edilir veya normalden daha fazla aktive edilmesi söz konusu olmaktadır. Birkaç farklı moleküler mekanizma, gen amplifikasyonu ve yukarı akış düzenleyicilerinde değişimler oluşturarak kanserde anormal PAK sinyallemesine neden olmaktadır (Chen ve ark., 2008). PAK4; PI3K, Akt, Bad, Bax ve p53 gibi pek çok önemli kanser sinyal yollarında anahtar sinyal dönüştürücüleri olarak rol oynarlar (Ye & Field, 2012). Yetişkin dokularında PAK4'ün DNA, RNA ve protein seviyelerinin aşırılığı sıklıkla kanserle ilişkilendirilmiştir (Rane & Minden, 2019). PAK4'ün kanser hücrelerinde aşırı eksprese olduğu ve bunun sonucunda da kanser hücrelerinin sağ kalımını ve çoğalmasını teşvik ettiği birçok çalışmayla kanıtlanmıştır (Gnesutta ve ark., 2001), (Gnesutta & Minden, 2003).

2.4.2.1. PAK4' ün Kanser Hücrelerinin Çoğalmasındaki Rolü

PAK4; kanser hücrelerinin sağ kalımını ve sürekli çoğalmasını destekleyici rol oynamaktadır (Gnesutta ve ark., 2001), (Gnesutta & Minden, 2003). Kanser hücrelerinde artan ifadesiyle PAK4, PI3K'ya doğrudan bağlanır ve AKT fosforilasyonunu artırarak PI3K/AKT sinyal yolunu aktive etmektedir. PI3K/AKT yolağı, hücrenin hayatta kalmasını, çoğalmasını destekler (He ve ark., 2017). PAK4 Akt yolağının yanı sıra başka birçok çeşitli mekanizmalar yoluyla da hücre proliferasyonunu etkilemektedir.

2.4.2.2. PAK4'ün Kanser Hücrelerinin Göçü, İnvazyonu ve Metastazında Rolü

Var olan toplam PAK üyelerinin arasından sadece PAK4; tümör hücrelerinin gelişimi ile ilişkili olan tutunma bağımsız hücre büyümesini destekler. Aktive PAK4; epitelyal-mezenkimal geçiş sürecini hızlandırarak ve kanser hücrelerinin göçünü ve metastazını destekleyerek kanserin ilerlemesine katkıda bulunur. PAK4 aşırı ekspresyonu, hücre göçü ve invazyonu için önemli bir proteinaz olan membran tipi 1 matris metalloproteinaz (MT1-MMP)'ı ve kofilini fosforile ederek inaktive eden LIMK1'i uyarırken ayrıca Vimentin, E-Kaderin, N-kaderin ekspresyonlarını da düzenler. Böylece hücre iskeleti organizasyonu ile birlikte hücre yapışma özelliğini değiştirmektedir (Kesanakurti ve ark., 2012), (Ahmed ve ark., 2008). Ayrıca PAK4 aşırı ekspresyonunun, bir takım büyüme faktörü reseptörü sinyal yollarını düzenleyerek hücre invazyonunu ve göçünü desteklediği de ortaya koyulmuştur (Kesanakurti ve ark., 2012).

2.4.2.3. PAK4 ve Apoptoz Mekanizması

PAK4'ün tümörijenik işlevine, apoptotik yolları düzenleme yeteneği de aracılık eder. Bu düzenlemeyi kinaz bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki şekilde gerçekleştirir. PAK4 kinaz bağımlı olarak pro-apoptotik molekül olan BAD'i serin rezidüsünden fosforile eder ve dolayısıyla mitokondriden sitokrom c salınımını engellemiş olur (Datta ve ark., 1997). Kinaz bağımsız olarak ise; mitokondriden sitokrom c salınımını aktive eden kaspaz8 aktivasyonunu engeller. Sitokrom c salınımının engellenmesi, kaspaz-9 aktivasyonunun baskılanması ve dolayısıyla kaspaz-3'ün kesilememesi ve baskılanmasına yol açarak hücrenin apoptozdan kaçmasına yol açar (Green, 1998). Ayrıca, aşırı PAK4 ifadesinin iskele proteini TRADD'nin, aktive edilmiş tümör nekroz faktör reseptörüne (TNFR) bağlanmasına yardımcı olarak proapoptotik yolu ortadan kaldırdığı (Li & Minden, 2005) ve kaspaz 8'in ölümü indükleyen sinyal kompleksine (DISC) bağlanmasını engelleyerek yine kinaz bağımsız bir şekilde hücrelerin apoptozdan kaçmasına sebebiyet verdiğide bilinmektedir (Gnesutta & Minden, 2003). Kaspaz-8 gibi başlatıcı kaspazların aktivasyonunun engellenmesi de kaspaz 3 ve 9 dahil olmak üzere diğer kaspazlarının aktivasyonunun baskılanmasına yol açar. Kaspaz 3 ve diğer efektör kaspazların baskılanması da Bax proteini gibi apoptotik tepkiye aracılık etmede önemli roller oynayan bir dizi farklı hedef proteinin aktivitesini engelleyerek hücrenin apoptozdan kaçmasına sebep olur (Gnesutta ve ark., 2001).

2.4.2.4. PAK4'ün Kanserde İnflamatuvar Etkileri

PAK4 aşırı ekspresyonu ve aktivasyonu; bazı inflamatuvar yanıtın azalmasına ve tedavide ilaç dirençliliğinin artmasına sebep olarak kanserli hastaların yaşama oranlarının düşmesi ile ilişkilidir (Radu ve ark., 2014), (Abril-Rodriguez ve ark., 2020). (Fu ve ark., 2014). (Bhardwaj ve ark., 2014), (Won ve ark., 2019). (Siu ve ark., 2010). (Shu ve ark., 2015), (Tyagi ve ark., 2016). PAK4'ün inflamasyon üzerine etkisini araştıran bazı çalışmalar, PAK4 yıkımının, tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), interlökin-6 (IL-6), interlökin-1 β (IL-1 β), kemokin (CC motifi) ligandı 5 (CCL5) ve interferon β ' yı içeren inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun azalmasına neden olduğunu kanıtlamıştır (He ve ark., 2017).

2.4.2.5. Meme Kanseri PAK4

Meme Kanseri kadınlarda en sık görülen kanserdir. Kadınların yaşamları boyunca meme kanserine yakalanma riski %12'dir. Evre 1 meme kanserinin 5 yıllık sağkalım oranı %98'dir ancak bu oran evre 4 metastatik meme kanserinde %25'e düşer (Cancer Research UK, 2021). PAK4 geni lokalizasyon olarak agresif meme kanserlerinde çok fazla amplifikasyona uğrayan bölgede olduğu için kanserde aşırı ifade edilmesi kaçınılmazdır (He ve ark., 2017). Normal meme epitel hücrelerinde neredeyse saptanamayacak kadar az olan PAK4 protein ve mRNA seviyelerinin, bazı meme kanseri hücre hattında ve insan meme kanseri tümör örneklerinde arttığına ve kanserin en ileri aşamasındaki hücre örneklerinde en yüksek PAK4 seviyelerine rastlanmıştır (He ve ark., 2017), (Bi e ark., 2016), (Wong ve ark., 2013). Bu durum PAK4'ün meme kanserinde onkojenik bir protein olarak rol oynadığını kanıtlamaktadır.

2.4.2.6. Kemoterapötik Olarak PAK4 İnhibitörlerinin Kullanımı

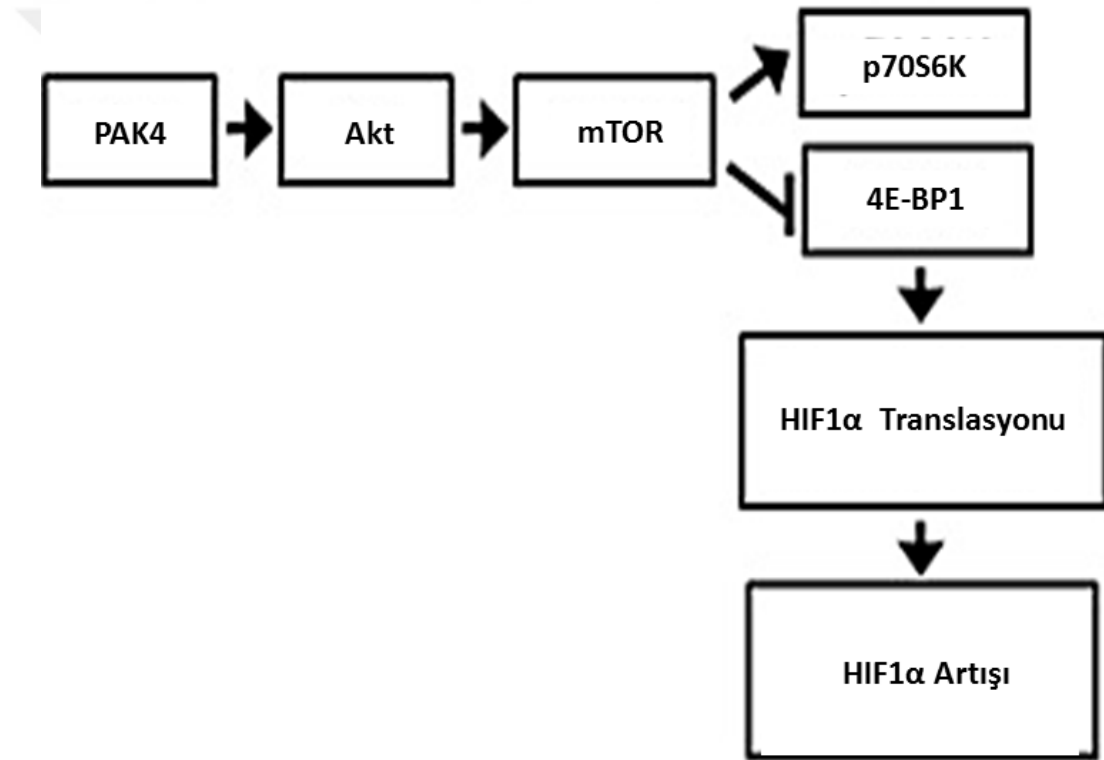
Dünya çapında, başta kanser olmak üzere bulaşıcı hastalıklar, kalp, diyabet ve pankreas hastalıkları gibi çeşitli birçok hastalıkta PAK' ların kritik rolleri göz önüne alınarak, PAK hedefli ilaç keşfi, büyük bir ilerleme kaydetmiştir (Liu ve ark., 2021).

PAK inhibitörleri; ATP-rekabetçi inhibitörleri, allosterik inhibitörleri ve doğal inhibitörleri içermektedir. ATP-rekabetçi inhibitörler ve allosterik inhibitörler, PAK' ların yapısına göre geliştirilmiştir. Doğal PAK inhibitörleri ise PAK aktivitesini veya PAK aracılı patojenik sinyal yollarını inhibe eden bitkilerden ekstrakte edilmiş

bileşiklerdir (Liu ve ark., 2021). ATP-rekabetçi inhibitörlere; PF3758309 adındaki PAK4 inhibitörü örnek verilebilir (Murray ve ark., 2010). Bu PAK4 inhibitörü, ATP bağlanma bölgesindeki PAK4 katalitik alanına bağlanır. Bu şekilde oluşturduğu biyolojik ve kimyasal değişikliklerle in-vitro tümör hücre büyümesini engellediği kanıtlanmıştır (Murray ve ark., 2010).

2.4.3. PAK4'ün Hipoksi İle İlişkisi

Yapılan bir çalışmada PAK4 aşırı ekspresyonunun hipoksik kanser hücrelerinde HIF1 α protein seviyesi üzerinde stabilize edici bir etki gösterdiği bulunmuştur. Aynı çalışmada; PAK4'ün yıkılması, hipoksi kaynaklı HIF1 α birikimini azalttığı gösterilmiştir (Kim ve ark., 2017).



Şekil 2.12. Pak4'ün Hipoksik Koşullar Altında Akt-mTOR-4E-BP1 Yolu Aracılığıyla HIF1 α Translasyonu Üzerine Etkisi (Kim ve ark., 2017).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Hücreler; hücre kültür kapları içerisinde, %10 Fetal Bovin Serum-FBS (PAN BIOTECH – Cat:P30-3303), %1 Penisilin/Streptomisin (MULTICELL – Cat:450-115-EL), L-Glutamin, esansiyel olmayan amino asitler, sodyum pirüvat içeren Dulbecco's modified eagle medium-DMEM (Sigma – Cat:D6429) besi ortamında monolayer şekilde kültürlenip çoğaltıldı.. Kültürasyon işlemi; standart hücre kültürü için gerekli şartları sağlayan (% 5 CO₂'li atmosfer ve 37°C) bir inkübatörde (ESCO – CCL-170B-8) gerçekleştirildi. Tüm hücresel deneyler steril hücre kültürü kabini (ESCO – AC2-4E8 Class II) uygulandı. Hücrelerin morfolojileri invert mikroskop (Carl Zeiss 415510-1101-000) yardımıyla görüntülendi.

3.1.1. Hücrelerin PDGF-BB ve PF3758309 Ajanı İle Muamele Edilmesi

MDA MB 231 hücreleri %70-80 konfluensiye ulaştığında hücrelerin bulunduğu kültür kabından %10 FBS'li besi ortamı aspire edildi. İki defa PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Ardından hücreler serum açlığına maruz bırakıldı ve gece boyu (16 saat) beklemek üzere inkübatöre kaldırıldı. Gece boyu serumsuz besiyerinde bekleyen hücreler üzerinden besiyeri uzaklaştırıldı ve iki kez PBS ile yıkama yapıldı. Hücreler kontrol için sadece serumsuz besiyerinde, PDGF-BB uyarımı için PDGF-BB (Sigma – Cat:SRP6296) PAK4 inhibisyonu için PF3758309 ajanı (MCE – Cat:898044-15-0) hem PDGF-BB uyarımı hemde PAK4 inhibisyonu için ise her iki ajanı içeren serumsuz besiyerinde tutuldu. Farklı deneyler için hep bu deney seti kullanıldı.

3.2. Hücre Proliferasyon Deneyi

İlk olarak MDA-MB-231 hücreleri tripsin (SARTORIUS – Cat:03-053-1B) ile tripsinize edilip homojenize edildi ve Thoma lamı (MARIENFELD) kullanılarak 5000 hücre/kuyu olacak şekilde tripan mavisi (BI Biological Industries - Cat:03-102-1B) yardımıyla sayıldı. Daha sonra hücre proliferasyonu için 96 kuyucuklu kültür kaplarına her kuyuda 5000 hücre olacak şekilde hücreler ekildi ve bir gün inkübatörde tutunmaları beklendi. Ertesi gün hücreler üzerindeki mevcut besiyeri aspire edildi ve serumsuz

besiyeri eklenerek bir gün inkübatörde inkübe edildi. Bir gün sonunda, kontrol, PDGF-BB, PF, PDGF-BB/PF şeklinde olan deney seti uygulanarak 48. Saat MTT (Sigma – Cat:M5655) okuması için inkübatöre kaldırıldı. 48.saatın sonunda besiyerine MTT ajanı eklendi ve 3 saat inkübatörde bekletildi. Ardından besiyerleri aspire edilerek tüm kuyulara DMSO (Honeywell–Cat:41640) koyuldu ve hemen ardından spektrofotometre (Thermo Scientific-MULTISKAN GO) yardımı ile 540-690 nm de spektrofotometrik ölçüm gerçekleştirildi.

3.3. Hücre Migrasyon Deneyi

MDA MB 231 hücrelerinin 6-kuyulu kaplara her kuyuda 10^4 hücre olacak şekilde ekimi yapıldı. Bir gün boyunca inkübatörde bekletilerek tutunmaları beklendi. Ertesi gün mevcut besiyeri uzaklaştırıldı ve serumsuz besiyeri ilave edilip gece boyu (16saat) inkübasyona bırakıldı. Serum açlığı uygulaması bittikten sonra serumsuz besiyeri de aspire edildi. Hücrelerin tam orta hattından kesit atıldı ve iki kez PBS ile yıkama yapıldı. Ardından hücrelere Kontrol, PDGF-BB, PF, PDGF-BB+PF olarak hazırlanan deney setine göre besiyerleri ilave edildi. 0. 24. 48. Saatlik durumları gözlemlendi. İlk süre sonunda çekilen görüntü ile diğer sürelerde çekilen görüntüler aynı büyütme oranında ve aynı bölgeden alındı. Image J programı ile görüntülerdeki hücre migrasyon alanları belirlendi. Alan verileri hesaplanarak kontrol, PDGF-BB, PF ve PDGF-BB/PF ile muamele edilen hücrelerin migrasyon oranları belirlendi. Veriler anlamlılık analizi için istatistiksel olarak hesaplandı.

3.4. Western Blot

3.4.1. Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Muamele süresi dolan hücrelerin üzerlerindeki besiyeri aspire edildi ve iki defa soğuk Dulbecco's Phosphate Buffered Saline-DPBS (Sigma-Cat:D5652-10X) ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra buz üzerinde hücrelere Triton-X Lizis tamponu (Cell Signalling–Cat:9806) eklenerek bir kazıyıcı yardımıyla tutunan hücreler kazındı. Hücre parçalarının olduğu solüsyon steril bir ependorfa alınarak vortekslendi. Ardından 13000 rpm de 1 dk santrifüj edilerek istenmeyen hücre kalıntılarından arınmış, içerisinde protein bulunan süpernatant yeni steril bir ependorfa aktarıldı. Örnekler kullanım zamanına kadar -80°C 'de saklandı.

3.4.2. Bradford Yöntemi

Hazırlanan lizatlar 1µl olacak şekilde 96kuyulu kültür kaplarına koyuldu. Yine aynı kapta boş kuyulara, %1 BSA (Sigma-Cat:A9058)'dan belirli konsantrasyonlarda koyularak protein standardı oluşturuldu. Daha sonra tüm kuyulara 100 µl'şer Bradford reaktifi (BIORAD-Cat:5000006) eklendi ve meydana gelen mavi renk ışımları bir spektrofotometre (Thermo Scientific-MULTISKAN GO) yardımıyla 595nm'de ölçüldü. Çıkan değerler protein standart grafiğine göre hesaplandı ve lizatlardaki µg/µl protein miktarı belirlendi.

3.4.3. Poliakrilamid Jelin Hazırlanması

Tablo 3.1. Poliakrilamid Jel Konsantrasyonları.

Resolving	%7'lik	%10'luk	Stacking	5mL'lik
Jel	Jel	Jel	Jel	Jel
Su	15mL	11,55mL	Su	3mL
Resolving	7,5mL	7,5mL	Stacking	1,25mL
Buffer			Buffer	
Acr	7,05mL	10,5mL	Acr	0,625mL
(29:08)			(29:08)	
%10 SDS	0,3mL	0,3mL	%10	50µl
			SDS	
%10 APS	0,3mL	0,3mL	%10	50µl
			APS	
Temed	30µl	30µl	Temed	5µl
Toplam	30mL	30mL		5mL
Hacim				

3.4.4. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Daha önceden Bradford yöntemiyle protein miktarı belirlenmiş olan örneklerden 50 µg alındı ve 5:1 oranında β-merkaptoetanol içeren SDS yükleme tamponu ile karıştırıldı. Ardından 95°C'de 5 dk kaynatıldı. Öncesinde hazırlanmış olan poliakrilamid jele uygun pipet uçlarıyla yüklendi. Örnekler jele yüklendikten sonra tank gerekli seviyeye kadar yürütme tamponu ile dolduruldu. Örnekler stacking jeli geçene kadar 80 voltta, resolving jelde ise 130 voltta yürütüldü.

3.4.5. Proteinlerin PVDF Membrana Transferi

Yürütülen örneklerin ıslak transferi için; ilk olarak süngerler transfer tamponunda ıslatıldı ve transfer aparatının negatif yükü temsil eden kısmına yerleştirildi. Üzerine whatman kağıdı, yine transfer tamponunda ıslatılarak koyuldu. Yürütme camları dikkatlice açılıp arasındaki jel çıkarıldı ve whatman kağıdının üzerine yerleştirildi. Ardından PVDF membran (Millipore IPVH00010) saf metanolde ıslatılarak jelin üzerine koyuldu ve hava kabarcığı kalmadığından emin olundu. Üzerine tekrar tamponda ıslatılmış whatman kağıdı (ACHEM) ve diğer sünger konularak transfer aparatı kapatıldı. Aparat tanka yerleştirildi ve membranın kurummasına izin vermeden gerekli seviyeye kadar tank transfer tamponuyla dolduruldu. Tankın kapağı kapatıldı ve voltaj cihazına bağlandı. Örnekler soğuk odada gece boyu 40 voltta transfer edildi.

3.4.6. İmmünblotlama

Transfer işlemi gerçekleştirildikten sonra membran TBS-T/BSA (1X TBS, % 0.1 Tween-20, %1 BSA) bloklama solüsyonunda 1 saat bloklandı. Daha sonra TBS-T/BSA içinde 1/1000 dilüsyonuyla hazırlanan primer antikor ile gece boyu soğuk odada işaretlendi. Ertesi gün primer antikor uzaklaştırıldı ve TBS-T ile her biri 15'er dakika olacak şekilde 2 kez yıkama yapıldı. Ardından, TBS-T/BSA içinde 1/2000 dilüsyon ile hazırlanmış primere uygun (anti-mouse veya anti-rabbit) sekonder antikorunda 1,5 saat işaretleme yapıldı. Sekonder antikorun uzaklaştırılmasının ardından membran yine TBS-T ile herbiri 15 dakika olacak şekilde 2 defa yıkandı.

3.4.7. Görüntüleme

İşaretleme yapılan membran üzerine ECL reaktifi (advansta–Cat: K-12043-D20) ilave edildi ve 1 dk bekletildi. Ardından görüntüleme için BIORAD Chemidoc görüntüleme cihazında kemilüminesans ölçüm alındı.

3.5. İmmünpresipitasyon Deneyi

HIF1 α ve PAK4'ün fiziksel olarak birbirine bağlandığını göstermek için; kontrol, PDGF-BB, PF ve PDGF-BB/PF deney seti uygulanan MDA MB 231 hücrelerinden hazırlanan hücre lizatı ile ayrı ayrı HIF1 α ve PAK4 proteini immunopresipitasyona tabii tutuldu. İmmünpresipitasyon için; MDA MB 231 hücreleri gece boyu serumsuz ortamda inkübe edildi. Daha sonra, deney seti hücrelerine göre ilk

olarak PDGF-BB uyarımı istenen hücreler PDGF-BB içeren besiyerine maruz bırakıldı ve 30 dk inkübatörde tutuldu. PAK4 inhibisyonu istenen hücreler ise 1 saat boyunca PF ajanı ile inkübe edildi. Kontrol hücrelerine hiçbir şey uygulanmadı. Daha sonra bu deney seti hücrelerinden lizat hazırlandı ve hazırlanan her bir lizatın 500 mikrogramı IP için ayrı ependorflara alındı. Lizatlar üzerine toplam hacim 600 µl olacak şekilde Triton X liziz tamponu eklendi. Her bir lizat/tampon karışımı üzerine ise iyice vortekslenip homojenize edilmek şartıyla 25 µl Manyetik G/A bead (Thermo Scientific – Cat:88803) eklendi. Daha sonra +4°C’de 30 dk rotatörde inkübe edildi. Süre sonunda 10.000rpm’de 1 dk yine +4°C’de mini santrifüj (nüve- NF048) ile santrifüj edilerek süpernatantlar yeni tüplere aktarıldı. Her tüpe 10 µl olacak şekilde anti-HIF1α (sc-13515) veya anti-PAK4 (sc-390507) antikorı koyuldu ve tekrar +4°C’de rotatörde 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda tüplerine 75 µl’şer manyetik boncuk ilave edildi ve yine +4°C’de rotatörde gece boyu (16 saat) olacak şekilde inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün bir mıknatıs yardımıyla manyetik boncuklar ependorf çeperine çekildi ve süpernatant atıldı. Pellet üzerine 200 µl Triton X tamponu eklendi ve yine boncuklar mıknatısla çepere çekilerek süpernatant atıldı. Bu yıkama işlemi 100 µl’şer tampon ile 2 defa tekrarlandı. İkinci yıkama sonunda pellet üzerine 100 µl Triton X tamponu eklenerek iyice homojenize edildi. Ardından tüplere 12,5 µl β-merkapto etanol içeren yükleme boyası eklendi ve western blot yapılana kadar -80°C’de saklandı. Western blot için örnekler jele yüklenmeden önce 5 dk kaynatıldı. Daha sonra yine bir mıknatıs yardımıyla manyetik boncuklar çepere çekildi ve içerisinde proteinlerin olduğu sıvı kısımdan her kuyuya 10 µl olacak şekilde jele yüklenerek western blot prosedürüne göre yöntem tamamlandı ve analiz edildi.

3.6. qRT-PCR (kantitatif gerçek zamanlı PCR) Yöntemi

3.6.1. RNA İzolasyonu ve Kantitasyonu

Hücre kültür kabından besiyeri uzaklaştırıldı. PBS ile 2 defa yıkama yapıldı. Ardından RNA izolasyon kiti (QIAGEN–Cat:12143) protokolü ve içeriğine göre; RLT tamponuyla hücre lizatı hazırlandı. Hazırlanan lizattan pipetaj yapılarak 600 µl alıp steril ependorfa koyuldu. Hücreler üzerine 1X hacimde %70 etanol eklendi. Kit içerisinde bulunan RNase mini spin tüpüne 700 µl bu karışımdan koyuldu. Daha sonra tüp 8000g (9180rpm)’de 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpünde kalan sıvı atıldı. Santrifüj işlemi iki kez tekrarlandı. Daha sonra RNase spin tüpüne 700 µl RW1 tamponu eklendi ve tekrar 8000g’de 15 saniye santrifügasyon yapıldı. Toplama tüpüne geçen sıvı atıldı.

Ardından RPE tamponundan 500µl RNase spin tüpüne eklendi ve tekrar 8000g'de 2dk santrifüje edildi. Toplama tüpüne geçen sıvı atıldı. RNase spin tüpü yeni ve steril bir ependorfa aktarıldı. Daha sonra RNase spin tüpünde bulunan membranın tam ortasına 50µl RNase içermeyen su koyuldu ve 1 dk bekletilmesinin ardından 8000g'de 2 dk santrifüj edildi. İzole edilen RNA örneklerinin saflık ve miktarları spektrofotometre ile ölçüldü ve 'RNA (µg/mL) = 40 x A260 x DF (Dilüsyon Faktörü)' formülüne göre hesaplandı.

3.6.2. cDNA Eldesi

Bu reaksiyon için Applied Systems (Appliedbiosystems – Cat:4368814) kiti kullanıldı. 4 adet 0,2'lik pcr tüpü ayrı ayrı reaksiyonlar için etiketlendi. Tablo 3.2'de gösterildiği gibi; her tüpe RT tamponundan 2µl, dNTP karışımından 0,8µl, RT Random Primerlerden 2µl, Ters Transkriptaz enziminden 1µl, RNase İnhibitöründen 0,5µl ve 3,7µl Nükleaz içermeyen Su koyularak her tüpün toplam hacmi 10µl oldu. Ardından spektrofotometre ile miktar ölçümü gerçekleştirilen her bir RNA'dan 500µg/µl olacak şekilde kendi tüplerine koyuldu. Tüplerdeki son reaksiyon hacmi 20µl oldu. Komplementer DNA (cDNA) eldesi için reaksiyon; 25°C'de 10dk, 37°C'de 120dk ve 85°C'de 5dk olacak şekilde thermal cycler cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 3.2. cDNA Reaksiyonu İçin Gerekli MasterMiks İçeriği

2X MasterMiks	Reaksiyon Hacmi (µl)
10X RT Tamponu	2.0
25X dNTP Mix (100Mm)	0.8
10X RT Random Primerler	2.0
Ters Transkriptaz	1.0
RNaz İnhibitörü	0.5
Steril H ₂ O	3.7
Son Hacim	10.0

3.6.3. Primer Tasarımı

Proje kapsamında ele aldığımız Rantes ve β-Aktin genlerinin ekspresyonlarını belirlemeye yönelik (her bir genin tüm bölgeleri primer dizisi tasarlamaya dahil edildi) Forward ve Reverse yönlü primerleri, Integrated DNA Technologies (IDT) ve NCBI primer designing tool programları kullanılarak tasarlanmıştır.

Tablo 3.3. Rantes (CCL5) ve β -Aktin (ACTB) Primer Dizileri.

Genler	Primerler	T _m (°C)
Rantes (CCL5)	İleri Primer: 5' CTTTGCCTACATTGCCCCGCC 3' Geri Primer: 3' TGCTGTCCCTCTCTCTTTGGC 5'	62°C
β -Aktin (ACTB)	İleri Primer: 5' CACCATTGGCAATGAGCGGTTC 3' Geri Primer: 3' AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT 5'	62°C

3.6.4. qRT-PCR ve Analizi

Reaksiyon Hi-ROX Kiti (AMPIGENE–Cat:ENZ-NUC104-1000) protokolüne göre kuruldu. Bunun için; 0,2'lik pcr kabı kullanıldı. Ayrı ayrı ependorf tüplerde hergen için bir karışım hazırlandı. Bir gen için; 40 μ l HiROX karışımından, 8 μ l'şer ileri ve geri primerlerden ve 16 μ l steril su koyuldu. Her genin kendi karışımı, ilgili kuyulara 9 μ l olacak şekilde dağıtıldı ve üzerlerine 1 μ l kendi cDNA'larından eklendi. Bir kuyunun toplam hacmi 10 μ l olacak şekilde hazırlanan reaksiyon tablo 3.3.'de gösterildiği gibi; 40 döngü olmak üzere 95°C'de 5sn, 60°C'de 20sn protokolüne göre Quant Studio3 cihazında Quant Studio Design yazılımı ile amplifikasyon gerçekleştirildi ve karşılaştırmalı CT değerleri ile analiz edildi.

Tablo 3.4. qRT-PCR Protokolü

Denatürasyon	95°C'de 2 dk
Amplifikasyon (40X)	95°C'de 5 sn 60°C'de 20 sn
Melt Curve	95°C'de 15 sn 60°C'de 1 dk 95°C'de 1 sn

3.6.5. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme Sistemi

qRT-PCR yöntemi kullanılarak amplifiye edilen örnekler %2'lik agaroz jel elektroforezinde analiz edildi. Bunun için; 2 gram agaroz (Sigma-A9539) tartılarak üzerine 100 mL 1X TBE (Tris-Sigma T1503/Borat-Merck 1.00165.1000/EDTA-VWR 6381-92-6) eklendi ve mikrodalga fırın yardımıyla kaynatılarak iyice çözdürüldü. 50-55°C'ye gelene kadar soğuması beklendi. Ardından çözeltiye çeker ocakta 4 μ l etidyum bromür (BIOMATIK-A2510) ilave edildi. Elektroforez küvetine taraklar yerleştirilerek sıvı haldeki agaroz jel çözeltisi elektroforez küvetine kabarcık oluşmayacak şekilde yavaşça döküldü. Oda sıcaklığında 25-30 dk polimerize olması için beklendi. Jel

polimerize olduktan sonra taraklar jelden dikkatlice çekildi ve agaroz jel, içerisinde 1X TBE bulunan agaroz jel elektroforez tankına yerleştirildi (BioRad). qRT-PCR ürünleri kuyucuklara 50bç'lik marker yükleme tamponu kullanılarak mikropipet vasıtasıyla yüklendi. Elektroforez tankına bağlı güç kaynağı ile 100 voltta 30 dk yürütüldü. Süre sonunda jel Chemidoc görüntüleme sistemine yerleştirilerek örnekler analiz edildi. Yine Chemidoc görüntüleme sistemi kullanılarak dijital olarak fotoğraflar alındı.

3.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler, Microsoft Excell ve GraphPad Prism 8 programları kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar normalize edilerek ve $\pm$ standart hata değerleri gösterilerek istatistiksel anlamlılık düzeyleri belirlendi ve grafikleri çizildi.

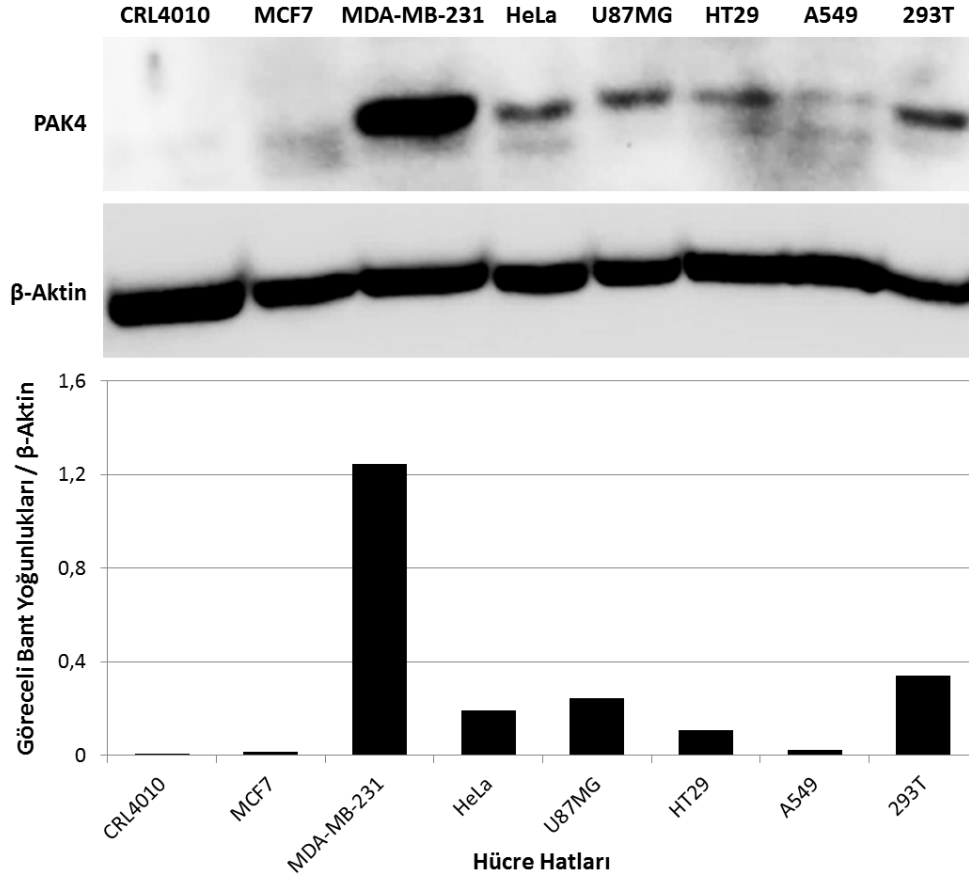
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Araştırma Sonuçları

Günümüzde PAK4'ün kanser gelişiminde rol oynayan önemli bir onkogen olduğu kanıtlanmıştır. Aynı zamanda PDGF-BB büyüme faktörünün normoksik koşullarda HIF-1 α üzerine stabilize edici etkisi olduğu da bilinmektedir. Şimdiye kadar, literatürde PDGFR β yolağının PAK4 ile ilişkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmadı. Ayrıca, HIF1 α ile PAK4 arasındaki etkileşimi gösteren herhangi bir rapora da rastlanmadı. PAK4'e ait substrat bağlanma motifleri incelendiğinde teorik olarak HIF1 α 'ya fiziksel olarak bağlanabileceği öngörüldü. Öncelikle, PAK4'ün PDGFR β sinyal yolağı ile aktive olup olmadığını doğrulamak için PDGF-BB uyarımına bağlı olarak PDGFR β aktivasyon zamanı ve bu süreçte PAK4 fosforilasyon düzeyleri belirlendi. PDGFR β 'nın PAK4'ü direkt aktive edip edemediğini belirlemek için immünpresipitasyon deneyi gerçekleştirildi ve reseptörün direkt PAK4'e bağlanabildiği ve aktive edebildiği gösterildi. Aynı zamanda aktive olan PAK4'ün HIF1 α 'ya da bağlanabildiği ve PAK4 fosforilasyonuna paralel olarak hücre içinde HIF1 α miktarının arttığı belirlendi. Dolayısıyla literatürde daha önce rapor edilmeyen PDGFR β -PAK4-HIF1 α aksisinde gerçekleşen sinyal yolağı ile, MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde kanser progresyonunun desteklenebildiği ve PAK4 inhibisyonuna bağlı olarak bu sürecin gerilediği *in vitro* ortamda gösterildi.

4.1.1. Çeşitli Kanser Hücre Hatlarında Endojen PAK4 İfadesinin Belirlenmesi

Tez çalışmamızda, ilk olarak laboratuvarımızda mevcut olan hücre hatlarında Western blot yöntemi kullanılarak endojen PAK4 proteininin ifade düzeyleri incelendi. En yüksek PAK4 protein ifadesi metastatik MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde saptandı (Şekil 4.1).

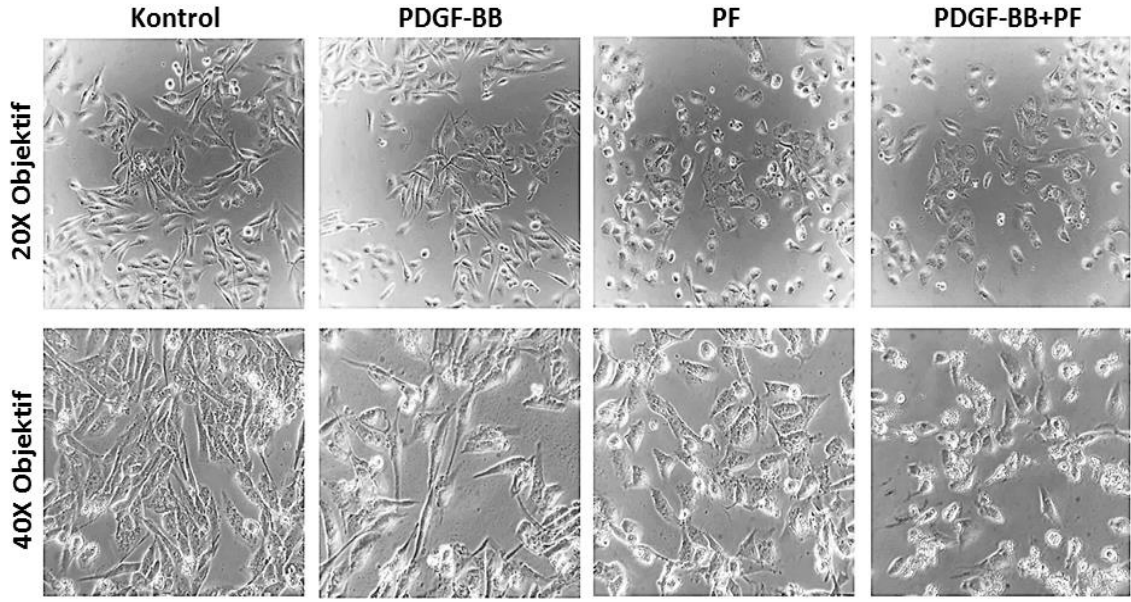


Şekil 4.1. Çeşitli İnsan Hücre Hatlarında endojen PAK4 Protein Düzeylerinin Gösterilmesi.

CRL4010 (sağlıklı meme hücre hattı), MCF7 (metastatik olmayan meme kanseri hücre hattı), MDA-MB-231 (metastatik meme kanseri hücre hattı), HeLa (servikal karsinoma hücre hattı), U87MG (glioma hücre hattı), HT29 (kolon adenokarsinoma hücre hattı), 293T (böbrek hücre hattı), ve A549 (akciğer kanseri hücre hattı).

4.1.2. PDGF-BB Faktörü ve PF3758309 Ajanının MDA-MB-231 Hücre Morfolojisine Etkisi

Hücrelere, literatüre göre belirlenen (20ng/mL) konsantrasyonda PDGF-BB faktörü ve 1μM konsantrasyonda PF3758309 (PF) ajanı uygulanıp 48 saat süre ile inkübe edilmesinin ardında hücrelerin morfolojilerindeki değişiklikler mikroskopik olarak takip edildi. PDGF-BB uygulanan hücrelerde daha belirgin hücre uzantıları ve mezenkimal morfoloji gözlenirken, PF inhibitör ajanı uygulanan hücrelerde epitelloid-benzer bir yapı gözlemlendi. PDGF-BB+PF ile muamele edilen hücrelerde ise net podozom oluşumu gözlenmezken epitelloid morfolojinin korunduğu saptandı.

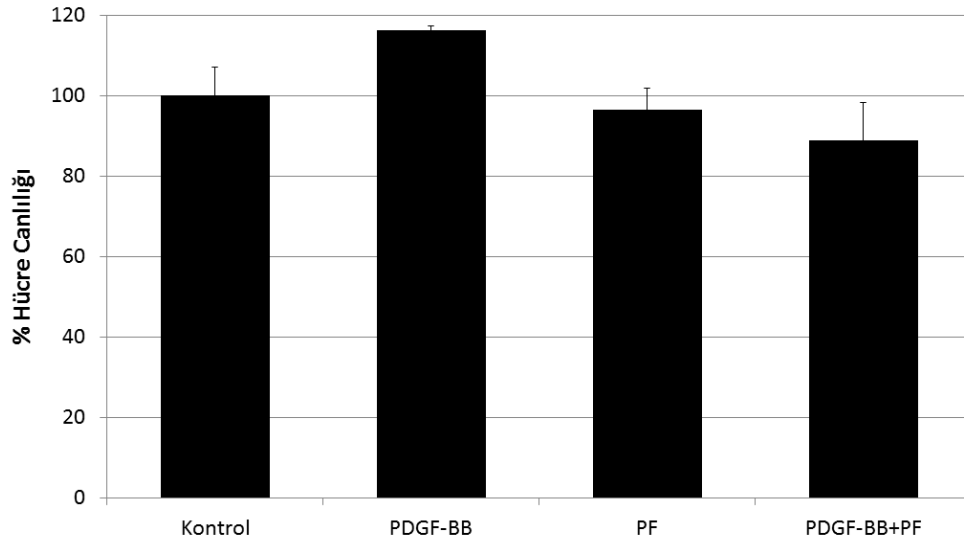


Şekil 4.2. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinin 48. Saat Sonunda Oluşan Morfolojilerinin Mikroskop Görüntüleri.

Kontrol (sadece serumsuz besiyerinde bulunan MDA-MB-231 hücreleri), PDGF-BB (trombosit türevi büyüme faktörü BB ile uyarılan MDA-MB-231 hücreleri), PF (PF3758309 PAK4 inhibitörü ile muamele edilen MDA-MB-231 hücreleri), PDGF-BB+PF (PDGF-BB faktörü ve PF3758309 ajanı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücreleri).

4.1.3. PDGF-BB ve PF3758309 Muamelesinin MDA-MB-231 Hücre Proliferasyonuna Etkisi

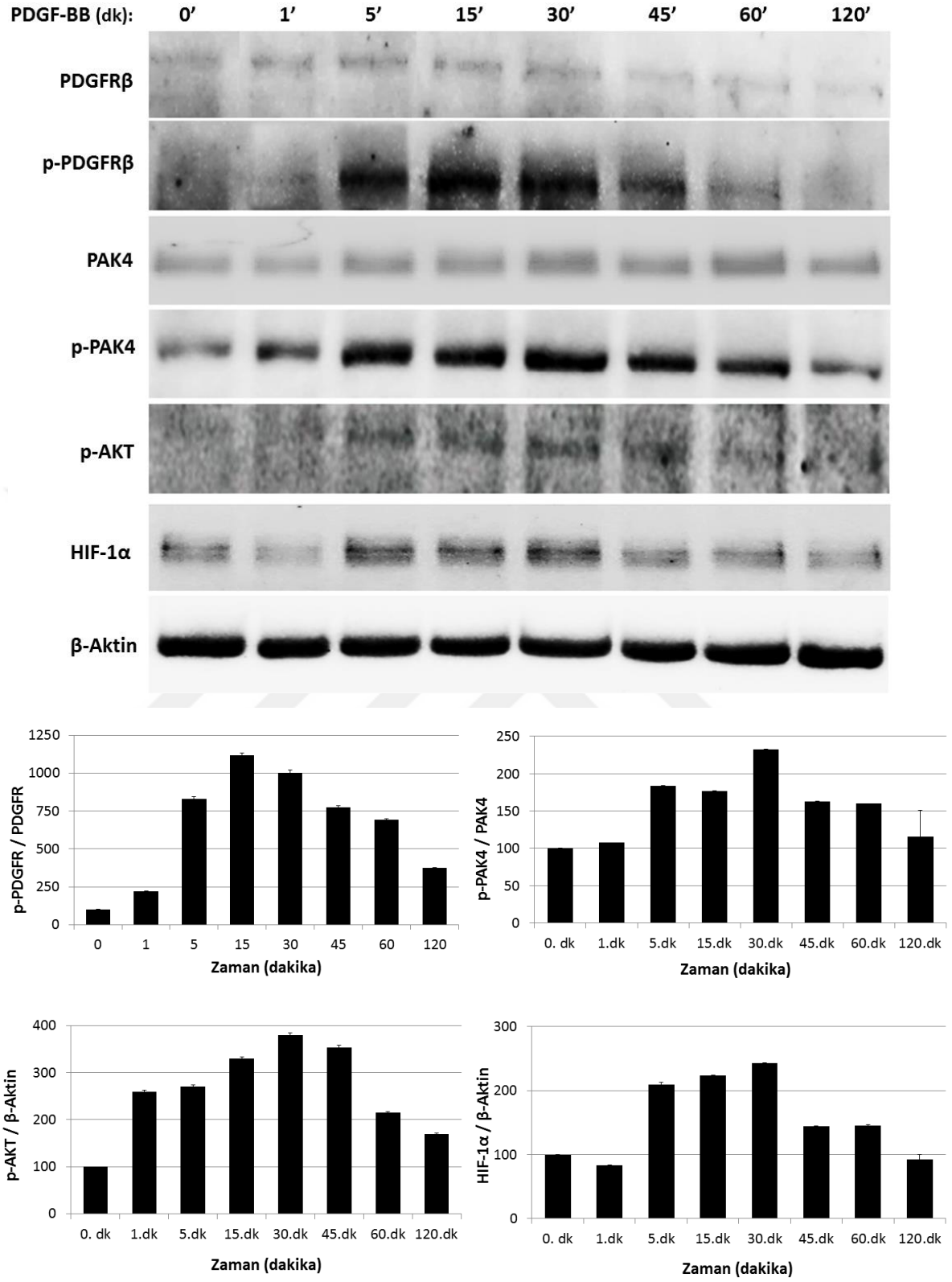
Bu çalışmamızda 20ng/mL PDGF-BB faktörü ve 1 μ M PF3758309 (PF) ajanı ile muamele edilen MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyon oranları *in vitro* şartlarda MTT deneyi ile belirlendi. Bunun için, kontrol, PDGF-BB, PF ve PDGF-BB+PF uyguladığımız hücre popülasyonlarının 48 saatlik proliferasyon hızları belirlendi (Şekil 4.3.). PDGF-BB ile uyarım gerçekleştirdiğimiz hücrelerde kontrole kıyasla proliferasyon kabiliyetinin 1,6-kat anlamlı olarak arttığı belirlendi. Bunun aksine PF uygulanarak PAK4 aktivasyonun inhibe edildiği hücrelerde, proliferasyon miktarı kontrole kıyasla çok fazla değişmemiş olduğu görüldü. Her iki ajanın uygulandığı hücrelerde ise kontrolün üzerinde beklenen bir proliferasyon hızı olmadığı saptandı.



Şekil 4.3. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinin 48. Saatlik Proliferasyon Oranları.

4.1.4. MDA-MB-231 Hücrelerinde PDGF-BB Uyarımına Bağlı Olarak PDGFR β , PAK4 ve AKT Aktivasyon Seviyeleri ile HIF1 α Protein Miktarının Belirlenmesi

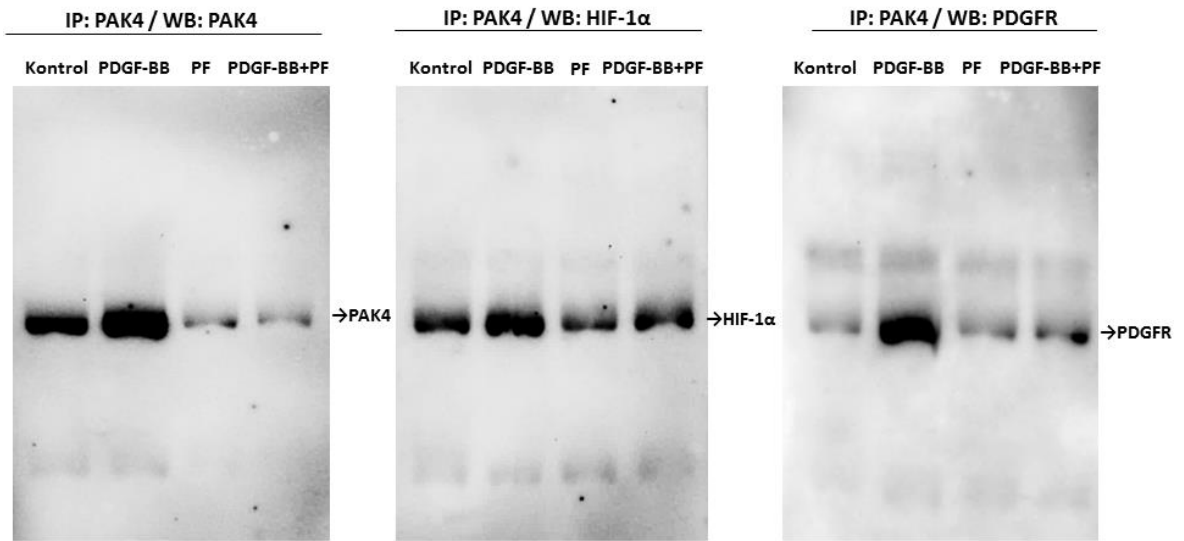
MDA-MB-231 hücrelerine 20 ng/mL insan trombosit türevi büyüme faktörü-BB (PDGF-BB) ile 0, 1, 5, 15, 30, 45, 60, 120 dakika süre boyunca stimüle edilerek PDGF-BB muamelesi gerçekleştirildi. Deney sonucunda göre, PDGF-BB stimülasyondan 15. dakika sonra PDGFR β fosforilasyonunun en yüksek düzeye ulaştığı belirlendi (11,2-kat). Bunun devamında, hücrelerde PAK4 fosforilasyon düzeyi ise 30. dakikada 2,3-kat artarak maksimum düzeye ulaştığı belirlendi. Aynı zamanda, AKT fosforilasyon düzeyi de 30. dakikada kontrole kıyasla en fazla olarak 3,8-kat artmış olduğu saptandı. Ayrıca, HIF1 α protein seviyesi de PDGF-BB uyarımının 30. dakikasında 2,43-kat arttığı, sonrasında ise azaldığı belirlendi. Bulgularımız neticesinde, MDA-MB-231 hücrelerinde PDGF-BB muamelesi ile birlikte beklendiği gibi PDGFR β reseptör aktivasyonunun sağlandığı belirlendi. PDGFR β aktivasyonuna bağlı olarak AKT ve PAK4 aktivasyonları meydana gelmiştir. Ayrıca PDGF-BB uyarımının 5. dakikasından itibaren p-PDGFR β ve p-PAK4 seviyelerinin arttığı, buna paralel olarak da HIF1 α protein seviyesinin kontrole kıyasla artmaya başladığı ve 30. dakikada maksimum seviyeye ulaştığı belirlendi (Şekil 4.4). Bu bulgular ışığında, PDGF-BB-aracılı PDGFR β aktivasyonu neticesinde PAK4 aktivasyonunun ve ayrıca HIF1 α stabilizasyonunun sağlanabildiği söylenebilir.



Şekil 4.4. MDA-MB-231 Hücrelerinde PDGF-BB Uyarımına Bağlı Olarak PDGFRβ, PAK4 ve AKT Fosforilasyon Durumlarının ve HIF1α İfadesinin Zamana Bağlı Değişimi.

4.1.5. PAK4-PDGFR β ve PAK4-HIF1 α Arasındaki Fiziksel İnteraksiyonun İmmünpresipitasyon Deneyi ile Gösterilmesi

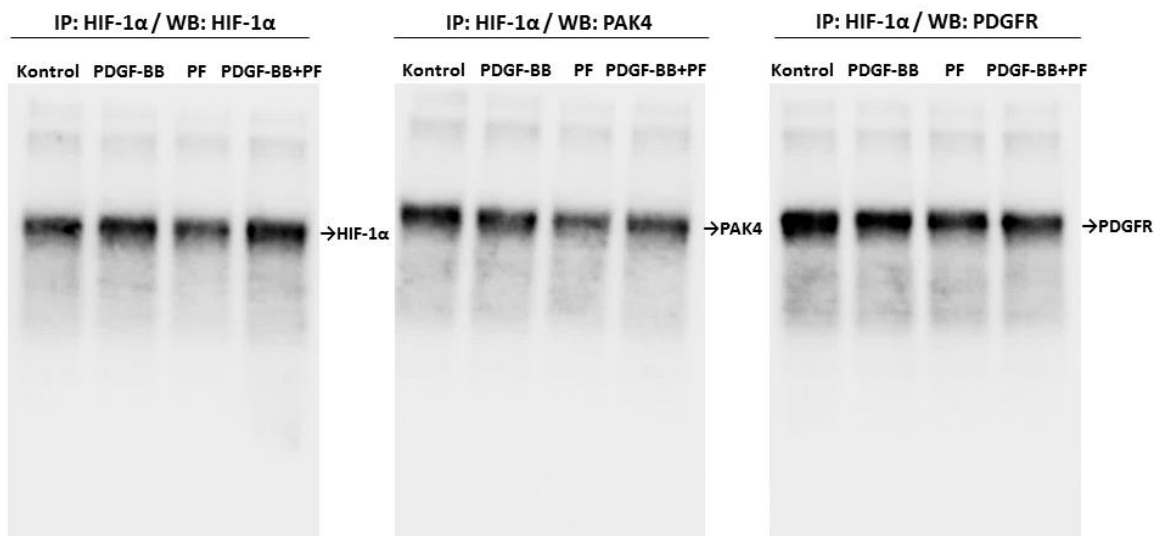
PDGF-BB aracılı PAK4 ve HIF1 α protein aktivasyon kinetiğine göre PAK4'ün HIF1 α ile en iyi bağlanabileceği zamanın optimizasyon çalışması sonucunda 30. dakikanın en uygun süre olduğu tespit edildi. Buna göre, immünopresipitasyon (IP) deneyi planlandı. Hücrelerin muamelesi sonucunda gerekli hücre lizatları elde edildi. Şekil 4.5.'de anti-PAK4 monoklonal antikor ile presipitasyon sonucunda Western blot ile PAK4, HIF1 α ve PDGFR β protein düzeyleri gösterildi. İlk olarak PAK4-PAK4 bağlanmasının kontrol örneğine kıyasla PDGF-BB muamelesi yapılan örnekte bağlanma anlamlı derecede artmıştır. Bunun aksine PF ile PAK4 inhibisyonu gerçekleştirilen örneklerdeki PAK4-PAK4 bağlanma oranı beklenen şekilde zayıflamıştır. Yine aynı şekil üzerinde ikinci olarak PAK4-HIF1 α bağlanma derecesi gösterildi. Burada kontrolde gözlenen bağlanmanın PDGF-BB muamelesiyle daha da arttığı saptandı. PF ile PAK4 inhibisyonu gerçekleştirilen örneklerdeki PAK4-HIF1 α bağlanma oranı anlamlı şekilde düşmüş olup hem PDGF-BB hem PF muamelesi yapılan örneklerdeki PAK4-HIF1 α bağlanması ise PDGF-BB varlığı dolayısıyla sadece PF uygulanan örneğe göre artış göstermiştir. Ayrıca, hücrelerimizde PAK4-PDGFR β interaksiyonu da gösterildi. Burada PDGF-BB uygulanan örnekte kontrole kıyasla güçlü bir PAK4-PDGFR β bağlanmasının olduğu belirlendi. PAK4 inhibisyonu sağlanan örnekte ise kontrole yakın düzeyde bağlanma gerçekleştirildiğini, her iki ajanın uygulandığı örnekte ise PDGF-BB kaynaklı hafif bir interaksiyon artışı olduğu saptandı.



Şekil 4.5. İmmünpresipitasyon Deneyi ile PAK4'ün HIF1 α ve PDGFR β 'ya Fiziksel Olarak Bağlanmasının Gösterilmesi.

4.1.6. HIF1 α -PDGFR β ve HIF1 α -PAK4 Arasındaki Fiziksel İnteraksiyonun İmmünpresipitasyon Deneyi ile Gösterilmesi

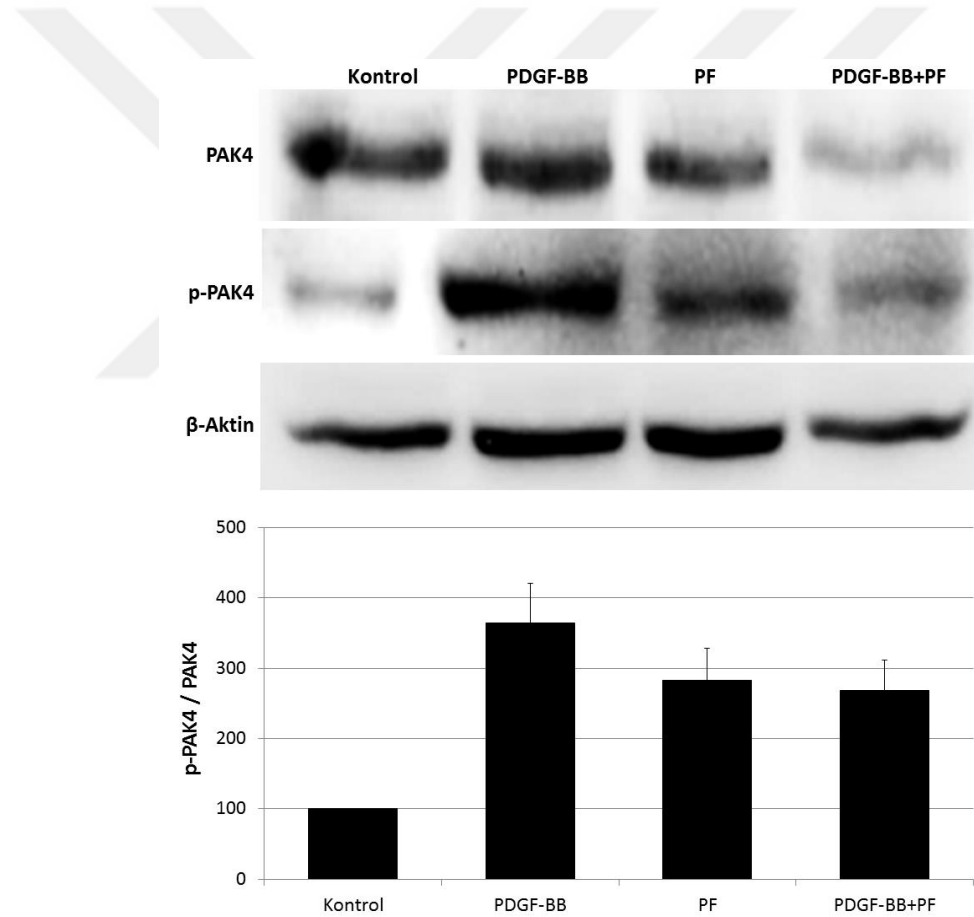
PAK4-HIF1 α interaksiyonunu doğrulamak için anti-HIF1 α antikorları ile immünpresipitasyon deneyi sonucunda HIF1 α -PAK4 interaksiyonu gösterildi. Bu deneyde, kontrol, PDGF-BB, PF ve PDGF-BB+PF ile muamele edilen hücrelerin lizatları kullanıldı. Şekil 4.6.'da görüldüğü üzere; anti-HIF1 α antikoru ile immünpresipitasyon çalışması sonrasında Western blot ile HIF1 α , PAK4 ve PDGFR β seviyeleri incelendi. İlk olarak HIF1 α -HIF1 α fiziki bağlanmasının kontrol örneğine göre PDGF-BB muamelesi yapılan örnekte bağlanma anlamlı şekilde artmıştır. Bunun aksine PF ile PAK4 inhibisyonu gerçekleştirilen örneklerdeki HIF1 α -HIF1 α bağlanma oranı zayıflamış olup her iki ajanın birlikte muamelesi yapılan hücrelerde PDGF-BB kaynaklı olduğu öngörülen bir artış söz konusudur. Yine aynı şekil üzerinde ikinci olarak HIF1 α -PAK4 bağlanması gösterilmiştir. Burada PDGF-BB muamelesiyle kontrolde gözlenen bağlanmaya paralel olarak bir artış olduğu gösterilmiştir. PF ile PAK4 inhibisyonu gerçekleştirilen örneklerdeki HIF1 α -PAK4 fiziki bağlanma oranı anlamlı şekilde düşmüş olup hem PDGF-BB hem PF muamelesi yapılan örneklerdeki HIF1 α -PAK4 bağlanması ise PDGF-BB varlığı dolayısıyla sadece PF uygulanan örneğin bağlanma oranına kıyasla hafif bir artış olduğunu gösterdik. Aynı şekil üzerinde üçüncü olarak HIF1 α -PDGFR β bağlanması gösterilmiştir. Burada PDGF-BB uygulanan örnekte kontrolle hemen hemen aynı oranda bir PDGFR β bağlanmasının olduğunu göstermiş olup PF uygulanan ve her iki ajanın uygulandığı örneklerde ise fiziki bağlanmanın kısmi şekilde azaldığı saptandı.



Şekil 4.6. İmmünpresipitasyon Deneyi ile HIF-1 α 'nın PAK4 ve PDGFR β 'ya Fiziksel Olarak Bağlanmasının Gösterilmesi.

4.1.7. MDA-MB-231 Hücrelerinin PDGF-BB ve PF3758309 ile Muamelesinin PAK4 Fosforilasyonu Üzerindeki Etkisi

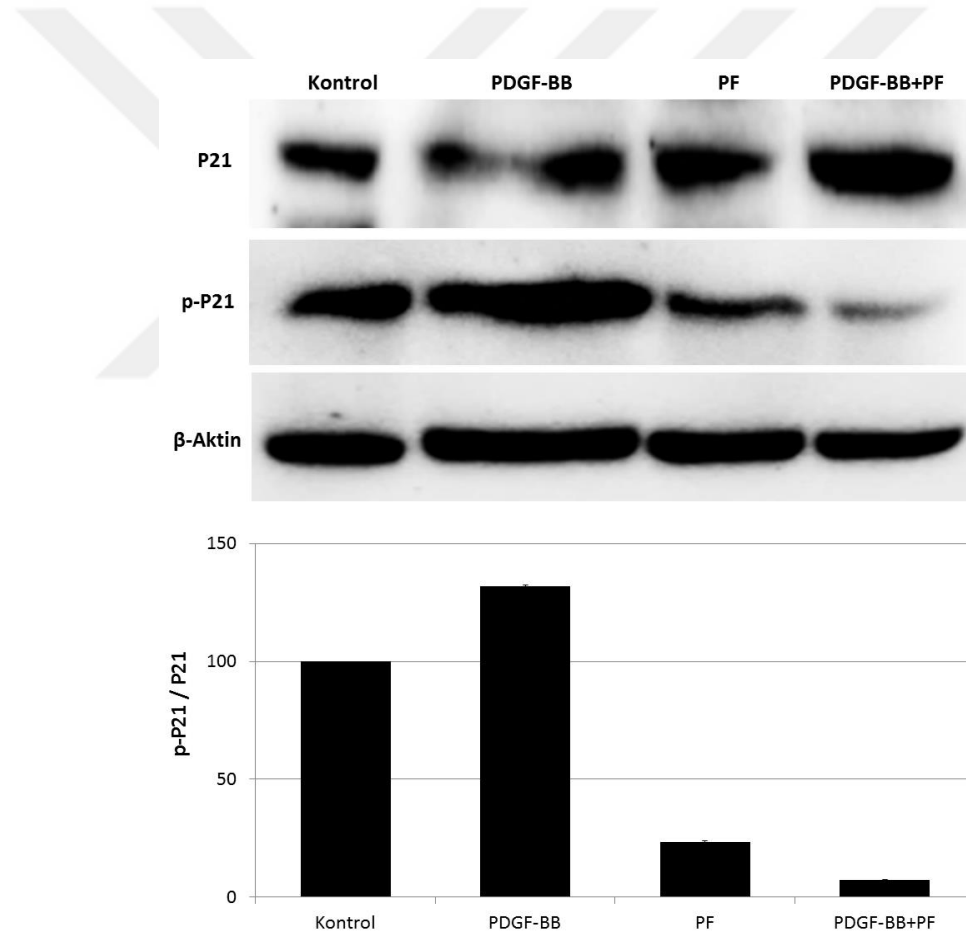
PDGF-BB muamelesinin hücrelerimizde PDGFR β aktivasyonunu sağladığı gösterildi. Bu çalışmada, reseptör aktivasyonuna bağlı olarak 48 saat boyunca muamele edilen hücrelerde, fosfo-PAK4 (p-PAK4) seviyesi ve aynı zamanda PAK4 inhibitörü olan PF ajanı varlığında bu seviyenin değişimi incelendi. Şekil 4.7.de, PDGF-BB ile muamele edilen hücrelerde endojen PAK4 ifadesi kontrole kıyasla anlamlı olarak değişmemiş fakat p-PAK4 ifadesi 3,63-kat artmış olduğu saptandı Kontrol, PF ve PDGF-BB+PF örneklerinde ise yalnızca PDGF-BB uygulanan örneğe nispeten düşük düzeyde protein ifadesi saptandı.



Şekil 4.7. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinde PAK4 ve p-PAK4 İfade Düzeylerinin Western blot ile Gösterilmesi.

4.1.8. MDA-MB-231 Hücrelerinde PAK4'ün PDGFR β -aracılı Aktivasyonu ve PF3758309-aracılı İnhibisyonunun P21 Fosforilasyon Düzeyine Etkisi

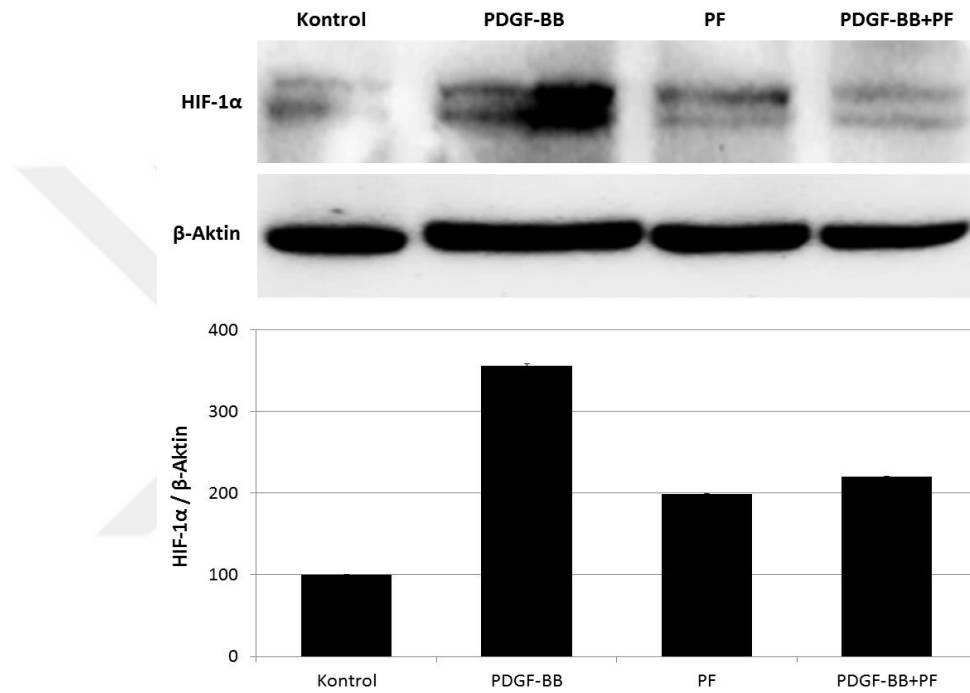
PAK4, P21 ile beraber aktive olduğundan dolayı P21 fosforilasyon düzeylerinin belirlenmesi fonksiyonel açıdan önemlidir. Bunun için; 48 saat boyunca PDGF-BB, PF ve PDGF-BB+PF ile muamele edilmiş hücrelerden hazırlanan lizatlar kullanılarak Western blot yöntemi ile P21 ve p-P21 protein ifadeleri incelendi. Şekil 4.8.de P21 protein ifade düzeyleri tüm örneklerde benzer düzeyde iken P21'in fosforilasyon düzeylerinin PDGF-BB muamelesine bağlı olarak arttığı ve PF inhibitörü varlığında azaldığı saptanmıştır. PF ile PAK4 inhibisyonu gerçekleştirdiğimiz örneklerde fosforilasyon düzeylerinde kontrole kıyasla 5-kat, her iki ajanında eklendiği örneklerde ise 14-kat azaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.8. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinde p21 ve p-p21 İfade Düzeylerinin Western blot ile Gösterilmesi.

4.1.9. MDA-MB-231 Hücrelerinde PAK4'ün PDGFR β -aracılı Aktivasyonu ve PF3758309-aracılı İnhibisyonunun HIF-1 α Protein Düzeyine Etkisi

Çalışmamızda hedef protein HIF1 α 'nın normoksik koşullardaki ifade düzeyi incelendi. Bu amaçla, 48 saat boyunca PDGF-BB, PF ve PDGF-BB+PF ile muamele edilen hücrelerin Western blot ile HIF1 α protein seviyesi belirlendi. Şekil 4.9.'da kontrol örneğine kıyasla PDGF-BB uygulanan örneklerdeki protein ifade düzeyleri 3,56-kat artmış olduğu belirlendi.

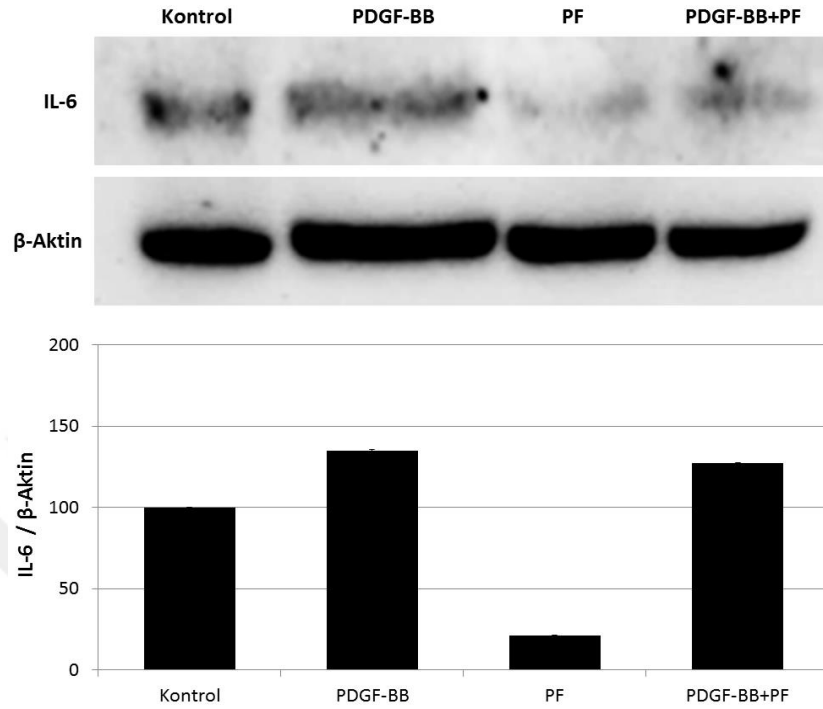


Şekil 4.9. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinde HIF1 α İfade Düzeylerinin Western blot ile Gösterilmesi.

4.1.10. MDA-MB-231 hücrelerinde PAK4'ün PDGFR β -aracılı Aktivasyonu ve PF3758309-aracılı İnhibisyonunun IL-6, IL-8 ve TGF- β Üretim Düzeyleri Üzerindeki Etkisi

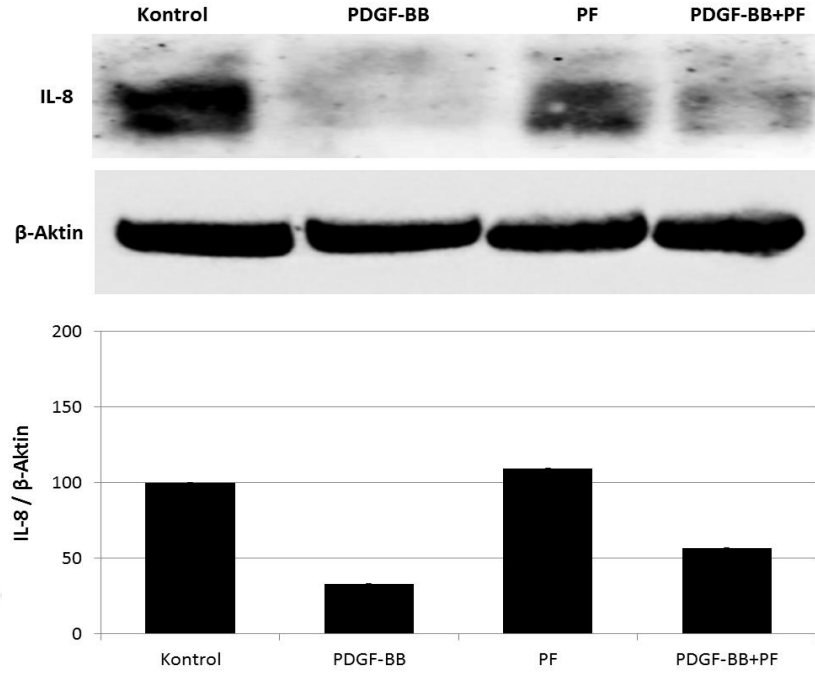
Çalışmamızda PAK4 aktivasyonunun IL-6, IL-8 ve TGF- β gibi immünolojik belirteçlerin olası üretim düzeylerinin değişimi incelendi. Bunun için, 48 saat boyunca PDGF-BB, PF ve PDGF-BB+PF ile hücreler muamele edildi. Şekil 4.10.'da gösterildiği üzere PDGF-BB uyarımı hücrelerimizde IL-6 üretimini anlamlı düzeyde artırmadı. Ancak, PF uygulanan hücrelerde kontrole kıyasla 5-kat anlamlı bir şekilde azalma

saptandı. Dolayısıyla, MDA-MB-231 hücrelerinde PAK4 inhibisyonunun önemli bir pro-inflamatuar sitokin olan IL-6'nın üretimini baskıladığı sonucuna varılabilir.



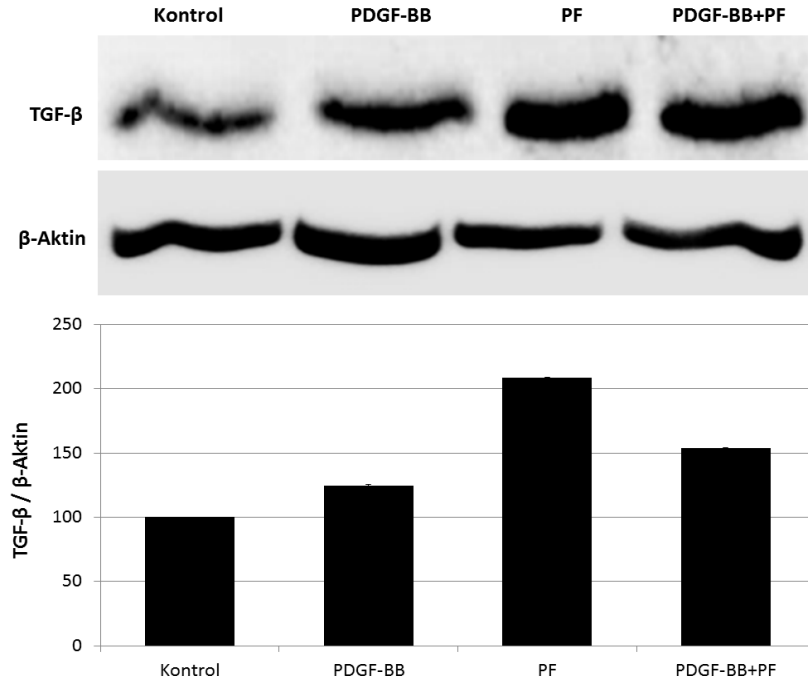
Şekil 4.10. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinde IL-6 İfade Düzeylerinin Western blot ile Gösterilmesi.

Şekil 4.11'da muamele edilen hücrelerin IL-8 ifade düzeyi gösterilmiştir. Sonuçlarımıza göre, PDGF-BB uygulamasının IL-8 üretimini kontrole göre 3-kat baskıladığı saptandı. PF ajanı ile PAK4 enzimi inhibe edilen hücrelerde ise IL-8 seviyesinin kontrol seviyesine benzer bir düzeyde olduğu ve PDGF-BB+PF ile muamele edilen hücrelerde IL-8 ifadesini baskılayan PDGF-BB etkisinin azaldığı saptandı.



Şekil 4.11. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinde IL-8 İfade Düzeylerinin Western blot ile Gösterilmesi.

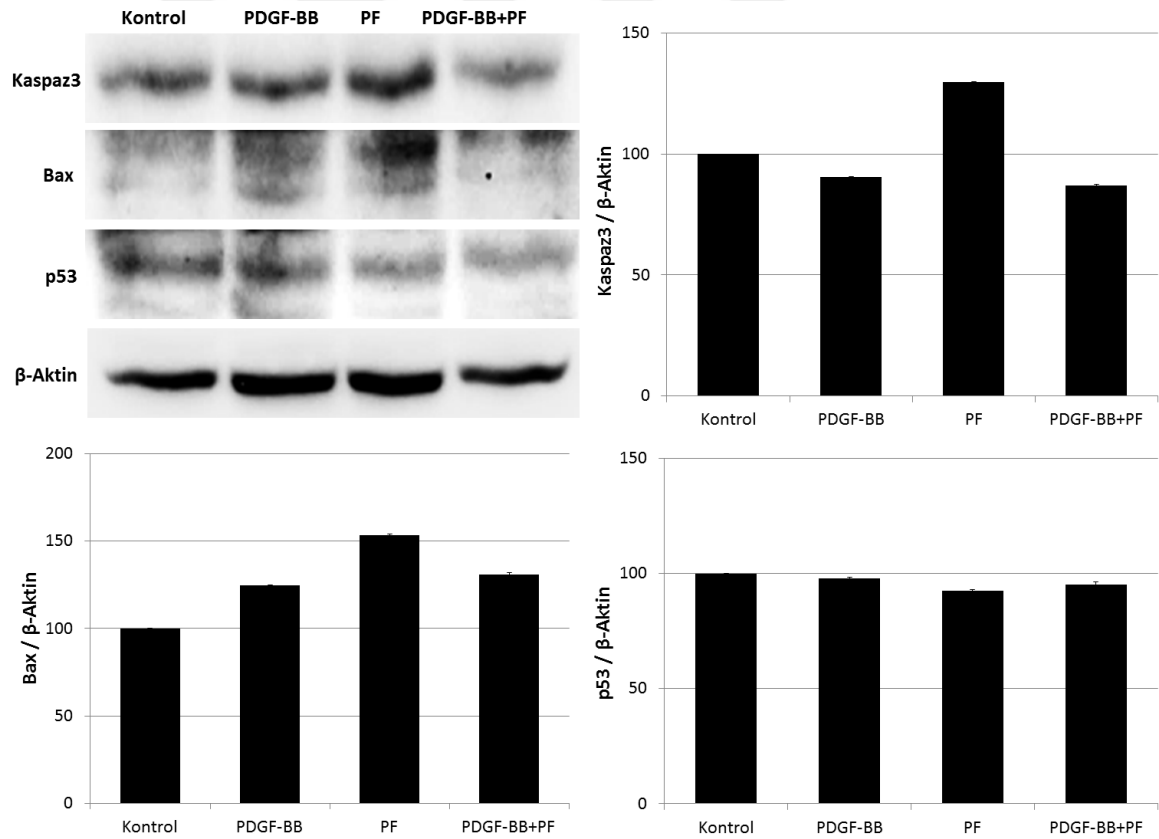
Şekil 4.12.'de söz konusu hücrelerimizin TGF- β protein ifade düzeyi gösterilmiştir. Sonuçlarımıza göre, PF inhibitör ajanının varlığında hücrelerin TGF- β üretimi yaklaşık 2-kat arttı. Buna bağlı olarak PAK4 inhibisyonunun MDA-MB-231 agresif meme kanseri hücrelerinde TGF- β üretimini desteklediği söylenilebilir.



Şekil 4.12. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinde TGF- β İfade Düzeylerinin Western blot ile Gösterilmesi.

4.1.11. MDA-MB-231 hücrelerinde PAK4'ün PDGFR β -aracılı Aktivasyonu ve PF3758309-aracılı İnhibisyonunun Apoptotik Belirteçler Olan Kaspaz3, Bax ve p53 Üzerindeki Etkileri

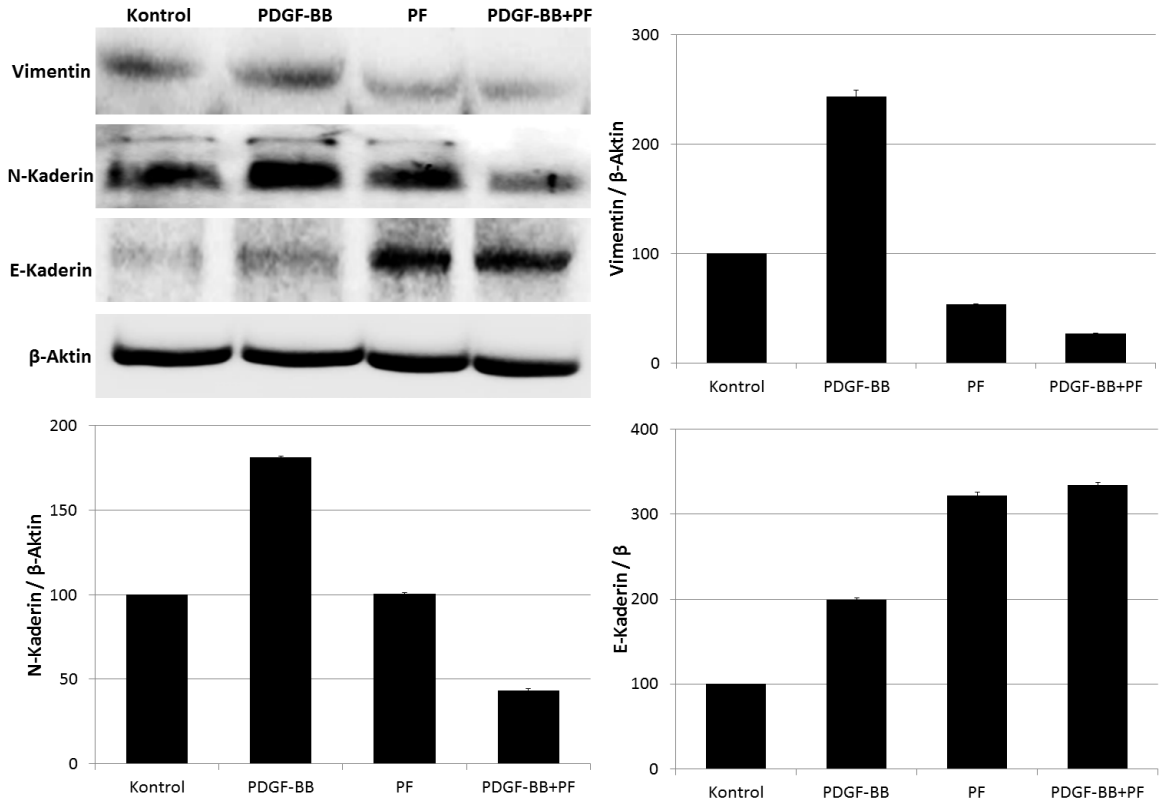
Çalışmamızda PAK4 aktivasyonu ve inhibisyonuna bağlı olarak hücrelerde pro-apoptotik özellikleri olan aktif Kaspaz3, Bax ve p53 ifadelerindeki değişimler incelendi. PF ajanı ile PAK4 inhibisyonu gerçekleştirildiğinde aktif Kaspaz3 seviyesinin yaklaşık 1,3-kat arttığı belirlendi. Benzer şekilde Bax ifadesi de bu hücrelerde 1,56-kat arttı. p53 ifade düzeyi ise anlamlı bir şekilde değişmedi. PDGF-BB uyarımı, PAK4 inhibisyonu varlığında bile hücrelerdeki apoptotik süreci baskılayabildiği saptandı (Şekil 4.13). Bu sonuçlara göre, PAK4 inhibisyonunun apoptoza karşı dirençli olduğu bilinen MDA-MB-231 hücrelerinde apoptotik süreci p53-bağımsız bir şekilde tetikleyebileceği söylenebilir.



Şekil 4.13. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinde Kaspaz3, Bax, p53 İfade Düzeylerinin Western blot ile Gösterilmesi.

4.1.12. MDA-MB-231 hücrelerinde PAK4'ün PDGFR β -aracılı Aktivasyonu ve PF3758309-aracılı İnhibisyonunun EMT Belirteçleri Üzerindeki Etkisi

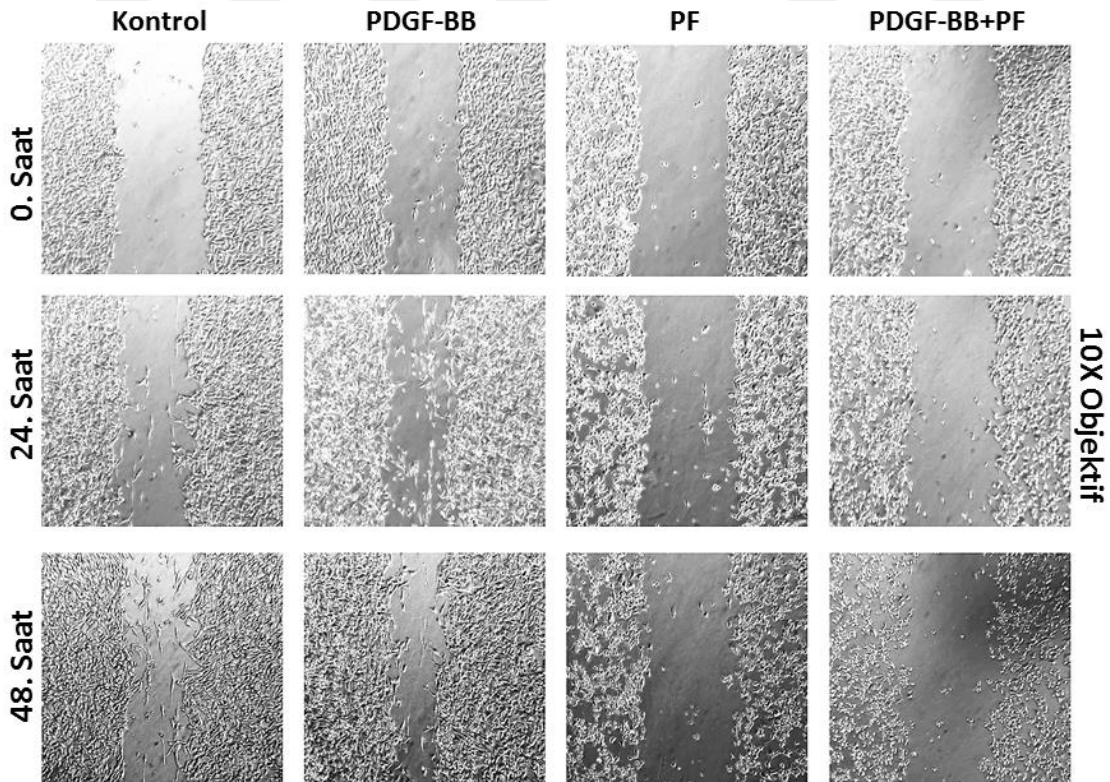
Çalışmamızda MDA-MB-231 hücrelerinde PAK4 aktivasyon ve inhibisyon durumlarının kanser metastazını tetikleyen epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) mekanizmasına etkileri incelendi. EMT sürecinde epitelyal belirteç olan E-Kaderin baskılanırken, mezenkimal belirteçler olan N-Kaderin ve Vimentin ifadeleri artmaktadır. Buna göre, PDGF-BB stimülasyonu MDA-MB-231 hücrelerinde E-Kaderin ifadesini 2,2-kat, Vimentin ifadesini 2,43-kat, N-Kaderin ifadesini 1,81-kat artırdı. PF-aracılı PAK4 inhibisyonu da E-Kaderin ifadesini 2,91-kat artırırken, Vimentin seviyesini 2-kat azaltmış, N-Kaderin seviyesi üzerinde ise anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. PDGF-BB uyarımına rağmen PAK4 inhibisyonu hücrelerde E-Kaderin düzeyini 2,96-kat artırdığını, ayrıca N-Kaderin düzeyini yaklaşık 2,5-kat ve Vimentin düzeyini yaklaşık 4-kat baskıladığı belirlendi (Şekil 4.14). Bu sonuçlara göre, PDGFRB yolağının aktivasyonu varlığında dahi PAK4 fonksiyonu inhibe edildiğinde, kanser hücrelerinde EMT sürecinin durdurabileceği ve hücrelerin metastatik kabiliyetlerinin azaltılabileceği ifade edilebilir.



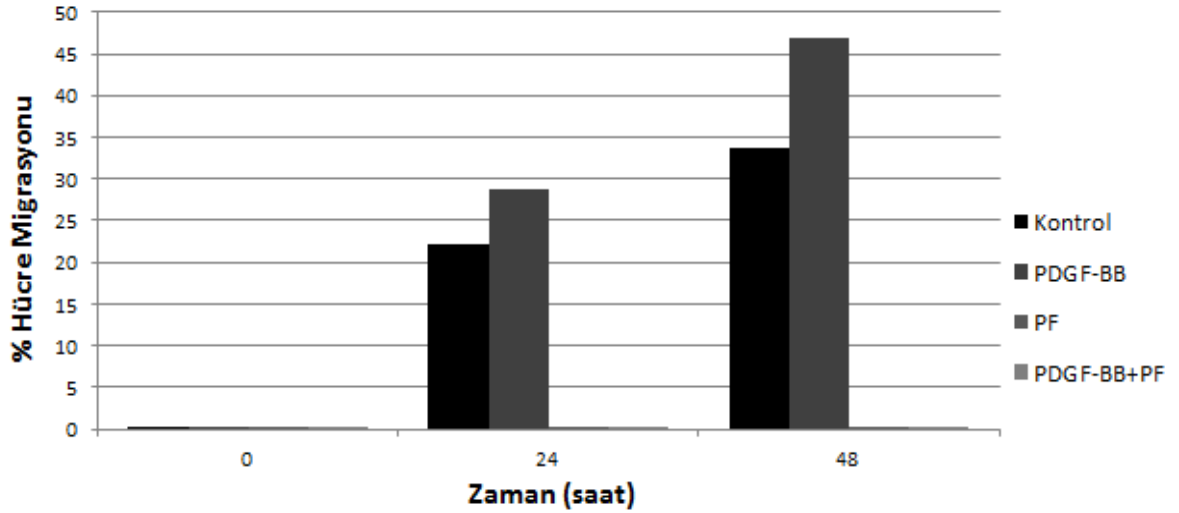
Şekil 4.14. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinde Vimentin, N-Kaderin ve E-Kaderin İfade Düzeylerinin Western blot ile Gösterilmesi.

4.1.13. MDA-MB-231 hücrelerinde PAK4'ün PDGFR β -aracılı Aktivasyonu ve PF3758309-aracılı İnhibisyonunun Hücre Migrasyon Kabiliyeti Üzerindeki Etkisi

PAK4 aktivasyon ve inhibisyon durumuna göre MDA-MB-231 hücrelerinin göç etme kabiliyetleri yara iyileşmesi (wound healing) deneyi ile belirlendi. Bu deneyde, yaklaşık %90 konfluent hücrelerin bulunduğu ortamda orta hattın çizilerek bir yara alanı oluşturuldu. Daha sonra hücreler, %1 1XDPBS (kontrol), 20ng/mL PDGF-BB, 1 μ M PF3758309 ve PDGF-BB+PF3758309 içeren %1 FBS'li ortamda 48 saat boyunca kültüre edildi. Yara alanının kapanması mikroskopik olarak takip edilerek 24 ve 48. saatteki kültürlerin fotoğrafları alındı. Sonuçlarımıza göre %1 1XDPBS ile muamele edilen kontrol hücreleri 24. saatte %22, 48. saatte ise %33,6 oranında kapanma gösterirken PDGF-BB uyarımı gerçekleştirdiğimiz MDA-MB-231 hücreleri 24. saatte %29, 48. saatte ise %47 oranında yara alanını kapattı. PF muamelesi yapılan kültürlerde yara alanının anlamlı bir şekilde kapanmadığı saptandı (Şekil 4.15). Bu sonuçlar, PDGF-BB uyarımının MDA-MB-231 hücrelerinin *in vitro* hücre göçü kabiliyetlerini desteklediğini göstermektedir. İlave olarak, PAK4 inhibisyonu sağlandığında ise hücrelerin göç etme kabiliyetleri baskılanmaktadır.



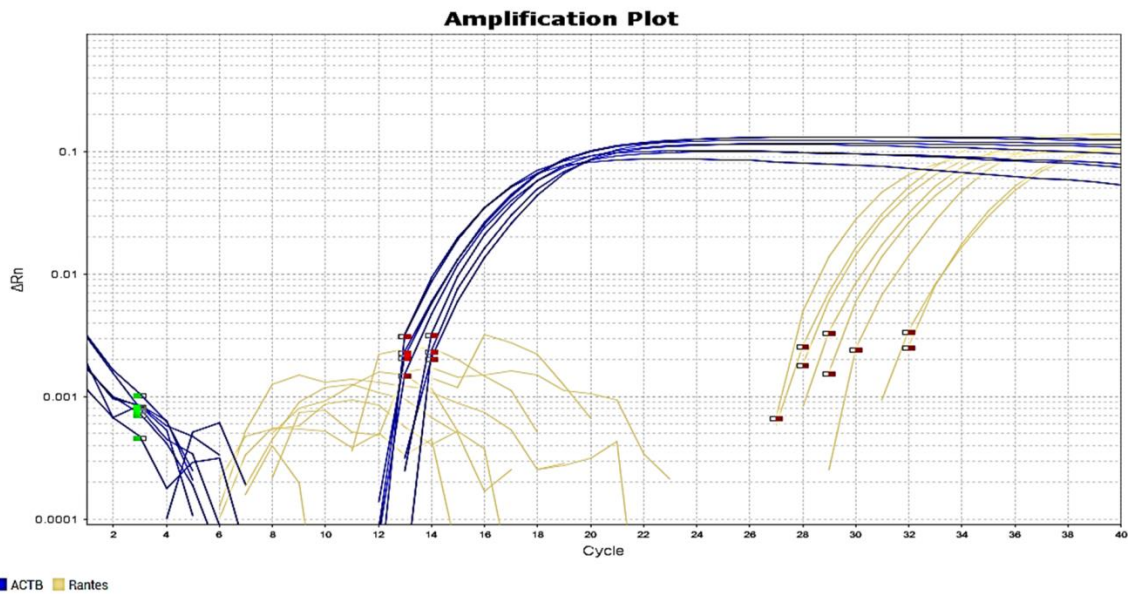
Şekil 4.15. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinin Migrasyon Görüntüleri.



Şekil 4.16. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinin Migrasyon Oranlarının Gösterilmesi.

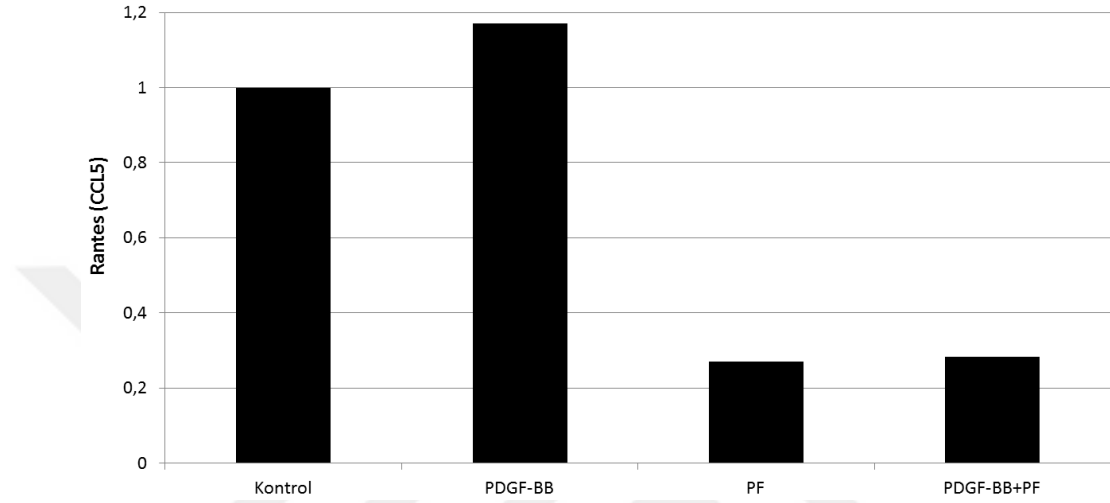
4.1.14. MDA-MB-231 hücrelerinde PAK4'ün PDGFR β -aracılı Aktivasyonu ve PF3758309-aracılı İnhibisyonunun Rantes (CCL5) mRNA İfadesi Üzerindeki Etkisi

PDGF-BB, PF3758309 (PF) ve PDGF-BB+PF ile 48 saat boyunca muamele edilen hücrelere ait RNA örnekleri kullanılarak cDNA eldesi gerçekleştirildi. Kontrol olarak hücreleri %1 1XDPBS içeren besi yerinde kültüre edildi. Elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak HIF1 α hedefi olarak öngördüğümüz Rantes (CCL5) geninin ifade düzeyi qRT-PCR yöntemi ile belirlendi. Tasarladığımız primerler ile reaksiyon sonunda QuantStudio3 cihazında Rantes ve beta-Aktin mRNA düzeylerine ait amplifikasyon eğrileri elde edildi (Şekil 4.16).

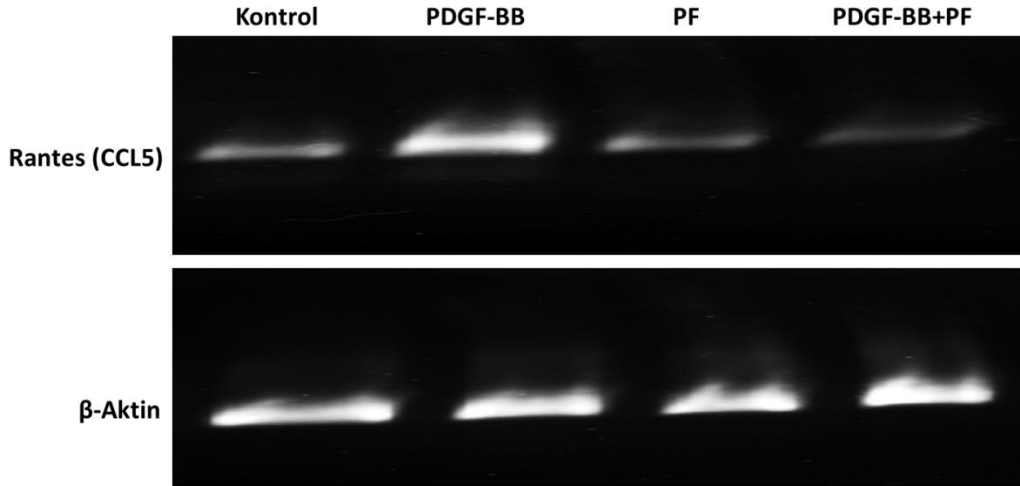


Şekil 4.17. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerinin Rantes ve beta-Aktin (ACTB) mRNA Dizilerine Ait Amplifikasyon Eğrileri.

Bu veriler ile her örneğe ait $2\Delta\Delta C_t$ değerleri hesaplanarak göreceli gen ifade değişimleri belirlendi. Sonuçlarımıza göre, PDGF-BB ile stimüle edilen hücrelerde Rantes (CCL5) ifadesi 1,17 kat arttı. PF ajanı ile PAK4 inhibisyonu sağlandığında ise Rantes gen ifadesi mRNA düzeyinde yaklaşık 4-kat baskılandı (Şekil 4.17, 4.18).



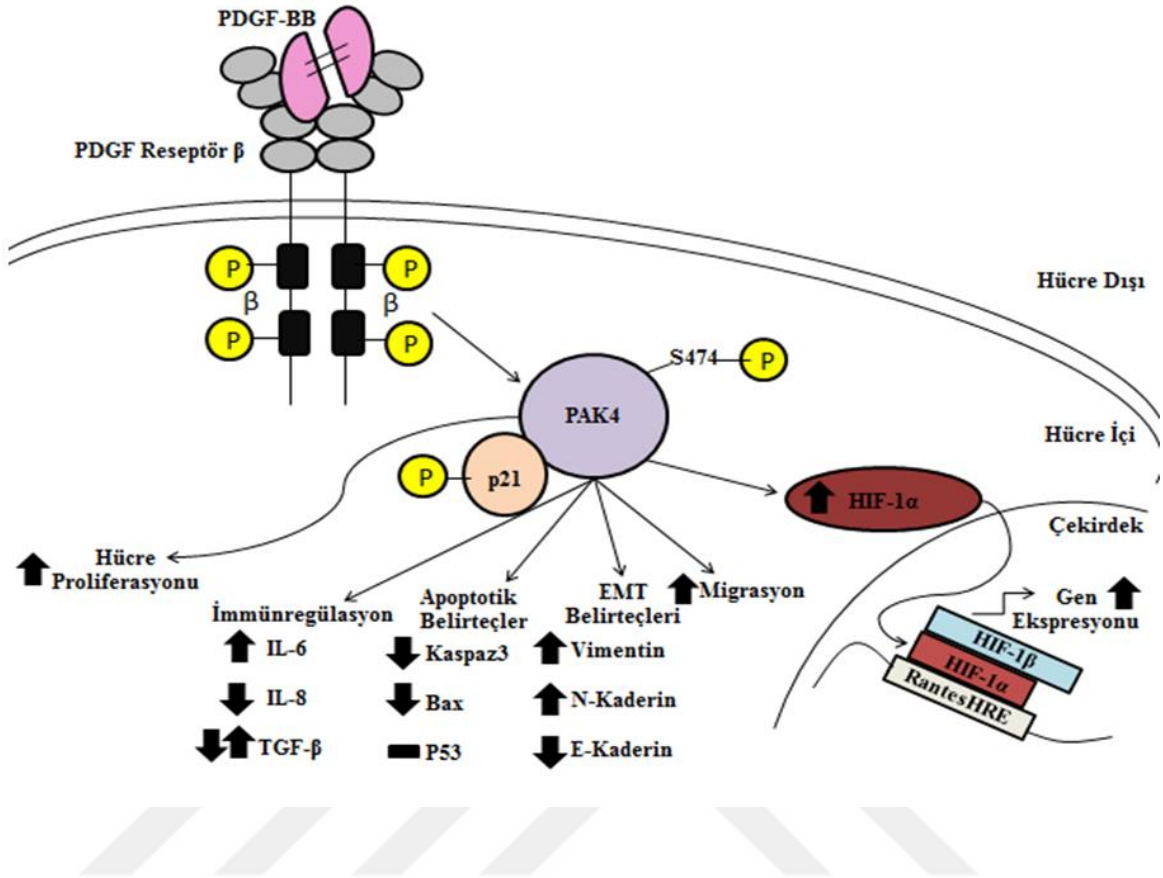
Şekil 4.18. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerine Ait Rantes (CCL5) mRNA İfade Düzeylerinin Göreceli Kat Değişimleri.



Şekil 4.19. PDGF-BB ile Uyarılan ve PF3758309 ile Muamele Edilen MDA-MB-231 Hücrelerine Ait Rantes ve beta-Aktin (ACTB) cDNA Amplifikasyon Düzeyleri (%2 Agaroz Jel).

Rantes, literatürde inflamatuvar ve immünregülatör etkileri olan önemli bir kemokindir. Bu bağlamda elde ettiğimiz bulgulara göre, PAK4 inhibisyonunun meme tümörü mikroçevresinde immünregülatör etkileri olabileceğini öne sürmekteyiz.

Araştırma Sonuçlarının Özeti;



4.2. Tartışma

Kanser, dünyada meydana gelen insan ölümlerinin ikinci önde gelen nedenidir (Bray ve ark., 2018). 2020 kanser istatistiklerine göre, dünyada 1 yıl içinde 19,3 milyon yeni kanser vakası görülmektedir ve kansere bağlı 10 milyon civarında ölüm gerçekleşmektedir. Türkiye’de ise yılda 233 bin 834 kişi yeni kanser tanısı alırken, 126.335 kişi kanserden ölmektedir (Cancer, 2020). Meme kanseri ise T.C. Sağlık Bakanlığı verilerine göre kadınların %23,9’luk kısmında teşhis edilerek ilk sırada yerini almaktadır (Türkiye Kanser İstatistikleri, 2020). Kadınlarda en sık teşhis edilen kanser türü olan meme kanseri, erken evrelerinde tespit edildiğinde tedavi edilebilmektedir fakat diğer organlara metastaz yapması durumunda bu kanserler artık malign (kötü huylu) olarak kabul edilir. Metastatik kanserler de daha çok ölümle sonuçlandığından dolayı tedavi açısından günümüzde bir çok araştırmacı bu konu üzerine yoğunlaşmıştır (Albogami, 2022).

p21 ile aktive olan kinazlar (PAK’lar) serin/treonin kinaz sınıfına ait enzimlerdir. Çok sayıda literatür çalışması, PAK’ların çeşitli dokularda eksprese edildiğini ve PAK aracılı sinyalleşmedeki anormalliklerin hücrel homeostazı bozduğunu kanıtlamıştır.

Bu bozukluklar neticesinde nörolojik sıkıntılar, kalp rahatsızlığı ve kanser gibi insan hastalıkları meydana gelmektedir. PAK ailesinin ikinci grubunda yer alan PAK4, çeşitli insan kanser hücre dizilerinde aşırı eksprese edilir. Literatürde insan meme epitel hücreleri ile karşılaştırıldığında meme kanseri hücre hatlarında PAK4 aşırı ekspresyonunun olduğu kanıtlanmıştır (Costa ve ark., 2019). Yüksek PAK4 sinyali, kanserin neredeyse tüm özellikleriyle önemli ölçüde bağlantılıdır. Yapılan araştırmalar PAK4'ün hücre büyümesi, proliferasyonu, EMT, metastaz, apoptotik hücre ölümünün baskılanması gibi onkojenik süreçte meydana gelen olaylarda önemli bir rol oynadığını kanıtlamıştır (Costa ve Strömblad, 2021).

PAK4 bir takım büyüme faktörleri ile aktive edilebilirken çeşitli inhibitörler ile de ifadesi baskılanabilir. Literatürde PDGF'in PAK'ı aktive ettiği kanıtlanmıştır (Li ve ark., 2000). Hücre proliferasyonu, farklılaşması, invazyonu ve tümör hücresi metastazı gibi migrasyonla ilişkili süreçlerin kontrolünde kilit roller oynayan PDGF, spesifik reseptörüne bağlandığında reseptörün dimerizasyonunu ve onun tirozin kinaz aktivitesini indükler. Aktive olan PDGF reseptörü (PDGFR) dolaylı olarak PAK4'ü aktive etmektedir. Meme kanseri hücre hatlarında yapılan başka bir çalışmada ise PAK4 ifadesinin baskılanması hücre proliferasyonunu ve göçünü azaltmıştır (Naija ve ark., 2021). Ayrıca, yakın tarihli bir çalışmada, Chandrashekar ve ark. invaziv mesane karsinomunda da PAK4 ifadesinin arttığını göstermişlerdir (Chandrashekar ve ark., 2020).

Hücre veya dokuların yeterince oksijen alamaması durumunda oluşan oksijen yetmezliği kısaca 'hipoksi' olarak adlandırılır. Hipoksi insan doku ve hücrelerine hasar vererek, kanser, diyabet, iskemi gibi birçok patolojik duruma zemin hazırlamaktadır. Hipoksi, önemli transkripsiyonel değişiklikleri indükleyen hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF) adındaki transkripsiyon faktörlerinin stabilizasyonu ile sonuçlanır. Literatürde, HIF transkripsiyon faktörlerinin stabilizasyonunun metastaz başta olmak üzere kanserin başlıca özelliklerini modüle eden genlerin ekspresyonlarını arttırdığı kanıtlanmıştır (Semenza, 2004). Tüm bunların yanı sıra normoksik koşullarda HIF'in alt birimi olan HIF1 α çok çabuk degrade olmaktadır. Bazı çalışmalar, PDGF büyüme faktörlerinin HIF1 α 'nın yarı ömrünü uzattığını ortaya koymuştur. Büyüme faktörleri bu işlemi hipoksiden bağımsız olarak protein translasyonu ile yapar. Bu HIF1 α stabilizasyonunun Ras/Raf/MAPK ve PI3K/Akt/mTOR gibi ortak bir hücresel kinaz yolu ile meydana geldiği çok önceden kanıtlanmıştır (Zhong, 2000). Literatürde, büyüme faktörünün spesifik reseptör tirozin kinaza bağlanarak fosfatidilinositol 3-kinaz

(PI3K) ve mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyal yollarını indüklediği ve bu sayede protein kinaz B (PKB) olarak da bilinen Akt'yi de aktive ettiği kanıtlanmıştır (Calapoğlu, 2016). MAPK sinyal yolağında bulunan büyüme faktörünün ise Ras sinyal yolağındaki aktivasyon silsilesini oluşturduğu bilinmektedir. Literatürde yalnızca bir çalışmanın, PAK4 aşırı ekspresyonunun hipoksik kanser hücrelerinde HIF-1 α protein seviyesi üzerinde stabilize edici bir etki gösterdiği bulunmuştur. Aynı çalışmada; PAK4'ün yıkılması, hipoksi kaynaklı HIF1 α birikimini azalttığı gösterilmiştir (Kim ve ark., 2017). Birçok insan kanserinde PAK aktivasyonunun kanser ilerlemesine aracılık ettiği bilinmesine rağmen, PAK proteinlerinin hipoksideki rolü tam olarak anlaşılamamıştır.

Yaptığımız çalışma kapsamında HIF1 α protein dizisini incelendiğinde HIF1 α 'nın normoksik koşullarda da PAK4 aracılığıyla stabilize olup aktivasyon gösterebileceği öngörüldü. Zira araştırmalarımız sonucunda HIF-1 α protein dizisinde PAK4 hedefi olabilecek diziler saptandı. Olası bu dizilerin PAK4 açısından fonksiyonel olup olmadıklarının kanıtlaması hedeflendi. Çalışmalara başlamadan önce hipotezimizi test edebileceğimiz uygun kanser hücre hatlarını belirlemek hedeflendi. Elimizdeki hücrelerde endojen PAK4 ekspresyon seviyesine bakıldığında metastatik olan MDA-MB-231 hücre hattında PAK4 ekspresyonunun literatürde belirtildiği üzere yüksek olduğu saptandı.

Çalışmamızda, yüksek düzeyde PAK4 ekspresyonu gösteren MDA-MB-231 (metastatik meme karsinomu hücre hattı) hücrelerini kullandık. Hücrelere bir yanda PDGF-BB uygulayarak PAK4 aktivasyonunu arttırdık, diğer bir yanda PF3758309 ajanını uygulayarak PAK4 ifadesini baskıladık. HIF1 α 'nın PAK4 bağımlı stabilizasyonunu göstermeyi hedeflediğimizden dolayı hem PAK4 hem de HIF1 α antikorlarını kullanarak saflaştırdığımız proteinlerle PAK4 ve HIF1 α 'nın birbiriyle yaptığı fiziki bağlanmayı açıkladık. PAK4 aktivasyonunu arttıran PDGF-BB ile muamele sonunda kontrole göre HIF1 α 'nın normoksik koşullarda stabilizasyonu ve aktivasyonunda artış, PAK4 aktivasyonunu baskılayan PAK4 inhibitörü PF3758309 muamelesinde ise HIF1 α stabilizasyonunda azalış olduğunu saptadık. Bu sonuçlarımız ile ilk kez normoksik koşullarda HIF1 α stabilizasyonu ve aktivasyonunun PDGF-BB indüklü PAK4 tarafından sağlandığını kanıtladık.

Literatürde de kanıtlandığı üzere fosforile PAK4, aktin polimerizasyonuna sebep olarak hücre morfolojisi, motilitesi ve transformasyonunun fizyolojik düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Callow ve ark., 2002). Çoğu kanser hücresi, genellikle hücre yüzeyi

yapışma moleküllerinin ekspresyonunun azalmasının bir sonucu olarak normal hücrelerden daha az yapışkan özellik gösterir. Dolayısıyla PAK4 ifadesinin; hücre morfolojisinin mezenkimale kaymasına ve hücrenin migrasyon kabiliyetini arttırmasına neden olduğunu düşünebiliriz. Yaptığımız hücre morfolojisi çalışmasında; PAK4 aktivasyonuna bağlı olarak hücrelerde sitoskeletal organizasyonda farklılıklar saptanmıştır. PDGF-BB ile PAK4 ekspresyonu sağladığımız hücrelerin podozom oluşturma sayıları ve uzunluklarında bir artışın olduğunu, PAK4'ü baskıladığımız hücrelerde ise podozom oluşturma oranının düştüğünü gözlemledik. Bu durumun; Vimentin, N-Kaderin ve E-Kaderin gibi hücre iskeleti ilişkili belirteçlerde meydana gelen ekspresyon düzeylerinin değişikliğinden kaynaklı olduğunu düşündük.

Literatürde de belirtildiği üzere; PAK4 hücre proliferasyonunu birçok mekanizma ile arttırmaktadır (Naïja ve ark., 2021). Bunlardan biri de AKT sinyal yolağıdır (He ve ark., 2017). Sonuçlarımızda PDGF-BB muamelesi yaparak PAK4 aktivasyonunu sağladığımız hücrelerde, gerçekten de hücre proliferasyonunun 1,6-kat arttığını gözlemledik fakat PAK4 inhibisyonu yaptığımız hücrelerde kontrole kıyasla proliferasyonun anlamlı olarak değişmediğini saptadık. Bu sonuç ile; hücre proliferasyonunun PAK4 bağımlı değilde daha çok PDGF-BB'in başka yollar üzerine etkisiyle proliferasyonu gerçekleştirdiğini kanıtlamaktayız.

PAK4 aktivasyonunu test ettiğimiz çalışma sonucumuz da literatürle uyumlu olarak PDGF-BB uygulamasının PAK4 fosforilasyonunu ve aktivasyonunu indüklediğini göstermiştir (Li ve ark., 2000). Ayrıca PAK4; p21 ile aktive olan kinazlardan olduğu için p21 fosforilasyon düzeyine baktığımızda, p21 fosforilasyonunun PAK4 inhibisyonuna doğru orantılı olarak azaldığı saptanmıştır.

PAK4 aşırı ekspresyonu ve aktivasyonunun; inflamasyona yanıtı azaltıp, tedavide ilaç dirençliliğini arttırması ve nihayetinde kanserli hastaların yaşama oranlarının düşmesi ile ilişkili olduğu bazı çalışmalarda desteklenmiştir. Bizde bu bilgiden yola çıkarak birtakım immünolojik belirteçlere baktık. Literatürde, PAK4 yıkımının Interlökin-6 (IL-6) ekspresyonunu baskıladığı (He ve ark., 2017) kanıtlanmış olup IL-6 ekspresyonu arttığında ise HIF1 α 'yı hedefleyerek MDA-MB-231 hücrelerinin agresifliğine katkıda bulunduğu açıklanmıştır (Wang ve ark., 2018). Sonuçlarımızda IL-6; kontrol ve PDGF-BB aracılı PAK4 aktivasyonu ile HIF1 α stabilizasyonunu sağladığımız hücrelerde IL-6 üretimini anlamlı düzeyde arttırmazken PAK4'ü inhibe ettiğimiz hücrelerde IL-6 üretimini kontrole kıyasla 5-kat azaltmıştır. Yine literatürde HIF1 α birikiminin IL-8 uyarımını tetiklediği gösterilmiştir (Malkov ve ark., 2021). Sonuçlarımızda literatürün

aksine, PDGF-BB muamelesinin IL-8 ifadesini 3-kat baskıladığını, PAK4 inhibisyonunun ise IL-8 üzerinde fazla bir etkisi olmadığını göstermiştir. Bu durumun PDGF-BB ile aktive olan reseptörün başka molekülleri aktive etmesiyle IL-8 üretimini baskıladığını düşünmekteyiz. Bir diğer immünolojik marker olan TGF- β 'nın PAK4 ile ilişkisine bakılmıştır ve 2018'de Fan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada PAK4'ün renal tübüler epitel hücrelerinde β -katenin sinyal yolunu aktive ederek EMT'yi indükleyebileceğini ve TGF- β 1 kaynaklı EMT'yi geliştirebileceğini kanıtlamışlardır (Yan ve ark., 2012), (Fan ve ark., 2018). Fakat literatüre göre TGF- β ; epitel hücrelerinin büyümesini güçlü bir şekilde engellediği için hem etkin bir anti-tümör ajan, hem de farklı bir hücresel bağlamda epitel hücrelerini mezenkimal hücrelere yeniden programlayan transkripsiyonel aktivitelerdeki değişiklikleri indükleyebildiği için tümör büyümesini teşvik ederek metastazı kolaylaştıran bir ajan olarak tanımlanır. Sonuçlarımıza göre; PDGF-BB uygulanan örneklerde TGF- β artışı gözlerken PAK4 inhibisyonu gerçekleştirdiğimiz örneklerde ise daha fazla 2-katlık bir artış gözledik. Bunun sebebinin ise TGF- β 'nın kanserde gösterdiği dual etki ve PDGF-BB ile yaptığı sinerjistik etkiden (Aula ve ark., 2019) kaynaklı olabileceğini saptadık.

Yapılan bazı çalışmalar, ifadesi baskılanmış PAK4'ün apoptotik süreci tetiklediğini net bir şekilde açıklamıştır (Gnesutta ve ark., 2001), (Gnesutta & Minden, 2003), (Li & Minden, 2005). Daha spesifik olarak kaspaz3, bax ve p53 gibi apoptotik moleküllerin aktivasyonunun PAK4 tarafından inhibe edildiğinde literatürde kanıtlanmıştır (Li ve ark., 2020). Buna ek olarak meme kanserinde normoksik koşullardaki HIF1 α aktivasyonunun sağlanmasında yine anti-apoptotik etki göstermiştir (Graijs ve Wall, 2004), (Flamant ve ark., 2010). Bizim sonuçlarımızda da PAK4 inhibisyonu yapılan hücrelerde 1,3-kat Kaspaz3 ve 1,56-kat Bax düzeylerinin literatürle uyumlu olarak arttığı gözlemlenmiştir. Fakat p53 düzeyinde anlamlı bir değişim saptanmamıştır. Dolayısıyla saptadığımız bulgulara göre, PAK4 inhibisyonunun apoptotik süreci p53-bağımsız olarak tetiklediğini düşünebiliriz.

Kanser hücreleri ayrıca hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri tarafından normal hücrelere göre daha az kontrollü düzenlenir. Yapılan birkaç çalışma sonucu epitel hücrelerinin ana yapışma molekülü olan E-kaderinin kaybının, karsinomların (epitelyal kanserler) gelişiminde önemli olduğunu göstermiştir (Janiszewska, 2020), (Pehlivanoğlu ve Aydın-Acar, 2020). Tüm bu literatür bilgileri doğrultusunda hücre yapışma moleküllerinin azaltılmış ifadesinin bir sonucu olarak , kanser hücreleri, diğer

hücreler ve doku bileşenleri ile etkileşimler tarafından nispeten kısıtlanmadığını ve malign hücrelerin invazyon ve metastaz yapma yeteneğine katkıda bulunduğunu söyleyebiliriz. Literatüre göre; EMT belirteçleri olarak E-Kaderin, N-Kaderin ve Vimentin standartize edilmiştir. Bizim sonuçlarımızda; PAK4'ün baskılanması E-Kaderin ekspresyonunda 2,96-kat artış meydana getirirken, N-kaderin düzeyini 2,5-kat ve vimentin düzeyimi yaklaşık 4-kat baskılamaktadır. Bunun aksine aktif PAK4, 2,43-kat N-Kaderin ve 1,81-kat Vimentin ekspresyonunu indüklemektedir. Bu sonuçlara göre; PDGFR β yolağının aktivasyonunda dahi PAK4 fonksiyonu inhibe edildiğinde, kanser hücrelerinde EMT sürecinin durdurulabileceği ve hücrelerin metastatik kabiliyetlerinin azaltılabileceği ifade edilir. Bulgularımız PDGF-BB uyarımı doğrultusunda PAK4 aktivasyonunun gerçekleşmesine yönelik kurgumuzun doğru olduğunu kanıtlamaktadır.

Endojen PAK4 ifadesinin yüksek olduğu hücrelerde metastaz kabiliyeti PAK4 bağımlı olarak geliyorsa, hücrelerde PAK4 ekspresyonunu arttırdığımızda migrasyonun artması gerekir veya PAK4 inhibisyonu olması halinde migrasyonun azalması gerekir diye düşünerek metastatik MDA-MB-231 hücre hattında hem PDGF-BB ile PAK4 ekspresyonunu uyardık hem de PF3758309 ajanı ile PAK4 ifadesini baskıladık. Böylece PAK4 aktivasyonu ve inhibisyonunun hücre migrasyonuna olan etkilerini MDA-MB-231 hücrelerinde test ettik. Sonuçlarımızda gerçekte PAK4 aktivasyonu artan hücreler; 24.saatte %29, 48.saatte %47 oranında yara alanını kapatmaktadır. PAK4 inhibisyonu yaptığımız hücrelerde ise yara alanlarının anlamlı bir şekilde kapanmadığı saptanmıştır. Migrasyon deneyi bulgularımıza göre, PAK4'ün literatürle uyumlu olarak hücre migrasyonunu arttırdığı söylenebilir.

HIF1 α 'nın hedefi olduğu bilinen Rantes (CCL5) geninde PAK4 ile ilişkisini araştırmak istedik. Literatürde Rantes'in diğer meme kanseri hücre hatlarına kıyasla MDA-MB-231 hücre hatlarında daha fazla eksprese olduğunu gördük (Lin ve ark., 2012). Yine aynı çalışmada hipoksik koşullarda Rantes ekspresyonunun normoksik koşullara kıyasla çok daha fazla eksprese edildiği kanıtlanmıştır (Lin ve ark., 2012). Yapılan başka bir çalışmada Rantes geninde HRE bölgelerinin bulunduğu ve dolayısıyla Rantes ekspresyonunun HIF1 kompleksi tarafından indüklendiği ileri sürülmüştür (Korbecki ve ark., 2020). Ayrıca PAK4 yıkımının da Rantes ekspresyonunu azalttığı, yine literatürde kanıtlanmıştır (He ve ark., 2017). Bizde tüm bu bilgiler çerçevesinde,

normoksik koşullarda PAK4 aracılığıyla stabilize ettiğimiz HIF1 α 'nın Rantes promotoru üzerinde bağlanacağı diziler olabileceğini düşündük. Araştırmalarımız sonucunda Rantes promotorunda HIF1 α ile olası benzer diziler saptadık. Ardından bu ilişkiyi qRT-PCR ile test ettik ve literatürle uyumlu olarak PDGF-BB uyguladığımız örnekte mRNA seviyesinde Rantes ekspresyonu kontrole kıyasla 1,17-kat artarken, PF ajanı ile PAK4 inhibisyonu gerçekleştirdiğimiz örneklerde ise Rantes gen ekspresyonlarının beklenen seviyede (4-kat) düştüğünü kanıtlamaktayız.

PAK4 hedefli inhibitör moleküllerin geliştirilmesi ve dolayısıyla HIF1 α stabilizasyonu ve aktivasyonunun engellenmesi temeline dayanan araştırmalar metastaz ve kanser progresyonunun tedavi edilebileceğini öngörmektedir (Liu ve ark., 2021). Bundan yola çıkarak projemizde kurguladığımız PAK4 inhibitörünün kanserde etkisinin araştırılması daha ekonomik ve kolay uygulanabilir bir yöntem olarak ele alınabilir. Bu yöntemle farklı ve yeni inhibitör moleküllerin araştırılıp geliştirilmesi yoluna gidilebilir. Ek olarak PAK4 ilişkili HIF1 α hedef genlerinin üzerinde daha fazla durularak PAK4'ün dolaylı yoldan hipoksiye etkisi araştırılabilir. Dolayısıyla PAK4 aktivasyonunu ve hipoksi sürecini inhibe eden etkin moleküllerin keşfiyle yeni tedavi stratejileri de ortaya çıkarılabilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Tez çalışmamız kapsamında; kanser hücrelerinde PAK4 aktivasyonu ve inhibisyonuna bağlı olarak PAK4-HIF1 α protein-protein etkileşimini ve PAK4 tarafından HIF1 α aktivasyonunu inceledik.

Elde ettiğimiz sonuçlar;

1- PAK4'ün metastatik kanser hücrelerinde metastatik olmayanlara oranla daha yüksek düzeyde ifadenmekte olduğunu ve çeşitli kanser hücreleri arasından en fazla MDA-MB-231 metastatik meme kanseri hücre hattında ifadenmekte olduğunu net bir şekilde ortaya koymuştur.

2- PDGF-BB uyarımının PAK4 aktivasyonunu indüklediğini ve PDGF-BB aracılı aktive olan PAK4'ünde normoksik koşullarda HIF1 α ile fiziki bağlanma yapabildiğini göstermektedir.

3- PDGF-BB'nin fosforillenmiş PAK4 ifadesi üzerinde arttırıcı bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda belirli zamanlarda PDGFR fosforilasyonunda arttırdığı saptanmıştır.

4- PDGF-BB aracılı aktive PAK4'ün AKT sinyal yolağı üzerindende HIF1 α translasyonunu arttırabileceğini desteklemektedir.

5- PDGF-BB muamelesinin MDA-MB-231 hücrelerinin proliferasyonu ve migrasyonunda destekleyici olduğunu göstermektedir.

6- PAK4 inhibisyonunun p21 fosforilasyonunu baskıladığını, PDGF-BB muamelesinin ise p21 fosforilasyonunu arttırıcı etki gösterdiğini kanıtlamaktadır.

7- Hücrelerde PAK4 ifadesinin IL-6, IL-8 ve TGF- β gibi immünolojik belirteçlere de etki ederek inflamatuvar yanıtı baskıladığı ve neticede tedavinin başarısız olmasına

zemin hazırladığı gösterilmektedir. Bu sebeple kemoterapiye direnç tedavilerinde PAK4 inhibitörlerinin üzerinde yapılan araştırmaların artması beklenir.

8- PAK4 ifadesinin baskılanması apoptotik süreçte kilit rol oynayan Kaspaz3 ve Bax ekspresyonlarını indüklemekte olduğunda açıklamaktadır.

9- PDGF-BB aracılı PAK4 aktivasyonu; hücrelerde E-Kaderin protein ekspresyonunu baskımlarken, N-Kaderin ve Vimentin ekspresyonlarını indüklemekte olduğunu ve bundan ileri gelerek EMT sürecine başlatıcı etkisi olduğunu kanıtlamaktadır.

10- PAK4 hedefli inhibitör araştırma stratejimiz siRNA temelli tedavilere göre daha ekonomik ve pratik bir yol olarak değerlendirilebileceğinin yanı sıra bu yöntemle yeni terapötiklerin daha fazla araştırılması yoluna gidilebilir.

5.2 Öneriler

1- PAK4 inhibisyonu için ticari inhibitörlerinin kullanımı yerine siRNA teknolojisi ile direkt olarak PAK4 ifadesi susturulabilir. Böylece daha kesin sonuçlar elde edilebilir.

2- Kobalt Klorür (CoCl_2) ve Deferoksamin (Desferoxamine) gibi ajanlar kullanılarak HIF1 α stabilizasyonu sağlanabilir. Bu sayede birikmiş HIF-1 α 'nın aktivasyonu daha rahat araştırılabilir.

3- Gösterdiğimiz apoptotik, immünolojik ve EMT sonuçları MDA-MB-231 hücrelerine özgü olarak da gerçekleşmiş olabilir. Bu nedenle baktığımız belirteçlerin ifadesine farklı hücre hatlarında aynı deney setini uygulayarak bakılması faydalı olabilir.

4- PDGF reseptör aktivasyonuna ek olarak PDGFR'ın transaktive ettiği EGF reseptörünün MDA-MB-231 hücrelerinde oluşturduğu PAK4 ekspresyon seviyesi de araştırılabilir. Böylelikle PDGFR'ın PAK4 üzerindeki direkt veya indirekt olarak yaptığı aktivasyon mekanizması aydınlatılabilir.

5- HIF1 α normoksik koşullarda çabuk degrade olduğundan, PAK4 aktivasyon durumunun HIF1 α hedef genleri üzerindeki etkisine de bakılabilir.



6. KAYNAKLAR

- Abo, A., Qu, J., Cammarano, M.S., Dan, C., Fritsch, A., Baud, V., Belisle, B., Minden, A., 1998, PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia, *EMBO J.*, 16;17(22):6527-40.
- Abril-Rodriguez G., et al., 2020, PAK4 inhibition improves PD-1 blockade immunotherapy, *Nature Cancer*, 1, pages46–58.
- Ahmed, T., et al., 2008, A PAK4-LIMK1 pathway drives prostate cancer cell migration downstream of HGF, *Cell Signal*, 20 (7), pp. 1320-1328.
- Albogami, S., 2022, Comprehensive analysis of gene expression profiles to identify differential prognostic factors of primary and metastatic breast cancer, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29, 7, 103318.
- Anastasiadi, Z., Lianos, G.D., Ignatiadou, E., Harisis, H.V., Mitsis, M., (2017), Breast cancer in young women: an overview, *Updates Surg.* 69(3):313-317.
- Arias-Romero and Chernoff, 2008, A tale of two PAKs, *Biol. Cell*, 100, pp. 97-108
- Aspenstrom, P., Fransson, A., Saras, J., 2004, Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system, *Biochem. J.*, 377, pp. 327-337.
- Aula, H., Skyttä, T., Tuohinen, S., Luukkaala, T., Hämäläinen, M., Virtanen, V., Raatikainen, P., Moilanen, E., & Kellokumpu-Lehtinen, P. L., 2019, Transforming growth factor beta 1 levels predict echocardiographic changes at three years after adjuvant radiotherapy for breast cancer. *Radiation oncology (London, England)*, 14(1), 155.
- Bagrodia, S., Taylor, S.J., Jordon, K.A., Van, Aelst L., Cerione, R.A., 1998, A novel regulator of p21-activated kinases, *J Biol Chem.*, 11;273(37):23633-6.
- Baldassa, S., Calogero, A.A., Colombo, G., Zippel, R., Gnesutta, N., 2010, N-terminal interaction domain implicates PAK4 in translational regulation and reveals novel cellular localization signals, *J. Cell. Physiol.*, 224, pp. 722-733.
- Bhardwaj, A., et al., 2014, CXCL12/CXCR4 signaling counteracts docetaxel-induced microtubule stabilization via p21-activated kinase 4-dependent activation of LIM domain kinase 1, *Oncotarget*, 5 (22), pp. 11490-11500.
- Bi, Y., Tian, M., Le, J., Wang, L.X., Qu, L.J., Hao, M., 2016, Study on the expression of PAK4 and P54 protein in breast cancer, *World J. Surg. Oncol.*, 14 (1), pp. 160-164.
- Bokoch, G.M., 2003, Biology of the p21-activated kinases, *Annu. Rev. Biochem.*, 72 (2003), pp. 743-781.

- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A., 2018, Global cancer statistics: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, Volume 68, Issue 6, Pages 394-424.
- Bruick, R.K., McKnight, S.L., 2001, A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF, *Science*, 294: 1337–1340.
- Calapoğlu, N.Ş., 2016, Hipoksiye Karşı Hücrel Cevabın Düzenleyicisi: HIF-1 Regulator of Cellular Response to Hypoxia, *Smyrna Tıp Dergisi*, 48.
- Callow, M.G., et al., 2002, Requirement for PAK4 in the anchorage-independent growth of human cancer cell lines, *J. Biol. Chem.*, 277 (1) 550-558.
- Cancer Research, UK, 2021, Cancer Statistics for the UK. Cancer Statistics in the UK, <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancerstatistics-for-the-uk>, [Ziyaret Tarihi: 27 Mayıs 2022].
- Cancer, who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer, 12 September 2018.
- Chandrashekar, D.S., Chakravarthi, B.V.S.K., Robinson, A.D., Anderson, J.C., Agarwal, S., Balasubramanya, S.A.H., Eich, M.L., Bajpai, A.K., Davuluri, S., Guru, M.S., Guru, A.S., Naik, G., Della, Manna, D.L., Acharya, K.K., Carskadon, S., Manne, U., Crossman, D.K., Ferguson, J.E., Grizzle, W.E., Palanisamy, N., Willey, C.D., Crowley, M.R., Netto, G.J., Yang, E.S., Varambally, S., Sonpavde, G., 2020, Therapeutically actionable PAK4 is amplified, overexpressed, and involved in bladder cancer progression, *Oncogene*, 39(20):4077-4091.
- Chen, S., Auletta, T., Dovirak, O., Hutter, C., Kuntz, K., El-ftesi, S., et al., 2008, Copy number alterations in pancreatic cancer identify recurrent PAK4 amplification, *Cancer Biol Ther*, 7:1793 – 802.
- Cooper, G.M., 2000, Signaling Molecules and Their Receptors, *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates*.
- Costa, T.D.F., Strömblad, S., 2021, Why is PAK4 overexpressed in cancer?, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 138, 106041.
- Costa, T.D.F., Zhuang, T., Lorent, J. et al., 2019, PAK4 suppresses RELB to prevent senescence-like growth arrest in breast cancer, *Nat Commun* 10, 3589.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E., 1997, Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery, *Cell*, 91:231-241.
- Dengler, V. L., Galbraith, M., & Espinosa, J. M., 2014, Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors, *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 49(1), 1–15.

- Edwards, D.C., Sanders, L.C., Bokoch, G.M., Gill, G.N., 1999, Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal Dynamics, *Nat. Cell Biol.*, 1, pp. 253-259.
- Emami Nejad, A., Najafgholian, S., Rostami, A. et al., 2021, The role of hypoxia in the tumor microenvironment and development of cancer stem cell: a novel approach to developing treatment, *Cancer Cell Int* 21, 62.
- Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., et al., 2001, C.elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation, *Cell*, 107: 43–54.
- Eswaran, J., Soundararajan, M., Kumar, R., Knapp, S., 2008, UnPAKing the class differences among p21-activated kinases, *Trends Biochem. Sci.*, 33, pp. 394-403.
- Fan, Y., Wang, X., Li, Y., Zhao, X., Zhou, J., Ma, X., An, D., & Jiang, H., 2018, PAK4 enhances TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition through activating β -catenin signaling pathway in renal tubular epithelial cells, *International journal of clinical and experimental pathology*, 11(6), 3026–3035.
- Flamant, L., Notte, A., Ninane, N. et al., 2010, Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia. *Mol Cancer* 9, 191.
- Frances, R., Balkwill, 2012, The tumor microenvironment at a glance, *J Cell Sci*, 125: 5591-5596.
- Fredriksson, L., Li, H., Eriksson U., 2004, The PDGF Family: Four Gene Products Form Five Dimeric Isoforms, *Box*, 240:197-204.
- Fu, X., et al., 2014, PAK4 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells via PI3K/Akt- and MEK/ERK-dependent pathways, *Biosci. Rep.*, 34(2).
- Gnesutta, N., Minden, A., 2003, Death receptor-induced activation of initiator caspase 8 is antagonized by serine/threonine kinase PAK4, *Mol. Cell Biol.*, 23 (21), pp. 7838-7848.
- Gnesutta, N., Qu, J., Minden, A., 2001, The serine/threonine kinase PAK4 prevents caspase activation and protects cells from apoptosis, *J. Biol. Chem.*, 276, pp. 14414-14419.
- Green, D.R., 1998, Apoptotic Pathways: The Roads to Ruin, *Cell*, 94, 6, 695-698.
- Greijer, A. E., and E van der Wall, 2004, The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis, *Journal of clinical pathology* vol. 57,10.
- Ha, B.H., et al., 2012, Type II p21-activated kinases (PAKs) are regulated by an autoinhibitory pseudosubstrate, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109, pp. 16107-16112.
- Hausman, D. M., 2019, What Is Cancer?, *Perspect Biol Med.*, 62(4):778-784.

- Heldin, CH., Westermark, B., 1999. Mechanism of Action and in Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor, *Phs. Rew.*, 79, 1283-1316.
- Hwang, K., WonKim, C.,ChulChoi, K., 2016, Anti-metastatic potential of resveratrol and its metabolites by the inhibition of epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion of malignant cancer cells, *Phytomedicine*, 23,14,15, Pages 1787-1796.
- He, H., Levitzki, A., Zhu, H.J., Walker, F., Burgess, A., Maruta, H., 2001, Platelet-derived Growth Factor Requires Epidermal Growth Factor Receptor to Activate p21-activated Kinase Family Kinases, *Journal of Biological Chemistry*, 276, Issue 29, Pages 26741-26744.
- He, L.F., Xu, W.W., Chen, M., Zian, Z.R., Wen, X.F., Chen, M.N., Du, C.W., Huang, W.H., Wu, J.D., Zhang, G.J., 2017, Activated-PAK4 predicts worse prognosis in breast cancer and promotes tumorigenesis through activation of PI3 K/AKT signaling, *Oncotarget*, 8 (11), pp. 17573-17585.
- Hernández Borrero, L.J., El-Deiry, W.S., 2021, Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic targeting. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.*; 1876(1):188556.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., *et al.*, 2001, HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing, *Science*, 292: 464–468.
- Iver, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., *et al.*, 1998, Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α , *Genes Dev.*,12: 149-162.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J. *et al.*, 2001, Targeting of HIF- α to the von Hippel–Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation, *Science*, 292: 468–472.
- Janiszewska, M., Primi, M. C., & Izard, T., 2020, Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *The Journal of biological chemistry*, 295(8), 2495–2505.
- Jewell, U.R., Kvietikova, I., Scheid, A., Bauer, C., Wenger, R.H., Gassmann, M., 2001, Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J*, 15: 1312–1314.
- Jiang, B.H., Semenza, G.L., Bauer, C., Marti, H.H. , 1996, Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension, *Am J Physiol*, 271 (4 Pt 1): C1172–C1180.
- Johanna, C., Brahimi-Horn, M.C., Pouyssegur, J., 2010, Tumour Hypoxia Induces a Metabolic Shift Causing Acidosis: A Common Feature in Cancer, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14,4,771–794.

- Kesanakurti, D., Chetty, C., Rajasekhar, D., Maddirela, Gujrati, M., Rao, J.S., 2012, Functional cooperativity by direct interaction between PAK4 and MMP-2 in the regulation of anoikis resistance, migration and invasion in glioma *Cell Death Dis.*, 3, p. e445.
- Kim, H., Woo, D.J., Kim, S.Y., Yang, E.G., 2017, p21-activated kinase 4 regulates HIF-1 α translation in cancer cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486, Issue 2, 29, Pages 270-276.
- Korbecki, J., Kojder, K., Barczak, K., Simińska, D., Gutowska, I., Chlubek, D., & Baranowska-Bosiacka, I., 2020, Hypoxia Alters the Expression of CC Chemokines and CC Chemokine Receptors in a Tumor-A Literature Review. *International journal of molecular sciences*, 21(16), 5647.
- KOSOVA, F., ARI, Z., 2008, Adipositokinler ve Meme Kanseri, 22 (6): 377 – 384.
- Kuijl, C., Savage, N.D., Marsman, M., Tuin, A.W., Janssen, L., Egan, D.A., Ketema, M., van den Nieuwendijk, R., van den Eeden, S.J., Geluk, A., Poot, A., van der Marel, G., Beijersbergen, R.L., Overkleeft, H., Ottenhoff, T.H., Neefjes, J., 2007, Intracellular bacterial growth is controlled by a kinase network around PKB/AKT1, *Nature*, 450, pp. 725-730
- Kumar, R., Sanawar, R., Li, X., Li, F., 2017, Structure, biochemistry, and biology of PAK kinases, *Gene*, 605, Pages 20-31.
- Li, J., Kim, Y.N., Bertics, P.J., 2000, Platelet-derived Growth Factor-stimulated Migration of Murine Fibroblasts Is Associated with Epidermal Growth Factor Receptor Expression and Tyrosine Phosphorylation, *Journal of Biological Chemistry*, 275, Issue 4, Pages 2951-2958.
- Li, Y., Jia, S., & Dai, W., 2020, Fisetin Modulates Human Oral Squamous Cell Carcinoma Proliferation by Blocking PAK4 Signaling Pathways. *Drug design, development and therapy*, 14, 773–782.
- Linda, K., Rausch, Nikolaus, C., Netzer, Hoegel, J., Pramsohler, S., 2017, The Linkage between Breast Cancer, Hypoxia, and Adipose Tissue, *Front Oncol.* 7: 211.
- Lin, S., Wan, S., Sun, L., Hu, J., Fang, D., Zhao, R., Yuan, S., Zhang, L., 2012, Chemokine C-C motif receptor 5 and C-C motif ligand 5 promote cancer cell migration under hypoxia, *Cancer Sci.*, ;103(5):904-12.
- Liu, H., Liu, K., & Dong, Z., 2021, The Role of p21-Activated Kinases in Cancer and Beyond: Where Are We Heading?, *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 641381.
- Li, X., Minden, A., 2005, PAK4 functions in tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced survival pathways by facilitating TRADD binding to the TNF receptor, *J. Biol. Chem.*, 280 (50), pp. 41192-41200.

- Lu, Y., Ding, Y., Wei, J., He, S., Liu, X., Pan, H., Yuan, B., Liu, Q., Zhang, J., 2021, Anticancer effects of Traditional Chinese Medicine on epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer: Cellular and molecular targets, *European Journal of Pharmacology*, 907, 174275.
- Malkov, M.I., Lee, C.T., Taylor, C.T., 2021, Regulation of the Hypoxia-Inducible Factor (HIF) by Pro-Inflammatory Cytokines, *Cells*.10(9):2340.
- Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z.S., Lim, L., 1994, A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1, *Nature*, 6;367(6458):40-6.
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., *et al.*, 1999, The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis, *Nature*, 399: 271–275.
- Murray, B.W., Guo, C., Piraino, J., Westwick, J.K., Zhang, C., Lamerdin, J., Dagostino, E., Knighton, D., Loi, C.M., Zager, M., Kraynov, E., Popoff, I., Christensen, J.G., Martinez, R., Kephart, S.E., Marakovits, J., Karlicek, S., Bergqvist, S., Smeal, T., 2010, Small-molecule p21-activated kinase inhibitor PF-3758309 is a potent inhibitor of oncogenic signaling and tumor growth, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 18;107(20):9446-51.
- Naija, A., Merhi, M., Inchakalody, V., Fernandes, Q., Mestiri, S., Prabhu, K.S., Uddin, S., Dermime, S., 2021, The role of PAK4 in the immune system and its potential implication in cancer immunotherapy, *Cellular Immunology*, 367,104408.
- Nazari, SS., Mukherjee, P., 2018, An overview of mammographic density and its association with breast cancer, *Breast Cancer*, May;25(3):259-267.
- Palmer, L.A., Gaston, B., Johns, R.A., 2000, Normoxic stabilization of hypoxia-inducible factor-1 expression and activity: redox-dependent effect of nitrogen oxides, *Mol Pharmacol*, 58: 1197-1203.
- Papadopoulos, N., Lennartsson, J., 2018, The PDGF/PDGFR Pathway as a Drug Target,, *Molecular Aspects of Medicine* Volume 62, Pages 75-88.
- Pehlivanoğlu, S., Aydın-Acar Ç., 2020, PAK4, MCF-7 hücrelerinde E-kaderini baskılayarak PKC-bağımlı invaziv potansiyeli destekler, *Türk Hij Den Biyol Derg*, 77(1): 107-116.
- Obeng, E., 2021, Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review, *Braz J Biol.*; 81(4):1133-1143.
- Qu, J., Cammarano, M.S., Shi, Q, Ha, K.C., De Lanerolle, P., Minden, A., 2001, Activated PAK4 regulates cell adhesion and anchorage-independent growth, *Molecular and Cellular Biology*. 21(10):3523–3533.
- Radu, M., Semenova, G., Kosoff, R., Chernoff, J., 2014, PAK signalling during the development and progression of cancer, *Nat Rev Cancer* 14:13–25.

- Rane, C.K., Minden, A., 2019, P21 activated kinase signaling in cancer. *Semin Cancer Biol.* 54:40-49, 54, Pages 40-49.
- Ren, X., Zhao, M., Lash, B., Martino, M., Julier, Z., 2020, Growth Factor Engineering Strategies for Regenerative Medicine Applications, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7.
- Sells, M.A., Chernoff, J., 1997, Emerging from the Pak: the p21-activated protein kinase family, *Trends Cell Biol.*, 7, pp. 162-167.
- Semenza, G.L., 2004, Hydroxylation of HIF-1: Oxygen Sensing at the Molecular Level, *Physiology*, 19 (4), 176-182.
- Semenza, G.L., 2007, Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway, *Sci STKE.*, (407).
- SenGupta, S., Parent, C.A., Bear, J.E., 2021, The principles of directed cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 22(8):529-547.
- Shu, X.R., *et al.*, 2015, PAK4 confers the malignance of cervical cancers and contributes to the cisplatin-resistance in cervical cancer cells via PI3K/AKT pathway, *Diagn. Pathol.*, 10, p. 177.
- Siu, M.K., *et al.*, 2010, p21-activated kinase 4 regulates ovarian cancer cell proliferation, migration, and invasion and contributes to poor prognosis in patients, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 107 (43), pp. 18622-18627.
- T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 2020, Türkiye Kanseri İstatistikleri.
- Trepap, X., Chen, Z., Jacobson, K., 2012, Cell Migration, *Compr Physiol*, Oct;2(4):2369-92.
- Tyagi, N., *et al.*, 2016, p-21 activated kinase 4 (PAK4) maintains stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells through activation of STAT3 signaling, *Cancer Lett.*, 370 (2), pp. 260-267.
- Uutela, M., 2004, PDGF-D, A Novel Member of the Platelet-Derived Growth Factor Family', *Mol. Can. Bio.*, 272, 5723-5741
- Vaughan, S., Jat, P.S., 2011, Deciphering the role of nuclear factor- κ B in cellular senescence, *Aging (Albany NY)*, 3 (10), pp. 913-919.
- Vaupel, P., Harrison, L., 2004, Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response, *Oncologist*. 9:4–9.
- Wang, G.L., Semenza, G.L., 1993, Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia, *J. Biol. Chem.*, 268: 21513-21518.

- Wang, K., Zhu, X., Zhang, K., Yin, Y., Chen, Y., Zhang, T., 2018, Interleukin-6 contributes to chemoresistance in MDA-MB-231 cells via targeting HIF-1 α . *J Biochem Mol Toxicol.* 2018; 32: e22039.
- Weidemann, A., and Johnson, R.S., 2008, Biology of HIF-1 α , *Cell Death & Differentiation*, 15, pages 621–627.
- Welch, D.R., Hurst, D.R., 2019, Defining the Hallmarks of Metastasis. *Cancer Res.*, 15;79(12):3011-3027.
- Wells, C.M., Jones, G.E., 2010, The emerging importance of group II PAKs, *Biochemical Journal* 425(3):465–473.
- Wigerup, C., Pålman, S., Bexell, D., 2016, Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol Ther.*, 164:152–69.
- Wong, L.E., Chen, N., Karantza, V., Minden, A., 2013, The Pak4 protein kinase is required for oncogenic transformation of MDA-MB-231 breast cancer cells, *Oncogenesis*, 2, pp. 1-6.
- Won, S.Y., *et al.*, 2019, PAK4 signaling in health and disease: defining the PAK4-CREB axis, *Exp. Mol. Med.*, 51 (2), pp. 1-9.
- Xiao, Y., Yu, D., 2021, Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer, *Pharmacology & Therapeutics*, Volume 221, May 2021, 107753.
- Yan, X., Zhang, J., Sun, Q., Tuazon, P.T., Wu, X., Traugh, J.A. *et al.*, 2012, p21-Activated kinase 2 (PAK2) inhibits TGF-beta signaling in Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells by interfering with the receptor-Smad interaction, *J Biol Chem* 2012; 2
- Yarden, Y., Escobedo JA., Kuang WJ., Yang-feng TL., Daniel TO., Tremble PM., Chen EY., Ando ME., Harkins RN., Francke U., 1986, Structure of the Receptor for Platelet-Derived Growth Factor Helps Define a Family of Closely Related Growth Factor Receptor, *Nature*, 323, 226-32.
- Ye, D., Field, J., 2012, PAK signaling in cancer, *Cell. Logist.*, 2 (2), pp. 105-116.
- Yin, M.,- Yau, C., Xu, L., Huang, C. L., Wong, C. M., 2018, Long Non-Coding RNAs in Obesity-Induced Cancer, *Noncoding RNA*. Sep; 4(3): 19.
- Zelzer, E., Levy, Y., Kahana, C., Shilo, B.Z., Rubinstein, M., Cohen, B., 1998, Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF1 α /ARNT, *EMBO J*, 17: 5085-5094.
- Zhang, K., Wang, Y., Fan, T. *et al.*, 2022, The p21-activated kinases in neural cytoskeletal remodeling and related neurological disorders. *Protein Cell* 13, 6–25.

- Zhong, H., 2000, Modulation of HIF-1 α expression by the epidermal growth factor/PI3K/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics, *Cancer Res*, 60: 1541-1545.
- Ziello, J.E., Jovin L.S., Huang, Y., 2007, Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Regulatory Pathway and its Potential for Therapeutic Intervention in Malignancy and Ischemia', *Yale J Biol Med*, 80(2): 51–60.
- Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A.R., Ryan, H.E., Johnson, R.S., Jefferson, A.B., Stokoe, D., Giaccia, A.J., 2000, Loss of PTEN facilitates HIF-1- mediated gene expression, *Genes Dev*, 14: 391-396.

