



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE SİNİR
BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN PAK4
REGÜLASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Sultan ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Nisan-2025
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Sultan ÇELİK tarafından hazırlanan “Glioblastoma Hücrelerinde Sinir Büyüme Faktörünün PAK4 Regülasyonu üzerindeki Etkisinin Araştırılması” adlı tez çalışması .../.../... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Dr. Öğr. Üyesi Esra YETİŞGİN

.....

Danışman

Doç. Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Merve ÖZCAN TÜRKMEN

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun .../.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Sultan ÇELİK

Tarih:21.04.2025

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

GLİOBLASTOMA HÜCRELERİNDE SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN PAK4 REGÜLASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Sultan ÇELİK

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

Danışman: Doç.Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

2025, 66 Sayfa

Jüri

Doç.Dr. Suray PEHLİVANOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Esra YETİŞGİN

Dr. Öğr. Üyesi Merve ÖZCAN TÜRKMEN

Glioblastoma Multiforme (GBM) malignitesi yüksek ve kötü prognoz gösteren beyin tümörüdür. Tümör, beyin dokusunun glial hücrelerinden köken alır ve hızlı bir şekilde gelişip yayılabilir. GBM gelişiminde birçok büyüme faktörü rol oynamaktadır. Bunlar arasında sinir büyüme faktörü (NGF), hem periferik hem de merkezi sinir sisteminde hücre büyümesi, gelişmesi, hayatta kalması ve farklılaşması için gereklidir. NGF, hücrelerde TrkA ve p75NTR reseptörleri ile etkileşime girerek hücre içi sinyalizasyonunu başlatır ve nöroprotektif etkilere neden olur. GBM hücreleri düşük glikoz varlığında NGF üretimini artırarak sağkalımlarını destekler. p21 aktive kinaz (PAK)'lar hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre hareketliliği ve apoptoz gibi hücreSEL süreçlerde rol oynayan ve 6 üyeden oluşan (PAK1-6) bir enzim ailesidir. Günümüzde, GBM ile ilişkili olarak özellikle PAK4'ün anormal şekilde aktive olması sonucunda hücre proliferasyonunu ve kanser gelişimini destekleyebildiği gösterilmiştir. Ayrıca, GBM hücrelerinin göç ve invazyon yeteneklerini artırarak tümörün çevre dokulara yayılmasına yardımcı olmaktadır. Bu bağlamda çalışmamızda, NGF-aracılı GBM gelişiminde PAK4'ün olası katkısının ortaya konması amaçlanmıştır. Tez çalışmamızda, GBM hücre hattı olan U-87 MG hücrelerinin farklı glikoz konsantrasyonlarındaki NGF üretim düzeyi belirlendi. Hücreler NGF ile uyarılarak ve beraberinde PI3K inhibitörü (LY294002), MEK inhibitörü (PD0325901), bir flavonoid olan Apigenin ve PAK4 inhibitörü (PF3758309) ile muamele edilerek oluşturulan deney setinde AKT, ERK ve PAK4 sinyal yollarının aktivasyon durumları belirlendi. Ayrıca, NGF stimülasyonu ve PAK4 inhibitörü varlığında PAK4 aktivasyon durumu ile ilişkili olarak, hücrelerin sağkalım, proliferasyon, koloni ve 3D sferoid oluşturma, ayrıca hücre migrasyon kabiliyetleri, epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) sürecinin belirteçleri olan E-kadherin, Twist ve Vimentin'in ifade düzeyleri belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre, artan glikoz konsantrasyonu hücre canlılığını artırdı, ancak düşük glikoz konsantrasyonu NGF üretimini artırdı. NGF, PAK4'ün fosforilasyon ve aktivasyon düzeyini artırırken, PF3758309 ajanı anlamlı bir şekilde bu etkiyi baskıladı. PAK4 inhibisyonu, NGF uyarımına rağmen hücrelerde, AKT ve ERK sinyal yollarını blokladı, hücre canlılığını, migrasyonunu, koloni oluşturma kabiliyetini ve EMT sürecini baskıladı. Dikkat çekici bir şekilde NGF uyarımı ile PAK4 aktivasyonu 3D *in vitro* oluşturulan sferoidin dağılmasını kolaylaştırdı. PAK4 inhibe edildiğinde ise söz konusu sferoidin yapı bütünlüğüne katkı sağladığı, ancak kontrole göre büyümediği saptandı. Sonuç olarak, PAK4'ün NGF-aracılı GBM gelişiminde moleküler düzeyde önemli roller oynadığı ve GBM tedavisine yönelik olarak NGF-PAK4 aksisinin terapötik hedef olarak ele alınabileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: GBM, Kanser, NGF, PAK4.

ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF NERVE GROWTH FACTOR ON PAK4 REGULATION IN GLIOBLASTOMA CELLS

Sultan CELIK

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN MOLECULAR BIOLOGY AND
GENETICS**

Advisor: Assoc Prof Dr Suray PEHLIVANOGLU

2025, 66 Pages

Jury

Assoc. Prof. Dr. Suray PEHLIVANOGLU

Asst. Prof. Dr. Esra YETISGIN

Asst. Prof. Dr. Merve OZCAN TURKMEN

Glioblastoma multiforme (GBM) is a highly malignant brain tumor with a poor prognosis, originating from glial cells in brain tissue and capable of rapid growth and spread. Numerous growth factors are implicated in the development of GBM, with nerve growth factor (NGF) being essential for cell growth, development, survival, and differentiation in both the peripheral and central nervous systems. The interaction of NGF with TrkA and p75NTR receptors in cells initiates intracellular signaling, leading to neuroprotective effects. GBM cells support their survival by increasing NGF production in the presence of low glucose. p21 activated kinases (PAKs) are a family of enzymes consisting of six members (PAK1-6) that play a role in cellular processes such as cell cycle regulation, cell motility, and apoptosis. Recent studies have indicated that aberrant activation of PAK4, particularly in the context of GBM, can promote cell proliferation and cancer development. Additionally, it has been reported to enhance the migration and invasion capabilities of GBM cells, facilitating the tumor's progression to surrounding tissues. Here, we sought to elucidate the potential role of PAK4 in NGF-mediated GBM progression. In the present study, an investigation was undertaken to ascertain the NGF production level of U87 MG cells, a glioblastoma multiforme (GBM) cell line, under varying glucose concentrations. The activation status of AKT, ERK, and PAK4 signaling pathways was determined in a series of experiments in which cells were stimulated with NGF and treated with PI3K inhibitor (LY294002), MEK inhibitor (PD0325901), Apigenin, a flavonoid, and PAK4 inhibitor (PF3758309). Furthermore, the effects of NGF stimulation and PAK4 activation status in the presence of a PAK4 inhibitor on various parameters were investigated. These parameters included cell survival, proliferation, colony and 3D spheroid formation, as well as cell migration abilities. Additionally, the expression levels of E-cadherin, Twist, and Vimentin, which are markers of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process, were determined. The obtained results indicated that increasing glucose concentration increased cell viability, while low glucose concentration increased NGF production. NGF increased the level of phosphorylation and activation of PAK4, while the PF3758309 agent significantly suppressed this effect. PAK4 inhibition blocked AKT and ERK signaling pathways, suppressed cell viability, migration, colony forming ability, and EMT process in cells despite NGF stimulation. Notably, PAK4 activation by NGF stimulation facilitated the dispersal of 3D spheroids formed *in vitro*, while PAK4 inhibition resulted in the spheroid contributing to its structural integrity without significant growth compared to the control. In light of the evidence presented, it can be concluded that PAK4 plays an essential role in NGF-mediated GBM development at the molecular level. The NGF-PAK4 axis can be considered as a potential therapeutic target for GBM treatment.

Keywords: Cancer, GBM, NGF, PAK4.

ÖNSÖZ

Tez çalışmamı yürütürken tüm bilgi birikimi ve tecrübeleriyle destek olan, danışmanım Doç. Dr. Suray PEHLİVANOĞLU'na emeklerinden dolayı saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans sürecim boyunca yoğun geçen ve psikolojik olarak zorlandığım günlerde benden desteğini esirgemeyen, çalışma ve azmi ile bana örnek olarak motivasyonumu yükselten laboratuvar arkadaşım Feyza KOSTAK'a ve bu süreç boyunca yanımda duran ve desteğini eksik etmeyen bütün arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Eğitim, öğrenim hayatım boyunca maddi, manevi desteğini eksik etmeyen, sevgilerini her zaman kalbimde hissettiğim, hayatıma yön verirken aldığım kararlara saygı duyarak daima arkamda duran, biricğim annem Zehra ÇELİK'e, her koşulda desteğini hissettiren canım babam İsa ÇELİK'e, neşe ve enerji kaynaklarım canım kardeşlerim Muhammet Tahir ÇELİK ve Hasan Basri ÇELİK'e teşekkürü borç bilir, minnetle sevgilerimi sunarım.

Sultan ÇELİK
KONYA-2025

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGE DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. p21-Aktive Kinaz 4 (PAK4) ve Glioblastoma Multiforme.....	1
1.2. Sinir Büyüme Faktörü (NGF) ve Kanser	1
1.3. Sinir Büyüme Faktörü (NGF) ve p21-Aktive Kinaz4 (PAK4)' ün İlişkisi	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Kanser	3
2.2. Glioblastoma Multiforme	4
2.2.1. Glioblastoma Multiforme'nin Sınıflandırılması	4
2.2.2. Glioblastoma Multiforme'nin Tedavisi	5
2.2.3. GBM Tedavisinin Zorlukları	8
2.3. GBM Sinyal Yolakları	10
2.4. Sinir Büyüme Faktörü.....	12
2.4.1. Sinir Büyüme Faktörü Reseptörleri	13
2.4.2. Sinir Büyüme Faktörü Sinyal Yolakları	14
2.5. p21 Aktive Kinaz-4 (PAK4)	17
2.5.1. Kanserde p21 aktive kinaz-4 (PAK4) Sinyal Yolakları.....	18
2.5.2. Tedavide PAK4 İnhibitörlerinin Kullanılması	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Hücre Kültürü	21
3.2. Hücre Canlılık Analizi	21
3.3. Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	21
3.4. Western Blot	22
3.4.1. Protein Lizatlarının Hazırlanması	22
3.4.2. Bradford Yöntemi ile Protein Miktarının Belirlenmesi	23
3.4.3. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)	23
3.4.4. Proteinlerin Jelden Polivinilidinden Florür (PVDF) Membrana Aktarılması	23
3.4.5. Membranın Bloklanması ve Antikorla İşaretlenmesi	24
3.4.6. Görüntüleme	24
3.5. <i>In vitro</i> Hücre Migrasyon Deneyi	24

3.6. <i>In vitro</i> Koloni Oluşturma Deneyi	25
3.7. 3 Boyutlu Hücre Kültürü	25
3.8. İstatistiksel Analiz.....	25
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	26
4.1. Araştırma Sonuçları	26
4.1.1. Farklı Glikoz Konsantrasyonlarında Kültüre Edilen LN229 ve U87-MG Hücrelerinin <i>in vitro</i> Morfolojik Görüntüleri ve Hücre Canlılık Düzeyleri	26
4.1.2. Farklı Glikoz Konsantrasyonları ile Kültüre Edilen U87-MG Hücrelerinin NGF Üretim Miktarı	27
4.1.3. Farklı Glikoz Konsantrasyonları Varlığında U87-MG Hücrelerinde NGF ve FBS Muamelelerinin Hücre Canlılık Düzeyine Etkileri.....	28
4.1.4. Farklı Glikoz Konsantrasyonları Varlığında U87-MG Hücrelerinde PI3K (LY294002), MEK (PD0325901) İnhibitörlerinin ve Apigeninin Hücre Canlılığı Düzeyine Etkisi.....	31
4.1.5. Farklı Glikoz Konsantrasyonları Varlığında U87-MG Hücrelerinde PAK4 İnhibisyonunun Hücre Canlılığı Düzeyine Etkisi.....	33
4.1.6. NGF Stimülasyonunun ve PAK4 İnhibisyonunun U87-MG Hücreleri Üzerindeki Zamana Bağlı Proliferatif Etkisi	35
4.1.7. LY294002 (PI3K inhibitörü), PD0325901 (MEK inhibitörü), Apigenin ve PF3758309 (PAK4 inhibitörü) İnhibitörlerinin U87-MG Hücrelerinde PAK4, pPAK4, AKT, pAKT, ERK ve pERK Protein Düzeylerine Etkisi.....	36
4.1.8. NGF Stimülasyonunun PAK4 Aktivasyonu Üzerindeki Etkisi.....	38
4.1.8.1. NGF Stimülasyonunun ve PAK4 İnhibisyonunun U87-MG Hücrelerinde EMT Sürecine Etkileri	40
4.1.9 NGF Stimülasyonunun ve PAK4 İnhibisyonunun U87-MG Hücrelerinin Migrasyon Kabiliyeti Üzerindeki Etkileri	41
4.1.10. NGF Stimülasyonunun ve PAK4 İnhibisyonunun U87-MG Hücrelerinin Koloni Oluşturma Yeteneği Üzerindeki Etkisi.....	43
4.1.11. NGF Stimülasyonunun ve PAK4 İnhibisyonunun Üç-Boyutlu (3D) Kültürde U87-MG Hücrelerinin Sferoid Büyüklüğüne Etkisi.....	44
4.2. Tartışma	46
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	53
5.1 Sonuçlar	53
5.2 Öneriler	54
6. KAYNAKLAR	55

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

g: gram
L: litre
mL: mililitre
ng: nanogram
nm: nanometre
pg: pikogram
 α : alfa
 β : beta
 μ g: mikrogram
 μ l: mikrolitre
 μ M: mikromolar

Kısaltmalar

ATM: Ataksi telenjektazi mutanı
BBB : Beyin Kan Bariyeri
BDNF: beyin kaynaklı nörotrofik faktörü
BTB: Beyin Tümör Bariyeri
CART-T: Kimerik Antijen Tedavisi
CNS: Merkezi Sinir Merkezi
CSC: Kanser Kök Hücresi
Da: Dalton
DDR: Diskoidin Domain Reseptörü
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO: dimetil sülfoksit
ECM: Ekstraselüler Matriks
EGF: Epitelyal Büyüme Faktörü
EGFR: Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
ELISA: Enzym-Linked Immunosorbent Assay
EMT: Epitelyal Mezenkimal Geçiş
FAP: fibroblast aktivasyon proteini
FBS: Fetal Bovine Serum
FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FGFR: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
GBM: Glioblastoma Multiforme
GSC: Glioma Kök Hücreleri
HGF: Hepatosit Büyüme Faktörü
IGFR: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü
MAPK: Mitojen Aktive Protein Kinaz
MRI: Manyetik Rezonans Görüntüleme
mTOR: Rapamisin'inin memeli hedefi
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromid
NGF: Sinir Büyüme Faktörü
NSC: Nöral Kök Hücre
NT-3: Nörotrofin 3
PAGE: Poliakrilamid Jel Elektroforezi

PAK: p21 aktive kinaz
PAK4: p21 aktive kinaz-4
PDGF: Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
PDGFR: Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü
PDL-1: Programlanmış Hücre Ölüm Ligandı 1
PET: Positron Emisyon Tomografi Taraması
p-gp: p-glikoproteini
PI3K: Fosfatidilinositol 3-kinaz
proNGF: Sinir Büyüme Faktörü Öncülü
PVDF: Polivinilidin Florür
Rpm: dakikadaki dönüş sayısı
RSK: Ribozomal s6 Kinazı
RT: Kemoterapi
RTK: Reseptör Tirozin Kinaz
TME: Tümör Mikroçevresi
TMZ: Temozolomid
TrkA: Tropomyozin reseptörü kinaz A
TTF: Tümör Tedavi Alanı
VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VGFR: Vasküler Büyüme Faktörü Reseptörü
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
XRT: Radyoterapi

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL	SAYFA
Şekil 2.1. Kanserin Temel Özellikleri A) 2011 yılında belirlenmiş olan kanserin temel özellikleri B) 2022 yılında belirlenmiş olan kanserin temel özellikleri.	4
Şekil 2.2. GBM' nin köken aldığı hücreler ve heterojenliği.	5
Şekil 2.3. Hastalığın yayılmasını gösteren GBM'li bir hastanın MRI taramaları. A) Ameliyat öncesi tarama, tümörün çevresi ödem ile çevrili. B) Ameliyat ve radyasyon tedavisi sonrası tarama. C) Ameliyattan 6 ay sonra tümörün yeniden nüks etmesi ve ikinci tümör oluşumu. D) Her iki tümörün rezeksiyon sonrası taramaları. E) 3 ay sonrasında tümörün rezeksiyon noktasında nüks ettiği ve diğer yarım küreye metastazını gösteren tarama.	8
Şekil 2.4. NGF, TrkA ve p75NTR aracılı sinyallemeyle ilgili hücre içi yollar.	15
Şekil 2.5. Kansere çalışmalarında TrkA ve p75NTR'nin moleküler etkileşimleri.	16
Şekil 2.6. PAK4'ün etki alanı yapısı.	18
Şekil 2.7. Kanserde PAK4' ün rolleri.	19
Şekil 4.1. Farklı glikoz konsantrasyonları ile muamele edilmiş LN229 ve U87-MG hücrelerindeki morfolojik değişim ve hücre canlılığı üzerindeki etkisi. A) 0.2- 1- 4.5 g/L glikoz ile muamele edilmiş LN229 ve U87-MG hücrelerin 48.saatte 20X objektif ile alınmış mikroskop görüntüleri. B) 0.2- 1- 4.5 g/L glikoz ile muamele edilmiş LN229 ve U87-MG hücrelerinin %canlılık analizleri. Grafikte p değeri **, p<0.01, ***, p<0.001, ****, p<0.0001 ile ifade edilmiştir	27
Şekil 4.2. Farklı glikoz konsantrasyonları ile muamele edilmiş U87-MG hücrelerinden elde edilen koşullandırılmış besiyerindeki β-NGF miktarı. Grafikte p değeri **, p<0.01, ***, p<0.001, ****, p<0.0001 ile ifade edilmiştir.	28
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda NGF ve FBS uygulanmış U87-MG hücrelerinin %canlılık analizi. A)0.2- 1- 4.5 g/L glikoz, %0.5 FBS ve farklı konsantrasyonlarda NGF (20- 50- 100- 200 ve 500 mg/ml) ile muamele edilen hücreler B) 0.2- 1- 4.5 g/L glikoz ve farklı konsantrasyonlarda FBS (%0.1- 0.5- 1- 5- 10) ile muamele edilen hücreler.Grafikte p değeri **, p<0.01, ***, p<0.001, ****, p<0.0001 ile ifade edilmiştir.	30
Şekil 4.4. Farklı inhibitörlerle muamele edilen U87-MG hücrelerinin % canlılık analizi. A)0.2- 1- 4.5 g/L glikoz, %10 FBS ve farklı inhibitörlerle muamele edilen hücreler B) 0.2- 1- 4.5 g/L glikoz, 100ng/ml NGF ve farklı inhibitörlerle muamele edilen hücreler.LY; 20 µM LY294002, PD; 20 µM PD0325901, API-50; 50 µM Apigenin, API-100; 100 µM Apigenin uygulandı. Grafikte p değeri **, p<0.01, ***, p<0.001, ****, p<0.0001 ile ifade edilmiştir.	32

Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda uygulanmış PF3758309 inhibitörünün U87-MG hücrelerindeki % canlılık analizi. A) 0.2- 1- 4.5 g/L glikoz, %10 FBS ve farklı konsantrasyonlarda PF3758309 inhibitörü (0-0.1-0.5-1 µM) uygulanan hücreler. B) 0.2- 1- 4.5 g/L glikoz, %0.5 FBS, 100ng/ml ve farklı konsantrasyonlarda PF3758309 inhibitörü (0-0.1-0.5-1 µM) uygulanan hücreler. Grafikte p değeri **: p<0.01, ***; p<0.001, ****; p<0.0001 ile ifade edilmiştir. 34

Şekil 4.6. U87-MG hücrelerine NGF, PF+NGF, PF muamelesi sonucunda zamana bağlı % canlılık analizleri. A) Uygulamadan 48 saat sonra mikroskop altında U87-MG hücrelerinin morfolojik görüntüleri (40X objektif). B) Uygulamanın ardından 24,48 ve 78. saatte U87-MG hücrelerinin % canlılık grafikleri. Grafikte p değeri **: p<0.01, ***; p<0.001, ****; p<0.0001 ile ifade edilmiştir. 35

Şekil 4.7. NGF ile uyarılan ve inhibitörler ile muamele edilen U87-MG hücrelerinin western blot analizi. A) PAK4, pPAK4, AKT, pAKT, ERK ve pERK proteinlerinin ifade düzeylerinin jel görüntüsü. PAK4(B), pPAK4(C), AKT(D), pAKT (E), ERK(F), pERK (G) proteininin ifade düzeyinin grafiği. LY; 20 µM LY294002, PD; 20 µM PD0325901, API-50; 50 µM Apigenin, API-100; 100 µM Apigenin, PF0.5; 0.5 µM PF3758309 ve PF 1; 1 µM PF3758309 uygulandı. 37,38

Şekil 4.8. NGF ile uyarılan PF3758309 inhibitörü ile muamele edilen U87-MG hücrelerinin western blot analizi. A) PAK4, pPAK4 ve p21 ifade düzeylerinin jel görüntüsü. PAK4(B), pPAK4(C), p21(D) proteininin ifade düzeyinin grafiği. 39

Şekil 4.9. NGF ile uyarılan PF3758309 inhibitörü ile muamele edilen U87-MG hücrelerinin western blot analizi. A) Twist, vimentin ve e-kadherin ifade düzeylerinin jel görüntüsü. Twist(B), Vimentin(C) E Kadherin(D) proteininin ifade düzeyinin grafiği. 41

Şekil 4.10. NGF ile uyarılan PF3758309 ile muamele edilen U87-MG hücrelerinin migrasyon analizi. A) U87-MG hücrelerinin migrasyon görüntüleri. B) U87-MG hücrelerinin % migrasyon grafiği. Grafikte p değeri **: p<0.01, ***; p<0.001, ****; p<0.0001 ile ifade edilmiştir. 42

Şekil 4.11. NGF uyarımının ve PF 3758309 muamelesinin U87-MG hücrelerinin koloni oluşturma yeteneği üzerindeki etkisi. A) 7.günün sonunda crystal violet ile boyanmış hücrelerin görüntüsü. B) ajanlar ile muamele edildikten 24 saat sonra hücrelerin morfolojisi. C) U87-MG hücrelerinin 7.günün sonunda kapladıkları alanın % grafiği. Grafikte p değeri **: p<0.01, ***; p<0.001, ****; p<0.0001 ile ifade edilmiştir. . . . 43,44

Şekil 4.12. NGF uyarımı ve PF37758309 inhibitörünün U87-MG hücrelerinin oluşturduğu sferoid büyüklüğüne etkisi. A) Sferoid yapılarının 5 günün sonunda mikroskop altında alınan görüntüleri. B) Uygulanan ajanların sferoid büyüklüğüne etkisinin alan grafiği. Grafikte p değeri **: p<0.01, ***; p<0.001, ****; p<0.0001 ile ifade edilmiştir. 45

ÇİZELGE DİZİNİ

ÇİZELGE

SAYFA

Çizelge 3.1. Jel hazırlamak için kullanılan malzemelerin miktarları. **28**

1. GİRİŞ

1.1. p21-Aktive Kinaz 4 (PAK4) ve Glioblastoma Multiforme

p21 aktive kinaz (PAK4), hücre büyümesi, hareket edebilme yeteneği ve hayatta kalma gibi biyolojik süreçlerde rol oynayan bir serin/treonin kinazdır. PAK4, özellikle kanser hücrelerinin invazyonu ve metastazı ile ilişkisi kanser araştırmaları açısından önemli bir hedef olarak öne çıkmaktadır.

Glioblastoma Multiforme (GBM), beyin tümörleri arasında en yaygın olarak görülen, agresif karakterde ve tedaviye dirençli tümörlerden biridir. Araştırmalar, PAK4'ün tümör hücrelerinin proliferasyonu ve invazyonunda etkili olduğunu göstermektedir. PAK4 ifadesinin artması GBM hücrelerinin kötü prognozu ile ilişkilendirilmiştir.

1.2. Sinir Büyüme Faktörü (NGF) ve Kanser

Sinir büyüme faktörü (NGF), sinir hücrelerinin büyümesi, hayatta kalması ve farklılaşmasında önemli rol oynayan bir nörotrofik faktördür. NGF'in temel görevi, nöronların onarımını kolaylaştırarak sinir sisteminin gelişmesini desteklemektedir. Bununla birlikte, NGF kanser gelişimi ile yakından ilişkilidir. Bazı kanser hücreleri NGF ve NGF reseptörlerini (TrkA ve p75NTR) yüksek düzeyde ifade ederek kanser hücrelerinin büyümesini ve yayılmasını destekler. Kanser hastalarında sık görülen ağrılar, tümörün etrafındaki sinirlerin etkilenmesi ile ilişkilidir. NGF, sinirlerin yeniden düzenlenmesi ve ağrının iletilmesine katkıda bulunabilir. NGF, kanser hücrelerinin metastaz yapmasında katkıda bulunacak bazı sinyal yollarını da tetikleyebilir. Sinir hücreleri ile tümör hücreleri arasındaki etkileşimler, kanserin yayılmasında yardımcı olur. NGF ve hücrel yolları, kanser tedavisinde hedef alınabilecek potansiyel hedeflerdir. Günümüzde NGF inhibitörleri, kanser tedavisinde yeni bir strateji olarak değerlendirilmektedir.

1.3. Sinir Büyüme Faktörü (NGF) ve p21-Aktive Kinaz4 (PAK4)'ün İlişkisi

Sinir büyüme faktörü (NGF) ve p21 aktive kinaz (PAK4) arasındaki ilişki, sinir hücrelerinin gelişimi ve nörolojik işlevlerle ilgili bazı önemli özellikler taşımaktadır. Araştırmalar, NGF'in PAK4 üzerinde etkili olabileceğini, bunun da nöroprotektif etkilere veya nörolojik hastalıklara karşı koruyucu mekanizmalara yol açabileceğini göstermektedir. Örneğin, NGF'in nöroprotektif etkileri, PAK4'ün aktivasyonu ile

ilişkilendirilebilir. Ayrıca, NGF ve PAK4 arasında karşılıklı etkileşimler, hücrelerde sinyal iletimini etkileyerek sinir hücresi büyümesini ve onarımını destekleyebilir.

NGF ve PAK4 arasındaki özgün ilişki ve etkileşimler konusunda daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Tez çalışmamızda glioblastoma hücrelerinde NGF uyarımının olası PAK4 regülasyonu ve kanser gelişimi üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

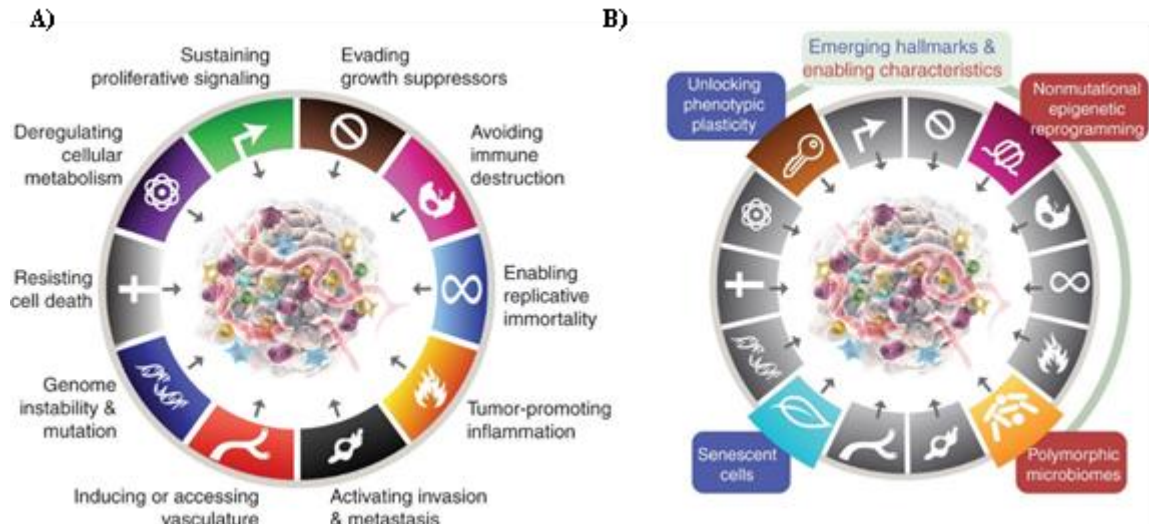
2.1. Kanser

Sağlıklı hücreler, gerektiğinde yeni hücreleri oluşturmak için çoğalırlar. Hasar gördüklerinde veya yaşlandıklarında ise apoptoza uğrarlar. Düzenli bir şekilde işleyen bu sürecin bozulması, hasarlı hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi ve vücudun diğer bölgelerine yayılması sonucunda kanser gelişebilmektedir (NCI,2021).

Dünya Sağlık Örgütü' nün (WHO) 2020' de paylaştığı verilere göre kanser dünya çapında 20 milyon insanı etkilemiş ve 10 milyon kişinin ölümüne sebep olmuştur (*World Health Organization (WHO)*, t.y.) Kanser, yüksek düzeyde düzenlenmiş hücresel sistemlerdeki bozukluklardan kaynaklanmaktadır. Kanser gelişiminin ilk basamağının nasıl meydana geldiği halen araştırma konusudur (Hanselmann & Welter, 2016).

Günümüzde kanser tedavisi için önemli terapötik stratejiler geliştirilmesine rağmen halen etkin yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Tedavide, genellikle tümörün evresine ve bulunduğu bölgeye bağlı olarak cerrahi müdahale, kemoterapötik hedefleme, radyoterapi ve immünoterapi uygulanmaktadır. Genetik olarak heterojen olduğu bilinmesine rağmen aynı kanser tanısı konmuş tüm hastalara benzer tedavi planı uygulanır. Genetik heterojenite ilaç dirençliliğine neden olabilmektedir. Tümör hücrelerinin genetik çeşitliliği, hastalığın temel sebebinin saptanamaması, teşhis araçlarının yeterli olmaması ve kişiye özel tedavi yaklaşımlarının eksikliği nedeniyle uygulanan tedaviler çoğu zaman başarısızlıkla sonuçlanır (Palumbo vd., 2013). Hastalığın progresyonu hakkındaki güncel literatür, kanserin çok yönlü mekanizmalarla ilişkili olması ve mevcut tedavilerin yetersizliği, yeni araştırma ve tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (Upadhyay, 2020).

Yeni çalışmalarla birlikte kanserin temel özellikleri güncellenmekte ve yeni bakış açıları kazandırılmaktadır. Bu özelliklerin başında, çoğalma sinyallerinin sürdürülmesi, büyüme baskılayıcı sinyallerden kaçma ve metabolizmanın yeniden düzenlenmesi gelmektedir. Genomik kararsızlık, mutasyonların birikimi, inflamasyonun desteklenmesi, bağışıklık sisteminden kaçınabilmesi tedaviyi zorlaştıran özelliklerinin başında gelmektedir (Hanahan & Weinberg, 2000). (**Şekil 2.1.**)



Şekil 2.1. Kanser'in Temel Özellikleri A) 2011 yılında belirlenmiş olan kanserin temel özellikleri B) 2022 yılında belirlenmiş olan kanserin temel özellikleri (Hanahan & Weinberg, 2011)(Hanahan, 2022).

Kanser hücrelerinin anjiyogenezi desteklemesi ile ihtiyaç duyduğu besine ulaşabilmesi sonucunda büyümesine olanak sağlanmaktadır. Doku invazyonu ve metastaz kanserin başka dokulara, organlara yayılması ve hastalığın seyrinin kötüleşmesine neden olmaktadır (Hanahan & Weinberg, 2011). Son yıllarda temel özelliklere ek olarak epigenetik yeniden programlama, yaşlanmış hücreler, polimorfik mikrobiyom ve fenotipik plastisite gibi özellikler de eklenmiştir. Bu yaklaşımlarla kansere karşı yeni bakış açılarının kazandırılması, hastalığın belirtileri ve ilerleyiş mekanizmalarının aydınlatılması mümkün olabilecektir (Hanahan, 2022).

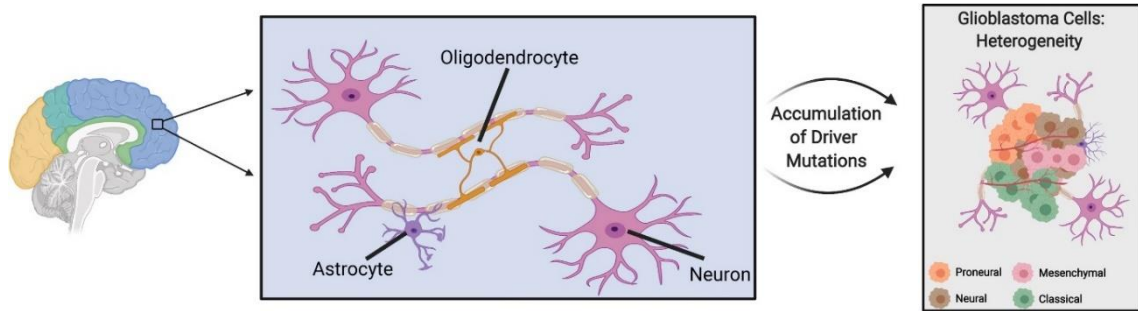
2.2. Glioblastoma Multiforme

Teşhis edilen yeni kanser vakalarının %2'sini merkezi sinir sistemi (MSS) kanserleri oluşturmaktadır. MSS tümörleri, kansere bağlı ölümlerin 12. sırasında, Glioblastoma multiforme ise 17. sırasındadır. 2020 yılında elde edilen verilere göre, 18.020 ölümlerle birlikte 23.890 yeni beyin kanser vakası teşhis edilmektedir (Kirstein et al., 2020).

2.2.1. Glioblastoma Multiforme'nin Sınıflandırılması

Glioma, genel olarak primer beyin tümörlerini tanımlamak için kullanılmaktadır. MSS' de en çok rastlanan kötü huylu tümörlerdir. Köken aldıkları hücre tiplerine göre sınıflandırılırlar. Bunlar; astrositomalar, oligodendrogliomalar, ependimomlar ve karışık gliomalardır (Chen et al., 2017). (Şekil 2.2.).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün yaptığı sınıflandırmada histopatolojik özellikler göz önüne alınarak gliomalar I, II, III ve IV. derece olarak sınıflandırılmaktadır. I. ve II. derece gliomalar, düşük çoğalma sinyallerine sahip ve cerrahi müdahale ile tedavisi mümkün iken III. (anaplastik) ve IV. (glioblastoma) derece gliomalar kötü huylu ve invazivdirler. Glioblastoma Multiforme (GBM), DSÖ tarafından IV. derece glioma olarak belirlenmiştir (Witthayanuwat et al., 2018).



Şekil 2.2. GBM' nin köken aldığı hücreler ve heterojenliği (Wu et al., 2021).

GBM tümörleri, beyin parankiminde üç tip hücreden köken alırlar. Bunlar; nöral kök hücreler (NSC), NSC' den türetilen astrositler, oligodendrosit öncü hücrelerdir (Şekil 2.2.). GBM, kapsamlı tümör içi hücreler ve heterojenite ile karakterize edilir. Bundan dolayı, mezenkimal, klasik, pronöral ve nöral olmak üzere dört alt gruba ayrılmışlardır (Wu et al., 2021).

2.2.2. Glioblastoma Multiforme'nin Tedavisi

Farklı hücre tiplerindeki gen ifade değişimleri, invaziv kabiliyet, radyo ve kemoterapiye direnç, tümör mikroçevresinin gelişimi ve glioma kök hücrelerinin varlığı mevcut tedaviyi zorlaştırmaktadır (Janjua et al., 2021). Bugüne kadar, GBM'nin gelişimi ile ilgili spesifik bir neden ortaya konulamamıştır. Tüm vakaların yaklaşık %5'i genetik yatkınlıkla ilişkilendirilmiştir. Bunun dışında iyonlaştırıcı radyasyona, böcek ilaçları gibi veya petrokimya endüstrisinde kullanılan kimyasallara maruz kalma ve sigara içme gibi etkenler GBM'e neden olabilecek faktörlerden bazılarıdır (Grochans et al., 2022).

GBM'nin tedavisi kişiye bağlı değişiklik gösterir ve oldukça maliyetlidir. GBM'nin yeri ve boyutu, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) veya pozitron emisyon tomografi taraması (PET) gibi görüntüleme teknikleriyle belirlenir (Kesari, 2011). Teşhis sonrası tümörün boyutuna ve yerine bağlı olarak tümör kitlesi cerrahi müdahale ile temizlenir (Lima et al., 2012). Cerrahi operasyondan sonra, temozolomid (TMZ), kemoterapi ve

radoterapi ile tedaviye devam edilmektedir. Kemoterapinin hücre ölümüne neden olduğu ana mekanizma DNA hasarıdır. Hücrelerin bu hasara karşı verdiği tepki, hücrel ve mikroçevresel faktörler tarafından belirlenir (Gong vd., 2021). Mevcut araştırmalar, radyoterapinin bazı beyin kanserlerinde diğerlerine göre daha az etkili olduğunu göstermiştir. GBM'ler, radyoterapiye en dirençli agresif kanser türleri arasındadır (Caragher vd., 2019). Literatürde U87, U251 ve T98G hücre hatları radyoterapiye en dirençli hücre hatları olduğu belirlenmiştir (Merrick vd., 2021). Radyoterapiye duyarlılık esas olarak p53 ve DNA hasar yanıtının düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan ataksi telenjiektazi mutanlığı (*ATM*) geninin ekspresyonu ile ilişkili olduğu saptanmıştır (Rabah vd., 2023). MDM2 aracılı p53 baskılanması, primer GBM'nin en az %25'inde ve sekonder GBM'nin %60'ında bozulduğu tespit edilmiştir. MDM2/p53 ekseninin kanser tedavisinde radyoterapinin etkinliğini azalttığı bildirilmiştir. Bu nedenle, MDM2/p53 etkileşiminin inhibe edilmesi, glioblastoma tedavisi de dahil olmak üzere potansiyel bir anti-kanser stratejisi olarak kabul edilmektedir (Okazaki, 2022). Radyoterapi direnci ayrıca kanser kök hücre (KKH)'lerin varlığı, hipoksi ve artmış DNA tamiri nedeniyle kaynaklanabilir (Ali vd., 2020). Radyoterapi ile tedavi edilen primer malignitelerin, sekonder MSS tümörleri geliştirme ihtimalinin yedi kat daha fazla olduğu gözlenmiştir (Davis, 2018). Radyo-direnç mekanizmalarının yanı sıra, tümör nüksünün ana nedenlerinden biri radyoterapinin primer tümörde invazyon ve hücre "kaçışını" indüklemesi olarak rapor edilmiştir. Cerrahi operasyon sonrası sınırlarda, %90'a varan invazyon oranları meydana gelebilmektedir (Nguemgo Kouam vd., 2018).

Tümör tedavi alanı (TTA) yaklaşımı, düşük yoğunluklu ve orta frekanslı elektrik (100-300 kHz) uygulanmasını içeren nispeten yeni bir non-invaziv terapötik yaklaşımdır (Fabian vd., 2019). TTA cihazları, hücre bölünmesini engellemeyi ve tümör büyümesini azaltmayı hedeflemektedir. Elektrik alanlarını oluşturabilmek için hastanın kafa derisine yerleştirilen dokuz yalıtılmış elektrottan oluşan bir aparat takılır. Özellikle TTA'lar, mitoz sırasında mikrotübüllerin normal polimerizasyon-depolimerizasyon sürecini bozduğu belirlenmiştir (Rominiyi vd., 2021).

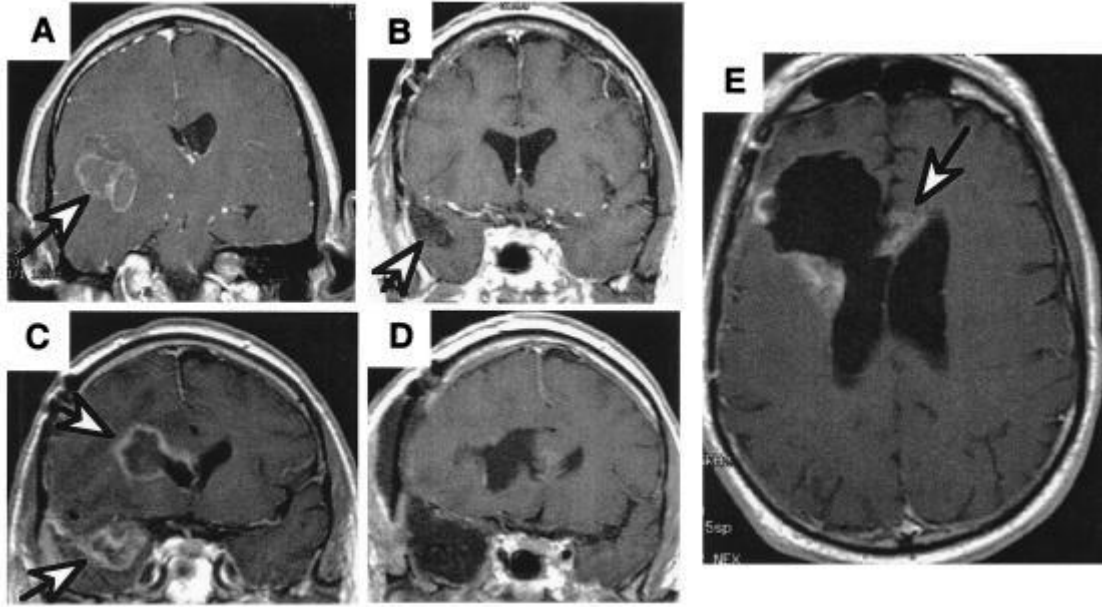
İmmünoterapi, kansere karşı savunma mekanizmalarının etkinliğini artırmayı amaçlayan bir tedavi yöntemidir. Birçok kanser türünün tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır ve bunlardan bazıları Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır (Esfahani vd., 2020). İmmünoterapi, gelecekte GBM tedavisinde önemli bir rol oynayabilecek tedavilerden biridir. Kimerik antijen tedavisi (CAR-T) hücre tedavisi, aşılarda, bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri ve onkolitik virüsler gibi GBM' i

tedavi etmek için uygulanan çeşitli immünoterapi yöntemleri söz konusudur (Huang vd., 2020).

Son yıllardaki gelişmelerle birlikte, kanser tedavisi spesifik olmayan sitotoksik ilaçlardan hedefe yönelik ilaçlara geçilmektedir (Zhong vd., 2021). Hedefe yönelik tedavide, kanser hücrelerinin bölünme ve yayılma kabiliyetlerini kontrol eden spesifik proteinler hedeflenmektedir. Bu ilaçlar, tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) gibi monoklonal antikorlar dahil olmak üzere küçük molekülleri içerir (Lee vd., 2018). Şimdiye kadar glioblastoma tedavisi için FDA tarafından onaylanan sadece vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) proteininin bir monoklonal antikor inhibitörü olan Bevacizumab onaylanmıştır (Fisher & Adamson, 2021).

Yağ oranı yüksek ve karbonhidrat oranı düşük ketojenik diyet GBM tedavisini destekleme potansiyeline sahiptir. Bunun temelinde, kanser hücrelerinin enerji ihtiyacı için büyük ölçüde glikoza ihtiyaç duyması yatar. Ketojenik diyet yoluyla glikoz alımı kısıtlanarak kanser hücrelerinin büyümesi engellenmeye çalışılır (Seyfried & Mukherjee, 2005). GBM'de ketojenik diyet kullanımını destekleyen bir çalışma, standart tedaviye ek olarak ketojenik diyet uygulayan hastaların, diyeti takip etmeyenlere göre daha uzun sağkalım oranına sahip olduğu belirlenmiştir (Rieger vd., 2014). Başka bir çalışma ise, ketojenik diyetin GBM tedavisinde uygulanan kemoterapinin etkinliğini artırabileceğini göstermiştir (Van der Louw vd., 2019).

Kemoterapi, cerrahi rezeksiyon ve radyasyon tedavisi GBM için başlıca güncel tedavi seçenekleridir. GBM açısından, bu tedavi seçeneklerinin etkinliği zayıftır ve yan etkileri vardır. Bu nedenle, hedefe yönelik tedavi stratejileri umut verici bir yaklaşımdır. Örneğin, Tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) ile endotelial büyüme faktörü reseptörü (EGFR) hedefli tedaviler, GBM tedavisi açısından iyi sonuçlara neden olmaktadır. Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR), programlanmış ölüm ligandı-1 (PD-L1) ve fosfatidilinositol-3-kinaz/ rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (PI3K / mTOR) yolağı hedefli tedaviler, monoterapi veya kombinasyon tedavisi olarak umut verici olabilmektedir. GBM için ayrıca siRNA-aracılı hedeflenmiş gen baskılanması, beyin kan bariyerinin (BBB) üstesinden gelmesi nedeniyle GBM'e karşı potansiyel bir terapötik yaklaşım olarak değerlendirilmektedir. Tüm bunların yanında, erken tanı ve hızlı tedavi başlangıcı, GBM hastalarının sağkalımı için oldukça önemlidir. MRI gibi görüntüleme teknikleri ile GBM tümörlerinin takibi ve hakkındaki detaylı bilgiler elde edilmekte ve tedavi süreci planlanabilmektedir. (**Şekil 2.3.**)



Şekil 2.3. Hastalığın yayılmasını gösteren GBM' li bir hastanın MRI taramaları. A) Ameliyat öncesi tarama, tümörün çevresi ödem ile çevrili. B) Ameliyat ve radyasyon tedavisi sonrası tarama. C) Ameliyattan 6 ay sonra tümörün yeniden nüks etmesi ve ikinci tümör oluşumu. D) Her iki tümörün rezeksiyon sonrası taramaları. E) 3 ay sonrasında tümörün rezeksiyon noktasında nüks ettiği ve diğer yarım küreye metastazını gösteren tarama (Holland, 2000).

2.2.3. GBM Tedavisinin Zorlukları

Geliştirilen tedavilere rağmen günümüzde glioblastoma (GBM) tam olarak tedavi edilememektedir. GBM tedavisinde yer alan zorluklar üç başlık altında değerlendirilmektedir; (1) dirençli alt popülasyonları içeren tümör heterojenitesi, (2) ilaçların verilmesini engelleyen tümörün lokasyonu ve (3) immün kaçıışı teşvik eden ve immün terapilerin etkinliğini sınırlayan lokal immün baskılanmanın indüklenmesi (Karim et al., 2016).

Tipik olarak GBM hücrelerinin çeşitli şekil ve boyutlarda olması sadece görünüm açısından değil, aynı zamanda gen ifade profilleri ve dolayısıyla fenotipler açısından da heterojen olduğunu göstermektedir. Bu heterojenite ile birlikte tümör mikroçevresinin katkısı ile birlikte tümör gelişimi desteklenmektedir (Omuro & DeAngelis, 2013).

GBM ilişkili mutasyonlar, kanserin malign ilerlemesini destekleyebilen büyüme faktörü sinyal yollarını tetikleyebilmektedir. Bunlar arasında vasküler endotelyel büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF) yolları yer almaktadır ("Malignant Gliomas in Adults," 2008).

GBM'in neden olduğu immün baskılamının tedavi başarısızlığına katkıda bulunduğu bilinmektedir. GBM'in kötü seyri ile bağlantılı olan CD133'ün aşırı ifade edildiği gösterilmiştir (Zeppernick et al., 2008). CD133'ün ifadesi, T-hücresi apoptozunun uyarılmasını sağlayarak immün baskılamaya yol açar (Lima et al., 2012b). Sonuç olarak, GBM'in heterojen doğası, yalnızca çeşitli tedavi seğeneklerine karşı direnci teşvik etmekle kalmaz, aynı zamanda tümör hücrelerinin immün sistemden kaçmasına izin vererek tümörün ilerleme olasılığını artırır (Jungk et al., 2019).

Beyin tümörlerinde iki bariyerin varlığı nedeniyle terapötik ajanların iletimi daha da kısıtlıdır. Bunlar; kan beyin bariyeri (KBB) ve beyin tümör bariyeridir (BTB). KBB'nin görevi nöral dengeyi ve maddelerin beyne geğişini kontrol etmektir. KBB, serebral endotel hücreleri, perisitler, astrositler, mikrogial ve düz kas hücrelerinden oluşur (Alyautdin et al., 2014). KBB'den yalnızca 500 Da'dan küçük ve lipofilik moleküller gibi seğici maddeler geğebilir. Büyük moleküler ağırlıklı ilaçların ve küçük farmasötik bileşenlerin %98'inin KBB'den geğemediği bilinmektedir. KBB, beyni toksin ve diğer zararlı maddelerden korumak için gereklidir ancak ilaç ve farmasötik bileşiklerin beyne iletilmesini de engellemektedir (Cardoso et al., 2010).

GBM hastalarında KBB'nin sağlam olduğu vakalar gözlemlense de bunun sıklıkla bozulduğu ve BTB yapısının ortaya çıktığı durumlar da bulunmaktadır. BTB düzensiz yapıda olması ve heterojen geğirgenliği sağlaması ile karakterizedir (Arvanitis et al., 2019). Proteaz enzimleri, VEGF ve HGF gibi maddelerin GBM hücreleri tarafından salgılanmasıyla BTB oluşumu gerėekleřir. Aynı zamanda BTB'nin heterojen yapısından dolayı bazı hipoksik bölgeler içerir. Bu bölgeler ise ilaçların ve farmasötik ajanların tümör dokusuna iletilmesini kısıtlar (Mudassar et al., 2020).

Bunun dışında KBB ve BTB, ilaçların hücre dışına atılımını sağlayan P-glikoproteinini (P-gp) eksprese edebilir. P-gp, TMZ dahil hidrofobik özellikte olan ilaçların %60'ının dışarı atılmasını sağlar (Munoz et al., 2015). Çoğu zaman GBM hücrelerinde P-gp'nin ifade düzeyi artmış durumdadır. Bu durum tümör bölgelerine eşit olmayan ilaç dağılımına, tümörün nüksüne dolayısıyla tedavi başarısızlığına neden olur (Arvanitis et al., 2019).

Tümörün bulunduğu konum, ilaçların tümöre iletilememesi ve nüks durumu tedavi zorluğunun önde gelen nedenlerindedir. Hastaların %5'inden azı 5 yıldan fazla hayatta kalabilmektedir. GBM hastalarının sağkalımı yaklaşık olarak 7.4 ay olduğu bilinmektedir (Janjua et al., 2021). Bu veriler göz önüne alındığında GBM için uygulanan

mevcut tedavilerin geliştirilmesi, biyolojik engellerin ortadan kaldırılması ve tümör mikroçevresinin aydınlatılması ile mümkün olacaktır.

2.3. GBM Sinyal Yolakları

Epitelyal mezenkimal geçiş (EMT), embriyogenez, yara iyileşmesi ve kanser gelişimi gibi fizyolojik ve patolojik süreçlerde rol oynayan temel mekanizmadır. Hücrelerin epitelyal özelliklerini kaybederek mezenkimal özellikler kazanmasını ifade eder. Literatürde, her biri farklı biyolojik koşullarda ortaya çıkan üç farklı EMT alt tipini tanımlamaktadır (Marconi vd., 2021).

Embriyonik gelişim de dahil olmak üzere normal doku dengesi, tip 1 EMT'den etkilenirken, tip 2 EMT yara iyileşmesi, organ fibrozu ve doku yenilenmesinde meydana gelir. Öte yandan Tip 3 EMT, genetik ve epigenetik değişikliklere uğramış, kanser gelişimini destekleyen ve tedaviye direnç gösteren neoplastik hücrelerle ilişkilidir (Dongre & Weinberg, 2019). Tip 3 EMT, hastalığın kötü prognozunu, tümörlerin bağışıklık sisteminden kaçışını ve doku invazyonunu destekler. GBM hücrelerinin mezenkimal özellikleri arttıkça göç etme konusunda daha yetenekli hale gelir. (Colella vd., 2019).

N-kadherin'in aşırı ifade edilmesi ve E-kadherin'in baskılanması, EMT'nin en belirgin özelliklerindedir (Loh vd., 2019). E-kadherin temel epitelyal belirteçtir ve düşük düzeyde ifade edilmesi, hücre kontaktlarının zayıflamasına neden olur (Na vd., 2020). Öte yandan, bir transmembran adezyon proteini olan N-kadherin'in aşırı ifade edilmesiyle hücrelerin invazyon kabiliyetlerinin artmasına neden olur (Noronha vd., 2021). EMT sürecinin tetiklenmesiyle birlikte GBM hücrelerinde radyoterapiye direnç gelişebildiği rapor edilmiştir (Lintz vd., 2017a).

Hücre iskeletinin ve ekstraselüler matriksin (ECM) yeniden şekillenmesiyle GBM hücreleri invaziv özellikler kazanır. Bu süreçte integrinler önemli roller üstlenmektedir (Lintz vd., 2017b). Hücre adezyonu ve göçü ECM'in moleküler ve fiziksel yapısı belirleyicidir. Normal beyin dokusunun ECM yapısı çoğunlukla hyaluronan, proteoglikanlar ve tenascin-C'den oluşur. GBM'deki ECM yapısı ise çoğunlukla kollajenler ve laminin gibi bazal membran bileşenlerinden oluşur. Bu bileşenlerin artışı hücre metastazını destekler niteliktedir (Mohiuddin & Wakimoto, 2021). Kollajen tip IV ve VI'nın GBM tümör büyümesi, anjiyogenez ve migrasyon için gerekli olduğu gösterilmiştir (Mammoto vd., 2013). Bu nedenle, kollajenler de dahil olmak üzere ECM elemanları, GBM için potansiyel terapötik hedefler olarak önerilmiştir (Gupta vd., 2021).

EGFR, fosfoinositid-3-kinaz (PI3K)/AKT, RAS ve STAT dahil olmak üzere hücre proliferasyonu, farklılaşması ve göçünde yer alan birçok sinyal yollarını düzenleyen bir tirozin kinaz reseptörüdür. EGFRvIII, hücre dışı ligand bağlama alanı bulunmayan (ekzon 2-7 delesyonu) ve GBM'lerin %50-60'ında yapısal olarak aktif olan mutant bir EGF reseptörüdür (Ramaswamy vd., 2019). İki reseptör arasındaki fark, aktive sinyal yollarında ortaya çıkar. EGFRvIII sinyali, wtEGFR sinyaline göre daha yüksek PI3K aktivitesine sahiptir (De la Iglesia vd., 2008).

Vasküler Endotel Büyüme Faktörü Reseptörü (VEGFR) ailesi üç farklı üyeden meydana gelen (VEGFR 1-3) bir reseptör tirozin kinazdır. Vaskülogenezi ve anjiyogenezi destekleyen bir reseptördür (N. Wang vd., 2017). GBM tümörlerinde VEGFR sinyali kontrolsüz hücre bölünmesine, hücre göçüne ve damar oluşumuna neden olur. GBM çevresindeki hipoksik mikroçevre VEGFR sinyalini tetikleyerek tümörlerin hipoksiden etkilenmemesine ve ayrıca radyoterapiye dirençli neden olur (Guarnaccia vd., 2018). Krcek vd., 2017).

Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptör (FGFR) ailesi, FGFR 1-4 olmak üzere dört reseptörden oluşur. Farklılaşma ve çoğalmanın yanı sıra MSS gelişmesinde yer alan temel biyolojik süreçleri kontrol eder (Guillemot & Zimmer, 2011). FGFR genetik mutasyonları GBM'de seyrek olarak görülse de astrositlerde FGFR'nin aşırı ifade edilmesi malign tümörlerin gelişmesine katkıda bulunur. Özellikle, FGFR3 ve FGFR4'ün invaziv GBM ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Kato & Nakagama, 2014).

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptör (PDGFR) ailesi, PDGFR α ve PDGFR β olmak üzere iki reseptör içerir. Bu reseptörler embriyogenez sırasında doku gelişimi için gereklidir. PDGFR mutasyonları GBM gelişimi ve metastazı ile ilişkilendirilmiştir (Cao, 2013). İki reseptör de GBM'nin ilerlemesine ayrı şekillerde katkıda bulunur. PDGFR α mutasyonları, GBM gelişimi ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. PDGFR β ise tercihen glioma kök hücrelerinde (GKH) ifade edilir ve burada Sox2 gibi kök hücre belirteçlerinin seviyesini düzenlemektedir. (Cui vd., 2021) .

c-MET olarak tanımlanan hepatosit büyüme faktörü reseptörü (HGFR), embriyogenez ve doku homeostazı süresince mezenkimal ve epitelyal hücrelerinin etkileşiminde önemli roller oynamaktadır. GBM hücreleri HGFR'ı aktive eden faktörleri yüksek düzeyde üretmektedir. HGFR aktivasyonu PI3K, STAT3 ve RAS sinyallerini önemli ölçüde aktive eder. Araştırmalar, GBM örneklerinin yaklaşık %40'nın HGFR ilişkili olarak meydana geldiğini göstermiştir (Cheng & Guo, 2019).

İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü 1 (IGFR-1), doğum öncesi ve doğum sonrası gelişimde önemli rol oynadığı bilinen IGF reseptör ailesinin bir üyesidir (Belfiore vd., 2017). Normal dokudaki IGFR1'in ifadesi, beyin gelişimi sırasında hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenler. GBM'lerdeki ifadesinin artışı, neoplastik dönüşüme, TMZ direncine ve kötü prognoza neden olan PI3K/AKT ve MAPK yollarının aktivasyonu ile ilişkilidir (Maris vd., 2015).

Üçlü sarmal yapıdaki kollajen, diskoidin domain reseptörlerini (DDR) (DDR1 ve DDR2) sürekli bir şekilde aktive eder. DDR'ler, proliferasyon, göç ve ECM'nin yeniden şekillenmesi dahil olmak üzere çeşitli süreçleri düzenleyerek embriyonik gelişimde hayati bir rol oynar (Carafoli & Hohenester, 2013). GBM'ler, DDR sinyalini ve ECM sertliğini sağlayan yüksek miktarda kolajen ile karakterizedir. GBM hücrelerinde DDR1 aşırı ifade edilmesi, invazyon ve kötü klinik sonuçlar ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Valiathan vd., 2012).

Ras/MAPK, PI3K/AKT, FAK/SRC ve DNA onarım sinyal yollarının düzenlenmesi GBM' de yaygın olarak bozulmuştur. RAS mutasyonları olmamasına rağmen, H-Ras veya K-Ras'ın ifade artışı astrositlerin GBM'e dönüşmesine neden olur (Abel vd., 2009). Hücre proliferasyonunu, invazyonunu, metastazını ve metabolizmayı kontrol eden PI3K/AKT ve FAK/SRC yolları, GBM'de kritik sinyal yollarıdır. PI3K, PTEN ve AKT mutasyonları GBM örneklerinde sıklıkla tanımlanmaktadır ve GBM gelişiminin temel destekleyicileridir (Hu vd., 2011).

DNA onarımı radyasyon veya kemoterapi direncini yöneten temel mekanizmalardan biridir. Bu direncin oluşmasında ana düzenleyicilerinden ve efektörlerinden biri Ataksi telenjipektazi mutanlığı (ATM) kinaz enzimidir. ATM aktivasyonu GBM vakalarında tedaviye dirence neden olabilmektedir (Bensimon vd., 2011).

2.4. Sinir Büyüme Faktörü

Sinir Büyüme Faktörü (NGF), tavuk embriyosunun vücut duvarına fare sarkomunun nakledilmesinden sonra R. Levi- Montalcini tarafından keşfedilmiştir. NGF, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin-3 (NT-3) ve nörotrofin-4/5'i içeren, nörotrofik faktör ailesine aittir (Rocco et al., 2018).

Başlangıçta yalnızca periferik sempatik ve duysal nöronların büyümesi ve farklılaşması üzerinde etki ettiği düşünülmüştür. NGF'in, sinir sistemindeki hedef hücrenin yanı sıra mast hücreleri, eşey hücreleri, T ve B lenfositler, granülositler,

monositler, keratinositler, endotel hücreleri, hormon salgılayan hücrelerle etkileşime girdiği keşfedilmiştir (Rocco et al., 2018). İmmün ve endokrin sistemlere ait hücreler üzerindeki NGF etkisi, nörotrofinin, homeostatik süreçlerin düzenlenmesinde hayati öneme sahip nöroimmünoendokrin mekanizmalar üzerinde modülatör bir rol oynadığı ileri sürülmektedir. Bu hipotez bize hem hayvan modellerinde hem de insan çalışmalarında stres varlığında dolaşımdaki ve beyindeki NGF düzeylerinin önemli farklılıklar olduğu gösterilmiştir (Niewiadomska et al., 2011).

In vivo ve *in vitro* çalışmalar, NGF'nin periferik ve merkezi sinir sistemine ait gelişmekte olan nöronların; farklılaşmasında, hayatta kalmasında, dejenere olan nöronların korunmasında belirgin bir rol oynadığını doğrulamıştır. Ayrıca, NGF'nin nörotransmitter ifadesi, salımının düzenlenmesini teşvik ettiği, sinaps oluşumunu kolaylaştırdığı ve sinaptik aktiviteyi modüle ettiği kanıtlanmıştır (Raychaudhuri et al., 2001).

NGF geninden kopyalanan çözünür 246 amino asitli bir pro-peptit olan bir biyokimyasal öncü (proNGF) olarak üretilir. ProNGF daha sonra sırasıyla furin ve matriks metaloproteinazlar tarafından işlenerek salgılanır. proNGF olgun NGF'in öncülüdür, ancak yalnızca bir öncü polipeptid değil, aynı zamanda p75NTR ve sortilin reseptörlerini aktive edebilir ve bu reseptörlerin ifade düzeyine bağlı olarak nöronal farklılaşmayı veya apoptozu teşvik ederek kendi biyolojik aktivitesini ortaya koyar. İlginç bir şekilde proNGF, meme kanseri, prostat kanseri ve melanom dahil olmak üzere birçok kanser türünün malign ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir. proNGF'nin daha önce GBM hücre hattı U87MG'den salgılandığı bildirilmiş olsa da, hasta numunelerinde proNGF'nin ekspresyonu ve potansiyel işlevi tam olarak açıklanmamıştır (Marsland et al., 2023) (Kliemann et al., 2004).

2.4.1. Sinir Büyüme Faktörü Reseptörleri

NGF'nin biyolojik etkileri, bağlandığı reseptör tipi ile doğrudan ilişkilidir. NGF, hücresel etkilerini üç farklı (TrkA, p75NTR ve sortilin) reseptör üzerinden gösterir. NGF, reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesi olan TrkA (tropomyozin reseptörü kinaz A) reseptörüne bağlanarak hücre sağkalımını destekler. Bir tümör nekroz faktörü reseptörü (TNFR) olan p75NTR ve sortiline bağlanarak hücre apoptozuna neden olmaktadır. Bilinen tüm nörotrofik faktörlerin p75NTR'ye bağlanabildiği bilinmektedir (Peleshok & Saragovi, 2006). Sortilin, aynı zamanda bir Tip 1 transmembran reseptörüdür ve NGF için tanımlanan son reseptördür. Sortilin reseptörü başlangıçta, reseptörle ilişkili protein

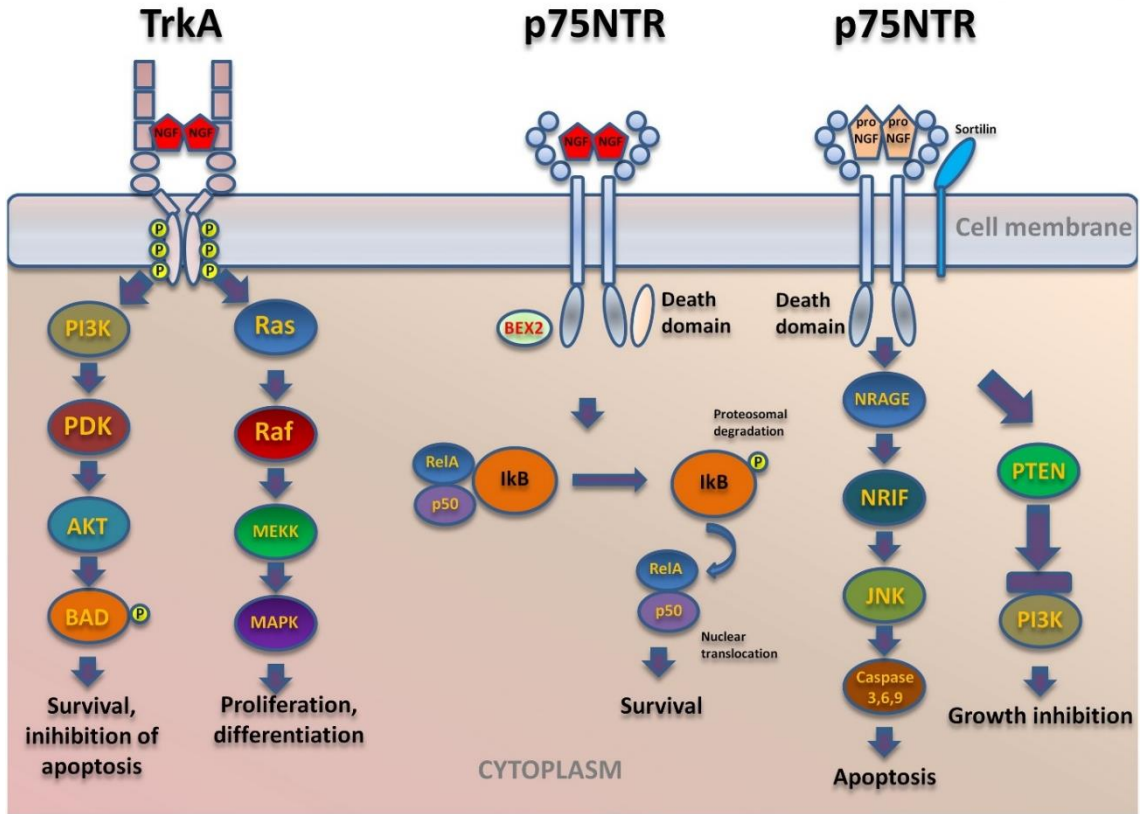
(RAP) ile bağıladığı ve Glut4'ü transport eden veziküllerde ifade edildiği belirlendi. Sortilin, TrkA ve p75NTR'yi birlikte eksprese eden hücrelerin hayatta kalmak yerine apoptoz yoluyla proNGF'ye yanıt vermesini sağlayan bir ko-reseptördür. Aslında, p75NTR ve TrkA reseptörleri sıklıkla birlikte eksprese edilir. Birbirleriyle etkileşime girer ve NGF sinyallerinin iletilmesinde iş birliği yaptıkları belirlenmiştir. Birçok çalışma, p75NTR'nin, TrkA ile birlikte aktive olduğunda hayatta kalma sinyaline aracılık ettiği, tek başına ise nöronların hücre ölümünü indüklediği bilinmektedir (Paiardini & Caputo, 2008). pro-NGF, p75NTR ve sortilin içeren bir reseptör kompleksine bağlanabilmekte ve hücre ölümü sinyalini aktive edebilmektedir. Özetle, NGF etkileşime girdiği reseptöre bağlı olarak hücrelerin sağkalımına veya apoptozuna neden olmaktadır (Niewiadomska et al., 2011).

2.4.2. Sinir Büyüme Faktörü Sinyal Yolakları

NGF hücrelerin hayatta kalmasını, apoptotik ölümlerini ve farklılaşma süreçlerini kontrol eden sinyal yolaklarını düzenler. NGF'nin TrkA'ya bağlanmasıyla, TrkA sitoplazmik kuyruklarındaki tirozin rezidularını dimerize ederek kendini fosforile eder. (**Şekil 2.4.**) Bu fosforillenmiş bölgeler daha sonra Grb2 ve GAB1 dahil olmak üzere adaptör proteinlerin sitoplazmaya bağlanmasını ve fosforilasyonunu sağlar. Bu proteinler ya fosfatidilinositol-3 kinazı (PI3K) ya da Ras'ı aktive eder. Aktive edilmiş Ras, daha sonra mitojenle aktive olan protein kinazı (MAPK) ve ardından ribozomal S6 kinazı (RSK) aktive eden Raf1 fosforile eder (Sofroniew et al., 2003). AKT veya RSK'nin aktivasyonu sonrasında anti-apoptotik etkilere aracılık eden siklik AMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (CREB) transkripsiyon faktörünün fosforilasyonu meydana gelir. NGF eksikliğinde, AKT veya MAPK yolakları c-Jun gibi hücre ölümünü teşvik eden transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini baskılayamaz ve bu da apoptozu neden olur (Linggi et al., 2005).

p75NTR'ye olgun NGF dimerlerinin bağlanması neticesinde I kappa B (I κ B) inhibitörünün fosforilasyonu ve ardından transkripsiyonu aktive eden RelA/p50 dimerlerinin çekirdeğe translokasyonu yoluyla hücrelerin hayatta kalmasını sağlar (Demir et al., 2016) (**Şekil 2.4.**). Bununla birlikte, yardımcı reseptör olan sortilin eş zamanlı olarak pro-NGF tarafından etkinleştirilebilir. ProNGF/p75NTR/Sortilin kompleksi, MAGE proteini NRAGE'nin p75NTR ile etkileşimini başlatır ve proapoptotik olan JNK yolunun aktivasyonuna aracılık eder. Ayrıca, PTEN aktive edilerek PI3K sinyali bloke edilir (Demir et al., 2016). p75NTR, TrkA'nın NGF'ye bağlanma yeteneğini

artırarak hücre ölümünü teşvik edebilir (Linggi et al., 2005). NGF, TrkA reseptörüne aktivasyonunu sağlar ve adaptör proteinlerin fosforillenmesi gerçekleşir. Bu süreçte, PI3K yolağı aktive olursa apoptozun inhibisyonu, Ras aktive olursa proliferasyon ve farklılaşma gerçekleşir (Şekil 2.4.).

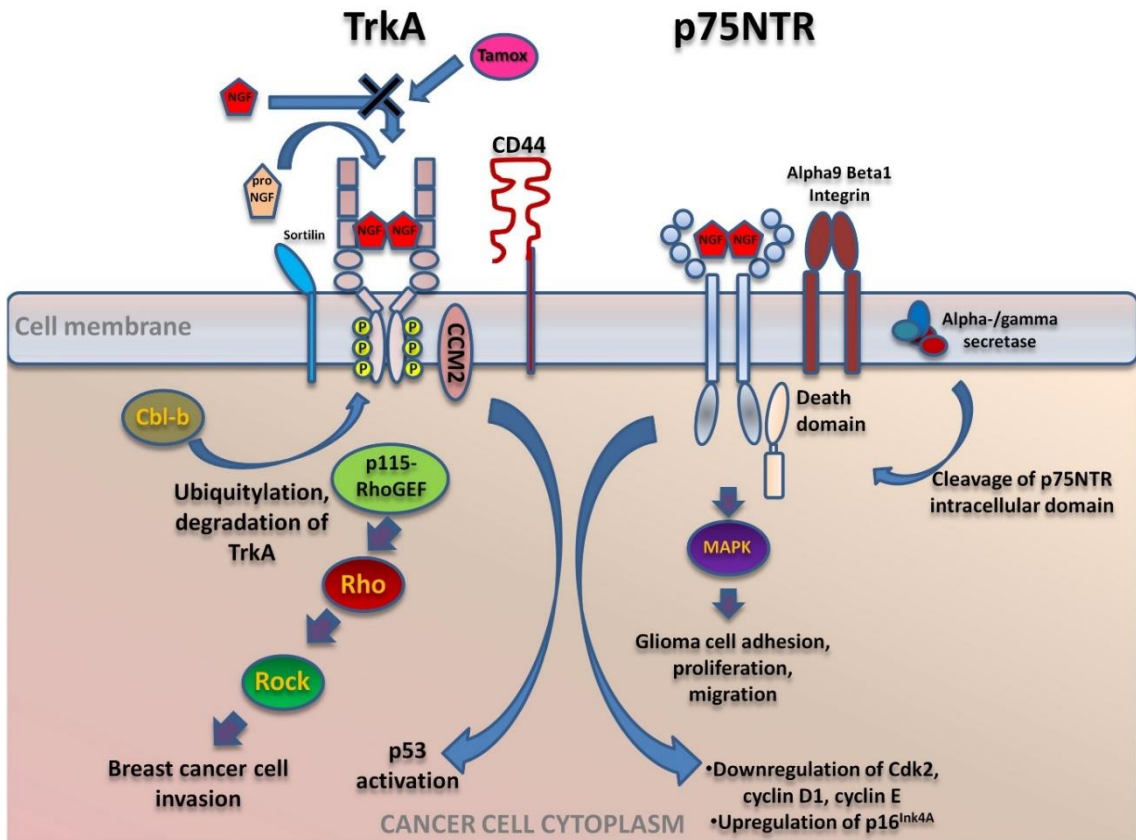


Şekil 2.4. NGF, TrkA ve p75NTR aracılı sinyallemeyle bağlı hücre içi yollar (Demir et al., 2016).

Yapılan çalışmalarda, NGF'in reseptörlerine bağlanmasını engellenerek, p53 aktivasyonuna ve hücre ölümüne, hücre döngüsünde görevli kinazların inhibisyonu ile hücre proliferasyonunun engellenmesi sağlanmıştır. Ayrıca, nöroblastoma hücrelerinde E3 ubiquitin ligaz Cbl-b'nin, TrkA'nın degradasyonunu sağladığı gösterilmiştir. Ayrıca, aktif reseptör kompleksine bağlanan CCM2, p53'ü aktive ederek apoptozisi tetiklediği belirlenmiştir. Meme kanserinde, tamoksifenin NGF'nin TrkA'ya bağlanmasını inhibe ettiği gösterilmiştir. TrkA, meme kanseri hücrelerinde CD44'ün birikimine yol açtığı ve hücre invazyonunu arttıran p115RhoGEF/RhoA/ROCK1 yolunu aktive ettiği gösterilmiştir (Yu et al., 2014) (Şekil 2.5.).

Glioma hücrelerinde aktif p75NTR membranda lokalize İntegrin α 9 β 1 ile etkileşime girerek MAPK yolağının aktivasyonu gerçekleşir. Bu sayede, glioma hücrelerinin büyümesi ve göçü tetiklenebilmektedir. Ayrıca, NGF alfa veya gama-

sekretaz aracılı p75NTR'in kesilmesini sağlayarak reseptörün intrasitoplazmik kısımlarının serbest kalmasını sağlar. Reseptörün intraselüler domaini hücre proliferasyonunu uyardığı belirlenmiştir (Khwaja & Djakiew, 2003). Hedef hücrelerden salınan NGF, akson terminallerinde TrkA'yı aktive eder ve PI3K/AKT, MEK/ERK ve PLC γ (fosfolipaz C) sinyal yollarının aktivasyonunu tetikler. Sinyal daha sonra nöronal sağkalımı desteklemek için akson boyunca retrograd olarak hücre gövdesine ilerler. Bununla birlikte, retrograd sinyalin doğası halen gizemini korumaktadır. p75NTR reseptörleri, apoptik hücre ölümüne yol açan temelde farklı bir sinyal yoluna aracılık edebildiği de bilinmektedir (Niewiadomska et al., 2011). (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Kanser çalışmalarında TrkA ve p75NTR'nin moleküler etkileşimleri (Demir et al., 2016).

Yapılan araştırmalar NGF'nin TrkA reseptörlerine bağlanması ile hayatta kalmaya ve farklılaşmaya (sempatik ve duyuşal nöronlar) ya da kanser gibi patolojik durumlara yol açtığı bilinmektedir. Bununla birlikte, NGF'nin tümör hücrelerindeki rolü, hücre proliferasyonunu inhibe etmekten mitojenik olmaya kadar değişken olmuştur. *In vitro* çalışmalarda hücre proliferasyonunu inhibe ettiği kanıtlanmış olsa da farklı hücre hatlarında bu durum değişiklik gösterebilmektedir. Marsland ve ark., proNGF'in GBM

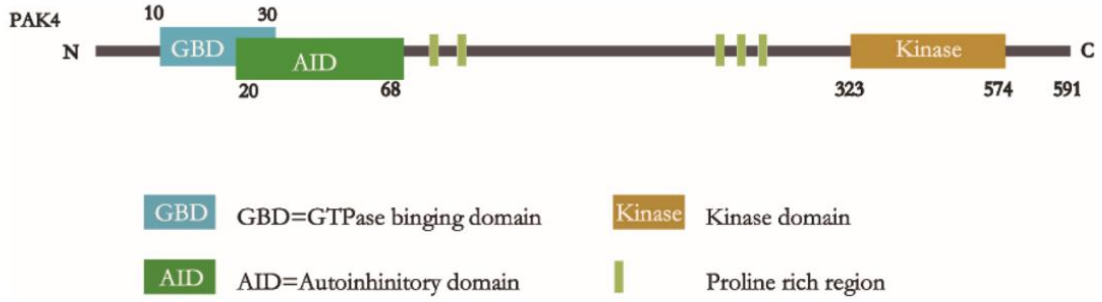
tümörlerinde aşırı ifade edildiği ve bazı GBM hastalarının kanında tespit edilebildiğini belirlemişlerdir. İnhibisyona neden olan anti-proNGF antikorları, GBM hücre büyümesini hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak inhibe etmektedir. Ancak TMZ'nin etkinliğini artıramadığı gözlemlenmiştir. Bu veriler, proNGF'nin GBM ilerlemesine katılabileceğini ve klinik biyobelirteç ve terapötik hedef olarak potansiyel değerini tanımlamak için daha ileri klinik öncesi ve klinik araştırmaların gerekli olduğunu vurgulamaktadır (Marsland et al., 2023).

2.5. p21 Aktive Kinaz-4 (PAK4)

p21 aktive kinazlar (PAK) serin/treonin kinaz ailesine ait enzimlerdir. PAK ailesi, dizi homolojilerine ve işlevlerine göre 2 gruba ayrılır: Grup I (PAK1, PAK2 ve PAK3) ve Grup II (PAK4, PAK5 ve PAK6). Yapısal olarak PAK'lar bir N-terminal GTPaz bağlama alanına ve korunmuş bir C-terminal kinaz alanına sahiptir. Grup I ve II PAK'lar kıyaslandığında yaklaşık %50 homolojiye sahiptir ve diğer domainler açısından farklılık gösterir (Amirthalingam vd., 2021a).

Grup II PAK'lar arasında, p21 aktive kinaz-4 (PAK4) şimdiye kadar en çok çalışılan üyedir. PAK4, hücre iskeleti organizasyonu, hücre göçü, proliferasyon, sağkalım ve hücre döngüsü dahil olmak üzere birçok hücrel aktiviteyi düzenler (Radu vd., 2014). Son zamanlarda PAK4'ün çeşitli tümörlerde aşırı yüksek düzeyde ifade edildiği ve kanser progresyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, PAK4 potansiyel yeni bir biyobelirteç, kanser teşhisi ve tedavisi için dikkat çekici bir terapötik hedef olarak değerlendirilmektedir (Abu Aboud vd., 2016).

PAK4 geni, insanda 19q13.2'de lokalizedir, 13 ekzondan oluşur, 591 amino asit büyüklüğünde ve 68 kDa ağırlığında bir proteini kodlar. PAK4 protein dizisi; N-terminalinde bir GTPaz bağlama alanı (GBD), p21-bağlama alanı (PBD) olarak da bilinen bir Cdc42/Rac etkileşim bağlama (CRIB) alanı; PAK4'ü inaktif durumda tutarak PAK4 kinaz aktivitesini baskılayan bir oto-inhibitör alan ve C-terminal protein kinaz alanından meydana gelmiştir (Baskaran vd., 2012). (**Şekil 2.6.**).

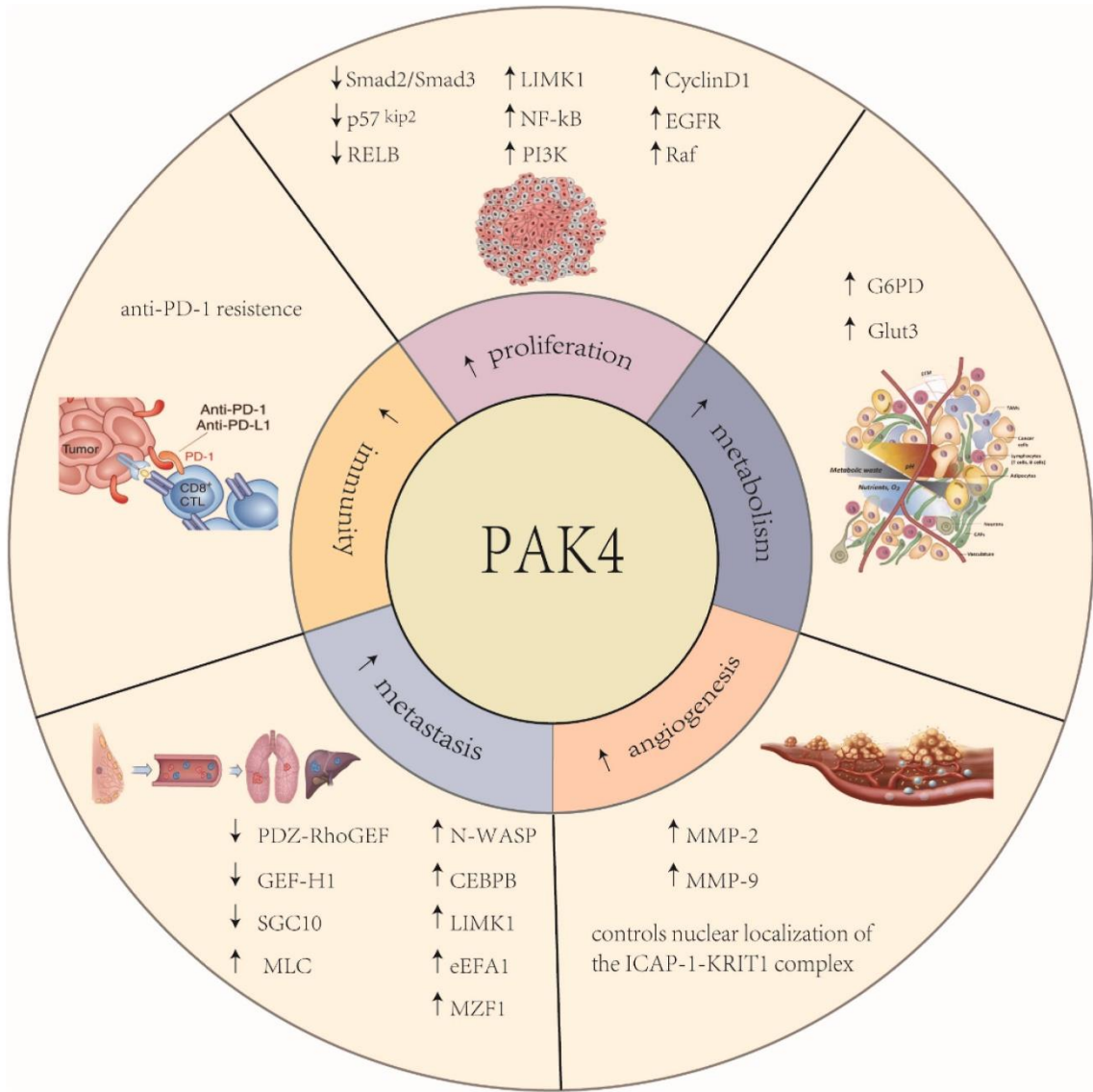


Şekil 2.6. PAK4'ün etki alanı yapısı (Yuan vd., 2022a).

PAK4'ü diğer PAK ailesi üyelerinden ayıran faktörlerden biri de doku spesifik ifadesidir. PAK4, embriyonik dönem dahil tüm dokularda eksprese edilir. PAK4-KO farelerde embriyonik letal etkileri gösterilmiştir. Yetişkin dokularda, PAK4 protein seviyeleri düşük düzeydedir. Bu dokularda PAK4'ün aşırı ekspresyonu genellikle kanserle bağlantılıdır (Y. Wang & Minden, 2021). PAK ailesinin diğer üyelerine bakıldığında PAK1, beyin, kas ve dalakta yüksek oranda eksprese edilir. PAK2 endotel hücrelerinde, PAK3 ise beyin nöronal hücrelerde ifade edildiği saptanmıştır. PAK5 esas olarak beyin ve pankreasta bulunurken, PAK6 testis, prostat ve beyinde tespit edilmiştir (Dart & Wells, 2013).

2.5.1. Kanserde p21 aktive kinaz-4 (PAK4) Sinyal Yolakları

PAK4, Rac/Cdc42'nin efektörü olarak işlev görür. Hücrelerde, proliferasyonu, invazyonu, metastazı, anjiyogenezi ve metabolizmayı tetikler, hücre apoptotik ölümünü baskılar ve bağışıklık yanıtından kaçışa yardımcı olur. PAK4, ERK/MEK ve PI3K/AKT sinyal yollarını aktive ederek hücre proliferasyonunu destekleyebilmektedir. PAK4, Raf fosforilasyonu ile hücre sağkalımını teşvik eder ve apoptozu inhibe eder. Ayrıca, LIMK1 gibi hücre iskeleti regülatörlerinin fosforilasyonu yoluyla hücre iskeleti organizasyonunu ve adezyonunu değiştirir. PAK4, N-WASP, GEF-H1, SGC10 dahil olmak üzere birçok substrat proteinlerini fosforile ederek tümör oluşumuna, kanser invazyonuna ve metastazına katkıda bulunur. İlave olarak, anjiyogenezi ve metabolik yeniden programlanmasını indükler. Son olarak, PAK4 bağışıklık hücrelerinin canlılığını etkiler ve kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçmasına yardımcı olur (Yuan vd., 2022a). (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. Kanserde PAK4' ün rolleri (Yuan vd., 2022c)

Çalışmalar, PAK'ların tümörlerde önemli ölçüde farklı mRNA ifade seviyelerine sahip olduğunu ve ayrıca birçok tümör dokusu ile normal dokular arasındaki ifade seviyelerinde de önemli farklılıklar olduğunu gösterir. Bu farklılıklar PAK genlerinin yukarı veya aşağı regüle edilmiş ifadesi olarak yansiyabilir. Farklı tümörler arasında GBM, çok farklı PAK ifade seviyeleri göstermektedir. Örneğin, PAK1 ve PAK3 normal dokularla karşılaştırıldığında GBM'de önemli ölçüde aşağı doğru düzenlenirken, PAK2 ve PAK6 önemli ölçüde yukarı doğru düzenlenmiştir. GBM'de PAK'lar üzerinde yapılan çalışmalar, PAK1 ve PAK4'ün GBM'in oluşumunda ve gelişiminde önemli roller oynadığını göstermiştir (Franovic vd., 2015). Genellikle bu PAK genlerinin metilasyon seviyelerinin düşük olduğu ve çeşitli mutasyonlar içerdiği gösterilmiştir. PAK'ların metilasyonu ve mutasyon durumu hakkında az sayıda çalışma olmasına rağmen, bu

değişikliklerin kinaz aktivitesini mi yoksa tümörlerin oluşumunu ve ilerlemesini etkileyip etkilemediği hala belirsizdir (Yuan vd., 2022b). Bununla birlikte bazı çalışmalarda, bazı PAK genlerindeki varyasyonların tümör oluşumuna ve ilerlemesine önemli katkılar sunduğu gösterilmiştir (Rane & Minden, 2019).

2.5.2. Tedavide PAK4 İnhibitörlerinin Kullanılması

Pfizer tarafından geliştirilen ve ATP ile rekabetçi bir inhibitör olan PF-3758309, PAK4 inhibitörü olarak tanımlanmıştır (Amirthalingam vd., 2021b). Kanser hücre hatlarının büyümesini durduran ve güçlü antikanser özellikleri sergileyen, oral yoldan uygulanabilen küçük molekül yapısında olan kemoterapötik bir ajandır. PF-3758309, PAK4 ekspresyonunu etkili bir şekilde azaltmakta, hücre döngüsünü bloke etmekte ve apoptozu indüklemektedir. Nöroblastoma hücrelerinde MEK/ERK yolunu baskılayarak hücre proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Shao vd., 2016).

Sonuç olarak, PAK4 hücre iskeleti dinamiklerini, proliferasyonu, invazyonu, metastazları, anjiyogenezleri, metabolizmanın yeniden programlanmasını ve kanser hücresi immün kaçışını düzenleyen bir onkogen olarak tanımlanmıştır. *PAK4* geni insan tümörlerinde sıklıkla mutasyona uğrar, hastalığın kötü seyretmesine neden olur. PAK4, onkojenik sinyallemede merkezi bir konuma sahiptir ve PI3K/Akt, Wnt/ β -katenin, ERK/MEK ve TGF- β sinyal yolları dahil olmak üzere kanser hücrelerinin her aşamasında sinyal yollarında görevlidir. Kanser ilerlemesindeki rolü göz önüne alındığında, PAK4'ün kanserin erken teşhisi için tanısal bir biyobelirteç ve kanser tedavisi için bir ilaç hedefi olarak umut verici bir aday olarak görülmektedir.

Proje hipotezimizde, U87-MG glioblastoma hücrelerinde NGF'in PAK4 aktivasyonu üzerindeki olası rolünün, glikoz konsantrasyonuna bağlı hücre proliferasyonunun, AKT ve ERK yolağı ile ilişkili aktivasyon durumunun, EMT belirteçlerinin ifade düzeyleri ve metastaz kabiliyeti üzerindeki etkilerinin, 2D ve 3D koloni oluşturma kabiliyetlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Bu tez çalışmasında insan beyin tümörü LN229 ve U87-MG hücre hatları kullanıldı. Hücreler T-25 hücre kültür kaplarında %10 Fetal Bovin Serum (FBS) (BI- Cat No:04-127-1A), %1 Penisilin-Streptomisin (PAN BIOTECH -Cat No: P30-3303) ve %1 L-Glutamin (PAN BIOTECH- Cat No: P06-07100) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sartorius – Cat NO:01-052-1A) besiyeri kullanılarak kültüre edildi. Hücreler %5 CO₂ ve 37°C şartlarını sağlayan inkübatörde (ESCO-CCL-170B-8) kültüre edildi. Hücreler %0.25 tripsin (Biowest L0909) kullanılarak pasajlandı. Hücrelerin morfolojileri, kültür ve uygulanan ajanların etkisinin takibi inverted mikroskop (Olympus CK40) aracılığıyla gerçekleştirildi.

3.2. Hücre Canlılık Analizi

Hücre canlılık analizi için MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazolyum bromid] ajanı kullanıldı. MTT, pozitif yüklü ve lipofilik özellikte bir bileşik olup, ökaryot hücrelerin membranını kolaylıkla geçer ve hücre içinde mitokondriyal enzimler tarafından indirgenerek formazan tuzunu oluşturur. Oluşan formazan, suda çözünmez niteliktedir ve dolayısıyla besiyerinde kristal şeklinde çökelmektedir. Tetrazolyum tuzları ile yapılan canlılık analizleri 3 aşamadan oluşmaktadır. İlk olarak hücrelere istenilen ajanın istenilen sürede uygulanması, ikinci olarak süre sonunda çalışılan tuzun (MTT) hücrelere uygulanması son olarak 1-4 saat bekleme süresinin ardından tuza uygun çözücü olan dimetil sülfoksit (DMSO) ile oluşan tuzun çözünmesi ve 540-690 nm dalga boylarında ölçümün alınması gerçekleştirilir.

3.3.Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA deneyi için β -NGF (ThermoScientific, Lot.241061319) kiti kullanıldı. 6 kuyulu plakaya 2×10^4 /hücre/kuyu olacak şekilde U87-MG hücreleri ekildi. Hücreler yüzeye tutunduktan sonra besiyerleri uzaklaştırıldı. PBS ile kuyular yıkanarak besiyeri tamamen uzaklaştırıldı. %10 FBS ve farklı miktarlarda glikoz (0.2g/L, 1g/L ve 4.5g/L) içeren besiyerleri kuyulara eklendi. Hücreler 48 saat boyunca inkübatörde bekletildi. 48.saatin sonunda kuyulardan besiyeri uzaklaştırılarak PBS ile kuyular yıkandı. FBS içermeyen farklı glikoz (0.2g/L, 1g/L ve 4.5g/L) miktarlarıyla hazırlanan koşullandırılmış besiyeri kuyulara eklendi. 48. saatin sonunda koşullandırılmış

besiyerleri toplanarak tüplere alındı. Örnekler ELISA kiti uygulanana kadar -20°C de saklandı.

Kit içeriğinde belirtilen miktarlara uygun olarak kullanılacak solüsyonlar ve tampon çözeltiler hazırlandı. Elde edilen koşullandırılmış besiyerleri ve standartlar kit içerisinde bulunan kuyulara $100\ \mu\text{l}$ eklendi. Kuyucuklar şeffaf film ile kaplandı. Oda sıcaklığında 2.5 saat inkübe edildi. Kuyulardan örnekler uzaklaştırıldı. 4 kez $300\ \mu\text{l}$ 1X yıkama tamponu ile yıkandı. Her kuyuya $100\ \mu\text{l}$ biotin konjugat eklendi. Oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. Solüsyon uzaklaştırılarak kuyular 4 kez $300\ \mu\text{l}$ 1X yıkama tamponu ile yıkandı. Yıkama tamponu uzaklaştırılarak $100\ \mu\text{l}$ Streptavidin-HRP eklendi. 45 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Solüsyon uzaklaştırılarak kuyular 4 kez $300\ \mu\text{l}$ 1X yıkama tamponu ile yıkandı. Yıkama tamponu uzaklaştırılarak her kuyuya $100\ \mu\text{l}$ TMB substrat eklendi. Mavi renk oluşumu gözlemlendi. Oda sıcaklığında, karanlıkta çalkalayıcı üzerinde 30 dakika inkübe edildi. $50\ \mu\text{l}$ durdurma solüsyonu eklendi. Mavi rengin sarı renge döndüğü gözlemlendi. 30 dakika içinde $450\ \text{nm}$ 'de spektrofotometre cihazında (Thermo Scientific- Mutiscan Go) ölçüm yapılarak optik dansite değerleri belirlendi ve sonuçlar kaydedildi. Toplanan koşullandırılmış besiyerlerindeki NGF miktarı, kalitatif ve kantitatif olarak belirlendi. Elde edilen veriler ile kit içeriğindeki standart grafikler oluşturularak her örneğin NGF düzeyi pg/ml olarak hesaplandı.

3.4. Western Blot

Western blot deneyinde, PI3K inhibitörü (LY294002), MEK inhibitörü (PD0325901), Apigenin ve PAK4 inhibitörü (PF3758309) ve NGF ($100\ \text{ng/ml}$) kullanıldı. U87-MG hücrelerinde, PAK4 aktivasyonu için PAK4, pPAK4 ve p21, AKT ve ERK sinyal yolağı için AKT, pAKT, ERK ve pERK, EMT sürecinin belirlenmesi için TWIST1, Vimentin ve E-Kadherin proteinlerinin ifade düzeyleri belirlendi.

3.4.1. Protein Lizatlarının Hazırlanması

U87-MG hücreleri petrilere %70-75 yoğunlukta olacak şekilde ekildi. Hücrelerin tutunması için petrilere gece boyunca inkübatörde bekletildi. Hücreler yüzeye tutunduktan sonra besiyerleri uzaklaştırılarak PBS ile yıkandı ve deney seti (Kontrol, NGF, PF3758309(PF), NGF+PF) 72 saat boyunca uygulandı. Süre sonunda, hücrelere ait protein lizatları 1X liziz tamponu (Cell Signalling- Cat:9806) ile elde edildi. ilave edildi. Tüpler vortekslenerek buz üzerine 30 dakika boyunca bekletildi. Örnekler $10.000\ \text{rpm}$ 'de

1 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant dikkatli bir şekilde yeni tüplere aktarılarak protein lizat örnekler elde edildi ve -80°C 'de saklandı.

3.4.2. Bradford Yöntemi ile Protein Miktarının Belirlenmesi

Hazırlanan lizatların içerisindeki protein miktarını analiz etmek için Bradford yöntemi kullanıldı. Standart oluşturmak için Bovine serum albumin (BSA) kullanıldı. BSA, 96 kuyucuklu plakalara 1, 3, 5 ve 7 μl 3'er tekrarlı olacak şekilde farklı kuyucuklara eklendi. Protein miktarı belirlenecek her bir örnekten 1'er μl farklı kuyucuklara 3'er tekrarlı konuldu. Bradford ajanı (Bio-Rad, 5000007) hazırlanarak kuyucuklara 100'er μl ilave edildi. Mavi renk oluşumu gözlemlendikten sonra spektrofotometrede (Thermo Scientific-MultiskanGO) plaka çalkanarak 595nm'de ölçüm yapıldı. Alınan sonuçlar doğrultusunda standart protein grafiği çizilerek lizatlardaki protein miktarları hesaplandı.

3.4.3. Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE)

Poliakrilamid Jel Elektrofrez (PAGE) için ayrıştırıcı ve yükleme jelleri aşağıda verilen çizelgeye göre hazırlandı. (Çizelge 3.4.3.1) Jelin polimerleşmesinden sonra elektrofrez tankına yerleştirildi.

Çizelge 3.1. Jel hazırlamak için kullanılan malzemelerin miktarları

	Ayrıştırıcı Jel	Yükleme Jeli
Su	11.55 ml	3 ml
Tampon	7.5 ml	1.25 ml
Acr (29:08)	10.5 ml	0.625 ml
% 10 SDS	0.3 ml	50 μL
% 10 APS	0.3 ml	50 μL
Temed	30 μL	5 μL

Örnekler en az 25'er μg protein olacak şekilde kuyucuklara 4X yükleme tamponu yardımıyla protein markere ile eş zamanlı olarak yüklendi. Örnekler, yükleme jeline 80 voltta, ayrıştırıcı jelde ise 120 volt da elektrofrez edildi.

3.4.4. Proteinlerin Jelden Polivinilidin Florür (PVDF) Membrana Aktarılması

Proteinler jelden PVDF membrana transfer edilirken ıslak transfer yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde kullanılan tüm malzemeler transfer tamponu ile ıslatılarak kullanıldı. Transfer tankında bulunan kasetin içerisine ilk olarak sünger tampon ile ıslatılarak yerleştirildi. 2 adet kurutma kağıdı tampon ile ıslatılarak süngerin üzerine

konuldu. Kurutma kağıtlarının üzerine jel konularak roller yardımı ile hava kabarcıkları giderildi. Membran metanolde 1 dakika bekletildikten sonra jelin üzerine konuldu. 2 adet kurutma kağıdı transfer tamponu ile ıslatılarak membranın üzerine konularak kaymaması için kaset sıkıca kapatılarak tanka yerleştirildi. Tankta belirtilen çizgiye kadar transfer tamponu konuldu. Elektrotlar güç kaynağına takılarak akım 90 volta ayarlandı ve 90 dakika boyunca transfer yapıldı. Protein ile çalışıldığı için tank buz dolu köpük kutunun içine yerleştirilerek transfer yapıldı.

3.4.5. Membranın Bloklanması ve Antikorla İşaretlenmesi

Transfer aşaması bittikten sonra membran alındı. Markerın olduğu kısım işaretlenerek membranın yönü belirlendi. TBS-T/BSA (1X TBS, %0.1 Tween-20, %1 BSA) ile bloklama solüsyonu hazırlandı. Membran bir kaba alınarak üzerine 10-15 ml kadar bloklama solüsyonu eklendi. Çalkalayıcı üzerinde membran 60-90 dakika inkübe edildi. Bloklama aşaması bittikten sonra bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak primer antikor (1/1000) eklendi. Çalkalayıcıya alınarak primer antikorda gece boyunca bekletildi. Ertesi gün TBS-T solüsyonu ile her biri 10 dakika olmak üzere 3 kez yıkama yapıldı. Daha sonra TBS-T/BSA içinde 1/2000 dilüsyon ile hazırlanmış primere uygun (anti-mouse veya anti-rabbit) sekonder antikorunda 2-3 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Sekonder antikor uzaklaştırıldıktan sonra tekrardan TBS-T solüsyonu ile her biri 10 dakika olmak üzere 3 kez yıkama yapıldı.

3.4.6. Görüntüleme

İmmün blotlamanın görüntülenmesi için 1:1 oranında hazırlanmış ECL reaktifi (advansta–Cat: K-12043-D20) kullanıldı. Membran görüntüleri BIORAD Chemidoc cihazına yardımıyla alındı.

3.5. *In vitro* Hücre Migrasyon Deneyi

U87-MG hücreleri 24-kuyucuklu kapların yüzeyini kaplayacak şekilde ekildi. Hücrelerin yüzeye tutunması için gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün 100 µl'lik pipet ucu yardımı ile yara alanları oluşturuldu ve deney seti uygulandı. Kuyucuklardaki yara alanları işaretlenerek 0., 24., ve 48. saatlerde fotoğraflar mikroskop altında çekildi ve hücrelerin migrasyon kabiliyetleri analiz edildi.

3.6. *In vitro* Koloni Oluşturma Deneyi

U87-MG hücreleri 96 kuyucuklu plakalarda 100'er hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin yüzeye tutunması için gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün kuyulardan besiyerleri uzaklaştırıldı ve deney seti uygulandı. Yedi gün sonra hücreler Crystal Violet solüsyonu (ChemBio – Cat: CB2340) kullanılarak boyandı. Ardından boya kuyulardan uzaklaştırıldı ve 400 µl PBS ile 2 kez yıkandı ve görüntüleri alındı.

3.7. 3 Boyutlu Hücre Kültürü

U87-MG hücreleri petri kapağına 20 µl'de 2×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Kapak tek hamlede ters çevrilerek hücrelerin yüzeye tutunmadan besiyerinde asılı kalması sağlandı. Sferoid yapıların oluştuğu gözlemlendikten sonra deney seti uygulandı. Beşinci gün sferoid yapılarının görüntüleri alındı ve analiz edildi.

3.8. İstatistiksel Analiz

Yapılan deneyler sonucunda alınan veriler Microsoft Excel programında normalize edilerek pozitif ve negatif standart hata değerleri belirlenerek grafikler çizildi. Alınan ELISA sonuçları GainData programı ile jel görüntüleri ise ImageJ programı ile analiz edildi. Anlamlılık değeri (p değeri) GraphPad Prism 8 programı ile analiz edildi.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

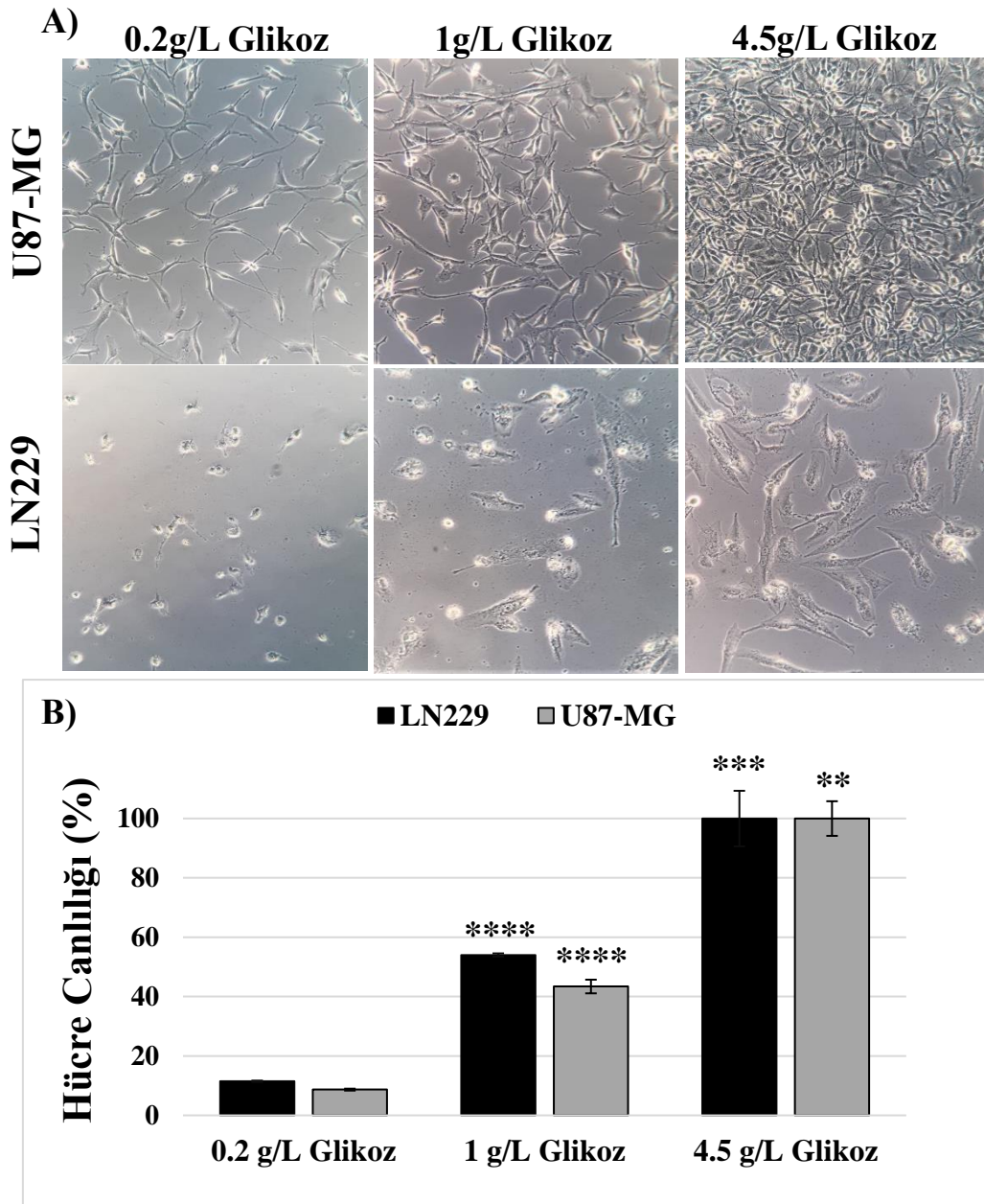
4.1. Araştırma Sonuçları

Proje çalışmamızda, öncelikle glioblastoma hücre hatları olan LN229 ve U87-MG hücrelerinin düşük (hipoglisem), normal (normoglisemi) ve yüksek glikoz (hiperglisemi) varlığında proliferasyon kabiliyetleri incelendi.

4.1.1. Farklı Glikoz Konsantrasyonlarında Kültüre Edilen LN229 ve U87-MG Hücrelerinin *in vitro* Morfolojik Görüntüleri ve Hücre Canlılık Düzeyleri

LN229 ve U87-MG hücreleri farklı konsantrasyonlarda glikoz (0.2- 1- 4.5 g/L) ve %0.5 FBS içeren besiyerleri ile muamele edildi. Hücrelerin takibi yapılarak 48. saatin sonunda mikroskopta görüntüler alındı.

LN229 ve U87-MG hücrelerin farklı konsantrasyonlarda glikoz (0.2 (düşük), 1 (normal), 4.5 g/L (yüksek)) ve %0.5 FBS içeren besiyerleri ile 48 saat boyunca muamele edildi. U87-MG hücrelerinin morfolojisinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Artan glikoz konsantrasyonuna bağlı olarak her iki hücre hattının da çoğaldığı gözlenmiştir. U87-MG hücrelerinde 0.2 g/L glikozla muamele edilmiş hücrelere kıyasla 1g/L glikozda hücre canlılığı 5.04 kat ($p<0.0001$), 4.5 glikozda 11 kat ($p<0.01$) artmıştır. LN229 hücreleri 0.2g/L glikoz ile muamele edilmiş hücrelere kıyasla 1g/L glikozda hücre canlılığı 4.7 kat ($p<0.0001$), 4.5g/L glikozda ise 8.7 kat ($p<0.01$) artmıştır (**Şekil 4.1.**). Ancak, LN229 hücrelerinin uzun süreli kültür devam etmemiş, özellikle düşük glikoz varlığında, canlılığını koruyamamıştır. Bu nedenle, tez çalışmasına U87-MG hücreleri ile devam edilmiştir.

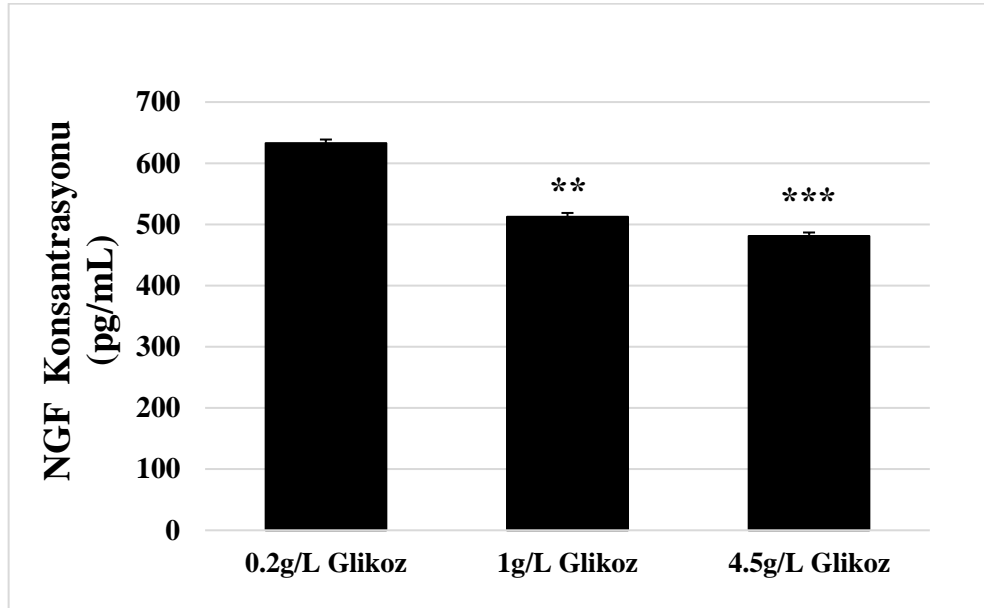


Şekil 4.1. Farklı glikoz konsantrasyonları ile muamele edilmiş LN229 ve U87-MG hücrelerindeki morfolojik değişim ve hücre canlılığı üzerindeki etkisi. A) 0.2- 1- 4.5 g/L glikoz ile muamele edilmiş LN229 ve U87-MG hücrelerin 48.saatte 20X objektif ile alınmış mikroskop görüntüleri. B) 0.2- 1- 4.5 g/L glikoz ile muamele edilmiş LN229 ve U87-MG hücrelerinin %canlılık analizleri. Grafikte p değeri **; p<0.01, ***; p<0.001, ****; p<0.0001 ile ifade edilmiştir.

4.1.2. Farklı Glikoz Konsantrasyonları ile Kültüre Edilen U87-MG Hücrelerinin NGF Üretim Miktarı

U87-MG hücrelerinin farklı glikoz konsantrasyon varlığındaki NGF salım seviyeleri ELISA deneyi ile gösterilmiştir. Hücrelerin ürettiği NGF miktarlarının belirlenmesi için örneklere ait koşullandırılmış besiyerleri kullanıldı. U87-MG hücreleri 0.2g/L glikoz içeren besiyerinde 633 pg/ml, 1g/L glikoz içeren besiyerinde 512.64 pg/ml,

4.5g/L glikoz içeren besiyerinde 481 pg/ml NGF bulunmaktadır. NGF miktarı 0.2g/L glikoz içeren hücelere kıyasla 1g/L glikozda 1.2 kat ($p<0.01$) daha azdır. 4.5g/L glikoz içeren besiyerindeki NGF miktarı, 0.2g/L glikoz içeren besiyerindeki NGF miktarından 1.35 ($p<0.001$) kat daha az olduğu saptanmıştır (Şekil 4.2.). Dolayısıyla, düşük glikoz varlığında veya glikoz açlığında U87-MG hücrelerinin NGF üretimini artırarak hücre sağkalımını koruduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.2. Farklı glikoz konsantrasyonları ile muamele edilmiş U87-MG hücrelerinden elde edilen koşullandırılmış besiyerindeki β -NGF miktarı. Grafikte p değeri **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$, ****, $p<0.0001$ ile ifade edilmiştir.

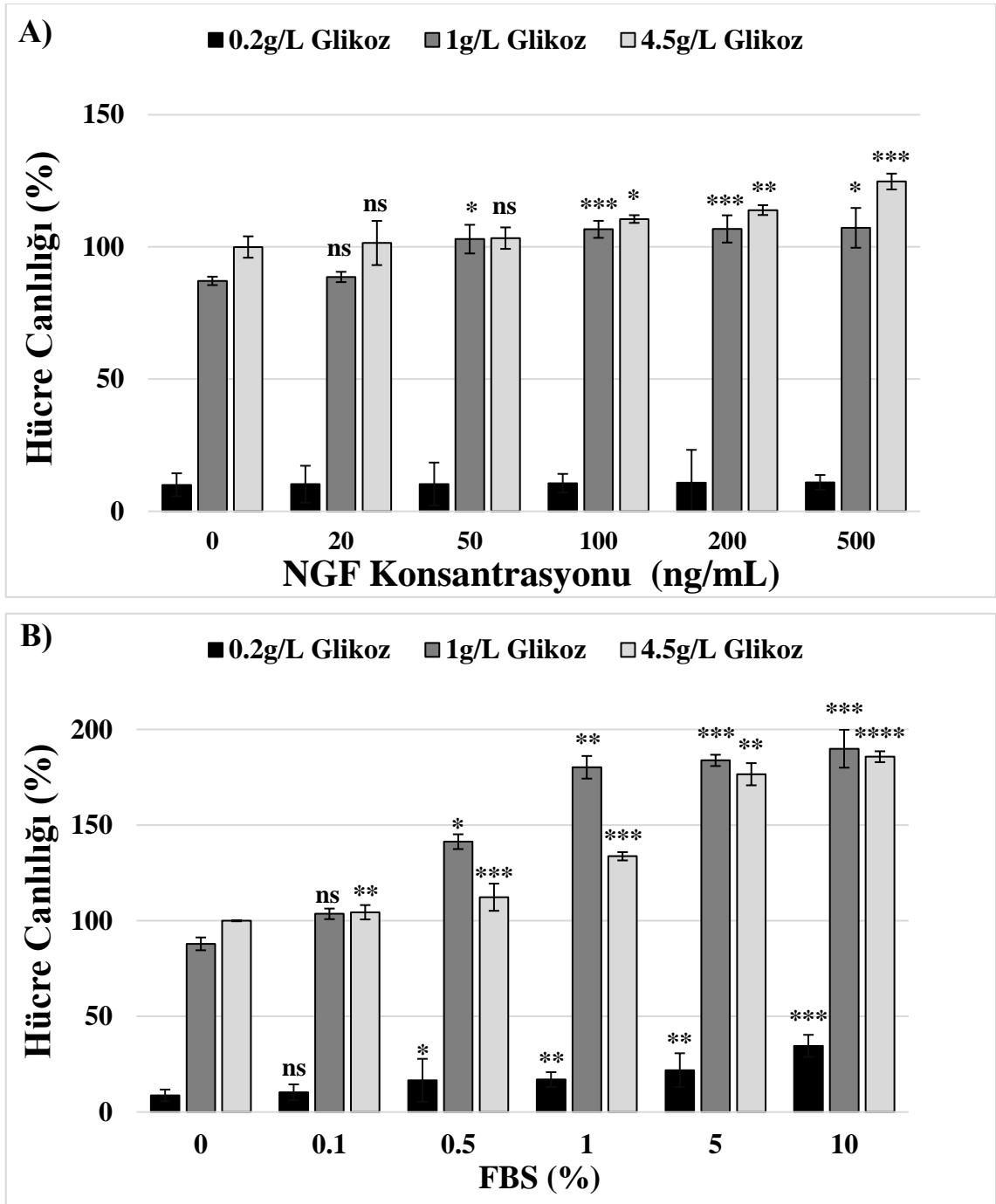
4.1.3. Farklı Glikoz Konsantrasyonları Varlığında U87-MG Hücrelerinde NGF ve FBS Muamelelerinin Hücre Canlılık Düzeyine Etkileri

Serumsuz ortamda dereceli NGF (0-500 ng/ml) stimülasyonu ve FBS (%0-10) varlığında U87-MG hücrelerinin glikoz konsantrasyonuna (0.2-4.5 g/L) bağlı canlılık düzeyleri araştırıldı. Öncelikle optimum NGF ve FBS miktarını belirlemek için farklı NGF ve FBS konsantrasyonları ile hücreler muamele edildi ve MTT analizi gerçekleştirildi. Bunun için, 0.2g/L, 1g/L ve 4.5g/L glikoz içeren besiyerlerine (%0.5 FBS) farklı konsantrasyonlarda NGF (20- 50- 100- 200 ve 500 ng/ml) eklenerek hücreler muamele edildi. Ayrıca, 0.2g/L, 1g/L ve 4.5g/L glikoz besiyerlerinde farklı FBS konsantrasyonlarında (%0.1, %0.5, %1, %5 ve %10) hücreler kültüre edildi. Muamelelerin 48.saatin sonunda canlılık analizi gerçekleştirildi. Deney sonucuna göre, 0.2g/L glikoz içeren ortamda hücre canlılığında anlamlı bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.3.-A). Kendi kontrolüne kıyasla, 1g/L glikoz varlığında; 20ng/mL NGF'de anlamlı bir

farklılık görülmemiştir, 50ng/mL NGF uyarımının 1.17 kat ($p<0.016$), 100 ng/mL NGF uyarımının 1.21 kat ($p<0.0016$), 200ng/mL NGF uyarımının 1.22 kat ($p<0.006$), 500ng/mL NGF uyarımının ise 1.23 kat ($p<0.02$) hücre canlılığını artırmıştır. Hiperglisemi ortamında (4.5g/L glikoz) kontrole kıyasla, 20ng/mL ve 50ng/mL NGF uyarımında hücre canlılığında anlamlı bir farklılık görülmemiştir, ancak 100 ng/mL NGF uyarımında 1.06 kat ($p<0.039$), 200ng/mL NGF uyarımında 1,14 kat ($p<0.01$) ve 500ng/mL NGF uyarımında 1.24 kat ($p<0.0002$) hücre canlılığı artmıştır (**Şekil 4.3.-A**).

Farklı glikoz konsantrasyonları ve farklı FBS miktarları ile muamele edilen U87-MG hücrelerindeki canlılık oranları incelendiğinde, hipoglisemi ortamında (0.2g/L glikoz) kontrole kıyasla %0.1 FBS varlığında anlamlı bir değişiklik olmamış, %0.5 FBS'de 1.91 kat ($p<0.00071$), %1 FBS'de 1.95 kat ($p<0.01$), %5 FBS' de 2.52 kat ($p<0.01$) ve %10 FBS varlığında ise 3.97 kat ($p<0.001$) artmıştır (**Şekil 4.3.1-B**). Normoglisemi ortamında (1g/L glikoz) hücre canlılığı kontrole kıyasla %0.1 FBS varlığında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiş, %0.5 FBS'de 1.12 kat ($p<0.037$), %1 FBS'de 1.33 kat ($p<0.0038$), %5 FBS'de 1.76 kat ($p<0.001$) ve %10 FBS'de ise 1.85 kat ($p<0.0006$) artmıştır. Hiperglisemi ortamında ise (4.5g/L glikoz) kontrole kıyasla, %0.1 FBS varlığında 1.17 kat ($p<0.0045$), %0.5 FBS'de 1.6 kat ($p<0.00051$), %1 FBS'de 2.05 kat ($p<0.001$), %5 FBS'de 2.09 kat ($p<0.01$) ve %10 FBS varlığında ise 2.16 kat ($p<0.0001$) artmıştır (**Şekil 4.3.-B**).

Elde edilen sonuçlara göre, U87-MG hücreleri normoglisemi ve hiperglisemi ortamlarında uygulanan NGF konsantrasyonu ve FBS artışına bağlı olarak doğru orantılı şekilde hücre canlılık düzeyleri artmıştır. Bundan sonraki çalışmalar için U87-MG hücreleri için hiperglisemik ortamda (4.5 g/ml glikoz) NGF konsantrasyonu 100 ng/ml ve FBS %10 olacak şekilde belirlenmiştir ve optimize edilmiştir.

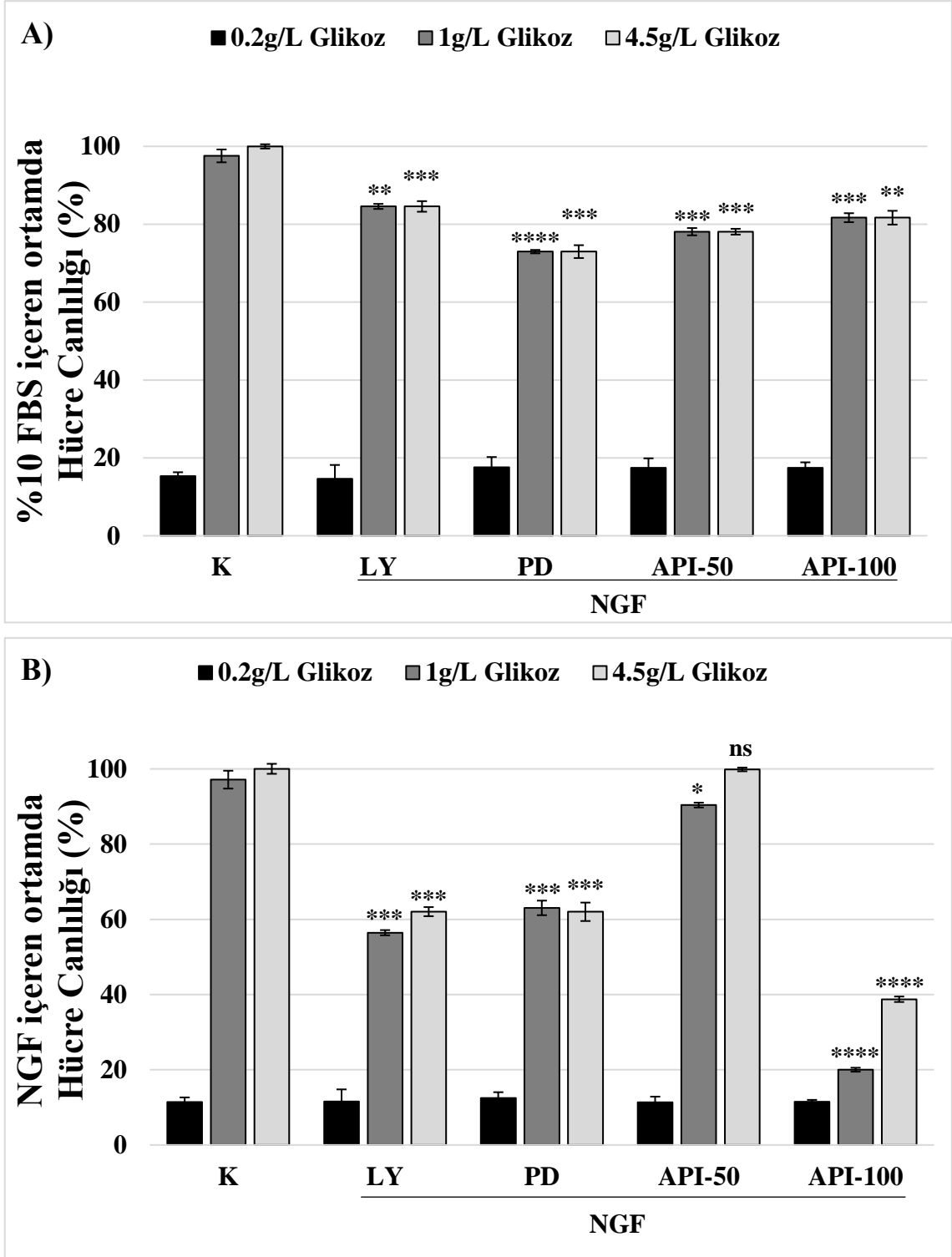


Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda NGF ve FBS uygulanmış U87-MG hücrelerinin %canlılık analizi. A)0.2- 1- 4.5 g/L glikoz, %0.5 FBS ve farklı konsantrasyonlarda NGF (20- 50- 100- 200 ve 500 ng/ml) ile muamele edilen hücreler B) 0.2- 1- 4.5 g/L glikoz ve farklı konsantrasyonlarda FBS (%0.1- 0.5- 1- 5- 10) ile muamele edilen hücreler. Grafikte p değeri **, p<0.01, ***, p<0.001, ****, p<0.0001 ile ifade edilmiştir. ns ise anlamlı olmayan ifadeleri göstermek için kullanılmıştır.

4.1.4. Farklı Glikoz Konsantrasyonları Varlığında U87-MG Hücrelerinde PI3K (LY294002), MEK (PD0325901) İnhibitörlerinin ve Apigeninin Hücre Canlılığı Düzeyine Etkisi

PI3K ve MEK inhibitörleri ve Apigenin (50 ve 100 μ M) ile muamele edilen U87-MG hücrelerinin hipoglisemi, normoglisemi ve hiperglisemi ortamında NGF (100 ng/ml) stimülasyonu ve %10 FBS varlığında hücre canlılık düzeyleri incelendi. Hipoglisemi (0.2 g/L glikoz) ortamında FBS veya NGF varlığında söz konusu inhibitörlerin herhangi bir etkisi gözlemlenmemiştir. Normoglisemi (1 g/L glikoz) ortamında, FBS varlığında hücre canlılığında kontrole kıyasla, PI3K inhibisyonunda 1.19 kat ($p<0.00084$), MEK inhibisyonunda 1.33 kat ($p<0.0001$), Api-50'de 1.27 kat ($p<0.00012$), Api-100'de 1,25 kat ($p<0.00023$) azalma belirlenmiştir (**Şekil 4.4.-A**). NGF stimülasyonu yapılan deney setinde hücre canlılığında kontrole kıyasla, PI3K inhibisyonunda 1.72 kat ($p<0.001$), MEK inhibisyonunda 1.54 kat ($p<0.00014$), Api-50' de 1.07 kat ($p<0.003$), Api-100' de 4.8 kat ($p<0.0001$) azalma tespit edilmiştir (**Şekil 4.4.-B**).

Hiperglisemi (4.5 g/L glikoz) ortamında, FBS varlığında, hücre canlılığında kontrole kıyasla PI3K inhibisyonunda 1.41 kat ($p<0.001$), MEK inhibisyonunda 1.50 kat ($p<0.001$), Api-50'de 1.25 kat ($p<0.00019$), Api-100'de 1.16 ($p<0.00075$), kat azalma saptanmıştır (**Şekil 4.4.-A**). NGF stimülasyonu yapılan deney setinde hücre canlılığında kontrole kıyasla yaklaşık olarak MEK inhibisyonunda 1.61 kat ($p<0.001$), Api-50' de 1.02 kat (istatistiksel olarak anlamsız), Api-100' de 2.6 kat ($p<0.0001$), azalma tespit edilmiştir (**Şekil 4.4.-B**).



Şekil 4.4. Farklı inhibitörlerle muamele edilen U87-MG hücrelerinin % canlılık analizi. A) 0.2- 1- 4.5 g/L glikoz, %10 FBS ve farklı inhibitörlerle muamele edilen hücreler B) 0.2- 1- 4.5 g/L glikoz, 100ng/ml NGF ve farklı inhibitörlerle muamele edilen hücreler. LY; 20 µM LY294002, PD; 20 µM PD0325901, API-50; 50 µM Apigenin, API-100; 100 µM Apigenin uygulandı. Grafikte p değeri **, p<0.01, ***, p<0.001, ****; p<0.0001 ile ifade edilmiştir.

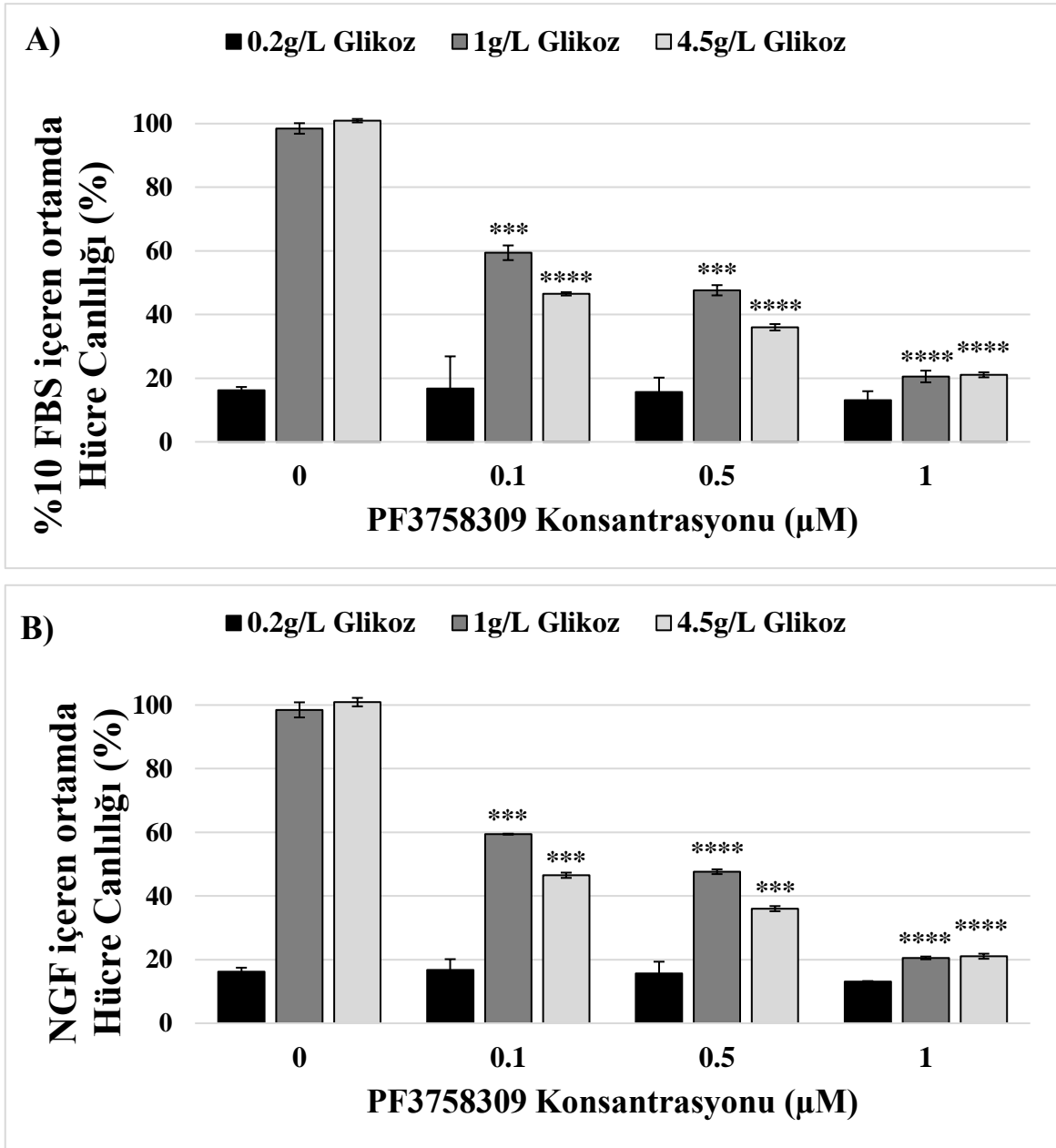
Elde edilen sonuçlara göre, NGF stimülasyonuna rağmen PI3K ve MEK inhibitörleri ve Apigenin varlığında U87-MG hücrelerinde canlılık oranları dikkat çekici

bir şekilde azalmıştır. Apigenin glioblastoma hücrelerinde birçok biyolojik prosesleri etkileyerek sitotoksik etkilere sahip olduğu bilindiğinden pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Deney bulgularına göre, U87-MG hücrelerinde NGF sinyalinin hücre içinde PI3K ve MAPK yolağını tetiklediği söylenebilir.

4.1.5. Farklı Glikoz Konsantrasyonları Varlığında U87-MG Hücrelerinde PAK4 İnhibisyonunun Hücre Canlılığı Düzeyine Etkisi

Çalışmamızda U87-MG hücrelerinde PAK4'ün olası hücre canlılığına etkisini test için PF3758309 (PF) inhibitörü aracılığıyla spesifik olarak PAK4 aktivasyonu inhibe edilmiştir. Bunun amaçla öncelikle uygun konsantrasyonu belirlemek için PAK4 inhibitörü farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5 ve 1 μ M) uygulanmıştır. NGF sinyal yolağının PAK4 ile ilişkili olarak hücre canlılığına etkisi, FBS varlığına kıyasla incelenmiştir. Hücreler, %10 FBS varlığında ve ayrıca %0.5 FBS içeren ortamda NGF (100 ng/ml) stimülasyonunda ve hipoglisemi, normoglisemi ve hiperglisemi ortamlarında (sırasıyla; 0.2g/L, 1g/L, 4.5g/L glikoz) kültüre edilerek canlılık düzeyleri incelenmiştir.

Hipoglisemik (0.2 g/L glikoz) ortamda PAK4 inhibisyonunun FBS varlığında veya NGF varlığında herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Normoglisemik (1 g/L glikoz) ortamda PAK4 inhibisyonu, FBS varlığında hücre canlılığında kontrole kıyasla 0.1 μ M PF uygulamasında 1.67 kat ($p<0.001$), 0.5 μ M PF'de 2.09 kat ($p<0.0001$), 1 μ M PF'de 4.98 kat ($p<0.001$) azalma saptamıştır (**Şekil 4.5.-A**). NGF stimülasyonunda ise hücre canlılığında kontrole kıyasla 0.1 μ M PF uygulamasında 2.92 kat ($p<0.001$), 0.5 μ M PF' de 3.54 kat ($p<0.0001$), 1 μ M PF'de 4.88 kat ($p<0.0001$) azalma tespit edilmiştir (**Şekil 4.5.-B**). Hiperglisemik (4.5 g/L glikoz) ortamda ise PAK4 inhibisyonunun FBS varlığında hücre canlılığında kontrole kıyasla 0.1 μ M PF uygulamasında 2.14 kat ($p<0.0001$), 0.5 μ M PF'de 2.84 kat ($p<0.0001$), 1 μ M PF'de 4.95 kat ($p<0.0001$) azalma saptamıştır (**Şekil 4.5.-A**). NGF stimülasyonunda ise hücre canlılığında kontrole kıyasla 0.1 μ M PF uygulamasında 3.1 kat ($p<0.001$), 0.5 μ M PF'de 4.16 kat ($p<0.0001$), 1 μ M PF'de 5.7 ($p<0.0001$), kat azalma tespit edilmiştir (**Şekil 4.5.-B**).



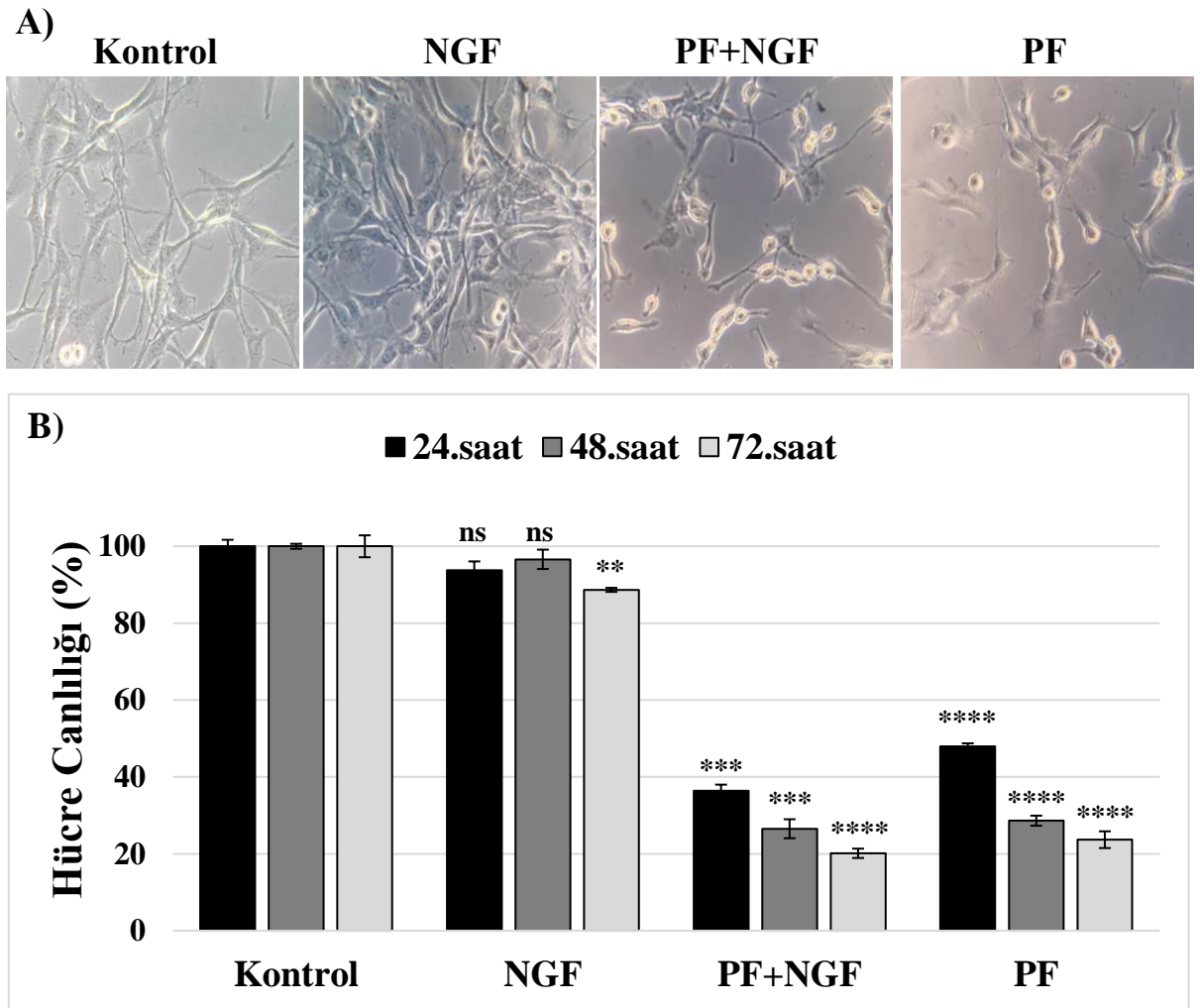
Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlarda uygulanmış PF3758309 inhibitörünün U87-MG hücrelerindeki % canlılık analizi. A)0.2- 1- 4.5 g/L glikoz, % 10 FBS ve farklı konsantrasyonlarda PF3758309 inhibitörü (0- 0.1-0.5-1 µM) uygulanan hücreler. B)0.2- 1- 4.5 g/L glikoz, %0.5 FBS, 100ng/ml ve farklı konsantrasyonlarda PF3758309 inhibitörü (0-0.1-0.5-1 µM) uygulanan hücreler. Grafikte p değeri **; p<0.01, ***, p<0.001, ****, p<0.0001 ile ifade edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda hipoglisemi ortamında (0.2 g/L glikoz) hücrelerin proliferasyon yanıtları değerlendirme kapsamına alınacak düzeyde değildi. Normoglisemi (1 g/L glikoz) ve hiperglisemi (4.5 g/L glikoz) ortamlarında PAK4 inhibisyonunun anlamlı bir şekilde hücre canlılığını azalttığı belirlendi. Hücre canlılığının, FBS ve NGF uyarımına bağlı olarak hücrelerde benzer şekilde PAK4 inhibitörünün konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığı saptandı. PF3758309 ajanının 1 µM

olarak uygulandığı örneklerde sitotoksik etkiler gözlemlendiği için bundan sonraki çalışmalarda 0.5 μ M konsantrasyonun kullanılmasına karar verilmiştir.

4.1.6. NGF Stimülasyonunun ve PAK4 İnhibisyonunun U87-MG Hücreleri Üzerindeki Zamana Bağlı Proliferatif Etkisi

NGF yolağının hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin PAK4 aktivasyonu ile ilişkili olup olmadığı zamana bağlı olarak incelenmiştir. Deney seti; Kontrol, NGF, PF+NGF, PF olacak şekilde oluşturulmuştur. Deney sonuçlarına göre, 24. saatin sonunda kontrole kıyasla hücre canlılığı NGF’de 1.07 kat ($p < 0.047$), PF+NGF’de 2.77 kat ($p < 0.001$), PF’de 2.08 kat ($p < 0.0001$) azalmıştır. 48. saatin sonunda kontrole kıyasla hücre canlılığı NGF’ de 1.03 kat (ns), PF+NGF’ de 3.77 kat ($p < 0.001$), PF’ de 3.49 kat ($p < 0.0001$) azalmıştır. 72. saatin sonunda kontrole kıyasla hücre canlılığı NGF’ de 1.13 kat ($p < 0.0087$), PF+NGF’ de 4.96 kat ($p < 0.0001$), PF’ de 4.22 kat ($p < 0.0001$) azalmıştır.



Şekil 4.6. U87-MG hücrelerine NGF, PF+NGF, PF muamelesi sonucunda zamana bağlı % canlılık

analizleri. A) Uygulamadan 48 saat sonra mikroskop altında U87-MG hücrelerinin morfolojik görüntüleri (40X objektif). B) Uygulamanın ardından 24,48 ve 72. saatte U87-MG hücrelerinin % canlılık grafikleri.

Grafikte p değeri **: p<0.01, ***; p<0.001, ****; p<0.0001 ile ifade edilmiştir.

U87-MG hücrelerine NGF uygulamasının hücre canlılığı üzerinde destekleyici bir etkisi olmadığı saptanmıştır. Ancak PAK4 inhibisyonunun NGF varlığında veya yokluğunda fark etmeksizin U87-MG hücrelerinde proliferasyonu güçlü bir baskılamıştır. Bu analize ve hücrelerin morfolojilerine göre ilerleyen aşamalardaki deneylerin 48. saatte uygulanmasına karar verilmiştir.

4.1.7. LY294002 (PI3K inhibitörü), PD0325901 (MEK inhibitörü), Apigenin ve PF3758309 (PAK4 inhibitörü) İnhibitörlerinin U87-MG Hücrelerinde PAK4, pPAK4, AKT, pAKT, ERK ve pERK Protein Düzeylerine Etkisi

NGF sinyalinin PI3K/AKT ve ERK yolağı üzerindeki etkisini ve bu süreçte PAK4'ün olası rolünü belirlemek için U87-MG hücreleri PI3K inhibitörü (LY294002), MEK inhibitörü (PD0325901), MAPK yolağı dahil birçok yolağı inhibe edebilen Apigenin ve PAK4 inhibitörü (PF3758309) ile muamele edilmiştir.

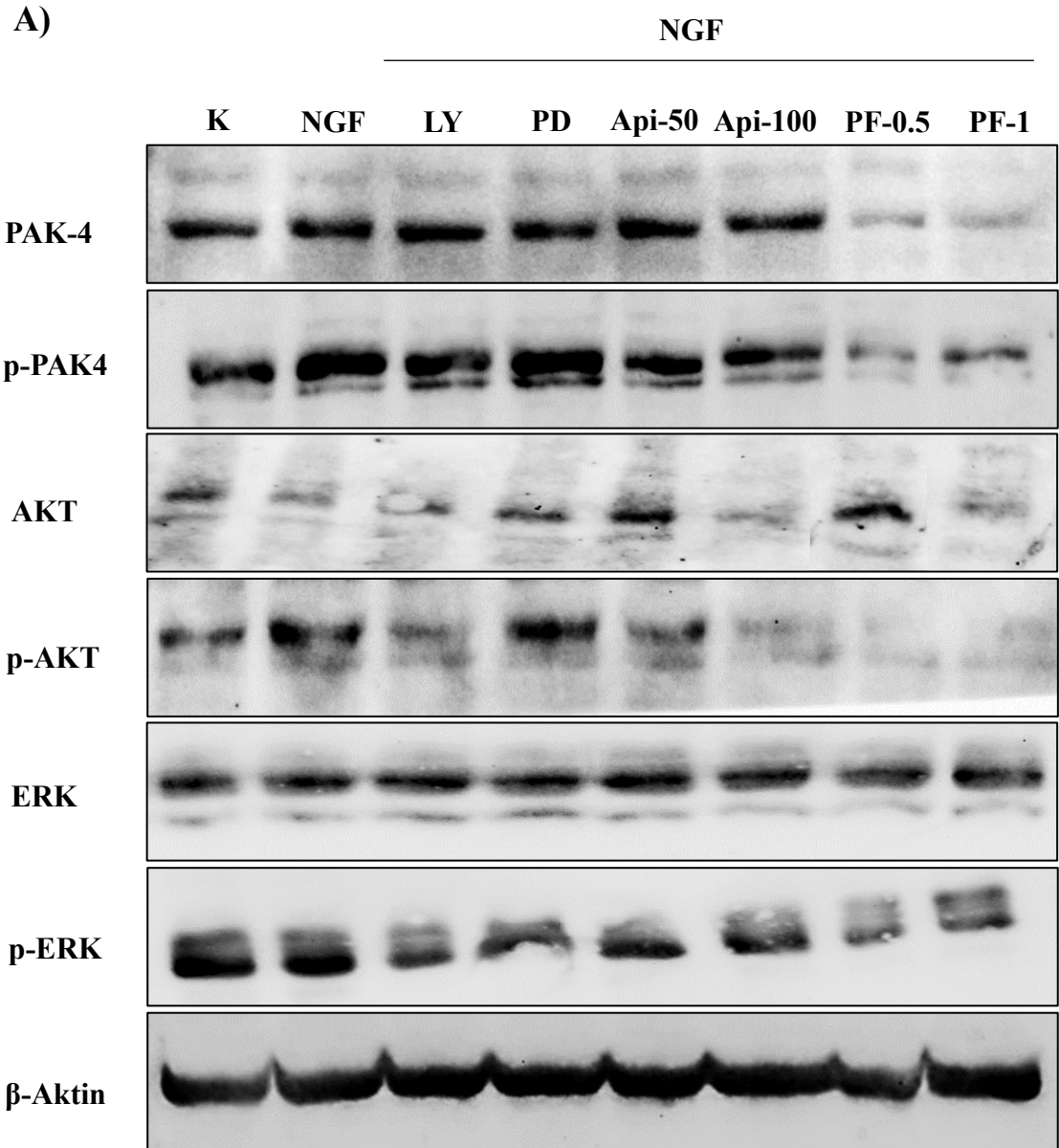
Bu çalışmada U87-MG hücreleri %0.5 FBS içeren besiyerinde 100 ng/ml NGF ile uyarılmadan 1 saat önce 20 µM LY294002 (LY) ve PD0325901 (PD), 50 ve 100 µM Apigenin (Api), 0.5 ve 1 µM PF3758309 (PF) inhibitörleri ile muamele edilmiştir. Yapılan muameleden 48 saat sonra hücre lizatları elde edilerek PAK4, fosfo-PAK4, AKT, pAKT, ERK, pERK ve β-aktin düzeyleri western blot yöntemi ile belirlenmiştir.

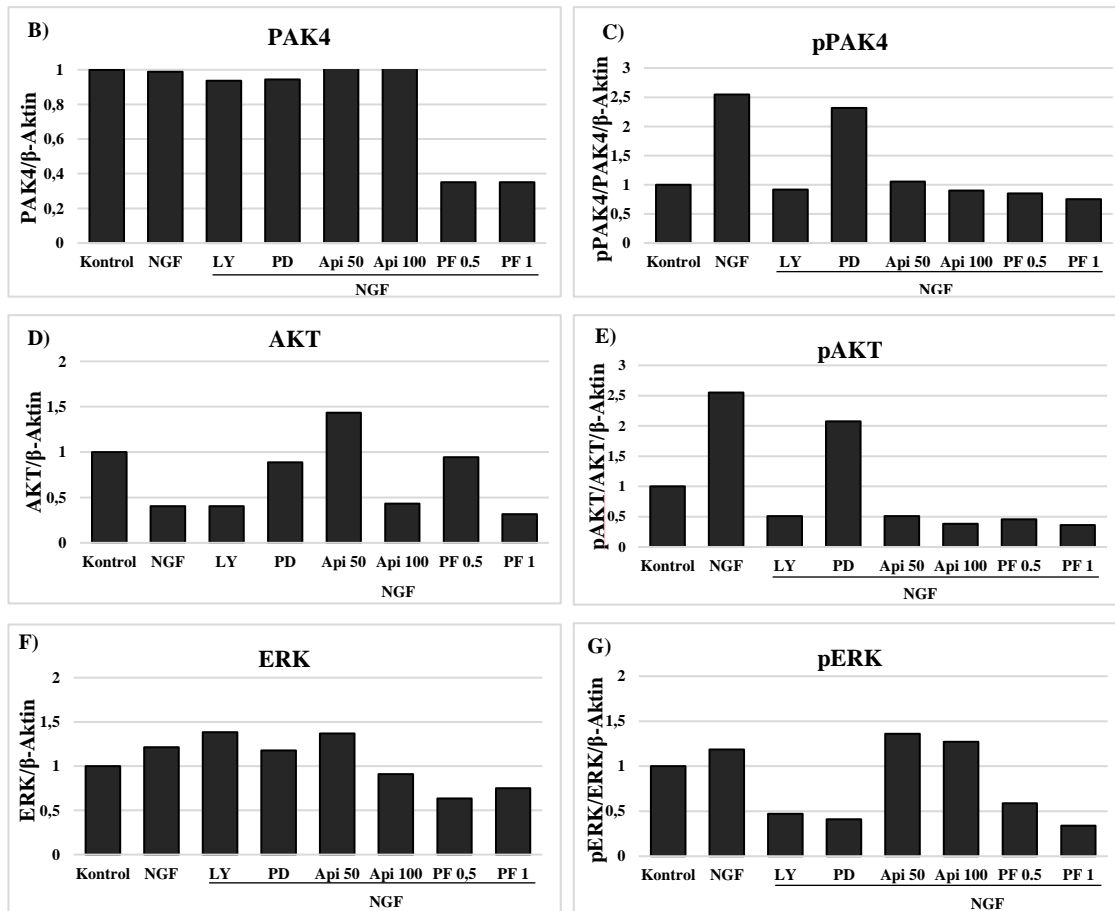
Western blot sonuçlarına göre, PAK4 ifade düzeyleri, kontrole kıyasla, PF3758309 inhibitör uygulanmış hücrelerde yaklaşık 2.85 kat azalmıştır. Diğer inhibitörlerde (LY, PD ve Api) PAK4 seviyesinde kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde değişmemiştir. pPAK4 ifade düzeyi kontrole kıyasla NGF ile muamele edilmiş hücrelerde yaklaşık 2.5 kat, PD'de 2.1 kat artmıştır. pPAK4 için diğer inhibitörlerde (LY ve Api) anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Bu sonuçlara göre NGF'in PAK4 aktivasyonunu sağladığı ve bu aktivasyonda AKT sinyalinin düzenleyici rolü olduğu söylenebilir. Ancak, PD-aracılı MEK inhibisyonu durumunda PAK4 fosforilasyon düzeyi değişmemiştir.

AKT aktivasyon düzeyleri incelendiğinde, kontrole kıyasla NGF'de 2.5 kat artarken PI3K inhibisyonu durumunda yaklaşık 2 kat azalmıştır. PD-aracılı MEK inhibisyonu durumunda pAKT düzeyi azalmamıştır. Fakat, Api ve PAK4 inhibitörü

varlığında pAKT düzeyleri kontrole kıyasla azalmıştır. Bu sonuçlara göre PAK4 inhibisyonunun, LY ve Api gibi AKT aktivasyonunu baskıladığı söylenebilir.

ERK aktivasyon düzeyleri incelendiğinde ise kontrole kıyasla NGF'de 1.2 kat artmış, PI3K inhibitörü olan LY'da ve ERK inhibitörü olan PD'de 2.5 kat azalmış olduğu tespit edilmiştir. PAK4 inhibisyonunda ise 0.5 μ M PF varlığında 2 kat, 1 μ M PF'de ise 3.3 kat ERK aktivasyonunun azaldığı saptanmıştır. Bu sonuçlara göre, NGF aracılı aktive olan ERK enziminin LY, PD ve PF aracılığıyla baskılandığı belirlenmiştir. U87-MG hücrelerinde NGF sinyali PI3K/AKT, ERK ve PAK4 sinyallerini aktive etmektedir. Dolayısıyla, PAK4'ün NGF sinyalinde PI3K/AKT ve ERK sinyal yolları üzerinde önemli regülatör rolleri olduğu ileri sürülebilir.





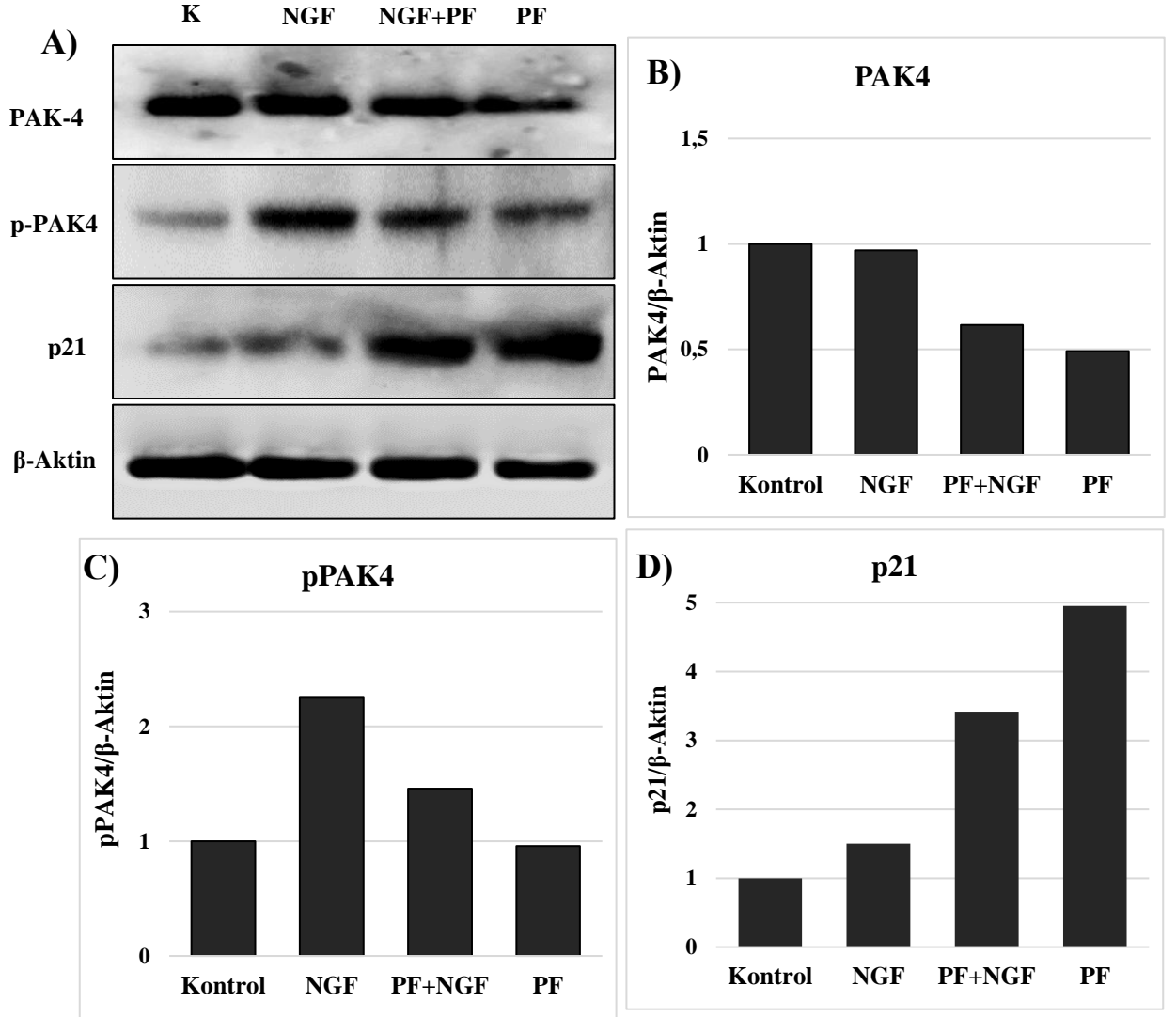
Şekil 4.7. NGF ile uyarılan ve inhibitörler ile muamele edilen U87-MG hücrelerinin western blot analizi. A) PAK4, pPAK4, AKT, pAKT, ERK ve pERK proteinlerinin ifade düzeylerinin jel görüntüsü. PAK4(B), pPAK4(C), AKT(D), pAKT (E), ERK(F), pERK (G) proteininin ifade düzeyinin grafiği. LY; 20 µM LY294002, PD; 20 µM PD0325901, API-50; 50 µM Apigenin, API-100; 100 µM Apigenin, PF0.5; 0.5 µM PF3758309 ve PF 1; 1 µM PF3758309 uygulandı.

4.1.8. NGF Stimülasyonunun PAK4 Aktivasyonu Üzerindeki Etkisi

NGF stimülasyonu neticesinde U87-MG hücrelerinde PAK4 aktivasyon seviyesinin belirlenmesi için Western blot deneyi uygulanmış ve PAK4, pPAK4 ve p21 ifade düzeyleri belirlenmiştir. Bunun için %70-75 oranında konfluent olan hücreler kullanılarak deney seti uygulanmış ve 48. saat sonunda protein lizatları elde edilmiştir. U87-MG hücrelerinde NGF uyarımına bağlı olarak PAK4 aktivasyonu yaklaşık 2.2 kat artmıştır. PF3758309 (PF)-aracılı inhibisyon yapıldığında PAK4 aktivasyonu bazal seviyeye gerilemiştir. NGF ve PF kombine uygulamada ise aktivasyon düzeyinin 1.4 kat artmış olduğu belirlenmiştir. p21 ifade düzeyi ise kontrole kıyasla NGF’de 1.5 kat, PF’de 4.9 kat, ikisinin beraber uygulanmasında ise 3.4 kat arttığı saptanmıştır (Şekil 4.8.)

PAK ailesi enzimlerde p21-bağlanma domaini (PBD) yer almaktadır. PBD ile otoinhibitör domaini PAK4 yapısında yan yana yer aldığı için p21 bağlanması neticesinde PDB bölgesine GTPaz’ların bağlanması mümkün olmaktadır. Bunun sonucunda otoinhibitör domaini inaktive edilir ve proteinin katlanması neticesinde aktif konformasyon

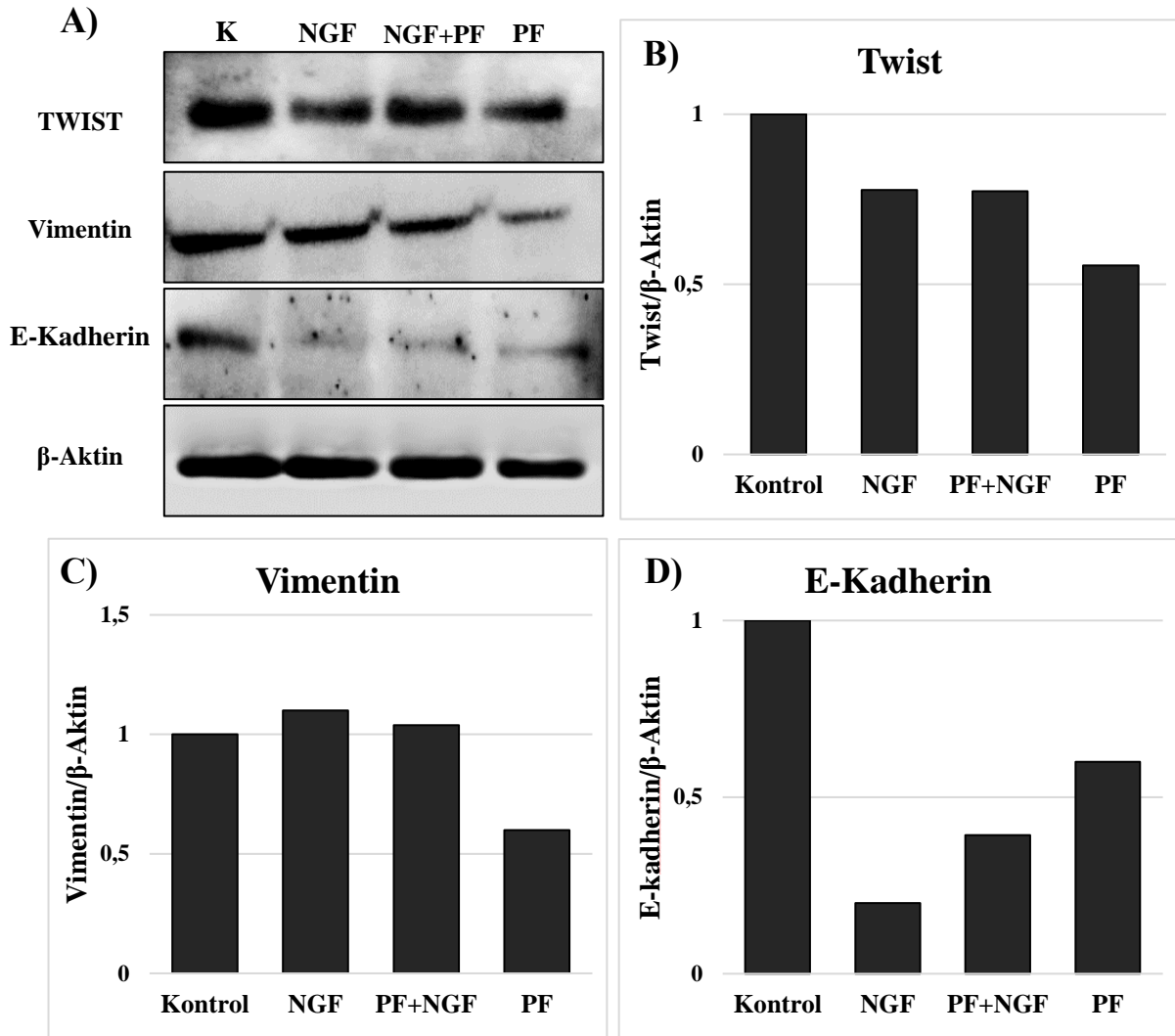
meydana gelerek kinaz domaininde yer alan S474 fosforile edilir. Bu sayede PAK4 enziminin aktivasyonu gerçekleşmektedir. Western blot sonuçlarına göre, NGF-aracılı PAK4 aktivasyonunda p21'in artışı görülmektedir. Bununla beraber PAK4 inhibitörünün hücre proliferasyonunu baskıladığı çalışmamızda gösterilmiştir. Bilindiği üzere p21 proteini hücre döngüsünün durdurulması sağlar. Dolayısıyla PF ajanı uygulandığında p21'in artış gösterdiği belirlenmiştir. NGF-aracılı PAK4 aktivasyonu ve PF-aracılı inhibisyonu durumlarında p21'in ifade düzeylerinin değişimi çalışmamızda karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. Sonuçlarımıza göre, PAK4 aktivasyonunda p21 ifadesi artarak buna katkı sağlarken, PF-aracılı PAK4 inhibisyonunda hücre döngüsünün durdurulması için p21 ifadesi yükselerek sürece katkı sağlamaktadır (**Şekil 4.8.**)



Şekil 4.8. NGF ile uyarılan PF3758309 inhibitörü ile muamele edilen U87-MG hücrelerinin western blot analizi. A) PAK4, pPAK4 ve p21 ifade düzeylerinin jel görüntüsü. PAK4(B), pPAK4(C), p21(D) proteininin ifade düzeyinin grafiği.

4.1.8.1. NGF Stimülasyonunun ve PAK4 İnhibisyonunun U87-MG Hücrelerinde EMT Sürecine Etkileri

Tez çalışmamızda NGF sinyalinin U87-MG hücrelerinde kanser metastazında önemli rol oynayan epitelyal-mezankimal (EMT) geçiş mekanizmasına etkisi araştırıldı. Bunun için deney setinin TWIST1, Vimentin ve E-kadherin ifade düzeyleri belirlendi. TWIST1 transkripsiyon faktörü EMT sürecinin temel regülatörlerinden biridir, Vimentin mezenkimal, E-kadherin ise epitelyal belirteçtir. EMT sürecinde hücrelerde epitelyal özellikler azalırken, mezenkimal özellikler artar. Elde edilen sonuçlara göre, NGF stimülasyonu TWIST1 transkripsiyon faktörünün artışına neden olmazken, PAK4 inhibitörü bu TWIST1 ifadesini 1.8-kat baskılamıştır. Mezenkimal belirteç olan Vimentin NGF uyarımı ile anlamlı düzeyde artmadığı, ancak PAK4 inhibisyonu ile yaklaşık 1.8-kat azaldığı saptanmıştır. Epitelyal belirteç olan E-kadherin kontrole kıyasla NGF uyarımında 5 kat, PAK4 inhibisyonunda ise yaklaşık 2 kat baskılanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, NGF sinyalinin U87-MG hücrelerinde E-kadherini ve dolayısıyla epitelyal özellikleri baskılayabildiği ve PAK4 inhibisyonunun NGF stimülasyonuna rağmen E-kadherini ve neticede epitelyal özelliklere destek olduğu söylenebilir. Ayrıca, PAK4 inhibisyonu tek başına Vimentin ifadesini azaltarak mezenkimal özelliklerin azalmasına neden olabildiği ileri sürülebilir.



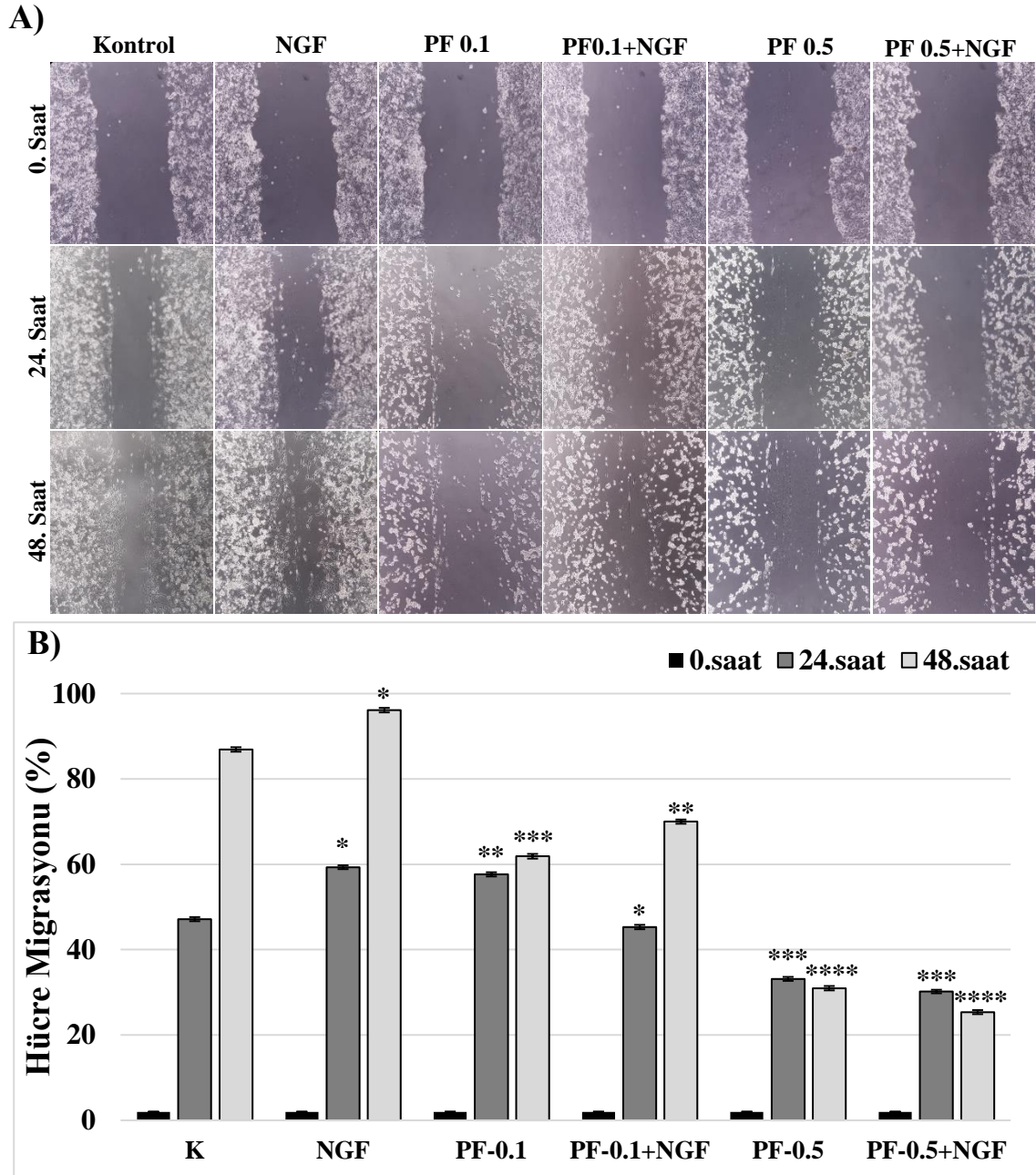
Şekil 4.9. NGF ile uyarılan PF3758309 inhibitörü ile muamele edilen U87-MG hücrelerinin western blot analizi. A) Twist, vimentin ve e-kadherin ifade düzeylerinin jel görüntüsü. Twist(B), Vimentin(C) E-Kadherin(D) proteininin ifade düzeyinin grafiği.

4.1.9 NGF Stimülasyonunun ve PAK4 İnhibisyonunun U87-MG Hücrelerinin Migrasyon Kabiliyeti Üzerindeki Etkileri

U87-MG hücrelerine NGF uyarımı ve PF3758309-aracılı PAK4 inhibisyonunun hücre göçü kabiliyeti üzerindeki etkisi wound healing (yara iyileşmesi) deneyi ile analiz edildi. Hücrelerin yara alanındaki göçleri 24 ve 48 saat süre ile takip edilmiştir. Hücreler PF3758309 inhibitörü ile iki farklı dozda (0.1 ve 0.5 μ M) muamele edilmiştir. Her bir örnek kendi 0. saatindeki yara alanına göre normalize edilerek kontrole göre kıyaslanmıştır.

Hücreler 24. saatin sonunda; NGF uyarımında %59 oranında ($p < 0.026$), 48. saatin sonunda %96 oranında ($p < 0.015$) yara alanını kapatmıştır. 0.1 μ M PF muamelesinde 24. saatin sonunda %57 oranında ($p < 0.0018$), 48. saatin sonunda %62

oranında ($p<0.0018$) kapanma göstermiştir. 0.1 μM PF ve 100ng/mL NGF muamelesinde 24. saatin sonunda %45 oranında ($p<0.032$), 48.saatin sonunda %84 ($p<0.0031$) oranında kapanma göstermiştir. 0.5 μM PF muamelesinde 24. saatin sonunda %33 oranında ($p<0.00058$), 48.saatin sonunda %31 ($p<0.0001$) oranında kapanma göstermiştir. 0.5 μM PF ve 100ng/mL NGF muamelesinde 24. saatin sonunda %30 oranında ($p<0.0006$), 48.saatin sonunda %25 ($p<0.0001$) oranında kapanma göstermiştir (Şekil 4.10.).



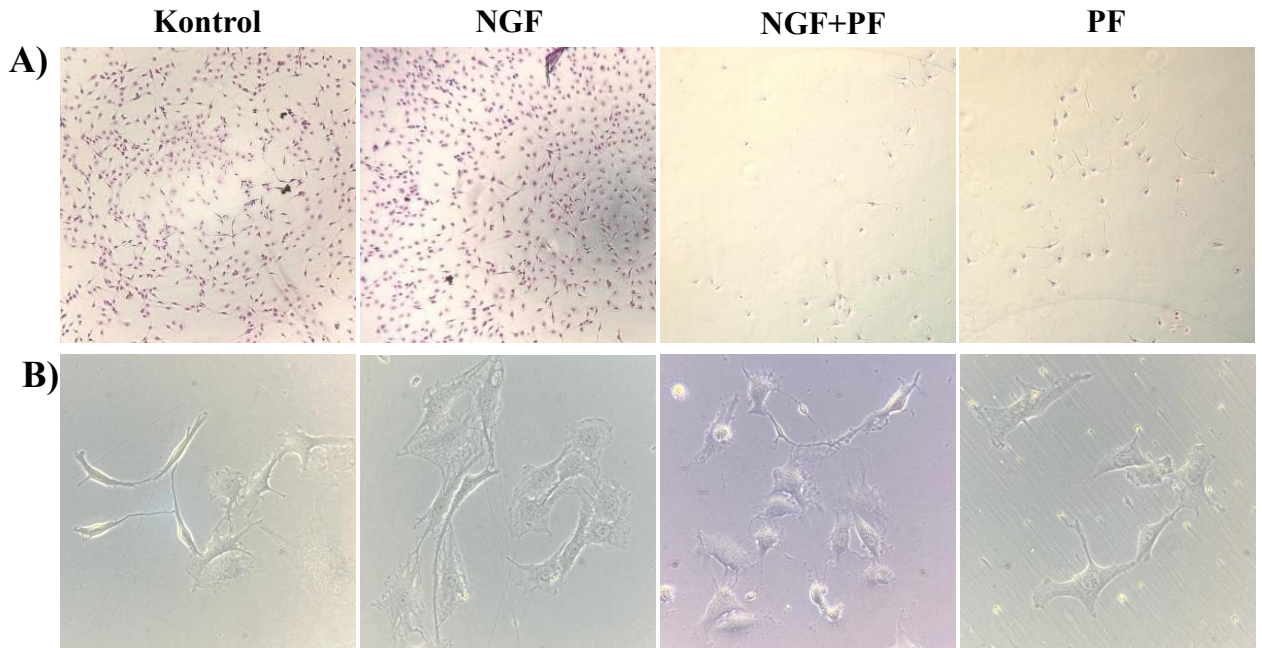
Şekil 4.10. NGF ile uyarılan PF3758309 ile muamele edilen U87-MG hücrelerinin migrasyon analizi. A)U87-MG hücrelerinin migrasyon görüntüleri. B) U87-MG hücrelerinin % migrasyon grafiği. Grafikte p değeri **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$, ****, $p<0.0001$ ile ifade edilmiştir.

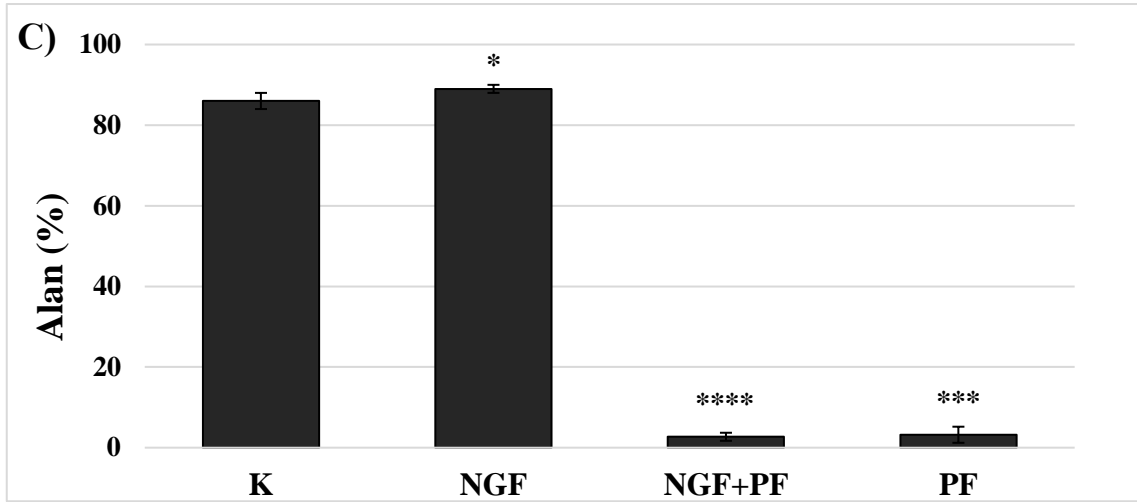
Bu sonuçlara göre, NGF stimülasyonunun U87-MG hücrelerinde hücre migrasyonunu tetiklediği belirlenmiştir. PAK4 inhibisyonu ise NGF uyarımına rağmen hücre migrasyonunu durdurduğu saptanmıştır. Dolayısıyla, PAK4'ün NGF ilişkili hücre göçünde önemli bir regülatör olduğu ileri sürülebilir.

4.1.10. NGF Stimülasyonunun ve PAK4 İnhibisyonunun U87-MG Hücrelerinin Koloni Oluşturma Yeteneği Üzerindeki Etkisi

NGF uyarımı ve PAK4 inhibisyonuna bağlı olarak U87-MG hücrelerinin koloni oluşturma yeteneği üzerindeki etkisi analiz edilmiştir. Deney seti uygulamanın 7. gününde kristal viyole ile hücreler boyanarak mikroskop altında görüntülenmiştir.

NGF ile uyarılan U87-MG hücrelerinin koloni oluşturma yeteneği kontrole kıyasla 1.03 kat ($p<0.04$) artmıştır. PAK4 inhibitörü ve NGF ile kombine muamele edilen hücrelerin kontrole kıyasla koloni oluşturma yeteneğinin yaklaşık 33 kat ($p<0.0001$) azaldığı saptanmıştır. PAK4 inhibisyonu durumunda hücrelerin kontrole kıyasla koloni oluşturma yeteneği 27 kat ($p<0.001$) azaldığı saptanmıştır (Şekil 4.11.).



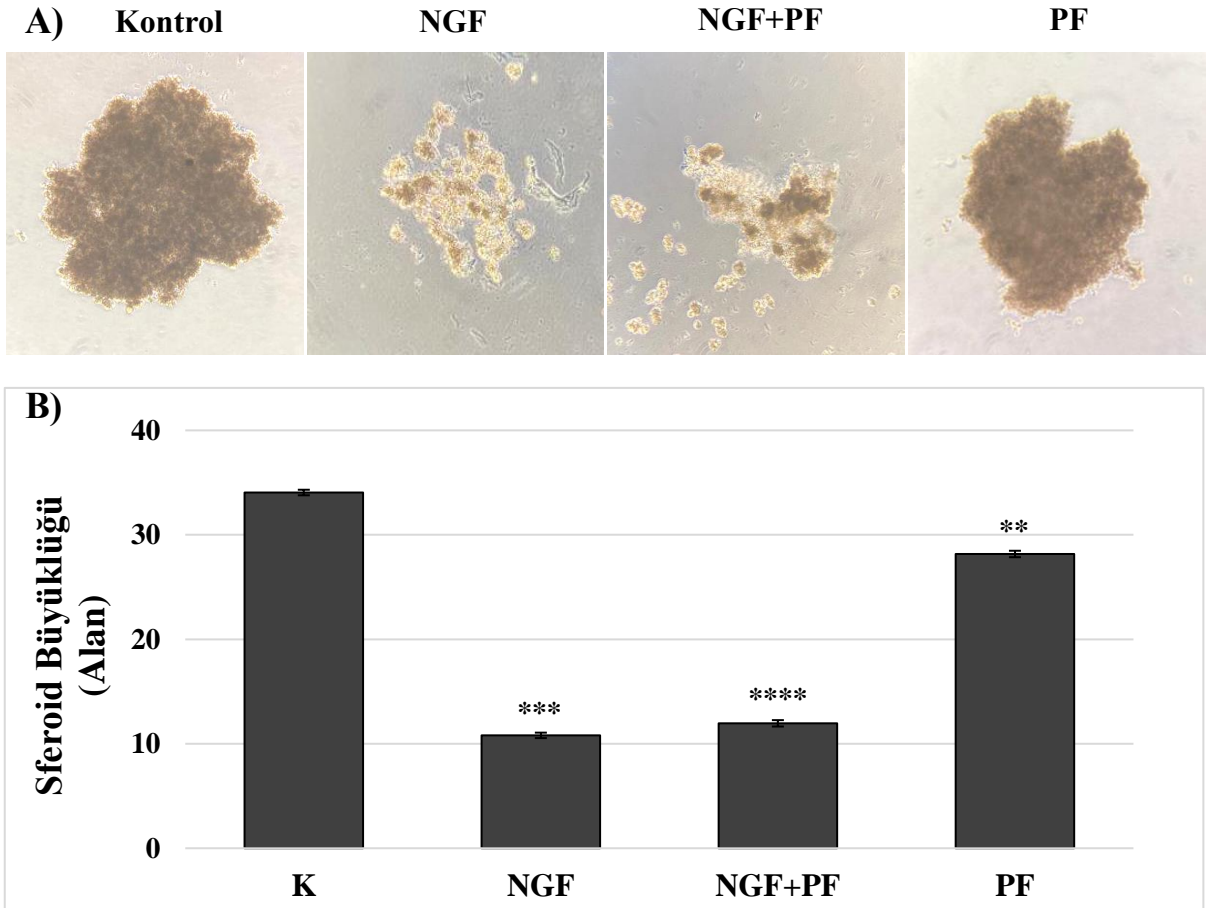


Şekil 4.11. NGF uyarımının ve PF 3758309 muamelesinin U87-MG hücrelerinin koloni oluşturma yeteneği üzerindeki etkisi. A) 7.günün sonunda crystal violet ile boyanmış hücrelerin görüntüsü. B) ajanlar ile muamele edildikten 24 saat sonra hücrelerin morfolojisi. C) U87-MG hücrelerinin 7.günün sonunda kapladıkları alanın % grafiği. Grafikte p değeri **, $p<0.01$, ***, $p<0.001$, ****, $p<0.0001$ ile ifade edilmiştir.

4.1.11. NGF Stimülasyonunun ve PAK4 İnhibisyonunun Üç-Boyutlu (3D) Kültürde U87-MG Hücrelerinin Sferoid Büyüklüğüne Etkisi

NGF uyarımı ve PAK4 inhibisyonunun ayrı ayrı ve kombine şekilde gerçekleştirilmesinin U87-MG hücrelerinin sferoid yapıları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Deney seti, uygulamanın ardından 5 gün boyunca asılı damla tekniği ile kültüre edilmiş ve mikroskop görüntülerine göre analiz edilmiştir.

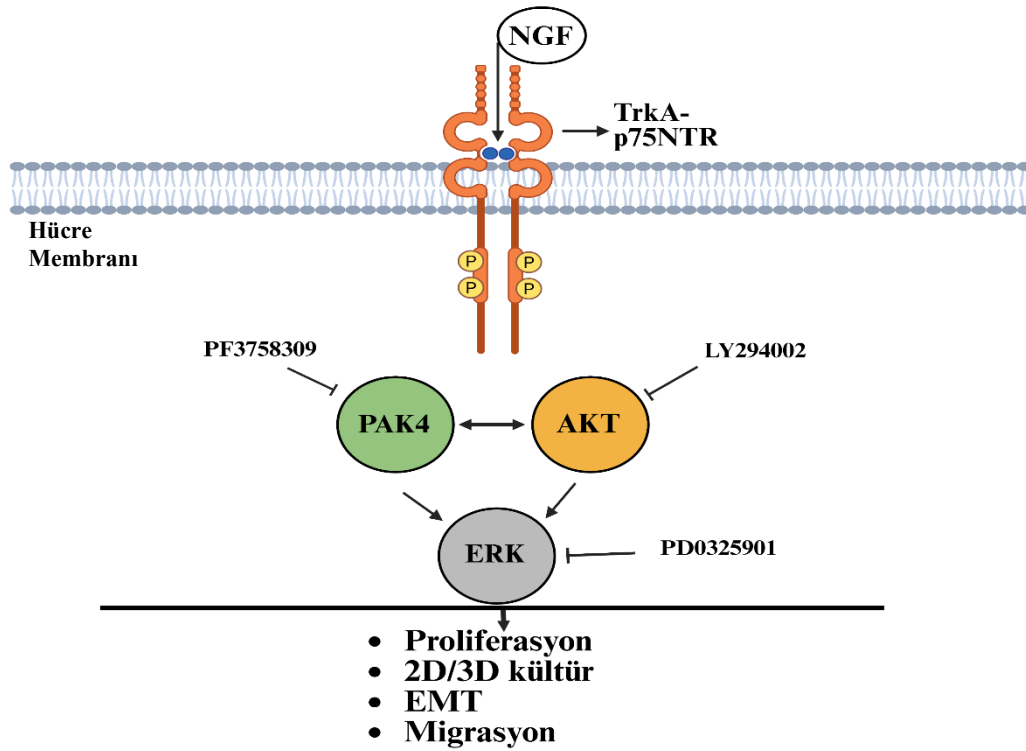
Deney sonuçlarına göre, NGF uyarımının kontrole kıyasla sferoid büyüklüğünü 3.09 kat ($p<0.001$), PAK4 inhibitörü ve NGF kombine muamelesinin ise 2.84 kat ($p<0.0001$) azalttığı saptanmıştır. PAK4 inhibitörünün tek başına uygulanmasında kontrole kıyasla sferoid büyüklüğü 1.20 kat ($p<0.00018$) azalmıştır (**Şekil 4.12.**).



Şekil 4.12. NGF uyarımı ve PF37758309 inhibitörünün U87-MG hücrelerinin oluşturduğu sferoid büyüklüğüne etkisi. A) Sferoid yapılarının 5 günün sonunda mikroskop altında alınan görüntüleri. B) Uygulanan ajanların sferoid büyüklüğüne etkisinin alan grafiği. Grafikte p değeri **: $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$, ****; $p < 0.0001$ ile ifade edilmiştir.

Elde edilen veriler doğrultusunda, NGF stimülasyonunun U87-MG hücrelerinin oluşturduğu sferoid yapılarının dağılmasını sağladığı, PF3758309 ajanının ile PAK4 inhibisyonu durumunda ise sferoid yapı bütünlüğünün korunduğu ancak sferoid büyümesini engellediği gösterilmiştir. Dolayısıyla, NGF'in 3D yapıda glioblastoma hücrelerinin hücre-hücre kontaktını zayıflatarak hücre disseminasyonunu desteklediği söylenebilir.

ARAŞTIRMA SONUÇLARININ ÖZETİ;



4.2. Tartışma

Bu tez çalışmasında, glioblastoma hücre hattı U87-MG'de sinir büyüme faktörünün (NGF) p21 aktive kinaz (PAK4) regülasyonu üzerindeki etkisi araştırıldı. Çalışmamızda farklı glikoz seviyelerinin NGF salımına etkisi ve NGF uyarımıyla birlikte PAK4 regülasyonu üzerindeki etkisinin araştırılması hedeflendi.

Bielecka Vajdman vd. yaptığı çalışmada; yüksek glikoz seviyeleri, hücre canlılığını, çoğalmasını ve göç etme kabiliyetini artırarak glioblastoma (GBM) progresyonunu desteklediği kanıtlanmıştır (Bielecka-Wajdman vd., 2022). Bu bağlamda çalışmamızda, ilk olarak artan glikoz miktarına bağlı olarak glioblastoma hücre hatlarında proliferatif etki incelenmiş ve glikoz artışına bağlı olarak U87-MG ve LN229 hücrelerinde proliferasyonu artırdığı gösterilmiştir. Ancak, düşük glikoz konsantrasyonlarında LN229 uzun süreli kültürü sağlıklı bir şekilde sağlanamadığından dolayı çalışmadan çıkarılmıştır. Sonraki aşamalardaki deneyler U87-MG hücreleri ile devam edilmiştir.

NGF seviyesi normal beyin dokusuna kıyasla malign GBM dokusunda 3 kat daha fazla olduğu bilinmektedir (Brown vd., 2008). Sıçan fetusları ile yapılan bir çalışmada,

serebral kortekste hipoksik/hipoglisemik koşullar altında 16-24 saatte nöronal ölümün başladığı gösterilmiştir. Hipoksik/hipoglisemik koşulların erken aşamasında kalsiyum miktarı hızlıca azaldığı ve geç aşamada ise güçlü bir artışın meydana geldiği rapor edilmiştir. Yüksek kalsiyum miktarı oksijen/glikoz eksikliğinde hücre hasarına neden olmaktadır. NGF hipoksik/hipoglisemik ortamda miktarı artırılarak hücre içi kalsiyum miktarını stabilize ettiği ve serebral kortikal nöronları oluşacak hücre hasarından koruduğu belirlenmiştir. (Wu & Zhang, 1998). Tez çalışmamızda, farklı glikoz seviyeleri ile muamele edilen U87-MG hücrelerinin koşullandırılmış besiyerindeki β -NGF miktarının glikoz miktarına duyarlı olduğu saptandı. Hipoglisemik koşullarda (0.2g/L glikoz) hiperglisemiye (4.5g/L glikoz) göre NGF salımının 1.35 kat daha fazla olduğu saptandı. Bu sonuç U87-MG hücrelerinde NGF'in glikoz eksikliğine bağlı olarak meydana gelecek hücre hasarına karşı koruyucu etkisini göstermektedir.

Tez çalışmamızda U87-MG hücrelerinin NGF ve FBS miktarlarının artışına bağlı olarak hücre canlılık düzeyleri belirlendi. Park vd. yaptığı çalışmada, NGF'in GBM proliferasyonu üzerinde doza bağlı olarak önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Fakat bunun kullanılan hücre hatlarında farklılık göstereceği belirtilmiştir (Park vd., 2018). Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda artan NGF miktarının farklı glikoz seviyelerinde, U87-MG hücrelerinde proliferasyon üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir. Ancak, artan FBS konsantrasyonunun hücre canlılığını artırdığı saptanmıştır. Yapılan bir çalışma, FBS'in nöral kök hücrelerin yüzeye bağlanmasını ve göçünü indüklediğini göstermiştir. NGF, FBS ile birlikte hücrelerde nöronal farklılaşmayı artırdığı belirlenmiştir (Hung vd., 2013).

Tez çalışmamızda U87-MG hücrelerinde NGF uyarımı ile aktifleşen PI3K/AKT ve MAPK/ERK sinyal yollarının PAK4 aktivasyonu üzerindeki etkisini belirlemek için PI3K inhibitörü olan LY294002, MEK1/2 inhibitörü olan PD0325901 ile muamele gerçekleştirilmiştir. Ayrıca birçok biyolojik prosesi regüle ettiği bilinen ve glioblastoma hücreleri üzerinde antiproliferatif ve apoptotik etkileri olduğu bilinen bir flavonoid olan Apigenin ile muamele yapılmıştır. Bunlara ilave olarak, PAK4 inhibisyonunun PI3K/AKT ve MAPK/ERK sinyal yolları üzerindeki olası regülatör etkisini belirlemek için PAK4 inhibitörü olan PF3758309 ile muamele gerçekleştirilmiştir.

Literatürde Chen vd. yaptıkları bir çalışmada, PI3K/Akt/mTOR yolunun, GBM'in tedaviye direncinde önemli bir rol oynadığını göstermişlerdir. PI3K inhibitörü olan LY294002 ile muamele neticesinde, tümör hücrelerinin proliferasyonu baskılanarak, apoptozis tetiklenerek ve hücrelerin invaziv karakteri azaltılarak, GBM hücrelerinde

temozolomidin (TMZ) sitotoksik etkisinin artırıldığı gösterilmiştir (Chen vd., 2011). Bu çalışmaya göre hücrelere uygulanacak LY294002 konsantrasyonu 20 μ M olacak şekilde uygulanmıştır. Çalışmamızda PI3K inhibitörünün 1g/L ve 4.5 g/L glikoz ortamında kültüre edilen hücrelerin canlılığını yaklaşık 2-kat azalttığı belirlenmiştir. MEK1/2 inhibitörü olan PD0325901 ajanının hücre proliferasyonunu engelleyerek antitümör aktivite gösterdiği önceki çalışmalarca gösterilmiştir (Hou vd., 2016). Çalışmamızda bu bulguya paralel olarak MEK inhibitörünün U87-MG hücrelerinde hücre canlılığını 1,5 kat azalttığı saptanmıştır. Son çalışmalar, GBM tedavisinde diyetle alınan bir flavonoid olan apigeninin terapötik potansiyeli üzerinde durulmuştur. Apigenin, c-Met sinyalini baskılayarak ve kök hücre belirteçlerinin ekspresyonunu azaltarak GBM hücrelerinde kanser kök hücre benzeri fenotipleri inhibe eder (Kim vd., 2016). Ayrıca GBM hücreleri üzerinde antiproliferatif ve apoptotik etkiler de gösterir. Apigenin, TMZ ile birleştirildiğinde, PI3K/AKT yoluyla glioma büyümesini inhibe ederek hücre döngüsünün durdurulmasını, apoptozu ve hücre göçünü hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak inhibe ettiği kanıtlanmıştır (D. Wang vd., 2024). Tez çalışmamızda, MTT analizi sonucunda U87-MG hücrelerine uygulanan 50 μ M apigeninin hücre proliferasyonda anlamlı bir değişiklik göstermediği, ancak 100 μ M apigenin uygulamasında hücre proliferasyonunu yaklaşık 3 kat azalttığı belirlenmiştir.

Literatürde, GBM hücrelerinde PAK4'ün yüksek düzeyde ifade edildiği ve hücrelerinin proliferasyonu ve invazyonunu arttırdığı kanıtlanmıştır. Ayrıca PAK4' ün glikoz metabolizmasını etkileyerek tümör hücrelerini hayatta kalmasına katkıda bulunduğu öne sürülmüştür (Kesanakurti vd., 2017a). Bu verilere göre, PAK4 spesifik inhibitörlerinin araştırılmasının ve geliştirilmesinin yeni tedavi yaklaşımları için önemli olacağı vurgulanmıştır. Tez çalışmamızda PAK4 inhibitörü uygulanan hücrelerde proliferasyonu yaklaşık 4-5 kat azaltmıştır. Bu sonuç bağlamında, literatür ile uyumlu olarak PAK4 hedefli tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç olduğunu söyleyebiliriz.

Farklı glikoz konsantrasyonları (0.2g/L, 1g/L, 4.5g/L) ile kültüre edilen ve NGF ile uyarılan U87-MG hücrelerine PI3K, MEK, Apigenin ve PAK4 inhibitörleri ile muamele edilen hücrelerin canlılık analizlerine göre, hipoglisemik ortamdaki (0.2g/L glikoz) hücrelerde canlılık düzeyleri bazal seviyede kalmış ve örnekler arasında anlamlı farklar belirlenememiştir. Normoglisemi ve hiperglisemi (1g/L ve 4.5g/L glikoz) ortamlarında NGF stimülasyonu hücre proliferasyonunu anlamlı düzeyde tetiklememiştir, ancak inhibitörler ile muamele edilen hücrelerde canlılık düzeylerinin kontrole kıyasla azaldığı saptanmıştır.

PAK'lar (p21-aktive kinazlar), hücre mobilizasyonu, proliferasyonu ve hücre sağkalımı ile ilişkili bir protein ailesidir. GBM'de, sitoplazmadaki PAK1 fosforilasyonu ve ifade düzeyi hasta prognozu ile ilişkilendirilmiştir. PAK5 inhibisyonu glioblastomada tümör gelişimini azalttığı, hücre döngüsünü bloke ettiği ve hücrelerinin göçünü baskıladığı gösterilmiştir. PAK4 ise GBM hücrelerinde apoptozu inhibe ederken hücre çoğalmasını ve invazyonunu desteklediği rapor edilmiştir (Blankenstein vd., 2022). Son çalışmalarda PAK4'ün GBM gelişiminde önemli rolleri olduğu belirlenmiştir. PAK4, gliomalarda yüksek seviyede ifade edildiği ve bunun kötü prognoz ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır (Kesanakurti vd., 2017b). Ayrıca, EMT'yi, radyoterapi direncini ve anjiyogenez oluşumunu destekleyici özellikleri söz konusudur. GBM'de PAK4'ün inhibe edilmesiyle, tümör içi anjiyogenezin normalleştiği, T hücresi infiltrasyonunun desteklendiği ve CAR-T hücre terapisine duyarlılığın arttığı belirlenmiştir (F. Yang vd., 2021). Tez çalışmamızda U87-MG hücrelerinin NGF ile uyarılması endojen PAK4 protein seviyesinde anlamlı bir artışa neden olmamıştır, ancak PAK4 aktivasyonunu yaklaşık 2.5 kat arttırmıştır. Şimdiye kadar literatürde, U87-MG hücrelerinde NGF ve PAK4 ilişkisini inceleyen herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Son yıllarda oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC)'da NGF, IL-6 ve EGFR1 ifade düzeylerinin PAK4 ile doğru orantılı bir şekilde arttığı ve PAK4'ün, PI3K/AKT sinyal yolunu aktifleştirerek OSCC hücrelerinin çoğalmasını desteklediği gösterilmiştir (Zhang vd., 2023).

GBM' de PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı, hücre çoğalması, EMT, metabolizma ve anjiyogenez gibi önemli biyolojik işlevlerin temel düzenleyici yollardan birisidir. (Zhang vd., 2023). Bu bağlamda çalışmamızda, U87-MG hücrelerinde NGF ile aktive olan PI3K/AKT sinyal yolağının PAK4 ile ilişkisi araştırılmıştır. Bunun için PI3K özgü inhibitör olan LY294002 (LY) kullanılmıştır. Daha önce belirtildiği gibi NGF uyarımı PAK4 aktivasyonunu yaklaşık 2.5-kat artırmıştır. LY, NGF ile uyarılan hücrelerde AKT, ERK ve PAK4 fosforilasyonlarını güçlü bir şekilde baskılamıştır. NGF tarafından aktive edilen bir diğer yolak MAPK/ERK yolağıdır. ERK hücre proliferasyonu, farklılaşma, transkripsiyon düzenlemesi dahil olmak üzere çok çeşitli hücresel süreçlerde yer alır. ERK'nin ifadesinin IV. derece tümörlerde II. derece tümörlere göre önemli ölçüde yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca ERK'ün baskılanmasının mTOR bağımlı yol aracılığıyla otofajik aktiviteyi desteklediği tespit edilmiştir (K. Yang vd., 2022). ERK sinyal yolağının aktivasyonu GBM'de NGF'e yanıt olarak otofajiye aracılık ettiği gösterilmiştir (Hansen vd., 2007). Çalışmamızda, NGF-PAK4 etkileşiminde bu yolağın etkisini incelemek için MEK inhibitörü olan PD0325901 ajanı kullanılmıştır. PD, NGF ile

uyarılan hücrelerde beklendiği gibi ERK'i güçlü bir şekilde baskılamıştır. Ancak, AKT ve PAK4 fosforilasyonları baskılanmamış ve NGF varlığındaki aktivasyonları devam etmektedir. Bu bulgu, U87-MG hücrelerinde NGF ile aktive edilen PAK4 enziminin PI3K/AKT üzerinden aktive olduğunu, MAPK/ERK yolağı üzerinden aktifleşmediğini göstermektedir. Apigenin birçok bitkide bulunan bir trihidroksifalvondur. GBM'de antiproliferatif, apoptotik etkileri ve kanser kök hücre benzer fenotiplerin azaltılmasını sağlar. Çalışmamızda, U87-MG hücrelerinde apigenin AKT ve PAK4 aktivasyonunu engellerken, ERK aktivasyonunu inhibe etmemiştir. PF3758309 aracılı PAK4 inhibisyonu ise beklendiği gibi NGF uyarımı varlığında PAK4 aktivasyonunu baskılarken, aynı zamanda AKT ve ERK aktivasyonlarını da güçlü bir şekilde baskılamıştır. Dolayısıyla PAK4 inhibisyonu durumunda beraberinde AKT ve ERK enzimleri de inhibe edilmiştir. Bu sonuçlar NGF sinyalinde PAK4'ün, AKT ve ERK yolaklarının çalışmasını düzenleyebildiği anlaşılmıştır.

p21 aşırı ekspresyonunun birden fazla insan glioma hücre hattında apoptoza neden olduğu ve hayatta kalan hücrelerde ise hücre döngüsü durmasını, yaşlanmasını sağlamaktadır. Tersine, p21 az ifade edilmesi glioma hücrelerinin hayatta kalmasını ve çoğalmasına neden olduğu gösterilmektedir (Mansour vd., 2023). Tez çalışmamızda, NGF uyarımı yapılan hücrelerde PAK4 fosforilasyon düzeyi yaklaşık 2.5-kat artarken, p21 düzeyinin 1.5 kat arttığı gösterildi. Ayrıca, PF3758309 ile PAK4 inhibisyonu yapılan hücrelerde PAK4 aktivasyon düzeyi bazal seviyeye gerilerken, p21 ifadesi 4.9 kat artmıştır. NGF aracılı PAK4 aktivasyonu ile birlikte p21 seviyesinin artması, p21 aktive kinaz özelliğinde olan PAK4'ün aktivasyon durumu ile ilişkilendirilebilir. Ancak PAK4 inhibisyonu sağlandığında p21'in daha yüksek düzeye çıkması PF3758309'nin antiproliferatif etkisi ile açıklanabilir. Bilindiği gibi p21 hücre döngüsünün önemli inhibitörlerinden biridir. Bu bağlamda PAK4 inhibitörünün antiproliferatif etkisine cevap olarak p21 miktarının arttığı söylenebilir.

Kanser metastazının en önemli regülatörlerinden biri EMT sürecidir. EMT sürecinin de önemli tetikleyicilerinden biri de TWIST1 transkripsiyon faktörüdür. TWIST1, E-kadherini baskılayarak epitelyal karakterlerin azalmasını ve Vimentin gibi belirteçlerin ifadesini artırarak mezenkimal özelliklerin kazandırılmasını sağlar. TWIST1, kötü huylu gliomalarda ifadesi artmaktadır. Bu faktör mezenkimal hedef genlerden biri olan Slug ve fibroblast aktivasyon proteini (FAP) yoluyla glioma hücre invazyonunu artırmaktadır. Hedefli olarak TWIST1'in baskılanması, GBM kök hücre oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (Barzegar Behrooz vd., 2022). Ayrıca, meme kanseri

hücrelerinde TWIST1 ifadesinin baskılanmasıyla hücre canlılığının azaldığı belirlenmiştir (Cordani vd., 2023). Çalışmamızda, NGF ile uyarılan hücrelerin TWIST1 ve Vimentin ifadelerini artırmadığı belirlendi. Ancak, dikkat çekici bir şekilde E-kadherin ifadesini baskılamıştır. NGF uyarımı E-kadherin ifadesini 5 kat, PF3758309 muamelesi ise yaklaşık 2 kat baskılanmıştır. Literatürde, E-kadherin ekspresyonunun ileri dereceli gliomalarda düşük dereceli olanlara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. E-kadherin pozitifliği olan bazı glioblastoma alt tiplerinde, E-kadherin ekspresyonu kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Glioma hücre modellerinde, E-kadherin ekspresyonunun *in vitro* büyüme ve invazyon kapasitesini önemli ölçüde etkilediği doğrulanmıştır (Noronha vd., 2021b). PAK4 inhibisyonu ise TWIST1 ve Vimentin ifadelerini kontrole göre azaltarak U87-MG hücrelerinde EMT sürecini baskılayabileceğini göstermiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, yüksek Vimentinin ifadesinin GBM hastalarında sağkalım süresini azalttığını göstermiştir (Zhao vd., 2018). Tez çalışması kapsamında gerçekleştirdiğimiz *in vitro* hücre migrasyon testinde NGF stimülasyonu U87-MG hücrelerinde hücre göçünü desteklemektedir. Bununla beraber, NGF stimülasyonu varlığına rağmen PAK4 inhibitörü ile muamele edilen hücrelerde göç kabiliyeti baskılanmıştır. Literatürde, miR-485'in GBM doku örneklerinde ve hücre hatlarında sağlıklı hücrelere göre ifadesinin baskılandığı belirlenmiştir. miR-485'in yüksek ifadesi sağlandığında, PAK4 ifadesini önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır. miR-485'in aşırı ekspresyonu, GBM hücre proliferasyonunu, koloni oluşumunu ve hücre göçünü inhibe ederek, *in vitro* apoptozisin desteklenmesini ve *in vivo* olarak tümör büyümesinin azalmasını sağlamıştır (Mao vd., 2017a). Bu bağlamda PAK4 inhibisyonunun, GBM tedavisinde önemli bir konu olan EMT sürecinin ve hücre migrasyonunun durdurulması hususunda önemli bir hedef olduğu anlaşılmaktadır.

Çalışmamızda NGF uyarımının ve PAK4 inhibisyonunun U87-MG hücrelerinde koloni oluşturma kabiliyetleri incelenmiştir. Literatürde, PAK4 inhibisyonunun GBM hücrelerinin koloni oluşturma yeteneğini, tümör gelişimini ve anjiyogenezi negatif yönde etkilediği bilinmektedir (Mao vd., 2017b, M. Wang vd., 2022)). Yaptığımız çalışmada, NGF uyarımının koloni oluşma kabiliyetine anlamlı düzeyde bir katkısının olmadığı belirlendi. PAK4 inhibisyonu durumunda ise, literatürle uyumlu olarak, U87-MG hücrelerinde koloni oluşumu güçlü bir şekilde baskılanmıştır.

Tez çalışmamızda, NGF uyarımının ve PAK4 inhibisyonunun sferoid oluşumuna etkileri üç boyutlu (3D) kültür çalışmaları ile incelenmiştir. Öncelikle kontrol grubunda U87-MG hücrelerinin başarılı bir şekilde sferoid yapılarını oluşturabildiği gösterilmiştir.

NGF ile uyarılan hücrelerde ise sferoid yapılarının bütünlüklerini kaybederek kolaylıkla dağılabildiği saptandı. PAK4 inhibisyonu yapılan hücrelerde sferoid yapısının korunduğu ancak gelişemediği belirlendi. NGF ve PAK4 inhibitörünün kombine bir şekilde muamele edilen hücrelerde sferoid yapısının 3D şeklinin koruyamayarak kolaylıkla dağılabildiği gözlemlendi. NGF uyarımı, U87-MG hücrelerinde proliferasyonunu güçlü bir şekilde tetiklemese de 3D yapının bozulmasını ve hücrelerin kolayca dağılmasını sağlamıştır. Bu sonuç, NGF'in GBM'de hücre-hücre bağlantılarını zayıflattığını ve 3D yapının dağılmasını tetiklediğini göstermektedir. Literatürde, E-kadherin ekspresyon seviyelerinin sferoid oluşturma eğilimine paralel olduğu kanıtlanmıştır. E-kadherin ekspresyonu MCF-7 hücrelerinde susturulduğunda sferoid yapılar oluşmamıştır. İlave olarak, normalde sferoid oluşturmayan bir hücre hattı olan SKBR3 hücrelerinde E-kadherinin aşırı ekspresyonu sağlandığında sferoid oluşumuna neden olmuştur (Kalender vd., 2022). Bu bulgulara göre, NGF'in U87-MG hücrelerinde E-Kadherin ifadesini baskılaması nedeniyle sferoid yapının kolaylıkla dispers olduğu ileri sürülebilir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Bu tez çalışmasında, U87-MG glioblastoma hücreleri üzerinde NGF sinyalinin PAK4 üzerindeki düzenleyici etkisi araştırıldı.

Deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen sonuçlar;

- 1) Yüksek glikoz seviyeleri, hücre canlılığını, çoğalmasını ve göç etme kabiliyetini artırarak GBM ilerlemesini desteklediği, artan glikoz konsantrasyonuna bağlı olarak hücre proliferasyonunu arttırdığı ortaya konmuştur.
- 2) Hipoglisemi ortamında U87-MG hücrelerinde β -NGF salımının arttığı ve bu şekilde hipoglisemik hasara karşı hücrelerin korunduğu gösterilmiştir.
- 3) NGF stimülasyonunun U87-MG hücrelerinde proliferatif etkisinin olmadığı, ancak FBS varlığında hücre proliferasyonunun desteklendiği sonucuna ulaşılmıştır.
- 4) U87-MG hücrelerinde, PI3K, MEK, PAK4 inhibitörlerinin ve Apigenin'in anti-proliferatif etkiye sahip oldukları gösterilmiştir.
- 5) NGF sinyalinin hücrelerde PI3K/AKT, MAPK/ERK ve PAK4 sinyal yollarını aktive ettiği belirlenmiştir.
- 6) NGF uyarımı durumunda PI3K'in AKT, ERK ve PAK4 aktivasyonuna aracılık ettiği saptanmıştır.
- 7) ERK'ün AKT ve PAK4 fosforilasyonu üzerinde aktive edici bir etkisi olmamıştır.
- 8) NGF uyarımında ve PAK4'ün inhibisyonu sonucunda, PAK4 ekspresyon ve aktivasyon düzeyinin azaldığı, aynı zamanda AKT ve ERK fosforilasyon düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir. Dolayısıyla PAK4'ün AKT ve ERK sinyal yolları üzerinde düzenleyici etkisinin olduğu belirlenmiştir.
- 9) NGF'in E-Kadherin ifadesini baskılayarak EMT sürecini destekleyebileceği saptanmıştır.
- 10) NGF, U87-MG hücrelerinin migrasyon kabiliyetlerini arttırdığı, PAK4 inhibisyonunun ise bunu engellediği belirlenmiştir.
- 11) NGF, U87-MG hücrelerinde koloni oluşumuna katkıda bulunmamıştır ancak PAK4 inhibisyonu NGF uyarımına rağmen koloni oluşumunu baskılamıştır.
- 12) NGF, 3D kültürde hücre-hücre kontaktını zayıflatarak sferoid oluşumunu engellediği ve sferoidin kolay dağılmasını sağladığı belirlenmiştir.

5.2 Öneriler

1) siRNA veya miRNA teknolojileri kullanılarak PAK4'ün susturulduğu veya PAK4-KO hücreler oluşturularak deneysel çalışmalar planlanabilir.

2) Çalışma farklı GBM hücre hatlarında tekrarlanabilir.

3) NGF reseptörleri spesifik olarak bloke edilerek NGF-PAK4 aksisinin nasıl aktivasyon göstereceği belirlenebilir.

4) NGF reseptörü ve PAK4 interaksiyonunun belirlenmesi için immünpresipitasyon çalışmaları gerçekleştirilebilir.

6. KAYNAKLAR

Abel, T. W., Clark, C., Bierie, B., Chytil, A., Aakre, M., Gorska, A., & Moses, H. L. (2009). GFAP-Cre-mediated activation of oncogenic K-ras results in expansion of the subventricular zone and infiltrating glioma. *Molecular Cancer Research: MCR*, *7*(5), 645-653. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-08-0477>

Abu Aboud, O., Chen, C.-H., Senapedis, W., Baloglu, E., Argueta, C., & Weiss, R. H. (2016). Dual and Specific Inhibition of NAMPT and PAK4 By KPT-9274 Decreases Kidney Cancer Growth. *Molecular Cancer Therapeutics*, *15*(9), 2119-2129. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0197>

Ali, M. Y., Oliva, C. R., Noman, A. S. M., Allen, B. G., Goswami, P. C., Zakharia, Y., Monga, V., Spitz, D. R., Buatti, J. M., & Griguer, C. E. (2020). Radioresistance in Glioblastoma and the Development of Radiosensitizers. *Cancers*, *12*(9), 2511. <https://doi.org/10.3390/cancers12092511>

Alvautdin, R., Khalin, I., Nafeeza, M. I., Haron, M. H., & Kuznetsov, D. (2014). Nanoscale drug delivery systems and the blood–brain barrier. *International Journal of Nanomedicine*, *9*(1), 795–811. <https://doi.org/10.2147/IJN.S52236>

Amirthalingam, M., Palanisamy, S., & Tawata, S. (2021a). p21-Activated kinase 1 (PAK1) in aging and longevity: An overview. *Ageing Research Reviews*, *71*, 101443. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101443>

Amirthalingam, M., Palanisamy, S., & Tawata, S. (2021b). p21-Activated kinase 1 (PAK1) in aging and longevity: An overview. *Ageing Research Reviews*, *71*. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101443>

Arvanitis, C. D., Ferraro, G. B., & Jain, R. K. (2019). The blood–brain barrier and blood–tumour barrier in brain tumours and metastases. *Nature Reviews Cancer* *2019 20:1*, *20*(1), 26–41. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0205-x>

Apoptotic Signaling by the p75 Neurotrophin Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(14), 13801–13808. <https://doi.org/10.1074/JBC.M410435200>

Barzegar Behrooz, A., Talaie, Z., Jusheghani, F., Łos, M. J., Klonisch, T., & Ghavami, S. (2022). Wnt and PI3K/Akt/mTOR Survival Pathways as Therapeutic Targets in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1353. <https://doi.org/10.3390/ijms23031353>

Baskaran, Y., Ng, Y.-W., Selamat, W., Ling, F. T. P., & Manser, E. (2012). Group I and II mammalian PAKs have different modes of activation by Cdc42. *EMBO Reports*, *13*(7), 653-659. Scopus. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.75>

Belfiore, A., Malaguarnera, R., Vella, V., Lawrence, M. C., Sciacca, L., Frasca, F., Morrione, A., & Vigneri, R. (2017). Insulin Receptor Isoforms in Physiology and Disease: An Updated View. *Endocrine Reviews*, *38*(5), 379-431. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00073>

Bensimon, A., Aebersold, R., & Shiloh, Y. (2011). Beyond ATM: The protein kinase landscape of the DNA damage response. *FEBS Letters*, 585(11), 1625-1639. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.013>

Bielecka-Wajdman, A. M., Ludyga, T., Smyk, D., Smyk, W., Mularska, M., Świderek, P., Majewski, W., Mullins, C. S., Linnebacher, M., & Obuchowicz, E. (2022). Glucose Influences the Response of *Glioblastoma* Cells to Temozolomide and Dexamethasone. *Cancer Control*, 29, 10732748221075468. <https://doi.org/10.1177/10732748221075468>

Blankenstein, L. J., Cordes, N., Kunz-Schughart, L. A., & Vehlow, A. (2022). Targeting of p21-Activated Kinase 4 Radiosensitizes Glioblastoma Cells via Impaired DNA Repair. *Cells*, 11(14), 2133. <https://doi.org/10.3390/cells11142133>

Brown, M. C., Staniszewska, I., Lazarovici, P., Tuszynski, G., Valle, L. D., & Marcinkiewicz, C. (2008). Regulatory effect of nerve growth factor in $\alpha 9\beta 1$ integrin-dependent progression of glioblastoma. *Neuro-Oncology*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Regulatory-effect-of-nerve-growth-factor-in-%CE%B19%CE%B21-of-Brown-Staniszewska/f228442b3ed2b0993fde06fc4985954e3e062b5d>

Cao, Y. (2013). Multifarious functions of PDGFs and PDGFRs in tumor growth and metastasis. *Trends in Molecular Medicine*, 19(8), 460-473. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.05.002>

Carafoli, F., & Hohenester, E. (2013). Collagen recognition and transmembrane signalling by discoidin domain receptors. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1834(10), 2187-2194. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.10.014>

Caragher, S., Chalmers, A. J., & Gomez-Roman, N. (2019). Glioblastoma's Next Top Model: Novel Culture Systems for Brain Cancer Radiotherapy Research. *Cancers*, 11(1), 44. <https://doi.org/10.3390/cancers11010044>

Cardoso, F. L., Brites, D., & Brito, M. A. (2010). Looking at the blood-brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Research Reviews*, 64(2), 328-363. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2010.05.003>

Chen, L., Han, L., Shi, Z., Zhang, K., Liu, Y., Zheng, Y., Jiang, T., Pei-yu, P., Jiang, C., & Kang, C. (2011). LY 294002 enhances cytotoxicity of temozolomide in glioma by down-regulation of the PI 3 K / Akt pathway. <https://www.semanticscholar.org/paper/LY-294002-enhances-cytotoxicity-of-temozolomide-in-Chen-Han/d4841265c03e60142b680e48c0c4e329818404f2>

Chen, R., Smith-Cohn, M., Cohen, A. L., & Colman, H. (2017). Glioma Subclassifications and Their Clinical Significance. *Neurotherapeutics*, 14(2), 284-297. <https://doi.org/10.1007/S13311-017-0519-X/TABLES/2>

Cheng, F., & Guo, D. (2019). MET in glioma: Signaling pathways and targeted therapies. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 38(1), 270. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1269-x>

Colella, B., Faienza, F., & Di Bartolomeo, S. (2019). EMT Regulation by Autophagy: A New Perspective in Glioblastoma Biology. *Cancers*, *11*(3), 312. <https://doi.org/10.3390/cancers11030312>

Cordani, N., Mologni, L., Piazza, R., Tettamanti, P., Cogliati, V., Mauri, M., Villa, M., Malighetti, F., Di Bella, C., Jaconi, M., Cerrito, M. G., Cavaletti, G., Lavitrano, M., & Cazzaniga, M. E. (2023). TWIST1 Upregulation Is a Potential Target for Reversing Resistance to the CDK4/6 Inhibitor in Metastatic Luminal Breast Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(22), 16294. <https://doi.org/10.3390/ijms242216294>

Cui, M., Gao, X., Chi, Y., Zhang, M., Lin, H., Chen, H., Sun, C., & Ma, X. (2021). Molecular Alterations and Their Correlation With the Survival of Glioblastoma Patients With Corpus Callosum Involvement. *Frontiers in Neuroscience*, *15*, 701426. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.701426>

Dart, A. E., & Wells, C. M. (2013). P21-activated kinase 4—Not just one of the PAK. *European Journal of Cell Biology*, *92*(4-5), 129-138. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.03.002>

Davis, M. E. (2018). Epidemiology and Overview of Gliomas. *Seminars in Oncology Nursing*, *34*(5), 420-429. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2018.10.001>

de la Iglesia, N., Konopka, G., Puram, S. V., Chan, J. A., Bachoo, R. M., You, M. J., Levy, D. E., Depinho, R. A., & Bonni, A. (2008). Identification of a PTEN-regulated STAT3 brain tumor suppressor pathway. *Genes & Development*, *22*(4), 449-462. <https://doi.org/10.1101/gad.1606508>

Demir, I. E., Tieftrunk, E., Schorn, S., Friess, H., & Ceyhan, G. O. (2016). Nerve growth factor & TrkA as novel therapeutic targets in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1866*(1), 37-50. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2016.05.003>

Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *20*(2), 69-84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>

Esfahani, K., Roudaia, L., Buhlaiga, N., Del Rincon, S. V., Papneja, N., & Miller, W. H. (2020). A review of cancer immunotherapy: From the past, to the present, to the future. *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, *27*(Suppl 2), S87-S97. <https://doi.org/10.3747/co.27.5223>

Fabian, D., Guillermo Prieto Eibl, M. D. P., Alnahhas, I., Sebastian, N., Giglio, P., Puduvalli, V., Gonzalez, J., & Palmer, J. D. (2019). Treatment of Glioblastoma (GBM) with the Addition of Tumor-Treating Fields (TTF): A Review. *Cancers*, *11*(2), 174. <https://doi.org/10.3390/cancers11020174>

Fisher, J. P., & Adamson, D. C. (2021). Current FDA-Approved Therapies for High-Grade Malignant Gliomas. *Biomedicines*, *9*(3), 324. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030324>

Grochans, S., Cybulska, A. M., Simińska, D., Korbecki, J., Kojder, K., Chlubek, D., & Baranowska-Bosiacka, I. (2022). Epidemiology of Glioblastoma Multiforme—Literature Review. *Cancers*, *14*(10). <https://doi.org/10.3390/CANCERS14102412>

Franovic, A., Elliott, K. C., Seguin, L., Camargo, M. F., Weis, S. M., & Cheresch, D. A. (2015). Glioblastomas Require Integrin $\alpha\beta 3$ /PAK4 Signaling to Escape Senescence. *Cancer Research*, *75*(21), 4466-4473. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0988>

Gong, L., Zhang, Y., Liu, C., Zhang, M., & Han, S. (2021). Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy. *International Journal of Nanomedicine*, *16*, 1083-1102. <https://doi.org/10.2147/IJN.S290438>

Guarnaccia, L., Navone, S. E., Trombetta, E., Cordiglieri, C., Cherubini, A., Crisà, F. M., Rampini, P., Miozzo, M., Fontana, L., Caroli, M., Locatelli, M., Riboni, L., Campanella, R., & Marfia, G. (2018). Angiogenesis in human brain tumors: Screening of drug response through a patient-specific cell platform for personalized therapy. *Scientific Reports*, *8*(1), 8748. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27116-7>

Guillemot, F., & Zimmer, C. (2011). From cradle to grave: The multiple roles of fibroblast growth factors in neural development. *Neuron*, *71*(4), 574-588. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.002>

Gupta, A. A., Kheur, S., Palaskar, S. J., & Narang, B. R. (2021). Deciphering the “Collagen code” in tumor progression. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, *17*(1), 29-32. https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_489_17

Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>

Holland, E. C. (2000). Glioblastoma multiforme: The terminator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(12), 6242. <https://doi.org/10.1073/PNAS.97.12.6242>

Hanselmann, R. G., & Welter, C. (2016). Origin of Cancer: An Information, Energy, and Matter Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *4*, 121. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00121>

Hansen, K., Wagner, B., Hamel, W., Schweizer, M., Haag, F., Westphal, M., & Lamszus, K. (2007). Autophagic cell death induced by TrkA receptor activation in human glioblastoma cells. *Journal of Neurochemistry*, *103*(1), 259-275. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04753.x>

Hou, J., Diao, Y., Li, W., Yang, Z., Zhang, L., Chen, Z., & Wu, Y. (2016). RGD peptide conjugation results in enhanced antitumor activity of PD0325901 against glioblastoma

by both tumor-targeting delivery and combination therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, 505(1-2), 329-340. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.04.017>

Hu, J., Mukhopadhyay, A., Truesdell, P., Chander, H., Mukhopadhyay, U. K., Mak, A. S., & Craig, A. W. B. (2011). Cdc42-interacting protein 4 is a Src substrate that regulates invadopodia and invasiveness of breast tumors by promoting MT1-MMP endocytosis. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 10), 1739-1751. <https://doi.org/10.1242/jcs.078014>

Huang, B., Li, X., Li, Y., Zhang, J., Zong, Z., & Zhang, H. (2020). Current Immunotherapies for Glioblastoma Multiforme. *Frontiers in Immunology*, 11, 603911. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.603911>

Janjua, T. I., Rewatkar, P., Ahmed-Cox, A., Saeed, I., Mansfeld, F. M., Kulshreshtha, R., Kumeria, T., Ziegler, D. S., Kavallaris, M., Mazzieri, R., & Popat, A. (2021a). Frontiers in the treatment of glioblastoma: Past, present and emerging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 171, 108–138. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2021.01.012>

Janjua, T. I., Rewatkar, P., Ahmed-Cox, A., Saeed, I., Mansfeld, F. M., Kulshreshtha, R., Kumeria, T., Ziegler, D. S., Kavallaris, M., Mazzieri, R., & Popat, A. (2021b). Frontiers in the treatment of glioblastoma: Past, present and emerging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 171, 108–138. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2021.01.012>

Kalender, M., Bulbul, M. V., Kolbasi, B., & Keskin, I. (2022). In 2D and 3D Cell Culture Models, Effects of Endothelial Cells on E-cadherin / β -catenin Expression Levels and Spheroid Sizes in Ishikawa Cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, 23(1), 39-51. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2022.23.1.39>

Karim, R., Palazzo, C., Evrard, B., & Piel, G. (2016). Nanocarriers for the treatment of glioblastoma multiforme: Current state-of-the-art. *Journal of Controlled Release*, 227, 23–37. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.02.026>

Katoh, M., & Nakagama, H. (2014). FGF receptors: Cancer biology and therapeutics. *Medicinal Research Reviews*, 34(2), 280-300. <https://doi.org/10.1002/med.21288>

Kesanakurti, D., Maddirela, D., Banasavadi-Siddegowda, Y. K., Lai, T.-H., Qamri, Z., Jacob, N. K., Sampath, D., Mohanam, S., Kaur, B., & Pudevalli, V. K. (2017a). A novel interaction of PAK4 with PPAR γ to regulate Nox1 and radiation-induced epithelial-to-mesenchymal transition in glioma. *Oncogene*, 36(37), 5309-5320. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.261>

Kesanakurti, D., Maddirela, D., Banasavadi-Siddegowda, Y. K., Lai, T.-H., Qamri, Z., Jacob, N. K., Sampath, D., Mohanam, S., Kaur, B., & Pudevalli, V. K. (2017b). A novel interaction of PAK4 with PPAR γ to regulate Nox1 and radiation-induced epithelial-to-mesenchymal transition in glioma. *Oncogene*, 36(37), 5309-5320. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.261>

Kesari, S. (2011). Understanding Glioblastoma Tumor Biology: The Potential to Improve Current Diagnosis and Treatments. *Seminars in Oncology*, 38(SUPPL. 4), S2–S10. <https://doi.org/10.1053/J.SEMINONCOL.2011.09.005>

Kim, B., Jung, N., Lee, S., Sohng, J. K., & Jung, H. J. (2016). Apigenin Inhibits Cancer Stem Cell-Like Phenotypes in Human Glioblastoma Cells via Suppression of c-Met Signaling. *Phytotherapy Research*, 30(11), 1833-1840. <https://doi.org/10.1002/ptr.5689>

Khwaja, F., & Djakiew, D. (2003). Inhibition of cell-cycle effectors of proliferation in bladder tumor epithelial cells by the p75NTR tumor suppressor. *Molecular Carcinogenesis*, 36(3), 153–160. <https://doi.org/10.1002/MC.10106>

Kliemann, M., Rattenholl, A., Golbik, R., Balbach, J., Lilie, H., Rudolph, R., & Schwarz, E. (2004). The mature part of proNGF induces the structure of its pro-peptide. *FEBS Letters*, 566(1–3), 207–212. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2004.04.034>

Krcek, R., Matschke, V., Theis, V., Adamietz, I. A., Bühler, H., & Theiss, C. (2017). Vascular Endothelial Growth Factor, Irradiation, and Axitinib Have Diverse Effects on Motility and Proliferation of Glioblastoma Multiforme Cells. *Frontiers in Oncology*, 7, 182. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00182>

Kirstein, A., Schmid, T. E., & Combs, S. E. (n.d.). *cancers The Role of miRNA for the Treatment of MGMT Unmethylated Glioblastoma Multiforme*. <https://doi.org/10.3390/cancers12051099>

Kirstein, A., Schmid, T. E., & Combs, S. E. (2020). The role of mirna for the treatment of mgmt unmethylated glioblastoma multiforme. In *Cancers* (Vol. 12, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers12051099>

Kliemann, M., Rattenholl, A., Golbik, R., Balbach, J., Lilie, H., Rudolph, R., & Schwarz

Lee, Y. T., Tan, Y. J., & Oon, C. E. (2018). Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *European Journal of Pharmacology*, 834, 188-196. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.034>

Lintz, M., Muñoz, A., & Reinhart-King, C. A. (2017a). The Mechanics of Single Cell and Collective Migration of Tumor Cells. *Journal of Biomechanical Engineering*, 139(2), 0210051-0210059. <https://doi.org/10.1115/1.4035121>

Lintz, M., Muñoz, A., & Reinhart-King, C. A. (2017b). The Mechanics of Single Cell and Collective Migration of Tumor Cells. *Journal of Biomechanical Engineering*, 139(2), 0210051-0210059. <https://doi.org/10.1115/1.4035121>

Lima, F. R. S., Kahn, S. A., Soletti, R. C., Biasoli, D., Alves, T., da Fonseca, A. C. C., Garcia, C., Romão, L., Brito, J., Holanda-Afonso, R., Faria, J., Borges, H., & Moura-Neto, V. (2012a). Glioblastoma: Therapeutic challenges, what lies ahead. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1826(2), 338–349. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2012.05.004>

Lima, F. R. S., Kahn, S. A., Soletti, R. C., Biasoli, D., Alves, T., da Fonseca, A. C. C., Garcia, C., Romão, L., Brito, J., Holanda-Afonso, R., Faria, J., Borges, H., & Moura-Neto, V. (2012b). Glioblastoma: Therapeutic challenges, what lies ahead. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1826(2), 338–349. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2012.05.004>

Linggi, M. S., Burke, T. L., Williams, B. B., Harrington, A., Kraemer, R., Hempstead, B. L., Sung, O. Y., & Carter, B. D. (2005). Neurotrophin Receptor Interacting Factor (NRIF) Is an Essential Mediator of Apoptotic Signaling by the p75 Neurotrophin Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 13801–13808. <https://doi.org/10.1074/JBC.M410435200>

Loh, C.-Y., Chai, J. Y., Tang, T. F., Wong, W. F., Sethi, G., Shanmugam, M. K., Chong, P. P., & Looi, C. Y. (2019). The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells*, 8(10), 1118. <https://doi.org/10.3390/cells8101118>

Malignant Gliomas in Adults. (2008). <https://doi.org/10.1056/NEJMc086380>, 359(17), 1850–1850. <https://doi.org/10.1056/NEJMC086380>

Marsland, M., Dowdell, A., Faulkner, S., Jobling, P., Rush, R. A., Gedye, C., Lynam, J., Griffin, C. P., Baker, M., Marsland, J., Jiang, C. C., & Hondermarck, H. (2023a). ProNGF Expression and Targeting in Glioblastoma Multiforme. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2). <https://doi.org/10.3390/IJMS24021616/S1>

Marsland, M., Dowdell, A., Faulkner, S., Jobling, P., Rush, R. A., Gedye, C., Lynam, J., Griffin, C. P., Baker, M., Marsland, J., Jiang, C. C., & Hondermarck, H. (2023b). ProNGF Expression and Targeting in Glioblastoma Multiforme. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1616. <https://doi.org/10.3390/IJMS24021616/S1>

Mammoto, T., Jiang, A., Jiang, E., Panigrahy, D., Kieran, M. W., & Mammoto, A. (2013). Role of collagen matrix in tumor angiogenesis and glioblastoma multiforme progression. *The American Journal of Pathology*, 183(4), 1293-1305. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.06.026>

Mansour, M. A., Rahman, M., Ayad, A. A., Warrington, A. E., & Burns, T. C. (2023). P21 Overexpression Promotes Cell Death and Induces Senescence in Human Glioblastoma. *Cancers*, 15(4), 1279. <https://doi.org/10.3390/cancers15041279>

Mao, K., Lei, D., Zhang, H., & You, C. (2017a). MicroRNA-485 inhibits malignant biological behaviour of glioblastoma cells by directly targeting PAK4. *International Journal of Oncology*, 51(5), 1521-1532. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4122>

Mao, K., Lei, D., Zhang, H., & You, C. (2017b). MicroRNA-485 inhibits malignant biological behaviour of glioblastoma cells by directly targeting PAK4. *International Journal of Oncology*, 51(5), 1521-1532. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4122>

Marconi, G. D., Fonticoli, L., Rajan, T. S., Pierdomenico, S. D., Trubiani, O., Pizzicannella, J., & Diomedede, F. (2021). Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT): The Type-2 EMT in Wound Healing, Tissue Regeneration and Organ Fibrosis. *Cells*, 10(7), 1587. <https://doi.org/10.3390/cells10071587>

Maris, C., D'Haene, N., Trépant, A.-L., Le Mercier, M., Sauvage, S., Allard, J., Rorive, S., Demetter, P., Decaestecker, C., & Salmon, I. (2015). IGF-IR: A new prognostic biomarker for human glioblastoma. *British Journal of Cancer*, 113(5), 729-737. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.242>

Merrick, M., Mimlitz, M. J., Weeder, C., Akhter, H., Bray, A., Walther, A., Nwakama, C., Bamesberger, J., Djam, H., Abid, K., & Ekpenyong, A. (2021). In vitro radiotherapy and chemotherapy alter migration of brain cancer cells before cell death. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 27, 101071. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2021.101071>

Mohiuddin, E., & Wakimoto, H. (2021). Extracellular matrix in glioblastoma: Opportunities for emerging therapeutic approaches. *American Journal of Cancer Research*, 11(8), 3742-3754.

Mudassar, F., Shen, H., O'Neill, G., & Hau, E. (2020). Targeting tumor hypoxia and mitochondrial metabolism with anti-parasitic drugs to improve radiation response in high-grade gliomas. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2021 39:1, 39(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/S13046-020-01724-6>

Munoz, J. L., Walker, N. D., Scotto, K. W., & Rameshwar, P. (2015). Temozolomide competes for P-glycoprotein and contributes to chemoresistance in glioblastoma cells. *Cancer Letters*, 367(1), 69–75. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2015.07.013>

Na, T.-Y., Schecterson, L., Mendonsa, A. M., & Gumbiner, B. M. (2020). The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(11), 5931-5937. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918167117>

Niewiadomska, G., Mietelska-Porowska, A., & Mazurkiewicz, M. (2011). The cholinergic system, nerve growth factor and the cytoskeleton. *Behavioural Brain Research*, 221(2), 515–526. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2010.02.024>

Nguemgo Kouam, P., Rezniczek, G. A., Kochanek, A., Priesch-Grzeszkowiak, B., Hero, T., Adamietz, I. A., & Bühler, H. (2018). Robo1 and vimentin regulate radiation-induced motility of human glioblastoma cells. *PloS One*, 13(6), e0198508. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198508>

Noronha, C., Ribeiro, A. S., Taipa, R., Castro, D. S., Reis, J., Faria, C., & Paredes, J. (2021a). Cadherin Expression and EMT: A Focus on Gliomas. *Biomedicines*, 9(10), 1328. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101328>

Noronha, C., Ribeiro, A. S., Taipa, R., Castro, D. S., Reis, J., Faria, C., & Paredes, J. (2021b). Cadherin Expression and EMT: A Focus on Gliomas. *Biomedicines*, 9(10), 1328. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9101328>

Okazaki, R. (2022). Role of p53 in Regulating Radiation Responses. *Life (Basel, Switzerland)*, 12(7), 1099. <https://doi.org/10.3390/life12071099>

Omuro, A., & DeAngelis, L. M. (2013). Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review. *JAMA*, 310(17), 1842–1850. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2013.280319>

Paiardini, A., & Caputo, V. (2008). Insights into the interaction of sortilin with proneurotrophins: A computational approach. *Neuropeptides*, 42(2), 205–214. <https://doi.org/10.1016/J.NPEP.2007.11.004>

Palumbo, M. O., Kavan, P., Miller, W. H., Panasci, L., Assouline, S., Johnson, N., Cohen, V., Patenaude, F., Pollak, M., Jagoe, R. T., & Batist, G. (2013). Systemic cancer therapy: Achievements and challenges that lie ahead. *Frontiers in Pharmacology*, *4*, 57. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00057>

Park, J. C., Chang, I. B., Ahn, J. H., Kim, J. H., Song, J. H., Moon, S. M., & Park, Y.-H. (2018). Nerve Growth Factor Stimulates Glioblastoma Proliferation through Notch1 Receptor Signaling. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, *61*(4), 441-449. <https://doi.org/10.3340/jkns.2017.0219>

Peleshok, J., & Saragovi, H. U. (2006). Functional mimetics of neurotrophins and their receptors. *Biochemical Society Transactions*, *34*(4), 612–617. <https://doi.org/10.1042/BST0340612>

Rabah, N., Ait Mohand, F.-E., & Kravchenko-Balasha, N. (2023). Understanding Glioblastoma Signaling, Heterogeneity, Invasiveness, and Drug Delivery Barriers. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(18), 14256. <https://doi.org/10.3390/ijms241814256>

Radu, M., Semenova, G., Kosoff, R., & Chernoff, J. (2014). PAK signalling during the development and progression of cancer. *Nature Reviews Cancer*, *14*(1), 13-25. <https://doi.org/10.1038/nrc3645>

Ramaswamy, P., Nanjaiah, N. D., & Borkotokey, M. (2019). Role of MEK-ERK signaling mediated adhesion of glioma cells to extra-cellular matrix: Possible implication on migration and proliferation. *Annals of Neurosciences*, *26*(2), 52-56. <https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.260203>

Rane, C. K., & Minden, A. (2019). P21 activated kinase signaling in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, *54*, 40-49. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.01.006>

Raychaudhuri, S. K., Raychaudhuri, S. P., Weltman, H., & Farber, E. M. (2001). Effect of nerve growth factor on endothelial cell biology: Proliferation and adherence molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. *Archives of Dermatological Research*, *293*(6), 291–295. <https://doi.org/10.1007/S004030100224/METRICS>

Rieger, J., Bähr, O., Maurer, G. D., Hattingen, E., Franz, K., Brucker, D., Walenta, S., Kämmerer, U., Coy, J. F., Weller, M., & Steinbach, J. P. (2014). ERGO: A pilot study of ketogenic diet in recurrent glioblastoma. *International Journal of Oncology*, *44*(6), 1843-1852. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2382>

Rocco, M. L., Soligo, M., Manni, L., & Aloe, L. (2018). Nerve Growth Factor: Early Studies and Recent Clinical Trials. *Current Neuropharmacology*, *16*(10), 1455. <https://doi.org/10.2174/1570159X16666180412092859>

Rominiyi, O., Vanderlinden, A., Clenton, S. J., Bridgewater, C., Al-Tamimi, Y., & Collis, S. J. (2021). Tumour treating fields therapy for glioblastoma: Current advances and future directions. *British Journal of Cancer*, *124*(4), 697-709. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01136-5>

Seyfried, T. N., & Mukherjee, P. (2005). Targeting energy metabolism in brain cancer: Review and hypothesis. *Nutrition & Metabolism*, 2, 30. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-2-30>

Shao, Y.-G., Ning, K., & Li, F. (2016). Group II p21-activated kinases as therapeutic targets in gastrointestinal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(3), 1224-1235. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i3.1224>

Sofroniew, M. V., Howe, C. L., & Mobley, W. C. (2003). Nerve Growth Factor Signaling, Neuroprotection, and Neural Repair. *Https://Doi.Org/10.1146/Annurev.Neuro.24.1.1217*, 24, 1217–1281. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.NEURO.24.1.1217>

Upadhyay, A. (2020). Cancer: An unknown territory; rethinking before going ahead. *Genes & Diseases*, 8(5), 655-661. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.09.002>

Valiathan, R. R., Marco, M., Leitinger, B., Kleer, C. G., & Fridman, R. (2012). Discoidin domain receptor tyrosine kinases: New players in cancer progression. *Cancer Metastasis Reviews*, 31(1-2), 295-321. <https://doi.org/10.1007/s10555-012-9346-z>

van der Louw, E. J. T. M., Olieman, J. F., van den Bemt, P. M. L. A., Bromberg, J. E. C., Oomen-de Hoop, E., Neuteboom, R. F., Catsman-Berrevoets, C. E., & Vincent, A. J. P. E. (2019). Ketogenic diet treatment as adjuvant to standard treatment of glioblastoma multiforme: A feasibility and safety study. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 11, 1758835919853958. <https://doi.org/10.1177/1758835919853958>

Wang, D., Wang, Z., Dai, X., Zhang, L., & Li, M. (2024). Apigenin and Temozolomide Synergistically Inhibit Glioma Growth Through the *PI3K / AKT* Pathway. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 39(2), 125-132. <https://doi.org/10.1089/cbr.2020.4283>

Wang, M., Zhang, C., Zheng, Q., Ma, Z., Qi, M., Di, G., Ling, S., Xu, H., Qi, B., Yao, C., Xia, H., & Jiang, X. (2022). RhoJ facilitates angiogenesis in glioblastoma via JNK/VEGFR2 mediated activation of PAK and ERK signaling pathways. *International Journal of Biological Sciences*, 18(3), 942-955. <https://doi.org/10.7150/ijbs.65653>

Wang, N., Jain, R. K., & Batchelor, T. T. (2017). New Directions in Anti-Angiogenic Therapy for Glioblastoma. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 14(2), 321-332. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0510-y>

Wang, Y., & Minden, A. (2021). The Use of Nanomedicine to Target Signaling by the PAK Kinases for Disease Treatment. *Cells*, 10(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/cells10123565>

Witthayanuwat, S., Pesee, M., Supaadirek, C., Supakalin, N., Thamrongnantasakul, K., & Krusun, S. (2018). Survival Analysis of Glioblastoma Multiforme. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 19(9), 2613. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.9.2613>

World Health Organization (WHO). (t.y.). Geliş tarihi 27 Kasım 2024, gönderen <https://www.who.int/>

Wu, J., & Zhang, J. (1998). Effects of nerve growth factor on intracellular free Ca²⁺ in oxygen/glucose-deprived cultures from cerebral cortex of fetal rats. *Chinese medical journal*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Effects-of-nerve-growth-factor-on-intracellular-in-Wu-Zhang/9c2419f0d708114bacc63021f19a839144ff21f3>

Wu, W., Klockow, J. L., Zhang, M., Lafortune, F., Chang, E., Jin, L., Wu, Y., & Daldrup-Link, H. E. (2021). Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. *Pharmacological Research*, *171*, 105780. <https://doi.org/10.1016/J.PHR.2021.105780>

Yang, F., Binder, Z., O'Rourke, D. M., & Fan, Y. (2021). EXTH-37. PAK4 INHIBITION REPROGRAMS VASCULAR MICROENVIRONMENT AND IMPROVES CAR T IMMUNOTHERAPY IN GLIOBLASTOMA. *Neuro-Oncology*, *23*(Supplement_6), vi171-vi171. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab196.676>

Yang, K., Luan, L., Li, X., Sun, X., & Yin, J. (2022). ERK inhibition in glioblastoma is associated with autophagy activation and tumorigenesis suppression. *Journal of Neuro-Oncology*, *156*(1), 123-137. <https://doi.org/10.1007/s11060-021-03896-3>

Yuan, Y., Zhang, H., Li, D., Li, Y., Lin, F., Wang, Y., Song, H., Liu, X., Li, F., & Zhang, J. (2022a). PAK4 in cancer development: Emerging player and therapeutic opportunities. *Cancer Letters*, *545*, 215813. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.215813>

Yuan, Y., Zhang, H., Li, D., Li, Y., Lin, F., Wang, Y., Song, H., Liu, X., Li, F., & Zhang, J. (2022b). PAK4 in cancer development: Emerging player and therapeutic opportunities. *Cancer Letters*, *545*, 215813. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.215813>

Yu, T., Calvo, L., Anta, B., López-Benito, S., López-Bellido, R., Vicente-García, C., Tessarollo, L., Rodriguez, R. E., & Arévalo, J. C. (2014). *In Vivo* Regulation of NGF-Mediated Functions by Nedd4-2 Ubiquitination of TrkA. *Journal of Neuroscience*, *34*(17), 6098–6106. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4271-13.2014>

Yuan, Y., Zhang, H., Li, D., Li, Y., Lin, F., Wang, Y., Song, H., Liu, X., Li, F., & Zhang, J. (2022c). PAK4 in cancer development: Emerging player and therapeutic opportunities. *Cancer Letters*, *545*, 215813. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.215813>

Zeppernick, F., Ahmadi, R., Campos, B., Dictus, C., Helmke, B. M., Becker, N., Lichter, P., Unterberg, A., Radlwimmer, B., & Herold-Mende, C. C. (2008). Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clinical Cancer Research*, *14*(1), 123–129. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0932>

Zhang, L., Lin, S., Zhang, Z., Yan, C., & Liu, F. (2023). The role of p21-activated kinase 4 in the progression of oral squamous cell carcinoma by targeting PI3K–AKT signaling pathway. *Clinical and Translational Oncology*, *25*(3), 739-747. <https://doi.org/10.1007/s12094-022-02980-y>

Zhao, J., Zhang, L., Dong, X., Liu, L., Huo, L., & Chen, H. (2018). High Expression of Vimentin is Associated With Progression and a Poor Outcome in Glioblastoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, *26*(5), 337. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000420>

Zhong, L., Li, Y., Xiong, L., Wang, W., Wu, M., Yuan, T., Yang, W., Tian, C., Miao, Z., Wang, T., & Yang, S. (2021). Small molecules in targeted cancer therapy: Advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 201. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00572-w>