

PAK4, MCF-7 hücrelerinde E-kaderini baskılayarak PKC-bağımlı invaziv potansiyeli destekler

PAK4 promotes invasive potential of MCF-7 cells in PKC-dependent manner through downregulation of E-Cadherin

Suray PEHLİVANOĞLU¹, Çiğdem AYDIN-ACAR²

ÖZET

Amaç: Normal meme epitel hücrelerinde p21 ile aktive edilen kinaz 4 (PAK4) overekspresyonu sağlandığında tek başına tümörigenezis sürecini başlatabilmektedir. Son zamanlarda yapılan araştırmalar, PAK4'ün meme kanserinde önemli bir onkojenik faktör olabileceğini ileri sürmektedir. Bu çalışmada, PAK4 overeksprese eden ve etmeyen MCF-7 meme kanseri hücrelerinde protein kinaz C aktivasyonu ve inhibisyonuna bağlı hücrelerin migrasyon kabiliyeti ve hücre-hücre kontaktını sağlayan E-Kaderin ekspresyon düzeylerinin araştırılması amaçlandı.

Yöntem: Çalışmada, meme kanseri modeli olarak MCF7 hücre hattı kullanıldı. MCF7 hücrelerinde PAK4 plasmid kullanılarak yabancıl-tip insan PAK4 geninin ektopik ekspresyonu sağlandı. Kontrol vektör olarak ise p3XFLAG-CMV-10 plazmidini kullanıldı. PKC inhibitörü olarak RO318220 ve PKC aktivatörü olarak ise phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA / TPA) kullanıldı. PAK4 plasmid ve kontrol vektör ile transfekte edilen her iki gruptaki hücreler %0,2 FBS, %10 FBS, RO318220 (5µM) ve TPA (200 nM) olacak şekilde 48 saat süre ile kültüre edildi. Meme kanseri hücrelerinde hücre migrasyonu, Oris Hücre migrasyon deneyi ile değerlendirildi. E-kaderin ekspresyonunun değerlendirilmesi için Western blot yöntemi kullanıldı.

ABSTRACT

Objective: The p21-activated kinase 4 (PAK4) overexpression is sufficient to initiate the tumorigenesis process in normal breast epithelial cells. Recent studies suggested that PAK4 could be an important oncogenic factor in breast cancer. The aim of this study was to investigate the migration ability of cells due to protein kinase C activation and inhibition and the expression levels of E-cadherin which provides cell-cell contact in MCF-7 breast cancer cells that PAK4 overexpressing and non-overexpressing cells.

Methods: MCF7 cell line was used as a breast cancer model. Ectopic expression of the wild-type human PAK4 gene was achieved using PAK4 plasmid in MCF7 cells. Plasmid p3XFLAG-CMV-10 was used as control vector. RO318220 was used as PKC inhibitor and phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA / TPA) was used as PKC activator. Cells in both groups transfected with PAK4 plasmid and control vector were cultured for 0.2 h FBS, 10% FBS, RO318220 (5µM) and TPA (200 nM) for 48 hours. Cell migration in breast cancer cells was evaluated by Oris cell migration assay. Western blot method was used to evaluate the expression of E-cadherin.

¹ Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Konya
² Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Bucak Sağlık Yüksekokulu, Burdur



İletişim / Corresponding Author : Suray PEHLİVANOĞLU

Necmettin Erbakan Üni., Fen Fak., Mol. Biyo. ve Gen. Böl., B0-Blok No: 208 Konya - Türkiye
Tel : +90 505 900 58 06 E-posta / E-mail : spehlivanoglu@erbakan.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 08.01.2020
Kabul Tarihi / Accepted : 30.01.2020

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2020.33340

Pehlivanoglu S, Aydın-Acar Ç. PAK4, MCF-7 hücrelerinde E-kaderini baskılayarak PKC-bağımlı invaziv potansiyeli destekler
Turk Hij Den Biyol Derg, 2020; 77(1): 107-116

Bulgular: Yüksek PAK4 ekspresyonu sağlanan MCF7 hücrelerinde mezenkimal-benzer fenotipin meydana geldiği ve podozomal yapıların sayılarının ve uzunluklarının arttığı belirlendi. Ayrıca TPA ile PKC aktivasyonu sağlanan hücrelerde PAK4 overekspresyonuna bağlı hücre migrasyonunda artış görüldü. Fakat PKC ile indüklenen invaziv etkiler PKC inhibitörü olan RO318220 ile muamele edilen hücrelerde bloke edildi. Bunun yansıması, PAK4 overekspresyon eden hücrelerde kontrole göre E-kaderin ekspresyonunda baskılanma meydana geldiği belirlendi.

Sonuç: E-kaderin, hücre-hücre kontaktını sağlayan ve hücre göçünü engelleyen temel yapılardan biridir. Birlikte değerlendirildiğinde, bu bulgular PKC ile aktive edilen PAK4 sinyalinin meme kanseri progresyonuna katkıda bulunduğunu göstermektedir. Bu nedenle, sonuçlarımız PKC-PAK4 sinyal yolağının inhibe edilmesinin meme kanseri tedavisi için potansiyel bir terapötik yaklaşım olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, PAK4, Protein kinaz C

Results: It was determined that mesenchymal-like phenotype was formed and the number and length of podosomal structures were increased in these PAK4 overexpressed cells. In addition, PKC activation via TPA treatment increased cell migration due to PAK4 overexpression. However, PKC-induced invasive effects were blocked by the PKC kinase inhibitor RO318220. In addition, PAK4 overexpression leads to downregulation of E-cadherin compared to control.

Conclusion: E-cadherin is one of the basic structures that provide cell-cell contacts and prevent cell migration. Taken together, these findings suggest that PKC-activated PAK4 signalling contributes to breast cancer progression. Therefore, our results show that inhibition of the PKC-PAK4 signaling pathway may be a potential therapeutic approach for the treatment of breast cancer.

Key Words: Breast cancer, PAK4, Protein kinase C

GİRİŞ

Meme kanseri, kadınlarda kanserin sebebiyet verdiği ölümler arasında birinci sırada yer almaktadır. 2019 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde 268.600 kişi yeni tanı almış ve 41.760 kişi meme kanserinden hayatını kaybetmiştir (1). Günümüzde meme kanseri tedavisinde yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilmektedir (2). Buna rağmen kanser tedavisi açısından etkili yöntemlere halen ihtiyaç duyulmaktadır. Genelde kansere bağlı ölümlerin ana nedeni metastazdır (3). Kanser metastazının biyolojik temellerinin daha iyi anlaşılması daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini sağlayacaktır. Bu bağlamda tanıya dayalı metastatik belirteçlerin tanımlanması ve bu belirteçlerin mekanizmasının anlaşılması, kanser hastaları için yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi için temel sağlayabilir.

PAK ailesi hem onkogeneizde hem de kanser progresyonunda rol oynayan bir serin-treonin kinaz ailesidir. Bu ailenin üyeleri grup-1 (Pak1-3) ve grup 2 (Pak4-6) olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır. PAK protein ailesinin 2. grubunda yer alan PAK4 (P21-activated kinase 4), en iyi karakterize edilmiş üyesidir ve ilk olarak CDC42 sinyal yolağında filopodia oluşumunu kontrol eden hücre iskeletini düzenleyici proteinlerin araştırılmasının ardından keşfedilmiştir (4-7). PAK4 embriyonik süreçte ve doku gelişiminde temel olmakla birlikte, normal erişkin dokuların büyük bir kısmında belirgin düzeyde ifade edilmemektedir (8, 9). PAK4 ile yapılan çalışmalarda onkogenik süreçte birçok role sahip olduğu gösterilmiştir (10). PAK4'ün meme kanseri (11, 12), mide kanseri (13), hepatosellüler karsinoma (14), serviks (15) ve pankreas

kanserini (16) de kapsayan pek çok farklı kanser türünde ifade seviyesinde artış olduğu belirlenmiştir (11-16). PAK4 normal dokularda da düşük düzeylerde ifade edilmektedir (17). PAK4'ün hücre göçü ve hücre çoğalmasına aracılık ettiği de yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (18, 19). Aynı zamanda, MAPK ve PI3K yollarını ilişkili onkojenik yolak ile etkileşime girdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (10, 19-22). Ayrıca, in vitro olarak fare meme epitelyal hücrelerinde PAK4'ün ifade seviyesinde aşırı artış sağlandığında hücrelerin tümör fenotipi kazandığı belirlenmiştir (23). Bu durum, PAK4'ün normal hücrelerde onkojenik transformasyonu indüklemeye yeteneği olduğunu işaret etmektedir (24, 25). PAK4 normal epitelyal dokuda çok az miktarda tespit edilirken, meme kanseri hücre hatlarında ve primer meme tümör dokularında sıklıkla aktive edildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (23, 26, 27). PAK4 ayrıca MDA-MB-231 hücrelerinde onkojenik fenotipi ve hücre göçünü arttırdığı belirlenmiştir (28, 29). Çalışmalardan elde edilen tüm bu bulgulara göre, PAK4'ün onkojenik bir protein ve dolayısıyla da potansiyel terapötik bir hedef olabileceğini göstermektedir.

MDA-MB-231 hücreleri östrojen, progesteron ve ERBB2(HER2) negatif (üçlü negatif) ve metastatik kabiliyeti yüksek fibroblast-benzer meme kanseri hücrelerdir. Bunun aksine, MCF-7 hücreleri ise östrojen pozitif ve zayıf metastatik potansiyele sahip epitelloid yapıda olan meme kanseri hücrelerdir. Bu iki hücre hattı protein kinaz C (PKC) aktivitesine bağlı olarak farklı invazyon özellikleri arz etmektedir. Forbol ester (TPA/PMA) ile PKC aktivasyonu sağlanan MCF-7 hücrelerinde hücre göçü kabiliyeti artarken, MDA-MB-231 hücrelerinde hücre göçü kabiliyeti azalmakta ve epitelloid morfoloji gelişmektedir (30). Bu nedenle çalışmamızda, PAK4 aktivasyonu temelli hücre migrasyonunun PKC yolağı üzerinden düzenlenip düzenlenmediğini belirleyebilmek için deneylerimizde MCF-7 hücre hattını kullandık. Bu bağlamda, ektopik olarak yüksek düzeyde PAK4 ifade eden ve etmeyen MCF-7 meme kanseri hücrelerinde PKC aktivasyonu ve inhibisyonuna bağlı olarak hücrelerin migrasyon

kabiliyeti ve hücre-hücre bağlantısını sağlayan E-Kaderin ifade düzeyleri araştırıldı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hücre Hattı ve Plazmitler

MCF-7 meme kanseri hücre hattı (HTB-22) Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC)'ndan temin edildi. Hücreler, inaktive edilmiş %10 fetal sığır serumu (FBS) (Sigma Aldrich Corp., 12106C, USA) ve %1 penisilin-streptomisin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma Aldrich Corp., D6429, USA) besiyeri içinde 37°C'de, %5 CO₂ ve 1 atmosfer basınç altında kültüre edildi. Bu çalışmada, MCF-7 hücrelerinde ektopik PAK4 ifadesi için Staffan Strömblad (Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, SE-141 83 Huddinge, Sweden) tarafından hibe edilen p3XFLAG-wild-type-PAK4 plazmid vektörü (Sigma-Aldrich Corp., E4401, USA) ve kontrol vektör olarak p3XFLAG-CMV-10 (Sigma Aldrich Corp., E4401, USA) plazmid vektörü kullanıldı. Plazmid vektörlerin MCF-7 hücrelerine transfeksiyonu Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ajanı kullanılarak ve kit talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi. PKC inhibitörü olarak RO318220 (Abcam, ab120374, Cambridge, MA, USA) (5µM) ve PKC aktivatörü olarak Phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA / TPA) (Cell Signalling Tech, cat.4174, USA) (200 nM) kullanıldı ve uygulama konsantrasyonları belirlendi (31, 32).

Oris Hücre Migrasyon Deneyi

Hücrelerin migrasyon düzeyleri, ticari olarak temin edilen Oris hücre migrasyon deney kiti (Platypus Technologies, Madison, WI) kullanılarak gösterildi. Deneyde, Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Inc., USA) yardımı ile boş plazmid vektör (p3XFLAG-CMV-10) transfekte edildi; kontrol MCF-7 hücreleri ve ökaryotik PAK4 ifade vektörü (p3XFLAG-wild-type-PAK4) transfekte edilmiş MCF-7 hücreleri kullanıldı. Öncelikle, kit içeriğinde mevcut olan Oris hücre durdurucuları (stopper) migrasyon zonu

oluşturabilmek için 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarının kuyucuklarına yerleştirildi. MCF-7 hücreleri her kuyucukta 3×10^2 hücre olacak şekilde ekildi ve hücrelerin tutunması için 24 saat kültüre edildi. Daha sonra durdurucu kaldırıldı ve tutunmayan hücreler 1XPBS (Capricorn Scientific GmbH, PBS-10XA, Ebsdorfergrund, Germany) ile yıkandı. Yıkama işlemini takiben kontrol ve ektopik PAK4 ifadesi sağlanan MCF-7 hücrelerini, serumsuz (%0,2 FBS), serumlu (%10 FBS), serumsuz RO318220(5 μ M) ve serumsuz TPA/PMA(200 nM) içeren besiyerlerinde 48 saat kültüre ederek Oris migrasyon yöntemini uyguladık. Süre sonunda hücreler metanol ile fikse edildi ve %5 Giemsa ile boyandı. Durdurucular ile oluşturulan yara alanı inverted mikroskop ile görüntülendi ve yara alanının boyutu Image-J programı kullanılarak analiz edildi. Deney üç defa tekrar edilerek sonuçlar değerlendirildi.

Western Blot

Toplanan hücre lizatları proteaz inhibitör kokteyli (1X) içeren liziz tamponu (RIPA) (Thermo Fisher Scientific, cat.89900, Waltham, Massachusetts, USA) kullanılarak elde edildi. Lizatların protein miktarı Bradford (BioRad Laboratories Inc., 500-0006, California, USA) reaktifi kullanılarak BSA (bovine serum albümin) standartı ile hesaplandı. Örneklerden 100'er μ g alınarak %10 poliakrilamid jele yüklendi. Yürüme sonunda PVDF membrana (Merck Millipore, IPVH00010, Massachusetts, USA) transfer gerçekleştirildi. Transfer aşamasından sonra blot %1 BSA (Sigma Aldrich Corp., B6917, USA) içeren PBST solüsyonunda blokladı. Sonrasında, membran ikiye kesilerek primer E-Kaderin antikoru (Santa Cruz Biotechnology, sc8426, Texas, USA) ve beta-Aktin (ACTB) antikoru (Santa Cruz Biotechnology, sc8432, Texas, USA) ile işaretlendi ve yıkamanın ardından anti-mouse sekonder antikoru (Santa Cruz Biotechnology, sc516102, Texas, USA) ile işaretleme yapıldı. Sekonder antikorun uzaklaştırılmasının ardından blot 1XPBST ile yıkandı. Üzerine enhanced chemoluminescence (ECL) reaktifi (GE Health care RPN2209, Illinois, USA)

ilave edildi ve 1 dk beklendikten sonra kemilüminas'a duyarlı film (Kodak, 8116428, New York, USA) ile görüntülendi. Üç ayrı deney tekrarından elde edilen protein lizatlarının Western Blot sonuçları Image-J yazılımı yardımı ile analiz edildi.

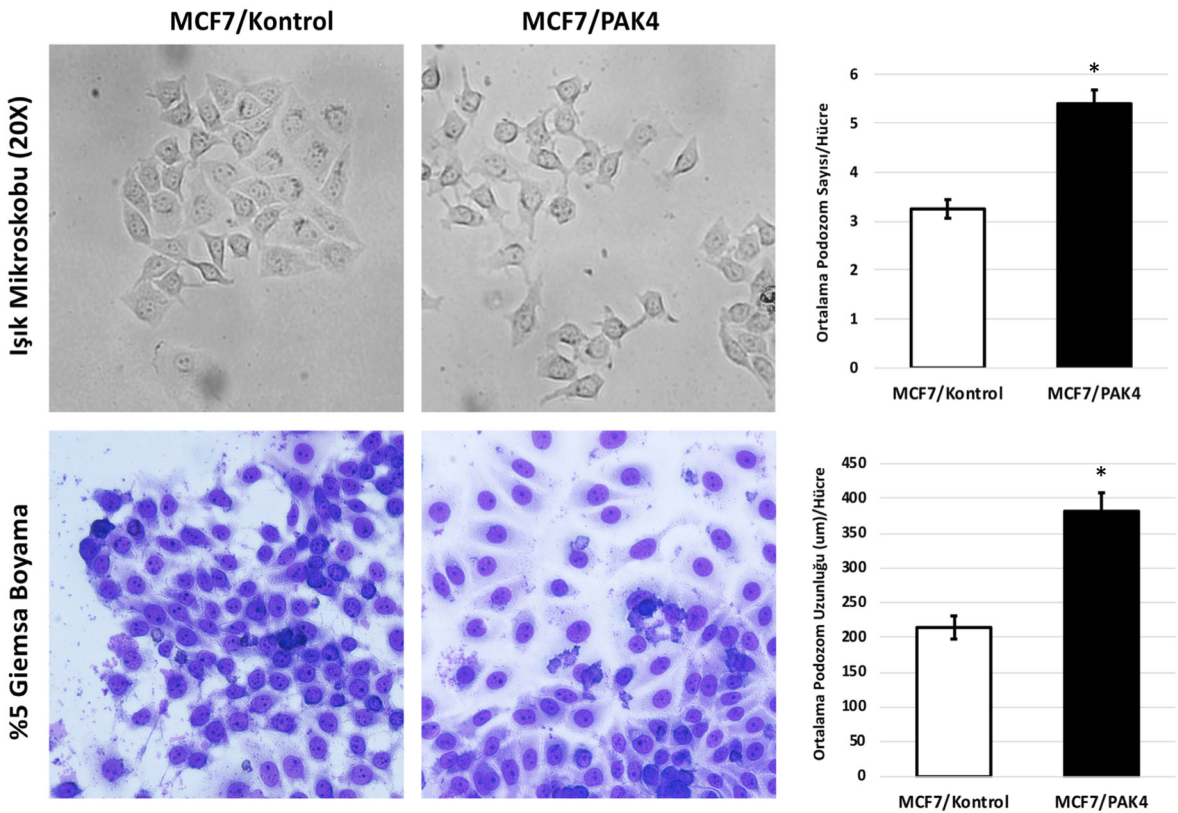
İstatistiksel Analiz

DeneySEL verilerin analizleri Microsoft Excel ve GraphPad Prism 8.0 yazılım programları aracılığıyla gerçekleştirildi. Sonuçların p değerleri One way ANOVA (Dunnet t-test) ile hesaplandı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi. Sonuçlar normalize edilerek ve \pm standart hata değerleri belirlenerek gösterildi.

BULGULAR

PAK4 MCF-7 hücrelerinde mezenkimalbenzer morfolojik değişimlere neden olur

İnsan PAK4 cDNA dizisi klonlanmış p3XFLAG-wild-type-PAK4 plazmid vektör ve kontrol olarak PAK4 içermeyen boş p3XFLAG-CMV-10 plazmid vektör transfekte edilen MCF-7 hücrelerinde morfolojik değişimler incelendi. Ektopik PAK4 ifadesi sağlanan MCF-7 hücrelerinde kontrole göre sitoskeletal organizasyonun değiştiği, hücre-hücre bağlantılarının zayıfladığı morfolojik olarak gözlemlendi. Hücrelerin podozom oluşturma sayılarını ve uzunluklarını image-J yazılımı yardımı ile değerlendirildi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre kontrol MCF-7 hücrelerinde morfolojik olarak ortalama 3,25; ektopik PAK4 ifade eden hücrelerde ise ortalama 5,4 podozom/hücre oluşturduğu belirlendi. Ayrıca hücrelerin oluşturduğu podozom uzunluklarına bakıldığında kontrol MCF-7 hücrelerde ortalama 214,55 μ m, ektopik PAK4 ifade eden hücrelerde ise ortalama 381,6 μ m olduğunu belirledi (Şekil 1).



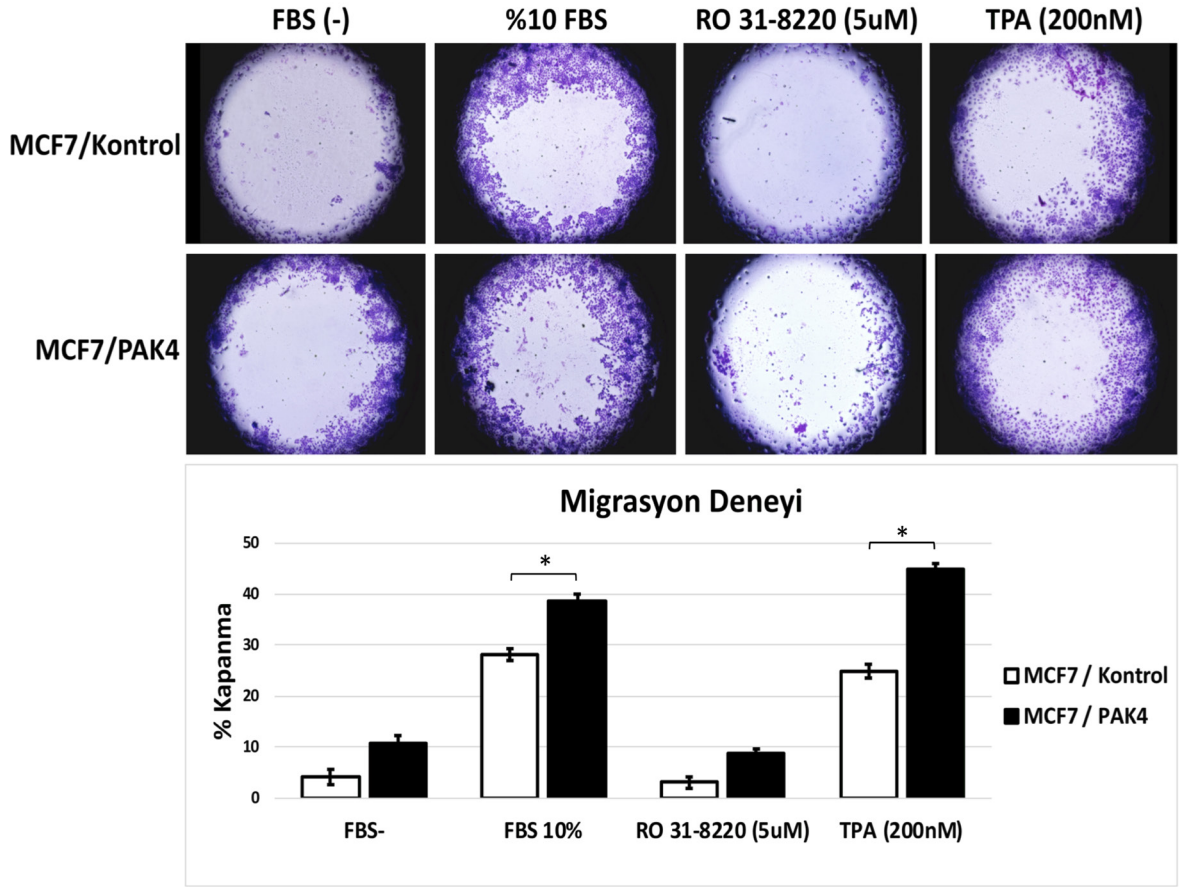
Ektopik PAK4 ifade eden MCF-7 (MCF-7/PAK4) hücrelerinin kontrol hücelere oranla daha fazla mezenkimal-benzer hücre morfolojisine sahip olduğu, podozom sayılarında yaklaşık 1,66-kat ve podozom uzunluklarında yaklaşık 1,77 kat artış belirlenmiştir (*p değeri <0,05).

Şekil 1. Boş plazmid vektör transfekte edilen kontrol ve ektopik PAK4 ifade eden MCF-7 hücrelerinin morfolojik görüntüsü ve hücrelerin podozomal yapı ve uzunluklarının analizi

PAK4, Protein Kinaz C aktivasyonu durumunda MCF-7 hücrelerinin migrasyon kabiliyetini artırır

Bu çalışmada, PAK4 destekli hücre migrasyonunun protein kinaz C (PKC) yolu üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediği araştırıldı. Bu amaçla %0,2 FBS, %10 FBS, PKC aktivatörü TPA(PMA) ve PKC inhibitörü (RO 318220) varlığında kontrol ve ektopik PAK4 ifade eden hücrelerin migrasyon kabiliyetlerini belirlendi. Çalışmamızın sonuçlarına göre, %0,2 FBS muamele edilmiş hücrelerde çok düşük düzeyde migrasyon oranları saptandı, boşluk kapanma düzeyleri; kontrol hücrelerde %4,2, ektopik PAK4 ifade eden hücrelerde %10,9 olarak belirlendi. Beklendiği gibi %10 FBS

varlığında hücrelerin migrasyon kabiliyeti artmaktadır, buna ilaveten ektopik PAK4 ifade eden hücrelerde migrasyon oranı anlamlı olarak kontrole (%28,2 kapanma) göre 1,38 kat (%38,8 kapanma) yükseldi. RO 318220 inhibitörü varlığında hücre migrasyonunda anlamlı bir şekilde azalma belirlendi. Boşluk kapanma düzeyleri; kontrol hücrelerde %3,1, ektopik PAK4 ifade eden hücrelerde %8,7 olarak bulundu. PKC aktivatörü TPA/PMA ile muamele edilen hücelere bakıldığında ektopik PAK4 ifade eden hücreler (%44,9) kontrole (%24,9) göre ortalama 1,8 kat arttı (Şekil 2). Bu sonuçlara göre PAK4'ün PKC aktivasyonu aracılığıyla hücre migrasyonunu desteklediği belirlendi.



FBS varlığında ve ayrıca TPA uygulaması ile PKC yolağı aktive edilen MCF7/PAK4 hücreleri kontrole oranla daha yüksek migrasyon kabiliyetine sahiptir (*p değeri <0,05).

Şekil 2. Kontrol ve ektopik PAK4 ifade eden MCF-7 hücrelerinin PKC-indüklü migrasyon kabiliyeti

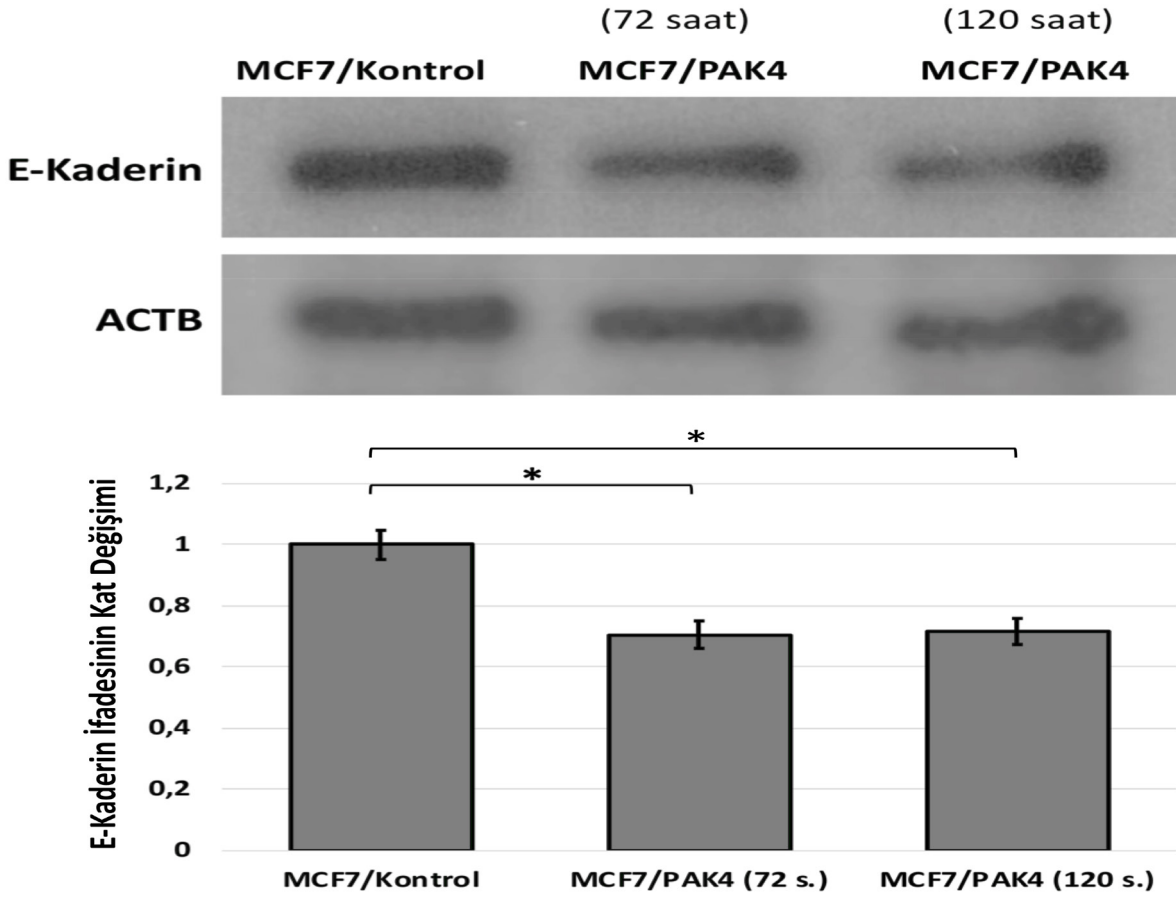
Yüksek PAK4 ifadesi E-Kaderini baskılamaktadır

E-Kaderin hücre-hücre bağlanma noktalarını oluşturan temel yapılardan biridir. E-Kaderin ifadesi azalan kanser hücrelerinde mezankimal-benzer hücre morfolojisi görülmekte, hücrelerin invazyon ve migrasyon kabiliyetleri artmaktadır (33-35). Çalışmamızda, ektopik PAK4 ifade eden hücrelerin E-Kaderin ifade düzeyleri Western blot yöntemi ile incelendi. Kontrol ve PAK4 cDNA'sı içeren plazmid vektörlerin MCF-7 hücrelerine transfeksiyonundan sonra 72. ve 120. saat kültürasyon zamanlarında hücre lizatları elde edildi. Bu örneklerin Western

Blot deney sonuçlarına göre ektopik PAK4 ifade eden MCF-7 hücrelerinde kontrole göre yaklaşık %30 oranında E-kaderin ifadesinin baskılandığını saptandı (Şekil 3). Bu durum hücrelerin birbirine bağlanma kabiliyetlerinin azaldığını göstermektedir.

TARTIŞMA

Günümüzde yapılan çalışmalar, PAK4'ün önemli bir terapötik hedef olabileceğini ileri sürmektedir (36, 37). Fare meme epitel hücrelerinde stabil yabancı tip PAK4 ifadesi arttırıldığında bu hücrelerin polaritelerini kaybettikleri belirlenmiştir (28). Ancak



MCF7/PAK4 hücrelerinde E-kaderin ifadesi kontrol hücelere oranla yaklaşık %30 oranında azaldığı belirlenmiştir (*p değeri <0,05).

Şekil 3. Kontrol ve ektopik PAK4 ifade eden MCF-7 hücrelerinin E-kaderin ifadesi

PAK4 ifadesi baskılandığında meme bezi gelişimi olumsuz yönde etkilenmemektedir (38). PAK4 özellikle üçlü negatif meme kanseri hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edildiği bilinmektedir. PAK4 aktivasyonu, kanser hücrelerinin çoğalma ve migrasyon kabiliyetlerini arttırarak hastaların sağkalm oranlarını düşürmektedir. Bu nedenle kötü prognoz ilişkili üçlü negatif meme kanseri hücreleri açısından önemli bir terapötik hedefdir (37). Buna ilave olarak PAK4 östrojen pozitif meme kanserinde de hastalığın gelişmesini desteklemektedir (39). Östrojen, PAK4 aktivasyonunu tetikleyerek kanser hücrelerinin invaziv ve metastatik kabiliyetlerini desteklemektedir (40). PAK4 gen ifadesinin baskılandığı çalışmalarda

ise onkojenik transformasyon gerilemektedir. PAK4 gen ifadesi baskılanan meme kanser hücrelerinde mTOR, RELB, CLDN4, PI3K/AKT, MEK/ERK gibi sinyal yolları olumsuz yönde etkilenmekte ve buna bağlı olarak kanser hücrelerinin çoğalma, invazyon ve migrasyon kabiliyetlerinde azalma, hastaların tümör büyüklüklerinde ve lenf bezi metastazı oranlarında azalma görülmektedir (22, 27, 36, 41, 42).

Bu çalışmada, zayıf metastatik özellikte olan MCF-7 hücrelerinde ektopik yüksek PAK4 ifadesi varlığında, önceki araştırmalardan farklı olarak PAK4'ün metastatik rolünün PKC yolağı ile ilişkisi açıklandı. Bunun için çalışmamızda MCF-7 hücrelerine

PAK4 cDNA'sını içeren vektörü ve kontrol olarak PAK4 cDNA'sı içermeyen boş vektörü lipofectamine 2000 aracılığıyla transfekte edildi. Bu hücrelerde PAK4 ifadesine bağlı olarak hücrelerin morfolojik özellikleri, migrasyon kabiliyetleri ve E-kaderin ifade seviyeleri belirlendi.

PAK4, PAK ailesi enzimlerdendir ve bu enzimler, özellikle hücre morfolojisinin, hücre iskeleti organizasyonunun, hücre proliferasyonunun, hücre döngüsü kontrolünün, hücre göçünün ve sağkalımın düzenlenmesinde önemli rolleri mevcuttur (43-46). Bu bilgiler ışığında, MCF-7 hücrelerinde ektopik PAK4 ifadesi sağladığımız in vitro koşullarda, hücrelerin mezenkimal-benzer bir fenotip kazandığını ve invazyon kabiliyeti açısından önemli olan podozomal yapıların sayısı ve uzunluklarının arttığını gözlemlendi. Bu sonuçlar, hücrelerde yeterince yüksek seviyede PAK4 geninin ektopik ekspresyonunu sağladığımızı ve hücre morfolojisini invaziv yönde değiştirdiğini göstermektedir.

PAK4'ün onkogenezi hangi hücrel mekanizmalar ile tetiklediği konusundaki araştırmalar halen devam etmektedir. Yapılan çalışmalar neticesinde PAK4 aktivasyonunun PI3K/AKT ve MEK/ERK gibi yollar ile sağlanabildiği gösterilmiştir (27, 42). Ancak meme kanserinde PAK ailesi genlerinin PKC ile ilişkisini gösteren bir çalışma şu an için mevcut değildir. Koh W. ve ark. (47) tarafından yapılan bir çalışmada PAK ailesinden PAK2 ve PAK4 genlerinin, endotel hücrelerinin lümen ve tüp oluşumunu PKC sinyal yolağı aracılığıyla gerçekleştirdiğini belirlemiştir. Dolayısıyla bu hücrelerde, PAK4 aktivasyonu PKC tarafından sağlanabilmektedir. Bu bilgiler ışığında, meme kanserinde ifadesi artan PAK4'ün PKC açısından önemli bir hedef olabileceği kanısına varıldı. Bu nedenle endojen düzeyde PAK4 ifade eden yani boş plazmid ile transfekte edilen kontrol MCF-7 hücrelerini ve ektopik olarak yüksek PAK4 ifadesi sağlanan MCF-7 hücrelerini TPA (12-O-tetradekanoilphorbol-13-asetat) / PMA (phorbol-12-miristat-13-asetat), RO318220 (metansülfonat) ve %10 fetal bovin serum

(FBS) ile muamele edildi ve hücre migrasyon deneyini uygulandı. TPA (PMA), iyi bilinen ve yaygın kullanılan bir phorbol esteridir. Bu ajan, PKC'ye bağlanarak enzimi aktive eder. RO318220 ise PKC aktivitesini baskılayan bir ajandır. Buna göre hücre migrasyonu sonuçlarına bakıldığında %10 FBS varlığında yüksek düzeyde PAK4 ifade eden hücrelerde çalışmalara uygun olarak migrasyon kabiliyeti kontrole göre 1,38 kat arttı. Buna ilave olarak, serumsuz TPA muamelesi yapılan hücrelerde ektopik PAK4 ifadesi hücre göçü kabiliyetini 1,8 kat arttı. RO318220 ile muamele edilen hücrelerde de beklenen azalma gösterildi. Elde ettiğimiz bu sonuçlara göre, MCF-7 hücrelerinde PAK4-aracılı hücre migrasyonunun PKC aktivasyonuna bağlı olarak düzenlendiği ve dolayısıyla PAK4'ün PKC hedefi olabileceği söylenebilir. Ancak PKC-PAK4 arasındaki direkt ilişkinin ortaya konması için ilave çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Kanser hücrelerinde metastatik değişimi sağlayan temel süreç epitelyal-mezenkimal transisyon (EMT) sürecidir. EMT'de kanıtlanmış ilk değişim hücreler arası fiziki bağlantıların zayıflatılması ve hücrelerin bulunduğu yerden ayrılmasıdır. Kaderinler Ca^{2+} bağımlı hücre adhezyon molekülleridir ve hücreler arası bağlantıları sağlayan temel yapılardır. Bu yapılar, doğrudan iki hücre iskeletinin E-Kaderin aracılığıyla birbirine bağlanması ile oluşur. E-kaderinlerin oluşturduğu hücreler arası sıkı bağlantı E-kaderin/ β -katenin/ α E-katenin kompleks yapısından meydana gelmektedir. E-kaderin baskılandığı zaman β -katenin serbest kalır ve hücre çekirdeğine göç ederek mezenkimal belirteçler olan vimentin, fibronektin ve integrin sentezini artırır. Bu durum EMT sürecini başlatır ve hücrenin bulunduğu yerden göç etmesine neden olur (33, 35, 48). Bu bilgiler doğrultusunda, ektopik PAK4 ifadesi sağlanan MCF7 hücrelerinde E-kaderin ifadesinin yaklaşık %30 oranında baskılandığı saptandı. Bu sonuç; PAK4'ün hücre-hücre bağlantılarının zayıflatılmasında ve hücrelerin birbirinden ayrılmasında önemli rolü olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*, 2019; 69(1):7-34.
2. Mahjoubin-Tehran M, Rezaei S, Jalili A, Aghaee-Bakhtiari SH, Orafi HM, Jamialahmadi T, Sahebkar A. Peptide decoys: a new technology offering therapeutic opportunities for breast cancer. *Drug Discov Today*, 2020; pii: S1359-6446(20)30036-2.
3. Dillekas H, Rogers MS, Straume O. Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Med*, 2019; 8(12):5574-6.
4. Bokoch GM. Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem*, 2003; 72:743-781.
5. Radu M, Semenova G, Kosoff R, Chernoff J. PAK signalling during the development and progression of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2014; 14:13-25.
6. Abo A, Qu J, Cammarano MS, Dan C, Fritsch A, Baud V, et al. PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *EMBO J*, 1998; 17:6527-40.
7. Dan C, Kelly A, Bernard O, Minden A. Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin. *J Biol Chem*, 2001 ;276:32115-21.
8. Qu J, Li X, Novitch BG, Zheng Y, Kohn M, Xie JM, et al. PAK4 kinase is essential for embryonic viability and for proper neuronal development. *Mol Cell Biol*, 2003; 23:7122-33.
9. Arias-Romero LE, Chernoff J. A tale of two Paks. *Biologie Cellulaire*, 2008; 100:97-108.
10. Won SY, Park JJ, Shin EY, Kim EG. PAK4 signaling in health and disease: defining the PAK4-CREB axis. *Exp Mol Med*, 2019; 12;51(2):11.
11. Minden A. The pak4 protein kinase in breast cancer. *ISRN Oncol*, 2012; 2012:694201.
12. Yang JX, Han YJ, Zheng H, Luo RC. Expression of PAK4 in breast cancer and benign breast pathological changes. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2010; 30:981-3.
13. Li D, Zhang Y, Li Z, Wang X, Qu X, Liu Y. Activated Pak4 expression correlates with poor prognosis in human gastric cancer patients. *Tumour Biol*, 2015; 36:9431-6.
14. Xue J, Chen LZ, Li ZZ, Hu YY, Yan SP, Liu LY. MicroRNA-433 inhibits cell proliferation in hepatocellular carcinoma by targeting p21 activated kinase (PAK4). *Mol Cell Biochem*, 2015; 399:77-86.
15. Shu XR, Wu J, Sun H, Chi LQ, Wang JH. PAK4 confers the malignance of cervical cancers and contributes to the cisplatin-resistance in cervical cancer cells via PI3K/AKT pathway. *Diagn Pathol*, 2015; 10:177.
16. Tyagi N, Marimuthu S, Bhardwaj A, Deshmukh SK, Srivastava SK, Singh AP et al. p-21 activated kinase 4 (PAK4) maintains stem cell-like phenotypes in pancreatic cancer cells through activation of STAT3 signaling. *Cancer Lett*, 2016; 370:260-7.
17. Nekrasova T, Minden A. PAK4 is required for regulation of the cell-cycle regulatory protein p21, and for control of cell-cycle progression. *J Cell Biochem*, 2011; 112:1795-806.
18. Kumar R, Gururaj AE, Barnes CJ. p21-activated kinases in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006; 6(6):459-71.
19. King H, Thillai K, Whale A, Arumugam P, Eldaly H, Kocher HM, et al. PAK4 interacts with p85 alpha: implications for pancreatic cancer cell migration. *Sci Rep*, 2017;7:42575.
20. Liu Y, Chen N, Cui X, Zheng X, Deng L, Price S et al. Karantza V, Minden . The protein kinase Pak4 disrupts mammary acinar architecture and promotes mammary tumorigenesis. *Oncogene*, 2010; 29:5883-94.
21. Fu X, Feng J, Zeng D, Ding Y, Yu C, Yang B. PAK4 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells via PI3K/Akt- and MEK/ERK-dependent pathways. *Biosci Rep*, 2014; (2)1;34.
22. Wang F, Gao Y, Tang L, Ning K, Geng N, Zhang H, et al. A novel PAK4-CEBPB-CLDN4 axis involving in breast cancer cell migration and invasion. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019; 2;511(2):404-8.
23. Arias-Romero LE, Villamar-Cruz O, Pacheco A, Kosoff R, Huang M, Muthuswamy SK, et al. A rac-pak signaling pathway is essential for ErbB2-mediated transformation of human breast epithelial cancer cells. *Oncogene*, 2010; 29:5839-49.
24. Arias-Romero LE, Chernoff J. p21-activated kinases in Erbb2-positive breast cancer: A new therapeutic target? *Small GTPases*, 2010; 1:124-8.
25. Callow MG, Clairvoyant F, Zhu S, Schryver B, Whyte DB, Bischoff JR, et al. Requirement for PAK4 in the anchorage-independent growth of human cancer cell lines. *J Biol Chem*, 2002; 277: 550-8.
26. He LF, Xu HW, Chen M, Xian ZR, Wen XF, Chen MN et al. Activated-PAK4 predicts worse prognosis in breast cancer and promotes tumorigenesis through activation of PI3K/AKT signaling. *Oncotarget*, 2017; 8(11): 17573-85.

27. Wong LE, Chen N, Karantzis V, Minden A. The Pak4 protein kinase is required for oncogenic transformation of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Oncogenesis*, 2013; 2: e50.
28. Zhang H, Li Z, Viklund EK, Stromblad S. P21-activated kinase 4 interacts with integrin alpha v beta 5 and regulates alpha v beta 5-mediated cell migration. *J Cell Biol*, 2002; 158: 1287-97.
29. Van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*, 2008; 65(23): 3756-88.
30. Platet N, Prevostel C, Derocq D, Joubert D, Rochefort H, Garcia M. Breast cancer cell invasiveness: correlation with protein kinase C activity and differential regulation by phorbol ester in estrogen receptor-positive and -negative cells. *Int J Cancer*, 1998; 2;75(5):750-6.
31. Brenner W, Beitz S, Schneider E, Benzing F, Unger RE, Roos FC, et al. Adhesion of renal carcinoma cells to endothelial cells depends on PKCmu. *BMC Cancer*, 2010; 6;10:183.
32. Goyal P, Pandey D, Behring A, Siess W. Inhibition of nuclear import of LIMK2 in endothelial cells by protein kinase C-dependent phosphorylation at Ser-283. *J Biol Chem*, 2005;280(30):27569-77.
33. Lau MT, So WK, Leung PC. Fibroblast growth factor 2 induces E-cadherin down-regulation via PI3K/Akt/mTOR and MAPK/ERK signaling in ovarian cancer cells. *PLoS One*, 2013;8(3):e59083.
34. Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res*, 2008; 68(10): 3645-54.
35. Ramos-Alvarez I, Jensen RT. P21-activated kinase 4 in pancreatic acinar cells is activated by numerous gastrointestinal hormones/neurotransmitters and growth factors by novel signaling, and its activation stimulates secretory/growth cascades. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2018; 315(2): 302-17.
36. Cordover E, Wei J, Patel C, Shan NL, Gionco J, Sargsyan D, et al. KPT-9274, an Inhibitor of PAK4 and NAMPT, Leads to downregulation of mTORC2 in triple negative breast cancer cells. *Chem Res Toxicol*, 2020; 9.
37. Arowosegbe MA, Amusan OT, Adeola SA, Adu OB, Akinola IA, Ogungbe BF, et al. Kaempferol as a potential PAK4 inhibitor in triple negative breast cancer: extra precision glide docking and free energy calculation. *Curr Drug Discov Technol*, 2019; 23.
38. Rabieifar P, Zhuang T, Costa TDF, Zhao M, Strömb-lad S. Normal mammary gland development after MMTV-Cre mediated conditional PAK4 gene depletion. *Sci Rep*, 2019; 8;9(1):14436.
39. Santiago-Gomez A, Kedward T, Simoes BM, Dragoni I, NicAmhlaoibh R, Trivier E, et al. PAK4 regulates stemness and progression in endocrine resistant ER-positive metastatic breast cancer. *Cancer Lett*, 2019; 28;458:66-75.
40. Li Y, Zhang H, Zhao Y, Wang C, Cheng Z, Tang L, et al. A mandatory role of nuclear PAK4-LIFR axis in breast-to-bone metastasis of ERα-positive breast cancer cells. *Oncogene*, 2019;38(6):808-21.
41. Costa TDF, Zhuang T, Lorent J, Turco E, Olofsson H, Masia-Balague M, et al. PAK4 suppresses RELB to prevent senescence-like growth arrest in breast cancer. *Nat Commun*, 2019; 9;10(1):3589.
42. Li SQ, Wang ZH, Mi XG, Liu L, Tan Y. MiR-199a/b-3p suppresses migration and invasion of breast cancer cells by downregulating PAK4/MEK/ERK signaling pathway. *IUBMB Life*, 2015;67(10):768-77
43. Kumar R, Sanawar R, Li X, Li F. Structure, biochemistry, and biology of PAK kinases. *Gene*, 2017; 605: 20-31.
44. Shao YG, Ning K, Li F. Group II p21-activated kinases as therapeutic targets in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol*, 2016; 22: 1224-35.
45. Ye DZ, Field J. PAK signaling in cancer. *Cell Logist*, 2012; 2: 105-16.
46. Tse JC, Kalluri R. Mechanisms of metastasis: epithelial-to-mesenchymal transition and contribution of tumor microenvironment. *J Cell Biochem*, 2007; 101(4): 816-29.
47. Koh W, Mahan RD, Davis GE. Cdc42- and Rac1-mediated endothelial lumen formation requires Pak2, Pak4 and Par3, and PKC-dependent signaling. *J Cell Sci*, 2008; 1;121(Pt 7):989-1001.
48. Gavert N, Ben-Ze'ev A. beta-Catenin signaling in biological control and cancer. *J Cell Biochem*, 2007; 102(4): 820-8.