

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Per-Arnt-Sim Kinaz'ın Kanser Moleküler Patogenezindeki Rolünün Meme Kanseri Hücre Hatlarında
Aydınlatılması**

Berna ÖZDEM

Ana Bilim Dalı
Tıbbi Biyoloji ve Genetik

Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. İbrahim TEKEDERELİ

İkinci Tez Danışmanı
Prof. Dr. Bülent ÖZPOLAT

Tez Jüri Üyeleri
Prof. Dr. İbrahim TEKEDERELİ
Prof. Dr. Elif YEŞİLADA
Prof. Dr. Sedat YILDIZ
Prof. Dr. Halit CANATAN
Prof. Dr. Ebru ÖNALAN

Bu Araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2025/3941 Proje numarası ile desteklenmiştir.

Bu çalışma, YÖK 100/2000 Öncelikli Alan Doktora Burs Programı, TÜBİTAK 2211-C Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı ve TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

MALATYA
2026

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
ETİK ve YAPAY ZEKÂ KULLANIM BEYANI

08/07/ 2026

İnönü Üniversitesi Lisansüstü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak, “Prof. Dr. İbrahim TEKEDERELİ” danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “Per-Arnt-Sim Kinaz’ın (PASK) Kansere Moleküler Patogeneziindeki Rolünün Meme Kanseri Hücre Hatlarında Aydınlatılması ” başlıklı / Doktora tezimde:

1. ETİK ve BİLİMSEL SORUMLULUKLARIM:

- Tezimde yer alan verileri, bilgileri ve belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Çalışmada yararlandığım tüm kaynaklara bilimsel kurallara uygun şekilde atıfta bulunduğumu ve kaynakça gösteriminde APA 7. baskı kurallarına uyduğumu,
- Tezimin özgün olduğunu, çalışma ve yazım sürecinde patent ve telif haklarını ihlal edici hiçbir davranışta bulunmadığımı,
- Aksi bir durumda doğabilecek tüm hukuki ve akademik sonuçları kabul ettiğimi,

2. YAPAY ZEKÂ KULLANIMINA İLİŞKİN BEYANIM:

() Tez yazım sürecinde yapay zekâ tabanlı araçlardan **faydalanmadım**.

(X) Tez yazım sürecinde yapay zekâ tabanlı araçlardan **faydalandım**.

Bu durumda:

- Yapay zekâ araçlarını yalnızca bilimsel üretim sürecini desteklemek amacıyla kullandığımı,
 - Kullanımın hipotez geliştirme, teorik tartışma ve yorumlama gibi üst düzey akademik becerileri içermediğini,
 - Kullanımın tezin özgünlüğüne, bilimsel etik kurallarına ve ilgili mevzuata aykırı olmadığını,
 - Usulsüz kullanımlara (kaynak göstermeksizin metin üretimi, yanıltıcı kaynak gösterimi, otomatik içeriklerin özgün eser gibi sunulması vb.) kesinlikle başvurmadığımı,
 - Kullanılan yapay zekâ araçlarının ve işlevlerinin, danışmanımın bilgisi dâhilinde, ekte verilen tabloda şeffaf biçimde belirtildiğini,
 - Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Faaliyetlerinde Üretken Yapay Zekâ Kullanımına Dair Etik Rehber’de belirtilen ilkelere riayet ettiğimi,
- kabul ve taahhüt ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı

Berna ÖZDEM

İmza

Yapay Zekâ Kullanım Tablosu

No	Üretken Yapay Zekâ Aracı	Kullanım Amacı	Kullanıldığı Bölüm	Kullanım Şekli
1	ChatGPT	Kavramsal çerçevede ön okuma ve öneri alma	Genel	Literatürdeki görüşleri özetlemek için yönlendirici sorular sorulmuştur. Otomatik üretilen metin aynen kullanılmamıştır.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
TABLolar DİZİNİ.....	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kanser: Genel Kavramlar	3
2.1.1. Kanserin Tanımı ve Genel Özellikleri.....	4
2.1.2. Kanserin Moleküler Temelleri.....	5
2.2. Meme Kanseri	7
2.2.1. Moleküler Alt Tipleri	8
2.2.2. Patogenezi ve Risk Faktörleri	9
2.3. RNA Tabanlı Tedaviler	10
2.3.1. siRNA ve Mekanizması	11
2.3.2. siRNA'nın Meme Kanserindeki Rolü.....	12
2.4. PASK (Per-Arnt-Sim Kinaz).....	15
2.4.1. Yapısı ve Fonksiyonu	15
2.4.2. Hücresel Lokalizasyonu ve İfade Edildiği Dokular	17
2.4.3. Glukoz ve Lipid Metabolizmasındaki Rolü.....	17
2.4.4. PASK ve İnsülin Direnci / Tip 2 Diyabet İlişkisi	18
2.4.5. PASK Hedef Proteinleri ve Sinyal Yolakları.....	19
2.4.6. Bir Terapötik Hedef Olarak PASK	20
2.5. PASK ve Vasküler Sinyalizasyon ve Stres Yanıtı	21
2.6. PASK'ın Onkojenik Rolü ve Kanslerle İlişkisi	21
3. MATERYAL VE METOT	23

3.1. Araştırma Tasarımı.....	23
3.2. Materyal.....	24
3.2.1. Cihazlar	24
3.2.2. Kimyasallar	25
3.2.3. Hücreler	26
3.2.4. siRNAlar ve inhibitörler	27
3.2.5. Hücresel Canlılık, Apoptoz ve Metabolik Analiz Parametreleri	30
3.2.6. Antikorlar	31
3.3.1. Hücre Kültürü	32
3.3.2. Hücrelerin Çözülmesi	32
3.3.3. Hücrelerin Pasajlanması	32
3.3.4. Hücrelerin Sayılması	33
3.3.5. Genetik Manipülasyon: siRNA Aracılı Gen Susturma	33
3.3.6. Protein Ekspresyon Analizi (Western Blotting)	34
3.3.7. Hücre Canlılığı ve Proliferasyon Analizleri	36
3.3.8. Koloni Oluşturma Kabiliyeti Deneyi	37
3.3.9. Anneksin/PI Flow Sitometri	38
3.3.10. Kaspaz 3/7 Akış Sitometrisi	39
3.3.11. JC-1 Akış Sitometrisi	39
3.4. İstatistiksel Analiz	40
3.5. Etik Onay	40
4. BULGULAR	41
4.1. Meme Kanseri Patogenezinde PASK Gen ve Protein İfadesinin Değerlendirilmesi.....	41
4.2. PASK Ekspresyonunun Klinik Sağkalım, Nüks ve Tedavi Yanıtı Üzerindeki Etkileri	43
4.3. PASK Susturulmasının Proliferasyon ve Koloni Oluşumuna Etkisi.....	45
4.4. PASK Baskılanmasının Apoptoz Üzerine Etkisi	50
4.5. PASK Baskılanmasının Mitokondriyal Değişiklikler Üzerine Etkileri	51
4.6. PASK Baskılanmasının Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi	53
4.7. PASK İnhibisyonunun Metastatik ve Sinyal Düzenleyici Etkileri.....	54
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
KAYNAKLAR	70

EKLER 78

EK. 1. Etik Kurul Gerek Olmadığına Dair Belge..... 78



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi birimi, akademik vizyonu ve bilimsel yaklaşımıyla bana her zaman yol gösteren, yalnızca bir danışman değil aynı zamanda akademik gelişimimde büyük emeği olan kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. İbrahim TEKEDERELİ' ye en derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Bilimsel düşünmeyi, araştırmayı sabırla yürütmeyi ve akademik disiplini öğrenmemde çok büyük katkıları olmuştur. Doktora sürecimin her aşamasında desteğini hissetmek benim için büyük bir şans olmuştur. Tez çalışmamın gelişiminde değerli katkıları bulunan, özellikle uluslararası araştırma deneyimi kazanmamda ve bilimsel bakış açımı geliştirmemde önemli destek sağlayan eş danışmanım Sayın Prof. Dr. Bülent ÖZPOLAT'a içten teşekkürlerimi sunarım. Akademik deneyimleri, yönlendirmeleri ve teşvik edici yaklaşımı araştırma sürecime çok değerli katkılar sağlamıştır. Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda eğitim aldığım süre boyunca bilgi ve tecrübeleriyle akademik gelişimime katkı sağlayan tüm değerli hocalarıma teşekkür ederim. Araştırma sürecimde bilimsel çalışmalarımı sürdürme fırsatı bulduğum Oklahoma Üniversitesindeki akademik ortamın ve araştırma imkanlarının gelişimime katkısı büyük olmuştur. Bu süreçte destek veren tüm akademik çevreme teşekkür ederim. Hayatım boyunca sevgi, fedakârlık ve sonsuz destekleriyle her zaman yanımda olan, bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan kıymetli annem Zeynep ÖZDEM ve babam Kemal ÖZDEM'e minnet ve sevgilerimi sunarım. Varlıkları, inançları ve destekleri bana her zaman güç vermiştir. Ayrıca yanımda olan aileme, dostlarıma ve desteklerini esirgemeyen herkese en içten teşekkürlerimi sunarım. Bu tez çalışması, TDK-2025/3941 numaralı proje kapsamında İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından desteklenmiştir. Ayrıca, doktora eğitimim ve araştırma sürecim boyunca sağladıkları değerli burs desteklerinden dolayı; YÖK 100/2000 Öncelikli Alan Doktora Burs Programı'na, TÜBİTAK 2211-C Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı'na ve yurt dışı araştırma çalışmalarımı fonlayan TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı'na en içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Berna ÖZDEM

Malatya, 2026

ÖZET

Per-Arnt-Sim Kinaz'ın Kanser Moleküler Patogenezindeki Rolünün Meme Kanseri Hücre Hatlarında Aydınlatılması

Giriş: Meme kanseri, özellikle Üçlü Negatif Meme Kanseri (ÜNMK) alt tipinde görülen yüksek heterojenite, metastaz ve tedavi direnci nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunudur. Hücresel enerji sensörü olarak görev yapan Per-Arnt-Sim Kinaz'ın (PASK), proliferasyon, metabolik yeniden programlanma ve metastatik progresyon süreçlerinde rol oynadığı düşünülmektedir. Bu çalışmada PASK'ın meme kanseri patogenezindeki onkojenik etkileri ve terapötik hedef potansiyeli araştırılmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmada MDA-MB-231, MDA-MB-436, BT474, MCF-7 ve MCF10A hücre hatları kullanılmıştır. PASK ekspresyonu siRNA ve seçici PASK inhibitörleri ile baskılanmıştır. Hücre canlılığı, proliferasyon, koloni oluşumu, apoptoz, mitokondriyal membran potansiyeli ve hücre döngüsü değişimleri MTS, koloni oluşum testi, Anneksin V/PI, Kaspaz-3/7, JC-1 akış sitometrisi ve Western blot yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Ayrıca biyoinformatik analizlerle PASK ekspresyonunun prognostik önemi incelenmiştir.

Bulgular: PASK siRNA uygulaması sonrası canlılık MDA-MB 231 hücrelerinde $42,67 \pm 1,53$, MCF7 hücrelerinde $49,00 \pm 1,00$ 'e gerilerken ($p < 0,0001$), koloni oluşturma kapasitesi $14,67 \pm 2,52$ 'ye düşmüş ve apoptotik hücre oranı $26,00 \pm 1,00$ seviyesine yükselmiştir. PASK inhibisyonu, mitokondriyal disfonksiyonu tetikleyerek MDA-MB 231 hücrelerinde düşük membran potansiyeline sahip popülasyonu $30,67 \pm 0,58$ 'e çıkarmıştır ($p < 0,0001$). Moleküler düzeyde Siklin D1 ekspresyonu $10,33 \pm 3,51$ 'e düşmüş, Bcl-2 seviyeleri $21,00 \pm 1,00$ 'e gerilemiştir. Doza bağımlı analizlerde 25 nmol PASK 10 siRNA, SRC ve P-SRC ekspresyonlarını sırasıyla $30,67 \pm 3,06$ ve $25,67 \pm 6,03$ 'e çekerek etkili inhibitör stratejisi olarak öne çıkmıştır. Bulgular, PASK'ın meme kanserinde proliferasyon, apoptoz direnci ve metastazda merkezi bir onkojenik düzenleyici olabileceğine işaret etmektedir.

Sonuç: Bulgular, PASK'ın meme kanserinde proliferasyon, apoptozdan kaçış ve metastatik progresyon süreçlerinde merkezi bir düzenleyici olabileceğini göstermektedir. PASK'ın özellikle agresif meme kanseri alt tiplerinde prognostik biyobelirteç ve hedefe yönelik tedaviler için güçlü bir terapötik hedef olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, EMG, Meme Kanseri, Onkojenik Sinyalizasyon, PASK, siRNA

ABSTRACT

Elucidation of the Role of Per-Arnt-Sim Kinase in the Molecular Pathogenesis of Cancer in Breast Cancer Cell Lines

Introduction: Breast cancer remains a major public health challenge due to its high molecular heterogeneity, metastatic potential, and therapy resistance, particularly in Triple-Negative Breast Cancer (TNBC). Per-Arnt-Sim Kinase (PASK), a cellular energy-sensing kinase, has been implicated in proliferation, metabolic reprogramming, and metastatic progression. This study aimed to investigate the oncogenic role and therapeutic target potential of PASK in breast cancer pathogenesis.

Materials and Methods: MDA-MB-231, MDA-MB-436, BT474, MCF-7, and MCF10A cells were used in this study. PASK expression was suppressed using siRNA-mediated gene silencing and selective PASK inhibitors. Cell viability, proliferation, colony formation, apoptosis, mitochondrial membrane potential, and cell cycle alterations were evaluated using MTT assay, colony formation assay, Annexin V/PI, Caspase-3/7, JC-1 flow cytometry, and Western blot analyses. In addition, bioinformatic analyses were performed to determine the prognostic significance of PASK expression.

Results: Following PASK siRNA application, cell viability decreased to $42.67\% \pm 1.53\%$ in MDA-MB 231 cells and $49.00\% \pm 1.00\%$ in MCF7 cells ($p < 0.0001$), while colony formation capacity dropped to $14.67\% \pm 2.52\%$ and the apoptotic cell rate increased to $26.00\% \pm 1.00\%$ ($p < 0.001$). PASK inhibition triggered mitochondrial dysfunction, increasing the population with low mitochondrial membrane potential to $30.67\% \pm 0.58\%$ in MDA-MB 231 cells ($p < 0.0001$). At the molecular level, Cyclin D1 expression decreased to $10.33\% \pm 3.51\%$, Bcl-2 levels declined to $21.00\% \pm 1.00\%$. In dose-dependent analyses, the 25 nmol PASK 10 siRNA dose emerged as the most effective inhibitory strategy, reducing SRC and P-SRC expression to $30.67\% \pm 3.06\%$ and $25.67\% \pm 6.03\%$, respectively. These findings suggest that PASK acts as a central oncogenic regulator managing proliferation, apoptosis resistance, and metastasis in breast cancer.

Conclusion: These findings indicate that PASK functions as a central regulator of proliferation, apoptosis evasion, and metastatic progression in breast cancer. "PASK may serve as a prognostic biomarker and a promising therapeutic target, particularly in aggressive breast cancer subtypes.

Keywords: Apoptosis, Breast Cancer, EMT, Oncogenic Signaling, PASK, siRNA

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$\Delta\Psi_m$	: Mitokondriyal Membran Potansiyeli
AKT	: Protein Kinase B (Protein Kinaz B)
ANOVA	: Analysis of Variance (Varyans Analizi)
ASIR	: Age-Standardized Incidence Rate (Yaşa Standardize İnsidans Oranı)
ASO	: Antisense Oligonucleotide (Antisens Oligonükleotid)
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adenosine Triphosphate (Adenozin Trifosfat)
BAX	: BCL2 Associated X Protein
BCL-2	: B-cell Lymphoma 2
BRCA1	: Breast Cancer Gene 1
BRCA2	: Breast Cancer Gene 2
BSA	: Bovine Serum Albumin (Bovin Serum Albümin)
CAS	: Chemical Abstracts Service
CCK-8	: Cell Counting Kit-8
CDK	: Cyclin-Dependent Kinase (Siklin Bağımlı Kinaz)
cDNA	: Complementary DNA (Komplementer DNA)
CO₂	: Carbon Dioxide (Karbondioksit)

CTLA-4	: Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein-4
DAPI	: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DMEM/F-12	: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide (Dimetil Sülfoksit)
DNA	: Deoxyribonucleic Acid (Deoksiribonükleik Asit)
DSÖ	:Dünya Sağlık Örgütü
ECL	: Enhanced Chemiluminescence (Gelişmiş Kemilüminesans)
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
EMG	: Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (Epithelial-Mesenchymal Transition)
EMT	: Epithelial-Mesenchymal Transition (Epitelyal-Mezenkimal Geçiş)
ER	: Estrogen Receptor (Östrojen Reseptörü)
FBS	: Fetal Bovine Serum (Fetal Bovin Serum)
FDA	: Food and Drug Administration (Gıda ve İlaç Dairesi)
FITC	: Fluorescein Isothiocyanate
G0/G1	: Gap 0 / Gap 1 Phase (G0/G1 Fazı)
GAPDH	: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GBCI	: Global Breast Cancer Initiative (Küresel Meme Kanseri Girişimi)
GSK3β	: Glycogen Synthase Kinase 3 Beta (Glikojen Sentaz Kinaz 3 Beta)
HDI	: Human Development Index (İnsani Gelişme Endeksi)

HER2	: Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HR	: Hazard Ratio
HRP	: Horseradish Peroxidase
IC₅₀	: Half Maximal Inhibitory Concentration
Ki-67	: Ki-67 Proliferation Marker (Ki-67 Proliferasyon Belirteci)
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
MIR	: Mortality-to-Incidence Ratio (Mortalite/İnsidans Oranı)
mRNA	: Messenger RNA (Haberçi RNA)
mTOR	: Mammalian Target of Rapamycin
MTT	: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NAFLD	: Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (Alkolsüz Karaciğer Yağlanması)
NF-κB	: Nuclear Factor Kappa B
PASK	: Per-Arnt-Sim Kinase (Per-Arnt-Sim Kinaz)
PBS	: Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tamponlu Tuzlu Su)
PD-1	: Programmed Cell Death Protein-1
PD-L1	: Programmed Death Ligand-1
PI	: Propidium Iodide (Propidyum İyodit)
PI3K	: Phosphoinositide 3-Kinase
PR	: Progesterone Receptor (Progesteron Reseptörü)

PTEN	: Phosphatase and Tensin Homolog
qPCR	: Quantitative Polymerase Chain Reaction
RAS	: Rat Sarcoma Viral Oncogene
RB1	: Retinoblastoma Protein 1
RFS	: Relapse-Free Survival (Nükssüz Sağkalım)
RIPA	: Radioimmunoprecipitation Assay Buffer
RISC	: RNA-Induced Silencing Complex (RNA Kaynaklı Susturma Kompleksi)
RNA	: Ribonucleic Acid (Ribonükleik Asit)
RNAi	: RNA Interference (RNA Girişimi)
ROS	: Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
SD	: Standard Deviation (Standart Sapma)
siRNA	: Small Interfering RNA (Küçük Müdahaleci RNA)
SREBP-1c	: Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c
STAT3	: Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TCGA	: The Cancer Genome Atlas
TNBC	: Triple Negative Breast Cancer (Üçlü Negatif Meme Kanseri)
TP53	: Tumor Protein p53
ÜNMK	: Üçlü Negatif Meme Kanseri (Triple Negative Breast Cancer)
WHO	: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

WNT : Wingless/Integrated Signaling Pathway)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 1. Kanser hücrelerinin temel özellikleri	5
Şekil 2. Karsinogenezde çoklu moleküler bozulmaların sinerjik etkisi	6
Şekil 3. Kıtalar arası meme kanseri epidemiyolojisinin karşılaştırılması	8
Şekil 4. Meme Kanseri Moleküler Alt Tiplerinin Biyobelirteç İfadesi ve Klinik Seyre Göre Karşılaştırılması.....	9
Şekil 5. Meme Kanseri Patogenezi ve Risk Faktörlerinin Çok Basamaklı Modeli	10
Şekil 6. RNA Tabanlı Tedavi Yaklaşımları ve Mekanizmaları	11
Şekil 7. siRNA mekanizması ve RNA interferansı (RNAi) yolunun basamakları	12
Şekil 8. Meme kanserinde konvansiyonel tedavilere karşı siRNA temelli hedefe yönelik terapötik yaklaşımın karşılaştırılması	13
Şekil 9. Trastuzumab ve HER2-siRNA Stratejilerinin Karşılaştırılması.....	15
Şekil 10. hPASK'ın Yapısal Organizasyonu, Aktivasyonu ve Hücrel Rollerini	16
Şekil 11. PASK Enziminin Tip 2 Diyabet ve İnsülin Direnci Mekanizmasındaki Rolü.....	19
Şekil 12. PASK Kinazın Moleküler Yapısı, Allosterik İnhibisyon Mekanizması.....	20
Şekil 13. PASK aracılı onkojenik sinyal kaskadı ve β -katenin stabilizasyonu üzerinden tümör progresyonunun düzenlenmesi	22
Şekil 14. Araştırma Tasarımı ve Deneysel Akış Şeması	23
Şekil 15. Deneysel Süreçlerde Kullanılan Temel Cihazlar, Marka/Modeller ve Fonksiyonel Gruplandırılmalar	25
Şekil 16. Meme Kanseri Hücre Hatlarının Moleküler Alt Tipleri ve Karakterizasyonu .	27
Şekil 17. BioE-1115 (PASK İnhibitör) Moleküler Yapısı ve Fonksiyonel Grupları	29

Şekil 18. BioE-1197 (PASK İnhibitörü) Moleküler Yapısı ve Kimyasal Karakterizasyonu	30
Şekil 19. Western Blotting ile Protein Ekspresyon Analizi İş Akışı ve Hedef Antikorlar	35
Şekil 20. PASK İnhibisyonunun Koloni Oluşturma Kabiliyeti Üzerindeki Etkilerinin Analizi	38
Şekil 21. PASK Ekspresyonunun Histolojik Analizi	41
Şekil 22. Farklı kanser türlerinde PASK ekspresyonunun karşılaştırmalı analizi	42
Şekil 23. Meme kanseri hastalarında PASK gen ekspresyonunun artışı (TCGA analizi)	43
Şekil 24. Yüksek PASK ekspresyonunun meme kanserinde prognoz ve sağkalım üzerindeki etkisi	44
Şekil 25. PASK ekspresyonu ile kemoterapiye direnç arasındaki ilişki	45
Şekil 26. PASK Ekspresyonunun Karakterizasyonu ve Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi	46
Şekil 27. PASK Gen Susturulmasının MCF10A Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi.....	47
Şekil 28. PASK'ın meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığı üzerindeki etkisi.....	48
Şekil 29. PASK 1115 inhibitörünün meme kanseri hücre hatlarında koloni oluşumu üzerine etkilerinin değerlendirilmesi.....	49
Şekil 30. PASK Susturulmasının Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptoz Üzerindeki Etkisi	50
Şekil 31. PASK susturulmasının Kaspaz 3/7 aktivasyonu üzerindeki etkisi	51
Şekil 32. PASK Susturulmasının Mitokondriyal Disfonksiyon Üzerindeki Etkisi	52
Şekil 33. PASK Susturulmasının Hücre Döngüsü Dağılımı Üzerindeki Etkisi	53
Şekil 34. PASK Susturulmasının Hücre Döngüsü Proteinlerine Etkisi	55
Şekil 35. PASK Susturulmasının Hücre P53 ve Bcl-2 Protein İfadeleri Üzerindeki Etkisi	56
Şekil 36. PASK Susturulmasının EMG Belirteçleri ve Apoptoz Regülatörleri Üzerindeki Etkisi.....	57

Şekil 37. PASK Susturulmasının Meme Kanseri Hücre Morfolojisi ve Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi	57
Şekil 38. MDA-MB 231 Meme Kanseri Hücre Hattında PASK Susturulmasının Sinyal Yolakları Üzerindeki Etkisi	59
Şekil 39. MDA-MB 231 Hücre Hattında PASK Susturulmasının Sinyal Yolakları Üzerindeki Doz Bağımlı İnhibitör Etkisi	60
Şekil 40. MDA-MB 231 Hücre Hattında PASK 1115 İnhibitörünün Sinyal İletim Yolakları Üzerindeki Etkisi	60



TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 1. Kanser Tedavisinde Güncel RNA Tabanlı Klinik Araştırmalar	14
Tablo 2. PASK Enziminin Farklı Dokulardaki İfade Karakteristikleri ve Fonksiyonel Rollerini	17
Tablo 3. BioE-1115 ve BioE-1197 İnhibitörlerinin Temel Karakteristikleri ve Kullanım Alanları.....	30
Tablo 4. Araştırma Kapsamında Kullanılan Spesifik Antikorların Marka, Katalog Numarası ve Fonksiyonel Gruplandırması.....	31

1. GİRİŞ

Meme kanseri, günümüzde kadın popülasyonu içerisinde en sık teşhis edilen malignite türü olma özelliğini korumakta ve dünya genelinde halk sağlığı üzerinde devasa bir yük oluşturmaktadır (Arnold vd., 2022). Bu hastalığın en temel zorluğu, sahip olduğu belirgin moleküler heterojenliktir; nitekim tümörlerin biyolojik davranışı ve tedaviye verdikleri yanıt, hücre yüzeyindeki reseptör durumlarına göre şekillenmektedir (Andrade de Oliveira vd., 2023). Güncel klinik uygulamalarda kullanılan kemoterapi ve hormonal tedaviler gibi konvansiyonel yöntemler, başlangıçta başarılı sonuçlar verse de sıklıkla sistemik toksisite, sağlıklı hücre hasarı ve en önemlisi de kazanılmış ilaç direnci gibi bariyerlerle karşılaşmaktadır (Garg vd., 2024). Bu durum, özellikle hedefli tedavi seçeneklerinin kısıtlı olduğu ve agresif seyreden Üçlü Negatif Meme Kanseri (ÜNMK) gibi alt tiplerde, malignitenin temel sürücü mekanizmalarını doğrudan hedef alan daha hassas ve yenilikçi moleküler yaklaşımların geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır (Garg vd., 2024). Bu çalışmanın odak noktasını oluşturan Per-Arnt-Sim Kinaz (PASK), hücrenin çevresel besin mevcudiyetini algılayarak bu sinyalleri uygun metabolik ve büyüme yanıtlarına dönüştüren, evrimsel süreçte yüksek oranda korunmuş bir serin/treonin kinazdır (Azad, 2022). Geleneksel olarak Tip 2 diyabet ve obezite gibi metabolik bozukluklarla ilişkilendirilmiş olsa da son yıllarda elde edilen veriler PASK'ın kanser hücrelerinin hayatta kalması için gerekli olan "metabolik yeniden programlama" sürecinde merkezi bir sinyal düğümü olarak işlev görebileceğini göstermektedir (Gul vd., 2025; Lucena Aguilar, 2025). PASK, elde edilen bulgular doğrultusunda, kanser hücrelerinde hücre döngüsü kontrol noktalarını bozarak kontrolsüz proliferasyonu teşvik etmekte, anti-apoptotik yolları aktive ederek programlı hücre ölümünden kaçışı kolaylaştırmaktadır. Bu çok yönlü rolü, PASK'ın tümörün hem iç büyümesini hem de dış korumasını sağlayan kritik bir faktör olduğunu düşündürmektedir. Kullanılan siRNA (küçük müdahaleci RNA) teknolojisi, hedef mRNA moleküllerini translasyon öncesi düzeyde seçici olarak parçalayarak spesifik gen susturulmasını sağlamakta ve böylece onkojenik proteinlerin üretimini en temel aşamada durdurmaktadır. Bu tez çalışması, PASK'ın meme kanseri patogeneziindeki merkezi rollerini farklı moleküler alt tipler üzerinden analiz etmeyi, bu kinazın susturulmasının hücre canlılığı, apoptoz ve metastatik belirteçler üzerindeki baskılayıcı etkilerini *in vitro* modellerde incelemeyi ve sonuç olarak PASK'ı gelecekteki kanser tedavileri için yeni nesil, stratejik bir terapötik hedef olarak konumlandırmayı amaçlamaktadır.

Bu çalışmanın temel amacı, hücresel enerji durumunu algılayan bir sensör olarak işlev gören Per-Arnt-Sim Kinaz (PASK) proteininin meme kanseri patogenezi üzerindeki onkojenik rollerini ve yeni nesil bir terapötik hedef olma potansiyelini belirlemektir. Araştırma kapsamında, meme kanserinin

heterojen yapısını temsil eden *MDA-MB 231*, *MDA-MB 436*, *BT474* ve *MCF-7* hücre hatları kullanılarak PASK geninin susturulmasının hücre canlılığı, proliferasyon, apoptoz ve hücre döngüsü üzerindeki etkileri analiz edilmiştir. Ayrıca PASK'ın, Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMG) ve onkojenik sinyal yolları üzerindeki düzenleyici rolü *in vitro* modeller üzerinden kanıtlanmaya çalışılmaktadır. Meme kanseri, özellikle Üçlü Negatif Meme Kanseri (ÜNMK) gibi alt tiplerde gelişen ilaç direnci ve yüksek nüks oranları nedeniyle ciddi bir halk sağlığı sorunudur; bu durum tümörün hayatta kalmasını yöneten yeni moleküler sürücülerin keşfini zorunlu kılmaktadır. PASK'ın, kanser hücrelerinde kontrolsüz proliferasyonu teşvik eden ve bağışıklık sisteminden kaçışı kolaylaştıran bir kinaz olarak saptanması, çalışmanın önemini artırmaktadır. Elde edilen bulgular, PASK'ın hem agresif meme kanseri olgularında prognostik bir biyobelirteç hem de siRNA tabanlı tedaviler için stratejik bir hedef olarak konumlandırılmasına olanak tanımaktadır. Bu araştırmanın en temel sınırlılığı, çalışmaların *MDA-MB 231* ve *MCF-7* gibi spesifik meme kanseri hücre hatları üzerinden *in vitro* (hücre kültürü) düzeyinde yürütülmesidir. Deneyler, siRNA teknolojisinin sağladığı gen susturma etkinliği ve kullanılan moleküler yöntemlerin (Western Blotting, akış sitometrisi) duyarlılığı ile sınırlıdır. Ayrıca, PASK ekspresyonunun klinik sağkalım üzerindeki etkilerine dair veriler mevcut biyoinformatik veri setleri ve klinik kohort analizleri üzerinden elde edilen istatistiksel sonuçlara dayanmaktadır. Çalışmada, kullanılan ticari hücre hatlarının temsil ettikleri lüminal ve üçlü negatif meme kanseri alt tiplerinin temel genetik ve biyolojik özelliklerini deney süresince muhafaza ettikleri varsayılmaktadır. siRNA aracılığıyla gerçekleştirilen fonksiyon kaybı deneyleri sonucunda gözlemlenen hücresel değişimlerin doğrudan PASK proteininin baskılanmasına bağlı olduğu kabul edilmektedir. Ayrıca, biyoinformatik analizlerde kullanılan veri setlerinin geniş hasta popülasyonlarını ve gerçek klinik tabloyu doğru bir şekilde yansıttığı varsayımı üzerinden hareket edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

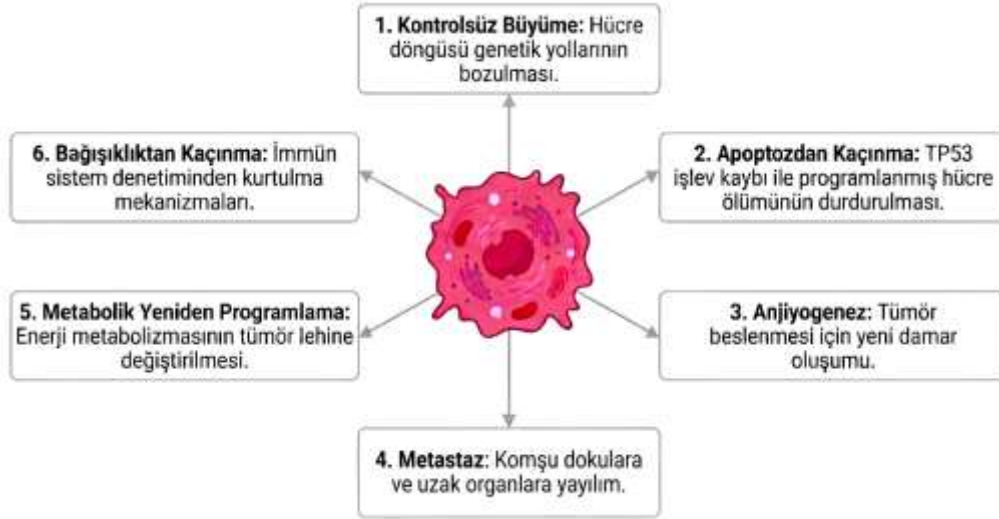
2.1. Kanser: Genel Kavramlar

Kanser, genetik ve epigenetik değişikliklerden kaynaklanan, hücrelerin düzensiz çoğalması ve komşu dokulara yayılması ile tanımlanan bir hastalıklar topluluğunu kapsar (Hanahan, 2022). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından bildirildiği üzere kanser, her yıl milyonlarca kişiyi etkileyen, dünya çapında önde gelen bir ölüm nedenidir (Bray vd., 2018). Genetik mutasyonlar, epigenetik değişiklikler ve çevresel etkiler kanser gelişiminde karmaşık bir etkileşim içindedir. Bu faktörler, hücre döngüsü, apoptoz, DNA onarımı ve bağışıklıktan kaçınma mekanizmaları gibi temel biyolojik süreçlerde bozulmalara neden olur (Hanahan & Weinberg, 2011). Proto-onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve DNA onarım mekanizmalarındaki eksiklikler kanser gelişiminde temel faktörlerdir. Hücre döngüsünü düzenleyen genetik yolların bozulması, kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açar (Matthews vd., 2022). TP53 gibi tümör baskılayıcı genlerdeki işlev kaybı, hücrelerde apoptozu engeller ve kanserin ilerlemesini destekler (Thomas vd., 2022). Kanserde yaygın olarak gözlenen *PI3K/AKT/mTOR* ve *MAPK/ERK* gibi sinyal yollarının düzensizliği hücre büyümesini ve hayatta kalmayı artırır (Vousden & Lane, 2007). Belirtilen özellikler, kontrolsüz büyüme, apoptozdan kaçınma, anjiyogenez, metastaz, enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve bağışıklık sisteminden kaçınma dahil olmak üzere kanser hücrelerinin temel davranışlarıyla ilgilidir. Bu özellikler, kanser biyoçeşitliliğinin anlaşılması ve terapötik hedeflerin geliştirilmesi için gereklidir (Hanahan & Weinberg, 2011). Çevresel faktörler de kanser gelişimini önemli ölçüde etkilemektedir. Genetik yatkınlıkla birlikte tütün kullanımı, aşırı alkol tüketimi, obezite, enfeksiyonlar ve radyasyona maruz kalma gibi faktörler kanser riskini artırmaktadır (Wadgaonkar, 2024). İnsan papilloma virüsü (HPV), serviks kanserinin başlangıcında önemli bir etiyolojik faktör olarak hizmet etmektedir. Yaşam tarzı faktörleri ve diyet, kanserin önlenabilir nedenlerini temsil etmektedir (Wolf vd., 2024). Kanser sınıflandırmaları, kaynaklandıkları dokuya dayanmaktadır (Tarin, 2023). Kanser türleri arasında yaygın olan karsinomlar epitelyal dokudan kaynaklanırken, sarkomlar bağ dokusu ve kas gibi mezenkimal dokulardan kaynaklanmaktadır (Tarin, 2023). Lösemiler ve lenfomalar hematolojik kaynaklardan kaynaklanır ve bağışıklık sistemi hücrelerini etkiler. Bu heterojen yapı, her kanser türünün farklı biyolojik özelliklere ve tedavi stratejilerine sahip olmasını gerektirmektedir (Saha vd., 2024). Tedavi modaliteleri cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapiyi kapsamaktadır. Kanser tedavisindeki son gelişmeler, immün kontrol noktası inhibitörleri (örn. *PD-1/PD-L1* ve *CTLA-4*) ve hedefe yönelik tedaviler de dahil olmak üzere yenilikçi yöntemlerle elde edilmiştir (Pandey vd., 2022; Wojtukiewicz vd., 2021).

Kanserin karmaşık özellikleri, kişiselleştirilmiş tıp stratejilerinin öneminin altını çizmektedir. Genomik analizler, hastaların genetik profillerine göre uyarlanmış tedavi stratejilerinin formüle edilmesini kolaylaştırmaktadır (Pardoll, 2012).

2.1.1. Kanserin Tanımı ve Genel Özellikleri

Sağlıklı hücrelerde apoptoz, DNA onarımı ve büyüme gibi süreçler sıkı bir şekilde regüle edilirken, çeşitli faktörlerin etkisiyle kontrolsüz hücre bölünmesi meydana gelebilmektedir. Kanseri; malign tümör gelişimi, çevre dokulara invazyon ve metastaz kapasitesi gibi özellikleri yönüyle benign lezyonlardan ayrılmaktadır (Bisoyi, 2022). Karsinogenez adı verilen süreçte biriken genetik mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler kanser oluşumunda önemli rol oynar (Hanahan, 2022). Kanseri hücreleri; sürekli proliferatif sinyal, büyüme baskılayıcı sinyallerden kaçış, apoptozun engellenmesi, replikatif ölümsüzlük, anjiyogenez ve metastaz yetenekleri kazanarak hayatta kalır (Şekil 1). Enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve immün yanıtın baskılanması bu süreci kolaylaştırır. Genetik, çevresel faktörler, yaşam tarzı ve enfeksiyonlarla tetiklenebilen kanser, DSÖ verilerine göre dünya genelinde ikinci önde gelen ölüm nedeni olarak kabul edilmektedir (Freihat vd., 2025). GLOBOCAN 2020 verileri, dünya genelinde 19,3 milyon yeni kanser vakası ve 10 milyon ölüm bildirmektedir. Akciğer, meme, kolorektal ve prostat kanserlerinin yüksek insidansı; önleme, erken teşhis ve tedaviyi kritik kılmaktadır. Genetik mutasyonlar, epigenetik değişiklikler ve mikro çevre faktörlerinin yönlendirdiği kanser patogenezinde; hücrelerin sınırsız çoğalma yeteneği artmış telomeraz aktivitesi, büyüme reseptör aşırı ekspresyonu ve bozulmuş apoptotik yollarla sürdürülmektedir (Yousefi vd., 2024). Ayrıca, anjiyogenez mekanizmaları ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMG) süreçleri kanser hücrelerinin metastatik hale gelmesine neden olabilir (Manfioletti & Fedele, 2023). Sonuç olarak, heterojen ve çok faktörlü bir hastalık olan kanserin moleküler patogenezinin aydınlatılması, hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak tanır. Ancak, hastalığın karmaşık yapısı nedeniyle halen yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



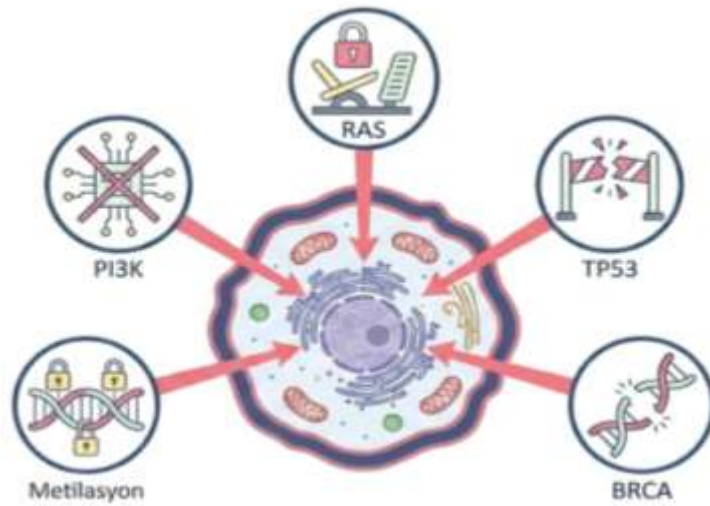
Şekil 1. Kanser hücrelerinin temel özellikleri

Kanser hücrelerinin malign transformasyon ve tümör progresyonu ile ilişkili temel özellikleri (kontrolsüz proliferasyon, apoptozdan kaçış, anjiyogenez, invazyon/metastaz, metabolik yeniden programlama ve immün kaçış) özetlenmektedir. Hücre döngüsü bozuklukları ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ile tetiklenen bu süreçler; tümör heterojenitesi, progresyon ve tedavi direnciyle doğrudan ilişkilidir. Şekil BioRender.com ile oluşturulmuştur (Hanahan, 2022).

2.1.2. Kanser Moleküler Temelleri

Kanserin moleküler temelleri, hücre büyüme, farklılaşma, apoptoz ve genomik stabiliteyi kontrol eden mekanizmaların bozulması sonucunda ortaya çıkan çok aşamalı ve karmaşık bir süreci içerir. Bu süreçte proto-onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, DNA onarım mekanizmalarının bozulması ve epigenetik değişiklikler önemli rol oynar (Liu vd., 2024). Kanser hücrelerinin temel özellikleri Şekil 1’de gösterilmiştir. Kanser gelişimindeki ilk kritik mekanizma, normal hücre büyümesini ve proliferasyonunu kontrol eden proto-onkogenlerin; gen amplifikasyonu, kromozomal translokasyonlar veya nokta mutasyonları ile onkogenlere dönüşmesidir. Bu dönüşüm, hücre içi büyüme sinyalini sürekli açık tutar. Örneğin, tüm kanserlerin yaklaşık %30’unda mutasyona uğrayan RAS geni, hücre içi büyüme sinyalini sürekli açık tutar. Benzer şekilde özellikle meme kanserinde yaygın olan HER2 amplifikasyonu, hücre yüzeyinde büyüme faktörü reseptörlerinin aşırı ekspresyonuna yol açar (Gonullu vd., 2023). İkinci önemli mekanizma ise tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonudur. Tümör baskılayıcı genler, hücre büyüme ve proliferasyonu sınırlayarak kanser oluşumunu önleyen genlerdir. Bu genlerin işlev kaybı, hücrelerin kontrolsüz şekilde bölünmesine neden olur. En iyi bilinen tümör baskılayıcı genler arasında *TP53*, *RB1* ve *PTEN* yer alır (Joyce vd., 2023). *TP53* geni, DNA hasarına karşı hücre yanıtı düzenler ve apoptozu başlatarak hücreleri korur. Ancak bu genin mutasyonu, kanserlerin yaklaşık %50’sinde görülmekte ve genomik instabiliteye neden olmaktadır (Chen vd., 2022). DNA onarım mekanizmalarındaki bozukluklar, kanserin moleküler temellerinde üçüncü önemli bileşendir. DNA hasarlarının birikmesi, mutasyonlara ve

kromozomal anormalliklere yol açarak karsinogenezi başlatır (Moon vd., 2023). Özellikle BRCA1 ve BRCA2 genlerinde görülen mutasyonlar, homolog rekombinasyon yoluyla DNA onarımını bozar ve meme ile over kanserlerine yatkınlığı artırır (Voutsadakis & Stravodimou, 2023). Bunun yanı sıra, epigenetik değişiklikler de kanser gelişiminde kritik rol oynar. DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve mikroRNA'ların (miRNA) ekspresyonu gibi epigenetik mekanizmalar, gen ekspresyonunu değiştirebilir. Özellikle tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgelerinde aşırı DNA metilasyonu bu genlerin susturulmasına yol açmaktadır (Alshammari vd., 2022). Ayrıca, miRNA'lar kanser hücrelerinde onkogenik veya tümör baskılayıcı olarak rol oynayarak hücre döngüsü, apoptoz ve metastaz süreçlerini etkiler (Shoari vd., 2024). Kanserın moleküler temellerinde sinyal yollarının bozulması da önemli bir yer tutar. Özellikle *MAPK/ERK*, *PI3K/AKT/mTOR*, *WNT/β-katenin* ve *NOTCH* sinyal yolları, hücresel proliferasyon, farklılaşma ve apoptozu düzenleyen temel yollardır (Babashah & Soleimani, 2011). Bu yollarda meydana gelen genetik değişiklikler, kanser hücrelerinin proliferasyonunu artırır ve tedaviye direnç geliştirmelerine neden olabilir. Sonuç olarak, kanserın moleküler temelleri, genetik ve epigenetik değişimlerin bir araya gelmesiyle şekillenen karmaşık bir süreci yansıtır (Şekil 2). Onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, DNA onarım mekanizmalarının bozulması ve sinyal yollarının düzensizliği, kanser hücrelerinin biyolojik özelliklerini kazanmalarında temel rol oynar. Bu süreçlerin anlaşılması, hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ve kanserın moleküler patogenezinin aydınlatılmasına önemli katkılar sağlamaktadır.

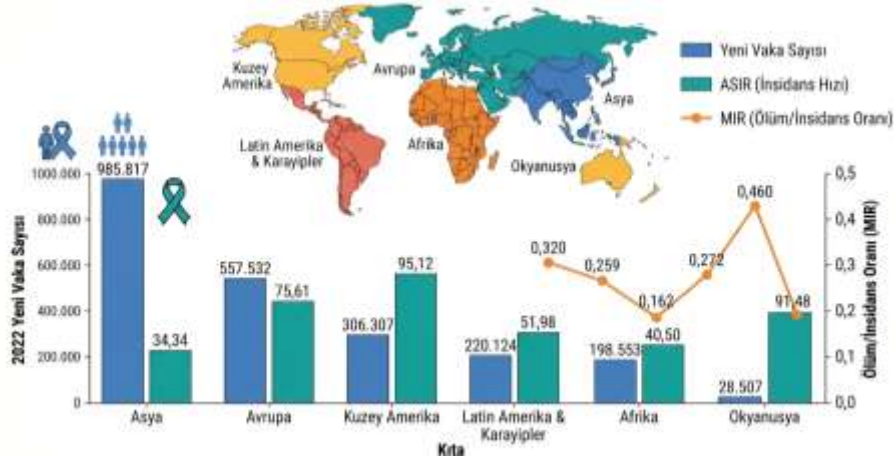


Şekil 2. Karsinogenezde çoklu moleküler bozulmaların sinerjik etkisi

Şemada, kanser gelişiminde rol oynayan başlıca genetik ve epigenetik bozulmaların hücresel homeostaz üzerindeki birleşik etkileri gösterilmektedir. RAS ve PI3K gibi onkogenik sinyal yollarının aktivasyonu, TP53 tümör baskılayıcı geninin inaktivasyonu, BRCA ilişkili DNA onarım defektleri ve DNA metilasyonu gibi epigenetik değişikliklerin birlikte hücresel kontrol mekanizmalarını bozduğu özetlenmektedir. Bu çok basamaklı moleküler değişimlerin hücre proliferasyonu, genomik stabilite ve apoptotik yanıt üzerinde etkili olarak malign transformasyona katkıda bulunduğu gösterilmektedir. Şekil BioRender.com kullanılarak oluşturulmuştur (Hanahan & Weinberg, 2011; Hanahan, 2022; Bisoyi, 2022).

2.2. Meme Kanseri

Meme kanseri, dünya genelinde kadınlar arasında en sık teşhis edilen malignite olma özelliğini korumakta ve halk sağlığı üzerinde devasa bir yük oluşturmaktadır (Arnold vd., 2022). 2022 yılı verilerine göre, küresel ölçekte yaklaşık 2,3 milyon yeni vaka teşhis edilmiş ve bu hastalık 670.000 ölümle sonuçlanmıştır (Freihat vd., 2025) (Şekil 3). Hastalık, sadece biyolojik bir olgu değil, aynı zamanda sosyoekonomik kalkınmışlık, sağlık hizmetlerine erişim ve yaşam tarzı değişiklikleriyle karmaşık bir etkileşim içindedir. Özellikle Amerika Birleşik Devletleri verileri, meme kanserinin kadınlarda görülen yeni kanser vakalarının yaklaşık %30'unu oluşturduğunu göstermektedir (Giaquinto vd., 2022). Bu da her sekiz kadından birinin yaşamı boyunca invaziv meme kanseri tanısı alacağı anlamına gelmektedir (Botezatu vd., 2025). 2050 yılına kadar yeni vaka sayısının %38, ölüm sayısının ise %68 oranında artacağı öngörülmektedir (Kim vd., 2025). WHO'nun Küresel Meme Kanseri Girişimi, 2040 yılına kadar 2,5 milyon hayat kurtarmayı hedefleyen bir yol haritası sunmaktadır (Organization, 2023). Bu strateji, tanı süresini 60 günün altına indirmeyi ve multimodal tedavilere erişimi %80'in üzerine çıkarmayı amaçlamaktadır (Organization, 2023). Meme kanseri insidansı, 2012-2021 yılları arasında yıllık yaklaşık %1 oranında artış göstermiştir (Giaquinto vd., 2024). Ancak bu artış, yaş grupları arasında homojen bir dağılım sergilememektedir. 50 yaş altı kadınlarda (erken başlangıçlı meme kanseri) insidans artış hızı yıllık %1,4 iken, 50 yaş ve üzeri kadınlarda bu oran %0,7 seviyesindedir (Giaquinto vd., 2024). Bu durum, genç popülasyonlarda çevresel faktörlerin, beslenme alışkanlıklarının ve reproduktif davranışlardaki değişimlerin (geç doğum, daha az emzirme gibi) etkisini sorgulatmaktadır (Freihat vd., 2025; Smolarz vd., 2022). Meme kanseri, 185 ülkenin 157'sinde kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Ancak, tanı konulan vaka sayısı ile ölüm oranları arasındaki ilişki, ülkelerin İnsani Gelişim Endeksi (HDI) ile doğrudan bağlantılıdır (Organization, 2023). Çok yüksek HDI değerine sahip ülkelerde her 12 kadından biri tanı alırken, ölüm oranı 71'de 1'dir (Organization, 2023). Buna karşılık, düşük HDI değerine sahip ülkelerde tanı oranı daha düşük (27'de 1) olmasına rağmen, ölüm oranı 48'de 1 gibi çok daha yüksek bir seviyededir (Bray vd., 2012). Bu uçurum, erken tanı imkanlarının eksikliği ve standart tedavi protokollerine erişimdeki kısıtlılıklardan kaynaklanmaktadır (Freihat vd., 2025).



Şekil 3. Kıtalar arası meme kanseri epidemiyolojisinin karşılaştırılması

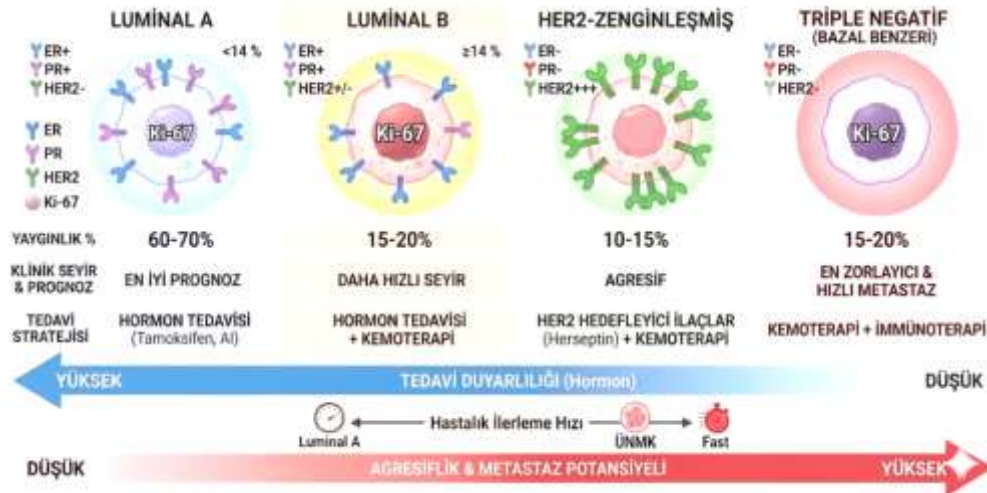
Farklı kıtalara ait meme kanseri insidansı, yeni vaka sayıları ve mortalite/insidans oranları (MIR) karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir. Asya'nın en yüksek toplam yeni vaka sayısına sahip olduğu; Kuzey Amerika ve Avrupa'da ise yaşa standardize insidans oranlarının daha yüksek olduğu görülmektedir. Afrika ile Latin Amerika ve Karayipler bölgelerinde daha düşük insidans oranlarına rağmen mortalite/insidans oranlarının görece yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Bu farklılıkların erken tanı olanakları, sağlık hizmetlerine erişim ve tarama programlarındaki değişkenliklerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Veriler GLOBOCAN 2022 tahminlerinden derlenmiştir. Şekil BioRender.com kullanılarak oluşturulmuştur. (Freihat vd., 2025).

Kuzey Amerika ve Okyanusya gibi gelişmiş bölgelerde insidans hızlarının yüksek seyrettiği, ancak Ölüm/İnsidans Oranı'nın (MIR) düşük kaldığı gözlenmektedir. Afrika'da ise insidans hızı nispeten düşük olmasına rağmen MIR'in 0,460 düzeyinde bulunması, teşhis edilen vakaların önemli bir kısmının hayatını kaybedebileceğine işaret etmektedir (Freihat vd., 2025). Bu durum, küresel meme kanseri kontrolünde "erken teşhis ve zamanında tedavi" stratejisinin ne kadar kritik olduğunu ortaya koymaktadır (Bray vd., 2012). Etnik gruplar arasındaki farklar, meme kanseri yükünün sadece genetik değil, yapısal faktörlerle de şekillendiğini ortaya koymaktadır (Giaquinto vd., 2022). Amerika Birleşik Devletleri'nde Siyah kadınların meme kanseri insidansı Beyaz kadınlara göre %5 daha düşük olmasına rağmen, mortalite (ölüm) oranı %38-41 daha yüksektir (DeSantis vd., 2016). Siyah kadınlarda ÜNMK gibi daha agresif alt türlerin görülme sıklığının daha fazla olması bu farkın biyolojik bir parçasıdır (Prakash vd., 2020). Ancak, lokalize evrede teşhis edilme oranının Siyah kadınlarda %58, Beyaz kadınlarda ise %68 olması, tarama hizmetlerine erişimdeki eşitsizliklerin ve sosyal belirleyicilerin rolünü vurgulamaktadır.

2.2.1. Moleküler Alt Tipleri

Meme kanserinin moleküler alt tipleri, hastalığın sadece mikroskopik görüntüsünü değil, doğrudan genetik yapısını ve biyolojik davranışını yansıtan en güncel sınıflandırma sistemidir (Waykar & Kumarapillai, 2024). Bu sınıflandırmanın temelinde, tümör hücrelerinin yüzeyinde bulunan östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) gibi proteinlerin varlığı ile hücrelerin bölünme hızını gösteren Ki-67 indeksi yer almaktadır (Libson &

Lippman, 2014; Waykar & Kumarapillai, 2024) (Şekil 4). En yaygın görülen alt tip olan Lüminal A, hormon reseptörleri açısından zenginken düşük bir çoğalma hızı sergiler ve bu durum onu en iyi prognoza sahip, hormon tedavisine en duyarlı tip yapar (Orrantia-Borunda vd., 2022). Buna karşılık Lüminal B alt tipi, yine hormon duyarlı olsa da daha yüksek bir Ki-67 indeksi veya bazen HER2 pozitifliği göstererek daha hızlı bir klinik seyir izler ve genellikle tedaviye kemoterapinin eklenmesini gerektirir (Dębska-Szmich & Potemski, 2026). HER2-Zenginleşmiş alt tip, hücre yüzeyindeki HER2 proteininin aşırı artışıyla karakterize olup agresif bir büyüme eğilimi gösterse de, günümüzde bu proteini hedef alan modern biyolojik ilaçlar sayesinde kontrol altına alınabilir hale gelmiştir (Asgari-Karchekani vd., 2022). Moleküler düzeyde en zorlayıcı grup olan ÜNMK ise her üç reseptörden de yoksun olması nedeniyle "üçlü negatif" olarak adlandırılır; bu tip genellikle daha genç yaşlarda görülür, hızlı metastaz yapma potansiyeline sahiptir ve hormon tedavisi seçenekleri bulunmadığı için ağırlıklı olarak kemoterapi ve yeni nesil immünoterapilerle yönetilir (Thomas vd., 2023; Zagami & Carey, 2022).



Şekil 4. Meme Kanseri Moleküler Alt Tiplerinin Biyobelirteç İfadesi ve Klinik Seyre Göre Karşılaştırılması

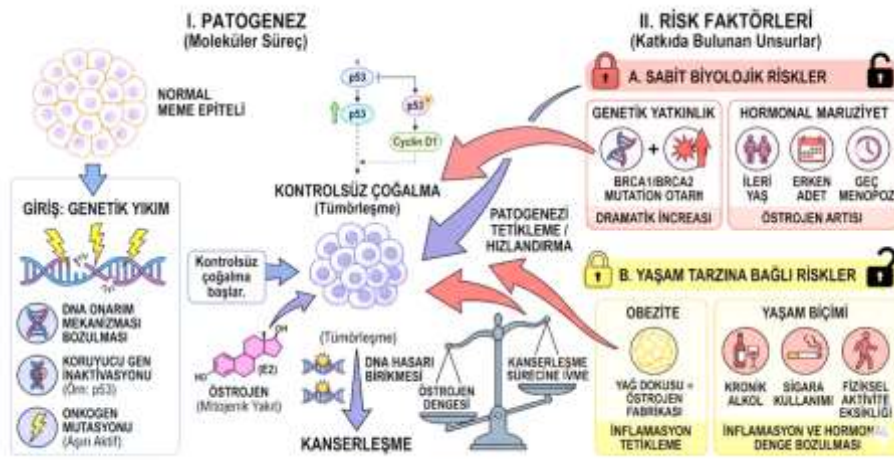
Şemada, meme kanserinin başlıca moleküler alt tipleri olan Luminal A, Luminal B, HER2-zenginleşmiş ve triple-negatif meme kanseri (TNMK) gruplarının biyobelirteç ekspresyon profilleri, klinik davranışları ve tedavi stratejileri karşılaştırılmaktadır.

Luminal alt tiplerin östrojen/progesteron reseptör pozitifliği ve hormonal tedaviye yüksek duyarlılık gösterdiği; HER2-zenginleşmiş tümörlerin HER2 ekspresyon artışı ile karakterize olduğu belirtilmektedir. ÜNMK alt tipin ise hormon reseptörü ve HER2 ekspresyonu göstermemesi nedeniyle daha agresif klinik seyir ve yüksek metastaz potansiyeli ile ilişkili olduğu özetlenmektedir. Ayrıca alt tipler arasında proliferasyon belirteci Ki-67 düzeyi, hastalık progresyonu ve tedavi yanıtındaki farklılıklar gösterilmektedir. Şekil BioRender.com kullanılarak oluşturulmuştur (Asgari-Karchekani vd., 2022; Dębska-Szmich & Potemski, 2026; Libson & Lippman, 2014; Orrantia-Borunda vd., 2022; Thomas vd., 2023; Waykar & Kumarapillai, 2024; Zagami & Carey, 2022).

2.2.2. Patogenezi ve Risk Faktörleri

Meme kanseri patogenezi; DNA onarım mekanizmalarının bozulması, p53 gibi tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve onkogenlerin aşırı aktif hale gelmesiyle tetiklenen, normal meme epitel hücrelerinin kontrolsüz çoğalmaya başladığı çok basamaklı ve karmaşık bir süreçtir (Matthews vd., 2022; Moon vd., 2023). Özellikle östrojen hormonu, meme hücreleri üzerinde mitojenik bir etki

yaratarak bu mutasyonların birikmesine zemin hazırlayan en güçlü yakıtlardan biridir (Al-Shami vd., 2023; Will vd., 2023). Hastalığın gelişimine yol açan risk faktörleri incelendiğinde, genetik yatkınlık ve hormonal maruziyetin merkezde olduğu görülmektedir; özellikle BRCA1 ve BRCA2 gibi genlerdeki kalıtsal mutasyonlar, hücrenin DNA hasarını onarma yeteneğini elinden alarak riski dramatik düzeyde artırır (Voutsadakis & Stravodimou, 2023). Meme kanserinde biyolojik riskler (ileri yaş, erken adet, geç menopoza) yaşam boyu östrojen maruziyetini artırırken; obezite (özellikle menopoza sonrası), alkol, sigara ve hareketsizlik gibi yaşam tarzı faktörleri de inflamasyonu tetikleyip hormonal dengeyi bozarak kanser sürecini hızlandırmaktadır (Şekil 5).



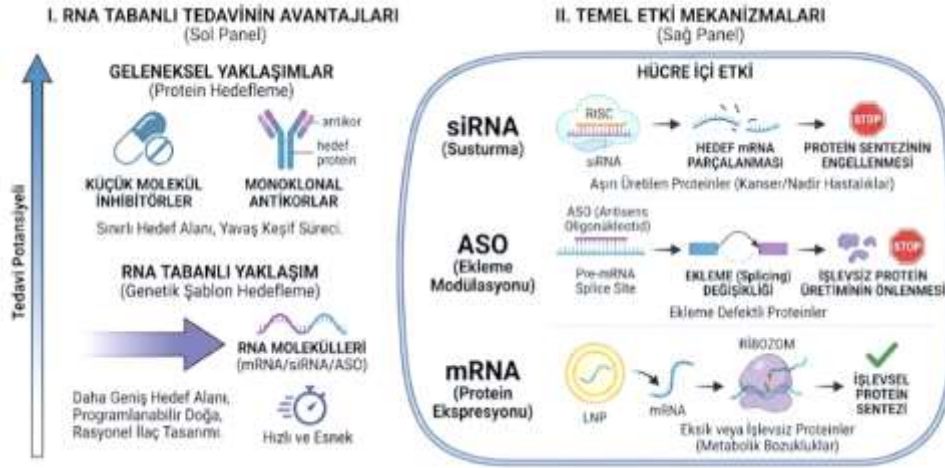
Şekil 5. Meme Kanseri Patogenezi ve Risk Faktörlerinin Çok Basamaklı Modeli

Şekilde meme kanseri gelişiminde rol oynayan moleküler patogenezi basamakları ile genetik, hormonal ve çevresel risk faktörleri özetlenmektedir. Sol panelde, DNA hasarı, DNA onarım mekanizmalarının bozulması, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ve onkogen aktivasyonu ile ilişkili moleküler değişimlerin kontrolsüz hücre çoğalmasına ve tümörleşmeye katkısı gösterilmektedir. Östrojen aracılı proliferatif sinyallerin ve mutasyon birikiminin tümör progresyonunu hızlandırabileceği belirtilmektedir. Sağ panelde ise BRCA1/BRCA2 mutasyonları, hormonal maruziyet, obezite, alkol kullanımı, sigara ve fiziksel aktivite eksikliği gibi meme kanseri gelişimi ile ilişkili risk faktörleri sınıflandırılmıştır. Şekil BioRender.com kullanılarak oluşturulmuştur (Libson & Lippman, 2014; Smolarz vd., 2022; Giaquinto vd., 2024; Dasegowda vd., 2026; Freihart vd., 2025).

2.3. RNA Tabanlı Tedaviler

Modern tıbbın tedavi alanları, geleneksel küçük moleküllü inhibitörler ve monoklonal antikorlara olan bağımlılıktan, daha temel bir genetik yaklaşım olan RNA temelli tedavilere doğru önemli bir dönüşüm yaşamaktadır. Bu eğilim, gen ifadesinin ürünleri olan proteinlerden, DNA ile protein sentezi arasında aracı şablon işlevi gören ribonükleik asit (RNA) moleküllerine geçişi ifade etmektedir (Sparmann & Vogel, 2023). Tarihsel olarak, terapötik ajanların geliştirilmesi, proteinlerin ilaç olabilmesinin zorluğu nedeniyle sınırlıydı; zira yalnızca belirli üç boyutlu ceplere sahip olanlar küçük moleküller tarafından hedef alınabiliyordu (Makkar, 2025). RNA'nın programlanabilir yapısı, rasyonel

ilaç tasarımı hız ve esneklik sağlayarak daha önce tedavi edilemez görülen hastalıklar için yeni kapılar açmaktadır. Bu yöntemle; siRNA ve ASO'lar aracılığıyla zararlı genler seçici olarak susturulabilirken, mRNA teknolojisi ile eksik proteinlerin üretimi sağlanarak fonksiyonel kayıplar geri kazandırılabilir (Şekil 6).



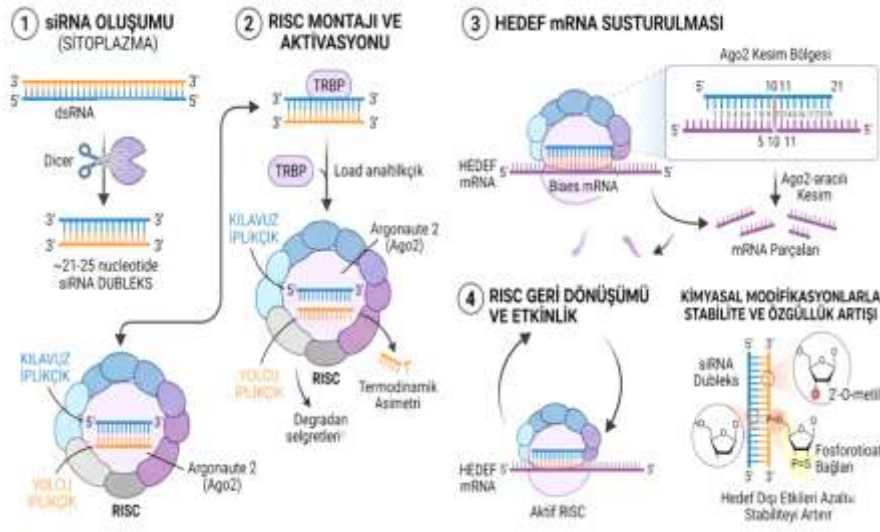
Şekil 6. RNA Tabanlı Tedavi Yaklaşımları ve Mekanizmaları

RNA tabanlı terapötik yaklaşımların geleneksel protein hedefli tedavilere göre avantajları ve temel etki mekanizmaları özetlenmektedir. Sol panelde, küçük molekül inhibitörleri ve monoklonal antikorlar gibi geleneksel yaklaşımlar ile RNA temelli stratejiler karşılaştırılmaktadır. RNA tabanlı yaklaşımların daha geniş hedef alanı, programlanabilir yapısı ve hızlı geliştirilebilir özellikleri vurgulanmaktadır. Sağ panelde ise siRNA, antisens oligonükleotidler (ASO) ve mRNA temelli terapilerin hücre içi etki mekanizmaları gösterilmektedir. siRNA'nın hedef mRNA'yı parçalayarak gen susturulmasını sağladığı, ASO'ların pre-mRNA işlenmesini düzenlediği ve mRNA terapilerinin işlevsel protein sentezini desteklediği özetlenmektedir. Şekil BioRender.com kullanılarak oluşturulmuştur (Dana vd., 2017; Neumeier & Meister, 2020; Sparmann & Vogel, 2023; Wang vd., 2025; Makkar, 2025).

2.3.1. siRNA ve Mekanizması

Küçük müdahaleci RNA (siRNA), başlangıçta viral patojenlere ve transpozonlara karşı bir savunma mekanizması olarak evrimleşen, yüksek oranda korunmuş bir biyolojik mekanizma olan RNA interferansı (RNAi) yolunun temel taşıdır (Neumeier & Meister, 2020). siRNA, belirli bir geni susturmak için tasarlanmış 21-25 nükleotidlik çift sarmallı RNA'lardır; tamamlayıcı mRNA'yı parçalayarak etki eder. 1998'de Fire ve Mello tarafından keşfedilen ve 2001'de memeli hücrelerinde kanıtlanan bu RNAi mekanizması, genetik araştırmalarda ve ilaç geliştirmede dönüştürücü bir araç haline gelmiştir (Dana vd., 2017; Neumeier & Meister, 2020). siRNA aracılı gen susturma, sitoplazmada gerçekleşen çok aşamalı bir süreçtir. İlk olarak Dicer enzimi, çift sarmallı RNA'yı 21–25 nükleotidlik siRNA dublekslerine parçalar; ardından bu moleküller RISC kompleksine dahil edilerek Ago2 proteini ile birleşir. Kompleks içinde siRNA dubleksi çözülür; "yolcu" iplikçik parçalanırken, "kılavuz" iplikçik RISC'yi hedef mRNA'ya yönlendirir. Ago2, mRNA'yı spesifik bir noktadan keserek parçalanmasını ve gen susturulmasını sağlar. RISC'nin birden fazla mRNA'yı hedefleyebilmesi sürecin verimliliğini artırırken, hedef dışı etkileri

önlemek ve stabiliteyi sağlamak amacıyla 2'-O-metil ve fosforotioat gibi kimyasal modifikasyonlar uygulanır (Şekil 7).



Şekil 7. siRNA mekanizması ve RNA interferansı (RNAi) yolunun basamakları

Şekilde siRNA aracılı RNA interferansı (RNAi) mekanizmasının temel basamakları gösterilmektedir. İlk aşamada çift iplikli RNA (dsRNA), Dicer enzimi tarafından yaklaşık 21–25 nükleotid uzunluğunda siRNA dublekslerine işlenmektedir. Oluşan siRNA dubleksi, TRBP ve Argonaute 2 (Ago2) proteinlerini içeren RISC kompleksine yüklenmekte; termodinamik asimetriye bağlı olarak kılavuz iplik seçilirken yolcu iplik degradasyona uğramaktadır. Kılavuz iplik, tamamlayıcı hedef mRNA dizisini tanıyarak Ago2 aracılı kesim ile mRNA'nın parçalanmasına ve gen ekspresyonunun baskılanmasına yol açmaktadır. Ayrıca siRNA'larda kullanılan kimyasal modifikasyonların stabiliteyi artırdığı ve hedef dışı etkileri azaltabildiği gösterilmektedir. Şekil BioRender.com kullanılarak oluşturulmuştur (Dana vd., 2017; Neumeier & Meister, 2020; Sparmann & Vogel, 2023).

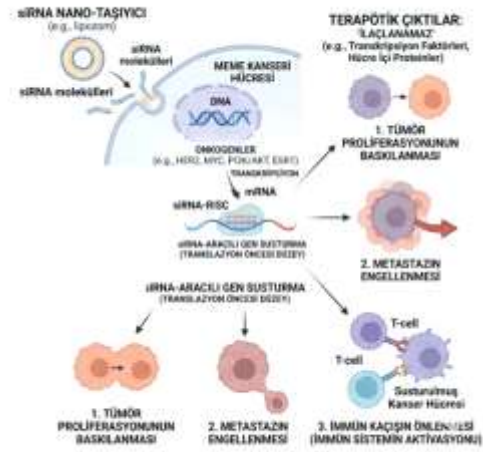
2.3.2. siRNA'nın Meme Kanseriindeki Rolü

Meme kanseri, belirgin moleküler heterojenliği ile karakterize edilen kompleks bir hastalıktır ve bu durum, malignitenin temel sürücü mekanizmalarını hedef alan hassas tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır (Ngamcherdtrakul & Yantasee, 2019). Konvansiyonel kemoterapi ve hormonal tedavilerin sistemik toksisite ve ilaç direnci gibi sınırlamalarına karşın, siRNA teknolojisi küçük moleküllerle hedeflenemeyen transkripsiyon faktörleri ve hücre içi proteinlere karşı özgün ve etkili bir terapötik strateji sunmaktadır (Tanwisa vd., 2025). siRNA, gen ekspresyonunu transkripsiyon öncesi düzeyde baskılayarak, tümör proliferasyonu, metastaz ve immün kaçış gibi kanser progresyonunun temel süreçlerinde rol oynayan onkogenlerin etkin şekilde susturulmasını mümkün kılmaktadır (Crintea vd., 2026; Ngamcherdtrakul & Yantasee, 2019; Sai vd., 2024).

KONVANSİYONEL TEDAVİLER VE SINIRLAMALARI



siRNA ARACILI TERAPÖTİK YAKLAŞIM



Şekil 8. Meme kanserinde konvansiyonel tedavilere karşı siRNA temelli hedefe yönelik terapötik yaklaşımın karşılaştırılması

Şemada, meme kanserinde kullanılan konvansiyonel tedavi yaklaşımlarının sınırlılıkları ile siRNA temelli hedefe yönelik terapötik stratejiler karşılaştırılmaktadır. Sol panelde, kemoterapi ve hormonal tedavilerin sistemik toksisite, çoklu ilaç direnci (MDR) ve hedef dışı etkiler gibi dezavantajları gösterilmektedir. Sağ panelde ise siRNA'nın nano-taşıyıcı sistemler aracılığıyla kanser hücrelerine taşınarak hedef genlerin susturulmasını sağladığı özetlenmektedir. siRNA aracılı gen susturma sonucunda tümör proliferasyonunun baskılanması, metastazın engellenmesi ve immün yanıtın düzenlenmesi gibi terapötik etkiler ortaya çıkabilmektedir. Şekil BioRender.com kullanılarak oluşturulmuştur (Ngamcherdtrakul & Yantasee, 2019; Will vd., 2023; Garg vd., 2024; Sai vd., 2024; Crintea vd., 2026).

İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2'nin (HER2) aşırı ekspresyonu, vakaların yaklaşık %15–30'ini oluşturan ve agresif bir klinik seyirle ilişkili olan belirgin bir meme kanseri alt tipini karakterize eder (Asgari-Karchekani vd., 2022). Trastuzumab gibi HER2'yi hedef alan monoklonal antikorlar hasta sonuçlarını önemli ölçüde iyileştirmiş olsa da, tedaviye direnç gelişimi hâlâ önemli bir klinik sorun olmaya devam etmektedir (Asgari-Karchekani vd., 2022). Bu bağlamda, siRNA aracılı gen susturma, direnç mekanizmalarını aşmak için umut vaat eden alternatif bir stratejiyi temsil etmektedir. siRNA, hem vahşi tip HER2'yi hem de trastuzumab direncinde sıklıkla rol oynayan delta16 HER2 gibi onkojenik varyantlarını etkili bir şekilde baskılayabilir. Öncelikle reseptör sinyalini inhibe eden antikor bazlı tedavilerin aksine, siRNA, HER2 mRNA'sının doğrudan bozulmasını indükler ve bu da HER2 protein ekspresyonunda önemli bir azalmaya yol açar (Gu vd., 2016). Bu durum, kanser hücrelerinde hayatta kalma ve çoğalma ile ilgili temel yolların bozulmasına yol açar. Ayrıca, çok sayıda HER2-pozitif kanser hücre hattında yürütülen uzun vadeli çalışmalar, siRNA temelli yaklaşımlara karşı direncin geleneksel tedavilere kıyasla daha az geliştiğini göstermiş ve siRNA'nın daha kalıcı ve etkili bir tedavi stratejisi olarak potansiyelini vurgulamıştır (Şekil 8). Şu anda meme kanserine özel olarak FDA onayı almış siRNA temelli bir tedavi yöntemi bulunmamakla birlikte, bu alan, solid tümörlerde siRNA uygulamalarını inceleyen erken aşama klinik çalışmalar sayesinde hızla ilerlemektedir (Makkar, 2025; Wang vd., 2025). Inclisiran ve vutrisiran gibi siRNA ilaçlarının onkoloji dışındaki klinik başarıları; bu terapötiklerin

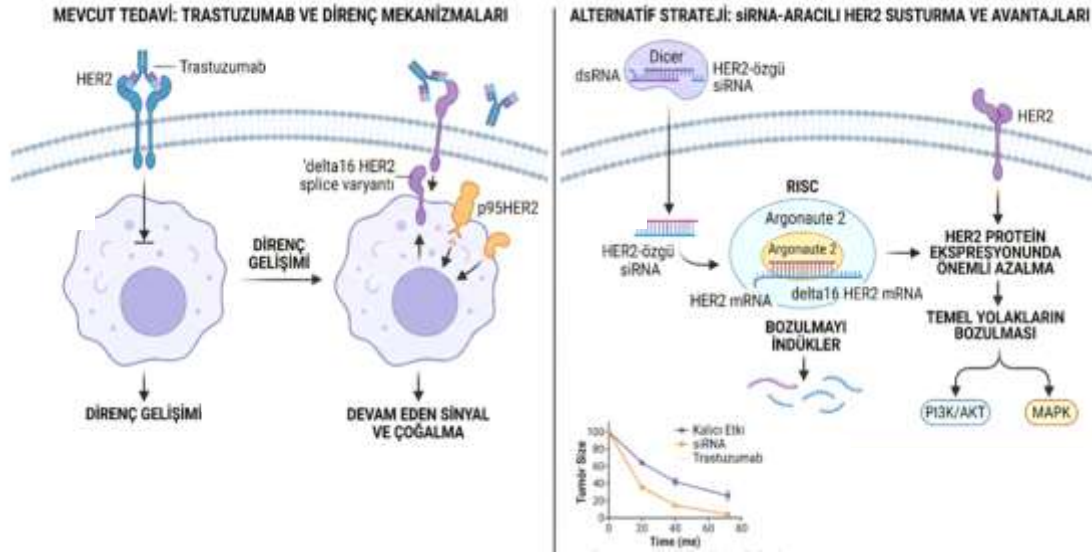
güvenliği, uygulama stratejileri ve üretimi için sağlam bir temel oluşturmuştur. Bu kazanımlar, meme kanseri tedavisinde siRNA tabanlı yaklaşımların gelecekteki klinik uygulamaları adına kritik bir translasyonel çerçeve sunmaktadır (Crintea vd., 2026; Makkar, 2025). HER2'ye özgü siRNA aracılı susturma yaklaşımının trastuzumab direncinin aşılmasındaki potansiyel rolü Şekil 9'da gösterilmiştir. (Güncel klinik araştırmalar Tablo 1'de özetlenmiştir).

Tablo 1. Kanser Tedavisinde Güncel RNA Tabanlı Klinik Araştırmalar

Klinik Araştırma No	Hedef Gen / Terapi	Aşama (Faz)	Temel Amaç
NCT06098651	DCR-STAT3 (siRNA)	Faz I	Dirençli solid tümörlerde güvenlik ve farmakokinetik (PK) analizi.
NCT01591356	EphA2 (siRNA-DOPC)	Faz I	İleri evre tümörlerde doz artırımı ve güvenlik değerlendirmesi.
NCT01837602	cMet Yönlendirmeli T-hücreleri (RNA)	Faz I/II	Metastatik meme kanserinde intratümöral uygulama.
NCT03087591	APN401 (Cbl-b Susturma)	Faz I	Solid tümörler için otolog hücre tedavisi.

Not. Klinik çalışma bilgileri ClinicalTrials.gov veri tabanından elde edilmiştir.

Bu çalışmalar, siRNA formülasyonlarının güvenilirliğini ve tolere edilebilirliğini ortaya koymaktadır; ancak karaciğer dışı hedefleme ve tümöre etkili bir şekilde nüfuz etme gibi zorluklar, halen devam eden araştırmaların odak noktası olmaya devam etmektedir. Yapay zekanın nano taşıyıcı tasarımına entegre edilmesi ve çoklu hedef sinerjilerinin araştırılması, siRNA'nın onkoloji alanındaki klinik etkisini hızlandıracağı öngörülmektedir.



Şekil 9. Trastuzumab ve HER2-siRNA Stratejilerinin Karşılaştırılması

Şemada, HER2 pozitif meme kanserinde trastuzumab tedavisine karşı gelişen direnç mekanizmaları ile HER2'ye özgü siRNA aracılı susturma stratejileri karşılaştırılmaktadır. Sol panelde, trastuzumabın HER2 reseptörüne bağlanarak sinyal iletimini baskıladığı; ancak alternatif HER2 varyantlarının oluşumu ve reseptörün yeniden aktivasyonu sonucunda tedavi direncinin geliştiği gösterilmektedir. Sağ panelde ise HER2'ye özgü siRNA'nın Dicer ve RISC kompleksleri aracılığıyla HER2 mRNA'sını hedefleyerek parçalanmasını sağladığı ve böylece HER2 protein ekspresyonunu azalttığı gösterilmektedir. Bu mekanizma sonucunda PI3K/AKT ve MAPK gibi aşağı akım sinyal yollarının baskılandığı özetlenmektedir. Ayrıca siRNA aracılı susturma yaklaşımının HER2 varyantlarını da hedefleyebilmesi nedeniyle direnç gelişimine karşı potansiyel avantaj sağlayabileceği belirtilmektedir. Şekil BioRender.com kullanılarak oluşturulmuşturGu vd., 2016; Asgari-Karchekani vd., 2022; Gonullu vd., 2023; Tanwisa vd., 2025; Garcia vd., 2026).

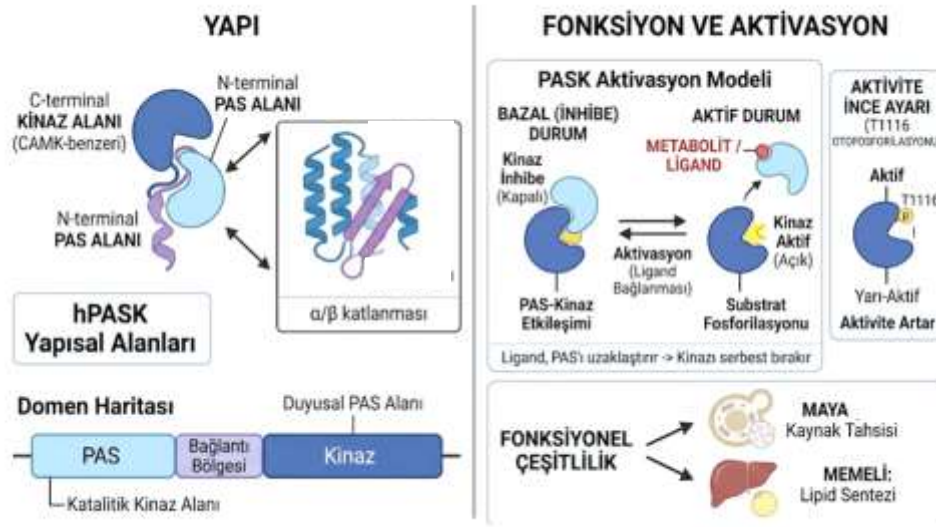
2.4. PASK (Per-Arnt-Sim Kinaz)

Hücrel homeostazın sürdürülmesi, çevresel besin mevcudiyetinin algılanması ve bu sinyallerin uygun metabolik yanıtlara dönüştürülmesini sağlayan karmaşık bir protein kinaz ağına bağlıdır. Bu ağın merkezinde yer alan Per-Arnt-Sim (PAS) alanı içeren serin/treonin kinaz (PASK), Glukoz ve lipid metabolizmasının düzenlenmesinde evrimsel olarak korunmuş bir sensör olarak ortaya çıkmaktadır (DeMille & Grose, 2013; Grose & Rutter, 2010). İlk olarak maya ve memeli sistemlerinde tanımlanan PASK, hücrenin enerji durumunu doğrudan gen ifadesi, protein çevirimi ve enzim aktivitesi ile ilişkilendiren özgün bir moleküler mimariye sahiptir (Grose & Rutter, 2010; Hao & Rutter, 2008).

2.4.1. Yapısı ve Fonksiyonu

PASK, serin/treonin kinaz ailesinin bir üyesi olup, adını N-terminal ucunda bulunan duyusal PAS alanlarından almaktadır (DeMille & Grose, 2013). Moleküler yapısı incelendiğinde, proteinin bir C-terminal katalitik kinaz alanı ve bir veya daha fazla N-terminal PAS alanı içerdiği görülmektedir. İnsan PASK (hPASK) proteini, birincil amino asit dizisi ve protein yapısı açısından kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz (CAMK) ailesine benzerlik gösterir (DeMille & Grose, 2013). hPASK, çoğu protein kinazın aksine, aktivasyon döngüsü fosforilasyonu (özellikle T1116 kalıntısı) olmadan da aktif bir konformasyon benimseyebilme yeteneğine sahiptir; ancak bu kalıntının otofosforilasyonu katalitik aktiviteyi önemli

ölçüde artırarak bir tür "ince ayar" mekanizması sağlar (DeMille & Grose, 2013). PAS domainleri, yaşamın tüm basamaklarında bulunan ve ışık, oksijen, redoks durumu ya da metabolitler gibi fiziksel ve kimyasal uyarımları algılayarak hücresel süreçleri yöneten çok yönlü modüllerdir (Möglich vd., 2009). Yapısal olarak, bir PAS alanı, beş iplikli antiparalel bir beta-tabakası ve bu tabakayı çevreleyen birkaç alfa-heliksinden oluşan korunmuş bir alfa\beta katlanmasına sahiptir. PASK içerisinde bu duyusal alan, katalitik alan ile doğrudan etkileşime girerek enzimi bazal durumda inhibe eder. Mevcut aktivasyon modeline göre, henüz tam olarak tanımlanmamış küçük bir metabolit veya ligandın PAS alanına bağlanması, bu intramoleküler etkileşimi bozar ve kinaz alanını serbest bırakarak substratlarını fosforillemesine olanak tanır (Möglich vd., 2009) (Şekil 10). PASK'ın fonksiyonel çeşitliliği, onun evrimsel korunmuşluğu ile yakından ilişkilidir. *Saccharomyces cerevisiae* maya suşunda Psk1 ve Psk2 olmak üzere iki ortolog bulunur. Bu proteinler, Glukozun glikojen depolanması yerine hücre duvarı biyosentezine yönlendirilmesini sağlar. Memelilerde ise bu temel "kaynak tahsisi" görevi daha karmaşık bir hal alarak endokrin fonksiyonların ve lipid sentezinin düzenlenmesine evrilmiştir (DeMille vd., 2019; Hao & Rutter, 2008).



Şekil 10. hPASK'ın Yapısal Organizasyonu, Aktivasyonu ve Hücresel Rollerini

Şemada, insan PASK (hPASK) proteininin yapısal domain organizasyonu, aktivasyon mekanizması ve hücresel fonksiyonları özetlenmektedir. Sol panelde, N-terminal bölgede yer alan PAS domainleri ile C-terminal katalitik kinaz domaini arasındaki yapısal organizasyon gösterilmektedir. PAS domainlerinin α/β katlanma motifleri aracılığıyla çevresel ve metabolik sinyallerin algılanmasına katkıda bulunduğu belirtilmektedir. Orta panelde, PASK'ın inhibitör durumda bulunan bazal formdan aktif konformasyona geçiş modeli sunulmaktadır. Ligand veya metabolit bağlanmasının PAS-kinaz etkileşimini değiştirerek kinaz domainini serbest bıraktığı ve substrat fosforilasyonunu başlattığı gösterilmektedir. Sağ panelde ise Thr1116 otofosforilasyonu ile ilişkili aktivite düzenlenmesi ve PASK'ın enerji homeostazı, metabolik adaptasyon ve lipid metabolizmasındaki fonksiyonel rolleri özetlenmektedir. Şekil BioRender.com kullanılarak oluşturulmuştur (Hao & Rutter, 2008; Möglich vd., 2009; Grose & Rutter, 2010; Wu & Romero, 2014; Zhang vd., 2015a; DeMille vd., 2019; Azad, 2022; Dhungel vd., 2025).

2.4.2. Hücresel Lokalizasyonu ve İfade Edildiği Dokular

PASK, memelilerde yaygın bir ifade profiline sahip olsa da metabolik ve endokrin açıdan aktif dokularda yoğunlaşır. Gen ifadesi glukoz tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir; yüksek glukoz seviyeleri, mRNA düzeyini ve protein sentezini artırarak PASK aktivasyonunu tetikler (Hao & Rutter, 2008). PASK, sitoplazma ve çekirdek arasında dinamik olarak yer değiştirebilen bir proteindir. Bu ikili lokalizasyon, PASK'ın hem sitozolik metabolik süreçleri düzenlemesine hem de gen ifadesini transkripsiyonel ve epigenetik yollarla yönetmesine olanak tanır. Özellikle testis germ hücreleri ve sperm orta kısmındaki yoğun ifadesi, enzimin enerji metabolizması ile protein sentezi arasında kritik bir köprü kurduğuna işaret etmektedir (PASK enziminin farklı dokulardaki ifade karakteristikleri ve fonksiyonel rolleri Tablo 2'de sunulmuştur). Bu durum PASK'ın enerji metabolizması ile protein sentezi arasında bir köprü kurduğunu düşündürmektedir (Eckhardt vd., 2007).

Tablo 2. PASK Enziminin Farklı Dokulardaki İfade Karakteristikleri ve Fonksiyonel Roller

Doku Grubu	İfade Karakteristiği	Başlıca Fonksiyonel Rolü
Pankreas (İslet)	Glukoz Bağımlı	İnsülin/Glukagon gen ifadesi ve salınımı.
Karaciğer	Beslenme/İnsülin Duyarlı	SREBP-1c olgunlaşması ve trigliserit sentezi.
Kas (Miyoblast)	Diferansiyasyon Bağımlı	Miyogenez; miyogenin promotör aktivasyonu.
Testis	Germ Hücresine Özgü	eEF1A1 etkileşimi; spermatogenez süreci.
Beyin (Hipotalamus)	Yaygın/Düşük Spesifite	Besin algılama; AMPK/mTOR yolları ile entegrasyon.

(Hao vd., 2007; Rutter vd., 2001; Katschinski & Marti, 2018; Kikani vd, 2010).

Genotip-Doku İfadesi (GTEx) ve İnsan Protein Atlası (HPA) verileri, PASK'ın birçok dokuda ifade edildiğini ve aktivitesinin besin durumuna göre değiştiğini doğrulamaktadır. Özellikle hipotalamusta PASK, enerji dengesini yöneten bir besin sensörü olarak görev yapar ve AMPK ile mTOR sinyal yollarının normal işleyişinde kritik bir bileşen olarak işlev görür.

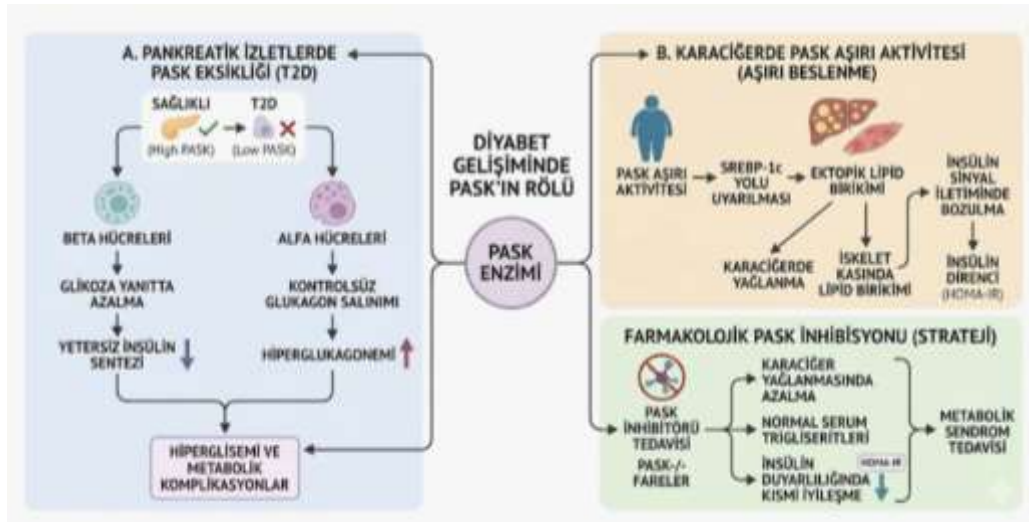
2.4.3. Glukoz ve Lipid Metabolizmasındaki Rolü

PASK, Glukozun hücre içerisindeki kaderini belirleyen bir molekül gibi hareket eder. Pankreatik beta hücrelerinde, yükselen Glukoz konsantrasyonları PASK aktivitesini hızla artırır. Aktifleşen PASK, preproinsülin geninin transkripsiyonunu ve bu sürecin anahtar düzenleyicisi olan PDX-1 (pankreatik duodenal homeobox-1) transkripsiyon faktörünün ifadesini ve stabilitesini uyarır (Semache vd., 2013). PDX-1 üzerindeki bu etki, PASK'ın Glikojen Sentaz Kinaz 3 beta (GSK3β) enzimini Ser9 kalıntısından fosforilleyerek inaktive etmesi aracılığıyla gerçekleşir; böylece PDX-1'in proteazomal yıkımı önlenir

(Semache vd., 2013). Lipid metabolizması bağlamında PASK, özellikle karaciğer dokusunda de novo lipogenez sürecinin güçlü bir indükleyicisi olarak görev yapmaktadır. Yağ asidi ve trigliserit sentezini kontrol eden Sterol Düzenleyici Element Bağlayıcı Protein-1c (SREBP-1c) transkripsiyon faktörünün aktivasyonu PASK'a bağımlıdır (Wu & Romero, 2014; Xu vd., 2013). SREBP-1c, endoplazmik retikulum (ER) membranına bağlı inaktif bir öncül olarak sentezlenir. Beslenme ve insülin sinyalleriyle tetiklenen süreçte PASK, bu öncülün proteolitik olarak olgunlaşmasını (RIP mekanizması) teşvik ederek aktif transkripsiyon faktörünün çekirdeğe girmesini sağlar (Wu & Romero, 2014). PASK eksikliği olan fare modellerinde (PASK^{-/-}), yüksek yağlı diyetle beslenseler dahi karaciğerde trigliserit birikiminin (steatoz) ve insülin direncinin gelişmesine karşı direnç gözlenmiştir (Pape vd., 2018). Bu fareler, Glukoza lipid olarak depolamak yerine mitokondriyal respirasyona yönlendirdikleri için hiper metabolik bir fenotip sergilerler; daha fazla oksijen tüketir ve daha fazla ısı üretirler. Bu durum, PASK'ın Glukoz kullanımını solunumdan uzaklaştırıp depolamaya (lipid sentezi) yönlendiren temel bir anahtar olduğunu ortaya koymaktadır (DeMille & Grose, 2013; Pape vd., 2018; Zhang vd., 2015b).

2.4.4. PASK ve İnsülin Direnci / Tip 2 Diyabet İlişkisi

PASK hem diyabetin gelişiminde hem de bu hastalığın metabolik komplikasyonlarının ilerlemesinde kritik bir rol oynar. İnsan islet çalışmaları, Tip 2 Diyabetli bireylerin pankreatik islet hücrelerinde PASK ifadesinin sağlıklı kontrollere kıyasla önemli ölçüde düşük olduğunu göstermiştir (da Silva Xavier vd., 2011). PASK düzeyindeki bu düşüş, beta hücrelerinin Glukoza yanıt olarak yeterli insülin sentezleyememesine ve alfa hücrelerinden kontrolsüz glukagon salınımına (hiperglukagonemi) katkıda bulunabilir (da Silva Xavier vd., 2011). Diğer yandan, PASK'ın karaciğerdeki aşırı aktivitesi, modern "aşırı beslenme" koşullarında insülin direncinin ana itici güçlerinden biri haline gelir. SREBP-1c yolunun PASK aracılığıyla sürekli uyarılması, karaciğerde ve iskelet kasında ektopik lipid birikimine yol açarak insülin sinyal iletimini bozar (Li vd., 2023) (Şekil 11). PASK^{-/-} farelerin obeziteye ve diyabete karşı direnci, PASK'ın farmakolojik olarak inhibe edilmesinin metabolik sendrom tedavisinde etkili bir strateji olabileceğine dair güçlü kanıtlar sunmaktadır. Klinik öncesi çalışmalarda, PASK inhibitörü tedavisi karaciğer yağlanmasını azaltmış, serum trigliseritlerini normalize etmiş ve insülin duyarlılığını (HOMA-IR skoru ile ölçülen) kısmen iyileştirmiştir (Lee vd., 2022).



Şekil 11. PASK Enziminin Tip 2 Diyabet ve İnsülin Direnci Mekanizmasındaki Rolü

Şemada, PASK enziminin pankreatik adacıklar ve karaciğer metabolizması üzerindeki etkileri ile Tip 2 diyabet gelişimindeki potansiyel rolü gösterilmektedir. (A) Pankreatik isletlerde PASK eksikliğinin beta hücrelerinde Glukoza yanıtın ve insülin sentezinin azalmasına, alfa hücrelerinde ise kontrolsüz glukagon salınımına yol açarak hiperglisemi ve metabolik komplikasyonları tetiklediği gösterilmektedir. (B) Karaciğerde artmış PASK aktivitesinin SREBP-1c sinyal yolunu uyararak ektopik lipid birikimi, hepatik yağlanma ve insülin direnci gelişimine katkıda bulunduğu özetlenmektedir. Ayrıca farmakolojik PASK inhibisyonunun karaciğer yağlanmasını azaltabileceği, serum trigliserid düzeylerini düzenleyebileceği ve insülin duyarlılığını iyileştirebileceği gösterilmektedir. Şekil BioRender.com kullanılarak oluşturulmuştur (da Silva Xavier vd., 2011; DeMille & Grose, 2013; Semache vd., 2013; Wu & Romero, 2014; Xu X. vd., 2013; Pape vd., 2018; Pérez-García vd., 2018; Swiatek vd., 2020; Lee vd., 2022; Li vd., 2023; Xu S. vd., 2025).

2.4.5. PASK Hedef Proteinleri ve Sinyal Yolakları

PASK'ın çok yönlü etkileri, sitoplazmadan çekirdeğe kadar uzanan geniş bir substrat yelpazesi ile açıklanmaktadır. Bu substratlar, PASK'ın metabolik durum ile genetik yanıtlar arasındaki köprü kurma yeteneğini temsil eder.

USF1 (Upstream Transcription Factor 1): PASK, USF1'i fosforilleyerek Glukozun solunum (respirasyon) ve depolama (lipid sentezi) arasındaki dağılımını kontrol eder. USF1, solunumla ilgili genlerin ifadesini desteklerken, PASK tarafından modüle edildiğinde hücrenin enerjiyi yağ olarak saklama kapasitesini artırır.

Wdr5 ve Miyogenez: Kas dokusunda PASK, Wdr5 proteinini Ser49 kalıntısından fosforilleyerek aktive eder. Bu fosforilasyon olayı, miyogenin geninin promotör bölgesinde yer alan baskılayıcı H3K4me1 (monometilasyon) işaretlerinin, transkripsiyonu teşvik eden H3K4me3 (trimetilasyon) formuna dönüşümünü tetikler. Bu epigenetik modülasyon, miyoblastların olgun kas liflerine farklılaşması (miyogenez) süreci için mutlak bir gerekliliktir (Kikani vd., 2017).

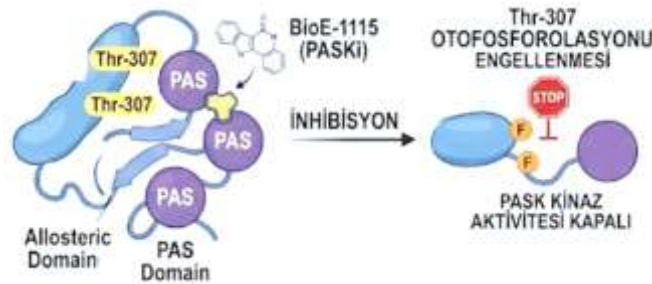
Histon H3: PASK, doğrudan bir histon kinaz olarak çekirdekte görev yapar ve Histon H3'ü T3, T6, S10 ve T11 kalıntılarından fosforiller. Bu modifikasyonlar, MLL2 metiltransferaz kompleksi ile etkileşime girerek belirli metabolik ve diferansiyasyon genlerinin ifadesini uyarır (Kikani vd., 2016).

eEF1A1 (Eukaryotic Translation Elongation Factor 1A1): PASK, protein sentezi makinesinin bir parçası olan eEF1A1 ile etkileşime girer ve onu Thr432 kalıntısından fosforiller. Bu etkileşim, hücrenin enerji durumu ile protein sentez hızı arasında bir koordinasyon sağladığını düşündürmektedir (Eckhardt vd., 2007).

2.4.6. Bir Terapötik Hedef Olarak PASK

PASK'ın metabolik sendrom, NAFLD (alkolsüz karaciğer yağlanması) ve Tip 2 Diyabet üzerindeki güçlü etkisi, onu ilaç geliştirme çalışmaları için cazip bir hedef haline getirmiştir. PASK'ın özgün kinaz alanı yapısı ve PAS alanları aracılığıyla allosterik olarak düzenlenebilmesi, yüksek seçiciliğe sahip küçük moleküllü inhibitörlerin geliştirilmesine olanak tanır (Xu vd., 2025a). BioE-1115 (PASKi) bileşiği, PASK üzerinde nanomolar düzeyde (nM) güçlü ve seçici bir inhibisyon sağlayan bir kinoksalin-karboksilik asit türevidir (Wu vd., 2014). BioE-1115, PASK'ın Thr-307 otofosforilasyonunu etkili bir şekilde bloke ederek SREBP-1c'nin olgunlaşmasını durdurur (Şekil 12). Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar, bu inhibitörün karaciğer trigliseritlerini %50'ye varan oranlarda azalttığını ve insülin direncini geri çevirdiğini göstermiştir (Wu vd., 2014).

NASH ve Karaciğer Fibrozu: PASK inhibisyonunun sadece yağ birikimini değil, aynı zamanda karaciğerdeki inflamasyonu ve fibrozisi de azalttığı saptanmıştır. NASH modellerinde BioE-1115 tedavisi, hepatosit balonlaşması ve vakuolizasyon gibi histolojik hasar belirtilerini hafifletmiş; fibrozis belirtici olan alfa-düz kas aktini (α -SMA) ifadesini ve kolajen birikimini anlamlı düzeyde düşürmüştür (Pape vd., 2018; Swiatek vd., 2020). Gelecekteki terapötik yaklaşımlar, PASK'ın sadece katalitik aktivitesini değil, aynı zamanda PAS alanları üzerinden gerçekleşen besin duyarlılığını da hedef alabilir. PASK'ın doku bazlı ifade farklılıkları ve sitoplazmik/nükleer rolleri, spesifik organlarda (örneğin sadece karaciğerde) aktif olan ilaçların geliştirilmesine imkân tanıyarak sistemik yan etkilerin minimize edilmesini sağlayabilir.



Şekil 12. PASK Kinazın Moleküler Yapısı, Allosterik İnhibisyon Mekanizması

Şemada, PASK kinazın PAS domainleri üzerinden BioE-1115 inhibitörü ile etkileşimi ve inhibitörün olası allosterik baskılama mekanizması gösterilmektedir. BioE-1115'in PAS bölgesine bağlanmasının Thr307 otofosforilasyonunu engelleyerek PASK kinaz aktivitesini baskıladığı öne sürülmektedir. Bu inhibisyon sonucunda enzimin aktif konformasyonunun değiştiği ve aşağı akım sinyal yollarının düzenlenebileceği düşünülmektedir. Şekil BioRender.com kullanılarak oluşturulmuştur.

2.5. PASK ve Vasküler Sinyalizasyon ve Stres Yanıtı

Vasküler sistem sürekli maruz kaldığı hemodinamik ve metabolik streslere karşı PASK'ı bir "sinyal entegratörü" olarak kullanır. Metabolik Sendrom bileşenleri olan hipertansiyon ve dislipidemi ile ilişkisi, PASK'ı vasküler sağlığın korunmasında kilit bir aktör kılar. PASK'ın vasküler etkileri temel olarak şu mekanizmalarla şekillenir:

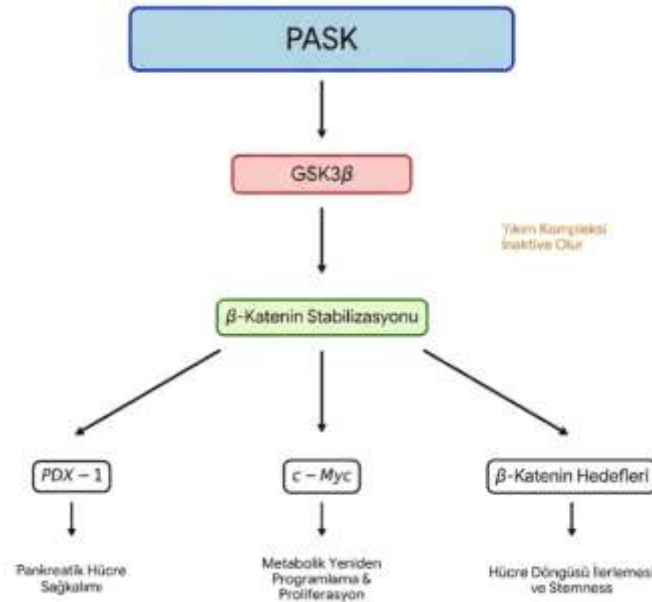
Aterogenez ve Lipid Stresi: PASK, karaciğerde lipogenezi ve SREBP-1c'yi teşvik ederek LDL ve trigliserit seviyelerini artırabilir; bu pro-aterojenik profil plak oluşumunu hızlandırabilir (Wu vd., 2014). PASK eksikliği ise ROS seviyelerini düşürüp mitokondriyal homeostazı iyileştirerek endoteli strese karşı dirençli kılar. Mayadan insana kadar korunan PASK, stres sinyallerini algılayarak metabolik kaynakları onarım süreçlerine yönlendirir; bu da onu vasküler sağlıkta kilit bir sinyal bileşeni yapar. PASK, besin mevcudiyetini algılayıp metabolik ve epigenetik yanıtları koordine eden, korunmuş bir sensör kinazdır. Karaciğerde lipogenezi desteklerken, pankreasta insülin sekresyonunu dengeler; bu yönüyle obezite ve insülin direnci patogenezinde merkezidir. Nükleer histon kinaz aktivitesiyle gen ekspresyonunu ve hücrel farklılaşmayı uzun vadede etkiler (Kikani vd., 2016). Klinik çalışmalar, PASK inhibitörlerinin obezite, insülin direnci ve NASH gibi hastalıklarda önemli bir terapötik hedef olduğunu göstermekte; bu sinyal ağlarının anlaşılması metabolik tedavi stratejileri için kritik önem taşımaktadır.

2.6. PASK'ın Onkogenik Rolü ve Kanserle İlişkisi

Hücrel homeostazın sürdürülmesi, besin mevcudiyetinin algılanması ve bu sinyallerin uygun büyüme programlarına dönüştürülmesi süreçlerinin hassas bir koordinasyonunu gerektirir. Bu koordinasyonun merkezinde yer alan PAS (Per-Arnt-Sim) domaini içeren serin/treonin kinaz (PASK), hem metabolik bir sensör hem de sinyal iletim integratörü olarak kritik bir role sahiptir (Cardon & Rutter, 2012; DeMille & Grose, 2013; Dhungel vd., 2025). Geleneksel olarak tip 2 diyabet, obezite ve metabolik sendrom ile ilişkilendirilmiş olsa da son yıllarda yapılan araştırmalar PASK'ın onkogenik potansiyelini ve kanser gelişimindeki rolünü giderek daha belirgin hale getirmektedir (Gul vd., 2025). Kanser hücrelerinin kontrolsüz proliferasyonu ve hayatta kalması için gerekli olan metabolik yeniden programlama süreci, PASK'ın temel fonksiyonel eksenini ile doğrudan kesilmektedir (Gul vd., 2025).

Kanser hücreleri, hızlı büyüme için metabolik yollarını Warburg Etkisi ile yeniden düzenleyerek bol oksijen varlığında bile aerobik glikolizi tercih ederler. PASK, bu geçişte merkezi bir sinyal düğümüdür. Anabolik süreçlerin ana regülatörü olan mTORC1, PASK'ı fosforile ederek aktive eder; bu nedenle mTORC1'in hiperaktif olduğu kanser hücrelerinde PASK da sürekli büyüme sinyali üretir (Garcia vd., 2026). PASK'ın eksikliği veya inhibisyonu, AMPK (AMP-aktive protein kinaz) aktivitesini etkileyerek hücrel enerji dengesini bozar ve bu durum tümör hücrelerinin metabolik stres altında apoptoza

gitmesine neden olabilir (Dongil vd., 2020; Hurtado-Carneiro vd., 2021). PASK'ın bu onkojenik sinyal ağındaki bir diğer kritik görevi ise GSK3 β yolağı üzerinden β -katenin stabilizasyonunu düzenlemesidir (Semache vd., 2013) (Şekil 13). PASK, Ser9 kalıntısı üzerinden β -katenin yıkımını engelleyerek nükleer translokasyonunu stabilize eder ve c-Myc ile Siklin D1 gibi proliferatif genlerin ifadesini tetikler.



Şekil 13. PASK aracılı onkojenik sinyal kaskadı ve β -katenin stabilizasyonu üzerinden tümör progresyonunun düzenlenmesi

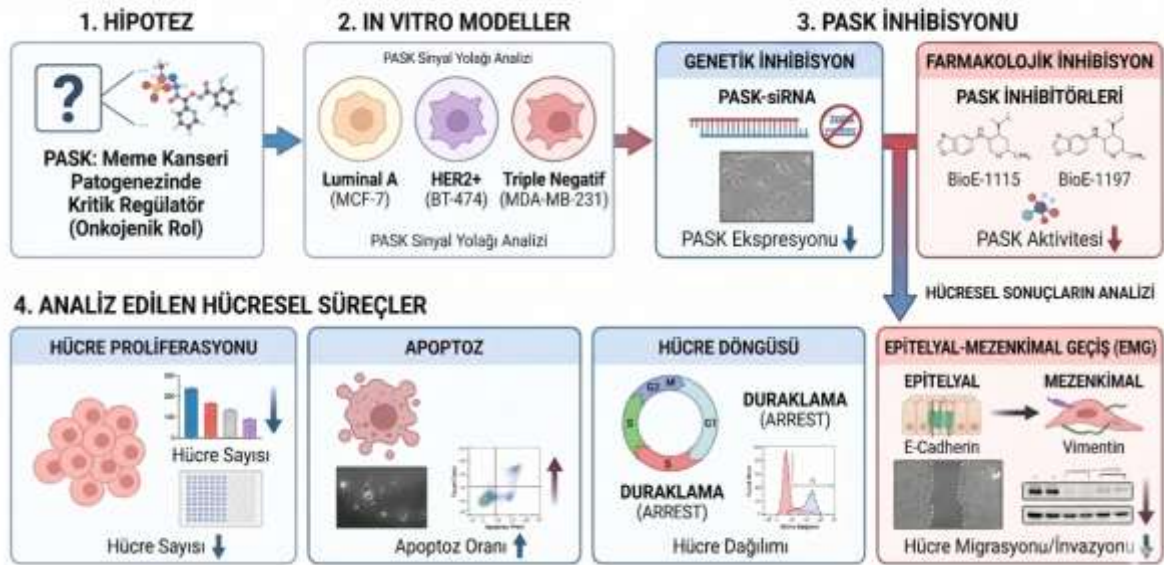
PASK'ın GSK3 β sinyal yolu üzerinden β -katenin stabilizasyonunu ve olası onkojenik etkilerini düzenleme mekanizması özetlenmektedir. PASK, GSK3 β 'yi Ser9 pozisyonunda fosforile ederek inhibe eder; bu durum yıkım kompleksini baskılayarak β -katenini stabilize eder. Stabilize β -katenin ise PDX-1 ve c-Myc gibi hedef genlerin ekspresyonunu artırarak proliferasyon, metabolik yeniden programlama, hücre döngüsü progresyonu ve kök hücre özelliklerini tetikler (Semache vd., 2013). Bu sinyal kaskadının, tümör progresyonu ve kanser hücre sağkalımında önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir. Şekil BioRender.com kullanılarak oluşturulmuştur.

Bu çalışmada, hücresel enerji metabolizması sensörü Per-Arnt-Sim Kinaz'ın meme kanseri patogenezindeki onkojenik rolleri araştırılmıştır. PASK'ın aşırı ekspresyonuyla temel sinyal yollarını indükleyerek proliferasyon, apoptoz direnci ve metastazı tetikleyen merkezi bir onkojenik sürücü olduğu hipotez edilmiştir. PASK'ın siRNA veya spesifik inhibitörlerle baskılanmasının; tümör canlılığı, koloni formasyonu ve metastatik kapasiteyi azaltacağı, böylece agresif meme kanseri alt tiplerinde hedefe yönelik yeni bir terapötik yaklaşım sunabileceği öngörülmektedir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Araştırma Tasarımı

Bu çalışma, meme kanseri patogenezinin moleküler mekanizmalarında rol oynayabileceği hipotez edilen Per-Arnt-Sim Kinaz (PASK) proteininin, farklı fenotipik ve genetik özelliklere sahip meme kanseri hücre hatları üzerindeki olası onkojenik rollerini ve aşağı akım sinyal yolağı interaksiyonlarını belirlemek amacıyla tasarlandı. Yürütülen deneysel araştırma kapsamında, PASK ekspresyonunun ve katalitik aktivitesinin genetik tabanlı siRNA (küçük müdahaleci RNA) ve farmakolojik inhibitör (BioE-1115) molekülleri vasıtasıyla baskılanmasının; hücresel proliferasyon kinetiği, programlanmış hücre ölümü (apoptoz) mekanizmaları, hücre döngüsü kontrol noktaları ve metastatik kaskad ile ilişkili olduğu düşünülen epitelyal-mezenkimal geçiş (EMG) programı üzerindeki potansiyel etkileri *in vitro* modeller nezdinde analiz edildi (Şekil 14).



Şekil 14. Araştırma Tasarımı ve Deneysel Akış Şeması

Çalışma kapsamında PASK enziminin meme kanseri patogenezindeki potansiyel onkojenik rolü farklı moleküler alt tiplerde araştırıldı. Deneysel model olarak luminal A (MCF-7), HER2 pozitif (BT-474) ve triple-negatif (MDA-MB-231) meme kanseri hücre hatları kullanıldı. PASK ekspresyonu ve aktivitesi, genetik (PASK-siRNA) ve farmakolojik (BioE-1115 ve BioE-1197 inhibitörleri) yöntemlerle baskılanmıştır. PASK inhibisyonunun ardından hücre proliferasyonu, apoptoz, hücre döngüsü dağılımı ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMG) süreçleri değerlendirilmiştir. Ayrıca hücre migrasyonu/invazyonu ile ilişkili moleküler belirteçlerdeki değişimler analiz edilmiştir. Şekil BioRender.com kullanılarak oluşturuldu.

3.2. Materyal

3.2.1. Cihazlar

Araştırma kapsamında gerçekleştirilen deneysel prosedürler, yüksek hassasiyetli ölçüm ve analiz cihazları kullanılarak yürütüldü (Şekil 15). Hücrelerin steril bir ortamda manipülasyonu için Euro Clone Safemate 1.2 model Laminar Flow kabini; fizyolojik koşullarda (37°C ve %5 CO₂) inkübasyonu için ise Euro Clone Safegrow serisi inkübatör sistemi kullanıldı. Hücre popülasyonlarının karakterizasyonu ve fenotiplendirilmesi amacıyla Beckman Coulter Cytoflex akış sitometrisi tercih edildi. Optik yoğunluk ölçümleri ve ELISA temelli analizler için Emax Plus spektrofotometre sistemi, protein bantlarının görüntülenmesi ve kemoluminesans tespiti için ise ChemiDoc-It2 görüntüleme ünitesi kullanıldı. Sıvı fazların ayrıştırılması aşamalarında Nüve santrifüj ünitesi, solüsyonların homojenizasyonu için Heidolph vorteks ve Daihan manyetik karıştırıcı kullanıldı. Sabit sıcaklık gerektiren inkübasyon aşamalarında Benchmark marka su banyosu ve dijital ısı blokları kullanıldı. Mikroskopik değerlendirmeler Olympos ışık mikroskobu ile gerçekleştirilirken, hassas tartım işlemleri A&D analitik terazi; pH ölçümleri ise Mettler Toledo dijital pH metre ile yapıldı. Deneysel süreçte ihtiyaç duyulan ultra saf su, Direct-Q 3UV su arıtma sisteminden sağlandı. Örneklerin düşük sıcaklıkta muhafazası ve soğuk zincirin korunması amacıyla International azot tankı ve Scotsman AF 80 buz makinesi kullanıldı. Karıştırma ve çalkalama işlemleri için Benchmark Scientific çalkalayıcı düzeneği tercih edildi. Deneylerin güvenilirliğini sağlamak ve kontaminasyon riskini minimize etmek adına tüm aşamalarda steril ve sertifikalı sarf malzemeler kullanıldı. Sıvı aktarımı ve pipetaj işlemleri için Biohit marka nükleaz içermeyen 10 µl ve 100 µl'lik pipet uçları ile CAPP marka 5 ml ve 10 ml hacimli serolojik pipetler kullanıldı. Numune hazırlığı ve depolanması için CAPP üretimi 1,5 ml'lik mikro santrifüj tüpleri ile 15 ml'lik konik tabanlı polipropilen tüplerden yararlanıldı. Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin yüzeye tutunması ve çoğaltılması için 75 cm² ve 25cm² hücre kültür kapları; analiz aşamalarında ise Costar marka 6 ve 96 kuyucuklu düz tabanlı plakalar kullanıldı. Hücre sayımları Marienfeld Neubauer lamı aracılığıyla yapıldı, hücrelerin dondurularak saklanması sürecinde Nalge Company kriyotüpleri kullanıldı. Western Blot analizlerinin transfer aşamasında Bio-Rad marka transfer tankı, Manie üretimi PVDF membranlar ve Bio-Rad marka yüksek emicilik kapasitesine sahip filtre kağıtları tercih edildi.



Şekil 15.Deneysel Süreçlerde Kullanılan Temel Cihazlar, Marka/Modeller ve Fonksiyonel Gruplandırılmalar

Çalışma kapsamında hücre kültürü, örnek hazırlama, görüntüleme ve moleküler analiz süreçlerinde kullanılan temel laboratuvar cihazları şematik olarak gösterildi. Hücre kültürü çalışmaları laminar akış kabini ve CO_2 inkübatörü sistemlerinde yürütüldü; hücre karakterizasyonu ve fenotiplendirme analizleri için Beckman Coulter CytoFLEX akış sitometrisi kullanıldı. Optik yoğunluk ölçümleri ve ELISA analizleri EMax Plus spektrofotometre sistemi ile gerçekleştirildi. Protein ekspresyon analizlerinde ChemoDoc-it2 görüntüleme sistemi ve Western blot düzeneklerinden yararlanıldı. Numune hazırlama süreçlerinde santrifüj ve vorteks cihazları kullanılırken, deneysel işlemlerde hassas tartım cihazları, ultra saf su sistemleri ve hücre sayım ekipmanlarından faydalanıldı. Şekil BioRender.com kullanılarak oluşturuldu.

3.2.2. Kimyasallar

Araştırma süresince kullanılan kimyasal bileşenler ve biyolojik reaktifler, analizlerin spesifikasyonlarına uygun saflık derecelerinde tedarik edildi. Hücrelerin devamlılığı ve deney gruplarının oluşturulması aşamalarında temel besiyeri olarak DMEM/F-12 (1:1 mix) (Biological Industries) kullanıldı. Besiyeri içeriği; Fetal Bovin Serum (FBS) (Sigma), L-glutamin (Lonza) ve Penisilin-Streptomisin (PAN Biotech) antibiyotik kombinasyonu ile desteklendi. Hücrelerin pasajlanması işlemlerinde Tripsin-EDTA (Bio Ind) solüsyonundan yararlanıldı. Transfeksiyon çalışmaları için Hiperfekt (Qiagen) reaktifi tercih edildi.

Western Blot ve elektroforez çalışmalarında protein ayrımı için Protogel (%30 Akrilamid, %0,8 Bis), Resolving Buffer ve Stacking Buffer (National Diagnostics) kullanıldı. Jel polimerizasyonu amacıyla Amonyum Persülfat (%98) ve Tetrametiletildiamin (TEMED) (Acros Organics) reaktiflerine başvuruldu. Ayrıca jel matriksinin hazırlanmasında Akrilamid (%98,5 ekstra saf) (Acros Organics) ve N,N-Metilenbisakrilamid (Sigma) kullanıldı. Proteinlerin moleküler ağırlıklarının belirlenmesinde Abcam marka Prism Ultra Protein Ladder (10-180 kDa ve 10-245 kDa) standartları kullanıldı. Blotlama sonrası bloklama aşamasında Skim Milk Powder (Sigma Aldrich) ve Bovin Serum Albümin (BSA) (Sigma) tercih edildi. Membran yıkama ve antikor inkübasyon süreçlerinde Tris Base (Fisher Scientific), Glisin (Carlo Erba), Trizma Hidroklorid (Sigma), Tween 20 (Sigma-Aldrich), Triton X-100 (Sigma) ve PBS (Zymed) içeren tampon çözeltiler kullanıldı.

Sinyal tespiti için Luminol (Sigma) ve p-Kumarik Asit (Sigma) reaktifleri; membranların tekrar kullanımı için ise Stripping Buffer (Thermo) kullanıldı. Deneylerde kullanılan ana çözücü ve fiksatifler arasında Etanol, Metanol, 2-Propanol (%99) (Sigma-Aldrich) ve Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Fisher Scientific) yer aldı. Hücre canlılığı ve apoptoz analizlerinde Propidyum İyodit (Sigma) boyası kullanıldı. Enzim inhibisyonu ve protein stabilizasyonu süreçlerinde Sodyum Florit (%99), Sodyum Ortovanadat (%99) (Acros Organics) ve 2-Merkaptoetanol (Acros Organics) kullanıldı. pH ayarlamaları ve solüsyon hazırlıklarında Sodyum Hidroksit (Sigma-Aldrich), Sodyum Klorit (Carlo Erba) ve yüksek saflıktaki diğer inorganik tuzlar tercih edildi.

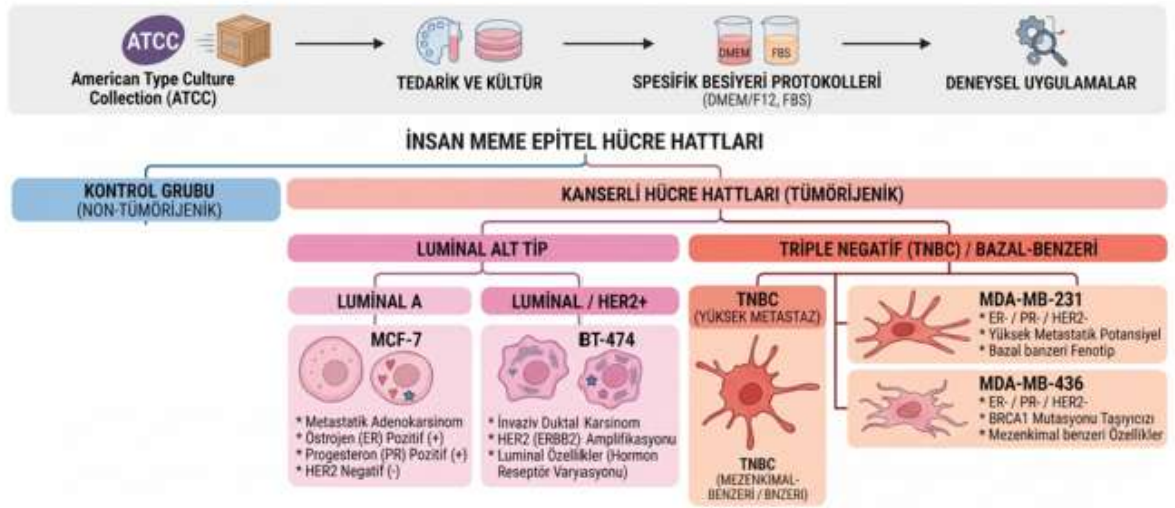
3.2.3.Hücreler

Çalışma kapsamında meme kanserinin farklı moleküler alt tiplerini ve progresyon aşamalarını temsil etmek amacıyla seçilen insan meme epitel hücre hatları kullanıldı (Şekil 16). Deneylerde kullanılan tüm hücre hatları American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) bünyesinden tedarik edildi.

MCF-7: Östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) pozitifliği ile karakterize olan, meme kanserinin klinik olarak en yaygın formlarından Lüminal A moleküler alt tipini in vitro koşullarda temsil eden metastatik fenotipe sahip bir adenokarsinom hücre modeli olarak seçildi. Bu hattın, hormon bağımlı tümör progresyonu ve endokrin tedavi mekanizmalarının araştırılmasında literatürde yaygın olarak tercih edildiği tercih edildi.

MDA-MB 231: Östrojen reseptörü (ER), progesteron reseptörü (PR) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) proteinlerini eksprese etmeyen, dolayısıyla klinikteki "Üçlü Negatif Meme Kanseri" (ÜNMK) tablosuna denk gelen bazal benzeri bir model olarak kullanıldı. Bu hattın, yüksek metastatik potansiyeli, invaziv karakteri ve konvansiyonel hedefe yönelik tedavilere dirençli yapısı nedeniyle agresif tümör fenotiplerinin incelenmesinde önemli bir zemin sunduğu düşünüldü.

BT-474: Hem hormonal (lüminal) belirteçleri barındıran hem de belirgin düzeyde HER2 (ŞERBB2\$) gen amplifikasyonuna ve aşırı ekspresyonuna sahip olan, invaziv duktal karsinom orijinli bir hücre hattı olarak seçildi. Bu modelin, özellikle lüminal B alt tipinin moleküler dinamiklerinin ve HER2 sinyal yolağı aktivasyonunun hücresel süreçler üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesinde uygun bir model teşkil edeceği öngörüldü.



Şekil 16. Meme Kanseri Hücre Hatlarının Moleküler Alt Tipleri ve Karakterizasyonu

Çalışmada, meme kanserinin moleküler heterojenitesini temsil eden farklı hücre hatları kullanıldı. Tümörjenik olmayan MCF-10A hücre hattı kontrol grubu olarak değerlendirilirken; lümal A alt tipini temsil eden MCF-7, HER2 pozitif/lümal özellik gösteren BT-474 ve triple-negatif meme kanseri (TNBC) alt tipini temsil eden MDA-MB-231 ile MDA-MB-436 hücre hatları deneysel analizlerde kullanıldı. Hücre hatları ATCC'den temin edildi ve ilgili hücre tiplerine özgü besiyeri protokolleri ile kültüre edildi. Şemada hücre hatlarının hormon reseptör durumları, tümörjenik özellikleri ve moleküler alt tip ilişkileri özetlendi. Şekil BioRender.com kullanılarak oluşturuldu.

MDA-MB-436: Üçlü Negatif Meme Kanseri (ÜNMK) moleküler profiline sahip olmasıyla karakterize edilen ve genomik yapısında BRCA1 mutasyonu barındıran, mezenkimal benzeri fenotipik özelliklere sahip bir model olarak seçildi. Bu hattın, kalıtsal meme kanseri patogenezinin, DNA hasar onarım mekanizmalarındaki defektlerin ve epitelyal-mezenkimal farklılaşma süreçlerinin in vitro düzeyde incelenmesinde önemli bir hücresel zemin sunacağı öngörüldü.

MCF-10A: Malign karakterdeki hücre hatlarından elde edilen deneysel bulguların karşılaştırılması ve karsinogenez süreçlerinin doğrulanması amacıyla kontrol grubu olarak seçilen, tümör oluşturma potansiyeli bulunmayan (non-tümörjenik) ve ölümsüzleştirilmiş normal meme epitel hücre modeli olarak belirlendi. Bu spesifik hattın, PASK ekspresyonunun veya inhibisyonunun normal meme dokusu üzerindeki sitotoksik ve fonksiyonel etkilerinin ayırt edilmesinde referans bir kontrol sistemi teşkil ettiği düşünüldü.

Hücrelerin kültüre edilmesi, pasajlanması ve stoklanması işlemleri, ATCC tarafından önerilen spesifik besiyeri protokollerine (DMEM/F12, %10 FBS ve gerekli takviyeler) göre gerçekleştirildi.

3.2.4. siRNAlar ve inhibitörler

ürütülen deneysel çalışma kapsamında, hedef genlerin transkripsiyon sonrası düzeyde geçici olarak susturulması (transient knockdown) amacıyla, diziye özgü küçük müdahaleci RNA (siRNA) moleküllerinin RNA interferans (RNAi) yoluyla üzerinden kullanıldığı bildirildi. Transfeksiyon

deneylerinde yararlanılan tüm siRNA oligonükleotid dizilimleri Qiagen (GeneGlobe, Hilden, Almanya) firmasından hazır tasarım olarak tedarik edildi.

Deneysel tasarımlarda, hedef lokus olarak belirlenen PASK geninin ekspresyonunu baskılamaya yönelik olarak iki farklı diziye özgü siRNA dubleksinin (PASK siRNA) eş zamanlı olarak kullanılması tercih edildi. Bu çiftli siRNA stratejisinin uygulanmasındaki temel amaç, olası diziye özgü off-target (hedef dışı) etkilerin elimine edilmesi ve elde edilen gen susturma verileri ile fenotipik sonuçların tutarlılığının moleküler düzeyde doğrulanmasıydı.

Hs_PASK_10 siRNA: PASK geninin mRNA transkriptini spesifik bölgelerden hedefleyerek degradasyona uğratan yüksek verimli siRNA molekülüdür.

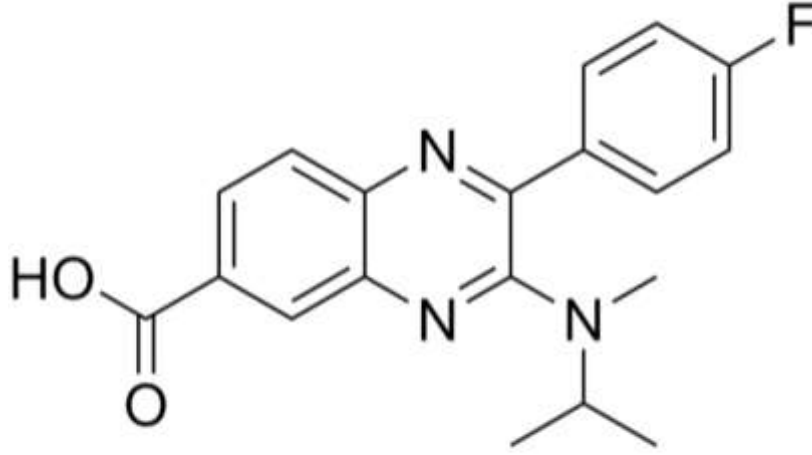
Hs_PASK_4 siRNA: PASK genine yönelik ikinci bir bağımsız dizi olarak, susturma işleminin spesifikliğini (hedef dışı etkilerin elenmesi) teyit etmek amacıyla kullanıldı.

Negatif Kontrol siRNA: Transfeksiyon prosedürünün ve kullanılan reaktiflerin hücre canlılığı ile gen ekspresyonu üzerindeki olası spesifik olmayan etkilerini gözlemlemek amacıyla kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Bu kontrol dizisi, bilinen hiçbir memeli gen dizisiyle homoloji göstermemektedir ve deneysel verilerin normalizasyonunda temel alındı.

siRNA komplekslerinin hücre içerisine taşınması için daha önce bölüm 2.3.1’de belirtilen Hiperfekt (Qiagen) transfeksiyon reaktifi kullanılmış; optimizasyon çalışmaları sonucunda en etkin susturma dozları belirlenerek deneylere devam edildi.

BioE-1115 | PASK İnhibitör

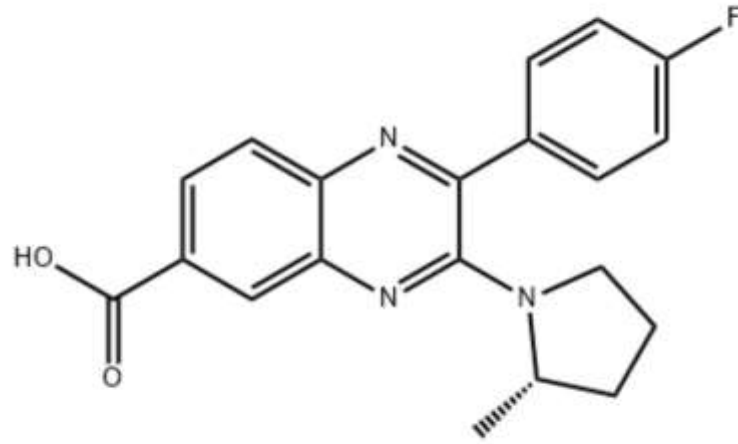
BioE-1115 inhibitörü, Glukoz homeostazı ve lipid metabolizmasının düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan PASK enzimini yüksek seçicilikle inhibe eder. Kimyasal yapısı, PASK’ın katalitik bölgesine bağlanarak enzimin substrat fosforilasyon yeteneğini bloke etmek üzere tasarlandı (Şekil 17).



Şekil 17. BioE-1115 (PASK İnhibitör) Moleküler Yapısı ve Fonksiyonel Grupları

Şekilde, PASK enziminin seçici inhibitörlerinden biri olan BioE-1115 bileşiğinin kimyasal yapısı gösterildi. Molekül, kinoksalin temelli bir çekirdek yapı içermekte olup karboksilik asit grubu ve florofenil halkası gibi çeşitli fonksiyonel gruplar taşıdı. Yapıda bulunan N-metilizopropilamin grubunun molekülün kimyasal özelliklerine katkı sağladığı düşünüldü. BioE-1115 inhibitörü, bu çalışmada PASK sinyal yollarının baskılanması amacıyla kullanıldı.

DC Chemicals portföyünde yer alan ve CAS 1268863-69-9 kayıt numarası ile tanımlanan bu molekül, PASK yolağında özgün bir küçük molekül inhibitörü olarak tanımlandı. Kimyasal yapısının (genellikle bir heterosiklik çekirdek etrafında optimize edilmiş fonksiyonel gruplar içerir), proteinin PAS domaini ile kinaz domaini arasındaki etkileşimi bozmaya veya doğrudan ATP bağlama bölgesini hedeflemeye yönelik olduğu belirlendi. BioE-1197 ise, özellikle enerji dengesi ve sirkadiyen ritim ile metabolizma arasındaki ilişkinin incelendiği in vitro modellerde tercih edildi (Şekil 18). Stabilite profilinin yüksek olduğu ve DMSO gibi organik çözücülerde iyi çözünürlük gösterdiği; bunun da ilgili molekülü yüksek verimli tarama (HTS) çalışmaları için uygun bir aday yaptığı saptandı (Çalışmada kullanılan her iki inhibitörün temel karakteristikleri Tablo 3'te karşılaştırmalı olarak gösterildi).



Şekil 18. BioE-1197 (PASK İnhibitörü) Moleküler Yapısı ve Kimyasal Karakterizasyonu

Şekilde, PAS domaini içeren serin/treonin kinaz (PASK) enziminin seçici inhibitörlerinden biri olan BioE-1197 bileşiğinin kimyasal yapısı gösterildi. Molekül yapısında yer alan kinoksalin çekirdeğinin PASK enziminin katalitik bölgesi ile etkileşimde rol oynadığı düşünüldü. Yapıda bulunan karboksilik asit grubu ve florofenil halkasının bileşiğin kimyasal özelliklerine katkı sağladı. Sağ alt bölümde gösterilen metil-pirolidin yapısının ise molekülün stereokimyasal konfigürasyonunu temsil ettiği belirlendi. Bu inhibitör, çalışmalarda PASK sinyal yollarının baskılanması amacıyla kullanıldı.

Tablo 3. BioE-1115 ve BioE-1197 İnhibitörlerinin Temel Karakteristikleri ve Kullanım Alanları

Özellik	BioE-1115	BioE-1197
Ana Hedef	PASK Enzimi	PASK / Metabolik Yollar
Tedarikçi Kaynağı	MedChemExpress	DC Chemicals
Kullanım Alanı	İnsülin direnci, Obezite	Enerji metabolizması, SREBP düzenlemesi

Tablo içerikleri üretici firma teknik dokümanları ve ilgili literatür verileri temel alınarak hazırlandı. MedChemExpress; DC Chemicals; Kikani vd., 2010; Hao vd, 2007).

3.2.5. Hücresel Canlılık, Apoptoz ve Metabolik Analiz Parametreleri

Hücresel yanıtların belirlenmesinde kullanılan tüm ticari kitler, üretici protokollerine uygun şekilde uygulandı. Hücre proliferasyonu ve canlılığı Promega marka CellTiter 96 AQueous One Solution marka kit ile ölçüldü. Apoptoz mekanizmaları; BD Biosciences marka FITC Annexin V Detection Kit I, BioLegend marka Kaspaz-3/7 Detection Kit ve Elabscience marka JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit kullanılarak akış sitometrisinde analiz edildi. Hücre döngüsü dağılımları Propidyum İyodür (PI) boyama yöntemiyle belirlendi. Toplam protein tayini Bio-Rad Protein Assay Kit ile yapıldı.

3.2.6. Antikorlar

Protein ifadesi analizi süreçlerinde, hedef proteinlerin tespiti ve sinyal iletim yollarının haritalandırılması amacıyla aşağıda detayları belirtilen ticari antikorlar kullanıldı (Deneylerde kullanılan antikorların detayları ve dilüsyon oranları Tablo 4'te verildi). Primer antikor etkileşimleri, membranların hedef protein spesifik antikorları ile +4°C'de gece boyu inkübe edilmesi esasına dayandı.

Tablo 4. Araştırma Kapsamında Kullanılan Spesifik Antikorların Marka, Katalog Numarası ve Fonksiyonel Gruplandırması

Antikor	Marka	Katalog No	Uygulama / Dilüsyon	Fonksiyon
PASK	Cell Signaling	ab230303	(1:1000)	Hedef Kinaz Tespiti
Siklin D1	ABCAM	ab16663	(1:2000)	Hücre Döngüsü (G1)
Siklin A	ABCAM	ab185619	(1:1000)	Hücre Döngüsü (S/G2)
p27 Kip1	ABCAM	ab32034	(1:5000)	Döngü İnhibitörü
p53	ABCAM	ab131442	(1:1000)	Tümör Baskılayıcı
Vimentin	ABCAM	ab92547	(1:2000)	Mezenkimal Belirteç
E-Kaderin	ABCAM	ab40772	(1:1000)	Epitelyal Belirteç
Beta-aktin	ABCAM	ab8226	(1:5000)	Yükleme Kontrolü
GAPDH	ABCAM	ab8245	(1:10000)	Yükleme Kontrolü
Keçi anti-Tavşan IgG-HRP	Santa Cruz	sc-2004	(1:5000)	İkincil Antikor
Tavşan anti-Fare IgG-HRP	Santa Cruz	sc-358914	(1:5000)	İkincil Antikor

Not. Antikor bilgileri üretici firmaların teknik veri sayfaları doğrultusunda düzenlendi.

3.3. Deneysel Yöntemler

3.3.1. Hücre Kültürü

Araştırma kapsamında kullanılan tüm hücre hatları, biyolojik materyallerin standardizasyonunu sağlamak amacıyla American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) firmasından tedarik edildi. Hücrelerin çözülmesi, pasajlanması ve dondurularak stoklanması gibi tüm manipülasyon süreçleri, sterilizasyon protokollerine uygun olarak Euro Clone Safemate 1.2 model laminar akımlı kabin içerisinde yürütüldü.

Hücreler, fizyolojik koşulları simüle eden 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ atmosferi sağlanan Euro Clone Safegrow serisi inkübatörlerde muhafaza edildi. Kültür ortamı olarak, %10 Fetal Bovin Serum (FBS) ve Penisilin-Streptomisin (100 U/mL) ile desteklenmiş DMEM/F-12 (1:1 mix) besiyeri tercih edildi. Deneysel verilerin tutarlılığını ve genetik stabiliteyi korumak amacıyla, tüm deneylerde hücrelerin pasaj sayısının 18'i aşmamasına titizlikle dikkat edildi.

3.3.2. Hücrelerin Çözülmesi

Deneysel çalışmalara başlamadan önce ilk aşama olarak, DMEM/F-12 besiyeri, Benchmark su banyosunda hücresel fizyolojiye uygun olan 37°C sıcaklığa ulaşana kadar bekletildi. Uzun süreli muhafaza amacıyla sıvı azot tankı içerisinde (-196°C) saklanan hücre stokları, tanktan çıkarılarak su banyosunda 37°C'de yavaş ve kontrollü bir şekilde çözündürüldü. Çözünme işlemi tamamlanan hücre süspansiyonu, steril koşullar altında 15 ml'lik CAPP falkon tüplerine aktarıldı. Dondurma medyumunun (DMSO) hücreler üzerindeki olası toksik etkilerini minimize etmek amacıyla, falkon tüplerindeki hücre süspansiyonuna 4 ml taze DMEM/F-12 besiyeri ilave edilerek seyreltme işlemi yapıldı. Seyreltilen hücreler, Nüve santrifüj cihazında 1500 rpm hızda 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası kriyoprotektan içeren süpernatant faz dikkatlice uzaklaştırıldı; elde edilen hücre peleti üzerine taze besiyeri eklenerek pipetaj aracılığıyla homojen bir süspansiyon haline getirildi. Hazırlanan hücreler, toplam hacim 6 ml olacak şekilde ayarlanarak 25 'lik Orange Scientific hücre kültür kaplarına ekildi.

3.3.3. Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin inkübasyonu sürecinde, Olympos faz kontrast ışık mikroskobu kullanılarak hücresel yoğunluk ve morfolojik bütünlük her gün düzenli olarak takip edildi. Hücreler kültür kabı yüzeyinin yaklaşık %70'ini kapladığında (logaritmik büyüme evresi), hücrelerin devamlılığını sağlamak amacıyla pasajlama işlemi gerçekleştirildi. Pasajlama protokolü kapsamında, öncelikle hücre yüzeyindeki eski besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı. Hücrelerin yüzeyden koparılması için kültür kaplarına 2 ml tripsin çözeltisi ilave edildi ve enzimin aktivasyonunu sağlamak üzere hücreler 37°C'deki inkübatörde ortalama 5 dakika bekletildi. Inkübasyon sonrası mikroskopik kontrol ile hücrelerin yüzeyden ayrıldığı teyit

edildikten sonra, tripsin enzimini nötralize etmek amacıyla 4 ml tam besiyeri eklendi. Hücre süspansiyonu 15 ml'lik CAPP falkon tüplere aktarıldı ve Nüve santrifüj cihazında 1500 rpm hızda 5 dakika süreyle çöktürüldü. Çöktürme sonrası süpernatant uzaklaştırıldı, pelet taze DMEM/F-12 besiyeri ile homojen hale getirildi. Hücreler, planlanan deneysel gruplara göre uygun yoğunluklarda 75 cm²'lik hücre kültür kaplarına veya ilgili analiz plakalarına aktararak kültüre edilmeye devam edildi.

3.3.4. Hücrelerin Sayılması

Deneysel grupların standardizasyonu ve kültür kaplarına eşit sayıda hücre ekimi yapılabilmesi amacıyla tüm aşamalarda hücre sayımı gerçekleştirildi. Sayım işlemi için hücre süspansiyonu, canlı ve ölü hücrelerin ayırt edilmesini sağlayan tripan mavisi boyası ile 1:1 oranında karıştırıldı. Hazırlanan bu karışımdan alınarak Neubauer lamına aktarıldı. Mikroskopik incelemede parlak ve düzenli morfolojiye sahip olan hücreler "canlı", boyayı içine almış koyu renkli ve şekilsiz hücreler ise "ölü" olarak kaydedildi. Hücre yoğunluğunun yüksek olduğu durumlarda örnekler uygun oranda seyreltilti. Toplam canlı hücre sayısı formül kullanılarak hesaplandı.

3.3.5. Genetik Manipülasyon: siRNA Aracılı Gen Susturma

PASK gen ifadesinin post-transkripsiyonel düzeyde geçici olarak susturulması (knockdown) amacıyla, Qiagen firmasından tedarik edilen ve hedef mRNA dizisine özgü olarak tasarlanmış iki farklı küçük müdahaleci RNA (PASK4 ve PASK10 siRNA) dubleksinden yararlanıldı. Deneysel süreçlerin standardizasyonu ve nükleik asit moleküllerinin hücresel membrana penetrasyonunun sağlanması adına uygulanan Transfeksiyon Protokolü şu şekilde gerçekleştirildi:

Kültür ortamında büyütülen meme kanseri ve normal meme epitel hücre hatları, 6-kuyucuklu plaklara homojen bir şekilde ekildi ve hücrelerin logaritmik büyüme fazını temsil eden %60-70 konfluent (yoğunluk) seviyesine ulaşmaları beklendi. İstenilen yoğunluğun sağlanmasının ardından, hedef spesifik siRNA nükleotid zincirleri, katyonik lipid tabanlı bir transfer ajanı olan HiPerFect transfeksiyon reaktifi ile muamele edilerek stabil lipozomal komplekslerin oluşumu tetiklendi.

Susturma (silencing) protokolünün moleküler kinetiğini optimize etmek ve hücre hatlarına özgü maksimum susturma verimliliğini elde edebilmek amacıyla, literatür verileriyle uyumlu olarak 50 nM ve 100 nM olmak üzere iki farklı nihai siRNA konsantrasyonu deneysel olarak test edildi. Transfeksiyon işleminin gerçekleştirilmesini takiben, hücresel homeostazın ve protein yıkım süreçlerinin tamamlanması adına hücreler 72 saat boyunca inkübe edildi ve bu sürenin sonunda fonksiyonel analizler için hasat edildi.

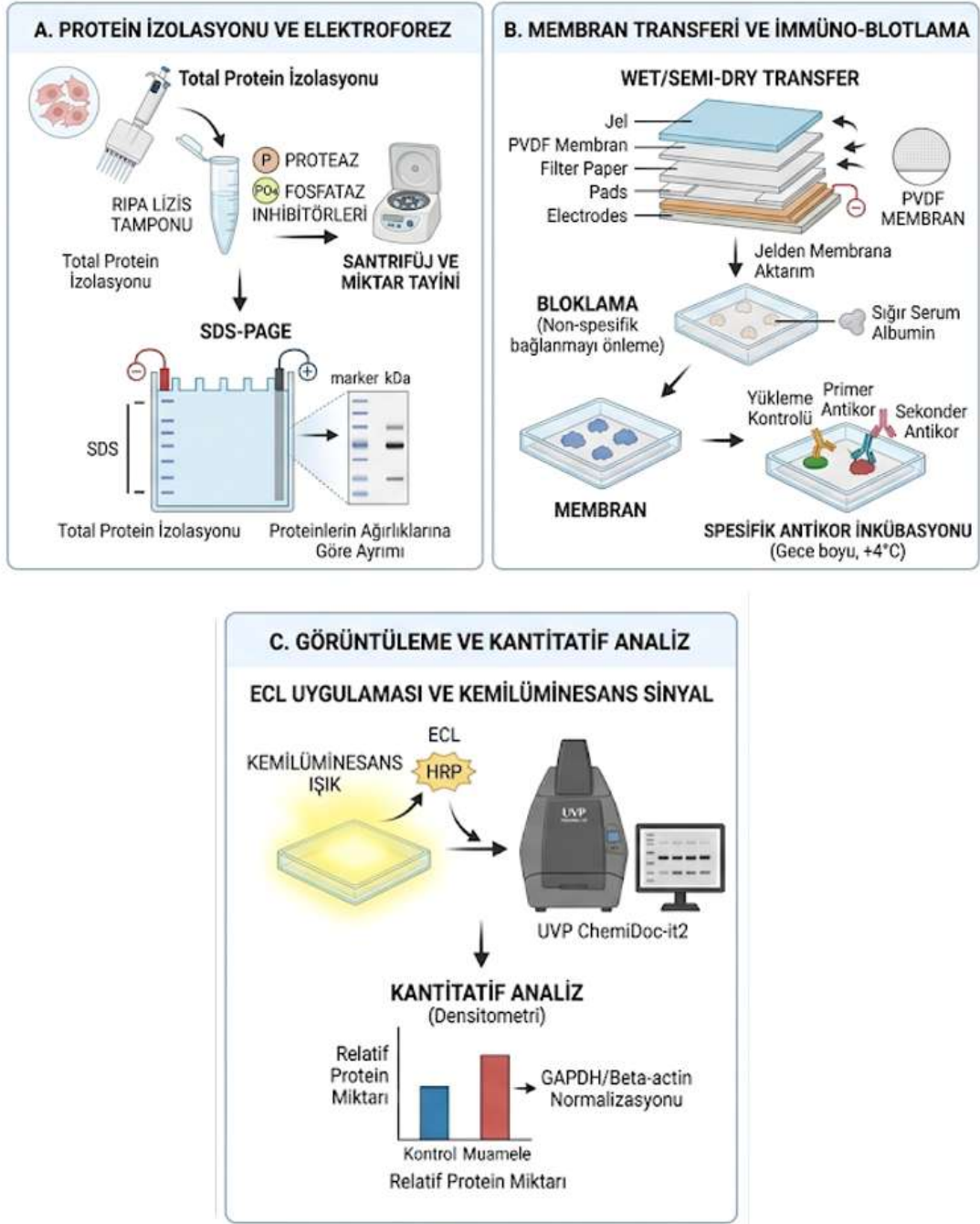
Hedeflenen PASK protein ekspresyonundaki azalma düzeyleri ve gen susturma etkinliği, Western Blotting tekniği kullanılarak protein seviyesinde kantitatif olarak doğrulandı. Ayrıca, transfeksiyon prosedürünün kendisinden, reaktif toksisitesinden veya hücre içi genel RNA interferans mekanizmasının uyarılmasından kaynaklanabilecek olası non-spesifik hücrel yanıtları ve artefaktları elimine etmek amacıyla, genomda bilinen herhangi bir gen dizisi ile homolojisi bulunmayan "Non-silencing/Scrambled" siRNA dizilimleri negatif kontrol grubu olarak eş zamanlı yürütüldü.

3.3.6. Protein Ekspresyon Analizi (Western Blotting)

Protein ekspresyon seviyelerinin ve post-translasyonel modifikasyonların (fosforilasyon gibi) kantitatif analizi için altın standart olan Western Blotting yöntemi, aşağıda belirtilen sistematik protokole uygun olarak gerçekleştirildi (Şekil 19) (Cardon, 2011).

Hücre içi sinyal yollarının ve hedef proteinlerin analizine başlamadan önce, hücrel bütünlüğü bozmak ve proteinleri çözünür hale getirmek amacıyla RIPA tamponu kullanıldı. Proteinlerin doğal yapısının korunması ve biyokimyasal analizlerin doğruluğu için lizis tamponuna taze olarak proteaz inhibitör kokteyli (enzimatik yıkımı önlemek için) ve fosfataz inhibitör kokteyli (protein üzerindeki fosfat gruplarını korumak için) ilave edildi.

Örnekler buz üzerinde inkübe edildikten sonra santrifüj edilerek total protein fraksiyonu elde edildi. İzole edilen proteinlerin miktar tayini yapıldıktan sonra, örnekler yükleme tamponu ile denatüre edildi ve SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi) sistemine yüklendi. Bu aşamada; SDS, proteinlere negatif yük kazandırarak onların sadece moleküler ağırlıklarına (kDa) göre ayrılmasını sağladı. Proteinler jel matrisi içerisinde elektriksel alan altında göç ettirildi. Jel üzerinde ayrışan proteinler, ileri immün kimyasal analizler için biyolojik olarak inert olan ve yüksek protein bağlama kapasitesine sahip PVDF (Poliviniliden Florür) membranlara transfer edildi. "Wet" veya "Semi-dry" transfer teknikleri kullanılarak proteinler jelden membran yüzeyine elektro-blotting yöntemiyle aktarıldı. Elektroforez ve transfer işlemlerinin ardından, membran üzerindeki boş bölgelere antikorların özgül olmayan şekilde bağlanmasını engellemek amacıyla, membranlar uygun bir bloklama solüsyonunda inkübe edildi.



Şekil 19. Western Blotting ile Protein Ekspresyon Analizi İş Akışı ve Hedef Antikorlar

Protein analiz süreci üç ana aşamada şematik olarak gösterildi. (A) Protein izolasyonu ve elektroforez aşamasında, RIPA lizis tamponu (proteaz ve fosfataz inhibitörleri ilaveli) kullanılarak elde edilen total proteinler SDS-PAGE yöntemi ile moleküler ağırlıklarına göre ayrıldı. (B) Membran transferi ve immüno blotlama aşamasında proteinler PVDF membrana aktarıldı, spesifik olmayan bağlanmalar bloklama solüsyonu ile engellendi ve membranlar hedef antikorlar (PASK, p-PASK, Cyclin D1, EMT belirteçleri vb.) ile gece boyunca inkübe edildi. (C) Görüntüleme ve kantitatif analiz aşamasında, ECL substratı kullanılarak elde edilen kemilüminesans sinyalleri UVP ChemiDoc-it2 görüntüleme sistemi ile kaydedildi ve bant yoğunlukları GAPDH veya Beta-aktin yüklemeye kontrollerine normalize edilerek densitometrik olarak analiz edildi. Şekil, BioRender.com kullanılarak oluşturuldu.

Bloklama işlemini takiben, çalışmanın temelini oluşturan hedef proteinlerin tespiti için spesifik primer antikolar ile +4°C'de gece boyu inkübasyon gerçekleştirildi. Bu kapsamda, hücresel sinyal iletimi ve enzim kinetiğinin incelenmesi amacıyla PASK antikorı kullanıldı. Hücre çoğalması ve döngüsünün kontrol mekanizmalarını değerlendirmek için hücre döngüsü regülatörlerinden Cyclin D1, Cyclin A, p27 ve p53 proteinleri hedeflendi. Hücrelerin hareketliliği ve fenotipik değişimlerini gözlemlemek adına ise Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMG) markırı olan vimentin antikorı ile çalışıldı.

Deneyin her aşamasının doğruluğunu teyit etmek, örnekler arası yükleme farklılıklarını ortadan kaldırmak ve sonuçları standardize etmek amacıyla, değişmez kabul edilen housekeeping proteinlerinden GAPDH veya Beta-aktin yükleme kontrolleri olarak kullanıldı. Primer antikor etkileşiminden sonra, hedef protein bantlarını görünür kılmak amacıyla HRP konjugeli sekonder antikolar uygulandı. Protein bantlarının görünür kılınması için ECL substratı membran üzerine tatbik edildi ve oluşan kemilüminesans sinyaller UVP ChemiDoc-it2 dijital görüntüleme sisteminde yüksek çözünürlükte kaydedildi. Elde edilen dijital görüntüler, densitometrik analiz programları aracılığıyla normalize edilerek protein miktarlarındaki değişimler istatistiksel olarak anlaşıldı.

3.3.7. Hücre Canlılığı ve Proliferasyon Analizleri

PASK enziminin farmakolojik olarak inhibe edilmesinin hücresel düzeydeki etkilerini belirlemek amacıyla, hücre canlılığı ve çoğalma kapasitesi üzerindeki sitotoksik etkileri CCK-8 (Cell Counting Kit-8) kolorimetrik yöntemi kullanılarak kapsamlı bir şekilde analiz edildi. Hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan CCK-8 analizi, hücrelerdeki dehidrogenaz aktivitelerine dayanan ve hassas sonuçlar veren bir metot olarak seçildi. Deney protokolü şu adımları içerdi:

Hücreler, logaritmik büyüme fazındayken 96 kuyucuklu plakalara uygun yoğunlukta ekildi ve stabilizasyon için inkübe edildi. Stabilizasyonun ardından PASK inhibitörü, belirlenen konsantrasyon aralıklarında (doza bağlı) ve farklı zaman dilimlerinde (24, 48 ve 72 saat gibi zamana bağlı) hücrelere uygulandı. Belirlenen inkübasyon sürelerinin sonunda, her bir kuyucuğa CCK-8 çözümü ilave edildi. Kit içerisinde bulunan WST-8 [2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülföfenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu], canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzimleri tarafından indirgenerek turuncu renkli ve suda çözünebilir bir formazan boyasına dönüştürüldü.

Oluşan formazan boyasının yoğunluğu, kuyucuktaki canlı hücre sayısı ile doğrudan orantılı olarak değerlendirildi. Renk değişimi, mikropilaka okuyucu sisteminde 450 nm dalga boyunda ölçüldü. Kontrol grubu (uygulama yapılmayan hücreler) %100 canlı kabul edilerek, farklı doz ve sürelerdeki absorbans değerleri üzerinden hücrelerin yüzde canlılık oranları hesaplandı. Elde edilen veriler ışığında, PASK inhibisyonunun hücre çoğalmasını hangi konsantrasyonda ve hangi sürede baskıladığını gösteren

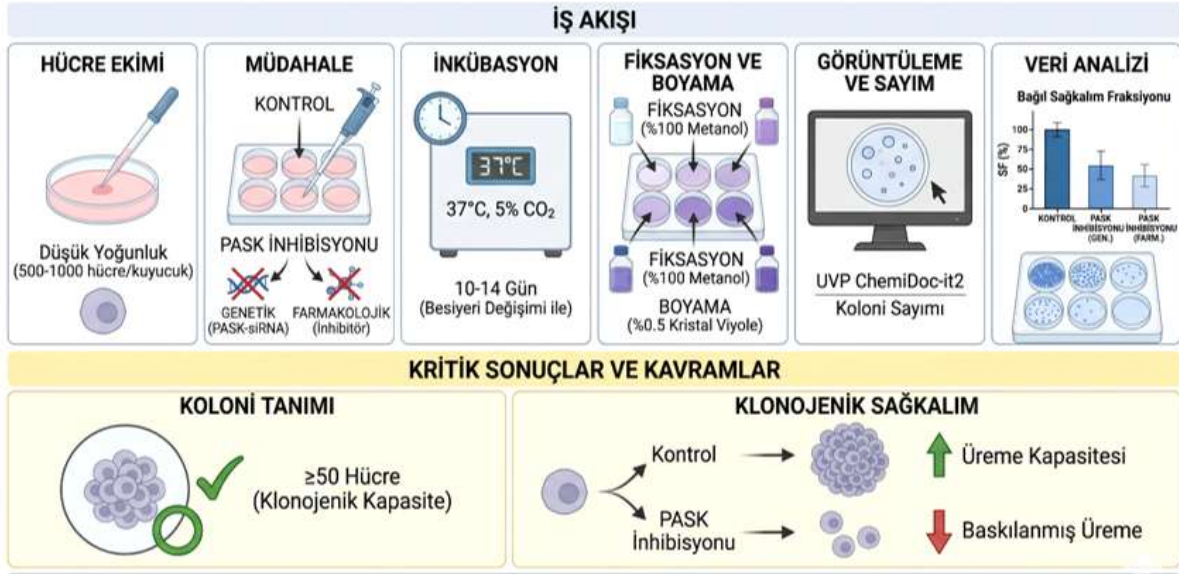
zamana ve doza bağılı proliferasyon eğrileri oluşturuldu. Bu analizler sonucunda, PASK enziminin hücre sağkalımı üzerindeki kritik rolü belirlenmiş ve sonraki deneylerde kullanılacak olan "yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu IC₅₀ değerleri saptandı.

3.3.8. Koloni Oluşturma Kabiliyeti Deneyi

Koloni oluşturma deneyi (klonojenik analiz), tek bir hücrenin sınırsız bir şekilde bölünerek en az 50 hücreden oluşan bir koloni meydana getirme yeteneğini, yani "üreme kapasitesini" test eden in vitro bir hücre sağkalım analizi olarak kullanıldı. PASK inhibisyonunun meme kanseri hücrelerinin uzun vadeli proliferasyonu ve bağımsız sağkalımı üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla ilgili protokol izlendi (Şekil 20). Büyüme fazındaki hücreler, birbirleriyle temas etmeyecek ve bağımsız koloniler oluşturabilecek kadar düşük bir yoğunlukta (kuyucuk başına 500-1000 hücre) 6 kuyucuklu plakalara ekildi.

Hücrelerin yüzeye tutunması için geçen 24 saatlik sürenin ardından, belirlenen dozlarda PASK inhibitörleri uygulanmış veya siRNA ile genetik susturma işlemi gerçekleştirildi. Kontrol grubu ise herhangi bir ekleme olmadan normal büyüme koşullarında bırakıldı. Plakalar, hücrelerin en az 5-6 nesil bölünerek makroskopik olarak görülebilir koloniler (genellikle >50 hücre) oluşturmaya izin verecek şekilde 10-14 gün boyunca 37 ve %5 CO₂ içeren inkübatörde muhafaza edildi. Bu süre zarfında besiyeri, inhibitör etkinliğini korumak adına belirli aralıklarla tazelendi. İnkübasyon süresi sonunda besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandıktan sonra %100 metanol kullanılarak oda sıcaklığında 15-20 dakika süreyle sabitlendi. Sabitlenen kolonileri görünür kılmak için %0,5'lik kristal viyole çözeltisi ile boyama yapıldı. Boyama sonrası plakalar distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı.

Uygulama yapılan gruptaki kolonilerin kontrol grubuna oranlanmasıyla elde edilen değer, PASK inhibisyonunun hücrelerin koloni oluşturma potansiyelini ne ölçüde baskıladığını kantitatif olarak ortaya koydu. Bu analiz, PASK enziminin meme kanseri hücrelerinde sadece kısa vadeli metabolik aktivite için değil, aynı zamanda hücrelerin tümörijenik potansiyeli ve kendi kendini yenileme kabiliyeti için de gerekliliğini kanıtlamak amacıyla kullanıldı.



Şekil 20.PASK İnhibisyonunun Koloni Oluşturma Kabiliyeti Üzerindeki Etkilerinin Analizi

Meme kanseri hücrelerinde klonojenik sağkalım analizi iş akışı ve değerlendirme kriterleri şematik olarak gösterilmektedir. Düşük yoğunlukta ekilen hücrelere genetik (PASK-siRNA) veya farmakolojik (PASK inhibitörü) müdahaleler uygulanmış, ardından hücreler 37°C ve %5 CO₂ koşullarında 10–14 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda oluşan koloniler metanol ile fikse edilmiş ve kristal viyole ile boyanmıştır. Koloni sayımları görüntüleme sistemleri kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sağkalım fraksiyonu hesaplanmıştır. Klonojenik analizde ≥50 hücre içeren yapılar koloni olarak değerlendirilmiştir. PASK inhibisyonu sonrasında koloni oluşum kapasitesi ve klonojenik sağkalımda gözlenen azalma, PASK'ın tümör hücrelerinin uzun dönemli proliferasyon ve kendini yenileme kapasitesindeki önemli rolünü desteklemektedir. Şekil BioRender.com kullanılarak oluşturulmuştur.

3.3.9. Anneksin/PI Flow Sitometri

PASK inhibisyonunun hücre üzerindeki etkilerini tek hücre düzeyinde ve yüksek hassasiyetle belirlemek amacıyla akış sitometrik analizler gerçekleştirildi. Bu kapsamda, programlı hücre ölümünün (apoptoz) tespiti için Anneksin V-FITC/Propidyum İyodür (PI) çift boyama yöntemi tercih edildi. Bu yöntemde, apoptozun erken evrelerinde hücre membranının iç kısmından dış yüzeyine yer değiştiren fosfatidilserin (PS) molekülleri, floresan işaretli Annexin V proteini tarafından spesifik olarak bağlanarak erken apoptotik popülasyonun belirlenmesini sağladı. Eş zamanlı olarak kullanılan ve hücre membran bütünlüğü bozulmuş olan geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin çekirdek asitlerine bağlanan PI boyası sayesinde; canlı, erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonları floresan ışıma yoğunluklarına göre birbirinden ayırt edilerek analiz edildi. Hücre döngüsü dinamiklerinin analizi sürecinde ise hücrelerin DNA içeriği üzerinden replikasyon evreleri belirlendi. Bu amaçla, logaritmik fazdaki hücreler hasat edildikten sonra hücresel yapının korunması ve boyanın çekirdeğe penetrasyonu için soğuk etanol içerisinde fiksasyon işlemine tabi tutuldu. Fikse edilen hücreler, DNA'ya entegre olan floresan bir boya olan PI ile inkübe edilerek her bir hücrenin sahip olduğu DNA miktarı ölçüldü. Elde edilen floresan sinyalleri aracılığıyla hücrelerin diploid (2n) veya tetraploid (4n) durumları analiz edilerek, popülasyonun G0/G1, S ve G2/M fazlarındaki dağılım oranları saptandı. Bu analiz, PASK

enziminin eksikliğinde veya inhibisyonunda hücre döngüsünün hangi spesifik noktada durakladığını ve proliferasyonun moleküler düzeyde nasıl baskılandığını net bir şekilde ortaya koydu. Deneyler en az üç bağımsız biyolojik tekrar halinde gerçekleştirildi. İstatistiksel değerlendirmeler GraphPad Prism yazılımı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki varyasyonun anlamlılığı için Student's t-test (iki grup) veya Tek Yönlü ANOVA (çoklu gruplar) testleri uygulandı. Tüm analizlerde $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.3.10. Kaspaz 3/7 Akış Sitometrisi

PASK inhibisyonunun hücre ölümü üzerindeki etkilerini belirlemek ve apoptozun efektör aşamasını doğrulamak amacıyla, Kaspaz 3/7 aktivite analizi akış sitometrisi yöntemiyle gerçekleştirildi. Apoptoz yolağının geri dönüşümsüz noktası olarak kabul edilen kaspaz aktivasyonu, hücresel yıkımın yürütülmesinde ve biyokimyasal olarak programlı hücre ölümünün tamamlanmasında merkezi bir rol oynadı. Bu analiz, özellikle PASK enziminin eksikliğinde hücrelerin hayatta kalma sinyallerinden yoksun kalarak doğrudan intihar yoluna girip girmediğinin belirlenmesi açısından kritik öneme sahip olarak değerlendirildi. Deneyin uygulama aşamasında, hücre içerisine kolayca penetre olabilen ve sadece aktive olmuş Kaspaz-3 veya Kaspaz-7 enzimleri tarafından tanınan spesifik bir amino asit dizisine (DEVD) bağlı floresan bir substrat kullanıldı. Belirlenen dozlarda PASK inhibitörü veya siRNA ile tedavi edilen meme kanseri hücreleri, apoptozun indüklenmesi için gerekli olan inkübasyon süresi boyunca muhafaza edildi.

Sağlıklı hücrelerde floresan olmayan formda kalan bu substrat, apoptoza giren hücrelerde aktive olan efektör kaspazlar tarafından kesildi ve bu işlem sonucunda serbest kalan boya floresan ışımaya yaparak hücreyi işaretledi. Elde edilen verilerin kantitatif değerlendirilmesi sürecinde, akış sitometrisi aracılığıyla binlerce hücreden yayılan floresan sinyalleri tek tek kaydedildi ve kaspaz pozitif hücre yüzdeleri hesaplandı. PASK inhibisyonu sonrasında kontrol grubuna kıyasla Kaspaz-3/7 aktivitesinde gözlenen artış, enzimin susturulmasının hücreyi klasik kaspaz bağımlı apoptotik yolağa sürüklediğini net bir şekilde ortaya koydu. Bu sonuçlar, daha önce yapılan Annexin V bulgularını biyokimyasal düzeyde destekleyerek, PASK enziminin meme kanseri hücrelerinde sağkalımı koruyucu ve apoptozu engelleyici bir fonksiyon üstlendiğini moleküler temellerle ortaya koydu.

3.3.11. JC-1 Akış Sitometrisi

PASK inhibisyonunun indüklediği apoptozun mitokondriyal yolakla ilişkisini ve hücresel enerji metabolizmasındaki erken değişimleri belirlemek amacıyla, akış sitometrisi eşliğinde JC-1 (5,5',6,6'-tetrakloro-1,1',3,3'-tetraetilsenzimidazolilkarbosiyanin iyodür) boyaması gerçekleştirildi. JC-1, mitokondriyal membran potansiyeline duyarlı katyonik bir boya olup, hücrenin apoptotik sürece girip

girmediğini gösteren hassas bir belirteç olarak değerlendirildi. Normal fizyolojik koşullarda ve yüksek membran potansiyeline sahip sağlıklı hücrelerde, JC-1 molekülleri mitokondri matrisinde konsantre olarak J-agregatları oluşturdu. Bu agregatlar, yaklaşık 590 nm dalga boyunda yoğun kırmızı floresan ışımaya yaptı. Ancak, PASK inhibisyonu gibi pro-apoptotik uyarılar sonucunda mitokondriyal membran bütünlüğü bozulduğunda ve membran potansiyeli düştüğünde, boya agregat halinden ayrılıp sitozole sızarak monomerik forma düştü. JC-1 monomerleri ise yaklaşık 527 nm dalga boyunda yeşil floresan ışımaya yaydı.

Deney protokolü kapsamında, PASK inhibitörü veya siRNA uygulanan meme kanseri hücreleri JC-1 çalışma solüsyonu ile inkübe edildikten sonra akış sitometrisinde analiz edildi. Elde edilen verilerde, kırmızı floresan sinyalindeki azalma ve yeşil floresan sinyalindeki artış (FL2/FL1 oranı değişimi), mitokondriyal membran potansiyelinin kaybolduğunu ve içsel apoptoz yolağının aktive olduğunu doğruladı. Bu analiz, PASK enziminin sadece hücre döngüsünü değil, aynı zamanda mitokondriyal kararlılığı koruyarak hücreyi programlı ölüme karşı dirençli tuttuğuna işaret etti.

3.4. İstatistiksel Analiz

Elde edilen tüm deneysel veriler GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) programı kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar en az üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ standart sapma (SD) değerleri olarak ifade edilmiştir.

Gruplar arası istatistiksel farklılıkların değerlendirilmesinde iki grup karşılaştırmaları için bağımsız örneklem Student's t-testi, ikiden fazla grubun karşılaştırılmasında ise tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ve ardından Tukey post-hoc çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

Hücre canlılığı, koloni oluşumu, apoptotik hücre oranı, kaspaz aktivitesi, hücre döngüsü dağılımı ve protein ekspresyon düzeylerine ait grafiksel analizler GraphPad Prism programı kullanılarak oluşturulmuştur.

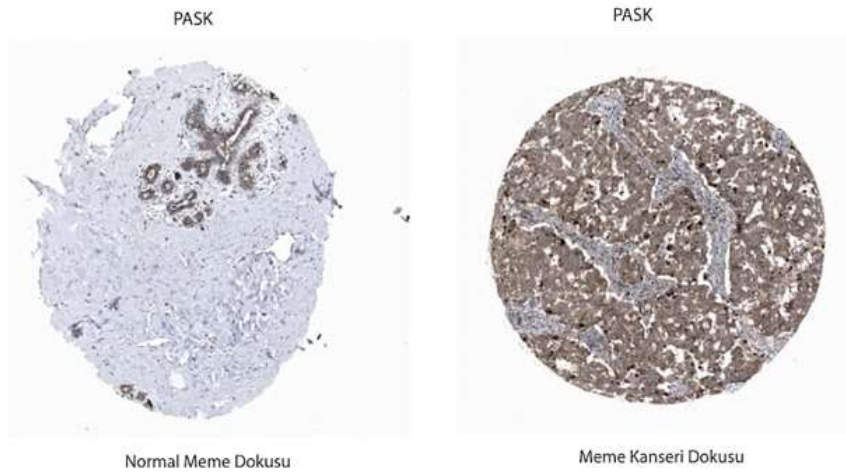
3.5. Etik Onay

Bu çalışma kapsamında ticari olarak temin edilen ve valide edilmiş hücre hatları kullanıldı. Çalışma, *in vitro* (hücre kültürü) düzeyinde yürütüldüğü ve insan/hayvan denek kullanımı içermediği için etik kurul onayından muaftır.

4. BULGULAR

4.1. Meme Kanseri Patogenezinde PASK Gen ve Protein İfadesinin Değerlendirilmesi

PASK'ın kanser gelişimindeki potansiyel rolü, hücrel sinyal iletimi ve metabolik regülasyondaki fonksiyonları nedeniyle son yıllarda giderek daha belirgin hale geldi. Bu çalışmada, PASK gen ve protein ekspresyon profilini meme kanseri patogenezi bağlamında moleküler düzeyde değerlendirmek amacıyla, kapsamlı veri tabanlarından elde edilen biyoinformatik analizler ve doku örnekleri karşılaştırmalı olarak incelendi. İnsan Protein Atlas veri tabanından elde edilen doku mikrodizilim görüntüleri üzerinden yapılan incelemelerde, PASK proteininin meme kanseri dokularında normal epitel dokusuna kıyasla belirgin şekilde yukarı regüle edildiği ve tümör dokusunda yoğun bir birikim sergilediği gösterildi (Şekil 21).

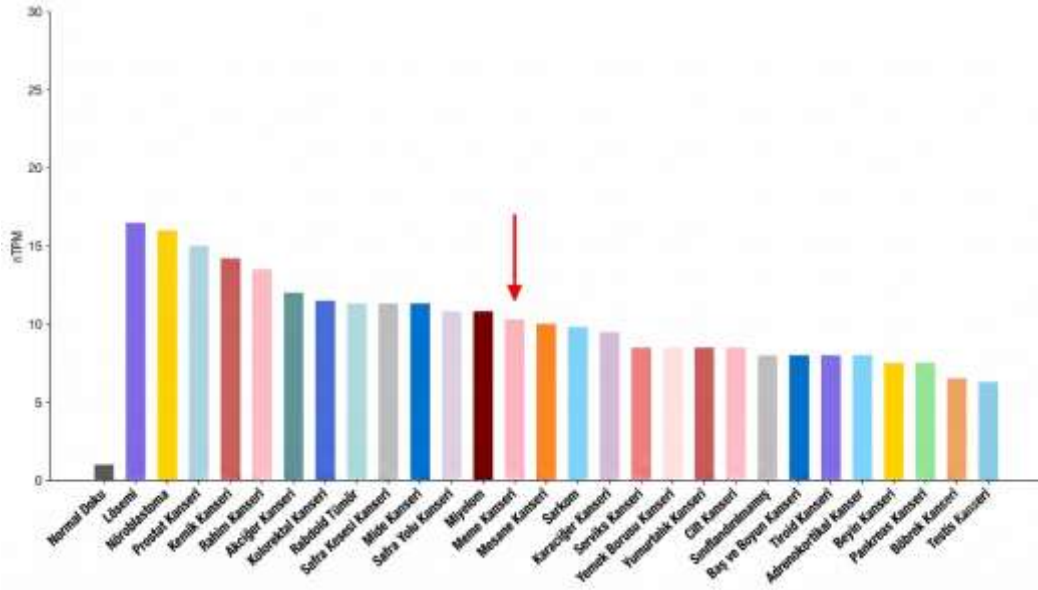


Şekil 21. PASK Ekspresyonunun Histolojik Analizi

PASK gen/protein ekspresyonunun meme kanserinde anlamlı şekilde artmış ve hem biyoinformatik hem de histolojik düzeyde göstermektedir. Panelde yer alan doku mikrodizilim (TMA) görüntüleri ile normal meme dokusuna kıyasla tümör dokusunda

PASK protein ekspresyonunun belirgin şekilde arttığı ve yukarı regüle olduğu doğrulanmıştır. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, PASK'ın meme kanseri patogenezi önemli bir rol oynayabileceği ve potansiyel bir biyobelirteç veya terapötik hedef olarak değerlendirilebileceği desteklenmiştir. İmmünohistokimyasal görüntüler Human Protein Atlas (HPA) veri tabanından alınmıştır (www.proteinatlas.org) Erişim Tarihi:10.05.2026.

PASK gen ekspresyonunun geniş bir spektrumda değerlendirildiği HPA temelli analizlerde ise, bu artışın birçok kanser türünde ortak bir patern sergilediği ve meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli tümörlerde kanser dışı dokulara oranla daha yüksek transkript seviyelerine sahip olduğu saptandı (Şekil 22).

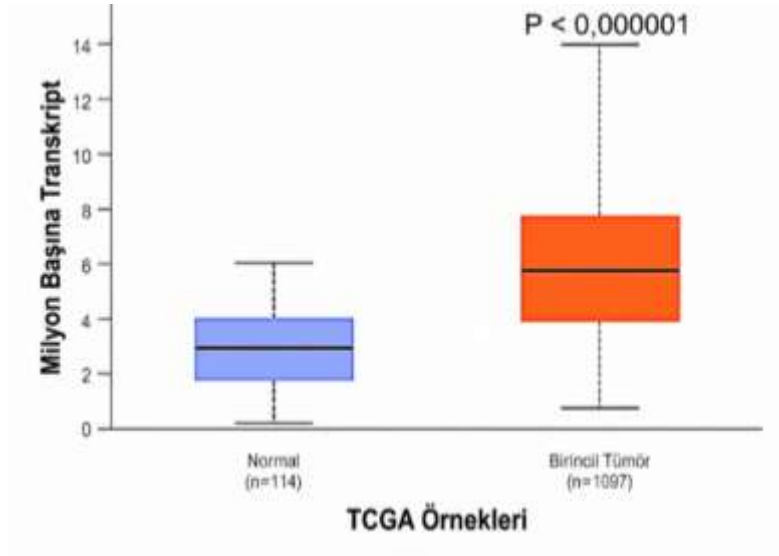


Şekil 22. Farklı kanser türlerinde PASK ekspresyonunun karşılaştırmalı analizi

PASK gen ekspresyon düzeylerinin farklı kanser türleri ve kanser dışı dokular arasındaki karşılaştırmalı dağılımı gösterilmiştir. Sonuçlarla, PASK ekspresyonunun birçok kanser tipinde belirgin şekilde arttığı ve özellikle meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli tümörlerde yukarı regüle olduğu ortaya konmuştur. Kanser hücre hatlarında gözlenen bu artışın, kanseröz olmayan dokulara kıyasla daha yüksek transkript seviyeleri ile karakterize olduğu belirlenmiştir. Bu yaygın ekspresyon artışı ile PASK'ın tümör biyolojisinde genel bir rol oynayabileceği ve farklı kanser türlerinde potansiyel bir biyobelirteç ya da terapötik hedef olarak değerlendirilebileceği desteklenmiştir. Görseller Human Protein Atlas veri tabanından elde edilmiştir (www.proteinatlas.org) Erişim Tarihi:10.05.2026.

Son olarak, The Cancer Genome Atlas (TCGA) veri tabanından elde edilen Meme İnvaziv Karsinomu örneklerinde yapılan klinik karşılaştırmalar, PASK geninin normal meme dokusuna (n=114) kıyasla primer tümörlerde (n=1097) istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde aşırı ifade edildiğini doğruladı (Şekil 23; $p < 0,000001$).

Veri tabanları üzerinden gerçekleştirilen bu analizler, PASK ekspresyonunun hem gen hem de protein düzeyinde evrensel bir artış sergilediğini ortaya koydu. Özellikle farklı kohortlar ve doku modelleri üzerinde gözlenen bu tutarlı artış ile PASK'ın meme kanseri progresyonunda önemli bir role sahip olabileceği desteklendi. Bu bulgularla, PASK'ın meme kanseri için hem prognostik bir biyobelirteç olarak değerlendirilebileceği hem de gelecekteki terapötik çalışmalar için stratejik bir hedef olma potansiyeli taşıdığı gösterildi.



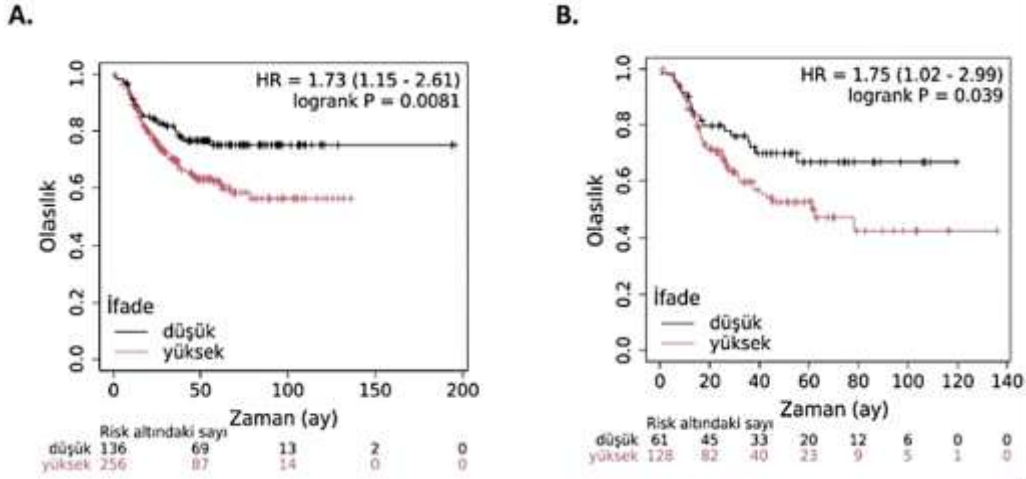
Şekil 23. Meme kanseri hastalarında PASK gen ekspresyonunun artışı (TCGA analizi)

TCGA veri tabanından elde edilen BRCA (Meme İnvaziv Karsinomu) örneklerinde normal meme dokusu (n=114) ve primer meme tümörü (n=1097) grupları arasında PASK gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. Primer tümör örneklerinde PASK ekspresyonunun normal meme dokularına kıyasla anlamlı derecede arttığı saptanmıştır ($p < 0,000001$). Bulgularla, PASK'ın meme kanseri gelişimi ve progresyonunda rol oynayabileceği ve potansiyel bir prognostik biyobelirteç olarak değerlendirilebileceği desteklenmiştir (TCGA-BRCA veri seti ;ualcan.path.uab.edu, Erişim Tarihi:06.05.2026).

4.2. PASK Ekspresyonunun Klinik Sağkalım, Nüks ve Tedavi Yanıtı Üzerindeki Etkileri

Meme kanseri patogenezinde moleküler düzeyde saptanan PASK aşırı ifadesinin, hastaların klinik seyri üzerindeki prognostik yansımalarını anlamak, bu kinazın klinik değerini belirlemek adına kritiktir. Bu bağlamda, Kaplan-Meier sağkalım analizleri ve kemoterapi yanıt verileri kullanılarak, PASK düzeyinin hasta sağkalımı, nüks riski ve tedaviye direnç süreçleri üzerindeki etkisi klinik veri setleri üzerinden değerlendirildi.

Klinik veri setlerinden elde edilen Kaplan–Meier sağkalım eğrileri ile yüksek PASK ifadesinin meme kanseri hastalarında zayıf klinik prognoz ve düşük sağkalım oranları ile doğrudan ilişkili olduğu gösterildi. Özellikle hedefe yönelik tedavilere dirençli olan Triple-Negatif Meme Kanseri (TNBC/ÜNМК) kohortunda, yüksek PASK seviyeleri nüksüz sağkalım (RFS) süresini anlamlı derecede kısaltmaktadır. Analiz sonuçlarına göre, yüksek PASK ekspresyonu nüks riskini HR=1,73 kat ($p=0,0081$) artırırken (Şekil 24A), lenf nodu pozitif olan agresif alt tiplerde bu risk artışı 1,75 kat (HR=1,75; $p=0,039$) olarak belirlendi (Şekil 24B).

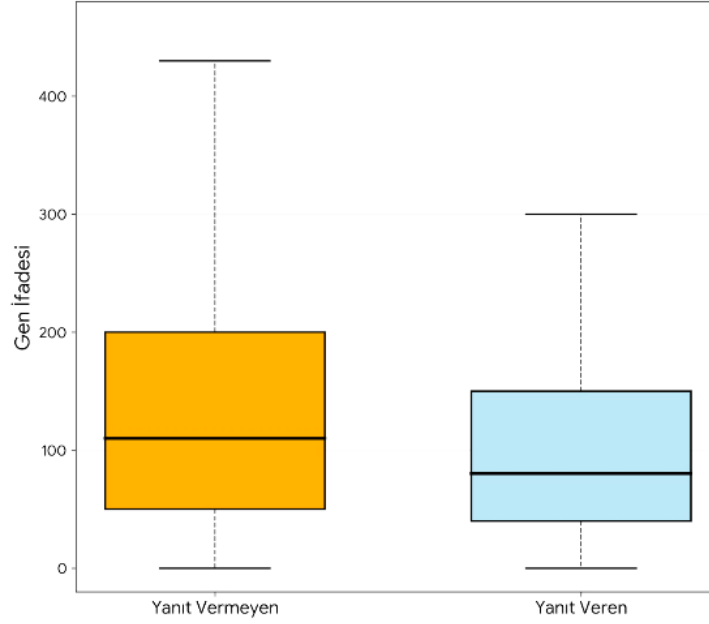


Şekil 24. Yüksek PASK ekspresyonunun meme kanserinde prognoz ve sağkalım üzerindeki etkisi

(A) Hormon reseptörü negatif (ÜNМК/triple-negatif) meme kanseri hasta kohortunda gerçekleştirilen Kaplan-Meier sağkalım analizi. Yüksek PASK ekspresyonuna sahip hastalarda nüksüz sağkalım olasılığının belirgin şekilde azaldığı ve artmış nüks riski ile ilişkili olduğu gösterilmektedir (HR = 1,73; p = 0,0081). (B) Lenf nodu pozitif ÜNМК hasta kohortunda gerçekleştirilen Kaplan-Meier sağkalım analizi. Yüksek PASK ekspresyonunun daha düşük nüksüz sağkalım olasılığı ile ilişkili olduğu gözlenmiştir (HR = 1,75; p = 0,039). Bulgular, yüksek PASK ekspresyonunun agresif tümör fenotipi, artmış nüks riski ve kötü klinik prognoz ile ilişkili olabileceğini desteklemektedir (www.kmplot.com, Erişim Tarihi: 10.06.2026).

Tedavi yanıtı bağlamında yapılan incelemelerde ise, kemoterapiye patolojik yanıt vermeyen hastalarda PASK gen ekspresyon düzeylerinin, yanıt veren gruplara kıyasla anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 25). Elde edilen veriler, yüksek PASK ekspresyonunun sadece agresif bir tümör fenotipi ile ilişkili olmadığını, aynı zamanda kemo-direnç mekanizmalarında aktif bir rol oynayabileceğini ortaya koydu. Kemoterapiye yanıt vermeyen hasta grubunda saptanan yüksek PASK düzeyleri, bu kinazın tümör hücre sağkalım mekanizmalarında bir "direnç faktörü" olarak görev yapabileceğini destekledi.

Bu bulgular ışığında PASK; meme kanserinde nüks riskini öngören bir prognostik biyobelirteç olmasının yanı sıra, özellikle kemo-dirençli vakalarda tedavi başarısını artırmak adına stratejik bir terapötik hedef olarak değerlendirildi.



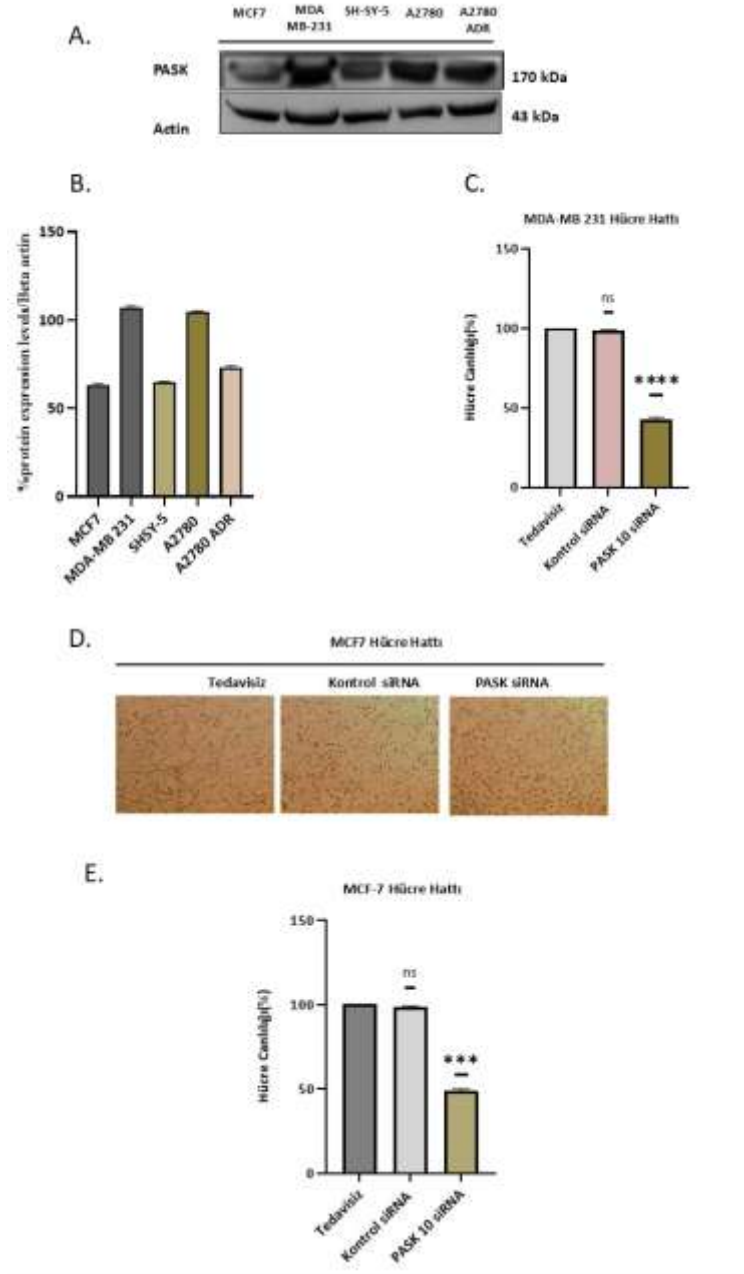
Şekil 25. PASK ekspresyonu ile kemoterapiye direnç arasındaki ilişki

Grafikte, kemoterapiye yanıt veren ve yanıt vermeyen hasta grupları arasında PASK gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması gösterilmektedir. Kemoterapiye yanıt vermeyen hastalarda PASK ekspresyonunun daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu bulgularla, artmış PASK ekspresyonunun kemoterapi direnci ve tümör hücre sağkalım mekanizmaları ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca PASK'ın, tedavi yanıtının öngörülmesinde potansiyel bir biyobelirteç ve terapötik hedef olarak değerlendirilebileceğini desteklemektedir. Veriler TCGA veri tabanından elde edilmiştir (www.rocplot.org, Erişim Tarihi: 09.06.2026).

4.3. PASK Susturulmasının Proliferasyon ve Koloni Oluşumuna Etkisi

PASK'ın besin mevcudiyetini büyüme sinyallerine entegre eden merkezi bir kinaz olduğu düşünüldüğünde, proteinin fonksiyon kaybı deneyleri aracılığıyla incelenmesi, onkogenik potansiyelinin aydınlatılması açısından temel bir gereklilik olarak görüldü. Bu bağlamda, PASK'ın proliferatif kapasite ve koloni oluşturma üzerindeki etkileri MDA-MB 231, MCF7 ve BT-474 gibi farklı meme kanseri hücre hatlarında kapsamlı olarak analiz edildi. Yapılan moleküler karakterizasyon ve Western Blot çalışmaları, PASK protein seviyelerinin özellikle agresif meme kanseri (MDA-MB 231) ve yumurtalık kanseri (A2780) hücre hatlarında belirgin şekilde yüksek olduğunu ortaya koydu (Şekil 26 A-B).

PASK susturulması, MDA-MB 231 hücrelerinde canlılığı anlamlı düzeyde düşürmüştü (Şekil 26C) ve MCF7 hücrelerinde morfolojik bütünlüğü bozarak hücre canlılığını baskılamıştır (Şekil 26 D-E). Elde edilen kantitatif analizler sonucunda; MDA-MB 231 hücre hattında PASK 10 siRNA uygulaması ile hücre canlılığının $42,67 \pm 1,53$ seviyesine düştüğü, MCF7 hücre hattında ise bu oranın $49,00 \pm 1,00$ seviyesine gerilediği saptandı ($p < 0,0001$).

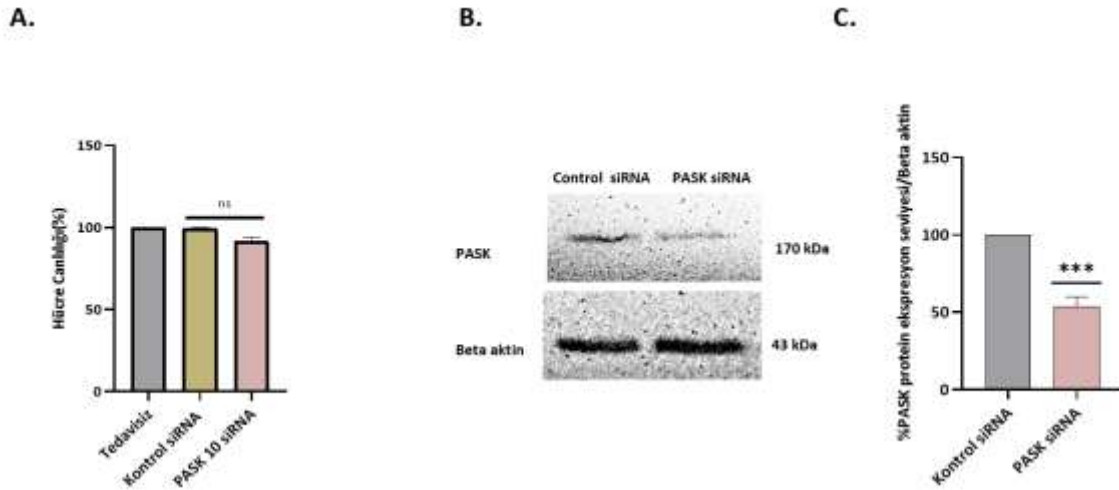


Şekil 26. PASK Ekspresyonunun Karakterizasyonu ve Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi

A) Western Blot Analizi: Meme (MCF7, MDA-MB 231) ve over (A2780, A2780-ADR) kanseri hücre hatlarında PASK protein seviyelerinin belirlenmesi. Beta-aktin, protein yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. B) Relatif Protein Kantifikasyonu: PASK protein bant yoğunluklarının Beta-aktin'e normalize edilmiş grafiksel gösterimi. En yüksek ekspresyonun MDA-MB 231 ve A2780 hatlarında olduğu görülmektedir. C) MDA-MB 231 Hücre Canlılığı: PASK siRNA transfeksiyonu sonrası hücre canlılığındaki değişim. PASK geninin susturulması, hücre canlılığında istatistiksel olarak çok yüksek düzeyde anlamlı bir azalmaya ($p < 0,0001$; ****) yol açmıştır. D) MCF7 Hücre Morfolojisi: Kontrol (NT), kontrol siRNA ve PASK siRNA uygulanan MCF7 hücrelerinin mikroskopik görüntüleri. PASK susturulmasının hücre yoğunluğunu ve morfolojik bütünlüğü negatif etkilediği gözlemlenmiştir. E) MCF7 Hücre Canlılığı Analizi: MCF7 hücrelerinde PASK eksikliğinin canlılık üzerindeki kantitatif etkisi. Veriler, PASK'ın bu hücre hattında da hayatta kalma için kritik bir rol oynadığını göstermektedir ($p < 0,001$; ***).

Bu inhibisyonun özgünlüğünü test etmek amacıyla kullanılan MCF10A hücre hattında canlılık kaybının istatistiksel olarak anlamlı bulunmaması, PASK bağımlılığının tümör hücrelerine spesifik bir özellik olabileceğine işaret etmektedir (Şekil 27A-C).

Ayrıca, MCF10A hücrelerinde yapılan densitometrik analizler, PASK-siRNA uygulaması sonrasında PASK protein ekspresyonunun ortalama $53,67 \pm 6,03$ seviyesine kadar başarıyla baskılandığını kanıtladı.

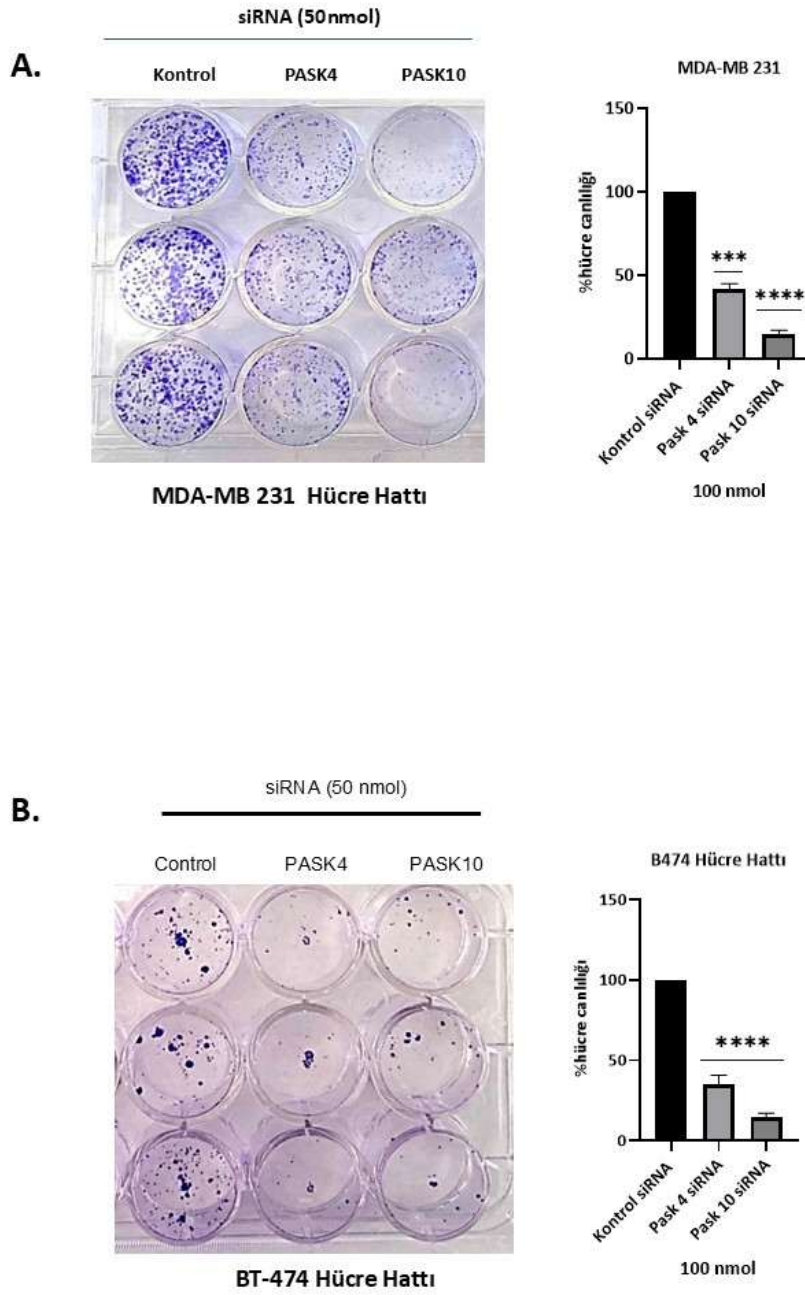


Şekil 27. PASK Gen Susturulmasının MCF10A Hücre Canlılığı Üzerine Etkisi

(A) MCF10A hücrelerinde PASK-siRNA (PASK10) uygulaması sonrasında elde edilen hücre canlılığı analizi. PASK susturulması sonrasında hücre canlılığında kontrol gruplarına kıyasla hafif düzeyde bir azalma gözlenmiş ancak bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (ns). (B) Kontrol siRNA ve PASK-siRNA gruplarında PASK protein ekspresyonunu gösteren Western blot analizi. Beta aktin (43 kDa), yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. (C) PASK protein düzeylerine ait densitometrik analiz sonuçları. PASK-siRNA uygulaması sonrasında PASK protein ekspresyonunda anlamlı azalma saptanmıştır (**p < 0,001). Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunulmuş olup deneyler üç bağımsız tekrar halinde gerçekleştirilmiştir.

MDA-MB 231 hücre hattında, PASK4 siRNA uygulaması ile koloni oluşturma kapasitesi $42,00 \pm 3,00$ seviyesine, daha etkili olan PASK10 siRNA uygulaması ile ise $14,67 \pm 2,52$ seviyesine geriledi. BT-474 hücre hattında ise benzer bir baskılayıcı etki gözlenmiş olup, PASK4 siRNA uygulaması ile koloni oluşturma kapasitesi $34,67 \pm 6,03$ seviyesine, PASK10 siRNA uygulaması ile ise $14,67 \pm 2,52$ seviyesine düşmüştür.

Bu bulgular, PASK geninin susturulmasının hem ÜNMK (MDA-MB 231) hem de HER2-pozitif (BT-474) meme kanseri modellerinde, koloni oluşturma kapasitesini doza ve sekansa bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı derecede kısıtladığını ortaya koymaktadır. (Şekil 28 A-B; p < 0,001).

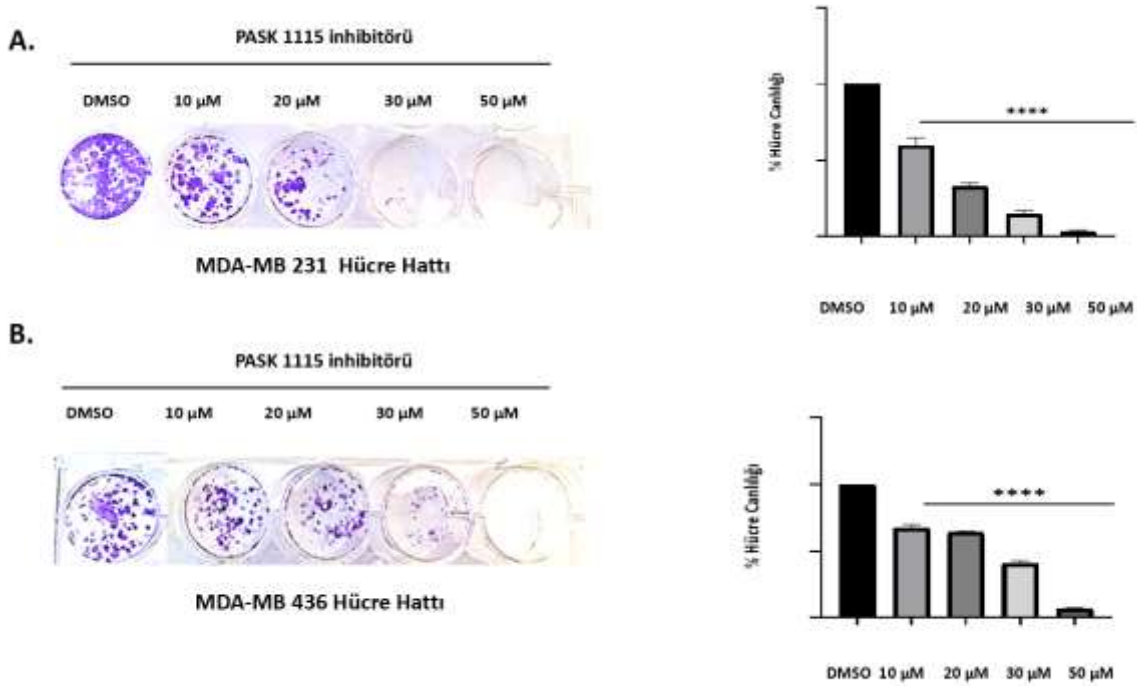


Şekil 28. PASK'ın MDA-MB 231 VE BT-474 meme kanseri hücre hatlarında proliferasyona etkisi

A) MDA-MB 231 ve B) BT-474 hücre hatlarında PASK4 ve PASK10 siRNA (50 nmol) uygulamalarının koloni oluşturma kapasitesi üzerindeki uzun dönemli etkileri. Her iki hücre hattında da PASK geninin susturulması, kristal viyole ile boyanan koloni sayısında ve boyutunda kontrol grubuna kıyasla dramatik bir azalmaya yol açmıştır. Sağ panellerdeki grafikler, koloni yoğunluğuna bağlı hücre canlılığı yüzdesindeki istatistiksel anlamlı düşüşü doğrulamaktadır. İnhibitör etki hem triple-negatif (MDA-MB 231) hem de HER2-pozitif (BT-474) hücre modellerinde benzer şekilde gözlenmiştir. Veriler üç bağımsız deneyi temsil etmekte olup ortalama $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir. ***, ****: Kontrol grubuna göre sırasıyla $p < 0,001$ ve $p < 0,0001$ düzeyinde yüksek derecede istatistiksel anlamlılık.

PASK-1115 inhibitörü uygulanan gruplarda, özellikle 30 μ M ve 50 μ M dozlarında antiproliferatif etkinin maksimum düzeye ulaştığı ve koloni oluşumunun neredeyse tamamen baskılandığı belirlendi (Şekil 29; $p < 0,0001$).

MDA-MB 231 hücrelerinde: 10 μ M dozunda canlılık $59,67 \pm 5,03$, 20 μ M dozunda $32,67 \pm 2,52$, 30 μ M dozunda $14,67 \pm 2,52$ ve 50 μ M dozunda $3,00 \pm 1,00$ olarak saptanmıştır. MDA-MB 436 hücrelerinde: 10 μ M dozunda canlılık $70,00 \pm 2,52$, 20 μ M dozunda $64,00 \pm 1,00$, 30 μ M dozunda $40,33 \pm 2,52$ ve 50 μ M dozunda $6,33 \pm 1,15$ seviyelerine gerilemiştir.



Şekil 29. PASK 1115 inhibitörünün meme kanseri hücre hatlarında koloni oluşumu üzerine etkilerinin değerlendirilmesi

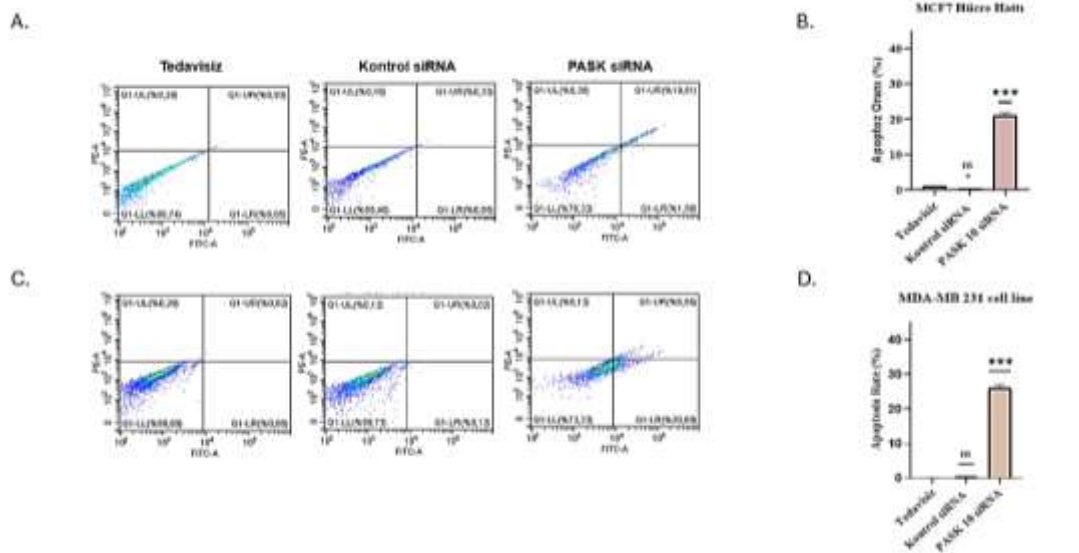
(A) MDA-MB-231 ve (B) MDA-MB-436 hücre hatları, farklı konsantrasyonlarda (10, 20, 30 ve 50 μ M) PASK 1115 inhibitörü ile muamele edilmiş ve koloni oluşum kapasitesi kristal viyole boyaması ile analiz edilmiştir. Temsilci koloni görüntüleri sol panelde, kantitatif analiz sonuçları ise sağ panelde gösterilmiştir. PASK 1115 uygulaması, her iki hücre hattında da doza bağlı olarak koloni oluşumunu ve hücre canlılığını anlamlı düzeyde azaltmıştır. Özellikle 30 μ M ve 50 μ M konsantrasyonlarında belirgin antiproliferatif etki gözlenmiştir. Veriler üç bağımsız deneyin ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunulmuştur. İstatistiksel analiz GraphPad Prism programı kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, anlamlılık düzeyleri **** $p < 0.0001$ olarak değerlendirilmiştir.

Bu bulgular, PASK'ın sadece kısa süreli proliferasyonu değil, aynı zamanda kanser hücrelerinin uzun dönemli hayatta kalma ve koloni oluşturma kapasitesini de düzenleyen temel bir "moleküler sürücü" olabileceğini ortaya koymaktadır.

Elde edilen sayısal veriler, PASK inhibisyonunun özellikle agresif meme kanseri modellerinde tümör yükünü baskılamada ve tümörojenik kapasiteyi sınırlamada güçlü bir terapötik potansiyele sahip olduğunu desteklemektedir.

4.4. PASK Baskılanmasının Apoptoz Üzerine Etkisi

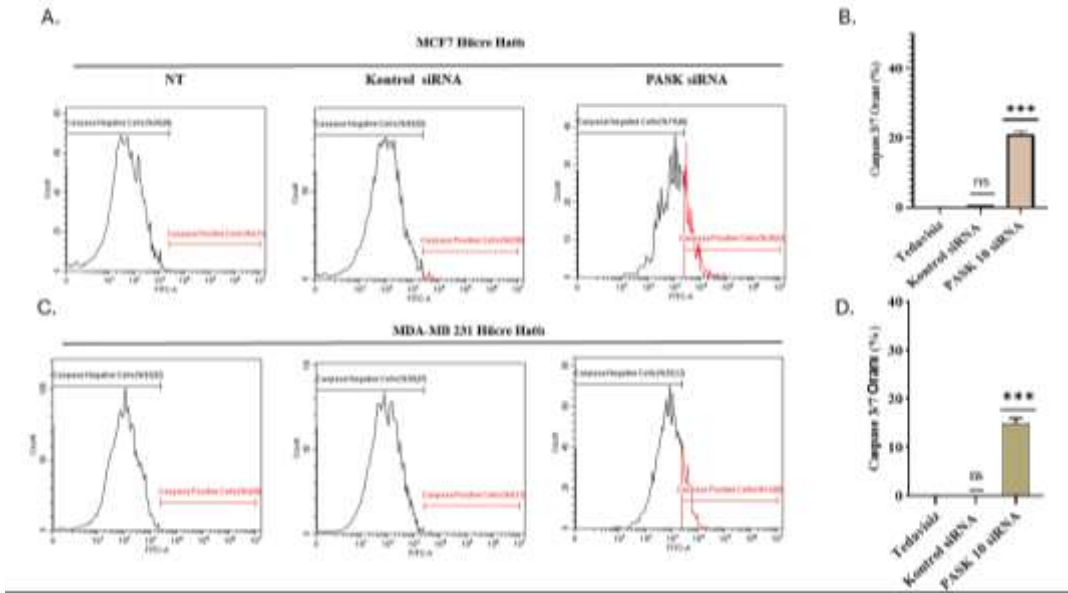
PASK inhibisyonunun meme kanseri hücrelerinde proliferatif kapasiteyi ve koloni oluşturma yeteneğini baskıladığı göz önüne alındığında, bu fenotipik değişimin altında yatan temel ölüm mekanizmasının tanımlanması kritik öneme sahiptir. Bu bağlamda, PASK baskılanmasının programlanmış hücre ölümü (apoptoz) süreçlerini tetikleyip tetiklemediği, Annekin V/PI akış sitometrisi, Kaspaz 3/7 aktivite analizleri ve hücre döngüsü profillemesi ile detaylı olarak incelendi. Meme kanseri hücrelerinde (MCF-7 ve MDA-MB-231) PASK geninin susturulması, hücreleri doğrudan apoptotik sürece sürüklemektedir. Annekin V/FITC ve PI boyaması ile gerçekleştirilen akış sitometrisi analizleri, PASK baskılanması sonrasında erken ve geç apoptotik hücre popülasyonlarında belirgin bir artış olduğunu ortaya koydu (Şekil 30 A-D). MDA-MB 231 hücre hattında: PASK 10 siRNA uygulaması sonrasında toplam apoptotik popülasyon $26,00 \pm 1,00$ seviyesine ulaşmıştır ($p < 0,001$). MCF7 hücre hattında: PASK 10 siRNA uygulaması sonrasında toplam apoptotik popülasyon $21,00 \pm 2,00$ seviyesine çıkmıştır ($p < 0,001$).



Şekil 30. PASK Susturulmasının Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptoz Üzerindeki Etkisi

(A–B) MCF-7 ve (C–D) MDA-MB-231 hücre hatlarında PASK-siRNA uygulaması sonrasında gerçekleştirilen Annexin V-FITC/PI akış sitometrisi analizleri. (A, C) Annexin V/PI dağılım grafikleri. Sol alt kadrant canlı hücreleri, sağ alt kadrant erken apoptotik hücreleri, sağ üst kadrant geç apoptotik hücreleri ve sol üst kadrant nekrotik hücre popülasyonlarını göstermektedir. PASK susturulması sonrasında her iki hücre hattında da apoptotik hücre popülasyonunda belirgin artış gözlenmiştir. (B, D) Toplam apoptotik hücre oranlarının kantitatif analizi. Bulgularla, PASK baskılanmasının apoptozu artırdığı ve hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunulmuş olup deneyler üç bağımsız tekrar halinde gerçekleştirilmiştir (** $p < 0,001$).

Bu apoptoz indüksiyonu, Kaspaz 3/7 enzim aktivitesindeki artış ile doğrulandı (Şekil 31 A-D). PASK susturulması, Kaspaz 3/7 aktivasyonunu MCF7 hücrelerinde $21,00 \pm 1,00$, MDA-MB 231 hücrelerinde ise $15,00 \pm 1,00$ seviyesine yükseltmiştir ($p < 0,001$).



Şekil 31. PASK susturulmasının Kaspaz 3/7 aktivasyonu üzerindeki etkisi

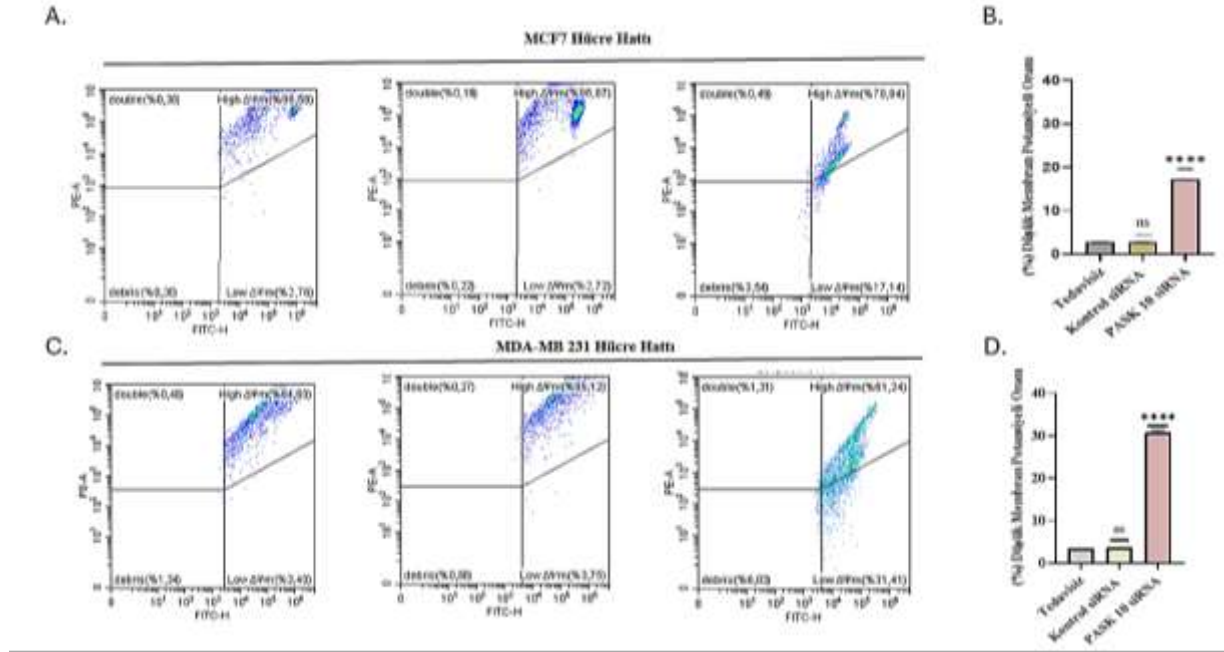
(A–B) MCF-7 ve (C–D) MDA-MB-231 hücre hatlarında PASK-siRNA (PASK10) uygulaması sonrasında gerçekleştirilen Kaspaz 3/7 aktivite analizleri. (A, C) Akış sitometrisi ile elde edilen temsili histogramlar. Kaspaz-negatif hücre popülasyonları siyah, Kaspaz-pozitif hücre popülasyonları ise kırmızı ile gösterilmiştir. PASK susturulması sonrasında her iki hücre hattında da Kaspaz 3/7 aktivitesi gösteren hücre oranında belirgin artış gözlenmiştir. (B, D) Kaspaz 3/7 pozitif hücre oranlarının kantitatif analizi. Bulgular, PASK baskılanmasının apoptotik hücre popülasyonunu artırdığını ve apoptozu indüklediğini göstermektedir. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunulmuş olup deneyler üç bağımsız tekrar halinde gerçekleştirilmiştir (** $p < 0,001$; ns: anlamlı değil).

4.5. PASK Baskılanmasının Mitokondriyal Değişiklikler Üzerine Etkileri

PASK, metabolik süreçleri ve enerji homeostazını düzenleyen bir kinaz olması nedeniyle, mitokondriyal fonksiyonların idamesinde kritik bir rol oynamaktadır. Önceki deneylerde gözlemlenen apoptotik hücre ölümünün mekanizmasını aydınlatmak amacıyla, PASK baskılanmasının mitokondriyal membran potansiyeli üzerindeki etkileri, mitokondriyal disfonksiyonun en duyarlı göstergelerinden biri olan JC-1 boyama tekniği ile analiz edildi.

MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında gerçekleştirilen akış sitometrisi analizleri, PASK susturulması ile mitokondriyal membran bütünlüğünün doğrudan etkilendiğini ortaya koydu. JC-1 boyaması sonuçlarına göre, kontrol gruplarında yüksek membran potansiyeline işaret eden agregat formlar baskınken, PASK susturulan hücrelerde mitokondriyal membran depolarizasyonunun bir göstergesi olan monomerik formlarda belirgin bir artış gözlemlendi. Kantitatif analizler, her iki hücre

hattında da düşük mitokondriyal membran potansiyeline sahip hücre popülasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 32A-D). PASK 10 siRNA uygulaması sonrasında, MCF7 hücre hattında düşük membran potansiyeline sahip hücre oranı $17,17 \pm 0,06$ seviyesine yükselirken ($p < 0,0001$), MDA-MB 231 hücre hattında bu oran $30,67 \pm 0,58$ seviyesine ulaştı ($p < 0,0001$).



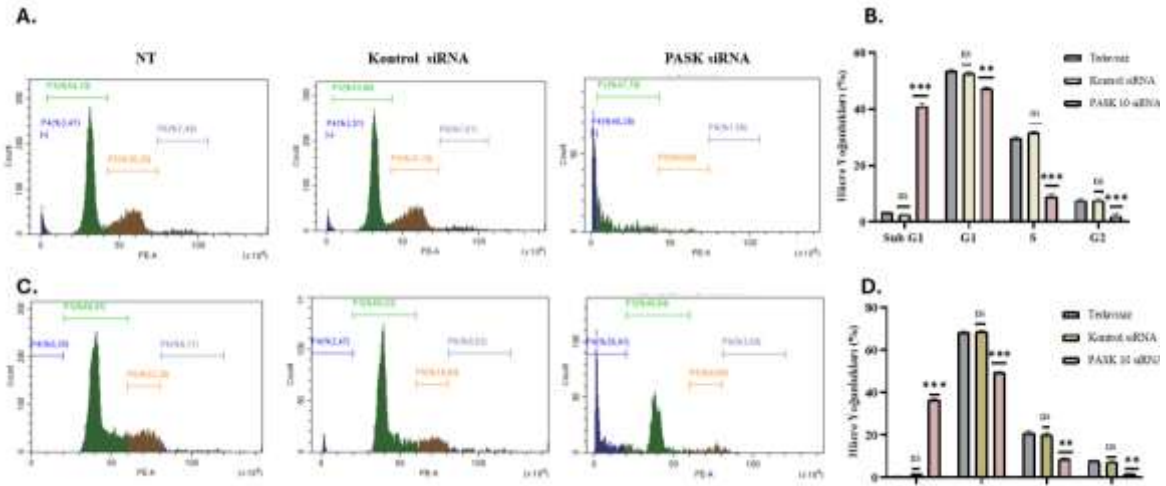
Şekil 32. PASK Susturulmasının Mitokondriyal Disfonksiyon Üzerindeki Etkisi

(A–B) MCF-7 ve (C–D) MDA-MB-231 hücre hatlarında PASK-siRNA (PASK10) uygulaması sonrasında gerçekleştirilen JC-1 akış sitometrisi analizleri. (A, C) Hücrelerin JC-1 boyaması sonrası elde edilen temsili dot-plot grafikleri. Yüksek mitokondriyal membran potansiyeline sahip hücreler JC-1 agregatları ile yüksek $\Delta\Psi_m$ bölgesinde yer alırken, düşük membran potansiyeline sahip hücreler JC-1 monomerleri ile düşük $\Delta\Psi_m$ bölgesinde gözlenmiştir. PASK susturulması sonrasında her iki hücre hattında da düşük membran potansiyeline sahip hücre popülasyonunda belirgin artış saptanmıştır. (B, D) Düşük mitokondriyal membran potansiyeline sahip hücre oranlarının kantitatif analizi. Bulgular, PASK baskılanmasının mitokondriyal membran depolarizasyonunu artırarak mitokondriyal disfonksiyonu tetiklediğini göstermektedir. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunulmuş olup deneyler üç bağımsız tekrar halinde gerçekleştirilmiştir (**** $p < 0,0001$; ns: anlamlı değil).

Bu veriler, PASK baskılanmasının mitokondriyal membran depolarizasyonunu tetikleyerek mitokondriyal disfonksiyona yol açtığını gösterdi. Mitokondriyal membran potansiyelindeki bu kayıp, hücre içi ATP üretiminin kısıtlanmasına ve beraberinde apoptotik sinyal yollarının aktivasyonuna zemin hazırlamaktadır. Sonuç olarak PASK, meme kanseri hücrelerinde hem metabolik bir "anahtar" hem de mitokondriyal bütünlüğü koruyan yapısal bir regülatör işlevi görmekte olabileceği; dolayısıyla bu kinazın inhibisyonu, mitokondriyal disfonksiyonu tetikleyerek kanser hücrelerini apoptotik ölüme sürükleyen temel mekanik süreci oluşturduğu söylenebilir.

4.6. PASK Baskılanmasının Hücre Döngüsü Üzerine Etkisi

PASK'ın hücre proliferasyonu ve hayatta kalma süreçleri üzerindeki düzenleyici rolü, bu kinazın inhibisyonunun hücre döngüsü progresyonunu nasıl etkilediğinin aydınlatılmasını zorunlu kılmaktadır. PASK susturulması sonucunda gözlenen canlılık kaybı ve apoptotik süreçlerin altında yatan hücre döngüsü dinamiklerini belirlemek amacıyla, akış sitometrisi temelli hücre döngüsü analizleri gerçekleştirildi. MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında PASK geninin siRNA aracılığıyla susturulması, hücre döngüsü profillerinde anlamlı değişimlere yol açmıştır. Analiz sonuçları, PASK baskılanmasının özellikle Sub-G1 fazındaki (apoptotik/ölü hücre) popülasyonda anlamlı bir artışa neden olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 33A-D; $p < 0,001$). Bununla birlikte, aktif döngü evreleri olan G1 ve S fazlarındaki hücre oranlarında gözlenen düşüş, PASK yokluğunda hücrelerin proliferatif döngüden çıkarak apoptoza yönlendirildiğini ortaya koymaktadır (Şekil 33A-D). MCF7 hücre hattında PASK 10 siRNA uygulaması sonrası Sub-G1 evresindeki hücre oranı $\%41,00 \pm 1,00$ seviyesine yükselirken, G1 evresi $\%47,33 \pm 0,58$, S evresi $\%9,00 \pm 1,00$ ve G2 evresi ise $\%2,00 \pm 1,00$ olarak saptandı. MDA-MB 231 hücre hattında ise PASK 10 siRNA uygulaması sonrasında Sub-G1 evresindeki hücre oranı $\%36,67 \pm 0,58$ seviyesine ulaşırken, G1 evresi $\%49,33 \pm 0,58$, S evresi $\%8,67 \pm 0,58$ ve G2 evresi ise $\%1,80 \pm 0,10$ olarak ölçüldü.



Şekil 33. PASK Susturulmasının Hücre Döngüsü Dağılımı Üzerindeki Etkisi

(A–B) MCF-7 hücre hattında ve (C–D) MDA-MB-231 hücre hattında PASK-siRNA (PASK10) uygulaması sonrasında gerçekleştirilen hücre döngüsü analizleri. (A, C) PI boyaması sonrası elde edilen temsili akış sitometrisi histogramları. (B, D) Hücre döngüsü faz dağılımlarının (Sub-G1, G1, S ve G2 fazları) kantitatif analizi. PASK susturulması her iki hücre hattında da Sub-G1 popülasyonunda anlamlı artışa neden olurken, G1 ve S fazlarındaki hücre oranlarında azalma gözlenmiştir. Bulgularla, PASK baskılanmasının hücre döngüsü progresyonunu inhibe ettiği ve apoptotik hücre popülasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunulmuş olup deneyler üç bağımsız tekrar halinde gerçekleştirilmiştir (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns: anlamlı değil).

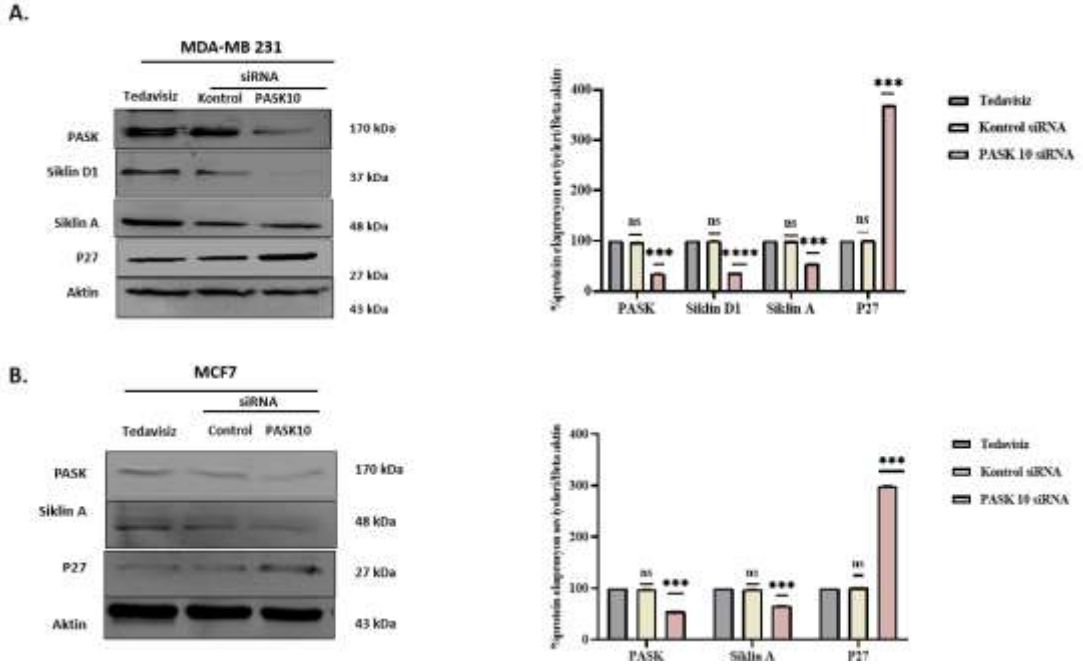
Bu bulgularla, PASK'ın hücre döngüsünün G1/S kontrol noktasında bir geçiş faktörü olarak görev yapabileceğine ve bu kinazın inaktivasyonunun hücre döngüsü mekanizmasını durdurabileceğine işaret edildi. Elde edilen hücre döngüsü verileri ile PASK inhibisyonunun sadece proliferasyonu yavaşlatmadığı, aynı zamanda tümör hücrelerinin mitotik yeteneklerini de ortadan kaldırdığı gösterildi. G1 ve S fazlarındaki azalma, hücrenin büyüme sinyallerine yanıt veremediğini ve bölünme kapasitesini yitirdiğini destekler niteliktedir. Bu mekanistik veriler, PASK'ın tümöral hücre döngüsü regülasyonunda vazgeçilmez bir bileşen olduğunu ve PASK inhibisyonunun hücreyi proliferatif bir döngüden çıkarıp programlanmış hücre ölümüne yönlendiren stratejik bir yaklaşım olduğuna işaret etmektedir.

4.7. PASK İnhibisyonunun Metastatik ve Sinyal Düzenleyici Etkileri

PASK'ın meme kanseri progresyonundaki rolünün moleküler düzeyde aydınlatılması, bu kinazın hücre döngüsü, sinyal iletimi ve epitelyal-mezenkimal geçiş (EMG) gibi temel onkojenik süreçleri nasıl regüle ettiğinin belirlenmesini gerektirmektedir. Bu bölümde, PASK susturulmasının hücre içi sinyal yolları, metastatik belirteçler ve hücre döngüsü regülatörleri üzerindeki etkisi Western blot analizleri ile incelendi.

Moleküler analizler, PASK susturulmasının hücre döngüsü ilerlemesinden sorumlu proteinleri baskıladığını ortaya koymuştur. PASK inhibisyonu, siklin D1 ve siklin A seviyelerini anlamlı derecede düşürürken, hücre döngüsü inhibitörü olan p27 düzeyini arttırdı (Şekil 34A-B). MDA-MB 231 Hücre Hattında, PASK 10 siRNA uygulaması sonrasında PASK ve Siklin D1 ekspresyon düzeyleri sırasıyla $35,00 \pm 1,00$ ve $35,33 \pm 0,58$ seviyelerine gerilerken, Siklin A düzeyi $54,00 \pm 1,00$ olarak saptanmıştır. Buna karşın, hücre döngüsü inhibitörü olan P27 protein ekspresyonu $369,00 \pm 1,00$ seviyesine kadar yükseldi ($p < 0,001$).

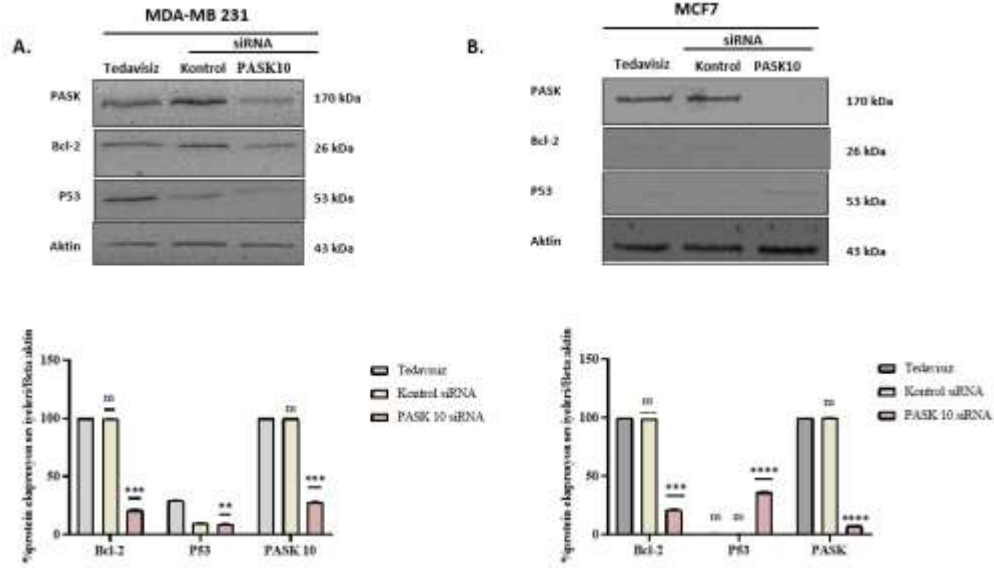
MCF7 Hücre Hattında, PASK 10 siRNA uygulaması sonrasında PASK ve Siklin A protein ekspresyon düzeyleri $34,00 \pm 1,00$ seviyesine gerilerken, Siklin D1 düzeyi $47,00 \pm 1,00$ olarak saptanmıştır. Buna karşın, hücre döngüsü inhibitörü olan P27 protein ekspresyonu $299,67 \pm 1,53$ seviyesine kadar yükseldi ($p < 0,001$). Bu veriler, PASK'ın hücre döngüsü progresyonunu destekleyen Siklin D1 ve Siklin A gibi proteinlerin ekspresyonunu koruduğunu; PASK baskılandığında ise hücrelerin döngü duraklamasından sorumlu P27 proteinini yukarı regüle ederek proliferasyonu kısıtladığını ortaya koymaktadır. Bu moleküler profil, PASK'ın meme kanseri hücrelerinde hem proliferasyonu sürdüren hem de apoptoz direnci sağlayan merkezi bir mekanizma olduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 34. PASK Susturulmasının Hücre Döngüsü Proteinlerine Etkisi

(A) MDA-MB-231 ve (B) MCF-7 hücre hatlarında PASK'a özgü siRNA (PASK10) uygulaması sonrasında elde edilen Western blot analizleri (üst panel) ve densitometrik analiz sonuçları (alt panel). PASK susturulması sonrasında her iki hücre hattında da hücre döngüsü progresyonu ile ilişkili Siklin D1 ve Siklin A protein ekspresyon düzeylerinde anlamlı azalma gözlenirken, hücre döngüsü inhibitörü olan p27 protein düzeylerinde artış saptanmıştır. Aktin (43 kDa), yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Proteinlere ait moleküler ağırlıklar (kDa) bantların sağ tarafında belirtilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunulmuş olup deneyler üç bağımsız tekrar halinde gerçekleştirilmiştir (***) $p < 0,001$; ns: anlamlı değil).

Ayrıca PASK baskılanması, hücre sağkalımı için kritik olan anti-apoptotik Bcl-2 proteinini düşürürken, MCF7 hücre hattında pro-apoptotik p53 ekspresyonunu tetikleyerek hücreyi ölüm sürecine yönlendirdi (Şekil 35A-B). MDA-MB 231 Hücre Hattında, PASK 10 siRNA uygulaması sonrasında, anti-apoptotik Bcl-2 protein ekspresyonu $\%21,00 \pm 1,00$ seviyesine gerilerken, P53 ekspresyonu $\%9,00 \pm 1,00$ ve PASK 10 ekspresyonu $\%28,00 \pm 1,00$ seviyesine düştü. MCF7 Hücre Hattında: PASK 10 siRNA uygulaması sonrasında, anti-apoptotik Bcl-2 protein ekspresyonu $\%21,00 \pm 1,00$ ve PASK ekspresyon düzeyi $\%7,33 \pm 0,58$ seviyelerine gerilerken, pro-apoptotik P53 ekspresyonu $\%36,00 \pm 1,00$ seviyesine yükseldi.

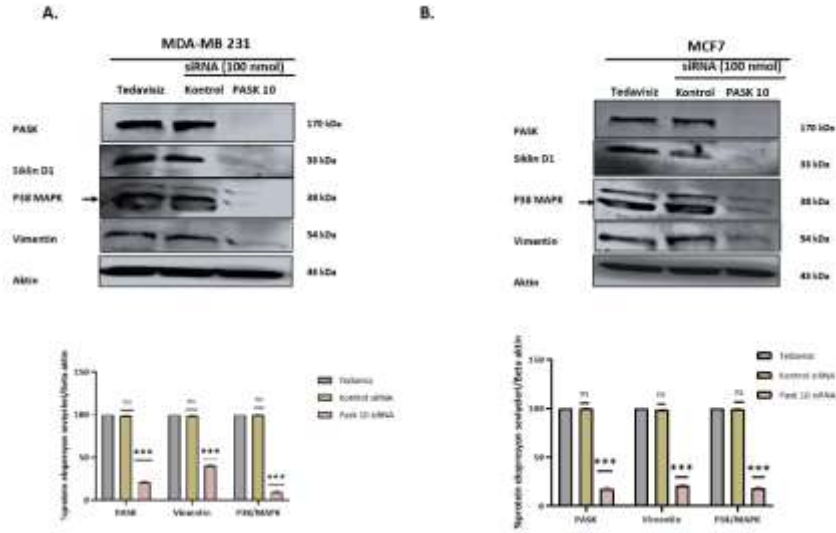


Şekil 35. PASK Susturulmasının Hücre P53 ve Bcl-2 Protein İfadeleri Üzerindeki Etkisi

- (A) MDA-MB-231 ve (B) MCF-7 hücre hatlarında PASK-siRNA (PASK10) uygulaması sonrasında elde edilen Western blot analizleri (üst panel) ve densitometrik analiz sonuçları (alt panel). PASK susturulması her iki hücre hattında da anti-apoptotik Bcl-2 protein ekspresyonunda anlamlı azalmaya yol açmıştır. Buna karşılık, özellikle MCF-7 hücre hattında p53 ekspresyonunda artış gözlenmiştir. PASK protein düzeylerinin siRNA uygulaması sonrası belirgin şekilde baskılandığı doğrulanmıştır. Aktin (43 kDa), yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Proteinlere ait moleküler ağırlıklar (kDa) bantların sağ tarafında belirtilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunulmuş olup deneyler üç bağımsız tekrar halinde gerçekleştirilmiştir (**p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001; ns: anlamlı değil).

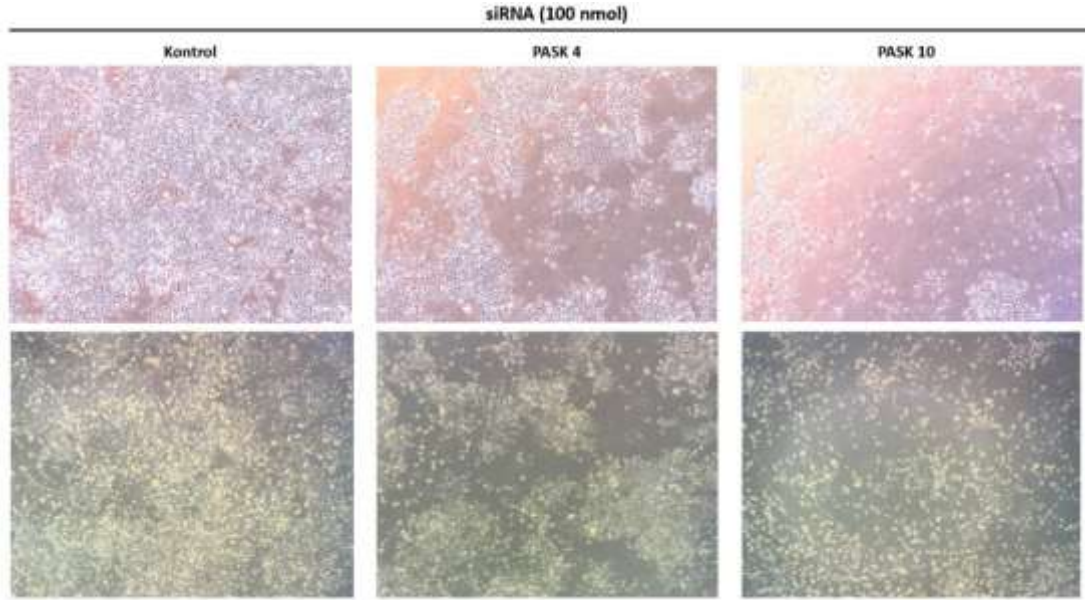
Metastatik potansiyel açısından incelendiğinde, PASK susturulmasının mezenkimal belirteç olan Vimentin seviyelerini düşürdüğü saptandı (Şekil 36A-B, Şekil 37). MDA-MB 231 Hücre Hattında PASK 10 siRNA uygulaması sonrasında PASK ekspresyon düzeyi $21,00 \pm 1,00$ ve Vimentin ekspresyon düzeyi $40,33 \pm 0,58$ seviyelerine gerilemiştir. MCF7 Hücre Hattında, PASK 10 siRNA uygulaması sonrasında PASK ekspresyon düzeyi $17,33 \pm 1,53$ ve Vimentin ekspresyon düzeyi $21,00 \pm 1,00$ seviyelerine gerilemiştir.

Bu veriler, PASK inaktivasyonunun metastatik potansiyeli kısıtlayan bir mekanizma olabileceğine işaret etmektedir. Vimentin baskılanması, PASK'ın meme kanseri hücrelerinde EMT sürecinin kontrolünde kritik bir düzenleyici rol oynayabileceğini göstermektedir.



Şekil 36. PASK Susturulmasının EMG Belirteçleri ve Apoptoz Regülatörleri Üzerindeki Etkisi

MDA-MB-231 (A) ve MCF-7 (B) hücrelerinde PASK-siRNA (100 nmol) uygulamasının Western blot (üst) ve densitometrik (alt) analizleri. PASK susturulması; her iki hat açılımında PASK, Vimentin, Siklin D1 ve P38 MAPK seviyelerini anlamlı derecede azaltmıştır. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak sunulmuş olup deneyler üç bağımsız tekrardan oluşmaktadır (**p < 0,01; ***p < 0,001; ns: anlamlı değil).



Şekil 37. PASK Susturulmasının Meme Kanseri Hücre Morfolojisi ve Yoğunluğu Üzerindeki Etkisi

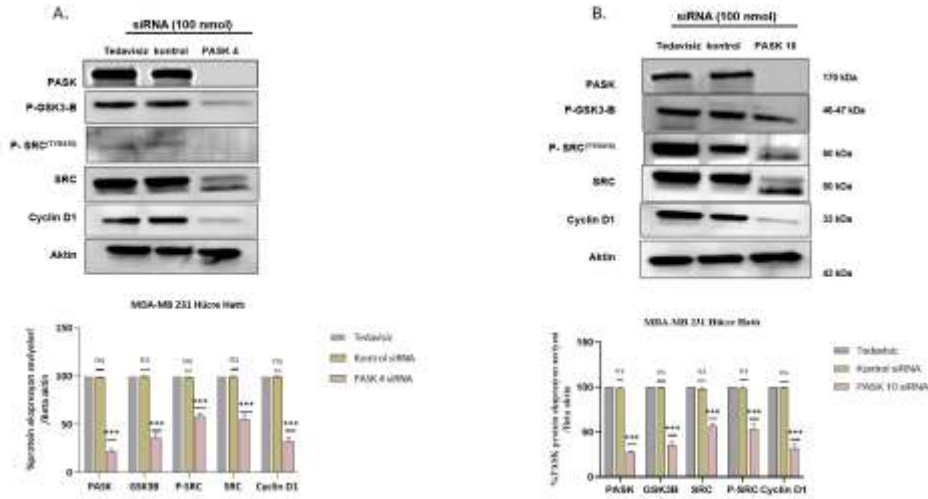
MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde PASK'a özgü iki farklı siRNA sekansının (PASK4 ve PASK10, 100 nmol) uygulanmasını takiben elde edilen 72 saatlik faz-kontrast mikroskop görüntüleri gösterilmektedir. Kontrol grubunda hücrelerin yüksek yoğunlukta büyüdüğü ve tipik epitel benzeri morfolojik özelliklerini koruduğu gözlenmiştir. Buna karşılık, PASK4 ve özellikle PASK10 siRNA uygulamaları sonrasında hücre yoğunluğunda belirgin azalma, hücre-hücre bağlantılarında bozulma ve morfolojik düzensizlikler izlenmiştir. PASK10 grubunda hücresel dejenerasyon ve hücre ölümüne ait morfolojik bulguların daha belirgin olduğu saptanmıştır. Görüntüler 100× büyütmede elde edilmiştir.

Sinyal iletim yollarına odaklanan analizlerde ise PASK inhibisyonunun; P38 MAPK, P-SRC (Tyr416), P-GSK3 β (Ser9), P-70S6K ve P-ERK1/2 gibi proliferasyonu destekleyen kritik moleküllerin aktivasyonunu doza bağılı olarak baskıladığı doğrulandı (Şekil 38A-B, Şekil 39A-B, Şekil 40A-B). PASK 4 siRNA uygulaması ile PASK ekspresyon düzeyi $22,00 \pm 2,65$ seviyesine gerilerken; GSK3B $35,67 \pm 4,04$, P-SRC $58,33 \pm 2,89$, SRC $55,00 \pm 5,00$ ve Cyclin D1 $32,33 \pm 4,51$ seviyelerine kadar baskılandı. PASK 10 siRNA uygulaması sonrası: PASK ekspresyon düzeyi $28,00 \pm 1,00$ seviyesine gerilerken; GSK3B $35,67 \pm 4,04$, SRC $56,67 \pm 2,89$, P-SRC $53,33 \pm 5,77$ ve Cyclin D1 $31,67 \pm 4,73$ seviyelerine kadar baskılandı.

Elde edilen sonuçlar, hem PASK 4 hem de PASK 10 siRNA dizilerinin, özellikle P-GSK3B ve Cyclin D1 protein ekspresyonlarını etkili bir şekilde baskıladığını göstermektedir. Ayrıca SRC ve P-SRC düzeylerindeki azalma, PASK'ın bu hücre hattında hücre içi sinyal yollarını modüle eden kritik bir rol oynayabileceğini desteklemektedir.

PASK geninin susturulmasında 10 nmol ve 25 nmol dozlarının etkinliğini karşılaştırmak amacıyla, MDA-MB 231 hücre hattında protein ekspresyon düzeyleri analiz edildi. Elde edilen veriler, her iki siRNA dizisinin de doza bağımlı bir şekilde hedef proteinleri baskıladığını ve 25 nmol dozunun 10 nmol doza göre çok daha etkin bir baskılama sağladığını göstermektedir. 10 nmol doz uygulamasında PASK ekspresyonu $62,33 \pm 2,52$ seviyesine gerilerken, 25 nmol dozunda bu oran $28,00 \pm 1,00$ seviyesine düşmüştür. Benzer şekilde, P-GSK3B ekspresyonu 10 nmol dozda $61,33 \pm 2,31$ iken, 25 nmol dozda $34,33 \pm 2,52$ seviyesine inmiştir. SRC ve P-SRC proteinlerinde 25 nmol doz uygulaması ile sırasıyla $30,67 \pm 3,06$ ve $25,67 \pm 6,03$ düzeylerine ulaşan belirgin bir azalma kaydedilmiştir. Ayrıca Siklin D1 ekspresyonu 10 nmol dozda $61,00 \pm 4,00$ seviyesinden, 25 nmol dozda $26,00 \pm 3,61$ düzeyine gerilemiştir.

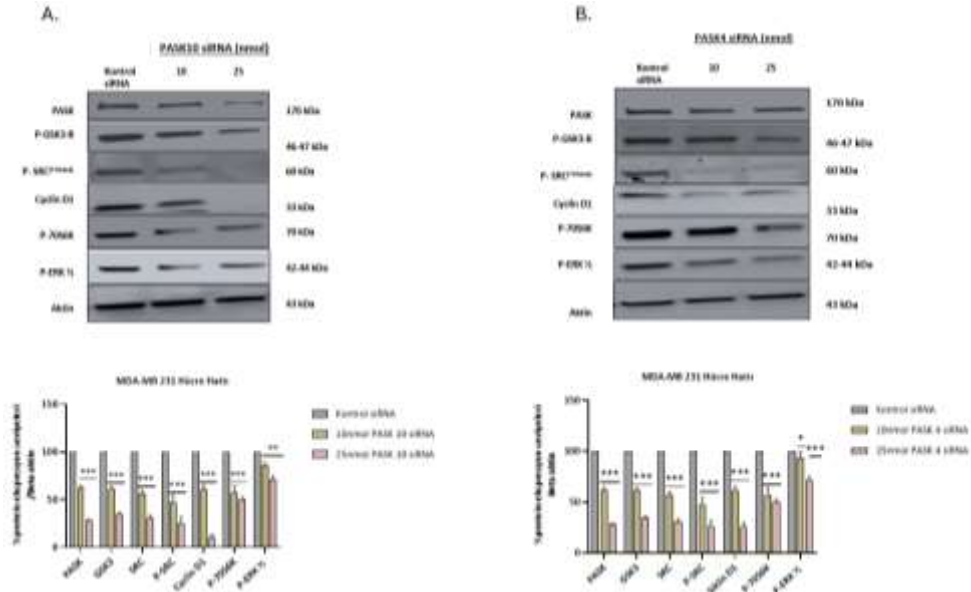
10 nmol doz uygulamasında PASK ekspresyonu $62,33 \pm 2,52$ seviyesine gerilerken, 25 nmol dozunda $28,00 \pm 1,00$ seviyesine düşmüştür. P-GSK3B ekspresyonu 10 nmol dozda $61,33 \pm 2,31$ iken, 25 nmol dozda $34,33 \pm 2,52$ seviyesine inmiştir. SRC ve P-SRC proteinlerinde 25 nmol doz uygulaması ile sırasıyla $30,67 \pm 3,06$ ve $25,67 \pm 6,03$ seviyelerine kadar azalma saptandı. Özellikle PASK 10 siRNA'nın 25 nmol dozu, Siklin D1 ekspresyonunda $10,33 \pm 3,51$ değeriyle en yüksek baskılayıcı etkiyi gösterdi. Her iki siRNA dizisi için de 25 nmol konsantrasyon, hücre içi sinyal yollarının modülasyonunda daha üstün bir etkinlik sergilemiştir. PASK ve Siklin D1 düzeylerindeki bu güçlü düşüşler, PASK inhibisyonunun hücre döngüsü progresyonunu durdurmada dozajın kritik önem taşıdığını düşündürmektedir.



Şekil 38. MDA-MB 231 Meme Kanseri Hücre Hattında PASK Susturulmasının Sinyal Yolları Üzerindeki Etkisi

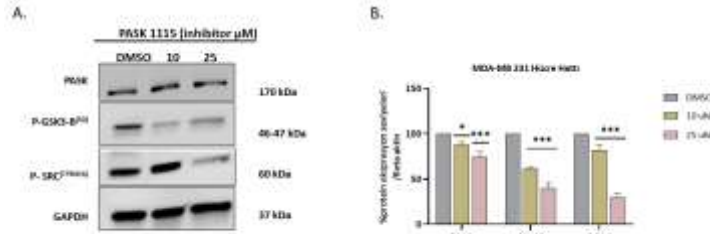
(A–B) PASK geninin iki farklı siRNA sekansı (PASK4 ve PASK10, 100 nmol) kullanılarak susturulması sonrasında elde edilen Western blot analizleri (üst panel) ve densitometrik analiz sonuçları (alt panel). Her iki siRNA uygulaması da hedef protein PASK'ın ekspresyonunu etkin şekilde baskılamış; buna eşlik eden şekilde P-GSK3β (Ser9), P-SRC (Tyr416), SRC ve Cyclin D1 protein düzeylerinde kontrol gruplarına (tedavisiz ve kontrol siRNA) kıyasla anlamlı azalmalar gözlenmiştir. Aktin (43 kDa), yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Proteinlere ait moleküler ağırlıklar (kDa) bantların sağ tarafında belirtilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunulmuş olup deneyler üç bağımsız tekrar halinde gerçekleştirilmiştir (***) $p < 0,001$; ns: anlamlı değil).

Ayrıca, en dikkat çekici değişimlerden biri olan Siklin D1 ekspresyonu, 10 nmol dozda $61,00 \pm 4,00$ seviyesinden, 25 nmol dozda $10,33 \pm 3,51$ gibi oldukça düşük bir düzeye gerilemiştir. Diğer yandan, P-70S6K ekspresyonu 10 nmol dozda $57,00 \pm 7,00$ iken 25 nmol dozda $49,67 \pm 3,06$ seviyesine; P-ERK $\frac{1}{2}$ ekspresyonu ise 10 nmol dozda $85,67 \pm 3,21$ iken 25 nmol dozda $71,00 \pm 3,61$ düzeyine gerilemiştir. Analizler, 25 nmol konsantrasyonun 10 nmol doza göre protein ekspresyonlarını modüle etmede çok daha üstün bir etkinlik sergilediğini doğrulamaktadır. Özellikle PASK ve Siklin D1 düzeylerindeki güçlü düşüşler, PASK inhibisyonunun hücre döngüsü progresyonunu baskılamada dozajın kritik rol oynadığını ve 25 nmol PASK 10 siRNA uygulamasının moleküler düzeyde en etkili strateji olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 39. MDA-MB 231 Hücre Hattında PASK Susturulmasının Sinyal Yolakları Üzerindeki Doz Bağımlı İnhibitör Etkisi

(A) PASK10 ve (B) PASK4 siRNA (10 ve 25 nmol) uygulamalarını takiben ilgili proteinlerin ekspresyon düzeylerini gösteren Western blot analizleri. PASK geninin siRNA aracılı susturulması; hücre proliferasyonu ve metabolik yollarda kritik rol oynayan GSK3 β , SRC, P-SRC, Cyclin D1, P-70S6K ve P-ERK1/2 protein seviyelerinde doza bağlı olarak anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. Proteinlere ait moleküler ağırlıklar (kDa) bantların sağ tarafında belirtilmiştir. Aktin (43 kDa), yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunulmuş olup deneyler en az üç bağımsız tekrar halinde gerçekleştirilmiştir (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).



Şekil 40. MDA-MB 231 Hücre Hattında PASK 1115 İnhibitörünün Sinyal İletim Yolakları Üzerindeki Etkisi

(A) Hücrelerin artan dozlarda (10 ve 25 μ M) PASK 1115 inhibitörü ile muamele edilmesi sonrası hedef proteinlerin ekspresyon ve aktivasyon düzeylerini gösteren Western blot analizi. (B) PASK, P-GSK3 β (Ser9) ve P-SRC (Tyr416) proteinlerine ait bağıl ekspresyon seviyelerinin densitometrik analizi. PASK 1115 inhibitörü uygulaması, PASK ekspresyonunda ve aşağı akım hedef proteinleri olan P-GSK3 β (Ser9) ile P-SRC (Tyr416) düzeylerinde DMSO kontrol grubuna kıyasla doz bağımlı bir azalmaya neden olmuştur. Protein yükleme kontrolü olarak GAPDH (37 kDa) kullanılmıştır. Moleküler ağırlıklar (kDa) bantların sağ tarafında belirtilmiştir. Grafiklerdeki veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak sunulmuştur. Deneyler en az üç bağımsız tekrar halinde gerçekleştirilmiştir (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Bu bulgular, PASK'ın meme kanseri hücrelerinde proliferatif sinyalleri (Siklin D1/A) ve sağkalım mekanizmalarını (Bcl-2, SRC, MAPK) destekleyen, aynı zamanda metastatik dönüşümü (EMG) yöneten merkezi bir sinyal merkezi olabileceğini ortaya koymaktadır. PASK 1115 inhibitörü ile gözlenen doz bağımlı sinyal blokajı, bu kinazın farmakolojik olarak hedeflenebilir olduğunu ve özellikle agresif tümör alt tiplerinde metastatik potansiyeli kırmak için güçlü bir stratejik hedef teşkil ettiğini ortaya koymaktadır. PASK inhibisyonunun, sinyal yolları üzerindeki bu çok yönlü baskılayıcı etkisi, hücreyi sadece döngüsel duraklamaya değil, aynı zamanda fenotipik bir gerilemeye (EMG'nin tersine çevrilmesi) sürükleyebileceğini de gösterebilmektedir.

5. TARTIŞMA

Meme kanseri, heterojen yapısı ve karmaşık moleküler alt tipleri nedeniyle dünya genelinde kadınlarda en sık teşhis edilen malignite olup, aynı zamanda kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenlerinden biri olmaya devam etmektedir (Dasegowda vd., 2026). Özellikle ÜNMK gibi agresif fenotipler önemli bir tedavi zorluğu oluşturmaktadır (Nair vd., 2026). Bunun temel nedeni, bu alt tiplerin çoğunun konvansiyonel hormonal tedavilere veya HER2 hedefli ajanlara yanıt vermemesi ve bu durumun yeni moleküler hedeflerin belirlenmesini zorunlu kılmasıdır (Nair vd., 2026). Bu doğrultuda, hücrel sinyal ağlarında önemli rolleri olabileceği öngörülen Per-Arnt-Sim Kinaz (PASK), son yıllarda stratejik bir odak noktası haline gelmiştir.

Per-Arnt-Sim Kinaz, evrimsel olarak korunmuş bir serin/treonin kinaz olup, hücrel enerji durumunu algılama ve bu sinyalleri anabolik süreçlere dönüştürme kapasitesi nedeniyle son yıllarda ilgi çeken moleküller arasında yer almaktadır (Cardon, 2011; Xu vd., 2025b; Zhang vd., 2015a). PASK geni, 2. kromozomda yer almakta olup 23 ekzon içermekte ve 1323 amino asit uzunluğunda büyük bir protein kodlamaktadır. Bu proteinin yapısı, N-terminalde yer alan duyusal PAS (Per-Arnt-Sim) domainleri ile C-terminalde bulunan katalitik kinaz domaininden oluşmaktadır (Azad, 2022; Rojas vd., 2024).

Bakteriyel atalarında PAS domainleri oksijen, ışık ve redoks potansiyeli gibi çevresel sinyalleri algılamakla görevliken, memeli hücrelerinde bu domainlerin PASK aracılığıyla glukoz algılama, lipid metabolizması ve protein sentezi gibi temel hücrel süreçlerin düzenlenmesinde rol oynayabileceği literatürde bildirilmektedir (Taylor, 2007; Xing vd., 2023; Zhao & Lin, 2021).

Artan deneysel bulgular ve biyoinformatik analizler, PASK'ın yalnızca metabolik bir düzenleyici olmayıp, aynı zamanda kanserde de potansiyel bir onkogenik kinaz olarak işlev görebileceğine işaret etmektedir (Aguilar, 2025; Dhungel vd., 2025; Yu vd., 2024). PASK'ın onkogenik potansiyelinin önemli göstergelerinden biri, normal ve malign dokular arasındaki ekspresyon asimetrisidir (Şekil 21). İnsan Protein Atlası ve TCGA (Kanser Genom Atlası) veri tabanlarını kullanan analizler, PASK'ın meme kanseri hücre hatlarında ve birincil tümör dokularında normal meme epitel hücrelerine göre önemli ölçüde arttığını göstermektedir (Şekil 22).

İnvaziv meme kanseri (BRCA) kohortunda, PASK gen ekspresyonu, normal dokulara (n=114) kıyasla birincil tümörlerde (n=1097) istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermektedir (Şekil 23). Kaplan-Meier kullanılarak yapılan relapsız sağkalım (RFS) analizleri, özellikle ER, PR ve HER2 negatif olan

ÜNMK kohortunda yüksek PASK düzeylerinin kötü gidişatın bağımsız göstergelerinden biri olabileceğini düşündürmektedir.

ÜNMK hastalarında yüksek PASK ekspresyonu, 1,73'lük bir oran ($p = 0,0081$) ile ilişkilendirilmiş olup, bu durum yüksek PASK seviyelerine sahip hastaların hastalık nüksü ve mortalite açısından %73 daha fazla risk altında olduğunu işaret etmektedir (Şekil 24). Lenf nodu pozitif ÜNMK alt grubunda ise risk oranının 1.75'e ($p = 0,039$) çıkması, PASK'ın metastatik süreçler ve ileri evre hastalık progresyonundaki olası rollerini desteklemektedir. Bu klinik veriler, PASK'ın meme kanseri patogenezinde pasif bir izleyici olmaktan ziyade, agresif fenotipi yönlendiren olası bir sürücü kinaz olarak konumlandırılabilirliğini akla getirmektedir. TCGA veri tabanından elde edilen bulgular, kemoterapiye yanıt veren ve vermeyen hasta grupları arasında PASK gen ekspresyon düzeylerinde anlamlı farklar olduğunu; yanıt vermeyen hastalarda PASK ekspresyonunun daha yüksek seyrettiğini göstermektedir (Şekil 25).

Bu sonuçlar, artmış PASK ekspresyonunun kemoterapi direnci ve tümör hücre sağkalım mekanizmaları ile ilişkili olabileceğini düşündürmekte ve PASK'ın tedavi yanıtının öngörülmesinde potansiyel bir biyobelirteç ve terapötik hedef olarak değerlendirilebileceği hipotezini desteklemektedir.

PASK'ın onkojenik karakterinin bir diğer göstergesi, proteinin baskılanmasıyla elde edilen fenotipik değişimlerdir. siRNA veya PASK inhibitörleri gibi gen susturma yöntemleriyle gerçekleştirilen deneyler, PASK eksikliğinin meme kanseri hücrelerinin proliferatif kapasitesini olumsuz etkilediğini göstermektedir. Nitekim MDA-MB 231 hücre hattında PASK 10 siRNA uygulaması ile hücre canlılığının $42,67 \pm 1,53$ seviyesine düştüğü, MCF7 hücre hattında ise bu oranın $49,00 \pm 1,00$ seviyesine gerilediği saptanmıştır ($p < 0,0001$) (Şekil 26C, 26E). Bununla birlikte, PASK gen susturulmasının normal benzeri meme epitel hücreleri (MCF10A) üzerindeki etkileri incelendiğinde, bu uygulamaların hücre canlılığı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı gözlenmiştir (Şekil 27A).

Ayrıca gerçekleştirilen analizlerde western blot ile MCF10A hücrelerinde PASK ifadesinin %53,67 oranında anlamlı bir şekilde baskılandığı da gösterilmiştir (Şekil 27B-C). Bu bulgu, PASK inhibisyonunun malign hücreler üzerindeki seçici toksik etkisinin, normal hücrelere kıyasla kanser hücrelerine özgü bir bağımlılığa işaret edebileceğini desteklemektedir.

Özellikle MDA-MB 231 gibi bazal benzeri agresif ÜNMK hattında, PASK inhibisyonu sonrasında koloni oluşum kapasitesinin anlamlı şekilde azalması, proteinin tümörün klonojenik potansiyeli ve kendi kendini yenileme yeteneğindeki olası kritik rolünü ortaya koymaktadır (Şekil 28A-B, 29A-B). Bu proliferatif etkinin moleküler temeli, PASK'ın bir metabolik sensör olarak ara işlevi ve büyüme sinyal

iletimine katılımından kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir (DeMille & Grose, 2013). Kanser hücreleri, hızlandırılmış proliferasyon için gerekli olan biyokimyasal öncülleri (lipitler, proteinler, nükleik asitler) üretmek üzere metabolizmalarını değiştirirler (Nava & Madrigal Perez, 2022). PASK'ın, hücre içi glukoz seviyelerini tespit ederek mTOR/S6K1 yolunu uyardığı ve aynı zamanda SREBP1c proteininin proteolitik olgunlaşmasını teşvik ederek lipogenik programı başlatabileceği bildirilmektedir (DeMille & Grose, 2013; Hurtado-Carneiro vd., 2014; Pérez-García vd., 2018; Wu vd., 2014). Lipid sentezinin artışı, yeni hücre zarlarının gelişimi için önem taşımaktadır. Sonuç olarak, PASK susturulduğunda hücrelerin sadece büyüme sinyallerini kaybetmekle kalmadığı, aynı zamanda anabolik yeteneklerinin zayıflaması nedeniyle çoğalmalarının da baskılandığı düşünülmektedir. PASK'ın anti-apoptotik fonksiyonu, protein susturulduğunda devreye giren "intrinsek apoptoz" kaskadı ile açıklanabilmektedir.

PASK siRNA tedavisinin Kaspaz 3 ve Kaspaz 7 aktivasyonunu tetiklediği ve hücreleri kaspaza bağımlı apoptoza sürüklediği gözlenmiştir. Kaspaz 3/7 aktivite oranlarındaki artış, PASK'ın hücre yaşamsallığını korumak için pro-apoptotik sinyalleri sürekli baskılama eğiliminde olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgular, Anneksin V/PI boyama analizleri ile de desteklenmiş olup, PASK inhibisyonunun erken ve geç apoptoz evresindeki hücre popülasyonunu anlamlı düzeyde artırdığı saptanmıştır. MDA-MB 231 hücre hattında toplam apoptotik popülasyon $26,00 \pm 1,00$ seviyesine ulaşırken, MCF7 hücre hattında ise $21,00 \pm 2,00$ seviyesine çıkmıştır ($p < 0,001$) (Şekil 30A-D, Şekil 31A-D). Apoptozun indüklenmesindeki merkezi olaylardan birinin, mitokondriyal membran potansiyelinin çökmesi olduğu bilinmektedir. JC-1 boyaması sonuçları, PASK inhibisyonunun mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkili olabileceğini ve düşük Delta oranına sahip hücre popülasyonunu belirgin şekilde artırdığını ortaya koymuştur (Şekil 32A-D).

Mitokondriyal homeostazın korunması, kanser hücrelerinin metabolik stres koşullarında hayatta kalmasını sağlayan kritik bir adaptasyon mekanizması olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, PASK'ın ROS (reaktif oksijen türleri) homeostazındaki rolü, proteinin antioksidan savunma mekanizmalarını (MnSOD, GPx gibi enzimler üzerinden) uyarabileceğini düşündürmektedir. PASK yokluğunda artan oksidatif stresin, mitokondriyal membran bütünlüğünü bozabileceği ve sitokrom-c salınımı ile apoptoz kaskadını geri dönülemez şekilde başlatabileceği öngörülmektedir. Mitofaji sürecindeki olası düzenleyici rolü de göz önüne alındığında PASK'ın, hasarlı mitokondrilerin temizlenmesini yöneterek hücreyi metabolik stres kaynaklı ölümden koruyan bir sağkalım faktörü olarak işlev görebileceği varsayılmaktadır.

PASK'ın onkojenik etkisi, hücre içindeki kritik sinyal iletim yollarını aynı anda manipüle etme yeteneğinden kaynaklanıyor olabilir. Bu "multi-nodal" regülasyon, proteinin bir onkojen olarak işlev görme potansiyelini açıklayan mantıklı bir zemin sunmaktadır.

PASK'ın çekirdek lokalizasyonu ve MLL2 kompleksi aracılığıyla histon H3K4 metilasyonunu kontrol etmesi, proteinin hücre farklılaşmasını küresel gen ekspresyonu seviyesinde inhibe edebileceğine ve hücreleri pro-proliferatif, kök hücre benzeri bir durumda tutabileceğine işaret etmektedir (Karakkat vd., 2019; Xiao vd., 2023).

PASK siRNA uygulaması sonrasında S-fazındaki hücre popülasyonunda görülen anlamlı azalma ve alt-G1 (apoptotik/ölü hücre) fraksiyonundaki artış, proteinin yokluğunda hücre döngüsünün stabilize edilemediğini ve hücrelerin ölüme sürüklendiğini göstermektedir (Şekil 33A-D). Moleküler düzeyde PASK'ın, "Siklin-CDK" kompleksleri ve onların inhibitörleri (CKI) arasındaki hassas dengeyi tümör lehine değiştirdiği düşünülmektedir.

DeneySEL bulgular, MDA-MB 231 Hücre Hattında, PASK 10 siRNA uygulaması sonrasında PASK ve Siklin D1 ekspresyon düzeylerinin sırasıyla $35,00 \pm 1,00$ ve $35,33 \pm 0,58$ seviyelerine gerilediğini, Siklin A düzeyinin ise $54,00 \pm 1,00$ olarak gerçekleştiğini göstermektedir. Buna karşın, hücre döngüsü inhibitörü olan P27 protein ekspresyonu $369,00 \pm 1,00$ seviyesine kadar yükseldiği gözlenmiştir ($p < 0,001$) (Şekil 34A-B). Siklin D1, G1 fazının ilerlemesi için anahtar proteinlerden biridir ve meme kanserlerinin önemli bir kısmında onkojenik bir motor görevi gördüğü bilinmektedir (Montalto & De Amicis, 2020). PASK'ın Siklin D1 üzerindeki etkisinin çift yönlü olabileceği öngörülmektedir.

İlk olarak, PASK nükleusa girerek Siklin D1 transkripsiyonunu doğrudan veya aracılar üzerinden artırabilir; ikinci olarak ise GSK3 β inhibisyonu üzerinden Siklin D1'in proteazomal yıkımını engelleyerek protein stabilitesine katkı sağlayabilir. Daha da önemlisi, PASK inhibisyonunun, güçlü bir hücre döngüsü durdurucu olan p27 Kip1 protein düzeylerini yukarı regüle ettiği saptanmıştır (Şekil 34A-B). p27 Kip1 artışı, hücreleri G1 evresinde hapsederek kontrolsüz bölünmeyi frenleyebilir. PASK'ın bu dengedeki onkojenik rolünün, hücre döngüsü "frenlerini" (p27) serbest bırakmak ve "gaz pedalını" (Siklin D1) sürekli aktif tutmak şeklinde gerçekleştiği ileri sürülebilir.

PASK inhibisyonunun p53 düzeyleri üzerindeki etkisinin, hücre hattının moleküler profiline göre farklılık gösterdiği saptanmıştır. Vahşi tip (wild-type) p53 içeren MCF7 hücrelerinde PASK inhibisyonu ile p53 düzeylerinin yukarı regüle olması, hücrenin doğal apoptoz mekanizmalarının tekrar tetiklendiğine ve tümör baskılayıcı yanıtın restore edildiğine işaret edebilir. Öte yandan, mutant p53 taşıyan MDA-MB-231 hücrelerinde PASK inhibisyonuna bağlı olarak mutant p53 düzeylerinin azalması, bu agresif

hücrelerin hayatta kalma ve direnç kazanma mekanizmalarının (mutant p53'ün onkojenik fonksiyon kazanımı etkileri dahil) kırılabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla, PASK inhibisyonunun her iki hücre tipinde de farklı ama sonuç olarak 'anti-tümöral' bir etki yaratma potansiyeli taşıdığı görülmektedir (Şekil 35A-B). Programlanmış hücre ölümünden kaçınma yeteneği, meme kanseri hücrelerinin kemoterapiye direnç göstermesinin ve metastatik yayılımının temel nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir.

p38 mitojen-aktif protein kinaz (MAPK) yolu, kanser biyolojisinde çift taraflı keskin bir kılıç gibi işlev görerek hem apoptozu hem de sağkalımı yönetebilmektedir. PASK'ın meme kanseri hücrelerinde p38 MAPK yolunu indüklemeye eğiliminde olduğu saptanmıştır (Şekil 36A-B). PASK aracılı p38 aktivasyonunun, muhtemelen stresli tümör mikroçevresinde (hipoksi, besin yoksunluğu) hücrelerin adaptasyonunu ve sağkalımını destekleyen genetik programları (örneğin HSP70 veya anti-apoptotik sitokinler) aktive ettiği tahmin edilmektedir. PASK yokluğunda p38 MAPK aktivitesinin bozulması, hücrenin çevresel stres faktörlerine karşı savunmasız kalmasına ve erken ölüme yol açıyor olabilir. Hücre döngüsünün G1 fazında hapsedilmesi ve proliferasyon motorunun yavaşlaması, tümör adhezyonu ve morfolojik stabilite üzerinde de doğrudan yansımalar bulabilir. Nitekim yürütülen *in vitro* analizlerde PASK'ın siRNA aracılığıyla fonksiyon dışı bırakılması, meme kanseri hücrelerinde tipik epitel benzeri morfolojik bütünlüğün kaybolmasına, sitoplazmik büzüşmelere ve mono katman yoğunluğunda belirgin bir seyreltiye yol açmıştır. Bu durum, hücre iskeleti (vimentin) dinamiklerinin PASK bağımlı aşağı akım sinyal ağları tarafından koordine edilebileceği ve kinaz yokluğunda hücrelerin tutunma özelliklerini kaybederek yuvarlaklaştığı hipotezini moleküler düzeyde destekler niteliktedir (Şekil 36A-B, 37).

Glikojen sentaz kinaz 3 beta (GSK3β), normal şartlarda beta-katenin ve Siklin D1 gibi onkojenik proteinleri fosforilleyerek yıkıma uğratan bir tümör baskılayıcı gibi davranmaktadır. Ancak, GSK3β'nin Serin-9 (Ser9) pozisyonundan fosforillenmesi, bu enzimi inaktive etmektedir. Deneysel bulgular, PASK'ın GSK3β 'yi Ser9 üzerinden doğrudan fosforilleyebileceğini göstermektedir (Semache vd., 2013) (Şekil 38A-B, 39A-B, 40A-B).

Bununla birlikte PASK'ın, meme kanseri hücrelerinde invazyon, göç ve metastatik yeteneği stimüle ettiği bilinen proto-onkojenik SRC kinaz yolağı ile de yakın ilişkili olabileceği değerlendirilmektedir.

PASK susturulduğunda veya farmakolojik olarak inhibe edildiğinde (BioE-1115), P- GSK3β (Ser9) seviyeleri belirgin şekilde düşmektedir. SRC aktivitesinin PASK'a bu derece bağımlı görünmesi, proteinin metastatik potansiyeli nasıl yönettiğinin olası bir açıklaması olarak öngörülmektedir. PASK'ın, muhtemelen SRC ile doğrudan fiziksel etkileşime girerek veya SRC'nin negatif regülatörü olan CSK

kinazını baskılayarak bu aktivasyonu sürdürdüğü tahmin edilmektedir. Sonuç olarak PASK inhibisyonunun, mevcut kemoterapötik ajanların etkisini artırabileceği (duyarlılaştırma) ve direnç mekanizmalarını kırabileceği öngörülmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması, evrimsel olarak korunmuş bir serin/treonin kinaz olan Per-Arnt-Sim Kinaz (PASK) proteininin, meme kanseri karsinogenezi ve progresyonu üzerindeki multifaktöriyel onkojenik rollerini *in vitro* deneysel modeller vasıtasıyla kapsamlı bir şekilde ortaya koymaktadır.

PASK, sadece bağımsız bir sinyal molekülü olarak değil, aynı zamanda hücresel proliferasyon ile metabolik anabolik süreçleri dinamik olarak senkronize eden merkezi bir metabolik regülatör olarak işlev görmektedir. Hücre döngüsü kontrol noktalarını deaktive ederek kontrolsüz mitotik aktiviteyi tetikleyen bu kinaz, eş zamanlı olarak mitokondriyal membran bütünlüğünü ve membran potansiyelini korumak suretiyle programlanmış hücre ölümü (apoptoz) mekanizmalarından kaçışı yönetmektedir.

Moleküler sinyal iletim ağlarında PASK, özellikle malign fenotipin sürdürülmesinde kritik öneme sahip olan SRC ve Glikojen Sentaz Kinaz 3 Beta (GSK3 β) gibi kritik kaskadları upstream (üst akış) düzeyde regüle ederek hücre içi sinyal iletimini kalıcı olarak aktive etmektedir. Ayrıca proteinin, epiteliyal polarite ve hücreler arası bağlantı komplekslerinin kaybı ile karakterize olan Epitelyal-Mezenkimal Geçiş (EMG) programını transkripsiyonel düzeyde indüklemesi, tümör hücrelerinin invaziv ve metastatik kapasitesini dramatik ölçüde hızlandırmaktadır. Bu çok yönlü etki mekanizmaları, PASK'ı kanserin ayırt edici temel özelliklerinin neredeyse tamamında rol oynayan kilit bir regülatör haline geldiğini önermektedir.

Gelecekte yürütülecek olan moleküler araştırmaların, PASK'ın östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) gibi steroid hormon reseptörleri ile olan fonksiyonel çapraz etkileşimlerini protein-protein interaksiyon düzeyinde daha derinlemesine incelemesi gerektiği öngörülmektedir. PASK'ın hücresel enerji durumuna ve metabolik streslere yanıt veren bir "hormon sensörü" olarak işlev görmesi, endokrin ve hormonal tedavilere karşı gelişen kazanılmış direnç mekanizmalarının moleküler temelini netleştirmede kritik bir dönüm noktası olacaktır. Buna ek olarak, klinik öncesi aşamada *in vitro* elde edilen bu verilerin validasyonu için, *in vivo* hayvan modellerinde (xenograft/ortotopik modeller) spesifik PASK inhibitörlerinin ve siRNA formülasyonlarının test edilmesi elzemdir.

Bu sistemik yaklaşımlar, PASK inhibisyonunun sadece tümör kütlesi üzerindeki sitotoksik etkilerini değil, aynı zamanda kompleks tümör mikroçevresi, anjiyogenez mekanizmaları ve antitümöral immün infiltrasyon (T-hücre aktivasyonu ve makrofaj polarizasyonu gibi) üzerindeki küresel etkilerini de açığa çıkararak translasyonel tıp ve klinik denemelerin önünü açacaktır.

Mevcut deneysel bulgular bütünüyle değerlendirildiğinde, PASK'ın, özellikle hedefe yönelik biyolojik tedavi seçeneklerinin son derece sınırlı olduğu ve konvansiyonel rejimlere karşı yüksek kemodirenç gösteren Üçlü Negatif Meme Kanseri (ÜNMK) olgularında hem kötü prognozu öngören güçlü bir prognostik biyobelirteç hem de RNA interferans (RNAi) tabanlı stratejiler için yüksek seçiciliğe sahip, yeni nesil bir terapötik hedef olduğu kanıtlanmıştır. Sonuç olarak, PASK sinyal yolağının terapötik olarak baskılanması, geleceğin kişiselleştirilmiş tıp ve tıbbi onkoloji pratiklerinde paradigma değiştiren bir tedavi stratejisi sunma potansiyeli taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Al-Shami, K., vd. (2023). Estrogens and the risk of breast cancer: A narrative review of literature. *Heliyon*, 9(9), e19614. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e20224>
- Alshammari, E., vd. (2022). Aberrant DNA methylation of tumor suppressor genes and oncogenes as cancer biomarkers. *Genomic and Epigenomic Biomarkers of Toxicology and Disease: Clinical and Therapeutic Actions*, 251-271. <https://doi.org/10.1002/9781119807704.ch12>
- Andrade de Oliveira, K., vd. (2023). The complex nature of heterogeneity and its roles in breast cancer biology and therapeutic responsiveness. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1083048. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1083048>
- Arnold, M., vd. (2022). Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *The breast*, 66, 15-23. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2022.08.010>
- Asgari-Karchekani, S., vd. (2022). The role of her2 alterations in clinicopathological and molecular characteristics of breast cancer and her2-targeted therapies: A comprehensive review. *Medical Oncology*, 39(12), 210. <https://doi.org/10.1007/s12032-022-01817-6>
- Azad, R. (2022). Structural basis of signal transduction within environmental sensing pas regulated ser/thr kinases. *Biophysical Journal*, 121(3), 451a-452a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.11.1864>
- Babashah, S., & Soleimani, M. (2011). The oncogenic and tumour suppressive roles of micrnas in cancer and apoptosis. *European journal of cancer*, 47(8), 1127-1137. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.02.015>
- Bisoyi, P. (2022). Malignant tumors—as cancer. In *Understanding cancer* (pp. 21-36). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99883-3.00011-1>
- Botezatu, C., vd. (2025). The five-year outcomes of breast cancer surgical management at the colentina surgical clinic, bucharest, romania: A descriptive retrospective analysis between 2019 and 2023. *Life*, 15(1), 92. <https://doi.org/10.3390/life15010092>
- Bray, F., vd. (2018). Global cancer statistics 2018: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424.

- Bray, F., vd. (2012). Global cancer transitions according to the human development index (2008–2030): A population-based study. *The lancet oncology*, 13(8), 790-801. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21492>
- Cardon, C. M. (2011). *Per-arnt-sim kinase regulates nutrient utilization and growth*. The University of Utah.
- Cardon, C. M., & Rutter, J. (2012). Pas kinase: Integrating nutrient sensing with nutrient partitioning. *Semin Cell Dev Biol*, 23(6), 626-630. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.12.007>
- Chen, X., vd. (2022). Mutant p53 in cancer: From molecular mechanism to therapeutic modulation. *Cell death & disease*, 13(11), 974. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05408-1>
- Crintea, A., vd. (2026). Overcoming chemotherapy resistance in triple-negative breast cancer with nanocarrier-delivered sirna therapeutics. *Journal of Clinical Medicine*, 15(6), 2311. <https://doi.org/10.3390/jcm15062311>
- da Silva Xavier, G., vd. (2011). Per-arnt-sim (pas) domain-containing protein kinase is downregulated in human islets in type 2 diabetes and regulates glucagon secretion. *Diabetologia*, 54(4), 819-827. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-2010-7>
- Dana, H., vd. (2017). Molecular mechanisms and biological functions of sirna. *Int J Biomed Sci*, 13(2), 48-57.
- Dasegowda, M., vd. (2026). Breast cancer basics: Understanding the disease and its challenges. In *Nano theragnostics in breast cancer: Advances, challenges, and future prospects* (pp. 51-88). Springer.
- Dębska-Szmich, S., & Potemski, P. (2026). Adjuvant systemic treatment in luminal breast cancer—what else apart from hormone therapy? *Oncology in Clinical Practice*, 22 <https://doi.org/10.5603/ocp.50816>
- DeMille, D., & Grose, J. H. (2013). Pas kinase: A nutrient sensing regulator of glucose homeostasis. *IUBMB Life*, 65(11), 921-929. <https://doi.org/10.1002/iub.1219>
- DeMille, D., vd. (2019). The regulation of cbf1 by pas kinase is a pivotal control point for lipogenesis vs. Respiration in *saccharomyces cerevisiae*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 9(1), 33-46. <https://doi.org/10.1002/iub.1219>
- DeSantis, C. E., vd. (2016). Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66(1), 31-42. <https://doi.org/10.3322/caac.21320>

- Dhungel, S., vd. (2025). Structural assembly of the pas domain drives the catalytic activation of metazoan pask. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 122(12), e2409685122. <https://doi.org/10.1073/pnas.2409685122>
- Dongil, P., vd. (2020). Pas kinase deficiency reduces aging effects in mice. *Aging (Albany NY)*, 12(3), 2275-2301. <https://doi.org/10.18632/aging.102745>
- Eckhardt, K., vd. (2007). Male germ cell expression of the pas domain kinase paskin and its novel target eukaryotic translation elongation factor eef1a1. *Cell Physiol Biochem*, 20(1-4), 227-240. <https://doi.org/10.1159/000104169>
- Freihat, O., vd. (2025). Global burden and projections of breast cancer incidence and mortality to 2050: A comprehensive analysis of globocan data. *Frontiers in Public Health*, 13 1622954. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2025.1622954>
- Garcia, K. C., vd. (2026). Pi3k regulates taz/yap and mtorc1 axes that can be synergistically targeted. *JCI insight*, 11(6), e191600. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.191600>
- Garg, P., vd. (2024). Emerging therapeutic strategies to overcome drug resistance in cancer cells. *Cancers (Basel)*, 16(13), 2478. <https://doi.org/10.3390/cancers16132478>
- Giaquinto, A. N., vd. (2022). Breast cancer statistics, 2022. *CA: a cancer journal for clinicians*, 72(6), 524-541. <https://doi.org/10.3322/caac.21754>
- Giaquinto, A. N., vd. (2024). Breast cancer statistics 2024. *CA Cancer J Clin*, 74(6), 477-495. <https://doi.org/10.3322/caac.21863>
- Gonullu, B., vd. (2023). Her2 amplification level predicts pathological complete response in the neoadjuvant setting of her2-overexpressing breast cancer: A meta-analysis and systematic review. *Int J Mol Sci*, 24(4), 3590.
- Grose, J. H., & Rutter, J. (2010). The role of pas kinase in passing the glucose signal. *Sensors (Basel)*, 10(6), 5668-5682. <https://doi.org/10.3390/s100605668>
- Gu, S., vd. (2016). Therapeutic sirna for drug-resistant her2-positive breast cancer. *Oncotarget*, 7(12), 14727.
- Gul, S., vd. (2025). Machine learning-based prognostic signature in breast cancer: Regulatory t cells, stemness, and deep learning for synergistic drug discovery. *Int J Mol Sci*, 26(14), <https://doi.org/10.3390/ijms26146995>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31-46.

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Hao, H. X., & Rutter, J. (2008). The role of pas kinase in regulating energy metabolism. *IUBMB Life*, 60(4), 204-209. <https://doi.org/10.1002/iub.32>
- Hurtado-Carneiro, V., vd. (2021). Preventing oxidative stress in the liver: An opportunity for glp-1 and/or pask. *Antioxidants (Basel)*, 10(12), <https://doi.org/10.3390/antiox10122028>
- Hurtado-Carneiro, V., vd. (2014). Pas kinase is a nutrient and energy sensor in hypothalamic areas required for the normal function of ampk and mtor/s6k1. *Molecular Neurobiology*, 50(2), 314-326. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8665-9>
- Joyce, C., vd. (2023). Tumor-suppressor genes. In *Statpearls [internet]*. StatPearls Publishing.
- Karakkat, J. V., vd. (2019). The metabolic sensor pask is a histone 3 kinase that also regulates h3k4 methylation by associating with h3k4 mll2 methyltransferase complex. *Nucleic acids research*, 47(19), 10086-10103. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz802>
- Kikani, C. K., vd. (2017). Mtorc1 activates pask-wdr5 signaling to epigenetically connect the nutrient status with myogenesis. *bioRxiv*, 232173. <https://doi.org/10.1101/232173>
- Kikani, C. K., vd. (2016). Pask integrates hormonal signaling with histone modification via wdr5 phosphorylation to drive myogenesis. *Elife*, 5 e17985. <https://doi.org/10.7554/eLife.17985>
- Kim, J., vd. (2025). Global patterns and trends in breast cancer incidence and mortality across 185 countries. *Nat Med*, 31(4), 1154-1162. <https://doi.org/10.1038/s41591-025-03502-3>
- Lee, S.-H., vd. (2022). Insulin resistance: From mechanisms to therapeutic strategies. *Diabetes Metab J*, 46(1), 15-37. <https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0280>
- Li, N., vd. (2023). Srebp regulation of lipid metabolism in liver disease, and therapeutic strategies. *Biomedicines*, 11(12), <https://doi.org/10.3390/biomedicines11123280>
- Libson, S., & Lippman, M. (2014). A review of clinical aspects of breast cancer. *International review of psychiatry*, 26(1), 4-15. <https://doi.org/10.3109/09540261.2013.852971>
- Liu, Z., vd. (2024). Multi-stage mechanisms of tumor metastasis and therapeutic strategies. *Signal transduction and targeted therapy*, 9(1), 270. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01955-5>
- Lucena Aguilar, F. (2025). *Identifying novel hereditary prostate cancer predisposing genes in finnish high-risk prostate cancer cohort and families* University of Turku]. Finland. <https://urn.fi/URN:NBN:fi-fe2025070377367>

- Makkar, S. K. (2025). Advances in rna-based therapeutics: Current breakthroughs, clinical translation, and future perspectives. *Front Genet*, 16 1675209. <https://doi.org/10.3389/fgene.2025.1675209>
- Manfioletti, G., & Fedele, M. (2023). Epithelial–mesenchymal transition (emt). In (Vol. 24, pp. 11386): MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms241411386>
- Matthews, H. K., vd. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature reviews Molecular cell biology*, 23(1), 74-88. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>
- Montalto, F. I., & De Amicis, F. (2020). Cyclin d1 in cancer: A molecular connection for cell cycle control, adhesion and invasion in tumor and stroma. *Cells*, 9(12), 2648. <https://doi.org/10.3390/cells9122648>
- Moon, J., vd. (2023). DNA damage and its role in cancer therapeutics. *Int J Mol Sci*, 24(5), 4741. <https://doi.org/10.3390/ijms24054741>
- Möglich, A., vd. (2009). Structure and signaling mechanism of per-arnt-sim domains. *Structure*, 17(10), 1282-1294. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.08.011>
- Nair, G. R., vd. (2026). Comparative insights on conventional and advanced therapeutics for triple negative breast cancer: Challenges and future outlooks. *Biomedical and Therapeutics Letters*, 13(2), 1865-1865. <https://doi.org/10.62110/sciencein.btl.2026.v13.1865>
- Nava, G. M., & Madrigal Perez, L. A. (2022). Metabolic profile of the warburg effect as a tool for molecular prognosis and diagnosis of cancer. *Expert review of molecular diagnostics*, 22(4), 439-447. <https://doi.org/10.1080/14737159.2022.2065196>
- Neumeier, J., & Meister, G. (2020). Sirna specificity: Rnai mechanisms and strategies to reduce off-target effects. *Front Plant Sci*, 11 526455. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.526455>
- Ngamcherdtrakul, W., & Yantasee, W. (2019). Sirna therapeutics for breast cancer: Recent efforts in targeting metastasis, drug resistance, and immune evasion. *Transl Res*, 214 105-120. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2019.08.005>
- Organization, W. H. (2023). *Global breast cancer initiative implementation framework: Assessing, strengthening and scaling-up of services for the early detection and management of breast cancer*. World Health Organization.
- Orrantia-Borunda, E., vd. (2022). Subtypes of breast cancer. *Breast Cancer* [Internet], <https://doi.org/10.36255/exon-publications-breast-cancer-subtypes>

- Pandey, P., vd. (2022). Revolutionization in cancer therapeutics via targeting major immune checkpoints pd-1, pd-l1 and ctla-4. *Pharmaceuticals*, 15(3), 335. <https://doi.org/10.3390/ph15030335>
- Pape, J. A., vd. (2018). Per-arnt-sim kinase (pask) deficiency increases cellular respiration on a standard diet and decreases liver triglyceride accumulation on a western high-fat high-sugar diet. *Nutrients*, 10(12), <https://doi.org/10.3390/nu10121990>
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12(4), 252-264. <https://doi.org/10.1038/nrc3239>
- Pérez-García, A., vd. (2018). Pas kinase deficiency alters the glucokinase function and hepatic metabolism. *Scientific reports*, 8(1), 11091. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29443-7>
- Prakash, O., vd. (2020). Racial disparities in triple negative breast cancer: A review of the role of biologic and non-biologic factors. *Frontiers in Public Health*, 8 576964. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.576964>
- Rojas, B. L., vd. (2024). Dimerization rules of mammalian pas proteins. *Journal of molecular biology*, 436(3), 168406. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.168406>
- Saha, S., vd. (2024). A comprehensive review on unravelling the complexity of blood cancer. *Blood Journal*, 6 7. <https://doi.org/10.47583/ijpsrr.2024.v84i03.020>
- Sai, B. M., vd. (2024). Therapeutic delivery of sirna for the management of breast cancer and triple-negative breast cancer. *Ther Deliv*, 15(11), 871-891. <https://doi.org/10.1080/20415990.2024.2400044>
- Semache, M., vd. (2013). Per-arnt-sim kinase regulates pancreatic duodenal homeobox-1 protein stability via phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 β in pancreatic β -cells. *J Biol Chem*, 288(34), 24825-24833. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.495945>
- Shoari, A., vd. (2024). Targeting invasion: The role of mmp-2 and mmp-9 inhibition in colorectal cancer therapy. *Biomolecules*, 15(1), 35. <https://doi.org/10.3390/biom15010035>
- Smolarz, B., vd. (2022). Breast cancer-epidemiology, classification, pathogenesis and treatment (review of literature). *Cancers (Basel)*, 14(10), <https://doi.org/10.3390/cancers14102569>
- Sparmann, A., & Vogel, J. (2023). Rna-based medicine: From molecular mechanisms to therapy. *Embo j*, 42(21), e114760. <https://doi.org/10.15252/embj.2023114760>
- Swiatek, W., vd. (2020). Validation of pas kinase, a regulator of hepatic fatty acid and triglyceride synthesis, as a therapeutic target for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology Communications*, 4(5), 696-707. <https://doi.org/10.1002/hep4.1498>

- Tanwisa, T., vd. (2025). Role of myc inhibition in overcoming resistance to her2-targeted therapies for breast cancer. *Life Sci*, 379 123902. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2025.123902>
- Tarin, D. (2023). The tumour system. In *Understanding cancer: The molecular mechanisms, biology, pathology and clinical implications of malignant neoplasia* (pp. 61-91). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-031-23073-9_3
- Taylor, B. L. (2007). Aer on the inside looking out: Paradigm for a pas–hamp role in sensing oxygen, redox and energy. *Molecular microbiology*, 65(6), 1415-1424. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05884.x>
- Thomas, A., vd. (2023). Rare subtypes of triple negative breast cancer: Current understanding and future directions. *NPJ Breast Cancer*, 9(1), 55. <https://doi.org/10.1038/s41523-023-00563-1>
- Thomas, A. F., vd. (2022). Of the many cellular responses activated by tp53, which ones are critical for tumour suppression? *Cell Death & Differentiation*, 29(5), 961-971. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00962-0>
- Vousden, K. H., & Lane, D. P. (2007). P53 in health and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(4), 275-283. <https://doi.org/10.1038/nrm2147>
- Voutsadakis, I. A., & Stravodimou, A. (2023). Homologous recombination defects and mutations in DNA damage response (ddr) genes besides brca1 and brca2 as breast cancer biomarkers for parp inhibitors and other ddr targeting therapies. *Anticancer research*, 43(3), 967-981. <https://doi.org/10.21873/anticanres.16262>
- Wadgaonkar, P. (2024). Environmental causes of cancer. In *Cancer epigenetics and nanomedicine* (pp. 69-92). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18958-5.00004-2>
- Wang, C.-E., vd. (2025). Clinical development prospects of sirna drugs for tumor therapy: Analysis of clinical trial registration data from 2004 to 2024. *Frontiers in Pharmacology*, Volume 16 - 2025 <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1637958>
- Waykar, R., & Kumarapillai, S. (2024). Breast cancer histopathology, classification and clinical management: Current perspectives. *Bioinformation*, 20(12), 2069. <https://doi.org/10.6026/973206300202069>
- Will, M., vd. (2023). Therapeutic resistance to anti-oestrogen therapy in breast cancer. *Nature Reviews Cancer*, 23(10), 673-685. <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00593-4>

- Wojtukiewicz, M. Z., vd. (2021). Inhibitors of immune checkpoints—pd-1, pd-l1, ctla-4—new opportunities for cancer patients and a new challenge for internists and general practitioners. *Cancer and Metastasis Reviews*, 40(3), 949-982. <https://doi.org/10.1007/s10555-021-09976-0>
- Wolf, J., vd. (2024). Human papillomavirus infection: Epidemiology, biology, host interactions, cancer development, prevention, and therapeutics. *Reviews in Medical Virology*, 34(3), e2537. <https://doi.org/10.1002/rmv.2537>
- Wu, X., & Romero, D. (2014). Pas kinase drives lipogenesis through srebp-1 maturation. *Cell Rep*, 8(1), 242-255. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.006>
- Xiao, M., vd. (2023). Pask links cellular energy metabolism with a mitotic self-renewal network to establish differentiation competence. *Elife*, 12 e81717. <https://doi.org/10.7554/eLife.81717>
- Xing, J., vd. (2023). Origin and functional diversification of pas domain, a ubiquitous intracellular sensor. *Science Advances*, 9(35), eadi4517. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adi4517>
- Xu, S., vd. (2025a). 'Druggability' of the per-arnt-sim (pas) domains of human pas domain kinase, a therapeutic target for metabolic and liver disorders. *QRB Discov*, 6 e18. <https://doi.org/10.1017/qrd.2024.1>
- Xu, X., vd. (2013). Transcriptional control of hepatic lipid metabolism by srebp and chrebp. *Semin Liver Dis*, 33(4), 301-311. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1358523>
- Yousefi, T., vd. (2024). Innovating cancer treatment through cell cycle, telomerase, angiogenesis, and metastasis. *DNA and Cell Biology*, 43(9), 438-451. <https://doi.org/10.1089/dna.2024.0109>
- Yu, J., vd. (2024). Unveiling potential: Urinary exosomal mrnas as non-invasive biomarkers for early prostate cancer diagnosis. *BMC urology*, 24(1), 163. <https://doi.org/10.1186/s12894-024-01540-6>
- Zagami, P., & Carey, L. A. (2022). Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. *NPJ Breast Cancer*, 8(1), 95. <https://doi.org/10.1038/s41523-022-00468-0>
- Zhang, D.-d., vd. (2015a). Per-arnt-sim kinase (pask): An emerging regulator of mammalian glucose and lipid metabolism. *Nutrients*, 7(9), 7437-7450. <https://doi.org/10.3390/nu7095347>
- Zhao, Y., & Lin, X. (2021). A pas protein directs metabolic reprogramming during cryptococcal adaptation to hypoxia. *Mbio*, 12(2), 10.1128/mbio.03602-03620. <https://doi.org/10.1128/mBio.03602-20>

EKLER

EK. 1. Etik Kurul Gerek Olmadığına Dair Belge