

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI



**YENİ SENTEZLENEN FLAVONOİD TÜREVİ BİLEŞİKLERİN
AKCİĞER ADENOKARSİNOMA HÜCRELERİNDE JAK/STAT
YOLAĞI ÜZERİNDE ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ
Haluk ULUCA

Danışman
Doç. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK

HATAY - 2020

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI

**YENİ SENTEZLENEN FLAVONOİD TÜREVİ BİLEŞİKLERİN
AKCİĞER ADENOKARSİNOMA HÜCRELERİNDE JAK/STAT
YOLAĞI ÜZERİNDE ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ
Haluk ULUCA

Danışman

Doç. Dr. Meral URHAN KÜÇÜK

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
18.D.005 nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY - 2020

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOKİMYA VE GENETİK (TIP) ANABİLİM DALI

**YENİ SENTEZLENEN FLAVONOİD TÜREVİ BİLEŞİKLERİN
AKCİĞER ADENOKARSİNOMA HÜCRELERİNDE JAK/STAT
YOLAĞI ÜZERİNDE ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ
Haluk ULUCA

Bu tez isimleri aşağıda yazılı olan tez jürisi tarafından 23.01.2020 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri Başkanı: Prof Dr. Abdullah ARPACI
Üye: Prof Dr. Gül ÖZYILMAZ
Üye: Prof Dr. Öztekin ALGÜL
Üye: Doç.Dr. Meral URHAN KÜÇÜK
Üye: Dr. Öğr. Üyesi Zuhul ALTINTAŞ

Bu tez, Enstitümüz Moleküler Biyokimya ve Genetik (Tıp) Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimde engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bilimsel ve manevi desteğini benden asla esirgemeyen, her koşulda özverisiyle yanımda duran sevgili tez danışmanım, Sayın Hocam Doç. Dr. Meral Urhan KÜÇÜK'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez çalışmalarımnda değerli katkılarını esirgemeyen Hasret Ecevit ve Cem Abidoğlu'na teşekkürü bir borç bilirim. Tez sürecinin başından sonuna kadar geçen süreçte farmakolojik bigisi ve yeni sentezlenen flavonoidlerin temininde bana yardımcı olan Prof. Dr. Öztekin ALGÜL hocama şükranlarımı sunarım.

Başta Dr. Öğr. Üyesi. Gülay Gülbol DURAN ve Prof. Dr. Abdullah ARPACI hocalarım olmak üzere, tez döneminde bana akademik vizyon kazandıran Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyokimya ve Genetik bölümünün tüm değerli hocalarıma, sürekli güler yüzleriyle beni karşılayan ve motive eden bölümün değerli öğrencilerine sonsuz saygılarımı sunarım.

Ayrıca sayın hocam Prof. Dr. Gül ÖZYILMAZ'a ve değerli eşi Prof. Dr. Ali Tuncay ÖZYILMAZ'a hayatımın her alanında olduğu gibi doktora sürecimde de sağladıkları manevi desteklerinden dolayı en içten sevgi ve saygılarımı sunarım.

Doktora sürecimde maddi ve manevi desteklerini bir an olsun eksik etmeyen, anneme, babama ve kardeşlerime en derin minnetlerimi ve sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	VIII
ÖZET	X
ABSTRACT.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Sinyal İletimi ve STAT Proteinleri	4
2.2. STAT Proteinlerinin yapısı	4
2.3. STAT Proteinlerinin İzofomları.....	5
2.4. STAT aktivasyonu ve düzenlenmesinin mekanizması	6
2.5. Janus kinaz ailesi.....	8
2.6. STAT proteinlerinin nükleer önemi ve Salınımı.....	10
2.7. STAT'ların Negatif Düzenleyicileri	11
2.8. SOCS inhibitör ailesi	12
2.9. STAT'ların biyolojik işlevleri	14
2.9.1. STAT1.....	14
2.9.2. STAT2.....	15
2.9.3. STAT3.....	15
2.9.4. STAT4.....	15
2.9.5. STAT5.....	15
2.9.6. STAT6.....	16
2.10. STAT proteinleri ve kanser.....	16
2.11. STAT3 Proteinlerinin Biyolojik işlevleri.....	17
2.11.1. Farelerde STAT3 koşullu gen hedefleme	17
2.11.2. İnsan hastalıklarında STAT3 işlevi.....	18
2.11.3. Kanserde STAT3.....	19
2.11.4. STAT3 hedef genleri.....	20
2.12. Flavonoidler	22
2.12.1. Flavonoidlerin Fizyolojisi	24

2.12.2. Flavonoidlerin Terapötik Amaçlı Kullanımı.....	25
2.11.3. Flavonoidler ve Kanser	26
2.12.4. Flavonoidlerin Epigenetik Etkileri.....	27
3.GEREÇ ve YÖNTEM	28
3.1. Çalışmada Kullanılan Flavonoid Türevi Bileşikler.....	28
Şekil 3.1. Çalışmamızda kullanılan flavonoid türevi bileşiklerin açık formülü	30
3.1.Hücre Hattı	30
3.2. DeneYlerde Kullanılan Kimyasal Materyaller	30
3.3. DeneYlerde Kullanılan Cihazlar	31
3.4. Çalışmalarda Kullanılan Ticari Kitler	32
3.5. Hücre Kültürü.....	32
3.6. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi (MTT).....	33
3.7. Gen ekspresyonu analizleri	34
3.8. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	34
3.8.1. RNA İzolasyonu.....	34
3.8.2. cDNA Sentezi.....	35
3.9. Real-time PCR	36
3.10. Çalışmada kullanılan primerler	36
3.11. İstatistiksel Analiz.....	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. MTT Assay Çalışmaları	39
4.1.1. 19Y-1 Bileşiğı için MTT Assay çalışması.....	39
4.1.2. 7y-2 Bileşiğı için MTT Assay çalışması	40
4.1.3. 5y-2 Bileşiğı için MTT Assay çalışması	40
4.1.4 5M Bileşiğı için MTT Assay çalışması.....	41
4.2. Gen Ekspresyon Analizi.....	43
5.TARTIŞMA	51
6. SONUÇ	56
7. KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	STAT 1 proteinlerinin üç boyutlu yapısı	5
Şekil 2.2.	STAT Proteinlerinin aktivatörleri	6
Şekil 2.3.	STAT sinyal yolağının bir özeti	7
Şekil 2.4.	JAK–STAT yolağı	8
Şekil 2.5.	Roma taç kapısı Janus.....	9
Şekil 2.6.	Nükleer transport	11
Şekil 2.7.	STAT moleküllerinin negatif düzenleyicileri	12
Şekil 2.8.	JAK / STAT yolağının SOCS proteinleri tarafından inhibisyonu.....	13
Şekil 2.9.	JAK/STAT Proteinlerinin aktivasyonu ve transkripsiyonu başlatması ...	14
Şekil 2.10.	STAT3 tarafından düzenlenen ve kanser progresyonundaönemli genler	21
Şekil 2.11.	Flavonoid anasınıfları ve molekül yapıları	23
Şekil 3.1.	Çalışmada kullanılan flavonoid türevi bileşiklerin açık formülü	30
Şekil 4.1.	5M Bileşiği için elde edilen MTT grafiği.....	39
Şekil 4.2.	7Y-2 Bileşiği için elde edilen MTT grafiği.....	40
Şekil 4.3.	5Y-2 Bileşiği için elde edilen MTT grafiği.....	41
Şekil 4.4.	5M Bileşiği için elde edilen MTT grafiği.....	42
Şekil 4.5.	GAPDH ve p53 primerlerine ait erime eğrileri	43
Şekil 4.6.	GAPDH ve p21 primerlerine ait erime eğrileri	44
Şekil 4.7.	GAPDH ve Bcl-Xl primerlerine ait erime eğrileri	45
Şekil 4.8.	GAPDH ve SOCS2 primerlerine ait erime eğrileri	45
Şekil 4.9.	GAPDH ve c-Myc primerlerine ait erime eğrileri	46
Şekil 4.10.	GAPDH ve ERK1 primerlerine ait erime eğrileri.....	46
Şekil 4.11.	GAPDH ve ERK2 primerlerine ait erime eğrileri	47
Şekil 4.12.	GAPDH ve STAT3 primerlerine ait erime eğrileri	48
Şekil 4.13.	Maruziyet gruplarının kontrol gruplarına göre kat değişimleri.....	48
Şekil 4.14.	Kontrol grupları ile maruziyet gruplarının gen ekspresyon seviyeleri.....	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	STAT protein genlerinin kromozomal lokasyonları.....	5
Çizelge2.2.	JAK'ların sitokinlerle aktivasyonu.....	10
Çizelge 2.3.	JAK inaktif farelerin fenotipi.....	11
Çizelge 2.4.	STAT3 hedef genleri.....	21
Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan Kimyasallar.....	30
Çizelge 3.2.	Kullanılan cihazlar.....	31
Çizelge 3.3.	Ticari kitler.....	32
Çizelge 3.4.	Çalışmada kullanılan primerler.....	37
Çizelge 4.1	19Y-1 molekülü MTT analizine ait veriler.....	39
Çizelge 4.2	7Y-2 molekülü MTT analizine ait veriler.....	40
Çizelge 4.3	5Y-2 molekülü MTT analizine ait veriler.....	41
Çizelge 4.4	5M molekülü MTT analizine ait veriler.....	42
Çizelge 4.5.	Kontrol grupları ile maruziyet gruplarının gen ekspresyon düzeyleri.....	48

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ABL	Abelson Murine Leukemia
ANOVA	Analysis Of Variance
Bcl-2	B-Cell Lymphoma 2
Bcl-XI	B-Cell Lymphoma-Extra Large
BCR	The Breakpoint Cluster Region
CD4	Cluster Of Differentiation 4
Cdk	Cyclin Dependent Kinase
Cip/Kip	CDK İnteracting Protein/Kinase İnhibitor Protein
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNMT	DNA Methyl Transferase
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EPO	Erythropoietin
ERK1	Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases 1
ERK2	Extracellular Signal-Regulated Protein Kinases 2
FCS	Fetal Calf Serum
G1	Gap 1
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GAS	Gamma Activated Sequence
GLUT	Gulcose Transporter
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDAC	Histone Deacetylases
IFN	Interferon
IGF	Insulin Like Growth Factor
IGFBP5	IGF-Binding Proteins

IL	Interleukin
JAK	Janus Kinase
LIFRβ	Leukaemia Inhibitory Factor Receptor B
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MRP2	Multidrug Resistance-Associated Protein 2
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NES	Nucleare Export Signal
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NK	Natural Killer
NLS	Nucleare Localization Signal
NPC	Nucleare Pore Complex
NPC	Nazopharengeal Carsinom
OSM	Oncostatin M
p21	Protein 21
p27	Protein 27
p53	Protein 53
PBS	Phosphate Bufffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PIAS	Protein Inhibitor Of Activated STAT
S	Synthesis
SCCHN	Squamous Cell Carcinoma Of The Head Ve Neck
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SF	Serum Free
SGLT1	Sodium-Glucose Co-Transporter 1
SH2	Src Homology 2
SOCS	Suppressor Of Cytokine Signalling
STAT	Signal Transducers and Activators Of Transcription
TGF-α	Transforming Growth Factor Alpha
TPO	Thrombopoietin
TYK2	Tyrosine Kinase 2

ÖZET

Yeni Sentezlenen Flavonoid Türevi Bileşiklerin Akciğer Adenokarsinoma Hücrelerinde Jak/STAT Yolağı Üzerinden Antiproliferatif Etkileri

Dünyanın gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerinde kanser, insanların beşte birinin ölümüne neden olmaktadır. En yaygın görülen kanser türleri; prostat, meme, akciğer, kolon/rektum ve serviks kanserleridir. Kanser, mutasyonların kademeli olarak birikmesi sonucu oluşur. Bu mutasyonlar hücreye; programlı hücre ölümüne direnç, anjiyogenezi indüklemek, proliferatif sinyal vermeyi sürdürmek, büyüme baskılayıcılardan kaçınma ve güçlü metastaz potansiyeli kazandırmaktadır.

Akciğer kanseri kemoterapisinde arzu edilen ve ideal olan, kullanılan ilaçların sadece kanserli dokuyu (malign hücreleri) etkilemesi ve sağlıklı hücreler üzerinde en az toksik etkiye sahip olmasıdır. Kanser patogenezi rol oynayan önemli yollardan biri Janus kinaz (JAK-Janus Kinase) ve sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatörü (STAT-Signal transducers and activators of transcription) elemanlarından oluşan JAK/STAT sinyal yolağıdır.

Flavonoidlerin antikanserojen, antitrombotik, antibakteriyel, antifungal, antiviral ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu özelliklere sahip oldukları düşünülmektedir. Moleküllerin kimyasal yapısında meydana gelen değişiklikler, moleküllerin biyolojik etkilerini radikal bir şekilde değiştirebilmektedir. Mevcut kemoterapi ajanlarının toksik etkileri; daha az toksik aynı zamanda daha etkili bileşiklerin sentezi için bir gereklilik meydana getirmiştir.

Bu tezin amacı, yeni sentezlenen bazı flavonoid türevi moleküllerin, akciğer adeno karsinoma hücrelerinde (A549) STAT3 yolağı üzerinden, antiproliferatif etkilerini incelemek ve antiproliferasyonun bu moleküller tarafından kontrol edilen STAT3 yolağı mekanizmalarını araştırmaktır.

Çalışmamızda; A549 hücreleri, yeni sentezlenen flavonoid türevi moleküller ile çeşitli konsantrasyonlarda (1-100 μ M), muamele edilerek MTT ile uygun konsantrasyonları belirlenmiş ve gen ekspresyon analizleri qRT-PCR kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada, sentetik olarak üretilen 4 flavonoid türevi bileşik arasından seçilen 5M bileşiğinin A549 hücre hattında 50 μ M, 75 μ M ve 100 μ M konsantrasyonlarda antiproliferatif etkisinin olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir. Antiproliferasyonun; JAK/STAT sinyal yolağı üzerinden gerçekleşmediği, MAPK gibi muhtemel başka sinyal yolları üzerinden gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kanser, Flavonoidler, Sentez, JAK/STAT, STAT3

ABSTRACT

Antiproliferative Effects of New Synthesized Flavonoid Derived Compounds on Jak/STAT Pathway in Lung Adeno Carcinoma Cells

Cancer causes the death of one fifth of people in developed and developing countries of the world. The most common types of cancer are prostate, breast, lung, colon / rectum and cervical cancers. Cancer occurs as a result of gradual accumulation of mutations. These accumulated mutations cause resistance to programmed cell death, induce angiogenesis, maintain proliferative signaling, avoid growth suppressors, and potent metastasis potential.

What is desirable and ideal in lung cancer chemotherapy is that drugs used only affect cancerous tissue (malignant cells) and have the least toxic effect on healthy cells. One of the important pathways involved in the pathogenesis of cancer is the JAK / STAT signaling pathway, consisting of Janus kinase (JAK) and signal transducers ve activators of transcription (STAT).

Flavonoids are thought to have anticancer antithrombotic, antibacterial, antifungal, antiviral and protective properties against cardiovascular diseases. Changes in the chemical structure of molecules can radically alter the biological effects of molecules. The toxic effects of existing chemotherapeutic agents have created a requirement for the synthesis of less toxic but also more effective compounds. The aim of this thesis is to investigate the antiproliferative effects of some newly synthesized flavonoid derived molecules via STAT3 pathway in lung adeno carcinoma cells (A549) and to investigate the mechanisms of STAT3 pathway controlled by these molecules.

In this study, after the A549 cells covered the surface of the culture dishes at a rate of 70-80%, SF (serum free medium; serum free) medium was added to the cultures instead of the medium containing 10% FCS. Cells were incubated for 24 hours under these conditions. The newly synthesized flavonoid derivative molecules were then treated with various concentrations (1-100 μ M). MTT analysis and gene expression analysis with qRT-PCR were performed.

As a result, in our study, it has been shown that 5M compound selected among 4 synthetically produced flavonoid derivative compounds has antiproliferative effect at 50 μ M, 75 μ M and 100 μ M concentrations in A549 cell line. It was concluded that the antiproliferation effect did not take place via the JAK / STAT signal pathway, but it could be possible through other signal pathways as MAPK.

Key words: Cancer, Flavonoids, Synthesis, JAK / STAT, STAT3

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri hem dünyada ve hem ülkemizde ölüm nedenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır (Tanoue ve ark. 2015). İleri aşamada tanısı konulan ve cerrahi uygulama ile müdahale edilemeyecek hastaların ortalama 5 yıllık sürede ölüm oranı % 80-90 dolaylarındadır. Cerrahi müdahale uygulanan hasta grubunda ise 5 yıllık ölüm oranı IA evresi için % 30, IIA evresi için % 50 ve IIIA evresi için % 70 olarak bildirilmiştir (Inoue ve ark. 1998, Smythe 2003). Akciğer kanserinde tedavi genelde cerrahi olarak yapılmakta, bunun yanı sıra radyoterapi ve kemoterapi de uygulanmaktadır (Gavilan 2004). Hangi tedavinin uygulanacağı hastalığın evresine ve kanserin histopatolojik tipine göre değişiklik göstermektedir. Terapiler ayrı ayrı tedaviler şeklinde olabildiği gibi farklı tedavilerin kombinasyonu şeklinde de uygulanabilmektedir. Akciğer kanserinde kemoterapi amaçlı kullanılan ilaç veya etken maddelerin (Sisplatin, Adriamisin, Vindesin gibi) tek başına veya kombinasyon halinde uygulanmasından kaynaklanan toksik ve yan etkiler önemli bir sorun teşkil etmektedir (Mascaux ve ark. 2000, McGuire ve ark. 1996, Twentyman ve ark. 1987). Akciğer kanseri kemoterapisinde arzu edilen ve ideal olan, kullanılan ilaçların sadece kanserli dokuyu (malign hücreleri) etkilemesi ve sağlıklı hücreler üzerinde en az toksik etkiye sahip olmasıdır.

Kansere neden olan tanımlanmış yüzlerce gen ve onların ürünleri olan proto-onkoproteinlerin büyük çoğunluğu kanserin oluşumunda etkili, MAPK, PI3K, Notch, Wnt ve Hedgehog gibi moleküler sinyal yollarında görev almakta ya da bu yollarının fonksiyonlarını etkilemektedir. Birbirleriyle etkileşim halinde olan bu yollar, aynı zamanda normal hücrelerin de sağ kalımını, proliferasyonunu, farklılaşmasını ve fonksiyonunu düzenleyen sistemlerin birer parçasıdır (Karamboulas ve Ailles 2013, Pazarbaşı ve ark. 2011).

Kanser patogenezinde rol oynayan önemli yollardan biri de Janus kinaz (JAK-“Janus Kinase”) ve sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) elemanlarından oluşan JAK/STAT sinyal yolağıdır (Bowman ve ark. 2000). JAK enzimleri inaktif durumda iken Tip 1 ve Tip 2 sitokinlerinin sitoplazmik uçlarına tutunmuş halde bulunurlar. Sitokin veya büyüme faktörü gibi bir ligandın, reseptörün hücre dış yüzeyine bağlanması ile konformasyonel değişime uğrayan reseptörler birer kinaz olan JAK’ları aktifleştirir.

Daha sonra JAK proteinleri STAT proteinlerini fosforilleyerek dimer oluşturmalarını sağlarlar. STAT dimerleri nükleusa geçiş yaparak sitokin veya büyüme faktörü ile ilişkili genlerin promotor alanlarındaki DNA sekanslarına bağlanır ve ilgili genlerin transkripsiyonunu düzenlerler (Dutta ve Li 2013, Kaushal ve Chorawala 2012, Sun ve ark. 2017).

Sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3), tümör hücrelerinde fosforillenerek, hücre türüne göre, bazı genlerin aktivasyonunu düzenleyen bir biyomoleküldür. Kanser hücrelerinde STAT3 proteinlerinin kontrolsüz aktivasyonu, malign transformasyona yol açarak hücrelerin proliferasyonu, metastazı ve apoptozisinde değişimlere sebep olabilmektedir (Kamran ve ark. 2009). STAT proteinleri hücre siklusunun sürdürülmesi ve/veya apoptozisinin düzenlenmesinde etkili olan siklin D1 ve c-Myc gibi onkogenlerin indüksiyonuna yol açarak hücre transformasyonunda doğrudan rol almaktadırlar (Bayram ve ark. 2006, Turkson ve Joand 2000). Ayrıca STAT3'ün anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xl proteinlerinin ekspresyonunu düzenlediği rapor edilmiştir (Lee ve ark. 2015).

Hücre çoğalması ve sağ kalımı için kritik bir düzenleyici olan c-Myc proteininin, çeşitli insan kanserlerinde seviyesinin arttığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar; c-Myc'in, STAT3 eksprese eden fibroblast hücrelerinde seviyesinin arttığını göstermekte, bu da STAT3'ün doğrudan ya da dolaylı olarak c-Myc ekspresyonunda etkili olabileceği fikrini ortaya çıkarmaktadır (Turkson ve Joand 2000). Memeli hücrelerinde saptanan siklin bağımlı kinaz (Cdk-cyclin-dependent kinase) inhibitörlerinden Cip/Kip ailesinin bir üyesi olan p21CIP1/WAF1'in hücre siklusunu kontrol eden anahtar proteinlerden biri olduğu bildirilmiştir (Yin ve ark. 1999). Bu konuda yapılan çalışmalar ayrıca, STAT 3 aktivasyonunun p21CIP1/WAF1'i indüklediğini ve bu proteinin düzeyinin çeşitli insan tümörlerinde arttığını ortaya koymuştur (Turkson ve Joand 2000).

JAK/STAT yolağı için çok sayıda negatif düzenleme mekanizmasının olduğu yapılan çalışmalar sonucunda tespit edilmiştir. Bunların en önemlilerinden biri Sitokin sinyali baskılayıcısı (SOCS-supressor of cytotokine signalling)'dır. SOCS proteinleri SH2 domaini bulundurmalarıyla ayırt edilir ve SOCS kutusu (SOCS box) denilen 40 aminoasitlik C terminali ile ilişkilidirler. SOCS-1'i inaktif fareler IFN γ aktivitesinin fazlalığı nedeniyle üç haftada ölürlür. SOCS protein ekspresyonu JAK/STAT yolağını aktive eden aynı sitokinler tarafından uyarılır (Sethi ve Ahn 2015, Williams 1999).

Siklin ve Cdk komplekslerinin hücre siklusunun sürdürülmesinde düzenleyici rolleri olduğu bilinmektedir (Hunter ve Pines 1994). Cdk'lar ile birlikte hücrenin G1 fazından S fazına ilerlemesini sağlayan siklin D1 ekspresyonunun, STAT3 ekspresyonuna eden hücrelerde arttığı rapor edilmektedir (Turkson ve Joand 2000). Fosforile STAT3 ve total STAT3 oranı (p-STAT 3/t-STAT3) JAK/STAT yolağının aktivasyonu hakkında bilgi verir. Bu yolağın aktivitesi hücre proliferasyonunun bir göstergesi olarak değerlendirilebilir.

Bu çalışmanın amacı, yeni sentezlenen bazı flavonoid türevi moleküllerin, akciğer adeno karsinoma hücrelerinde (A549) STAT3 yolağı üzerinden, antiproliferatif etkilerini incelemek ve antiproliferasyonun bu moleküller tarafından kontrol edilen STAT3 yolağı mekanizmalarını araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sinyal İletimi ve STAT Proteinleri

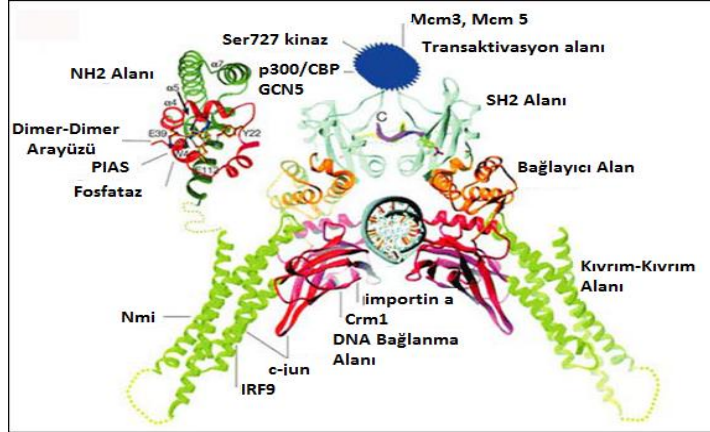
STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) proteinleri, hücre dışı uyaranlara yanıt olarak aktive edilen latent sitoplazmik transkripsiyon faktörlerinin bir alt ailesidir. İnterferon (IFN) aracılı gen aktivasyonu araştırmalarında, öncelikle STAT1 ve STAT2 keşfedilmiştir. Daha sonra memeli hücrelerinde STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6 olmak üzere 7 STAT üyesi tespit edilmiştir. STATlar 750-850 amino asit uzunlukları arasında değişen, birçok hücre tipinde bol miktarda bulunan 90-115 kDa ağırlığında protein yapılı moleküllerdir. STAT ailesi proteinleri kodlayan genler farklı kromozomal bölgelere yerleşmişlerdir (Çizelge 2.1.) (Benekli ve ark. 2003, Irwin ve ark. 2015, Johnson ve ark. 2018).

Çizelge 2.1. İnsan STAT proteinler kodlayan genlerin kromozomal lokasyonları (Baumann ve Wetzler 2003)

Molekül Adı	Lokalizasyonu
STAT1	2q32.3
STAT2	12q13.3
STAT3	17q21.2
STAT4	2q32.2
STAT5a	17q21.2
STAT5b	17q21.2
STAT6	12q13.3

2.2. STAT Proteinlerinin yapısı

STAT proteinleri DNA'ya tetramerik olarak bağlanan farklı üç boyutlu yapı motifleri sergileyen moleküllerdir. DNA'ya bağlanan STAT1, STAT3 ve STAT4 proteinlerinin, NH2 terminalindeki amino asit kristalografik çalışmaları ve mutageniz çalışmaları, STAT proteinlerinin bazı düzenleyici ortak etki alanlarını ortaya çıkarmıştır (Levy ve Darnell 2002, Yang ve ark. 2019).



Şekil 2.1. STAT 1 proteinlerinin üç boyutlu yapısı. STAT1 dimerinin DNA'ya bağlanması ve proteinlerin bağlanma bölgelerinin yeri gösterilmektedir (Levy ve Darnell 2002).

STAT proteinlerinin etkileşim alanları birbirine yakın şekilde (yaklaşık 20 baz çifti) konuşlanmışlardır. STAT proteinlerinin N-terminal bölgesi, hem protein-protein (STAT-STAT) dimerik yapıları ve hemde tetramerik (dimer-dimer) STAT molekülleri açısından son derece önemlidir. Amino terminalinde rezidü eksikliğine sebep olan delesyonlar, yanlış bölgelere STAT bağlanmasına yol açar ve bu delesyonlar nedeniyle STAT dimerleri uygun tetramerik yapılar oluşturamaz. Güçlü bir STAT-DNA etkileşimi için tetramer oluşumunun gerekli olduğu ve optimum transkripsiyon için tetramer yapının önemli olduğu gösterilmiştir (Zhang ve Darnell 2001).

Src-homoloji 2 (SH2) alanı, 580 ve 680 rezidüleri arasında uzanan SH2-fosfotirozin peptit etkileşimleri yoluyla dimerizasyona aracılık eden ve en iyi bilinen ortak yapısal motiftir. Aktivasyon durumunda fosforile olan ve SH2 yoluyla dimerizasyon için gerekli olan kritik STAT tirozin rezidüsü (700), SH2 alanının yakınındadır (Bowman ve ark. 2001).

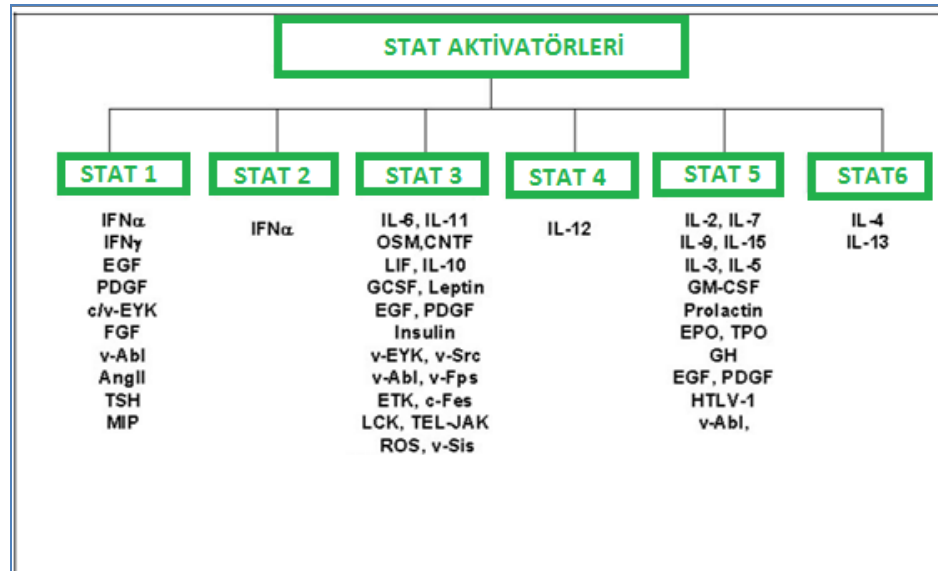
2.3. STAT Proteinlerinin İzofomları

Doğal olarak ortaya çıkan STAT'ların kesimleme varyantları, serin rezidüsü de dahil olmak üzere C-terminali alanının, JAK/STAT yoluyla gerçekleşen gen indüksiyonu üzerinde dominant-negatif etkisi vardır. Kesimlenmiş izofomlar da diğer STAT izofomları gibi tirozin rezidüleri üzerinden fosforile edilirler ve dimerize olup nükleusta DNA'ya tetramerik olarak bağlanırlar. Şimdiye kadar, STAT1, STAT3 ve STAT5'in iki farklı mekanizma tarafından üretilen STAT1, STAT3β ve STAT5β olarak adlandırılan varyantları tanımlanmıştır. Örneğin wild tip STAT3 ile karşılaştırıldığında, STAT3β yedi

fazla amino aside sahiptir ve STAT3'ün C terminalinden farklı olarak 50 baz çiftlik bir iç alandan yoksundur. Wild tip STAT3 ve STAT3 β izoformu birbirleriyle dimer oluşturabilirler. Bu dimerizasyon ürünü, STAT3'ün doğal olarak oluşan bir izoformudur ve Ser727 fosforilasyon bölgesinden yoksun olan 80-kDa'lık dimerik bir protein yapısıdır (Aigner ve ark. 2019).

2.4. STAT aktivasyonu ve düzenlenmesinin mekanizması

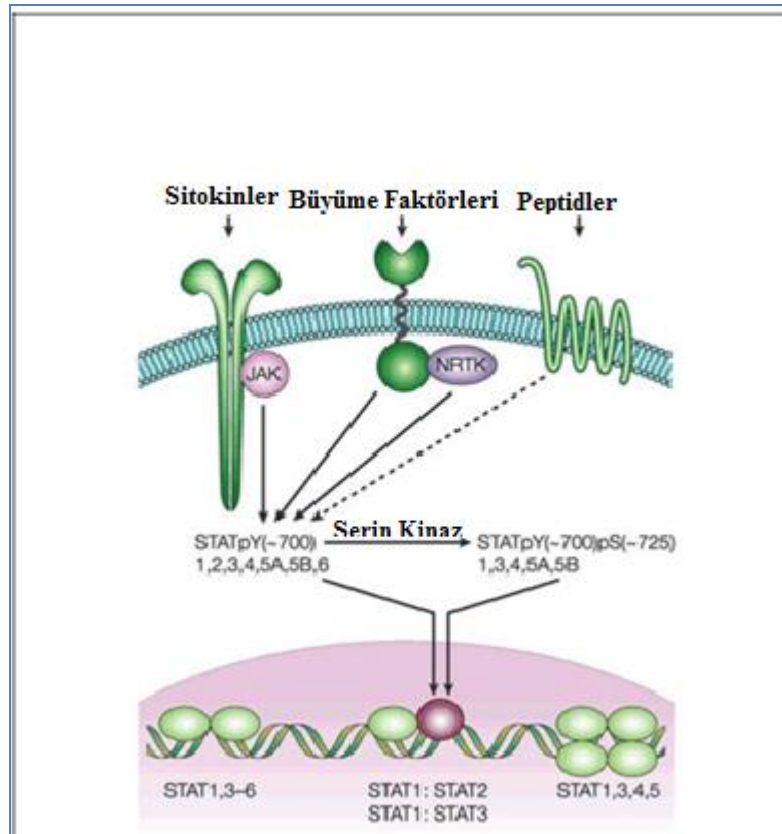
Reseptörlere bağlı Janus Kinases (JAK) proteinlerinin STAT'ları fosforile ettiği bir çok çalışmayla gösterilmiştir (Park ve ark. 2003). Reseptör tirozin kinazlara (RTK) bağlanan epidermal büyüme faktör (EGF) ve platelet kaynaklı büyüme faktör (PDGF) gibi büyüme faktörleri, STAT aktivasyonunu, doğrudan veya diğer reseptör olmayan tirozin kinazlar (Örn. Src) yoluyla gerçekleştirebilir (Wang ve ark. 2000) Ayrıca, aktive edilmiş Src ve ABL gibi reseptör olmayan tirozin kinazlar, ligand kaynaklı reseptör aktivasyonunun yokluğunda doğrudan STAT proteinlerini fosforile edebilir (Danial ve Rothman 2000, Recio ve ark. 2019). STAT proteinleri JAK'lar üzerinden, 40'tan fazla farklı polipeptit, bağlayıcı sitokin reseptörü, G-protein-bağlı reseptörler, epidermal büyüme faktörü reseptörü ve platelet kaynaklı büyüme faktörü reseptörü tarafından aktive edilirler (Şekil 2.2.) (Bromberg 2001).



Şekil 2.2. STAT Proteinlerinin aktivatörleri (Bromberg 2001)

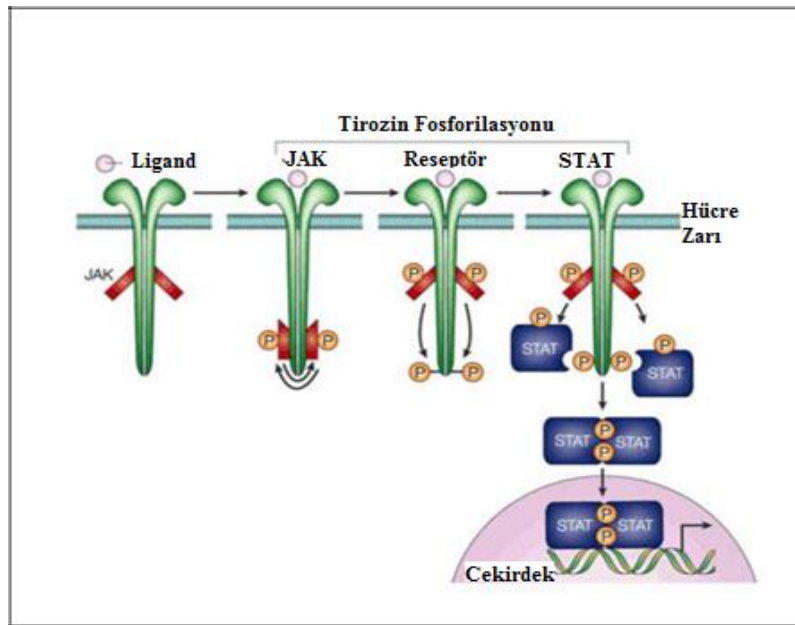
JAK aktivasyonu ligand aracılı reseptör multimerleşmesinin neticesinde gerçekleşir. Aktivasyon için iki JAK monomeri birbirine çok yakın hale getirilir ve trans-

fosforilasyonun gerçekleşmesi için uygun konumlanma şartları oluşmuş olur. Aktive olan JAK'lar daha sonra hem reseptörler hem de ana substratlar olan STAT'lar da dahil olmak üzere diğer hedef proteinleri fosforile ederler. STAT'lar aktive oluncaya kadar sitoplazmada latent transkripsiyon faktörleri şeklinde hazır beklerler. Memelilerde bulunan STAT proteinlerinin tamamı, C-terminusunun yakınında, JAK'ler tarafından fosforile edilebilen korunmuş bir tirozin rezidüsüne sahiptirler. Sinyal aktivasyonunda bu tirozin fosforillenerek fosfotirozin rezidüsü meydana gelir. Bu fosfotirozin, diğer bir fosforile STAT proteininin SH2 alanı ile etkileşerek STAT'lerin dimerizasyonuna neden olur. Fosforile ve dimerize olmuş olan STAT'lar nükleusa, importin aracılı bir mekanizma ile giriş yaparlar. Nükleusa girdikten sonra, dimerize STAT'lar, hedef genlerin transkripsiyonunu aktive etmek veya bastırmak için spesifik düzenleyici dizilere bağlanırlar. Böylece JAK/STAT kaskadı bir hücre dışı sinyali transkripsiyonel bir yanıt çevirmek için doğrudan nükleusa uzanan hızlı bir mekanizma sağlar (Şekil 2.3) (Ahmad ve Farooqi 2019).



Şekil 2.3. STAT sinyal yolağının bir özeti (Levy ve Darnell 2002)

STAT'ların fosforilasyonu, SH2 alanları ve fosfotirozinleri arasındaki karşılıklı etkileşimle, homodimerizasyon veya heterodimerizasyon ile sonuçlanır. STAT1, STAT3, STAT4, STAT5a ve STAT5b homodimer oluştururlar. STAT1 ile STAT2 ve STAT1 ile STAT3 kendi aralarında heterodimerler oluşturabilirler. STAT homodimerleri veya heterodimerleri hedef genlerin promotöründeki GAS elemanı TTN₅₋₆AA (gama interferon aktive edilmiş sekans) olarak adlandırılan, spesifik STAT-DNA bağlanma elemanlarına bağlandıkları nükleusa transloke olurlar (Şekil 2.4) (Levy ve Darnell 2002, Tabassum ve ark. 2019)



Şekil 2.4. JAK-STAT yolağı (Levy ve Darnell 2002)

2.5. Janus kinaz ailesi

Janus kinazı veya "just another kinase" (JAK) JAK-STAT yolağı aracılığıyla sitokin aracılı sinyalleri iletir, hücre içi, reseptörsüz tirozin kinaz ailesidir. Başlangıçta "sadece başka bir kinaz" 1 ve 2 olarak adlandırılmışlardı (çünkü bunlar PCR-esaslı çok sayıda keşfedilen kinazların sadece iki tanesiydi) daha sonra "Janus kinase" olarak isimlendirilmişlerdir. Bu adı, iki yüzlü Roma taç kapısı Janus'tan alırlar (Şekil 2.5). Çünkü JAK'lar birbirine yakın iki özdeş fosfat aktarma özelliğine sahip alanlar içerirler. Bunlardan biri kinaz aktivitesine sahipken diğeri bu aktiviteyi negatif yönde düzenler (Shoey ve Simionica 2018).



Şekil 2.5. Roma taç kapısı Janus (Online 1)

JAK kinazlar STAT aracılı sitokin sinyalizasyonunda spesifikliğin kesin bir belirleyicisi değildir, çünkü birçok farklı sitokin aynı JAK'ı aktive edebilir (Çizelge2.2). Bununla birlikte, JAK gen hedefleme çalışmaları, karakteristik sinyalizasyonları tanımlamıştır. Bu çalışmalar, JAK1 -/- farelerin perinatal öldürücü bir fenotip sergilediğini ancak başka anormalliklere sebep olmadığını göstermektedir. IFN'lar (tip II sitokinler), γ 'ye bağımlı sitokinler ve gp130 bağımlı sitokinler dahil olmak üzere üç farklı sitokin reseptörü familyasını bağlayan sitokinlere yanıt verememektedir (Rodig ve ark. 1998).

Çizelge2.2. JAK'ların sitokinlerle aktivasyonu (Yaru ve ark. 2019)

Sitokinler	JAK-kinaz
İnterferonlar (IFN'lar)	
IFN α/β , IL-10	JAK1, TYK2
IFN γ	JAK1, JAK2
Reseptörlerinde ortak γc bulunan Sitokinler	
IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21	JAK1, JAK3, JAK2, TYK2
Reseptörlerinde ortak βc bulunan Sitokinler	
IL-3, IL-5, GM-CSF	JAK2
Reseptörlerinde ortak gp130 bulunan Sitokinler	
IL-6, IL-11, OSM, CNTF, LIF, CT-1	JAK1, JAK2, TYK2
IL-12	JAK2, TYK2
Reseptörleri homodimer olan sitokinler	
Büyüme hormonu, Prolaktin, EPO, TPO	JAK2

JAK2 inaktif farelerde, kesin eritropoezi ölümcül olmayan, bozulmuş sitokin sinyallemesinden kaynaklanan, embriyonik immünolojik bozukluklar gözlenir. Tyk2 inaktif fareler, interferon ve IL-12'ye verilen tepkilerin yol açtığı artmış patojen duyarlılığı sergilerler (Karaghiosoff ve ark. 2000, O'Shea ve ark. 2002). Yapılan çalışmalarda,

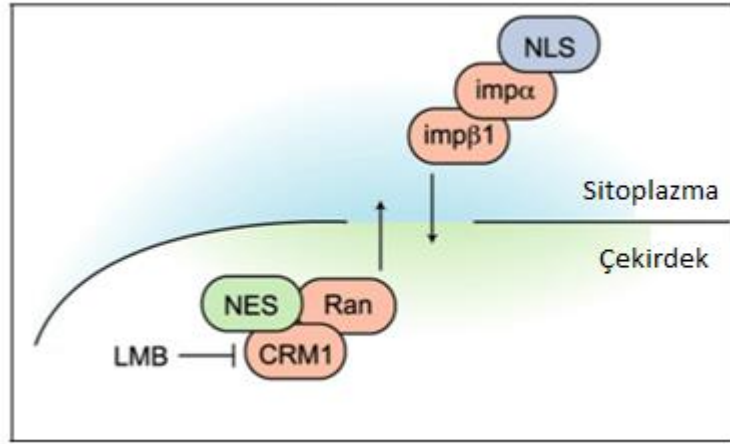
JAK3'teki mutasyonların bazı hastalarda ciddi kombine immün yetmezlik hastalığına (SCID) yol açtığı bulunmuştur. İnsanlar açısından en önemli JAK üyesi ürünü γ ortak alıcı zinciri ile nispeten özel bir ilişki sergileyen JAK3'tür. IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 ve IL-21 reseptörleri tarafından paylaşılan ortak sitokin reseptör zincirindeki mutasyonlar, insanlarda ciddi kombine immün yetmezliğe (SCID) neden olur (Muller 2019, Leonard 1996). Benzer şekilde, JAK3 $-/-$ fareler, timositlerde, T hücrelerinde ve B hücrelerinde, sitokin sinyalinin radikal bir şekilde aksamasından dolayı SCID'e benzer semptomlar gösterirler (Çizelge 2.3) (Segovia ve ark. 2019).

Çizelge 2.3. JAK inaktif farelerin fenotipi (O'Shea ve Schreiber 2002)

Gen	Null faredeki fenotip	
JAK1	Canlı	Nörolojik defektlere bağlı perinatal hastalıklar, SCID
JAK2	Ölü	Eritropoezde başarısızlık, sitokin sinyalizasyonunda bozulma
JAK3	Canlı ve fertile,	SCID
TYK2	Canlı ve fertile	Bozulmuş IFN ve IL-12 yanıtı, artan patojen duyarlılık

2.6. STAT proteinlerinin nükleer önemi ve Salınımı

STAT proteinleri, trifosforilasyon ve dimerizasyon üzerinden nükleusa transloke olurlar. Bu süreç çeşitli gruplar tarafından gerçekleştirilir ve nükleer gözenek kompleksi (NPC'ler) boyunca aktif taşıma işlemi ile sürdürülür çünkü STAT dimerleri NPC'de pasif difüzyon için çok büyük moleküllerdir ($> 50kD$). Nükleer bir lokalizasyon sinyali (NLS) moleküllerin nükleer porlardan aktif taşınması için gereklidir. NLS sinyalleri genellikle, yaklaşık 10 korunmamış rezidü ile aralıklı, yüksek miktarda bazik arginin ve lizin amino asitleri içeren tekli ya da çift uzantılardır (Şekil 2.6). (McBride ve Reich 2003).



Şekil 2.6. Nükleer transport. (McBride ve Reich 2003)

Bild ve arkadaşları STAT3'ün, reseptör aracılı endositozun plazma zarından perinükleer bölgeye geçişi sırasında endositotik veziküller ile bağlı olduğunu göstermiştir (Bild ve ark. 2002). Bununla birlikte, STAT3-ER ve STAT3-C gibi yapıların, reseptör aktivasyonu olmadan nükleusa yer değiştirdiği gözlenmiştir. Ayrıca son zamanlarda STAT3 için iki NLS bildirilmiştir. Arjininlerin 214-215 alfa sarmal yapıdaki 2 bölgesinden bir tanesinin, epidermal büyüme faktörü ve ayrıca interlökin-6 tarafından uyarılabilecek yeni bir STAT3 NLS aminoasit sekansı içerdiği gösterilmiştir (Ma ve ark. 2003).

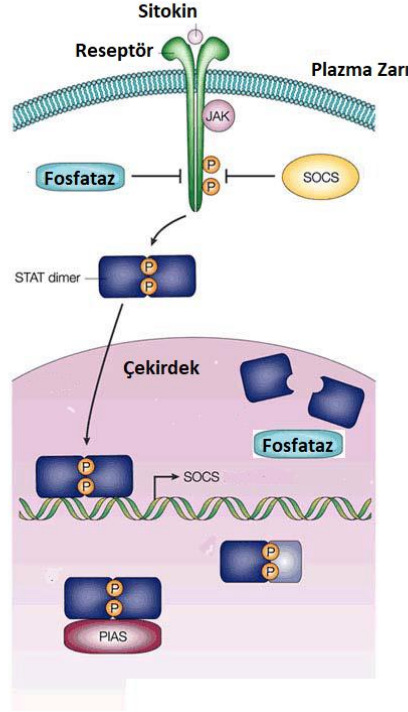
STAT3 için DNA bağlama alanında bir NLS tanımlanmıştır. Bu, bilinen bir STAT1 NLS olan ve STAT1'in 410-413 lizinlerine karşılık gelen 414-417 arjininleridir. Öte yandan, STAT1 nükleer transferi için gerekli bir rezidü olan STAT1'in 407 lösinine karşılık gelen, STAT3 lösin 411, STAT3 nükleer salınımı için gerekli değildir (Tan ve Cao 2003).

STAT3'ün nükleer salınımı üç nükleer salınım sinyali (NES) elemanı ile sağlanır. Bu elemanlar 306-318 bölgesi ve 404-414 bölgesi ve 524-535 bölgesinde bulunan sekanslardır. STAT3'ün nükleer salınımını STAT1'de olduğu gibi leptomisin B ile engellemek de mümkündür (Bhattacharya ve Schindler 2003).

2.7. STAT'ların Negatif Düzenleyicileri

Son araştırmalar STAT sinyalinin, reseptörlerin fosforilasyonu ve endositozunu, JAK'ların fosforilasyonunu ve reseptörlerin proteolitik bozunumunu içeren reseptörlerin defosforilasyonu ve endositozunu içeren farklı sinyallerle negatif olarak düzenlendiğini

göstermektedir. STAT ve JAK'lar ve iki farklı protein ailesi SOCS proteinleri aracılığıyla inhibe edilebilirler (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. STAT moleküllerinin negatif düzenleyicileri (Levy ve Darnell Jr 2002).

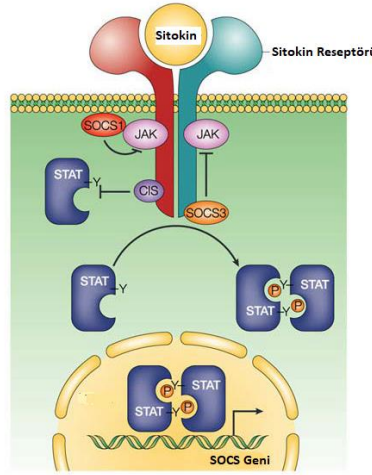
2.8. SOCS inhibitör ailesi

Sitokin sinyalleme sisteminin baskılayıcıları (SOCS), bağışıklık sisteminin sitokinlere tepkisini negatif yönde düzenlemede kritik bir rol oynayan hücre içi proteinlerin bir ailesidir. Bu inhibitörler, JAK sitokin sinyalleme sisteminin bağlayıcı proteinleri (JAK'lar), STAT ile indüklenmiş STAT inhibitörleri (SSI) veya sitokin kaynaklı SH2 (CIS) olarak çeşitli şekillerde adlandırılmışlardır (Cooney 2002, Ghafouri ve ark. 2018).

SOCS proteinlerine ait aile, sitokinler aracılığı ile indüklenebilen SH2 alanı taşıyan SOCS1-SOCS7 proteinlerini içerir. SOCS proteinleri merkezi bir SH2 alanı, bir amino terminali ve SOCS kutusu olarak bilinen bir karboksi-terminal 40 amino asit modülü durumunda taşıyan bir değişken sekans ve bir dizin alanı içerir. SOCS1 ve SOCS3 proteinleri ayrıca bir kinaz inhibe edici bölge bulundurlar (Krebs ve Hilton 2000) SOCS kutusu, bir ubiquitin E3 ligaz kompleksinin bilinen bileşenleri olan B ve C bölgesine bağlanabilir. Bu da SOCS proteinlerinin, JAK2 gibi sinyalleme moleküllerini, degradasyon veya proteozomik aktivite için işaretleyebileceği sonucunu doğurmaktadır (Kamizone ve ark. 2004). SOCS1'in SOCS kutusunun Cullin-2 ile etkileşime girdiğini ve TEL-JAK2'nin

aktivasyonunu güçlendirdiğini göstermiştir (O'Shea ve Schreiber 2002, Yoshimura ve ark. 2018). SOCS proteinleri genellikle uyarılmamış hücrelerde düşük seviyelerde eksprese edilir ve ekspresyon büyük ölçüde sitokin, insülin ve EGF uyarımı yoluyla artırılır. Daha sonra JAK/STAT sinyalini inhibe ettikleri gerçeği, klasik geri besleme döngüsü inhibitörleri olarak davrandıkları sonucunu ortaya çıkarmıştır. SOCS3'ün post-translasyonel modifikasyonları da sitokinler ve büyüme faktörleri ile uyarıldıktan sonra gösterilmiştir.

SOCS proteinlerinin inhibisyon mekanizması, farklı SOCS proteinleri arasında farklılık göstermektedir. SOCS1, doğrudan SH2 alanıyla tirozinleri fosforillenmiş JAK'lara bağlanır, bunun sonucunda JAK aktivitesi doğrudan inhibe edilir (Şekil 2.8). Oysa SOCS3, JAK'lerin inhibisyonu için farklı bir mekanizma kullanır. SOCS3 JAK inhibisyonunda aktive edilmiş reseptöre doğrudan bağlanır. GP30'a bağlanma, SHP2'yi de bağlayan Y759 motifinde meydana gelir. Makrofajlarda SOCS3'ten yoksun fareler üretmek için koşullu gen hedefleme çalışmaları, SOCS3 proteinlerinin sitokinler için spesifikliğe sahip olduğunu ancak JAK'lar veya STAT'ler için spesifik olmadıklarını göstermiştir. (Callus ve Mathey 2002, Durham ve ark. 2019, Nicholson ve Hilton 1998, Shuai ve Liu 2003).

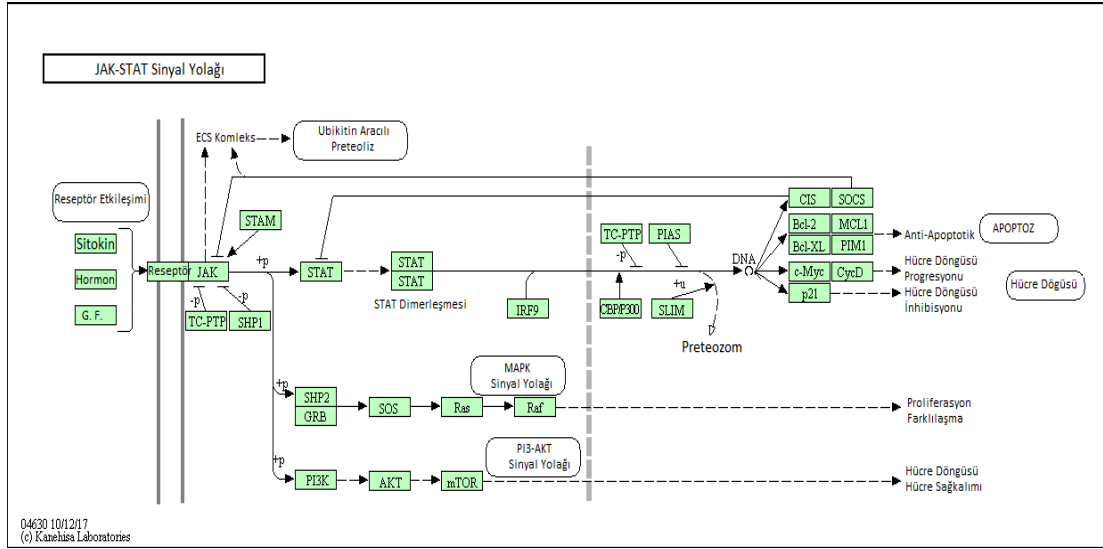


Şekil 2.8. JAK / STAT yolağının SOCS proteinleri tarafından inhibisyonu (Shuai ve Liu 2003)

Gen hedefleme çalışmaları, SOCS proteinlerinin immün sistemin düzenlenmesinde de temel bazı fonksiyonları üstlendiğini göstermiştir (Levy ve Darnell 2002).

2.9. STAT'ların biyolojik işlevleri

Gen hedefleme çalışmaları, bazı STAT proteinlerinin fonksiyonlarında oldukça spesifik davrandıklarını ve memelilerde hücre proliferasyonu, hücre farklılaşmasının yanı sıra immün yanıtı aracılık etmekten de sorumlu olduklarını göstermektedir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. JAK/STAT Proteinlerinin aktivasyonu ve transkripsiyonu başlatması (Online 2)

2.9.1. STAT1

STAT1, tip I, tip II veya tip III interferonların oluşturduğu sinyallerden oluşan yolda genlerin pozitif yönde düzenlenmesine katılır. IFN γ uyarımına yanıt olarak STAT1 ve STAT3 homodimerler veya heterodimerler oluşturarak GAS (İnterferon-Gamma Aktive Edilmiş Dizi) yükseltici elemana bağlanır; IFN α ya da IFN β uyarımına yanıt olarak STAT1, STAT2 ile ISRE'yi (İnterferon Uyarılmış Tepki Elementi) destekleyici elemana bağlayabilen bir heterodimer oluşturur. STAT1 inaktif fareler canlı ve üreme yeteneğine sahiptir ve gelişimsel bir kusur göstermezler. Bununla birlikte, STAT1 -/- fareler, IFN α/β ve IFN γ ile stimülasyondan sonra hedef genlerin transkripsiyonunu indüklememiştir. Ayrıca bu fareler, mikrobiyal ve viral enfeksiyonlara karşı oldukça hassastır. Doğal bir heterozigot germline STAT1 mutasyonu sonucu oluşan mikobakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı atipik duyarlılık, STAT1'in immün yanıtlara katkıda bulunmadaki önemini daha da güçlendirmiştir. STAT1 eksikliği olan fareler karsinojenik bir hidrokarbon olan methylcholanthrene uygulaması sonrasında spontan tümör gelişimi için

yüksek duyarlılık göstermiştir. Bu, STAT1'in proapoptotik bir işlevi olduğunu da göstermektedir. (Akira 1999, Dupuis ve ark. 2001).

2.9.2. STAT2

STAT2, STAT ailesinin biraz daha farklı bir üyesidir. Çünkü GAS elementlerine bağlanmaz ve homodimer oluşturmaz. Bunun yerine STAT2, IFN α tarafından aktivasyonu üzerine, STAT1 ve p48/ISGF3gamma ile birlikte transkripsiyon faktörü kompleksi ISGF3'ü (IFN-uyarımlı gen faktör 3) oluşturur. STAT2 inaktif fareler canlı ve verimli olmalarının yanı sıra gelişimsel kusur göstermezler. Bununla birlikte, IFN α sinyallemesine cevap verme kabiliyetlerini yitirmelerinden dolayı viral enfeksiyonlara karşı daha duyarlıdırlar. (Park ve ark. 2000)

2.9.3. STAT3

STAT3 bölümünde detaylı olarak ele alınacaktır.

2.9.4. STAT4

STAT4 sadece doğal katil hücrelerde (NK hücreleri), dentritik hücrelerde ve T lenfositlerde eksprese edilir ve esas olarak IL-12 tarafından aktive edilir. STAT4 Th1 (Tüylü hücreli lösemi) hücrelerinde, hücre dışı patojenlere ve tümörlere karşı konak savunmasında ve özellikle romatoid artrit, diyabet ve multipl skleroz gibi otoimmün hastalıkların gelişmesinde rol oynar.

STAT4 inaktif olan farelerin, romatoid artrit, diyabet ve deneysel, alerjik ensefalomiyelit (EAE) gibi otoimmün hastalıklara direnç sağlayamadığı gösterilmiştir (Gadina ve Schreiber 2002). İnsanlarda yapılan çalışmalarda, IFN α /P'nin, Th1 gelişimini desteklemek için T hücrelerini uyardığı ancak IL-12 ile indüklenen sinyalleme ihtiyacını bypass ederek, IFN α 'nın farelerde Th1 farklılaşmasına desteklemediği gösterilmiştir. Bunun nedeni, IFN α / γ 'nin, STAT4'ü, sadece insan hücrelerinde STAT2'nin C-terminali ile IFN α reseptör kompleksine alarak, STAT4'ü aktive edebilmesidir. Fare ve insan sinyali arasındaki fark, fare STAT2 geninin, C-ucu sekansını değiştiren ve diğer STAT'ların aktivasyonunu etkilemeden STAT4'ün aktive etme yeteneğini seçici bir şekilde bozduğu bir minisatellit domaini bulundurmasıdır (Farrar ve ark. 2000).

2.9.5. STAT5

STAT5 proteinleri tüm dokularda eksprese edilir ve ekspresyonları çok çeşitli sitokinler tarafından aktive edilir. Geniş aktivasyon aralığı göz önüne alındığında, bu

proteinlerin inaktivasyonunun birçok etkisinin olacağı düşünülebilir. Ayrı ayrı STAT5a ve STAT5b eksikliği bulunan fareler canlı ve verimli olmalarının yanısıra gelişimsel bir kusur sergilemezler. Aynı anda ayrı STAT5a ve STAT5b inaktif fareler kısırdırlar, boyut olarak küçüktürler. Genellikle doğumdan birkaç hafta sonra ölürlar ve meme bezi ve korpus luteum gelişimi bakımından kusurludurlar (Richard ve ark. 2018, Tolomeo ve ark. 2019).

2.9.6. STAT6

STAT6 her hücre türünde etkili bir şekilde ifade edilir ve esas olarak IL-4 ve IL-13 tarafından aktive edilir. IL-4, aktive edilmiş T ve B hücreleri tarafından eksprese edilir ve CD4+ T hücrelerinin Th2 hücrelerine farklılaşmasını ve B hücrelerinin sınıf geçişini düzenleyerek IgE'nin salgılanmasını sağlar. Th2 yardımcı hücreler, helmintlere ve ayrıca alerjik tepkilere karşı konakçı savunma için gereklidir. STAT6 ve IL-4 eksikliği bulunan fareler benzer fenotipleri gösterir; ikisi de Th2 hücrelerine farklılaşamazlar ve IgE'ye sınıf geçişi için uygun değildirler; aksi takdirde bunlar canlı, verimlidir ve gelişimsel bir kusur göstermezler (Yan ve ark. 2016). Ek olarak, STAT6 eksikliği bulunan fareler, ağırlıklı olarak Th1 fenotipine sahiptirler, EAE'nin ciddi bir klinik seyri gözlemlenir, bu farelerde helmintlere karşı konakçı savunmasında STAT6 inhibe edilir, septik peritonite karşı dirençlidirler, lokal bakteriyel klirensi artırılmış tümörün tekrarlanmasına ve gen ifadesinin yeniden düzenlenmesiyle gerçekleştirilen gen aktivasyonuna karşı direnç gösterirler. STAT6 eksikliği farelerde NF- κ B, endotoksinlerin indüklediği proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin ekspresyonunun azalmasına yol açar (Masia ve ark. 2017, Elks ve Stephens 2018).

2.10. STAT proteinleri ve kanser

Aktive olan STAT1, STAT3 ve STAT5 proteinleri, çok çeşitli insan kanser hücre hatlarında ve primer tümörlerde gözlenmiştir. STAT1, bir tümör baskılayıcı olarak kabul edilir, çünkü STAT1 inaktif fareler, kimyasal olarak indüklenen primer tümörlere ve transplante edilmiş tümörlere karşı daha hassastır. Ayrıca, STAT1, kısmen sitokinlere cevap olarak siklin bağımlı kinaz (cdk) inhibitörü p21 WAF1 / CIP1'in indüklenmesiyle, IFN γ ve EGF'ye yanıt olarak hücre büyümesinin baskılanması için gereklidir. STAT5, esas olarak lösemilerde ve lenfomalarda aktive edilir ve aktif STAT5'in, BCR-Abl onkogen tarafından transforme edilmiş hematopoetik hücrelerin, miyeloid öncül hücrelerin ve lösemi hücrelerinin büyümesi için gerekli olduğu, negatif bir STAT5 formunun ifadesiyle

gösterilmiştir. Ek olarak, STAT5, Bcl-x1 gibi antiapoptotik sinyal proteinlerinin ekspresyonunu indükleyebilir (Sillaber ve ark. 2000).

2.11. STAT3 Proteinlerinin Biyolojik İşlevleri

STAT3 başlangıçta IL-6 tarafından aktive edilen akut faz yanıt faktörü olarak tanımlanmıştır. STAT3 her dokuda ifade edilir ve STAT3 ekspresyonu farede implantasyon sonrası gelişme sırasında çok erken başlar. STAT3 birçok farklı sitokin, büyüme faktörü ve onkogen ile aktive edilebilir. IL-6 sitokin ailesinin birçok biyolojik işlevi vardır ve STAT3 bu işlemlerde önemli bir rol oynar. Fare miyeloid lösemi M1 hücrelerinde IL-6 aktivasyonunun, hücrelerde çoğalmanın durmasına ve makrofajlarda terminal farklılaşmasına yol açtığı gösterilmiştir. STAT3'ün aşırı ekspresyonu, IL-6'nın neden olduğu etkileri ve c-myc ve c-myc'nin IL-6 ile indüklenmiş baskısının inhibisyonu ile sonuçlanır. Bu deneyler ilk kez STAT3 aktivasyonunun IL-6 aracılı büyüme için gerekli olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalar STAT3 aktivasyonunun sadece hücrenin hayatta kalması için gerekli olmadığını, aynı zamanda STAT3 aracılı siklin D2, D3 ve A ve cdc25A'nın regüle edilmesi ve p21 ile p27'nin regülasyonu yoluyla hücre döngüsü geçişi için de gerekli olduğunu gösterdi. (Fukada ve ark. 1998).

2.11.1. Farelerde STAT3 koşullu gen hedefleme

Embriyonik dönemde eksikliği mortaliteye yol açan tek STAT ailesi üyesi STAT3'tür. STAT3 eksikliği olan fareler embriyonik öncesi aşamaya kadar gelişir, ancak embriyonik dönemde hızlı bir dejenerasyon gösterir. Bu muhtemelen beslenme yetersizliğinden kaynaklanmaktadır, çünkü STAT3, 7. günde, maternal ve embriyonik çevre arasındaki besin alışverişi için önemli olan embriyonik viseral endodermda eksprese edilir. STAT3 aktive edici yolakların bileşenlerinin inaktif edilmesi ayrıca gp130 ve LIFR β gibi embriyonik ölümlere yol açar. Bununla birlikte, bilinen aktive edici sitokinlerin ya da büyüme hormonlarının ya da JAK'ların hiçbiri gelişimde bu kadar erken işlev görmez (Levy ve Darnell 2002).

STAT3 eksikliği olan T hücreleri, IL-6 aracılı apoptozun önlenmesindeki bir kusurdan dolayı proliferatif bir yanıt kaybı oluşturduğu gösterilmiştir. STAT3 eksikliği olan T hücrelerinde, antiapoptotik protein Bcl-2 IL-6'ya cevaben artar. Bu, STAT3'ün Bcl-2 bağımsız anti-apoptotik fonksiyona sahip olduğunu göstermektedir (Danial ve Rothman 2000, Bowman ve Joyce 2016).

STAT3 fosforilasyonu, meme bezi involusyonu başlangıcında meydana gelir ve STAT3 boş meme bezleri, apoptozda bir azalma ve epitel hücrelerinin geniş apoptosisi ile karakterize edilen meme bezi gelişiminde bir aşama olan çarpıcı bir involusyonu gecikmesi gösterir. Normal bezlerde, involusyona, insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein (IGFBP5) seviyelerinin artması eşlik eder ve bu, yaşama faktörü insülin benzeri büyüme faktörünü (IGF1) bağlar ve IGF1'i inhibe eder. IGFBP5 düzenlemesinin STAT3 boş meme bezlerinde gözlenmemesi nedeniyle IGFBP-5'in STAT3 için doğrudan veya dolaylı bir hedef olduğunu gösteren kanıtlar vardır. Bu veriler ilk kez STAT3'ün in vivo apoptoz için önemli olduğunu göstermiştir. (Chapman ve ark. 1999).

Kardiyomiyositlerde STAT3 geninin çıkarıldığı çalışmalarda, STAT3'ün inflamatuvar cevap ve sağkalımın düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Jacoby ve ark. 2003). STAT3 eksik olan hepatositlerde, IL-6'nın ciddi şekilde bozulmuş olan karaciğerde akut faz yanıtını indüklediği ortaya konmuştur. STAT3β eksikliği olan fareler, endotoksik şok sonrası iyileşmenin azaldığını ve karaciğerde endotoksin ile indüklenebilen genlerin bir alt kümesine aşırı duyarlılık sergilediklerini gösterdi. Bu bulgular, sistemik inflamasyonun kontrolünde STAT3β'nin kritik bir negatif düzenleyici olduğunu ortaya koymaktadır. Bu veriler, erken gelişim dönemindeki STAT3 aktivatörlerinin yetişkin dönemdeki aktivatörlerden farklı olduğunu göstermektedir. (Alonzi ve ark. 2001, Li ve Schneider 2003, Yoo ve ark. 2002).

2.11.2. İnsan hastalıklarında STAT3 işlevi

Chron hastalığı, gastrointestinal kronik enflamatuvar bir hastalıktır. Crohn hastalığına sahip insanlarda ve fare modellerinde yapılan araştırmalarla, hastalığın; genetik olarak önceden belirlenmiş bir konakçıda, bağırsak florasının normal bileşenlerine düzensiz bir bağışıklık tepkisi olarak ortaya çıktığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar, STAT3'ün, Crohn hastalığına yol açan doğal bağışıklık geliştirilmesinde ve düzenlenmesinde kritik rollere sahip olabileceğini göstermektedir. İlk olarak, hematopoez sırasında kemik iliği hücrelerinde STAT3'ün dokuya özgü bozulması, 4 ila 6 ay arasındaki farelerin ölümüne neden olur. (Welte ve ark. 2003). İkincisi, Crohn hastalığından ve sağlıklı gönüllülerden alınan intestinal T hücrelerinin bir çalışmada, STAT3 ve STAT4'ün, Crohn hastalarında yapısal olarak aktif hale getirildiği, ancak sağlıklı bireylerde aktif olmadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, STAT3'ün Crohn hastalığı patolojisine katkıda bulunduğu mekanizma bilinmemektedir (Lovato ve ark. 2003).

2.11.3. Kanserde STAT3

STAT3, çok çeşitli insan tümörlerinde yapısal olarak aktive edilir, bu aktivite, sitokin reseptörlerinin düzensizliğine, büyüme faktörleri reseptörlerine ve anormal JAK aktivitesine atfedilir. Örneğin, TGF- α ve EGFR'nin yükselmesi, baş ve boynun skuamöz hücreli karsinomunda (SCCHN) STAT3'ü aktive eder (Song ve Grveis 2000). STAT3 ayrıca v-abl, v-src, v-fps, v-sis, v-ros ve v-eyk gibi onkojenler tarafından da aktif olarak aktive edilir. STAT3'ün aşırı ekspresyonu, STAT3 antisens oligonükleotitlerinin kullanımının, çok sayıda kanser hücre dizisi veya tümöründe yapısal olarak aktive edilmiş STAT3'ün fonksiyonunu incelemek için geçerli araçlar olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, STAT3 sinyalinin inhibe edilmesi, transforme fenotipin baskılanmasına, küçük olmayan akciğer hücrelerinin, melanom hücrelerinin, meme kanseri hücrelerinin, prostat kanseri hücrelerinin, yumurtalık kanseri hücrelerinin, glioblastoma multiforme hücrelerinin ve apoptozinin baskılanmasına neden olmaktadır (Burke ve ark. 2001, Rahaman ve ark. 2002). STAT3 aracılı transformasyon için diğer kanıtlar, SH2 alanının C-terminali döngüsündeki iki sistein tortusunun ikame edilmesi nedeniyle kendiliğinden dimer olan, DNA'ya bağlanan ve bu yapının transkripsiyonunu aktive eden bir STAT3 molekülü (STAT3-C) ile yapılan deneylerden elde edilmiştir. (Bromberg ve ark. 1999, Levy ve Inghirami 2006).

Genel bir yaklaşımla, STAT3 aktivasyonunun apoptozu önlediğini, proliferasyonu uyardığını ve malign transformasyonda etkili olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, STAT3 aktivasyonunun pro-apoptotik ve büyüme önleyici fonksiyonlara sahip olduğu örnekler de vardır. Yapılan çalışmalar STAT3 aktivitesi ve daha iyi sağkalım ile aralarında bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Örneğin, nodül negatif meme kanseri pozitif, fosfo-STAT3 nükleer ekspresyonu olan hastalar, hem kısa (5 yıl) hem de uzun vadede (20 yıl) önemli ölçüde iyileşmiş bir yaşam süresine sahiptir (Filhart ve ark. 2003).

2.11.4. STAT3 hedef genleri

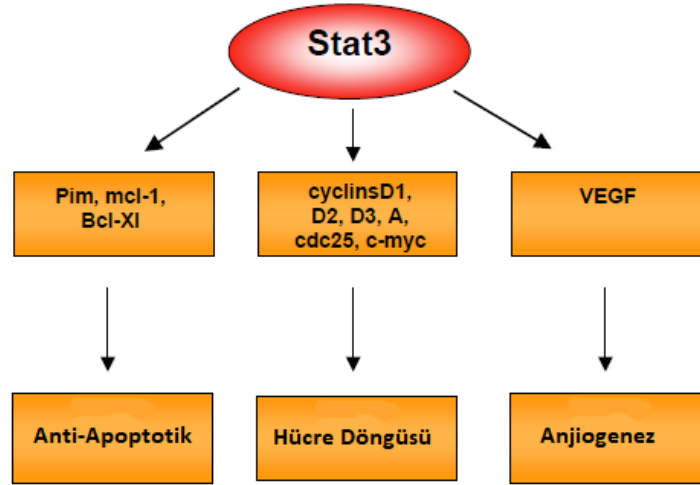
Aktive STAT3'ün neden farklı hücre tiplerinde farklı fonksiyonlara sahip olduğu cevabı bilinmemektedir, ancak bunun farklı STAT3 hedef genlerinin ekspresyonundan kaynaklandığı ileri sürülmektedir. STAT3 tarafından düzenlenen genler, son gözlemlenen biyolojik etkilere yol açan sinyal kaskadlarını tetikledikleri için çok önemlidir (Şekil 2.10) (Çizelge 2.4) (Zhang ve ark. 2003, Matsui ve ark. 2002).

Çizelge 2.4. STAT3 hedef genleri

STAT3 Tarafından upregüle edilen genler	Hücre Hattı	Referans
Angiotensinogen II	HepG2	(Sherman ve Brasier, 2001)
Bcl-xl	STAT3C transforme NIH3T3, U266 myeloma hücreleri, Baş ve boyun squamous hücre carcinomaları	(Bromberg ve arkadaşları., 1999; Catlett-Falcone ve ark. 1999; Grandis ve ark. 2000)
cdc25A	BAF/B03	pro-B cells (Fukada ve ark. 1998)
C/EBP δ	MCF-7	(Zhang ve ark. 2003)
c-myc	STAT3C transforme NIH3T3, BAF/B03, murine pro-B hücreleri, MCF-7, HepG2	(Bowman ve ark. 2001; Bromberg ve ark. 1999; Kiuchi ve ark. 1999; Zhang ve ark. 2003)
cyclin A	BAF/B03 pro-B cells	(Fukada ve ark., 1998)
cyclin D1	STAT3C transforme NIH3T3, MCF-7, v-src transforme NIH3T3 ve BALB/c 3T3	(Bromberg ve ark. 1999; Sinibaldi ve ark. 2000; Zhang ve ark. 2003)
cyclin D2	BAF/B03 pro-B cell	(Fukada ve ark. 1998)
cyclin D3	BAF/B03 pro-B cell	(Fukada ve ark. 1998)
cyclin E	v-src transforme NIH3T3 ve BALB/c 3T3	(Sinibaldi ve ark. 2000)
Fibronectin	MCF-7, T47D	Zhang ve ark. 2003a
mcl-1	Large granular lymphocyte (LGL) lökemia hücreleri	(Epling-Burnette ve ark. 2001)
p21	v-src transforme NIH3T3 hücreleri ve BALB/c3T3 hücreleri	(Sinibaldi ve ark. 2000)
p27	A375	(Kortylewski ve ark. 2001)

Çizelge 2.4. STAT3 hedef genleri (devam)

p53	MCF-7	(Zhang ve ark. 2003)
pim-1 ve pim-2	BAF/B03 pro-B cell	(Shirogane ve ark. 1999)
VEGF NIH3T3,	B16 tümör hücreleri, İnsan pankreatik hücre hattı	(Niu ve ark. 2002b; Wei ve ark. 2003)
STAT3 Tarafından downregüle edilen genler	Hücre Hattı	Referans
cyclin D1	fetal hepatocytes	(Matsui ve ark. 2002)
cyclin D2	fetal hepatocytes	(Matsui ve ark. 2002)
p21	BAF/B03 pro-B cells	(Fukada ve ark. 1998)
p27	BAF/B03 pro-B cells	(Fukada ve ark. 1998)



Şekil 2.10. STAT3 tarafından düzenlenen ve kanser progresyonunda önemli genler (Carpenter ve Lo 2014)

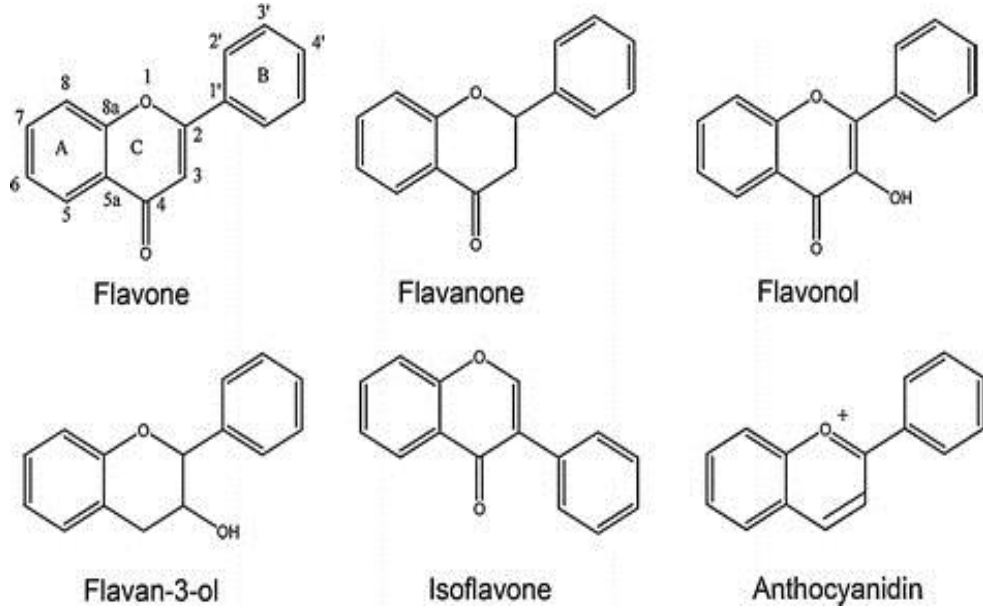
STAT3 tarafından düzenlenen P27 ve C/EBP δ dışında, kanser hücrelerinde STAT3 kaynaklı büyüme inhibisyonuna katılan hedefler henüz belirlenememiştir. p27, BAF/B03 pro-B hücrelerinde STAT3 ile azaltılır. Bu tutarsızlık, hücrelerin farklı genetik arka planından kaynaklanıyor olabilir (Kortylewski ve diğerleri, 2001).

2.12. Flavonoidler

Flavonoidler ailesi başlıca; flavonlar, flavanlar, flavonoller, kateşinler ve antosiyanidinler üyelerinden oluşan, bitkilerin biyolojik süreçlerde doğal olarak sentezledikleri polifenolik bileşiklerdir (Şekil 2.11) (Cassidy ve Minihane 2017).

Yaklaşık 500 milyon yıl önce yeşil alglerde, rastlanan flavonoidler, evrimsel süreçte iki biyogenez yolunun (sinnamat ve antik poliketid yollarının) füzyonu sonucu meydana gelmişlerdir (Di Carlo ve ark. 1999, Harborne ve Mabry 2013). Flavonoidler bitkilerde genellikle glikozile halde bulunurlar ve yapraklar, çiçekler ve meyvelerdeki mavi, kırmızı, sarı ve turuncu parlak tonların oluşmasına neden olurlar (Brouillard ve Cheminat 1987). Yaprak çiçek ve meyvelerden başka, flavonoidler, fındık, tahıl, baharatlar ve bazı tıbbi bitkilerde ayrıca şarap (özellikle kırmızı şarap), çay gibi içeceklerde ve düşük seviyelerde de birarada bulunurlar (Kühnau 1976).

Flavonoid iskeletinin B-halkası ve heterosiklik kısmı, uygun bir hidroksi sinamik asit-CoA ester (genellikle 4-kumaroil-CoA) ile sağlanırken, A-halkası; malonil-CoA yoluyla üç asetat ünitesinden orjin alır (Harborne 2013). Flavonoidler metabolize edildikleri sırada sırasında, hidroksil grupları ile modifiye edilirler (Faz I biyotransformasyon) ve daha sonra metillenerek, sülfatlanarak veya glukuronidasyonla (Faz II biyotransformasyon) modifiye edilirler. Yiyeceklerde, flavonoidler çoğunlukla 3-O-glikozitler ve polimerler şeklinde bulunur (Hammerstone ve ark. 2000). Örneğin; fermantasyon süresince yeşil çay yapraklarının enzimatik olarak oksitlenerek siyah çaya dönüşmesi, flavanollerin tanenlere ve diğer kompleks bileşiklere polimerizasyonun sonucudur (Balentine ve ark. 1997).



Şekil 2.11. Flavonoid anasınıfları ve molekül yapıları (Cook ve Samman 1996)

En yaygın glikosidik birim glikozdur, bunun yanında glukoramnoz, galaktoz, arabinoz ve ramnoz daha az bulunan diğer örnekler arasında gösterilebilir (Cook ve Samman 1996). Bu şekerlerin β -bağı genellikle pankreatik enzimler tarafından hidrolize edilmeye karşı dirençlidirler. Bu nedenle glikosidik bağın beta-hidrolizinden bağırsak mikrobiyotasının, sorumlu olduğu kabul edilmektedir (Day ve ark. 2000). Luteolin-7-glukozit, kaempferol-3-glukosid ve kersetin-3-glukosid, ince bağırsak tarafından hidrolize edilip absorbe edilebilir. Bunun yanında Antosiyanin glikozitleri gibi bazı flavonoid glikozidlerin bozulmadan absorbe edilebildiği bilinmektedir (Cao ve Prior 1999, Cassidy ve Minihane 2017, Gopalan ve ark. 1992, Spencer ve ark. 1999). Emilim, kolonun mikrobiyal popülasyonunun yanı sıra, dozaja, taşıyıcı araçlara, öncül diyetlere, cinsiyet farklılıklarına da bağlı olarak değişkenlik gösterebilir (Cassidy ve Minihane 2017).

Esas olarak flavonoidler, bitki biyokimyasında ve fizyolojisinde antioksidan etki göstermek, enzim inhibitörleri olarak rol almak ve toksik maddelerin öncülleri olmak gibi önemli roller oynarlar. Bu bileşikler; fotosentezde aracı moleküller olarak, enerji transfer faktörleri olarak, büyüme düzenleyicileri ve enfeksiyonlara karşı koruyucu olarak da işlev görürler. Bunun dışında azot fiksasyonuna katılırlar ve bazı bitkilerde pigment olarak görev alırlar. Bitki flavonoidlerinin, çeşitli hayvan türleri ve diğer organizmalarla evrim boyunca uzun süre ilişki içinde olması, memelilerde ve diğer biyolojik sistemlerde, bu kimyasalların önemli biyokimyasal ve farmakolojik aktivitelerden sorumlu olabilecekleri fikrini

doğurmuştur (Tohge ve ark. 2017, Waladkhani ve Clemens 2008). Öte yandan, insanlarda ve yüksek organizmalarda flavonoidlerin anti-inflamatuar, antioksidan, antialerjik ve hepato-koruyucu özelliklere sahip oldukları uzun zamandır bilinmektedir. Bu özelliklerine ek olarak flavonoidlerin antitrombotik, antibakteriyel, antifungal, antiviral, antikanser ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu özelliklere sahip oldukları düşünülmektedir (Orhan ve ark. 2010, Tapas ve ark. 2008).

Flavonoid gibi antioksidan özellik gösteren moleküllerce zengin diyetlerin yaşam süresini uzatabileceği düşünülmektedir. Bu fenomen “Fransız Paradoksu” olarak da isimlendirilmektedir. Fransız Paradoksuna göre yüksek meyve/meyve suyu ve sebze/sebze suyu içeren diyetlerle beslenen popülasyonlarda koroner kalp hastalıklarının insidansı göreceli olarak daha düşüktür (Cerletti ve ark. 2017, Hertog ve ark. 1993, Terao 2017).

2.12.1. Flavonoidlerin Fizyolojisi

Flavonoidler genellikle aglikon formunda değil suda daha iyi çözünen glikozid formunda bulunurlar. Flavonoid glikozitler, ince bağırsağa ulaştıklarında, sodyum bağımlı glukoz taşıyıcı 1 (SGLT1), aracılığıyla veya glikoz taşıyıcıları olan GLUT-1 ve GLUT-2 aracılığıyla epitelden geçebilir. (Tarahovsky ve ark. 2014, Williamson ve ark. 2018) Sitosolik β -glukozidazlar daha sonra bu glikoz parçasını koparır ve bundan sonra flavonoid aglikon formunda hücre içinde kalabilir veya sistemik dolaşıma girebilir. Hem ince hem de kalın bağırsakların lümenlerindeki β -glukozidazlar, flavonoid aglikonu glikozile edilmiş formdan parçalayabilir ve bundan sonra epitelyal hücreler tarafından absorbe edilebilir. Bununla birlikte, bu absorpsiyon şekli, flavonoid glikozidi ince bağırsak lümenine geri aktarabilen MRP2 (Multidrug resistance-associated protein 2) tarafından verimsiz hale getirilebilmektedir. Aglikon karaciğere ulaştığında, atılmadan önce glukuronide edilebilir, sülfatlanabilir veya oksidatif metabolizmaya maruz kalabilir (Walle 2004, Kay ve Crozier 2018)

Aglikon flavonoidler direkt olarak plazma zarlarına girebilirler çünkü hidrofobiktirler ve bu nedenle de zarlarda birikme eğilimi gösterirler. (Yagolnik ve Muzafarov 2014, Kay ve Crozier 2018) Flavonoidlerin moleküler yapısı, plazma zarında ne miktarda tutulacaklarının temel belirleyicisidir. Membranın polar fosfat grupları; moleküldeki hidroksil grupları, şeker kısımları ve sülfat grupları ile hidrojen bağları oluştururlar (Košinová ve ark. 2012).

Flavonoidler, hücrenin sitozolünde çok çeşitli sinyal yollarını düzenler. Bu yollar, metabolizma, hücre büyümesi, hücre döngüsü, apoptoz, otofaji, hücre farklılaşması ve kanser hücresi metastazı gibi kritik hücre fonksiyonlarıdır (Zhang ve ark. 2009, Zhu ve ark. 2013). Flavonoidlerin tetiklediği sinyaller karmaşık olabilir ve dallanmalı bir şekilde düzenleyici yolları başlatabilir. Siklinler ve sikline bağımlı kinazlar, hücre bölünmesinin kilit düzenleyicileridir. Siklinler ve sikline bağımlı kinazlar hücre döngüsünün aşamasına ve söz konusu hücrenin tipine bağlı olarak farklı bir rol üstlenirler (Bendris ve ark. 2015, Malumbres ve Barbacid 2009). Genellikle p21 gibi Cdk inhibitörleri ile ilişkili fonksiyonlarını yerine getirmek için kompleksler oluştururlar. (Taylor ve ark. 2008) Esas görevleri normal şartlar altında istenmeyen hücreleri apoptoza yönlendirmektir. Bu durum, kaspaz proteinlerinin aktivasyonu ile sonuçlanan birkaç yolla tetiklenebilir. Apoptotik olaylar da, B hücreli lenfoma-2 molekülü (BCL-2), Bcl-X1 gibi anti-apoptotik proteinler ve Bax veya Bad gibi pro-apoptotik proteinler tarafından düzenlenebilir.

2.12.2. Flavonoidlerin Terapötik Amaçlı Kullanımı

Flavonoidlerin bitkilerde oynadığı fizyolojik roller dışında, son yıllarda, antioksidan etkileri ve potansiyel terapötik rolleri de incelenmiştir (Zhang ve ark. 2019). Diyet takviyesi olarak kullanımlarının, sağlığı teşvik edici özelliklerinin bulunmasının yanı sıra, flavonoidlerin kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etkilerinin de olduğu gösterilmiştir (Cook ve Samman 1996, Jiang ve ark. 2019, Maggiolini ve ark. 2005, Nöthlings ve ark. 2007).

Flavonoidlerin sağlığa faydaları yeni ilaç keşiflerinin yapılmasında yardımcı olabilir. Flavonoidler oldukça zengin bir alt sınıf tablosu gösterirler. Örneğin; Apigenin, baicalein, luteolin ve chrysin flavonların alt sınıfına aittir; kaempferol, myricetin ve quercetin flavonların alt sınıfına daha yakındır; hesperetin, flavanone bileşiğidir; genistein ve daidzein izoflavonların alt sınıfı ile birlikte sınıflandırılır; baicalin, catechin ve rutin sırasıyla flavon glikozitler, flavan-3-ols ve flavonol glikozitler ile uyumludur. Kanserler dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar flavonoid alımı ile kontrol edilir. Kanser hücre hattındaki sitotoksikite çalışmaları, temel olarak normal hücreleri etkilemeyen kanser hücrelerinde toksisiteye sebep olan flavonoid bileşiklerinin güçlü antikanser etkilerini göstermiştir (Manthey ve Guthrie 2002, Edgar ve ark. 2008, Ullah ve ark. 2011). Flavonoidler kanser hücresi eliminasyonunda makrofaj fonksiyonunu düzenleme

yeteneğine sahip olan ve hücre çoğalmasının potansiyel bir inhibitörü olarak işlev gören flavonlarla gerçekleştirilen birçok in vitro ve in vivo çalışma, flavonoidlerin çeşitli kanser hücre hatlarına karşı iyi aktiviteye sahip olduğunu doğrulamıştır. Ayrıca flavonoidler, kanser hücresi hatlarında antiproliferasyon ve sitotoksosite oluşturma kabiliyetine sahip bileşiklerdir (Abotaleb ve ark. 2019).

Flavonoidlerin kimyasal yapısında meydana gelen küçük değişiklikler bu moleküllerin biyolojik aktivitelerini çok önemli ölçüde etkileyebilir. Bunun en çarpıcı örneklerinden biri krizin ve kersetin moleküllerinin antioksidan etkileri arasındaki farktır. Kersetin krizin molekülünden farklı olarak B halkasında iki, C halkasında ise bir tane olmak üzere toplam üç tane hidroksil grubu bulundurur ve krizin kersetine göre 20 kat daha etkili bir antioksidandır (Mohammed 2009).

2.11.3. Flavonoidler ve Kanser

Doğal bileşiklerin ve bu bileşiklerinin türevlerinin kanser tedavisinde kullanımı, son yıllarda bilim dünyasının en yoğun çalıştığı alanların başında gelmektedir ve doğal ürünler ve türevleri, ilaçların keşfedilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Butler 2008, Butler 2004, Liu ve Zhan 2019, Mishra ve Tiwari 2011).

İlk etapta sağlığı teşvik edici özellikleri üzerinde yoğunlaşılacak flavonoidler ve türevi bileşikler üzerine son zamanlarda yapılan çalışmalarda; meme (Pan ve ark. 2012), prostat (Brown ve ark. 2005), akciğer (Liskova ve Büsselberg 2019, Park ve ark. 2012, García ve ark. 2019, Shih ve ark. 2009) ve kolorektal kanser (Ko ve ark. 2005, Wang ve ark. 2018) dahil olmak üzere, birçok kanser türüne yönelik oluşturulan modeller flavonoidlerin in-vitro ve prelinik etkilerini ortaya koymuştur. Benzer şekilde flavonoidler ve türevleri, lösemi (Ko ve ark. 2005), glioma (Siegelin ve ark. 2009, Siegelin ve ark. 2008), hepatik (Huang ve ark. 2013) ve pankreas kanseri (Henderson ve Kolonel 2007) gibi kanser türlerinde terapi amaçlı kullanılacak aday moleküller olarak gösterilmişlerdir.

Özetle flavonoidler birçok kanser hücre hattında hücre döngüsünün baskılanmasını ve apoptozu indükleyebilir. Hücre siklüsünün baskılanmasını, G1 / S kontrol noktasında siklin D, E ve A'nın ve siklin-bağımlı kinazların CDK2 ve CDK4'ün aşağı yönlü regülasyonu yoluyla indükleyebilirler (Cullen ve Martin 2008).

Flavonoidler, hücre içi sinyal mekaniklerini düzenlemelerinin yanı sıra hücre zarında birikerek de kanser hücrelerinin davranışlarını değiştirebilirler. Flavonoidlerin

kanser hücrelerinin zarlarında birikmeleri zar akışkanlığını farklı derecelerde etkileyebilir ve bu fenotipik etki, kanser hücrelerinin metastatik özellikleri üzerinde önemli etkilere neden olabilir (Ajdžanović ve ark. 2013, Pawlęga ve ark. 2013, Selvaraj ve ark. 2015).

2.12.4. Flavonoidlerin Epigenetik Etkileri

Flavonoidlerin çok çeşitli hücre içi sinyal yollarını doğrudan etkilemesi muhtemeldir, çünkü flavonoidler çoğu zaman epigenetik modülatörler olarak işlev görür. Flavonoidler, enzim aktivitesini ve ayrıca DNA metilasyonu veya histon asetilasyonu ile ilişkili proteinlerin miktarını değiştirebilir. PC-3 ve 22Rv1 insan prostat kanseri hücrelerinde, apigenin flavonoidi, hem histon deasetilaz proteinlerinin (HDAC) protein ekspresyonunu hem de enzim aktivitesini azaltmıştır; sonuç olarak bu durum, H3 ve H4 histonlarının asetilasyonunu arttırmıştır. Genistein flavonoidinin HeLa insan rahim ağzı kanseri hücre hattında, DNA metil transferazların (DNMT) enzim aktivitesini ve HDAC'ların protein seviyelerini azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, yapılan başka bir çalışmada, genistein MCF-7 ve MDA-MB-231 insan meme kanseri hücrelerinde DNA metilasyon seviyelerini, DNMT aktivitesini ve DNMT1 mRNA ve protein seviyelerini düşürdüğü rapor edilmiştir (Russo ve Ungaro 2019, Xie ve ark. 2014).

Kanser hücreleri, hücre fizyolojisi dinamiklerini epigenetik olarak da değiştirirler: hem pozitif büyüme sinyallerinin aktivitesinde bir artış hem de kontrolsüz büyümeyi önleyebilecek sinyal yollarında yolaklarının aktivitesinde bir düşüş gözlemlenir (Malumbres ve Barbacid 2009). Flavonoidlerin kansere bağlı genlerin transkripsiyonunu epigenetik olarak düzenlediği rapor edilmiştir. MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinde, apigenin flavonoidi, HDAC aktivitesini önemli ölçüde önleyerek ve histon H3 asetilasyonunu indükleyerek p21WAF1/CIP1 transkripsiyonunda bir artışa neden olmuştur (Tseng ve ark. 2017). Genistein flavonoidi ile muamelenin, Sfrp2, Sfrp5 ve Wnt5a'nın DNA metilasyonunu arttırdığı, böylece gen ürünlerinin ekspresyonunu baskıladığı bulunmuştur (Zhang ve ark. 2013)

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Flavonoid Türevi Bileşikler

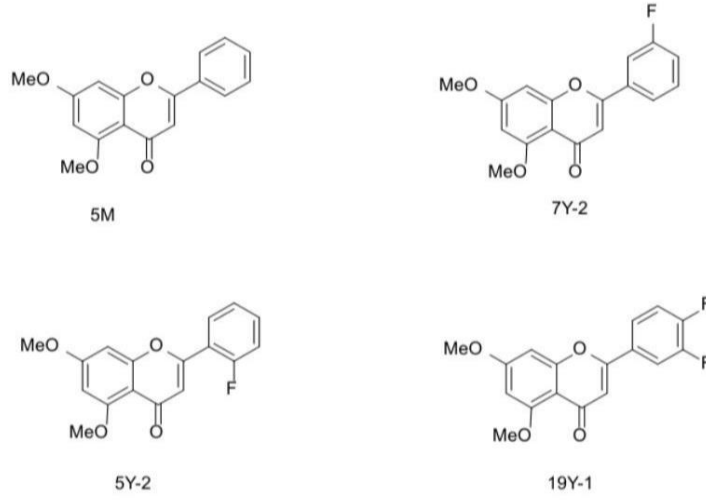
Çalışmamızda kullanılan flavonoid türevi bileşikler, Atatürk Üniversitesi Kimya Bölümü, Organik Kimya Anabilim Dalı'nda sentezlenmiştir. Flovonoid türevi bileşiklerin eldesi, flavone ana omurgasının çeşitli karbonlarından metoksillenmesi ve florlanması ile modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1.).

5M bileşiği flavone omurgadaki A halkasının, 5 ve 7 nolu karbonlarının metoksillenmesiyle elde edilmiştir (Şekil 3.1.). Molekül 282,295g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Bileşiğin maruziyet çalışmalarında kullanılmak üzere ana ve ara stok solüsyon olmak üzere iki konsantrasyonda solüsyonları hazırlanmıştır. 0,001M (1mM) ana stok için 0,0028 gram bileşik 10 ml %2'lik DMSO içerisinde çözünmüş ve su banyosunda sonikasyona maruz bırakılmıştır. Bu solüsyon +4'te 1 aydan fazla olmamak koşuluyla muhafaza edilmiştir. Maruziyet günü 100 mikromolarlık ara stok oluşturmak için ana stoktan 1:10 oranında dilüsyonlar DMEM kullanılarak hazırlanmıştır. Böylece ara stokta %0,2'lik bir DMSO konsantrasyonu elde edilmiştir. Daha düşük seri dilüsyonlar yine DMEM kullanılarak elde edilmiş ve final DMSO konsantrasyonunun % 0,2'ye eşit veya daha düşük olması sağlanmıştır.

7Y-2 molekülü ise A halkasındaki 5 ve 7 nolu karbonların metoksilasyonuna ek olarak B halkasının 3 nolu karbondan florlanmıştır (Şekil 3.1.). Molekül 300,29g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Bileşiğin maruziyet çalışmalarında kullanılmak üzere ana ve ara stok solüsyon olmak üzere iki konsantrasyonda solüsyonları hazırlanmıştır. 0,001M (1mM) ana stok için 0,0030 gram bileşik 10 ml %2'lik DMSO içerisinde çözünmüş ve su banyosunda sonikasyona maruz bırakılmıştır. Bu solüsyon +4'te 1 aydan fazla olmamak koşuluyla muhafaza edilmiştir. Maruziyet günü 100 mikromolarlık ara stok oluşturmak için ana stoktan 1:10 oranında dilüsyonlar DMEM kullanılarak hazırlanmıştır. Böylece ara stokta %0,2'lik bir DMSO konsantrasyonu elde edilmiştir. Daha düşük seri dilüsyonlar yine DMEM kullanılarak elde edilmiş ve final DMSO konsantrasyonunun % 0,2'ye eşit veya daha düşük olması sağlanmıştır.

5Y-2 molekülü 7Y-2 molekülünden farklı olarak B halkasının 3 nolu karbonundan değil 6 nolu karbonundan florlanarak sentezlenmiştir (Şekil 3.1.). Molekül 300,29g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Bileşiğin maruziyet çalışmalarında kullanılmak üzere ana ve ara stok solüsyon olmak üzere iki konsantrasyonda solüsyonları hazırlanmıştır. 0,001M (1mM) ana stok için 0,0030 gram bileşik 10 ml %2'lik DMSO içerisinde çözülmüş ve su banyosunda sonikasyona maruz bırakılmıştır. Bu solüsyon +4'te 1 aydan fazla olmamak koşuluyla muhafaza edilmiştir. Maruziyet günü 100 mikromolarlık ara stok oluşturmak için ana stoktan 1:10 oranında dilüsyonlar DMEM kullanılarak hazırlanmıştır. Daha düşük seri dilüsyonlar yine DMEM kullanılarak elde edilmiştir. Böylece ara stokta %0,2'lik bir DMSO konsantrasyonu elde edilmiştir. Daha düşük seri dilüsyonlar yine DMEM kullanılarak elde edilmiş ve final DMSO konsantrasyonunun % 0,2'ye eşit veya daha düşük olması sağlanmıştır.

19Y-1 molekülü A halkasının, 5 ve 7 nolu karbonlarının metoksillenmesine ek olarak B halkasının 4 ve 5 nolu karbonlarının florlanması ile sentezlenmiştir (Şekil 3.1.). Molekül 318,28g/mol molekül ağırlığına sahiptir. Bileşiğin maruziyet çalışmalarında kullanılmak üzere ana ve ara stok solüsyon olmak üzere iki konsantrasyonda solüsyonları hazırlanmıştır. 0,001M (1mM) ana stok için 0,0032 gram bileşik 10 ml %2'lik DMSO içerisinde çözülmüş ve su banyosunda sonikasyona maruz bırakılmıştır. Bu solüsyon +4'te 1 aydan fazla olmamak koşuluyla muhafaza edilmiştir. Maruziyet günü 100 mikromolarlık ara stok oluşturmak için ana stoktan 1:10 oranında dilüsyonlar DMEM kullanılarak hazırlanmıştır. Daha düşük seri dilüsyonlar yine DMEM kullanılarak elde edilmiştir. Böylece ara stokta %0,2'lik bir DMSO konsantrasyonu elde edilmiştir. Daha düşük seri dilüsyonlar yine DMEM kullanılarak elde edilmiş ve final DMSO konsantrasyonunun %0,2'ye eşit veya daha düşük olması sağlanmıştır.



Şekil 3.1. Çalışmamızda kullanılan flavonoid türevi bileşiklerin açık formülü

3.1.Hücre Hattı

Tez çalışmamızda A549 Akciğer Adenokarsinom hücre hattı kullanılmıştır.

3.2. Deneyleerde Kullanılan Kimyasal Materyaller

Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan Kimyasallar

Kimyasal Adı	Markası
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (1X) (DMEM)	Gibco
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco
Hank's Balanced Salt Solution (1X) (HBSS)	Gibco
Trypsin/EDTA (1X)	Gibco
Phosphate buffered saline (1X) PBS	Gibco
Penicilin/Streptomycin (10.000 Units/mL penicilin) (10.000 µg/mL streptomycin)	Gibco
Tripan Mavisi Boyası (% 0.4)	Gibco
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	Sigma
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma
RIPA Lysis Buffer	Thermo

3.3. DeneYlerde Kullanılan Cihazlar

Çalışmamızda kullanılan cihazlar Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Markası
Biyogüvenlik Kabini	Thermo, HeraSafe KS Class II
Karbondioksit İnkübatörü	Thermo, HeraCell 150i
Hassas Terazi	OHAUS, Pioneer PA214C
Işık Mikroskobu	Novel, N-120
İnverted Mikroskop	Nikon, Eclipse TS100
pH Metre	HANNA Instruments, HI 2211
Soğutmalı Santrifüj	Hettich, Universal 320R
Spektrofotometre	Thermo, Multiskan GO
Su Banyosu	Stuart, SWBD
Ultrasonik Homojenizatör	Elma, Elmasonic S 40
-20°C Derin Dondurucu	Bosch
+4°C Derin Dondurucu	Bosch
Soğutmalı Santrifüj	Sigma, 3-30K
Manyetik Karıştırıcı-Isıtıcı	Heidolph, MR Hei-Stveard
-80°C Derin Dondurucu	DAIHAN, SimpleFreez U500

Çizelge 3.2. Kullanılan cihazlar (devam)

Vorteks	VELP Scientifica, Classic
Kuru Blok Isıtıcı	WiseTherm® HB-96D
Soğutmalı Santrifüj	Beckman Coulter, Microfuge 20R
Thermal Cycler	Bio-Rad, T100
Mikrosantrifüj	DAIHAN, Centrifuge CF-5
Real-time PCR Cycler	STRATAGENE Mx3000P
Otoklav	DAIHAN, MaXterile 47

Çizelge 3.2. Kullanılan cihazlar (devamı)

Saf Su Cihazı	Merck, Millipore Direct-Q® 3UV
Western Blot Jel Tankı	Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra System
Güç Kaynağı	Bio-Rad PowerPac HV
Western Blot Transfer Cihazı	Bio-Rad Trans-Blot® Turbo™ Transfer System
Çalkalayıcı	IKA® Rocker 2d Digital

3.4. Çalışmalarda Kullanılan Ticari Kitler

Çalışmamızda kullanılan ticari kitler Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan ticari kitler

Ticari Kitin Adı	Markas
RNeasy Mini Kit	Qiagen
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo
Applied Biosystems Power SYBR Green PCR Master Mix	Thermo

3.5. Hücre Kültürü

Tez çalışmalarımız Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı Hücre Kültürü Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Deneylerde Akciğer Adenokarsinom (A549) hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler, %10 fetal sıgır serumu (FCS), 0.2 mM glutamin, 100 µg/ml streptomisin 100 IU/ml penisilin içeren DMEM-F12 vasatında 37 oC’de, % 5 CO2 ve 1 atm basınç altında 25 ve 75 cm²’lik steril flasklar içerisinde kültüre edilmiştir. Kültür vasatı haftada iki kez değiştirildi hücreler yeterli sayıya ulaştıklarında deneylerde kullanılmak üzere 75 cm²’lik kültür kapları ve 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekim yapılmıştır. Hücreler kültür kaplarının yüzeyini %70-80 oranında kapladıktan sonra, kültürlerin üzerine %10 FCS içeren vasatın yerine SF

(serumsuz vasat; serum free) vasatı eklenerek 24 saat süreyle bu koşullarda inkübe edilmiştir. 24 saat kültüre edildikten sonra yeni sentezlenen flavonoid türevi moleküllerle çeşitli konsantrasyonlarda (1-100µM) muamele edilmiştir. Flavonoidler suda çok az çözündüklerinden, flavonoid anastokları oluşturmak için, çözücü olarak %2 DMSO (Dimethyl Sulfoxide) içeren DMEM solüsyonu kullanılmıştır. Bunun yanında JAK/STAT yolağının çekirdeğe doğrudan transkripsiyon faktörü ile geçiş yapan STAT proteinlerinden dolayı hızlı bir yolak olduğu göz önüne alınarak, maruziyet için 24 saatlik inkübasyon süresi tercih edilmiştir.

3.6. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi (MTT)

Çalışmada yeni sentezlenen flavonoid türevi moleküllerin maruziyet dozları ve süreleri MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testi ile belirlenmiştir. Hücre canlılığının tespiti için yapılan analizler en az üç tekrarlı yapılmıştır. MTT analizinin çalışma prensibi, proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile sarı renkli bir bileşik olan tetrazolyumu kullanarak mor renkli formazan boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak mikropate okuyucu veya spektrofotometre ile ölçülmesine dayanır (Meerlo ve ark. 2011).

MTT analizi aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

- 1- 1 mg/mL MTT çözeltisi hazırlamak için 15 mg MTT tartılıp 15 mL PBS' de çözülmüştür. Her analiz öncesi taze hazırlanmış ve alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korunmuştur.
- 2- A549 hücreleri DMEM besi ortamında 75 cm²'lik flasklarda pasaj geçilmiştir. Pasaj geçilen hücreler tripsinle süspanse edilmiştir. Flask yüzeyinden tamamen kalkan hücre süspanسیونuna serumlu besiyeri eklenerek tripsinin etkinliği durdurulmuştur.
- 3- Hücre süspanسیونu santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve taze besiyeriyle hücreler yeniden süspanse hale getirilmiştir.
- 4- Gerekli dilüsyonlar yapılarak 96 kuyucuklu pleyte 200 µl besi ortamına 50.000 hücre/kuyucuk konsantrasyonunda ekim yapılmıştır.
- 5- Pleyt yüzeyine hücrelerin tutunması için 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- 6- 24 saat inkübasyondan sonra SF aspire edilerek çeşitli konsantrasyonlarda yeni sentezlenmiş olan flavonoid türevi bileşikleri (5M, 7Y-2, 19Y-1 ve 5Y-2) eklenmiş, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- 7- Kuyucuklardaki besiyeri aspirasyon yöntemi ile uzaklaştırılmıştır.

8- Her bir kuyucuk 50 µl PBS ile yıkanmıştır.

9- Kuyucuklardaki son konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde 200 µl MTT çözeltisi eklenmiştir.

10- Hücreler 1 saat MTT çözeltisi ile inkübe edilmiştir.

11- İnkübasyondan sonra kuyucuklardaki MTT çözeltisi aspirasyon yöntemi ile uzaklaştırılıp oluşan formazon kristalleri 150 µl DMSO' da çözülmüştür. Absorbanstaki değişim 490 nm dalgaboyunda izlenmiştir.

3.7. Gen ekspresyonu analizleri

Yeni sentezlenen flavonoid türevi moleküllerinden seçtiğimiz 5M molekülünün MTT analizi ile belirlenen konsantrasyon ve sürelerdeki maruziyetinden sonra A549 hücrelerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirmiş ve hücre proliferasyonunda önemli rol oynayan JAK/STAT yolğunun temel molekülü olan STAT3 ile STAT3'ün uyarıldığı SOCS2, BCL-XL, c-Myc, P21, p53 ve bir başka hücre proliferasyon yolağı olan MAPK yolğunun elamanı ERK1 ve ERK2 genlerinin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Gen ekspresyon analizleri üç tekrarlı yapılmıştır.

3.8. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

RNA izolasyonu için 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına 50000 hücre/ml olacak şekilde ekilen hücreler, tabanı %70 oranında kapladığında flask tabanından Tripsin-EDTA (1X) (% 0.25) ile kaldırılarak toplanmıştır. RNA izolasyonu (Qiagen; RNeasy Mini Kit, Catalog number: 74104) ve cDNA sentezi (Thermo; High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Catalog number: 4368814) aşamaları ticari kit kullanılarak yapılmıştır.

3.8.1. RNA İzolasyonu

Kit içeriği;

RNeasy Mini Spin Columns

Collection Tubes (Toplama tüpleri) (1.5 mL)

Collection Tubes (Toplama tüpleri) (2 mL)

Buffer RLT (45 mL)

Buffer RW1 (45 mL)

Buffer RPE (11 mL)

RNase-Free Water (RNaz içermeyen su) (10 mL)

RNA izolasyon Protokolü aşağıdaki gibi uygulanmıştır.

- 1- Hasat edilen hücrelerin üzerine 600 µL Buffer RLT eklenmiştir.
- 2- Hücreler vorteksenerek çalkalanmıştır.
- 3- Homojenize edilmiş lizata 600 µL % 70'lik etanol eklenmiştir.
- 4- Lizat ve etanol karışımından 700 µL çekilmiştir ve 2 mL'lik toplama tüpleri içindeki RNeasy Mini Spin Column tüplere aktarılmıştır. Tüplerin kapakları kapatılarak oda sıcaklığında $\geq 8000 \times g$ 'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
- 5- RNeasy Mini Spin Column tüplere 700 µL Buffer RW1 eklenmiştir. Tüplerin kapakları kapatılarak oda sıcaklığında $\geq 8000 \times g$ 'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
- 6- RNeasy Mini Spin Column tüplere 500 µL Buffer RPE eklenmiştir. Tüplerin kapakları kapatılarak oda sıcaklığında $\geq 8000 \times g$ 'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
- 7- RNeasy Mini Spin Column tüplere 500 µL Buffer RPE eklenmiştir. Tüplerin kapakları kapatılarak oda sıcaklığında $\geq 8000 \times g$ 'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
- 8- RNeasy Mini Spin Column tüpleri yeni 1.5 mL'lik toplama tüplerine transfer edilmiştir. 30-50 µL RNaz içermeyen su eklenmiş, tüp kapakları kapatılmış ve 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- 9- Toplama tüplerindeki saflaştırılan RNA örneklerinin konsantrasyonu ve A260/A280 absorbans oranı nükleik asit ölçer (Thermo, Multiskan GO) ile belirlenerek cDNA sentezi için kullanılmıştır.

3.8.2. cDNA Sentezi

Kit içeriği

10X RT Buffer, 1 × 1 mL

10X RT Random Primers, 1 × 1 mL

25X dNTP Mix (100 mM), 1 × 0.2 mL

MultiScribe® Reverse Transcriptase (50 U/µL), 2 × 0.1 mL

Protokol;

- 1- Her bir örnek için 2 µL 10X RT Buffer, 2 µL 10X Random primers, 0,8 µL 25X dNTP Mix, 1 µL Reverse Transcriptase, 4,2 µL RNaz içermeyen su kullanılarak; her bir örnek için 10 µL 2X RT master mix solüsyonu hazırlanmıştır.
- 2- 2X RT master mix solüsyonundan, her reaksiyon tüpüne 10 µL aktarılmıştır.

- 2- Her tüpe 10 µL RNA örneği eklenmiştir.
- 3- Tüpler etiketlendikten sonra, aşağıda verilen koşullarda inkübe edilmiştir.

Sıcaklık	Zaman
25°C	10 dakika
37°C	120 dakika
85°C	5 dakika
4°C	∞

İnkübasyon sonrası her tüpe 80 µL RNaz içermeyen su eklenmiştir. Örnekler kullanılıncaya kadar uygun koşullarda saklanmıştır.

3.9. Real-time PCR

Gen ekspresyon analizleri, QIAGEN-Rotor-Gene Q Real-time PCR cihazında, Thermo; Applied Biosystems Power SYBR Green PCR Master Mix, (Catalog number: 4367659) ticari kiti kullanılarak yapılmıştır. Analizi yapılan genlere ait primer dizileri Çizelge 3.4'te verilmiştir. Housekeeping gen olarak kullanılan GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) genine ait primer ise, ticari olarak (Qiagen) satın alınmıştır. Spesifik olmayan ürünleri ve primer-dimer varlığını kontrol etmek için melting curve analizi yapılmıştır. Deneysel üç tekrarlı yapılmış olup, her örnek duplike olarak çalışılmıştır. Deneysel sonuçları kat değişimi (Fold-change) olarak verilmiştir.

3.10. Çalışmada kullanılan primerler

Primerler için literatür çalışması (Çizelge 3.4.) yapıldıktan sonra NCBI sitesinin sunduğu BLAST hizmeti kullanılarak primerlerin spesifik olup olmadığı kontrol edilmiştir. BLAST genetik diziler arasındaki benzer bölgelerin belirlenmesini sağlayan bir algoritma kullanmaktadır. Program, veritabanlarını karşılaştırmak için nükleotit veya protein sekanslarını tarayıp karşılaştırmakta ve istatistiksel hesaplamalar yapmaktadır.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan primerler

Genler	Primerler	Kaynak
STAT3	Forward CAGCAGCTTGACACACGGTA Reverse AAACACCAAAGTGGCATGTGA	(Yu ve ark. 2016)
SOCS2	Forward TTAAAAGAGGCACCAGAAGGAAC Reverse AGTCGATCAGATGAACCACACT	(Zhu ve ark. 2013)
c- MYC	Forward GTCAAGAGGCGAACACACAAC Reverse TTGGACGGACAGGATGTATGC	(Liu ve ark. 2019)
p21	Forward TGTCCGTCAGAACCCATGC Reverse AAAGTCGAAGTTCCATCGCTC	(Meng ve ark. 2018)
P53	Forward CAGCACATGACGGAGGTTGT Reverse TCATCCAAATACTCCACACGC	(Yang ve ark. 2018)
Bcl-X1	Forward GAGCTGGTGGTTGACTTTTCTC Reverse TCCATCTCCGATTCAGTCCCT	(Guo ve ark. 2018)
Erk-1	Forward CTACACGCAGTTGCAGTACAT Reverse CAGCAGGATCTGGATCTCCC	(Wang ve Zhang 2018)
Erk-2	Forward TACACCAACCTCTCGTACATCG Reverse CAGCAGGATCTGGATCTCCC	(Yang ve ark. 2018)

Real time PCR Protokolü;

1- Her bir örnek tüpüne 12.5 µL Power SYBR Green PCR Master Mix, 100 nM primer, 6 µL RNaz içermeyen su ve 100 ng cDNA eklenerek tüplerin kapakları kapatılmıştır.

2- Tüpler cihaza yerleştirilerek aşağıdaki tabloda verilen koşullarda inkübe edilmiştir.

Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
95°C	10 dakika	1
95°C	15 saniye	40
60°C	60 saniye	

3.11. İstatistiksel Analiz

Hücre canlılığı ile ilgili verilerin değerlendirilmesinde GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software Inc. USA) programı kullanılmıştır. Verilerin değerlendirilmesi tek yönlü varyans analizi (One way analysis of variance, ANOVA) ile Dunnet çoklu karşılaştırma (post-hoc) testi kullanılmıştır. Deneyler 3 defa tekrarlanmıştır.

Real-Time PCR verilerinin istatistiksel analizi RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5 ile yapılmıştır. Deneyler 3 defa tekrarlandı. Sonuçlar kat değişimi olarak verilmiştir. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

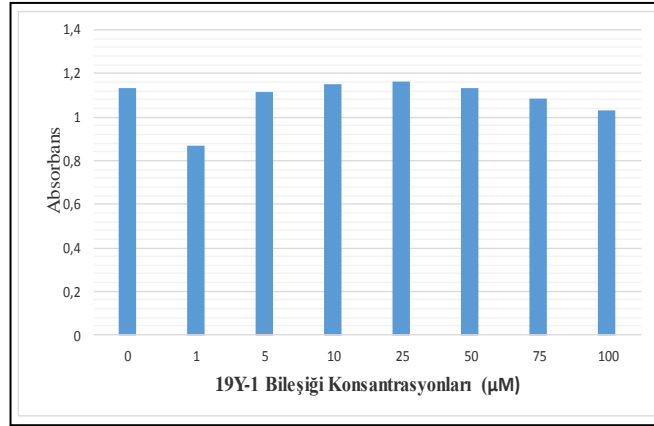
4. BULGULAR

4.1. MTT Assay Çalışmaları

Çalışmamızda; 24 saat boyunca 19Y-1, 5Y-2, 7Y-2 ve 5M bileşiklerine maruz bırakılan A549 hücrelerinden elde edilen MTT sonuçları değerlendirilmiştir.

4.1.1. 19Y-1 Bileşiği için MTT Assay çalışması

19Y-1 bileşiği için gerçekleştirilen MTT analizlerinde 0 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M ve 100 μ M konsantrasyonları 8 tekrarlı çalışılmış, spektrofotometrik olarak analiz edilmiş, absorbans değerlerinin ortalaması hesaplanarak sütun grafiği çıkarılmıştır (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. 19Y-1 Bileşiği için elde edilen 24 Saatlik uygulama sonunda elde edilen MTT sonuçları.

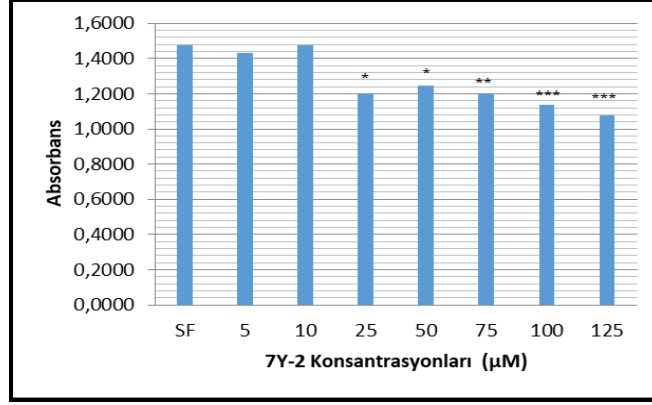
19Y-1 bileşiği için yapılan maruziyet çalışmalarından elde edilen sonuçlarda, uygulama sonrası kontrol grubu (SF) ile maruziyet gruplarının arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Çizelge 4.1.) ($p < 0,05$).

Çizelge 4.1. 19Y-1 molekülü MTT analizine ait veriler (-: önemli değil, +: önemli, $p < 0,05$)

Kontrol ve Maruziyet Gruplarının karşılaştırması	Ort. Farkı	Önemlilik	Önemlilik Derecesi	Uyarlanmış p değeri
SF vs. 1	0,07698	-	-	0,5815
SF vs. 5	-0,01615	-	-	0,9996
SF vs. 10	-0,07588	-	-	0,5959
SF vs. 25	-0,03723	-	-	0,9749
SF vs. 50	-0,002383	-	-	>0,9999
SF vs. 75	0,0009333	-	-	>0,9999
SF vs. 100	0,02475	-	-	0,9972

4.1.2. 7y-2 Bileşiği için MTT Assay çalışması

MTT analizlerinde her konsantrasyon 8 tekrarlı çalışılmış, spektrofotometrik olarak analiz edilmiş, absorbans değerlerinin ortalaması hesaplanarak sütun grafiği çıkarılmıştır (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. 7y-2 Bileşiği için elde edilen 24 Saatlik uygulama sonunda elde edilen MTT sonuçlar

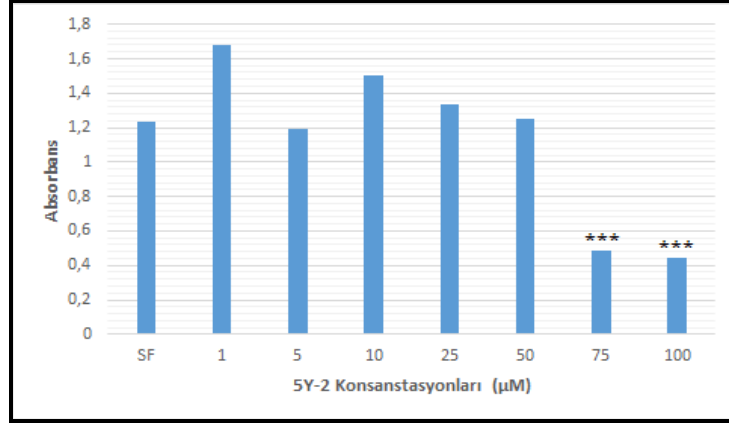
7Y-2 bileşiği için yapılan maruziyet çalışmalarından elde edilen sonuçlarda, uygulama sonrası kontrol grubu (SF) ile maruziyet gruplarının 25 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM ve 125 µM arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.) ($p < 0,05$).

Çizelge 4.2. 7Y-2 molekülü MTT analizine ait veriler (-: önemli değil, +: önemli, $p < 0,05$)

Kontrol ve Maruziyet Gruplarının karşılaştırması	Ort. Farkı	Önemlilik	Önemlilik Derecesi	Uyarlanmış p değeri
SF vs. 5	0,04375	-	-	0,9931
SF vs. 10	0,00305	-	-	>0,9999
SF vs 25	0,274	+	*	0,0101
SF vs. 50	0,2344	+	*	0,0352
SF vs. 75	0,2765	+	**	0,0093
SF vs. 100	0,3433	+	***	0,0009
SF vs. 125	0,399	+	***	0,0001

4.1.3. 5y-2 Bileşiği için MTT Assay çalışması

MTT analizlerinde her konsantrasyon 8 tekrarlı çalışılmış, spektrofotometrik olarak analiz edilmiş, absorbans değerlerinin ortalaması hesaplanarak sütun grafiği çıkarılmıştır (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. 5Y-2 Bileşiği için elde edilen 24 Saatlik uygulama sonunda elde edilen MTT sonuçları

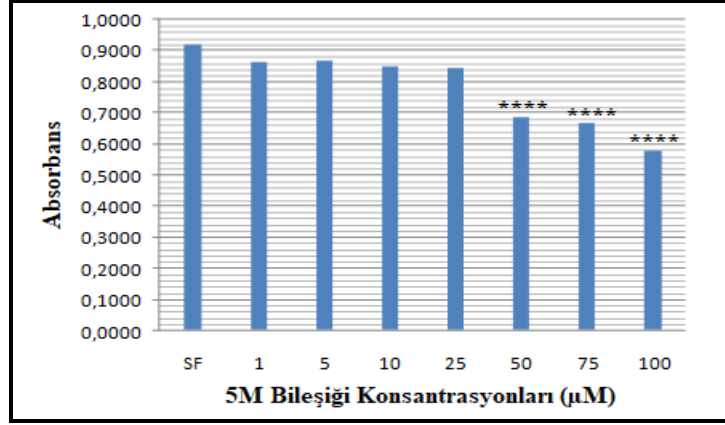
5Y-2 bileşiği için yapılan maruziyet çalışmalarından elde edilen sonuçlarda, uygulama sonrası kontrol grubu (SF) ile maruziyet gruplarının 75 µM ve 100 µM konsantrasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir (Çizelge 4.3.) ($p < 0,05$).

Çizelge 4.3. 5Y-2 molekülü MTT analizine ait veriler (-: önemli değil, +: önemli, $p < 0,05$)

Kontrol ve Maruziyet Gruplarının karşılaştırması	Ort. Farkı	Önemlilik	Önemlilik Derecesi	Uyarlanmış p değeri
SF vs. 1	-0,5186	-	-	0,9974
SF vs. 5	-0,06737	-	-	0,9074
SF vs. 10	-0,2876	-	-	0,2875
SF vs. 25	-0,187	-	-	0,7128
SF vs. 50	-0,09872	-	-	0,9810
SF vs. 75	0,6417	+	***	0,0010
SF vs. 100	0,6904	+	***	0,0004

4.1.4 5M Bileşiği için MTT Assay çalışması

5M bileşiği için gerçekleştirilen MTT analizlerinde 0 µM (SF), 1 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 75 µM ve 100 µM konsantrasyonları 8 tekrarlı çalışılmış, spektrofotometrik olarak analiz edilmiş, absorbans değerlerinin ortalaması hesaplanarak sütun grafiği çıkarılmıştır (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. 5M Bileşigi için elde edilen 24 Saatlik uygulama sonunda elde edilen MTT sonuçları

5M bileşigi için yapılan maruziyet çalışmalarından elde edilen sonuçlarda, uygulama sonrası kontrol grubu (SF) ile maruziyet grupları arasında 1, 5, 10, 25 µM konsanstrasyonlardaki maruziyetlerde anlamlı bir fark bulunamamış ancak 50, 75 ve 100 µM konsanstrasyonlardaki maruziyetlerde istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir (Şekil 4.4) ($p < 0,05$).

Çizelge 4.4. 5M molekülü MTT analizine ait veriler (-: önemli değil, +: önemli, $p < 0,05$)

Kontrol ve Maruziyet Gruplarının karşılaştırması	Ort. Farkı	Önemlilik	Önemlilik Derecesi	Uyarlanmış p değeri
SF vs. 1	0,05533	-	-	0,5729
SF vs. 5	0,04997	-	-	0,6740
SF vs. 10	0,06899	-	-	0,3394
SF vs. 25	0,07804	-	-	0,2227
SF vs. 50	0,2353	+	****	<0,0001
SF vs. 75	0,2538	+	****	<0,0001
SF vs. 100	0,3451	+	****	<0,0001

Analizler sonucunda A549 hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkisi uygun olan moleküllerden 5M molekülü gen ekspresyon analizleri gerçekleştirilmek üzere seçilmiştir. Gen ekspresyon analizleri için, istatistiksel olarak anlamlılığın başladığı konsantrasyon 50 µM ve istatistiksel olarak anlamlı bir farkın henüz oluşmadığı 25 µM konsantrasyonu seçilmiştir (Çizelge 4.1). Etkili konsantrasyon olarak ilk anlamlı antiproliferatif etkinin gözlemlendiği 50 µM'lık konsanstrasyon JAK/STAT yolağının moleküler indüksiyonunun belirlenmesinde tercih edilmiştir. Etkinlik göstermeyen uç değer olarak 25 µM konsanstrasyon kullanılmıştır. Hücre kontrol grubu olarak sadece serumsuz media içeren

SF grubu kullanılmıştır. Maruziyet yapılmayan SF grubu negatif kontrol olarak gen ekspresyon analizlerinde kullanılmıştır.

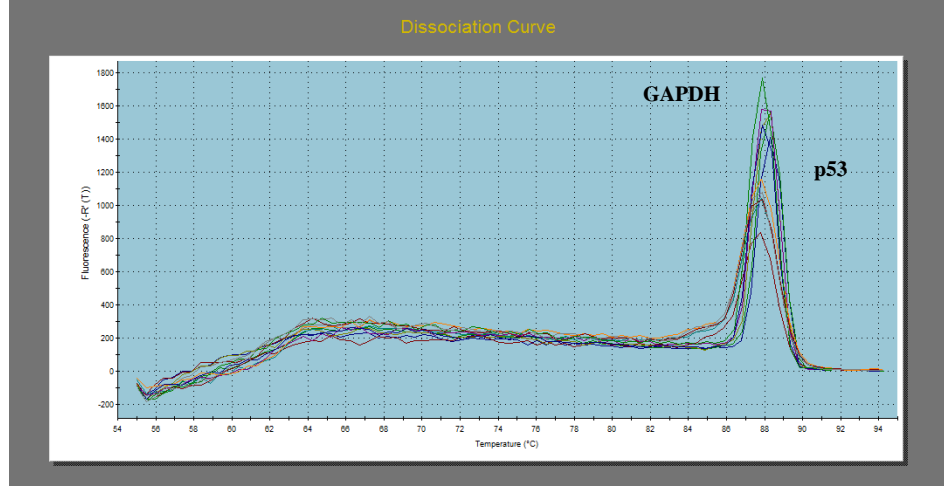
4.2. Gen Ekspresyon Analizi

DMEM besiyeri içinde çoğaltılan A549 hücrelerinden elde edilen cDNA örnekleri kullanılarak STAT3, p21, Bcl-Xl, p53, SOCS2, c-myc, ERK1, ERK2 ve GAPDH gen ekspresyon analizleri yapılmıştır. GAPDH Housekeeping gen olarak kullanılmıştır. Sonuçlar kat değişimi olarak verilmiştir. Kat değişim hesaplamaları referans gen (bu çalışmada GAPDH kullanılmıştır) için elde edilen Ct (threshold Cycle) değerinden sırasıyla SF ve maruziyet grupların Ct değerleri çıkarılarak ΔCt_{SF} ve $\Delta Ct_{Maruziyet}$ değerleri hesaplanmıştır. Daha sonra Livak Metodu'na (Livak ve Schmittgen 2001) göre $2^{-(\Delta Ct_{SF} - \Delta Ct_{Maruziyet})}$ yani $2^{-\Delta \Delta Ct}$ değeri hesaplanmıştır.

Spesifik olmayan ürünleri ve primer-dimer varlığını kontrol etmek için bütün primerlere erime eğrisi analizi yapılmıştır (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.9)

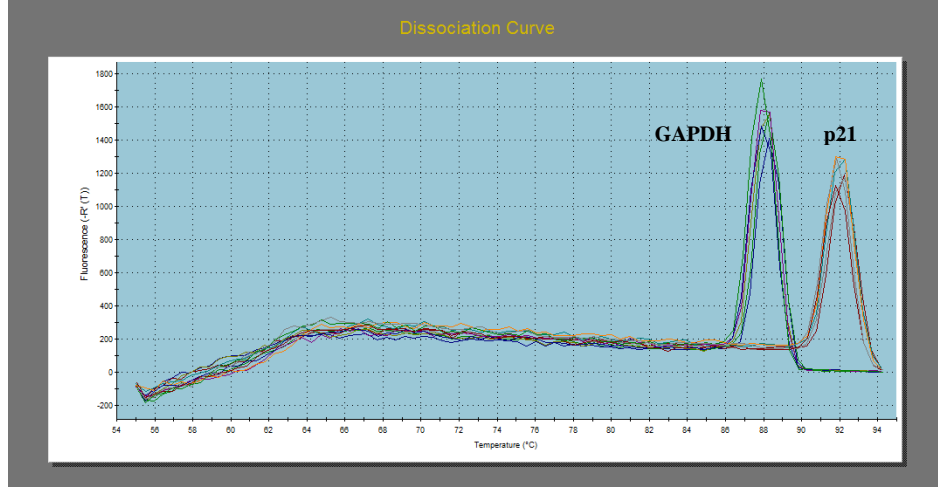
Melting (Dissociation) curve analizlerinde, GAPDH genine ait erime eğrisinin türevsel grafiği yaklaşık olarak 88 °C'de tek bir pik meydana getirmiştir. Bu durum GAPDH geninin amplifikasyonunda kullanılan primerlerin non-spesifik (özgün olmayan) bir pik oluşturmadığını göstermektedir. Yine grafikte küçük yükseltiye sahip herhangi bir ikincil pik/pikler oluşmadığından, primer-dimer etkileşimlerinden kaynaklı interferansların gözlenmediği görülmüştür. Bu durum uygun bir primer seçildiğini göstermektedir (Şekil 4.5).

Benzer şekilde Melting (Dissociation) curve analizleri incelendiğinde, p53 genine ait erime eğrisinin türevsel grafiği yaklaşık olarak 87 °C'de tek bir pik meydana getirmiştir. Bu durum p53 geninin amplifikasyonunda kullanılan primerlerin non-spesifik (özgün olmayan) bir pik oluşturmadığını göstermektedir. Yine grafikte küçük yükseltiye sahip herhangi bir ikincil pik/pikler oluşmadığından, primer-dimer etkileşimlerinden kaynaklı interferansların gözlenmediği görülmüştür. Bu durum uygun bir primer seçildiğini göstermektedir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. GAPDH ve p53 primerlerine ait erime eğrileri

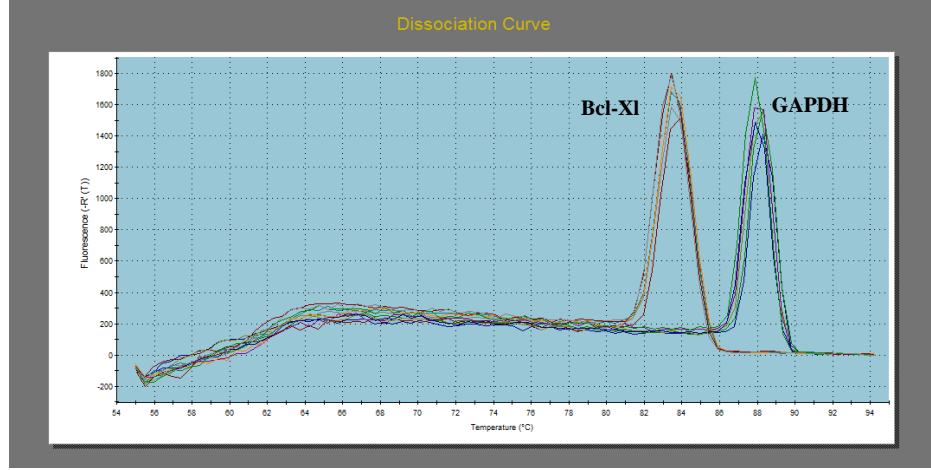
p21 genine ait erime eğrisinin melting (dissociation) curve analizleri incelendiğinde, türevsel grafik yaklaşık olarak 92 °C’de tek bir pik meydana getirmiştir. Bu durum p21 geninin amplifikasyonunda kullanılan primerlerin non-spesifik (özgün olmayan) bir pik oluşturmadığını göstermektedir. Yine grafikte küçük yükseltiye sahip herhangi ikincil pik/pikler oluşmadığından, primer-dimer etkileşimlerinden kaynaklı interferansların gözlenmediği görülmüştür. Bu durum uygun bir primer seçildiğini göstermektedir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. GAPDH ve p21 primerlerine ait erime eğrileri

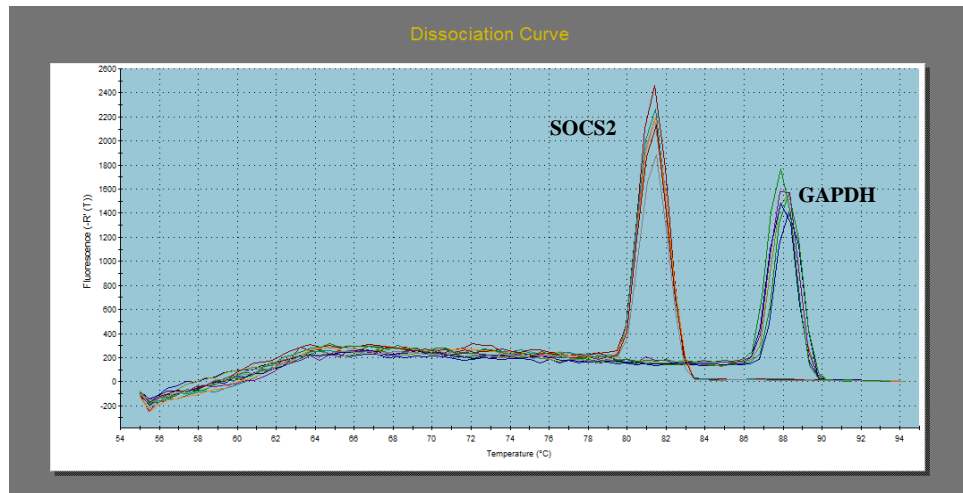
Bcl-X1 genine ait erime eğrisinin melting (dissociation) curve analizleri incelendiğinde, türevsel grafik yaklaşık olarak 83 °C’de tek bir pik meydana getirmiştir. Bu durum Bcl-X1 geninin amplifikasyonunda kullanılan primerlerin non-spesifik (özgün

olmayan) bir pik oluşturmadığını göstermektedir. Yine grafikte küçük yükseltiye sahip herhangi ikincil pik/pikler oluşmadığından, primer-dimer etkileşimlerinden kaynaklı interferansların gözlenmediği görülmüştür. Bu durum uygun bir primer seçildiğini göstermektedir(Şekil 4.7).



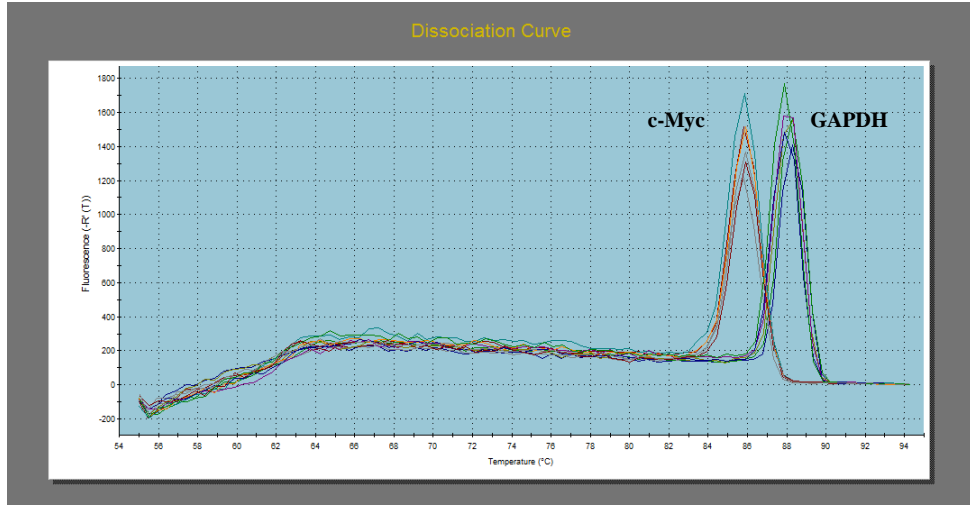
Şekil 4.7. GAPDH ve Bcl-Xl primerlerine ait erime eğrileri

SOCS2 genine ait erime eğrisinin melting (dissociation) curve analizleri incelendiğinde, türevsel grafik yaklaşık olarak 81 °C’de tek bir pik meydana getirmiştir. Bu durum SOCS2 geninin amplifikasyonunda kullanılan primerlerin non-spesifik (özgün olmayan) bir pik oluşturmadığını göstermektedir. Yine grafikte küçük yükseltiye sahip herhangi ikincil pik/pikler oluşmadığından, primer-dimer etkileşimlerinden kaynaklı interferansların gözlenmediği görülmüştür. Bu durum uygun bir primer seçildiğini göstermektedir (Şekil 4.8).



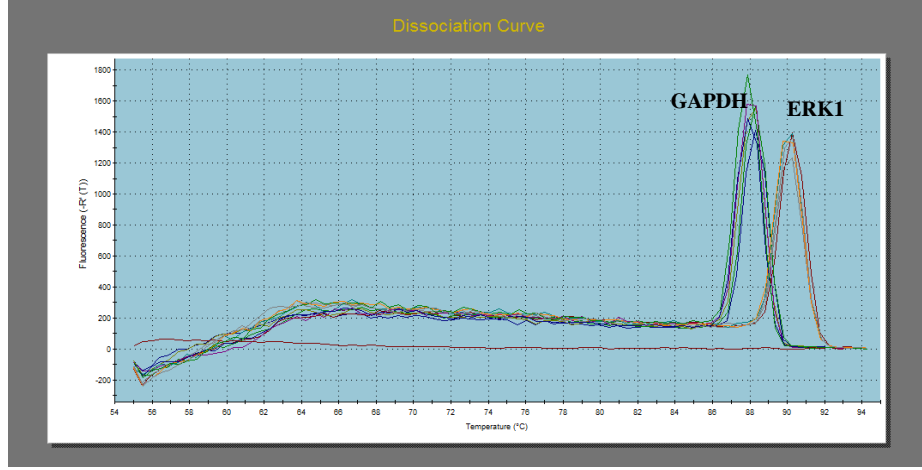
Şekil 4.8. GAPDH ve SOCS2 primerlerine ait erime eğrileri

c-Myc genine ait erime eğrisinin melting (dissociation) curve analizleri incelendiğinde, türevsel grafik yaklaşık olarak 81 °C’de tek bir pik meydana getirmiştir. Bu durum c-Myc geninin amplifikasyonunda kullanılan primerlerin non-spesifik (özgün olmayan) bir pik oluşturmadığını göstermektedir. Yine grafikte küçük yükseltiye sahip herhangi ikincil pik/pikler oluşmadığından, primer-dimer etkileşimlerinden kaynaklı interferansların gözlenmediği görülmüştür. Bu durum uygun bir primer seçildiğini göstermektedir(Şekil 4.9).



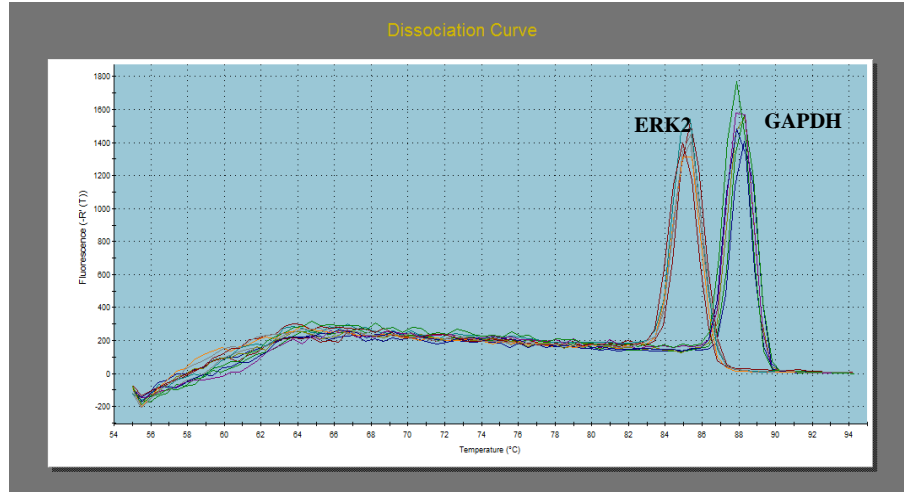
Şekil 4.9. GAPDH ve c-Myc primerlerine ait erime eğrileri

ERK1 genine ait erime eğrisinin melting (dissociation) curve analizleri incelendiğinde, türevsel grafik yaklaşık olarak 90 °C’de tek bir pik meydana getirmiştir. Bu durum ERK1 geninin amplifikasyonunda kullanılan primerlerin non-spesifik (özgün olmayan) bir pik oluşturmadığını göstermektedir. Yine grafikte küçük yükseltiye sahip herhangi ikincil pik/pikler oluşmadığından, primer-dimer etkileşimlerinden kaynaklı interferansların gözlenmediği görülmüştür. Bu durum uygun bir primer seçildiğini göstermektedir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. GAPDH ve ERK1 primerlerine ait erime eğrileri

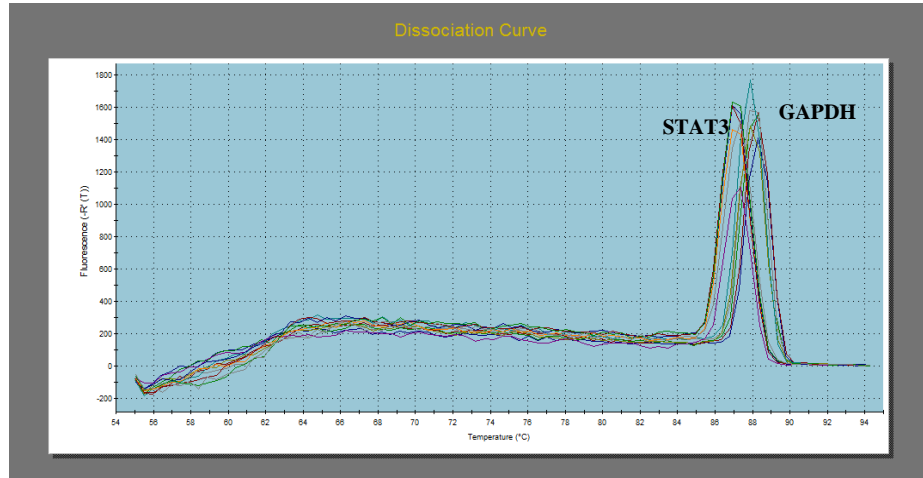
ERK2 genine ait erime eğrisinin melting (dissociation) curve analizleri incelendiğinde, türevsel grafik yaklaşık olarak 85 °C’de tek bir pik meydana getirmiştir. Bu durum ERK2 geninin amplifikasyonunda kullanılan primerlerin non-spesifik (özgün olmayan) bir pik oluşturmadığını göstermektedir. Yine grafikte küçük yükseltiye sahip herhangi ikincil pik/pikler oluşmadığından, primer-dimer etkileşimlerinden kaynaklı interferansların gözlenmediği görülmüştür. Bu durum uygun bir primer seçildiğini göstermektedir(Şekil 4.11).



Şekil 4.11. GAPDH ve ERK2 primerlerine ait erime eğrileri

STAT3 genine ait erime eğrisinin melting (dissociation) curve analizleri incelendiğinde, türevsel grafik yaklaşık olarak 87 °C’de tek bir pik meydana getirmiştir. Bu durum STAT3 geninin amplifikasyonunda kullanılan primerlerin non-spesifik (özgün olmayan) bir pik oluşturmadığını göstermektedir. Yine grafikte küçük yükseltiye sahip herhangi ikincil pik/pikler oluşmadığından, primer-dimer etkileşimlerinden kaynaklı

interferansların gözlenmediği görülmüştür. Bu durum uygun bir primer seçildiğini göstermektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. GAPDH ve STAT3 primerlerine ait erime eğrileri

Relatif gen ekspresyon düzeyleri, GAPDH referans geni kullanılarak hesaplanmış, 25 μ M ve 50 μ M derişimler için kat değişimleri Livak Metoduna göre hesaplanmıştır. Gruplar arasındaki fark t-test ile değerlendirilmiş ve $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (Çizelge 4.5.).

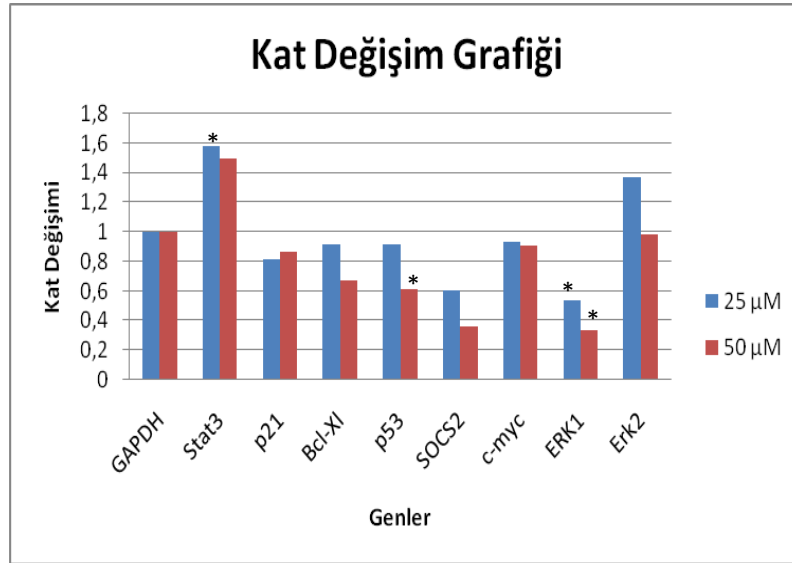
Çizelge 4.5. Kontrol grupları ile Maruziyet Gruplarının Gen Ekspresyon düzeyleri

Gen Sembolü	Kontrol grupları ile Maruziyet Gruplarının İstatistiksel Karşılaştırılması			
	25 μ M		50 μ M	
	Kat Değişimi	p	Kat Değişimi	p
STAT3	1,5801	0,001255	1,4948	0,084006
p21	0,8123	0,184353	0,8675	0,293851
Bcl-XI	0,9202	0,515829	0,669	0,06351
p53	0,9138	0,304755	0,6156	0,021037
SOCS2	0,6071	0,296838	0,3585	0,189078
c-myc	0,9298	0,601893	0,9107	0,540242
ERK1	0,5359	0,000944	0,3368	0,000926
ERK2	1,3708	0,162321	0,9862	0,905915
GAPDH	1	0	1	0

5M bileşiminin 25 μ M'lık maruziyet sonrası A549 hücre hattındaki JAK/STAT3 yolağı üzerinde bulunan ve kanser progresyonu ile ilgili oldukları bilinen STAT3, p21, Bcl-XI, p53, SOCS2, c-myc genlerinin ve JAK/STAT yolağının non-kanonikal düzenleyicileri olan ERK1 ve ERK2 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde

STAT3 gen ifadesinde istatistiksel olarak önemli bir artış ve ERK1 gen ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir düşüş gözlemlenmiştir. Ancak p21, Bcl-X1, p53, SOCS ve ERK2 proteinlerine ait gen ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak önemli bir değişim gözlenmemiştir. (Şekil 4.10), (Çizelge 4.5.).

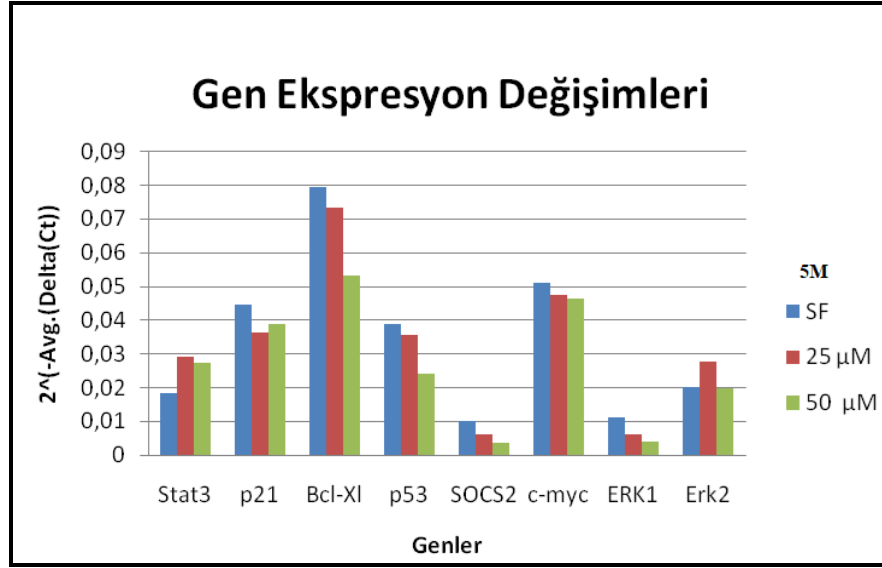
Çizelge 4.5.'de verilen tablodaki değerler aşağıdaki şekilde kat değişimlerinin kıyaslanması amacıyla grafik haline getirilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Maruziyet gruplarının kontrol gruplarına göre kat değişimleri (* p<0,05)

5M bileşiğinin 50µM'lık maruziyet sonrası A549 hücre hattındaki JAK/STAT3 yolağı üzerinde bulunan ve kanser progresyonu ile ilgili oldukları bilinen STAT3, p21, Bcl-X1, p53, SOCS2, c-myc genlerinin ve JAK/STAT yolağının non-kanonikal düzenleyicileri olan ERK1 ve ERK2 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde p53 ve ERK1 gen ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir düşüş gözlemlenmiştir. Ancak STAT3 p21, Bcl-X1, p53 ve ERK2 proteinlerine ait gen ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak önemli bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.13) (Çizelge 4.5.).

Gen ekspresyonu sonuçları, eşik (threshold) çizgisinin amplifikasyon eğrisini üssel fazda kestiği nokta baz alınarak ölçülmüştür. Bütün örneklem için aynı threshold değeri (0,05) kullanılmıştır. Gen ekspresyonu doğrudan biyolojik yanıtı temsil etmediğinden istatistiksel hesaplamalar gen ekspresyon sonuçları üzerinden değil de relatif gen ekspresyon değeri olan $2^{-\Delta(\Delta C_t)}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.14. Kontrol grupları ile maruziyet gruplarının gen ekspresyon seviyelerindeki değişim grafiği

5M bileşiği için $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ analizleri incelendiğinde STAT3, Bcl-Xl, p53, SOCS2, c-Myc ve ERK1 genlerine ait relatif gen ekspresyon değerlerinde sayısal olarak aşağı yönlü bir değişim olmasına rağmen, bu düşüş kat değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe karşılık gelmemiştir (Şekil 4.14).

5.TARTIŞMA

Flavonoidler bitki bazlı sekonder metabolitlerdir. Flavonoidlerin kullanımı her zaman güvenlidir ve yan etki açısından en güvenli bileşikler arasında gösterilirler. Yapılan son araştırmalar, farklı meyve ve sebzelerin tüketiminin kanser gelişimini önlediğinin ve kanser riski seviyesini en az % 20 azalttığını ortaya koymuştur. Buna dayanarak, bilim insanları kanserin kontrol altına alınması için bitki bazlı bileşiklere odaklanmışlardır. Birçok bileşik gibi flavonoidler de bitkilerden izole edilmiş ve özellikle antikanser aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu in vitro ve in vivo çalışmalarla doğrulanmıştır (Havsteen 2002, Manthey ve Guthrie 2002, Veeramuthu ve ark. 2017).

Son yıllarda, yaygın olarak “bitki polifenoller” olarak adlandırılan bitki kaynaklarından elde edilen fenolik bileşikler, büyük ölçüde diyet polifenollerine atfedilen sağlıklı özelliklere odaklanan çok sayıda araştırmaya konu olmuştur. Özellikle, bazı düşük moleküler ağırlıklı polifenollerin kanser kemopreventif aktivitesi üzerine yüzlerce çalışma yapılmıştır. Örneğin; bir derlemede sadece resveratrol molekülünün karsinogenez inhibisyonuna ilişkin 512 referans gösterilmiştir (Pezzuto 2008).

Bununla birlikte, doğal polifenoller için sıklıkla gözlenen zayıf biyoyararlanım, hızlı metabolik dönüşüm, düşük veya ana bileşiğin toksisitesinin olmaması pek çok araştırma grubunu sentetik olarak türevlendirilmiş flavonoidlerle ilgili çalışmalara yönlendirmiştir (Kumar ve ark. 2003, Spatafora ve Tringali 2011). Doğal polifenollerden türetilmiş analogların kütüphanelerinin hazırlanması ayrıca fenolik doğal bileşiklerin yapı-aktivite ilişkisi (SAR) çalışmaları moleküler etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunabilir. Bazı çalışmalarda, optimize edilmiş flavonoid analogları, doğal flavonoidlere göre, daha etkili bir mekanizmayla, daha gelişmiş biyolojik aktivite göstermiştir. Bu nedenle, tümör hücrelerine karşı antiproliferatif aktiviteye ek olarak, doğal olarak türetilmiş polifenoller üzerine yapılan çalışmalardan ümit verici biyolojik etkiler (antianjiyojenik, proapoptotik, MDR inhibe edici, DNA etkileşimi ve diğerleri) ortaya çıkmaktadır (Davidson ve Khan 2003, Spatafora ve Tringali 2011) .

Moleküllerin kimyasal yapısında meydana gelen değişiklikler, moleküllerin biyolojik etkilerini radikal bir şekilde etkileyebilir (Mohammed 2009). Bu sebeple doğal veya sentetik birçok moleküle yeni yan gruplar eklenerek, dimerleştirilerek veya hibrit

sentezlerle yeniden modifiye edilmekte ve biyolojik etkileri değiştirilebilmektedir. Güçlendirilmiş farmakolojik özelliklere ve kanser hücrelerine yönelik seçici toksisiteye sahip yeni bileşiklerin veya bileşik türevlerinin tasarımı önem arz etmektedir. Örneğin prostat kanser hücre hatlarında, sıtma hastalığının tedavisinde kullanılan artemisininin, antikanser etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, artemisinin türevinin artemisininine göre 30 kat daha etkili olduğu saptanmıştır. Aynı şekilde flavonoidlerin kimyasal yapısında oluşturulacak küçük değişiklikler, bu moleküllerin biyolojik aktivitelerini radikal bir şekilde etkileyebilir (Morrissey ve ark. 2010, Lee 2011).

Ca'rdenas ve arkadaşlarının bazı flavonoid türevlerini kullanarak; serviks HeLa adenokarsinom, orofarenjal karsinom; meme MCF-7 kanseri; SK-MEL-28 melanomu ve fare hücre hatları (F3II ve LM3, meme adenokarsinomları; akciğer LP07 tümörü; B16-F0 melanom) üzerinde yaptıkları bir çalışmada 20 molekülden; doğal flavonoid-3, kafeik asit esteri-12 ve flavonoid nitro-türevi-26 moleküllerinin, HeLa, KB, WISH, MCF-7, F3II, ve LM3 hücre hatları üzerinde güçlü antiproliferatif etki gösterdiğini tespit etmişlerdir (Cárdenas ve ark. 2006).

Mills ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, bir dizi yeni sentezlenmiş flavonoid bileşiklerinin anti-kanser etkilerini, insan meme kanseri MCF-7 hücreleri üzerinde test etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda yeni flavonoid türevlerinin biyolojik değerlendirmeleri yapıldığında anti-kanser aktivitenin artan bileşik lipofilikliği ve serbest hidroksil gruplarının varlığı ile arttığını gösterilmiştir (Mills ve ark. 2006).

Walle tarafından yapılan bir çalışmada bir flavon metoksi gruplarının molekülüne eklenmesinin, daha yüksek çözünürlük, biyoyararlanım ve kanser hücresi antiproliferatif aktivitesinin yanı sıra azaltılmış toksik yan etkileri olan metabolik olarak daha stabil türevlere yol açtığı bildirilmiştir (Walle 2009). Bizim çalışmamızda flavonoid türevi moleküllerin metoksi gruplarının hücre kültüründe yani in-vitro etkisi tartışılmış olmasına karşın, metoksillenmenin biyoyararlanım ve çözünürlük üzerine etkileri bu çalışma kapsamında araştırılmamıştır.

Shi ve arkadaşları O-metillenmiş flavonoid türevi bileşikler sentezleyerek, boyun ve baş (M4E), servikal (HeLa), insan meme kanseri (SKBR) ve insan akciğer kanserleri (A549, H157, H460, 1792, 1944, H266, H522, Hop62, 1299, 292G, ve Calu1) üzerinde yüksek etkili bir tarama (HTS) yaklaşımı kullanarak, bu sentetik bileşiklerin kanser hücreleri büyümesini önleme yeteneklerini değerlendirmişlerdir. Bu araştırmalar, kuersetin

içindeki fenolik hidroksil gruplarının seçici maskelenmesinin, antiproliferatif aktivitenin güçlendirilmesinde oldukça etkili olduklarını göstermiştir (Shi ve ark. 2014, Shi ve ark. 2014). Bizim çalışmamızda kullanılan flavonoid türevi bileşikler de flavon A halkasından orto ve meta bölgelerinden metoksillenerek modifiye edilmişlerdir (Şekil 3.1.). Ancak biz kontrol grubu olarak modifiye edilmemiş flavon molekülleri kullanmadığımızdan metoksillenme modifikasyonunun, molekülün antiproliferatif etkisi ile ilgili kesin bir sonuca ulaşmamız mümkün değildir. Çalışmamızda kullanılan bileşiklerin modifiye edilmemiş versiyonları, modifiye edilmiş versiyonları ile karşılaştırılarak, bu modifikasyonların antiproliferatif etkiye katkısı başka bir çalışmada değerlendirilebilir.

Bilim insanları antiproliferatif etkiyi tanımlarken moleküler yolların bu etkideki rolünü de ortaya koymak üzere sayısız çalışma gerçekleştirmişlerdir. Muthian ve Bright yaptıkları bir çalışmada kuersetinin IL-2 sinyal yolağını inhibe ederek STAT moleküllerinin tirozin fosforilasyonunu inhibe ettiğini gözlemlemişlerdir (Muthian ve Bright 2004).

Ozbey ve arkadaşları bir flavonoid olan apigeninin WNT/ β -catenin ve JAK/STAT yollarını regüle ettiğini rapor etmişlerdir (Ozbey ve ark. 2019).

Bizim çalışmamızda da, yeni sentezlenen bazı flavonoid türevi moleküllerin, akciğer adeno karsinoma hücrelerinde (A549) STAT3 yolağı üzerinden, antiproliferatif etkilerinin araştırılması ve antiproliferasyonun bu moleküller tarafından kontrol edilen STAT3 yolağı mekanizmalarının aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaçla; yeni sentezlenen flavonoid türevi 19Y-1, 5Y-2, 7Y-2 ve 5M bileşiklerine maruz bırakılan A549 hücrelerinden elde edilen MTT sonuçları değerlendirilmiştir (Şekil 4.1. Şekil 4.2. Şekil 4.3. Şekil 4.4.). Analizler sonucunda 5M molekülünün A549 hücre hattı üzerinde antiproliferatif etkisi uygun bulunarak gen ekspresyon analizleri gerçekleştirilmek üzere seçilmiştir. Sentetik flavonid 5M molekülü A549 hücre hattında 50 μ M, 75 μ M ve 100 μ M konsantrasyonlarda antiproliferatif özellik göstermiştir (Şekil 4.4., Çizelge 4.4.).

Etkili konsantrasyon olarak ilk anlamlı antiproliferatif etkinin gözlemlendiği 50 μ M'lık konsantrasyon JAK/STAT yolağının moleküler indüksiyonunun belirlenmesinde tercih edilmiştir. Etkinlik göstermeyen uç değer olarak 25 μ M konsantrasyon kullanılmıştır. Hücre kontrol grubu olarak sadece serumsuz media içeren SF grubu kullanılmıştır.

5M bileşiğinin 25 μ M'lık maruziyet sonrası A549 hücre hattındaki JAK/STAT3 yolağı üzerinde bulunan ve kanser progresyonu ile ilgili oldukları bilinen STAT3, p21,

Bcl-X1, p53, SOCS2, c-myc genlerinin ve JAK/STAT yolağının non-kanonikal düzenleyicileri olan ERK1 ve ERK2 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde STAT3 gen ifadesinde istatistiksel olarak önemli bir artış ve ERK1 gen ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir düşüş gözlemlenmiştir. Ancak p21, Bcl-X1, p53, SOCS ve ERK2 proteinlerine ait gen ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak önemli bir değişim gözlenmemiştir (Çizelge 4.5.).

A549 hücre hattında 25 µM'lık konsantrasyonda yapılan maruziyet sonucunda, JAK/STAT yolağının en önemli elemanlarından biri olan STAT3 proteininin, transkripsiyon düzeyindeki gen ekspresyon seviyesinde önemli bir artış olmasına rağmen bu artış, yolak üzerindeki önemli proteinler olan, p21, Bcl-X1, p53, SOCS2 ve c-myc genlerinin transkripsiyon düzeyindeki gen ekspresyon seviyesinde önemli bir değişikliğe sebep olmamıştır (Çizelge 4.5.). Bunun en temel sebebi, STAT3 proteininin sitoplazmada latent bir protein olarak bulunması ve aktifleşmesi için TYK2 enzimleri tarafından fosforilenmesinin gerekliliğidir (Wung ve ark. 2005, Glienke ve ark. 2009) Dolayısıyla, STAT3 proteininin gen ifadesinin artması JAK/STAT yolağının aktivasyonu anlamına gelmediği gibi, STAT3 proteininin gen ifadesinin azalması da JAK/STAT yolağının inhibisyonu anlamına gelmez. Bu çalışmada STAT3'ün gen ekspresyonunu ölçümü yapılarak, hücrede STAT3 proteinlerinin ekspresyonunda bir susturulma veya baskılanma olup olmadığının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

5M bileşiğinin 50µM'lık maruziyet sonrası A549 hücre hattındaki JAK/STAT3 yolağı üzerinde bulunan ve kanser progresyonu ile ilgili oldukları bilinen STAT3, p21, Bcl-X1, p53, SOCS2, c-myc genlerinin ve JAK/STAT yolağının non-kanonikal düzenleyicileri olan ERK1 ve ERK2 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde p53 ve ERK1 gen ekspresyon düzeylerinde istatistiksel olarak önemli bir düşüş gözlemlenmiştir. Ancak STAT3, p21, Bcl-X1, p53 ve ERK2 proteinlerine ait gen ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak önemli bir değişim gözlenmemiştir (Çizelge 4.5.).

Gen ekspresyonu sonuçları doğrudan biyolojik yanıtı temsil etmediğinden istatistiksel hesaplamalar gen ekspresyon sonuçları üzerinden değil de relatif gen ekspresyon değeri olan $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ olarak hesaplanmıştır. 5M bileşiği için $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$ analizleri incelendiğinde STAT3, Bcl-X1, p53, SOCS2, c-Myc ve ERK1 genlerine ait relatif gen ekspresyon değerlerinde sayısal olarak aşağı yönlü bir değişim olmasına rağmen, bu düşüş

kat değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşe karşılık gelmemiştir. Çünkü kat değişimlerinin istatistiksel olarak değerlendirildiği modelde gen ekspresyonundan farklı olarak, verideki değişimin, örneklem için tanımlanan belli bir orantısal eşik değerini aşması gerekmektedir (Dalman ve ark 2012, Fu ve ark 2006).

6. SONUÇ

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada, sentetik olarak üretilen 4 flavonoid türevi bileşik arasından seçilen 5M bileşiğinin A549 hücre hattında 50µM, 75 µM ve 100µM konsantrasyonlarda antiproliferatif etkisinin olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir. Antiproliferasyonun; JAK/STAT sinyal yolağı üzerinden gerçekleşmediği, muhtemelen MAPK sinyal yolağı gibi başka sinyal yolağı/yolakları üzerinden gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır.

A549 hücre hattında 25 µM'lık konsantrasyonda yapılan maruziyet sonucunda, JAK/STAT yolağının en önemli elemanlarından biri olan STAT3 proteininin, transkripsiyon düzeyindeki gen ekspresyon seviyesinde önemli bir artış olmasına rağmen bu artış, yolak üzerindeki önemli proteinler olan, p21, Bcl-X1, p53, SOCS2 ve c-myc genlerinin transkripsiyon düzeyindeki gen ekspresyon seviyesinde önemli bir değişikliğe sebep olmamıştır.

Elde edilen gen ekspresyon analizlerinden anlaşıldığı üzere, hem 25 µM hem de 50 µM maruziyet konsantrasyonlarında ERK1 molekülünün gen ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak önemli ölçüde düştüğü tespit edilmiştir. ERK1 molekülü MAPK sinyal yolağının hücre proliferasyonu ile ilgili önemli bir gen ekspresyonu düzenleyicisi olması sebebiyle, antiproliferatif etki, 5M molekülünün MAPK yolu üzerinde yaptığı inhibisyonla gerçekleşmiş olabilir. ERK1 proteininin gen ekspresyonunun 50µM'lık konsantrasyonda daha radikal bir düşüş göstermesi 5M molekülünün MAPK yolu üzerinden inaktivasyona sebep olmuş olma ihtimalini de güçlendirmektedir. Bu bakımdan, tez çalışmamızda elde ettiğimiz veriler de göz önünde bulundurularak 5M molekülünün MAPK yolu üzerinden antiproliferatif etkileri araştırılabilir. Çünkü JAK/STAT sinyal yolağında olduğu gibi; MAPK sinyal yolağı da hücrelerin, kanser hücrelerine farklılaşmasında rol oynayabilen önemli bir sinyal yolağıdır.

Bu tezin amacı, yeni sentezlenen bazı flavonoid türevi moleküllerin, A549 hücrelerinde STAT3 yolağı üzerinden, antiproliferatif etkilerini incelemektir. Tezin kapsamı ve amacı doğrultusunda MAPK sinyal yolağının detaylı olarak araştırılması hedeflenmediğinden, 5M molekülünün, MAPK sinyal yolağı üzerindeki diğer proteinlerin gen ekspresyon seviyesini değiştirip değiştirmediği araştırılmamıştır. Ancak 5M

molekölünün ve/veya yeni sentezlenecek flavonoid türevi bileşiklerin MAPK gibi kanser sürecinde rol oynayan moleköl yolaklarındaki etkisi başka çalışmalarla araştırılabilir. Ayrıca 5M molekölünün inhibe ettiği sinyal yolağı belirlendikten sonra, in-vivo çalışmalarla biyoyararlanım profilleri incelenebilir.

7. KAYNAKLAR

- 1 **Abotaleb M, Samuel SM, Varghese E, Varghese S, Kubatka P, ve ark.** Flavonoids in cancer and apoptosis. *Cancers*, (11), **2019**, s. 28
- 2 **Aigner P, Just V ve Stoiber D.** STAT3 isoforms: alternative fates in cancer? *Cytokine*, (118), **2019**, s. 27-34
- 3 **Ajdžanović V Mojić M, Maksimović-Ivanić D, Bulatović M, Mijatović S, Milošević V ve ark.** Membrane fluidity, invasiveness ve dynamic phenotype of metastatic prostate cancer cells after treatment with soy isoflavones. *The Journal of membrane biology*, (246), **2013**, s. 307-314
- 4 **Akira S.** Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem cells*, (17), **1999**, s. 138-146
- 5 **Alonzi T, Maritano D, Gorgoni B, Rizzuto G, Libert, C ve ark.** Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene activation in the liver. *Molecular ve cellular biology*, (21), **2001**, s. 1621-1632
- 6 **Balentine DA, Wiseman SA ve Bouwens, LC.** The chemistry of tea flavonoids. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, (37), **1997**, s. 693-704
- 7 **Bayram H, Ito K, Issa R, Ito M, Sukkar M ve ark.** Regulation of human lung epithelial cell numbers by diesel exhaust particles. *Eur Respir J*, (27), **2006**, s. 705-13
- 8 **Bayram H, Ito K, Issa R, Ito M, Sukkar M ve ark.** Regulation of human lung epithelial cell numbers by diesel exhaust particles. *Eur Respir J*, (27), **2006**, s. 705-13
- 9 **Bendris N, Lemmers B ve Blanchard JM.** Cell cycle, cytoskeleton dynamics ve beyond: the many functions of cyclins ve CDK inhibitors. *Cell cycle*, (14), **2015**, s. 1786-1798
- 10 **Benekli M, Baer MR, Baumann H ve Wetzler M.** Signal transducer ve activator of transcription proteins in leukemias. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, (101), **2003**, s. 2940-2954
- 11 **Bhattacharya S ve Schindler C.** Regulation of Stat3 nuclear export. *The Journal of clinical investigation*, (111), **2003**, s. 553-559
- 12 **Bild AH, Turkson J ve Jove R.** Cytoplasmic transport of Stat3 by receptor-mediated endocytosis. *The EMBO journal*, (21), **2002**, s. 3255-3263
- 13 **Bowman T, Broome MA, Sinibaldi D, Wharton W, Pledger W ve ark.** Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation ve PDGF-induced mitogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (98), **2001**, s. 7319-7324
- 14 **Bowman T Garcia R, Turkson J ve Jove, R.** STATs in oncogenesis. *Oncogene*, (19), **2000**, s. 2474-88
- 15 **Bromberg JF.** Activation of STAT proteins ve growth control. *Bioessays*, (23), **2001**, s. 161-169
- 16 **Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG ve ark.** Stat3 as an oncogene. *Cell*, (98), **1999**, s. 295-303
- 17 **Brouillard R ve Cheminat, A.** Flavonoids and plant color. *Progress in clinical ve biological research*, (280), **1987**, s. 93-106
- 18 **Brown DM, Kelly GE ve Husbve AJ.** Flavonoid compounds in maintenance of prostate health ve prevention ve treatment of cancer. *Molecular biotechnology*, (30), **2005**, s. 253
- 19 **Burke WM, Jin X, Lin H-J, Huang M, Liu ve ark.** Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian ve breast cancer cells. *Oncogene*, (20), **2001**, s. 7925
- 20 **Butler MS.** Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Natural product reports*, (25), **2008**, s. 475-516
- 21 **Butler MS.** The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products*, (67), **2004**, s. 2141-2153
- 22 **Callus BA ve Mathey-Prevot B.** SOCS36E, a novel Drosophila SOCS protein, suppresses JAK/STAT ve EGF-R signalling in the imaginal wing disc. *Oncogene*, (21), **2002**, s. 4812
- 23 **Cao G ve Prior RL.** Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract. *Clinical Chemistry*, (45), **1999**, s. 574-576
- 24 **Cárdenas M, Marder M, Blank VC ve Roguin LP.** Antitumor activity of some natural flavonoids ve synthetic derivatives on various human ve murine cancer cell lines. *Bioorganic & medicinal chemistry*, (14), **2006**, s. 2966-2971

- 25 **Carpenter RL ve Lo H-W.** STAT3 target genes relevant to human cancers. *Cancers*, (6), **2014**, s. 897-925
- 26 **Cassidy A ve Minihane A-M.** The role of metabolism (ve the microbiome) in defining the clinical efficacy of dietary flavonoids. *The American journal of clinical nutrition*, (105), **2017**, s. 10-22
- 27 **Cerletti C, De Curtis A, Bracone F, Digesù C, Morganti AG ve ark.** Dietary anthocyanins ve health: data from FLORA ve ATHENA EU projects. *British journal of clinical pharmacology*, (83), **2017**, s. 103-106
- 28 **Chapman RS, Lourenco PC, Tonner E, Flint DJ, Selbert DJ ve ark.** Suppression of epithelial apoptosis ve delayed mammary glve involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes & development*, (13), **1999**, s. 2604-2616
- 29 **Cook N ve Samman, S.** Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of nutritional biochemistry*, (7), **1996**, s. 66-76
- 30 **Cook NC ve Samman S.** Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *The Journal of nutritional biochemistry*, (7), **1996**, s. 66-76
- 31 **Cooney RN.** Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock*, (17), **2002**, s. 83-90
- Dalman, M. R., Deeter, A., Nimishakavi, G., & Duan, Z. H. (2012, December). Fold change and p-value cutoffs significantly alter microarray interpretations. In *BMC bioinformatics* (Vol. 13, No. S2, p. S11). BioMed Central.
- 32 **Danial NN ve Rothman P.** JAK-STAT signaling activated by Abl oncogenes. *Oncogene*, (19), **2000**, s. 2523
- 33 **Day AJ, Cañada FJ, DíAz JC, Kroon PA, Mclaunchlan ve ark.** Dietary flavonoid ve isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS letters*, (468), **2000**, s. 166-170
- 34 **Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA ve Capasso F.** Flavonoids: old ve new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life sciences*, (65), **1999**, s. 337-353
- 35 **Dimri S, Sukanya S ve De A.** Approaching non-canonical STAT3 signaling to redefine cancer therapeutic strategy. *Integr Mol Med*, (4), **2017**, s. 1-10
- 36 **Dolled-Filhart M, Camp RL, Kowalski DP, Smith BL ve Rimm, DL.** Tissue microarray analysis of signal transducers ve activators of transcription 3 (Stat3) ve phospho-Stat3 (Tyr705) in node-negative breast cancer shows nuclear localization is associated with a better prognosis. *Clinical Cancer Research*, (9), **2003**, s. 594-600
- 37 **Dupuis S, Dargemont C, Fieschi C, Thomassin N, Rosenzweig ve ark.** Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science*, (293), **2001**, s. 300-303
- 38 **Durham GA, Williams JJ, Nasim MT ve Palmer TM.** Targeting SOCS Proteins to Control JAK-STAT Signalling in Disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, **2019**, s.
- 39 **Dutta P ve Li WX.** Role of the JAK-STAT Signalling Pathway in Cancer. *eLS*, **2013**, s.
- 40 **Farrar JD, Smith JD, Murphy TL, Leung S, Stark, GR ve ark.** Selective loss of type I interferon-induced STAT4 activation caused by a minisatellite insertion in mouse Stat2. *Nature immunology*, (1), **2000**, s. 65
- 41 **Fukada T, Ohtani T, Yoshida Y, Shirogane T, Nishida K, ve ark.** STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition. *The EMBO journal*, (17), **1998**, s. 6670-6677
- 42 **Gavilan DM, Serrano RF, Vidal J, Marchal JA, Aranega A ve ark.** Synthesis of tetrahydrobenzoxazepine acetals with electron-withdrawing groups on the nitrogen atom. Novel scaffolds endowed with anticancer activity against breast cancer cells. *Tetrahedron*, (60), **2004**, s. 11547-11557
- 43 **Ghafouri-Fard S, Oskoei VK, Azari I ve Taheri M.** Suppressor of cytokine signaling (SOCS) genes are downregulated in breast cancer. *World journal of surgical oncology*, (16), **2018**, s. 226
- 44 **Glienke, W., Maute, L., Wicht, J., & Bergmann, L.** Curcumin inhibits constitutive STAT3 phosphorylation in human pancreatic cancer cell lines and downregulation of survivin/BIRC5 gene expression. *Cancer investigation*, (2009). 28(2), 166-171.
- 45 **Gopalan V, Pastuszyn A, Galey W ve Glew R.** Exolytic hydrolysis of toxic plant glucosides by guinea pig liver cytosolic beta-glucosidase. *Journal of Biological Chemistry*, (267), **1992**, s. 14027-14032

- 46 **Guo X, He D, Zhang E, Chen J, Chen E ve ark.** HMGB1 knockdown increases MM cell
vulnerability by regulating autophagy ve DNA damage repair. *Journal of Experimental & Clinical
Cancer Research*, (37), **2018**, s. 205
- 46 **Hammerstone JF, Lazarus SA ve Schmitz, HH.** Procyanidin content ve variation in some
commonly consumed foods. *The Journal of nutrition*, (130), **2000**, s. 2086S-2092S
- 47 **Harborne JB.** The flavonoids: advances in research since 1980. *Springer*, **2013**, s.
- 48 **Harborne JB ve Mabry, TJ.** The flavonoids: advances in research. *Springer*, **2013**, s.
- 49 **Havsteen BH.** The biochemistry ve medical significance of the flavonoids. *Pharmacology &
therapeutics*, (96), **2002**, s. 67-202
- 50 **Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D, Hollman P ve Katan M.** Dietary antioxidant flavonoids and
risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet*, (342), **1993**, s. 1007-1011
- 51 **Huang S, Do J, Mahalanabis M, Fan A, ve ark.** Low cost extraction and isothermal amplification of
DNA for infectious diarrhea diagnosis. *PLoS One*, (8), **2013**, s. e60059
- 52 **Hunter T ve Pines J.** Cyclins ve cancer. II: Cyclin D ve CDK inhibitors come of age. *Cell*, (79),
1994, s. 573-82
- 53 **Inoue K, Sato M, Fujimura S, Sakurada A, Takahashi ve ark..** Prognostic assessment of 1310
patients with non-small-cell lung cancer who underwent complete resection from 1980 to 1993. *J
Thorac Cardiovasc Surg*, (116), **1998**, s. 407-11
- 54 **Irwin MR, Witarama T, Caudill M, Olmstead R ve Breen, EC.** Sleep loss activates cellular
inflammation ve signal transducer ve activator of transcription (STAT) family proteins in humans.
Brain, behavior, ve immunity, (47), **2015**, s. 86-92
- 55 **Jacoby JJ, Kalinowski A, Liu M-G, Zhang SS-M, ve ark.** Cardiomyocyte-restricted knockout of
STAT3 results in higher sensitivity to inflammation, cardiac fibrosis, ve heart failure with advanced
age. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (100), **2003**, s. 12929-12934
- 56 **Jiang X, Hao X, Jing L, Wu G, Kang D ve ark.** Recent applications of click chemistry in drug
discovery. *Expert opinion on drug discovery*, (14), **2019**, s. 779-789
- 57 **Johnson DE, O'keefe RA ve Grveis JR.** Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer.
Nature reviews Clinical oncology, (15), **2018**, s. 234
- 58 **Kamran MZ, Patil P ve Gude RP.** Role of STAT3 in cancer metastasis ve translational advances.
Biomed Res Int, (2013), s. 421821
- 59 **Karaghiosoff M, Neubauer H, Lassnig C, Kovarik P, Schindler ve ark.** Partial impairment of
cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity*, (13), **2000**, s. 549-560
- 60 **Karamboulas C ve Ailles L.** Developmental signaling pathways in cancer stem cells of solid tumors.
Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, (1830), **2013**, s. 2481-2495
- 61 **Kaushal M ve Chorawala M.** The JAK/STAT signaling pathway. *International Journal of Advanced
Research in Pharmaceutical & Bio Sciences*, (1), **2012**, s. 363-386
- 62 **Ko C-H, Shen S-C, Lee TJ ve Chen Y-C.** Myricetin inhibits matrix metalloproteinase 2 protein
expression ve enzyme activity in colorectal carcinoma cells. *Molecular cancer therapeutics*, (4), **2005**,
s. 281-290
- 63 **Ko CH, Shen S-C, Hsu C-S ve Chen, Y-C.** Mitochondrial-dependent, reactive oxygen species-
independent apoptosis by myricetin: roles of protein kinase C, cytochrome c, ve caspase cascade.
Biochemical pharmacology, (69), **2005**, s. 913-927
- 64 **KošInová Pn, Berka K, Wykes M, Otyepka M ve Trouillas P.** Positioning of antioxidant quercetin
ve its metabolites in lipid bilayer membranes: implication for their lipid-peroxidation inhibition. *The
Journal of Physical Chemistry B*, (116), **2012**, s. 1309-1318
- 65 **Krebs DL ve Hilton, DJ.** SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J Cell Sci*, (113),
2000, s. 2813-2819
- 66 **Kumar SK, Hager, E, Pettit, C, Gurulingappa, H, Davidson, NE ve ark.** Design, synthesis, ve
evaluation of novel boronic-chalcone derivatives as antitumor agents. *Journal of medicinal chemistry*,
(46), **2003**, s. 2813-2815
- 67 **Kühnau J.** The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition.
Karger Publishers, World review of nutrition ve dietetics, (24), **1976**, s. 117-191
- 68 **Lee JH, Kim, C, Sethi, G ve Ahn, KS.** Brassinin inhibits STAT3 signaling pathway through
modulation of PIAS-3 ve SOCS-3 expression ve sensitizes human lung cancer xenograft in nude mice
to paclitaxel. *Oncotarget*, (6), **2015**, s. 6386
- 69 **Lee SJ.** Synthesis of 10 β -substituted triazolyl artemisinins ve their growth inhibitory activity against
various cancer cells. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, (32), **2011**, s. 737-740

- 70 **Leonard M, Warren J.** The molecular basis of X-linked severe combined immunodeficiency: defective cytokine receptor signaling. *Annual review of medicine*, (47), **1996**, s. 229-239
- 71 **Levy DE ve Darnell Jr, J.** Signalling: Stats: transcriptional control ve biological impact. *Nature reviews Molecular cell biology*, (3), **2002**, s. 651
- 72 **Levy, DE ve Inghirami, G.** STAT3: a multifaceted oncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (103), **2006**, s. 10151-10152
- 73 **Liu G, Pang Y, Zhang Y, Fu H, Xiong W ve ark.** GJB4 promotes gastric cancer cell proliferation ve migration via Wnt/CTNNB1 pathway. *Oncotargets ve therapy*, (12), **2019**, s. 6745
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, (2001) 25(4), 402-408.
- 74 **Lovato P, Brender C, Agnholt J, Kelsen J, Kaltoft C ve ark.** Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *Journal of Biological Chemistry*, (278), **2003**, s. 16777-16781
- 75 **Ma J, Zhang T, Novotny-Diermayr V, Tan, AL ve Cao X.** A novel sequence in the coiled-coil domain of Stat3 essential for its nuclear translocation. *Journal of Biological Chemistry*, (278), **2003**, s. 29252-29260
- 76 **Maggiolini M, Recchia A, Bonofiglio D, Catalano S, Vivacqua A ve ark.** The red wine phenolics piceatannol ve myricetin act as agonists for estrogen receptor α in human breast cancer cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, (35), **2005**, s. 269-281
- 77 **Malumbres M ve Barbacid, M.** Cell cycle, CDKs ve cancer: a changing paradigm. *Nature reviews cancer*, (9), **2009**, s. 153
- 78 **Manthey JA ve Guthrie, N.** Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines. *Journal of Agricultural ve Food Chemistry*, (50), **2002**, s. 5837-5843
- 79 **Mascaux C, Paesmans, M, Berghmans, T, Branle, F, Lafitte, ve ark.** A systematic review of the role of etoposide ve cisplatin in the chemotherapy of small cell lung cancer with methodology assessment ve meta-analysis. *Lung Cancer*, (30), **2000**, s. 23-36
- 80 **Mcbride KM ve Reich, NC.** Nuclear Trafficking of STAT Proteins. *Springer, Signal Transducers ve Activators of Transcription (STATs)*, **2003**, s. 269-283
- 81 **Mcguire WP, Hoskins, WJ, Brady MF, Kucera PR, Kucera PR ve ark.** Cyclophosphamide ve cisplatin compared with paclitaxel ve cisplatin in patients with stage III ve stage IV ovarian cancer. *New Englv Journal of Medicine*, (334), **1996**, s. 1-6
- 82 **Meng W, Wang B, Mao W, Wang J, Zhao W ve ark.** Enhanced efficacy of histone deacetylase inhibitor combined with bromodomain inhibitor in glioblastoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, (37), **2018**, s. 241
- 83 **Mills C, Mateeva N ve Redda K.** Synthesis of novel flavonoid derivatives ve evaluation of their anti-cancer activities. *AACR*, **2006**, s.
- 84 **Mishra BB ve Tiwari VK.** Natural products: an evolving role in future drug discovery. *European journal of medicinal chemistry*, (46), **2011**, s. 4769-4807
- 85 **Mohammed H.** Natural ve synthetic flavonoid derivatives with potential antioxidant ve anticancer activities. *University of Saarlve, Saarbrucken, Germany, Reterived on January*, (1), **2009**, s. 2012
- 86 **Morrissey C, Gallis B, Solazzi JW, Kim BJ, Gulati R, ve ark.** Effect of artemisinin derivatives on apoptosis ve cell cycle in prostate cancer cells. *Anti-cancer drugs*, (21), **2010**, s. 423
- 87 **Muller R.** JAK inhibitors in 2019, synthetic review in 10 points. *European journal of internal medicine*, **2019**, s.
- 88 **Muthian G ve Bright, JJ.** Quercetin, a flavonoid phytoestrogen, ameliorates experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through JAK-STAT pathway in T lymphocyte. *Journal of clinical immunology*, (24), **2004**, s. 542-552
- 89 **Nicholson SE ve Hilton, DJ.** The SOCS proteins: a new family of negative regulators of signal transduction. *Journal of leukocyte biology*, (63), **1998**, s. 665-668
- 90 **Nöthlings U, Murphy SP, Wilkens LR, Henderson BE ve Kolonel, LN.** Flavonols ve pancreatic cancer risk: the multiethnic cohort study. *American journal of epidemiology*, (166), **2007**, s. 924-931
- 91 **O'shea JJ, Gadina M ve Schreiber RD.** Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *cell*, (109), **2002**, s. S121-S131
- 92 **Orhan DD, Özçelik, B, Özgen S ve Ergun F.** Antibacterial, antifungal, ve antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological research*, (165), **2010**, s. 496-504
- 93 **Ortiz-Masia D, Salvador P, Macias-Ceja D, Gisbert-Ferrándiz ve ark.** P087 Increased wnt ligands expression in M2c macrophages is associated with fibrosis in Stat6 knockout mice. *Journal of Crohn's ve Colitis*, (11), **2017**, s. S120-S121

- 94 **Ozbey U, Attar R, Romero MA, Alhewairini SS, ve ark.** Apigenin as an effective anticancer natural product: Spotlight on TRAIL, WNT/ β -catenin, JAK-STAT pathways, ve microRNAs. *Journal of cellular biochemistry*, (120), **2019**, s. 1060-1067
- 95 **Pan H, Zhou W, He W, Liu X, Ding Q, ve ark.** Genistein inhibits MDA-MB-231 triple-negative breast cancer cell growth by inhibiting NF- κ B activity via the Notch-1 pathway. *International journal of molecular medicine*, (30), **2012**, s. 337-343
- 96 **Park C, Li S, Cha E ve Schindler C.** Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity*, (13), **2000**, s. 795-804
- 97 **Park J-I, Strock CJ, Ball DW ve Nelkin BD.** The Ras/Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway induces autocrine-paracrine growth inhibition via the leukemia inhibitory factor/JAK/STAT pathway. *Molecular ve cellular biology*, (23), **2003**, s. 543-554
- 98 **Park KI, Park HS, Nagappan A ve Hong GE.** Induction of the cell cycle arrest ve apoptosis by flavonoids isolated from Korean Citrus aurantium L. in non-small-cell lung cancer cells. *Food chemistry*, (135), **2012**, s. 2728-2735
- 99 **Pawlikowska-Pawłęga B, Misiak LE, Zarzyka B, Paduch R, Gawron A ve ark.** FTIR, ¹H NMR ve EPR spectroscopy studies on the interaction of flavone apigenin with dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, (1828), **2013**, s. 518-527
- 100 **Pazarbaşı A, Kasap M ve Kasap H.** Kanser Yolakları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, (20), **2011**, s.
- 101 **Pezzuto JM.** Resveratrol as an inhibitor of carcinogenesis. *Pharmaceutical Biology*, (46), **2008**, s. 443-573
- 102 **Rahaman SO, Harbor PC, Chernova O, Barnett GH, Vogelbaum MA ve ark.** Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation ve induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene*, (21), **2002**, s. 8404
- 103 **Recio C, Guerra B, Guerra-Rodríguez M, Arvea-Tavío H, Martín-Rodríguez P ve ark.** Signal transducer ve activator of transcription (STAT)-5: An opportunity for drug development in oncohematology. *Oncogene*, **2019**, s. 1
- 104 **Richard AJ, Hang, H, Allerton, TD, Elks, CM ve Stephens, JM.** STAT5 Deficiency in Mature Adipocytes Results in Metabolically Healthy Adiposity, Reduced Growth Hormone Signaling in Adipose Tissue, ve Decreased Energy Expenditure. *Am Diabetes Assoc*, **2018**, s.
- 105 **Rodrig SJ, Meraz MA, White JM, Lampe PA, ve ark.** Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory ve nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell*, (93), **1998**, s. 373-383
- 106 **Rodríguez-García C, Sánchez-Quesada C ve Gaforio JJ.** Dietary flavonoids as cancer chemopreventive agents: an updated review of human studies. *Antioxidants*, (8), **2019**, s. 137
- 107 **Russo GL ve Ungaro P.** Epigenetic Mechanisms of Quercetin ve Other Flavonoids in Cancer Therapy ve Prevention. *Elsevier, Epigenetics of Cancer Prevention*, **2019**, s. 187-202
- 108 **Segovia MC, Ravindra K, Barbas A, Collins B, Borle D, Shah J ve Sudan D.** Combined multivisceral ve renal transplant in a patient with JAK-2 mutation. *Transplantation*, (103), **2019**, s. S143
- 109 **Selvaraj S, Krishnaswamy S, Devashya V, Sethuraman S ve Krishnan UM.** Influence of membrane lipid composition on flavonoid–membrane interactions: Implications on their biological activity. *Progress in lipid research*, (58), **2015**, s. 1-13
- 110 **Shi Z-H, Li N-G, Tang Y-P, Shi Q-P, Tang H, ve ark.** Biological evaluation ve SAR analysis of O-methylated analogs of quercetin as inhibitors of cancer cell proliferation. *Drug development research*, (75), **2014**, s. 455-462
- 111 **Shi ZH, Li N-G, Tang Y-P, Shi Q-P, Zhang ve ark.** Synthesis, biological evaluation ve SAR analysis of O-alkylated analogs of quercetin for anticancer. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, (24), **2014**, s. 4424-4427
- 112 **Shih YW, Wu P-F, Lee Y-C, Shi M-D ve Chiang T-A.** Myricetin suppresses invasion ve migration of human lung adenocarcinoma A549 cells: possible mediation by blocking the ERK signaling pathway. *Journal of agricultural ve food chemistry*, (57), **2009**, s. 3490-3499
- 113 **Shoiev L ve Simionica E.** Janus Kinase-Signal Transducer ve Activator of Transcription in target therapy of cancer. *Moldovan Medical Journal*, s. 48
- 114 **Shuai K ve Liu B.** Regulation of JAK–STAT signalling in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, (3), **2003**, s. 900

- 115 **Siegelin M, Gaiser T, Habel A ve Siegelin Y.** Myricetin sensitizes malignant glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by down-regulation of the short isoform of FLIP ve bcl-2. *Cancer letters*, (283), 2009, s. 230-238
- 116 **Siegelin MD, Reuss DE, Habel A, Herold-Mende C ve Von Deimling A.** The flavonoid kaempferol sensitizes human glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis by proteasomal degradation of survivin. *Molecular cancer therapeutics*, (7), 2008, s. 3566-3574
- 117 **Sillaber C, Gesbert F, Frank DA, Sattler M ve Griffin, JD.** STAT5 activation contributes to growth ve viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood*, (95), 2000, s. 2118-2125
- 118 **Smythe WR.** Treatment of stage I non-small cell lung carcinoma. *Chest*, (123), 2003, s. 181S-187S
- 119 **Edgar TJ, Scvelyn, MJ, Stuart, EC, Nedelec, MJ, Valentine, SP ve ark.** The combination of epigallocatechin gallate ve curcumin suppresses ER α -breast cancer cell growth in vitro ve in vivo. *International journal of cancer*, (122), 2008, s. 1966-1971
- 120 **Song, JI ve Grveys, JR.** STAT signaling in head ve neck cancer. *Oncogene*, (19), 2000, s. 2489
- 121 **Spatafora C ve Tringali, C.** Natural Polyphenols to Synthetic Antitumor Agents. Bioactive Compounds from Natural Sources, *Natural Products as Lead Compounds in Drug Discovery*, 2011, s. 299-338
- 122 **Spencer JP, Chowrimootoo G, Choudhury R, Debnam ES, Srail SK ve ark.** The small intestine can both absorb ve glucuronidate luminal flavonoids. *FEBS letters*, (458), 1999, s. 224-230
- 123 **Sun X, Li B, Xie B, Xu Z, Chang G ve ark.** DCZ3301, a novel cytotoxic agent, inhibits proliferation in diffuse large B-cell lymphoma via the STAT3 pathway. *Cell death & disease*, (8), 2017, s. e3111
- 124 **Tabassum S, Abbasi R, Ahmad N ve Farooqi, AA.** Targeting of JAK-STAT Signaling in Breast Cancer: Therapeutic Strategies to Overcome Drug Resistance. *Springer, Breast Cancer Metastasis ve Drug Resistance*, 2019, s. 271-281
- 125 **Tanoue LT, Tanner NT, Gould MK ve Silvestri GA.** Lung cancer screening. *Am J Respir Crit Care Med*, (191), 2015 s. 19-33
- 126 **Tapas AR, Sakarkar D ve Kakde R.** Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, (7), 2008, s. 1089-1099
- 127 **Tarahovsky YS, Kim YA, Yagolnik EA ve Muzafarov EN.** Flavonoid–membrane interactions: Involvement of flavonoid–metal complexes in raft signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, (1838), 2014, s. 1235-1246
- 128 **Taylor RC, Cullen SP ve Martin SJ.** Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell biology*, (9), 2008, s. 231
- 129 **Terao, J.** Factors modulating bioavailability of quercetin-related flavonoids ve the consequences of their vascular function. *Biochemical Pharmacology*, 2017, s.
- 130 **Tohge T, De Souza, LP ve Fernie AR.** Current understveing of the pathways of flavonoid biosynthesis in model ve crop plants. *Journal of Experimental Botany*, 2017, s. erx177
- 131 **Tolomeo M, Meli M ve Grimaudo S.** STAT5 ve STAT5 Inhibitors in Hematological Malignancies. Anti-cancer agents in medicinal chemistry, 2019, s.
- 132 **Tseng TH, Chien MH, Lin WL, Wen YC, Chow JM, ve ark.** Inhibition of MDA-MB-231 breast cancer cell proliferation ve tumor growth by apigenin through induction of G2/M arrest ve histone H3 acetylation-mediated p21WAF1/CIP1 expression. *Environmental toxicology*, (32), 2017, s. 434-444
- 133 **Twentyman P, Fox N ve White D.** Cyclosporin A ve its analogues as modifiers of adriamycin ve vincristine resistance in a multi-drug resistant human lung cancer cell line. *British journal of cancer*, (56), 1987, s. 55
- 134 **Ullah MF, Ahmad A, Zubair H, Khan HY, Wang Z ve ark.** Soy isoflavone genistein induces cell death in breast cancer cells through mobilization of endogenous copper ions ve generation of reactive oxygen species. *Molecular nutrition & food research*, (55), 2011, s. 553-559
- 135 **Veeramuthu D, Raja WRT, Al-Dhabi NA ve Savarimuthu I.** Flavonoids: Anticancer Properties. *Flavonoids: From Biosynthesis to Human Health*, 2017, s. 287
- 136 **Waladkhani AR ve Clemens, MR.** Dietary Phytochemicals in Prevention ve Therapy of Cancer. *CABI Press*, 2008, s.
- 137 **Walle T.** Absorption ve metabolism of flavonoids. *Free radical biology ve medicine*, (36), 2004, s. 829-837
- 138 **Walle T.** Methylation of dietary flavones increases their metabolic stability ve chemopreventive effects. *International journal of molecular sciences*, (10), 2009, s. 5002-5019
- 139 **Wang Y-Z, Wharton W, Garcia R, Kraker A, Jove R ve ark.** Activation of Stat3 preassembled with platelet-derived growth factor β receptors requires Src kinase activity. *Oncogene*, (19), 2000, s. 2075

- 140 **Wang, Y, Wang, Y ve Zhang, Z.** Adipokine RBP4 drives ovarian cancer cell migration. *Journal of ovarian research*, (11), **2018**, s. 29
- 141 **Welte T, Zhang SS, Wang T, Zhang Z, Hesslein DG ve ark.** STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis ve lethality: a critical role of STAT3 in innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (100), **2003**, s. 1879-1884
- 142 **Williams JG.** Serpentine receptors ve STAT activation: more than one way to twin a STAT. *Trends in biochemical sciences*, (24), **1999**, s. 333-334
- 143 **Williamson G, Kay CD ve Crozier, A.** The bioavailability, transport, ve bioactivity of dietary flavonoids: A review from a historical perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science ve Food Safety*, (17), **2018**, s. 1054-1112
- 144 **Xie Q, Bai Q, Zou LY, Zhang QY, Zhou Y ve ark.** Genistein inhibits DNA methylation ve increases expression of tumor suppressor genes in human breast cancer cells. *Genes, Chromosomes ve Cancer*, (53), **2014**, s. 422-431
- 145 **Yan D, Wang H-W, Bowman RL ve Joyce JA.** STAT3 ve STAT6 signaling pathways synergize to promote cathepsin secretion from macrophages via IRE1 α activation. *Cell reports*, (16), **2016**, s. 2914-2927
- 146 **Yang F, Wen C, Zheng S, Yang S, Chen J ve ark.** Involvement of MAPK/ERK1/2 pathway in microcystin-induced microfilament reorganization in HL7702 hepatocytes. *Journal of Toxicology ve Environmental Health, Part A*, (81), **2018**, s. 1135-1141
- 147 **Yang J, Kunimoto H, Katayama B, Zhao H, Shiromizu H ve ark.** Phospho-Ser727 triggers a multistep inactivation of STAT3 by rapid dissociation of pY705-SH2 through C-terminal tail modulation. *International immunology*, **2019**, s.
- 148 **Yang X, Ye H, He M, Zhou X, Sun N ve ark.** LncRNA PDIA3P interacts with c-Myc to regulate cell proliferation via induction of pentose phosphate pathway in multiple myeloma. *Biochemical ve biophysical research communications*, (498), **2018**, s. 207-213
- 149 **Yaru W, Zhiyang Z, Nai S, Chen X, Zhao Y ve ark.** Atomistic Insight into Inhibition Mechanisms of Suppressors of Cytokine Signaling on Janus Kinase. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2019**, s.
- 150 **Yin Y, Solomon G, Deng C ve Barrett JC.** Differential regulation of p21 by p53 ve Rb in cellular response to oxidative stress. *Mol Carcinog*, (24), **1999**, s. 15-24
- 151 **Yoo J-Y, Huso DL, Nathans D ve Desiderio S.** Specific ablation of Stat3 β distorts the pattern of Stat3-responsive gene expression ve impairs recovery from endotoxic shock. *Cell*, (108), **2002**, s. 331-344
- 152 **Yoshimura A, Ito M, Chikuma S, Akanuma T ve Nakatsukasa H.** Negative regulation of cytokine signaling in immunity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, (10), **2018**, s. a028571
- 153 **Yu P, Xiao L, Lin L, Tang L, Chen C, ve ark.** STAT3-mediated TLR2/4 pathway upregulation in an IFN-gamma-induced Chlamydia trachomatis persistent infection model. *Pathogens ve disease*, (74), **2016**, s.
- 154 **Zhang Q, Zhao X-H ve Wang Z-J.** Cytotoxicity of flavones ve flavonols to a human esophageal squamous cell carcinoma cell line (KYSE-510) by induction of G2/M arrest ve apoptosis. *Toxicology in vitro*, (23), **2009**, s. 797-807
- 155 **Zhang X ve Darnell, JE.** Functional importance of Stat3 tetramerization in activation of the α 2-macroglobulin gene. *Journal of Biological Chemistry*, (276), **2001**, s. 33576-33581
- 156 **Zhang Y, Li Q ve Chen H.** DNA methylation ve histone modifications of Wnt genes by genistein during colon cancer development. *Carcinogenesis*, (34), **2013**, s. 1756-1763
- 157 **Zhang Z, Xu H, Hu W, Hu T ve Wang, X.** LINC01116 promotes proliferation, invasion ve migration of osteosarcoma cells by silencing p53 ve EZH2. *European review for medical ve pharmacological sciences*, (23), **2019**, s. 6813-6823
- 158 **Zhu J-g, Dai Q-s, Han Z-d, He H-c, Mo R-j ve ark.** Expression of SOCSs in human prostate cancer ve their association in prognosis. *Molecular ve cellular biochemistry*, (381), **2013**, s. 51-59
- 159 **Zhu Y Mao, Y, Chen H, Lin Y, Hu Z, ve ark.** Apigenin promotes apoptosis, inhibits invasion ve induces cell cycle arrest of T24 human bladder cancer cells. *Cancer cell international*, (13), **2013**, s. 54
- 160 **Fu, W. J., Hu, J., Spencer, T., Carroll, R., ve Wu, G.** Statistical models in assessing fold change of gene expression in real-time RT-PCR experiments. *Computational biology and chemistry*, (2006) 30(1), 21-26.
- 161 **Online1** https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c8/As_janus_rostrum_okretu_ciach.jpg, Erişim tarihi 15.12. 2019

- 162 **Online 2** https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?fca04630 **Erişim tarihi 15.12. 2019**
- 163 **Van Meerloo, Johan, Gertjan JL Kaspers, ve Jacqueline Cloos.** "Cell sensitivity assays: the MTT assay." *Cancer cell culture*. Humana Press, **2011**. 237-245.
- 164 **Wung, B. S., Hsu, M. C., Wu, C. C., & Hsieh, C. W.** Resveratrol suppresses IL-6-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells: effects on the inhibition of STAT3 phosphorylation. *Life sciences*, (**2005**). 78(4), 389-397.

ÖZGEÇMİŞ

Dicle Üniversite Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği anabilim dalından 2011 yılında mezun oldu. Adıyaman üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya A.B.D'den 2014 yılında mezun oldu. Aynı yıl Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde Moleküler Biyokimya ve Genetik A.B.D.'de doktora eğitimine başladı.