

T.C.  
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CURCUMİN'İN TERAPOTİK ETKİNLİĞİNİN OTOKRİN BÜYÜME  
HORMONU SİNYAL YOLAĞI ARACILIĞI İLE MDA-MB-453  
MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE POLİAMİN  
METABOLİZMASI İRDELENEREK İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve UĞUR  
(1409241008)

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı : Doç.Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

Haziran - 2016

T.C.  
İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CURCUMİN'İN TERAPOTİK ETKİNLİĞİNİN OTOKRİN BÜYÜME  
HORMONU SİNYAL YOLAĞI ARACILIĞI İLE MDA-MB-453  
MEME KANSERİ HÜCRELERİNDE POLİAMİN  
METABOLİZMASI İRDELENEREK İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Merve UĞUR  
(1409241008)

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Programı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı : Doç.Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN

Jüri Üyeleri : Doç.Dr. Elif Damla ARISAN

Doç.Dr. Fatema BAHADORİ

Haziran - 2016

## ÖNSÖZ

Tez çalışmam ve lisans eğitimim boyunca engin bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım, her konuda yakın ilgi gösteren, her zaman desteğini ve yardımını esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ajda ÇOKER GÜRKAN'a

Tüm lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgilerini ve akademik tecrübelerini benimle paylaşan, her zaman desteklerini hissettiğim değerli hocalarım Prof. Dr. Narçın PALAVAN ÜNSAL, Doç. Dr. Elif Damla ARISAN ve Yrd. Doç. Dr. Pınar OBAKAN YERLİKAYA'ya

Tez çalışmalarım sırasında fikirlerine danışabildiğim, yanımda olduklarını hissettiğim Araş. Gör. Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ ve Araş. Gör. Özge BERRAK RENCÜZOĞULLARI'na

Aynı projede bir bütün olarak birlikte çalıştığım, akademik ve özel hayatımda yanımda olduğunu hissettiğim, her konuda motivasyon ve desteğini esirgemeyen Merve ÇELİK'e

Yardımları ve desteklerinden dolayı arkadaşlarım Utku ÖZBEY, Ayça Ece NEZİR, Buse KAYHAN ve Narod Nayat CİROĞLU'na

Ekip ruhu ile çalıştığımız projede her türlü yardımları için Recep GENÇ, Furkan KAYSIN, Zeynep Begüm DURDU ve Tuğçe DEMİREL'e

Bugüne kadar attığım her adımda yanımda olan, benimle birlikte üzüldüğüm ve sevdiğim, her zaman fedakarlıklarını esirgemediği bugünlere gelmemi sağlayan canım babam Yaşar UĞUR ve canım annem Jaklin UĞUR'a, her şeyimi paylaştığım canım kardeşim Melis UĞUR'a

Her konuda yanımda olan ve her konuda destek veren Şahin ÖZMARKARYAN'a

Tez çalışmamın gerçekleşmesi için finansal destek sağlayan ve bursiyer kapsamında görev aldığım TÜBİTAK 1001-113Z791 nolu projeye ve deneysel süreçte İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarlarına vermiş oldukları destek ve olanaklar için teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İçindekiler .....	ii
KISALTMALAR .....	vi
TABLO LİSTESİ .....	ix
ŞEKİL LİSTESİ .....	x
SEMBOL LİSTESİ .....	xiii
ÖZET .....	xiv
SUMMARY .....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
1.1. GİRİŞ .....	1
1.2. AMAÇ .....	5
2. GENEL BİLGİLER .....	6
2.1. MEME KANSERİ .....	6
2.1.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi .....	7
2.1.2. Meme Kanseri Etiyolojisi .....	8
2.2. BÜYÜME HORMONU .....	9
2.3. CURCUMİN .....	11
2.4. HÜCRE SAĞKALIM SİNYAL YOLAKLARI .....	12
2.4.1. JAK-STAT Sinyal Yolağı .....	12
2.4.2. İnvazyon ve Metastaz .....	16
2.4.2.1. Epitel-Mezenkimal Geçiş (EMT) .....	16
2.4.2.2. Matriks Metalloproteinaz (MMP) .....	18
2.4.3. PI3K/AKT Sinyal Yolağı .....	19
2.4.4. MAPK Sinyal Yolağı .....	20
2.4.5. Onkogenler .....	22
2.4.6. NF-κB Sinyal Yolağı .....	23
2.4.6.1. Klasik (Standart) Yolak .....	25
2.4.6.2. Alternatif (Standart Olmayan) Yolak .....	25
2.4.6.3. Alışılmadık Yolak .....	26

2.5.	POLİAMİNLER.....	27
2.5.1.	Poliamin Metabolizması .....	28
2.6.	HÜCRE ÖLÜM SİNYAL YOLAĞI .....	30
2.6.1.	Apoptoz.....	30
2.6.1.1.	İç (İntrinsik) Sinyal Yolağı .....	32
2.6.1.2.	Dış (Ektrinsik) Sinyal Yolağı.....	33
3.	MALZEME VE YÖNTEMLER.....	35
3.1.	KULLANILAN MALZEMELER .....	35
3.1.1.	Kullanılan Cihazlar .....	35
3.1.2.	Hücre Kültürü Donanımları .....	35
3.1.3.	Kullanılan Kimyasallar .....	35
3.1.4.	Kullanılan Tamponlar .....	35
3.1.4.1.	10X TBS Hazırlanması .....	35
3.1.4.2.	1X TBS-Tween Hazırlanması .....	35
3.1.4.3.	Yürütme Tamponunun Hazırlanması .....	35
3.1.4.4.	Transfer Tamponunun Hazırlanması.....	36
3.1.4.5.	Yürütme Jelinin Hazırlanması.....	36
3.1.4.6.	Hücre Dondurma Medyasının Hazırlanması.....	36
3.2.	YÖNTEMLER.....	36
3.2.1.	Hücre Kültürü .....	36
3.2.1.1.	Doğal Tip Hücrelere Transfeksiyon Yapılması .....	37
3.2.2.	Hücre Canlılığının Belirlenmesi .....	38
3.2.2.1.	MTT ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi .....	38
3.2.2.2.	Hücre Sağkalımı ile Canlılığın Belirlenmesi .....	38
3.2.3.	Eliza Yöntemi ile GH Varlığının Belirlenmesi .....	38
3.2.4.	Koloni Oluşumu Yöntemi.....	39
3.2.5.	Yara İyileşmesi .....	39
3.2.6.	İnvazyon-Metastaz Yöntemi .....	39
3.2.7.	Soft Agar ile Koloni Oluşumu Yöntemi .....	39
3.2.8.	Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) .....	40
3.2.9.	Floresan Boyama.....	41
3.2.9.1.	3,3' Dihidroksiloksakarbosiyanin İyodür (DiOC <sub>6</sub> ) Boyama.....	41

3.2.9.2.	4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama .....	41
3.2.9.3.	Propidyum iyodür (PI) boyama.....	41
3.2.10.	Hücre Akış Sitometresinde PI Boyaması .....	41
3.2.11.	Annexin V/PI Analizi.....	42
3.2.12.	DCF-DA Boya ile Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Tayini .....	42
3.2.13.	İmmunoblatma Yöntemi .....	43
3.2.13.1.	Protein İzolasyonu.....	43
3.2.13.2.	Bradford Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini .....	43
3.2.13.3.	Protein Hazırlanması ve SDS-PAGE Jelde Yürütülmesi.....	44
3.2.13.4.	Proteinlerin Membrana Transfer Edilmesi ve Bloklama.....	44
3.2.13.5.	Membranları Primer ve Sekonder Antikora Alma .....	44
3.2.13.6.	Protein Bantlarının Chemidoc Cihazında Görüntülenmesi.....	45
3.2.14.	Poliamin Miktarlarının Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Tayini	45
4.	SONUÇLAR.....	46
4.1.	MDA-MB-453 Meme Kanseri Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri.....	46
4.2.	MDA-MB-453 Meme Kanseri Hücrelerinde PC3.1-GH Plazmiti Aracılığı ile Otokrin GH Anlatımının Arttırılması .....	46
4.3.	Otokrin GH Anlatımı Gerçekleştirilen MDA-MB-453 Hücrelerinde GH Anlatımının Bazal Seviyesinin İmmunoblotlama Tekniği ile Belirlenmesi .....	47
4.4.	MDA-MB-453 Doğal tip ve Otokrin GH Anlatımı Gerçekleşen Meme Kanseri Hücre Hatlarının Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	48
4.5.	Doğal tip ve Otokrin GH Anlatımı Gerçekleştirilen MDA-MB-453 Meme Kanseri Hücrelerinde Curcuminin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Gösterilmesi .....	50
4.6.	Curcuminin GH Sinyali ve JAK-STAT Sinyal Yolağı Üzerine Etkisinin MDA- MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde İrdelenmesi.....	51
4.7.	Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde Koloni Oluşumu Üzerine Etkisi.....	54
4.8.	Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde Soft Agar ile Koloni Oluşumu Üzerine Etkisi .....	55
4.9.	Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkisi .....	58
4.10.	Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde İnvazyon-Metastaz Üzerine Etkisi.....	60
4.11.	Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde EMT Üzerine Etkisi.....	64

4.12.	Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde Akış Sitometresi ile Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisi.....	67
4.13.	Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde PI3K/AKT Sinyal Yolağı Üzerine Etkisi.....	70
4.14.	Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde MAPK Sinyal Yolağı Üzerine Etkisi .....	71
4.15.	Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde Onkogenler Üzerine Etkisi.....	72
4.16.	Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde NF- $\kappa$ B Sinyal Yolağı Üzerindeki Etkisi.....	73
4.17.	Curcuminin MDA-MB- 453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde Poliamin Üzerine Etkisinin İrdelenmesi .....	76
4.18.	Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücre Hatlarında Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Üzerine Etkisinin İrdelenmesi .....	78
4.19.	Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptoz Sinyal Yolağı Üzerine Etkisi.....	79
4.20.	MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Hücrelerinde NAC ile Curcumin Etkisinin Geri Çekildiğinin Gösterilmesi .....	86
5.	TARTIŞMA .....	93
	KAYNAKLAR .....	99
	EKLER.....	109

## KISALTMALAR

<b>ANK :</b>	Ankirin motifi
<b>AP-1 :</b>	Aktivatör protein-1
<b>Apaf-1 :</b>	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
<b>APS :</b>	Amonyum persülfat
<b>AZ :</b>	Antizim
<b>AZI :</b>	Antizim inhibitörü
<b>BAFF :</b>	B-hücrelerini aktive eden faktör
<b>Bcl-2 :</b>	B-hücre lenfoma 2
<b>BSA :</b>	Sığır serum albumin
<b>CO<sub>2</sub> :</b>	Karbondioksit
<b>DAPI :</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DCF-DA :</b>	2',7'-diklorodihidrofloresein diasetat
<b>DiOC<sub>6</sub> :</b>	3, 3'-diheksiloksakarbosianin iyodür
<b>DMSO :</b>	Dimetilsülfoksit
<b>ECM :</b>	Ekstraselüler matriks
<b>EDTA :</b>	Etilen daimin tetra asetik asit
<b>EGF :</b>	Epidermal büyüme faktörü
<b>EGFR :</b>	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
<b>EMT :</b>	Epitel-mezenkimal geçiş
<b>ER :</b>	Östrojen reseptörü
<b>ERK :</b>	Ekstraselüler sinyal regüle edici kinaz
<b>FoxO :</b>	Forkhead/Winged helix kutusu sınıf O



<b>GH :</b>	Büyüme hormonu
<b>GHR :</b>	Büyüme hormonu reseptörü
<b>GHRH :</b>	Büyüme hormonu serbestleyen hormon
<b>HER2/neu :</b>	İnsan epidermal büyüme faktörü tip-2 reseptörü
<b>HIF-1 :</b>	Hipoksi indükleyen faktör
<b>HPLC :</b>	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :</b>	Hidrojen peroksit
<b>JAK :</b>	Janus kinaz
<b>JNK :</b>	c-Jun NH <sub>2</sub> terminal kinaz
<b>MAPK :</b>	Mitojen-aktive edici protein kinaz
<b>MMP :</b>	Matriks metalloproteinaz
<b>MTT :</b>	Metiltiazol difeniltetrazolyum bromür
<b>NAC :</b>	N-asetilsistein
<b>NaCl :</b>	Sodyum klorür
<b>NF-κB :</b>	Nükleer faktör kappa B
<b>ODC :</b>	Ornitin dekarboksilaz
<b>PA :</b>	Poliamin
<b>PAO :</b>	Poliamin oksidaz
<b>PARP :</b>	Poli ADP riboz polimeraz
<b>PBS :</b>	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
<b>PCR :</b>	Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PDGFR :</b>	Trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü
<b>PI :</b>	Propidyum iyodür
<b>PI3K :</b>	Fosfatidilinositol 3 kinaz
<b>PIP :</b>	Fosfatidilinositol bifosfat
<b>PIP<sub>2</sub> :</b>	Fosfatidilinositol difosfat
<b>PIP<sub>3</sub> :</b>	Fosfatidilinositol trifosfat

<b>PKB :</b>	Protein kinaz B
<b>PR :</b>	Progesteron reseptörü
<b>Put :</b>	Putresin
<b>PVDF :</b>	Poliviniliden florid
<b>RHD :</b>	Rel-homoloji domaini
<b>RIP :</b>	Reseptör-etkileşimli protein
<b>ROS :</b>	Reaktif oksijen türleri
<b>RT-PCR :</b>	Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
<b>SAMDC :</b>	S-adenosilmetionin dekarboksilaz
<b>SDS :</b>	Sodyum dodesil sülfat
<b>SDS-PAGE :</b>	SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi
<b>Ser :</b>	Serin
<b>SH2 :</b>	Src homoloji 2
<b>SMO :</b>	Spermin oksidaz
<b>Spd :</b>	Spermidin
<b>Spm :</b>	Spermin
<b>SSAT :</b>	Spermidin/spermin asetil transferaz
<b>STAT :</b>	Sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatörü
<b>TBS :</b>	Tris tamponlu tuz çözeltisi
<b>TCA :</b>	Trikloroasetik asit
<b>TGF :</b>	Tümör Büyüme Faktörü
<b>TIMP :</b>	Metalloproteinaz doku inhibitörü
<b>TNF :</b>	Tümör nekroz faktörü
<b>TRADD :</b>	TNF reseptör ilişkili ölüm domain proteini
<b>TRAF :</b>	TNF reseptör ilişkili faktör
<b>TRAIL :</b>	TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand reseptör
<b>VEGF :</b>	Vasküler endotelial büyüme faktörü

## TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Metalloproteinaz primerlerin PCR cihazında çalıştığı sıcaklık dereceleri..... 40

Tablo 2. MDA-MB-453 doğal tip hücre hattında GH, GHR, GHRH ve GHRHR anlatım durumlarının gösterilmesi. .... 46



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. İnsan meme yapısı [46].	7
Şekil 2. Büyüme hormonu sinyalinin hücre içi yolağı [72].	11
Şekil 3. Curcuminin kimyasal yapısı [44].	12
Şekil 4. STAT3 proteini alt birimlerinin moleküler yapısı [93].	14
Şekil 5. Normal ve onkogenik STAT sinyal yolağı [92, 93].	15
Şekil 6. Hücrenin EMT-MET geçişi [14].	17
Şekil 7. PI3K sinyal yolağı [değiştirilmiştir: [118]].	20
Şekil 8. MAPK sinyal yolağının tetiklendiği genel mekanizma [değiştirilmiştir: [20]].	21
Şekil 9. MAPK sinyal yolağı [99].	22
Şekil 10. Memelilerde NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B ve IKK aile üyeleri [24].	24
Şekil 11. Klasik, alternatif ve alışılmamış NF- $\kappa$ B sinyal yolakları [126].	26
Şekil 12. Hüresel poliaminler ve onların asetil türevleri [149].	28
Şekil 13. Memeli hücresinde poliamin metabolizması. Mavi: PA biyosentez enzimleri, kırmızı: PA katabolik enzimler [değiştirilmiştir: [149]].	30
Şekil 14. Bcl-2 ve ilişkili protein aileleri [172].	32
Şekil 15. Apoptoz iç sinyal yolağı [değiştirilmiştir: [184]].	33
Şekil 16. Apoptoz sinyal yolağı ve diğer yolaklar ile etkileşimi [186].	34
Şekil 17. GH transfekte edilen MDA-MB-453 hücre hatlarında GH anlatım seviyesinin belirlenmesi. 1.MDA-MB-453 doğal tip, 2-7. PC3.1-GH plazmit transfeksiyon sonrası neomisin ile seçilen klonlar, 8.MDA-MB-453 PC3.1 hücresi.	47
Şekil 18. MDA-MB-453/GH+ meme kanseri hücrelerinde zamana bağlı bazal GH anlatımının immunoblotlama ile gösterilmesi. 1.MDA-MB-453 doğal tip, 2.MDA-MB-453 GH+ 24 saat, 3.MDA-MB-453 GH+ 48 saat, 4.MDA-MB-453 GH+ 72 saat, 5.MDA-MB-453 PC3.1 hücresi.	47
Şekil 19. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde GH varlığının immunoblotlama ve Elisa yöntemi ile gösterilmesi (P: Hücre lizatı, M: Hücre kültürü medium) ***p<0,0001.	48

Şekil 20. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında zamana bağlı olarak hücre morfolojilerindeki değişikliklerin belirlenmesi.....	49
Şekil 21. MDA-MB-453 doğal tip ve GH transfekte edilmiş hücre hatlarında doza bağlı curcumin uygulamasının hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi. A. 24 saat B. 48 saat doza bağlı curcuminin hücre canlılığına etkisi. C. 20 µM curcuminin hücre büyümesi üzerindeki etkisi.....	51
Şekil 22. MDA-MB-453 doğal tip ve transfekte edilen GH+ ve PC3.1 hücre hatlarında curcuminin zamana bağlı GH, GHR ve GHRH anlatımına etkisinin gösterilmesi.....	52
Şekil 23. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin JAK/STAT sinyal yolağı üzerine etkisinin gösterilmesi.....	53
Şekil 24. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcumin ile JAK/STAT inhibitörleri üzerine etkisinin gösterilmesi.....	54
Şekil 25. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi.....	55
Şekil 26. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin soft agar da koloni oluşumu üzerine etkisinin ışık ve DiOC <sub>6</sub> boya ile floresan çekiminin gösterilmesi.....	56
Şekil 27. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin soft agar da koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi (Büyütme: 40X, ns: istatistiksel olarak farklı değildir, **p< 0.05).....	57
Şekil 28. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin yara iyileşmesi üzerine etkisinin gösterilmesi (ns: istatistiksel olarak farklı değildir , **p : < 0,05). .....	59
Şekil 29. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin invazyon üzerine etkisinin gösterilmesi (**p< 0,05).....	61
Şekil 30. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin metastaz üzerine etkisinin gösterilmesi (*p< 0,05).....	63
Şekil 31. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin EMT üzerine etkisinin immunoblotlama tekniği ile gösterilmesi.....	65
Şekil 32. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin matriks metalloproteinazlar üzerine etkisinin PCR ile gösterilmesi.....	66
Şekil 33. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin Matriks Metalloproteinazlar üzerine etkisinin immunoblotlama tekniği ile gösterilmesi.....	66
Şekil 34. Curcuminin MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsü üzerindeki etkisinin gösterilmesi.....	68

Şekil 35. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin hücre döngüsü üzerine etkisinin gösterilmesi. ....	69
Şekil 36. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin PI3K/AKT sinyal yolağı üzerine etkisinin immunoblotlama tekniğı ile gösterilmesi. ....	70
Şekil 37. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin MAPK sinyal yolağı üzerine etkisinin immunoblotlama tekniğı ile gösterilmesi. ....	71
Şekil 38. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin onkogenler üzerine etkisinin gösterilmesi.....	72
Şekil 39. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin NF-κB klasik ve alternatif sinyal yolağı üzerine etkisinin gösterilmesi. ....	75
Şekil 40. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin poliamin metabolizması üzerine etkisinin immunoblotlama tekniğı ile gösterilmesi. ....	76
Şekil 41. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin poliamin metabolizması üzerine etkisinin HPLC ile gösterilmesi (*p<0,05; **p<0,05). ....	77
Şekil 42. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin ROS üzerinde etkisinin gösterilmesi (*p< 0,05). ....	78
Şekil 43. Curcumin zamana bağı MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde hücre ölümü üzerindeki etkisinin gösterilmesi. ....	80
Şekil 44. Curcuminin MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde hücre ölümü üzerindeki etkisinin Annexin V-FITC ve PI ile analiz edilerek gösterilmesi. ....	82
Şekil 45. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin apoptoz iç yolağı üzerine etkisinin immunoblotlama tekniğı ile gösterilmesi. ....	84
Şekil 46. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin apoptoz dış yolak üzerine etkisinin immunoblotlama tekniğı ile gösterilmesi.....	85
Şekil 47. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde NAC ile curcumin etkisinin geri çekilmesinin MTT ile gösterilmesi (A: 24 saat, B: 48 saat; **p= 0,0011; ***p< 0,0001; ****p< 0,0001). ....	87
Şekil 48. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin ve NAC ile hücre ölümü üzerindeki etkisinin akış sitometrisinde gösterilmesi. ....	89
Şekil 49. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin ve NAC ile ROS birikiminin analiz edilmesi. ....	91
Şekil 50. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde NAC ve curcumin etkisinin poliamin içeriklerinin HPLC analizi ile gözterilmesi. ....	92
Şekil 51. Curcuminin MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde etkili olduğu sinyal yolakları. ....	98

## SEMBOL LİSTESİ

<b>% :</b>	Yüzde
<b>°C :</b>	Santigrat derece
<b><math>\Delta\psi_m</math> :</b>	Mitokondri membran potansiyeli
<b><math>\mu\text{g}</math> :</b>	Mikrogram
<b><math>\mu\text{l}</math> :</b>	Mikrolitre
<b><math>\mu\text{m}</math> :</b>	Mikrometre
<b><math>\mu\text{M}</math> :</b>	Mikromolar
<b>bç :</b>	Baz çifti
<b><math>\text{cm}^2</math> :</b>	Santimetrekare
<b>kDa :</b>	Kilo dalton
<b>ml :</b>	Mililitre
<b>mm :</b>	Milimetre
<b>nm :</b>	Nanometre
<b>ng :</b>	Nanogram
<b>V :</b>	Voltaj

## ÖZET

Curcumin, *Curcumuma longa* bitkisinin kökünden özütlenen ve anti-inflammatuar, anti-proliferatif, anti-oksidan ve anti-kanserojenik etkisi prostat, melanoma, kolon, servikal ve meme kanseri üzerinde gösterilen bir ilaçtır. Postnatal dönemde hipofiz bezinden salınan, lipit, karbonhidrat ve protein metabolizmasını etkileyerek büyümeyi sağlayan büyüme hormonu (GH), meme kanseri tümör biyopsi örneklerinde normal meme epitel hücrelerine kıyasla arttığı belirlenmiştir. Malign durumların sıklıkla görüldüğü akromegali hastalarında endokrin bozuklukların meme kanseri gelişimini tetiklediği ve GH'nin meme bezi gelişiminde prolaktin gibi indükleyici bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca otokrin meme kanseri hücre hatlarında hücre invazyon, metastaz ve kanserojenik artış gösterilmiştir. Bu tez ile amacımız, otokrin GH anlatımı olan MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde curcuminin NF- $\kappa$ B sinyal yolağı ile birlikte apoptotik hücre ölümü üzerine etkisinin ve poliamin (PA) moleküler mekanizmasının irdelenmesidir. Otokrin GH anlatımı olan MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde invazyon, metastaz, koloni oluşumu doğal tip hücrelere kıyasla artış göstermiştir. Doza ve zamana bağlı curcumin uygulamasının MDA-MB-453 GH+ ve doğal tip meme kanseri hücrelerinde hücre canlılığına ve hücre büyümesi ile koloni oluşumuna ket vurduğu belirlenmiştir. Curcuminin her iki hücre hattında JAK/STAT, NF- $\kappa$ B, PI3K/AKT/MAPK sinyal yolağına ket vurarak ve Bcl2 ailesi üyelerini modüle ederek iç apoptotik hücre ölümüne yol açtığı tespit edilmiştir. Bunlara ilaveten, curcuminin PA katabolik enzimleri olan SSAT (spermidin/spermin asetil transferaz) ve PAO (poliamin oksidaz)'yu indükleyerek hücre içi PA seviyesini azalttığı ve ROS oluşumunu indüklediği ve NAC (N-asetilsistein) ile bu etkinin geri çekildiği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Meme Kanseri, Büyüme Hormonu, Curcumin, NF- $\kappa$ B, Poliamin, Reaktif Oksijen Türleri



## SUMMARY

Curcumin, that extracted from *Curcuma longa* root and shown anti-inflammation, anti-proliferative, anti-oxidant and anti-carcinogenic effect on prostate, melanoma, colon, cervical and breast cancer is medicine. Growth hormone (GH) that releasing from pituitary gland and providing growth with effecting lipid, carbohydrate and protein metabolism in postnatal term has been determined increase GH level in breast cancer compared to normal breast epithel cells in biopsy sample. It has been identified that triggered breast cancer progress of endocrine irregularity often seen the malign situation on acromegaly patients, and existed the effect of inducing like prolactine in breast gland progression. Also it has been shown increase cell invasion, metastasis and carcinogenic on autocrine breast cancer cell line. Our aim with this thesis examines over the effect of curcumin NF- $\kappa$ B signalling pathway with apoptotic cell death and polyamine (PA) molecular mechanism existing autocrine GH expression in MDA-MB-453 breast cancer cells. Invasion, metastasis and colony formation have shown increase existing autocrine GH expression in MDA-MB-453 breast cancer cells compared to wild type cells. It has been determined by dose and time dependent curcumin applied handicapping cell survival and cell growth with colony formation in MDA-MB-453 GH+ and wild type breast cancer cells. It has been identified of curcumin raise to intrinsic apoptotic cell death handicapping JAK/STAT, NF- $\kappa$ B, PI3K/AKT/MAPK signalling pathway and modulating Bcl2 family members both cell lines. In addition, it has been shown of curcumin decrease intracellular PA level inducing PA catabolic enzyme involve SSAT (spermidine/spermine acetyl transferase) and PAO (polyamine oxidase), and induce ROS formation, and regress this effect with NAC (N-acetylcysteine).

**Key words:** Breast Cancer, Growth Hormone, Curcumin, NF- $\kappa$ B, Polyamine, Reactive Oxygen Species

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

## 1.1. GİRİŞ

Dünyada meme kanseri, kadınlar arasında kanser olgularının %28,8'inden ve kanser ölümlerinin de %16,8'inden sorumludur [1]. Etkin tarama yöntemleri ile erken teşhis ve gelişen tedavi yöntemleri ile birlikte meme kanserinde belirgin bir azalma görülmüştür [2].

Meme kanseri genelde cerrahi, radyasyon terapi, kemoterapi ve hormon tedavisi ile çeşitli kombinasyonlar uygulanarak tedavi edilmektedir. Tanı konulduktan sonra klinik ve patolojik özelliklere göre tedavi seçilmektedir. Etkin tedavi yöntemleri hastanın yaşı, menopoz durumu, hastalık evresi, birincil tümörün histolojik ve nükleer seviyesi, tümörün östrojen reseptör (ER), progesteron reseptör durumu, insan epidermal büyüme faktörü tip-2 reseptörün (HER2/neu) aşırı ekspresyonu ve tümörün proliferasyon kapasitesi ile ilişkilidir [3]. Meme kanserinin gelişmesinde spesifik ER'lerin aktivasyonu aracılığı ile aktive olan östrojenlerin büyük bir rol oynadığı düşünülmektedir. Çeşitli klinik gözlemler ve deneysel çalışmalar büyüme hormonu dahil olmak üzere hipofiz hormonlarının insan meme kanseri gelişimde rol oynadığını göstermektedir [4].

Büyüme hormonu (GH) insanda büyüme ve gelişimde rol oynayan fizyolojik sistemlere ve bazı organlara etki eden anabolik bir hormondur. GH ön hipofizde somatotrof hücrelerinde üretilerek saklanmakta ve kana salgılanmaktadır [4]. GH fazla salgılanması akromegali hastalığına neden olurken, az salgılanması cüceliğe sebep olduğu gösterilmiştir. Anormal GH salgılanması akromegali hastalarında şeker hastalığı ve konjestif kalp yetmezliği riskinin artmasının [5] yanı sıra kolon, tiroid ve potansiyel olarak meme kanseri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [6]. Ayrıca kanser hastalarının serumlarında GH seviyesi değerlendirilerek mide, kalın bağırsak [7], akciğer [8] ve meme kanseri [9] hastalarında hormon seviyesinin arttığı gösterilerek desteklenmiştir.

Sinyal ileten ve transkripsiyonu aktifleştiren (STAT) sinyal yolağı normal hücrelerde embriyonik gelişim, organların oluşum ve işlevleri, doğuştan ve sonradan kazanılan immün sistem fonksiyonları, hücrelerin farklılaşması, büyümesi ve apoptozda önemli bir role sahiptir [10]. STAT1, STAT3 ve STAT5'in aktivasyonu çeşitli insan tümör hücrelerinde görülürken meme kanserinde özellikle STAT1 ve hücre büyümesini düzenleyen STAT3 sinyal yolları sürekli aktiftir [11]. STAT3 ve STAT5'in sürekli aktivasyonu, apoptozu önleyerek veya hücre çoğalmasını teşvik ederek ya da her ikisini birden yaparak insan kanserlerinin gelişimine ve ilerlemesine katkıda bulunmaktadır.

Epitel-mezenkimal geçiş (EMT), gelişimi ve yeniden yara iyileşmesini düzenlemekle birlikte fibrosis ve kanser ilerlemesini de sağlamaktadır [12, 13]. EMT sırasında hücrelerin karakteristik özelliklerle değişerek epitel gen ekspresyonları azalmakta ve mezenkimal gen ekspresyonları artmaktadır. Mezenkimal gen ekspresyon artışına bağlı olarak hücreler hareketlilik kazanmaktadır. EMT sürecinde plazma membranından ayrılan E-kaderin,  $\beta$ -catenin ile daha fazla etkileşim kuramaz ve  $\beta$ -catenin nukleusa göçerek transkripsiyonu teşvik etmektedir. Buna bağlı olarak E-kaderin seviyesi düşmekte, N-kaderin seviyesi de artmaktadır [14]. Aynı şekilde Vimentin de organellerin ve membran-ilişkili proteinlerin düzenlenmesini sağlamakla birlikte motor proteinlerle etkileşim kurarak hücre hareketliliğini sağlamaktadır [15, 16]. Ayrıca TNF reseptör-ilişkili faktör-6 (TRAF6) aracılı tümör büyüme faktörü (TGF- $\beta$ )-indüklü p38 MAPK (mitojen-aktive edici kinaz) ve JNK (c-jun NH<sub>2</sub> terminal kinaz); tirozin kinaz indüklü ERK (ekstraselüler sinyal regüle edici kinaz) ve Akt aracılı NF- $\kappa$ B (nükleer faktör kappa B) aktivasyonu ile EMT sağlanmaktadır. ERK ve p38 MAPK aktivitelerinin inhibisyonu TGF $\beta$ -indüklü EMT'yi baskılamaktadır. ERK ve MAPK sinyalleri TGF $\beta$ -indüklü transkripsiyonu artırarak E-kaderin baskılanmasını arttırmasıyla birlikte N-kaderin ve MMP (matriks metalloproteinaz) ekspresyonunu aktive etmektedir [17, 18].

PI3K (fosfatidil inositol 3 kinaz) ve MAPK yolları arasında çapraz-konuşma olduğu ve PI3K Ras-GTP bağımlı kompleks ile etkileşim içinde olduğu belirlenmiştir. Ras, PI3K'in ya yukarı yolağı ya da aşağı yolağı teşvik ettiği gösterilmiştir. Aktif PI3K aşağı yolak hedeflerinden PKB/Akt ve NF- $\kappa$ B'yi hem fosforillemektedir ve hem de aktive etmektedir [19].

Memeli hücrelerinde MAPK ailesi hücre proliferasyonu, hücrelerin farklılaşması, hücre gelişimi, transformasyon, inflamasyon cevapları ve apoptoz gibi kompleks hücresel programlarda önemli rollere sahiptir. ERK1/2 (p42/44 MAPK) hücre mitogenezi için hücre içi kontrol noktası olarak bilinmektedir. MAPK sinyal yolağı büyüme faktörleri, sitokinler, stres, TGF- $\beta$  ve seramidler ile aktive olmaktadır [20]. Çeşitli sitokin reseptörleri JAK (JAK1, 2, 3 ve Tyk2) aktivasyonu ile ERK yolağını aktive etmektedir. JAK (Janus kinaz), adaptör protein olan Shc fosforilleyerek ERK1/2 yolağını aktive etmektedir [21]. Aktif ERK nükleusa geçerek c-myc dahil çeşitli transkripsiyon faktörlerini fosforile etmektedir. JNK yolağında JNK, STAT3 ve p53'ü aktive etmesinin yanı sıra c-Jun'un NH<sub>2</sub>-terminal aktivasyon bölgesine bağlanarak Ser-63 ve Ser-73'de fosforillemektedir. JNK yolağı hem apoptoz hem de hücre sağ kalım sinyal yollarında etkilidir. VEGF (vasküler endotel büyüme faktörü) gibi epitel hücre büyüme faktörü tarafından aktive edildiği zaman ERK, JNK aktivasyonunu indüklemektedir. Ayrıca TGF- $\beta$ 'nin reseptöre bağlanması sonucu aktive olan p38 MAP kinaz yolağında p38 nükleusa geçerek NF- $\kappa$ B bağımlı transkripsiyon faktörlerini regüle etmektedir. Hücre döngüsünün regülasyonunda p44/42 MAPK ve p38 dengesi önemli bir rol oynamaktadır [20]. Ras onkogenleri tümörögenizde aşağı sinyal yolağını düzenlemede önemli bir role sahiptir. c-Jun JNK tarafından Ser-63 ve Ser-73'de fosforile edilmektedir.

Çoklu genomik fonksiyonel göreve sahip transkripsiyon faktörü olan NF- $\kappa$ B aracılığı ile programlı hücre ölümünü (apoptoz), hücre adhezyonu, proliferasyonu, doğal ve edinilmiş immün cevapları, inflamasyonu, hücre stres cevapları ve doku modellemesini düzenlemektedir [22, 23]. Bu genlerin ekspresyonu diğer transkripsiyon faktörleri ve sinyal yollarının aktivitesi ile sıkı bir şekilde koordine edilmektedir. NF- $\kappa$ B'nin degradasyonu ya da IKK fonksiyonunun bozulmuş olması birçok insan hastalıklarının ve kanser türlerinin oluşmasını tetiklemektedir [24]. NF- $\kappa$ B sinyal yolağı reseptör ve uyaran sinyalin farklılığına göre üç şekilde meydana gelir: klasik (standart) yolak, alternatif (standart olmayan) yolak ve alışılmadık yolak. Klasik yolda sinyal iletimi I $\kappa$ B $\alpha$  ve p65 üzerinden ilerlerken, alternatif yolda NIK ve p100 proteinleri görev almaktadır. NF- $\kappa$ B aktivasyonu, NF- $\kappa$ B'ye bağlanan ve onun inhibitörü olan I $\kappa$ B proteininin sinyal indüklü degradasyonu ile başlamaktadır. I $\kappa$ B proteininin bağlanması NF- $\kappa$ B'nin inaktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. I $\kappa$ B'nin degradasyonu sonucu NF- $\kappa$ B, hücre nükleusuna girmek

için fırsat elde etmektedir. NF-κB nukleusta transkripsiyonel regülasyonu sağlamaktadır ve apoptozdan kaçınmak için özgün genlerin ekspresyonunu başlatmaktadır [25, 26]. IKK, NF-κB sinyal yolağının aktivasyonunda ana regülatör olduğu düşünülmektedir. Çünkü NF-κB yolağını inaktive eden ve dolaylı olarak apoptozu teşvik eden IKK fosforilasyonu IKK tarafından baskılanmaktadır [27, 28]. IKK/NF-κB sinyal yolağının aktivasyonu hedef genlerin indüksiyonuna neden olarak apoptotik sürece müdahale etmektedir [29, 30].

Poliaminler memeli hücrelerde hücre büyümesi ve farklılaşmasında rol almanın yanı sıra doğrudan hücre ölümü ile de ilişkilidir. Poliamin (PA) olan putresin, spermidin ve spermin meme kanserinde hücre proliferasyonunda ciddi olarak rol oynamaktadır [31-33]. Meme kanseri hücrelerinde östradiol ve büyüme faktörleri ile dönüşen çoğalma sinyalleri ornitin dekarboksilaz indüksiyonu sayesinde PA'ler ile ayarlanmaktadır [34]. PA'ler östrojen reseptörleri ve nükleer faktör κB gibi transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girmektedir [35] ve ER-negatif proliferasyonu ve tümör hücrelerinin invazyon modellerini de kapsamaktadır [36]. PA'ler *c-myc* gibi büyümeyi düzenleyici genlerin transkripsiyonunu regüle etmektedir [37, 38]. *c-myc* onkogenin aşırı ekspresyonu ve *c-fos* gibi diğer onkogenler ODC aktivitesinin aşırı ekspresyonuna yol açarak karsinogeneze neden olmaktadır [39]. Memeli hücrelerinde PA yolağındaki artış mitokondriyel membran potansiyelinin azalışı ile korelasyon göstermektedir. Bu durum mitokondriyel sitokrom c'nin serbestlenerek caspas-8 kaskadının caspas-3'e doğru ilerlemesi ile sonuçlanmaktadır. Caspas-3 aktivasyonu endonukleazları ve proteazları aktive ederek direkt apoptoza neden olmaktadır. Ayrıca, PA'lerin artan PAO aktivitesi ve artan putresin ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seviyeleri ile mitokondriyel transmembran potansiyelini etkilediği gösterilmiştir [40, 41].

Kanser, onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin mutasyona uğraması sonucu sinyal yolaklarında değişikliklerin meydana gelmesiyle oluşan kompleks genetik bir hastalıktır [42]. Tamir edilemeyen DNA hasarı meydana geldiği zaman hücreyi ölüme götüren majör yolak programlı hücre ölümü olan apoptozdur. Apoptoz ölüm reseptör yolağı (dış) ve mitokondriyel yolak (iç) olmak üzere iki yolak üzerinden gerçekleşmektedir [43].

Curcumin (diferuloilmetan) sarı renkli bir polifenoldür ve antitümör, antioksidan ve antiproliferatif etkisi olduğundan kemoterapötik bir ajandır. Zerdeçal olarak bilinen *Curcuma longa* bitkisinin rizomundan elde edilmektedir [44]. Curcumin transkripsiyon faktörleri, sitokinler, enzimler, hücre proliferasyonu, apoptozu, büyüme faktörleri ve reseptörlerini düzenleyen genler gibi birçok moleküler hedefe sahiptir. Curcumin aynı zamanda birçok sağ kalım sinyal yolağını baskılamakta, invazyon, metastaz ve anjiyogenezi inhibe etmekte ve apoptozu teşvik etmektedir [45].

## 1.2. AMAÇ

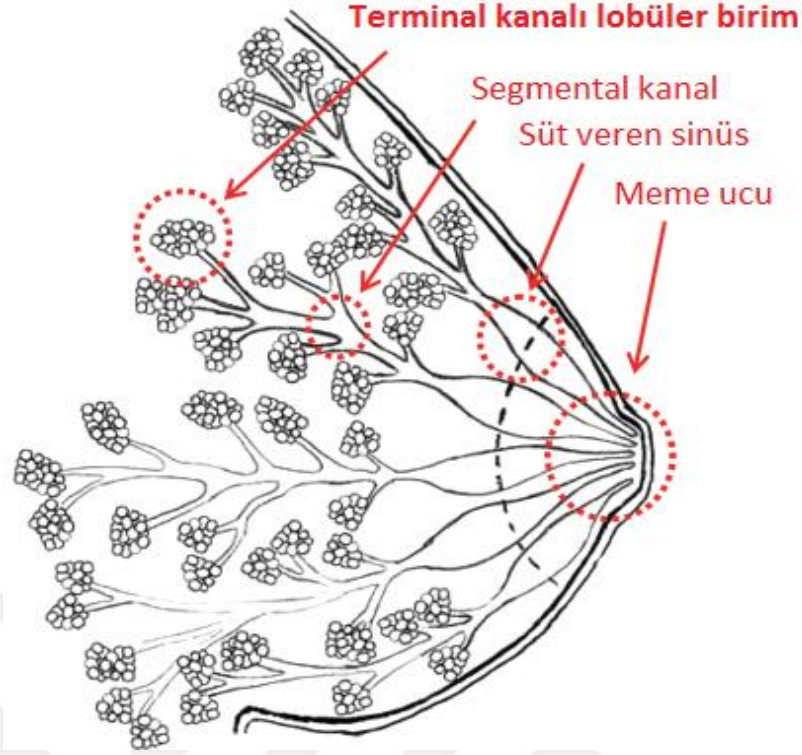
Bu tezin amacı, GH anlatımına sahip olmayan MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerine GH geni içeren PC3.1 plazmiti transfekte edilerek stabil GH anlatımı sağlayan doğal tip MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde NF- $\kappa$ B kıyaslamalı olarak curcuminin invazyon-metastaz, hücre sağkalım yolları, PA ve apoptoz yolağı üzerindeki etkisinin gösterilmesidir. Böylece kemoterapötik bir ajan olan curcuminin meme kanseri hücrelerinde hedef aldığı moleküler mekanizmaların belirlenmesi hedeflenmektedir. Curcumin ile meme kanserinde PPAR $\gamma$  ve apoptozun indüklendiğı, aynı zamanda JAK-STAT, NF- $\kappa$ B ve diğer sağ kalım yollarının baskılandığı literatürde gösterilmiştir. Bunun yanı sıra curcuminin PA biyosentez ve katabolizma enzimlerine etkisi, sağ kalım yolları ve invazyon-metastaz üzerine etkisi bu çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmanın, curcuminin meme kanseri hücrelerinde hangi moleküler mekanizmaları hedef aldığı ve gelecekte tedavide kullanılabilirliği açısından ön veri olabileceğı düşünülmüştür.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. MEME KANSERİ

Kanser Latince yengeç anlamına gelen “crab” sözcüğünden türetilmiştir. Yunanlı hekim Hipokrat bu hastalığın başladığı bölgeden diğer organlara yayılmasını gözlemleyerek bu tanılamayı yapmıştır. Kanser vücuttaki bir hücre grubunun farklılaşarak aşırı kontrolsüz çoğalması sonucu meydana gelmektedir. Kökenlendikleri doku kanser hücrelerine farklı özellikler kazandırmaktadır. Kanserlerin %85’i epitel hücrelerinden kökenlenmekte ve karsinomlar olarak adlandırılmaktadır. Kemik ve kas gibi mezoderm hücrelerinden türetilen kanserlere sarkomalar, meme gibi salgı dokularından meydana gelen kansere ise adenokarsinomalar denmektedir [46].

Meme kanserinin tanımlanmasında meme yapısından yola çıkılmaktadır. Memede salgı yapan hücreler lobül adı verilen birimleri oluşturmaktadır. Lobüller birleşerek lobları oluşturmaktadır. Lobüller birbirlerine süt kanalları ile bağlanmakta ve süt kanalları meme başına doğru birleşmektedir. Meme kanseri süt kanallarını ya da lobülleri oluşturan hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile meydana gelmektedir. Süt kanallarından kaynaklanan kansere duktal karsinoma, lobüllerden kaynaklanan kansere ise lobüler karsinoma adı verilmektedir [47] (Şekil 1).



Şekil 1. İnsan meme yapısı [46].

### 2.1.1. Meme Kanseri Epidemiyolojisi

Her gün binlerce kadına dünya çapında meme kanseri teşhisi konmakta ve ölümlere sebep olan bir kanser türü olarak belirtilmektedir. Dünyada kadınlarda en sık görülen meme kanseri 2012'de yaklaşık 1,7 milyon durum ve 521.900 ölüm olarak belirlenmiştir. Meme kanseri tüm kanserin %25'ini ve tüm kanser türlerindeki ölümlerin %15'ini oluşturmaktadır. Gelişmiş ülkelerde meme kanseri vakalarının yarısı ve ölümlerin de %38'i olarak görülmektedir. Genellikle vakaların görülme oranları Kuzey Amerika, Avustralya/Yeni Zelanda, Kuzey ve Batı Avrupa'da oldukça yüksek; Orta ve Doğu Avrupa, Latin Amerika ve Karayip'de orta düzey; Afrika ve Asya'da ise düşüktür [48].

GLOBOCAN verilerine göre meme kanserinin görülme sıklığı vakaları 2012 yılında dünyada 1.671.149 ve Türkiye'de 15.230 olarak belirtilmiştir. 2015 yılı tahmini verilere göre dünyada görülme sıklığı vakaları 1.790.861 ve Türkiye'de 17.034 olarak verilmiştir. Meme kanserinden ölüm vakaları 2012 yılında dünyada 521.907 ve Türkiye'de 5.199 olarak belirtilmiştir. Ölüm vakaları 2015 yılı tahmini verilere göre dünyada 560.407 ve Türkiye'de 6.023 olarak belirtilmiştir. 2015



tahmini verilerine göre görülme vakaları dünyada 1.242.801 ve Türkiye’de 13.466 kişi 65 yaş altında bulunmaktadır. 65 yaş altında görülen vakalardan dünyada 329.680 ve Türkiye’de 3.950 kişinin ölümü ile sonuçlanmaktadır.

Meme kanserinde erken teşhis konması daha gelişmiş ülkelerde, az gelişmiş ülkelere göre daha fazladır [48]. Gelişmiş ülkelerde bu durumun fazla olması tarama yapılmasına bağlıdır ve tarama ile meme kanserini erken evrelerde yakalamak ölümü ve hastalıklı olmayı azaltmaktadır [2]. Mamografik tarama hiçbir belirti olmadan, meme kanserini erken evrede tanılamak için kullanılan en etkili yöntemdir [49]. Erken tanı tümörün büyüklüğü açısından ve hayatta kalmak için önemlidir. Çünkü bazı meme kanserlerinin lenf düğümlerine invazyon yapma olasılığı vardır [50].

Meme kanserindeki ölüm oranı 1975 ile 2010 yılları arasında %34 azalmıştır. Tüm bunlara karşın meme kanserinin görülme sıklığı %30 artmış ve 1975 ile 2002 yılları arasında hayatta kalma oranı %28 arttığı tahmin edilmektedir. Meme kanserinin görülmesindeki artış, eski yıllarda veri eksikliğine bağlı olmasının yanı sıra yakın zamanlarda risk faktörlerinin daha artmasından kaynaklanmaktadır. Ölüm oranının azalması ve hayatta kalma oranının artması, tarama ile erken evrelerde meme kanserinin yakalanması ve tedavinin doğru uygulanması ile açıklanabilir [51].

### **2.1.2. Meme Kanseri Etiyolojisi**

Meme kanserinin görülme sıklığı çoğu ülkede tarihsel oranlara bağlı olarak artmaktadır [52]. Tarihsel süreci oluşturan durumlar meme kanserinde aile öyküsü ve yaşa bağlı risk [53] olmakla birlikte kalıtsal genetik mutasyonların olmasıdır. Meme kanserinde rol oynayan en önemli genlerden BRCA1 ve BRCA2 tümör baskılama genlerinin mutasyonu genel popülasyondaki oranı arttırmaktadır [54]. BRCA1 geni bulunan meme kanseri hücrelerinde yaklaşık %75 oranında ER-negatif ve bununla birlikte bazı meme kanseri hücrelerinde %25 oranında ER-pozitif olduğu görülmektedir. Genel popülasyonda ise BRCA2 geni bulunan meme kanseri hücrelerinde %75 oranında ER-pozitif ve %25 oranında da ER-negatif bulunmaktadır [55]. BRCA1 ve BRCA2 meme kanserleri onların hormon reseptörlerinden farklıdır. Steroidlerin, özellikle östrojen normal meme bezlerinin farklılaşmasında ve büyümesinde ana düzenleyici olması ile meme karsinomalarının gelişmesinde ve ilerlemesinde etkili olduğu düşünülmektedir [56].

BRCA1 mutasyonu çoğunlukla üçlü-negatif (ER, PR ve HER2 negatif) meme kanserlerinde görülmektedir ve bu durum metastaz potansiyelini de oluşturmaktadır [50]. Erken yaşta doğum yapmak ve anne sütü ile besleme eksikliği bazal kanserler yani üçlü-negatif ve BRCA1 için yüksek risk oluşturmaktadır [57, 58]. Menopoza geçişin ER pozitif meme kanserini, ER negatif meme kanserinden daha fazla etkileyerek görülme oranını değiştirmesi, tahminsel olarak hormon patogenezinin duyarlı kanserlerde büyük rol oynayan cinsiyet steroid hormonları ile ilişkisi gösterilmiştir [59]. Ancak bunlara karşın menopozun ER negatif kanserler üzerindeki etkisi ER pozitif kanserlerden daha büyüktür [60].

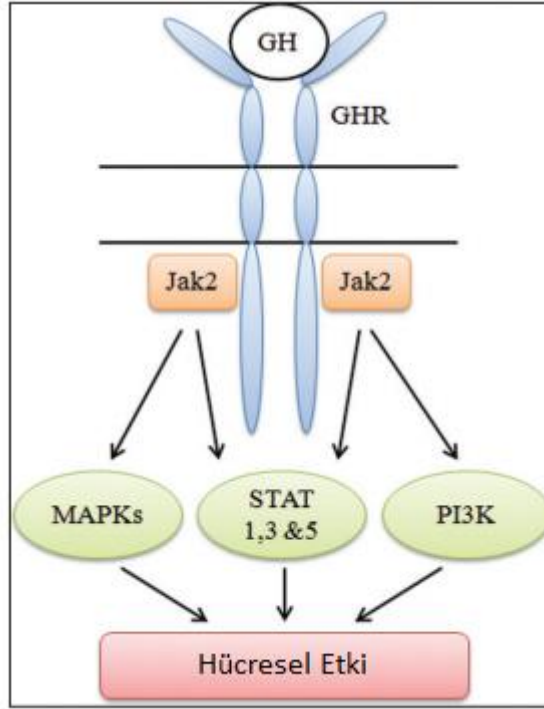
Obezite kolesterol metabolizmasına bağlı olarak yaş ve ER durumu meme kanserinde etkili diğer bir risk faktörüdür [61]. Obezite, hormon reseptörü-negatif kanserlerden daha çok hormon reseptörü-pozitif kanserler ile sıkı bir ilişki içerisindedir [62] ve bu da bazal, üçlü-negatif ve iltihaplı meme kanseri riskini arttırmaktadır [63, 64]. Vücut ağırlığı menopoz sonrası dönemde meme kanseri ile direkt ilişkilidir ve menopoz öncesinde de kanser ile ters bir ilişki içerisindedir [65]. Menopoz sonrası şişmanlık hormon reseptör-pozitif tümörlerde, hormon reseptör-negatif tümörlere göre daha risklidir ve şişmanlık, insülin direnci ve artan insülin konsantrasyonu ile ilişkili olarak meme tümörlerinde mitojenik etkiye sahiptir [66].

## **2.2. BÜYÜME HORMONU**

Büyüme hormonu (GH) insanda büyüme ve gelişimde rol almaktadır. GH fizyolojik sistemlere ve bazı organlara etki eden anabolik bir hormon olmasıyla birlikte karbonhidrat, protein ve lipit metabolizmasını düzenlemektedir [67]. GH-serbestleyen hormon (GHRH) teşviki ile GH, ön hipofiz bezinde somatotrof hücrelerinde üretilerek saklanmaktadır ve kana salgılanmaktadır [4]. GH fazla salgılanması akromegali hastalığına neden olurken, az salgılanması cüceliğe sebep olduğu gösterilmiştir. Anormal GH salgılanması akromegali hastalarında şeker hastalığı ve konjestif kalp yetmezliği riskinin artmasının [5] yanı sıra kolon, tiroid ve potansiyel olarak meme kanseri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [6]. Çeşitli klinik gözlemler ve deneysel çalışmalar büyüme hormonu dahil olmak üzere hipofiz hormonlarının insan meme kanseri gelişimde rol oynadığını göstermektedir. Kanser

hastalarının serumlarında GH seviyesi değerlendirilerek mide, kalın bağırsak [7], akciğer [8] ve meme kanseri [9] hastalarında hormon seviyesinin arttığı gösterilerek desteklenmiştir.

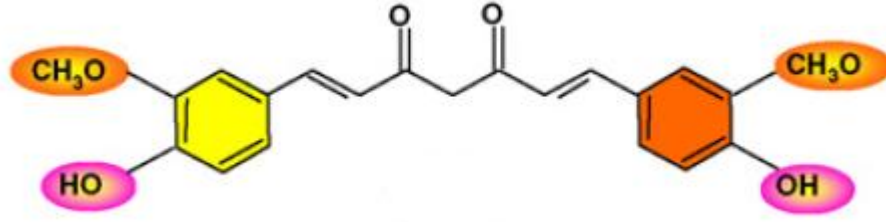
İnsan büyüme hormonu (GH) 191 amino asitli peptid hormondur ve prolaktinleri de içeren evrimsel açıdan oldukça büyük bir ailenin üyesidir [68]. 17. kromozomun uzun kolunda bulunan GH 5 gene ile ilişkilidir ve bunlardan sadece *GH-N* geni ön hipofiz bezinden transkribe edilmektedir [69]. Ön hipofiz bezinden otokrin ve parakrin olarak da salgılanan endokrin GH meme dokusu, merkezi sinir sistemi, immun sistem ve akciğer hücrelerinde tespit edilmiştir [70]. Otokrin GH bazı insan malig tümörleri ile ilişkili olup özellikle de meme karsinomaları ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir [71]. GH metabolik aktivitesini oldukça fazla eksprese edilen büyüme hormonu reseptörü (GHR) aracılığı ile gerçekleştirmektedir. Tip I sitokin reseptör ailesine ait olan GHR bir glikoprotein transmembranıdır ve GHR geni 5. kromozomun kısa kolunda yer almaktadır [72]. GHR, GH yokluğunda hücre membranında önceden dimer oluşturur [73]. GH, GHR'ye bağlanarak reseptör dimerizasyonu ile GHR konformasyonel değişikliğe uğramaktadır ve birçok GH metabolik aktivitesine aracılık eden insülin-benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) serbestlenmesini teşvik etmektedir [74]. GHR tarafından reseptör olmayan tirozin kinazlardan Janus kinaz 2 (JAK2) kullanılmaktadır. GH bağlanması ile konformasyonel değişikliğe uğrayan GHR, JAK2 moleküllerini yakına getirir ve fosforilleyerek aktivasyonunu sağlamaktadır. Aktive olan JAK2 bazı tirozin residülerini ve GHR'yi fosforillemektedir. JAK2 bazı sinyal molekülleri ve transkripsiyon faktörleri için özellikle de sinyal ileten ve transkripsiyon proteinlerinin aktivatörü (STAT'lar) için Src homoloji 2 (SH2) domainine sahiptir [75]. GH sinyalindeki JAK/STAT yolağına STAT5a ve b majör olarak katılmaktadır. JAK/STAT yolağına ek olarak GH sinyali, hücre dışı sinyal-düzenleyen kinazlar (ERK), c-Jun N-terminal kinazlar (JNK) ve p38 MAPK içeren mitojen-aktif protein kinaz (MAPK) yolağı ve fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) yolağını meydana getirmektedir [72] (Şekil 2).



Şekil 2. Büyüme hormonu sinyalinin hücre içi yolağı [72].

### 2.3. CURCUMİN

Curcumin (diferuloilmetan) sarı renkli bir polifenoldür ve antitümör, antioksidan ve antiproliferatif etkisi olduğundan kemoterapötik bir ajandır. Zerdeçal olarak bilinen *Curcuma longa* bitkisinin rizomundan elde edilmektedir. Uzun ömürlü olan *Curcuma longa* bitkisi kimyasal olarak curcumin bileşenleri ile ilişkili curcuminoidleri içermektedir. Curcuminin suda çözünürlüğü azdır fakat dimetil sülfoksit (DMSO), etanol, metanol ve aseton gibi organik çözücülerde kolay çözünmektedir. Moleküler formülü  $C_{21}H_{20}O_6$  olan curcuminin moleküler ağırlığı 368,37 g/mol' dür [44]. Curcuminin ilk izolasyonu 1815 yılında yapılmıştır ve 1870 yılında da kristal formu elde edilerek diferuloilmetan olarak isimlendirilmiştir [76, 77] (Şekil 3).



**Şekil 3. Curcuminin kimyasal yapısı [44].**

Çoğu kanser türünde transkripsiyon faktörlerini aktive edici protein (AP)-1, nüklear faktör kappa B (NF-κB), sinyal üreten ve transkripsiyonu aktive eden (STAT)-3, β-catenin, erken büyüme cevap geni (EGR)-1, hipoksi indükleyen faktör (HIF)-1 ve Notch-1 regülasyonu fazla olmaktadır. Bu durum hücre proliferasyonu, invazyon, metastaz, anjiyogenez, kemoterapiye ve radyoterapiye dirençten kaynaklanmaktadır [44]. Curcumin transkripsiyon faktörleri, sitokinler, enzimler, hücre proliferasyonu, apoptozu, büyüme faktörleri ve reseptörlerini düzenleyen genler gibi birçok moleküler hedefe sahiptir. Curcumin aynı zamanda birçok sağ kalım sinyal yolağını baskılamakta ve MMP-9 üzerinden hücrelerde invazyon, metastaz ve anjiyogenezi inhibe etmektedir [45]. Tümör ilerlemesinde majör rol oynayan ve meme kanserinde eksprese edilen östrojen reseptörü (ER), curcumin ile hem ER-pozitif hem de ER-negatif hücrelerde proliferasyon inhibe edildiği gösterilmiştir [78]. Meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde aşırı eksprese edilen HER2 curcumin ile baskılandığı gösterilmiştir [79]. Tümör oluşmasını ve ilerlemesini tetikleyen GH, curcumin ile baskılandığı belirlenmiştir [80]. Curcuminin STAT3 aktivasyonu, STAT1 fosforilasyonu ve JAK2 fosforilasyonunu inhibe ettiği belirlenmiştir [81]. Hücre sağ kalımını baskıladığı belirlenen curcumin NF-κB fosforilasyonunu ve iltihap gen ürünlerini baskıladığı gösterilmiştir [82]. Apoptoz inhibitörleri olarak sınıflandırılan kaspaz-3, -7 ve -9 curcumin ile inhibe edildiği belirlenmiştir [83].

## **2.4. HÜCRE SAĞKALIM SİNYAL YOLAKLARI**

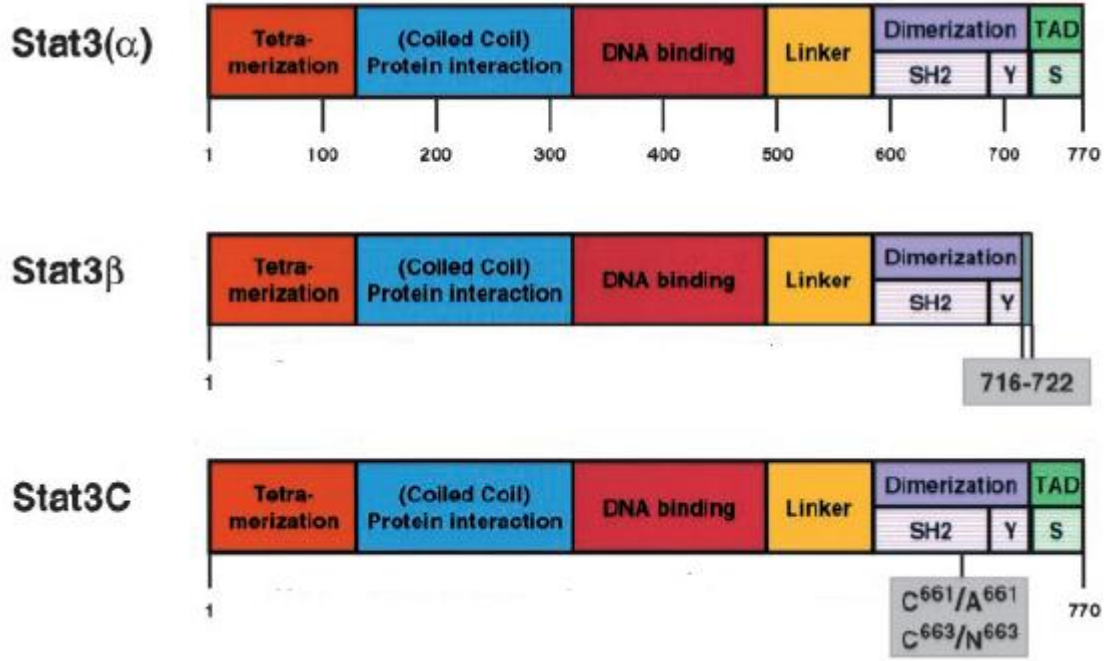
### **2.4.1. JAK-STAT Sinyal Yolağı**

Memeli hücrelerinde belirlenen sinyal ileten ve transkripsiyonu aktifleştiren (STAT) ailesi proteinleri STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b ve STAT6 olmak üzere yedi üyeden oluşmaktadır [84]. STAT ailesi, genellikle hücre

yüzeyinde üretilen reseptörler aracılığı ile sitoplazmik transkripsiyon faktörlerini içeren sinyalleri STAT'ların spesifik DNA promotör bölgelerine bağlayarak nukleusa iletmekte ve gen ekspresyonunu düzenlemektedir [85, 86]. STAT sinyal yolağı normal hücrelerde embriyonik gelişim, organların oluşum ve işlevleri, doğuştan ve sonradan kazanılan immün sistem fonksiyonları, hücrelerin farklılaşması, büyümesi ve apoptozda önemli bir role sahiptir [10, 87]. STAT sinyallerinin sürekli aktif olması özellikle STAT1, STAT3 ve STAT5'in aktivasyonu çeşitli insan tümör hücrelerinde görülmekte ve solid (katı) tümör olan meme kanserinde özellikle STAT1, hücre büyümesini düzenleyen STAT3 sinyal yolları sürekli aktiftir. STAT3 ve STAT5'in sürekli aktivasyonu, apoptozu önleyerek veya hücre çoğalmasını teşvik ederek ya da her ikisini birden yaparak insan kanserlerinin gelişimine ve ilerlemesine katkıda bulunmaktadır [11]. Ancak STAT1 hücre büyümesini baskılayarak malign hücrelere dönüşümü engellediğinden STAT1'in potansiyel olarak tümör baskılayıcı olduğu düşünülmektedir ve bazı tümörlerde STAT1'in aktivasyonunun yükselmesi bu mekanizmaya bağlıdır [88].

STAT proteinlerinin her biri fonksiyonel farklılıklara sahip olsa da STAT1, STAT3 ve STAT4'ün NH<sub>2</sub> ucu yapısal özellik olarak aynıdır. STAT'ların NH<sub>2</sub>-ucu protein-protein etkileşimini sağlayarak tetramerik STAT molekülünü oluşturmakta ve bu yapı promotör bölgesinde zayıf olan DNA-bağlanma aktivitesini sağlamlaştırmaktadır [89]. COOH-ucunda SH2 domaini STAT'ların reseptörleri fosforillemesi ve dimer oluşumunu sağlayan monomerik STAT'lar arasında karşılıklı SH2 fosfotirozin etkileşimleri için gereklidir [90]. Tirozin (Y) residüleri SH2-fosfotirozin (STAT3'de 705. aminoasit) etkileşimleri için gerekli olduğundan STAT aktivasyonu SH2 domaini yakınında olmaktadır. TAD (transkripsiyonel aktivasyon domaini), COOH-ucunda bulunan Stat1 ve Stat3'de serin (S, STAT3'de 727. aminoasit) fosforilasyon bölgesini içeren transkripsiyon kompleksleri ile iletişimde olan bir bölgedir. Ayrıca STAT'ların maksimum düzeyde transkripsiyonel aktivitesi için de serin fosforilasyonu gereklidir [91]. STAT3 tirozin kinazların 705. pozisyonu fosforilasyonu epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) ve trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü (PDGFR) içeren intrinsik tirozin kinaz aktivitesi ile ilişkilidir. MAPK (p38MAPK, ERK, JNK) ve mTOR sinyal yolları serin kinazlardan 727.pozisyonunun fosforilasyonu için STAT3'ün maksimum transkripsiyonel aktivitesine gerek duyar

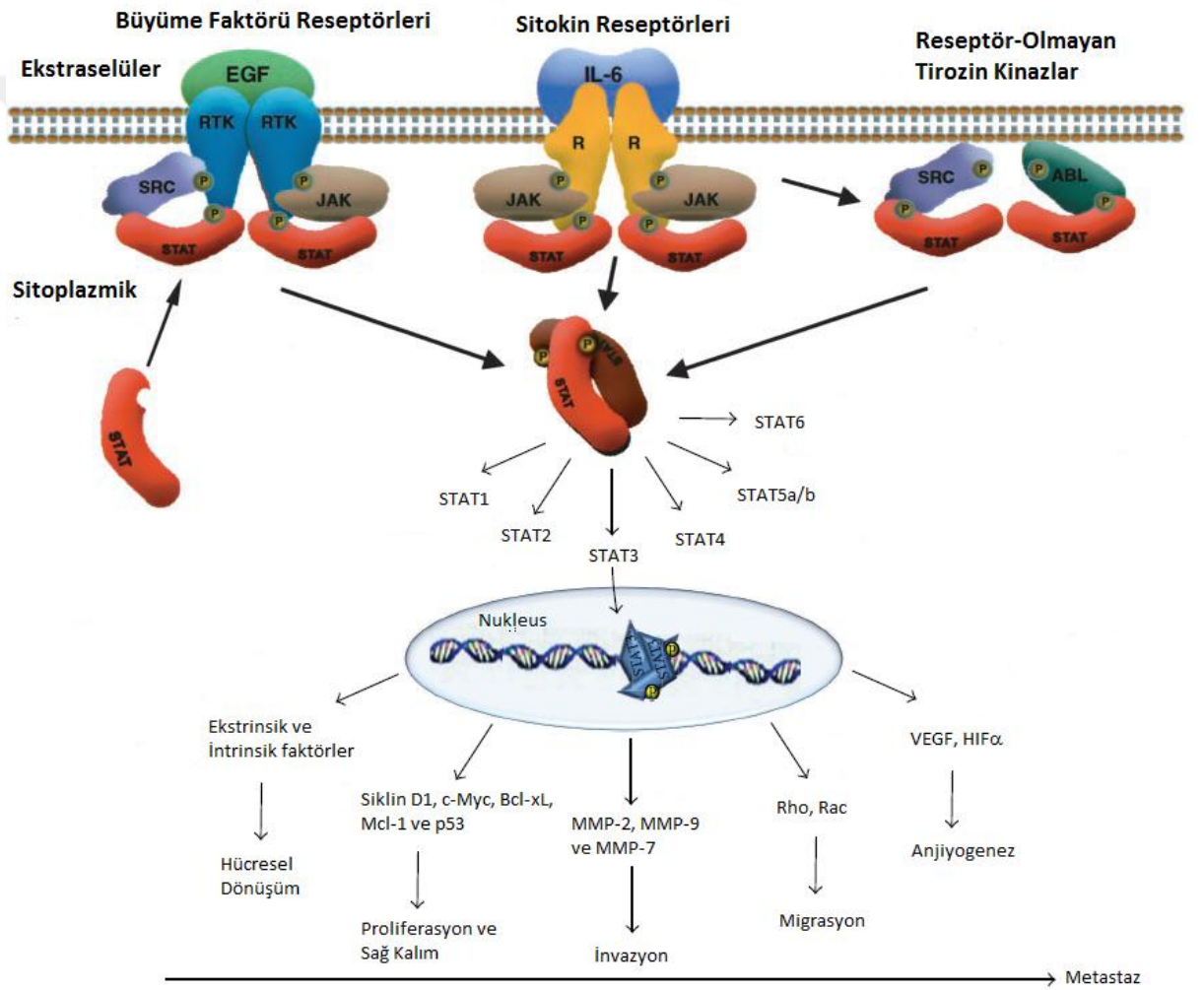
[92]. STAT3 alt birimlerinden STAT3 $\alpha$  tam-uzunluğa sahiptir, STAT3 $\beta$  COOH-ucu kesilmiş çeşidi ve STAT3C tirozin fosforilasyonu olmadan sürekli aktif formudur (Şekil 4).



Şekil 4. STAT3 proteini alt birimlerinin moleküler yapısı [93].

STAT sinyal yolağında hücre yüzeyinde bulunan aynı kökenli sitokin reseptörlerine ligand bağlanması ile reseptörler dimerize olur ve JAK gibi reseptör ilişkili tirozin kinazlar aktive olarak reseptörün sitoplazmada bulunan kısmı fosforillenir [84]. Sitokin reseptörlerine alternatif olarak intrinsik tirozin kinaz reseptörleri, büyüme faktörü ya da EGF (epidermal büyüme faktörü) reseptörleri gibi, reseptörün sitoplazmik kuyruğunda otofosforillenir [11, 86]. Bazı durumlarda da Src ailesinin bulunduğu reseptör-olmayan tirozin kinazlar STAT aktivitesine katılır [94]. Fosforillenmiş tirozin reseptörleri sitoplazmada bulunan monomerik STAT proteinlerini SH2 domaininde eşleşmelerini sağlar ve böylece STAT dimerleri oluşur. Bu dimerler dakikalar içerisinde nukleusa giderek transkripsiyonel faktörler ile etkileşime girer, onların spesifik promoter sekanslarına bağlanır ve gen ekspresyonunu indükler [86, 90]. Normal hücrelerde STAT aracılı gen regülasyonu hem geçici hem de daha sıkı düzenlenirken onkogenlerde özellikle STAT3 ve STAT5'in sürekli aktivasyonu temel hücrel süreçleri kontrol eden genlerin ekspresyonunda kalıcı değişiklikler yapmaktadır. Onkogenlerde STATlar apoptoz

inhibitörlerinin (Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1), hücre döngüsü düzenleyicilerinin (siklin D1/D2, c-Myc) fazla-regülasyonuna katılır ve anjiyogenez (VEGF) indükleyici olarak rol oynar [93]. Hücre döngüsünde G1 fazının redülasyonu için c-Myc ve siklin D1 gereklidir ve STAT3 c-Myc ve siklin D1 ekspresyonunun artması ile ilişkilidir [95]. Kanser hücrelerinde STAT3 sinyalleri apoptozu baskılaması ve sağ kalımı indüklemesi Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Mcl-1 ve p53 ekspresyonuyla ilişkilidir [96]. Ayrıca STAT3 matris metalloproteinazların (MMP'ler) aktivitelerini düzenleyerek invazyonu başlatmakta ve tümör büyümesi ile metastaz basamaklarında rol almaktadır [97] (Şekil 5).



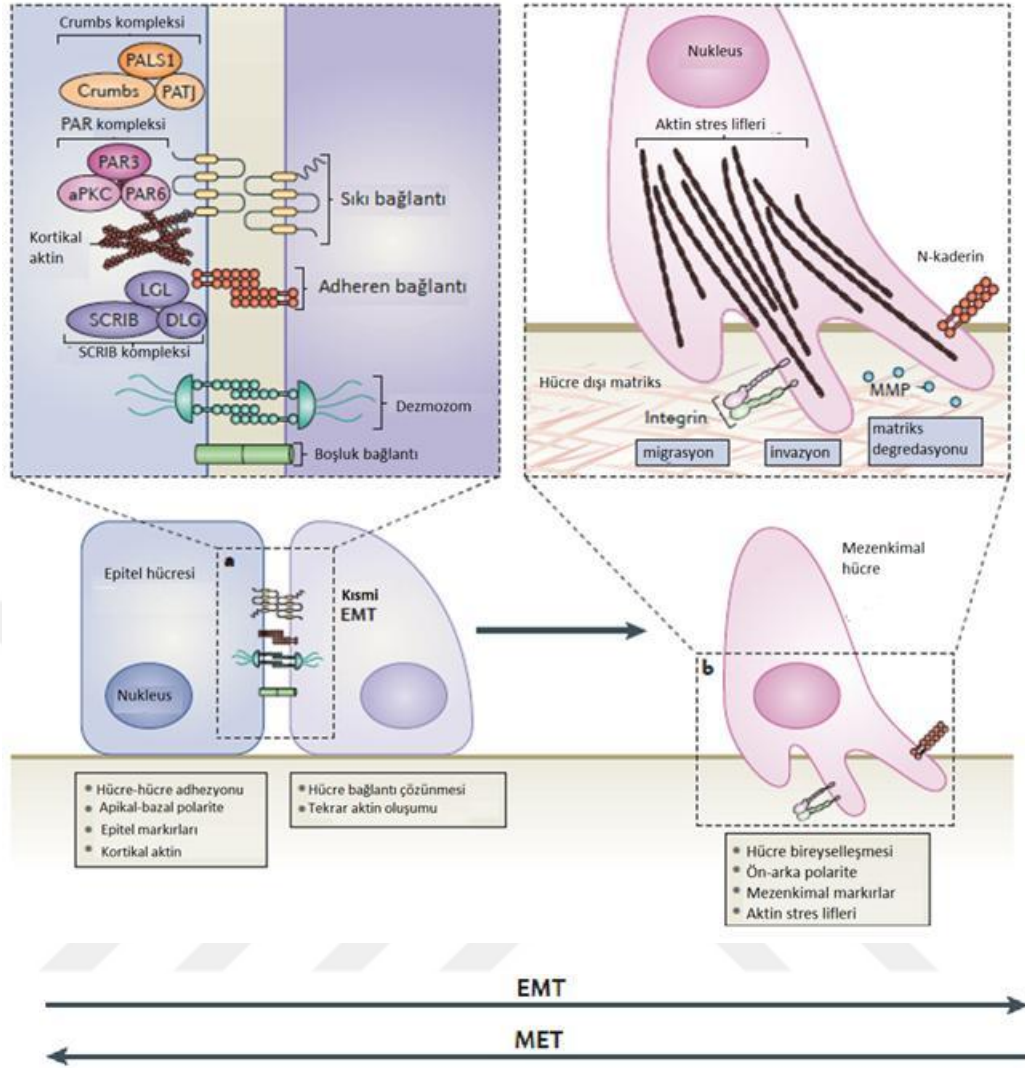
Şekil 5. Normal ve onkogenik STAT sinyal yolağı [92, 93].



## 2.4.2. İnvazyon ve Metastaz

### 2.4.2.1. Epitel-Mezenkimal Geçiş (EMT)

Epiteller ya tek katlı hücrelerden ya da çok katlı dokulardan oluşmuş ve çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Epitel hücreler integrinler ile etkileşim halinde olduklarından onların fizyolojilerini belirleyen membrana yerleşmiş olup, apikal-bazal polarite özelliğinde, hücre içi bağlantılara tutunan ve onlarla iletişim halinde olan hücrelerdir. Epitel hücrelerin, hareket edebilen mezenkimal hücrelere farklılaşması epitel-mezenkimal geçiş (EMT) olarak bilinmektedir ve bu sürecin tersi mezenkimal-epitel geçiş (MET) olarak tanımlanmıştır [14]. EMT, gelişimi ve yeniden yara iyileşmesini düzenlemekle birlikte fibrosis ve kanser ilerlemesini de sağlamaktadır [12, 13]. EMT'nin başlamasını ve ilerlemesini kontrol eden sinyal yolağı ve gen ekspresyonları değişikliğe uğramaktadır. Dokulara ve sinyallere bağlı olarak epitel hücreler bazı karakteristik özelliklerini kaybedebilmekte, epitel gen ekspresyonları azalmakta ve mezenkimal özellik gösterebilmektedir [14]. EMT sırasında epitel hücreler bağlantılarını ve apikal-bazal polaritesini kaybederek hücre iskeleti tekrar oluşmakta ve hem gen ekspresyonunu tekrar düzenleyen hem de hücre şeklini belirleyen sinyal programları değişikliğe uğramaktadır. Bu durum bireysel hücrelerin hareketliliğini artırarak invaziv fenotipin ve göçün gelişmesini sağlamaktadır [12, 98]. Bazı durumlarda da hücre dışı matriks (ECM) proteinleri parçalanarak invaziv davranışı başlatmaktadır. Böylece hücreler EMT'ye uğrayarak senesens ile apoptoza dirençli hale gelmektedir [99] (Şekil 6).



Şekil 6. Hücrenin EMT-MET geçişi [14].

EMT boyunca sıkı bağlantıların çözünmesine claudin ve occludin ekspresyonlarının azalması da eşlik etmektedir [15]. Yapışık bağlantıların istikrarsızlığı sürecinde epitel kaderin (E-kaderin) plazma membranından ayrılarak degrade olmaktadır [100]. Sonuç olarak  $\beta$ -catenin E-kaderin ile daha fazla etkileşim kuramaz ve buna bağlı olarak ya degrade olur ya da degradasyondan kaçarak transkripsiyonda rol almaktadır [101]. Catenin proteinleri nükleusta birikerek transkripsiyona katılmaktadır ve böylece E-kaderin seviyesi düşmektedir [102]. E-kaderinin azalmasına bağlı olarak mezenkimal nöral kaderin (N-kaderin) ekspresyonunun artması ile denge sağlanmaktadır [103].

#### 2.4.2.2. Matriks Metalloproteinaz (MMP)

Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) yapısal olarak çoklu gen ailesine aittir ve fonksiyonel olarak endoproteinazlar ile ilişkilidir [104]. MMP'ler katabolik enzim olarak kabul edilmektedir ve inaktif formda prozimojen olarak sentez edilmektedir. MMP'ler kollojenazlar, MMP-2 ve MMP-9'un dahil olduğu jelatinazlar, stromelisinler, matrilisinler ve membran-ilişkili MMP'ler şeklinde alt gruplara ayrılmaktadır [105]. MMP'lerin temel rolü tümör hücrelerinde migrasyon ve metastaz sürecinde kollojen, jelatin, fibronektin, vitronektin ve laminin gibi tüm ECM içeriklerinin parçalanmasını sağlamaktadır [106]. Ek olarak tümör hücrelerinde MMP'ler invazyon, metastaz, anjiyogenez, epitel-mezenkimal geçiş, inflamasyon ve kanser için immün sisteme cevap vermede görev almaktadır [105].

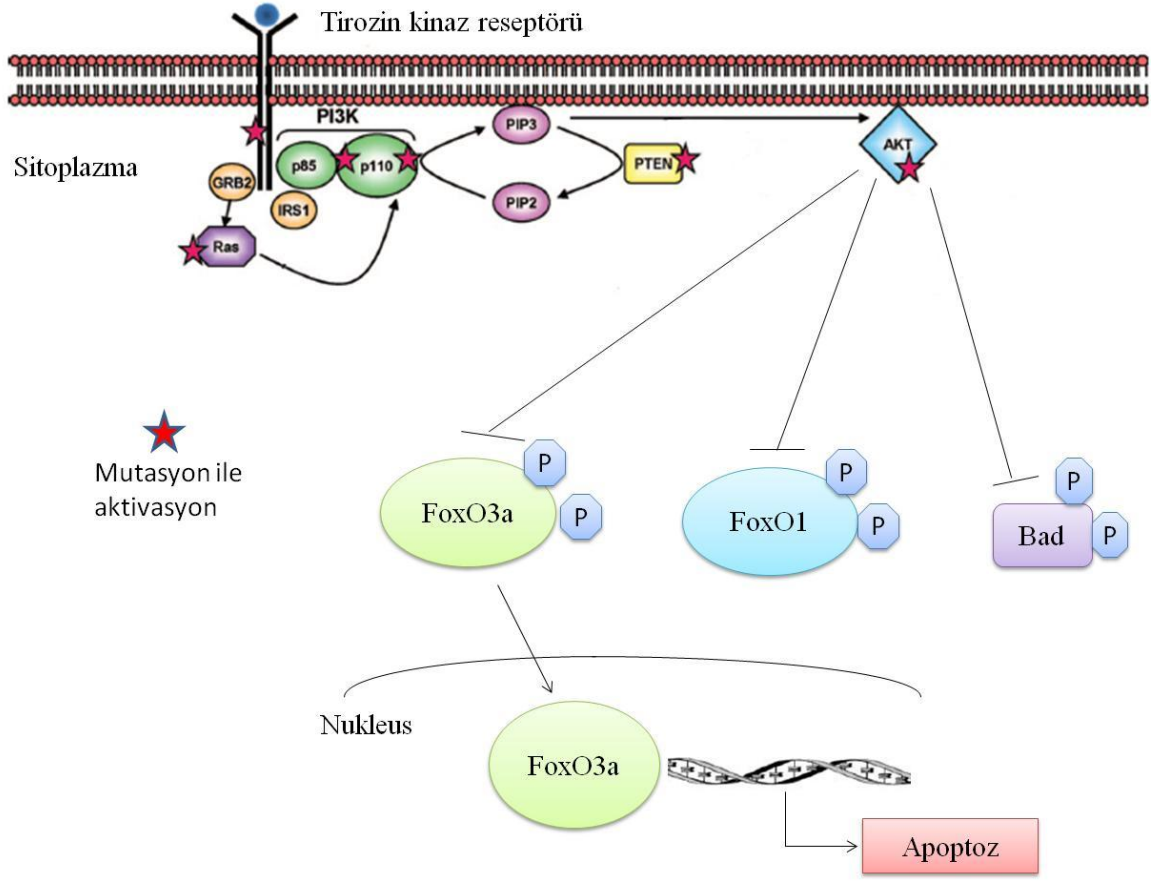
MMP-2 meme tümörlerinde stromal hücrelerden salgılanırken MMP-9 hem stromal hücrelerde hem de kanser hücresi membranlarında bulunmaktadır [107]. Meme kanser hücresinin büyümesinde MMP'lerin katıldığı bazı mekanizmalar vardır: TGF $\alpha$  gibi bazı büyüme faktörlerinin serbestlenmesi [106], bağlanma proteinlerinin degradasyonu ile büyüme faktörlerinin artması [108], integrinler ile büyüme sinyallerinin düzenlenmesi, hücre sağ kalımı ve kanser hücrelerinin apoptoza uğramasının inhibisyonu ve büyüme faktörü reseptörlerinin aktivasyonu [104]. İntegrin değişimleri EMT boyunca matriks metalloproteinaz MMP-2, MMP-9 gibi proteazların artan ekspresyonları ile korelasyon göstermektedir. MMP'ler E-kaderin hücre dışı domainin serbestlendiği bazı transmembran proteinleri hedeflemektedir. Bundan dolayı yapışık bağlantıların kaybına katkı sağlamaktadır [109]. MMP-9 hücre sağ kalımını başlatmasına ve apoptozu inhibe etmesine rağmen hücre gelişimi sırasında hücre ölümünü indüklemektedir [110]. MMPler, ECM'lerin ayrılarak endotel hücreleri ele geçirmesi ve ECM kaynaklarından serbestlenen bazı büyüme faktörlerinin teşvik edilmesi ile vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi majör anjiyogenezi başlatmaktadır [111]. MMP-9 VEGF gibi pro-anjiyogenik ajanların biyokullanımını düzenleyerek arttırmaktadır [112].

Genellikle metastaz MMP'ler ve metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP'lar) ekspresyonu ile ayarlanmaktadır [113]. Gelişim ve doku yenilenmesi sırasında eksprese edilen metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMP'lar) matriksinlerin spesifik inhibitörleridir ve dokularda MMP'lerin lokal aktivitelerini

kontrol etmektedir [114]. TIMP1 spesifik olarak MMP-2 inhibitörü iken TIMP2 MMP-9 inhibitörü olarak bilinmektedir. TIMP2 fibroblast büyüme faktörü ile indüklenen endotel hücre büyümesini inhibe etmektedir [115]. TIMP1 ve TIMP2 antiapoptotik aktiviteye sahip olmasıyla birlikte TIMP2 mezenkimal büyümeye katılması sebebi ile TIMP1 ve TIMP2'nin aşırı ekspresyonu tümör büyümesine neden olmaktadır [115-117].

### **2.4.3. PI3K/AKT Sinyal Yolağı**

PI3K yolağı hücre proliferasyonu, farklılaşma, hücre sağ kalımı ve hücrel metabolizma gibi farklı hücrel fonksiyonları sağlamaktadır. PI3K yolağı kanser metabolizmasında ve tümör büyümesinde hedef alınan en önemli yolaklardan biridir. Reseptör aktivasyonu ile p110 üzerinde inhibitör etkisi olan p85 uzaklaşır ve böylece PI3K aktivasyonu gerçekleşir. Aktifleşen kinaz fosfatidilinositol bifosfatın (PIP2) fosfatidilinositol trifosfata (PIP3) fosforilasyonunu katalizler. PIP3 Akt için yerleştirme bölgesi rolü oynar. Bu bölge de PI3K yolağının merkezi aracısı olan serin/treonin kinazdır. Hücre plazma membranında lokalize olan Akt önce fosforillenir ve mTOR aracılığı ile protein sentezi ve hücre büyümesini teşvik eder [118]. Fosforillenen Akt sitoplazmada Bad ve FoxO fosforilasyonunu inhibe eder ve FoxO3a'yı sitoplazmada tutar. Fosforillenmiş FoxO3a sitoplazmada p21 artışına sebep olarak hücre döngüsünü durdurur. Sağ kalım faktörleri olmadığında FoxO3a defosforillenir ve nukleusa geçerek hücre ölümünü Fas ligand-bağımlı yolak üzerinden tetikler [119] (Şekil 7).



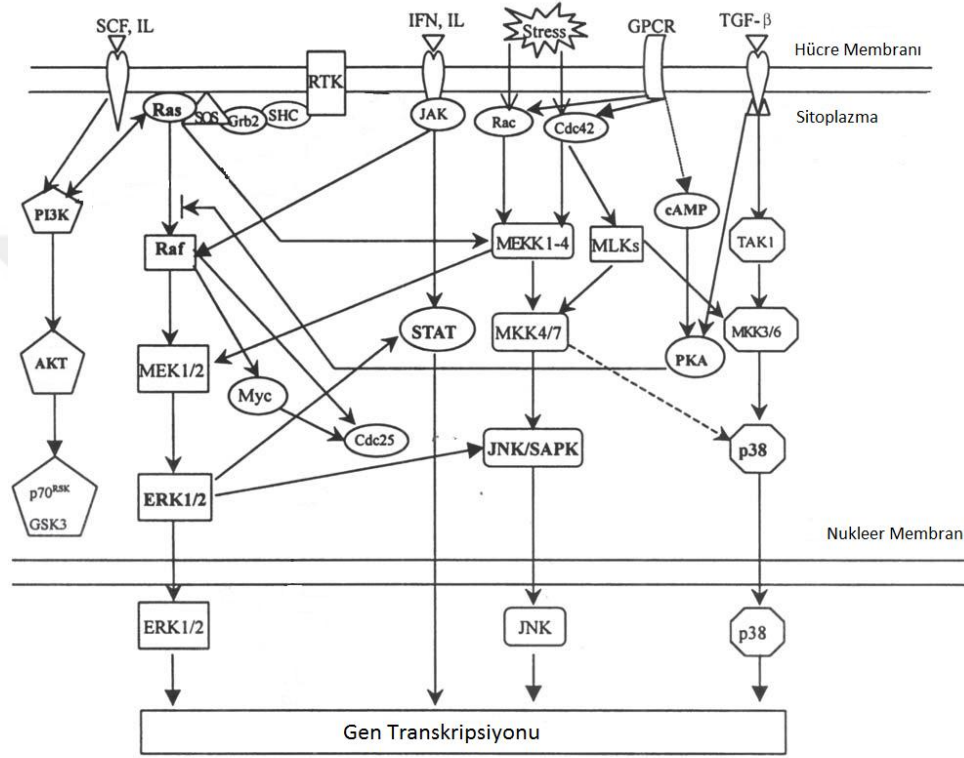
Şekil 7. PI3K sinyal yolağı [değiştirilmiştir: [118]].

#### 2.4.4. MAPK Sinyal Yolağı

Memeli hücrelerinde MAPK ailesi hücre proliferasyonu, hücrelerin farklılaşması, hücre gelişimi, transformasyon, inflamasyon cevapları ve apoptoz gibi kompleks hücresel programlarda önemli rollere sahiptir. Hücre dışı düzenlenmiş-sinyal kinaz (ERK), c-Jun N-terminal kinaz/aktif-stres protein kinaz (JNK/SAPK) ve p38 MAPK olmak üzere üç tane MAPK ailesi belirlenmiştir [20]. Bu üç majör MAPK yolağı insan dokularında mevcuttur fakat ERK1/2 meme kanseri ile daha fazla ilişkilidir. Çeşitli büyüme faktörü, steroid hormon ve G protein reseptör aracılı ligandlar ile indüklenen sinyal trafiklerinden, peptid büyüme faktörleri gibi rol oynayan tirozin kinaz içeren reseptörler ERK1/2'nin majör regülatörleridir. MAP kinaz hücre dışı düzenlenmiş kinaz ve ERK1/2 izoformu olduğu için ERK olarak da isimlendirilmiştir [99].

Üç majör MAPK kaskadı memeli hücrelerinde diğer ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde mevcuttur. Memelilerde birinci kaskad, sekansta başlatıcı kinaz olarak

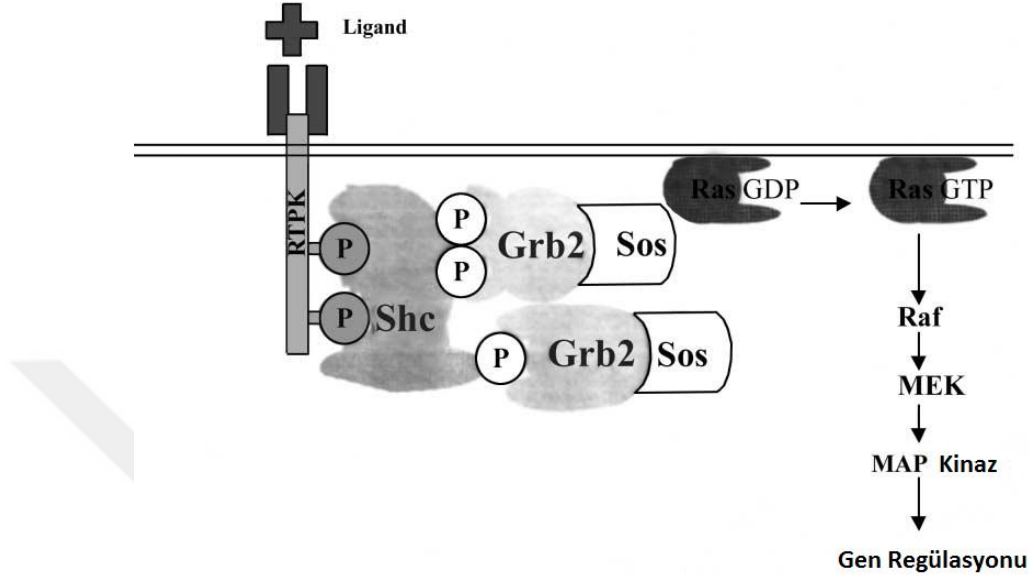
Raf-1'i içermektedir (MAPKKK), ikinci kinaz MEK-1 ve MEK-2 (MAPKK), üçüncü kinaz ise ERK-1 ve ERK-2 (MAPK) olarak devam etmektedir. İkinci kaskad, c-Jun N-terminal kinaz/aktifleşmiş stres protein kinazı (JNK/SAPK) aktivasyonu ve üçüncü kaskad da p38 MAP kinazı içermektedir. Diğer sistemlerde ise MAP kinaz kaskadları ozmatik değişiklikler ve diğer faktörler ile aktive olmaktadır [120] (Şekil 8).



**Şekil 8. MAPK sinyal yolağının tetiklendiği genel mekanizma [değiştirilmiştir: [20]].**

Peptid büyüme faktörleri hücre dışı, transmembran ve hücre içi domainlere sahip olan membran reseptörlerine bağlanır ve bağlanma ile yapısal değişiklik meydana gelerek oto-fosforile olur. Adaptör protein olan Shc, peptid hormon reseptörüne bağlanır ve fosforillenir. Reseptör-Shc kompleksi yine bir adaptör protein olan GRB-2 ile kompleks oluşturur. Guanin nukleotit değişim faktörü SOS komplekse girer ve GDP bağlı olan Ras molekülünü GTP' ye çevirerek Ras proteinine katalizler. MAPK aşağı yolağında GDP-Ras kompleksine göre daha affiniteli olan GTP-Ras ilk olarak Raf-1 (c-Raf) ile etkileşim kurar. Raf-1, ERK1/2 yolağında Ras aktivitesinin majör bir aracısıdır. Akifleşmiş olan Raf-1, MEK (MEK-1 ve -2) proteininin fosforilasyonunu sağlar. Aktif MEK, ERK-1 (p44 MAPK) ve

ERK-2 (p42 MAPK)'nin aktivasyon bölgesinde bir tirozin ve bir treonin fosforiller [99]. Buna bağlı olarak aktif ERK1/2 nukleusa geçerek transkripsiyon faktörlerini, büyümeyi, farklılaşmayı ve mitozu başlatmak için gen ekspresyonunu teşvik eder [20] (Şekil 9).



Şekil 9. MAPK sinyal yolağı [99].

#### 2.4.5. Onkogenler

Plazma membranında bulunan GTP-yüklü Ras diğer moleküller için gereklidir ve sinyal kompleksini aktifleştirmede büyük rol oynamaktadır [121]. Ras onkogenleri tümörögenizde aşağı sinyal yolağını düzenlemede önemli bir role sahiptir. MAPK yolağında Ras onkogeni, efektörü olan Raf (c-Raf) onkogenine bağlanarak aktive etmektedir [122]. JNK yolağında JNK, c-Jun'un NH2-terminal aktivasyon bölgesine bağlanarak Ser-63 ve Ser-73'de fosforillemektedir. c-Jun transaktivasyonu c-Jun geninin ekspresyonunu arttırmaktadır [20]. Buna ilaveten MAP kinaz nukleusa geçtiğinde direkt olarak c-Jun, c-Fos ve aktive edici transkripsiyon faktör-2'yi (ATF-2) aktive etmektedir [99]. Ras/Raf sinyal iletimi c-myc ekspresyonunun indüklenmesini sağlamaktadır. c-Myc proteini DNA'ya bağlanarak hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptoz dahil ilgili gen ekspresyonlarının transkripsiyonel kontrolünü sağlamaktadır [123].

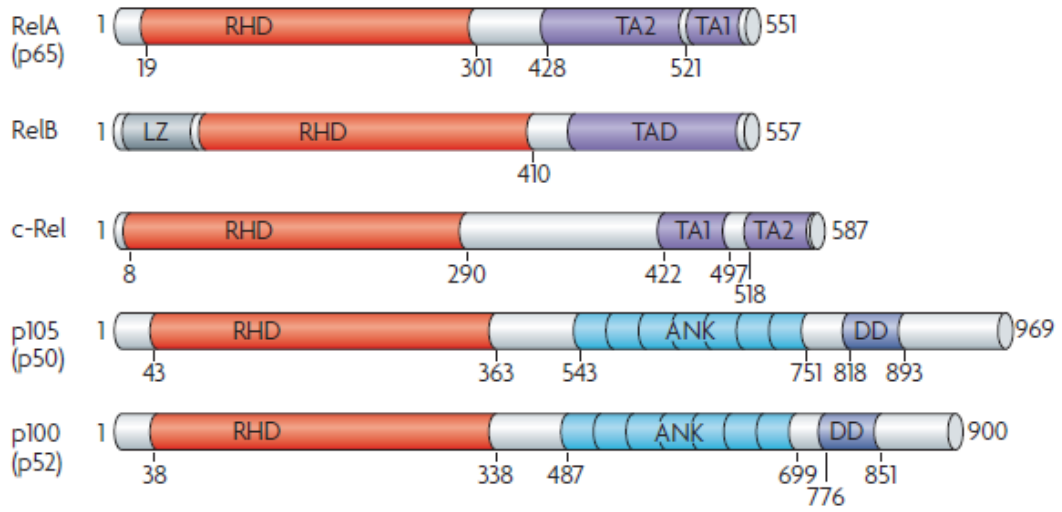
#### 2.4.6. NF-κB Sinyal Yolağı

Nükleer faktör (NF)-κB inflamasyon, immün sistem, hücre çoğalması ve apoptozda önemli rollere sahip olan bir transkripsiyon faktörüdür. NF-κB'nin bozulması ya da IKK fonksiyonu birçok insan hastalıklarının ve kanserin oluşmasını tetiklemektedir [24]. Genler NF-κB aracılığı ile programlı hücre ölümünü (apoptoz), hücre adhezyonu, proliferasyonu, doğal ve edinilmiş immün cevapları, inflamasyonu, hücrel stres cevapları ve doku modellemesini düzenler [22, 23]. Bu genlerin ekspresyonu diğer transkripsiyon faktörleri ve sinyal yolaklarının aktivitesi ile sıkı bir şekilde koordine edilir.

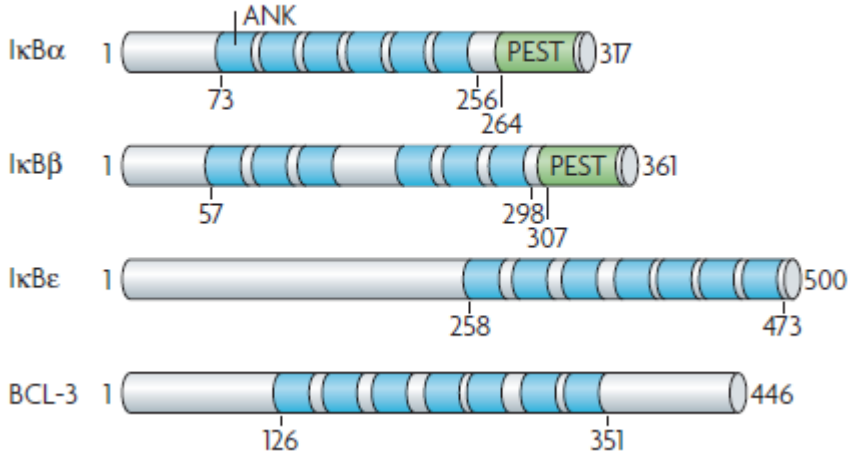
NF-κB ailesi NF-κB1 (p50/p105), NF-κB2 (p52/p100), RelA (p65), RelB ve c-Rel olmak üzere beş genden oluşur [124]. p50 ve p52 daha uzun olan p105 ve p100 öncü proteinlerinden sentezlenir ve C terminalinde, benzer şekilde IκB proteinlerinde bulunan tekrarlı ankirin motiflere (ANK) sahiptir. Bütün NF-κB ailesi üyeleri N-terminalinde Rel-homoloji domaini (RHD) içerir ve bu domain nukleer-lokalizasyon domaini içererek DNA'ya bağlanmada ve dimerizasyonda aracılık eder. NF-κB ailesinden Rel alt ailesi RelA, RelB ve c-Rel C-terminalinde transkripsiyonel aktivasyon domaini (TAD) bulundurur. RelA transaktivasyon domaini TA1 ve TA2 alt domainlerden oluşmuştur. NF-κB inhibitörü olan IκB ailesi IκBα, IκBβ, IκBε ve BCL-3 proteinlerinden oluşur ve tekrarlı ankirin motiflerine sahiptir. IκB kinaz yani IKK ailesi ise üç ana alt birimden oluşur. IKKα ve IKKβ katalitik alt üniteler iken IKKγ (NEMO) NF-κB için gereken modifikasyonları düzenleyen alt ünite dir [24] (Şekil 10).



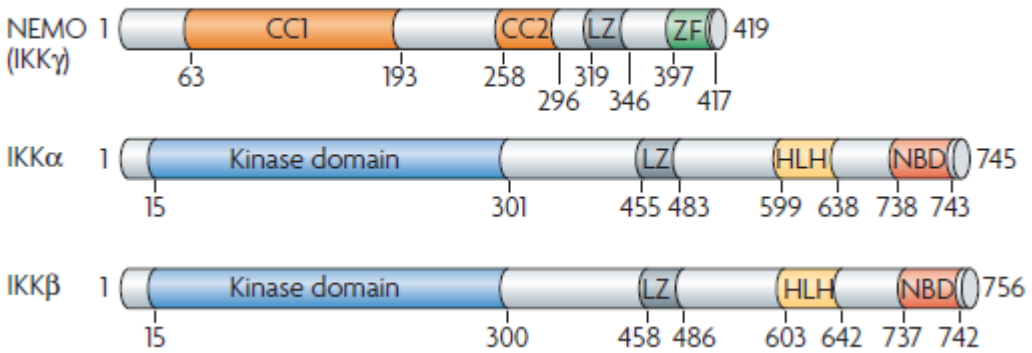
**a NF- $\kappa$ B ailesi**



**b I $\kappa$ B ailesi**



**c IKK ailesi**



**Şekil 10. Memelilerde NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B ve IKK aile üyeleri [24].**

NF- $\kappa$ B sinyal yolağı reseptör ve uyaran sinyalin farklılığına göre üç şekilde meydana gelir: klasik (standart) yolak, alternatif (standart olmayan) yolak ve alışılmadık yolak. NF- $\kappa$ B molekülünün aktivasyonu I $\kappa$ B kinaz (IKK) kompleks ile I $\kappa$ B'nin fosforilasyonu aracılığıyla I $\kappa$ B degradasyonunu gerektirir. Bu da NF- $\kappa$ B serbestlenmesine sebep olarak nukleusa geçmesini sağlar [125]. Klasik yolakta NF- $\kappa$ B inhibitörü I $\kappa$ B $\alpha$  iken alternatif yolakta p100 molekülüdür. Ayrıca NF- $\kappa$ B aktivasyonu için I $\kappa$ B $\alpha$  ve p100 moleküllerinin fosforilasyonu gereklidir ve bütün fosforilasyon olayları sinyal indüklüdür [126].

#### 2.4.6.1. Klasik (Standart) Yolak

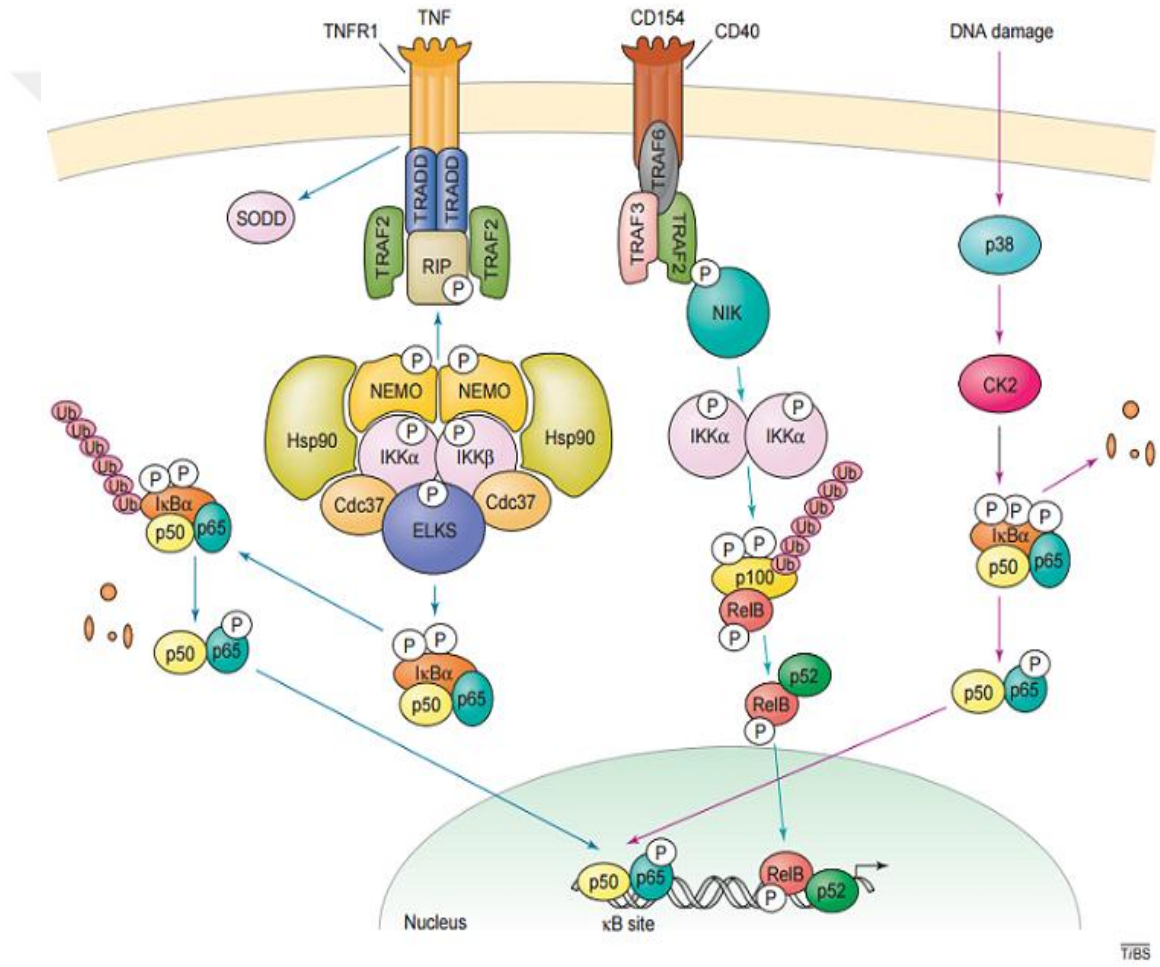
Klasik yolak tümör nekroz faktörü (TNF)- $\alpha$  gibi öncü-enflamatuar sitokinler ile tetiklenir ve sitoplazmik membranda TNF-reseptör-ilişkili ölüm domain proteini (TRADD), reseptör-etkileşimli protein (RIP) ve TNF-reseptör-ilişkili faktör 2 (TRAF2) içeren çeşitli adaptörlerin bir arada olmasına yol açmaktadır [127]. Bunu takiben IKK kompleksi (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  ve NEMO yani IKK $\gamma$ ) aktifleşerek I $\kappa$ B $\alpha$ 'yı Ser32 ve Ser36'dan fosforilleyerek ubiquitinler ve proteozom aracılığı ile degrades eder [128-130]. Serin residülerinde I $\kappa$ B fosforilasyonu için en sorumlu kinaz IKK $\beta$  alt birimidir. Sitoplazmada p50 ile birlikte bulunan RelA (p65) ya da c-Rel dimerleri, I $\kappa$ B ile etkileşim halinde iken inaktiftir ve I $\kappa$ B $\alpha$ 'nın fosforillenmesi ile serbest kalan NF- $\kappa$ B nukleusa geçerek nukleer transkripsiyon faktörlerini harekete geçirmektedir [124] (Şekil 11).

#### 2.4.6.2. Alternatif (Standart Olmayan) Yolak

Alternatif yolak NEMO bağımsız ve lenfotoksin  $\beta$  [131], B-hücrelerini aktive eden faktör (BAFF) [132] gibi sitokinler ile ya da CD40 ligandı [133] ile tetiklenmektedir. Bu sinyal yolağı membranda TRAF proteinlerine ve IKK $\alpha$  homodimerini aktive eden NF- $\kappa$ B-indükleyici kinaza (NIK) dayanmaktadır [134]. NIK ile aktifleşen IKK $\alpha$ , p100 inhibitör molekülünü fosforilleyerek ubiquitinasyona uğramasına neden olmaktadır. Böylece NF- $\kappa$ B proteini olan p52'yi üretmek için p100 ayrılmış olur. RelB ile p52 proteini heterodimer oluşturarak nukleusa geç eder ve hedef genleri aktive etmektedir [135] (Şekil 11).

### 2.4.6.3. Alışılmadık Yolak

Alışılmadık yolak ise IKK bağımsız ve proteozom gerektiren, UV ya da doksorubisin gibi DNA hasarı ile tetiklenen bir yoldur. DNA hasarı ile uyarıldıktan sonra sırayla p38 ve kazein kinaz 2 (CK2) aktivasyonu gerçekleşmektedir [136, 137]. Bu aktivasyon sonunda I $\kappa$ B $\alpha$  fosforillenerek IKK bağımsız olarak degradasyona uğrar. I $\kappa$ B $\alpha$ , CK2 aracılığı ile sürekli Ser293'de fosforillenir ve bu fosforilasyon I $\kappa$ B $\alpha$ 'nın hızlı bir şekilde proteolizi için gereklidir. I $\kappa$ B $\alpha$ 'nın degradasyonu sonucu sitoplazmada serbest kalan NF- $\kappa$ B nukleusa geçerek hedef genlerin aktivasyonunu sağlamaktadır [126] (Şekil 11).



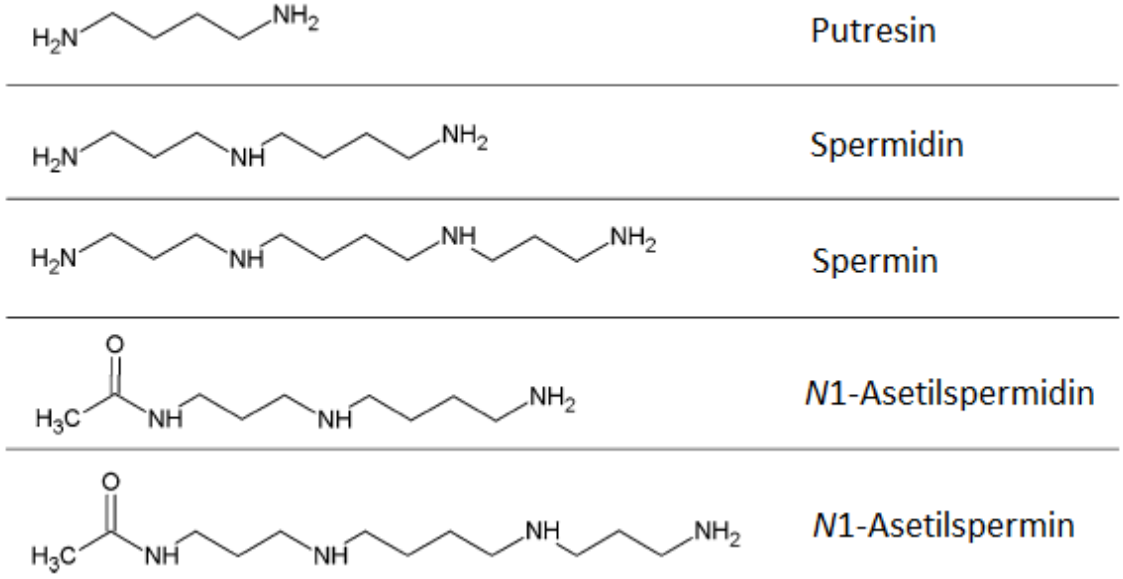
Şekil 11. Klasik, alternatif ve alışılmamış NF- $\kappa$ B sinyal yolları [126].

## 2.5. POLİAMİNLER

Antonie van Leeuwenhoek 1678 yılında insan semeninden bazı “üç-terafli” kristalleri izole etmesiyle poliaminlerin keşfi başlamıştır [138]. 1924 yılına kadar bu kristaller deneysel olarak formüle edilememiştir ancak daha sonraki yıllarda kimyasal olarak sentez edilebilmiştir. Majör grup Putresin (PUT), Spermidin (SPD) ve Spermin (SPM) olarak isimlendirilmiştir [139] (Şekil 12).

Poliaminler (PA) doğal yollarla meydana gelen küçük organik polikationik yapılu moleküllerdir ve ökaryotlarda hücre büyümesinde ve hücre gelişiminde rol almaktadırlar [140]. Aynı zamanda memelilerde poliaminler direkt olarak hücre farklılaşmasını ve hücre ölümünü yani apoptozu etkiler [141, 142]. Poliaminlerin hücre içi konsantrasyonları bağırsak florası ve katabolik reaksiyonlar aracılığı ile *de novo* sentez ve hücre taşıma mekanizması tarafından ayarlanmaktadır [143, 144]. Artan hücre içi PA seviyesinin, özellikle PA biyosentetik enzimlerin aşırı regülasyonunun malign transformasyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [145].

Poliaminler DNA, RNA, proteinler, fosfolipitler ve nükleotid trifosfatların çoklu bölgelerinde ligandlar gibi rol oynayabilir [146]. Poliaminlerin pozitif yükleri hücre içinde polianyonik makromoleküller ile poliaminler arasındaki elektrostatik etkileşimini sağlamaktadır. Spermidin ve spermin DNA'nın majör ve minör oluklarında ya iki farklı molekülü ya da aynı molekülün iki uzak parçasını kelepçe gibi tutarak köprü görevi görmektedir [147]. Ayrıca poliaminler membrandaki asidik fosfolipitler ile etkileşime girmektedir [148]. Genelde spermidin ve spermin, fosfolipitler ve proteinler ile oluşan kompleksler sayesinde membran sertliğini artırarak membrana esnemezlik özelliği kazandırmaktadır.



Şekil 12. Hücresel poliaminler ve onların asetil türevleri [149].

### 2.5.1. Poliamin Metabolizması

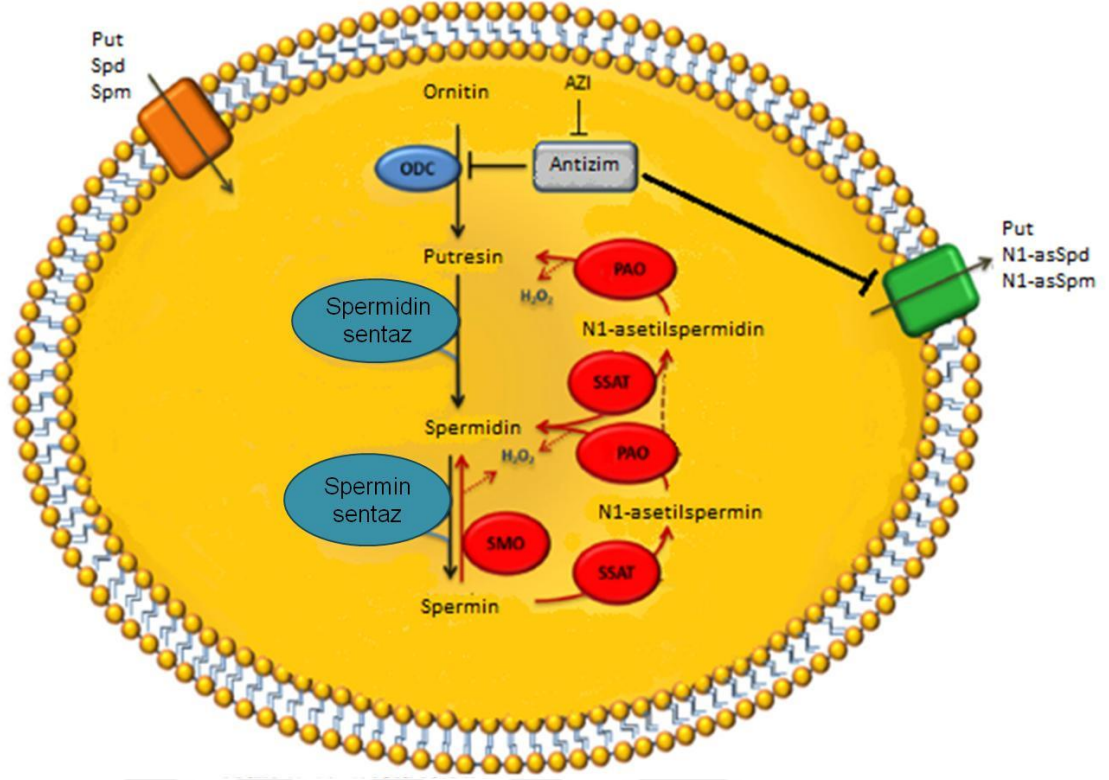
Normal hücrelerde PA seviyeleri biyosentetik ve katabolik enzimler ile kontrol edilmektedir ve böylece hücre içi denge sağlanmaktadır. Ornitin dekarboksilaz (ODC), S-adenosilmetionin dekarboksilaz (SAMDC), spermidin sentaz ve spermin sentaz biyosentetik enzimler iken spermidin/spermin asetiltransferaz (SSAT), poliamin oksidaz (PAO), diamin oksidaz ve diğer amin oksidazlar katabolik enzimler olarak tayin edilmiştir [145].

Ökaryotik hücrelerde majör üç poliamin (put, spd, spm) L-arjinin (L-ornitin ile) ve L-metioninden birbirine bağlı olan altı basamaklı enzim reaksiyonu ile sentez edilmektedir. Memeli hücrelerinde ODC vasıtasıyla ornitin dekarboksilasyonundan putresin oluşması ile poliamin biyosentezi başlamaktadır. Bu reaksiyonları takiben spermidin sentaz ile spermidin üretilir ve ikincil aminopropiltransferaz reaksiyonu içeren spermin sentaz ile spermin üretilir [150].

Hücre içi PA seviyeleri katabolik enzimler tarafından kontrol edilmektedir [151] ve sperminin putresine geri dönüşümü sürecinde asetil-CoA kullanarak  $N^1$ -asetilspermidin ve spermin oluşturmak için ilk basamakta SSAT bulunmaktadır.  $N^1$ -asetil türevleri sırayla spermidin ve putresin üretirken FAD-bağımlı PAO substratları tercih edilmektedir [152]. Ayrıca, spermin spermidine geri dönüşürken asetilasyona gerek duymadan spermin oksidaz (SMO) ile gerçekleşen bir basamak bulunmaktadır

[153]. SMO enzimi spermidin üretmek için özellikle spermini substrat olarak tanımaktadır ve aynı zamanda  $H_2O_2$  üretilmektedir [154]. PA katabolizmasının aracı ürünleri olan  $N^1$ -asetilspermidin ve  $N^1$ -asetilspermin normal hücrelerde nadiren bulunmaktadır çünkü majör poliaminler -putresin- hücreden dışarı çıkarılmaktadır [155]. Hücrede PA taşınmasını baskılayan ve ODC'nin degradasyonuna sebep olan ODC antizim (AZ), PA biyosentezi ve hücre içine girişi arasındaki bağlantıyı sağlamaktadır [156, 157]. AZ, ODC üzerindeki etkisinden bağımsız olarak PA girişinin down-regülasyonu ile poliamin dengesini değiştirebilmektedir [158, 159]. AZ aktivitesi ODC'nin inaktif homologu olan antizim inhibitörün (AZI) bağlanması ile baskılanmaktadır [160]. Bu sayede, AZI AZ'nin ODC degradasyonu ve poliaminlerin hücresel girişi üzerindeki etkisini önlemektedir [161]. Meme kanserinde AZI'nin indüklenmiş aşırı ekspresyonu, artan hücre proliferasyonu ile birlikte ODC aktivitesinin ve putresin içeriğinin artması ile sonuçlanmaktadır. Bu sebeple AZI hücre proliferasyonunda ve poliamin dengesinde düzenleyici fonksiyonlara sahip olduğundan gerekli bir proteindir [160].

Asetilpoliaminler kanser hücrelerinde yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır ve PA metabolizması ile karsinogenezdeki değişiklikler arasında bağlantı kurmaktadır [162]. SSAT ve PAO poliaminleri oksitlemek ve asetillemek için uyum içerisinde çalışmaktadır ve her oksidasyonda  $H_2O_2$  üretilmektedir.  $H_2O_2$ , SSAT aktivitesini indüklemektedir ve böylece döngüyü devam ettirmektedir. Üretilmiş olan  $H_2O_2$ 'in yüksek konsantrasyonu ise hücrede oksidatif strese yol açarak hücre ölümüne sebep olmaktadır [163] (Şekil 13).



Şekil 13. Memeli hücresinde poliamin metabolizması. Mavi: PA biyosentez enzimleri, kırmızı: PA katabolik enzimler [değiştirilmiştir: [149]].

## 2.6. HÜCRE ÖLÜM SİNYAL YOLAĞI

### 2.6.1. Apoptoz

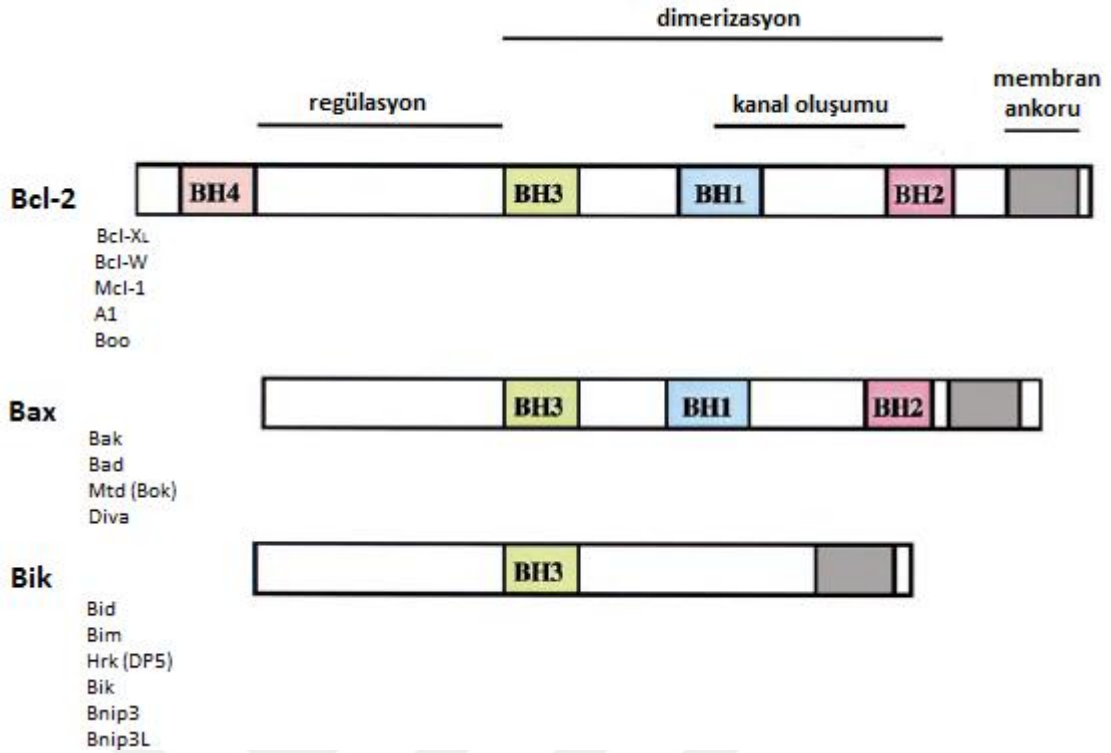
Tamir edilemeyen DNA hasarı meydana geldiği zaman hücreyi ölüme götüren majör yolak programlı hücre ölümü olan apoptozdur. Programlı hücre ölümü normal hücrelerde sağ kalım ve hücre ölümü arasında bir dengeye sahip ve bu denge tahribat karşısında bozularak kanser hücrelerinin kaderi için karar vermede apoptoz büyük bir rol oynamaktadır [164, 165]. Apoptoz ile ölen hücrelerde hücre büzülmesi, nüklear yoğunlaşma ve degradesyon, membran kabarcıkları ve ekstraselüler matriksten ya da komşu hücrelerden adhezyon kaybı gibi hem morfolojik hem de biyokimyasal değişiklikler yapmaktadır [166].

Apoptotik hücre ölümü sürecinde pro-apoptotik proteinler, anti-apoptotik proteinler, kaspazlar ve ölüm reseptör ailesinden oluşan birçok protein ailesi görev almaktadır. Bcl-2 ailesi apoptoz sırasında anahtar regülatör olarak rol oynamakta ve bu molekül bazı kanser hücre tiplerinde aşırı eksprese edilmektedir [167]. İç yolakta görev alan Bcl-2 ailesi çok sayıda Bax, Bak, Bad, Bid, Bim ve Bcl-X<sub>S</sub> gibi pro-

apoptotik protein ailesi üyeleri ve Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W ve Mcl-1 gibi anti-apoptotik protein üyelerini içermektedir [168]. Bcl-2 ailesine ait proteinler mitokondri zarının dış kısmında lokalize olmaktadır. Apoptozun mitokondriyel yolağının başlaması, mitokondri membran potansiyelinin bozulması ile birlikte mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) gibi moleküllerin salınması ile gerçekleşmektedir. Mitokondri membran potansiyelinin bozulmasına, mitokondri dış membranında lokalize olan Bcl-2 ailesi üyelerinden pro-apoptotik proteinlerin por oluşturması neden olmaktadır. Pro-apoptotik proteinlerin oluşturduğu bu porlara da anti-apoptotik proteinler engel olmaktadır [169]. Apoptozun dış yolağını başlatan ölüm reseptör (DR) ailesi de tümör nekroz reseptörü TNF-R1, Fas, DR3, TRAIL-R1/2 (DR4/5) ve DR6 üyelerini kapsamaktadır [170]. Bu aile üyeleri arasındaki benzerlik, uygun ligandlara bağlanmak için Fas-ilişkili ölüm domaini (FADD) gerektiren, reseptörlerin sitoplazmik bölgesine yani ölüm domainlerine (DD) dayanmaktadır.

Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerine ait proteinler apoptozu indüklerken anti-apoptotik aile üyelerine ait proteinler apoptozu baskılamaktadır. Bu iki farklı işleyişe sahip olan proteinlerin fonksiyonları, yapılarında bulunan Bcl-2 homoloji bölgeleri (BH) tarafından düzenlenmektedir. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin yapısında BH1, BH2, BH3 ve BH4 olmak üzere 4 tane BH domaini bulunmaktadır. Bcl-2 ailesine ait proteinler BH1, BH2 ve BH3 bölgeleri ile diğer Bcl-2 ailesi proteinlerine BH3 bölgesinden bağlanarak iletişim kurmaktadır. Pro-apoptotik protein ailesi taşıdıkları BH domainine göre BH1, BH2, BH3 bölgelerini taşıyan (Bak, Bax) ve sadece BH3 bölgesini taşıyan (Bid, Bad, Bim) proteinler olarak ikiye ayrılmaktadır. Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri olan Bcl-2, Mcl-1, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-w ise sadece BH4 domaini taşımaktadır. Bcl-2 ailesine ait pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin arasındaki denge hücre sağ kalımı ve ölümü arasındaki dengeden kaynaklanmaktadır [171, 172]. Anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonları fazla olduğunda apoptoz baskılanırken pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonları fazla olduğunda hücrenin apoptoza gitmesini teşvik etmektedir [173, 174] (Şekil 14).





**Şekil 14. Bcl-2 ve ilişkili protein aileleri [172].**

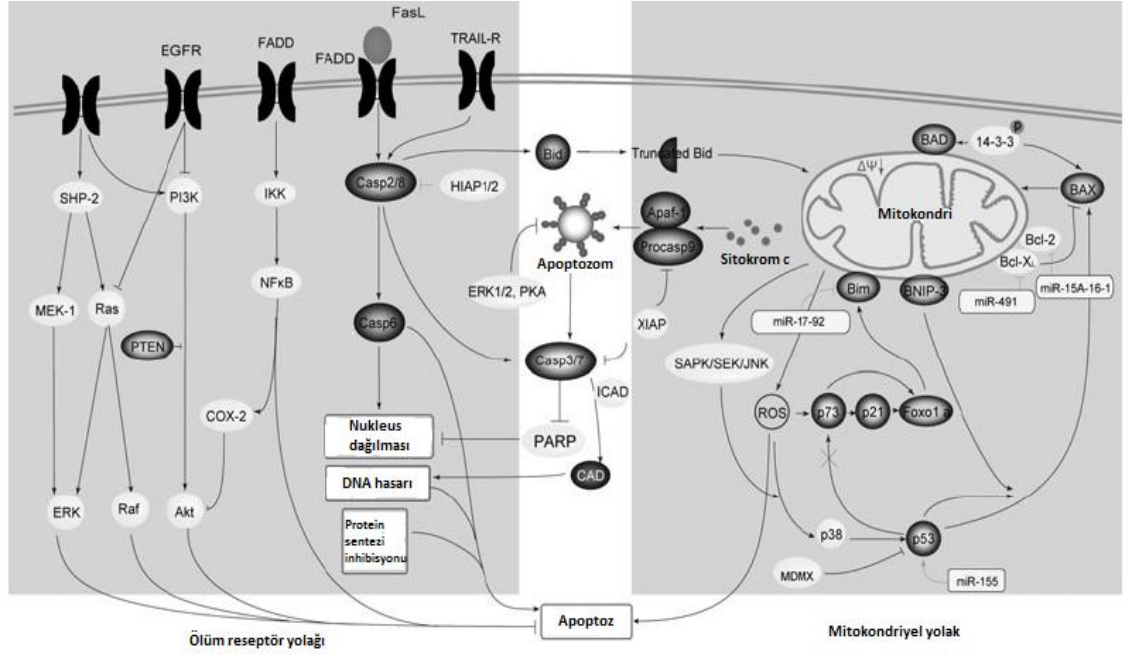
Nükleer transkripsiyon faktörü olan p53, apoptozun iç yolağında apoptotik sinyallerin mitokondri aracılı olmasını kontrol edebilen önemli bir apoptotik faktör ve tümör inhibitörüdür [175]. p53 genelde iç yolakta DR-5 ve Bax gibi pozitif apoptoz regülatörlerinin aktivasyonu ile mitokondri aracılı apoptotik hücre ölümünü başlatmaktadır [176, 177]. Apoptoz ölüm reseptör yolağı (dış) ve mitokondriyel yolak (iç) olmak üzere iki yolak üzerinden gerçekleşmektedir [43].

#### 2.6.1.1. İç (İntrinsik) Sinyal Yolağı

İç yolak mitokondriyel pro-enzimlerin kontrolü altında apoptozun gerçekleşmesi olayıdır. Hücrenin, ya hücre dışı uyaranlar ya da hücre içi sinyaller ile mitokondriyel dış membranı geçirgen hale gelmekte ve sitokrom c sitozole salınmaktadır. Sadece-BH3 spesifik olan tüm moleküller intrinsik pro-apoptotik aktivitelerini sağlamak için Bax ve Bak gibi çoklu-domain BH3 proteinlerinin varlığını gerektirmektedir. Bu durum sitokrom c salınmasına ve ikincil mitokondri kökenli kaspazların aktivatörüne neden olmaktadır [178]. Sitokrom c, kaspaz 9/3 sinyal kaskadını downstream olarak tetikleyen apoptozomu oluşturmak için Apaf-1 ve pro-kaspaz-9 arasındaki etkileşimi güçlendirmektedir [179]. Kaspaz-9 mitokondriyel apoptozu yani iç yolağı başlatan etmen olarak temsil edilmektedir.



kaspaz-3'ü tetiklemektedir ve böylece apoptotik süreç ilerlemektedir [185] (Şekil 16).



Şekil 16. Apoptoz sinyal yolu ve diğer yollar ile etkileşimi [186].

## **3. MALZEME VE YÖNTEMLER**

### **3.1. KULLANILAN MALZEMELER**

#### **3.1.1. Kullanılan Cihazlar**

Kullanılan cihazlar Ekler bölümünde Tablo 1’de verilmiştir.

#### **3.1.2. Hücre Kültürü Donanımları**

Hücre kültüründe kullanılan donanımlar Ekler bölümünde Tablo 2’de verilmiştir.

#### **3.1.3. Kullanılan Kimyasallar**

Çalışma kapsamında kullanılan kimyasal maddeler Ekler bölümünde Tablo 3’te verilmiştir.

#### **3.1.4. .Kullanılan Tamponlar**

##### **3.1.4.1. 10X TBS Hazırlanması**

10X TBS hazırlamak için 86,6 g NaCl ve 12,11 g Tris-Baz tartılarak pH: 8 olacak şekilde ayarlanır ve distile su ile 1000 ml’e tamamlanır. 10X TBS’i kullanmak için distile su ile 1X TBS’e çevrilir.

##### **3.1.4.2. 1X TBS-Tween Hazırlanması**

1X TBS-T hazırlamak için 1X TBS içerisine 1: 1000 oranında Tween 20 eklenerek hazırlanır.

##### **3.1.4.3. Yürütme Tamponunun Hazırlanması**

10X yürütme tamponu hazırlamak için 30,3 g Tris-Baz, 114 g Glisin ve 10 g SDS tartılarak distile su ile 1000 ml’ye tamamlanır. Jel yürütme sırasında kullanmak için distile su ile 1X’e çevrilir ve +4°C’ de saklanır.

#### **3.1.4.4. Transfer Tamponunun Hazırlanması**

Transfer tamponunu hazırlamak için 200 ml 10X yürütme tamponuna 100 ml metanol eklenir ve distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır ve +4°C' de saklanır.

#### **3.1.4.5. Yürütme Jelinin Hazırlanması**

Proteinlerin ağırlıklarına göre yürümeleri için yürütme jeli ve ayrılmalarına göre de ayırma jeli olacak şekilde %12'lik SDS-PAGE jel hazırlanmıştır. Jel hazırlanması için jel içerikleri Ekler bölümünde Tablo 4'te verilmiştir.

#### **3.1.4.6. Hücre Dondurma Medyasının Hazırlanması**

Filtre edilmiş 9 ml FBS ve 1 ml DMSO karıştırılarak hazırlanır ve 1 ml olacak şekilde mikrofij tüplerine bölüştürülür.

## **3.2. YÖNTEMLER**

### **3.2.1. Hücre Kültürü**

MDA-MB-453 (östrojen reseptörü negatif, ER-) meme kanseri hücre hatları American Type Tissue Culture Collection'dan temin edilmiştir. Hücreler DMEM besiyerinde % 10 sığır fetusu serumu ve 10 U/ml penisilin/streptomisin antibiyotik katkısı ile % 5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C etüvde inkübe edilmiştir. Hazırlanan besiyeri 0,22 µM por çapındaki hücre kültürü ile uyumlu filtrelerden geçirilerek steril hale getirilip, 50 ml'lik falkon tüplerde +4°C'de saklanmıştır.

Hücreler 75 cm<sup>2</sup> ve 25 cm<sup>2</sup> lik hücre petrilerinde yetiştirilmiştir. Protein izolasyonu için 100 ve 60 mm'lik hücre kültürü petrilerine, PA izolasyonu için 60 mm'lik hücre kültürü petrilerine, RNA izolasyonu ve akış sitometrisi için 6 kuyulu hücre kültürü petrilerine, floresan mikroskopu çekimleri için 12 kuyulu hücre kültürü petrilerine hücrelerin ekimleri gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin gece boyu petriye yapışmalarını bekledikten sonra doza bağlı curcumin (0-50 µM) ilaç uygulaması yapılmıştır ve 37 °C 'de % 5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde bekletilmiştir.

Hücre ekimi için 75 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü petrilerinde bulunan hücrelerden besiyeri uzaklaştırılmıştır ve 2 ml fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkanarak 1,5 ml tripsin-EDTA (% 0,25 etilen diamin tetra asetik asit) uygulanmıştır. Hücreler %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde 3 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda tripsin etkintliğini

inhibe etmek için 1,5 ml DMEM eklenerek hücreler 15 ml'lik falkona toplamıştır ve 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak hücreler 1 ml DMEM içerisinde çözülmüştür. İyice pipetaj yapılarak homojen bir hale gelen hücreler sayım cihazında sayılmıştır.

### 3.2.1.1. Doğal Tip Hücelere Transfeksiyon Yapılması

Büyüme hormonu anlatımı olmayan MDA-MB-453 meme kanseri hücre hatlarına anlatımı sağlamak amacıyla GH geni içeren PC3.1 plazmidi lipofektamin aracılığı ile verilmiş ve Neomisin ile seçim yapılarak stabil MDA-MB-453 GH+ hücre hattı elde edilmiştir.

MDA-MB-453 doğal tip hücre ekimi için tripsin ile hücreler kaldırılmış, sayım yapılmış ve 6 kuyulu hücre kültürü petrilere  $1,0 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücreler gece boyu % 5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C etüvde inkübe edildikten sonra transfeksiyon yapmak için hazır hale gelmiştir. Plazmid (GH-PC3.1) ve transfeksiyon ajanı (Fugene) oranı 1:3 olarak uygulama yapılmıştır. İki ayrı 1,5 ml'lik mikrofüj tüpleri içerisine 100 µl fetus serumu ve penisilin içermeyen DMEM eklenmiştir. Plazmid ilave edeceğimiz mikrofüj tüpüne 1 µl GH plazmidi ve diğer mikrofüj tüpüne 3 µl transfeksiyon ajanı eklendikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir. Plazmid içeren besiyerini transfeksiyon ajanı bulunan besiyeri ortamında birleştirerek 20 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 6 kuyulu hücre petrilere bulunan besiyeri ortamdaki uzaklaştırılıp hücreler PBS ile yıkanmıştır ve 1800 µl taze besiyeri eklenmiştir. Birlikte 20 dakika bekletilen plazmid ve transfeksiyon ajanı hücre petrisi kuyusuna ilave edilmiştir. Gece boyu etüvde bekletilen hücrelerden besiyeri uzaklaştırılarak taze besiyeri ile değiştirilmiştir ve hücreler etüvde büyümeye bırakılmıştır.

Hücre petrisinde uygun yoğunluğa ulaşan hücelere gün aşırı doz artırarak (200-1000 ng) Neomisin uygulanmıştır. Böylece plazmidi alan hücrelerde Neomisin ilacına direnç olacağından sağ kalan hücrelerde koloni seçimi yapılmıştır ve yeni bir 6 kuyulu hücre petrisine bu koloniler geçirilmiştir. 6 kuyulu hücre petrisinde büyütülen transfekte hücreler 25 cm<sup>2</sup>'lik hücre petrisine geçirilerek stabil MDA-MB-453 GH+ hücre hattı elde edilmiştir.

### **3.2.2. Hücre Canlılığının Belirlenmesi**

#### **3.2.2.1. MTT ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi**

MTT ajanı ile canlı hücrelerde mor renkli formazon tuzu oluşturarak hücre canlılığına bakılmıştır. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültürü petrisinin her kuyucuğuna  $1,0 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekim yapılmış ve 24 saat boyunca hücrelerin yapışması için etüvde bekletilmiştir. Curcumin ilaç uygulaması doza bağlı olarak (5-30  $\mu\text{M}$ ) 24 saat ve 48 saat boyunca uygulanmıştır. İlaç uygulaması takiben 24 saat ve 48 saat sonunda her kuyucuğa 10  $\mu\text{l}$  MTT ajanı eklenerek hücreler 4 saat boyunca etüvde bekletilmiştir. 4 saat sonrasında besiyeri hücrelerden uzaklaştırılarak her kuyucuğa 100  $\mu\text{l}$  DMSO eklenmiştir ve karanlıkta 5 dakika bekletilmiştir. Spektrofotometrede ikili dalga boyu 570 nm ve 655 nm'de absorbans ölçümü ile okutulmuştur.

#### **3.2.2.2. Hücre Sağkalımı ile Canlılığın Belirlenmesi**

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücreleri 6 kuyulu hücre kültürü petrisine  $0,5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Gece boyu hücrelerin yapışması beklendikten sonra hücrelere 20  $\mu\text{M}$  curcumin 24, 48 ve 72 saat uygulanmıştır. 24, 48 ve 72 saat sonunda hücreler tripsin ile kaldırılmış ve 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak 1 ml taze besiyerinde hücreler pipetaj ile karıştırılmıştır. Mikrofüj tüpüne 10  $\mu\text{l}$  hücre ve 10  $\mu\text{l}$  tripan mavisi eklenerek hücreler boyanmıştır. Boyalı hücrelerden 10  $\mu\text{l}$  çekilerek sayma aparatına konmuş ve hücre sayım cihazında canlı ve ölü hücreler sayılmıştır.

### **3.2.3. Eliza Yöntemi ile GH Varlığının Belirlenmesi**

25 cm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü petrilerinde bulunan MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinin 24 saatlik besiyeri toplanmıştır ve filtreli 50 ml'lik falkon milipore ile 4000 rpm'de 50 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası milipore filtresinde kalan kısım yeni bir 1,5 ml'lik mikrofüj tüpüne alınmıştır. Growth Hormone (GH) Human SimpleStep ELISA™ Kit (ab190811) kullanılarak önce standartlar 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9 pg/ml olacak şekilde Sample Diluent ile birlikte hazırlanmıştır. ELISA plakasının kuyucuklarına standartlar ve örnekler 50  $\mu\text{l}$  eklenerek protokol doğrultusunda devam edilmiştir ve ELISA cihazında 450 nm dalga boyunda okutulmuştur.

### **3.2.4. Koloni Oluşumu Yöntemi**

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücreleri 6 kuyulu hücre kültürü petrisine  $2,0 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekilmiştir. Bir gece yapışması beklenen MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerine  $20 \mu\text{M}$  curcumin uygulanmıştır. İlaç uygulamasını takiben 24 saat sonunda curcumin uygulanan hücrelerin besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak taze besiyeri ile değiştirilmiştir. 10-15 gün etüvde inkübasyon sonunda MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerde koloni oluşumu kristal viyole ile boyanarak gösterilmiştir.

### **3.2.5. Yara İyileşmesi**

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücreleri 35 mm hücre kültürü petrisine  $5,0 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekilmiştir. Bir gece yapışması beklenen hücreler  $200 \mu\text{l}$  mikropipet ucu ile çizilerek yara izleri açılmıştır. Hücrelerin besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak PBS ile yıkanmıştır ve taze besiyeri eklenmiştir. İlaç uygulanan hücrelere de  $20 \mu\text{M}$  curcumin besiyerine verilmiştir. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde 24 saat sonra yara kapanmasını belirlemek için ışık mikroskopunda görüntü alınmıştır.

### **3.2.6. İnvazyon-Metastaz Yöntemi**

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücreleri 24 kuyucuklu Matrigel Chamber hücre kültürü petrisine  $2,5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Petrinin por yapılı jel olan iç kısmına hücreler %0,1 besiyeri ile birlikte ve ilaç uygulanacak hücreler de ilave olarak  $20 \mu\text{M}$  curcumin ile birlikte ekilmiştir. Petrinin alt kısmına ise %5 besiyeri hazırlanarak ilave edilmiştir. İlaç uygulamasından 24 saat sonra MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinden por yapılı jel içeren kuyucuklarda kalan hücreler mikroskopta çekim yapılmış ve invazyon ve metastaz yapan hücrelerin sayıları belirlenmiştir.

### **3.2.7. Soft Agar ile Koloni Oluşumu Yöntemi**

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücreleri 6 kuyulu hücre kültürü petrisine agar ile birlikte  $3,0 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 6 kuyulu hücre petrisine alt agar olarak  $500 \mu\text{l}$  %0,5'lik agaroz ile  $500 \mu\text{l}$  %20 FBS



içeren besiyeri karıştırılarak her kuyuda 1 ml olacak şekilde dökülmüştür. Agarın donması için petri laminar flow içerisinde bekletilmiştir.

Bu arada dışarıda kalan agar da donmuş olduğundan %0,5'lik agarozu tekrar mikrodalga fırında eriterek %0,3'lük agarozu dilüe edilmiştir. Aynı ayrı 3 adet steril mikrofij tüpleri birincisinde 333 µl %0,3'lük agaroz, ikincisinde 333 µl %20 FBS içeren besiyeri, üçüncüsünde de 333 µl %10 FBS içeren besiyeri ve  $3,0 \times 10^4$  hücre olacak şekilde hazırlanmıştır. İlaç uygulaması olan örneklerde 20 µM curcumin %20 FBS içeren besiyeri olan mikrofij tüpüne ilave edilmiştir. %0,3'lük agaroz ve %20 FBS içeren besiyeri ile çok sıcak olmamasına dikkat edilerek karıştırılmıştır ve agaroz donmadan %10 FBS içeren besiyeri ve hücre üzerine ilave edilerek karıştırılmıştır. Tek mikrofij tüpünde birleştirilen süspansiyon 6 kuyulu petride donmuş olan agarın üzerine ilave edilmiştir. Hücreler etüve kaldırılarak koloni oluşturmaları için beklenmiştir.

### 3.2.8. Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücreleri RNA izolasyonu yapılması için 6 kuyulu hücre kültürü petrisine  $3,0 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekilmiştir. Gece boyu yapışması beklenen MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerine 20 µM curcumin uygulanmıştır. İlaç uygulamasından 24 saat sonra hücrelerden Trizol ile RNA izole edilmiştir. RNA'nın izole edildiği %2'lik agaroz jelde görüntülendikten sonra PCR atmak için 1000 ng/µl konsantrasyondan RNA'lar Iscript cDNA Sentez Kiti ile cDNA'ya çevrilmiştir.

**Tablo 1. Metalloproteinaz primerlerin PCR cihazında çalıştığı sıcaklık dereceleri.**

Primer	Dizi	Bağlanma Sıcaklığı
MMP2F MMP2R	GGCTGGTCAGTGGCTTGGGGTA AGATCTTCTTCTTCAAGGACCGGT	51°C
MMP9F MMP9R	GCGGAGATTGGGAACCAGCTGTA GACGCGCCTGTGTACACCCACA	65°C
TIMP1F TIMP1R	ACCATGGCCCCCTTTGAGCCCCCTG TCAGGCTATCTGGGACCGCAGGGA	65°C
VEGFAF VEGFAR	ATTGGAGCCTTGCCCTTGCTG CACGTCTGCGGATCTTGAC	65°C

Elde edilen cDNA'ların konsantrasyonları spektrofotometre ile ölçüldükten sonra 5000 ng/μl konsantrasyondan GeNet Bio kiti ile MMP2, MMP9, TIMP1 ve VEGF primerleri kullanılarak PCR atılmıştır. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

### **3.2.9. Floresan Boyama**

#### **3.2.9.1. 3,3' Diheksiloksakarboşyanin İyodür (DiOC<sub>6</sub>) Boyama**

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücreleri 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisine  $1,0 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekilmiştir. Bir gece yapışması beklenen hücelere 20 μM curcumin uygulanmıştır. İlaç uygulamasını takiben 24 saat sonra hücreler 0,1 μM DioC6 boya ile 15 dakika inkübe edilmiştir ve floresan mikroskopta mavi filtre ile canlı hücrelerin görüntüleri çekilmiştir.

#### **3.2.9.2. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Boyama**

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücreleri 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisine  $1,0 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekilmiştir. Bir gece yapışması beklenen hücelere 20 μM curcumin uygulanmıştır. İlaç uygulamasını takiben 24 saat sonra hücreler 1μl/ml DAPI boya ile 5 dakika inkübe edilmiştir ve floresan mikroskopta hücrelerdeki DNA kırıkları görüntülenmiştir.

#### **3.2.9.3. Propidyum iyodür (PI) boyama**

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücreleri 12 kuyucuklu hücre kültürü petrisine  $1,0 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekilmiştir. Bir gece yapışması beklenen hücelere 20 μM curcumin uygulanmıştır. İlaç uygulamasını takiben 24 saat sonra hücreler PI boya ile 30 dakika inkübe edilmiştir ve floresan mikroskopta yeşil filtre ile ölü hücreler görüntülenmiştir.

### **3.2.10. Hücre Akış Sitometresinde PI Boyaması**

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücreleri 6 kuyulu hücre kültürü petrisine  $3,0 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece yapışması beklenen hücelere 20 μM curcumin uygulanmıştır. İlaç uygulandıktan 24 saat sonra hücreler fikse edilmek için tripsin ile kaldırılmış ve hücreler petriden 1,5 ml'lik mikrofüj

tüpüne toplanarak 2.500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası sıvı kısım atılarak pellet üzerine 1 ml PBS eklenmiştir ve tekrar 2.500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası PBS ortamdan uzaklaştırılarak pellet üzerine 1 ml -20°C'de muhafaza edilen %70 Etanol eklenmiştir. Mikrofüj tüpünde bulunan örnekler alt-üst edilerek karıştırıldıktan sonra -20°C'ye kaldırılarak kısa süreli bekletilmiştir.

Örnekler Facs cihazında okutulmadan hemen önce PI ile boyanması gerekmektedir. Öncelikle örnekleri etanolden uzaklaştırmak için 13.200 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılmıştır ve santrifüj sonrası etanol atılarak örnekleri yıkamak amacıyla 1 ml PBS eklenmiştir. Tekrar 13.200 rpm'de 2 dakika santrifüj yapılmıştır ve sonrasında PBS atılmıştır. Örneklerin üzerine 245 µl 1XPBS, 2,5 µl PI boya ve 2,5 µl RNase eklenerek pipetaj yapılmıştır ve karanlıkta 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örnekler cihazda sırayla okutulmuştur.

### **3.2.11. Annexin V/PI Analizi**

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücreleri 6 kuyulu hücre kültürü petrisine  $3,0 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece yapışması beklenen hücrelere 20 µM curcumin uygulanmıştır. İlaç uygulandıktan 24 saat sonra hücreler tripsin ile kaldırılmış ve hücreler petriden 1,5 ml'lik mikrofüj tüpüne toplanarak 2.500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası besiyeri atılarak pellet üzerine 1 ml PBS eklenmiştir ve tekrar 2.500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası PBS çekilerek atılmıştır. Örneklerin her birine 250 µl 1xBinding Buffer eklenmiştir ve yavaş bir şekilde pipetaj yapılmıştır. Sadece PI olarak okutulacak örneklerin üzerine 2,5 µl PI ilave edilmiştir. Sadece Annexin olarak okutulacak örneklerin üzerine 2,5 µl Annexin ilave edilmiştir. PI ve Annexin birlikte okutulacak örneklerin üzerine de 2,5 µl PI ve 2,5 µl Annexin ilave edilmiştir. Sonra oda sıcaklığında 15 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir ve cihazda okutulmuştur.

### **3.2.12. DCF-DA Boya ile Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Tayini**

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücreleri 6 kuyulu hücre kültürü petrisine  $3,0 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece yapışması beklenen hücrelere 20 µM curcumin uygulanmıştır. İlaç uygulandıktan 24 saat sonra hücrelerin besiyerine 0,5 µl DCF-DA boya eklenerek 30 dakika etüvde inkübe

edilmiştir. İnkübasyon sonrasında petriden besiyeri uzaklaştırılarak hücrelere PBS eklenmiştir ve floresan mikroskopunda mavi filtre ile hücrelerdeki ROS birikimleri görüntülenmiştir.

Mikroskop görüntüleri alındıktan sonra hücreler tripsin ile kaldırılmış ve hücreler petriden 1,5 ml'lik mikrofüj tüpüne toplanarak 2.500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası sıvı kısım atılarak pellet üzerine 1 ml PBS eklenmiştir ve pipetaj ile hücreler karıştırılmıştır. Örneklere okutmadan hemen önce sırasıyla 1 µl PI eklenerek cihazda okutmalar yapılmıştır.

### **3.2.13. İmmunoblatma Yöntemi**

#### **3.2.13.1. Protein İzolasyonu**

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücreleri 60 mm'lik ve 100 mm'lik hücre kültürü petrilere  $8,0 \times 10^5$  ve  $2,2 \times 10^6$  hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bir gece yapışması beklenen hücrelere 20 µM curcumin uygulanmıştır. İlaç uygulandıktan 24 saat sonra hücreler normal protein izolasyonu için 1XPBS ve fosfo protein izolasyonu için 1XTBS ile kazınarak mikrofüj tüplerine toplanmıştır. Hücreler 2 dakika 13.200 rpm'de +4 °C de santrifüj edilmiştir. Hücreleri kazıma ve santrifüj işlemi iki kere tekrarlanmıştır ve santrifüj sonrasında üst sıvı çekilerek atılmıştır. Hücrelerin üzerine pelletin yoğunluğuna göre lizis tamponu eklenerek 20 dakika boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örnekler 20 dakika 13.200 rpm'de +4 °C de santrifüj edilmiştir ve üst faz yeni bir mikrofüj tüpüne alınarak örnekler -80°C'de saklanmıştır.

#### **3.2.13.2. Bradford Yöntemi ile Protein Miktarı Tayini**

Hücrelerdeki protein miktarının belirlenmesi için Bradford yöntemi kullanılarak konsantrasyonları ölçülmüştür. Standart eğrinin oluşturulabilmesi için 1,5 µg/ µl, 3 µg/ µl, 4,5 µg/ µl, 6 µg/ µl, 7,5 µg/ µl olacak şekilde 1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl, 5 µl BSA 96 kuyucuklu hücre petrisine eklenmiştir ve protein örneklerinden 1 µl çekilerek aynı petriye eklenmiştir. Tüm örneklerin üzerine Bradford tamponu ilave edilerek 595 nm dalga boyunda absorbansları ölçülmüştür. Standartların absorbans/konsantrasyon grafiği elde edildikten sonra, bu grafiğin eğim eşitliliği kullanılarak absorbans değerleri bilinen örneklerin protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.

### 3.2.13.3. Protein Hazırlanması ve SDS-PAGE Jelde Yürütülmesi

Protein örnekleri 35 µg olacak şekilde ve 5X laemmlili hesaplanarak mikrofüj tüpünde hazırlanmıştır ve 5 dakika 95°C'de inkübe edilmiştir. %4 yükleme ve %12 ayırma SDS-PAGE jel hazırlanarak örnekler ve protein belirteç kuyucuklara yüklenmiştir. SDS-PAGE jel 90 V'da 4 saat yürüme tamponu içerisinde yürütülmüştür.

### 3.2.13.4. Proteinlerin Membrana Transfer Edilmesi ve Bloklama

SDS-PAGE sonrası yükleme jeli kesilerek ortamdan uzaklaştırılmıştır ve ayırma jeli transfer tamponuna alınmıştır. Ayırma jeli boyutunda kesilen 0,45 µm poliviniliden florid (PVDF) membran metanol ile aktive edilerek transfer tamponunda packler ve jel ile birlikte 15 dakika bekletilmiştir. Transfer cihazına önce packin bir kısmı konmuştur ve üzerine membran ve jel yerleştirildikten sonra tekrar pack konarak transfer edilmeye başlanmıştır. Transfer işlemi sonrası membranlar, 1 saat oda sıcaklığında %5'lik sütte (süt tozu 1X TBS içerisinde çözülmüştür) bekletilerek bloklama yapılmıştır.

### 3.2.13.5. Membranları Primer ve Sekonder Antikora Alma

Bloklanan membranlar süttten alınarak 50 ml'lik falkonlarda 1:250, 1:500 ya da 1:1000 oranlarda hazırlanan primer antikorlarla gece boyu +4°C'de roller üzerinde döndürülmüştür.

Kullanılan primer antikorlar β-actin, GAPDH, GH, GHR, GHRH, JAK2, p-JAK2, STAT1, p-STAT1, STAT3, p-STAT3 (Ser727), p-STAT3 (Tyr705), STAT5, p-STAT5, Src, SOCS1, SOCS3, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, E-cadherin, N-cadherin, β-catenin, Vimentin, PARP, Caspase-7, Caspase-3, Caspase-9, Bax, p-Bad (Ser112), Mcl-1, Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, PUMA, Fas, TRADD, FADD, Caspase-2, Caspase-8, Bid, Siklin D1, Rb, p-Rb, p21, p53, PI3K, Akt, p-Akt (Ser473), FoxO3a (Ser253), FoxO3a (Ser318,321), p38, p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), p44/42, p-p44/42, SAPK/JNK, Ras, c-Raf, c-fos, c-jun, c-myc, IKKα, IKKβ, p-IKKα/β, IKBα, p-IKBα (Ser32), NF-kB, p-NF-kB, PPARγ, TRAF2, TRAF3, NIK, P100, p-P100, RelB, AZI, AZ, ODC, PAO, SSAT'dir.

Primer antikor uygulamasının ardından membranlar 3 kere TBS-Tween ile 5'er dakika yıkanarak 1:3000 oranda hazırlanan sekonder atikorlara alınmıştır.

Membranlar gece boyu +4°C’de roller üzerinde döndürülerek proteinlere bağlanmış olan primer antikorlara, sekonder atikorların bağlanması sağlanmıştır.

#### **3.2.13.6. Protein Bantlarının Chemidoc Cihazında Görüntülenmesi**

Sekonder antikor uygulamasının ardından membranlar 2 kere TBS-Tween ve 1 kere TBS ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından membranlar sırayla lumimol ile hazırlanan ECL tampon içerisinde 2-3 dakika bekletildikten sonra Chemidoc cihazında çekim yapılmıştır. Luminol, membranda primer ve sekonderin bağlanmış olduğu proteinin ışınmasını sağlayarak bantların koyu renkte bilgisayar programında görünmesine olanak sağlamaktadır.

#### **3.2.14. Poliamin Miktarlarının Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Tayini**

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücreleri 60 mm’lik hücre kültürü petrisine  $1,0 \times 10^6$  hücre olacak şekilde ekim yapılarak bir gece yapışması beklenen hücrelere 20  $\mu$ M curcumin uygulanmıştır. İlaç uygulandıktan 24 saat sonra hücreler soğuk PBS ile kazınarak 1,5 ml’lik mikrofüj tüplerine toplanmıştır ve 13.200 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında supernatant çekilerek atılmıştır ve 1 ml PBS eklenerek pipetaj ile hücreler iyice karıştırılmıştır. Üzerine 100  $\mu$ l TCA (Trikloroasetik asit) ilave edilerek mikrofüj tüpü alt-üst edilerek karışması sağlanmıştır. Örnekler 14.500 rpm’de 25 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst fazda bulunan PA ekstraktları yeni bir mikrofüj tüpüne geçirilmiştir ve -20°C’de saklanmıştır. Pellet ise 50  $\mu$ l PBS ile çözülerek Bradford yapılmıştır ve protein konsantrasyonları hesaplanmıştır.

-20°C’de bulunan PA ekstraktların PH’ı 1 ml 2M sodyum hidroksit (NaOH) ile ayarlanarak 10  $\mu$ l benzil klorür ilave edilmiştir ve böylece poliaminlere benzil halkası bağlanmıştır. Daha sonra 2 ml 5M sodyum klorür (NaCl) tuz çözeltisi ilave edilerek diğer monomerlerin ve artıkların çökmesi sağlanmıştır. Her tüpe 2 ml dietileter ilave edilerek poliaminlerin çözünmeleri sağlandıktan sonra faz ayrımı ile poliaminler ayrılmıştır. Eppendorf konsantratör ile uçurma yapılarak ortamdan uzaklaştırılan dietileter poliaminlerin dipte çökmelerini sağlamıştır. Bu aşamada kristal formda bulunan poliaminler %60 Metanol içerisinde çözünmüştür ve Applied Biosciences HPLC sistemi kullanılarak hücrelerdeki poliamin seviyeleri ölçülmüştür.

## 4. SONUÇLAR

### 4.1. MDA-MB-453 Meme Kanseri Hücrelerinin Karakteristik Özellikleri

MDA-MB-453 doğal tip hücre hattında büyüme hormonu (GH), büyüme hormonu reseptörü (GHR), büyüme hormonunu serbestleyen hormon (GHRH) ve büyüme hormonunu serbestleyen hormon reseptörü (GHRHR) anlatım durumlarını belirlemek için RT-PCR ve immunoblotlama yöntemi kullanılmıştır. RT-PCR ve immunoblotlama sonuçları birbirini destekleyerek GH, GHR, GHRH ve GHRHR anlatım durumları Tablo 2’de verilmiştir.

**Tablo 2. MDA-MB-453 doğal tip hücre hattında GH, GHR, GHRH ve GHRHR anlatım durumlarının gösterilmesi.**

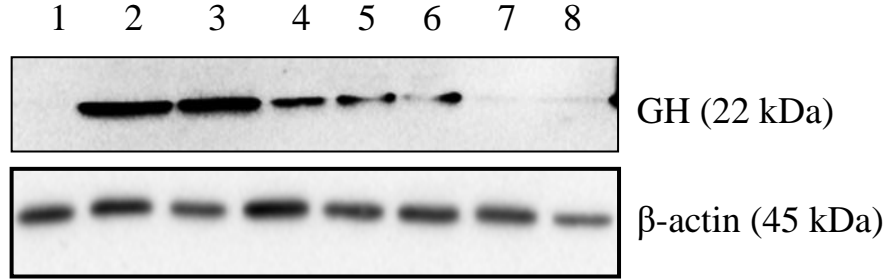
Hücre Hattı	Anlatım durumu			
	GH	GHR	GHRH	GHRHR
MDA-MB-453	-	+	+	-

### 4.2. MDA-MB-453 Meme Kanseri Hücrelerinde PC3.1-GH Plazmiti Aracılığı ile Otokrin GH Anlatımının Arttırılması

MDA-MB-453 meme kanseri hücre hatlarına PC3.1-GH plazmiti aktarılarak MDA-MB-453 hücrelerine otokrin GH anlatımı kazandırılmıştır. Plazmit aktarılmasından sonra stabil hücre hattı oluşturmak amacıyla neomisin ile seçim yapılarak 6 farklı koloni elde edilmiştir. Seçilen kolonilerden protein izolasyonu yapılmış ve SDS-PAGE jelde yürütülerek PVDF membrana transfer edildikten sonra GH anlatımına bakılmıştır.

GH transfekte edilen kolonilerde immunoblotlama sonucuna göre seçilen kolonilerde etkin bir GH transfeksiyonu yapıldığı görülmüş, yapılacak olan

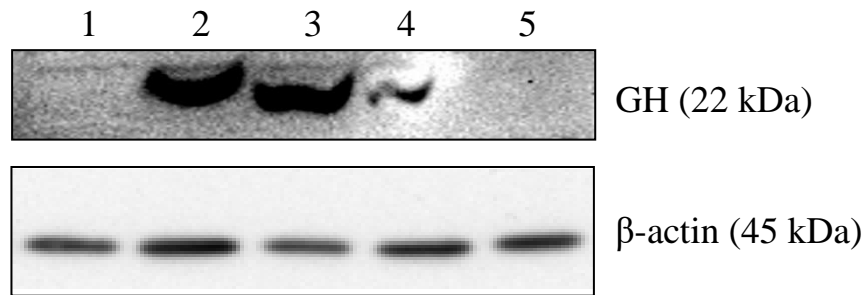
deneylerde kullanılmak üzere GH anlatımı fazla olan 2. koloni seçilmiştir. Bununla beraber MDA-MB-453 doğal tip hücrelerinde ve PC3.1 plazmiti aktarılan hücrelerde GH anlatımının olmadığı belirlenmiştir (Şekil 17).



**Şekil 17. GH transfekte edilen MDA-MB-453 hücre hatlarında GH anlatım seviyesinin belirlenmesi.** 1.MDA-MB-453 doğal tip, 2-7. PC3.1-GH plazmit transfeksiyon sonrası neomisin ile seçilen klonlar, 8.MDA-MB-453 PC3.1 hücresi.

### 4.3. Otokrin GH Anlatımı Gerçekleştirilen MDA-MB-453 Hücrelerinde GH Anlatımının Bazal Seviyesinin İmmunoblotlama Tekniği ile Belirlenmesi

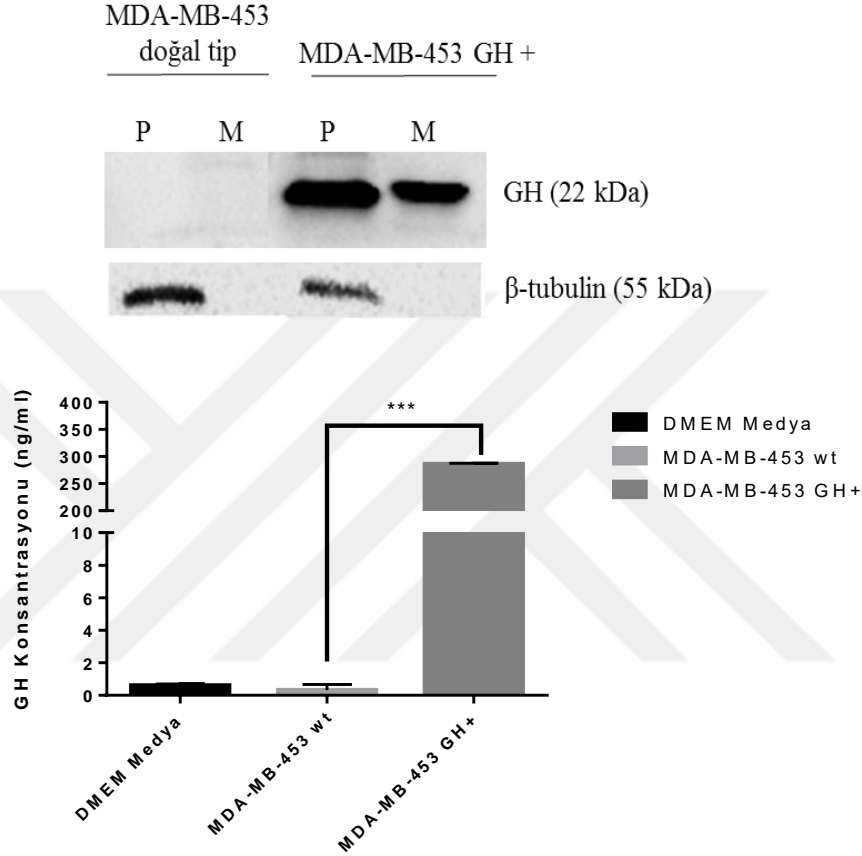
Transfeksiyon sonrası GH anlatımının daha fazla olduğu belirlenen 2. koloniden stabil hücre hattı oluşturulmuş ve bu hücre hattından 24, 48 ve 72 saatlik protein izolasyonu yapılarak hücre içindeki otokrin GH seviyesinin zamana bağlı olarak anlatımına bakılmıştır. Yapılan immunoblotlama sonucunda hücre içi bazal GH anlatımının 48 saatten sonra azaldığı belirlenmiştir (Şekil 18).



**Şekil 18. MDA-MB-453/GH+ meme kanseri hücrelerinde zamana bağlı bazal GH anlatımının immunoblotlama ile gösterilmesi.** 1.MDA-MB-453 doğal tip, 2.MDA-MB-453 GH+ 24 saat, 3.MDA-MB-453 GH+ 48 saat, 4.MDA-MB-453 GH+ 72 saat, 5.MDA-MB-453 PC3.1 hücresi.



MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde medya ve protein izolasyonu sonucu elde edilen pellette GH miktarı immunoblotlama tekniği ve Eliza yöntemi ile tayin edilmiştir. Doğal tip hücrelerde medya ve pellette GH varlığı bulunmaz iken GH+ transfekte yapılan MDA-MB-453 hücrelerinde GH varlığı saptanmıştır (Şekil 19).

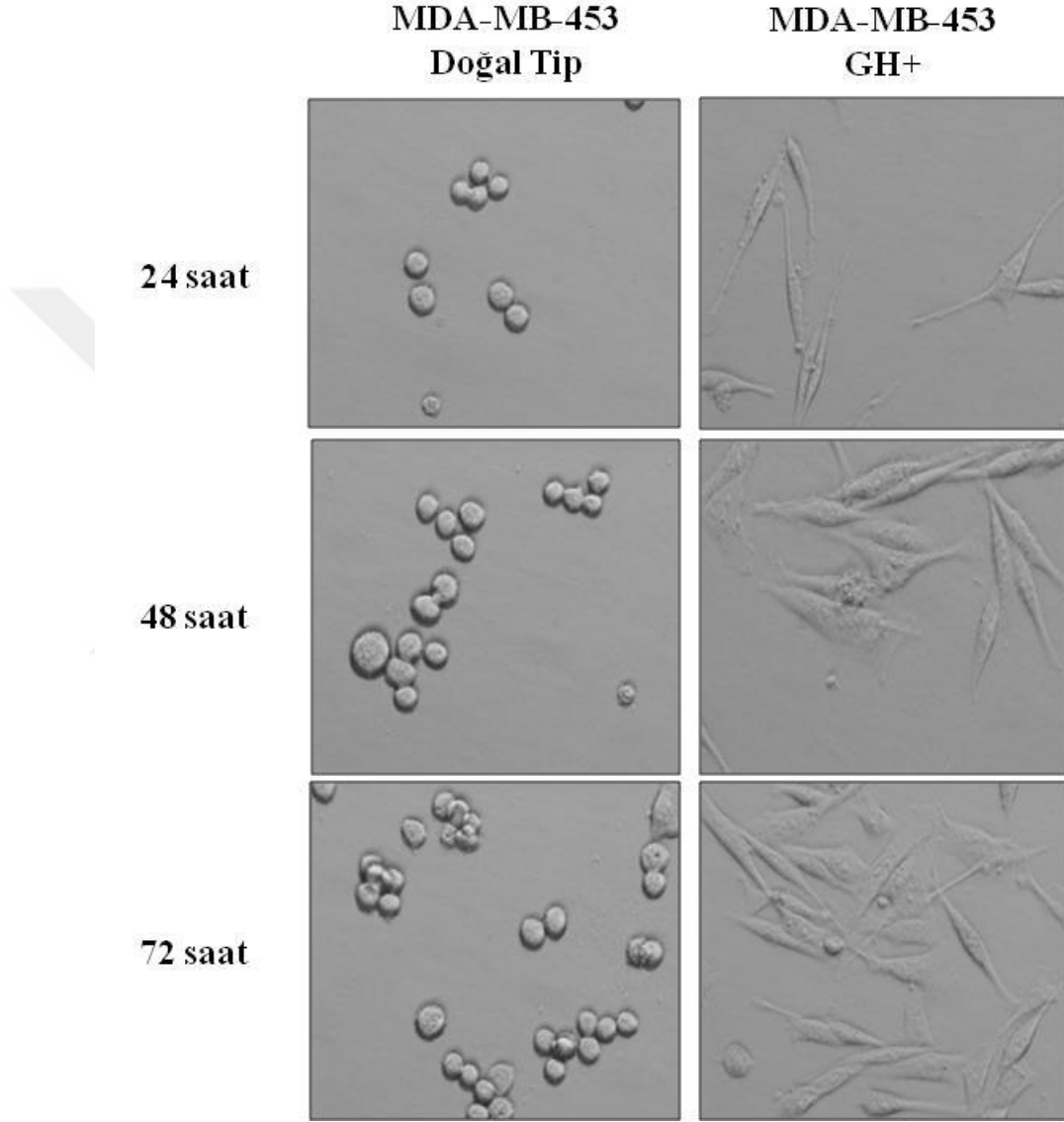


Şekil 19. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde GH varlığının immunoblotlama ve Eliza yöntemi ile gösterilmesi (P: Hücre lizati, M: Hücre kültürü medium) \*\*\*p<0,0001.

#### 4.4. MDA-MB-453 Doğal tip ve Otokrin GH Anlatımı Gerçekleşen Meme Kanseri Hücre Hatlarının Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Otokrin GH anlatımı gerçekleştirilen MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinin morfolojik özellikleri ışık mikroskobu ile belirlenmiştir. Doğal tip ve otokrin GH anlatımı gerçekleştirilen MDA-MB-453 hücrelerindeki morfolojik farklılıklar ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonundaki değişimler 24, 48 ve 72

saat boyunca görüntülenmiştir. Işık mikroskobu görüntülerine bakıldığında doğal tip MDA-MB-453 hücrelerinin GH transfekte edilmiş hücre hattına göre daha yuvarlak morfolojide olduğu görülmüştür. Otokrin GH anlatımı kazandırılmış hücrelerde zamana bağlı olarak doğal tip hücre hattına göre morfolojilerinin değişerek daha hızlı büyüdüğü belirlenmiştir (Şekil 20).

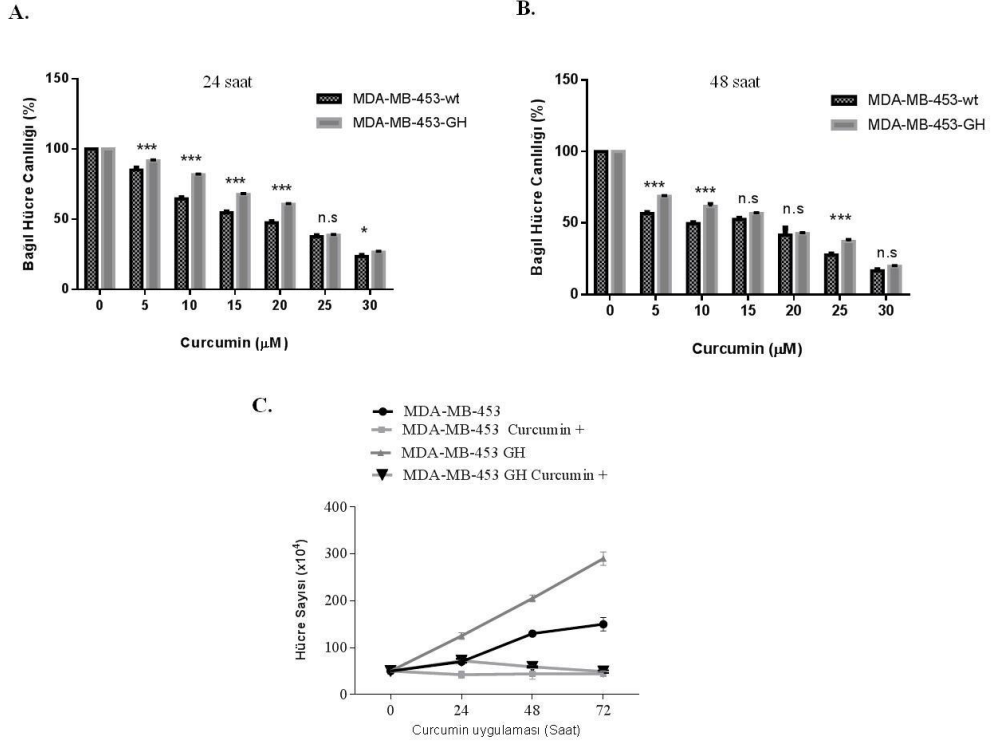


Şekil 20. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında zamana bağlı olarak hücre morfolojilerindeki değişikliklerin belirlenmesi.

#### **4.5. Doğal tip ve Otokrin GH Anlatımı Gerçekleştirilen MDA-MB-453 Meme Kanseri Hücrelerinde Curcuminin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Gösterilmesi**

MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde otokrin GH anlatımının curcumin ile indüklenen hücre ölümü üzerine etkisini belirlemek amacıyla MTT tekniği kullanılmıştır. Doğal tip ve MDA-MB-453 GH+ hücrelerine artan dozlarda 24 ve 48 saat boyunca curcumin uygulanmıştır. Yapılan MTT sonucunda curcuminin doğal tip MDA-MB-453 hücre hattında hücre canlılığını azalttığı görülürken GH anlatımı gerçekleştirilen MDA-MB-453 meme kanseri hücre hatlarının ise daha dirençli olduğu görülmüştür. Daza bağlı 48 saat uygulanan curcuminde ise GH aktarılan hücrelerde bu direncin 20 µM curcumin uygulaması ile kırıldığı görülmüştür.

Seçilen 20 µM curcumin dozunun hücre sağ kalımı üzerine etkisini belirlemek amacıyla sağ kalım analizi gerçekleştirilmiştir. Sağ kalım analizi sonuçlarına bakıldığında, doğal tip ve otokrin GH anlatımı gerçekleştirilen MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinin kontrol grupları karşılaştırılacak olursa GH anlatımı ile birlikte hücre proliferasyonunda zamana bağlı olarak önemli derecede bir arttığı belirlenmiştir. Curcumin uygulanan doğal tip hücre hattında zaman bağlı olarak hücre büyümesi azalırken GH transfekte edilen MDA-MB-453 hücrelerinde ise 24 saate bir direnç oluştuğu 48 saatle beraber bu direncin kırılarak hücre büyümenin baskılandığı belirlenmiştir (Şekil 21).

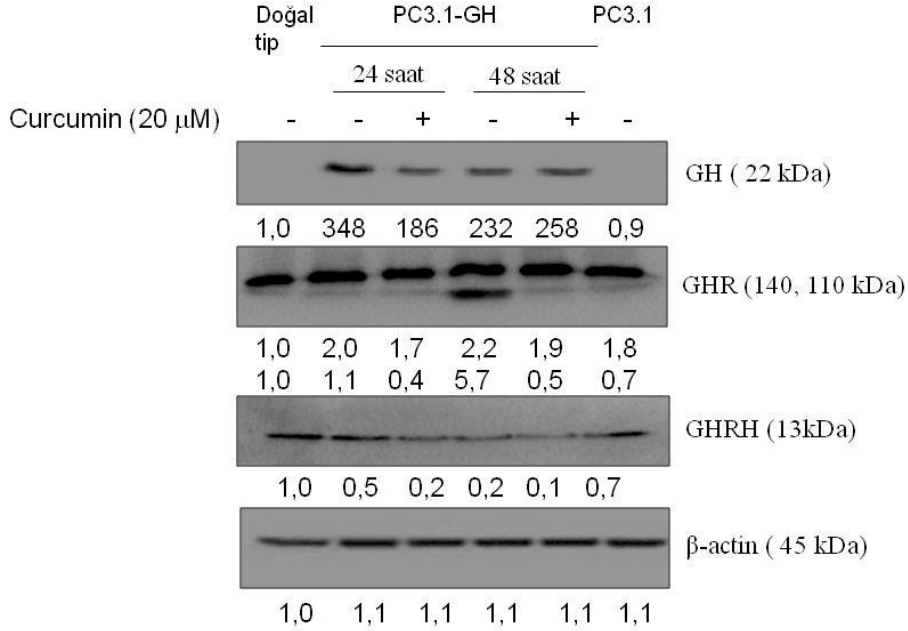


Şekil 21. MDA-MB-453 doğal tip ve GH transfekte edilmiş hücre hatlarında doza bağlı curcuminin uygulamasının hücre canlılığına etkisinin belirlenmesi. A. 24 saat B. 48 saat doza bağlı curcuminin hücre canlılığına etkisi. C. 20 µM curcumin uygulamasının hücre büyümesi üzerindeki etkisi.

#### 4.6. Curcuminin GH Sinyali ve JAK-STAT Sinyal Yolağı Üzerine Etkisinin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde İrdelenmesi

Curcumin'in GH sinyali üzerindeki etkisinin irdelenmesi için GH anlatımı arttırılan MDA-MB-453 hücrelerine 24 ve 48 saat curcumin uygulamasını takiben izole edilen protein özütlerinde GH, GHR, GHRH anlatımları immunoblotlama ile irdelenmiştir. MDA-MB4-53 GH+ hücrelerine 24 saatte 20 µM curcumin uygulamasının hem GH hem de GHRH anlatımında ilaç uygulanmayan MDA-MB-453 GH+ hücelere kıyasla belirgin şekilde baskıladığı tespit edilmiştir. GH anlatımının MDA-MB-453 GH+ hücrelerinde ilaç uygulamasıyla birlikte bu etkinin devamlılığını koruduğu belirlenmiştir. GHR anlatımı GH anlatımı arttırılan MDA-MB-453 meme kanseri hücresinde 24 saatte curcumin uygulamasıyla azalmıştır. 48 saatte ise kontrol ile ilaç uygulanan hücreler arasındaki GHR anlatımında çok fazla değişiklik görülmemiştir. Doğal tip MDA-MB-453 ve MDA-MB-453 PC3.1 meme

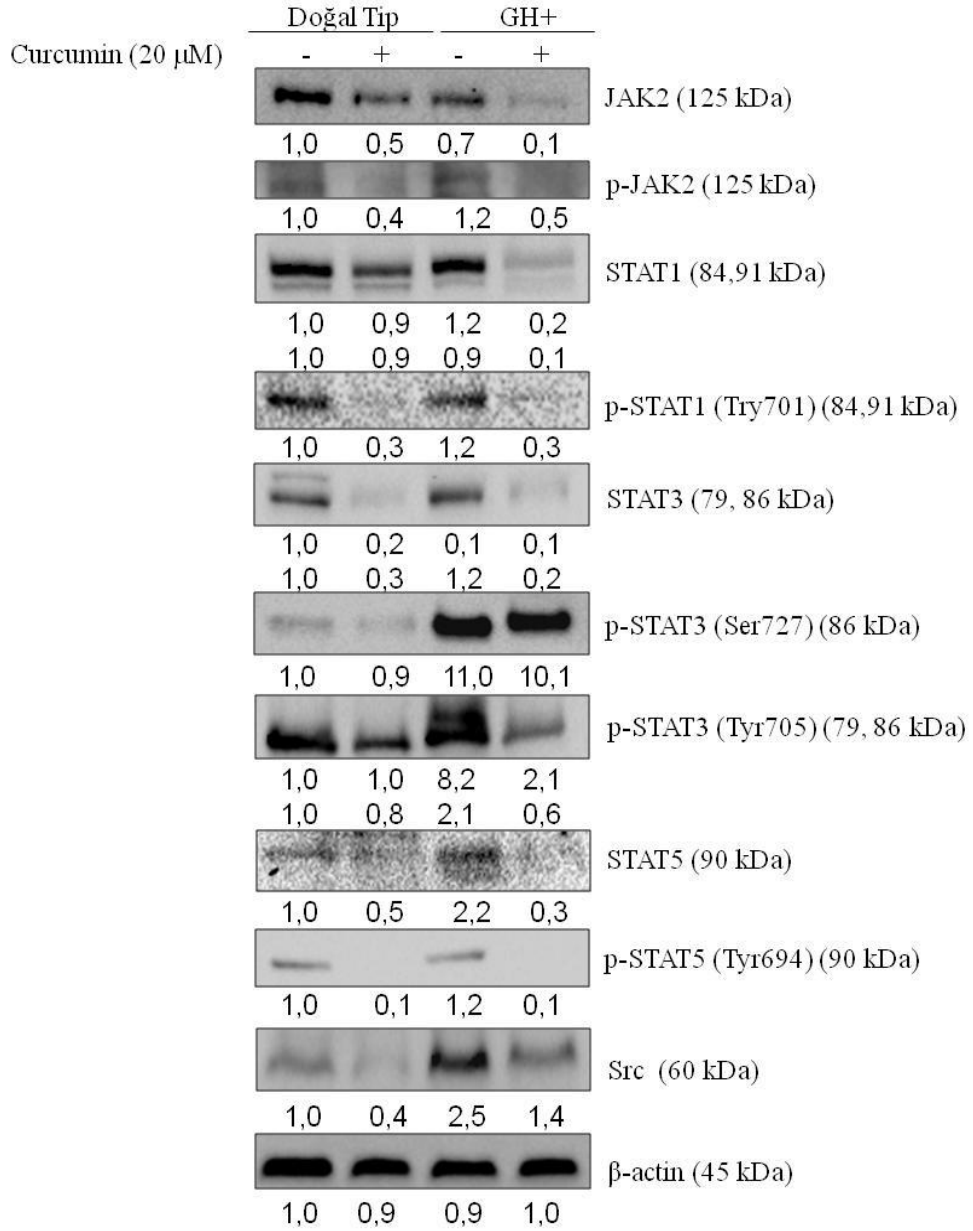
kanseri hücre hatlarında ise GHR nin anlatımı aynı seviyede tespit edilmiştir. GHRH anlatımı ise GH anlatımı olan MDA-MB-453 meme kanseri hücresinde ilaç uygulamasıyla birlikte azalış göstermekle birlikte kontrol gruplarında da zamana bağlı olarak anlatımının azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 22).



**Şekil 22. MDA-MB-453 doğal tip ve transfekte edilen GH+ ve PC3.1 hücre hatlarında curcuminin zamana bağlı GH, GHR ve GHRH anlatımına etkisinin gösterilmesi.**

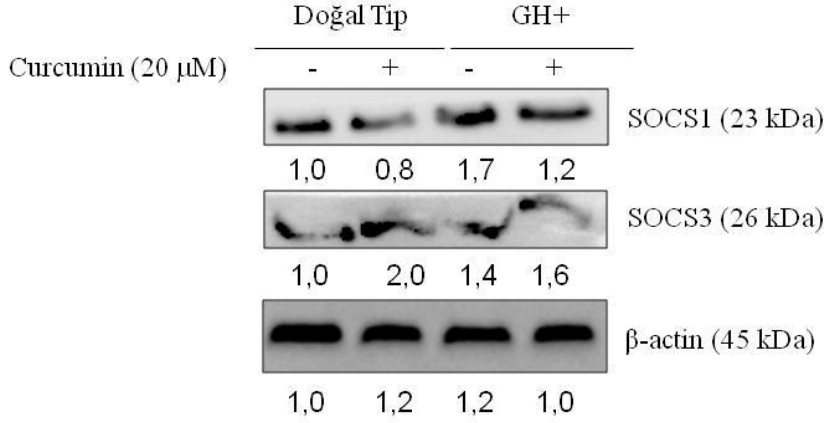
GH sinyalinin aşağı sinyal anahtar molekülü olan STAT5 anlatımının MDA-MB-453 doğal tip hücrelere kıyasla GH+ hücrelerinde fazla olduğu ve curcumin ile STAT5 anlatımında azalış olması ile birlikte biyolojik olarak aktif olan pSTAT5 (Tyr694) defosforile olduğu tespit edilmiştir. Plazmit aracılığı ile GH anlatımı arttırılan MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde GH sinyalinin biyolojik olarak aktif olabilmesi için gerekli olan STAT5 Tyr694 fosforilasyonunun MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde ilaç uygulamasına bağlı olarak defosforile olduğu gösterilmiştir. GH anlatımı arttırılan MDA-MB-453 hücrelerine göre JAK2 anlatımı daha fazla olan doğal tip hücrelerinde curcumin uygulaması ile birlikte sinyal tepeden bakılındığı gösterilmiştir. Hücre sağ kalımı, proliferasyonu, invazyon, metastaz ve anjiyogenez ile ilişkisi bilinen Src, STAT1 ve STAT3 anlatımı curcumin ile MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde baskılandığı gösterilmiştir. Aynı zamanda STAT1 Tyr701 fosforilasyonu ve STAT3 Tyr705 fosforilasyonu curcumin ile her iki hücre hattında da baskılanmaktadır. STAT3 Ser727 fosforilasyonu az olan MDA-MB-453 doğal tip hücrelerinde curcumin ile baskılanmasına rağmen GH+

hücrelerinde fosforilasyonun değişmemesi diğer sinyal yolları ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (Şekil 23).



**Şekil 23. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin JAK/STAT sinyal yolağı üzerine etkisinin gösterilmesi.**

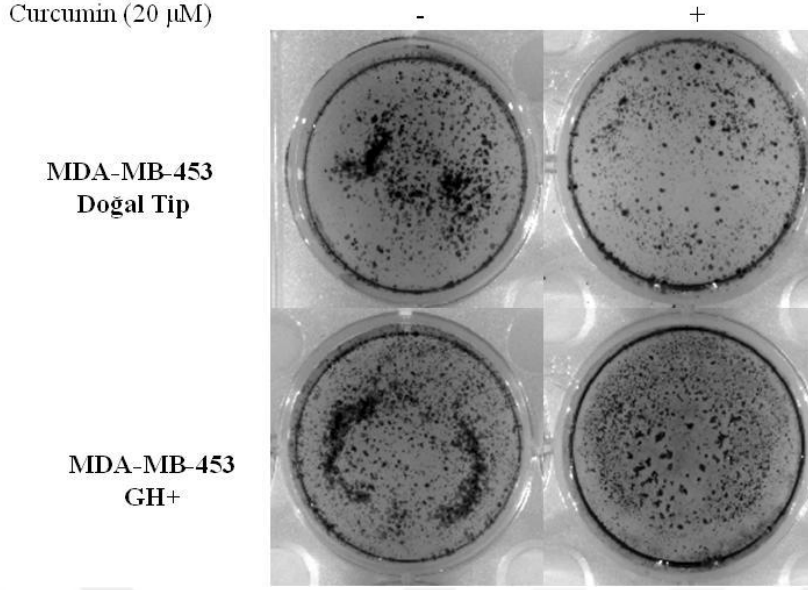
JAK2, STAT1, STAT5 ve aynı zamanda NF-κB p65 inhibitörü olan SOCS1 MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcumin ile birlikte baskılanarak SOCS1 proteininin JAK/STAT yolağı üzerinde inhibe edici etkisinin olmadığını göstermiştir. STAT3 inhibitörü olan SOCS3 ise curcumin ile MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde artarak STAT3'ün baskılanmasını sağlamaktadır (Şekil 24).



**Şekil 24. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcumin ile JAK/STAT inhibitörleri üzerine etkisinin gösterilmesi.**

#### **4.7. Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde Koloni Oluşumu Üzerine Etkisi**

MDA-MB-453 GH+ meme kanseri hücrelerinde GH anlatımının arttırılmasına bağlı olarak koloni oluşturma üzerine etkisi irdelendiği MDA-MB-453 doğal tip hücrelere kıyasla zamana bağlı koloni oluşturma durumu GH anlatımı arttırılan MDA-MB-453 GH+ meme kanseri hücrelerinde daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Curcumin uygulamasının zamana bağlı olarak MDA-MB-453 doğal tip hücrelerinde koloni oluşumunu belirgin bir şekilde baskıladığı tespit edilmiştir. Ayrıca curcuminin MDA-MB-453 GH+ meme kanseri hücrelerinde de zamana bağlı koloni oluşumunu baskıladığı tespit edilmiştir (Şekil 25).

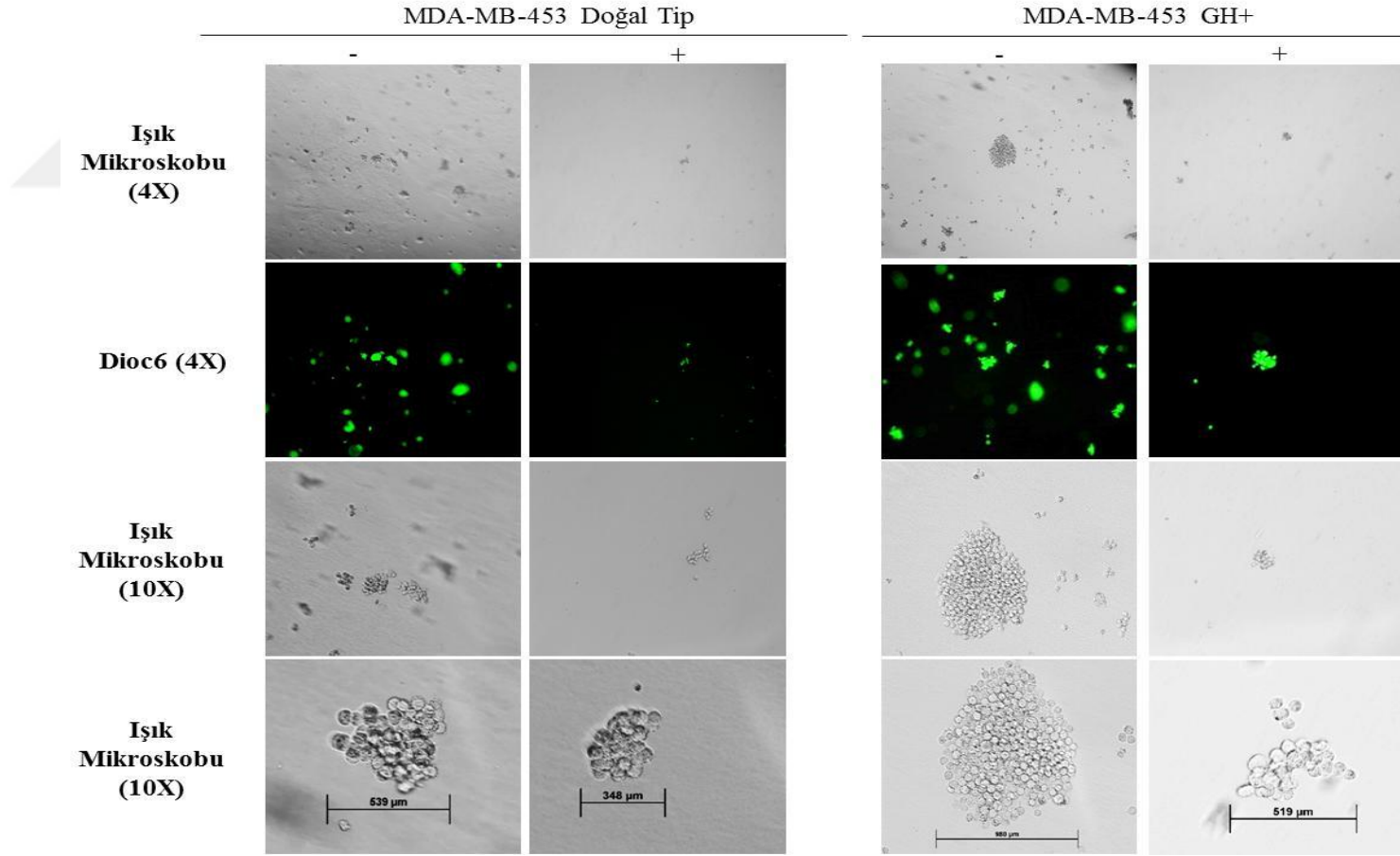


Şekil 25. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi.

#### 4.8. Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde Soft Agar ile Koloni Oluşumu Üzerine Etkisi

Curcuminin MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde koloni oluşumu üzerine etkisinin soft agar ile gösterilmiştir. MDA-MB-453 doğal tip meme kanseri hücrelerinin 525 µm çapında koloni oluşturdukları tespit edilirken, GH anlatımı artırıldığında MDA-MB-453 hücrelerinin koloni çapları 832 µm olarak yükseldiği tespit edilmiştir. 20 µM curcumin uygulamasının hem doğal tip hem de MDA-MB-453 GH+ hücrelerinin koloni oluşturma durumları irdelendiği zamana doğal tip hücreler 348 µm çapında koloni oluştururken, GH+ hücrelerin koloni çapları curcumin uygulaması ile 472 µm olarak tespit edilmiştir. Soft agar deney sonucuna göre GH anlatımının artırılmasına bağlı aktif GH sinyal durumunun MDA-MB-453 GH+ meme kanseri hücrelerinde koloni oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir. Ayrıca curcumin uygulamasının MDA-MB453 hücrelerinin koloni oluşumu üzerine ket vurucu etkisi görülmüştür. GH+ anlatımın artırılmasının koloni oluşumunu doğal tipe kıyasla yüksek oranda arttırmış olsa da curcumin uygulamasının bu etkiyi baskıladığı tespit edilmiştir (\*\*p= 0.0081, Şekil 26).

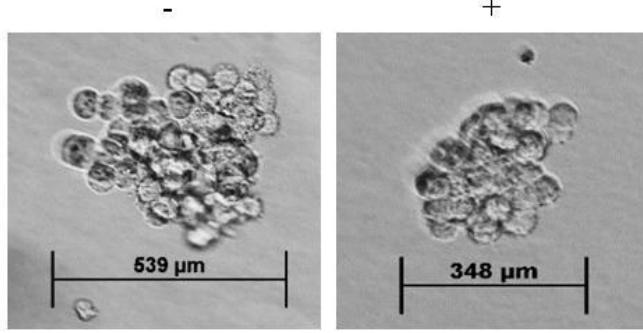




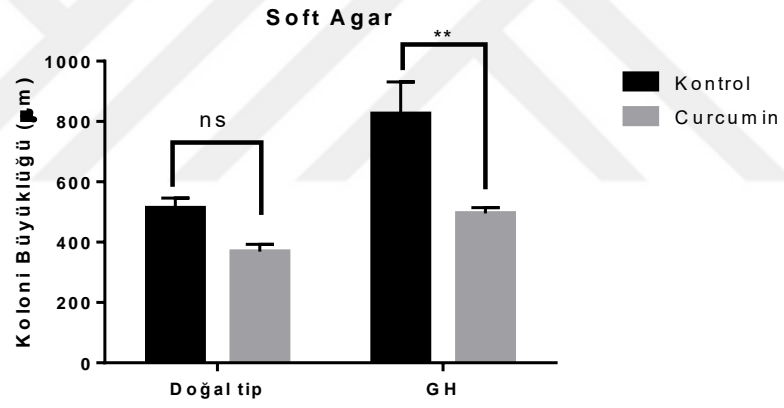
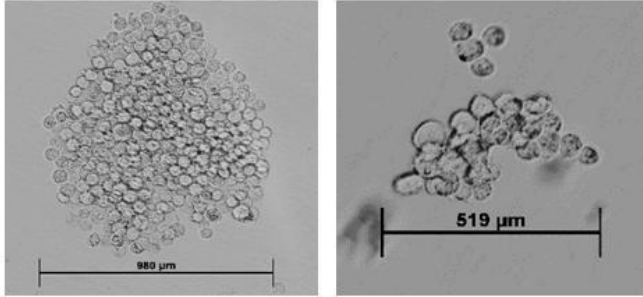
Şekil 26. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin soft agarda koloni oluşumu üzerine etkisinin ışık ve DiOC<sub>6</sub> boya ile floresan çekiminin gösterilmesi.

Curcumin (20 µM)

MDA-MB-453  
Doğal Tip



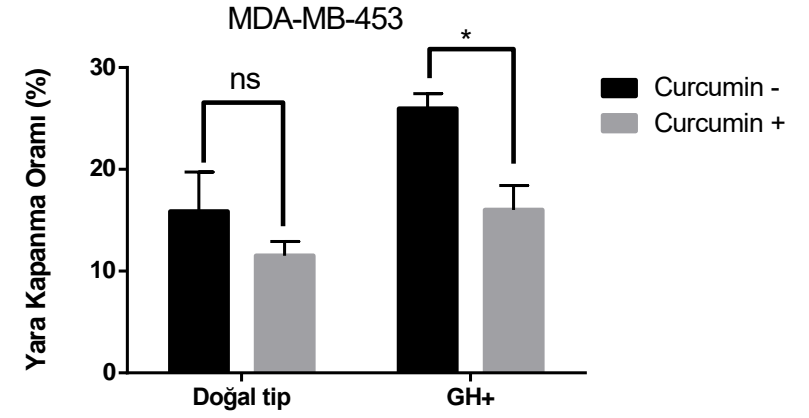
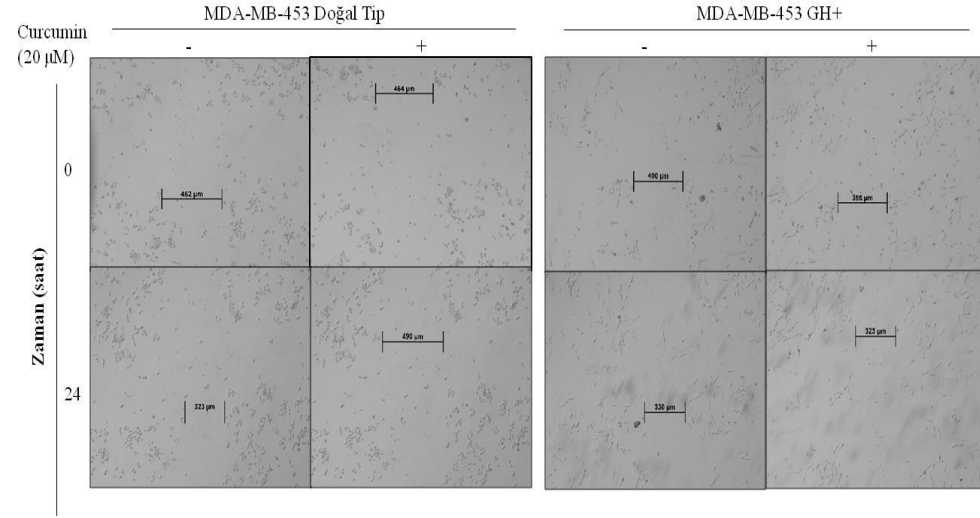
MDA-MB-453  
GH +



Şekil 27. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin soft agarda koloni oluşumu üzerine etkisinin gösterilmesi (Büyütme: 40X, ns: istatistiksel olarak farklı değildir, \*\*p< 0.05).

#### **4.9. Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkisi**

MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde aktif GH sinyalinin invazyon üzerine etkinin gösterilmesi için MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde oluşturulan yaranın kapanma durumu 0-24 saat aralıklarında çekim yapılarak ölçülmüştür. MDA-MB-453 doğal tip hücrelerinde 0. saatte oluşturulan yara aralık uzunluğu 453 µm olarak belirlenmiş ve oluşturulan yaranın kapanma durumu 24. saatte 323 µm olarak ölçülmüştür. Ayrıca MDA-MB-453 GH+ meme kanseri hücrelerinde ise yara mesafesi, 0. saatte aralık uzunluğu 400 µm ve 24. saatte 307 µm olarak ölçülmüştür. Böylece hem doğal tip hem de GH+ MDA-MB-453 meme kanseri hücresinde zamana bağlı olarak yaranın büyük ölçüde kapanma durumunda olduğu belirlenmiştir. Curcuminin MDA-MB-453 doğal tip hücre hattında yara kapanma üzerinde ket vurucu etkisi tespit edilirken (0. saatte 464 µm, 24. saatte 490 µm), GH anlatımı arttırılan MDA-MB-453 hücre hattında ise yara kapanmasının sabitlendiği görülmüştür (0. saatte; 395 µm, 24. saatte 323 µm). Sonuç olarak GH anlatımı arttırılan MDA-MB-453 meme kanseri hücresinin doğal tip meme kanseri hücresine göre 24 saatte ilaca karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir (Şekil 28, \*\*p= 0,0079).



Şekil 28. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin yara iyileşmesi üzerine etkisinin gösterilmesi (ns:  $p > 0,05$ ;  $**p < 0,05$ ).

#### **4.10. Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde İnvazyon-Metastaz Üzerine Etkisi**

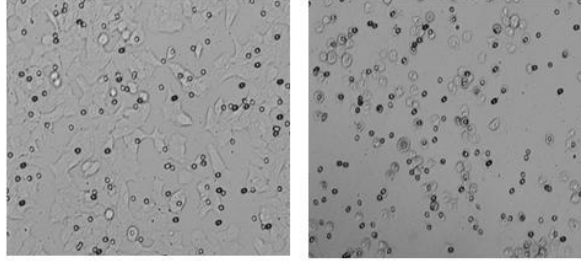
MDA-MB-453 doğal tip hücrelerinde GH anlatımı arttırılmış MDA-MB-453 ve doğal tip MDA-MB-453 hücrelerinde 20  $\mu$ M curcuminin metastaz üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla BioCoat matrigel invazyon kuyucuklarına ekilen hücreler 24 saat boyunca petri ve filtre ışık mikroskobunda görüntülenmiştir. Doğal tip ve GH+ MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde curcumin ile birlikte 24 saatte kuyucukta bulunan hücrelerin sayısı azalmakta fakat GH+ hücrelerindeki azalma doğal tip hücrelerine oranla daha azdır. GH+ hücrelerinde direnç olmasına rağmen curcumin invazyonu baskılamaktadır (Şekil 29, doğal tip \*\*p= 0,0029; GH+ \*\*p= 0,0080).

Curcumin (20 µM)

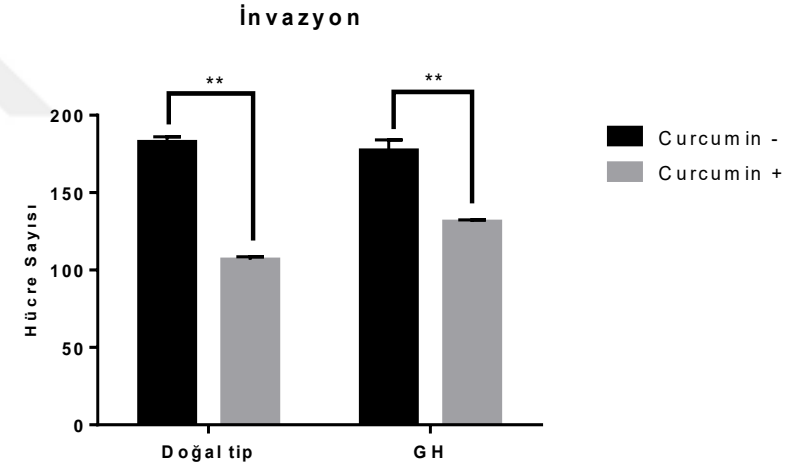
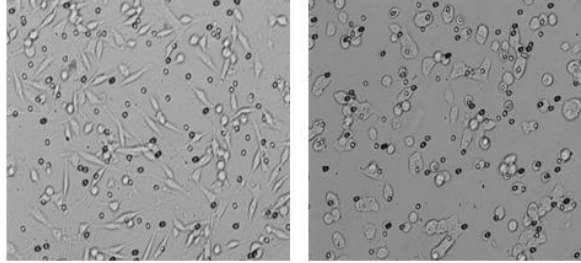
-

+

MDA-MB-453  
Doğal Tip



MDA-MB-453  
GH+



Şekil 29. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin invazyon üzerine etkisinin gösterilmesi (\*\*p< 0,05).

Doğal tip MDA-MB-453 meme kanseri hücresinde ilaçla birlikte 24 saatte kontrol grubuna oranla alt petrideki hücre sayısının azaldığı görölmektedir. GH anlatımı olan MDA-MB-453 meme kanseri hücresinde kontrol grubunda 24 saatte giderek alt petrideki hücre sayısının arttığı tespit edilmiştir. İlaçla birlikte alt petrideki hücre sayısı zamana bağlı olarak azalmıştır. Sonuç olarak 20 µM curcumin ile birlikte metastazın GH anlatımı olan ve doğal tip MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde azaldığı ve GH anlatımı olan hücrelerin ilaca karşı daha dirençli olduğu belirlenmiştir (Şekil 30).

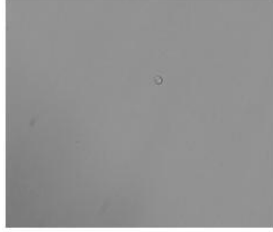
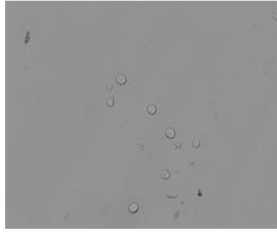


Curcumin (20 µM)

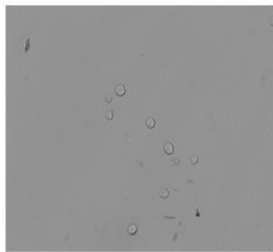
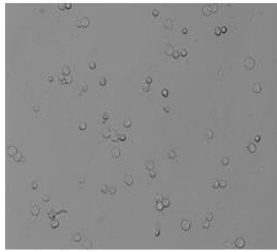
-

+

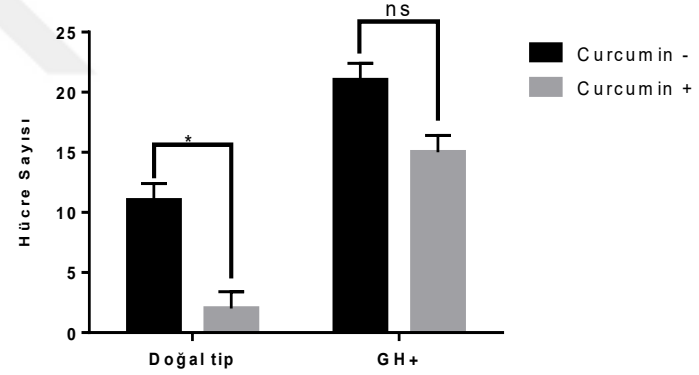
MDA-MB-453  
Doğal Tip



MDA-MB-453  
GH+



Metastaz

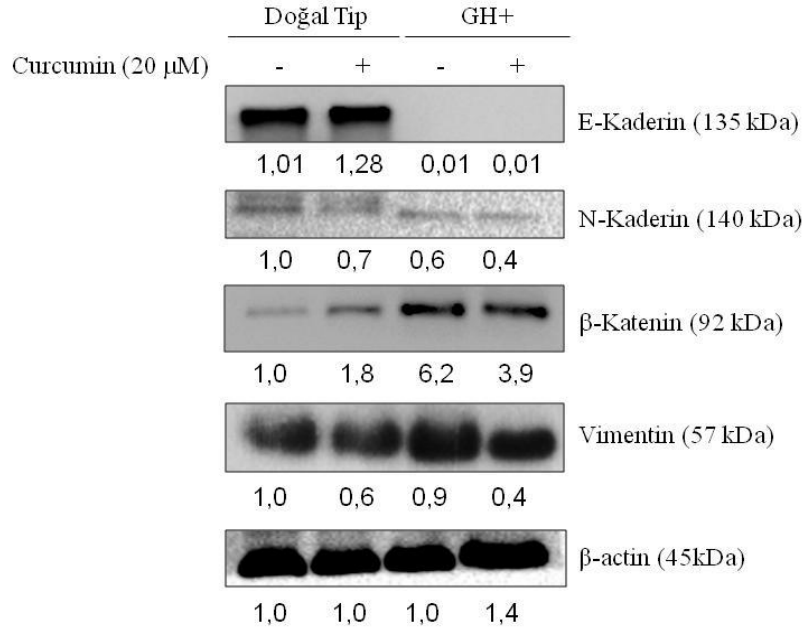


Şekil 30. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin metastaz üzerine etkisinin gösterilmesi (ns>0,05 \*p<0,05).



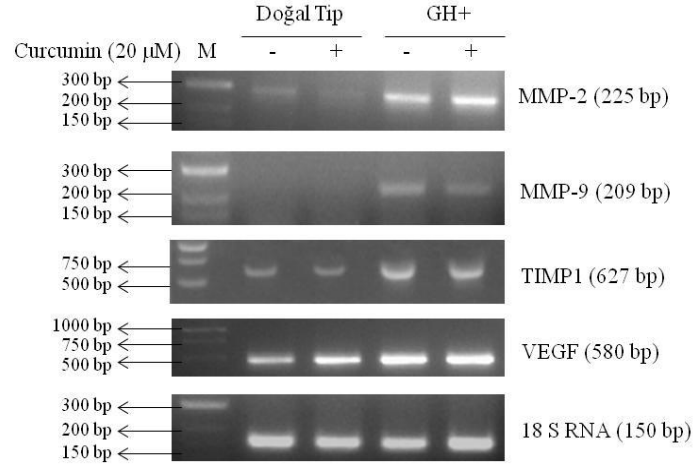
#### **4.11. Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde EMT Üzerine Etkisi**

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin EMT üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla immnuoblotlama tekniği kullanılarak hücrelerdeki anlatım seviyelerine bakılmıştır. Epitel markır olarak E-Kaderin ve  $\beta$ -catenin, mezenkimal markır olarak N-Kaderin ve Vimentin kullanılmıştır. E-Kaderin epitel hücreleri başta olmak üzere ektoderm veya endoderm kaynaklı proliferen olan tüm epitel hücrelerden eksprese edilmektedir. Tümör hücrelerinin düzensiz davranışı nedeniyle hücre-hücre ilişkisi tümörlerde bozulmuştur. E-Kaderin, hücrenin hareketlilik özelliğinin yok olmasına neden olan anahtar bir moleküldür. MDA-MB-453 doğal tip hücrelerinde 20  $\mu$ M curcumin uygulaması sonucunda 24 saatte E-kaderin anlatımının az da olsa arttığı ve GH+ hücrelerinde ise E-Kaderin anlatımı olmadığı görülmüştür.  $\beta$ -catenin doğal tip hücrelerde curcumin ile artmakta, GH+ hücrelerde ise değişmemektedir. N-Kaderin epitel hücrelerin mezenkimal hücrelere geçinde rol oynamaktadır ve bu durum da hücrenin hareketlilik kazandığını göstermektedir. N-Kaderin MDA-MB-453 doğal tip hücrelerde curcumin ile baskılanmakta iken GH+ hücrelerinde değişmemiştir. Buna bağlı olarak  $\beta$ -catenin göçü GH+ hücrelerinde devam etmektedir. Dolayısıyla mezankimale geçiş MDA-MB-453 GH+ hücre hattında devam etmektedir. Vimentin de mezankimale geçişte önemli rol oynayan bir proteindir ve anlatımının MDA-MB-453 GH+ hücrelerinde doğal tipe oranla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Curcumin uygulamasıyla beraber MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde Vimentin anlatımı 24 saatte azalmıştır (Şekil 31).



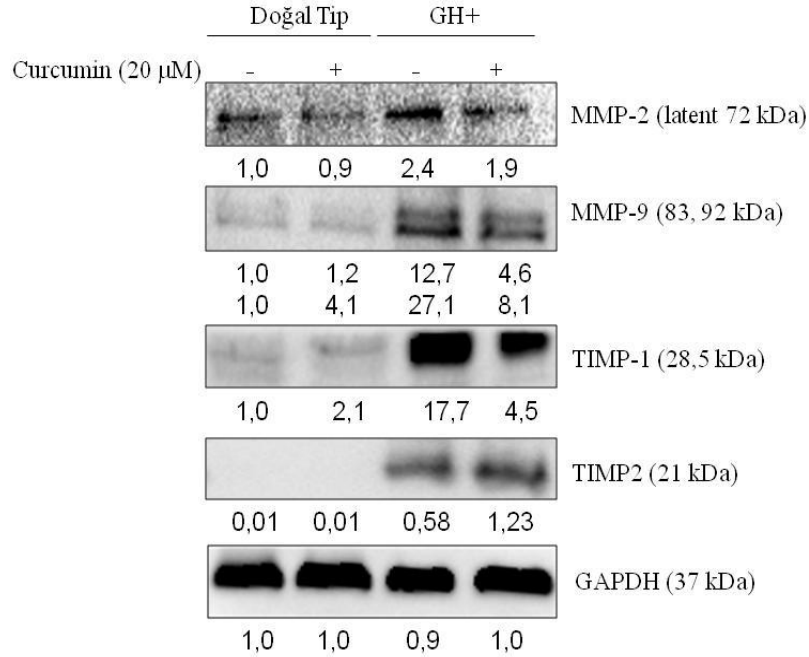
**Şekil 31. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin EMT üzerine etkisinin immunoblotlama tekniği ile gösterilmesi.**

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin matriks metalloproteinaz 2 (MMP-2) anlatım seviyesi üzerine etkisinin mRNA seviyesinde gösterilebilmesi amacıyla RT-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. MDA-MB-453 GH+ hücre hattında MDA-MB-453 doğal tip hücre hattına oranla MMP-2 mRNA düzeyinde önemli derecede artış saptanmıştır. Doğal tip hücrelerde MMP-2 mRNA düzeyi düşük olmakla birlikte curcumin ile MMP-2 mRNA düzeyinde azalma belirlenmiştir. GH+ hücre hattında ise MMP-2 mRNA düzeyi fazla olmakla birlikte curcumin ile MMP-2 mRNA düzeyi artmaktadır. MMP-9 mRNA düzeyi doğal tip hücrelerde çok düşük olmakla birlikte GH+ hücrelerinde artış görülmektedir. GH+ hücre hattında curcumin ile MMP-9 mRNA düzeyinin azaldığı görülmektedir. Doğal tip hücrelerde TIMP1 mRNA düzeyi curcumin ile değişmemekte ve GH+ hücrelerinde az da olsa azalmaktadır. GH+ hücre hattında ise curcumin ile birlikte TIMP1 mRNA düzeyinin azaldığı görülmektedir. VEGF mRNA düzeyi düşük olan MDA-MB-453 doğal tip hücrelerinde curcumin ile birlikte VEGF mRNA düzeyinin arttığı görülmektedir. VEGF mRNA düzeyi fazla olan MDA-MB-453 GH+ hücrelerinde ise curcumin ile birlikte VEGF mRNA düzeyinde çok fazla değişim görülmemektedir (Şekil 32).



**Şekil 32. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin matriks metalloproteinazlar üzerine etkisinin PCR ile gösterilmesi.**

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin MMPler üzerine etkisi aynı zamanda immunoblotlama tekniği ile gösterilmiştir. MMP-2 ve MMP-9 anlatımı fazla olan GH+ hücrelerinde curcumin ile hem doğal tip hem de GH+ hücrelerinde anlatım baskılanmakta ve MMP-9 inhibitörü olan TIMP-1 curcumin ile doğal tip hücrelerde artarken GH+ hücrelerinde azalmaktadır. MMP-2 inhibitörü olan TIMP-2 anlatımı doğal tip hücrelerde olmamakla birlikte GH+ hücrelerinde TIMP-2 anlatımı curcumin ile artmaktadır (Şekil 33).

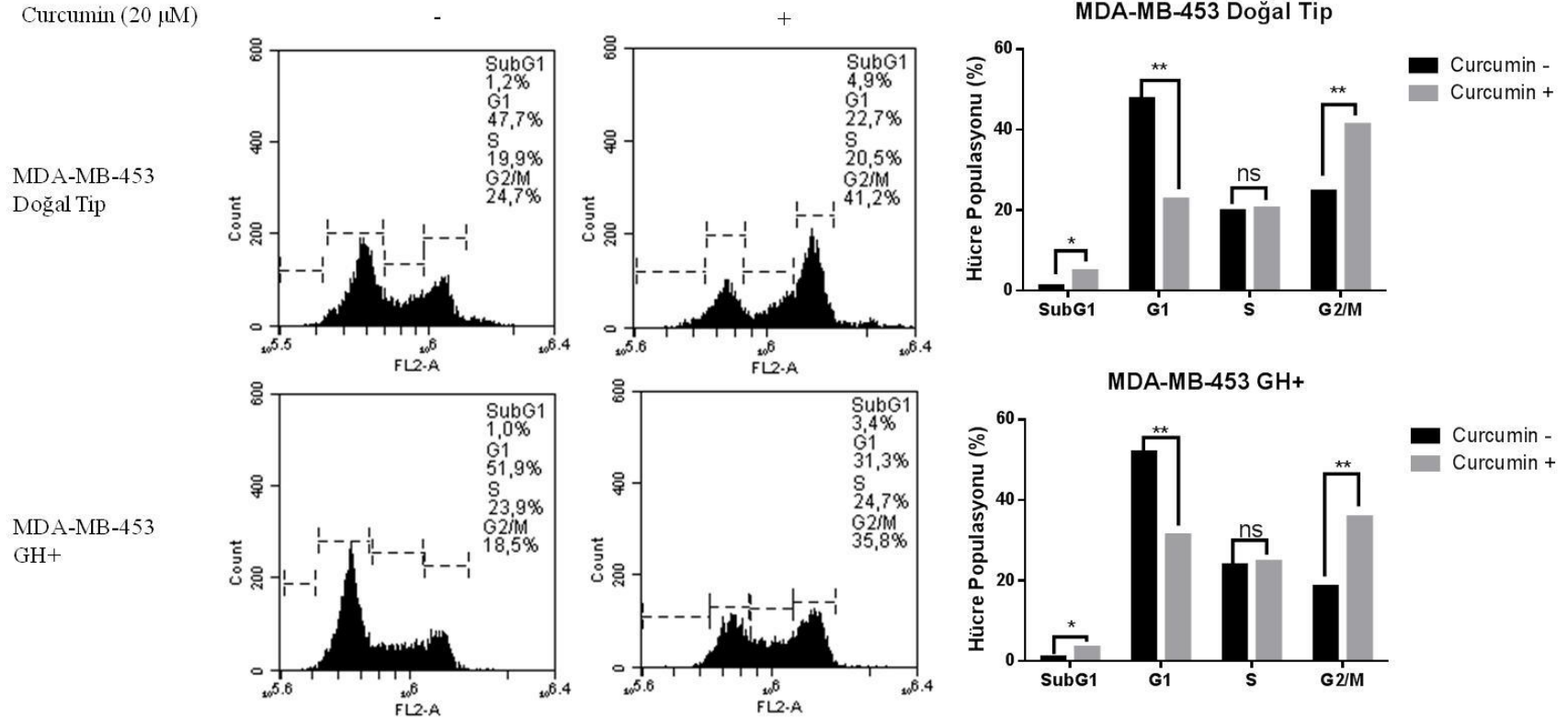


**Şekil 33. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin Matriks Metalloproteinazlar üzerine etkisinin immunoblotlama tekniği ile gösterilmesi.**

#### **4.12. Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde Akış Sitometresi ile Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisi**

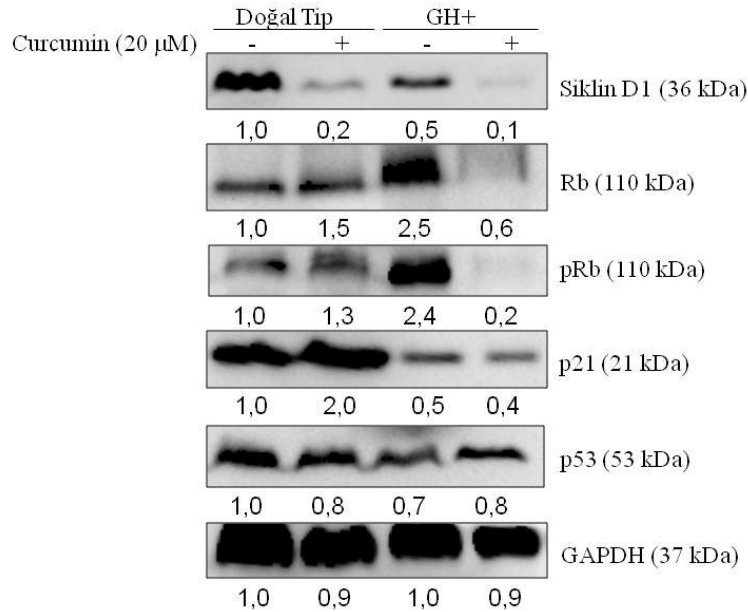
MDA-MB-453 doğal tip ve MDA-MB-453 GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcumin uygulanarak hücre döngüsü üzerindeki etkisi PI boya ile birlikte akış sitometresinde gösterilmiştir. MDA-MB-453 doğal tip hücre hattında curcumin uygulanması sonucu SubG1 popülasyonunda artış görülmektedir. Kontrol hücrelerinde SubG1 popülasyonu %1,2 iken curcumin uygulanan hücrelerde %4,9'a yükselmiştir. GH anlatımı arttırılan MDA-MB-453 hücresinde ise kontrol grubunda SubG1 popülasyonu %1 iken curcumin uygulaması ile %3,4'e yükselmiştir. Curcumin ile SubG1 popülasyonunun artması MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde apoptotik hücre ölümünün tetiklendiğini göstermektedir.

MDA-MB-453 doğal tip hücrelerde curcumin uygulanması sonucu G2/M popülasyonu %24,7'den %42,2'ye yükselmiştir. MDA-MB-453 GH+ hücrelerinde ise curcumin uygulanması sonucu G2/M popülasyonu %18,5'den %35,8'e yükselmiştir. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında curcumin ile birlikte G2/M popülasyonundaki artış hücre döngüsüne G2/M fazında ket vurmaktadır (Şekil 34).



Şekil 34. Curcuminin MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde hücre döngüsü üzerindeki etkisinin gösterilmesi (ns>0,05; \*p<0,05; \*\*p<0,0001).

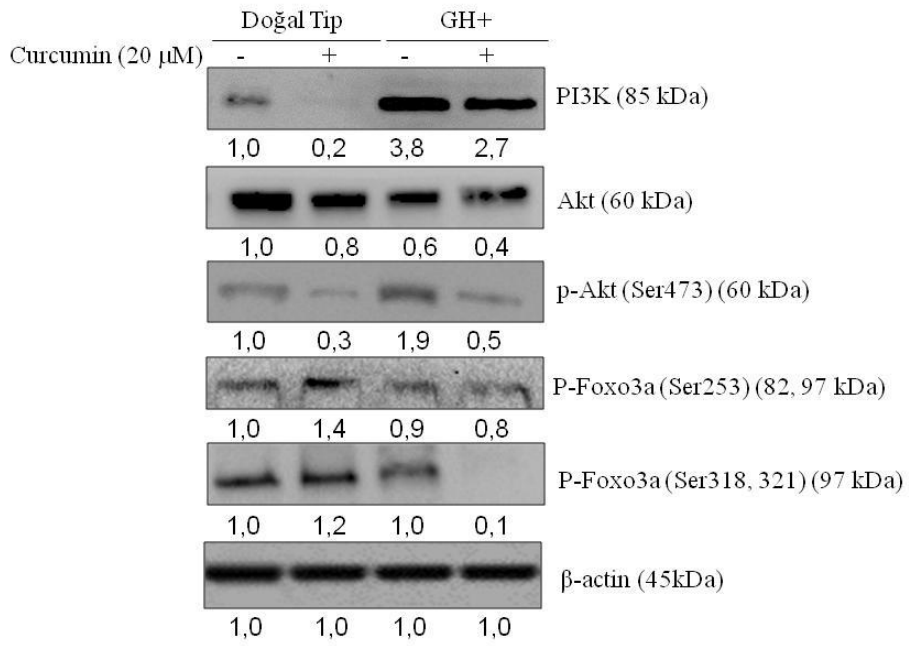
MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücre hatlarında 24 saat curcumin uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisi immunoblotlama tekniği ile gösterilmiştir. Siklin D1 hücre döngüsünde G1 evresiyle ilişkili bir siklin molekülü olup, MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcumin ile anlatımı baskılandığı tespit edilmiştir. Siklin D1 anlatımındaki baskılanma akış sitometresi analizi ile curcuminin G1 evresinde baskılandığı sonucu ile tutarlılık göstermektedir. Retinoblastoma (Rb) anlatımı curcumin ile siklin D1 üzerinden baskılandığından MDA-MB-453 doğal tip hücrelerde değişmemektedir. Fakat GH anlatımı arttırılan MDA-MB-453 hücrelerinde ise Rb anlatımı doğal tip hücrelerden fazla olmasına rağmen curcumin ile anlatım baskılanmaktadır. Buna bağlı olarak retinoblastomanın fosfarilasyonu doğal tip hücrelerde curcumin ile değişmemekte ve fosforilasyonun daha fazla gerçekleştiği GH+ hücrelerde ise baskılanmaktadır. MDA-MB-453 doğal tip hücrelerinde curcumin ile p21 anlatımı indüklenirken GH+ hücrelerinde değişmemektedir. İndüklenen p21 nukleus içerisindeki c-Jun'u aktive etmesiyle bilinmektedir. Bu sonuç onkogen immunoblotlama sonuçları ile korelasyon göstermektedir. MDA-MB-453 doğal tip hücrelerde p53 anlatımı curcumin ile azalırken GH+ hücrelerinde anlatımı artmaktadır. Bu durum MDA-MB-453 doğal tip hücrelerde curcumin ile apoptotik yolağın devamlılığını sağlamakta iken GH+ hücrelerinde indüklediği gösterilmiştir (Şekil 35).



**Şekil 35. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücre hatlarında curcuminin hücre döngüsü üzerine etkisinin gösterilmesi.**

#### 4.13. Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde PI3K/AKT Sinyal Yolağı Üzerine Etkisi

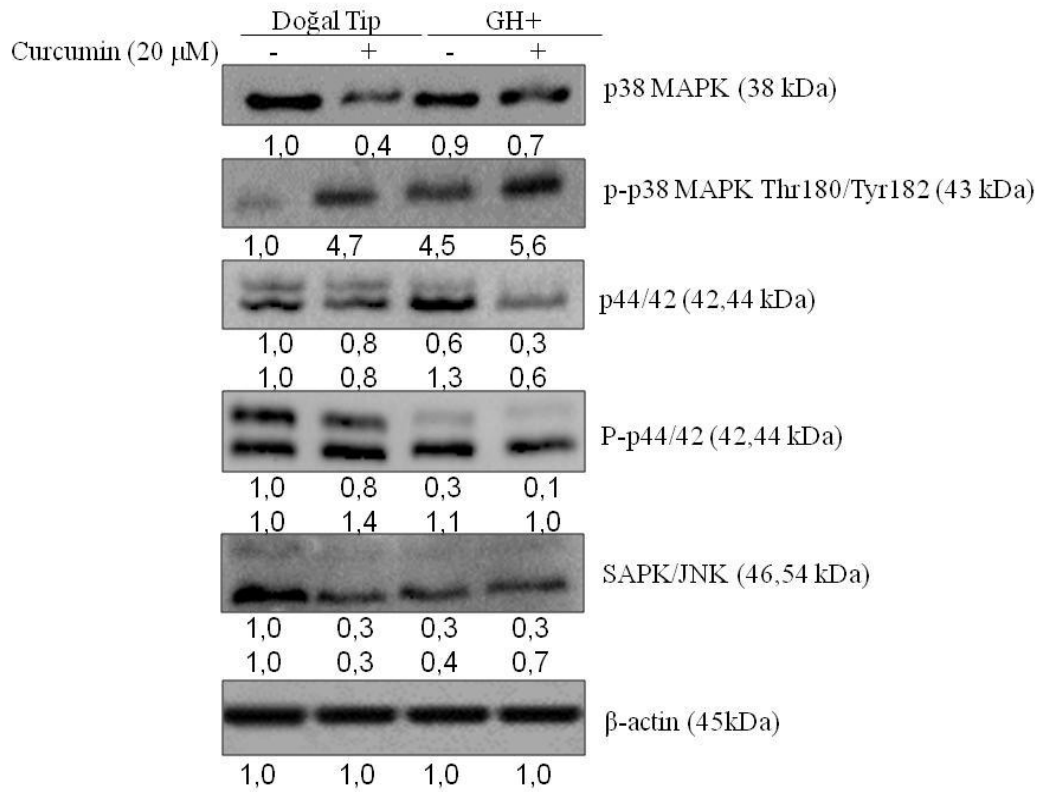
MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde sağ kalım yolağı olan PI3K/AKT sinyal yolağı üzerine curcuminin etkisi immunoblotlama tekniği ile gösterilmiştir. MDA-MB-453 doğal tip hücrelerine göre GH+ hücrelerinde anlatımı fazla olan PI3K curcumin ile baskılanmaktadır. Curcumin ile Akt aktivasyonu baskılanan doğal tip ve GH+ hücrelerinde Akt Ser473 defosforilasyonu olduğu gösterilmiştir. Akt fosforilasyonunun inhibe ettiği FoxO3a Ser253 ve Ser318, 321 fosforilasyonu doğal tip hücrelerde curcumin ile artarken GH+ hücrelerinde defosforilasyonu gerçekleşmektedir (Şekil 36).



Şekil 36. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin PI3K/AKT sinyal yolağı üzerine etkisinin immunoblotlama tekniği ile gösterilmesi.

#### 4.14. Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde MAPK Sinyal Yolağı Üzerine Etkisi

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde diğer bir sağ kalım yolağı olan MAPK sinyal yolağı üzerine curcuminin etkisi immunoblotlama tekniği ile gösterilmiştir. MDA-MB-453 doğal tip hücrelerine göre GH+ hücrelerinde curcumin ile MAPK p38 baskılanmakta ve MAPK Thr180/Tyr182 fosforilasyonu gerçekleşmektedir. ERK curcumin ile doğal tip ve GH+ hücrelerinde baskılanmakta iken doğal tip hücrelerde ERK fosforilasyonu ve GH+ hücrelerde ERK defosforilasyonu gerçekleşmektedir. SAPK/JNK doğal tip hücrelerde curcumin ile baskılanırken GH+ hücrelerde değişmemektedir (Şekil 37).

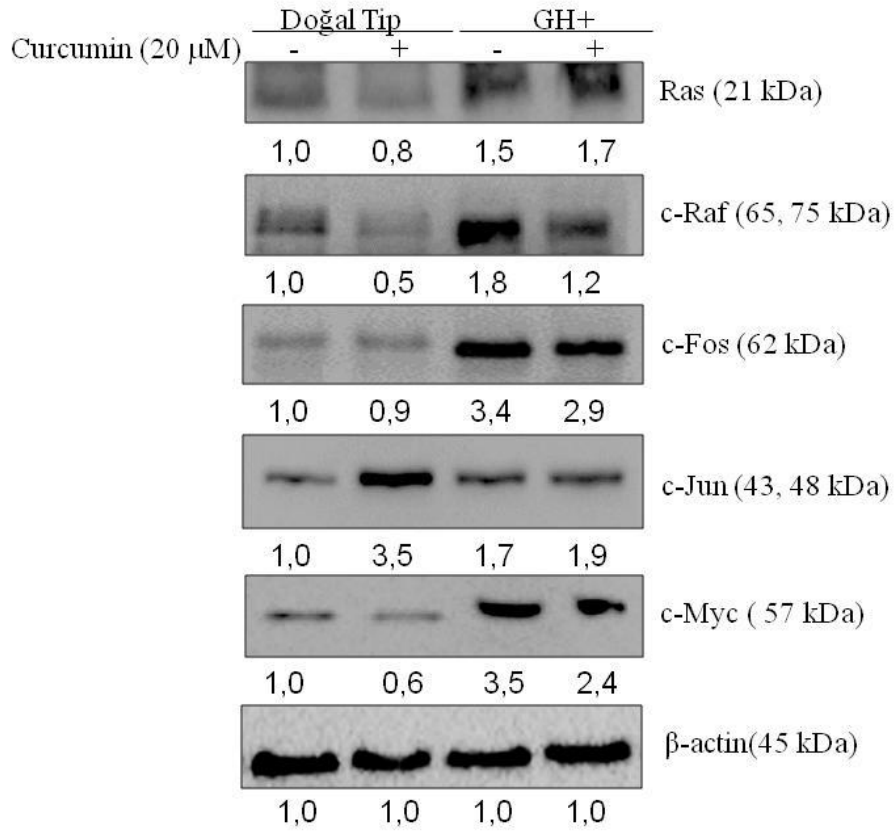


Şekil 37. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin MAPK sinyal yolağı üzerine etkisinin immunoblotlama tekniği ile gösterilmesi.



#### 4.15. Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde Onkogenler Üzerine Etkisi

JAK/STAT sinyal yolağı hedefi olan onkogenlerin MDA-MB-453 doğal tip ve GH anlatımı arttırılan hücre hatlarında curcumin ile 24 saatte anlatımındaki değişiklikler immunoblotlama tekniği ile belirlenmiştir. GH anlatımı arttırılan MDA-MB-453 hücrelerinde Ras, c-Raf, c-Fos, c-Jun ve c-Myc anlatımı doğal tip hücrelerden daha fazladır. Curcumin ile MDA-MB-453 GH+ hücrelerinde Ras ve c-Fos anlatımları değişmemektedir. MDA-MB-453 doğal tip hücrelerinde curcumin ile Ras anlatımı baskılanmasına rağmen c-Fos anlatımında bir değişim gözlemlenmemiştir. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcumin ile c-Raf anlatımı ve az da olsa c-Myc anlatımı baskılanmaktadır. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde c-Jun anlatımı curcumin ile artmaktadır. MDA-MB-453 doğal tip hücrelerindeki bu artış p21 indüklü c-Jun'un aktive olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Şekil 38).



Şekil 38. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin onkogenler üzerine etkisinin gösterilmesi.

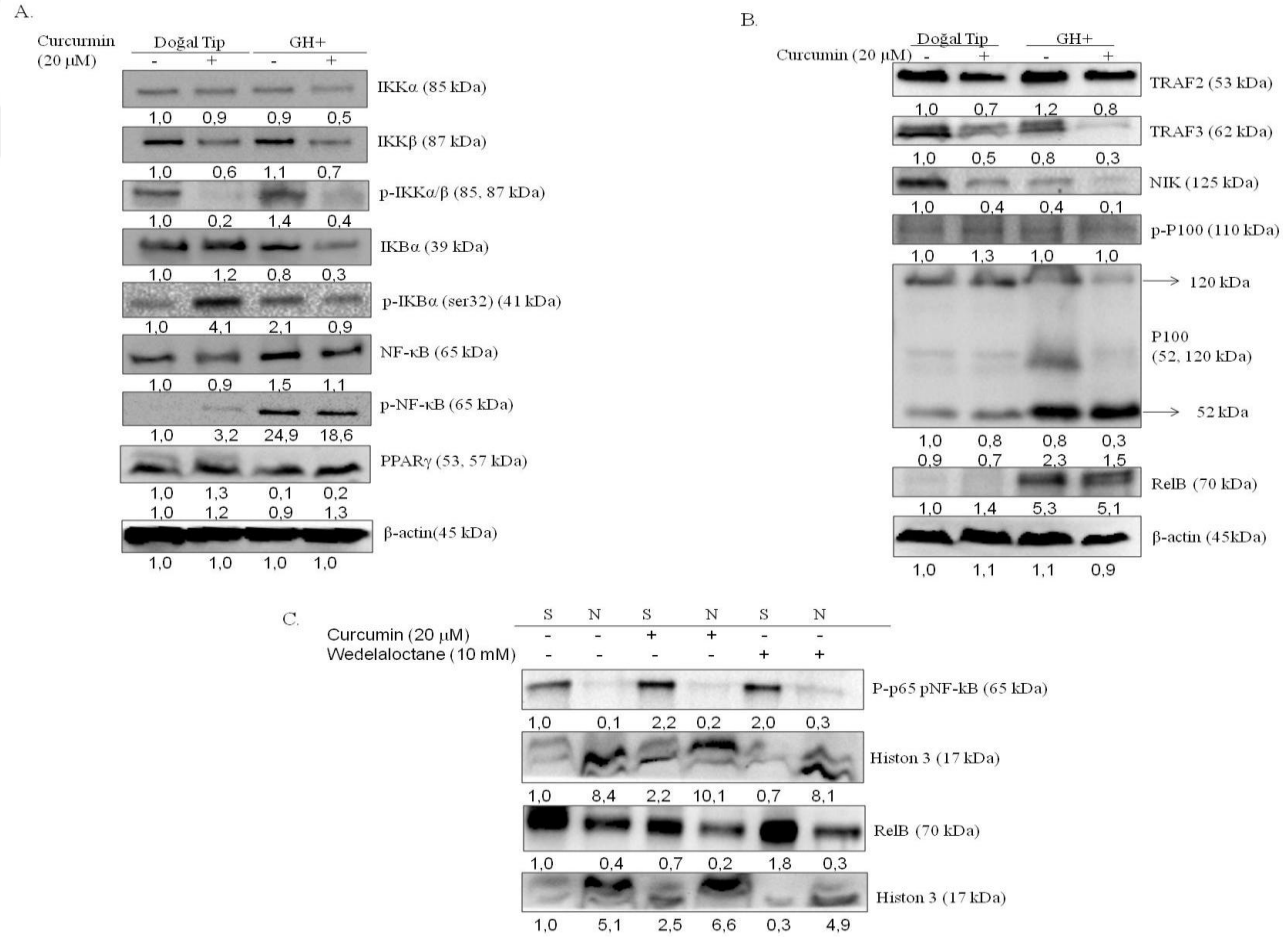
#### **4.16. Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde NF-κB Sinyal Yolağı Üzerindeki Etkisi**

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde 20 µM curcuminin 24 saatte NF-κB sinyal yolağındaki etkisine hem klasik hem de alternatif yolak üzerinden bakılmıştır. Klasik yolakta, sitoplazmada bulunan IKK kompleksine bağlı IKKα curcumin ile MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde önemli bir değişim gözlemlenmiyorken, IKKβ anlatımı curcumin ile azalmaktadır. Ayrıca curcumin ile MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde IKKα/β kompleksinin Ser176/180 defosforilasyonu da gerçekleşmektedir. Curcumin, IKK kompleksi tarafından aktifleşen NF-κB inhibitörü IκBα anlatımına MDA-MB-453 doğal tip hücrelerde etki etmezken IκBα Ser32 fosforilasyonunu arttırmaktadır. MDA-MB-453 GH+ hücrelerinde ise curcumin ile IκBα anlatımında baskılanma olmasına bağlı IκBα defosforile olmaktadır. IκBα'nın fosforilasyonu ile serbestlenen NF-κB curcumin uygulaması ile MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde baskılanmaktadır. Buna bağlı olarak NF-κB fosforilasyonu curcumin uygulaması ile MDA-MB-453 doğal tip hücrelerde artarken MDA-MB-453 GH+ hücrelerinde değişmemektedir. Böylece fosforile olan NF-κB aktif olarak MDA-MB-453 doğal tip hücrelerde nükleusa geçmektedir. Proliferasyon ile ilişkili olan PPARγ curcumin ile doğal tip ve GH+ hücrelerinde bir miktar artış saptanmıştır. PPARγ anlatımındaki bu artış hücre farklılaşması ile ilişkilendirilebilir (Şekil 39A).

Alternatif yolakta ise sitozolik kısımdan membranda bulunan TRAF2 ve TRAF3 komplekslerine bakıldığında, curcumin uygulaması sonrası MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde TRAF3 proteinindeki baskılanma TRAF2 proteininden daha fazladır. TRAF2 proteini ile birleşen NF-κB-indükleyici kinaz, NIK, MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcumin ile baskılanarak sinyal iletiminin devamlılığını sağlamadığını göstermektedir ve sinyal devamında bulunan IKKα'nın da değişmemesi bu durumu desteklemektedir. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcumin ile p100 proteininin fosforilasyonu değişmemektedir. Fakat MDA-MB-453 GH+ hücrelerinde curcumin uygulanan ve uygulanmayan durumlarda p100 proteini p52 proteinini oluşturduğu görülmektedir. p52 proteini ile

kompleks oluşturan RelB proteini MDA-MB-453 doğal tip hücresinde anlatımı görölmezken MDA-MB-453 GH<sup>+</sup> hücrelerinde curcumin uygulanan ve uygulanmayan durumlarda mevcuttur. NF-κB alternatif sinyal yolağı MDA-MB-453 doğal tip hücrelerde aktif değilken, GH anlatımı arttırılan MDA-MB-453 hücrelerinde aktiftir (Şekil 39B).

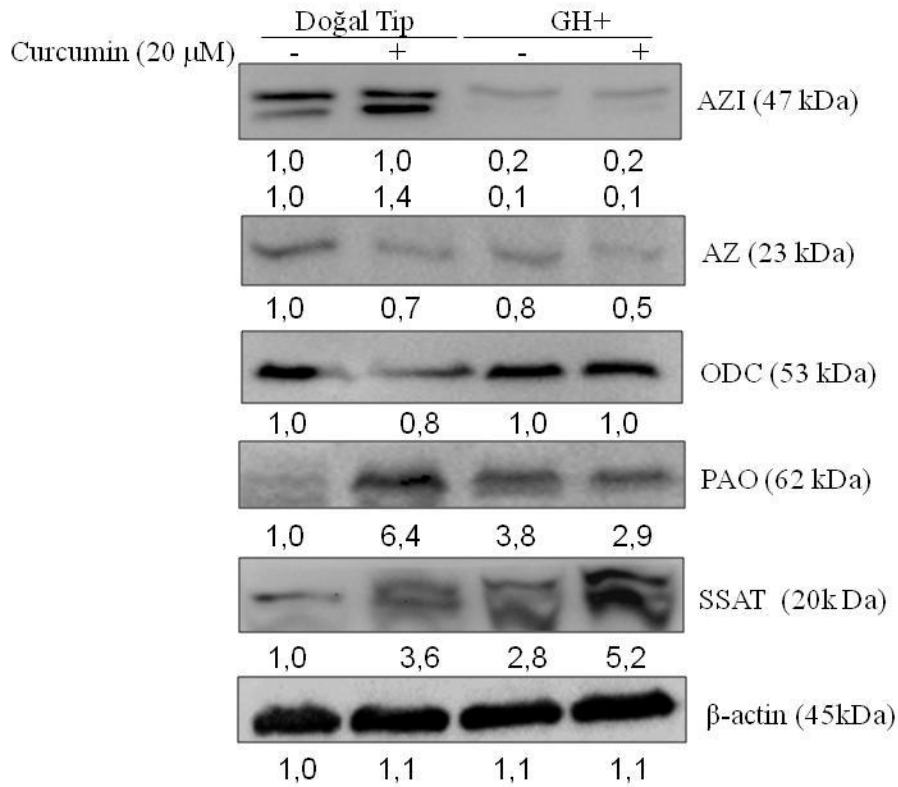
GH anlatımı arttırılan MDA-MB-453 hücre hattında NF-κB p52 oluşumu ve RelB anlatımı varlığı doğrultusunda, sitoplazmada oluşan RelB-p52 kompleksinin nukleusa göçünü ve sitoplazmada oluşan p50-p65 kompleksinin nukleusa göçünü belirlemek amacıyla nukleer-sitoplazmik protein izolasyonu yapılarak immunoblotlama tekniği ile gösterilmiştir. MDA-MB-453 GH<sup>+</sup> hücresinde fosforillenen NF-κB p65 sitoplazmada varlığı kontrol grubunda ve curcumin uygulaması ile belirlenirken nukleusa göç etmediği tespit edilmiştir. RelB-p52 kompleksinin ise sitoplazmadan nukleusa göç ettiği ve curcumin uygulaması sonucu hem sitoplazmada hem de nukleusta bulunan RelB anlatımının baskılandığı belirlenmiştir. Kontrol amacıyla Histon 3 antikoruna ile nukleustaki protein varlığı belirlenerek sonuçlar doğrulanmıştır (Şekil 39C).



Şekil 39. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin NF-κB klasik ve alternatif sinyal yolağı üzerine etkisinin gösterilmesi.

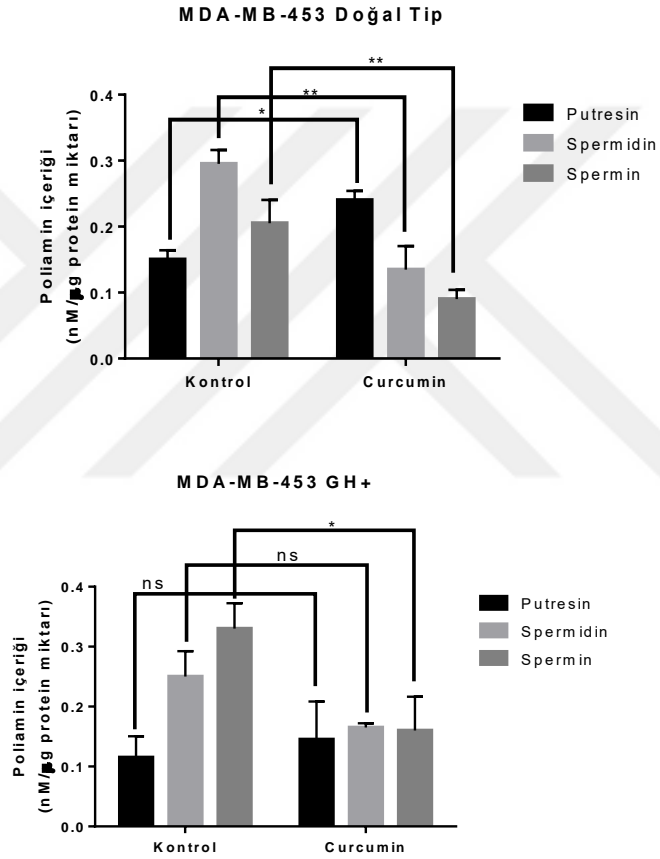
#### 4.17. Curcuminin MDA-MB- 453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde Poliamin Üzerine Etkisinin İrdelenmesi

MDA-MB- 453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde 20 µM curcuminin 24 saatte poliamin metabolizması üzerindeki etkisine bakılmıştır. Poliamin metabolizmasında AZ inhibitörü olan AZI MDA-MB-453 GH+ hücre hattında değişim görülmezken MDA-MB-453 doğal tip hücrelerinde curcumin ile kırılmanın arttığı görülmektedir. Buna bağlı olarak ODC inhibitörü olan AZ MDA-MB-453 doğal tip hücrelerinde ve GH+ hücrelerinde baskılanmaktadır. Poliamin biyosentezinde putresin üretimini sağlayan ODC enzimi curcumin ile MDA-MB-453 doğal tip hücrelerinde baskılanmaktadır fakat GH+ hücrelerinde etkilenmemektedir. MDA-MB-453 doğal tip hücrelerinde poliamin katabolizmasında görevli olan PAO ve SSAT enzimleri curcumin ile artmaktadır ve GH+ hücrelerinde PAO curcumin ile azalırken SSAT artmaktadır (Şekil 40).



Şekil 40. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin poliamin metabolizması üzerine etkisinin immunoblotlama tekniği ile gösterilmesi.

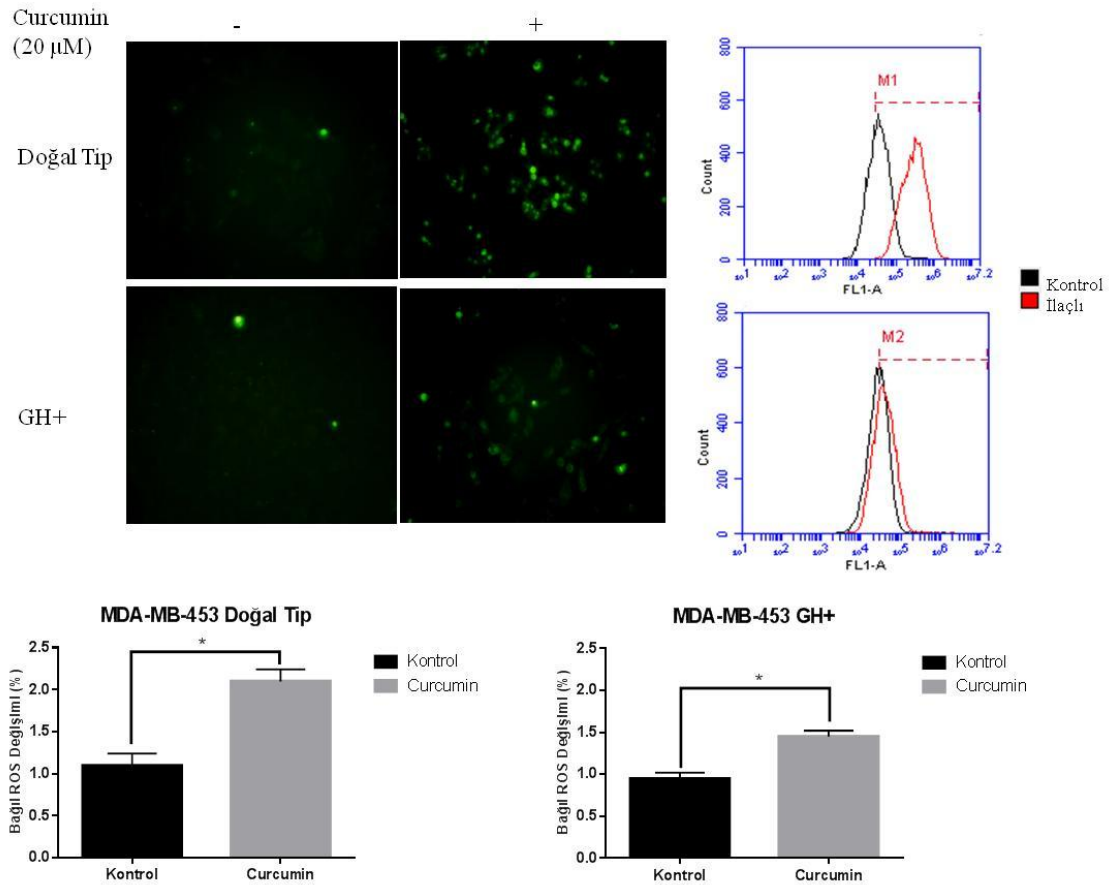
MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde 24 saatte 20  $\mu$ M curcuminin poliamin metabolizması üzerine etkisi HPLC ile gösterilmiştir. MDA-MB-453 doğal tip hücrelerde curcumin ile putresin (\*p= 0,0300) artmakta, spermidin (\*\*p= 0,0018) ve spermin (\*\*p= 0,0097) miktarı azalmaktadır. MDA-MB-453 GH+ hücrelerinde ise curcumin ile spermin (\*p= 0,0274) miktarı azalmaktadır (Şekil 41).



**Şekil 41.** MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin poliamin metabolizması üzerine etkisinin HPLC ile gösterilmesi (\*p<0,05; \*\*p<0,05).

#### 4.18. Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücre Hatlarında Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Üzerine Etkisinin İrdelenmesi

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin hücre içinde strese bağlı oluşan reaktif oksijen türleri (ROS) üzerine etkisini belirlemek için DCF-DA boya ile floresan çekimi ve akış sitometresinde PI (Propidyum iyodür) eklenerek 24 saatlik analizi yapılmıştır. DCF-DA boya hücre içerisinde artan ROS birikimlerini floresan mikroskopunda parlak yeşil renkli olarak göstermektedir. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcumin ile birlikte hücre içindeki ROS birikimleri artmaktadır. Akış sitometresi analizlerinde de curcumin ile ROS birikimi MDA-MB-453 doğal tip hücrelerinde GH+ hücrelerinden daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 42, \*p= 0,0194).

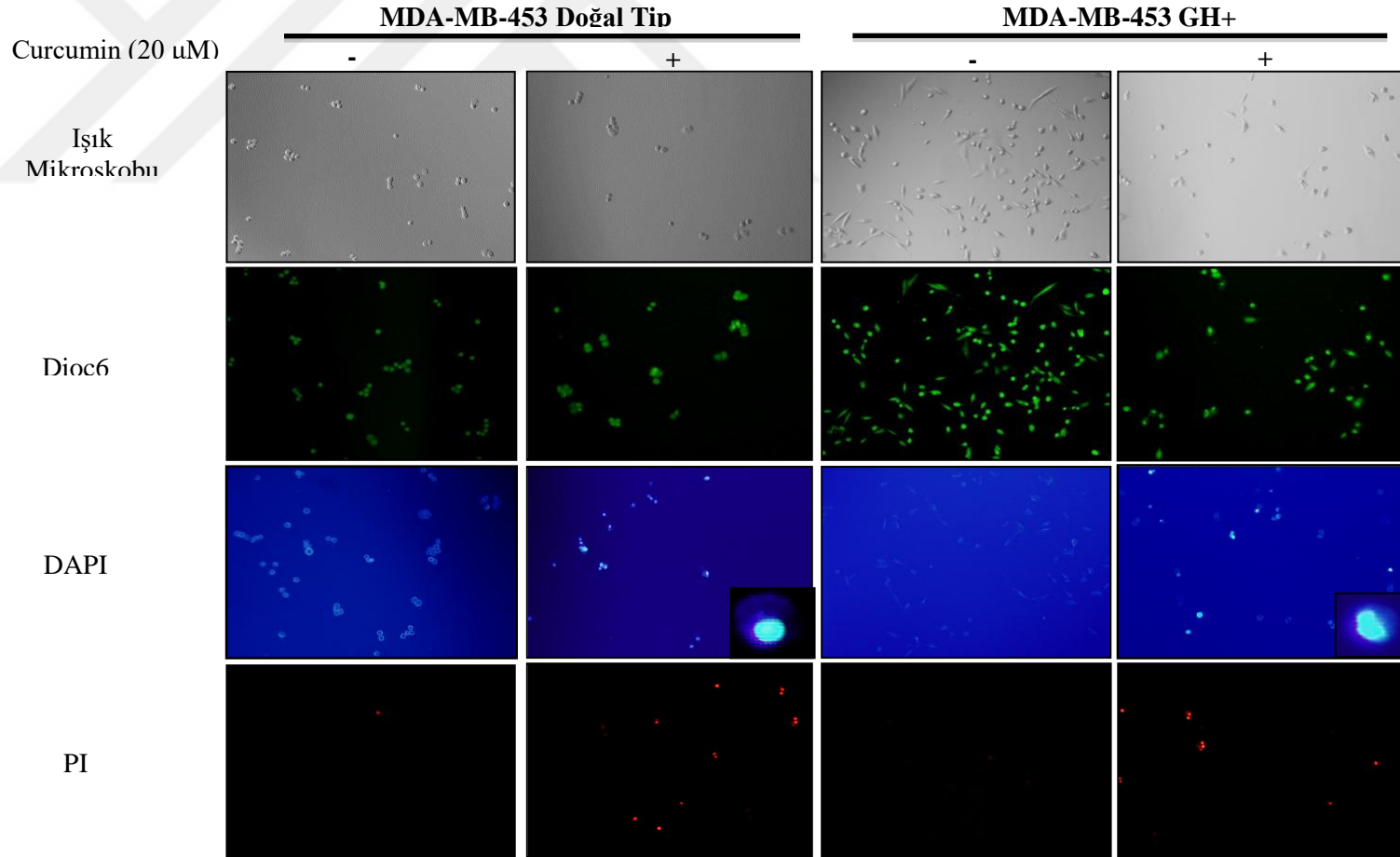


Şekil 42. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin ROS üzerinde etkisinin gösterilmesi (\*p< 0,05).

#### **4.19. Curcuminin MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Meme Kanseri Hücrelerinde Apoptoz Sinyal Yolağı Üzerine Etkisi**

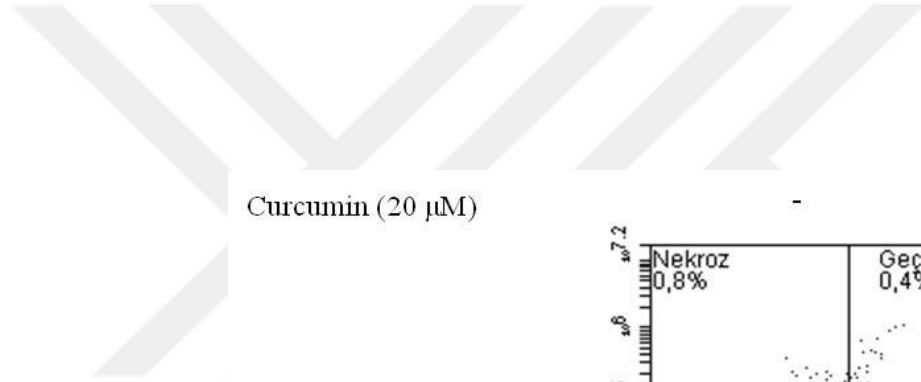
MDA-MB-453 meme kanseri hücrelerinde ilaç uygulamasıyla birlikte 24 saatte DAPI boyası ve DNA kırıklarının arttığı gözlemlenmiştir. MDA-MB-453 GH anlatımı arttırılan hücrelerde ise 24 saatte DNA kırıklarının arttığı fakat doğal tip MDA-MB-453 hücrelerine göre daha az DNA kırıklarının olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 43). MDA-MB-453 doğal tip ve GH anlatımı arttırılan hücrelerde mitokondriyal membran potansiyeli incelenmek amacıyla DiOC6 boyama yapılmıştır. Her iki hücre hattında da curcumin uygulamasının kontrol grubuna oranla 24 saatte etkili olduğu, mitokondriyal membran potansiyelini bozarak apoptotik hücre ölümünü tetiklediği görülmüştür. İki hücre hattı karşılaştırıldığında ise GH anlatımı olan hücre hattının doğal tipe göre daha dirençli olduğu görülmüştür (Şekil 43). Kontrol grubu ve zamana bağlı olarak curcumin uygulanan MDA-MB-453 ve MDA-MB-453 GH+ hücrelerin PI (Propidyum iyodür) boyaması sonrası 10X büyüklüğünde floresan mikroskopunda incelenmiştir. PI boyası hücre ölümünü tespit etmekle birlikte hücre içerisinde nukleusa bağlanmaktadır. Her iki hücre hattında 24 saatte ilaç uygulamasıyla boyanan hücre sayısının arttığı görüntülenmiştir. MDA-MB-453 GH anlatımı olan hücrelerin doğal tipe göre daha dirençli olduğu PI boyama ile de tespit edilmiştir (Şekil 43).





Şekil 43. Curcumin zamana bağlı MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde hücre ölümü üzerindeki etkisinin gösterilmesi.

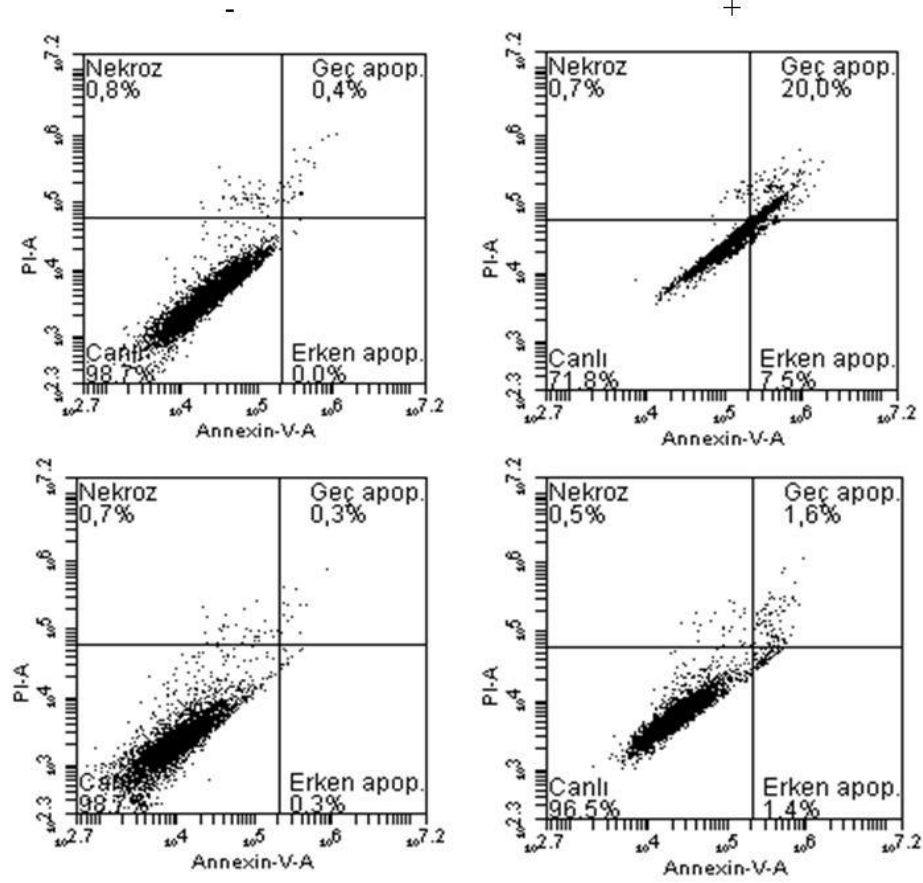
MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin 24 saatte apoptotik evreler üzerindeki etkisinin belirlenmesi için Annexin V-FITC ve PI boya ile birlikte akış sitometresi kullanılarak gösterilmiştir. Apoptozun başlamasıyla hücrelerde fosfatidilserin membran, plazma membranının iç yüzeyinden hücre yüzeyine transloke olur. Annexin V hücre yüzeyinde fosfatidilserin membranı boyayarak apoptotik hücrelerin belirlenmesini sağlar. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcumin ile birlikte nekrotik hücre popülasyonu çok değişmezken apoptoza giden hücre popülasyonları artmaktadır. MDA-MB-453 doğal tip hücresinde geç apoptotik hücre popülasyonu %0.4 iken curcumin ile %20'ye yükselirken geç apoptotik hücre popülasyonu da %7.5'e yükselmiştir. GH anlatımı arttırılan MDA-MB-453 hücrelerinde ise curcumin ile birlikte erken apoptotik hücre popülasyonu %0.3' den %1.6'ya ve erken apoptotik hücre popülasyonu da %0.3'den %1.4'e yükselmiştir. Curcuminin MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (Şekil 44).



Curcumin (20  $\mu$ M)

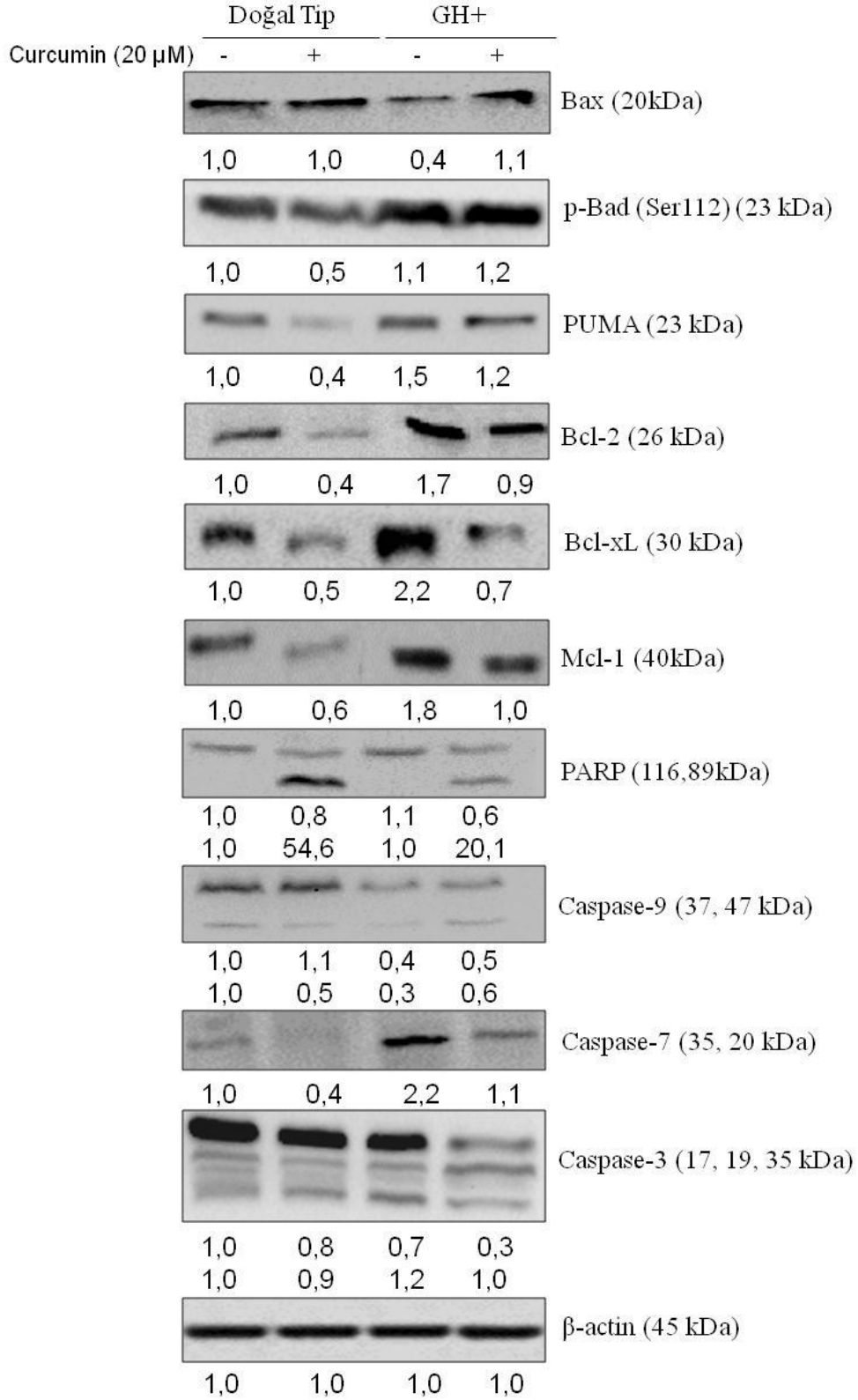
MDA-MB-453  
Doğal Tip

MDA-MB-453  
GH+



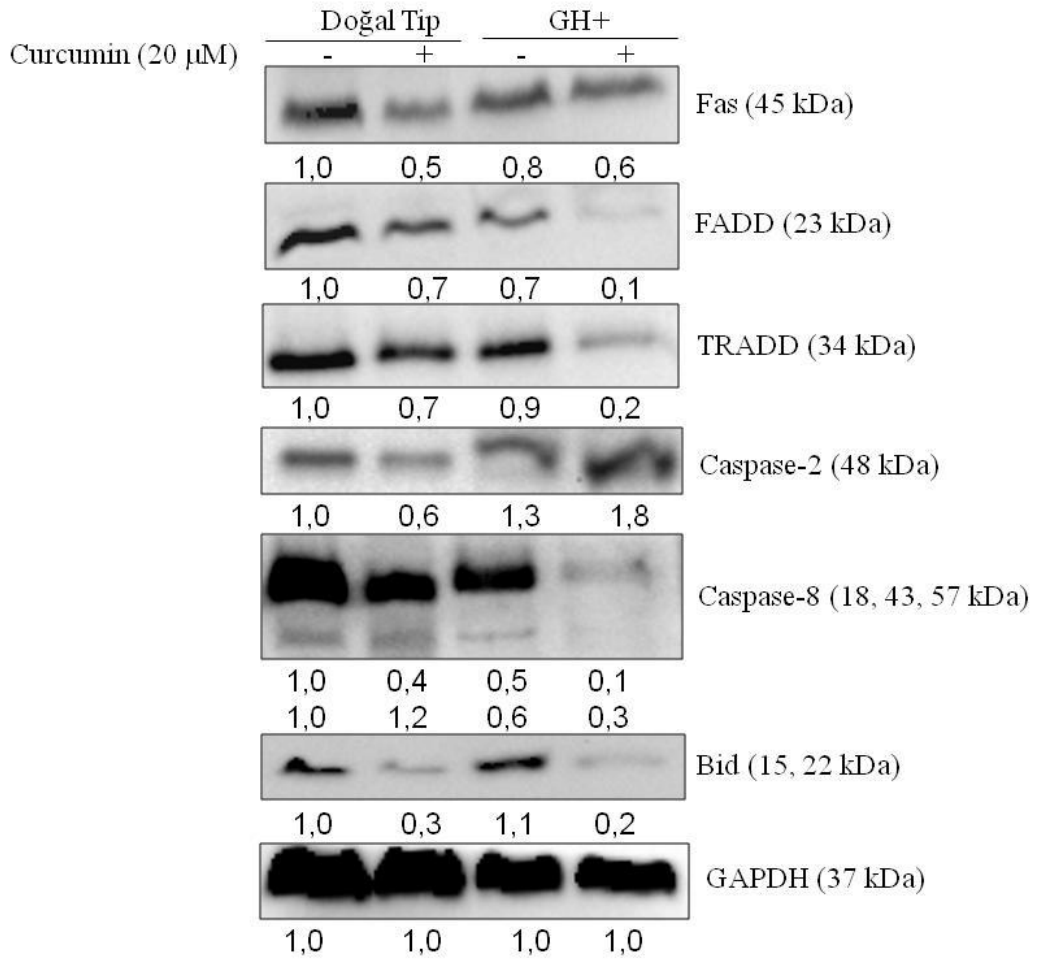
Şekil 44. Curcuminin MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde hücre ölümü üzerindeki etkisinin Annexin V-FITC ve PI ile analiz edilerek gösterilmesi.

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde içsel ve dışsal apoptotik sinyal yolağı 24 saatte immunoblotlama tekniğı ile gösterilmiştir. İntrinsik yolağında mitokondride bulunan pro-apoptoz molekülü olan Bax dışsal yolağından gelen Bid molekülünün kesilmesiyle aktivasyonu sağlanır. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcumin ile Bid baskılanarak kesilmektedir. MDA-MB-453 doğal tip hücrelerde curcumin ile Bax aktivitesi değişmezken GH anlatımı artırılan MDA-MB-453 hücrelerinde ise artmaktadır. Doğal tip hücrelerde curcumin ile Bad defosforilasyonu gerçekleşirken GH+ hücrelerinde Bad fosforilasyonu devam etmektedir. Bcl ailesinden Bcl-2 ve Bcl-X<sub>L</sub> proteinlerine ket vuran PUMA curcumin ile doğal tip hücrelerde baskılanırken GH+ hücrelerinde değişmemektedir. Buna bağılı olarak doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcumin ile Bcl-2 ve Bcl-X<sub>L</sub> baskılanmaktadır. Hücre sağ kalımı ile ilişkili olan Mcl-1 ise curcumin ile birlikte doğal tip ve GH+ hücrelerinde baskılanmaktadır. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcumin ile yine hücre canlılığı ile ilişkili olan PARP molekülünün kırılması gerçekleşmektedir. Kaspaz kaskadının aktivasyonuna bakıldığında ise doğal tip ve GH+ hücrelerinde kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün curcumin ile kırıldığı, kaspaz-7'nin de curcumin ile baskılandığı görülmektedir (Şekil 45).



**Şekil 45. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin apoptoz iç yolağı üzerine etkisinin immunoblotlama tekniğı ile gösterilmesi.**

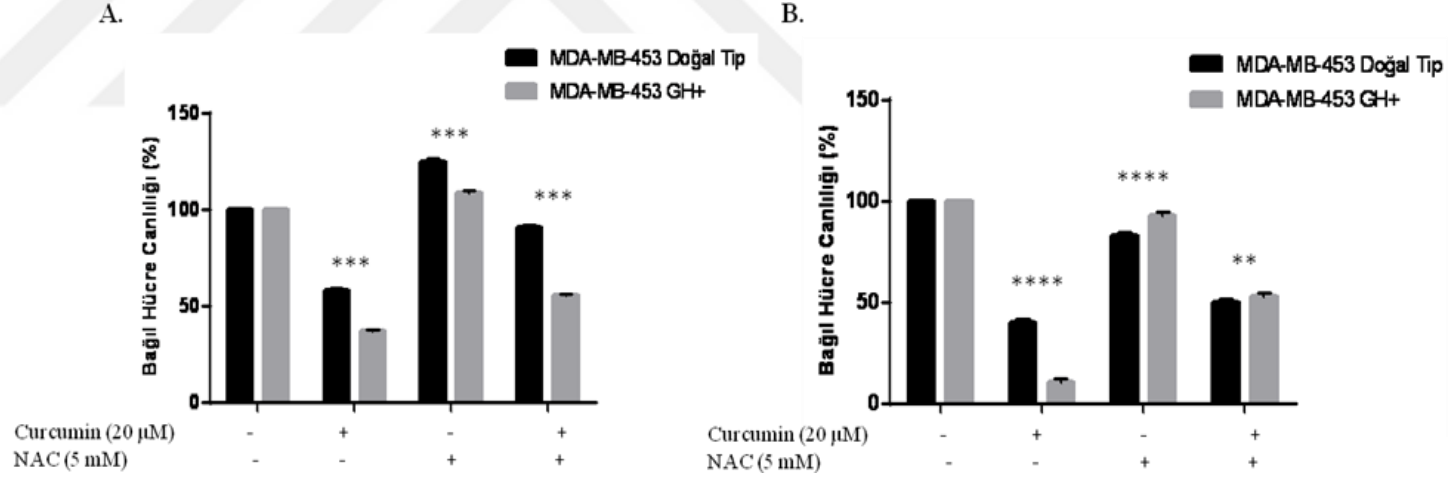
Dışsal yolda membranda gömülü bulunan ölüm sinyal reseptörü Fas curcumin ile MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerde baskılanmaktadır. Aynı zamanda curcumin ile birlikte doğal tip ve GH+ hücrelerinde FADD ve TRADD proteinlerinin anlatımı da baskılanmaktadır. Kaspaz-2'nin apoptotik yolk ile ilişkili olan kısa formu doğal tip hücrelerde curcumin ile baskılanmakta ve GH+ hücrelerinde ise apoptozu indüklemektedir. Bid proteinin aktivasyonunu sağlayan kaspaz-8 curcumin ile doğal tip ve GH+ hücrelerinde kırılmakta ve baskılanmaktadır (Şekil 46).



Şekil 46. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcuminin apoptoz dış yolk üzerine etkisinin immunoblotlama tekniğı ile gösterilmesi.

#### **4.20. MDA-MB-453 Doğal Tip ve GH+ Hücrelerinde NAC ile Curcumin Etkisinin Geri Çekildiğinin Gösterilmesi**

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin hücrelere verdiği etkinin geri çekildiğini göstermek amacıyla 5 mM dozunda NAC ve 20 µM curcumin ile birlikte 5 mM NAC hücrelere uygulanarak MTT yapılmıştır. 24 saatte MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcumin ile hücre canlılığı %50 civarlarına düşmüş iken NAC ve curcumin birlikte uygulandığında doğal tip hücrelerinde %90 civarına, GH+ hücrelerinde ise %70 civarına yükselmektedir. 24 saatte NAC ile curcumin etkisinin geri çekilmesi doğal tip hücrelerde GH+ hücrelerine kıyasla daha fazladır (Şekil 47A.). 48 saatte MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcumin uygulaması sonucu hücre canlılığı %50 altında iken NAC ve curcumin birlikte uygulanması sonucu %50 üzerine çıkmaktadır. GH+ hücrelerinde curcumin ile canlılık doğal tipe kıyasla daha az olmasına rağmen NAC etkisini GH+ hücrelerinde doğal tip hücrelerine göre daha fazla göstermiştir (Şekil 47B.).



Şekil 47. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde NAC ile curcumin etkisinin geri çekilmesinin MTT ile gösterilmesi (A: 24 saat, B: 48 saat; \*\*p= 0,0011; \*\*\*p< 0,0001; \*\*\*\*p< 0,0001).



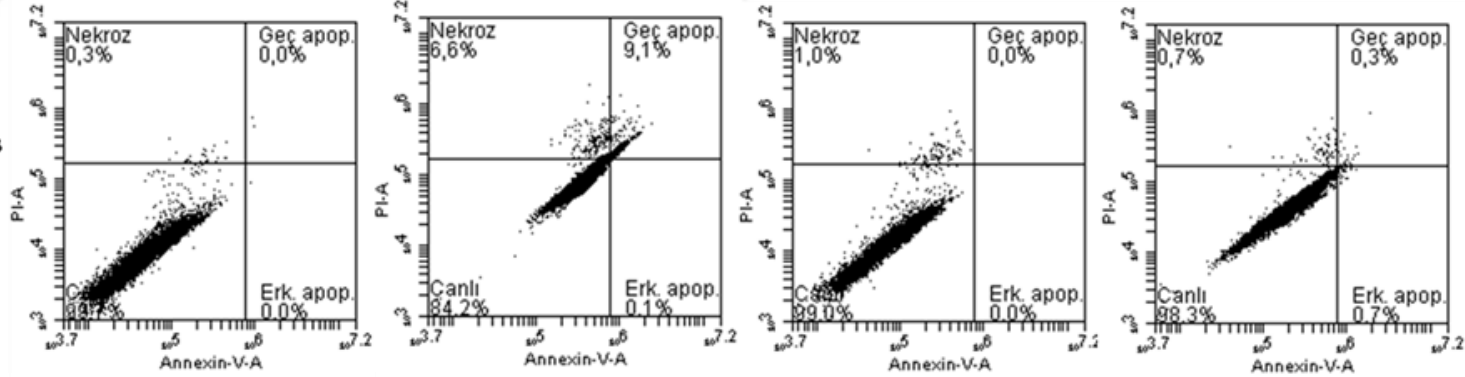
MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcumin etkisinin NAC ile geri çekildiği akış sitometrisi analizinde gösterilmiştir. MDA-MB-453 doğal tip hücrelerde curcumin ile geç apoptoz hücre popülasyonu %9,1 iken, curcumin ve NAC uygulanması sonucu %0,3'e düşmektedir. MDA-MB-453 GH+ hücrelerinde ise curcumin ile geç apoptotik hücre popülasyonu %4,5 iken, curcumin ve NAC uygulaması sonucu bu popülasyon %0,2'ye düşmektedir (Şekil 48).



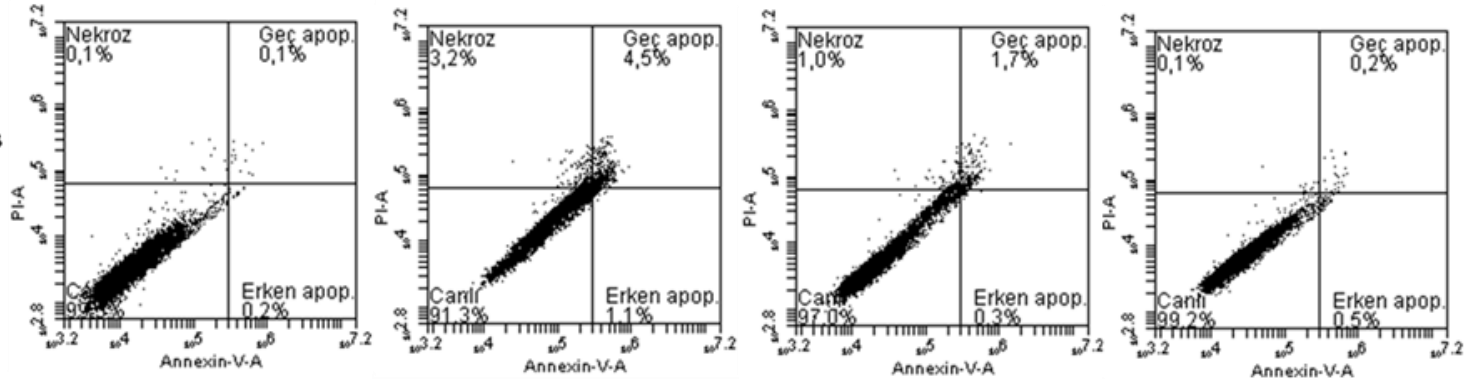
Curcumin (20 µM)  
NAC (5 mM)

- +  
- +

MDA-MB-453  
Doğal Tip



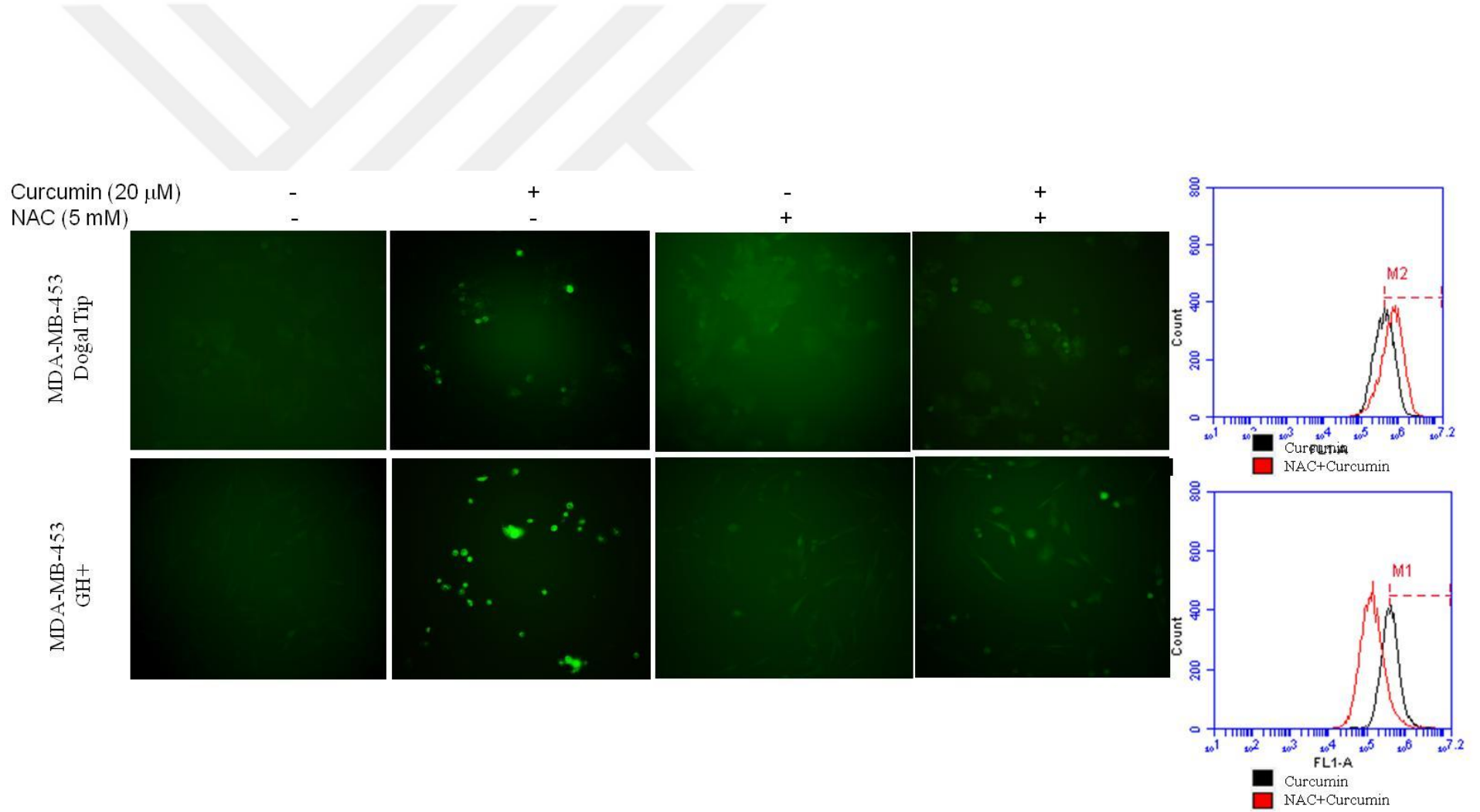
MDA-MB-453  
GH+



Şekil 48. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin ve NAC ile hücre ölümü üzerindeki etkisinin akış sitometrisinde gösterilmesi.

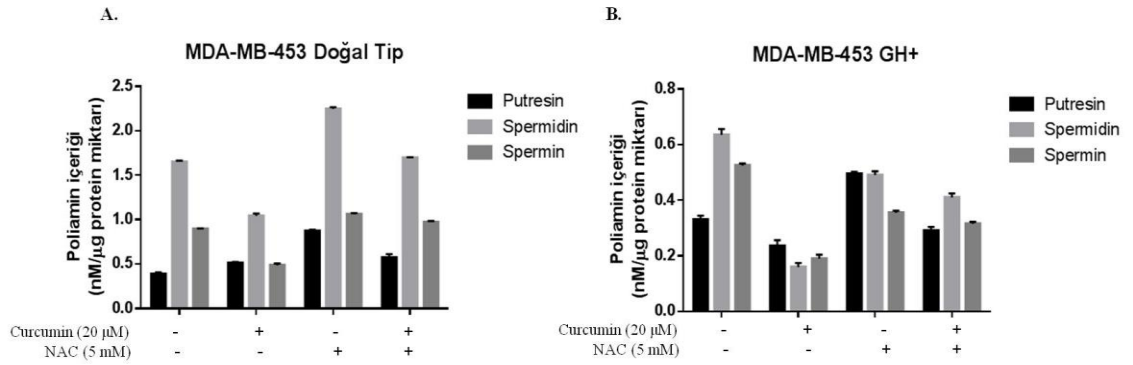
MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde 5 mM NAC'ın curcuminin etkisini geri çektiğini göstermek amacıyla DCF-DA boya ile ROS miktarı floresan çekim ve akış sitometrisi ile tayin edilmiştir. Floresan çekimlerinde 5 mM NAC doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcuminin oluşturduğu ROS miktarını geri çektiği gözlemlenmiştir. Akış sitometrisinde yapılan analizde ise NAC'ın doğal tip hücrelerde curcuminin etkisini azalttığı ve GH+ hücrelerinde de curcumin etkisini geri çektiği gösterilmiştir (Şekil 49).





Şekil 49. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ meme kanseri hücrelerinde curcumin ve NAC ile ROS birikiminin analiz edilmesi.

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde NAC ile curcumin etkisinin geri çekildiği HPLC tekniği ile poliamin metabolizması üzerinde gösterilmiştir. MDA-MB-453 doğal tip hücrelerde curcumin uygulaması ve NAC uygulaması ile putresin miktarı artmakta, spermidin ve spermin miktarı curcumin ile azalırken NAC ve curcumin uygulaması sonucu artmaktadır. MDA-MB-453 GH+ hücrelerinde putresin miktarı NAC ve curcumin uygulaması ile sadece curcumin uygulamasına göre artmakta, curcumin ile azalan spermidin ve spermin miktarı ise NAC ve curcumin ile artmaktadır (Şekil 50).



**Şekil 50. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde NAC ve curcumin etkisinin poliamin içeriklerinin HPLC analizi ile gösterilmesi.**

## 5. TARTIŞMA

Meme kanseri dünya çapında kadınlarda görülme sıklığı en yüksek olan kanser çeşitidir [48]. Batılı ülkelerde görülme sıklığı daha fazla olan meme kanseri coğrafi bölgelere, diyete ve genetik faktörlere bağlı olarak değişmektedir [2]. Bununla birlikte erken yaşta anne olmak, menopoza giriş yaşı ve menopoz sonrası şişmanlık risk faktörleri arasındadır. Meme kanserinde önemli rol oynayan BRCA1 ve BRCA2 gen mutasyonlarından ER, PR ve HER2/neu negatif profiline sahip olan BRCA1 hastalık seyirinde daha agresif bir profil çizmektedir [50]. Meme kanseri gelişiminde özellikle spesifik ER aktivasyonu ile aktive olan östrojenlerin büyük bir rol oynadığı düşünülmektedir.

Hipofiz bezinden salgılanan GH çocukluk döneminde büyümeyi sağlarken çocukluk dönemi sonrası devam etmesi akromegali hastalığına sebep olmaktadır. Çeşitli klinik gözlemler ve deneysel çalışmalar GH dahil hipofiz bezinden salgılanan hormonların insan meme kanseri gelişiminde rol oynadığını göstermiştir [4]. Akromegali hastalarında GH seviyesinden dolayı kanseri tetiklediği, hasta serumlarından alınan örnekler değerlendirilerek meme kanserini tetiklediği gösterilmiştir [9]. Ayrıca meme kanserinde büyüme hormonu reseptörü eksprese ettiği gösterilmiştir [187].

Kanser hücrelerinde belirlenen artan metabolik faaliyetleri ile son yıllarda daha fazla çalışılan PA'lar tedavide yeni bir hedef olmaktadır. Katabolizma ve biyosentezde önemli moleküller olan putresin, spermidin ve spermin meme kanserinde hücre proliferasyonunda, hücre büyümesinde ve farklılaşmasında önemli rol oynamaktadır [31]. Kanserli hücrelerin normal dokulara göre fazla miktarda PA içerdikleri, metabolik faaliyetlerinin daha aktif olduğu ve PA'de görevli metabolik enzim olan ODC'nin de arttığı gösterilmiştir [188]. Son yıllarda çeşitli ajanlarla PA metabolizmasına etki ederek PA seviyelerinin düşürülmesi hedeflenmiştir [189]. PA metabolizmasında azalma meydana gelmesi ile katabolizmada görevli olan SSAT ve

SSAT tarafından asetillenen PAO oksidasyonu hücrede H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretilmesi sonucu strese neden olmakta ve apoptotik süreci tetiklemektedir [190].

*Curcuma longa* bitkisinden elde edilen curcumin anti-tümör, anti-oksidan, anti-proliferatif etkisiyle birlikte anti-terapötik bir ilaçtır. Bu sebeple çeşitli kanser türlerinde tedavi etmek amacıyla *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar başlamıştır [191]. Curcumin sağ kalım sinyal yollarını baskılamakta ve hücreyi apoptoza teşvik etmektedir. Bununla birlikte curcumin invazyon, metastaz ve anjiyogenezi inhibe ederek tümör gelişimini baskıladığı gösterilmiştir [45]. Tümör ilerlemesinde majör rol oynayan ve meme kanserinde eksprese edilen östrojen reseptörü, curcumin ile hem ER-pozitif hem de ER-negatif hücrelerde proliferasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir [78]. Meme kanseri de dahil olmak üzere birçok kanser türünde aşırı eksprese edilen HER2 curcumin ile baskılandığı gösterilmiştir [79].

Reseptör açısından ER ve PR negatif, HER2/neu pozitif profile sahip olan MDA-MB-453 meme kanseri hücre hattı GH transfeksiyon ile GH anlatımı artırılarak doğal tip hücrelere kıyasla curcumin etkilerine bakılmıştır. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde etkin curcumin dozunu belirlemek amacıyla doza ve zamana bağlı MTT yapılmış ve 20 µM doz ile 24 saate karar verilmiştir. GH varlığı belirlenen MDA-MB-453 hücreleri Eliza yöntemi ile medyada GH varlığı tespit edilerek medyaya salınan GH'nun otokrin olarak hücreyi büyümeye teşvik ettiği belirlenmiştir. Curcuminin GH'nu baskıladığı [80] bilinerek 24 saatte MDA-MB-453 GH+ hücrelerinde de bu etki gösterilmiştir.

Sağ kalım sinyal yollarından hücre proliferasyonu, anjiyogenez, invazyon, migrasyon ile ilişkisi ve apoptozu engellediği [92] bilinen JAK/STAT sinyal yolağı curcumin ile MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde baskılandığı gösterilmiştir. MDA-MB-453 GH+ hücrelerinde STAT3 Ser727 fosforillenmesi doğal tip hücrelere kıyasla daha fazla olmakta ve curcumin ile fosforillenme devam etmektedir. p38 MAPK maksimum transkripsiyonel aktivite için Ser727'den fosforillenen STAT3 aktivasyonuna gerek duyduğu bilinmektedir [92].

JAK/STAT inhibitörlerinden SOCS1 JAK2, STAT1, STAT5 ve p65 NF-κB inhibitörü iken SOCS3 STAT3 ve pro-inflamasyon sitokinlerini tetikleyen yolağı MAPK'lar ve NF-κB üzerinden TRAF6-TAK1 inhibe etmesi ile bilinmektedir [192].

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde SOCS1 proteini curcumin ile artması beklenirken azalma tespit edilmiştir. Bu sebeple MDA-MB-453 hücrelerinde SOCS1 proteini JAK/STAT sinyal yolağı üzerinden değil de p65 NF-κB üzerinden inhibisyonunu gerçekleştirmektedir. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde SOCS3 proteini curcumin ile artmaktadır. STAT3 Ser727 fosforilasyonu curcumin ile değişmeyen GH+ hücrelerinde SOCS3, STAT3 üzerinden inhibisyonunu gösterememektedir.

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde koloni oluşumu üzerine curcumin etkisi irdelendiğinde her iki hücre hattında da koloni oluşumunu engellediği gösterilmiştir. Koloni oluşumu aynı zamanda soft agar tekniği ile yapılarılarak curcuminin koloni oluşumunu baskıladığı görülmüştür. Her iki teknik ile curcumin uyulanması sonucu koloni oluşturmada GH+ hücreleri doğal tip hücrelere kıyasla daha dirençli olduğu görülmüştür.

MDA-MB-453 GH+ hücrelerinde doğal tip hücrelere göre yara kapanma oranı daha fazla olmasına rağmen curcumin ile birlikte her iki hücre hattında da azalmaktadır. Ayrıca curcumin ile doğal tip ve GH+ hücrelerinde invazyon ve metastaz baskılanmıştır. Fakat GH+ hücrelerinde invazyon ve metastaz oranı doğal tip hücrelere kıyasla fazla olmasıyla birlikte curcumin uygulaması sonrası da bu oranın doğal tipe göre fazla olduğu saptanmıştır. Bu durum GH+ hücrelerinin invazyon ve metastaz yapma potansiyelinin doğal tip hücrelere göre fazla olduğunu fakat curcuminin bu direnci kırdığını göstermektedir.

Buna bağlı olarak MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde EMT markırlarına bakılmıştır. E-kaderin azalması ve N-kaderin artması hücrelerin epitel yapıdan mezenkimale geçtiğini göstermekte ve bu durumun migrasyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [14]. Curcumin ile doğal tip hücrelerde E-kaderin anlatımında az da olsa bir artış varken N-kaderin anlatımı azalmaktadır. GH+ hücrelerinde ise E-kaderin anlatımı bulunmamakla birlikte N-kaderin anlatımı curcumin ile değişmemektedir. Curcuminin doğal tip hücrelerde migrasyonu baskıladığı belirlenmiştir. β-catenin göçü curcumin ile doğal tip hücrelerde tetiklenmekte ve GH+ hücrelerinde göç devam etmektedir. β-catenin göçü c-myc transkripsiyon faktörlerini aktive ettiği bilinmektedir. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde



MMP-2 curcumin ile baskılanmakta ayrıca GH+ hücrelerinde MMP-9 baskılanmakta ve MMP-9 inhibitörü olan TIMP-2 curcumin ile artmaktadır.

MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcumin ile hücre döngüsü G1 fazında baskılanırken hücrelerin G2/M fazında tutulu kaldığı saptanmıştır. Bu durum curcuminin MDA-MB-453 hücrelerinde proliferasyona G2/M fazında ket vurduğunu göstermektedir. Aynı zamanda G1 fazı ile ilişkili olan Siklin D1 ve Rb anlatımları da curcumin ile her iki hücrede baskılanmaktadır. Doğal tip hücrelerde curcumin ile indüklenen p21 nukleus içindeki c-Jun'u aktive ettiği bilinmektedir. Doğal tip hücrelerde c-Jun aktivitesinin curcumin ile fazla olmasının buna bağlı olduğu düşünülmektedir.

Akt fosforilasyonunun Bad ve FoxO proteinlerinin fosforillenmesini inhibe ederek FoxO'nun nukleusta kalmasını sağladığı ve böylece apoptoza teşvik ettiği bilinmektedir [119]. MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde Akt fosforillenmesi curcumin ile baskılanmasına rağmen FoxO3a Ser253 fosforillenmesi doğal tip hücrelerde artmakta ve Ser318,321 fosforilasyonu da değişmemektedir. Fosforillenen FoxO3a nukleustan çıkarak p21 artışına sebep olduğundan doğal tip hücrelerdeki bu fosforillenmenin p21'yi indüklediği düşünülmektedir.

Curcuminin MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde sağ kalım yolağını p38 MAPK ve ERK1/2 sinyal yolağı üzerinden baskıladığı tespit edilmiştir. MDA-MB-453 doğal tip hücrelerinde curcumin ile ERK fosforillenmesi devam etmekte ve bu durum p65'i fosforillediği göstermektedir. SAPK/JNK nukleusta c-Jun'u aktive ettiği bilinmekte ve doğal tip hücrelerde curcumin ile SAPK/JNK baskılanması sonucu nukleusta c-Jun'u aktive edemediği, doğal tip hücrelerde artan c-Jun'un SAPK/JNK kaynaklı olmadığı düşünülmektedir.

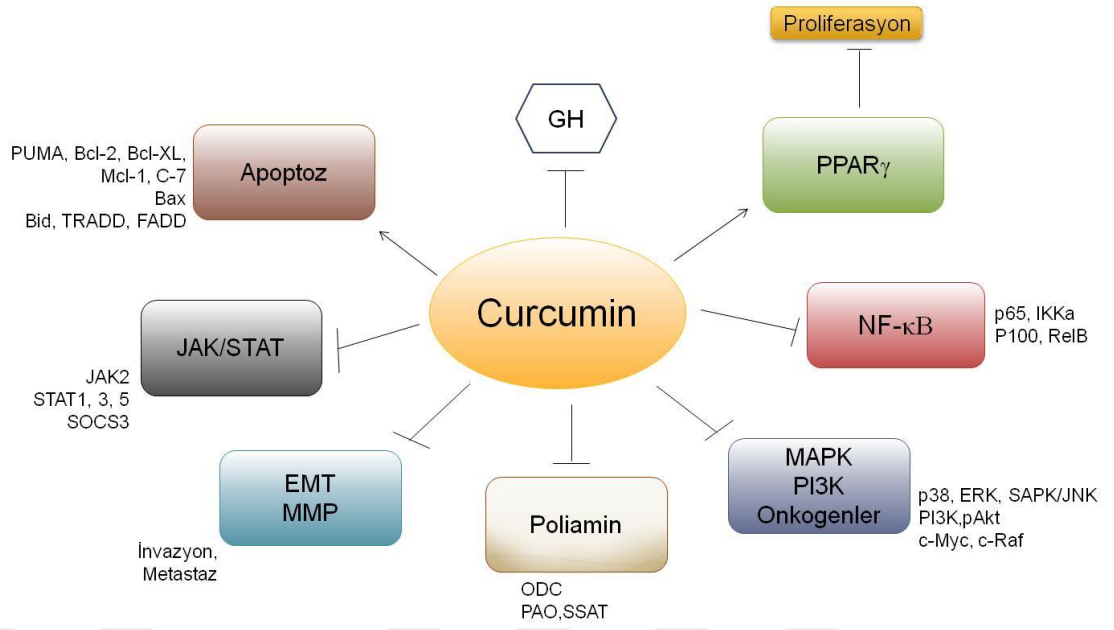
NF-κB sinyal yolağı curcumin ile birlikte MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde baskılanmaktadır. Curcuminin p65 proteinini inhibe ettiği bilinmekle birlikte bu baskılanmada SOCS1 proteini üzerinden gerçekleşebileceği de düşünülmektedir. NF-κB fosforilasyonu GH+ hücrelerinde curcumin ile değişmemesi STAT3 Ser727 fosforilasyonunun değişmemesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca GH+ hücrelerinde curcumin ile değişmeyen ERK1/2 anlatımının NF-κB fosforilasyonunu da devam ettirdiği düşünülmektedir. PPARγ

curcumin ile doğal tip ve GH+ hücrelerinde artış göstermekte ve böylece proliferasyonu baskılayarak farklılaşmayı arttırmaktadır. Alternatif yolağ üzerinden GH+ hücrelerinde p52 ve RelB kompleksinin sitoplazmadan nukleusa göçü vardır ve curcumin ile bu göçün baskılandığı gösterilmiştir.

NF-κB ile ilişkisi bilinen PA metabolizmasında MDA-MB-453 doğal tip hücrelerde curcumin ile ODC baskılanması sonucu biyosenteze ket vurduğu gösterilmiştir. Katabolik metabolizmada görev alan PAO ve SSAT enzimleri curcumin ile artmakta fakat GH+ hücrelerinde SSAT artmış olmasına rağmen PAO değişmemiştir. Hücreden dışarıya N1-asetilspermidin/spermin çıkışı olduğundan PAO'nun değişmediği düşünülmektedir. Ayrıca PA metabolizmasında curcumin ile MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde spermidin ve spermin azalmasına gerçekleşirken katabolik enzimlerin faaliyetine, strese ve açığa çıkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarına bağlı olarak putresin artışı olmaktadır. GH+ hücrelerindeki curcumin ile artış ve azalmalar doğal tipe kıyasla daha az miktardadır. Bu durum ODC'nin curcumin ile değişmemesi göz önünde bulundurularak GH+ hücrelerinde katabolik faaliyetlerle birlikte biyosentezinde aktif bir şekilde çalıştığından kaynaklandığı düşünülmektedir. PA metabolizmasında açığa çıkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve stres ile tetiklenen hücrelerdeki ROS birikimi MDA-MB-453 doğal tip ve GH+ hücrelerinde curcumin ile artmaktadır.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı ve stres ile tetiklenen apoptozda curcumin ile MDA-MB-453 doğal tip hücrelerde anti-apoptotik proteinler baskılanmakta ve GH+ hücrelerinde ise Bcl-X<sub>L</sub> aracılığı ile engellenmektedir. Buna bağlı olarak Bid kesilmesiyle aktive olan pro-apoptotik proteinler curcumin ile artarak apoptoz teşvik edilmektedir.

Sonuç olarak curcuminin sağ kalım yolağlarını baskılaması, invazyon, migrasyon ve anjiyogenezi inhibe etmesi, apoptozu teşvik ederek kanserli hücrelerin ölümünü sağlaması ve poliamin metabolizmasındaki etkileri MDA-MB-453 hücre hattında gösterilmiştir. Curcuminin bilinen özellikleri ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda gelecekte tedavi amaçlı kullanımına ışık tutmaktadır.



**Şekil 51. Curcuminin MDA-MB-453 meme kanseri hücresinde etkili olduğu sinyal yolları.**

## KAYNAKLAR

1. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012*. European Journal of Cancer, 2013. **49**: p. 1374-1403.
2. Youlten, D.R., et al., *The descriptive epidemiology of female breast cancer: An international comparison of screening, incidence, survival and mortality*. Cancer Epidemiology, 2012. **36**(3): p. 237-248.
3. Simpson, J.F., et al., *Prognostic value of histologic grade and proliferative activity in axillary node-positive breast cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Companion Study, EST 4189*. J Clin Oncol, 2000. **18**: p. 2059-2069.
4. Pincus, S.M., et al., *Females secrete growth hormone with more process irregularity than males in both humans and rats*. The American journal of physiology, 1996. **270**: p. 107-115.
5. Maitra, A. and A.K. Abbas, *The endocrine system. Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2005: p. 1161-1163.
6. Ruchala, M., et al., *Risk of neoplasms in acromegaly*. Wspolczesna Onkol, 2012. **16**(2): p. 111-117.
7. Triantafyllidis, J.K., et al., *Increased fasting serum levels of growth hormone and gastrin in patients with gastric and large bowel cancer*. ANNALS OF GASTROENTEROLOGY, 2002. **15**(1): p. 72-77.
8. Mazzoccoli, G., et al., *Decreased serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I in patients with lung cancer: temporal relationship with growth hormone (GH) levels*. Anticancer research, 1999. **19**(2B): p. 1397-1399.
9. Emerman, J.T., et al., *Elevated growth hormone levels in sera from breast cancer patients*. Hormone and metabolic research, 1985. **17**(8): p. 421-424.
10. Hirano, T., K. Ishihara, and M. Hibi, *Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors*. Oncogene, 2000. **19**: p. 2548-2556.
11. Bowman, T., et al., *STATs in oncogenesis*. Oncogene, 2000. **19**: p. 2474-2488.
12. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease*. Cell, 2009. **139**: p. 871-890.
13. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. The Journal of Clinical Investigation, 2009. **119**(6): p. 1420-1428.
14. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2014. **15**: p. 178-196.
15. Huang, R.Y.-J., P. Guilford, and J.P. Thiery, *Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition*. 2012. **125**: p. 4417-4422.
16. Mendez, M.G., S.-I. Kojima, and R.D. Goldman, *Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition*. The FASEB Journal, 2010. **24**: p. 1838-1851.
17. Yu, L., M.C. Hebert, and Y.E. Zhang, *TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses*. The EMBO Journal, 2002. **21**(14): p. 3749-3759.

18. Xie, L., et al., *Activation of the Erk Pathway Is Required for TGF- $\beta$ 1-Induced EMT In Vitro*. *Neoplasia*, 2004. **6**(5): p. 603-610.
19. Rommel, C., et al., *Differentiation stage-special inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt*. *Science*, 1999. **286**: p. 1738-1741.
20. Zhang, W. and H.T. Liu, *MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells*. *Cell Research*, 2002. **12**(1): p. 9-18.
21. Winston, L.A. and T. Hunter, *Intracellular signalling: Putting JAKs on the kinase MAP*. *Current Biology*, 1996. **6**: p. 668-671.
22. Bonizzi, G. and M. Karin, *The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity*. *TRENDS in Immunology*, 2004. **25**(6): p. 280-288.
23. Pahl, H.L., *Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors*. *Oncogene*, 1999. **18**: p. 6853-6866.
24. Perkins, N.D., *Integrating cell-signalling pathways with NF- $\kappa$ B and IKK function*. *Nature* 2007. **8**: p. 49-62.
25. Kühnel, F., et al., *NF $\kappa$ B mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis*. *J. Biol. Chem*, 2000. **275**: p. 6421-6427.
26. Nelson, D.E., et al., *Oscillations in NF- $\kappa$ B Signaling Control the Dynamics of Gene Expression*. *Science*, 2004. **306**: p. 704-708.
27. Yin, M.J., Y. Yamamoto, and R.B. Gaynor, *The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I ( $\kappa$ )B kinase-beta*. *Nature*, 1998. **396**: p. 77-80.
28. Karin, M., Y. Yamamoto, and Q.M. Wang, *The IKK NF- $\kappa$ B system: a treasure trove for drug development*. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. **3**: p. 17-26.
29. Song, J.K., et al., *Cell Growth Inhibition and Induction of Apoptosis by Snake Venom Toxin in Ovarian Cancer Cell via Inactivation of Nuclear Factor  $\kappa$ B and Signal Transducer and Activator of Transcription 3*. *Arch Pharm Res*, 2012. **35**(5): p. 867-876.
30. Ling, H., et al., *Pachymic acid impairs breast cancer cell invasion by suppressing nuclear factor- $\kappa$ B-dependent matrix metalloproteinase-9 expression*. *Breast Cancer Res Treat*, 2011. **126**: p. 609-620.
31. Manni, A., et al., *Role of polyamines in the growth of hormone-responsive experimental breast cancer in vivo*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 1988. **11**: p. 231-240.
32. Manni, A., et al., *Selectivity of polyamine involvement in hormone action on normal and neoplastic target tissues of the rat*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 1990. **17**: p. 187-196.
33. Glikman, P., et al., *Polyamine Involvement in the Growth of Hormone-responsive and -resistant Human Breast Cancer Cells in Culture*. *CANCER RESEARCH*, 1989. **49**: p. 1371-1376.
34. Glikman, P.L., et al., *Polyamine Involvement in Basal and Estradiol-Stimulated Insulin-Like Growth Factor I Secretion and Action in Breast Cancer Cells in Culture*. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 1990. **37**(1): p. 1-10.
35. Shah, N., et al., *Activation of nuclear factor  $\kappa$ B by polyamines in breast cancer cells*. *Biochemistry*, 1999. **38**(14763-14774).
36. Balabhadrapathruni, S., et al., *Bis(ethyl)norspermine potentiates the apoptotic activity of the pure antiestrogen ICI 182780 in breast cancer cells*. *Oncol Rep*, 2005. **13**: p. 101-108.
37. Hampel, K.J., P. Crosson, and J.S. Lee, *Polyamines Favor DNA Triplex Formation at Neutral pH*. *Biochemistry*, 1991. **30**: p. 4455-4459.
38. Celano, P., et al., *Characterization of an Endogenous RNA Transcript with Homology to the Antisense Strand of the Human c-myc Gene\**. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992. **267**(21): p. 15092-15096.

39. Wrighton, C. and M. Busslinger, *Direct Transcriptional Stimulation of the Ornithine Decarboxylase Gene by Fos in PC12 Cells but Not in Fibroblasts*. *Molecular and Cellular Biology*, 1993. **13**(8): p. 4657-4669.
40. Maccarrone, M., et al., *Oxidation products of polyamines induce mitochondrial uncoupling and cytochrome c release*. *FEBS Letters*, 2001. **507**: p. 30-34.
41. Erez, O., et al., *Putrescine Activates Oxidative Stress Dependent Apoptotic Death in Ornithine Decarboxylase Overproducing Mouse Myeloma Cells*. *Experimental Cell Research*, 2002. **281**: p. 148-156.
42. Amelio, I., G. Melino, and R.A. Knight, *Cell death pathology: Cross-talk with autophagy and its clinical implications*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011. **414**: p. 277-281.
43. Eum, K.H. and M. Lee, *Crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of paclitaxel-induced cell death in v-Ha-ras-transformed fibroblast*. *Mol Cell Biochem*, 2011. **348**: p. 61-68.
44. Kunnumakkara, A.B., P. Anand, and B.B. Aggarwal, *Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins*. *Cancer Letters*, 2008. **269**: p. 199-225.
45. Aggarwal, B.B., Y.H. Surh, and S. Shishodia, *The molecular targets and therapeutics of curcumin in health and disease*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2007. **995**.
46. Allred, D.C., *Ductal carcinoma in situ: terminology, classification and natural history*. *JNCI Monographs*, 2010. **2010**(41): p. 134-138.
47. Perou, C.M. and A.-L. Borresen-Dale, *Systems biology and genomics of breast cancer*. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*, 2011. **3**(2): p. a003293.
48. Lindsey A. Torre, F.B., Rebecca L. Siegel, Jacques Ferlay, Joannie Lortet-Tieulent, Ahmedin Jemal, DVM., *Global Cancer Statistics, 2012*. *CA CANCER J CLIN*, 2015. **65**: p. 87-108.
49. Joann G. Elmore, et al., *Screening for Breast Cancer*. *JAMA*, 2005. **293**(10): p. 1245-1256.
50. Foulkes WD, Reis-Filho JS, and N. SA., *Tumor size and survival in breast cancer—a reappraisal*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010. **7**(6): p. 348-353.
51. Narod S.A., I.J., Miller A.B., *Why have breast cancer mortality rates declined?* *Journal of Cancer Policy*, 2015. **5**: p. 8-17.
52. William F. Anderson, P.S.R., Aleix Prat, Charles M. Perou, Mark E. Sherman, *How Many Etiological Subtypes of Breast Cancer: Two, Three, Four, Or More?* *JNCI J Natl Cancer Inst*, 2014. **106**(8).
53. Paul D.P. PHAROAH, N.E.D., Stephen DUFFY, Douglas F. EASTON and Bruce A.J. PONDER, *FAMILY HISTORY AND THE RISK OF BREAST CANCER: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS*. *Int. J. Cancer*, 1997. **71**: p. 800-809.
54. Alison M. Dunning, et al., *A Systematic Review Of Genetic Polymorphisms and Breast Cancer Risk*. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 1999. **8**: p. 843-854.
55. Jingmei Li, K.H., Hatef Darabi, Gustaf Rosin, Ulf Hannelius, Tuomas Heikkinen, Kristiina Aittomäki, Carl Blomqvist, Paul DP Pharoah, Alison M Dunning, Shahana Ahmed, Maartje J Hoening, Antoinette Hollestelle, Rogier A Oldenburg, Lars Alfredsson, Aarno Palotie, Leena Peltonen-Palotie, Astrid Irwanto, Hui Qi Low, Garrett HK Teoh, Anbupalam Thalamuthu, Juha Kere, Mauro D'Amato, Douglas F Easton, Heli Nevanlinna, Jianjun Liu, Kamila Czene, Per Hall, *A genome-wide association scan on estrogen receptor-negative breast cancer*. *Breast Cancer Research*, 2010. **12**.

56. Niklas Loman, et al., *Steroid Receptors in Hereditary Breast Carcinomas Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations or Unknown Susceptibility Genes*. *CANCER*, 1998. **83**(2): p. 310-319.
57. Joanne Kotsopoulos, J.L., Leonardo Salmena, Henry T Lynch, Charmaine Kim-Sing, and P.G. William D Foulkes, Susan L Neuhausen, Rochelle Demsky, Nadine Tung, Peter Ainsworth, Leigha Senter, Andrea Eisen, Charis Eng, Christian Singer, Ophira Ginsburg, Joanne Blum, Tomasz Huzarski, Aletta Poll, Ping Sun and Steven A Narod, *Breastfeeding and the risk of breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers*. *Breast Cancer Research*, 2012. **14**(2): p. R42.
58. Robert C. Millikan, B.N., Chiu-Kit Tse, Patricia G. Moorman, Kathleen Conway, Lisa V. Smith, Miriam H. Labbok, Joseph Geradts, Jeannette T. Bensen, Susan Jackson, Sarah Nyante, Chad Livasy, Lisa Carey, H. Shelton Earp, and Charles M. Perou, *Epidemiology of basal-like breast cancer*. *Breast Cancer Res Treat*, 2008. **109**(1): p. 123-139.
59. J.D., Y.Y.a.P., *The shape of age-incidence curves of female breast cancer by hormone- receptor status*. *Cancer Causes and Control*, 1999. **10**: p. 431-437.
60. Tarone, R.E.a.C., K.C., *The greater impact of menopause on ER- than ER+ breast cancer incidence: a possible explanation (United States)*. *Cancer Causes and Control*, 2002. **13**: p. 7-14.
61. Xiaohong R. Yang, J.C.-C., Ellen L. Goode, Fergus J. Couch, Heli Nevanlinna, Roger L. Milne, Mia Gaudet, Marjanka K. Schmidt,, et al., *Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the breast cancer association consortium studies*. *Journal National Cancer Institute*, 2011. **103**(3): p. 250-263.
62. Michelle D. Althuis, J.H.F., Montserrat Garcia-Closas, Louise A. Brinton, M. Patricia Madigan, and Mark E. Sherman, *Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004. **13**(10): p. 1558-1568.
63. Catherine Schairer, Yan L., Peter Frawley, Barry I. Graubard, Robert D. Wellman, Diana S. M. Buist, Karla Kerlikowske, Tracy L. Onega, William F. Anderson, Diana L. Miglioretti, *Risk Factors for Inflammatory Breast Cancer and Other Invasive Breast Cancers*. *Journal National Cancer Institute*, 2013. **105**: p. 1373-1384.
64. Amanda I. Phipps, K.E.M., Peggy L. Porter, Janet R. Daling, and Christopher I. Li,, *Body Size and Risk of Luminal, HER2-Overexpressing, and Triple-Negative Breast Cancer in Postmenopausal Women*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008. **17**(8): p. 2078-2086.
65. Michelle Harvie, A.H., Robert A. Vierkant, Nagi Kumar, James R. Cerhan, Linda E. Kelemen, Aaron R. Folsom, and Thomas A. Sellers, *Association of gain and loss of weight before and after menopause with risk of postmenopausal breast cancer in the Iowa women's health study*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005. **14**(3): p. 656-661.
66. Stoll, B.A., *Upper abdominal obesity, insulin resistance and breast cancer risk*. *International Journal of Obesity*, 2002. **26**: p. 747-753.
67. Moller, N. and J.O. Jorgensen, *Effects of growth hormone on glucose, lipid, and protein metabolism in human subjects*. *Endocr Rev*, 2009. **30**: p. 152-177.
68. Barsh, G.S., P.H. Seeburg, and R.E. Gelinas, *The human growth hormone gene family: structure and evolution of the chromosomal locus*. *Nucleic acids research*, 1983. **11**(12): p. 3939-3958.
69. Chen, E.Y., et al., *The human growth hormone locus: Nucleotide sequence, biology, and evolution*. *Genomics*, 1989. **4**: p. 479-497.
70. Harvey, S., *Extrapituitary growth hormone*. *Endocrine*, 2010. **38**: p. 335-359.

71. Mukhina, S., et al., *Phenotypic conversion of human mammary carcinoma cells by autocrine human growth hormone*. Proc Natl Acad Sci USA, 2004. **101**: p. 15166-15171.
72. Kaabi, Y.A., *Growth hormone and its receptor: A molecular insight*. Saudi Journal of Health Sciences, 2012. **1**(2): p. 61-68.
73. Waters, M.J. and A.J. Brooks, *Growth hormone receptor: Structure function relationships*. Horm Res Paediatr, 2011. **76**(1): p. 6-12.
74. Florini, J.R., D.Z. Ewton, and S.A. Coolican, *Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis*. Endocr Rev, 1996. **17**: p. 481-517.
75. Postel-Vinay, M.C. and P.A. Kelly, *Growth hormone receptor signalling*. Baillieres Clin Endocrinol Metab, 1996. **10**: p. 323-336.
76. Vogel and Pelletier, J. Pharm, 1818. **2**: p. 50.
77. Daybe, F.V., *Uber Curcumin*. den Farbstoff der Curcumawurzel Ber., 1870. **3**: p. 609.
78. Verma, G.B. and P.S. Lin, *The inhibition of the estrogenic effects of pesticides and environmental chemicals by curcumin and isoflavonoids*. Environ. Health Perspect, 1998. **12**: p. 807-812.
79. Kortula, L., et al., *Inhibition of ligand-induced activation of epidermal growth factor receptor tyrosine phosphorylation by curcumin*. Carcinogenesis, 1995. **18**: p. 1741-1745.
80. Miller, M., et al., *Curcumin (Diferuloylmethane) Inhibits Cell Proliferation, Induces Apoptosis, and Decreases Hormone Levels and Secretion in Pituitary Tumor Cells*. Endocrinology, 2008. **149**(8): p. 4158-4167.
81. Bharti, A.C., N. Donato, and B.B. Aggarwal, *Curcumin diferuloylmethane inhibits constitutive and IL-6-inducible STAT3 phosphorylation in human multiple myeloma cells*. J. Immunol., 2003. **7**: p. 3863-3871.
82. Aggarwal, B.B., et al., *Curcumin-Biological and Medicinal Properties*. The CRC Press, Boca Raton, FL, 2006: p. 297-368.
83. Dean, E.J., et al., *Novel therapeutic targets in lung cancer: Inhibitor of apoptosis proteins from laboratory to clinic*. Cancer Treat Rev, 2007. **33**: p. 203-212.
84. Darnell, J.J.E., I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Jak-STAT Pathways and Transcriptional Activation in Response to IFNs and Other Extracellular Signaling Proteins*. Science, 1994. **264**: p. 1415-1421.
85. Decker, T. and P. Kovarik, *Transcription factor activity of STAT proteins: structural requirements and regulation by phosphorylation and interacting proteins*. Cell. Mol. Life Sci., 1999. **55**: p. 1535-1546.
86. Bromberg, J. and J.J.E. Darnell, *The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function*. Oncogene, 2000. **19**: p. 2468-2473.
87. Zeidler, M.P., E.A. Bach, and N. Perrimon, *The roles of the Drosophila JAK/STAT pathway*. Oncogene, 2000. **19**: p. 2598-2606.
88. Bromberg, J.F., et al., *Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma*. Cell Biology, 1996. **93**: p. 7673-7678.
89. Chen, X., et al., *Crystal Structure of a Tyrosine Phosphorylated STAT-1 Dimer Bound to DNA*. Cell, 1998. **93**: p. 827-839.
90. Ihle, J.N., *STATs: Signal Transducers and Activators of Transcription*. Cell 1996. **84**: p. 331-334.
91. Wen, Z., Z. Zhong, and J.J.E. Darnell, *Maximal Activation of Transcription by Stat1 and Stat3 Requires Both Tyrosine and Serine Phosphorylation*. Cell, 1995. **82**: p. 241-250.



92. Kamran, M.Z., P. Patil, and R.P. Gude, *Role of STAT3 in Cancer Metastasis and Translational Advances*. Biomed Research International, 2013: p. 1-16.
93. Buettner, R., L.B. Mora, and R. Jove, *Activated STAT Signaling in Human Tumors Provides Novel Molecular Targets for Therapeutic Intervention*. Clinical Cancer Research, 2002. **8**: p. 945-954.
94. Reddy, E.P., et al., *IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled*. Oncogene, 2000. **19**: p. 2532-2547.
95. Dang, C.V., *c-Myc Target Genes Involved in Cell Growth, Apoptosis, and Metabolism*. Molecular and Cellular Biology, 1999. **19**(1): p. 1-11.
96. Bhattacharya, S., R.M. Ray, and L.R. Johnson, *STAT3-mediated transcription of Bcl-2, Mcl-1 and c-IAP2 prevents apoptosis in polyamine-depleted cells*. Biochem, 2005. **392**: p. 335-344.
97. Tong-xin, X., et al., *Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis*. Oncogene, 2004. **23**: p. 3550-3560.
98. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nature Rev. Mol. Cell Biol., 2006. **7**: p. 131-142.
99. Santen, R.J., et al., *The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase in breast cancer*. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, 2002. **80**: p. 239-256.
100. Yilmaz, M. and G. Christofori, *EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion*. Cancer Metastasis Rev, 2009. **28**: p. 15-33.
101. Niehrs, C., *The complex world of WNT receptor signalling*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2012. **13**: p. 767-779.
102. Kourtidis, A., S.P. Ngok, and P.Z. Anastasiadis, *p120 catenin: an essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression*. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci., 2013. **116**: p. 409-432.
103. Wheelock, M.J., et al., *Cadherin switching*. Journal of Cell Science, 2008. **121**: p. 727-735.
104. Duffy, M.J., et al., *Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis*. Breast Cancer Research, 2000. **2**(4): p. 252-257.
105. Koujan, S.E., et al., *Matrix Metalloproteinases and Breast Cancer*. Thrita, 2015. **4**(1): p. e21959.
106. Roy, R., J. Yang, and M.A. Moses, *Matrix Metalloproteinases As Novel Biomarkers and Potential Therapeutic Targets in Human Cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2009. **27**(31): p. 5287-5297.
107. Egeblad, M. and Z. Werb, *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(3): p. 161-174.
108. Manes, S., et al., *Identification of insulin-like growth factor-binding protein-1 as a potential physiological substrate for human stromelysin-3*. J Biol Chem, 1997. **272**(41): p. 25706-25712.
109. Nistico, P., M.J. Bissell, and D.C. Radisky, *Epithelial-Mesenchymal Transition: General Principles and Pathological Relevance with Special Emphasis on the Role of Matrix Metalloproteinases*. Cold Spring Harbor Perspectives Biology, 2012. **4**: p. 1-10.
110. Schafer, B., et al., *Distinct ADAM metalloproteinases regulate G protein-coupled receptor-induced cell proliferation and survival*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 47929-47938.
111. Stetler-Stevenson, W.G., *Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention*. J Clin Invest, 1999. **103**(9): p. 1237-1241.
112. Bergers, G., et al., *Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(10): p. 737-744.

113. Ahonen, M., A.H. Baker, and V.M. Kahari, *Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells*. *Cancer Res*, 1998. **58**(11): p. 2310-2315.
114. Gomez, D.E., et al., *Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions*. *Eur J Cell Biol.*, 1997. **74**: p. 111-122.
115. Murphy, A.N., E.J. Unsworth, and W.G. Stetler-Stevenson, *Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation*. *J Cell Physiol.*, 1993. **157**: p. 351-358.
116. Guedez, L., L. Courtemanch, and M. Stetler-Stevenson, *Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells*. *Blood*, 1998. **92**: p. 1342-1349.
117. Brew, K., D. Dinakarandian, and H. Nagase, *Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function*. *Biochim Biophys Acta.*, 2000. **1477**: p. 267-283.
118. Baselga, J., *Targeting the Phosphoinositide-3 (PI3) Kinase Pathway in Breast Cancer*. *The Oncologist*, 2011. **16**(1): p. 12-19.
119. Brunet, A., et al., *Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor*. *Cell*, 1999. **96**: p. 857-868.
120. Pearson, G., et al., *Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions*. The Endocrine Society, 2001. **22**(2): p. 153-183.
121. Kolch, W., *Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**: p. 827-837.
122. Dhillon, A.S., et al., *MAP kinase signalling pathways in cancer*. *Oncogene*, 2007. **26**: p. 3279-3290.
123. Osborne, C., P. Wilson, and D. Tripathy, *Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications*. *The Oncologist*, 2004. **9**: p. 361-377.
124. X. Dolcet, et al., *NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer*. *Virchows Arch*, 2005. **446**: p. 475-482.
125. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF- $\kappa$ B*. *Genes Development*, 2004. **18**: p. 2195-2224.
126. P. Viatour, et al., *Phosphorylation of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: implications in cancer and inflammation*. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 2005. **30**(1): p. 43-52.
127. Hsu, H., J. Xiong, and D.V. Goeddel, *The TNF Receptor I-Associated Protein TRADD Signals Cell Death and NF- $\kappa$ B Activation*. *Cell*, 1995. **81**: p. 495-504.
128. Zandi, E., et al., *The I $\kappa$ B Kinase Complex (IKK) Contains Two Kinase Subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , Necessary for I $\kappa$ B Phosphorylation and NF- $\kappa$ B Activation*. *Cell*, 1997. **91**: p. 243-252.
129. Devin, A., et al., *The Distinct Roles of TRAF2 and RIP in IKK Activation by TNF-R1: TRAF2 Recruits IKK to TNF-R1 while RIP Mediates IKK Activation*. *Immunity*, 2000. **12**: p. 419-429.
130. Yamaoka, S., et al., *Complementation Cloning of NEMO, a Component of the I $\kappa$ B Kinase Complex Essential for NF- $\kappa$ B Activation*. *Cell*, 1998. **93**(1231-1240).
131. Dejardin, E., et al., *The Lymphotoxin-Beta Receptor Induces Different Patterns of Gene Expression via Two NF- $\kappa$ B Pathways*. *Immunity*, 2002. **17**: p. 525-535.
132. Claudio, E., et al., *BAFF-induced NEMO-independent processing of NF- $\kappa$ B2 in maturing B cells*. *Nature Immunology*, 2002. **3**(10): p. 958-965.
133. Coope, H.J., et al., *CD40 regulates the processing of NF- $\kappa$ B2 p100 to p52*. *The EMBO Journal*, 2002. **21**(20): p. 5375-5385.
134. Xiao, G., E.W. Harhaj, and S.-C. Sun, *NF- $\kappa$ B-Inducing Kinase Regulates the Processing of NF- $\kappa$ B2 p100*. *Molecular Cell*, 2001. **7**: p. 401-409.

135. Xiao, G., A. Fong, and S.-C. Sun, *Induction of p100 Processing by NF- $\kappa$ B-inducing Kinase Involves Docking I $\kappa$ B Kinase  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ) to p100 and IKK $\alpha$ -mediated Phosphorylation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(29): p. 30099-30105.
136. Kato, T.J., et al., *CK2 Is a C-Terminal I $\kappa$ B Kinase Responsible for NF- $\kappa$ B Activation during the UV Response*. *Molecular Cell*, 2003. **12**: p. 829-839.
137. Tergaonkar, V., et al., *I $\kappa$ B Kinase-Independent I $\kappa$ B $\alpha$  Degradation Pathway: Functional NF- $\kappa$ B Activity and Implications for Cancer Therapy*. *Molecular and Cellular Biology*, 2003. **23**(22): p. 8070-8083.
138. Leeuwenhoek, A.v., *Observationes D. Anthonii Leeuwenhoek, de Natis e semine genitali Animalculis*. *Philos. Trans. R. Soc. London*, 1678. **12**: p. 1040-1043.
139. Wallace, H.M., A.V. Fraser, and A. Hughes, *A perspective of polyamine metabolism*. *Biochem J*, 2003. **376**: p. 1-14.
140. Rea, G., A. Bocedi, and M. Cervelli, *Question: what is the biological function of the polyamines?* *IUBMB Life*, 2004. **56**: p. 167-169.
141. Schipper, R.G., L.C. Penning, and A.A.J. Verhofstad, *Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors?* seminars in CANCER BIOLOGY, 2000. **10**: p. 55-68.
142. Thomas, T. and T.J. Thomas, *Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications*. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2001. **58**: p. 244-258.
143. Nowotarski, S.L., P.M. Woster, and J.R.A. Casero, *Polyamines and cancer: Implications for chemoprevention and chemotherapy*. *Expert Rev Mol Med*, 2013. **15**:e3.
144. Amendola, R., et al., *Spermine Metabolism and Anticancer Therapy*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009. **9**: p. 118-130.
145. Thomas, T. and T.J. Thomas, *Polyamine metabolism and cancer*. *J. Cell. Mol. Med.*, 2003. **7**(2): p. 113-126.
146. Pegg, A.E. and P.P. McCann, *Polyamine metabolism and function*. *Am. J. Physiol.*, 1982. **243**: C: p. 212-221.
147. Matthews, H.R., *Polyamines, chromatin structure and transcription*. *BioEssays*, 1993. **15**: p. 561-567.
148. Schuber, F., *Influence of polyamines on membrane functions*. *Biochem J*, 1989. **260**: p. 1-10.
149. Cervelli, M., et al., *Polyamines metabolism and breast cancer: state of the art and perspectives*. *Breast Cancer Res Treat*, 2014. **148**: p. 233-248.
150. Pegg, A.E., *Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes*. *Biochem J*, 1986. **234**: p. 249-262.
151. Casero, J.R.A. and A.E. Pegg, *The turning point in polyamine metabolism*. *FASEB J.*, 1993. **7**: p. 653-661.
152. Bolkenius, F.N. and N. Seiler, *Acetyl derivatives as intermediates in polyamine catabolism*. *Int. J. Biochem.*, 1981. **13**: p. 287-292.
153. Vujcic, S., et al., *Identification and characterization of a novel flavin-containing spermine oxidase of mammalian cell origin*. *Biochem. J.*, 2002. **367**: p. 665-675.
154. Cervelli, M., et al., *Structure-Function Relationships in the Evolutionary Framework of Spermine Oxidase*. *J Mol Evol*, 2013. **76**: p. 365-370.
155. Wallace, H.M., *Polyamine catabolism in mammalian cells: excretion and acetylation*. *Med. Sci. Res.*, 1987. **15**: p. 1437-1440.
156. Seiler, N., J.G. Delcros, and J.P. Moulinox, *Polyamine transport in mammalian cells. An update*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1996. **28**: p. 843-861.
157. Zhu, C., D.W. Lang, and P. Coffino, *Antizyme 2 is a negative regulator of ornithine decarboxylase and polyamine transport*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(37): p. 26425-26430.

158. Mitchell, J.L., et al., *Feedback repression of polyamine transport is mediated by antizyme in mammalian tissue-culture cells*. *Biochem J*, 1994. **299**: p. 19-22.
159. Sakata, K., K. Kashiwagi, and K. Igarashi, *Properties of a polyamine transporter regulated by antizyme*. *Biochem J*, 2000. **347**: p. 297-303.
160. Silva, T.M., et al., *A role for antizyme inhibitor in cell proliferation*. *Amino Acids*, 2015. **47**: p. 1341-1352.
161. Kahana, C., *Antizyme and antizyme inhibitor, a regulatory tango*. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2009. **66**: p. 2479-2488.
162. Wallace, H.M., et al., *Alterations in Polyamine Catabolic Enzymes in Human Breast Cancer Tissue*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**: p. 3657-3661.
163. Chopra, S. and H.M. Wallace, *Induction of Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase in Human Cancer Cells in Response to Increased Production of Reactive Oxygen Species*. *Biochemical Pharmacology*, 1998. **55**: p. 1119-1123.
164. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. *Cell*, 2011(144): p. 646-674.
165. Laubenbacher, R., et al., *A systems biology view of cancer*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009. **1796**: p. 129-139.
166. Nishida, K., O. Yamaguchi, and K. Otsu, *Crosstalk Between Autophagy and Apoptosis in Heart Disease*. *Circ. Res*, 2008. **103**: p. 348-351.
167. Llambi, F. and D.R. Green, *Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family*. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2011. **21**: p. 12-20.
168. Engel, T. and D.C. Henshall, *Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis?* *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 2009. **1**: p. 97-115.
169. Chinnaiyan, A.M., *The Apoptosome: Heart and Soul of the Cell Death Machine*. *Neoplasia*, 1999. **1**(1): p. 5-15.
170. Sayers, T.J., *Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy*. *Cancer Immunol Immunother*, 2011. **60**: p. 1173-1180.
171. Chao, D.T. and S.J. Korsmeyer, *BCL-2 FAMILY: Regulators of Cell Death*. *Annu. Rev. Immunol.*, 1998. **16**: p. 395-419.
172. Tsujimoto, Y. and S. Shimizu, *Bcl-2 family: Life-or-death switch*. *FEBS Letters*, 2000. **466**: p. 6-10.
173. Michels, J., P.W.M. Johnson, and G. Packham, *Molecules in focus Mcl-1*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2005. **37**: p. 267-271.
174. Halestrap, A.P., et al., *Mitochondria and cell death*. *Biochemical Society*, 2000. **28**(2): p. 170-177.
175. Kastan, M.B., et al., *Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage*. *CANCER RESEARCH*, 1991. **51**: p. 6304-6311.
176. Yu, J., et al., *PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells*. *PNAS*, 2003. **100**(4): p. 1931-1936.
177. Benchimol, S., *P53-dependent pathways of apoptosis*. *Cell Death Differ*, 2001. **8**: p. 1049-1051.
178. Wen, X., et al., *Caspase-mediated programmed cell death pathways as potential therapeutic targets in cancer*. *Cell Proliferation*, 2012. **45**: p. 217-224.
179. Irene, M., et al., *Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy*. *CA A Cancer Journal for Clinicians*, 2005. **55**: p. 178-194.
180. Zou, H., et al., *Apaf-1, a Human Protein Homologous to C. elegans CED-4, Participates in Cytochrome c-Dependent Activation of Caspase-3*. *Cell*, 1997. **90**: p. 405-413.
181. Li, P., et al., *Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade*. *Cell*, 1997. **91**: p. 479-489.

182. Kelly, P.N. and A. Strasser, *The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy*. Cell Death Differentiation, 2011. **18**: p. 1414-1424.
183. Shamas-Din, A., et al., *BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis*. Biochimica et Biophysica Acta, 2011. **1813**: p. 508-520.
184. Nikolettou, V., et al., *Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy*. Biochimica et Biophysica Acta, 2013. **1833**: p. 3448–3459.
185. Kerr, J.F.R., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br. J. Cancer, 1972. **26**: p. 239-257.
186. Ouyang, L., et al., *Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis*. Cell Proliferation, 2012. **45**: p. 487-498.
187. Kopchick, J.J. and J.M. Andry, *Growth Hormone (GH), GH Receptor, and Signal Transduction*. Molecular Genetics and Metabolism, 2000. **71**: p. 293-314.
188. McCann, P.P. and A.E. Pegg, *Ornithine decarboxylase as an enzyme target for therapy*. Pharmacol Ther, 1992. **54**: p. 195-215.
189. Nowotarski, S.L., P.M. Woster, and R.A. Casero, *Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention*. Expert Rev Mol Med, 2013. **15**: p. e3.
190. Agostinelli, E., et al., *The biological function of polyamine oxidation products by amine oxidases: perspectives of clinical applications*. Amino Acid, 2004. **27**: p. 347-358.
191. Anto, R.J. and e. al., *Curcumin (diferuloylmethane) induces apoptosis through activation of caspase-8, BID cleavage and cytochrome c release: its suppression by ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xl*. Carcinogenesis, 2002. **23**(1): p. 143-150.
192. Yoshimura, A., T. Naka, and M. Kubo, *SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation*. Nature Reviews Immunology, 2007. **7**: p. 454-465.

## EKLER

**Tablo 1.**Kullanılan cihazların listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
UV-Transluminatör	GelDOC	BioRad
Santrifüj	5417R	Eppendorf
Spin mini spin plus	22331	Eppendorf
Yatay elektroforez sistemi	Gel XL ultra V-2	BioRad
Hassas Tartı	LE6202S	Sartorius
Mikropipet (0,5µl-10µl)	EH52836	Thermo
Mikropipet (20µl-200µl)	EH46925	Thermo
Mikropipet (200µl-1000µl)	T27274	Thermo
Otoklav	OTO32	Nüve
Manyetik Karıştırıcı	SB162	Stuart/ProLab
Distile Su Cihazı	TANKPE030	Millipore Direct-Q 5 UV
pH Metre	N315	SEM/Mettler Toledo
Derin Dondurucu	2041D	Arçelik
Buzdolabı ( No frost )	4263TMB	Arçelik
Vorteks	SA8	Stuart/ProLab
Dry heat sterilizer	FN120	Nüve
Spektrofotometre	Ultraspec 2100 pro	Biosciences
Güç Kaynağı	PowerPac/Basic	BioRad
Laminar Flow	Model: 12469,2000	HeraSafe
Inverted Mikroskop	Model: XDS-1B	SOIF
İnkübatör	Hera Cell 150	Thermo
Floraslan Mikroskobu	Model: 1X71	Olympus
Flow Cytometry	AC6531180147	BD ACCURI C6
HPLC	1200 Infinity	Agilent Technologies
Dondurucu (-80°C)	Ultra Low Temperature	New Brunswick

	Freezer, U725 innova	Scientific
Elektroforez Aletleri		BioRad

**Tablo 2.** Hücre kültürü donanımları

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
12 kuyucuklu petri	92012	TPP
6 kuyucuklu petri	92006	TPP
96 kuyucuklu petri	92096	TPP
75cm <sup>2</sup> hücre petrileri	90076	TPP
25cm <sup>2</sup> hücre petrileri	90026	TPP
100mm hücre petrileri	93100	TPP
60mm hücre petrileri	93060	TPP
MATRIGEL Invasion Chamber	354483	BD Bioscience
ELISA Kit (GH)	GR180572-1	Abcam
Millipore Santrifüj Filtresi	UFC901024	Merck
Steril pipetler (5ml)	94005	TPP
Steril pipetler (10ml)	94010	TPP
Şırınga filtreleri (0.22 µm)	99722	TPP
Enjektör seti	21G	AstraJect
Tripsin-EDTA	25200-056	Gibco
Penisilin/Streptomisin	15140-122	Gibco
Fetal Bovine Serum	10500-064	Gibco
DMEM	41966-029	Gibco
MDA-MB-453 (HTB-131) hücre hattı	60470335	ATCC

**Tablo 3.** Kullanılan kimyasalların listesi

ADI	ÜRÜN KODU	FİRMA ADI
Etanol	CAS64-17-5	ALKOMED
Saf Etanol	32221	SIGMA
Metanol	24229	SIGMA-ALDRICH
İzopropanol	K44518295 321	Merck
2-merkptoetanol	S4805940 517	Merck
Akrilamid/Bis-Akrilamid 30% çözelti	A9099	SIGMA-ALDRICH
Amonyum persülfat	A2941	AppliChem
Coomassie Blue Belirteci	A3480	AppliChem
DMSO	K46505343 517	SIGMA
DMSO (Curcumin için)	D2650	SIGMA
EDTA	A2937	AppliChem
DiOC6 Boya	2129966	Fluka
DAPI Boya		
Propidium Iodide	P4170-100MG	SIGMA
CM-H2DCFDA	C6827	Invitrogen
Laemli Tamponu	S3401-1V	SIGMA
p-Coumaric Asid	C9008-1G	SIGMA
Luminol	A2185	AppliChem
MTT Solüsyonu	M2128-5G	SIGMA
Phosphate buffered saline (PBS)	BE17-515F	LONZA
Sığır Serum Albumin (BSA)	A2153-10G	SIGMA
SDS (Sodyum dedosil sülfat)	UN1325	AppliChem
Protein İzolasyonu Tamponu	78501	Thermo
Page Ruller Plus Prestained Protein Ladder	26619	Fermentas
Agaroz	A9539	SIGMA
Tris Baz	648310	CALBIOCHEM
Asetik Asit	27225	SIGMA-ALDRICH



Ethidium Bromide	E1510	SIGMA
Hidroklorik Asit	K43804717 239	Merck
Kloroform	UN1888	AppliChem
Ponceau Red Belirteci	A1405	AppliChem
Kristal Viyole	FN1048735	Merck
Tris-HCl	648317	CALBIOCHEM
1 kb Marker	SM1163	Fermentas
6X yükleme Tamponu	R0631	Fermentas
Fenol Kloroform	A2279, 0250	Appllichem
Curcumin	C1386-10G	SIGMA
Neomisin	G8168	SIGMA
Sodyum Klorür	A2942	AppliChem
Tween 20	S6740684 348	MERCK
TEMED	A1148, 0100	Appllichem
Yağsız Süt Tozu	Sc-2325	Santa Cruz
Glisin	3570	CALBIOCHEM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Hidrojen peroksit	K39218400838	MERCK
cDNA Sentez Kiti	1708891	BioRad
PCR Extrime Taq	G-4000	Genet Bio
Trizol RNA Solüsyonu	10296010	Thermo
RNase-free Water	42480093	QIAGEN
Blocklama Solüsyonu	37536	Thermo

**Tablo 4.** %12'lik SDS-PAGE Jel İçeriği

	<b>Alt Jel</b>	<b>Üst Jel</b>
<b>Distile su</b>	3,4 ml	3,075 ml
<b>Tris-HCl</b>	2,5ml (1,5M pH: 8,8)	1,125ml (0,5M pH: 6,8)
<b>%10 SDS</b>	0,1 ml	0,05ml
<b>Akrilamid/Bis-Akrilamid</b>	4 ml	0,67 ml
<b>Amonyum Persulfat (APS)</b>	0,05 ml	0,025ml
<b>TEMED</b>	0,005ml	0,005ml
<b>TOPLAM</b>	10,005 ml	5,05ml

## Özgeçmiş



### Kişisel bilgiler

Ad / Soyad

**Merve Uğur**

Adres

Bozkurt mah. Baruthane cad. Baruthane Palas No:45 Daire:5  
Osmanbey - Şişli / İstanbul ( Türkiye)

Telefon

212-2801186

İş/Cep | 535 3211128

e-posta

[merwe\\_ugur@hotmail.com](mailto:merwe_ugur@hotmail.com)

Uyruk

T.C.

Doğum tarihi

09/02/1988

Cinsiyet

Bayan

### Eğitim ve öğretim

Tarihler

2002 - 2006

Eğitim ve öğretim kapsamına giren  
temel konular / mesleki beceriler

F-M

Eğitim ve öğretim veren kurumun adı  
ve türü

Özel Oğuzkaan Koleji  
İstanbul (Türkiye)

Tarihler

2007-2009

Önlisans eğitim ve öğretim veren  
kurumun adı ve türü

Beykent Üniversitesi (İstanbul), İşletme

Tarihler

**2009 – 2013**

Eğitim ve öğretim kapsamına giren  
temel konular / mesleki beceriler

Genetik laboratuvarı, Mikrobiyoloji laboratuvarı, Hayvan doku kültürü laboratuvarı, Moleküler biyoloji teknikleri, Rekombinant dna teknolojileri laboratuvarı

Lisans eğitim ve öğretim veren  
kurumun adı ve türü

**İstanbul Kültür Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik**

Tarihler	<b>2014 – 2016</b>																														
Eğitim ve öğretim kapsamına giren temel konular / mesleki beceriler	Kanser hücre kültürü, Hayvan doku kültürü, Moleküler biyoloji teknikleri, Eliza																														
Yüksek lisans eğitim ve öğretim veren kurumun adı ve türü	<b>İstanbul Kültür Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik (Tezli)</b>																														
<b>Çalıştığı projeler</b>	<b>1001 Tübitak projesi:</b> Curcumin'in terapötik etkinliğinin otokrin büyüme hormonu sinyal yolağı aracılığı ile farklı meme kanseri hücrelerinde poliamin metabolizması irdelenerek incelenmesi (Bursiyer)																														
<b>Kişisel beceri ve yeterlilikler</b>																															
Ana dil(ler)	<b>Türkçe</b>																														
Diğer dil(ler)																															
Kişisel değerlendirme																															
Avrupa düzeyi (*)																															
<b>İngilizce</b>																															
	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="4">Anlama</th> <th colspan="4">Konuşma</th> <th colspan="2">Yazma</th> </tr> <tr> <th colspan="2">Dinleme</th> <th colspan="2">Okuma</th> <th colspan="2">Karşılıklı konuşma</th> <th colspan="2">Sözlü anlatım</th> <th colspan="2"></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>C1</td> <td>Yeterli</td> <td>C1</td> <td>Yeterli</td> <td>C1</td> <td>Yeterli</td> <td>C1</td> <td>Yeterli</td> <td>C1</td> <td>Yeterli</td> </tr> </tbody> </table>	Anlama				Konuşma				Yazma		Dinleme		Okuma		Karşılıklı konuşma		Sözlü anlatım				C1	Yeterli	C1	Yeterli	C1	Yeterli	C1	Yeterli	C1	Yeterli
Anlama				Konuşma				Yazma																							
Dinleme		Okuma		Karşılıklı konuşma		Sözlü anlatım																									
C1	Yeterli	C1	Yeterli	C1	Yeterli	C1	Yeterli	C1	Yeterli																						
Sosyal beceri ve yeterlilikler	İyi ve çabuk iletişim kurabilmek, takım çalışması yapabilmek,																														
Bilgisayar beceri ve yeterlilikleri	MS-Office																														
Hobiler	Yüzmek, jet-ski yapmak, kayak kaymak, sinema, tiyatro, kitap okumak, puzzle yapmak, resim çizmek																														
Sürücü belgesi/ Tarih	B / 2007																														
<b>Stajlar</b>	<p>İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi (Ağustos 2011)</p> <p>Acıbadem Labcell Hücre Laboratuvarı ve Kordon Kanı Bankası (Ağustos 2012)</p> <p>İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi – Temel Tıp Bilimleri (Aralık 2013-Şubat 2014)</p>																														
<b>Katıldığı Kongreler ve Sertifikalar</b>	<p>Moleküler Biyoloji ve Genetik Hafta Sonu V (Boğaziçi Üniversitesi) - 2010</p> <p>Moleküler Biyoloji ve Genetik Hafta Sonu VII (Boğaziçi Üniversitesi) - 2012</p> <p>International Congress on Polyamines (Kültür Üniversitesi) - 2012</p> <p>Nanotechnology and Tissue Engineering: Current Challenges &amp; Future Prospects (Kültür</p>																														

## Sertifikalar

Üniversitesi) - 2013

2nd Nanotechnology and Tissue Engineering: Current Challenges & Future Prospects (Kültür Üniversitesi) - 2014

I.Kök Hücre Sempozyumu (Haliç Üniversitesi) – 2015

Kök Hücre Temelli Tedavilerde Güncel Yaklaşımlar (Kültür Üniversitesi) - 2015

Kök Hücre ve Uygulamaları Sempozyumu (İstanbul Üniversitesi) – 2016

II. Karaköy Otofaji Sempozyumu - 2016

Liderlik Eğitimi (2010-2011)

PCR – POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (2014)

GLP – İYİ LABORATUVAR UYGULAMALARI (2014)

GMP – İYİ ÜRETİM UYGULAMALARI (2014)

OHSAS 18001 : 2007 İŞ SAĞLIĞI VE GÜVENLİĞİ YÖNETİM SİSTEMİ (2014)

OHSAS 13485 : 2012 TIBBİ CİHAZLAR KALİTE YÖNETİM SİSTEMİ (2014)

Abcam Seminar: “introduction and optimization of Chip” and “optimization of ELISA” (Bilim Üniversitesi) – 2015