

EGE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA  
PROJE KESİN RAPORU  
EGE UNIVERSITY SCIENTIFIC  
RESEARCH PROJECT REPORT

**PROJE NO: 05-TIP-005**

**LÖSEMİ HÜCRE HATLARINDA SİNYAL  
İLETİCİSİ VE TRANSKRİPSİYON  
AKTİVATÖRÜ PROTEİNLERİNİN mRNA  
DÜZEYİNDE KANTİTASYONU**

**PROJE YÖNETİCİSİ**

Yrd. Doç. Dr. Buket KOSOVA

**ARAŞTIRMACILAR**

Araş. Gör. Burçin (TEZCANLI) KAYMAZ

Doç. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ

Yrd. Doç. Dr. Zuhale EROĞLU

Araş. Gör. Nur SELVİ

Prof. Dr. Nejat TOPÇUOĞLU

Doç. Dr. Güray SAYDAM

Uzm. Dr. Fahri ŞAHİN

Araş. Gör. Çığır Biray AVCI

**Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

Faculty of Medicine  
Department of Medical Biology

**Bornova-İZMİR  
2008**

## ÖNSÖZ

### LÖSEMİ HÜCRE HATLARINDA SİNYAL İLETİCİSİ ve TRANSKRİPSİYON AKTİVATÖRÜ PROTEİNLERİNİN mRNA DÜZEYİNDE KANTİTASYONU

JAK/STAT sinyal yolağında görev alan STAT proteinleri, sinyal iletiminde ve malignitede ekspresyon artışı gösteren genlerin aktivasyonunda nükleer transkripsiyon faktörleri olarak fonksiyon görürler. Toplam yedi üyeden oluşan STAT protein ailesinin en önemli üç üyesi STAT3, STAT5A ve STAT5B' dir. STAT3 erken embriyonik gelişim için vazgeçilmezdir; ekspresyonu, sitokinlerin inhibisyonuna ve tümör hücrelerinin kemokin üretimine yol açar. STAT5A ve STAT5B ise farklı hücrelerde gen transkripsiyon etkinliğine bağlı olarak hücre döngüsünü, hücre proliferasyonunu ve apoptozu düzenlerler, çeşitli hematolojik hastalıklarda aktifleşerek lösemi oluşumunda da rol oynarlar. Bu nedenle aktivasyona bağlı olarak ekspresyonu artış gösteren STAT' ların bu ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Çünkü çeşitli kanserlerde ekspresyonları artmış olan bu üç STAT geninin baskılanmasıyla, kanser hücrelerinin apoptozu indüklenebileceğinin anlaşılmasından sonra STAT' lar, geliştirilen yeni anti-kanser ilaçların birinci hedefi haline gelmişlerdir.

Çalışmamızda CCRF-CEM, HL-60 ve K-562 lösemi hücre serileri kullanılarak STAT3, STAT5A ve STAT5B mRNA düzeyinde ekspresyonları gerçek zamanlı RT-PCR ile belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre STAT3 rölatif ekspresyonu her üç hücre serisinde de yüksek ve 0,279 – 1,530 değerleri arasında, STAT5A rölatif ekspresyonu yine hücre serilerinde yüksek ve 0,311 – 0,696 değerleri arasında belirlenmiştir. Benzer şekilde STAT5B rölatif ekspresyon değeri de yüksek ve 0,633 – 1,490 arasında hesaplanmıştır.

Çalışmamızın sonucunda lösemi hücre serilerinde STAT' ların mRNA düzeyinde ekspresyon artışı sergiledikleri, bu yüksek ekspresyonun kantite edilebileceği belirlenmiştir. Sonraki çalışmalar için taban oluşturacak bu bulgular oldukça önemlidir. Böylelikle STAT' ların ekspresyonunu baskılayarak apoptozu indükleyecek bazı ajanların kullanımının önemli olduğu gündeme gelmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilebilecek diğer çalışmalar arasında antisense oligonükleotidleri, tuzak (decoy) nükleotidleri ile siRNA teknolojisi en önemlileri olarak görünmektedir. Böylelikle artmış STAT

ekspresyonları hem mRNA hem de protein seviyesinde baskılanarak kanser hücrelerinin apoptozu indüklenebilecektir.

Çalışmamız için katkıda bulunan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Merkezine teşekkür ederiz.

## İÇİNDEKİLER

Şekil Dizini .....	III
Öz .....	IV
Abstract .....	VI
Kısaltma ve Semboller Dizini .....	VIII
1. Giriş .....	1
2. Literatür Özeti .....	3
3. Materyal ve Yöntem .....	8
3.1. Lösemi Hücre Hatlarının Kültüre Edilmesi .....	8
3.1.1. Hücre Canlılık Testi .....	8
3.1.2. Hücrelerin Pasajlanması .....	9
3.1.3. Hücrelerin Dondurulması .....	9
3.2. Lösemi Hücre hatlarında STAT Ekspresyonlarının Belirlenmesi .....	9
3.2.1. Total RNA İzolasyonu .....	9
3.2.2. cDNA Reaksiyonu .....	10
3.2.3. STAT Ekspresyonlarının Belirlenmesi .....	11
3.2.3.1. STAT3 mRNA Ekspresyon Değerlerinin Belirlenmesi .....	11
3.2.3.2. STAT5A mRNA Ekspresyon Değerlerinin Belirlenmesi .....	14
3.2.3.3. STAT5B mRNA Ekspresyon Değerlerinin Belirlenmesi .....	16

4. Bulgular .....	19
4.1. Hücre Canlılık Testi .....	19
4.2. STAT Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi Amacıyla G6PDH	
Standart Eğrilerin Oluşturulması .....	20
4.2.1 STAT3 Gen Ekspresyon Çalışmalarında Kullanılan G6PDH	
Standart Eğrisi.....	20
4.2.2. STAT5A Gen Ekspresyon Çalışmalarında Kullanılan G6PDH	
Standart Eğrisi .....	20
4.2.3. STAT5B Gen Ekspresyon Çalışmalarında Kullanılan G6PDH	
Standart Eğrisi .....	22
4.3. STAT Gen Ekspresyonlarının Kantitasyonu .....	22
4.3.1. STAT3' e ait Gen Ekspresyon Değerleri .....	23
4.3.2. STAT5A' ya ait Gen Ekspresyon Değerleri .....	23
4.3.3. STAT5B' ye ait Gen Ekspresyon Değerleri .....	25
5. Tartışma, Sonuç ve Öneriler .....	26
6. Kaynaklar .....	32

## ŞEKİL DİZİNİ

<b>Şekil 1:</b> Tripan mavisi boyası ile hücre sayımı .....	19
<b>Şekil 2:</b> STAT3 gen ekspresyon çalışmalarında kullanılan G6PDH standart eğrisi .....	21
<b>Şekil 3:</b> STAT5A gen ekspresyon çalışmalarında kullanılan G6PDH standart eğrisi .....	21
<b>Şekil 4:</b> STAT5B gen ekspresyon çalışmalarında kullanılan G6PDH standart eğrisi .....	22
<b>Şekil 5:</b> STAT3 gen ekspresyon çalışması. K-562 hücrelerine ait sonuçlar ...	24
<b>Şekil 6:</b> STAT5A gen ekspresyon çalışması. HL-60 hücrelerine ait sonuçlar .....	24
<b>Şekil 7:</b> STAT5B gen ekspresyon çalışması. CCRF-CEM hücrelerine ait sonuçlar ..	25

## TABLO DİZİNİ

<b>Tablo 1:</b> Hücre hatlarının ortalama canlı – ölü sayıları ile hücre canlılıkları .....	19
<b>Tablo 2:</b> STAT3 genine ait gen ekspresyon değerleri .....	23
<b>Tablo 3:</b> STAT5A genine ait gen ekspresyon değerleri .....	23
<b>Tablo 4:</b> STAT5B genine ait gen ekspresyon değerleri .....	25

## ÖZ

### **Lösemi Hücre Hatlarında Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü Proteinlerinin mRNA Düzeyinde Kantitasyonu**

STAT proteinleri sitokin-, büyüme faktörü- veya peptid reseptörlerinden aldıkları sinyaller ile aktive olan ve bu sinyalleri çekirdeğe ileten ‘latent’ sitoplazmik transkripsiyon faktörleri olarak fonksiyon görürler. Aktive olduklarında önce fosforillenerek, sonra da dimerleşerek çekirdeğe yönelirler ve hedef genin promoter bölgesine bağlanarak gen ekspresyon değişikliklerine neden olurlar. STAT’ lar hücre yaşamı ve sürdürülmesi, hücre proliferasyonunu uyarma, anjiogenezi uyarma ve hücreleri immun sistemden koruma gibi önemli görevleri bulunan çeşitli proteinlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinden sorumludurlar. Bu nedenlerden dolayı, anormal aktivasyonları çoğu zaman hücresel transformasyona neden olur. STAT proteinlerinden özellikle STAT3 ve STAT5 kontrolsüz çoğalan, apoptoza uğramayan, immun sistemden kaçan ve anjiogenezi uyaran tümör hücrelerinde yüksek oranda ifade edilirler. Bu transkripsiyon faktörlerinin yüksek ekspresyonları olağan gen ekspresyon şablonlarını değiştirip maligniteye sebep veren genleri aktive ederek, kanserleşmeyi tetikleyebilirler.

Çalışmamızda CCRF-CEM, HL-60 ve K-562 lösemi hücre serileri kullanılarak STAT3, STAT5A ve STAT5B rölatif ekspresyonları mRNA düzeyinde gerçek-zamanlı RT-PCR ile belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre CCRF-CEM, HL-60 ve K-562 hücre serilerinde sırasıyla STAT3 ekspresyonu 0.958, 1.530 ve 0.279, STAT5A ekspresyonu 0.311, 0.423 ve 0.696 olarak belirlenirken STAT5B ekspresyonu ise 1.490, 0.633 ve 0.636 olarak saptanmıştır. Bulgularımıza göre üç hücre hattında STAT3, 5A, 5B rölatif kantitasyon değerlerini karşılaştırdığımızda; CCRF-CEM’ de STAT5B geninin, HL-60’ ta STAT3 geninin, K-562’ de ise STAT5A geninin en yüksek oranda ifade edildiği belirlenmiştir.

Çalışmamızın sonucunda lösemi hücre serilerinde STAT’ ların mRNA düzeyinde ekspresyon artışı sergiledikleri, bu yüksek ekspresyonun kantite edilebileceği

gösterilmiştir. Sonuç olarak, STAT gen ekspresyonunun kantitatif olarak takip edilmesiyle gerçekleştirilen bu çalışmayla, ileride hastaların tedavilerini izleme ve yönlendirilmelerine yardımcı olunacağı ve bireye özgü tedavi protokolleri oluşturulmasına katkıda bulunulacağı kanısındayız.

**Anahtar Kelimeler:** Lösemi, Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü Proteinleri, STAT, mRNA Kantitasyonu



## ABSTRACT

### **Signal Transducer And Activator Of Transcription Proteins' Quantification at mRNA Level in Leukemia Cell Lines**

Stat proteins are activated by signals they receive from cytokines, growth factors, peptid receptors and transmit them to the nucleus, as they function as cytoplasmic latent transcription factors. When they are activated, following phosphorylation they dimerise and move to the nucleus and by binding to the target gene's promoter region, they cause differences in gene expression. STATs are responsible for regulating various proteins' expressions that function as keeping on cell survival, stimulating cell proliferation, angiogenesis and protecting cells from immune system. Because of these, their abnormal activities generally cause cell transformation. Among STAT proteins especially STAT3, STAT5A and STAT5B are overexpressed in tumor cells that proliferative uncontrollably, escape apoptosis, evade immun detection and induce angiogenesis. These transcription factors' high expressions trigger cancer by activating genes that change usual gene expression patterns and induce malignancy.

In the current study, STAT3, STAT5A and STAT5B gene expressions at mRNA levels were determined by real-time RT-PCR by using CCRF-CEM, HL-60 and K-562 leukemia cell lines. According to our results, while STAT3 expression was found 0.958, 1.530, 0.279 and STAT5A expression as 0.311, 0.423 and 0.696, STAT5B expression was detected as 1.490, 0.633 and 0.636 in CCRF-CEM, HL-60 and K-562 cell lines, respectively. According to our data, when we compare STAT3, 5A and 5B relative quantification rate in three cell lines, highest overexpression rates were detected in CCRF-CEM for STAT5B gene, in HL-60 for STAT3 gene and in K-562 for STAT5A gene.

At the end of our study it is shown that, in leukemia cell lines STATs are overexpressed at mRNA levels and this overexpression can be quantified. In conclusion we think that by this study based on determination of STAT genes' expressions

quantitatively, it would be helpful to follow up and guide the cases' treatment and to create individualized specific treatment protocols for each patients in the future.

**Key Words:** Leukemia, Signal Transducer and Activator of Transcription Proteins, STAT, mRNA Quantification

## **KISALTMA ve SEMBOLLER DİZİNİ**

**STAT:** Sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü

**JAK:** Janus kinaz

**IL6:** İnterlökin 6

**EGF:** Epidermal büyüme faktörü

**CTNF:** İnsan ciliary nörotrofik faktör

**IL3:** İnterlökin 3

**GM-CSF:** Granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör

**G-CSF:** Granülosit koloni stimüle edici faktör

**EPO:** Eritropoietin

**TPO:** Trombopoietin

**VEGF:** Vasküler endotelial büyüme faktörü

**HIF1:** Hipoksi yoluyla uyarılan faktör 1

**AML:** Akut myeloid lösemi

**HL-60:** İnsan promiyelositik lösemi hücre dizisi

**CCRF-CEM:** İnsan T-hücreli lenfoblastik lösemi hücre dizisi

**K-562:** İnsan kronik miyeloid lösemi hücre dizisi

**FBS:** Fötal sığır serum

**G6PDH:** Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz

**cDNA:** Komplementer DNA

**ALS:** Amiyotrofik lateral skleroz

**2'-FU, FC:** 2'-Flourouridin / 2'-Florositidin

## 1. GİRİŞ

Son yıllarda, ‘Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü’ (STAT) proteinleri özellikle kontrolsüz çoğalan, apoptoza uğramayan, immun sistemden korunan ve anjiyogenezi uyaran insan tümör hücrelerinde daha yüksek oranda ifade edildikleri bulunduktan sonra önemli birer terapötik hedef haline gelmişlerdir (1).

STAT proteinleri interfaz’ daki hücrelerin sitoplazmalarında inaktif halde bulunurlar. Büyüme faktörü veya sitokinler tarafından uyarılmalarından sonra aktif hale gelen STAT’ lar nukleusa yönelir ve hedef genlerin promoter bölgelerine bağlanarak transkripsiyonlarını başlatırlar. Kanser hücrelerinde meydana gelen genetik değişiklikler nedeniyle hızla artış gösteren sitoplazmik tirozin kinazların (JAK ve SRC ailesi) aşırı aktifleşmelerine bağlı olarak STAT proteinleri de aktifleşirler (2, 3). Bunun sonucunda, tümör büyümesi ve anjiyogenez gibi hücrelere malign özellik kazandıran değişiklikler meydana gelir (4, 5).

Büyüme faktörü reseptörleri genellikle ‘intrinsik’ tirozin kinaz aktivitesine sahipler iken, pek çok sitokin reseptörü buna sahip değildir ve sitoplazmik tirozin kinazlar üzerinden sinyal iletim yolağını aktive ederler. Normal hücrelerde STAT’ ların aktivasyonu, ligandın reseptöre bağlanması sonrasında tirozin kinazların aktifleşmesiyle düzenlenmektedir. Aktifleşen tirozin kinazlar sitokin reseptörlerini, sitoplazmik kuyruklarında bulunan belirli tirozin amino asit kalıntıları üzerinden fosforile ederler. Fosforile olmuş yerlere bağlanan STAT’ ların kendilerinin de fosforile olmaları, dimerleşmeleri ve nukleusa göç edip hedef genlerin ekspresyonlarını değiştirmeleri sonrasında hücre bölünmesi gerçekleşir (6, 7, 8). Bu açıdan, STAT proteinleri sitokin sinyal iletim yolağının kilit komponentlerinden sayılırlar. Yakın zamanda, aktifleşmiş STAT proteinlerinin değişik insan tümör tiplerinde ve hücre hatlarında yüksek oranda ifade edildiklerini gösteren çalışmalar mevcuttur (9, 10). STAT3 ve STAT5 aktivitelerinin kontrolsüz işleyişi, malign transformasyonda rol oynamaktadır. 1990’lı yılların başlarında hız kazanan çalışmalar göstermiştir ki; devamlı olarak aktif olan STAT proteinleri, antiapoptotik yolları uyararak malign süreçte etkili olmaktadır (11). Ayrıca, STAT aracılı sinyal iletimi ile uyarılan hedef genlerin hücre döngüsünün kontrolünü sağlayarak ve apoptozu engelleyerek karsinogenez süreci hızlandırdıkları

gösterilmiştir. Çalışmamızın temelini oluşturan lösemik blast hücrelerinde sitokin sentezi ve otokrin/parakrin yolla JAK/STAT yolağının uyarılması, akut myeloid lösemide artış gösteren STAT aktivasyonunu açıklayabilmektedir.

Çalışmamızda, farklı iki gen tarafından kodlanan STAT ailesi üyelerinden çok benzer iki protein STAT 5A (96 kDa) ve STAT5B (94kDa)'nin ile STAT 3'ün kantitasyonları mRNA düzeyinde gerçekleştirilmiştir. Amacımız bu çalışmanın sonucunda, kanser tedavisi gören hastaların STAT proteinlerinin ekspresyonunu belirleyerek, tedaviye verdikleri yanıtı izlemek ve tedavilerinin yönlendirmesinde yardımcı olmaktır.

Çalışmamızın devamı ise, TÜBİTAK' ın 105S459 no' lu araştırma projesi ile kapsamı oldukça genişletilerek gerçekleştirilmiştir. Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Merkezince desteklenen projemiz kapsamında temel çalışmaları gerçekleştirip protokolleri laboratuvar şartlarımıza göre standardize edip alt yapı çalışmalarını tamamladıktan sonra, çalışmalar iletmiştir.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

STAT ailesi ile gerçekleştirilen ilk çalışmalar, üyelerinin fonksiyonlarının belirlenmesi ile başlamıştır. Bu amaçla genlerin karakterizasyonu tanımlanmaya çalışılmıştır. Buna göre, STAT3 interlökin 6 (IL6), epidermal büyüme faktörü (*epidermal growth factor*; EGF) ve leptin tarafından aktive edilebilen ve erken embriyonik gelişim için vazgeçilmez olan STAT ailesindeki en önemli moleküler hedef olarak karşımıza çıkmaktadır. (1). STAT3, epiteliyal hücrelerin apoptozunda, postlaktatik meme bezlerin düzenli çalışmasında, derinin yeniden şekillenmesinde, keratinosit göçünde, makrofaj inaktivasyonunda ve T-helper hücre cevabında oluşan inflamatuvar sitokinlerin ‘down’-regülasyonunda rolleri bulunmaktadır (12, 13, 14 ). STAT3 te, diğer STAT aile üyeleri gibi, Janus kinazlar (JAK) tarafından tirozin-fosforilasyonuna uğratılarak dimerize olmakta ve hedef genleri aktive edeceği nükleusa taşınmaktadır. STAT3; IL6 ve CTNF (*human ciliary neurotrophic factor*) gibi sitokin reseptörlerinin veya intrinsik tirozin kinaz aktiviteye sahip reseptörlerinin ligandlarına bağlanmaları sonucunda aktive olur. Hücre büyümesini düzenler, IL6’ ya-bağımlı karaciğer rejenerasyonuna ve hücrel transformasyona aracılık ederler (15, 16, 17). Aktive STAT3 ayrıca, multiple myelomlu hastaların kemik iliğindeki mononükleer hücrelerde bulunur. STAT3’ ün sürekli dimerize halde kalmasına neden olan mutasyonlar, normal tirozin kinaz düzeylerinde bile hücre hatlarını transforme ederek, bunları kanser hücrelerine dönüştürebilme kapasitesine sahiplerdir (15). Bu sebeple, STAT3 aktivasyon inhibisyonu kanser hücrelerinin tedavisinde oldukça önemli bir yer alır.

STAT protein ailesinin başka bir üyesi ise STAT5A’ dır ve meme bezi gelişimi için gerekli, prolaktin sinyal iletiminden de sorumludur; STAT5B ise, büyüme hormonunun sinyal iletiminde etkilidir (18, 19).

Fareler ile yapılan fonksiyonel bir çalışmada, STAT5B gen delesyonunun cinsel dimorfik gen düzenlenmesini ortadan kaldırarak, erkek farelerin daha iri ve kilolu olmalarına neden olduğu gösterilmiştir. İki STAT5 geninin delesyonu ise, hematopoietik gelişim bozukluğuna neden olmaktadır (20, 21). STAT5’ ler İnterlökin 3 (IL3), granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), granülosit koloni

stimüle edici faktör (G-CSF), eritropoietin (EPO), trombopoietin (TPO) gibi hematopoietik hücre proliferasyonunu ve gelişimini uyaran çeşitli hematolojik sitokinler, hormonlar ve büyüme faktörleri tarafından aktive edilebilmektedirler. Buna bağlı olarak ta IL3, IL5 ve GM-CSF gibi sitokin reseptörlerinin ligandlarına bağlanmaları sonucunda aktive olurlar (19). STAT5 proteinlerinin tümör hücrelerindeki ekspresyonlarının baskılanması apoptozu indüklediğinden, bu proteinler çok önemli birer terapötik hedef olarak kabul edilirler.

JAK/STAT sinyal iletimi yolağının önemli rollerinin belirlenmesinden sonra konu ile ilgili çalışmalar daha da hız kazanmıştır. Her geçen gün karsinogenez ve onkogenез sürecinde daha çok fonksiyonu olabileceği düşünülen STAT proteinlerinden özellikle STAT3 ve STAT5' in anjiyogenezdeki rolleri önem kazanmaya başlamıştır. Bilindiği gibi kanser hücrelerinin kontrolsüz olarak çoğalabilme ve apoptozdan kaçabilme kabiliyetleri, tümör gelişimi için çoğunlukla gereklidir; fakat yeterli değildir. Organogenez esnasında bir dokunun içindeki hücreler kılcal damarlara yakın olarak yerleşmeleri gereklidir (22). Benzer şekilde birçok tümör, kendilerini yeni gelişen kan damarları aracılığıyla O<sub>2</sub> ve besinle takviye edemedikleri sürece büyüyemezler. Zaman geçtikçe, aktive edilen onkogen ürünlerinin önemli bir görevleri de anjiogenez uyarma olduğu anlaşılmıştır (23, 24, 25). Kan damarı oluşumunu uyaran 'potent' sinyal vasküler endotelial büyüme faktörü' dür (*vascular endothelial growth factor*; VEGF). Kanser hücreleri, normal hücrelere oranla artmış düzeylerde VEGF oluştururlar (26, 27). VEGF endotel hücrelerdeki transmembran reseptör kinazlara bağlanarak, yeni kan damarların oluşumu için gerekli olan endotelial hücre göçünü ve çoğalmasını aktive eder (28, 29). Yakın zamanda, STAT3' ün doğrudan VEGF geninin transkripsiyonel aktivatörü olduğu anlaşılmıştır (30, 31). Hücrelerin, devamlı aktif olan STAT3C mutantıyla transfekte edilmesinin VEGF ekspresyonunu arttırmaya ve *in vivo* olarak anjiogenez uyarma için yeterli olduğu görülmüştür (30). STAT3 sinyalleşmesinin engellenmesiyle, SRC ve IL-6 tarafından uyarılan VEGF artışı engellemektedir ve belki de VEGF tarafından uyarılan ve STAT3' den önce gelen başka birçok tirozin kinaz yolağı da iptal edilmektedir (30, 32).

Hipoksi yoluyla uyarılan faktör 1 (*hypoxia-inducible factor 1*; HIF1) O<sub>2</sub>-homeostazını kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür ve kanserde artan VEGF sentezinin son 'moleküler şalter' idir (33). İntratümöral hipoksiye bağlı O<sub>2</sub> eksikliği ve



sinyal iletim yollarının aktivasyonu HIF1' in aktivasyon artışına neden olabilirler (33). Bunun yanında p53' ün, HIF1' in uyarılabilir HIF1- $\alpha$  alt ünitesinin dayanıklılığını düzenlemede önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (34). STAT3, p53 ekspresyonunu engellediğinden; STAT3 sinyalleşmenin engellenmesiyle, p53' e-bağımlı mekanizmalarla HIF1' in yıkımı teşvik edilecektir ve bunun sonucunda da HIF1 aktivitesi düşecektir. Böylece, STAT3 inhibitörleri VEGF' in ekspresyonunu değişik basamaklarında engelleyip, 'potent' anti-anjiogenik etkiler yaratacaklardır. Bu çalışmalar sonucunda, STAT proteinlerinin kanser ile doğrudan ilişkili oldukları ortaya çıkartılmış ve birçok onkolojik sinyal yolağının birleştiği nuklear transkripsiyon faktörleri olduklarından, kanser hastalığının tedavi çalışmalarında önemli birer moleküler hedef oldukları kanısına varılmıştır (35, 36).

STAT' ların ekspresyonlarının araştırıldığı çeşitli çalışmalarda STAT protein ailesi üyelerinin hücre içi ekspresyon ve aktivasyon düzeyleri kantitatif metotlarla ölçülmüş ve değerlendirilmiştir (37, 38, 39). STAT proteinleri ile yapılan çalışmalarda, çeşitli kanser hücre hatlarından veya hastalardan alınan kanserli hücreler ile oluşturulan kültürlerden yararlanılmıştır. Yapılan bir çalışmada, 20 Akut Myeloid Lösemi (AML) hastanın 15' inin (%75) blast hücrelerinde STAT5A' nın, 18' inin de (%90) STAT5B' nin fosforile formlarının aktive olduğu rapor edilmiştir (40). STAT proteinlerinin aktivasyonunun değerlendirildiği diğer metodlar arasında immunopresipitasyon, EMSA ve Western Blot yer almaktadır (41). Gerçekleştirilen bir başka çalışma alanı da, STAT proteinlerinin ekspresyonunu baskılayan antisense oligonükleotidlerin kullanımınıdır. Bu amaçla, hedef STAT genlerinin mRNA' sına komplementer olacak şekilde dizayn edilmiş anti-sense oligonükleotidler ile inkübe edilip sonrasında RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir (42, 43, 11). Elde edilen RNA' lar uygun bir Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) protokolüne göre amplifiye edilip mRNA düzeyleri belirlenmiştir. Protein düzeyinde gerçekleştirilen çalışmalar Western Blot analizleriyle gerçekleştirilmiştir. STAT protein ailesi üyeleri ile ilgili bilgi düzeyi arttıkça, bu genlerin apoptoz üzerindeki etkileri de araştırılmaya başlanmıştır (11). Bu çalışmalar sonrasında STAT' ların inhibisyonunun, hücrelerin apoptotik durumunu değiştirerek apoptozun indüklendiği belirlenmiştir. STAT' ların inhibisyonu ise hedef genlerin mRNA' sına özgül olarak dizayn edilmiş antisense oligonükleotidleri, siRNA' lar ve decoy oligonükleotidler ile gerçekleştirilmiştir. STAT' ların hem mRNA hem de protein

seviyesinde baskılanma düzeyleri yine ekspresyon analizlerinin değerlendirildiği metodlara benzer biçimde RT-PCR ile (24. – 48. saatler için) Western Blot analizleriyle (72. - 96. saatler için) değerlendirilmiştir. Daha uzun süreli baskılamanın gerçekleştirildiği çalışmalarda ise bu kez shRNA' lar kullanılarak benzer metodlar ile mRNA ve protein seviyesinde ekspresyon değerleri belirlenmiştir. Gen baskılama çalışmaları sonrasında apoptozun indüklenmesinin kontrolü de çeşitli metodlarla tayin edilebilmektedir. Bunlar en kolay olarak ilk önce etidyum bromür/akridin oranj ve PI (propidium iodid) boyamalarıyla floresan mikroskopta morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Sonraki adımlarda ise apoptotik durumu belirleyen çeşitli ticari kitler ile çalışılarak ya floresan mikroskobu ile ya da ELISA gibi cihazlarla araştırmalar gerçekleştirilmiştir.

Yurt içinde bu konuyla ilgili sınırlı sayıda makale bulunmakla birlikte, moleküler anlamda herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Mevcut veriler, STAT proteinlerinin onkojenik sinyal iletimi yolağındaki önemlerini belirtmektedir ve herhangi bir laboratuvar çalışmasını içermemektedir (44, 45).

Tüm bu verilerin ışığında, çalışmamızda lösemi hücre serileri ile çalışıldığından, literatürde yer alan çalışmalara benzer şekilde hücre serilerinin kültürü yapılmıştır. Hücreler uygun hale geldikten sonra total RNA izolasyonunu takiben cDNA' ları elde edilmiştir. STAT3, STAT5A ve STAT5B' nin mRNA kantitasyonları için gerçek zamanlı RT-PCR cihazı kullanılarak ~50 dakika gibi kısa bir sürede sonuçlar alınıp değerlendirilmiştir.

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), DNA ipliğinin önceden belirlenen bir bölgesini amplifiye etme amacıyla kullanılan moleküler bir metottur. PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngülerini sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler), hassas ölçüm aletleri ile birleştirilmesi sonucu gerçek-zamanlı PCR yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem sayesinde, DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda örnek son derece düşük kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir. Gerçek zamanlı PCR' da ürünlerin analizi reaksiyon esnasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Gerçek zamanlı PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problemlerden

yararlanılmaktadır. Böylece sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' mızda aktif olarak kullandığımız bu cihaz ile çalışmamızda alacağımız sonuçların güvenilirliği tartışılmazdır.

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Lösemi Hücre Hatlarının Kültüre Edilmesi

Proje kapsamında, promiyelositik lösemi HL-60 [(Human Caucasian promyelocytic Leukemia) – ECACC (European Collection of Cell Cultures), Morphology: Lymphoblast, Katalog no: 98070106, Lot no: 05/G/011)], insan T-hücreli lenfoblastik lösemi CCRF-CEM [(Human Caucasian acute lymphoblastic Leukemia) – ECACC (European Collection of Cell Cultures), Morphology: Lymphoblast, Katalog no: 85112105, Lot no: 01/E/017)] ve kronik miyeloid lösemi K-562 [(Human Caucasian Chronic Myelogenous Leukemia) – ECACC (European Collection of Cell Cultures), Morphology: Lymphoblast, Katalog no: 89121407, Lot no: 06/A/015)] lösemi hücre hatları uygun hücre kültür şartları ortamında çoğaltılmıştır. Bu amaçla, %1 - L Glutamin, 10.000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin ve %10 inaktif fetal sığır serum (FBS) eklenen RPMI-1640 besiyeri ortamı kullanılmış ve lösemik hücre hatları, 37°C’ de ve %95 nem, %5 CO<sub>2</sub>’ li inkübatörde çoğaltılmıştır. Hücrelerin proliferasyonu, pasajları ve takip işlemleri Inverted Mikroskop kullanılarak izlenmiştir. Uygun hücre kültür şartlarında çoğaltılmış hücreler dondurularak, -86°C’ ye kaldırılmıştır.

##### 3.1.1. Hücre Canlılık Testi

Kültüre edilen hücrelerin canlılıklarını ve sayılarını takip etmek amacıyla, Tripan mavisi boyası testi kullanılmıştır. Buna göre, 50 µl hücre lizatı ile 50 µl boya karıştırılarak, ışık mikroskobu altında hücrelerin canlılığı ve sayısı “Neubayer” lam kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla, “Neubayer” lamda bulunan 4x4’ lük karelerden oluşmuş 4 alan sayılmıştır. Tripan mavisi boyası testi gereğince boyayı içine alıp mavi renkte görünen hücreler ölü, boyayı içine almayanlar ise canlı olarak değerlendirilmiştir. Canlı hücre toplamının ortalaması alınarak 20.000 ile çarpılmasıyla, ml başına düşen canlı hücre sayısı saptanmıştır. Aynı işlem ölü hücreler için de gerçekleştirildiğinde, ml başına düşen ölü hücre sayısı belirlenmiştir. Hücre canlılığı ise, toplam hücre sayısının canlı hücrelere % olarak oranlanmasıyla belirlenmiştir.

### 3.1.2. Hücrelerin Pasajlanması

Pasajlanması gereken hücreler 50 ml' lik tüplere alınarak 2.000 rpm' de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Çöken hücre pelleti üzerine taze ortam ilave edilerek hücreler flaslere ekilmiştir.

### 3.1.3. Hücrelerin Dondurulması

Deneylerde kullanılmayacak fazla olan hücreler 50 ml' lik tüplere alınarak 2.000 rpm' de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti üzerine 9:1 oranında hazırlanmış fetal sığır serumu ile DMSO karışımından 750 µl eklenmiştir. Resüspanse edildikten sonra kriyotüplere transfer edilen hücreler -86°C' de muhafaza edilmişlerdir.

## 3.2. Lösemi Hücre Hatlarında STAT Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Oligonükleotid ile muamele edilmemiş CCRF-CEM, HL-60, K-562 hücre hatlarında gözlenen normal STAT3, STAT5A ve STAT5B mRNA ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Bu amaçla hücrelerden total RNA izolasyonuna takiben cDNA reaksiyonu ve gen ekspresyon analizi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.1. Total RNA İzolasyonu

1. Süspanse halde bulunan lösemi hücre hatlarından 1' er ml alınıp, hücreler çöktürüldükten sonra 200 µl serum fizyolojik içinde süspanse edilmişlerdir.
2. Üzerlerine 400 µl Lysis Binding Buffer eklenmiştir. Karışım pipetle iyice resüspanse edildikten sonra, cam lifli filtreli tüpe aktarılmıştır.
3. 10.000 rpm' de 15 saniye santrifüj edildikten sonra, filtrenin altına geçen süpernatant atılmıştır.
4. 90 µl DNase Incubation Buffer + 10 µl DNase' dan oluşan karışım hazırlanmış ve tamamı filtreli tüpe aktarılarak 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.

5. İnkübasyonu tamamlanmış hücrelerin üzerine 500 µl Wash Buffer I eklenip, 10.000 rpm' de 15 saniye santrifüj sonrasında süpernatant atılmıştır.
6. 500 µl Wash Buffer II eklenip, 10.000 rpm' de 15 saniye santrifüj sonrasında süpernatant atılmıştır.
7. Hücrelerin üzerine 200 µl Wash Buffer II eklenip, 13.000 rpm' de 2 dakika santrifüj sonrası filtre yeni bir Eppendorf tüpe aktarılmıştır.
8. 50 µl Elution Buffer eklenip, 10.000 rpm' de 1 dakika santrifüj edildikten sonra tüpte kalan çözelti total RNA' mızı oluşturmuştur.

### 3.2.2. cDNA Reaksiyonu

İzole edilen total RNA' ların RT-PCR (revers transkriptaz - PCR) ile komplementer DNA' ya (cDNA) çevrilmeleri için, FirstStrand cDNA Synthesis kit protokolüne göre thermal cycler' da PCR' ları gerçekleştirilmiştir. Bunun için 10 µl total RNA önce 65°C' de 10 dakika denatüre edilmiştir. Sonra, cDNA reaksiyonu için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlanmıştır:

#### Reaksiyon Karışımı

PCR seviyesindeki su:	4,4 µl
5x Reaksiyon Tamponu:	4,0 µl
Random Primer:	0,2 µl
dNTP:	0,4 µl
AMV Reverse transkriptaz:	0,4 µl
RNase İnhibitör:	0,6 µl

Bu şekilde hazırlanan karışıma 10 µl denatüre edilmiş total RNA eklendikten sonra örnekler 37°C' de 1 saat, 65°C' de 10 dakika ve 4°C' de 5 dakika duracak şekilde programlanan thermal cycler cihazına yerleştirilmiştir. Amplifikasyon süresinin sonunda cDNA elde edilmiştir. cDNA reaksiyonu sonrasında STAT gen ekspresyonlarının LightCycler cihazıyla belirlenme aşamasına geçilmiştir.

### 3.2.3. STAT Ekspresyonlarının Belirlenmesi

CCRF-CEM, HL-60 ve K-562 hücre hatlarından elde edilen cDNA' lardan STAT3, STAT5A, STAT5B ekspresyonları belirlenmiştir. Bu amaçla, hedef STAT genlerine özgül olarak dizayn edip sentez ettirilen primer ve probalar (TibMolBiol, Germany), Fast Start DNA Master Hybridisation Probes (Roche Applied Science, Germany) ve G6PDH House Keeping Gene Seti (Roche Applied Science, Germany) kitlelerinin özellikleri doğrultusunda geliştirilen reaksiyon protokolleri, gerçek-zamanlı bir PCR cihazı olan LightCycler' e (Roche Applied Science, Germany) uyarlandı.

G6PDH cDNA' larını kullanmamızdaki amaç, çalışma sonrasında kopya sayısı bilinen standartlar ile bir standard eğrinin çizilmesi ve bu eğriye göre kopya sayılarını bilmediğimiz örneklerin hedef gen konsantrasyonlarını belirlemektir. Rölatif kantitasyon değeri, hedef gen kopya sayısının house keeping gen kopya sayısına bölünerek elde edilmiştir.

#### 3.2.3.1 STAT3 mRNA Ekspresyon Değerlerinin Belirlenmesi

STAT3 mRNA ekspresyonunun LightCycler' da rölatif olarak belirlenebilmesi amacıyla, buna uygun bir PCR protokolü hazırlanmıştır. Oluşturulan bu reaksiyon protokolüne göre;

#### **Hedef (STAT3)**

PCR seviyesindeki su: 2,3 µl

MgCl<sub>2</sub>: 1,2 µl

İleri primer: 1 µl

Geri primer: 1 µl

FL: 0,5 µl

LC-Red 640: 0,5 µl

Fast Start DNA Master Hybridisation Probe: 1 µl

cDNA: 2,5 µl

#### **Referans (G6PDH)**

PCR seviyesindeki su: 4,3 µl

MgCl<sub>2</sub>: 1,2 µl

Primer-Probe Karışımı: 1 µl

Fast Start DNA Master Hybridisation Probe: 1 µl

cDNA: 2,5 µl

STAT3 (NM-003150) genine ait primer – prob dizileri aşağıda verilmektedir:

STAT3 İleri Primer: 5' – ACC AAC AAT CCC AAG AAT GT –3'

STAT3 Geri Primer: 5' – CGA TGC TCA GTC CTC GC –3'

STAT3 Fluorescein: 5' – TCA AGT GGC CGA GGT CCT GA –FL

STAT3 LC Red 640: 5' – CTG GCA GTT CTC CTC CAC CAC CA –p

LightCycler' da STAT3 ekspresyon tayini için oluşturulan PCR termal profili:

### 1-DENATÜRASYON

PARAMETRE	DEĞER
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	Yok
	1.Segment
Hedef Isı (°C)	95
İnkübasyon Zamanı [sn]	120
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0
Okuma Modu	Yok



## 2-AMPLİFİKASYON

PARAMETRE	DEĞER		
Döngü Sayısı	50		
Analiz Modu	<b>Kantitasyon</b>		
	<i>1.Segment</i>	<i>2.Segment</i>	<i>3.Segment</i>
Hedef Isı (°C)	95	51	72
İnkübasyon Zamanı [sn]	10	10	5
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0	20.0	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0	0	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0	0.0	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0	0	0
Okuma Modu	Yok	Tek	Yok

## 3-SOĞUMA

PARAMETRE	DEĞER
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	Yok
	<i>1.Segment</i>
Hedef Isı (°C)	40
İnkübasyon Zamanı [sn]	30
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0
Okuma Modu	Yok

### 3.2.3.2 STAT5A mRNA Ekspresyon Değerlerinin Belirlenmesi

STAT5A mRNA ekspresyonunun LightCycler' da rölatif olarak belirlenebilmesi amacı yla, buna uygun bir PCR protokolü hazırlanmıştır. Oluşturulan bu reaksiyon protokolüne göre;

#### **Hedef (STAT5A)**

PCR seviyesindeki su: 2,3 µl

MgCl<sub>2</sub>: 1,2 µl

İleri primer: 1 µl

Geri primer: 1 µl

FL: 0,5 µl

LC-Red 640: 0,5 µl

Fast Start DNA Master Hybridisation Probe: 1 µl

cDNA: 2.5 µl

#### **Referans (G6PDH)**

PCR seviyesindeki su: 4,3 µl

MgCl<sub>2</sub>: 1,2 µl

Primer-Probe Karışımı: 1 µl

Fast Start DNA Master Hybridisation Probe: 1 µl

cDNA: 2,5 µl

STAT5A (NM-003152) genine ait primer – prob dizileri aşağıda verilmektedir:

STAT5A İleri Primer: 5' GAA GCT GAA CGT GCA CAT GAA TC - 3'

STAT5A Geri Primer: 5' -GTA GGG ACA GAG TCT TCA CCT GG -3'

STAT5A Fluorescein: 5' - ACA GGA CTG TGA ACT TCT CCT CTG TCA CGG  
-FL

STAT5A LC Red 640: 5' -CTC TGC ACC CCG CCG GTC AG -p

LightCycler' da STAT5A ekspresyon tayini için oluşturulan PCR termal profili:

## 1-DENATÜRASYON

PARAMETRE	DEĞER
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	Yok
	1.Segment
Hedef Isı (°C)	95
İnkübasyon Zamanı [sn]	120
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0
Okuma Modu	Yok

## 2-AMPLİFİKASYON

PARAMETRE	DEĞER		
Döngü Sayısı	50		
Analiz Modu	<b>Kantitasyon</b>		
	<i>1.Segment</i>	<i>2.Segment</i>	<i>3.Segment</i>
Hedef Isı (°C)	95	64	72
İnkübasyon Zamanı [sn]	10	10	12
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0	20.0	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0	0	0
BasamakBüyüklüğü (°C)	0.0	0.0	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0	0	0
Okuma Modu	Yok	Tek	Yok

### 3-SOĞUMA

PARAMETRE	DEĞER
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	Yok
	<i>1.Segment</i>
Hedef Isı (°C)	40
İnkübasyon Zamanı [sn]	30
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0
Okuma Modu	Yok

#### 3.2.3.3 STAT5B mRNA Ekspresyon Değerlerinin Belirlenmesi

STAT5B mRNA ekspresyonunun LightCycler' da rölatif olarak belirlenebilmesi amacı yla, buna uygun bir PCR protokolü hazırlanmıştır. Oluşturulan bu reaksiyon protokolüne göre;

#### **Hedef (STAT5B)**

PCR seviyesindeki su: 2,3 µl

MgCl<sub>2</sub>: 1,2 µl

İleri primer: 1 µl

Geri primer: 1 µl

FL: 0,5 µl

LC-Red 640: 0,5 µl

Fast Start DNA Master Hybridisation Probe: 1 µl

cDNA: 2,5 µl

#### **Referans (G6PDH)**

PCR seviyesindeki su: 4,3 µl

MgCl<sub>2</sub>: 1,2 µl

Primer-Probe Karışımı: 1 µl

Fast Start DNA Master Hybridisation Probe: 1 µl

cDNA: 2,5 µl

STAT5B (NM-012447) genine ait primer – prob dizileri aşağıda verilmektedir:

STAT5B İleri Primer: 5' -AGT TTG ATT CTC AGG AAA GAA TGT -3'

STAT5B Geri Primer: 5' - TCC ATCA ACA GCT TTA GCA GT -3'

STAT5B Fluorescein: 5' -TTG GGA GAC TTG AAT TAC CTT ATC TAC GT -  
FL

STAT5B LC Red 640: 5' - TTC CTG ATC GGC CAA AAG ATG AA -p

LightCycler' da STAT5B ekspresyon tayini için oluşturulan PCR termal profili:

### 1-DENATÜRASYON

PARAMETRE	DEĞER
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	Yok
	1.Segment
Hedef Isı (°C)	95
İnkübasyon Zamanı [sn]	120
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0
Okuma Modu	Yok

## 2-AMPLİFİKASYON

PARAMETRE	DEĞER		
Döngü Sayısı	50		
Analiz Modu	<b>Kantitasyon</b>		
	<i>1.Segment</i>	<i>2.Segment</i>	<i>3.Segment</i>
Hedef Isı (°C)	95	57	72
İnkübasyon Zamanı [sn]	10	10	8
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0	20.0	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0	0	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0	0.0	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0	0	0
Okuma Modu	Yok	Tek	Yok

## 3-SOĞUMA

PARAMETRE	DEĞER
Döngü Sayısı	1
Analiz Modu	Yok
	<i>1.Segment</i>
Hedef Isı (°C)	40
İnkübasyon Zamanı [sn]	30
Isı Geçiş Oranı (°C/sn)	20.0
İkinci Hedef Isı (°C)	0
Basamak Büyüklüğü (°C)	0.0
Basamak Geciktirmesi (Döngü)	0
Okuma Modu	Yok

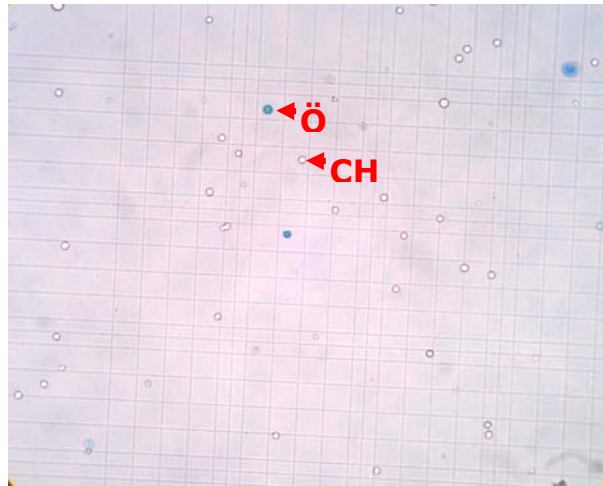
## 4. BULGULAR

### 4.1. Hücre Canlılık Testi

Kültüre edilen hücrelerin sayı ve canlılıklarını takip etmek için gerçekleştirilen Tripan mavisi boyası testinin 96. saat için sonuçları CCRF-CEM, HL-60 ve K-562 için Tablo 1’ de özetlenmiştir. Neubayer lamı kullanılarak incelenen hücrelere ait bir görüntü de Şekil 1’ de verilmektedir. Bu sonuçlara göre, hücrelerin ikilenme zamanına uygun olarak çoğaldıkları ve deneylerde kullanılabilir şekilde yüksek canlılıkta oldukları belirlenmiştir.

HÜCRE TİPİ	HÜCRE SAYISI		HÜCRE CANLILIĞI (%)
	Ort. Canlı (/ml)	Ort. Ölü (/ml)	
CCRF-CEM	520.000	20.000	96.2
HL-60	350.000	15.000	95.8
K-562	365.000	20.000	94.8

**Tablo 1:** Hücre hatlarının ortalama canlı – ölü sayıları ile hücre canlılıkları



**Şekil 1:** Tripan mavisi boyası ile hücre sayımı. Örnek verilen hücreler CCRF-CEM hücre hatına aittir. ÖH: Ölü hücre, CH: Canlı hücre.

## 4.2. STAT Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi Amacıyla G6PDH Standart

### Eğrilerin Oluşturulması

Lösemi hücre hatlarında STAT3, STAT5A ve STAT5B hedef genlerinin kopya sayılarını belirlemede kullanılacak olan “house keeping gen” G6PDH standart eğrileri her gen için ayrı olarak çizilmiştir. STAT3 – G6PDH, STAT5A – G6PDH, STAT5B – G6PDH çalışmalarında kullanılan eğriler sırasıyla verilmektedir (Şekil 2-4).

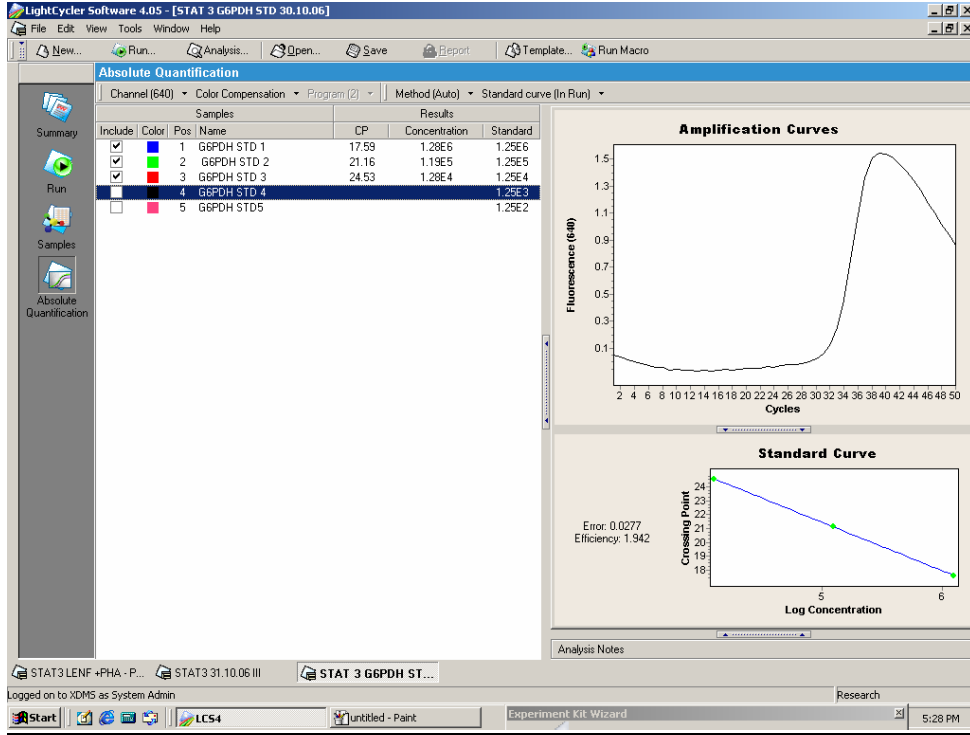
#### 4.2.1 STAT3 Gen Ekspresyon Çalışmalarında Kullanılan G6PDH Standart Eğrisi

STAT3 ekspresyon tayini için özgül olarak oluşturulan PCR protokolünde, STAT3 kopya sayılarını belirlemede kullanılan G6PDH standart eğrisi Şekil 2’ de gösterilmektedir. Buna göre, standart eğri yüksek etkinliktedir (efficiency: 1.942) ve tüm STAT3 mRNA çalışmaları için referans olarak kullanılabilir.

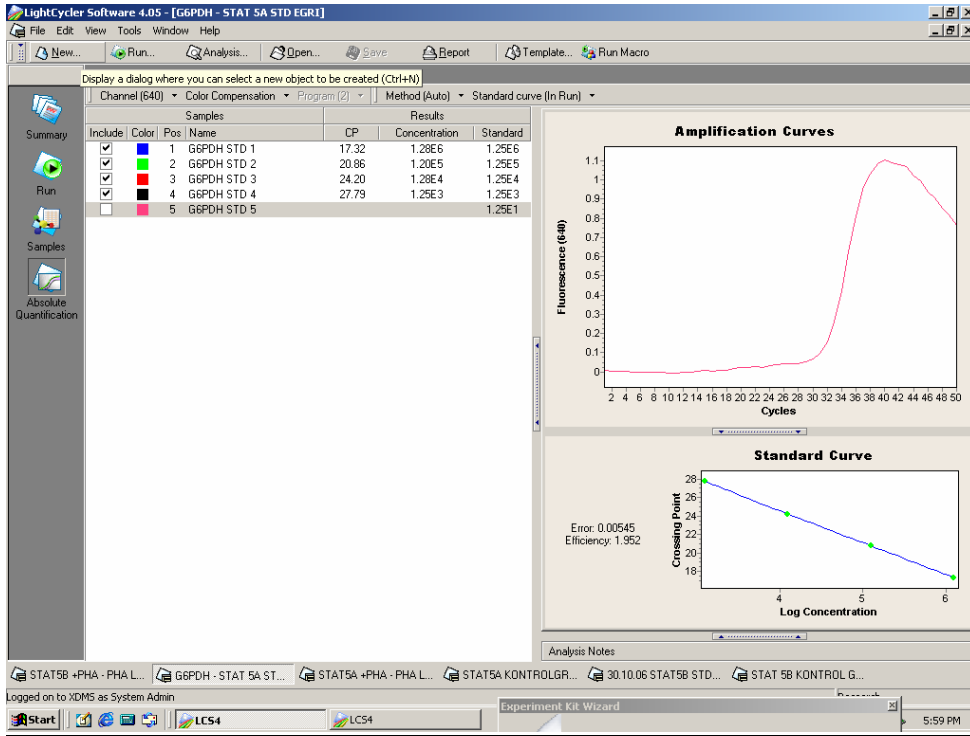
#### 4.2.2. STAT5A Gen Ekspresyon Çalışmalarında Kullanılan G6PDH Standart Eğrisi

STAT5A kopya sayılarını belirlemede kullanılan G6PDH standart eğrisi Şekil 3’ te gösterilmektedir. Bu standart eğrinin etkinliği de yüksek (efficiency: 1.952) olduğundan, tüm STAT5A çalışmaları için referans olarak kullanılmıştır.





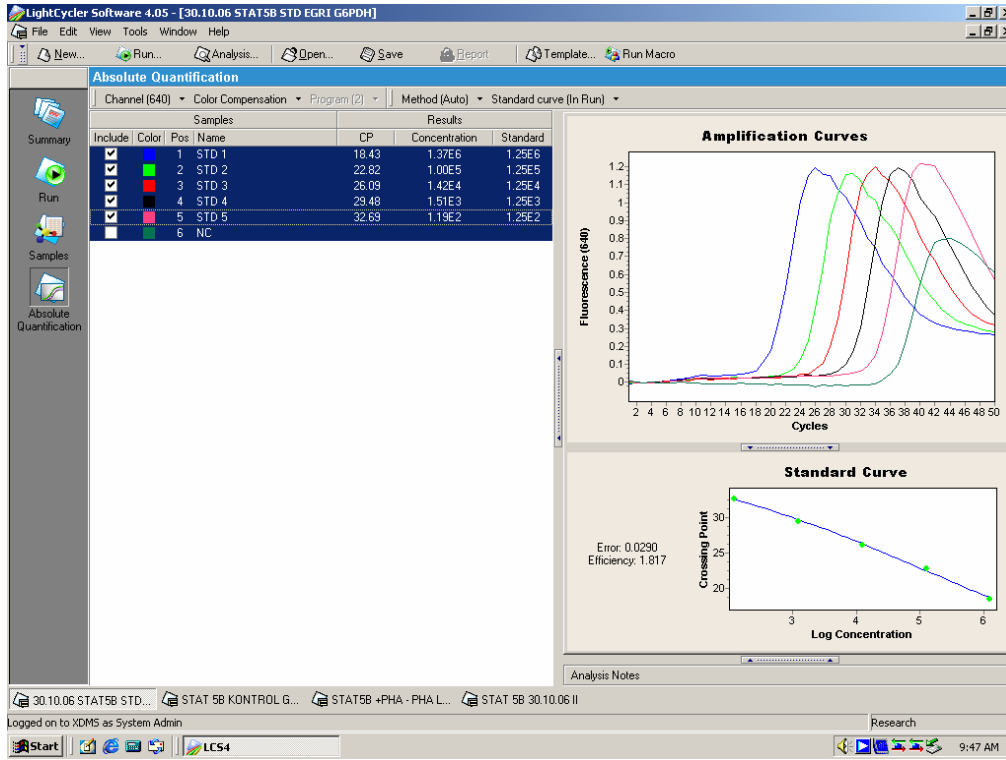
Şekil 2: STAT3 Gen Ekspresyon Çalışmalarında Kullanılan G6PDH Standart Eğrisi.



Şekil 3: STAT5A Gen Ekspresyon Çalışmalarında Kullanılan G6PDH Standart Eğrisi.

#### 4.2.3. STAT5B Gen Ekspresyon Çalışmalarında Kullanılan G6PDH Standart Eğrisi

STAT5B kopya sayılarını belirlemede kullanılan G6PDH standart eğrisi Şekil 4' te gösterilmektedir. Bu standart eğrinin etkinliği de yine yüksek (Efficiency: 1.817) bulunduğundan, tüm STAT5B çalışmaları için referans olarak kullanılmıştır.



Şekil 4: STAT5B Gen Ekspresyon Çalışmalarında Kullanılan G6PDH Standart Eğrisi.

#### 4.3. STAT Gen Ekspresyonlarının Kantitasyonu

G6PDH standart eğrilerin üç hedef gen için çizdirilmesinden sonra, hücre hatlarındaki STAT3, STAT5A ve STAT5B gen ekspresyonları kantite edilmiştir. Hesaplamalar aşağıdaki formüle göre gerçekleştirilmiştir:

$$\text{Rölatif Ekspresyon Değeri} = \frac{\text{Hedef Gen kopya sayısı}}{\text{Referans Gen (G6PDH) kopya sayısı}}$$

CCRF-CEM, HL-60 ve K-562 hücre hatlarındaki STAT3, STAT5A ve STAT5B' ye ait gen ekspresyon değerleri sırasıyla verilecektir.

#### 4.3.1. STAT3' e ait Gen Ekspresyon Değerleri

$1 \times 10^6$ /ml hücre sayısı ile gerçekleştirilen çalışmalarda STAT3 genine ait ekspresyon değerleri Tablo 2' de özetlenmektedir. STAT3 gen ekspresyon çalışmasına ait bir sonuç ta Şekil 5' te verilmektedir.

HÜCRE TİPİ	STAT3 EKSPRESYONU
CCRF-CEM	0.958
HL-60	1.530
K-562	0.279

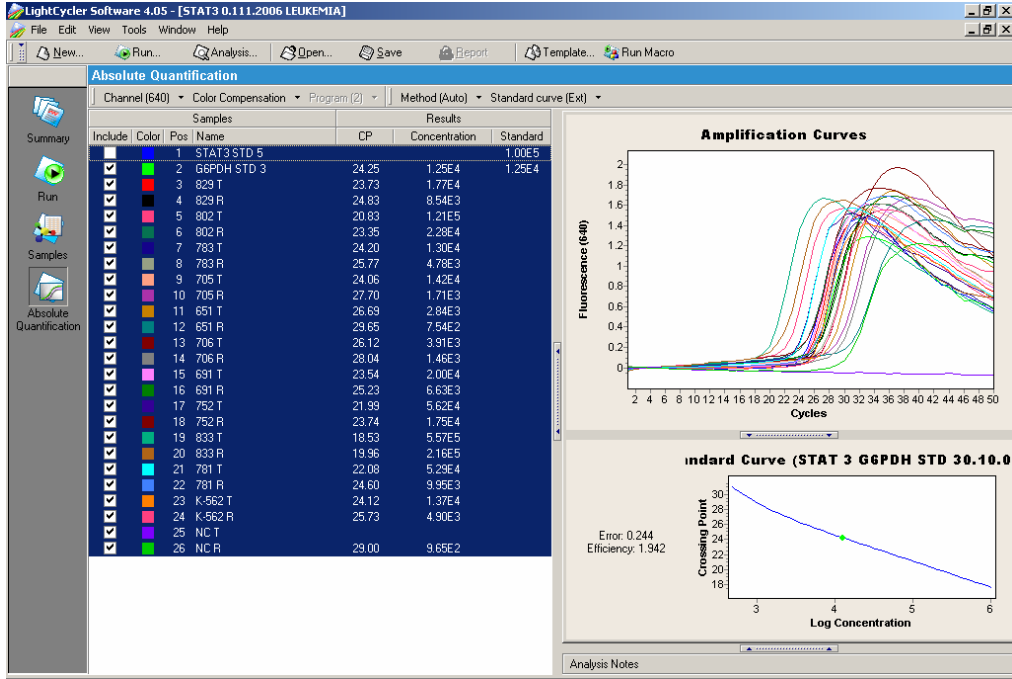
**Tablo 2:** STAT3 Genine ait Gen Ekspresyon Değerleri

#### 4.3.2. STAT5A' ya ait Gen Ekspresyon Değerleri

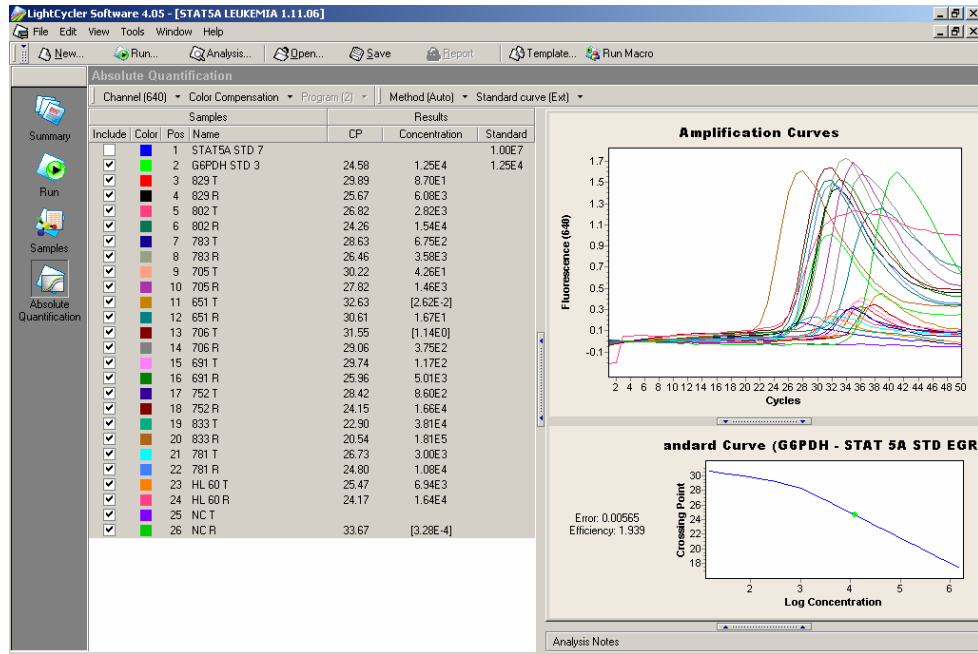
$1 \times 10^6$ /ml hücre sayısı ile gerçekleştirilen çalışmalarda STAT5A genine ait ekspresyon değerleri Tablo 3' te özetlenmektedir. STAT5A gen ekspresyon çalışmasına ait bir sonuç ta Şekil 6' da verilmektedir.

HÜCRE TİPİ	STAT5A EKSPRESYONU
CCRF-CEM	0.311
HL-60	0.423
K-562	0.696

**Tablo 3:** STAT5A Genine ait Gen Ekspresyon Değerleri



Şekil 5: STAT3 gen ekspresyon çalışması. K-562 hücrelerine ait sonuçlar No. 23 ve 24' te görülmektedir.



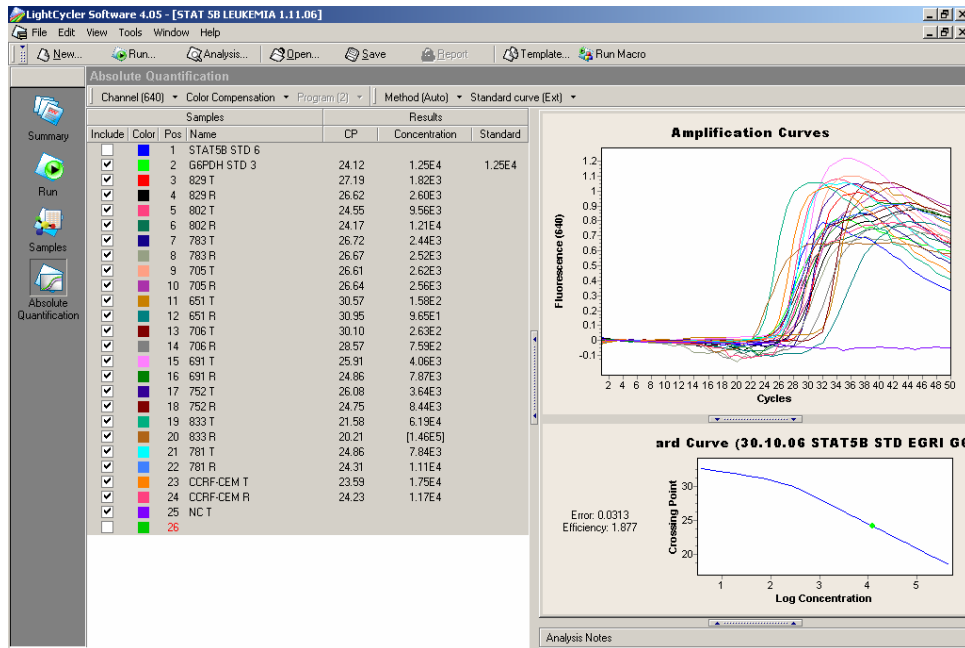
Şekil 6: STAT5A gen ekspresyon çalışması. HL-60 hücrelerine ait sonuçlar No. 23 ve 24' te görülmektedir.

### 4.3.3. STAT5B'ye ait Gen Ekspresyon Değerleri

1x10<sup>6</sup>/ml hücre sayısı ile gerçekleştirilen çalışmalardaki STAT5B genine ait ekspresyon değerleri Tablo 4' te özetlenmektedir. STAT5B gen ekspresyon çalışmasına ait bir sonuç ta Şekil 7' de verilmektedir.

HÜCRE TİPİ	STAT5B EKSPRESYONU
CCRF-CEM	1.490
HL-60	0.633
K-562	0.636

Tablo 4: STAT5B Genine ait Gen Ekspresyon Değerleri



Şekil 7: STAT5B gen ekspresyon çalışması. CCRF-CEM hücrelerine ait sonuçlar No. 23 ve 24' te görülmektedir.

## 5. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Lösemi -lenfoma ile birlikte- lenfoid neoplazmlar altında sınıflandırılarak incelenir ve kemik iliğin yaygın tutulumu ile periferik kanda görülen çok sayıdaki tümör hücresiyle karakterizedir. Lenfoma daha çok ayrı doku kitleleri oluşturacak şekilde proliferen olan kan kanserlerini tanımlar (46). Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl ~29.000 yetişkin ve 2.000 çocuk lösemiden hastalanır. 2008 yılı için tahmini sayılar yeni tanı için 44.270 ve lösemiye bağlı hayatını kaybedenler için 21.710' dur (47). Bununla birlikte, lösemi hakkındaki bilgilerimiz gün geçtikçe artmaktadır -özellikle moleküler patogeneziyle ilgili olarak. Örnek olarak, son 3 yılda yine çok gündemde olan JAK/STAT sinyal yolağı verilebilir.

JAK/STAT sinyal yolağındaki düzensizliklerin akciğer, meme, baş ve boyun kanserleri gibi solid tümörlerin yanında, lösemi ve lenfomalarda da sıklıkla ortaya çıktıkları uzun süredir bilinmektedir (48, 49). Fakat 2005 yılında birbirinden bağımsız beş araştırma grubunun miyeloproliferatif neoplazmlarda aynı JAK2 (*janus kinase 2*) mutasyonu tanımlamalarından sonra, bu sinyal yolağı yine belirli bir popularite kazanmıştır. V617F olarak adlandırılan bu mutasyon JAK2' nin kendi üzerindeki otoinhibitör baskılamayı ortadan kaldırarak, ligand yokluğunda devamlı kinaz aktivasyonuna ve bunun sonucunda da artmış hücre proliferasyonuna neden olur. Somatik olarak kazanılan JAK2V617F mutasyonu miyeloid soy içinde sınırlı kalır ve genellikle polisitemia vera, essansiyel trombositemi veya primer miyelofibroz gelişimine yol açar (50–54). Hematopoietik BaF/3 hücre hatıyla yapılan bir çalışmada JAK2V617F alelinin, büyüme faktöründen-bağımsız hücre proliferasyonuna yol açabilmesi için sitokin reseptör yapı iskelesine ihtiyaç duyduğu gösterilmiştir (55). Çünkü V617F mutasyonunun aktivasyonu için JAK2' nin önce sitokin reseptörüne bağlanması gerekir. Fakat akut megakaryoblastik lösemi hücre hatında saptanan bir başka mutasyonunda (JAK2T875N) JAK2' nin sitokin reseptörüne bağlanması, sinyal ileti yolağı basamaklarında kendinden sonra gelen STAT5 proteinleri çekmek ve aktive etmek için de önemli olduğu gösterilmiştir (56).

STAT aktivasyonunun, JAK2V617F tarafından indüklenen transformasyonda önemli olduğunu gösteren başka bulgular da vardır. Bunlardan ilki, hematopoietik öncü hücrelerinde devamlı aktif STAT5 veya onun anti-apoptotik hedef genlerinden biri olan BCL-X<sub>L</sub> ekspresyonunun eritropoietinden bağımlı koloni oluşumuna neden olduklarıdır; ki bu da polistemia vera' nın en önemli belirtilerinden biridir (57). Hatta, polistemia vera' lı olgu örneklerinde STAT3 aktivasyonu ve BCL-X<sub>L</sub>' nin yüksek ekspresyonu gerçekten de gözlenmektedir (58, 59). Bu veriler, STAT aktivasyon yolağının JAK2V617F-tarafından indüklenen transformasyonda önemli olduğunu gösterirler; fakat onun 'gerekli' mi yoksa 'yeterli' mi olduğunu açıklamazlar. STAT5A ve STAT5B' leri bulunmayan farelerdeki kemik iliği nakli çalışmalarında transformasyonun devamlı aktif TEL-JAK2 füzyon tirozin kinazı tarafından indüklenmesi için, STAT5' e ihtiyaç gösterdiği gösterilmiştir (60). Buna benzer bir durumun JAK2V617F için de söz konusu olup olmadığı ileride yapılacak olan çalışmalar sonrasında görülecektir.

Miyeloproliferatif neoplazmlardan çok önce STAT3 ve STAT5 aktivasyonlarının HTLV-1-bağımlı-, akut miyeloid-, kronik myeloid- ve büyük granüler lenfositik lösemi ile birçok lenfoma çeşidinin moleküler patogeneziinde etkili oldukları bilinmekteydi (48, 49). Aktive olmuş STAT' ların yüksek seviyelerde eksprese edildiği bilinmektedir. Biz de çalışmamızda promiyelositik lösemi HL-60, insan T-hücreli lenfoblastik lösemi CCRF-CEM ve kronik miyeloid lösemi K-562 lösemi hücre hatlarını kullanarak STAT ailesi üyelerinden STAT3, 5A ve 5B' nin mRNA seviyesindeki ekspresyonlarını gerçek zamanlı bir PCR cihazı olan LightCycler ile kantite edip değerlendirdik. Buna göre lösemi hücre serilerimizde STAT' ların yüksek seviyede eksprese olduklarını belirlemiş olduk. Yapılan çalışmaların tümünde de aktive olmuş STAT' ların Akut Myeloid Lösemi, Akut Lenfoblastik Lösemi, Kronik Myeloid Lösemi hücre hatlarında ve lösemili olgulara ait lenfosit kültürlerinde yüksek oranda eksprese oldukları rapor edilmiştir (40, 61-63). Bu çalışmalardan farklı olarak biz STAT3, 5A ve 5B' nin mRNA seviyesindeki rölatif ekspresyon seviyelerini gerçek-zamanlı PCR ile kantitatif olarak belirledik. Biethahn ve ark. yaptıkları çalışmalarında bizim sonuçlarımıza benzer şekilde STAT1, STAT3 ve STAT5' in primer AML blastlarında ve AML hücre serilerinde CD34+ ile kıyaslanabilecek düzeyde yüksek oranda eksprese edildiklerini rapor etmişlerdir (64). Aynı grup sonraki çalışmalarında AML için jak kinazlar ve

STAT transkripsiyon faktörlerinin aktivasyon derecelerini, STAT' ların dimerizasyon ve tirozin fosforilasyonlarının, JAK' ların aktivasyon derecelerini ve bir JAK inhibitörünün AML hücre büyümesi üzerindeki etkisini inceleyerek saptamayı amaçlamışlardır. Sonuç olarak, JAK' ların değil sadece STAT transkripsiyon faktörlerinin tirozinler üzerinden fosforilasyona uğradığı ve AML blastlarında heterodimer oluşturduklarını saptamışlardır. Ayrıca AG490 olarak adlandırılan JAK inhibitörünün AML blast hücrelerinin büyümesini baskıladığını rapor etmişlerdir. Bunun yanı sıra, STAT' ların aktivasyonu için tirozin fosforilasyonunun ve heterodimer oluşumunun gerekli olduğunu belirtmişlerdir (65). Literatürde STAT' ların lösemi hücrelerinde yüksek ekspresyon sergilemediğini savunan çalışma bulunmamaktadır. Çünkü STAT' ların aktivasyonuna bağlı olarak hematolojik hastalıklarda ekspresyon seviyesinin yükseldiği, anjiyogenezin uyarıldığı, immun sistemin yetersiz kaldığı artık bilinen gerçeklerdir.

STAT' ların yüksek seviyede ekspresyonunun belirlenmesini takiben gerçekleştirilen çalışmalar, bu ekspresyon seviyesini, baskılayarak kanser hücrelerinin apoptozunu indükleyebilmek idi. Çünkü STAT3 veya STAT5 inhibisyonunun kanser hücrelerinin apoptozuna yol açtıkları anlaşılmasından sonra çalışmalar derinleştirilerek, olası tedavi yaklaşımları da araştırılmaya başlanmıştır. Bunların arasında STAT3 proteininin dominat-negatif formunu ifade eden vektör, moleküler inhibitör, antisense oligonükleotid, 'tuzak' oligonükleotid ve siRNA kullanımları da bulunmaktadır (66-69, 70-75). Çalışmamızın bir sonraki adımı ilgili hücre hatlarında STAT3 veya STAT5 gen ekspresyonlarının özgül olarak susturulmalarına bağlı olarak hücre apoptozunun gerçekleşmesidir. Bu çalışmalarda önemli olan nokta mRNA' nın yanı sıra protein seviyesinde de ekspresyon baskılamasını göstermek ve apoptozu değerlendirmektir.

Ekspresyon baskılama çalışmalarında bu kadar önemli yere sahip siRNA çalışmalarını kliniğe uyarlamak mümkün müdür? RNAi mekanizması daha çok yakın sayılacak bir zamanda çözümlenmesine rağmen, daha şimdiden kendine klinik araştırmalar içinde bir yer edinmiştir. Örneğin, Merck & Co. Firması ve onun stratejik partneri olan Allergan Inc., körlüğün yaygın bir nedeni olan yaşa bağlı maküler dejenerasyonun tedavisinde VEGF reseptör 1' i hedef alan siRNA' ların faz I çalışmalarını başarıyla tamamlayarak, faz II çalışmalarına geçmişlerdir (76, 77). Bunun dışında amiyotrofik lateral skleroz (ALS), Hepatit C, AIDS ve Tip 2 Diyabet gibi



hastalıkların RNAi mekanizmasını temel alan terapötiklerle tedavilerinin faz I çalışmaları devam etmektedir (78). Lösemilerle ilgili siRNA – faz I/II çalışmaları bulunmamasına karşılık, bu alandaki yoğun çalışmalar ve teknolojik ilerlemeler bu aşamalara yakın zamanda geçilebileceğini vaat ediyor.

Tüm bu gelişmelere paralel olarak, ilaç sanayisinin ‘moleküler hedef’ lere karşı sentetik inhibitör geliştirme çabaları devam etmektedir. Örneğin, gelecekte miyeloproliferatif neoplazm tedavisinde kullanılması planlanan bir JAK2 inhibitörün ilk *in vitro* hücre kültürü denemelerinde, kanser hücrelerin geliştirilen ajana karşı daha duyarlı oldukları gösterilmiştir (79). *BCR-ABL* pozitif kronik miyeloid lösemi, *FIP1L1-PDGFR* pozitif kronik eozinofilik lösemi ve *PDGFRB* yeniden düzenlemelerle birlikte görülen miyeloproliferatif neoplazmların tedavilerinde başarıyla kullanılan tirozin kinaz inhibitörü imatinib’ den sonra, gelecekte belki JAK2 inhibitörleri de *JAK2V617F* mutasyonu gözlenen miyeloproliferatif neoplazmların tedavilerinde etkin bir şekilde kullanılacaktır (80-85). Benzer şekilde, rasyonel dizayn yoluyla geliştirilmiş olan küçük STAT3 inhibitörlerin, STAT3 dimerizasyonunu ve DNA’ ya-bağlanma aktivitesini *in vitro* ve *in vivo* koşullarda bloke edebildikleri ve tümör hücrelerinin ölümüne yol açtıkları görülmüştür (69). Bu alandaki çalışmalar da hızlı bir şekilde devam etmektedir.

Sonuç olarak, projedeki temel hedeflerimize ulaşmış bulunuyoruz. Temel bulgularımıza ulaşip protokolleri laboratuvar şartlarımıza göre oluşturup tüm alt yapı çalışmalarımızı tamamladıktan sonar, TÜBİTAK’ ın 105S459 no’ lu araştırma projesine devam edilmiştir. Bu çalışmalarımızda antisense oligonükleotidler ve siRNA’ lar ile hem mRNA hem de protein seviyesinde STAT’ ların ekspresyonunun baskılandığı belirlenmiştir. Ayrıca siRNA uygulamalarına bağlı olarak lösemi hücrelerinin apoptozununun indüklendiğini de saptamış olduk. Tamamladığımız bu çalışmaların devamında gerçekleştireceklerimiz, Türk Hematoloji Derneği tarafından desteklenen projemizdir. Bu çalışmada da önce STAT3, STAT5A ve STAT5B hedef genlerimize karşı özgül olarak dizayn edilmiş olan 4’ er adet siRNA arasından gen susturulmasında en etkin birini seçerek, çalışmalarımıza onlarla devam etmeyi planlıyoruz. Bunun için ön çalışmalarımızı tamamlamış bulunmaktayız. siRNA’ ların en büyük dezavantajları gen susturma etkinliklerinin birkaç günden - 1 haftaya kadar kısa sürmeleridir. Bu süreyi arttırabilmek için, literatürde daha yeni yer almaya başlayan kimyasal olarak

modifiye edilmiş siRNA' ları kullanmayı düşünüyoruz. Bu tür kimyasal modifikasyonlar genellikle siRNA' ların 3'-OH uçlarına yapılmaktadır. Hayvan deneylerinde başarıyla kullanılmış olan, ayrıca gerçekleştirilmesi de kolay ve ucuz olan modifikasyonlardan biri siRNA 3'-ucundaki kolesterol takısıdır. Kolesterol ile modifiye edilmiş olan siRNA' ların, modifiye edilmemiş siRNA' lara oranla daha dayanıklı ve gen susturma etkinlikleri daha uzun oldukları görülmüştür ( $\geq 2$  hafta). 3'-OH uçlarında kolesterol takısı bulunduran siRNA' ların ayrıca reseptör aracılı endositoz mekanizmasıyla hücreye daha rahat girdikleri gösterilmiştir (86). Tüm bu avantajlarının yanında, kolesterolün insan doğasına yabancı sentetik bir madde olmaması ve çalışmalarda kullanıldığı oranlarda zarar vermemesi açısından, çalışmalara ilk olarak kolesterol ile modifiye edilmiş olan siRNA' larla başlamayı planladık.

Kolesterol modifikasyonu yanında siRNA dayanıklılığı ve etkinliğini arttırabilecek bir diğer kimyasal modifikasyon, riboz şekerinin 2'-karbon pozisyonuyla ilgili olanıdır. Riboz şekerinin 2'-O-metilpürin ya da 2'-floropirimidin modifikasyonu, serumdaki RNase aktivitesine karşı direnç oluşturarak siRNA dayanıklılığını arttırmaktadır. Ayrıca, yerleşimi iki siRNA ipliği arasına denk gelecek şekilde tasarlanmış olan 2'-O-metil modifikasyonu siRNA' ları degradasyondan koruyarak, RNAi' ye bağlı gen susturulmasının etkin olarak devam ettirilmesini sağlamaktadır. Bunun yanında, 2'-O-metil modifikasyonları interferon yanıt oluşumunu da engellemektedir (87). Kendi çalışmamızda bir de 2'-Flourouridin ve 2'-Florositidin modifikasyonunu denemek istiyoruz (88). Bu modifikasyon, yine kolesterollü olana benzer şekilde, siRNA' nın dayanıklılığını arttırmaktır. Bunun yanında, riboz şekerinin 2'-O-metilpürin ya da 2'-floropirimidin modifikasyonunda olduğu gibi, siRNA' yı RNase' nin degrade edici aktivitesinden korumaktadır. 3'- ya da 5'-uçlarında 2'-OH modifikasyonu bulunduran siRNA' ların kullanıldığı deneylerde, etkinliklerinin % 68 - 81 oranında bozulmadan kaldıkları görülmüştür. Tüm bu nedenlerden dolayı 2'-Flourouridin / 2'-Florositidin (2'-FU,FC ) modifikasyonunun denenmesinin de önemli olacağını düşünmekteyiz. Bu modifikasyonun şimdiye kadar lösemi hücre hatlarında denenmemiş olması gerçeği de çalışmamıza özgünlük katacaktır.

Son olarak, apoptoza giren hücreleri sağlıklı hücrelerden manyetik hücre ayırıştırıcısı yardımıyla ayırmayı düşünüyoruz. Böylece, hedef genlerimiz için uygun modifiye

siRNA' ların tespitinden sonra bunların ya doğrudan tedavide, ya da gelecekte otograft kemik iliği nakli öncesinde kemik iliğine uygulanıp manyetik hücre ayrıştırıcı yardımıyla son malin hücrelerden arındırılması işleminde kullanılabilirliklerini önceden *in vitro* koşullarda test etmiş olacağız.

## 6. KAYNAKLAR

1. Takeda K. ve *ark*. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1997, 94: 3801–3804.
2. Hill, C. S., and Treisman. R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*. 1995, 80: 199–211.
3. Ihle, J. N. STATs. Signal transducers and activators of transcription. *Cell*, 1996, 84: 331–334.
4. Darnell JE, Kerr IM, Stark GR: JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 1994, 264: 14 15.
5. Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Thierfelder WE, Kreider B, Silvennoinen: Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem Sci*, 1994, 19:222.
6. Wilks AF, Harpur AG: Cytokine signal transduction and the JAK family of protein tyrosine kinases. *Bioessays*, 1994,16:313.
7. Briscoe J, Guschin D, Muller M: Just another signaling pathway. *Cum Biol* 1994, 4: 1033.
8. Taniguchi T: Cytokine signaling through non receptor protein tyrosine kinases. *Science*, 1995, 268:251.
9. Chai SK, Nichols GL, Rothman P: Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J Immunol* 1997, 159:4720.
10. Fumihiko Hayakawa, Masayuki Towatari, Hiroatsu Ido. Differential constitutive activation between STAT-related proteins and MAP kinase in primary acute myelogenous leukemia. ***Br J Haematol***, 1998, Jun;101(3):521–8.
11. Bas' kiewicz-Masiuk M, Machalin' ski B. The role of the STAT5 proteins in the proliferation and apoptosis of the CML and AML cells. *Eur J Haematol* 2004: 72: 420–429.

12. Chapman R.S. ve *ark*. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev.*, 1999, 13: 2604-2616.
13. Sano S. ve *ark*. Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodelling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO J.*, 1999, 18: 4657-4668.
14. Takeda K. ve *ark*. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*, 1999, 10: 39–49.
15. Bromberg J.F. ve *ark*. Stat3 as an oncogene. *Cell*, 1999, 98: 295–303.
16. Cressman D.E. ve *ark*. Rapid activation of the Stat3 transcription complex in liver regeneration. *Hepatology*, 1995, 21: 1443–1449.
17. Weber-Nordt R.M. ve *ark*. Constitutive activation of Stat proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-reacted lymphoma cell lines. *Blood*, 1996, 88: 809–816.
18. Wakao H. ve *ark*. Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *EMBO J.*, 1994, 13: 2182-2191.
19. Teglund S. ve *ark*. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*, 1998, 93: 841–850.
20. Park S.H. ve *ark*. Distinctive roles of Stat5a and Stat5b in sexual dimorphism of hepatic P450 gene expression. Impact of Stat5a gene disruption. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274: 7421-7430.
21. Socolovsky M. ve *ark*. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a<sup>-/-</sup>5b<sup>-/-</sup> mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*, 1999, 98: 181–191.
22. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl Cancer Inst.*, 1990, 82: 4-6.
23. Hanahan D. ve Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100: 57–70.
24. Hanahan D. ve Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996, 86: 353–364.

25. Rak J., Yu J.L., Klement G. ve Kerbel R.S. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 2000, 5: 24-33.
26. Grunstein J., Roberts W.G., Mathieu-Costello O., Hanahan D. ve Johnson R.S. Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor in tumor expansion and vascular function. *Cancer Res.*, 1999, 59: 1592-1598.
27. Plate K.H., Breier G., Weich H.A. ve Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumor angiogenesis factor in human gliomas *in vivo*. *Nature*, 1992, 359: 845–848.
28. Veikkola T. ve Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin. Cancer Biol.*, 1999, 9: 211-220.
29. Veikkola T., Karkkainen M., Claesson-Welsh L. ve Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res.*, 2000, 60: 203-212.
30. Niu G. ve ark. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*, 2002, 21: 2000–2008.
31. Wei D. ve ark. Stat3 activation regulated the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis. *Oncogene*, 2003: 22, 319–329.
32. Wei L.H. ve ark. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a Stat3 pathway. *Oncogene*, 2003, 22: 1517–1527.
33. Semenza G.L. Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer. *Intern. Med.*, 2002, 41: 79-83.
34. Ravi R. ve ark. Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$ . *Genes Dev.*, 2000, 14: 34-44.
35. Levitzki, A. Protein Tyrosine Kinase Inhibitors As Novel Therapeutic Agents. *Pharmacol. Ther.* 1999, 82:231–239.
36. Catlett–Falcone, R. and Dalton, W.S. STAT Proteins as Novel Targets for Cancer Therapy. *Curr. Opin. Oncol.* 1999, 11:490–496.
37. Darnell, J.E.Jr. STATs & Gene Regulation. *Science*, 1997, 277:1630–1635.

38. Bromberg, J. and Darnell, J.E.Jr. The Role of STATs in Transcriptional Control and Their Impact on Cellular Function. *Oncogene*, 2000, 19:2468–2473.
39. Bowman, T., Garcia R., Turkson, J. and Jove, R. STATs in Oncogenesis. *Oncogene*, 2000, 19:2474–2488.
40. Hayakawa F, Towatari M, Iida H., Wakao H., Kiyoi H., Naoe T., Hidehiko S. Differential constitutive activation between STAT-related and neutrophil proteins and MAP kinase in primary acute myelogenous leukemia. *Br J Haematol* 1998;101:521–528.
41. C.Pallard, F.Gouilleux, L.Benit, L.Cocault, M.Souyri, D.Levy, B.Groner, S.Gisselbrecht and Dusanter-Fourt. Thrombopoietin activates a STAT5-like factor in hematopoietic cells. *The EMBO Journal* 1995, vol.14 no.12 pp.2847-2856.
42. Catlett-Falcone, R. *et al.* Constitutive activation of STAT3 signalling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 1999, 10:105-115.
43. Mora, L.B. *et al.* Constitutive activation of STAT3 in human prostate tumours and cell lines: direct inhibition of STAT3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2002, 62:6659–6666.
44. A. Lale Doğan, Dicle Güç. Sinyal İletimi Mekanizmaları ve Kanser, Hacettepe Tıp Dergisi 2004; 35:34–42.
45. Güray Saydam. Hematolojik Malignitelerde Sinyal İletim Sistemleri. Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi, Temel Moleküler Hematoloji Kursu.
46. Aster J.C *Robins and Cotran: Pathologic Basis of Disease*, 7th Edition, (Ed. Kumar V. ve ark), 2005, 661-709, (Elsevier Saunders, Philadelphia
47. National Cancer Institute. *What You Need To Know About™ Leukemia*. Online booklet. <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/leukemia>, (2008).
48. Bowman T., Garcia R., Turkson J. ve Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene*, 2000,19: 2474-2488.
49. Buettner R., Mora L.B. ve Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin. Cancer Res.*, 2002, 8:945-954.

50. Baxter E.J. ve ark. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*, 2005, 365: 1054–1061.
51. James C. ve ark. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*, 2005, 434: 1144–1148.
52. Kralovics R. ve ark. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.*, 2005, 352: 1779-1790.
53. Levine R.L. ve ark. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, 2005, 7: 387–397.
54. Zhao R. ve ark. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280: 22788-22792.
55. Lu X. ve ark. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2005, 102: 18962-18967.
56. Mercher T. ve ark. JAK2T875N is a novel activating mutation that results in myeloproliferative disease with features of megakaryoblastic leukemia in a murine bone marrow transplantation model. *Blood*, 2006, 108: 2770–2779.
57. Garcon L. ve ark. Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood*, 2006, 108:1551–1554.
58. Roder S. ve ark. STAT3 is constitutively active in some patients with Polycythemia rubra vera. *Exp. Hematol.*, 2001, 29: 694-702.
59. Silva M. ve ark. Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.*, 1998, 338: 564-571.
60. Schwaller J. ve ark. Stat5 is essential for the myelo- and lymphoproliferative disease induced by TEL/JAK2. *Mol. Cell*, 2000, 6: 693-704.
61. Tetsuya Nosaka ve ark. STAT5 as molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *The EMBO Journal* 1999, Vol:18, no:17 pp:4754–4765.
62. Rolf P. de Groot, Jan A.M. Raaijmakers, Jan-Willem J. Lammers, Richard Jove and Leo Koenderman. STAT5 Activation by BCR-Abl Contributes to Transformation of K562 Leukemia Cells. *Blood*, 1999, 94: 1108-1112.



63. Zheng Xia, Maria R. Baer, AnneMarie W. Block, Heinz Baumann, and Meir Wetzler. Expression of Signal Transducers and Activators of Transcription Proteins in Acute Myeloid Leukemia Blasts. *Cancer Research* 1998, 58: 3173–3180, July 15.
64. Biethahn S, Alves F, Wilde S, Hiddemann W, Spiekermann K. Expression of G-CSF and GM-CSF-associated signal transduction proteins of the JAK/STAT pathway in normal granulopoiesis and in blast cells of acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol* 1999; 27:885±894.
65. Spiekermann K, Biethahn S, Wilde S, Hiddemann W, Alves F. Constitutive activation of STAT transcription factors in acute myelogenous leukemia. Constitutive activation of STAT transcription factors in acute myelogenous leukemia. *Eur J Haematol* 2001, 67: 63±71
66. Catlett-Falcone R. ve ark. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, 1999,10: 105-115.
67. Niu G. ve ark. Gene therapy with dominant-negative STAT3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor *in vivo*. *Cancer Res.*, 1999, 59: 5059-5063.
68. Niu G. ve ark. Overexpression of a with dominant-negative signal transducer and activator of transcription 3 variant in tumor cells leads to production of soluble factors that induce apoptosis and cell cycle arrest. *Cancer Res.*, 2001, 61: 3276-3280.
69. Turkson J. ve ark. Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA-binding activity, gene regulation and cell transformation. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 45443-45455.
70. Grandis J.R. ve ark. Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, 1998, 102: 1385-1392, ()
71. Frank D.A. STAT signaling in cancer: insights into pathogenesis and treatment strategies. *Cancer Treat. Res.*, 2003, 115: 267-291.
72. Turkson J. ve Jove R. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene*, 2000, 19: 6613–6626.

73. Sillaber C., Gesbert F., Frank D.A., Sattler M. ve Griffin J.D. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood*, 2000, 95: 2118–2125.
74. Konnikova L., Kotecki M., Kruger M.M. ve Cochran B.H. Knockdown of STAT3 expression by RNAi induces apoptosis in astrocytoma cells. *BMC Cancer*, 2003, 3: 23.
75. Leong P. ve ark. Targeted inhibition of *Stat3* with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2003, 100: 4138-4143.
76. Shen J. ve ark. Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther.*, 2006, 13: 225-234.
77. Kleinman M.E. ve ark. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature*, 2008, 452: 591–597.
78. Beal J. Silence is golden: can RNA interference therapeutics deliver? *Drug Discov. Today*, 2005, 10: 169–172.
79. Pardanani A. ve ark. TG 101209, a small molecule JAK2-selektive kinase inhibitor potently inhibits myeloproliferative disorder associated JAK2V617F and MPLW515L/K mutations. *Leukemia*, 2007, 21:1658-1669.
80. Druker B. ve ark. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the Bcr-Abl tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 2001, 344: 1031-1037.
81. Cools J. ve ark. A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in ideopathic hypereosinophilic syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 2003, 348: 1201-1214.
82. Apperley J.F. ve ark. Response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloproliferative diseases with rearrangements of the platelet-derived growth factor receptor  $\beta$ . *N. Engl. J. Med.*, 2002, 347: 481-487.
83. Dobrzanski P. ve ark. CEP-701 is a JAK inhibitor which attenuates JAK2/STAT5 signaling pathway and the proliferation of primary cells from patients with myeloproliferative disorders. *Blood*, 2006, 108: abst. 3594.

84. Geron I. ve ark. Inhibition of JAK2 V617F-induced erythroid skewing of hematopoietic stem cell differentiation with a selective JAK2 antagonist. . *Blood*, 2006, 108: abst. 3616.
85. Gourley E.S. ve ark. Discovery and characterization of small molecule inhibitors of JAK2. *American Association for Cancer Research Proceedings*, 2007, abst. 2387.
86. Soutschek J. ve ark. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature*, 2004, 432: 173–178.
87. Kim D.H ve Rossi J.J. Strategies for Silencing Human Disease Using RNA Interference. *Nature Reviews Genetics*, 2007, 8: 173–184.
88. Chiu Y.L. ve Rana T.M. siRNA Function in RNAi: A Chemical Modification Analysis. *RNA*, 2003, 9: 1034–1048.