



**T.C.
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ (K-562) HÜCRE SERİSİNDE
miR-33a/ANK3 EKSPRESYONLARININ VE
FONKSİYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Nurgül KAR
0009-0002-8558-8247**

FARMASÖTİK BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SİVAS
MAYIS 2025**

T.C.
SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ (K-562) HÜCRE SERİSİNDE
miR-33a/ANK3 EKSPRESYONLARININ VE
FONKSİYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nurgül KAR

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ.DR. SEMA MISIR**

FARMASÖTİK BİYOKİMYA ANA BİLİM DALI

SİVAS-2025

KABUL VE ONAY

“Kronik Miyeloid Lösemi (K-562) Hücre Serisinde miR-33a/ANK3 Ekspresyonlarının ve Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi” adlı **Yüksek Lisans** Tezi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Farmasötik Biyokimya** Ana Bilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

Üye (Danışman): Doç. Dr. Sema MISIR
(FARMASÖTİK BİYOKİMYA A.B.D)

Üye: Doç. Dr. Ceylan ÖZSOY
(FARMASÖTİK BİYOKİMYA A.B.D)

Üye: Doç. Dr. Serap ÖZER YAMAN
(TIBBİ BİYOKİMYA A.B.D)

Bu tez çalışması, ... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyde AKIN POLAT

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

BEYAN

Bu tez çalışmasının Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

İmza

Nurgül KAR

ÖZET

KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ (K-562) HÜCRE SERİSİNDE miR-33a/ANK3 EKSPRESYONLARININ VE FONKSİYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Nurgül KAR

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Biyokimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Mayıs 2025

Danışman: Doç. Dr. Sema MISIR

Kronik miyeloid lösemi (KML), miyeloid hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla karakterize bir kemik iliği kanseri türüdür. MikroRNA'lar (miRNA'lar), gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde rol oynayan küçük kodlamayan RNA molekülleridir. Bu moleküller, hücre çoğalması, farklılaşma, apoptoz ve hematopoez dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçler için gereklidir. Bu çalışma, KML'de miR-33a-5p ve Ankrin 3 (ANK3) arasındaki ilişkiyi incelemeyi ve miR-33a-5p'nin bu hastalığın ilerlemesindeki düzenleyici mekanizmalarını araştırmayı amaçlamaktadır. mRNA ekspresyon profilleri GSE100026 veri setinden elde edildi. Farklı şekilde eksprese edilen mRNA'lar GEO2R analizi ile belirlendi. miR-33a-5p ve ANK3 ekspresyon düzeylerini değerlendirmek için kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) gerçekleştirildi. miR-33a-5p ve ANK3 arasındaki olası etkileşimler biyoinformatik analizler yoluyla değerlendirildi. miRNA'ların ve hedef genlerinin KML bağlamındaki biyolojik işlevlerini araştırmak için çeşitli veri tabanları, miRNET, miRWALK, miRDIP, TargetScan, BioGRID ve DAVID kullanılmıştır. miR-33a-5p ekspresyonu belirgin şekilde yükselirken, ANK3 ekspresyonu önemli ölçüde azalmıştır. ANK3 miR-33a-5p'nin potansiyel hedef geni olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, ANK3'ün yolak ve fonksiyon analizleri, hücre döngüsü ve apoptozdaki rolünü ortaya koymuştur. Sonuç olarak, miR-33a-5p'nin KML hücre hattında aşırı eksprese edildiği, ANK3'ün miR-33a-5p'nin doğrudan hedefi olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada miR-33a-5p/ANK3 ekseninin KML gelişimini desteklediği ortaya konulmaktadır.

Anahtar Kelimeler; Kronik miyeloid lösemi; miRNA; miR-33a-5p; ANK3

ABSTRACT

EVALUATION OF miR-33a/ANK3 EXPRESSIONS AND FUNCTIONS IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA (K-562) CELL LINE

Nurgül KAR

Sivas Cumhuriyet University, Institute of Health Sciences

Department of Pharmaceutical Biochemistry

Master Thesis, May 2025

Supervisor: Doç. Dr. Sema MISIR

Chronic myeloid leukemia (CML) is a type of bone marrow cancer characterized by the uncontrolled proliferation of myeloid cells. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules involved in the post-transcriptional regulation of gene expression. These molecules are essential for various physiological processes including cell proliferation, differentiation, apoptosis, and hematopoiesis. This study aims to examine the relationship between miR-33a-5p and Ankyrin 3 (ANK3) in CML and investigate the regulatory mechanisms of miR-33a-5p in the progression of this disease. mRNA expression profiles were obtained from the GSE100026 dataset. Differentially expressed mRNAs were determined by GEO2R analysis. Quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed to evaluate the expression levels of miR-33a-5p and ANK3. Possible interactions between miR-33a-5p and ANK3 were evaluated through bioinformatics analyses. Various databases, miRNET, miRWALK, miRDIP, TargetScan, BioGRID and DAVID were used to investigate the biological functions of miRNAs and their target genes in the context of CML. While miR-33a-5p expression was significantly increased, ANK3 expression was significantly decreased. ANK3 was identified as a potential target gene of miR-33a-5p. In addition, pathway and function analyses of ANK3 revealed its role in cell cycle and apoptosis. In conclusion, miR-33a-5p was overexpressed in CML cell line and ANK3 was determined to be a direct target of miR-33a-5p. This study demonstrates that miR-33a-5p/ANK3 axis supports the development of CML.

Key Words; Chronic myeloid leukemia; miRNA; miR-33a-5p; ANK3

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez sürecim boyunca desteğini ve yardımlarını benden eksik etmeyen, değerli bilgi, görüş ve tecrübelerini bana aktaran sevgili tez danışmanım Doç. Dr. Sema MISİR'a,

Tez çalışmamda bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, varlığıyla maddi manevi her zaman yanımda olduğunu hissettiren saygıdeğer hocam Doç. Dr. Ceylan ÖZSOY'a

Tez çalışmamda bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, tez sürecime destek olan sevgili hocam Doç. Dr. Serap ÖZER YAMAN'a,

Tüm yaşantım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen, eğitimim için bana güvenip, cesaret verip, her zaman yanımda olduklarını gösteren sevgili ANNEM ve BABAM'a,

Varlıklarına şükrettiğim sevgili AİLEM'e teşekkürü bir borç bilirim. İyi ki varsınız.

Sivas

Nurgül KAR

27/05/2025

İçindekiler

KABUL VE ONAY	i
BEYAN	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser	4
2.1.1. Kronik Miyeloid Lösemi	5
2.1.2. Kronik Miyeloid Lösemide Tanı	6
2.1.3. Kronik Miyeloid Lösemide Tedavi	7
2.2. MikroRNA	8
2.2.1. MikroRNA Biyogenezi	9
2.2.2. MikroRNA'ların Moleküler Etki Mekanizması	10
2.3. MikroRNA ve Kanser İlişkisi	10
2.4. MikroRNA ve Kanser Tedavisi	11
2.5. MikroRNA ve KML ilişkisi	12
2.6. miR-33a-5p	13
2.7. ANK3	15
2.8. Biyoinformatik Yöntemler	16
2.8.1. miRNET	16
2.8.2. miRDIP	17
2.8.3. miRWALK	17
2.8.4. TargetScan	18
2.8.5. BioGRID	18
2.8.6. DAVID	19

3. GEREÇ VE YÖNTEM	20
3.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	20
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	20
3.3. Biyoinformatik Analizler	21
3.3.1. KML'de miRNA'ların Tanımlanması	21
3.3.2. miRNA Hedeflerinin Belirlenmesi	21
3.3.3. ANK3'ün Protein/Protetin Etilişim Ağı ve Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi	22
3.4. Hücre Kültürü.....	22
3.4.1. K-562 ve HaCaT Hücre Serilerinin Eldesi ve Kültürü.....	22
3.4.2. Kültür Aşamaları	22
3.4.3. Hücrelerin Pasajlanması	22
3.5. miRNA Ekspresyon Seviyesinin RT-qPCR ile Belirlenmesi	23
3.5.1. miRNA İzolasyonu	23
3.5.2. miRNA-cDNA Sentezi	24
3.5.3. miRNA için RT-qPCR	24
3.6. ANK3 Ekspresyon Seviyesinin RT-qPCR ile Belirlenmesi	26
3.6.1. RNA İzolasyonu	26
3.6.2. cDNA Sentezi	27
3.6.3. RT- qPCR Analizi	28
3.7. İstatistiksel Yöntemler.....	29
4. BULGULAR	30
4.1. KML'de miRNA'ların Belirlenmesi	30
4.2. miR-33a-5p'nin Ekspresyon Değeri	30
4.3. miR-33a-5p'nin Hedeflerinin Belirlenmesi	31
4.4. ANK3 Ekspresyon Seviyeleri	32
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
7. KAYNAKÇA	44
8. ÖZGEÇMİŞ	58

Tablolar Dizini

Tablo 1. Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler.....	20
Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasallar/kitler ve üretici firmalar	21
Tablo 3. miRNA-cDNA sentezi mastermix bileşenleri	24
Tablo 4. miRNA-cDNA sentezi reaksiyon koşulları	24
Tablo 5. RT-qPCR için kullanılan primer dizileri.....	25
Tablo 6. miRNA ekspresyonu için kullanılan bileşenler	25
Tablo 7. miRNA için RT-qPCR reaksiyon koşulları.....	25
Tablo 8. cDNA sentezi için kullanılan mastermix bileşenleri	27
Tablo 9. cDNA sentez reaksiyonu koşulları	27
Tablo 10. ANK3 ekspresyonu için kullanılan primer dizileri	28
Tablo 11. ANK3 için kullanılan mastermix bileşenleri	28
Tablo 12. ANK3 için RT-qPCR reaksiyon koşulları	28
Tablo 13. ANK3, CTNNB1, KRAS, CCNF ve TP53 genleri ile zenginleştirme analizi	35
Tablo 14. ANK3, TP53, CCNF, KRAS ve CTNNB1'in KEGG ve Reactome zenginleştirme analizi.....	36

Şekiller Dizini

Şekil 1. Kanser hücresinin özellikleri	5
Şekil 2. Philadelphia kromozomu oluşumu	6
Şekil 3. İmatinib etki mekanizması.....	7
Şekil 4. MikroRNA biyogenezi	9
Şekil 5. KML'de yer alan miRNA'lar	30
Şekil 6. HaCaT'a göre K-562 hücre hattının miR-33a-5p ekspresyon analiz sonucu	31
Şekil 7. miR-33a-5p ve ANK3 arasındaki hedefleme ilişkisi	32
Şekil 8. HaCaT'a göre K-562 hücre hattının ANK3 gen ekspresyon analiz sonucu .	33
Şekil 9. miR-33a-5p ekspresyon seviyesi ile ANK3 arasındaki ilişki	33
Şekil 10. ANK3'e dayalı protein-protein etkileşim ağı.....	34

Resimler Dizini

Resim 1. miR-33a-5p'ye ait amplifikasyon eğrileri 26

Resim 2. ANK3'e ait amplifikasyon eğrileri 29



Kısaltmalar Dizini

- ABL** : Abelson Lösemi Onkogeni
AGO2 : Argonat 2 Protein
ANK : Ankrin
cDNA : Tamamlayıcı DNA
DGCR8 : Drosha ve DiGeorge Sendromu Kritik Bölge 8
GO : Gen Ontolojisi
IM : İmatinib
KEGG : Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi
KLL : Kronik Lenfositik Lösemi
KML : Kronik Miyeloid Lösemi
KRAS : Kirsten Rat Sarcoma Viral Onkogen Homolog
miRNA : MikroRNA
MM : Multiple Miyeloma
PDCD4 : Programlanmış Hücre Ölüm Proteini 4
PDGFR : Trombosit Bağı Büyüme Faktörü Reseptörü
Ph : Philadelphia Kromozomu
PPI : Protein-protein Etkileşimi
RISC : RNA Susturma Kompleksi
RT-PCR : Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TKI : Tirozin Kinaz İnhibitör

1. GİRİŞ

Kronik miyeloid lösemi (KML), kemik iliği hücrelerinin farklı olgunlaşma aşamaları sırasında sınırsız ve anormal olarak çoğalmasıyla oluşan lösemi türüdür (Alves ve ark., 2021). KML yetişkin popülasyonda görülen lösemilerin yaklaşık %15'ini oluşturur (Wang ve ark., 2024). KML'nin ayırt edici özelliği, kromozomların (chr) 9 ve 22'nin uzun kollarının karşılıklı translokasyonu ile oluşan anormal bir Philadelphia kromozomunun (Ph) varlığıdır, füzyon geni olan BCR/ABL1'in oluşumuna yol açar (Pasic ve Lipton, 2017). BCR/ABL1 kimerik proteini, kötü huylu dönüşüme neden olan sinyal yollarını aktive eden sürekli aktif bir tirozin kinazdır (Deininger ve Osman, 2021). BCR-ABL1 tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKI) geliştirilmesi KML tedavisinde önemli bir süreç olmuştur (Hochhaus ve ark., 2020). Son yıllarda yapılan çalışmalar uygun tedaviyi seçmek için hastaya özgü faktörlerin önemini vurgulamaktadır. Bu nedenle, KML'nin altta yatan moleküler mekanizmasının kapsamlı bir şekilde anlaşılması önemlidir (Kotagama, Chang ve Mangone, 2015). Ayrıca, hastalığın erken tespiti için genel sağkalım sonuçlarını iyileştirmede kritik öneme sahiptir (Pinnenti, Sami ve Hassan, 2024).

MikroRNA'lar (miRNA'lar), gen düzenlemesinde önemli fonksiyonlara sahip, yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda, evrimsel olarak korunmuş, küçük kodlamayan RNA'lardır. Anormal şekilde eksprese edilen miRNA'ların çeşitli kanser türlerinin oluşumu ve gelişimi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Shi ve ark., 2021). miRNA'lar, esas olarak hedef mRNA'ların 3'-çevrilmeyen bölgelerine (3'-UTR'ler) doğrudan bağlanarak gen ifadesini düzenler ve bu da mRNA bozunumuna ve/veya translasyon inhibisyonuna yol açar (Huang ve ark., 2011). Bu mekanizmalar aracılığıyla, miRNA'lar kanser hücrelerinin büyümesini, çoğalmasını, göçünü ve invazyonunu etkiler (Nicoloso ve ark., 2009; Akidan, Petrovic ve Mısırs, 2025).

KML'de miRNA'ların ve hedef genlerinin tanımlanması, tümör oluşumu ve gelişimindeki rollerini anlamak için kritik öneme sahiptir (Nie ve ark., 2019). Yapılan çalışmalar miRNA'ların, KML gelişimi ve tedavisinde bir hedef olabileceği ileri sürmektedir (Akidan, Petrovic ve Mısırs, 2025; Nie ve ark., 2019; Keramati ve ark., 2021).

miR-33a, oldukça korunan miR-33 ailesinin bir üyesidir ve sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinlerin genlerinde bulunan bir intronik miRNA'dır. miR-33a'nın değişen ekspresyon seviyeleri, kanser de dahil olmak üzere pek çok hastalıkla ilişkilidir. miR-33a farklı genleri hedef alarak onkogen veya supresör olarak hareket etme potansiyeline sahiptir. miR-33a ve hedef genlerinin, tümör hücrelerinin proliferasyonu, metastazı, invazyonu, hücre döngüsü, apoptozu, kendini yenileme, kemoterapi direnci ve radyo rezistans gibi farklı biyolojik fonksiyonları ve prognoz/sağkalım gibi hasta sonuçlarını etkilediği belirtilmiştir (Gao ve ark., 2020). Ancak, şu ana kadar KML'de miR-33a-5p'nin ekspresyonu, işlevleri ve hedefleri hakkında çok az veri bulunmaktadır.

Ankrin protein ailesinin bir üyesi olan Ankrin 3 (ANK3), ankrin G olarak da bilinir (Somsuan ve Aluksanasuwan, 2023). ANK3 proteini, spektrin proteinlerini integral membran proteinlerine bağlayarak plazma membranı ve sitoskeleton arasında bir köprü görevi görür. Hücre hareketliliği ve proliferasyonu dahil olmak üzere pek çok hücre sel süreci düzenler (Wang ve ark., 2016). ANK3'ün farklı kanser türlerinde genetik ve ekspresyon değişiklikleri olduğu belirtilmiştir. ANK3'ün down regülasyonunun meme, prostat, akciğer ve yumurtalık kanserlerinde kötü prognozla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Somsuan ve Aluksanasuwan, 2023; Wang ve ark., 2016). ANK3'ün prostat kanseri hücrelerinde hücre döngüsünü düzenlediği ve hücre invazyonunu engellediği (Wang ve ark., 2016), over ekspresyonunun ise hücre apoptozunu tetiklediği ve papiller tiroid karsinom hücrelerinde epitel-mezenkimal geçişi baskıladığı belirtilmiştir (Zeng ve ark., 2022). Tüm bu bulgular ele alındığında, ANK3'ün çeşitli kanserlerde prognostik değeri ve tümör baskılayıcı işlevi olduğu ortaya konulmuştur. Ancak ANK3'ün KML de ki rolü büyük ölçüde bilinmemektedir. Bu nedenle ANK3'ün KML deki fonksiyonları ve hedefleri hakkında daha fazla ileri düzey çalışmaya ihtiyaç vardır.

Biyoinformatik teknikler hastalıkların patofizyolojisini tanımlamak ve gen/protein düzeylerinde farmakolojik tedavi hedeflerini belirlemek için kullanılır (Meng ve ark., 2023). Tümör biyoinformatiği kanser araştırmalarında önemli bir yer tutar. Genomik, transkriptomik, epigenomik ve diğer omik veriler, bu verilerinin entegrasyonu ve analizi kansere ilişkin anlayışımızı arttırmaktadır.

Bu kaynaklar, moleküler mekanizmaların, kişiselleştirilmiş tedavinin ve kanser prognozunun keşfedilmesine yardımcı olur (Huang ve ark., 2024).

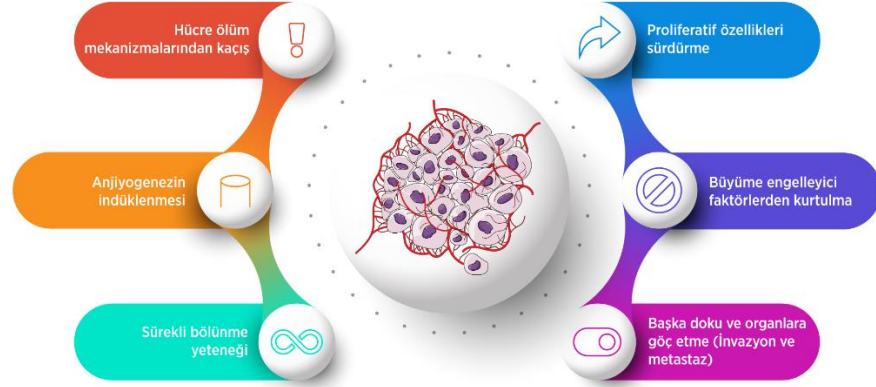
Bu çalışmada, çeşitli veri kaynaklarını entegre ederek ve *in vitro* yöntemleri uygulayarak, miR-33a-5p ve ANK3'ün KML'deki ekspresyon değişimlerini belirlemeyi ve miR-33a-5p/ANK3 ekseninin KML ilerlemesindeki rolünü ortaya koymayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, günümüz tıbbının en önemli ve güncel sağlık sorunlarından biri olmakla birlikte dünyada ve ülkemizde kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer alan ölüm nedenidir (Çetingöz ve ark., 2002; Turgay ve ark., 2004; Tuncer, 2007; Özkan, 2007). Kanser, büyüme özellikleri bozulmuş, kontrolsüz bir şekilde çoğalan ve apoptotik aktivitelerini kaybetmiş hücrelerin meydana getirdiği bir hastalıktır (Çakır ve Yokuş, 2012). Kanserle eş anlamlı olarak kullanılan ‘tümör’ ise ‘oncos’ kelimesinden gelir, iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign) kavramlarını barındırmaktadır (Hanahan ve Weinberg, 2011). Bir kanser hücresinin özellikleri Şekil 1 'de gösterilmektedir. Kanser oluşumunda 3 temel gen grubu oldukça önemlidir. Bunlar onkogen, tümör baskılayıcı ve DNA tamir genleridir. Kanser genellikle hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynayan onkogenlerin veya tümör baskılayıcı genlerin mutasyona uğramaları ve işlevsiz hale gelmeleriyle başlamaktadır (Blackadar, 2016). Gende meydana gelebilecek bir hasara bağlı olarak DNA tamir sistemleri onarım yapsa da her zaman başarı durumu gözlenmemektedir (Baykara, 2016). Onkogenler, mutasyona uğradığında aktive olur ve kontrolsüz hücre büyümesini tetikler (Croce, 2009). Tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar ise normal hücrelerin büyümesini düzenlemek ve DNA onarımı için gereken mekanizmaları kaybetmesine neden olmaktadır (Macleod, 2000). Kanser oluşum sebepleri çeşitlilik gösterir, bakterilerden virüslere, radyasyondan kalıtıma, çevresel faktörlerden beslenme alışkanlığına ve kimyasallara kadar birçok faktör kanser oluşumunda rol almaktadır (Williams, 2001). Kemoterapi, radyoterapi, cerrahi yöntemler kanser tedavisinde en çok kullanılan yöntemlerdir. Bunların yanı sıra hormon terapisi gibi farklı yaklaşımlar da tek başına veya diğer yöntemlerle kombine olarak kullanılabilir. Yöntemlerin kendine has avantaj ve dezavantajlarının bulunması, kanserin kişiye özgü bir hastalık olması, tedavilerin kişiden kişiye farklılık göstermesi nedeniyle tek kesin bir tedavi yönteminden bahsetmek mümkün değildir (Kinhikar ve ark., 2014).

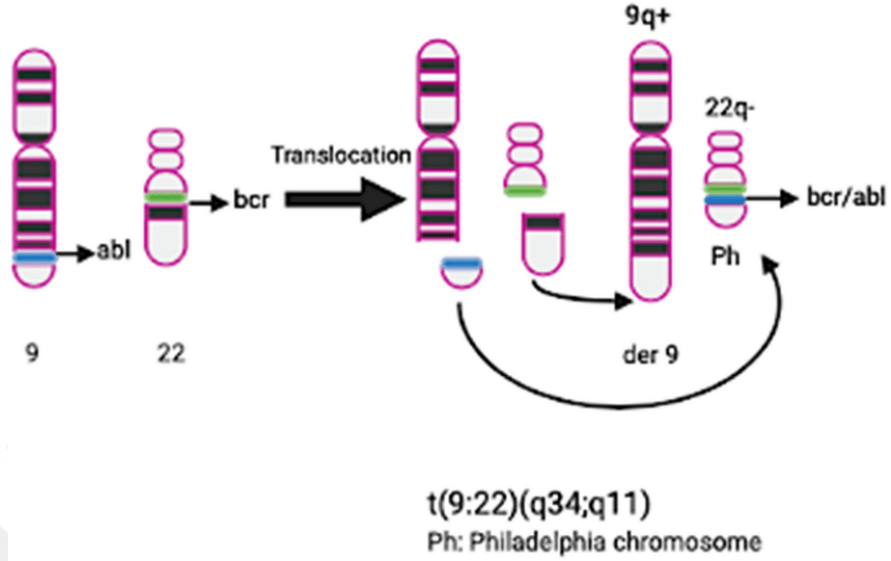


Şekil 1. Kanser hücresinin özellikleri (TÜSEB <https://tke.tuseb.gov.tr>)

2.1.1. Kronik Miyeloid Lösemi

KML, kemik iliği hücrelerinin farklı olgunlaşma aşamaları sırasında sınırsız ve anormal olarak çoğalmasıyla oluşan lösemidir. Bu hastalığın insidansı 1-2 vaka / 100.000 kişi olduğu tahmin edilmekte olup yetişkin lösemi vakalarının yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır (Alves ve ark., 2021). KML hastalarının %50'si asemptomatiktir. KML farklı hastalıklarla ilgili yapılan kan tetkikleri ve fizik muayene sonucunda tespit edilir (Thompson, Kantarjian ve Cortes, 2015). KML'nin ayırt edici özelliği, kromozomların 9 ve 22'nin uzun kollarının karşılıklı translokasyonu ile oluşan anormal bir Philadelphia kromozomunun varlığıdır. Philadelphia kromozomu oluşumu Şekil 2' de gösterilmiştir. Ph kromozomu 9. kromozomdan bir parçanın 22. kromozoma bağlanması; 22. kromozomdan bir parçanın da 9. kromozoma bağlanmasıyla oluşan bu yapı t(9;22) olarak yazılır. Kromozomun boyu kısalmış ve bu translokasyon sonucu oluşan gen füzyon transkriptine BCR-ABL denir. Oluşan bu yeni genin ürünü 210 kDa (p210) molekül ağırlığında bir proteindir (Untekin, 2014).

Formation mechanism of Philadelphia chromosome



Şekil 2. Philadelphia kromozomu oluşumu (Karasu ve ark., 2021)

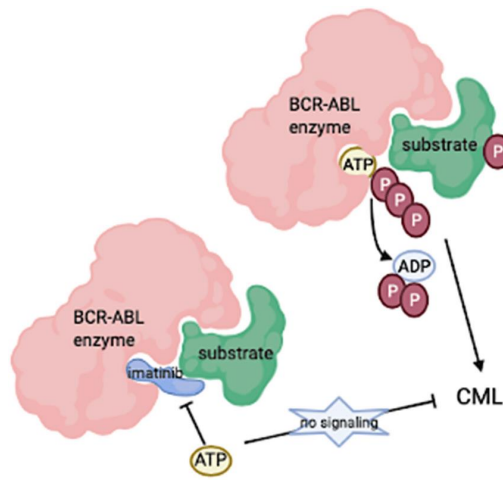
Hastalık, kronik, akselere (hızlanmış) ve blastik faz olmak üzere üç evreden oluşmaktadır. Hastaların çoğunluğu, hastalık kronik evrede tanı alırken, tedavi edilmeden doğal seyrine bırakıldığında hastalık akselere evreye (AE) ve/veya blastik evreye (BE) ilerleyebilmektedir (Türk Hematoloji Derneği). KML'nin etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte, iyonize radyasyon maruziyeti, bilinen tek risk faktörü olarak öne çıkmaktadır (Au ve ark., 2004).

2.1.2. Kronik Miyeloid Lösemide Tanı

KML tanısı için ilk olarak tam kan sayımında lökosit sayısının artması ve periferik yaymada genç miyeloid hücrelerin görülmesi şüphe uyandırır (Untekin, 2014). Hastaların neredeyse tamamında tanı anında sitogenetik incelenme sonucu $t(9;22)(q34;q11)$ ve Ph kromozomu tespit edilir. Lökosit sayısında artış ile birlikte kemik iliğinde miyeloid proliferasyonu ve matürasyon görülür. Kan ve kemik iliğinde blast sayısı %5'ten azdır (Kırkızlar ve Demir, 2012).

2.1.3. Kronik Miyeloid Lösemide Tedavi

KML tedavisinde öncelikli hedef, kan sayımındaki bozuklukları düzeltmektir. Vakaların birçoğunda Ph kromozomda bir bozukluk vardır. KML oluşumunda, tirozin kinaz aktivitesi gösteren BCR-ABL1 füzyon onkogeni önemli rol oynar. BCR-ABL1 proteini kendiliğinden aktif olup JAK2/STAT, PI3K/AKT/mTOR, MAPK/ERK ve daha birçok alt sinyal yollarını aktive ederek miyeloid hücrelerin büyümesine ve çoğalmasına neden olur (Kang ve ark., 2016). Hücrelerin kontrolsüz çoğalması nedeniyle kemik iliği uzun kemiklerin kavitesine (örneğin, femur) yayılır, ayrıca karaciğer ve dalakta hematopoez süreci devam eder (Minciacchi, Kumar ve Krause, 2021). KML’de görülen yorgunluk, halsizlik, sol üst kadranda dolgunluk ve ağrı gibi belirti ve semptomlar anemi ve splenomegaliden kaynaklanmaktadır (Sezen, 2023). KML tedavisinde başlangıçta, hastalığın biyolojik seyrini değiştirmeyen hücre sayısını azaltmaya yönelik sitotoksik ajanlar, özellikle hidroksiüre ve busulfan tercih edilmiştir. Daha sonraki dönemlerde ise, sitogenetik remisyon elde etmek amacıyla biyolojik yanıt düzenleyici ajanlar özellikle interferon ve interferon/ARA-C kombinasyonu kullanılmaya başlanmıştır (Hehlmann ve ark., 1993). Ancak, 1998’de bir tirozin kinaz inhibitörü olan imatinibin kullanıma girmesi ile KML’nin ölümcül bir hastalık olmaktan çıkıp hastalığının uzun dönem kronik fazda izlenmesi sağlanmıştır (Guilhot ve ark., 2003; Branford ve ark., 2003). İmatinib etki mekanizması Şekil 3’te gösterilmektedir.



Şekil 3. İmatinib etki mekanizması (Karasu ve ark., 2021)

KML’de sitogenetik, moleküler ve hematolojik tedavi yanıtları hedeflenir. Tedaviye yanıtsızlık ya da izlemde yanıt kaybı gelişen hastalar erken dönemde saptanmalı ve etkin tedavi değişikliği yapılmalıdır. Kemoterapi, KML’de hematolojik yanıt sağlayabilir ancak sitogenetik ve moleküler yanıt oluşturmaz (Kırkızlar ve Demir., 2015).

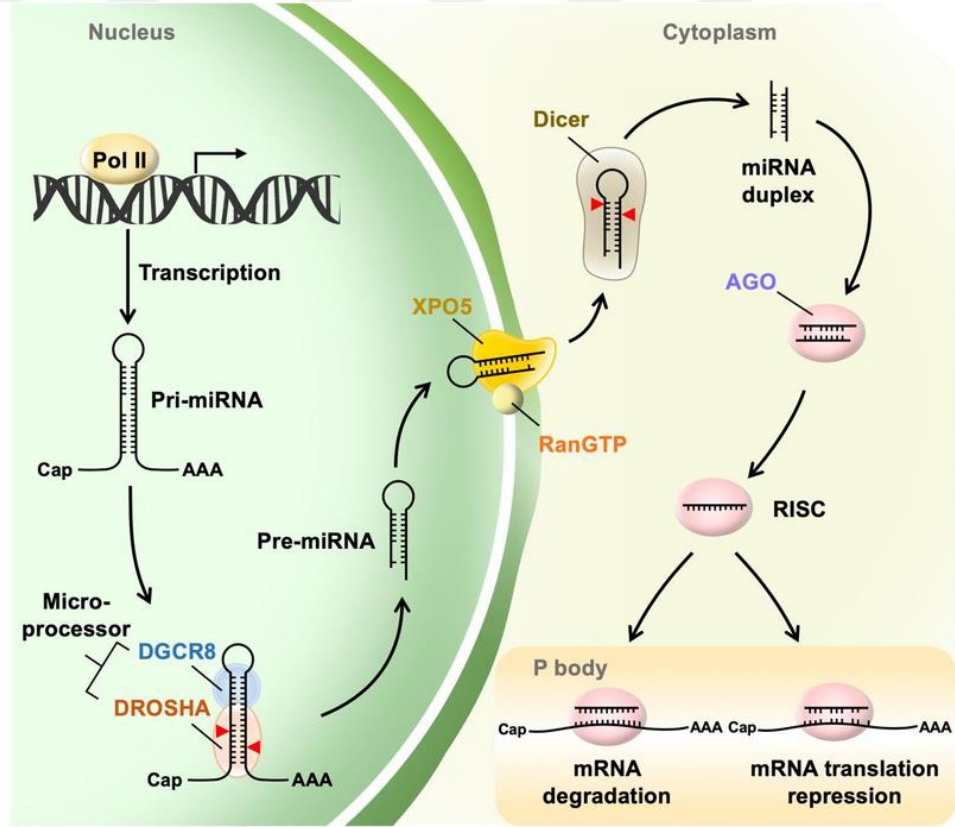
İmatinib Bcr-Abl onkoproteini tirozin kinaz etki alanının inhibitörüdür ve kinaz substratının ATP tarafından fosforilasyonunu önler. t(9:22) Philadelphia kromozomal translokasyonu ile karakterize bir pluripotent hematopoetik kök hücre hastalığı KML için endikedir. Bu ajan aynı zamanda trombosit bağılı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR), kök hücre faktörü ve c-kitine yönelik diğer reseptör tirozin kinazları da inhibe eder (Chu, MD ve Sartorelli, 2014). Bir tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib, KML hastalarının büyük çoğunluğu için işe yarasa da, direnç kendiliğinden veya tedavi sırasında gelişebilir (Alves ve ark., 2021). KML hastalarında izlemde gelişebilecek ek mutasyonlar ve direnç gibi durumlar nedeniyle imatinibe yanıtsızlık gelişmesi veya intolerans durumlarında ikinci kuşak TKİ (dasatinib ve nilotinib), 3. kuşak TKİ (ponatinib) klinik kullanıma girmiştir (Garcia-Gutierrez ve Herrera-Pabalo, 2011; Cortes ve ark., 2013).

2.2. MikroRNA

miRNA’lar, 20-25 nükleotid uzunluğunda protein kodlamayan ve gen ifadesini post transkripsiyon olarak kontrol eden protein kodlamayan (non-coding) RNA molekülleridir (Anderson ve ark., 2007; Bhattacharyya ve ark., 2008). miRNA’lar ilk olarak 1993 yılında, model organizma olarak kullanılan *Caenorhabditis elegans* (C. elegans) üzerinde yapılan araştırmalarla keşfedilmiştir. Bu organizmada bulunan *lin-4* geninin başlangıçta geleneksel bir protein kodlayan gen olduğu düşünülmüş, ancak daha sonra *lin-4*’ün herhangi bir protein değil, 22 nükleotit uzunluğunda düzenleyici bir RNA molekülü kodladığı anlaşılmıştır (Lee ve ark., 1993; Wightman ve ark., 1993). 2000’li yılların başında Reinhart ve arkadaşları C.elegans adındaki canlıya let-7 ismini vererek bu canlının gelişimini düzenleyen farklı bir miRNA bulmuşlardır. Let-7’nin insanlar dahil olmak üzere birçok organizmada bulunduğu gösterilmiştir (Reinhart ve ark., 2000; Lee ve ark., 2016).

2.2.1. MikroRNA Biyogenezi

miRNA biyogenezi, hem nükleus hem de sitoplazmada gerçekleşen aşamalı bir süreçtir. Başlangıç olarak miRNA biyogenezi nükleusta RNA polimeraz II aracılığıyla gerçekleşen transkripsiyon ile başlar. Transkripsiyon sonucunda saç tokası yapısında miRNA dizisini içeren pri-miRNA oluşur. Pri-miRNA, nükleusta bulunan RNAz III enzim ailesine ait bir endonükleaz olan Drosha ve onun kofaktörü DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8) tarafından tanınarak belirli bölgelerden kesilir ve yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda bir pre-miRNA molekülüne dönüştürülür. Oluşan pre-miRNA, nükleer transport reseptörü Exportin 5 ve RAN-GTP aracılığıyla nükleustan sitoplazmaya taşınır (Auyeung ve ark., 2013). miRNA biyogenezi Şekil 4'te gösterilmektedir.



Şekil 4. MikroRNA biyogenezi (Chang, 2023)

pre-miRNA'lar sitoplazmada bir RNaz III enzimi olan Dicer tarafından kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA: miRNA dubleksine çevrilir. Son olarak çift iplikli miRNA'ların bir ipliği bozulurken, diğer ipliği Argonuate-2 (Ago-2) bağlı RNA susturma kompleksine (RISC) bağlanır. Oluşan miRNA-RISC kompleksi, ya argonaute proteinleri yardımıyla mRNA'nın degradasyonuna ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olurlar (Treiber ve ark., 2012; Hammond, 2015; Macfarlane ve Murphy, 2010).

2.2.2. MikroRNA'ların Moleküler Etki Mekanizması

Olgun miRNA'lar, hedef genlerin ekspresyonunu azaltarak veya translasyonu baskılayarak protein sentezinin düzenlenmesinde görev alırlar. miRNA'lar, kendi nükleotid dizilerine tamamlayıcı olan hedef genleri tanıma yeteneğine sahiptir. RISC ile kompleks oluşturan miRNA, baz eşleşmesi yoluyla hedef mRNA'ya bağlanır ve bu bağlanma sonucunda ya translasyonun baskılanmasına ya da mRNA'nın parçalanmasına neden olur (Shenouda ve Alahari, 2009).

miRNA'lar genellikle hedef mRNA'nın 3' UTR (translasyona uğramayan bölge) ya da ORF (open reading frame) bölgelerine bağlanır. Bağlanma yeri, miRNA ile mRNA arasındaki tamamlayıcılık düzeyine bağlıdır. 3' UTR bölgesine bağlanma genellikle kusurlu ya da kısmi tamamlayıcılık içerir ve bu durum translasyonun baskılanmasına yol açar. Buna karşılık, ORF bölgesine kusursuz yani tam tamamlayıcılıkla bağlanma, Ago2 aracılığıyla mRNA'nın yıkımına neden olur (Sun ve ark., 2010). Ayrıca, bir miRNA'nın birden fazla mRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebileceği gibi, bir mRNA da birden fazla miRNA tarafından hedef alınabilmektedir (Pillai, 2005).

2.3. MikroRNA ve Kanser İlişkisi

miRNA profillemeye çalışmaları doku ve hücre tüplerinde farklı ekspresyon düzeylerine sahip miRNA'ların belirlenmesinde önemli fırsatlar sunmaktadır. Değişen miRNA düzeylerinin çok sayıda kanser tür ve alt tiplerini sınıflandırmada kullanılabileceği gösterilmiştir (Lu ve ark., 2005). Kanserli ve normal dokular arasındaki bu ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi miRNA'ların kanser patogenezindeki rollerini daha da güçlendirmiştir (Saydam ve ark., 2011).

Son yıllarda miRNA'ların tümör oluşumunda etkili olduğunun ortaya konması, kanserin genetik kökenlerinin sanılandan daha karmaşık olduğunu göstermiştir (Calin ve Croce, 2006). Kanserle ilişkilendirilen genomik bölgelerin ya da fragil (kırılgan) bölgelerin %50'sinden fazlasının miRNA kodlayan genleri içermesi, miRNA'ların kanser patogeneğinde önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır (Calin ve ark., 2004). Yapılan birçok çalışma ise miRNA'ların hücre büyümesi ile apoptoz mekanizmasının düzenlenmesinde aktif rol oynadığını göstermiştir (Byrom ve ark., 2005; Cesi ve ark., 2005).

miRNA'ların kanser hücrelerinin hücre proliferasyonu, gelişimi, farklılaşması, kök hücrenin yenilenmesi, strese yanıt, apoptoz ve metastaz gibi pek çok biyolojik süreçte rol oynadığı görülmektedir (Bartel, 2004; Hwang ve Mendell, 2006). miRNA'lar hedefledikleri mRNA'nın moleküler yollardaki özelliğine göre onkogenik veya tümör supresör özellik gösterirler (Koturbash ve ark., 2011). Bir onkogenin ekspresyonunu kontrol eden miRNA'lar tümör supresör, tümör supresörlerin baskılanmasını sağlayan miRNA'lar ise onkogen olarak adlandırılır (Zhang ve ark., 2007).

miRNA ve kanser arasındaki ilişki ilk olarak 2002 yılında kronik lenfositik lösemili (KLL) hastalarda yapılan çalışmayla ortaya konulmuştur. miR-15a ve miR-16-1'in kanserleşme sürecine etki mekanizmaları 2005 yılında Cimmino ve arkadaşlarının KLL'li bireylerde yaptıkları çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Karagün, 2012).

2.4. MikroRNA ve Kanser Tedavisi

Kanser tedavisinde miRNA tabanlı kanser tedavisine ilişkin kanıtlar hala nispeten erken aşamada olsa da, giderek artan literatür ve bilimsel kanıtlar bu yaklaşımın değerli olduğunu gösteriyor (Toden ve ark., 2021). miRNA tabanlı tedaviler, miRNA taklitleri ve miRNA inhibitörleri (antimiR olarak da bilinir) olarak ikiye ayrılabilir. miRNA taklitleri, karşılık gelen miRNA dizisine uyan ve bu nedenle hastalıklarda kaybolan miRNA ekspresyonunu işlevsel olarak yenilemeyi amaçlayan sentetik çift sarmallı küçük RNA molekülleridir. Buna karşılık, antimiR'ler tek sarmallıdır ve mRNA'ları hedeflemek üzere tasarlanmış veya kilitli nükleik asitlerle (LNA'lar) modifiye edilmiş birinci nesil antisens oligonükleotidlere (ASO'lar) dayanır. 2'-O-metoksietil modifikasyonuna sahip antimiR'lere ayrıca antagomiR denir.

Bu sentetik küçük RNA molekülleri, inhibe edilecek miRNA'ya tamamlayıcı bir diziye sahiptir ve ona güçlü bir şekilde bağlanarak karşılık gelen miRNA'nın işlevini engeller. Yıllar içinde, nükleotid omurgasında yapılan kimyasal modifikasyonlar yoluyla miRNA taklitlerinin ve antimiR'lerin bağlanma afinitesi, stabilitesi ve hedef modülasyon etkilerinde önemli gelişmeler elde edilmiştir. miRNA taklitleri veya antimiR'ler aracılığıyla in vivo miRNA ekspresyonunu ve aktivitesini modüle etme yeteneği, kansere yönelik yenilikçi terapötik yaklaşımların geliştirilmesi için bir fırsat sağlar (Rupaimoole ve Slack, 2017).

Son zamanlarda, insanda ilk miRNA terapötiklerinin faz I klinik çalışmalarda güvenli ve iyi tolere edildiği bulunmuş ve ileri kanserler için faz II klinik çalışmalara taşınmıştır. Bunlar arasında mezotelyomada TargomiR (miR-16 taklit bazlı tedavi) ve T hücreli lösemi/lenfomada Cobomarsen (anti-miR-155) ve hepatit C enfeksiyonu olan bireylerde Miravirsen (anti-miR-122) yer almaktadır (Kara, Calin ve Özpolat, 2022).

2.5. MikroRNA ve KML ilişkisi

miRNA'lar, KML'nin moleküler gelişimine duyarlı olduğu bulunan dinamik düzenleyici moleküllerdir ve potansiyel ilaç hedefleri ve biyobelirteçler olarak büyük potansiyele sahiptirler. Ayrıca erken teşhis stratejilerinin hasta prognozu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu biyobelirteç araştırmaları için miRNA'lar önemli moleküllerdir (Kotagama, Chang ve Mangone, 2015). Kronik miyeloid lösemi de dahil olmak üzere birçok insan kanserinde değişen miRNA ekspresyonu tanımlanmıştır (Flamant ve ark., 2010). Son çalışmalar anormal şekilde eksprese edilen miRNA'lar ile KML'nin başlangıcı ve ilerlemesi arasında güçlü bir ilişki olduğunu belirtmiştir (Litwinska ve Machalinski., 2017; Chakraborty ve ark., 2016). miR-16-1, miR-20, miR-106, miR-126, miR-155, miR-222 ve miR-451'nin tümör supresör veya onkogen olarak KML'de rol oynadıkları ve KML gelişimiyle ilgili çeşitli sinyal yollarını etkiledikleri belirtilmiştir (Keramati ve ark., 2021).

Kronik faz KML hastalarında yapılan çalışmada miR-150'nin KML tanısı için bir biyobelirteç olabileceği gösterilmiştir (Flamant ve ark., 2010). Wang ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, KML öncü hücrelerinde miR-486-5p'in aşırı eksprese edildiğini ve hücre büyümesi, hayatta kalma ve tirozin kinaz inhibitörlerine yanıtı arttırdığını belirtmişlerdir (Wang ve ark., 2015).

miR-17-92 kümesinin (yedi miRNA'yı kodlayan: miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 ve miR-92-1) KML'de onkojenik bir rolü olduğu ileri sürülmüştür. 13q31-q32'deki kromozomal amplifikasyon, CD34+ KML'de kromozom 13 açık okuma çerçevesi 25 (C13orf25) geni tarafından kodlanan miR-17-92 kümesinin aşırı ekspresyonuna yol açtığı gösterilmiştir (Venturini ve ark., 2007).

Başka bir çalışmada, KML'de miR-96 up regülasyonu ve miR-120, miR-151 ve miR-10 down regülasyonunu tanımlanmıştır. miR-10 down regülasyonunun BCR-ABL sinyallemeinden bağımsız olduğu belirtilmiştir (Agirre ve ark., 2008). miR-409-5p'nin çocuk KML'de düşük düzeyde eksprese edildiği ve NUP43 hedefleyerek etki gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca, miR-409-5p'nin aşırı ekspresyonunun KML'de imatinib direncini arttırdığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 2019). Zhou ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, histon demetilaz RBP2 tarafından doğrudan ve epigenetik olarak miR-21'in down regülasyon mekanizmasını tanımlamışlardır. Lösemi hücrelerinde RBP2'nin doğrudan miR-21'i ekspresyonunu azalttığını gözlemlediler ve PDCD4 ekspresyonun ise miR-21 tarafından düzenlendiğini buldular. RBP2'nin miR-21 ekspresyonunu azaltarak PDCD4'ü (mRNA'sı ve protein seviyesi) arttırdığı belirtmişlerdir (Zhou ve ark., 2015). Bir başka çalışmada miR-153-3p'nin over ekspresyonunun Bcl-2'nin inhibisyonuna, apoptozu teşvik etmeye ve lösemi hücrelerinin imatinibe duyarlılığını artırmaya yol açtığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2020). Ayrıca miR-29b, ABL1 mRNA'sının 3'UTR bölgesine bağlanarak doğrudan ABL1'i hedef alır. miR-29b'nin aşırı ekspresyonu, ABL1 gen ekspresyonunu baskılayarak BCR-ABL'de bir azalmaya neden olabileceği ve bu da pSTAT-5 ve p-AKT seviyelerinin zayıflamasına, p21 ve p27'nin indüklenmesine, BAX/Bcl-2 oranının artmasına neden olduğu belirtilmiştir. Böylece miR-29b'nin KML hücrelerinin apoptozunu desteklediği gösterilmiştir (Li ve ark., 2013).

2.6. miR-33a-5p

miR-33a-5p, lipid homeostazında rol oynayan membrana bağlı transkripsiyon faktörleri olan sterol düzenleyici element bağlayıcı protein SREBP-1 ve SREBP-2'yi kodlayan genlerin intronik bölgesinde yer alır (Rani ve ark., 2017). miR-33a ve miR-33b olarak bilinen iki miR-33 izoformu insanlarda tanımlanmıştır ve sırasıyla SREBP-2 ve SREBP-1 genleri içinde kodlanmıştır.

İki izoformu aynı başlangıç dizisini paylaşır ancak olgun formlarında başlangıç dizisinden hemen sonra iki nükleotid farklılık gösterir. miR-33a/b'nin transkripsiyon faktörü sterol düzenleyici element bağlayıcı proteini hedef alarak lipid ve kolesterol metabolizmasını kontrol etmede önemli roller oynadığı bildirilmiştir (Calin ve ark., 2006). Çalışmalar, SREBP/miR-33 ekseninin ise hücre büyümesi ve döngüsünde rol oynadığını göstermiştir. Bu bağlamda, miR-33a düzeylerindeki dengesizlik, kolesterol seviyelerini etkileyerek tümör gelişimine katkı sağlayabilir (Shao ve ark., 2017).

miR-33 kanonik hedefleme bölgelerine sahip mRNA'ların hem sentetik miR-33a hem de miR-33b tarafından baskılandığı bildirilmiş olmasına rağmen, bu durum bunların aynı genleri hedeflediklerini düşündürmektedir, miR-33a/b'nin farklı işlevlere sahip olduğu gösterilmiştir (Ramirez ve ark., 2013; Koyama ve ark., 2019; Ballester ve ark., 2021). miR-33a'nın kanser hücreleri üzerinde büyüme, apoptoz, epitel-mezenkimal geçiş ve tümör baskılayıcı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Cong ve ark., 2018). miR-33a, prostat kanseri, safra kesesi kanseri, melanom, osteosarkom ve meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanserler türlerinde tanımlanmıştır (Huang ve ark., 2018). miR-33a'nın kanserde kolesterol metabolizmasını hedeflemede önemli bir molekül olduğu ve meme kanseri gelişiminde tümör baskılayıcı bir rolü olabileceği belirtilmiştir (GuoRong ve ark., 2020). Gong ve arkadaşları, miR-33a-5p ve miR-128-3p'nin akciğer kanseri teşhisi için biyobelirteç olabileceğini belirtmişlerdir (Gong ve ark., 2018). Chen ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada miR-33a'nın osteosarkom hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığını göstermişlerdir (Chen ve ark., 2015). miR-33a-5p'nin kolorektal kanser (Yang ve ark., 2019), ilaca dirençli üçlü negatif meme kanseri (TNBC) (Guan ve ark., 2019) ve akciğer kanserinde (Pan ve ark., 2020) hücre çoğalması ve migrasyonu azalttığı belirtilmiştir.

Gang ve arkadaşlarının mide kanserinde yapmış olduğu çalışmada miR-33a-5p ekspresyonunun komşu normal dokulara kıyasla azaldığı gösterilmiştir (Gang ve ark., 2022).

2.7. ANK3

Ankrin'ler, integral membran proteinlerini altta yatan spektrin-aktin sitoskeletonuna bağlayan protein ailesidir (Chen ve Bennett, 2001). ANK proteinleri, hücreler arası bağlantılar, sinyal iletimi, hücre döngüsü düzenlemesi, veziküler taşıma, sitoskeletal bütünlük, inflamatuvar yanıtlar ve transkripsiyonel düzenleme gibi bir dizi hücresel süreçte yer alır (Mosavi ve ark., 2004).

Çeşitli hedef proteinler için farklı afinitelere sahip ANK'nın çoklu izoformları, dokuya özgü, gelişimsel olarak düzenlenmiş bir şekilde eksprese edilir. Çoğu ankrin tipik olarak üç yapısal alandan oluşur. Bunlar; çoklu ankrin tekrarları içeren bir amino-terminal alan, oldukça korunmuş bir spektrin bağlanma alanına sahip merkezi bir bölge ve en az korunmuş ve değişime tabi olan bir karboksi-terminal düzenleyici alandır (Kapfhamer ve ark., 1995; Yang ve ark., 2019). ANK3, Ankrin-G olarak da bilinir (Somsuan ve Aluksanasuwan, 2023). Ankrin 3, ankrin 1 ve 2'den immünolojik olarak farklı bir gen ürünüdür. Dokuya özgü ekleme nedeniyle gelişimsel olarak düzenlenen ve farklı şekilde eksprese edilen ANK3'ün birden fazla izoformu vardır. Özellikle, her biri benzersiz bir nöronal devre fonksiyonuna ve dağıtım örüntüsüne sahip olan 190 kDa, 270 kDa ve 480 kDa'lık (dev AnkG) üç ana beyin özgü izoformu tanımlanmıştır (Lambert ve ark., 1995; Chang ve ark., 2014; Smith ve ark., 2014).

ANK3, sitoskeletonu plazma membranına bağlayarak hücresel stabilite sağlama işlevi gören Ankrin ailesinin bir üyesidir. ANK3 ifadesinin düzensizliği birçok insan kanserinde gözlemlenmiştir ancak mekanizması hala bilinmemektedir (Tingting ve ark., 2016). Azalmış ANK3 ekspresyonu prostat kanserinde (Wang ve ark., 2016) ve androjen reseptörü pozitif meme kanserinde zayıf sağkalımla ilişkilendirilmiştir (Kurozumi ve ark., 2019). ANK3'ün hücre döngüsünü düzenlediği ve prostat kanseri hücrelerinde hücre invazyonunu engellediği gösterilmiştir (Wang ve ark., 2016). Yapılan çalışmalar ANK3'ün artan ekspresyonunun hücre apoptozunu teşvik ettiğini ve papiller tiroid karsinom hücrelerinde epitel-mezenkimal geçişi baskıladığını belirtmiştir (Zeng ve ark., 2022).

Yapılan bir çalışmada ANK3'ün androjen reseptör sinyal yolu ile ilişkisi ve meme kanseri hastalarının prognozu üzerindeki etkisi ortaya konulmuştur (Kurozumi ve ark., 2019).

2.8. Biyoinformatik Yöntemler

Tümör biyoinformatiği kanser araştırmalarında ve hassas tıpta önemli bir rol oynar. Geleneksel kanser araştırmalarının temel odağı, bir dizi temel yol ve genin moleküler ve klinik çalışmaları olmuştur (Huang ve ark., 2024).

Biyoinformatik, büyük ölçekli biyolojik verilerin analizini gerçekleştirmek amacıyla çeşitli disiplinlerin bir araya gelmesiyle oluşan multidisipliner bir bilim dalıdır. Bu alan, biyolojik verilere bilişim tekniklerini uygulamak için algoritmalar ve biyoistatistiksel yöntemlerden yararlanır (Akın ve ark., 2014). Özellikle biyolojik dizilerin analizine odaklanan biyoinformatik, günümüzde biyoloji, genomik ve gen ekspresyonu araştırmaları, hastalıkların tanı ve tedavi süreçleri ile bu hastalıklara yönelik ilaç geliştirme gibi pek çok alanda kullanılmakta; bilişim teknolojileri ve biyoistatistik biliminden yoğun şekilde faydalanmaktadır (Keklik ve Özcan, 2022).

Günümüzde, biyolojik veri tabanlarının hızla gelişmesi nedeniyle büyük örnek boyutları ve karmaşık algoritmalar kullanan biyoinformatik analizler çok daha temsili ve güvenilirdir. Kanser seyrini analiz etmek ve olası tedavi hedeflerini belirlemek için biyoinformatik analiz kullanımı son yıllarda önemli ölçüde artmıştır. Bu araştırmalar, çeşitli örnek boyutları, mikrodizi teknolojisi ve dizileme platformları nedeniyle literatürde görülen çelişkili sonuçların üstesinden gelebilme avantajına sahiptir (Tian ve ark., 2020).

Biyoinformatik alanında yapılan çalışmaları, hastalıkların tanılanması ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından önemli ilerlemeler sağlamaktadır. Bilim ve teknolojiye yaşanan gelişmeler ise biyoinformatik yazılımlarının daha da ilerlemesine ve gelecekte kullanım alanlarının genişlemesine işaret etmektedir (Atalay, 2002).

2.8.1. *miRNET*

Son yıllarda, yüksek verimli deneysel teknolojiler kullanılarak yapılan miRNA'ların işlevsel çalışmalarının sayısı artmıştır ve bu çalışmaları, miRNA hedef genleri ve bunların küçük moleküller, uzun kodlamayan RNA'lar, epigenetik değiştiriciler, hastalık ilişkileri vb. etkileşimleri hakkında çok miktarda veri üretmiştir. Bu zengin bilgi kümeleri, toplu işlevleri ve düzenleyici mekanizmaları hakkında ışık tutmak için miRNA'ları çeşitli biyolojik olarak önemli varlıklarla bağlayan kapsamlı ağların oluşturulmasını sağlamıştır (Fan ve ark., 2016).

miRNET, miRNA işlevlerini açıklamaya yardımcı olmak için tasarlanmış, kullanımı kolay, web tabanlı bir platformdur. miRNET, miRNA'ların, genlerin, transkripsiyon faktörlerinin, ncRNA'ların, hastalıkların, epigenetik faktörlerin, bunların herhangi bir kombinasyonunun veya mikrodizi, RNAseq veya RT-qPCR deneylerinden elde edilen verileri sağlar ve miRNA merkezli etkileşim ağlarının görsel keşfini iyileştirmeye yardımcı olmak için çok çeşitli seçenekler sunar. Ağ oluşturma aşamasında, kullanıcılar etkileşim tablolarına veya ağlara farklı filtreler uygulayarak ağı iyileştirebilir. Ağ görselleştirme sayfasında, kullanıcılar türlerine göre düğüm stilleri belirleyebilir, düğüm örtüşmesini azaltabilir veya kenar paketleme vb. gerçekleştirebilir (Chang ve ark., 2020).

2.8.2. miRDIP

mirDIP, doğru miRNA:hedef ilişkilerini açıklamak için tahmin veri tabanlarını entegre eder ve kullanıcıların çalışma yollarına bağlı olarak "yüksek hassasiyetli" veya "yüksek geri çağırılabilir" veri tabanlarında aramalarını, miRNA tahmin veri tabanlarının herhangi bir alt kümesine odaklamalarına olanak tanır (Shirdel ve ark., 2011). mirDIP, toplamda 27.936 gen ve 2734 miRNA için 46.364.047 tahmin içeriyor bu da onu mirGeneDB'den gelen verileri kullanarak etkileşimler sağlayan veri tabanı yapmaktadır. Minimal istatistiksel veya hesaplama deneyimiyle bile geniş bir kullanıcı yelpazesi için uygun olan, miRNA hedef tahminleri için kapsamlı, güvenilir bir kaynak sağlar (Tokar ve ark., 2018).

2.8.3. miRWALK

miRWALK, miRNA-hedef etkileşimi hakkında tahmin edilen ve doğrulanan bilgileri sunar. Bu veri tabanı araştırmacıların yalnızca 3'-UTR'de değil, aynı zamanda bilinen tüm genlerin diğer bölgelerinde de yeni miRNA hedeflerini doğrulamasını sağlar (Pandey ve ark., 2011). Mevcut miRNA-hedef kaynaklarından 13 tahmin veri kümesi toplayarak bir genin tüm bölgeleriyle olası miRNA etkileşimlerini oluşturmak için geliştirilmiştir (Dweep ve Gretz., 2015). Öngörülen hedef modülü ve doğrulanmış hedef modülü içeren miRWALK verilerin çok katmanlı bir görünümünü içerir ve miRNA'lar, genler, epigenomik yollar, ontolojiler, protein sınıfları, fenotip, genotip, tek nükleotid polimorfizmleri, fonksiyonel ağlar ve tandem kütle spektrumları ile ilgili bilgi sunar (Dweep ve Gretz., 2015).

Ayrıca gen ve protein sınıfları, bozukluklar ve mitokondriyal genomlarla ilişkili genler üzerinde istatistiksel olarak anlamlı miRNA etkileşimleri elde etmek ve Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (KEGG) aracılığıyla yolları keşfetmek için bir bakış açısı sunar (Dweep ve Gretz., 2015).

2.8.4. TargetScan

TargetScan, miRNA'nın 5' ucunda bulunan ve "tohum bölgesi" olarak adlandırılan belirli bir diziyi analiz etme olanağı sağlamakta böylece potansiyel olarak onunla etkileşime girebilecek en olası genleri tahmin eden bir veri tabanıdır (Saito ve Saetrom, 2010; Bartel ve ark., 2015). TargetScan, miRNA'nın tohumuna (nükleotidler 2-7) muhafaza edilmiş tamamlayıcılığa sahip mRNA'ları belirleyerek omurgalı miRNA'lar düzenleyici hedeflerini tahmin eder. mRNA'lardaki tohum tamamlayıcı bölgelerini çevreleyen muhafaza edilmiş adenozinlerin aşırı temsili, birincil dizi belirleyicilerinin miRNA hedef tanınmasını belirlemek için baz eşleşmesini tamamlayabileceğini gösterir (Shi ve ark., 2017).

2.8.5. BioGRID

Biyolojik Genel Etkileşim Veri Kümeleri Deposu (BioGRID), 2003 yılında Mike Tyers, Bobby-Joe Breitkreutz ve Chris Stark tarafından Lunenfeld-Tanenbaum Araştırma Enstitüsü'nde oluşturulan protein-protein etkileşimleri, genetik etkileşimler, kimyasal etkileşimler ve protein translasyon sonrası modifikasyonların düzenlendiği, tüm önemli model organizma türleri ve insanlar için birincil biyomedikal literatürden derlenen genetik ve protein etkileşimlerini barındıran açık erişimli bir veri tabanıdır (Boucher ve ark., 2017). BioGRID yüksek çıktılı veri kümelerinden ve birincil literatürden alınan kapsamlı iyileştirme çalışmaları ile derlenen etkileşimleri içerir (Winter ve ark., 2011). Ayrıca artık genom çapındaki CRISPR taramalarından gen-fenotip ilişkilerini de düzenler (Oughtred ve ark., 2019).

BioGRID, kullanıcıların bildirilen etkileşimler için ilgi duydukları bir geni, proteini veya kimyasalı hızla sorgulamasına olanak tanır ve etkileşimi tespit etmek için kullanılan tüm deneysel yöntemlerin yanı sıra verileri bildiren belirli yayınları görüntüler. Aranabilir tanımlayıcılar arasında gen/protein adları, bilinen takma adlar, sistematik açık okuma çerçevesi (ORF) adları, kimyasal adlar veya formüller ve diğer kaynak tanımlayıcıları bulunur (Oughtred ve ark., 2021).

2.8.6. DAVID

DAVID, gen listelerinin işlevsel açıklama ve zenginleştirme analizleri için bir web sunucusu ve web hizmeti içeren popüler bir biyoinformatik kaynak sistemidir. Kapsamlı bir bilgi tabanından ve bir dizi işlevsel analiz aracından oluşur (Sherman ve ark., 2022). DAVID, büyük gen/protein listelerinin işlevsel yorumlanması için araçlar sağlamayı amaçlayan web tabanlı biyoinformatik kaynağıdır. Herhangi bir yüklenen gen listesi için, DAVID biyoinformatik kaynakları yalnızca tipik gen-terim zenginleştirme analizini değil, aynı zamanda kullanıcıların büyük gen listelerini gen işlevsel gruplarına yoğunlaştırmasına, çok sayıda genden çok sayıda terime ilişkileri görselleştirmesine, gereksiz ve heterojen terimleri gruplara kümelemesine, ilginç ve ilgili genleri veya terimleri aramasına, genleri yollardaki listelerinden dinamik olarak görüntülenmesine ve daha fazlasına olanak tanıyan araçlar da sağlamaktadır (Jiao ve ark., 2012). Ayrıca, iyi bilinen KEGG ve BioCarta yollarından tam anlamıyla yararlanmak için, DAVID İşlevsel Açıklama Aracı'nın bir diğer özelliği olan yeni DAVID Yol Görüntüleyicisi, bir kullanıcının listesindeki genleri yol haritalarında görüntüleyerek bir ağ bağlamında biyolojik yorumlamayı kolaylaştırabilir (Huang ve ark., 2007).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler

Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, laboratuvar gereçleri ve malzemeler Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihaz, alet ve malzemeler

Kullanılan Cihaz, Alet ve Malzemeler	Marka / Model
Derin dondurucu, -80o	Thermo Electron Corporation
Dalga boyu ayarlanabilir mikroyet okuyucu	VERSA max Molecular Devices
Etüv	Heraeus
Çeşitli hacimlerde otomatik pipetler	Eppendorf
Spektrofotometre	Shimadzu, UV-1601
Hücre kültürü kabini	Heraeus KS-12 Air Flow
İnvert mikroskop	Nikon Eclipse TS100
CO2 inkübatör	Thermo Forma 381
Standart T-25 ve T-75 hücre kültür flaskları	Greiner Cellstar
Real-Time PCR cihazı	Applied Biosystems™ 7500
Mikro hacimli spektrofotometre	Thermo Nanodrop 2000
Çeşitli hacimlerde steril pipet uçları	Axygen
Termocycler	ProFlex

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler, üretici firmaları ve ürün kodları Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan kimyasallar/kitler ve üretici firmalar

Kullanılan Maddeler	Üretici Firmalar
DMEM besi yeri	Sigma, D6046
Penisilin/Streptomisin	Gibco, 15140-122
Trypsin/EDTA çözeltisi	BI, 03-053-1A
Fetal bovine serum (FBS)	Biochrom, S 0115
Trypan blue çözeltisi	Sigma, T8154
RNA izolasyon kiti RiboEx	GeneAll, 301-001
SYBR Green Mastermix	ABT, Q03-01-05
cDNA sentez kiti	ABT, C03-01-05
miRNA kiti	GeneAll, Hybrid-R miRNA, 325-150
miRqGreen MasterMix Kiti	ABT, Q04-01-01

3.3. Biyoinformatik Analizler

3.3.1. KML'de miRNA'ların Tanımlanması

KML'de miRNA'ların tespiti için, çevrimiçi platformlar olan miRNET (<https://www.mirnet.ca/> 8 Ocak 2025'te erişildi) (Chang ve ark., 2020), miRWALK (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/faqs/>, 8 Ocak 2025'te erişildi) (Dweep ve Gretz, 2015) kullanıldı. miRWALK veri tabanında Hastalık Ontolojisinde görülen 8552 kronik miyeloid lösemi, miRNET ise olası görülenler KML BCR/ABL pozitif olarak seçildi.

3.3.2. miRNA Hedeflerinin Belirlenmesi

Hsa-miR-33a-5p'nin potansiyel hedef genini belirlemek için TargetScan (https://www.targetscan.org/vert_80/, 9 Ocak'ta 2025'te erişildi) (McGeary ve ark., 2019) ve mirDIP (<https://ophid.utoronto.ca/mirDIP/>, 9 Ocak'ta 2025'te erişildi) (Shirdel ve ark., 2011) veri tabanları kullandı. miR-33a-5p hedeflerini belirlerken mirDIP veri tabanında, puan kısmı çok yüksek olarak seçildi. Ayrıca, TargetScan kullanılarak ANK3 3'UTR ve miR-33a-5p tamamlayıcı dizileri gösterildi (McGeary ve ark., 2019). Bir miRNA-hedef görsel ağı oluşturmak için Cytoscape kullanıldı.

3.3.3. ANK3'ün Protein/Protetin Etkileşim Ağı ve Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi

Protein-protein etkileşim ağı, BioGRID'den (<https://thebiogrid.org/>, 13 Ocak 2025'te erişildi) elde edildi (Oughtred ve ark., 2021). DAVID (<http://david.ncifcrf.gov/>, 13 Ocak 2025'te erişildi) seçilen genlerin (ANK3, CTNNB1, KRAS CCNF VE TP53) potansiyel aktivitelerinin yol ve işlev analizini gerçekleştirmek için kullanıldı (Huang ve ark., 2007). Biyolojik süreç ve yol zenginleştirmeyi tanımlamak için sırasıyla GO ve KEGG, Reactome veri tabanları kullanıldı. P <0,05 olarak belirlendi.

3.4. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmaları için; çalışma öncesi kabin ve kullanılacak malzemeler steril edildi, sonrasında kabin %70'lik etanol ile temizlendi.

3.4.1. K-562 ve HaCaT Hücre Serilerinin Eldesi ve Kültürü

K-562 ve HaCaT hücre hatları için besiyeri çözeltisi: 442.5 mL DMEM üzerine 50 ml FBS ve 7.5 mL penisilin-streptomisin eklenerek hazırlandı.

3.4.2. Kültür Aşamaları;

1. HaCaT ve K-562 hücreleri 15 mL'lik falkon tüplere aktarıldı ve son hacim %10 FBS ve %1 penisilin+streptomisin içeren DMEM besiyeri ile 10 mL'ye tamamlandı.
2. Hücre süspansiyonları 130 g'de 6 dakika santrifüj edildi.
3. Süpernatant uzaklaştırıldı, 1'er mL besiyeri ilave edilerek çözölen hücreler T-75'lik flasklara ekildi. Hücreler %5 CO₂ ortamında, 37 °C' de, inkübatörde çoğaltıldı.

3.4.3. Hücrelerin Pasajlanması;

Hücreler flask yüzeyinin %80'lik kısmını kapladıktan sonra hücre pasajlaması yapıldı.

1. Flasklardaki besiyeri uzaklaştırıldı.
2. Flasklar 4'er mL PBS ile yıkandıktan sonra her birine 2 mL tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 2 dakika inkübatörde bekletildi.
3. Hücreler falkon tüpe toplandı. Hücre süspansiyonu 130g'de 5 dakika santrifüjlendi.
4. Süpernatant kısımları 1 mL kalacak şekilde uzaklaştırıldı. Hücre süspansiyonlarından 10 µL'si 10 µL tripan blue ile karıştırıldı ve 3 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

5. Karışımdan 10 µL alındı ve neubauer hematositometre lamına aktarıldı. İnvert mikroskop ile incelenen hematositometre lamı üzerinde 16'ya bölünmüş dört ayrı kare vardır. Çapraz iki kare içerisinde bulunan canlı hücreler sayıldı ve mililitredeki canlı hücre sayısı; "sayılan hücre sayısı x seyreltme oranı x 10⁴" formülü kullanılarak hesaplandı.
6. Flasklara 10000 hücre/cm² olacak şekilde tekrar hücre ekimi yapılarak kültürleme sürecine devam edildi.

3.5. miRNA Ekspresyon Seviyesinin RT-qPCR ile Belirlenmesi

3.5.1. miRNA İzolasyonu

K-562 ve HaCaT hücrelerinden miRNA izolasyonu kullanılan ticari kitin yönlendirmeleri doğrultusunda yapıldı.

1. Hücre santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Örnek üzerine 500 µL RiboEx ilave edilerek karışması sağlandı.
2. Karışım 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
3. Karışım 11.000 rpm, 10 dakika 4°C de santrifüj edildi ve süpernatant başka bir tüpe aktarıldı.
4. Karışım üzerine 100 µl kloroform eklenerek, 2 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
5. 11.000rpm, 1 dakika 4°C de santrifüj edildi ve süpernatant başka bir tüpe aktarıldı.
6. Süpernatant üzerine %50 etanol ilave edilerek pipetaj yapıldı.
7. Karışımdan 700 µL alınarak B kolonuna aktarıldı.
8. 11.000rpm, 1 dakika, oda sıcaklığında santrifüj edildi.
9. Altta kalan sıvının üzerine 1:1 oranda %100 etanol eklenerek pipetaj yapıldı.
10. Karışımdan 650 µL alınarak W kolonuna aktarıldı.
11. 11.000rpm, 1 dakika, oda sıcaklığında santrifüj edildi. Diğer örnekler için 9-10. işlemler tekrarlandı.
12. Toplama tüpü değiştirildi ve üzerine 500 µL RBW solüsyonu eklendi.
13. 11.000 rpm, 1 dakika, oda sıcaklığında santrifüj edildi.
14. Toplama tüpü değiştirildi ve üzerine 500µL RNW solüsyonu eklendi.
15. 11.000 rpm, 1 dakika, oda sıcaklığında santrifüj edildi. 15-16. işlemler tekrarlandı.
16. Toplama tüpü değiştirildi ve 11.000 rpm, 2 dakika, oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- Kolon temiz bir tüpe alındı.
17. Kolon üzerine 50 µL RNaz-free su eklendi ve 2 dakika, oda sıcaklığında bekletildi.

18. 11.000rpm, 2 dakika, oda sıcaklığında santrifüj edildi. miRNA örnekleri -80°C de saklandı.

3.5.2. miRNA-cDNA Sentezi

miRNA için spesifik “stem-loop primer” dizayn edilerek cDNA sentezinde bu primerler kullanılmıştır. cDNA sentezi için kullanılan bileşen bilgileri Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3. miRNA-cDNA sentezi mastermix bileşenleri

Bileşenler	Hacim
10X Reaksiyon tamponu	1 µl
Stem-loop primer (miRNA spesifik)	1 µl
20X dNTP mix	0.5 µl
Reverse transkriptaz	0.5 µl
RNaz Inhibitor	0.25 µl
ddH ₂ O	5.75 µl
miRNA örneği	1 µl
TOPLAM	10 µl

Karışım hazırlandıktan sonra reverse transkripsiyon reaksiyonuna geçilmiştir. cDNA sentezi için kullanılan reaksiyonun koşulları Tablo 4’te belirtilmiştir.

Tablo 4. miRNA-cDNA sentezi reaksiyon koşulları

	1	2	3	4
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre	10 dk	120 dk	5 dk	-

Elde edilen miRNA-cDNA örnekleri için RT-qPCR aşamasına kadar -80 °Cde muhafaza edildi.

3.5.3. miRNA için RT-qPCR

miRNA-cDNA elde edildikten sonra RT- qPCR aşamasına geçilmiştir. RT-qPCR için kullanılan primer ve primer dizileri Tablo 5’te gösterilmiştir.

Tablo 5. RT-qPCR için kullanılan primer dizileri

Primer Adı	Primer Dizisi
Hsa-miR-33a-5p-F	GUGCAUUGUAGUUGCAUUGCA
RNU6-F	CTCGCTTCGGCAGCACA
RNU6-R	AACGCTTCACGAATTTGCGT
Universal Reverse	CGAGGAAGAAGACGGAAGAAT

RT- qPCR için kullanılan bileşenler Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. miRNA ekspresyonu için kullanılan bileşenler

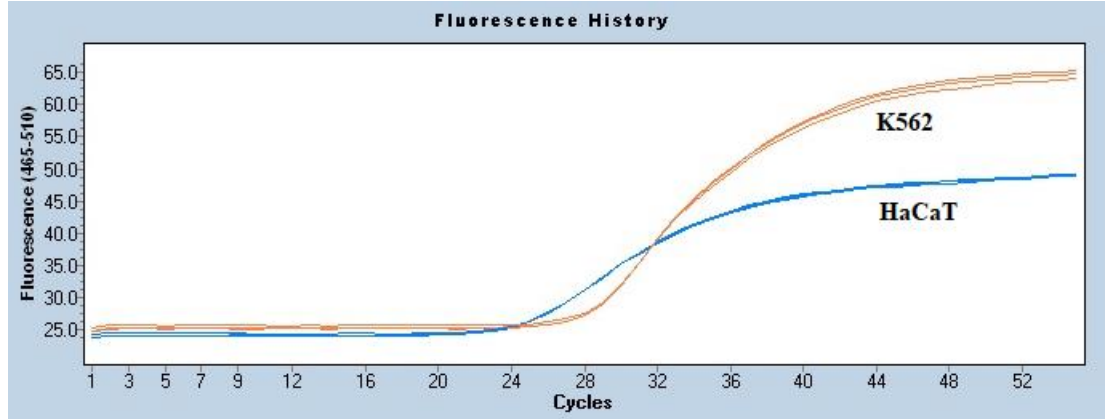
MasterMix Bileşenleri	Hacim
miRqGreen MasterMix	10 µl
miRNA Spesifik Forward Primer	1 µl
miRNA Genel Reverse Primer	1 µl
miRNA-cDNA Template	2 µl
ddH ₂ O	Up to 20 µl
TOPLAM	20 µl

RT-qPCR için kullanılan reaksiyon koşulları Tablo 7’de belirtilmiştir

Tablo 7. miRNA için RT-qPCR reaksiyon koşulları

PCR Basamakları	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Başlangıç denatürasyon	95	300 sn	1
Denatüre	95	10-30 sn	40
Anneal	60	10-60 sn	40
Erime Eğrisi	65-95	2-5 sn/step	1

miRNA ekspresyonuna ait amplifikasyon eğrileri Resim 1’de verilmiştir.



Resim 1. miR-33a-5p’ye ait amplifikasyon eğrileri

RT-qPCR ile elde edilen sonuçların kantite edilmesinde karşılaştırmalı Cp metodu ($2^{-\Delta\Delta C_p}$ metodu) rölatif kantitasyonu analiz etmede kullanılan normalize edilmiş gen ekspresyonunun matematiksel modelidir (Livak ve Schmittgen, 2001). Bu eşitliğe göre ΔC_p hedef: Cp hedef gen-Cp referans gen (RNAU6), ΔC_p kontrol: Cp Hedef gen-Cp Referans gen.

3.6. ANK3 Ekspresyon Seviyesinin RT-qPCR ile Belirlenmesi

3.6.1. RNA İzolasyonu

K-562 ve HaCaT hücrelerinden RNA izolasyonu kullanılan ticari kitin yönlendirmeleri doğrultusunda aşağıdaki gibi gerçekleştirildi.

1. Hücreler santrifüj edildi, süpernatantı uzaklaştırıldı. Örneklerin üzerine 1 mL RiboEx eklenerek vortekslendi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
2. Karışım 11.000 rpm, 10 dakika, 4 °C koşullarında santrifüj edildi ve süpernatant başka bir tüpe aktarıldı. Karışım üzerine 200 µL kloroform eklendi karıştırıldı, 2 dakika inkübe edildi.
3. +4°C de 12.000×g’de 15 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant temiz bir tüpe alındı. Süpernatantın hacmi kadar RB1 solüsyonu eklenip pipetaj yapıldı.
4. 700 µL karışım kolona aktarıldı. 10.000×g’de 30 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpü yenisi ile değiştirildi. Kolon üzerine 500 µL SW1 solüsyonu eklendi.
5. 10.000×g de 30 saniye santrifüj yapıldı. Toplama tüpü yenisi ile değiştirildi.
6. Kolon üzerine 500 µL RNW solüsyonu eklendi.

7. 10.000×g de 30 saniye santrifüj yapıldı. Tüpü yenisi yenisi ile değiştirildi.
8. Kolon içinde kalan yıkama solüsyonlarını uzaklaştırmak için 10.000×g de 1 dakika santrifüj yapıldı. Daha sonra kolon temiz bir tüpe alındı.
9. Kolon üzerine 50 µL RNaz-free su eklendi ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
10. Sonra 10.000×g de 1 dakika santrifüj yapılarak elde edilen RNA örnekleri -80°C sıcaklıkta donduruldu.

3.6.2. cDNA Sentezi

mRNA izolasyonu sonrasında cDNA sentezi aşamasına geçildi. cDNA sentezi için kullanılan mastermix bileşenleri Tablo 8’de belirtilmiştir.

Tablo 8. cDNA sentezi için kullanılan mastermix bileşenleri

Bileşen	Hacim
10X Reaksiyon Tamponu	2 µl
20X dNTP Mix	1µl
Random Hexamer	2 µl
RTaz	1µl
RNaz Inhibitor	0.5µl
ddH ₂ O	3.5 µl
Örnek	10 µl
TOPLAM	20 µl

cDNA sentezi için mastermix hazırlandıktan sonra reverse transkripsiyon reaksiyonuna geçilmiştir. cDNA sentezi için kullanılan reverse transkripsiyon reaksiyonunun koşulları Tablo 9’da belirtilmiştir. cDNA örnekleri RT-qPCR aşamasına kadar -80 °C de muhafaza edildi.

Tablo 9. cDNA sentez reaksiyonu koşulları

	1	2	3	4
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre	10 dk	120 dk	5 dk	-

3.6.3. RT- qPCR Analizi

cDNA elde edildikten sonra RT-qPCR aşamasına geçilmiştir. ANK3 ekspresyonu için kullanılan primer bilgileri aşağıdaki Tablo 10’da belirtilmiştir.

Tablo 10. ANK3 ekspresyonu için kullanılan primer dizileri

Primer Adı	Primer Dizisi
ANK3-F	ACACCTTGAACAGAAGCTCCTA
ANK3-R	CGTCCACCATAAAGCTAACCAG
HS-GAPDH-F	TGA CTT CAA CAG CGA CAC CCA
HS-GAPDH-R	CAC CCT GTT GCT GTA GCC AAA

RT-qPCR için kullanılan mastermix bilgileri aşağıdaki Tablo 11’de belirtilmiştir.

Tablo 11. ANK3 için kullanılan mastermix bilgileri

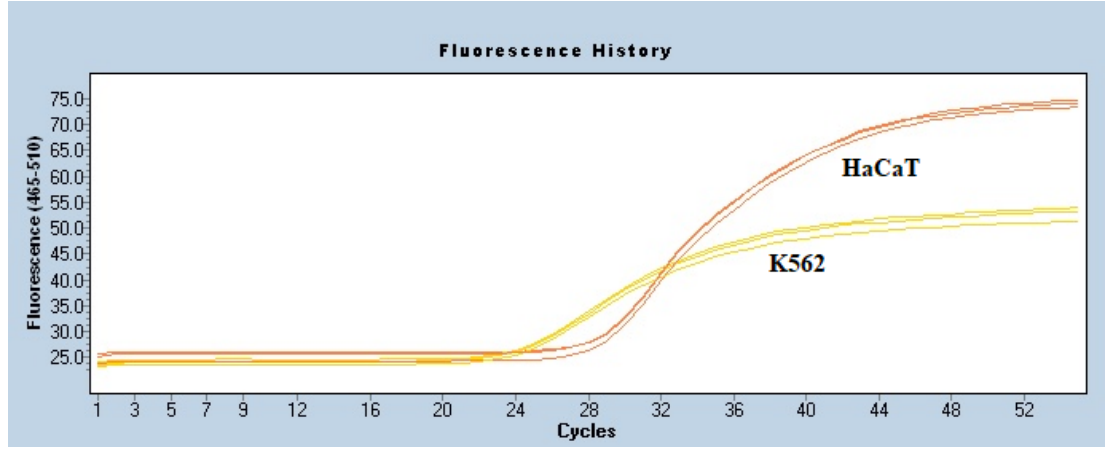
MasterMix Bileşenleri	Hacim
2X MasterMix (with SYBR-Green)	10 µl
ROX Dye	1 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl
Reverse Primer (10 µM)	1 µl
cDNA Template	4 µl
RNase-Free Distile Su	3 µl
TOPLAM	20 µl

Mastermix hazırlandıktan sonra Real-Time qPCR reaksiyonuna geçildi. RT-qPCR için kullanılan reaksiyon koşulları aşağıdaki Tablo 12’de belirtilmiştir.

Tablo 12. ANK3 için RT -qPCR reaksiyon koşulları

PCR Basamakları	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Initial Denaturation	95	300 sn	1
Denatüre	95	15 sn	40
Anneal	60	60 sn	40

ANK3 ekspresyonuna ait amplifikasyon eğrileri Resim 2’de verilmiştir.



Resim 2. ANK3’e ait amplifikasyon eğrileri

RT-qPCR ile elde edilen sonuçların kantite edilmesinde karşılaştırmalı Cp metodu kullanılmıştır. Referans gen GAPDH’dır.

3.7. İstatistiksel Yöntemler

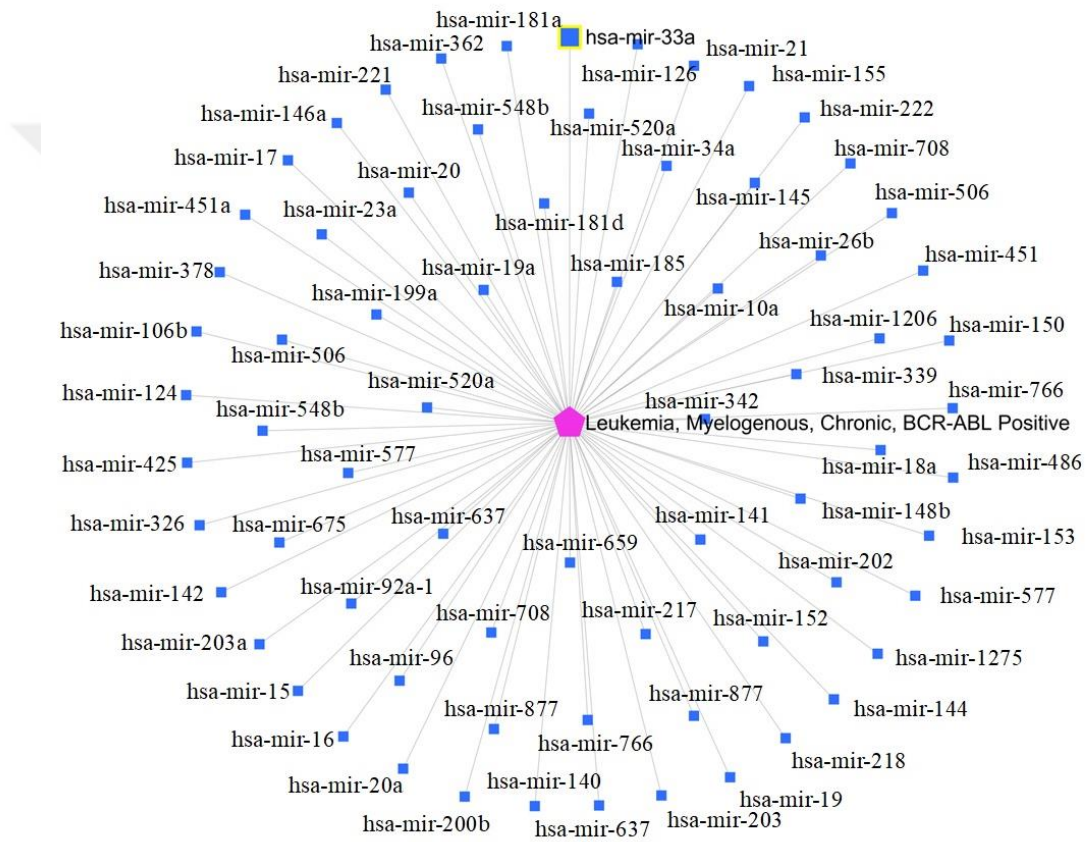
Deney sonuçları, SPSS (Statistics Program for Social and Science) (sürüm 23.0; IBM Corp., Armonk, NY, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Değişkenlerin normalliği Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak değerlendirildi. miR-33a-5p ve ANK3 ekspresyon düzeylerinin K-562 ve HaCaT hücreleri arasında karşılaştırılması için bağımsız örnekler t-testi kullanıldı. Veri dağılımı göz önüne alındığında, miR-33a-5p ve ANK3 ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkileri incelemek için Pearson korelasyon analizi yapıldı. K-562 hücrelerinde, miR-33a-5p ve ANK3 ekspresyon sonuçları için Pearson korelasyon analizi ayrı ayrı gerçekleştirildi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak belirlendi. Tüm deneyler üçer kez gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1. KML'de miRNA'ların Belirlenmesi

KML'de bulunan miRNA'ları tanımlamak için miRNET ve miRWALK veritabanları kullanıldı. miRNET'te 71 miRNA (Şekil 5'te gösterilmiştir), miRWALK'ta ise 2645 miRNA belirlendi.

Her iki veri tabanı yer alan ortak miRNAlar belirlendi ve miR-33a ileri analizler için seçildi.

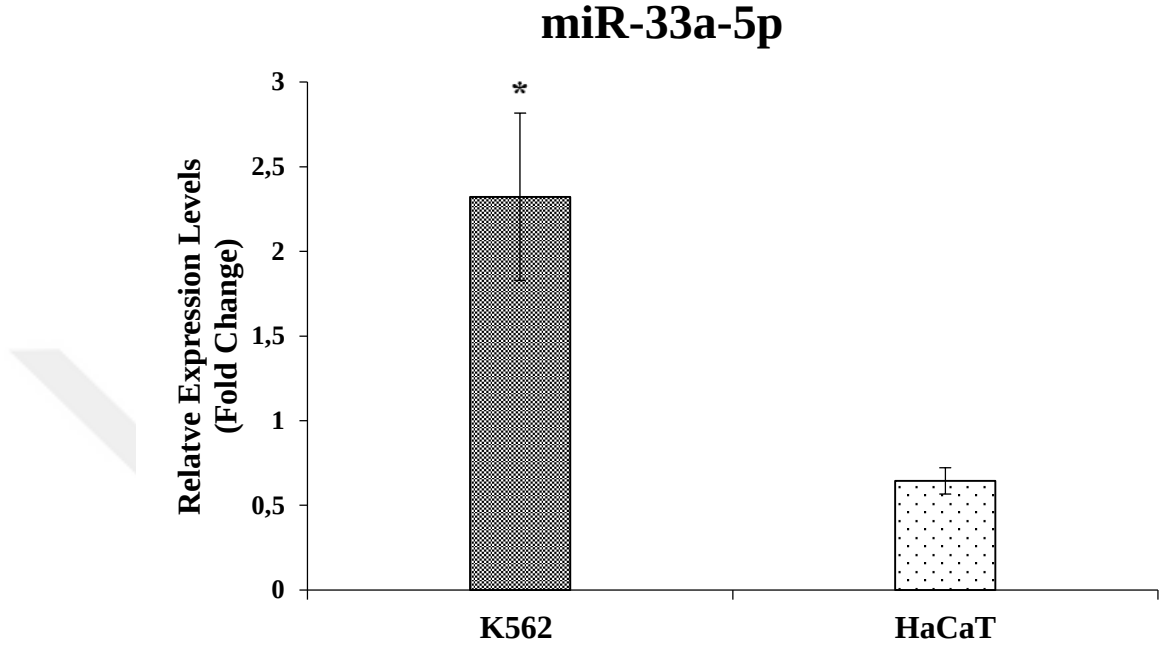


Şekil 5. KML'de yer alan miRNA'lar

4.2. miR-33a-5p'nin Ekspresyon Değeri

K-562 ve HaCaT hücrelerinde miR-33a-5p ekspresyonu kat olarak Şekil 6'da sütun grafiği olarak verildi. miRNA'nın ekspresyon düzeyleri RNAU6 ile normalize edilmiştir.

HaCaT'a göre K-562 hücre hattının miR-33a-5p ekspresyon analiz sonucu Şekil 6'da sütun grafiği olarak verilmiştir. K-562 hücre serisinde miR-33a-5p ekspresyonu HaCaT kontrol grubuna göre anlamlı artış ($p=0.0001$) görülmüştür.

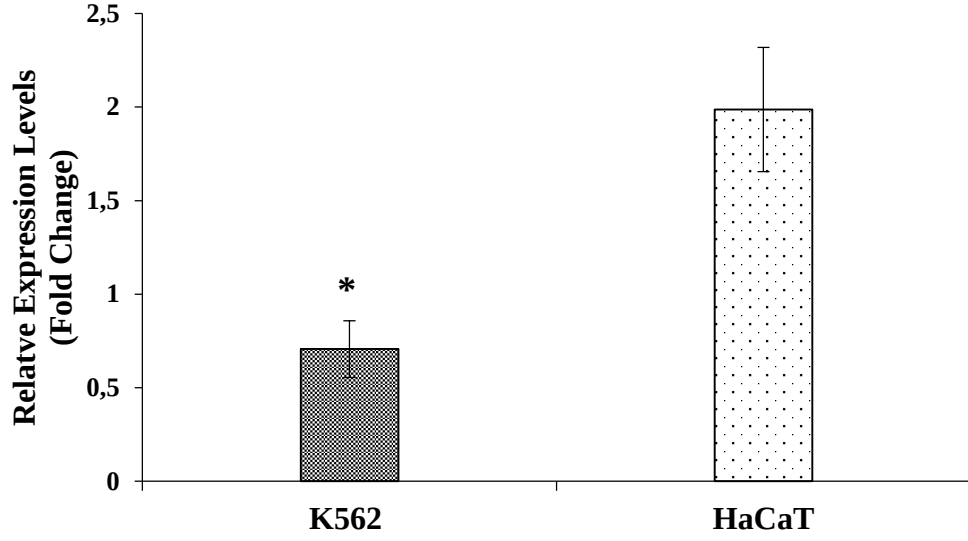


Şekil 6. HaCaT'a göre K-562 hücre hattının miR-33a-5p ekspresyon analiz sonucu (n=8) [* HaCaT grubuna göre artış görüldü ($p=0.0001$).]

4.3. miR-33a-5p'nin Hedeflerinin Belirlenmesi

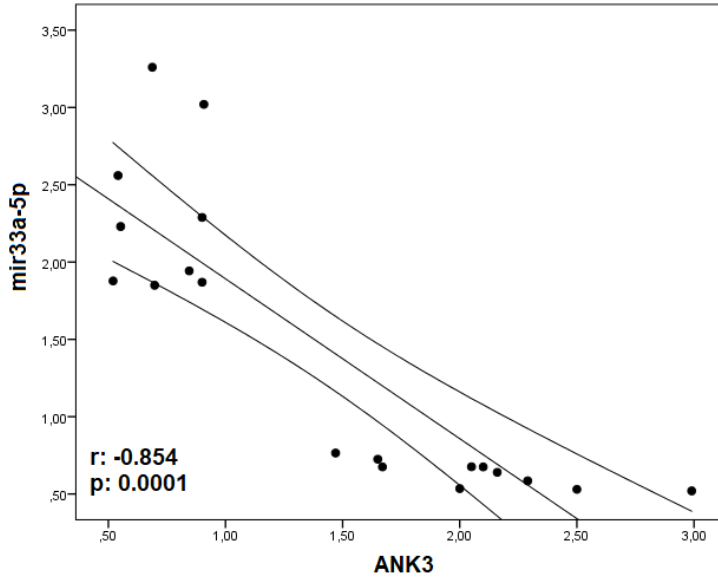
miR-33a-5p'nin ortak hedefleri 2 farklı miRNA hedef tahmin aracı (TargetScan, miRDIP) kullanılarak belirlendi ve ortak hedefler Cytoscape yazılımıyla görselleştirildi. miR-33a-5p ve ANK3 arasındaki hedefleme ilişkisi Şekil 7'de verilmiştir. Bu veritabanlarının sonuçlarına göre TargetScan'de 523 gen, miRDIP'de 194 gen ve miR-33a-5p'nin ortak hedef genleri olarak 153 gen belirlendi. Bu hedef genler arasında, KML'de ekspresyonu azalan ANK3 geni daha ileri analiz için seçildi.

ANK3



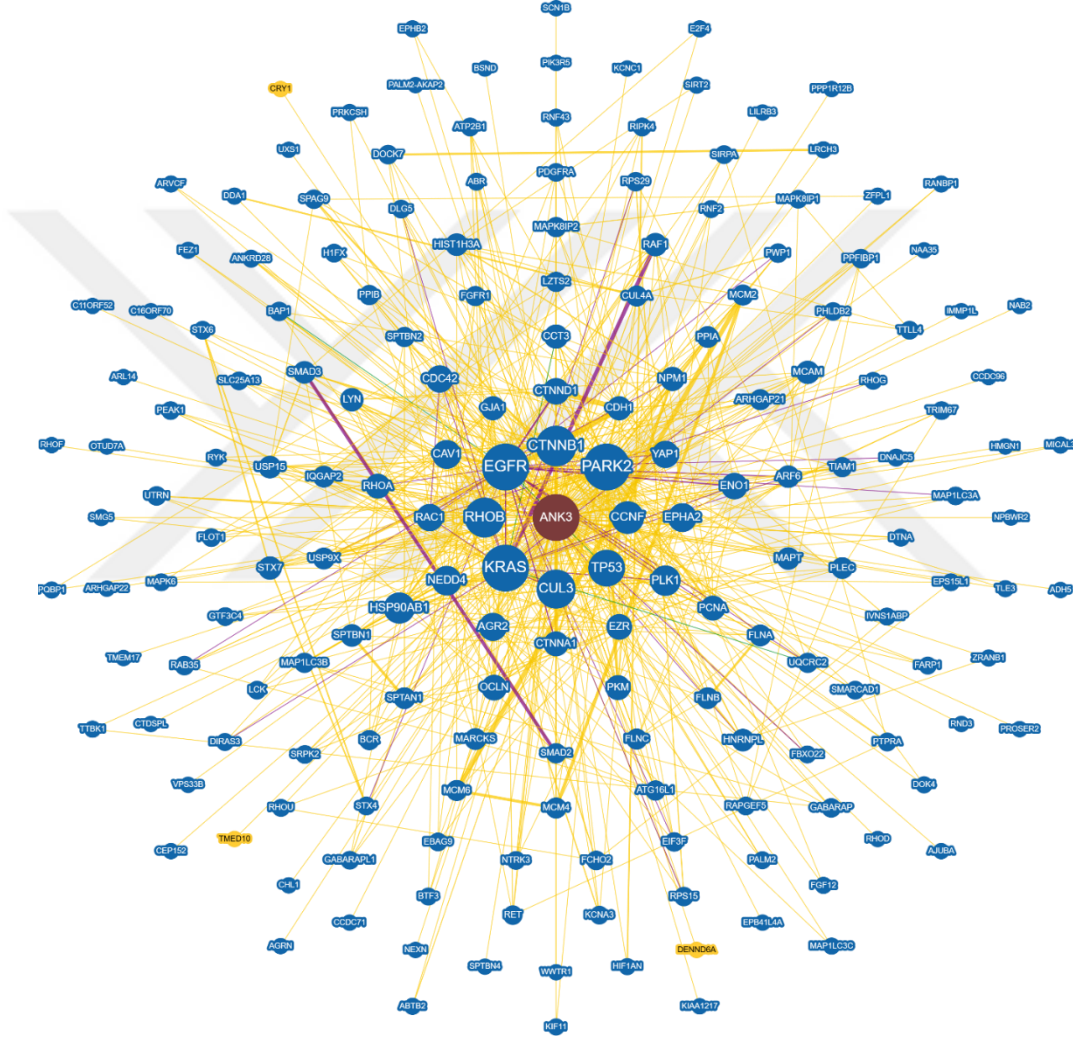
Şekil 8. HaCaT'a göre K-562 hücre hattının ANK3 gen ekspresyon analiz sonucu (n=8) [* HaCaT grubuna göre azalma görüldü (p=0.0001).]

Ayrıca ANK3 ve miR-33a-5p arasında negatif ilişki bulunmuştur (Şekil 9'da gösterilmiştir).



Şekil 9. miR-33a-5p ekspresyon seviyesi ile ANK3 arasında negatif ilişki bulundu

PPI analizi, kanser fizyolojik ve patolojik değişikliklerinin moleküler mekanizmalarını yansıtabilir. ANK3 ile ilişkili hedef genlerin PPI ağı, BioGRID veritabanından alınmıştır (Şekil 10). Daha sonra, yüksek dereceye sahip kanser patoloji ile ilişkili 5 gen (ANK3, CTNNB1, KRAS, CCNF ve TP53) daha ileri analiz için merkez genler olarak seçildi. GO ve KEGG yolu analizleri, tanımlanan genlerin etkilediği yolakları belirlemek için gerçekleştirildi.



Şekil 10. ANK3'e dayalı protein-protein etkileşim ağı (yeşil: genetik ilişki, sarı: fiziksel ilişki, mor: genetik ve fiziksel ilişki)

Biyolojik süreçler için, bu genel olarak gen ekspresyonunun pozitif düzenlenmesi, nöroblast proliferasyonu, kök hücre proliferasyonu, Ras protein sinyal iletimi, nöron apoptotik süreci, MAPK kaskadı, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve apoptotik sürecin pozitif düzenlenmesi vb. süreçleri kapsamaktadır. Moleküler fonksiyonlar için sonuçlar, bu genlerin esas olarak düzensiz alana spesifik bağlanması, transmembran taşıyıcı bağlanması, RNA polimeraz II'ye özgü DNA-bağlanma transkripsiyon faktörü bağlanması, ubiquitin protein ligaz bağlanması vb. şeklindedir. ANK3, CTNNB1, KRAS, CCNF VE TP53 genleri ile zenginleştirilmiş GO analizi Tablo 13' te verilmiştir. KEGG ve Reactome yolak analizi, genlerin esas olarak sırasıyla, kanserde proteoglikanlar, kanserde yolaklar, kronik miyeloid lösemi, apoptozis, WNT sinyal yolu, MAPK sinyal yolu, gelişim biyolojisi, Ca²⁺ yolu, Beta-katenin bağımsız WNT sinyal yolu, programlanmış hücre ölümü gibi yollarda zenginleştirildiğini ortaya koydu. ANK3, TP53, CCNF, KRAS ve CTNNB1'in KEGG ve Reactome zenginleştirme analizi Tablo 14'te verilmiştir.

Tablo 13. ANK3, CTNNB1, KRAS, CCNF ve TP53 genleri ile zenginleştirme analizi

Kategori	Terim	P-Değeri
Gen Ontolojisi Biyolojik Süreçler	GO:0010628- Gen İfadesinin Pozitif Düzenlenmesi	6.9E-5
	GO:0060441-Akciğer Morfogenezinde Yer Alan Epitel Tüp Dallenması	3.5E-3
	GO:0014009-Glial Hücre Çoğalması	3.7E-3
	GO:0033077-Timusta T Hücre Farklılaşması	8.0E-3
	GO:0007405-Nöroblast Proliferasyonu	8.6E-3
	GO:0072089-Kök Hücre Çoğalması	1.0E-2
	GO:0043525-Nöron Apoptotik Sürecinin Pozitif Düzenlenmesi	1.4E-2
	GO:0007265-Ras Protein Sinyal İletimi	1.7E-2
	GO:0051402-Nöron Apoptotik Süreci	1.8E-2
	GO:0000165-MAPK Kaskad	2.4E-2
	GO:0001701-Rahimiçi Embriyonik Gelişim	4.5E-2
	GO:0051726-Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi	4.8E-2
	GO:0009410-Ksenobiyotik Uyarana Yanıt	5.2E-2
	GO:0043065-Apoptotik Sürecin Pozitif Düzenlenmesi	6.6E-2
	GO:0008285-Hücre Popülasyonu Çoğalmasının Negatif Düzenlenmesi	8.7E-2
Gen Ontolojisi Moleküler Fonksiyonlar	GO:0097718-Düzensiz Alan Spesifik Bağlanması	7.7E-3
	GO:0044325-Transmembran Taşıyıcı Bağlanması	3.0E-2
	GO:0061629-RNA Polimeraz II-Spesifik DNA Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü Bağlanması	3.8E-2
	GO:0031625- Ubikitin Protein Ligaz Bağlanması	6.3E-2
	GO:0045296-Kadherin Bağlanması	6.5E-2
	GO:0019899-Enzim Bağlanması	7.6E-2

Tablo 14. ANK3, TP53, CCNF, KRAS ve CTNNB1'in KEGG ve Reactome zenginleştirme analizi

Kategori	Terim	%	P-Değeri
KEGG ANALİZİ	Kanserde Proteoglikanlar	80	1.2E-5
	Tiroid Kanseri	60	5.1E-5
	Endometriyal Kanser	60	1.3E-4
	Kolorektal Kanser	60	2.8E-4
	Prostat Kanseri	60	3.6E-4
	Tiroid Hormonu Sinyal Yolu	60	5.6E-4
	Meme Kanseri	60	8.2E-4
	Mide Kanseri	60	8.4E-4
	Hepatit C	60	9.5E-4
	Hepatoselüler Karsinom	60	1.1E-3
	Kaposi Sarkomu ile İlişkili Herpesvirüs Enfeksiyonu	60	1.4E-3
	İnsan Sitomegalovirüs Enfeksiyonu	60	1.9E-3
	İnsan Papillomavirüs Enfeksiyonu	60	4.1E-3
	Kanserdeki Yollar	60	1.0E-2
	Mesane Kanseri	40	1.4E-2
	Bazal Hücreli Karsinom	40	2.1E-2
	Kanserde Merkezi Karbon Metabolizması	40	2.4E-2
	Melanom	40	2.5E-2
	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri	40	2.5E-2
	Gliom	40	2.6E-2
	Kronik Miyeloid Lösemi	40	2.6E-2
	Pankreas Kanseri	40	2.6E-2
	Uzun Ömür Düzenleme Yolu	40	3.0E-2
	Endokrin Direnci	40	3.3E-2
	Melanogenez	40	3.4E-2
	Mitofaji-Hayvan	40	3.5E-2
	Nörotrofin Sinyal Yolu	40	4.0E-2
	Sfingolipid Sinyal Yolu	40	4.1E-2
	Apoptozis	40	4.5E-2
	Sıvı Kayma Stresi ve Ateroskleroz	40	4.7E-2
	Kök Hücrelerin Çok Yönlülüğünü Düzenleyen Sinyal Yolu	40	4.8E-2
	Hücrel Yaşlanma	40	5.2E-2
	Hepatit B	40	5.4E-2
	Wnt Sinyal Yolu	40	5.8E-2
	Viral Karsinogenez	40	6.8E-2
	Rap1 Sinyal Yolu	40	7.0E-2
	Lipid ve Ateroskleroz	40	7.1E-2
	İnsan T Hücreli Lösemi Virüsü 1 Enfeksiyonu	40	7.4E-2
	MAPK Sinyal Yolu	40	9.8E-2

Tablo 14. ANK3, TP53, CCNF, KRAS ve CTNNB1'in KEGG ve Reactome zenginleştirme analizi (Devam)

Kategori	Terim	%	P-Değeri
REACTOME ANALİZİ	RUNX3 Tarafından Transkripsiyonel Düzenleme	60	3.5E-4
	Gelişimsel Biyoloji	80	7.1E-3
	Büyüme Faktörü Reseptörleri ve İkinci Haberciler Tarafından Sinyal İletimi Hastalıkları	60	9.3E-3
	VENTX Tarafından Transkripsiyonel Düzenleme	40	1.4E-2
	İmmün Sistem	80	2.1E-2
	Ca ²⁺ Yolu	40	2.2E-2
	Proteinlerin Mekanizması	80	2.3E-2
	VEGFA-VEGFR2 Yolu	40	3.5E-2
	VEGF Tarafından Sinyalleme	40	3.8E-2
	Beta-Katenin Bağımsız WNT Sinyallemesi	40	4.7E-2
	Doğuştan Bağışıklık Sistemi	60	4.7E-2
	Apoptozis	40	5.9E-2
	Genel Transkripsiyon Yolu	60	6.3E-2
	Programlanmış Hücre Ölümü	40	7.0E-2
	RNA Polimeraz II Transkripsiyonu	60	7.5E-2
	Translasyon Sonrası Protein Modifikasyonu	60	8.8E-2
	Gen ifadesi (Transkripsiyon)	60	9.9E-2

5. TARTIŞMA

KML yetişkin popülasyonda görülen en yaygın lösemilerden biridir (Rinaldi ve Winston, 2023). KML gelişiminin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasında ilerlemeler kaydedilmiş olsa da (Quintas-Cardama ve Cortes, 2006) hastaların prognozu olumsuz olmaya devam etmektedir (Radujkovic ve ark., 2019). KML tedavisinin hedefleri olan yaşam süresini uzatmak, yaşam kalitesini iyileştirmek, patlama fazına dönüşümü önlemek TKİ'ler ile yönetilebilir hale getirilse de (Wang ve ark., 2024) hala aşılması gereken pek çok sorun mevcuttur. Örneğin çoğu hastanın nüksetmeyi önlemek için sürekli olarak TKİ alması gerekliliği, kronik TKİ toksisitesi ve TKİ'nin yaşam kalitesi üzerindeki etkisi gibi hala çözülmemiş sorunlar devam etmektedir (Rinaldi ve Winston, 2023). Bu sorunların ele alınabilmesi için KML patogenezinde yer alan moleküler yolların daha iyi anlaşılması gerekmektedir. Birçok çalışma KML'nin birden fazla gen, yolak ve etki eden faktörden kaynaklandığını göstermiştir (Sant'Antonio ve ark., 2021).

miRNA'lar gen ifadesinin transkripsiyon sonrası düzenlenmesinde yer alan küçük kodlamayan RNA'lardır (Saliminejad ve ark., 2019). miRNA'lar proliferasyon, farklılaşma, apoptozis, hematopoez gibi birçok fizyolojik süreçte önemli rol oynarlar (Navabi ve ark., 2022). miRNA'ların çeşitli kanserlerde onkogenik veya tümör baskılayıcı etkilere sahip olabileceği, ayrıca kanser tanısı ve tedavisinde umut verici biyobelirteçler olarak hizmet edebileceği belirtilmiştir (Chang ve ark., 2017). miRNA ekspresyonu, hücresel düzeyde fizyolojik durumdaki değişiklikleri yansıtan dinamik bir süreçtir (Litwinska ve Machalinski, 2017). Son çalışmalar, anormal şekilde eksprese edilen miRNA'ların KML oluşumu ve gelişimiyle yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (Yeh, Moles ve Nicot, 2016; Litwinska ve Machalinski, 2017; Chakraborty ve ark., 2016). Ayrıca miRNA'ların KML'nin TKİ direncinin gelişiminde rol oynadıkları belirtilmiştir. Bu moleküller lösemogenezde onkogenler veya tümör baskılayıcı genler olarak işlev görebildiğinden, aktivitelerini inhibe ederek veya arttırarak kullanılma potansiyeli lösemi tedavisi için yeni stratejiler sunmaktadır (Litwinska ve Machalinski, 2017).

Bu çalışmanın amacı miR-33a-5p ve ANK3 'ün KML'de değişen ekspresyon değişimlerini ve patogenezindeki olası etkilerini açıklamaktır. Artan kanıtlar ile birlikte miR-33a-5p ve ANK3'ün birçok kanser türünde farklı şekilde eksprese edildikleri ve kanserin başlaması/ilerlemesinde önemli bir rol oynadıkları ortaya konulmuştur. Ancak, miR-33a-5p/ANK3 ekseninin KML'deki potansiyel rolü araştırılmamıştır. Bu amaç doğrultusunda mevcut çalışmada, ANK3 mRNA ekspresyon düzeylerinin KML'de normal dokulara kıyasla anlamlı şekilde azaldığının gözlemlendi. Azalmış ANK3 ekspresyonu miR-33a-5p ekspresyon düzeyleriyle negatif korelasyon gösterdi.

İlk olarak miR-33a-5p'in KML patogenezinde yer aldığı ve ekspresyon seviyesi arasındaki ilişki çeşitli biyoinformatik yaklaşımlar kullanılarak belirlendi. miRNA ekspresyon değişimlerinin validasyonu RT-PCR ile gerçekleştirildi. miRNET, miRNA işlevlerini açıklamaya yardımcı olmak için tasarlanmış, web tabanlı bir platformdur. Genler, hastalıklar, küçük moleküller, SNP'ler (miRNA'ları veya bağlanma yerlerini etkileyen), kodlanmayan RNA'lar (lncRNA, sncRNA, circRNA veya pseudogen), epigenetik değiştiriciler ve transkripsiyon faktörleriyle miRNA merkezli ağların kolayca oluşturmasına olanak tanır (Chang ve ark., 2020). KML'de yer alan miRNA'ları belirlemek için miRNET ve miRWALK veri tabanları kullanıldı. 71 (miRNET), 2645 (miRWALK) miRNA tanımlandı ve sonraki çalışmalar için seçilen miR-33a-5p'nin validasyon analizi K-562 ve HaCaT hücrelerinde gerçekleştirildi. miR-33a-5p'nin K-562 hücrelerinde HaCaT hücrelerine göre daha yüksek ekspresyona sahip olduğu gözlemlendi. Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde miR-33a'nın farklı kanserlerde de çeşitli düzenleyici rollere sahip olduğu, tümör supresör veya onkogenik karakter sergilediği belirtilmiştir (Gao ve ark., 2020). Sun ve arkadaşlarının IM dirençli KML hücre hatlarında yaptıkları çalışmada tribbles psödokinaz 2'nin (TRIB2) ERK sinyal yolu aracılığıyla c-Fos'u düzenleyebileceği ve c-Fos'un transkripsiyonel aktiviteyi ve miR-33a-5p ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir. TRIB2'nin KML'de IM direncini tersine çevirmek için miR-33a-5p'yi düzenlediği gösterildi; IM direncinin klinik tedavisi için yeni hedef olabileceği belirtilmiştir (Sun ve ark., 2022).

Kronik Miyelomonositik Lösemide (CMML) yapılan çalışmada Treonin protein kinazın (PIM), bromodomain ve ekstra-terminal protein inhibitörlerinin (BETi) tedavisinden sonra arttığı ve miR-33a down regülasyonunun serin/treonin kinazın (PIM1) artan regülasyonunun altında yatan mekanizma olduğu gösterilmiştir (Letson ve ark., 2023). LINC01003 over ekspresyonunun miR-33a-5p down regüle ettiği böylece MM gelişimini engellediği ve apoptozunu desteklediği belirtilmiştir (Wu ve ark., 2021).

miRNA'ların hastalık yolundaki birden fazla genin ekspresyonunu düzenlediği, bu moleküllerin ve etkiledikleri genlerin terapötik hedefler olabileceği bilinmektedir (Litwinska ve Machalinski, 2017). miR-33a ve hedef genleri, tümör hücrelerinin proliferasyon, metastaz, göç, invazyon, hücre döngüsü, apoptoz, kendini yenileme, kemoterapi direnci ve radyorezistans gibi farklı biyolojik davranışlarını ve prognoz ve sağkalım gibi hasta sonuçlarını etkiler (Gao ve ark., 2020). miR-33a-5p'nin hedef genleri TargetScan, miRDIP veri tabanları kullanılarak belirlendi ve her iki veri tabanındaki ortak genler arasından ANK3 ileri analizler için seçildi. Ayrıca ANK3 KML'deki değişen gen değişimi GSE100026 verilerinden elde edildi. ANK3'ün validasyon analizi K-562 ve HaCaT hücrelerinde RT-qPCR yapıldı. GSE100026 setinden elde edilen verilerde ANK3'ün kat değişim değerinin -4.31 olduğu gözlemlendi. ANK3'ün K-562 hücrelerinde kontrol grubuna göre daha düşük ekspresyona sahip olduğu gözlemlendi. Ayrıca miR-33a-5p ve ANK3 arasındaki korelasyon analizinde ile ters ilişkili olduğu gösterildi. miR-33a-5p'nin kesin rolü ve mekanizmaları KML karsinogenezinde tam olarak gösterilmemiştir. Bu çalışmada, miR-33a-5p/ANK3 eksenini aracılığıyla KML'deki moleküler rolü gösterilmiştir.

Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında ANK proteinleri, hücreler arası bağlantılar, sinyal iletimi, hücre döngüsü düzenlemesi, veziküler taşıma, inflamatuvar yanıtlar ve transkripsiyonel düzenleme gibi bir dizi hücresel süreçte yer alır (Mosavi ve ark., 2004). ANK3'ün farklı tümör dokuları ve normal dokulardaki farklı ekspresyonları analiz edildi ve ANK3'ün kolanjyokarsinom ve prostat adenokarsinomunda önemli ölçüde up regüle edildiği, kolon adenokarsinomu (COAD), baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu, böbrek kromofob, böbrek renal berrak hücreli karsinomu ve mide adenokarsinomu tümör dokularında ise önemli ölçüde down regüle edildiği belirtilmiştir.

İmmünolojik mikroçevre de özellikle COAD, böbrek renal berrak hücreli ve karaciğer hepatosellüler karsinomu olmak üzere ANK3 ekspresyonu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Tan ve ark., 2024). Bir başka çalışmada ANK3'ün böbrek renal berrak hücreli karsinomunda PPAR sinyal yolağı ve lipid metabolizmasında rol oynadığını ortaya koymaktadır (Somsuan ve Aluksanasuwan, 2023). Kurozumi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ANK3'ün AR sinyal yolu ve meme kanseri prognozu ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Kurozumi ve ark., 2019). Bu veriler, ANK3'ün kanserlerinin patogeneğinde potansiyel bir rolü olduğunu öne sürmektedir. Bu bulgular ANK3 ekspresyonunun kanser hücresi yanıtlarını etkilediği ve çeşitli malignitelerde immünoterapi sonuçları için bir biyobelirteç olabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar ANK3'ün kanser gelişiminde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. ANK3'ün anjiyogenez, apoptoz, farklılaşma, hipoksi ve inflamasyon ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Ancak, ANK3'ün KML oluşumundaki potansiyel moleküler mekanizmasını ve KML tedavisi için bir hedef olabileceğini ortaya koymak için daha araştırmaya ihtiyaç vardır.

ANK3 ile ilişkili PPI ağı oluşturuldu ve onun potansiyel moleküler düzenleyici mekanizmaları incelendi. ANK3, CTNNB1, KRAS, CCNF ve TP53 PPI analizinde belirlenen en önemli genler olarak belirlendi. KML üzerine yapılan çalışmalarda CTNNB1 (Tomasello ve ark., 2020), KRAS (Luo ve ark., 2025; Abuzneid ve ark., 2021) ve TP53'nin (Sailaja ve ark., 2012; Weich ve ark., 2016; Peller ve ark., 1998) KML'nin gelişiminde rol oynadıkları belirtilmiştir. Elde edilen veriler araştırmanın bulgularıyla uyumludur.

Tanımlanan genlerin etkilediği yolakları ve süreçleri daha iyi anlamak için GO ve KEGG yolu analizleri yapıldı. Bu genlerin, WNT sinyal yolu, Ras protein sinyal yolu, apoptozis, programlanmış hücre ölümü, MAPK sinyal yolu, kanserdeki proteoglikanlar ve hücre döngüsü vb. ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde MAPK sinyal yolağı (Chakraborty ve ark., 2016), Ras protein sinyal yolağı (Bertacchini ve ark., 2015), WNT sinyal yolağı (Pehlivan ve ark., 2022), hücre döngüsü (Jonuleit ve ark., 1998) ve apoptozisin (Repsold ve ark., 2017) KML'de rol oynadığı bildirilmiştir. Tümör hücreleri ve çevreleri, bağışıklık baskılayıcı faktörleri artıran veya bağışıklık aktivatörlerini azaltan ve dolayısıyla bağışıklık kaçışını kolaylaştıran çok sayıda bağışıklık düzenleyicisi üretir.

Önceki çalışmalar, ANK3'ün kanser hücrelerinde hücre döngüsü, apoptoz ve invazyonu kapsayan çok sayıda biyolojik süreci düzenlediğini göstermiştir (Wang ve ark., 2016; Kurozumi ve ark., 2019). Tan ve arkadaşları, ANK3'ün anti-anjiyojenik özellikler sergilediğini ve makrofajların M1 fenotipine doğru farklılaşmasını ve polarizasyonunu kolaylaştıran sitokinler olan immün agonistlerle pozitif ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (Tan ve ark., 2024). Bu çalışmada yapılan biyoinformatik analizler, ANK3'ün tümör baskılanması için bağışıklık mikroçevresinin yeniden oluşturulmasında yararlı bir etkiye sahip olabileceğini de göstermektedir. Sonuç olarak, ANK3 immünomodülatör gen ekspresyonunu etkileyebilir veya kendisi bir immünomodülatör gen olarak işlev görebilir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, miR-33a-5p'nin KML hücre hattında aşırı eksprese edildiği, ANK3'ün miR-33a-5p'nin doğrudan hedefi olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada miR-33a-5p/ANK3 ekseninin KML gelişimini desteklediği ortaya konulmuştur. Bu sonuçlar miR-33a-5p ve ANK3'ün potansiyel bir terapötik hedef ve prognozu için yeni bir biyobelirteç olarak hizmet edebileceğini düşündürmektedir. Mevcut çalışma, miR-33a-5p/ANK3 ekseninin KML oluşumu ve ilerlemesindeki potansiyel işlevine ilişkin anlayışımızı geliştiriyor olsa da, çalışmamızda bazı sınırlamalar mevcuttur. Bu çalışmadaki analizlerin çoğu miR-33a-5p ve ANK3'ün mRNA seviyelerine dayanarak gerçekleştirildi. Ayrıca çıkarımların çoğu biyoinformatik analizlere dayanarak öne sürülmektedir. Bu nedenle, mevcut çalışmada klinik uygulama ve ileri analizler eksiktir. Bu sonuçları doğrulamak için daha fazla temel ve klinik araştırmaya ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKÇA

1. Abuzneid, Y. S., Alzeerelhouseini, H. I., Marzouqa, N., Yaghi, Y., Al-Ihribat, A. R., Alqam, B., Krama, A. (2021). Atypical CML with TET2 mutation, associated with NRAS and KRAS: A case report and literature review. *Annals of Medicine and Surgery*, 71, 102980.
2. Agirre, X., Jiménez-Velasco, A., San José-Enériz, E., Garate, L., Bandrés, E., Cordeu, L., ... Prosper, F. (2008). Down-regulation of *hsa-miR-10a* in chronic myeloid leukemia CD34+ cells increases USF2-mediated cell growth. *Mol Cancer Res* 6: 1830-1840.
3. Akın, A. C., Bürçe, B., Çevirici, B., Şahin, B., Şahin, E., Şahin, Y. (2014). Disiplinler arası bir bilim dalı: biyoinformatik.<https://paperzz.com/doc/5078763/p12.-disiplinler-aras%C4%B1-birbilim-dal%C4%B1—biyoinformatik>
4. Akidan, O., Petrovic, N., Mısır, S. (2025). mir-188-5p emerges as an oncomir to promote chronic myeloid leukemia via upregulation of BUB3 and SUMO2. *Mol Biol Rep*.52(1):269.
5. Alves, R., Gonçalves, A. C., Rutella, S., Almeida, A. M., De Las Rivas, J., Trougakos, I. P., Sarmiento Ribeiro, A. B. (2021). Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia-From Molecular Mechanisms to Clinical Relevance. *Cancers (Basel)*.13(19):4820.
6. Anderson, T. A., Zhang, B. H., Pan, X. P., Cobb, G. P. (2007). MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*.302(1):1-12.
7. Atalay, R. Ç. (2002). Neden biyoinformatik? *Avrasya Dosyası. Moleküler Biyoloji ve Gen Teknolojileri Özel*.8(3): 129-141.
8. Au, W. Y., Ooi, G. C., Ma, S. K., Wan, T. S., Kwong, Y. L. (2004). Chronic myeloid leukemia in an adolescent with Ollier's disease after intensive X-ray exposure. *Leuk Lymphoma*.45:613–616.
9. Auyeung, V. C., Ulitsky, I., McGeary, S. E., Bartel, D. P. (2013). Beyond secondary structure: Primary-sequence determinants license Pri-miRNA hairpins for processing. *Cell*,152(4), 844–858.
10. Ballester, M., Criado-Mesas, L., Crespo-Piazuelo, D., Passols, M., Castelló, A., Sánchez, A., Folch, J. M. (2021). Expression analysis of porcine miR-33a/b in liver,

adipose tissue and muscle and its potential role in fatty acid metabolism. PLoS One.16(1):e0245858.

11. Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell.116(2):281-97.

12. Bartel, D. P., Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. 12:4:e05005.

13. Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi.

14. Bennett, V., Chen, L (2001). Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites, Current Opinion in Cell Biology, Volume 13, Issue 1, Pages 61-67.

15. Bertacchini, J., Ketabchi, N., Mediani, L., Capitani, S., Marmioli, S., Saki, N. (2015). Inhibition of Ras-mediated signaling pathways in CML stem cells. Cellular Oncology, 38, 407-418.

16. Bhattacharyya, S. N., Filipowicz, W. and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Nat Rev Genet.9(2):102-114.

17. Blackadar, C. B. (2016). Historical review of the causes of cancer. World J Clin Oncol.7(1):54-86.

18. Boucher, L., Chatr-Aryamontri, A., Oughtred, R., Rust, J., Chang, C., Kolas, N. K., ... Stark, C. (2017). The BioGRID interaction database. Nucleic acids research, 45(D1):D369-D379.

19. Branford, S., Hughes, T. P., Kaeda, J., Rudzki, Z., Hochhaus, A., Hensley, M.L., ... Radich, J. P. (2003). Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. N Engl J Med.349:1423-1432.

20. Byrom, M. W., Cheng, A. M., Shelton, J., Ford, L. P. (2005). Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. Nucleic Acids Res.33(4):1290-7.

21. Calin, G. A., Croce, C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer. 6(11): 857-66.

22. Calin, G. A., Garzon, R., Fabbri, M., Cimmino, A., Croce, C. M. (2006). MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med*.12(12):580-7.
23. Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., ... Croce, C. M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Ulusal Bilimler Akademisi Bildiriler Kitabı*.101:2999-3004.*Cancer. Non-coding RNA*;10(5).
24. Cesi, V., Tanno, B., Vitali, R., Sesti, F., Giuffrida, M. L., Mancini, C., ... Raschellà, G. (2005). Silencing of endogenous IGFBP-5 by micro RNA interference affects proliferation, apoptosis and differentiation of neuroblastoma cells. *Cell Death Differ*.12(3):213-23.
25. Chakraborty, C., Sharma, A. R., Patra, B. C., Bhattacharya, M., Sharma, G., Lee, S. S. (2016). MicroRNAs mediated regulation of MAPK signaling pathways in chronic myeloid leukemia. *Oncotarget*.7(27):42683-42697.
26. Chang, K. J., Zollinger, D. R., Susuki, K., Sherman, D. L., Makara, M. A. Brophy, P. J., ... Rasband, M.N. (2014). Glial ankyrins facilitate paranodal axoglial junction assembly. *Nat Neurosci*.17(12):1673–1681.
27. Chang, L., Zhou, G., Soufan, O., Xia, J. (2020). miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology. *Nucleic acids research*, 48(W1), W244-W251.
28. Chang, W., Zhang, L., Xian, Y., Yu, Z. (2017). MicroRNA-33a promotes cell proliferation and inhibits apoptosis by targeting PPAR α in human hepatocellular carcinoma. *Exp Ther Med* 13: 2507–2514.
29. Chang, Y. M. (2023). The Impact of Dysregulated microRNA Biogenesis Machinery and microRNA Sorting on Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 24. 3443. 10.3390/ijms24043443.
30. Chu, E., MD, Sartorelli, A. C. (2014). *Kanser Kemoterapisi*. Zeliha Yazıcı (Çev.).
31. Cong, X. L., Xie, R. T., Zhong, X. M., Luo, P., Yang, H. Q., Lu, G. X., ... Ma, Y. S. (2018). MicroRNA-33a down regulation is associated with tumorigenesis and poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*.15(4):4571-4577.
32. Cortes, J. E., Kim, D. W., Pinilla-Ibarz, J., Le Coutre, P., Paquette, R., Chuah, C., ... Kantarjian, H. (2013). A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* .369:1783-1796.

33. Croce, C. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. 10(10), 704–714.
34. Çetingöz, R., Kentli, S., Uruk, Ö., Demirtaş, E., Eyiler, F., Kınay, M. (2002). Turkish People's Knowledge of Cancer and Attitudes Toward Prevention and Treatment. *Journal of Cancer Education*, 17, 55-58.
35. Dweep, H., Gretz, N. (2015). miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods* 12, 697.
36. Fan, Y., Siklenka, K., Arora, S. K., Ribeiro, P., Kimmins, S., Xia, J. (2016). miRNet - dissecting miRNA-target interactions and functional associations through network-based visual analysis. *Nucleic Acids Res.*44(W1):W135-41.
37. Flamant, S., Ritchie, W., Guilhot, J., Holst, J., Bonnet, M. L., Chomel, J. C., ... Rasko, J. E. J. (2010). Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* .95 (8): 1325– 1333.
38. Gang, T., Zongliang, G., Lili, L., Yongqiang, L., Bin, Y., Jian, W., ... Feng, L. (2022). miR-33a-5p Targets RAP2A to Mediate the Sensitivity of Gastric Cancer Cells to 5-FUDR Disease Markers. Article ID 9701047, 14 pages.
39. Gao, C., Wei, J., Tang, T., Huang, Z. (2020). Role of microRNA-33a in malignant cells (Review). *Oncol Lett.*20(3):2537-2556.
40. Garcia-Gutierrez, J. V., Herrera-Pabalo, L. L. (2011). Impact of second-generation tyrosine kinase inhibitors as second line treatment for patients with chronic myeloid leukemia. *Blood*.118:632.
41. Gong, Z., Zuo, Z., Ma, L., Xue, L., Wang, Q. (2018). Long non-coding RNA CASC15 promotes tongue squamous carcinoma progression through targeting miR-33a-5p. *Environ Sci Pollut Res Int.*25:22205–12.
42. Guan, X., Gu, S., Yuan, M., Zheng, X., Wu, J. (2019). MicroRNA-33a-5p overexpression sensitizes triple-negative breast cancer to doxorubicin by inhibiting eIF5A2 and epithelial-mesenchymal transition. *Oncol Lett.*18(6):5986–94.
43. Guilhot, F., O'Brien, S. G., Larson, R. A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., ... Druker, B. J. (2003). Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic -phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.*348:994-1004.

44. GuoRong, Z., Weihua, Z., Xiaolong, C., Weizhan, L. (2020). miR-33a functions as a tumor suppressor in triple-negative breast cancer by targeting EZH2. *Cancer Cell Int.*20:85.
45. Hammond, S. M. (2015). An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Review*,87, 3–14.
46. Hanahan, D, Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*.144:646-674.
47. Hehlmann, R., Heimpel, H., Hasford, J., Kolb, H. J., Pralle, H., Hossfeld, D. K., ... Georgi, A. (1993). Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: Prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group. *Blood* 82;398-407.
48. HematoLog 2012:2.1 Kronik Miyeloid Lösemi Klinik Bulgular, Tanı, Tedavi (Türk Hematoloji Derneği).
49. Hochhaus, A., Baccarani, M., Silver, R. T., Schiffer, C., Apperley, J. F., Cervantes, F., ... Hehlmann, R. (2020). European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*.34(4):966-984.
50. <https://tke.tuseb.gov.tr> (TÜSEB)
51. Huang, D. W., Sherman, B. T., Tan, Q., Kir, J., Liu, D., Bryant, D., ... Stephens, R. (2007). DAVID Bioinformatics Resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 35, 169–175.
52. Huang, J., Mao, L., Lei, Q., Guo, A. Y. (2024). Bioinformatics tools and resources for cancer and application. *Chinese Medical Journal*.137(17):2052-2064.
53. Huang, Y., Shen, X. J., Zou, Q., Wang, S. P., Tang, S. M., Zhang, G. Z. (2011). Biological functions of microRNAs: a review. *J Physiol Biochem*.67(1):129–139.
54. Huang, Y., Zhang, J., Shao, H., Liu, J., Jin, M., Chen, J., Zhao, H. (2018). miR-33a mediates the anti-tumor effect of lovastatin in osteosarcoma by targeting CYR61. *Cell Physiol Biochem*.51:938–948.
55. Hwang, H. W., Mendell, J. T. (2006). MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer*.94(6):776-80.

56. Jiao, X., Sherman, B. T., Huang, W., Stephens, R., Baseler, M. W., Lane, H. C., Lempicki, R. A. (2012). DAVID-WS: a stateful web service to facilitate gene/protein list analysis. *Bioinformatics*.28(13):1805-6.
57. Jonuleit, T., Peschel, C., Schwab, R., Kuip, H. V. D., Buchdunger, E., Fischer, T., ... Aulitzky, W. E. (1998). Bcr-Abl kinase promotes cell cycle entry of primary myeloid CML cells in the absence of growth factors. *British journal of haematology*, 100(2), 295-303.
58. Kang, Z. J., Liu, Y. F., Xu, L. Z., Long, Z. J., Huang, D., Yang Y, ... Liu, Q. (2016). The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer*.35:48.
59. Kapfhamer, D., Miller, D. E., Lambert, S., Bennett, V., Glover, T. W., Burmeister, M. (1995). Chromosomal localization of the ankyrinG gene (ANK3/Ank3) to human 10q21 and mouse 10. *Genomics*.27(1):189-91.
60. Kara, G., Calin, G. A., Ozpolat, B. (2022). RNAi-based therapeutics and tumor targeted delivery in cancer. *Advanced drug delivery reviews*, 182, 114113.
61. Karag n, S. B. (2012).  ocukluk ve Yetişkin  ağı Akut L semilerinde Mikro-Rna Paneli, Yüksek Lisans Tezi.
62. Karasu, N., Akalin, H., Gokce, N., Yildirim, A. B., Demir, M., Kulak, H., ... Dundar, M. (2021). Detection of mutations in CML patients resistant to tyrosine kinase inhibitor: imatinib mesylate therapy. *Medical Oncology*. 38. 10.1007/s12032-021-01571-1.
63. Keklik, G.,  zcan, B. D. (2022). Multidisipliner Bir Bilim Dalı Olarak Biyoinformatiğe Genel Bir Bakış. *OKU Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 5(2): 1082-1091.
64. Keramati, F., Jafarian, A., Soltani, A., Javandoost, E., Mollaei, M., Fallah, P. (2021). Circulating miRNAs can serve as potential diagnostic biomarkers in chronic myelogenous leukemia patients. *Leukemia Research Reports*.16(1).
65. Kırkızlar, O., Demir, A.M. (2015). Kronik Myeloid Lösemi: Patogenez, Klinik  zellikler, Tanı. *Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics*.5:1-6.
66. Kırkızlar, O., Demir, M.A. (2012). Kronik Miyeloid Losemi: Patogenez, Klinik Ozellikler, Tanı *Turkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics* .5(2):16.
67. Kinhikar, R. A, Pawar, A. B, Mahantshetty, U., Murthy, V., Dheshpande, D. D, Shrivastava, S. K. (2014). Rapid Arc, helical tomotherapy, sliding window intensity

modulated radiotherapy and three dimensional conformal radiation for localized prostate cancer: a dosimetric comparison. *J Cancer Res Ther.*10(3):575-82.

68. Kotagama, K., Chang, Y., Mangone, M. (2015). miRNAs as biomarkers in chronic myelogenous leukemia. *Drug Development Research.*76(6), 278-285.

69. Koturbash, I., Zemp, F.J., Pogribny, I., Kovalchuk, O. (2011). Small molecules with big effects: the role of the microRNAome in cancer and carcinogenesis. *Mutat Res.*722(2):94-105.

70. Koyama, S., Horie, T., Nishino, T., Baba, O., Sowa, N., Miyasaka, Y., ... Ono, K. (2019). Identification of Differential Roles of MicroRNA-33a and -33b During Atherosclerosis Progression With Genetically Modified Mice. *J Am Heart Assoc.*8(13):e012609.

71. Kurozumi, S., Joseph, C., Raafat, S., Sonbul, S., Kariri, Y., Alsaeed, S., ... Rakha, E. A. (2019). Utility of ankyrin 3 as a prognostic marker in androgen-receptor-positive breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 176(1): 63-73.

72. Lambert, S., Kordeli, E., Bennett, V. (1995). AnkyrinG, A new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier. *J Biol Chem.*270(5):2352-9.

73. Lee, H., Han, S., Kwon, C. S., Lee, D. (2016). Biogenesis and regulation of the let-7 miRNAs and their functional implications. *Protein & Cell*,7(2), 100.

74. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. and Ambros, V. (1993). The C-Elegans heterochronic gene Lin-4 encodes small Rnas with antisense complementarity to Lin-14. *Cell.*75(5):843-854.

75. Letson, C. T., Balasis, M. E., Newman, H., Binder, M., Vedder, A., Kinose, F., ... Padron, E. (2023). Targeting BET proteins downregulates miR-33a to promote synergy with PIM inhibitors in CMML. *Clinical Cancer Research*, 29(15), 2919-2932.

76. Li, Y. L., Tang, J. M., Chen, X. Y., Luo, B., Liang, G. H., Qu, Q., Lu, Z. Y. (2020). MicroRNA-153-3p enhances the sensitivity of chronic myeloid leukemia cells to imatinib by inhibiting B-cell lymphoma- 2-mediated autophagy. *Hum Cell.*33:610–8.

77. Li, Y., Wang, H., Tao, K., Xiao, Q., Huang, Z., Zhong, L., ... Feng, W. (2013). miR-29b suppresses CML cell proliferation and induces apoptosis via regulation of BCR/ABL1 protein. *Exp Cell Res.*319(8):1094–101.

78. Litwinska, Z., Machalinski, B. (2017). miRNAs in chronic myeloid leukemia: small molecules, essential function. *Leuk Lymphoma*.58(6):1297-1305.
79. Liu, Y. Y., Jiao, W. Y., Li, T., Bao, Y. Y. (2019). MiRNA-409-5p dysregulation promotes imatinib resistance and disease progression in children with chronic myeloid leukemia. *Eur. Rev. Med. Pharmacol Sci*. Vol.23, Pages: 8468-8475.
80. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402-408.
81. Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., ... Golub, T.R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*.435(7043):834–8.
82. Luo, Z., Lin, C., Yu, C., Yuan, C., Wu, W., Xu, X., ... Xie, C. (2025). Targeted Degradation of SOS1 Exhibits Potent Anticancer Activity and Overcomes Resistance in KRAS-Mutant Tumors and BCR–ABL–Positive Leukemia. *Cancer Research*, 85(1), 101-117.
83. Macfarlane, L., Murphy, P. R. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer, 537–561.
84. McGeary S. E., Lin, K. S., Shi, C. Y., Pham, T. M., Bisaria, N., Kelley, G. M., Bartel, D.P. (2019). The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. *Science* (80-). 366(6472).
85. Meng, Z., Yuan, B., Yang, S., Fu, X., Zhang, B., Xu, K., ... Huang, Y. (2023). Identification of potential biomarkers and candidate therapeutic drugs for clear cell renal cell carcinoma by bioinformatic analysis and reverse network pharmacology. *Medicine (Baltimore)*.102(35).
86. Minciocchi, V. R., Kumar, R., Krause, D. S. (2021), Chronic myeloid leukemia: A model disease of the past, present and future. *Cells*, 10(1), 1-23.
87. Mosavi, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C., Peng, Z. Y. (2004). The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci*.13:1435-48.
88. Navabi, A., Akbari, B., Abdalsamadi, M., Naseri, S. (2022). The role of microRNAs in the development, progression and drug resistance of chronic myeloid leukemia and their potential clinical significance. *Life sciences*, 296, 120437.

89. Nicoloso, M. S., Spizzo, R., Shimizu, M., Rossi, S., Calin, G. A. (2009). MicroRNAs-the micro steering wheel of tumour metastases. *Nat Rev Cancer*. 9(4):293-302.
90. Nie, Z. Y., Liu, X. J., Zhan, Y., Liu, M. H., Zhang, X. Y., Li, Z. Y., ... Yang, L. (2019). miR-140-5p induces cell apoptosis and decreases Warburg effect in chronic myeloid leukemia by targeting SIX1. *Biosci Rep*;39(4).
91. Deininger, M. W., Osman, A. E. F. (2021). Chronic Myeloid Leukemia: Modern therapies, current challenges and future directions. *Blood Rev*.49:100825.
92. Oughtred, R., Rust, J., Chang, C., Stark, C., Leung, G., Dolma, S., ... Tyers, M. (2021). The BioGRID database: A comprehensive biomedical resource of curated protein, genetic, and chemical interactions. *Protein Sci* 30:187 200.
93. Oughtred, R., Stark, C., Breitkreutz, B. J., Rust, J., Boucher, L., Chang, C., ...Tyers, M. (2019). The BioGRID interaction database: 2019 update. *Nucleic Acids Res*.47:D529–D541.
94. Özkan, S. (2007). Psiko-Onkoloji. İstanbul: Form Reklam Hizmetleri.
95. Pan J, Fang S, Tian H, Zhou C, Zhao X, Tian H, ... He, J. (2020). lncRNA JPX/miR-33a-5p/Twist1 axis regulates tumorigenesis and metastasis of lung cancer by activating Wnt/ β -catenin signaling. *Mol Cancer*.19(1):9.
96. Pandey, P., Dweep, H., Sticht, C., Gretz, N. (2011). miRWalk – Database: Prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes, *Journal of Biomedical Informatics*, Volume 44, Issue 5, Pages 839-847, ISSN 1532-0464.
97. Pasic, I., Lipton, J. H. (2017). Current approach to the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Leukemia research*.55:65-78.
98. Pehlivan, M., Çalışkan, C., Yüce, Z., Sercan, H. O. (2022). sFRP1 expression regulates wnt signaling in chronic myeloid leukemia K562 cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 22(7), 1354-1362.
99. Peller, S., Yona, R., Kopilova, Y., Prokocimer, M., Goldfinger, N., Uysal, A., ... Rotter, V. (1998). Molecular alterations in the TP53 gene of peripheral blood cells of patients with chronic myeloid leukemia. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 21(1), 2-7.

100. Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., Artus, C. G., Tabea, Z., Cougot, N., Basyuk, E., ... Filipowicz, W. (2005). Inhibition of Translational Initiation by Let-7 MicroRNA in Human Cells. *Science*. 309:1573-76.
101. Pinnenti, M., Sami, M. A., Hassan, U. (2024). Enabling biomedical technologies for chronic myelogenous leukemia (CML) biomarkers detection. *Biomicrofluidics*.18(1):011501.
102. Quintás-Cardama, A., Cortes, J. E. (2006). Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. In *Mayo Clinic Proceedings* (Vol. 81, No. 7, pp. 973-988).
103. Radujkovic, A., Dietrich, S., Blok, H. J., Nagler, A., Ayuk, F., Finke, J., ... Chalandon, Y. (2019). Allogeneic stem cell transplantation for blast crisis chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitors: a retrospective study by the EBMT chronic malignancies working party. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*.25(10), 2008-2016.
104. Ramírez, C. M., Goedeke, L., Rotllan, N., Yoon, J. H., Cirera-Salinas, D., Mattison, J. A., ... Fernandez-Hernando, C. (2013). MicroRNA 33 regulates glucose metabolism. *Mol Cell Biol*.33(15):2891-902.
105. Rani, J., Mittal, I., Pramanik, A., Singh, N., Dube, N., Sharma, S., ... Ramachandran, S. (2017). T2DiACoD: A Gene Atlas of Type 2 Diabetes Mellitus Associated Complex Disorders. *Sci Rep*. 7(1):6892.
106. Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., ... Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*.403(6772):901-906.
107. Repsold, L., Pool, R., Karodia, M., Tintinger, G., Joubert, A. M. (2017). An overview of the role of platelets in angiogenesis, apoptosis and autophagy in chronic myeloid leukaemia. *Cancer Cell International*, 17, 1-12.
108. Rinaldi, I., Winston, K. (2023). Chronic myeloid leukemia, from pathophysiology to treatment-free remission: a narrative literature review. *Journal of Blood Medicine*, 261-277.
109. Rupaimoole, R., Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature reviews Drug discovery*, 16(3), 203-222.

110. Sailaja, K., Rao, V. R., Yadav, S., Reddy, R. R., Surekha, D., Rao, D. N., ... Vishnupriya, S. (2012). Intronic SNPs of TP53 gene in chronic myeloid leukemia: Impact on drug response. *Journal of natural science, biology, and medicine*, 3(2), 182.
111. Saito, T., Sactrom, P. (2010). MicroRNAs– targeting and target prediction. *N Biotechnol*.27(3):243–9.
112. Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of cellular physiology*, 234(5), 5451-5465.
113. Sant'Antonio, E., Camerini, C., Rizzo, V., Musolino, C., Allegra, A. (2021). Genetic heterogeneity in chronic myeloid leukemia: how clonal hematopoiesis and clonal evolution may influence prognosis, treatment outcome, and risk of cardiovascular events. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 21(9), 573-579.
114. Saydam, F., Değirmenci, İ., Güneş, H. V. (2011). MikroRNA'lar ve kanser. *Dicle Tıp Derg*.38.
115. Sezen, Y. (2023). The effect of chemotherapy-induced oral mucositis on appetite and nutritional status in patients with hematological cancer. *Dokuz Eylul Universitesi (Turkey) ProQuest Dissertations & Theses*, 30822117.
116. Shenouda, S. K., Alahari, S. K. (2009). MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev*.28:369–378.
117. Sherman, B. T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Michael, W., Baseler, H., ... Chang, W. (2022). DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists. *Nucleic Acids Research*, Volume 50, Issue W1, Pages W216–W221.
118. Shi, Y., Yang, F., Wei, S., Xu, G. (2017). Identification of Key Genes Affecting Results of Hyperthermia in Osteosarcoma Based on Integrative ChIP-Seq/TargetScan Analysis. *Med Sci Monit*.23:2042-2048.
119. Shi, Y., Liu, Z., Lin, Q., Luo, Q., Cen, Y., Li, J., ... Gong, C. (2021). MiRNAs and Cancer: Key Link in Diagnosis and Therapy. *Genes (Basel)*.12(8):1289.
120. Shirdel, E. A., Xie, W., Mak, T. W., Jurisica, I. (2011). NAViGaTing the micronome--using multiple microRNA prediction databases to identify signalling pathway-associated microRNAs. *PLoS One*.6(2):e17429.

121. Smith, K. R., Kopeikina, K. J., Gao, R., Myczek, K., Radulavic, J., Swanson, G. T., ... Penzes, P. (2014). Psychiatric risk factor ANK3/ankyrin-G nanodomains regulate the structure and function of glutamatergic synapses. *Neuron*.84(2):399–415.
122. Somsuan, K., Aluksanasuwan, S. (2023). Bioinformatic analyses reveal the prognostic significance and potential role of ankyrin 3 (ANK3) in kidney renal clear cell carcinoma. *Genomics & Informatics*. 21(2): e22.
123. Sun, H., Li, Y., Wang, X., Zhou, X., Rong, S., Liang, D., ... Sun, Y. (2022). TRIB2 regulates the expression of miR-33a-5p through the ERK/c-Fos pathway to affect the imatinib resistance of chronic myeloid leukemia cells. *International Journal of Oncology*, 60(5), 49.
124. Sun, W., Li, Y. S. J., Huang, H. D., Shyy, J. Y. J., Chien, S. (2010). microRNA: A Master Regulator of Cellular Processes for Bioengineering Systems. *Annu Rev Biomed Eng* .12:1-27.
125. Tan, Y., Meng, W., Jiang, Z., Li, N., Zhang, T., Zhang, J., ... Guan, Y. (2024). A comprehensive analysis of the prognostic and immunological role of ANK3 in pan-cancer. *Translational Cancer Research*, 13(2): 1091-1113.
126. Thompson, P. A., Kantarjian, H. M., Cortes, J. E. (2015), Diagnosis and treatment of chronic myeloid leukemia in. *Journal of Clinical Patyways*, 90(10), 1440–54.
127. Tian, Y., Xing, Y., Zhang, Z., Peng, R., Zhang, L., Sun, Y. (2020). Bioinformatics Analysis of Key Genes and circRNA-miRNA-mRNA Regulatory Network in Gastric Cancer. *Biomed. Res. Int.*2862701.
128. Tingting, W., Hatem, A., Samar, A. H., Mohammed, A., Konstantin, S., John, L., ... Tarek, A. (2016). BismarAnkyrin G expression is associated with androgen receptor stability, invasiveness, and lethal outcome in prostate cancer patients *J Mol Med*.94:1411–1422.
129. Toden, S., Zumwalt, T. J., Goel, A. (2021). Non-coding RNAs and potential therapeutic targeting in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1875(1), 188491.
130. Tokar, T., Pastrello, C., Rossos, A. E., Abovsky, M., Hauschild, A. C., Tsay, M., ... Jurisica, I. (2018). mirDIP 4.1-integrative database of human microRNA target predictions. *Nucleic acids research*, 46(D1), D360-D370.

131. Tomasello, L., Vezzalini, M., Boni, C., Bonifacio, M., Scaffidi, L., Yassin, M., ... Sorio, C. (2020). Regulative loop between β -catenin and protein tyrosine receptor type γ in chronic myeloid leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2298.
132. Treiber, T., Treiber, N., Meister, G. (2012). Regulation of microRNA biogenesis and function., (16), 605–610.
133. Tuncer, A. M. (2007). *Kanserin Ülkemiz ve Dünyada Önemi, Hastalık Yüğü ve Kanser Kontrol Politikaları. İçinde Tunçer, A.M. (Ed.), Türkiye’de Kanser Kontrolü. Ankara: T.C Sağlık Bakanlığı Yayınları No: 707.*
134. Turgay, A. S., Sarı, D., Türkistanlı E.Ç. (2004). Knowledge, Attitudes, Risk Factors, and Early Detection of Cancer Relevant to the Schoolteachers in İzmir, Turkey. *Preventive Medicine*, 40, 636-641.
135. Untekin, Y. B. (2014). *İnsan Kronik Myeloblastik Lösemi Hücre Dizisi K-562’de imatinibin Ve Silimarinin Bcr-Abl1, Grb2, Gab2, Akt ve Erk Gen İfadelenmelerine Olan Etkisinin Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi.*
136. Venturini, L., Battmer, K., Castoldi, M., Schultheis, B., Hochhaus, A., Muckenthaler, M. U., ... Scherr, M. (2007). Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. *Blood* 109: 4399-4405.
137. Wang, L. S., Li, L., Li, L., Chu, S., Shiang, K. D., Li, M., ... Bhatia, R. (2015). MicroRNA-486 regulates normal erythropoiesis and enhances growth and modulates drug response in CML progenitors. *Blood*.125(8):1302-13.
138. Wang, T., Abou-Ouf, H., Hegazy, S. A., Alshalalfa, M., Stoletov, K., Lewis, J., ... Bismar, T. A. (2016). Ankyrin G expression is associated with androgen receptor stability, invasiveness, and lethal outcome in prostate cancer patients. *J Mol Med (Berl)*.94(12):1411-1422.
139. Wang, Y., Liang, Z. J., Gale, R. P., Liao, H. Z., Ma, J., Gong, T. J., ... Liang, Y. (2024). Chronic myeloid leukaemia: Biology and therapy. *Blood Reviews*, 65:101196.
140. Weich, N., Ferri, C., Moiraghi, B., Bengió, R., Gier, I., Pavlovsky, C., ... Fundia, A. (2016). TP53 codon 72 polymorphism predicts chronic myeloid leukemia susceptibility and treatment outcome. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 59, 129-133.

141. Wightman, B., Ha, I. and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *Lin-14* by *Lin-4* mediates temporal Pattern-formation in *C. Elegans*. *Cell*.75(5):855-862.
142. Williams, G. M. (2001). Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology*; 14:166 (1-2):3-10.
143. Winter, A. G., Wildenhain, J., Tyers, M. (2011). BioGRID REST Service, BiogridPlugin2 and BioGRID WebGraph: new tools for access to interaction data at BioGRID. *Bioinformatics*, 27(7), 1043-1044.
144. Wu, L., Xia, L., Chen, X., Ruan, M., Li, L., Xia, R. (2021). Long non-coding RNA LINC01003 suppresses the development of multiple myeloma by targeting miR-33a-5p/PIM1 axis. *Leukemia research*, 106, 106565.
145. Yang, R., Walder-Christensen, K. K., Lalani, S., Yan, H., García-Prieto, I. D., Álvarez, S., ... Bennett, V. (2019). Neurodevelopmental mutation of giant ankyrin-G disrupts a core mechanism for axon initial segment assembly. *Proc Natl Acad Sci USA*.116(39):19717-19726.
146. Yeh, C. H., Moles, R., Nicot, C. (2016). Clinical significance of microRNAs in chronic and acute human leukemia. *Molecular cancer*, 15, 1-1.
147. Yokuş, B. ve Çakır, D. Ü. (2012). Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 1 (2), 7-18.
148. Zeng, C., Long, J., Deng, C., Xie, L., Ma, H., Guo, Y., ... Deng, M. (2022). Genetic Alterations in Papillary Thyroid Carcinoma With Hashimoto's Thyroiditis: ANK3, an Indolent Maintainer of Papillary Thyroid Carcinoma. *Front Oncol* .12:894786.
149. Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*.1;302(1):1-12.
150. Zhou, M., Zeng, J., Wang, X., Wang, X., Huang, T., Fu, Y., ... Chen, C. (2015). Histone demethylase RBP2 decreases miR-21 in blast crisis of chronic myeloid leukemia. *Oncotarget*.6(2):1249.