

Kronik Miyeloid Lösemili Hastaların CD34+ Hücrelerinde Gen İfade Profili

Gene Expression Profiling in CD34+ Cells of Patients with Chronic Myeloid Leukemia

© Buket Altınok Güneş¹, © Tülin Özkan²

¹Ankara Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri, Ankara, Türkiye

²Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Öz

Amaç: Kronik miyeloid lösemi (KML), hematopoietik kök hücrelerden kaynaklanan malign, klonal ve proliferatif bir hastalıktır. Bu çalışmanın amacı, KML'nin moleküler mekanizmalarını araştırmak için kronik fazdaki KML hastalarında rol oynayan potansiyel anahtar genleri ve yolları belirlemek için biyoinformatik analiz yapmaktır.

Gereç ve Yöntem: Biyoinformatik analiz için Gen Ekspresyonu Omnibus'u (GEO) veritabanından GSE5550 erişim numarasına sahip 9 KML hasta ve 8 sağlıklı bireyden alınan CD34+ hücrelerinin mRNA mikrodizin verileri indirildi. KML hastalarından alınan örneklerle sağlıklı bireylerden alınan örnekler farklı şekilde ifade edilen genleri (DEG) bulmak için GEO2R ile analiz edildi. DEG'ler için gen ontoloji ve Kyoto gen ve genom ansiklopedisi zenginleştirme analizleri ile protein-protein etkileşimi ağ analizi gerçekleştirildi ve KML ile ilişkili önemli genler belirlendi.

Bulgular: GEO2R ile analiz sonrası $p < 0,01$ ve $\log_2FC < 0$, $\log_2FC > 0$ olan DEG'ler seçildi. GSE5550 veri setinde KML hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre 1894 genin ifadesi artmış, 796 genin ifadesi azalmıştır. Sağlıklı kontrol grubuna göre KML hasta grubunda, farklı ifade edilen genlerin metabolik yollarda, RNA transportu, ribozom, endoplazmik retikulumda protein işlenmesi ve Ubiquitin aracılı proteoliz gibi yollarda zenginleştiği görülmüştür. Buna ilaveten *RPL35*, *RPL39*, *RPS12*, *eEF1A1*, *RPLP1*, *RPL12*, *ODC1*, *PSMD7*, *USP14*, *PSMA1*, *GLI2*, *PSMC6* en önemli aday genler olarak belirlenmiştir.

Sonuç: Çalışmamızın sonucu, ortaya çıkan genlerin ve yolların lösemik kök hücreleri hedef alacak ve ilaç tedavisinde kullanılabilecek birer biyobelirteç adayı olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: KML, biyoinformatik analiz, mikrodizin, gen ifadesi

Abstract

Objectives: Chronic myeloid leukaemia (CML) is a malignant, clonal and proliferative disease originating from haematopoietic stem cells. The aim of this study is to use bioinformatic analysis to identify potential key genes and pathways involved in CML patients in the chronic phase to investigate the molecular mechanisms of CML.

Materials and Methods: For bioinformatic analysis, mRNA microarray data of CD34+ cells from 9 CML patients and 8 healthy individuals with accession number GSE5550 were downloaded from the Gene Expression Omnibus (GEO) database. Samples from CML patients and healthy individuals were analysed with GEO2R to find differentially expressed genes (DEGs). Gene ontology and Kyoto gene and genome encyclopedia enrichment analyses and protein-protein interaction network analysis were performed for DEGs and important CML related genes were identified.

Results: After analysis with GEO2R, DEGs with $p < 0.01$ and $\log_2FC < 0$, $\log_2FC > 0$ were selected. In the GSE5550 data set, the expression of 1894 genes increased and 796 genes decreased in CML patients compared to the healthy control group. It was observed that DEGs were enriched in pathways such as metabolic pathways, RNA transport, ribosome, protein processing in endoplasmic reticulum and Ubiquitin-mediated proteolysis in the CML patient group in comparison to the healthy controls. In addition, *RPL35*, *RPL39*, *RPS12*, *eEF1A1*, *RPLP1*, *RPL12*, *ODC1*, *PSMD7*, *USP14*, *PSMA1*, *GLI2*, *PSMC6* were identified as the most important candidate genes.

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Buket Altınok Güneş, Ankara Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri, Ankara, Türkiye

Tel.: +90 312 357 32 42 E-posta: baltinok@ankara.edu.tr ORCID ID: orcid.org/0000-0002-8852-6626

Geliş Tarihi/Received: 17.11.2023 Kabul Tarihi/Accepted: 09.03.2024



Conclusion: The results of our study showed that the genes and pathways identified in our study may be biomarker candidates that can be used in drug treatment to target leukaemic stem cells.

Key Words: CML, bioinformatic analysis, microarray, gene expression

Giriş

Kronik miyeloid lösemi (KML), kromozom 9 ve 22 (t(9;22)(q34;q11)) arasında karşılıklı translokasyon ile karakterize olan hematopoietik kök hücrenin (HKH) malign bir hastalığıdır. Tirozin kinaz aktivitesine sahip bir proteini kodlayan ve HKH'lerin lösemik kök hücrelere (LKH) dönüşümünde anahtar rol oynayan BCR-ABL füzyon onkogeni, bu translokasyon sonucunda oluşur (1-3). KML üç fazlı bir hastalıktır. KML tanısı alan hastaların çoğu, kemik iliğinde ve kanda <math><10\%</math> miyeloblast bulunan kronik fazdadır (CP). Tedavi edilmeyen KML-CP, kemik iliğinde ve periferik kanda >math>>20\%</math> miyeloblast ile akut miyeloid ve lenfoid lösemiye benzeyen blastik faza (BP) dönüşür. Hızlandırılmış faz olarak adlandırılan ara faz (AP), %10 ila %20 oranında miyeloblast ile tanımlanır (4,5).

Imatinib gibi etkili tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKİ) geliştirilmesi, KML'nin hedefe yönelik tedavisinde bir dönüm noktası olmuştur (6). Bununla birlikte, son yıllarda yapılan çalışmalar yaşam boyu TKİ alan hastaların yaklaşık %50-60'ında LKH'lerin varlığını sürdürdüğünü göstermektedir, bu durum TKİ direncinin ve KML hastalığının nüksetmesinin birincil nedenidir (1-3,7-9). Bu sebeple, özellikle LKH'leri hedef alacak bir anahtar molekülün veya yolun belirlenmesi, etkili KML tedavisi için kritik bir öneme sahiptir.

Son yıllarda moleküler dinamik simülasyon gibi bilgisayar tabanlı teknolojilerin hızlı gelişimi, hastalığın yeni moleküler mekanizmalarını yavaş yavaş ortaya çıkarmıştır. Gen Ekspresyonu Omnibus'u (GEO), Açıklama, Görselleştirme ve Entegre Keşif Veritabanı (DAVID) gibi Web tabanlı sistemler, veri madenciliği yöntemleri (cancergenome.nih.gov/) ve bilgisayar tabanlı analiz tekniklerinin kombinasyonu sayesinde oldukça spesifik ve hassas bir dizi belirteç rapor edilmiştir (10,11). Gen çipleri, bir geni tespit etme teknolojisi olarak yaygın bir şekilde uygulanmaktadır ve ilgili datalar, herkese açık veritabanlarında saklanmaktadır. Bu genomik dataları entegre etmek ve yeniden analiz etmek, hastalıkla ilişkili yararlı biyobelirteçleri tanımlamak için olanaklar sunmaktadır (12).

Bu çalışmada, "GSE5550" orijinal gen mikrodizin veri seti National Center for Biotechnology Information (NCBI)-GEO veritabanından indirildi. Bu veri setine ait KML hasta ve kontrol örneklerinden elde edilen CD34+ hücreleri R yazılımına ve Bioconductor'a dayalı karşılaştırılarak, bu örneklerde farklı şekilde ifade edilen genleri (DEG) tanımlamak için biyoinformatik analiz gerçekleştirilmiştir. DEG'lerin fonksiyonel zenginleştirme analizini belirlemek için DAVID yazılım programı ile birlikte gen

ontoloji (GO) analizi, Kyoto gen ve genom ansiklopedisi (KEGG) yolak analizi ve protein-protein etkileşimi (PPI) ağ analizi yapıldı. Bu çalışmada, tanımlanan biyobelirteçlerin ve yolakların, KML'nin potansiyel moleküler mekanizmalarını ortaya çıkarması beklenmektedir. Sonuç olarak, özellikle LKH'leri hedef alacak yeni anahtar hedeflerin belirlenmesi etkili KML tedavisi için kritik öneme sahiptir.

Gereç ve Yöntem

Mikrodizin Verileri

Kronik fazdaki KML hastalarına ve sağlıklı bireylere ait transkriptom veri setleri GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) veritabanından taranmıştır. GSE5550 erişim numarasına sahip gen ifade profillerine ait mikrodizin veri seti, halka açık bir fonksiyonel genomik veri deposu olan NCBI-GEO veritabanından indirilmiştir. GSE5550 erişim numaralı çalışma [HG-Focus] Affymetrix Human HG-Focus Target Array platformunda gerçekleştirilmiş olup 9 KML hasta ve 8 sağlıklı kontrol örneği içermektedir.

DEG'lerin Tanımlanması

Diferansiyel ifade analizi için, KML hastalarının ve sağlıklı bireylerin CD34+ hücreleri arasında DEG, çevrimiçi analiz aracı GEO2R kullanılarak tespit edildi. GEO2R, GEO verilerini analiz edebilen R tabanlı bir web uygulamasıdır ve kullanıcıların farklı grupları karşılaştırarak "DEG" elde etmelerini sağlayan bir araçtır (13). Önceden işlenmiş mikrodizin verilerinde log2 kat değişimi (log2FC) hesaplandı. p-değerleri ve ayarlanmış p-değerleri, t-testleri kullanılarak hesaplandı. $p < 0,01$ ve $|\log_2FC| > 0$, önemli ölçüde DEG taraması için kriter olarak kabul edildi. Kat değişimine bağlı olarak, genler yukarı regüle edilmiş genler ($\log_2FC > 0$) ve aşağı regüle edilmiş genler ($\log_2FC < 0$) olmak üzere iki sınıfa ayrıldı.

GO ve KEGG Yolak Analizi

Çalışmamızda DEG'lerin fonksiyonel ve yol zenginleştirme analizleri için DAVID 6.8 (david.abcc.ncifcrf.gov/) yazılımı kullanıldı. DAVID (14), GO analizi ve Kyoto Genler ve Genler Ansiklopedisi (KEGG) yolu analizi için uygulandı. DAVID, en geniş kapsamlı halka açık biyoinformatik kaynaklarını içeren ve kullanıcıların biyolojik bilgi edinmeleri için genlerle ilgili biyolojik yapılar sağlayan çevrimiçi bir analiz aracıdır. GO analizi, protein fonksiyonlarını tahmin etmek için kullanılan biyolojik süreç (BP), hücresel bileşen (CC) ve moleküler fonksiyon (MF) olmak üzere 3 kategoride sınıflandırıldı (15). KEGG yolak analizi ise, halihazırda

bilinen protein fonksiyonlarını ve biyolojik sistemleri entegre edebilen bir veritabanı kaynağıdır (16). Fonksiyon zenginleştirme analizlerinde $p < 0.05$ olan terimler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

PPI Ağ Analizi ve Hub Genlerin Tanımlanması

PPI ağ analizi, bilinen ve tahmin edilen PPI'lerinin çevrimiçi bir veritabanı olan STRING (<https://string-db.org/>) (17) kullanılarak diferansiyel genler için gerçekleştirildi. Hedef protein ağları oluşturmak ve ağ analiz etmek için String veritabanı ve Cytoscape v3.6.0 yazılımı kullanıldı. Eşik değeri olarak $>0,9$ 'luk bir etkileşim skoru belirlendi. Cytoscape, genlerin ve proteinlerin moleküler etkileşim ağlarını görselleştirmek için açık kaynaklı bir biyoinformatik araçtır (18). Komşu düğümlerle en fazla etkileşime sahip düğümler, hub düğümleri olarak kabul edildi. Cytoscape'teki Moleküler Kompleks Algılama (MCODE) uygulaması, anahtar PPI ağ modüllerini tanımlamak ve gen ağ kümeleme analizini gerçekleştirmek için kullanıldı (19). MCODE skoru >4 ve düğüm sayısı >5 , varsayılan parametrelerle kesme kriteri olarak belirlendi (derece kesme=2, düğüm puanı kesme=0,2, K-çekirdek=2 ve maksimum derinlik=100). Daha yüksek bağlantı derecesine sahip düğümler, tüm ağın stabilitesini korumak için daha önemlidir; genellikle bağlantı derecesi ≥ 10 olan düğümler, çekirdek aday genler (hub genler) olarak kabul edildi. Anahtar modüllerin tanımlanması için anlamlılık eşiği olarak $p < 0,05$ ayarlandı. Belirlenen proteinler, protein etkileşim ağında en fazla etkileşime sahip hub genlerdir.

Bulgular

DEG'lerin Tanımlanması

Herkese açık mikrodizin veri seti GSE5550 indirildi ve KML-sağlıklı örnekleri arasında farklı şekilde ifade edilen genleri tanımlamak için analiz edildi. GSE5550 veri setine ait transkriptom analizi sonucunda, p -değeri $< 0,01$ ve $\log_2FC > 0$ veya < 0 olan DEG'ler seçildi. Bu veri setinde KML hasta grubunda, sağlıklı kontrol grubuna göre 2690 genin ifadesinin değiştiği bulunmuştur (1894 artan-796 azalan).

DEG'lerin GO ve KEGG Yolak Analizi

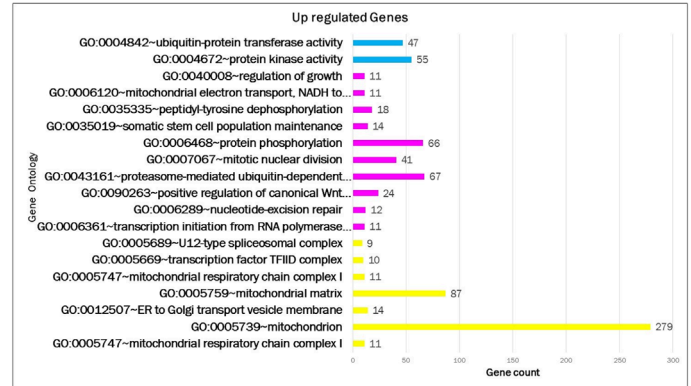
Çalışmamızda sağlıklı kontrol grubuna göre KML hasta grubunda, farklı ifade edilen genlerin fonksiyonel ve yol zenginleştirme analizleri için DAVID yazılımı kullanılarak GO ve KEGG analizleri yapıldı. GO analizi ile ifadesi artan DEG'lerin esas olarak "RNA splicing, DNA repair, ER to Golgi vesicle-mediated transport, mitochondrion, mitotic nuclear division and canonical Wnt signaling pathway" gibi BP ve CC gruplarında çeşitli açılardan fazla miktarda zenginleştiği görülmüştür ($p < 0,05$) (Enrichment Score > 1.3) (Şekil 1). İfadesi azalan DEG'lerin ise önemli farklılıklara sahip GO analizi "innate immune response, rRNA processing, proteolysis, plasma membrane, integral

component of membrane and extracellular region" gibi BP ve CC gruplarında yer aldıkları tespit edilmiştir. $p < 0,05$ ile zenginleştirilmiş GO terimleri Şekil 1'de verilmiştir (Şekil 2).

KEGG yolak analizlerinde ifadesi azalan genlerin "Sitokin-sitokin reseptör interaksyonu, ribozom, hücre adezyon molekülleri (CAMs), kanserde transkripsiyonel yanlı düzenleme, hematopoetik hücre soyu başta olmak üzere anlamlı olarak zenginleştiği", ifadesi artan genlerin ise "Metabolik yollar, antibiyotiklerin biyosentezi, RNA transportu, endoplazmik retikulumda protein işlenmesi, Ubikitin aracılı proteoliz" yollarında zenginleştiği görülmüştür (Tablo 1).

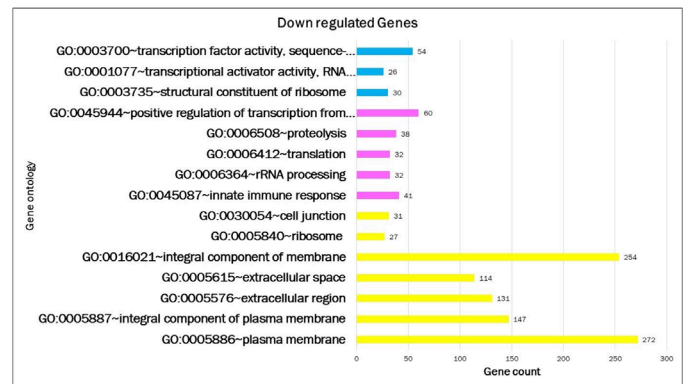
Entegre PPI Ağı

KML hastalarında, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla azalan ve artan genlerin PPI ağ yapısı STRING veritabanı kullanılarak analiz edildi. STRING analizi sonucu bilgilere dayanarak, ifadesi azalan genlerde gen etkileşim ağı 30 düğüm ve 433 kenar içermektedir (Şekil 3A). İfadesi artan genlerin gen etkileşim ağı 28 düğüm ve 346 kenar içermektedir ($p < 0,05$) (Şekil 3B). Düğümler DEG'leri ve kenarlar DEG'ler arasındaki etkileşimleri göstermektedir. Bu genleri analiz etmek için Cytoscape



Şekil 1: İfadesi artan genlerin GO analizi

*Sarı: CC, Pembe: BP, Mavi: MF



Şekil 2: İfadesi azalan genlerin GO analizi

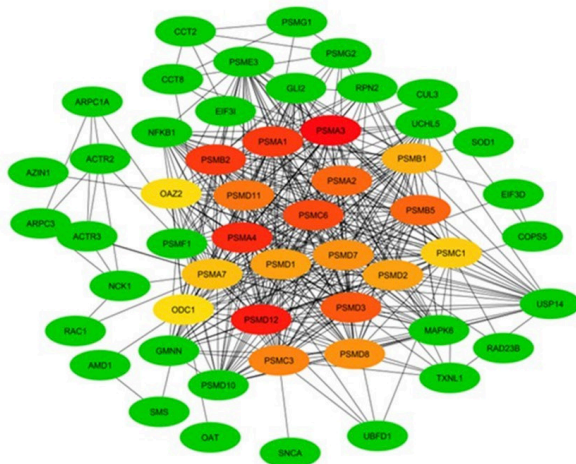
*Sarı: CC, Pembe: BP, Mavi: MF

GO: Gen ontoloji

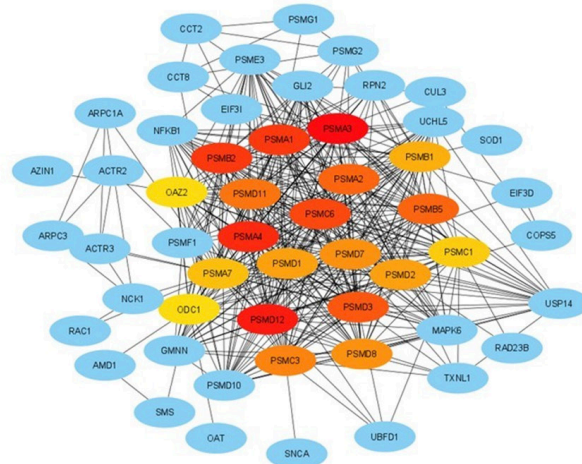
yazılımındaki NetworkAnalyzer kullanıldı ve çekirdek (hub) genler, tahmin edilen puanlara/skorlara göre sıralandı. İfadesi azalan hub genler arasında *RPL35*, *RPL39*, *RPS12*, *EEF1A1*, *RPLP1*, *RPL12*, *RPS4X*, *RPL7*, *RPL9*, *RPS5*, KML hastalarında en yüksek düğüm derecesine sahipti. En yüksek ifade düzeyine sahip 10 hub gen ise şunlardı: *ODC1*, *PSMD7*, *USP14*, *PSMA1*, *GLI2*, *PSMC6*, *UCHL5*, *PSMC3*, *PSMB2*, *GMNN*. Şekil 3A ve B'de proteinlerin birbirleri ile bağlantıları gösterilmiştir. Kırmızıdan sarıya skor azalmaktadır. Daha sonra, gen etkileşim ağının modüllerini taramak için Cytoscape yazılımında, yüksek derecede birbirine bağlı bölgeleri tespit etmeye yarayan MCODE analizi ile hub genler seçildi. Şekil 4'te MCODE skoru (score>4) en yüksek olan 2 modül ve Tablo 2'de bu modüllere ait öne çıkan hub genler gösterildi.

Tablo 1: Diferansiyel olarak ifade edilen genlerin KEGG veritabanını kullanan ilk 10 yoluğu		
Kategori	Yolaklar	Gen sayısı
	İfadesi artan genler	
KEGG	hsa01100:Metabolik yolaklar	259
KEGG	hsa01130:Antibiyotiklerin biyosentezi	75
KEGG	hsa03013:RNA transportu	53
KEGG	hsa04141:Endoplazmik retikulumda protein işlenmesi	38
KEGG	hsa04120:Ubikitin aracılı proteoliz	36
	İfadesi azalan genler	
KEGG	hsa04060:Sitokin-sitokin reseptör interaksiyonu	31
KEGG	hsa03010:Ribozom	30
KEGG	hsa04514:Hücre adezyon molekülleri (CAMs)	23
KEGG	hsa05202:Kanserde transkripsiyonel yanlı düzenleme	21
KEGG	hsa04640:Hematopoetik hücre soyu	15

A.



B.



Şekil 3: Ayrıntılı protein etkileşimlerini gösteren düzenleyici genlerin PPI ağı. A. İfadesi azalan genler B. İfadesi artan genler

PPI: Protein-protein etkileşimi

Tartışma

KML aktif tirozin kinaz BCR-ABL'nin ifadenmesi sonucu ortaya çıkan HKH kaynaklı bir hematolojik malignitedir. TKI'ler remisyonu indüklemeye çok etkilidir, ancak LKH'lerin hedeflenen tedavisinde terapötik etkilere ulaşmada başarısız olmaktadır (20). Bu nedenle, LKH'ler için aday hedeflerin bulunması, KML'nin ortadan kaldırılması açısından birincil öneme sahiptir. Mikrodizinler gibi biyoinformatik teknolojilerinin hızla gelişmesiyle birlikte hastalık mekanizmalarına yönelik araştırmalar ileri düzeylere ulaştı. Bu nedenle bu çalışmada, gen mikrodizin ifade profili verileri, KML'de LKH'lerdeki önemli aday DEG'leri yeni terapötik hedefler ve biyobelirteçler olarak tanımlamak ve bunların dahil olduğu sinyal yollarını açığa çıkarmak için kullanıldı.

Bu çalışmada, KML ile sağlıklı kontrol CD34+ hücreleri arasındaki DEG'leri taramak için mRNA mikrodizin veri setini analiz ettik. DEG'ler arasındaki etkileşimleri keşfetmek için GO ve KEGG zenginleştirme analizleri yapıldı. Biyoinformatik analiz kullanarak, GSE5550 veri ifade profillerinden 1894 yukarı regüle edilmiş ve 796 aşağı regüle edilmiş diferansiyel olarak ifade edilmiş DEG elde ettik. Çalışmamızda DEG'lerin özellikle metabolik yolaklar, RNA transportu, ribozom, endoplazmik retikulumda protein işlenmesi ve Ubikitin aracılı proteoliz gibi yolaklarda zenginleştiği gözlemlendi. Önceki yapılan çalışmalar metabolik yolların, ribozomun ve Ubikitin aracılı proteolizin KML'de önemli rol oynadığını bildirmiştir (21-25). Literatüre ait tüm çalışmalar bizim sonuçlarımızla tutarlıdır.

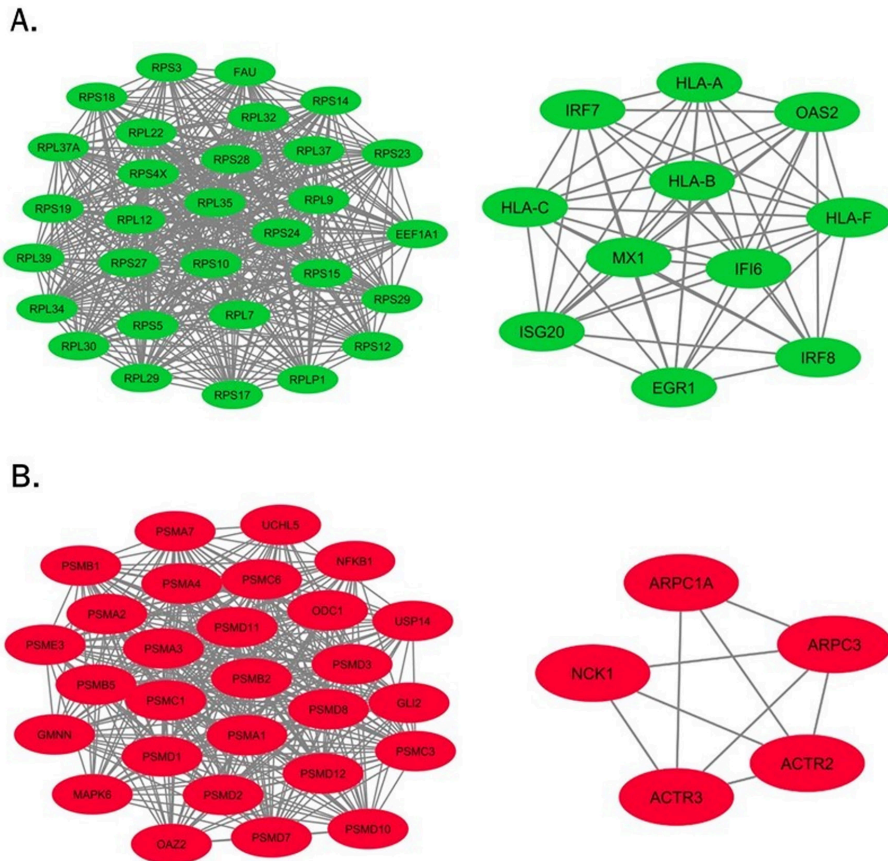
En önemli modülü elde etmek için Cytoscape'i kullandık ve dereceleri ≥ 10 olan 12 DEG'yi hub genler olarak seçtik. Ribozomal, proteazomal, ubikitin ve transkripsiyon faktörü ile ilgili genlerin (*RPL35*, *RPL39*, *RPS12*, *eEF1A1*, *RPLP1*, *RPL12*, *ODC1*, *PSMD7*, *USP14*, *PSMA1*, *GLI2*, *PSMC6*) bu çalışmada en önemli ölçüde modüle edilen genler olduğunu gösterdik.

Ribozomun yapısal parçalarını oluşturan ribozomal proteinler (RP), ribozom yapımı ve işlevi için gerekli olup, giderek artan sayıda veriler, rRNA sentezindeki değişiklik, mitokondriyal ya da sitozolik bazı RP'lerin düzensizleşmesi ve insan kanserlerinin gelişimi arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir (26). Bizim sonuçlarımızda, KML hastalarında ifadesi azalan genlerin ribozomal yolda toplandığını göstermiştir. Alsamman ve ark. (27) yaptıkları çalışmada KML'de potansiyel hedef gen olarak RP ailesi üyelerinden *RPL9*, *RPL34*, *RPL36A* ve *RPL39* genlerini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada bulunan özellikle *RPL39* geni meme ve pankreas kanserlerinde de tümör oluşumundan sorumlu olduğu düşünülen bir gen olup, bizim çalışmamızda da KML hastalarında aday genler arasında çıkmıştır. Buna ek olarak *RPL35*, *RPS12*, *RPLP1* ve *RPL12* ribozomal genlerinin ise çalışmamızda ilk defa önemli olduğu ve KML gelişiminden sorumlu olabilecekları gösterilmiştir.

eEF1A1, insan tümörlerinin farklı formlarında yer alan bir proteindir. eEF1A1, protein sentezinin uzama adımında yer alır. İki majör izoformu vardır ve her iki eEF1A1 izoformu da, esas olarak fonksiyonlarının düzensizliği nedeniyle solid ve hematolojik insan tümörlerinde rol oynamaktadır. Literatürde, kronik lenfoblastik lösemi hastalarından oluşan çalışma

grubunda, *eEF1A1* ve *eEF1A2* gen ifade düzeylerinin kontrole kıyasla arttığı bildirilmiştir (28). Bunun aksine, Lin ve ark. (29) yaptıkları çalışmada meme kanserli dokularda eEF1A1 ifadesinin düşük olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da, Lin ve ark. (29) yaptıkları çalışma ile uyumlu olarak, *eEF1A1* gen ifadesinin azaldığı KML hastalarında ilk defa bulunmuştur. Tümörler proliferatif ve bu nedenle çoğu hücrenin G0/G1 fazında olan normal dokulara kıyasla hücre döngüsünün S/G2/M fazlarındaki hücrelerde zenginleşmiştir. Bu durum, G1 fazına özgü eEF1A1 mRNA ifadesinin KML hastalarında az ifadenmesinin ana nedeni olarak görünmektedir (29).

ODC1, l-ornitini poliaminlere metabolize ederek hücre farklılaşması, proliferasyonu ve göçünde rol oynadığı bildirilen poliaminlerin metabolizmasında yer alan hız sınırlayıcı bir enzim olarak görev yapar ve birçok kanserde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (30,31). Dahası, anormal poliamin metabolizmasının PTEN-PI3K-mTOR kompleks1, Wnt- β -katenin sinyali ve RAS yolları gibi sinyal yollarının düzenlenmesi yoluyla kanser insidansı ile ilişkili olduğu yaygın olarak literatürde bildirilmiştir. İnsan hepatoselüler karsinoma hücrelerini kullanarak Ye ve ark. (31) yaptıkları çalışmada, ODC1 inhibisyonunun AKT/GSK3 β / β -katenin yolunun aktivitesini



Şekil 4. Protein etkileşim ağı kurulumu ve tanımlanan hub genlerin modül analizi

*Yeşil: Aşağı regüle genler, Kırmızı: Yukarı regüle genler

Tablo 2: Kontrol grubuna kıyasla KML hasta grubunda MCODE skoru >4 olan protein-protein etkileşim ağındaki önemli modüller

İfadesi azalan genler				
Modül	Skor	Düğüm	Kenar	Hub genler
1	29.862	30	433	RPL35, RPL39, RPS12, EEF1A1, RPLP1, RPL12, RPS4X, RPL7, RPL9, RPS5, RPS14, RPL30, RPS18, RPL32, RPS15, RPS19, RPS24, RPL37A, RPS10, RPL34, RPS27, RPS17, RPS28, FAU, RPL29, RPL22, RPS29, RPS23, RPS3, RPL27
2	10.8	11	54	HLA-A, HLA-C, IRF8, EGR1, MX1, IRF7, IFI6, HLA-F, ISG20, HLA-B, OAS2
3	5.333	16	40	BCL6, GNAS, FPR1, CCR3, CD72, HCK, CCL11, CD79B, ADRB2, EPHA1, EPHA4, EFNB1, LCK, BLK, BCR, BLNK
İfadesi artan genler				
Modül	Skor	Düğüm	Kenar	Hub genler
1	25.63	28	346	ODC1, PSMD7, USP14, PSMA1, GLI2, PSMC6, UCHL5, PSMC3, PSMB2, GMNN, PSMB5, NFKB1, PSMA7, PSMD1, PSME3, PSMD3, PSMB1, PSMA3, PSMD11, OAZ2, PSMC1, PSMA2, MAPK6, PSMD10, PSMD8, PSMA4, PSMD12, PSMD2
2	4.5	5	9	ACTR2, ACTR3, ARPC3, ARPC1A, NCK1

KML: Kronik miyeloid lösemi, MCODE: Moleküler kompleks tespiti

bloke ettiğini saptayarak, *ODC1* geninin bu kanser hücrelerinde β -katenin ile birlikte eksprese edildiğini de bulmuşlardır. Literatüre ait çeşitli kanser türlerinde yapılan çalışmalar ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda da *ODC1* geninin ifadesi ilk defa KML hastalarında artmış olarak bulunmuştur.

Hüresel proteinlerin çoğu, çeşitli BP'lerde yer alan ubiquitin-proteazom (UPS) sistemi aracılığıyla parçalanır (32). Ubikitinasyon, çeşitli hüresel süreçlerde kritik rol oynayan bir post-translasyonel modifikasyondur (33). 26S proteazom, 20S çekirdek kompleksi ve 19S düzenleyici kompleksten oluşan çok alt birimli büyük ve önemli bir protein kompleksidir ve bu kompleks poliubikitin zincirleri ile işaretlenmiş substratların parçalanması sürecinde önemli bir rol oynar (34). Birçok çalışma 26S proteazomun apoptoz, hücre döngüsü süreci, transkripsiyon, antijen sunumu, protein kalite kontrolü, DNA onarımı ve protein katlanmasında rol oynadığını göstermiştir (35,36). Proteazom fonksiyonunun inhibe edilmesi antikanser tedavisi için önemli bir strateji haline gelmiştir, çünkü 26S proteazom hücre BP'lerinde, özellikle tümör hücresi büyümesi ve hayatta kalmasında kritik rol oynamaktadır (37). Çalışmamızda öne çıkan genlerden PSMD7, 26S proteazomun çekirdek bileşeni olup, meme kanserinde yüksek oranda ifade edildiği ve kötü sağkalım ile pozitif olarak ilişkilendirildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (38). PSMD7'nin inhibisyonunun özofagus skuamöz hücreli karsinomda tümörü inhibe ettiği ve apoptozu indüklediği yine literatürde yapılan çalışmalar arasındadır (39). Diğer bir proteazom alt birimi olan alfa tip 1 (PSMA1), oldukça düzenli halka şeklinde 20S çekirdek yapısına sahip çok katalitik bir proteinaz kompleksidir (40) ve çeşitli insan kanserlerinde onkogen olarak görev yaptığı bilinmektedir. Yang ve ark. (40), kolon kanseri hastalarının kanser dokularından ve eşleştirilmiş normal dokularından elde ettikleri proteinleri kullanarak yaptıkları çalışmada, çalışmamızda tespit ettiğimiz önemli genlerden biri diğeri olan PSMA1'in kanser dokularında

önemli ölçüde düzenlendiğini ve bunun kolon kanseri taraması ve erken tanı için bir belirteç olabileceğini bulmuşlardır. Diğer çalışmaların sonuçlarına göre ise metastatik mide kanseri serumunda PSMA1'in aşırı ifade edildiği gösterilmiştir (41,42).

Proteozom inhibisyonu, akciğer kanseri de dahil olmak üzere çeşitli maligniteler için umut verici bir tedavi stratejisi olarak kabul edilmektedir. Proteazomun bir diğer alt birimi olan çalışmamızda öne çıkan hub genler arasında bulunan PSMC6 proteini ile yapılan son çalışmalarda, PSMC6'nın aşırı ifadenmesinin PI3K/AKT sinyal yolunu inhibe ederek hücre döngüsü ilerlemesini ve hücre proliferasyonunu bozabileceği gösterilmiştir. PSMD10, PSMD6, PSMD9, PSMD13, PSMB3, PSMB1, PSMA4, PSMC1, PSMC2, PSMD7 ve PSMD14 gibi proteozom alt birimlerinin PSMC6 ile doğrudan etkileşime girerek, PSMC6'nın ifade düzeyleri ile yüksek oranda korele olduğu gözlenmiştir (43). Wnt sinyalinin aktivitesi, AXIN kompleksinin proteozom yoluyla bozulmasıyla artırılmıştır, bu da PSMC6 aşırı ifadesinin AXIN proteinini bozarak Wnt sinyalini aktive edebileceğini ve böylece tümör ilerlemesini teşvik edebileceğini göstermektedir (43). Bizde bu çalışmada literatür ile uyumlu olarak 26S proteazomal alt birimlerden *PSMD7*, *PSMA1*, *PSMC6* genlerinin daha önce lösemide hiç çalışılmamış olduğunu ve bu genlerin ifade düzeylerinin kontrol gruba kıyasla ilk defa KML hastalarında arttığını tespit ettik.

Tümör hücreleri anormal metabolizma ile karakterize olduğundan, esas olarak hücre içi protein döngüsünde işlev gören UPS oldukça aktiftir. Çalışmamızda öne çıkan ve literatürle uyumlu olarak KML hastalarında ifadesi artan genlerden biri de, USP14'tür. Ubikitinlenmiş bir protein, proteazom tarafından parçalanmadan önce, ilk olarak 19S kısmına alınmalı ve burada poliubikitin zinciri USP14, UCHL5 ve POH1 dahil olmak üzere 19S proteazomal deubikitinazlar tarafından çıkarılmalıdır. İlk 20S proteazom inhibitörü olan bortezomib, multipl miyelom tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır. b-AP15, USP14 ve

UCHL5 dahil olmak üzere proteazomal deubikitinazların bir inhibitörüdür. b-AP15, özofagus skuamöz hücreli karsinomu, nöroblastom ve multipl miyelom dahil olmak üzere hem solid hem de nonsolid tümörlerde önemli bir antineoplastik etki göstermektedir. Bununla birlikte, proteazomal deubikitinaz inhibitörünün KML üzerindeki etkileri henüz rapor edilmemiştir (44). Jiang ve ark. (44) yaptıkları çalışmada, USP14 ve UCHL5'in KML hastalarında yüksek oranda ifade edilmesinin, KML tedavisi için yeni bir hedef olabileceğini göstermişlerdir. Bu bulgular, TKİ-dirençli KML tedavisi için önemli birer terapötik hedef olarak USP14 ve UCHL5'in kullanılabilmesini öngörmektedir.

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, hematolojik malignitelerin yanı sıra bir dizi solid tümörde Hedgehog (Hh) sinyalinin anormal aktivasyonunun rolünü ortaya koymuştur. Hh proteinleri (ligandlar) reseptör patched'e bağlanarak smoothed (SMO) tarafından inhibisyonun salınmasına ve ardından çekirdeğe translokasyon yapan ve hedef genlerini aktive eden transkripsiyon faktörleri GLI-1 ve GLI-2'nin aktivasyonuna neden olur. SMO aktivasyonunu takiben Hh yolağı sinyalinin ana efektörleri olan GLI transkripsiyon faktörleri, GLI1 ve GLI2, apoptoz inhibitörlerini ve anjiyogenez indükleyicilerini kodlayan genlerin yukarı regülasyonu yoluyla onkogenezi teşvik eder (45). Radich ve ark. (46) yaptıkları çalışmada, *GLI2* geninin KML hastalarında aşırı ifadelenecek bir düzensizliğe neden olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmaya benzer şekilde bizim çalışmamızda da KML hastalarında *GLI2* geninin sağlıklı bireylere kıyasla daha fazla ifade edildiği gösterildi.

Buradan yola çıkılarak, bulunan aday genlerin bir kombinasyonu kullanılarak KML tedavisinde kullanılabilir. Örneğin, çalışmalar TKİ'lerin, ubiquitin proteazom inhibitörleri ile kombinasyonunun KML'de dirence karşı TKİ'leri yeniden duyarlı hale getirmede etkili olabileceğini göstermiştir (47).

Sonuç

Günümüzde TKİ kullanımının hastaları tedavi etmesinin yanı sıra hastaların ilaca direnç geliştirmesi gibi çok büyük bir dezavantajı da vardır. Bu nedenle, ilaç direncinden sorumlu olabilecek biyobelirteçlerin düzgün bir şekilde anlaşılması çok büyük önem arz etmektedir. Çalışmamızda yapılan analizlerin, KML'nin moleküler mekanizmalarının anlaşılması ve LKH'leri hedef alabilecek aday terapötik ajanların tanımlanması gibi önemli etkileri olabilir. Bu nedenle ilk kez bu çalışmada öne çıkan *RPL35*, *RPS12*, *RPLP1*, *RPL12*, *eEF1A1*, *ODC1*, *PSMD7*, *PSMA1* ve *PSMC6* genlerinin tedaviye direnç gösteren KML hastalarının tedavisinde birer potansiyel tanısal belirteç ve terapötik hedef olarak hizmet edebileceği öngörülebilir.

Etik

Etik Kurul Onayı: Etik kurul onayı tüm veriler anonim olduğundan bu çalışma için geçerli ve gerekli değildir.

Hasta Onayı: Hasta onayı tüm veriler anonim olduğundan bu çalışma için geçerli ve gerekli değildir.

Yazarlık Katkıları

Konsept: B.A.G., T.O., **Dizayn:** B.A.G., **Veri Toplama veya İşleme:** B.A.G., T.O., **Analiz veya Yorumlama:** B.A.G., T.O., **Literatür Arama:** B.A.G., **Yazan:** B.A.G.

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Finansal Destek: Yazarlar bu yazının araştırma ve yazarlık sürecinde herhangi bir finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

Kaynaklar

- Cokic VP, Mojsilovic S, Jaukovic A, et al. Gene expression profile of circulating CD34(+) cells and granulocytes in chronic myeloid leukemia. *Blood Cells Mol Dis.* 2015;55:373-381.
- Diaz-Blanco E, Bruns I, Neumann F, et al. Molecular signature of CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells of patients with CML in chronic phase. *Leukemia.* 2007;21:494-504.
- Soverini S, De Santis S, Monaldi C, et al. Targeting Leukemic Stem Cells in Chronic Myeloid Leukemia: Is It Worth the Effort? *Int J Mol Sci.* 2021;22:7093.
- FApperley J. Part II: Management of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncology.* 2007;8:1116-1128.
- Keramatnia A, Ahadi A, Akbari ME, et al. Genomic Profiling of Chronic Myelogenous Leukemia: Basic and Clinical Approach. *Journal of Cancer Prevention.* 2017;22:74-81.
- O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine.* 2003;348:994-1004.
- Chomel JC, Bonnet ML, Sorel N, et al. Leukemic stem cell persistence in chronic myeloid leukemia patients with sustained undetectable molecular residual disease. *Blood.* 2011;118:3657-3660.
- Chu S, McDonald T, Lin A, et al. Persistence of leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia patients in prolonged remission with imatinib treatment. *Blood.* 2011;118:5565-5572.
- Holyoake T, Jiang XY, Eaves C, et al. Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1999;94:2056-2064.
- Gao CD, Zhou C, Zhuang J, et al. Identification of key candidate genes and miRNA-mRNA target pairs in chronic lymphocytic leukemia by integrated bioinformatics analysis. *Molecular Medicine Reports.* 2019;19:362-374.
- Zhang H, Wang PR, Song T, et al. Screening and identification of key genes in imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells: a bioinformatics study. *Hematology.* 2021;26:408-414.
- Yan HM, Zheng GF, Qu JW, et al. Identification of key candidate genes and pathways in multiple myeloma by integrated bioinformatics analysis. *Journal of Cellular Physiology.* 2019;234:23785-23797.
- Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets-update. *Nucleic Acids Research.* 2013;41:D991-D995.
- Huang DW, Sherman BT, Tan Q, et al. The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. *Genome Biology.* 2007;8:R183.
- Eden E, Navon R, Steinfeld I, et al. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics.* 2009;10:48.
- Klukas C, Schreiber F. Dynamic exploration and editing of KEGG pathway diagrams. *Bioinformatics.* 2007;23:344-350.

17. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Research*. 2013;41:D808-D815.
18. Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*. 2003;13:2498-2504.
19. Bandettini WP, Kellman P, Mancini C, et al. MultiContrast Delayed Enhancement (MCOE) improves detection of subendocardial myocardial infarction by late gadolinium enhancement cardiovascular magnetic resonance: a clinical validation study. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2012 Nov;14:83.
20. Cheloni G, Tanturli M, Tusa I, et al. Targeting chronic myeloid leukemia stem cells with the hypoxia-inducible factor inhibitor acriflavine. *Blood*. 2017;130:655-665.
21. Delvecchio VS, Fierro C, Giovannini S, et al. Emerging roles of the HECT-type E3 ubiquitin ligases in hematological malignancies. *Discov Oncol*. 2021;12:39.
22. Bhingarkar A, Vangapandu HV, Rathod S, et al. Amino Acid Metabolic Vulnerabilities in Acute and Chronic Myeloid Leukemias. *Front Oncol*. 2021;11:694526.
23. Karlikova R, Siroka J, Friedecky D, et al. Metabolite Profiling of the Plasma and Leukocytes of Chronic Myeloid Leukemia Patients. *J Proteome Res*. 2016;15:3158-3166.
24. Caocci G, Deidda M, Noto A, et al. Metabolomic Analysis of Patients with Chronic Myeloid Leukemia and Cardiovascular Adverse Events after Treatment with Tyrosine Kinase Inhibitors. *J Clin Med*. 2020;9:1180.
25. Elhamamsy AR, Metge BJ, Alsheikh HA, et al. Ribosome Biogenesis: A Central Player in Cancer Metastasis and Therapeutic Resistance. *Cancer Res*. 2022;82:2344-2353.
26. Pecoraro A, Pagano M, Russo G, et al. Ribosome Biogenesis and Cancer: Overview on Ribosomal Proteins. *Int J Mol Sci*. 2021;22:5496.
27. Alsamman K, Alamri AM, Vatte C, et al. Potential Candidate Genes for Therapeutic Targeting in Chronic Myeloid Leukemia: A Pilot Study. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2023;24:3077-3085.
28. Dapas B, Pozzato G, Zorzet S, et al. Effects of eEF1A1 targeting by aptamer/siRNA in chronic lymphocytic leukaemia cells. *Int J Pharm*. 2020;574:118895.
29. Lin CY, Beattie A, Baradaran B, et al. Contradictory mRNA and protein misexpression of EEF1A1 in ductal breast carcinoma due to cell cycle regulation and cellular stress. *Sci Rep*. 2018;8:13904.
30. Jiang F, Gao Y, Dong C, et al. ODC1 inhibits the inflammatory response and ROS-induced apoptosis in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;504:734-741.
31. Ye Z, Zeng Z, Shen Y, et al. ODC1 promotes proliferation and mobility via the AKT/GSK3beta/beta-catenin pathway and modulation of acidotic microenvironment in human hepatocellular carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2019;12:4081-4092.
32. Pathare GR, Nagy I, Sledz P, et al. Crystal structure of the proteasomal deubiquitylation module Rpn8-Rpn11. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:2984-2989.
33. Ryan K, Bauer DL. Finishing touches: post-translational modification of protein factors involved in mammalian pre-mRNA 3' end formation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40:2384-2396.
34. Shah SA, Potter MW, McDade TP, et al. 26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer. *J Cell Biochem*. 2001;82:110-122.
35. Ito S. Proteasome Inhibitors for the Treatment of Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)*. 2020;12:265.
36. Hungria VTM, Crusoe EQ, Bittencourt RI, et al. New proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2019;41:76-83.
37. Mahmoudian M, Valizadeh H, Lobenberg R, et al. Bortezomib-loaded lipidic-nano drug delivery systems; formulation, therapeutic efficacy, and pharmacokinetics. *J Microencapsul*. 2021;38:192-202.
38. Teng X, Yang T, Yuan B, et al. Prognostic analysis of patients with breast cancer based on tumor mutational burden and DNA damage repair genes. *Front Oncol*. 2023;13:1177133.
39. Shi K, Zhang JZ, Zhao RL, et al. PSM7 downregulation induces apoptosis and suppresses tumorigenesis of esophageal squamous cell carcinoma via the mTOR/p70S6K pathway. *FEBS Open Bio*. 2018;8:533-543.
40. Yang Q, Lu Y, Shangguan J, et al. PSMA1 mediates tumor progression and poor prognosis of gastric carcinoma by deubiquitinating and stabilizing TAZ. *Cell Death Dis*. 2022;13:989.
41. He YJ, Li WL, Liu BH, et al. Identification of differential proteins in colorectal cancer cells treated with caffeic acid phenethyl ester. *World J Gastroenterol*. 2014;20:11840-11849.
42. Ding XQ, Wang ZY, Xia D, et al. Proteomic Profiling of Serum Exosomes From Patients With Metastatic Gastric Cancer. *Front Oncol*. 2020;10:1113.
43. Zhang JY, Shi KZ, Liao XY, et al. The Silence of PSMC6 Inhibits Cell Growth and Metastasis in Lung Adenocarcinoma. *Biomed Res Int*. 2021;2021:9922185.
44. Jiang L, He Q, Chen X, et al. Inhibition of proteasomal deubiquitinases USP14 and UCHL5 overcomes tyrosine kinase inhibitor resistance in chronic myeloid leukaemia. *Clin Transl Med*. 2022;12:e1038.
45. Sadarangani A, Pineda G, Lennon KM, et al. GLI2 inhibition abrogates human leukemia stem cell dormancy. *J Transl Med*. 2015;13:98.
46. Radich JP, Dai H, Mao M, et al. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:2794-2799.
47. Crawford LJ, Chan ET, Aujay M, et al. Synergistic effects of proteasome inhibitor carfilzomib in combination with tyrosine kinase inhibitors in imatinib-sensitive and -resistant chronic myeloid leukemia models. *Oncogenesis*. 2014;3:e90.