

Karaciğer Hastalıklarında DNA Diziliminin
Biyoenformatik Hesaplamalarla İrdelenmesi

Saliha Acar

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bilgisayar Mühendisliği Anabilim Dalı

Ocak 2019

Analyzing DNA Sequence in Liver Diseases
by Using Bioinformatic Computations

Saliha Acar

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Computer Engineering

January 2019

Karaciğer Hastalıklarında DNA Diziliminin
Biyoenformatik Hesaplamalarla İrdelenmesi

Saliha Acar

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Bilgisayar Mühendisliği Ana Bilim Dalı
Bilgisayar Yazılımı Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Eyyüp Gülbandılar

Ocak 2019

ONAY

Bilgisayar Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Saliha Acar'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Karaciğer Hastalıklarında DNA Diziliminin Biyoenformatik Hesaplamalarla İrdelenmesi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Eyyüp Gülbandılar

İkinci Danışman : --

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Doç.Dr. Eyyüp GÜLBANDILAR

Üye : Doç.Dr. Ahmet YAZICI

Üye : Dr.Öđr. Üyesi Gıyasettin ÖZCAN

Üye : -

Üye : -

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet Erřahan
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç.Dr. Eyyüp Gülbandılar danışmanlığında hazırlamış olduğum “Karaciğer Hastalıklarında DNA Diziliminin Biyoenformatik Hesaplamalarla İrdelenmesi” başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 09.01.2019

Saliha Acar
İmza

ÖZET

Ülkemizde en çok siroz zemininde oluşan karaciğer kanseri, dünyada en sık rastlanan ilk 5 kanser türü arasında ve aynı zamanda ölüme sebep olan kanserler içinde 3. sıradadır. Toplumda yaygın olarak görülmesinin yanı sıra en sık karşılaşılan türü olan Hepatosellüler Karsinoma (HCC) hastalarının organ nakli dışında hayatta kalma olasılıklarının çok düşük olması HCC hastalığının ortaya çıkması ve ilerlemesinde rol oynayan moleküler yapıların ve protein etkileşimlerinin belirlenmesi ve analizi için yapılan araştırmaların önemini arttırmıştır.

Bu çalışmada, 10 HCC hastası ve 10 sağlıklı bireyin karaciğer doku örneklerinden elde edilen mikrodizi verileri ile 17 HCC hastası ve 20 sirozlu karaciğere sahip bireyden alınan toplam 37 doku örneğinden elde edilen mikrodizi verileri kullanılarak gen ifade değişimlerinin tespiti için Differentially Expressed Genes (DEGs) Analizi, ifadesi sağlıklı birey genlerine göre artmış ve azalmış genlerin hücresel bileşen, moleküler işlev ve biyolojik süreç bağlamında sınıflandırılması için Gene Ontology (GO) Analizi ve anahtar genlerin birbirleriyle olan etkileşimlerinin tayini için de Protein-Protein Interaction (PPI) Network Analizi yapılmıştır.

Yapılan biyoenformatik analizler sonucunda önemli karaciğer hastalıklarının oluşumu ve gelişiminde anahtar rol oynadığı tespit edilen 12 genin ifade seviyelerinde sağlıklı birey genlerine göre anlamlı değişim olduğu görülmüştür. Bu durum; hücre bölünmesi, proteoliz, nükleer bölünme, DNA hasar yanıtı ve lipid metabolizması regülasyonu gibi süreçlerde görevli olan bu genlerin kodladığı proteinlerin işlevlerini yerine getirmelerinin zorlaştığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Mikrodizi, biyoenformatik, gen ifade analizi, gen ontoloji analizi, HCC, karaciğer kanseri.

SUMMARY

Liver cancer that appeared on cirrhosis level in our country, is among the top five most common cancer types in the world and also it is the third in the cancers causing death. In addition to being widely seen in society, because of its the most common type Hepatocellular Carcinoma (HCC) patients have very low survival probabilities except for organ transplant, importance of researches conducted to determination and analysis of molecular structures and protein interactions involved in the initiation and progression of HCC, has increased.

In this study; differentially expressed genes were analyzed to determine rates of the gene expressions, using microarray data obtained from 10 HCC patients' with 10 normal individuals' liver tissue samples and 17 HCC patients' with 20 cirrhosis patients' liver tissue samples. Then, Gene Ontology (GO) Analysis was performed to classify the genes those' expressions have increased or have decreased compared to normal individual's genes in context of cellular component, biological process and molecular function. Protein-protein interaction (PPI) network analysis was executed to determine interactions between the key genes.

As a result of bioinformatics analysis done, meaningful changes at the level of expressions of the 12 genes which detected to play a key role in the initiation and progression of significant liver diseases. This situation shows that it is becoming more difficult to fulfill the functions of the proteins encoded by these genes involved in processes such as cell division, proteolysis, nuclear division, DNA damage response and lipid metabolism regulation.

Keywords: Microarray, bioinformatics, gene expression analysis, gene ontology analysis, HCC, liver cancer.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanması ve yşrştşlmesinde yardımlarını esirgemeyen danıőmanım Doç. Dr. Eyyřp GŐLBANDILAR' a ve yşksek lisans eğitimim sşresince yanımda olarak manevi desteklerini esirgemeyen aileme teőekkřrlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	vi
SUMMARY	viii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiiiiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1. Karaciğer ve Kesin Tedavisi Olmayan Karaciğer Hastalıkları	3
2.1.1. Karaciğer	3
2.1.2. Siroz	4
2.1.3. Primer malign (birincil kötü huylu) karaciğer tümörleri	6
2.2. Biyoformatik	9
2.3. Gen İfadesi	11
2.4. Mikrodizi Nedir?	12
2.5. DNA Çipleri ve Dizilemenin Tarihçesi	13
2.6. Mikrodizi Deneyleri ve Mikrodizi Veri Analizleri	14
2.6.1. Mikrodizi veri analizinde kullanılan yazılım ve araçlar	16
2.6.2. Mikrodizi veri analizi adımları	18
2.6.3. İleri karaciğer hastalıklarında (siroz, HCC vb.) DNA mikrodizi analizi	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM	26
3.1. Materyal	26
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Differentially Expressed Genes (DEGs) analizi öncesi işlem adımları	30
3.2.2. Differentially Expressed Genes (DEGs) analizi	31
3.2.3. Gene Ontology (GO) zenginleşim analizi	32
3.2.4. Protein-Protein Interaction (PPI) ağ analizi	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	34
4.1. Mikrodizi Çiplerine Ait Kalite Değerlendirme Sonuçları	34
4.2. Normalizasyon Öncesi ve Sonrası İfade Değerleri	35

İÇİNDEKİLER (devam)

	Sayfa
4.3. Differentially Expressed Genes (DEGs) Analizi Sonuçları	36
4.3.1. İlk veri seti (GSE29721) için yapılan DEGs analizi sonuçları	37
4.3.2. İkinci veri seti (GSE17548) için yapılan DEGs analizi sonuçları	40
4.3.3. Her iki veri seti için yapılan DEGs analizleri sonucunda ifadesi en çok değişmiş genlerin kesişim kümesi.....	42
4.4. Gene Ontology (GO) Analizi Sonuçları	43
4.4.1. İlk veri seti (GSE29721) için yapılan GO analizi sonuçları.....	44
4.4.2. İkinci veri seti (GSE17548) için yapılan GO analizi sonuçları	45
4.4.3. Kullanılan iki veri seti için yapılan GO analizi sonuçları	47
4.5. Protein - Protein Interaction (PPI) Analizi Sonuçları	56
4.5.1. GSE29721 nolu veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok değişen genlerin protein – protein etkileşim analizi sonuçları	57
4.5.2. GSE17548 nolu veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok değişen genlerin protein – protein etkileşim analizi sonuçları	59
4.5.3. Kullanılan iki veri seti için yapılan, ifadesi en çok değişen ortak genlerin protein – protein etkileşim analizi sonuçları	61
4.6. Cytoscape Yazılımı ile Görselleştirilen PPI Analizi Bulguları	63
4.7. Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi.....	65
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	74
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Karaciğerin vücuttaki yeri	3
2.2. Karaciğerin işlevleri	4
2.3. Siroz patofizyolojisi	5
2.4. HCC’de risk faktörleri ve hepatokarsinogenezis süreçleri.....	8
2.5. Hepatoma Patogenezi	9
2.6. Hepatoma Patogenezi	9
2.7. Biyoformatik ve ilişkili bilim dalları	10
2.8. Biyoformatiğin alt çalışma alanları	11
2.9. Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Mikrodizi Örneği	13
2.10. Mikrodizi deneylerinin yapısı a) RNA b) Protein	15
2.11. Mikrodizi analizleri süreç şeması.....	15
3.1. Mikrodizi analizi işlem adımları	29
4.1. GSE29721 numaralı Mikrodizi çiplerine ait a) RLE ve b) NUSE kutu grafikleri	34
4.2. GSE17548 numaralı Mikrodizi çiplerine ait a) RLE ve b) NUSE kutu grafikleri	35
4.3. GSE29721 numaralı veri setinin a) normalizasyon öncesi ve b) normalizasyon sonrası log-dönüştürülmüş ifade değerlerini gösteren kutu grafikleri	36
4.4. GSE17548 numaralı veri setinin a) normalizasyon öncesi ve b) normalizasyon sonrası log-dönüştürülmüş ifade değerlerini gösteren kutu grafikleri.....	36
4.5. En önemli 125 GO yolağının birbirleriyle ilişkisini gösteren şema	44
4.6. En önemli 106 GO yolağının birbirleriyle ilişkisini gösteren şema	46
4.7. GSE29721 nolu veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok değişen ve tanınan 61 genin protein – protein etkileşim haritası	57
4.8. GSE29721 nolu veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok artan 20 genin protein – protein etkileşim haritası.....	58
4.9. GSE29721 nolu veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok azalan 41 genin protein – protein etkileşim haritası	59
4.10. GSE17548 nolu veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok değişen ve tanınan 22 genin protein – protein etkileşim haritası	60
4.11. GSE17548 nolu veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok artan 7 genin protein – protein etkileşim haritası.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.12. Kullanılan iki veri seti için ifadesi en çok artan 23 genin protein – protein etkileşim haritası	61
4.13. Kullanılan iki veri seti için ifadesi en çok azalan 47 genin protein – protein etkileşim haritası	62
4.14. Kullanılan iki veri seti için ifadesi en çok değişen ortak 11 genin protein – protein etkileşim haritası.	63
4.15. Her iki veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok arttığı tespit edilen genlerin etkileşim görseli.....	64
4.16. Her iki veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok azaldığı tespit edilen genlerin etkileşim görseli.....	64
4.17. Her iki veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok arttığı tespit edilen ortak genlerin etkileşim görseli.....	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Siroz nedenleri	5
2.2. Epitelyal ve mezenkimal primer malign karaciğer tümörleri	7
3.1. GSE29721 erişim numaralı veri seti içeriğinin bir bölümü.....	27
3.2. GSE17548 erişim numaralı veri seti içeriğinin bir bölümü.....	27
4.1. GSE29721 nolu veri setinde ifadesi 3 kattan fazla artmış gen listesi.....	37
4.2. GSE29721 nolu veri setinde ifadesi 3 kattan fazla azalmış gen listesi.....	38
4.3. GSE17548 nolu veri setinde ifadesi 2 kattan fazla artmış gen listesi.....	41
4.4. GSE17548 nolu veri setinde ifadesi 2 kattan fazla azalmış gen listesi.....	41
4.5. Çalışılan iki veri seti (GSE29721 ve GSE17548) için yapılan analiz sonuçlarının kesişim kümesi.....	43
4.6. GSE29721 nolu veri seti için yapılan GO analizi sonucunda bulunan en önemli 10 yolak.....	45
4.7. GSE17548 nolu veri seti için yapılan GO analizi sonucunda bulunan en önemli 7 yolak.....	47
4.8. İfadesi en çok artan toplam 23 genin biyolojik süreç zenginleşim analizi sonuçları.....	48
4.9. İfadesi en çok artan toplam 23 genin hücrenel bileşen zenginleşim analizi sonuçları.....	51
4.10. İfadesi en çok azalan toplam 47 genin biyolojik süreç zenginleşim analizi sonuçları.....	52
4.11. İfadesi en çok azalan toplam 47 genin hücrenel bileşen zenginleşim analizi sonuçları.....	55
4.12. İfadesi en çok azalan toplam 47 genin moleküler fonksiyon zenginleşim analizi sonuçları.....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ANLN	Anillin Actin Binding Protein
APOF	Apolipoprotein F
ASPM	Abnormal Spindle Microtubule Assembly
CLEC4G	C-type Lectin Domain Family 4 Member G
CLTRN	Collectrin Amino Acid Transport Regulator
CXCL14	C-X-C Motif Chemokine Ligand 14
DEGs	Differentially Expressed Genes
DNA	Deoksiribonükleik asit
FCN3	Ficolin 3
GO	Gene Ontology (Gen Ontolojisi)
HBV	Hepatitis B Virus (Hepatit B Virüsü)
HCC	Hepatocellular Carcinoma (Hepatosellüler karsinoma)
HCV	Hepatitis C Virus (Hepatit C Virüsü)
LINC01093	Long Intergenic Non-protein Coding RNA 1093
lncRNA	Long Non-coding Ribonükleik Asit
logFC	Log-Fold Change (Logaritmik Kat Değişimi)
mRNA	Mesajcı Ribonükleik asit
NAFLD	Alkolik Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
NUSE	Normalized Unscaled Standart Errors

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
OIT3	Oncoprotein Induced Transcript 3
PPI	Protein-Protein Interaction (Protein - Protein Etkileşimi)
RLE	Relative Log Expression
RMA	Robust Multi-Array Average
RNA	Ribonükleik asit
SPINK1	Serine peptidase inhibitor Kazal type 1
THRSP	Thyroid Hormone Responsive
TOP2A	Topoisomerase (DNA) II Alpha

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son 10 yıl içerisinde özellikle kanser gibi, oluşumunda ve gelişiminde genetik faktörlerin rol oynadığı tahmin edilen hastalıkların moleküler mekanizmasının araştırılmasında mikrodizi veri analizi yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Mikrodizi teknolojisi, mRNA (messenger -mesajcı- RNA) üzerindeki binlerce genin ifade değişim seviyelerinin eş zamanlı olarak tespit edilmesine olanak sağlamaktadır (Hayran, 2014).

Birçok mikrodizi çalışması farklı fenotipler ile ilişkili genleri tespit etmek amacıyla tasarlanmaktadır. Mikrodizi deneylerini yorumlanabilir hale getirmek için bir dizi algoritma ve istatistiksel yaklaşımın uygulandığı biyoenformatik analizler yapılması gerekmektedir (Atış, 2014). Bu analizler sonucunda; gen ifade seviyelerinin (genellikle hasta ve sağlıklı olmak üzere) iki grup arasında karşılaştırılması ve değişim oranlarının bilgisayar yazılımları yardımıyla elde edilmesi, farklı seviyelerde ifade edilmiş genlerin hücresel bileşen, moleküler işlev ve biyolojik süreç bağlamında sınıflandırılması, genlerin ürünleri olan proteinlerin birbirleriyle olan fizyolojik, biyolojik ve fonksiyonel ilişkilerinin belirlenmesi gibi biyolojik göstergeler ve sonuçlar elde edilebilmektedir.

Bu çalışmada; 10 HCC hastası ve 10 sağlıklı karaciğere sahip bireyden alınan toplam 20 doku örneğinden oluşan ve 17 HCC hastası ve 20 sirozlu karaciğere sahip bireyden alınan toplam 37 doku örneğinden oluşan iki veri seti kullanılarak mikrodizi veri analizi yapılmıştır.

İlk olarak, her iki mikrodizi verisi için ayrı ayrı gen ifade profilleri çıkarılmış ve sağlıklı hücrelerdeki genlerle kıyaslandığında ifadeleri artan ve azalan genler tespit edilmiştir. Bu genler arasında ifade değişim oranları en fazla olan genler, yine her iki veri seti için ayrıca belirlenmiş ve bunlar arasındaki ortak genler ortaya konmuştur. Buraya kadar olan kısım veri analizinin ilk adımı olup, analiz sonrakı adımları için temel teşkil etmektedir ve bu çalışmanın temel amacını oluşturmaktadır.

İkinci olarak; ilk adımda ifadeleri sağlıklı hücrelerdeki genlere kıyasla anlamlı değişime uğrayan genler girdi olmak üzere, fizyolojik biyolojik ve fonksiyonel sınıflandırma analizi yapılmıştır. Bu analiz de her iki veri seti için ayrı ayrı ve bir bütün halinde yapılmış olup analiz sonrasında önemli biyolojik yollar tespit edilmiştir.

Son olarak da önemli işlevlerin yerine getirilmesinde anahtar rol oynayan genlerin ürünü olan proteinlerin birbirleriyle olan fizyolojik ve fonksiyonel etkileşimlerini tespit etmek üzere protein – protein etkileşim analizleri yapılmıştır.

Ortaya çıkan protein etkileşim ağlarının görselleştirilmesi amacıyla kullanılan Cytoscape yazılımı ile önemli protein ilişkileri netleştirilmiştir. Böylece ilerlemiş karaciğer hastalıklarında moleküler düzeyde meydana gelen değişim faktörlerinin ve birbirleriyle olan ilişkilerinin daha iyi anlaşılması hedeflenmiştir.

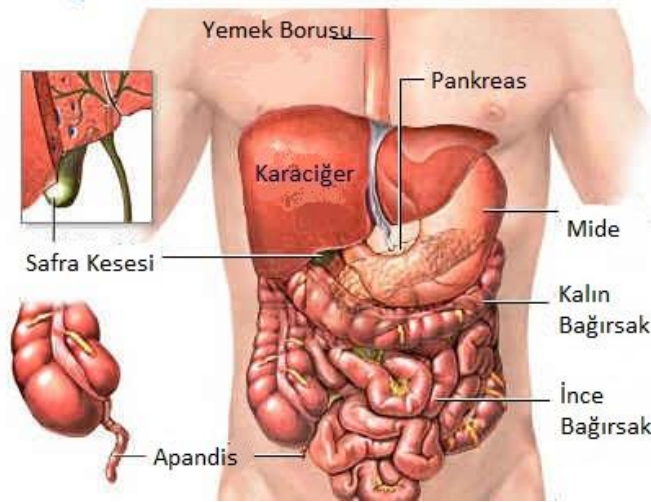
Tüm bu analiz sürecinde belirlenen önemli genlerin tespiti, karaciğer hastalığının ortaya çıkışı ve ilerlemesine paralel seyreden genetik değişimlerin ve tedavi aşamasında kontrol altına alınması gereken biyolojik süreçlerin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Karaciğer ve Kesin Tedavisi Olmayan Karaciğer Hastalıkları

2.1.1. Karaciğer

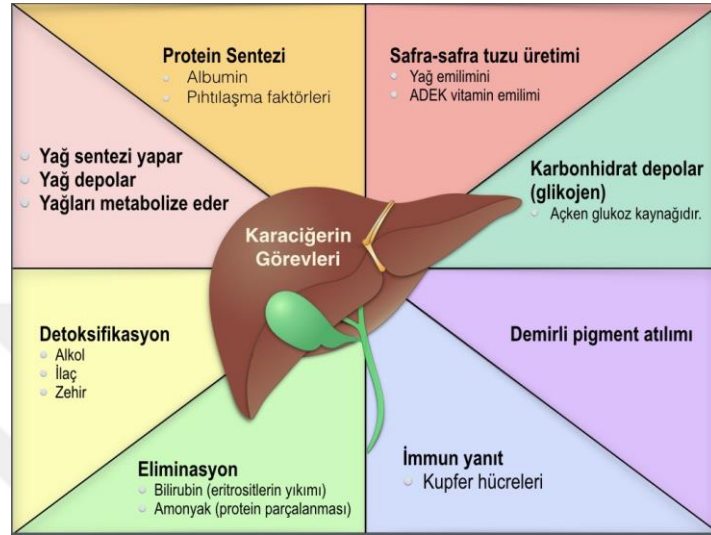
Karaciğer, karın boşluğunun sağ üst kısmında yer alan; 1200-1500 gr ağırlığı ile vücuttaki en büyük organdır (Şekil 2.1). Oldukça yumuşak ve esnek bir yapıya sahip olan karaciğer, diyafram altında karın boşluğunun sağ üst bölümünün neredeyse tamamını doldurur (Dilek vd., 2003 a).



Şekil 2.1. Karaciğerin vücuttaki yeri (Anonim, 2011)

Karaciğer; safra üretimi ve salgılanması, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında 500' ün üzerinde kimyasal reaksiyonun gerçekleştirilmesi, biyokimyasal sindirim, gastrointestinal sistemden kaynaklanan bakterilerin filtre edilmesi ve daha birçok metabolik ve biyolojik süreçte etkisi olan hayati bir organdır (Şekil 2.2). Yokluğunda veya

işlev yitiminde diyalizle kısa bir süreliğine fonksiyonları yerine getirilebilse de uzun dönemli telafisi mümkün olmamaktadır (Taş, 2010).

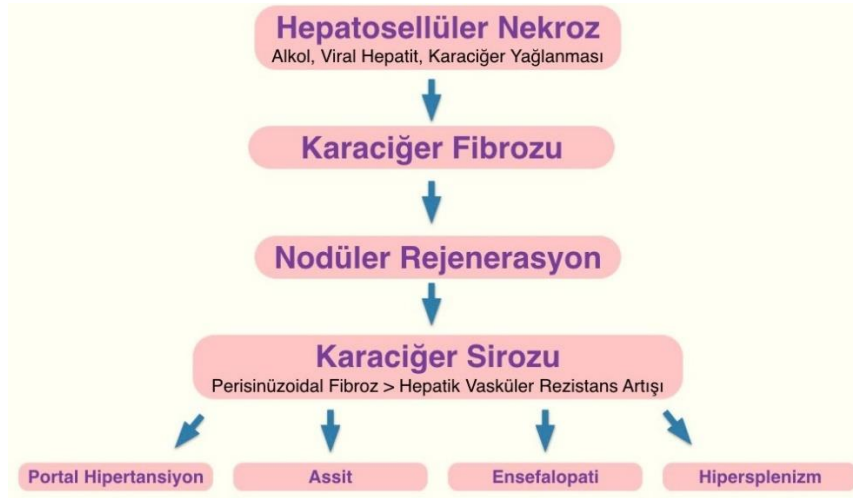


Şekil 2.2. Karaciğerin İşlevleri (Tarhan' dan, 2018)

Karaciğerin yaklaşık %67'sini hepatosit adı verilen karaciğer hücreleri oluşturur. Bunun dışında karaciğerde, karaciğer dokusunun %37'sini oluşturan safra kanal epitel hücreleri, ito hücreleri, kupfer hücreleri ve fibroblastlar gibi hücre tipleri de mevcuttur (Dilek vd., 2003 b).

2.1.2. Siroz

Siroz, bağ dokularının sayısının artmasıyla kanın karaciğerden geçişinin zorlaşması anlamına gelen karaciğer fibrozunun son noktasıdır (Şekil 2.3). Sınırlı yenilenme kapasitesi ve komplikasyonların eşlik ettiği siroz, birçok karaciğer hastası için önemli bir ölüm nedenidir (Chan vd., 2016). Çünkü siroz hastası, çoğu zaman HCC hastalığına giden yolda HCC sınırındadır. Nitekim 2010 yılında dünyada bir milyondan fazla kişinin ölümüne (tüm ölümlerin %2'si) neden olmuştur (Aydın Çil vd., 2017).



Şekil 2.3. Siroz patofizyolojisi (Anonim, 2011)

Her kronik karaciğer hastalığı her yaşta siroza yol açabilir (Çizelge 2.1). Ülkemizde etyolojik (nedensel) ajan olarak viral hepatitler özellikle hepatit B, C ve D virüsü önemli rol oynamaktadır (Ortaburun, 2015).

Çizelge 2.1. Siroz nedenleri (Ortaburun' dan uyarlanmıştır, 2015)

Alkolizm	
Kronik viral hepatit	Hepatit B
	Hepatit C
Otoimmün hepatit	
Nonalkolik steatohepatit	
Bilier siroz	Primer biliyer siroz
	Primer sklerozan kolanjit
	Otoimmün kolanjiopati
Kardiyak siroz	
Kriptojenik siroz	
Kalıtsal metabolik karaciğer hastalığı	Hemokromatozis
	Wilson hastalığı
	Alfa-1 antitripsin eksikliği
	Kistik fibrozis

Siroz hastalarında; hastalık sürecinde çoğu hayatı tehdit eden, hızla ve hemen müdahale edilmez ise ölümlü sonuçlanabilecek komplikasyonlar görülür. Bunların başlıcaları, portal hipertansiyon ve onun sonucu olarak splenomegali, asit, hepatik ensefaolopati, spontan bakteriyel peritonit, hepatorenal sendrom ve HCC' dir (Ortaburun, 2015).

Sirozun kesin tedavisi olmamakla birlikte organ nakli ile sağlıklı yaşama devam edilebilmektedir. Bu nedenle siroz hastalığının HCC' ye dönüşmeden önce ilerlemesinin durdurulabilmesi büyük önem taşımaktadır.

2.1.3. Primer malign (birincil kötü huylu) karaciğer tümörleri

Karaciğerin primer malign tümörleri menşei aldıkları dokuya göre epitelyal, mezenkimal, mikst ve metastatik (sekonder) olmak üzere dört ana grupta incelenebilir (Çizelge 2.2). Klinikte vakaların %90' dan fazlasını epitelyal hücrelerden kaynaklanan (başta HCC olmak üzere) kanserler oluşturur (Dilek vd., 2003 b).

Primer karaciğer kanserleri geniş anlamda iki tiptir: Hepatositlerden kaynaklanan HCC ve intrahepatik safra kanallarından gelişen kolanjiyosellüler karsinom (CCC). Primer karaciğer kanserlerinin yaklaşık %90'ını HCC, %10'unu ise CCC oluşturur (Göksay ve Kapan, 2002).

Mevcut primer karaciğer kanseri olgularının büyük çoğunluğunu oluşturan HCC, karaciğer kanseri türleri arasında en yaygın olanıdır (Karakülah, 2009) ve ölüme sebebiyet veren kanser türleri arasında ise 3. sıradadır (Shangguan vd., 2015). Tedavi edilemeyen karaciğer kanserinin sonuçları kötüdür. Böyle bir vakada beklenen yaşam süresi 6-9 ay kadardır. Uygun vakalarda beş yıllık yaşam, cerrahi tedavi alanlarda %60-70 iken perkütan (deri geçişli) girişimlerde %40-50 arasındadır. Dolayısıyla hayatta kalım oranı oldukça düşüktür (Anonim, 2009).

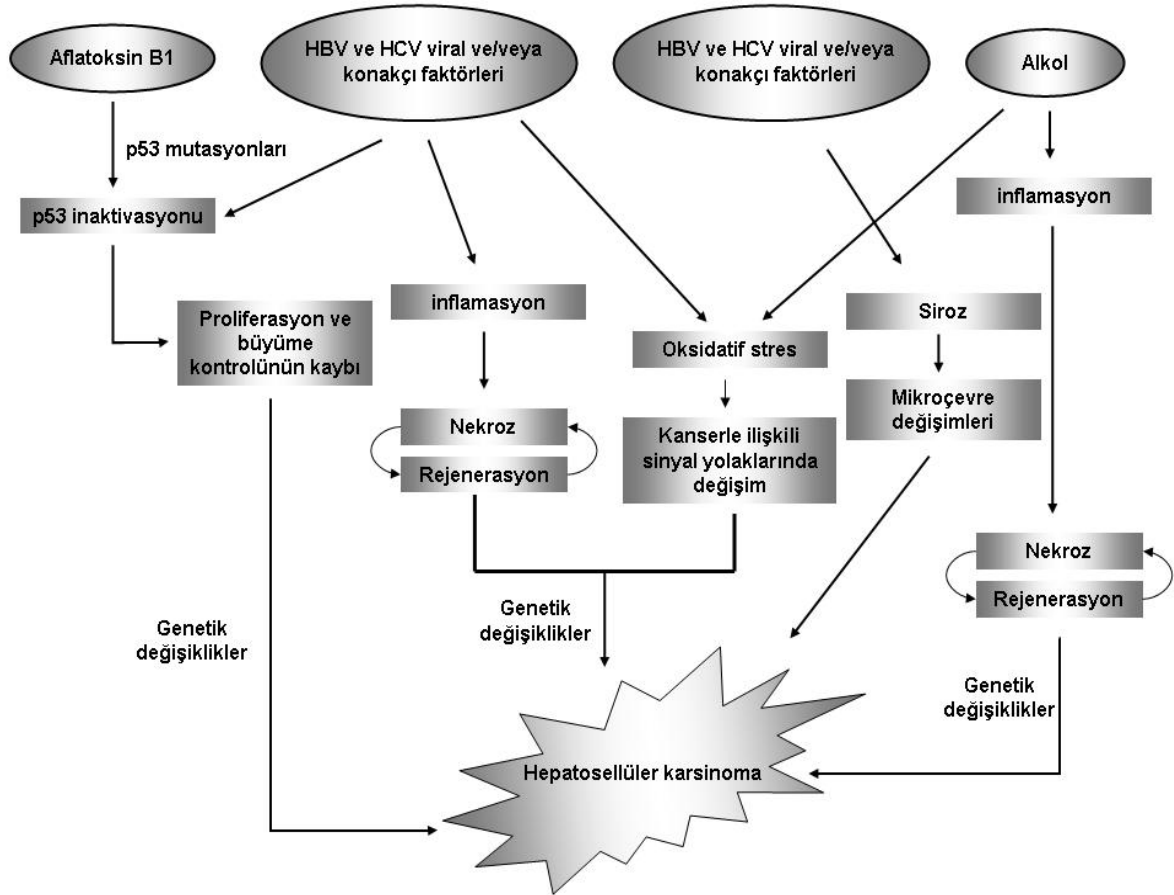
Karaciğer kanserinin erken çok özgün bir bulgusu yoktur. Yani, karaciğer kanseri büyük boyutlara varmadan özgün şikâyetlere neden olmaz (Anonim, 2009). Bu nedenle

HCC'lerin %60'ında tanı konduğunda ekstrahepatik metastaz (karaciğer dışından tümör sıçraması) mevcuttur (Gümüştay vd., 2016).

Çizelge 2.2. Epitelyal ve mezenkimal primer malign karaciğer tümörleri (Dilek vd.'den, 2003 b)

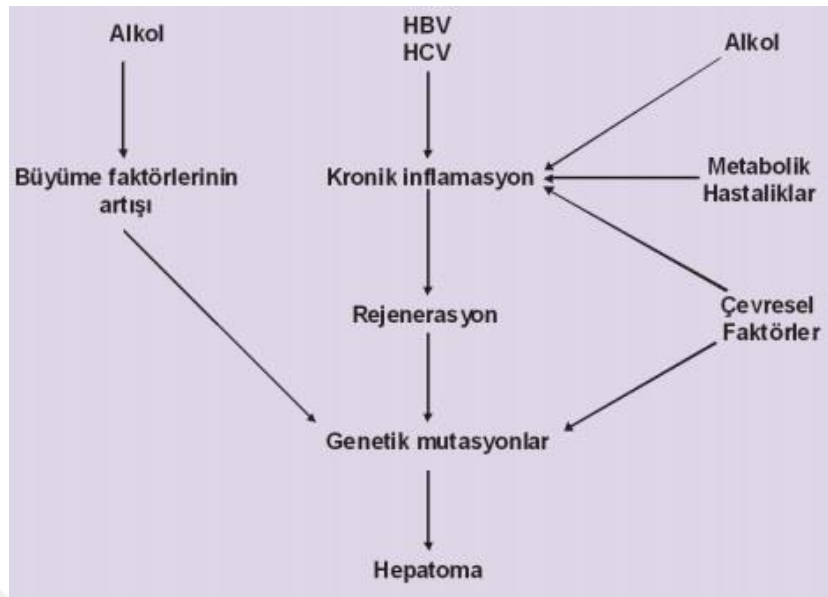
Epitelyal (Epitel dokuda gelişen)	Mezenkimal (Bağ dokuda gelişen)
Hepatosellüler Karsinoma (HCC)	Kolanjiyosarkom
Kolanjiyokarsinoma (CCC)	Anjiyosarkom
Hepatokolanjiyokarsinoma	İndiferansiye Sarkom
Hepatoblastoma	Epiteloid Hemanjiyoendoteliyoma
Kistadenokarsinom	Leiomyosarkom
Squamos Hücreli Kanser	Malign Schwannoma
	Lenfoma
	Fibrosarkom
	Diğer...

Hepatit C enfeksiyonları, hepatit B enfeksiyonları, siroz başta olmak üzere; alkolik karaciğer hastalığı, tirozinemi, hemokromatozis de HCC gelişimi için risk faktörleridir (Kazimi vd., 2010). HCC için bilinen bu temel risk faktörleri, farklı etki mekanizmaları ile hücrede bir dizi genetik değişikliklere yol açmakta ve beraberinde HCC fenotipinin oluşumuna neden olmaktadır (Karakülah, 2009) (Şekil 2.4).

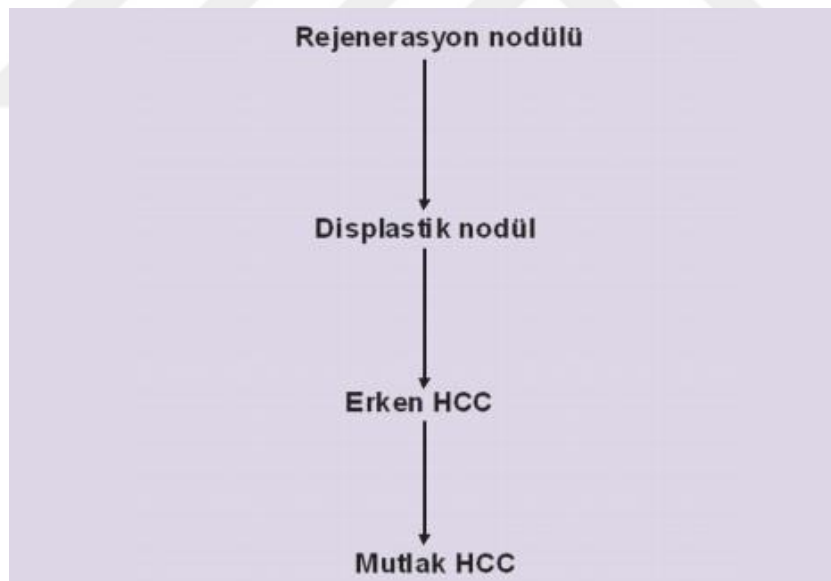


Şekil 2.4. HCC’de risk faktörleri ve hepatokarsinogenezis süreçleri (Karakülah’ tan, 2009)

HCC’lerin %70-90’ ı karaciğer sirozu üzerine gelişir. Ancak, etken ne olursa olsun karaciğerde ilk önce inflamasyon (iltihap) görülür. İnflamasyondan sonra fibrozis (doku hasarı), nekrozis (doku ölümü) ve rejenerasyon (hücre, doku yenilenmesi) gelişir. Fibrozis ve rejenerasyon sirozun en önemli patofizyolojik göstergeleridir. Rejenerasyon nodüllerinden sonra sırayla displastik nodül, erken hepatoma ve mutlak hepatoma gelişir (Taş, 2010) (Şekil 2.5 ve Şekil 2.6).



Şekil 2.5. Hepatoma Patogenezi (Taş' tan, 2010)



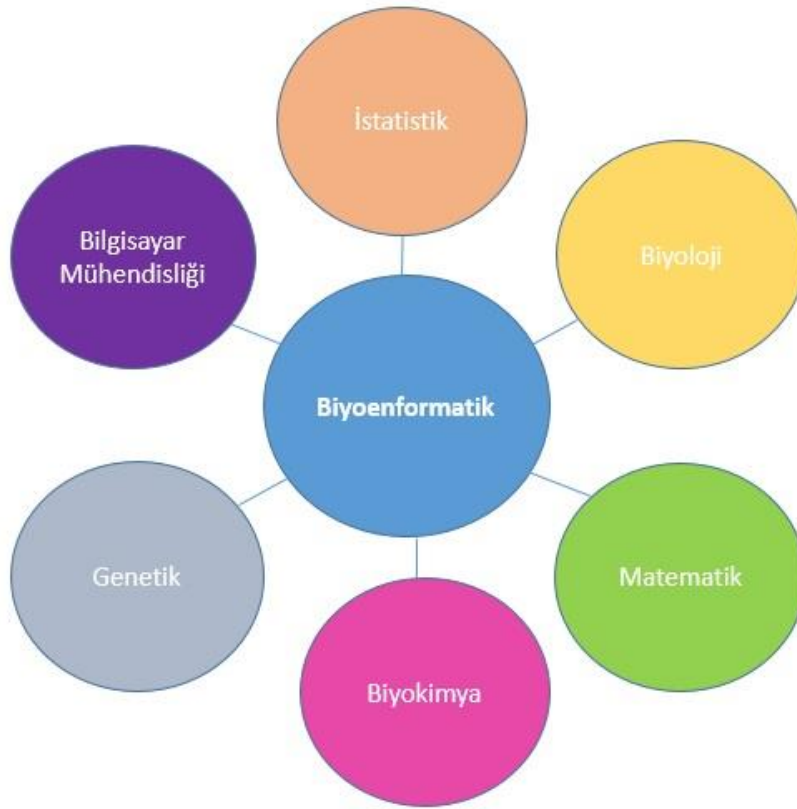
Şekil 2.6. Hepatoma Patogenezi (Taş' tan, 2010)

2.2. Biyoenformatik

Biyoenformatik, kompleks biyomedikal problemlerle baş etmek için biyoistatistiği bilgisayar bilimleri ile birleştiren görece yeni bir disiplindir. Biyoenformatiğin geçmişi,

DNA sekans verilerinin depolanma, yönetilme ve analiz edilme ihtiyaçlarının doğduğu 1970'lere dayanır. Sonrasında internetin ve bilgisayarların yayılmasıyla 1990' larda ilerlemiştir (J. H. Moore, 2013, yazılı görüşme).

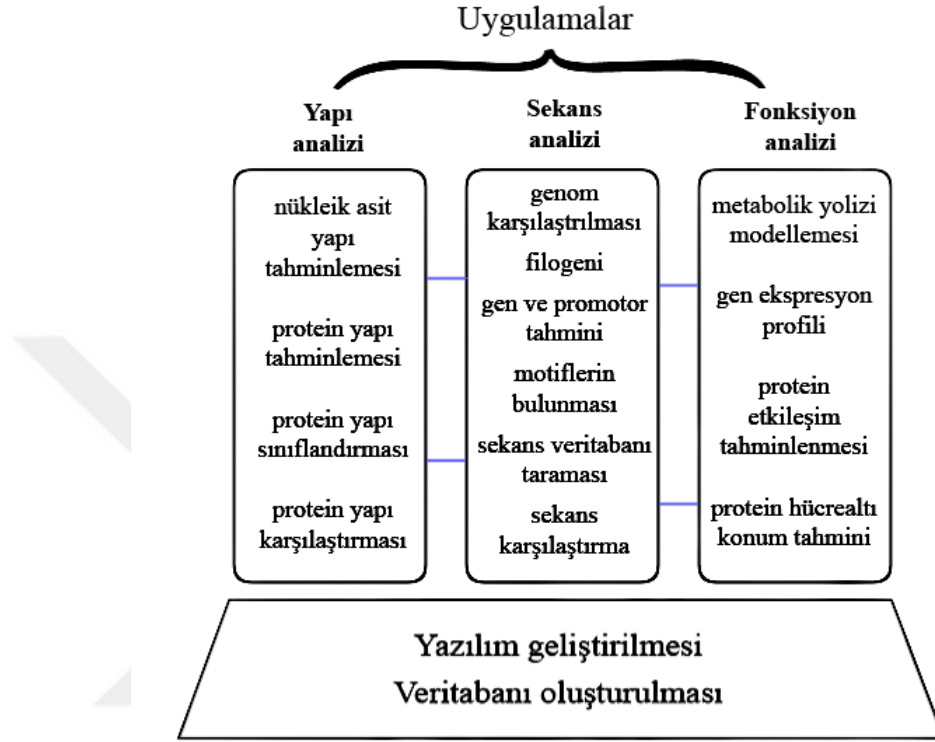
Kısaca biyoenformatik, biyolojik bilginin bilgisayar yardımı ile incelenmesi ve işlenmesidir. Biyoenformatik; biyoloji, bilgisayar bilimleri, uygulamalı matematik ve istatistiği tek bir disiplinde birleştiren disiplinler arası modern bir bilimdir (E. Chao, 2013, yazılı görüşme) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Biyoenformatik ve ilişkili bilim dalları

Biyoenformatik araştırmalarının üç temel amacı vardır: Var olan biyolojik verileri araştırmacıların ulaşabileceği biçimde organize etmek ve yeni bilgiler üretildikçe veriler üzerine ekleme yapabilmeye imkân vermek, var olan verilerin analizleri için araçlar

geliştirmek ve analiz araçlarını kullanarak, verileri biyolojik olarak yorumlayabilmek (Yazağan, 2014) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Biyoenformatiğin alt çalışma alanları (Tanyolaç vd.’ den, 2012)

2.3. Gen İfadesi

Hemen hemen her hücre aynı genleri içeren kromozom takımına sahiptir. DNA’daki genetik bilginin, transkripsiyonla RNA’ya, daha sonra da translasyonla proteine dönüşmesi “gen ifadesi” olarak adlandırılmaktadır (Özkan ve Selçukcan Erol, 2017).

Gen ifadesi, bir hücrenin hem kendi değişen ihtiyaçlarına hem de çevresel uyarılara dinamik olarak cevap vermesini sağlar. Bu mekanizma, bir hücrede ifade edilen genleri kontrol etmek için “açma-kapama” düğmesi gibi davranır. Hem de bir ses kontrolü gibi gerektiğinde belirli genlerin ifade düzeyini artırır veya azaltır (Özkan ve Selçukcan Erol, 2017).

Gen ifade seviyesi çeşitli nedenlerle olması gerekenin altında veya üstünde seyredebilir. Bu durumun molekül, hücre ve organizma düzeyinde etkileri görülebilmektedir.

2.4. Mikrodizi Nedir?

Nükleik asitler (DNA ve RNA) canlılardaki hücrelerde meydana gelen metabolik olayların gerçekleştirilmesinde, kontrolünde rol alan ve kalıtımı sağlayan temel yapı taşı moleküllerdir ve nükleotit olarak adlandırılan basit birimlerden oluşurlar. Nükleik asit moleküllerindeki nükleotit bazları (adenin, guanin, sitozin, timin ve urasil) sırasının belirlenmesi DNA dizileme olarak adlandırılmaktadır (Kızmaz vd., 2017).

Bir organizmaya ait DNA bazlarının dizilişini bilmek, genlerin nasıl çalıştıklarını, hastalıklarla olan ilişkilerini ve metabolik süreçlerin hastalıkla nasıl değiştiğini öğrenmek için yeterli değildir. Bir hücrenin tipi veya içinde bulunduğu evre, o hücrede ifade edilen gen profili yani sahip olduğu genlerin mRNA düzeyindeki değişiklikleri ile belirlenebilir. Ancak, tüm genlerin ifade profillerini eş zamanlı olarak tespit etmek için geniş kapsamlı teknolojilere ihtiyaç vardır. Mikrodizi çipleri bu ihtiyaca binaen geliştirilmiş olup, çeşitli biyolojik ve genetik araştırmalarda kullanılmaktadır.

Mikrodiziler, yüksek yoğunluklu gen çipleridir ve tek bir deneyde binlerce genin anlatım profillerinin incelenmesine olanak vermektedir. İki tip mikrodizi vardır: Geleneksel DNA mikrodizi olarak kabul edilen cDNA 500-5000 baz uzunluğunda problemlerin (DNA veya RNA parçaları) cam yüzeylere basılması ile üretilir. Oligonükleotid mikrodiziler ise, 20-80 baz uzunluğundaki oligonükleotidlerin önce sentezlenip sonra çip yüzeyine tutturulması veya doğrudan çip üzerinde sentezlenmesi (fotolitografi) ile üretilir. Bu yöntem, Affymetrix firması tarafından geliştirilmiştir (Şekil 2.9).

Mikrodizi kullanılarak bir örnekteki gen ifade profilini çıkarmak; cam, silikon gibi bir desteğin üzerine nükleik asit (DNA, mRNA) örneklerinin belirli bir düzende yerleştirilmesi işlemi ile başlar. Daha sonra sırasıyla; hibridizasyon, yıkama, tarama ve görüntü alma işlemleri gerçekleştirilerek ham veriler elde edilir (Atış, 2014).

Mikrodizilerin kullanım amaçları arasında; genetik bağlantı veya ilişkilendirme, hastalıkların tanısı, gen tanımlama (gıdalardaki mikroorganizmaların tayini gibi) ve farmakogenetik çalışmalar da yer almaktadır (Yoltaş ve Karaboz, 2010). Gen çipleri ile elde edilmiş pek çok gen ifade profili verisine, www.ncbi.nlm.nih.gov sitesinde geniş kapsamlı Gene Expression Omnibus (GEO) veritabanından erişilebilmektedir.



Şekil 2.9. Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Mikrodizi Örneği (Kun Huang' dan, 2010)

2.5. DNA Çipleri ve Dizilemenin Tarihçesi

DNA ve RNA moleküllerinin kalıttaki rolleri ve canlıların yaşam fonksiyonlarındaki önemini anlaşılmasıyla, 1950'li yıllardan itibaren DNA çalışmaları ön plana çıkmıştır. Dizileme çalışmaları ise ilk olarak RNA moleküllerinin dizi analiziyle başlamış daha sonra gelişen tekniklerle birlikte DNA dizileme çalışmaları da yapılmaya başlanmıştır (Kızmaz vd., 2017).

Orijinal DNA çipinin, 1975' te Grunstein ve Hogness' ın koloni hibridizasyonu metodu ile ortaya çıktığı kabul edilmektedir. 90' ların sonu ve 2000' lerin başlarında ise yeni üretim teknikleri ve floresan algılama işleminin sürece adapte edilmesi nedeniyle DNA çip

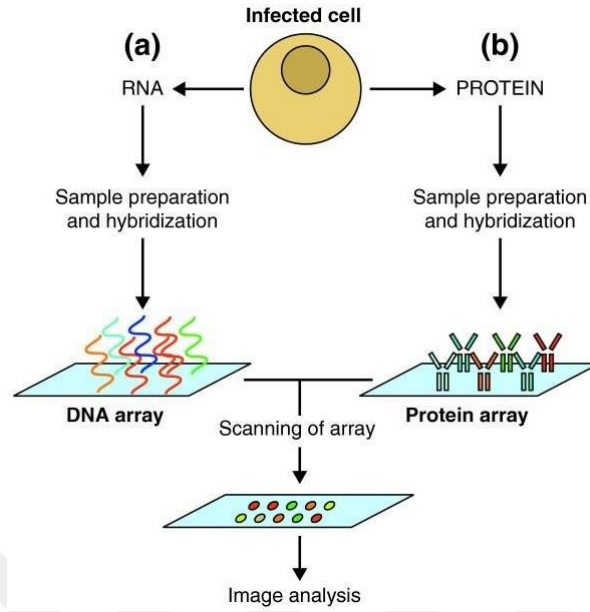
teknolojisi hızla gelişmiştir (Bumgarner, 2013). Özellikle Affymetrix ve GeneChip mikrodizi firmalarının 1996 yılında kurulmasından sonraki on yılda, DNA çip teknolojisi ile prokaryotik ve ökaryotik organizmalardaki çeşitli gen ifadesi araştırmaları hızlı bir gelişme göstermiştir (Kızmaz vd., 2017).

DNA dizilemede ilk kullanılan yöntemler zaman alıcı, yoğun emek gerektiren ve pahalı yöntemlerdir. Araştırmacıların daha ucuz, daha hızlı ve daha hassas yöntemler geliştirmek için yürüttükleri çalışmalar neticesinde Yeni Nesil Dizileme sistemleri ortaya çıkmıştır. 2000'li yılların başından bu yana farklı dizileme yöntemlerine, çeşitli örnek hazırlama stratejilerine, immobilizasyona (DNA örneklerinin birleştirilmesi) ve nükleik asit kimyasına sahip çok sayıda Yeni Nesil Dizileme Sistemleri şu an ulaşılabilir durumdadır. Bu yöntem o zamana kadar kullanılan Sanger yöntemine göre daha yüksek hacim ve doğrulukla dizileme yapılabilmesini mümkün kılmıştır. Ayrıca, dizileme maliyetini oldukça düşürmüştür (Kızmaz vd., 2017).

Bu sistemler karmaşık biyoenformatik yazılımlarla birleştirilerek çoğu bilim dalında genom dizileme, metagenomik, transkriptomik ve amplikon çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Kızmaz vd., 2017).

2.6. Mikrodizi Deneyleri ve Mikrodizi Veri Analizleri

Genel anlamda mikrodizi veri analizi yönteminin veri işleme ve çözümlene basamaklarını; mRNA'lara ait ışık şiddetlerinin ölçülmesi ile elde edilen ham ifade verilerinin (Şekil 2.10) normalize edilmesi, normalize edilmiş verilerin istatistiksel anlamlılığının test edilmesi ve veriler üzerinde biyolojik yorumlar (fonksiyonel sınıflandırma gibi) ve çıkarımların yapılması oluşturmaktadır (Şekil 2.11). Bu basamakların her birinde farklı biyoenformatik araçlar ve istatistiksel çözümlene yöntemleri kullanılmakta olup, bu bakımdan mikrodizi veri analizi yöntemi yüksek derecede biyoenformatik, matematik ve istatistik disiplinlerine bağımlıdır (Karakulah, 2009).



Şekil 2.10. Mikrodizi deneylerinin yapısı a) RNA b) Protein (Livingston vd.' den, 2005)



Şekil 2.11. Mikrodizi analizleri süreç şeması (Özkan ve Selçukcan Erol' dan, 2017)

Gen ifade düzeylerinin ölçülmesi, DNA mikrodizi deneylerinin en temel amacıdır (Bumgarner, 2013). Aynı zamanda sınıf tahmini olarak da adlandırılan bu çalışma, önceden

tanımlanmış sınıfları temsil eden örnekler arasında hangi genlerin farklı düzeylerde ifade edildiğini belirlemeye odaklanır. Sınıflar; farklı doku tiplerini, aynı hücre tipindeki normal ve hastalıklı dokuları veya farklı deneysel koşullar altında aynı doku örneğini temsil ediyor olabilir. İfade profillerinin bağımsız olarak tanımlanması, sınıf karşılaştırma/gen bulma çalışmasının karakteristik özelliğidir. İlk mikrodizi çalışmalarında; araştırmacılar sınıf karşılaştırma işlemlerini, mikrodizide yer alan farklı sınıflara ait her gen için kat değişim oranlarını inceleyerek gerçekleştirmişlerdir (Simon, 2009).

Karşılaştırılan sınıflar arasında farklı düzeyde ifade edilen gen listesinin biyolojik olarak yorumlanması, gen ifade profili veri analizinde karşılaşılan önemli bir problemdir. Ayrıca; bir gen seti içerisindeki gen ifade kalıpları, birbirlerinin önemini arttırabilir ve tek başına çoğunlukla önem taşımaz (Simon, 2009).

Elde edilen gen setinin biyolojik olarak yorumlanması için çeşitli yöntemler mevcuttur. Bunların çoğu; açıklanan metabolik yollar veya sinyal yolları içerisinde yer alan genleri, aynı kromozom kolu içerisinde yer alan genleri, aynı transkripsiyon faktörü için hedef genleri, aynı protein alanında yer alan ve yolak aktivasyonu veya susturulmasına yanıt vermekle yükümlü genleri içeren ontoloji gruplarını verir (Simon, 2009).

Özellikle kanser gibi, oluşumunda ve gelişiminde genetik faktörlerin rol oynadığı tahmin edilen hastalıklar üzerine yapılan mikrodizi çalışmalarında temelde kanserli ve sağlıklı hücre dokularındaki moleküler farklılıkların tespit edilmesi amaçlanmaktadır. Böylelikle tedavide daha etkili ilaçların keşfi için hedef moleküler yapıların belirlenmesi mümkün olmaktadır. Ayrıca bir hastalığın farklı tiplerinde ortaya çıkan moleküler değişikliklerin tespiti ve aynı hastalığın çeşitli evrelerinde gen ifade örüntülerinin değerlendirilerek her hastalık evresi için farklı tedavi seçeneklerinin ortaya çıkarılması sağlanabilmektedir.

2.6.1. Mikrodizi veri analizinde kullanılan yazılım ve araçlar

Bu çalışma, her bir analiz ve sonuç görselleştirme adımında kullanılan çeşitli yazılımlar vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Bunlar; R programlama dili yazılımı, RStudio

tümleşik geliştirme arayüz yazılımı, Bioconductor yazılımı, STRING veritabanı aracı ve Cytoscape görselleştirme programıdır.

R programlama dili: R programlama dili, istatistiksel veri analizi için çok elverişli araçlar sunmaktadır. Bu konuda çeşitli amaçlar için kullanılacak fonksiyonlar özel paketler halinde R ortamına yüklenirler.

RStudio tümleşik geliştirme arayüz yazılımı: RStudio, R istatistiksel hesaplama/programlama dilinin daha verimli kullanılabilmesi için geliştirilmiş, etkileşimli bir araç seti içeren açık kaynak kodlu tümleşik geliştirme ortamı (IDE) yazılımıdır.

Bioconductor: Bioconductor, hesaplamasal biyoloji ve biyoenformatik bilimi için açık kaynak kodlu yazılım geliştirmeyi amaçlayan bir projedir. Bioconductor, araştırmacılara genomik veri kaynaklarının ve analiz araçlarının sunulduğu bir R ortamıdır. Veri bilimi camiasında geniş bir kullanıcı kitlesine sahip esnek bir dil olan R programlama dilini kullanır. Ayrıca, genomik veri analizi için paketler halinde indirilerek kullanılabilen güçlü istatistiksel ve grafiksel metotlar sunar (Bioconductor, 2018).

R ortamında Bioconductor paketleri fonksiyonları doğrultusunda indirilerek kullanılabilen olup, bu paketlerin sayısı 3.7 versiyonundan itibaren 1500' ün üzerindedir.

STRING veritabanı yazılımı: Sistem bazında hücresel fonksiyonları anlamak, ifade edilen proteinler arasındaki fonksiyonel etkileşimlerin bilinmesini gerektirir. STRING veritabanı yazılımı, çok sayıda organizma için bilinen ve tahmin edilen protein – protein ilişki bilgilerini dinamik olarak birleştirip araştırmacılara ücretsiz sunmaktadır.

STRING' in sunduğu etkileşimler, her ikisi de spesifik ve biyolojik olarak anlamlı olan direkt (fiziksel) ve indirekt (fonksiyonel) etkileşimleri kapsamaktadır (Szklarczyk vd., 2016).

Cytoscape görselleştirme yazılımı: Cytoscape, moleküler etkileşim ağlarını görselleştirmek için geliştirilmiş açık kaynak kodlu bir yazılımdır. Diğer bir deyişle,

biyolojik ağları görüntülemek ve analiz etmek için tasarlanmıştır. Cytoscape' in temel işlevi, düğüm olarak temsil edilen genler, proteinler ve moleküller ile düğümler arasındaki bağlantıları temsil eden etkileşimlerden meydana gelen ağları düzenlemektir.

2.6.2. Mikrodizi veri analizi adımları

Mikrodizi ifade yoğunluk verilerinin analize hazırlanması:

Mikrodizi gen ifade veri kümelerinin ön işleme sürecinin ilk basamağı, verilerin kalite kontrolünün yapılmasıdır. Kalite kontrol değerlendirmesi, deneysel verilerin kalitesinin kabul edilir olup olmadığını ve herhangi bir hibridizasyonun tekrarlanmasının gerekip gerekmediğini belirlemek için yapılmalıdır (Atış, 2014). Böylece, verilerin analize hazırlanması sağlanmış olur.

Kalite kontrol değerlendirme işleminde, çiplerle veya deneyle ilgili potansiyel sorunları saptamak amacıyla çeşitli açıklayıcı veri grafikleri çizilmektedir (Atış, 2014).

Bunlardan RLE (Relative Log Expression) grafiği, bir mikrodizi çipindeki, her bir prob setine ait ifade değerinin, bütün çiplerdeki o prob setine ait ifade değerlerinin medyan değerinden sapmasının hesaplanması ile bulunan sonuçları belirten bir grafikdir (Karakülah, 2009). Kalite problemi olan çiplere ait kutular, daha geniş bir alana yayılıp 0 (sıfır) değerinden daha uzakta bir değer almaktadır.

NUSE (Normalized Unscaled Standart Errors) grafiği ise; mikrodizi çiplerinin, her bir prob setindeki problemlerin ifade değerleri arasındaki standart hatanın hesaplanmasından sonra, bu standart hataların medyan değeri ile her bir prob setindeki problemler arası standart hataya bölünmesi ile elde edilen sonuçları içermektedir (Karakülah, 2009). Kalite problemi olan çiplere ait kutular, daha geniş bir alana yayılıp 1 değerinden daha uzakta bir değer almaktadır.

Ön işleme sürecinin ikinci adımı ise normalizasyondur. Normalizasyon, mikrodizi veri madenciliği ile ilgili analizlere geçmeden önce yapılması gereken bir ön işlemdir. Mikrodizi ölçümlenmeleri, mikrodizilerin oluşturulması esnasında çeşitli olumsuz olayların

etkileri altında kalabilir. Gen ifade seviyesi hibridizasyon sonrasında floresan yoğunluğu olarak ortaya çıkmaktadır. Söz konusu bu yoğunluk RNA miktarı, hibridizasyon kalitesi gibi faktörler tarafından etkilenebilir (Özkan ve Selçukcan Erol, 2017).

Normalizasyon, farklı diziler ve renk kanalları içeren DNA mikrodizilerinin karşılaştırılabilirliğini sağlamak üzere verinin standart hale getirilmesi yani yoğunluklar arası farklılıkları önlemek için ihtiyaç duyulan bir işlemdir (Özkan ve Selçukcan Erol, 2017).

Differentially Expressed Genes (DEGs) analizi: Kalite kontrolü ve normalizasyon ön işleme adımları yapıldıktan sonra DEGs analizine geçilebilir. DEGs analizi, normalize edilmiş gen ifade verilerini okuyarak deneysel gruplar arasındaki anlamlı nicel değişimleri tespit etmek amacıyla yapılan istatistiksel bir analizdir. Özellikle kanser araştırmalarında ve hücre gelişimi çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Ritchie vd., 2015).

Günümüze kadar birçok DEGs analizi metodu geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları edgeR, DESeq, DreamSeq, PoissonSeq, CuffDiff, TSPM ve limma metotlarıdır.

Bu çalışmada bahsi geçen metotlardan limma analiz metodu kullanılmıştır. Limma metodunda ana fikir, her bir gene ait ifade verisini elde etmek için lineer bir model kurmaktır. Bu lineer istatistiksel model, çok sayıdaki RNA hedefleri arasında eş zamanlı olarak karşılaştırmalı analiz yapılmasını sağlamaktadır. Limma her bir gen için hesaplanan logaritmik kat değişimi (logFC) sonuçlarında standart hataları azaltmak için Empirical Bayes (Deneysel Bayes) yöntemini kullanır (Ashtiani, 2018).

Karşılıklı olarak genler arasındaki farklılıkları tespit etmek için Empirical Bayes ve diğer istatistiksel yöntemlerin kullanılması; analizi, az sayıda çiple yapılan deneylerde bile kararlı hale getirmektedir (Smyth, 2005).

Analiz sürecinde, elde edilecek ifadesi değişen genler için bir anlamlılık düzeyi belirlenir. Bu değer, (p: probability-olasılık) istatistiksel anlamlılığın (statistical significance) varlığının ve varsa da var olan farklılığın kanıtının düzeyinin belirlenmesi amacı ile kullanılan bir değerdir. Her istatistiksel testin sonucunda kullanılan test istatistiğine

ait bir p değeri hesaplanır. Bu p değeri “ilgili hipotez testi sonucunda anlamlı fark vardır” denileceği durumda hatalı karar verme olasılığının ne olduğunu gösterir (Kul, 2014).

Analiz tamamlandıktan sonra, sağlıklı/normal dokularda ifade edilen genlerin ifade seviyelerine göre ifadesi artmış veya azalmış tüm genler arasından istatistiksel olarak anlamlı değişime uğramış olanlar alınır ve GO (Gene Ontology - fonksiyonel ve biyolojik sınıflandırma) analizinde girdi genleri listesi olarak kullanılır. Bu ayırimda belirleyici faktör, logFC kriteridir. İfade seviyesi değişiminin anlamlı sayılabilmesi için logFC mutlak değerinin 1 veya üzerinde olması gerekmektedir.

Gene Ontology (GO) zenginleşim analizi: Çoğu durumda, DEGs listesini (ifade seviyesi anlamlı olarak değişen genlerin listesini) elde etmek DNA mikrodizi analizlerinin son adımı değildir. Bu listede yer alan genlerin fonksiyonel, hücrenel ve biyolojik anlamda sınıflandırılmasına ihtiyaç vardır. GO bu amaçla oluşturulan ve geliştirilmeye devam eden bir biyoenformatik projesidir.

Ontoloji, bilgi sahibi olduğumuz bir şeyin temsilidir. "Ontolojiler" tespit edilebilir ya da doğrudan gözlemlenebilir şeylerin ve bu şeyler arasındaki ilişkilerin temsilinden oluşur. Biyoloji ve ilişkili sahalarda evrensel bir standart terminoloji bulunmamaktadır, belirli bir türe özgü, araştırma alanına özgü, hatta belirli bir araştırma grubuna özgü terim kullanımları olabilmektedir. Bu da verilere dair iletişim ve paylaşımı daha zor kılmaktadır. Gen Ontolojisi projesi gen ürünü özelliklerini temsil eden tanımlı terimlerin bir ontolojisini sağlar.

Ontoloji üç sahayı kapsar:

- 1) Hücrenel bileşen, bir hücrenin ya da hücre dışı ortamının parçaları.
- 2) Moleküler işlev, bir gen ürününün moleküler düzeydeki bağlanma ya da enzim katalizi gibi ögesel faaliyetleri.
- 3) Biyolojik süreç, entegre yaşam birimlerinin (hücrelerin, dokuların ve organizmaların) işleyişiyle ilgili, tanımlı bir başlangıcı ve sonu olan işlemler veya moleküler olay kümeleri (Anonim, 2018).

GO analizi için geliştirilmiş birçok hazır araç olduğu gibi analiz adımlarını içeren komutlardan oluşan Bioconductor paketleri de mevcuttur. Bunlardan bazıları GOstats, goseq, gProfileR, clusterProfiler ve topGO paketleridir. Bu çalışmada GO analizi için topGO metodu kullanılmıştır.

Bu metot, gen ontolojisi için yarı otomatik zenginleştirme analizini kolaylaştırmak amacıyla tasarlanmıştır. GO zenginleşim analizi yapmak için kullanımı kolay bir fonksiyon seti sunmasının yanında; kullanıcılara, GO grafik yapısıyla başa çıkabilen yeni istatistiksel testler veya algoritmalar uygulayabilme imkânı sağlamaktadır. Classic, elim, weight, weight01, lea ve parentchild topGO metodunun desteklediği zenginleşim testi algoritmalarıdır. topGO paketinin kullandığı varsayılan algoritma bu çalışmada da kullanılan elim ve weight algoritmalarının bir karışımı olan weight01 algoritmasıdır (Alexa ve Rahnenführer, 2014).

Protein-Protein Interaction (PPI) ağ analizi: Hastalıklarla ilişkisi olan çoğu proteinin, önemli hücresel fonksiyonu ve hastalık patogenezi içerisindeki rolü anlaşılamamaktadır. PPI ağları oluşturarak ilgili bağlantıları kurmaya yarayan biyolojik sistem araçları kullanmak, bu proteinlerin fonksiyonlarını kavramak için izlenebilecek bir stratejidir (Alexa ve Rahnenführer, 2014). Yapılan bilimsel çalışmalar birçok proteinin fiziksel ve fonksiyonel partnerlerinin bulunduğunu ve birbirleriyle etkileşim içerisinde olduklarını göstermiştir.

PPI ağları ile gen ifade verilerini entegre etmek, farklı ifade edilen genlerin fonksiyonel ilişkileri bakımından anlamlı biyolojik bir bağlam üretilmesini sağlar (String Consortium, 2018).

2.6.3. İleri karaciğer hastalıklarında (siroz, HCC vb.) DNA mikrodizi analizi

Günümüzde, siroz ve HCC gibi ileri karaciğer hastalıklarının moleküler düzeyde sınıflandırılması ve gen ifade örüntülerinin belirlenmesi ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır.

Lian vd. (2018) yaptıkları gen ifade analizi çalışmasında, ANLN geninin yüksek ifadesinin programlı hücre ölümü ve DNA hasar yanıtı proseslerinin seviyesini düşürmek yoluyla HCC hastalarında tümör gelişimini teşvik ettiği sonucuna varmışlardır.

Satow vd. (2010) HCC hastalığı için terapötik hedef tayini amacıyla yaptıkları fonksiyonel genom araştırmasında; AKR1B10, HCAP-G, RRM2, ve TPX2 genlerinin normal hücrelerdekine kıyasla oldukça yüksek düzeyde ifade edildiğini ve bu durumun HCC tümörlü hücrelerin çoğalmasında ve hastalığın gelişiminde rol oynadığı sonucuna varmışlardır.

Wong vd. (2008) yaptıkları mikrodizi analiz çalışmasıyla TOP2A geninin yüksek ifadesinin; ileri HCC tümör histolojisi, mikrovasküler saldırı ve erken evre saldırısı gibi belirtilerle dolayısıyla hastalığın erken yaşlarda ortaya çıkması ve hastaların hayatta kalma sürelerinin kısalması ile ilişkisi olduğunu tespit etmişlerdir.

Gao vd. (2018) HCC hastalığı ile ilişkili kritik gen ve yolakları tanımlamak amacıyla yaptıkları mikrodizi analiz çalışmasıyla CDK1, CCNB1, CCNB2, MAD2L1, ACACB, IGF1, TOP2A ve EHHADH genlerinin HCC için prognostik biyobelirteç ve terapötik hedef genleri olduğu sonucuna varmışlardır.

Wang vd. (2013) 126 HCC hastasından alınan tümörlü ve tümörsüz doku örneklerini kullanarak yaptıkları kantitatif gen ifade analizi çalışması sonucunda, tümörlü dokuların %88.1' inde yer alan CXCL14 geninin ifade seviyesinin önemli derecede düşüş sergilediğini gözlemlemişlerdir. Böylece, CXCL14 geninin HCC için potansiyel tümör baskılayıcı olarak önemli bir role sahip olduğu sonucuna varmışlardır.

Esposti vd. (2016) normal, sirozlu ve HCC hastası 23 bireyin doku örneklerini analiz ederek yaptıkları çalışmada ifade seviyesi normal dokulardaki genlere kıyasla 2 kat üzerinde artmış lncRNA (Long Non-coding Ribonükleik Asit) genlerini tespit etmişler ve bu genlerin kronik karaciğer hastalıklarında karaciğer fonksiyonlarının kaybı ile ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır.

Dai vd. (2017) toplam 6 veri seti kullanarak yaptıkları biyoenformatik analiz çalışmasında; hücre bölünmesi, çekirdek plazması ve protein bağlama gibi 12 önemli yolak ile ilişkili CRNDE, LINC01419, GBAP1 ve LINC01093 genlerinin HCC için önemli birer tanısal değer ve dolayısıyla prognoz değerlendirme, hedefli terapi tedavisi gibi konularda önemli birer referans olabileceği sonucuna varmışlardır.

Li vd. (2015) HCC ve HBV (Hepatit B virüsü) - enfekte siroz hastası bireylerden alınan doku örneklerini kullanarak yaptıkları çalışmada, FOXP1 ve SPINK1 genlerinin yüksek ifadelerinin sirozun kanserleşmesinde önemli rol oynadığını ve HCC' nin erken tanısı için önemli potansiyel biyobelirteçler olabileceğini tespit etmişlerdir.

Jovel vd. (2018) HCC tümörünün görüldüğü ve sağlam dokulardan alınan örneklerle yaptıkları lncRNA analizinde kanserle ilişkili olduğu sonucuna vardıkları 56 gen tespit etmişlerdir.

Xu vd. (2003) yaptıkları biyoenformatik DNA analizi sonucunda OIT3 (LZP) geninin ifadesinin HCC tümörlü hücrelerde sağlıklı hücrelerdekine kıyasla önemli ölçüde düştüğünü tespit etmişler ve OIT3' ün HCC hastalığında önemli bir biyobelirteç olabileceği sonucuna varmışlardır.

Ho vd. (2015) 50 HCC hastası bireyden alınan tümörlü ve komşu tümörsüz doku örneklerini kullanarak yaptıkları gen ifade analizi çalışmasında ifade düzeyi en çok değişen genlerin CENPF, FOXM1, CLEC4G, CRHBP ve CLEC1B olduğunu gözlemlemişlerdir.

Chen vd. (2017) yaptıkları HCC mikrodizi gen ifade analizi çalışmasında; HCC gelişiminde ifade seviyesi normal hücrelerdekine kıyasla en çok düşen genleri içeren ZNF354C, NFATC2, ARID3A, BRCA1, ZNF263, FOXD1, GATA3, FOXO3, FOXL1 ve NR4A2 isimli 10 transkripsiyon faktörü tespit etmişler ve CLEC4G geninin ifadesinin tümörsüz dokulara kıyasla en fazla düşen genlerden biri olduğunu gözlemlemişlerdir. Dolayısıyla C-tipi lektin proteinlerin HCC patogenezinde rol oynayabileceği sonucuna varmışlardır.

Cheng vd. (2012) 48 HCV (Hepatit C virüsü) -enfekte siroz hastasından alınan 75 cerrahi karaciğer örneği kullanarak yaptıkları mikrodizi analizi ve yolak zenginleşim analizi sonucunda 395 genin ifadesinin tümörlü hücrelerde diğer hücrelerdekine kıyasla farklı düzeyde ifade edildiğini gözlemlemişlerdir.

Agarwal vd. (2017) 423 HCC hastası bireyden alınan tümörlü ve komşu tümörsüz doku örneklerini kullanarak yaptıkları gen ifade analizi çalışmasında AFP, NUF2, MELK ve TTK gibi genlerin ifade seviyelerinin en çok değişen genler arasında olduğunu keşfetmişlerdir. Ayrıca hiyerarşik kümeleme analizi sonucunda HCC için 4 alt grup belirlemişlerdir.

Chang vd. (2009) 31 HCC hastasından aldıkları tümörlü ve sağlıklı doku örnekleri ile yaptıkları mikrodizi ve interaktif yolak analizi çalışmasında; yüksek ve düşük JNK1 aktivasyonlu olmak üzere iki alt gruba ayırdıkları örnekler içinde yüksek JNK1 aktivasyonu içeren HCC dokularının hepatik kökenli öncü hücreler içerdikleri ve dolayısıyla HCC prognozu için iyi bir biyobelirteç ve terapötik hedef olduğu sonucuna varmışlardır.

Su ve Wu (2008) yaptıkları karaciğer fibrozu ve sirozu hastalıklarına sahip bireylerden alınan örneklerden elde edilen verileri kullanarak yaptıkları veri analizi sonucunda 8 tane genin ifadesinin sirozlu örneklerde yüksek, 13 tane genin ifadesinin düşük olduğunu ve 9 tane genin ilaç tasarımında terapötik hedef olarak kullanılabileceğini belirlemişlerdir.

Shangguan vd. (2015) farklı karaciğer hastalıklarına ve sağlıklı karaciğere sahip bireylerden alınan örneklerle yaptıkları HCC gen ifade profili analiz çalışmasında HCC ile ilişkili olduğunu düşündükleri 43 anahtar gen ve bunların ait olduğu biyolojik yolları saptamışlardır.

Chan vd. (2016) sirozlu ve sağlıklı karaciğer dokusu örneklerinden oluşan veriler üzerinde yaptıkları biyoenformatik mikrodizi analizi sonucunda 213 anahtar gen ve ayrıca önemli sinyal yollarını tespit etmişlerdir.

Zhang vd. (2017) HCC hastalığına sahip ve sağlıklı karaciğer dokusu örnekleriyle, HCC için anahtar gen ve yolakları belirlemek amacıyla yaptıkları biyoenformatik analiz sonucunda HCC' nin başlaması ve ilerlemesiyle yakından ilişkili olduğunu düşündükleri önemli anahtar gen ve yolakları tanımlamışlardır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada, Moshe Szyf tarafından 2011 yılında ve Mehmet Öztürk tarafından 2013 yılında Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsüne bağlı Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezine (NCBI - National Center for Biotechnology Information) teslim edilen ve Gene Expression Omnibus (GEO) veritabanında araştırmacıların kullanımına ücretsiz sunulan GSE29721 ve GSE17548 erişim numaralı veri setleri kullanılmıştır.

GSE29721 erişim numaralı veri seti, 10 adet sağlıklı karaciğer doku örneği, 10 adet HCC hastası karaciğer doku örneğinden oluşan bir mikrodizi verisidir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi>, erişim tarihi: 18.10.2018). Bu ifade verileri, Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 array çipi kullanılarak elde edilmiş olup, 2018 yılında güncellenmiştir. Her bir örneğe ilişkin verileri içeren dizin; bir tümörlü bir sağlıklı doku örneğini içeren veri dosyaları arka arkaya gelecek şekilde sıralanmış 20 tane sıkıştırılmış .CEL uzantılı dosyadan ibarettir.

GSE17548 erişim numaralı veri seti ise, 20 adet sirozlu karaciğer doku örneği, 17 adet HCC hastası karaciğer doku örneğinden oluşan bir mikrodizi verisidir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi>, erişim tarihi: 19.11.2018). Bu ifade verileri, Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 array çipi kullanılarak elde edilmiş olup, 2018 yılında güncellenmiştir. Her bir örneğe ilişkin verileri içeren dizin; sirozlu ve kanserli doku örneğini içeren veri dosyaları arka arkaya gelecek şekilde sıralanmış 37 tane sıkıştırılmış .CEL uzantılı dosyadan ibarettir.

Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2' de bu çalışmada kullanılan veri setlerinin içeriklerinin bir bölümü görülmektedir.

Çizelge 3.1. GSE29721 erişim numaralı veri seti içeriğinin bir bölümü.

Veri Seti 1 (GSE29721)		Hasta ve Sağlıklı Bireylere Ait Mikrodizi Çipleri				
		GSM437457.CEL	GSM437458.CEL	GSM437459.CEL	GSM437460.CEL	...
Gen İsimleri	1007_s_at (Bilinmiyor)	9.3170183533677	9.3987258662915	8.3756390497674	8.5449989240863	...
	1053_at (RFC2)	6.8241953009575	7.8802103417485	6.6702504957928	6.5916944691537	...
	117_at (HSPA6)	7.4367890031559	6.8931218842495	9.1449875135128	6.8936621847199	...
	121_at (PAX8)	8.7853521336643	8.5949018420141	8.2015453568378	8.1635668355649	...

Çizelge 3.2. GSE17548 erişim numaralı veri seti içeriğinin bir bölümü.

Veri Seti 2 (GSE17548)		Hasta ve Sağlıklı Bireylere Ait Mikrodizi Çipleri				
		GSM737065.CEL	GSM737066.CEL	GSM737067.CEL	GSM737068.CEL	...
Gen İsimleri	1007_s_at (Bilinmiyor)	6.4251597875022	6.7053331569236	7.6488043138202	6.8047016527778	...
	1053_at (RFC2)	5.6367240423770	5.6804917383948	7.0398860849256	5.294970895718	...
	117_at (HSPA6)	4.1171643698055	4.5920711060631	4.3485008861909	5.053302657583	...
	121_at (PAX8)	6.6147023378840	6.2484846716167	6.1686110527646	6.1116199642072	...

Bu çalışma, her bir analiz ve sonuç görselleştirme adımında kullanılan çeşitli yazılımlar vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Bunlardan R programlama dili, RStudio ve Bioconductor yazılımlarının son sürümleri indirildikten sonra DEGs ve GO analizleri R dili ile kodlanarak, bu iki analiz sonucuna göre bulguların PPI ağ analizi ve görselleştirme işlemleri ise STRING ve Cytoscape yazılımları aracılığıyla herhangi bir kod yazmadan ilgili araçlar yardımıyla yapılmıştır.

R programlama dili: Bu çalışmada yapılan DEGs analizi, GO analizi ve bu analizlerde elde edilen verilerin ve sonuçların grafiğe dökülmesi gibi işlemler Bioconductor paketleri indirilerek R programlama dili ile RStudio tümleşik geliştirme ortamı yazılımında kodlanmıştır. Çalışmadaki mikrodizi verilerinin kalite kontrolü, normalizasyonu, normalize edilmiş verilerin istatistiksel çözümlene kodları R programının 3.5.1 sürümünde yazılmıştır.

RStudio tümleşik geliştirme ortamı yazılımı: Bu çalışmada yapılan tüm veri analizi kodlamaları, RStudio tümleşik geliştirme ortamı yazılımının 1.1.456 sürümünde R dili kullanılarak yapılmıştır.

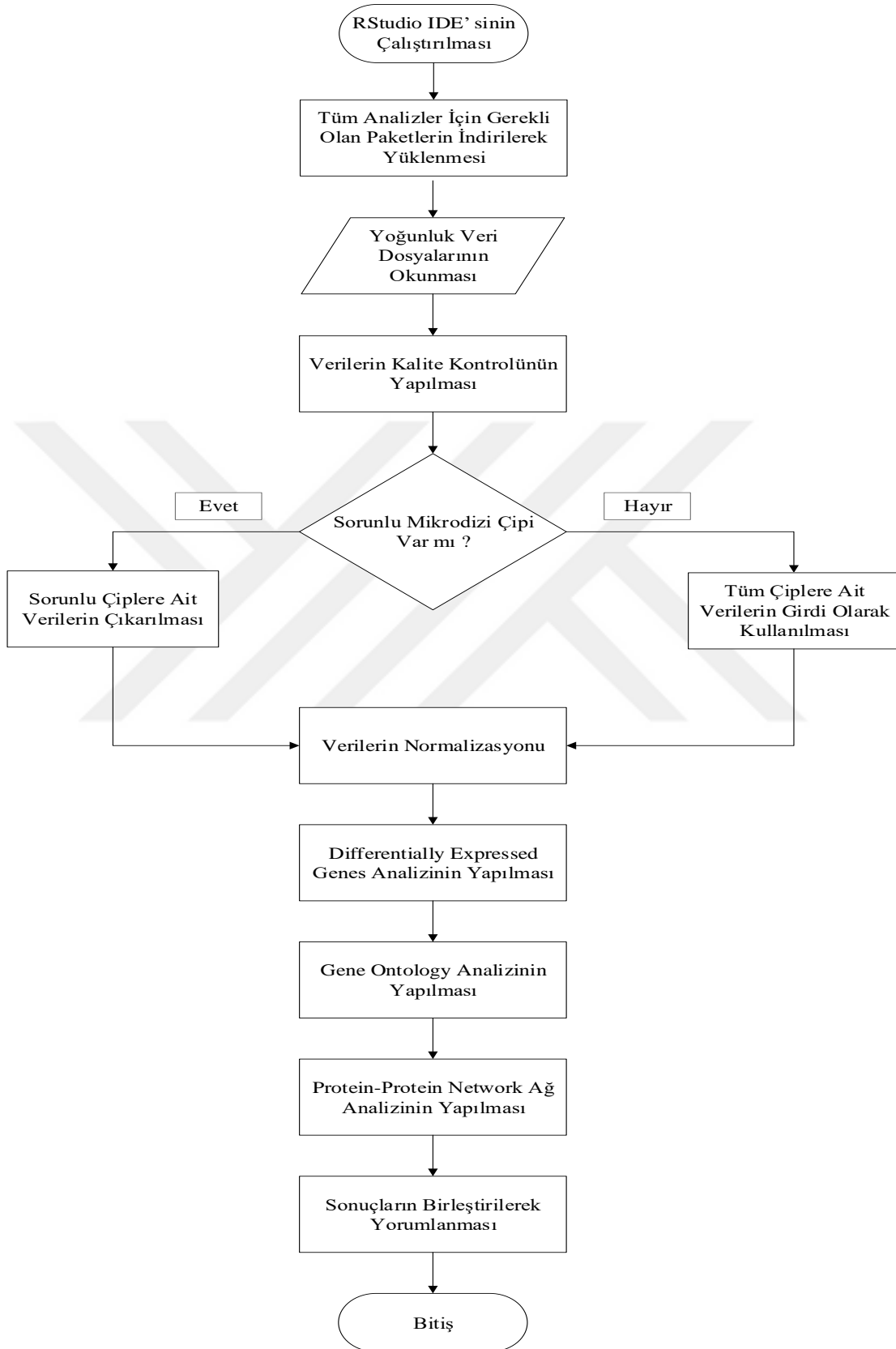
Bioconductor: Bu çalışmada yapılan tüm veri analizlerinde kullanılan fonksiyonel paketler Bioconductor' in 3.8 versiyonu aracılığıyla indirilmiş ve kullanılmıştır.

STRING veritabanı yazılımı: Bu çalışmada, önemli proteinler arası etkileşim ağları, STRING protein protein etkileşim veritabanı yazılımının 10.5 versiyonu kullanılarak kurulmuştur.

Cytoscape görselleştirme yazılımı: STRING protein protein etkileşim veritabanı yazılımı ile oluşturulan etkileşim ağları, Cytoscape yazılımının 3.7.0 versiyonu kullanılarak görselleştirilmiştir.

3.2. Yöntem

Bu çalışma süresince gerçekleştirilen analizlere ait işlem adımları Şekil 3.1' deki akış diyagramında görülmektedir.



Şekil 3.1. Mikrodizi analizi işlem adımları.

3.2.1. Differentially Expressed Genes (DEGs) analizi öncesi işlem adımları

Veriler üzerinde yapılacak olan analizlere geçmeden önce, analizlerde kullanılacak olan fonksiyonel komut setlerini içeren Bioconductor paketlerinin indirilerek yüklenmesi, daha önceden bilgisayara indirilen yoğunluk veri dosyalarının okunması ve bir değişkene aktarılması, verilerin kalite kontrolünün ve normalizasyonunun yapılması gerekmektedir.

Analizlerde kullanılacak Bioconductor paketlerinin indirilerek yüklenmesi: Tüm çalışma süresince; DEGs analizi için affy, affyio, affyQCReport, biomaRt, limma ve hgu133plus2.db paketleri, GO analizi için biomaRt, GO.db, Rgraphviz ve topGO paketleri kullanılmıştır.

Ham mikrodizi ifade yoğunluk verilerinin okunması: İlgili paketlerin indirilerek yüklenmesinden sonra ReadAffy() metodu ile mikrodizi yoğunluk veri dosyaları okunarak bir değişkene aktarılmış ve metin dosyası (txt uzantılı) olarak bilgisayara kaydedilmiştir.

Verilerin kalite kontrolü: Bu adımda, ham mikrodizi gen ifade verilerinin elde edilmesinde kullanılan mikrodizi çiplerinin kalite değerlendirilmesi yapılmıştır. R ortamı için oluşturulmuş olan affyQCReport paketi kullanılmış ve affyQARepor fonksiyonu ile çiplerin RLE ve NUSE kutu grafikleri elde edilmiştir.

Grafikler yardımıyla, yapılacak analizlere negatif etkisi olabilecek çiplerin olup olmadığı tespit edilmiştir.

Verilerin normalizasyonu: Kalite kontrolü yapılan ham ifade verilerinin normalizasyonu için, affy paketi ve Robust Multi-Array Average (RMA) fonksiyonu kullanılmıştır. RMA fonksiyonu, girdi olarak ham verileri alır ve sırasıyla arka plan düzeltme, kantil normalizasyonu (quantile normalisation) ve medyan parlatma yöntemini kullanarak özetleme (median polish summarization) işlemlerini yapar. Çıktı olarak log2 dönüşümleri de yapılmış ifade değerlerini verir.

Kantil normalizasyon yöntemi, prob yoğunluklarının her bir çip için aynı olacak biçimde dağılımlarını sağlar. Bu yöntemde, her çip için en büyük arka planı düzeltilmiş ve log2 dönüşümü yapılmış yoğunluklar belirlenir ve ortalaması alınır. Daha sonra ortalamaya katılan tüm değerler yerine bulunan ortalama koyulur. Bu işlem her bir çipte mevcut olan gen sayısı kadar tekrarlanır (Özkan ve Selçukcan Erol, 2017).

Bu yöntemde, ilk önce büyüklüklerine göre sıralanmış deneysel çip yoğunluk verilerinin ($q = (q_1, q_2, \dots, q_n)$ olmak üzere) ortalaması alınır. $y_{(1),j}^c \leq y_{(2),j}^c \leq \dots \leq y_{(m),j}^c$ c. grupta (c = A, B) j. çipte (j = 1, 2, ..., n) sıralanmış gen ifade değerlerini göstermek üzere, referans alınan çipin r. elemanı aşağıdaki gibi olsun (Qiu vd., 2013):

$$qr = \frac{1}{2n} \left(\sum_{k=1}^n y_{(r),k}^A + \sum_{l=1}^n y_{(r),l}^B \right) \quad (3.1) \text{ (Qiu vd., 2013)}$$

Denklem (3.1) deki orijinal ifade değerleri, aynı sırada yer alan referans çip girdisiyle yer değiştirir. , r_{ij}^c, y_{ij}^c nin çip içerisindeki sırasını göstermek üzere normalize edilmiş gen ifade değerleri aşağıdaki gibidir (Qiu vd., 2013) (Denklem 3.2) :

$$y_{ij}^{*c} = q_{r_{ij}^c} = \frac{1}{2n} \left(\sum_{k=1}^n y_{(r_{ij}^c),k}^A + \sum_{l=1}^n y_{(r_{ij}^c),l}^B \right) \quad (3.2) \text{ (Qiu vd., 2013)}$$

3.2.2. Differentially Expressed Genes (DEGs) analizi

Her bir veri setinde (GSE29721 ve GSE17548) yer alan gen ifade verileri için ayrı ayrı yapılan kalite kontrol ve normalizasyon işlemlerinin ardından DEGs analizleri yapılmıştır. Bu çalışmada, bahsi geçen metotlardan limma analiz metodu kullanılmıştır.

Önemli genlerin tespiti için, “limma” paketi R ortamına yüklenerek lineer bir model kurulmuştur. Analizde genlerin değişen ifadeleri için istatistiksel anlamlılık düzeyi (p değeri) 0.05 olarak seçilmiştir.

Her bir DEGs analizi sonucunda ifadesi değişen tüm genlerin listesi elde edilmiştir. GSE29721 nolu veri seti için yapılan analiz sonucunda elde edilen listeden logaritmik fold change (ifade kat değişimi) mutlak değeri 3 ve üzerinde olan genler seçilmiş ve bir sonraki analizde (GO analizi) girdi olarak kullanılmak üzere ayrı bir tabloda birleştirilmiştir. GSE17548 nolu veri seti için yapılan analiz sonucunda elde edilen listeden de log fold change (logaritmik ifade kat değişimi) mutlak değeri 2 ve üzerinde olan genler seçilmiş ve bir sonraki analizde (GO analizi) girdi olarak kullanılmak üzere ayrı bir tabloda birleştirilmiştir.

Ayrıca, her iki veri seti için de yapılan analizlerde ifadesi en az 2 kat azalan veya artan genlerin kesişimi alınmış ve kesişen genlere ait sayısal ve alfasayısal veriler ayrı bir tabloda birleştirilmiştir.

GO analizi için girdi olarak seçilen genler ayrıca çizelge haline dönüştürülmeden önce her bir gen için global olarak kullanılan gen sembolleri tespit edilmiştir.

3.2.3. Gene Ontology (GO) zenginleşim analizi

İfade düzeyleri anlamlı bir şekilde değişmiş genlerin ve değişen ifade düzeylerinin, biyolojik açıdan işaret ettiği anlamların ortaya konması amacıyla her bir veri seti için (GSE29721 ve GSE17548) ayrı ayrı GO zenginleşim analizi yapılmıştır. Bu analiz ile, ifadesi anlamlı olarak değişen genlerin ilişkili olduğu GO terimlerinin ve bunlara karşılık gelen sınıflamaların/süreçlerin bulunması amaçlanmıştır.

Yapılan GO çözümlemesinde, GO terimleri arasındaki yerel benzerlikleri ve bağımlılıkları elimine etmek için weight01 algoritması kullanılmış ve istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak 0.05 değeri seçilmiştir.

GSE29721 nolu veri seti için yapılan analizde, DEGs analizi sonucunda elde edilen ve ifadesi anlamlı olarak değişen (en az 3 kat artmış veya azalmış) genler arka plan girdisi olarak, her iki veri setinde de ifadesi anlamlı olarak değişen kesişim genleri ise aday liste girdisi olarak kullanılmıştır.

GSE17548 nolu veri seti için yapılan analizde, DEGs analizi sonucunda elde edilen ve ifadesi anlamlı olarak değişen (en az 2 kat artmış veya azalmış) genler arka plan girdisi olarak, her iki veri setinde de ifadesi anlamlı olarak değişen kesişim genleri ise aday liste girdisi olarak kullanılmıştır.

3.2.4. Protein-Protein Interaction (PPI) ağ analizi

Her iki veri seti (GSE29721 ve GSE17548) için yapılan DEGs analizinde istatistiksel çözümlenme ile elde edilen gen listelerinin sistem bazında incelenebilmesi için STRING veritabanı yazılımı kullanılarak protein – protein etkileşim ağları kurulmuştur.

GSE29721 nolu veri setinin DEGs analizi sonrasında ifadesi en az 3 kat artmış veya azalmış olan 66 gen için, GSE17548 nolu veri setinin DEGs analizi sonrasında ifadesi en az 2 kat artmış veya azalmış olan 26 gen için ve bu iki kümenin kesişiminde yer alan 12 gen için protein – protein etkileşim ağı kurulmuştur.

Ancak, STRING veritabanı tarafından tanımlanamayan genler ilgili etkileşim ağına dahil olmamıştır.

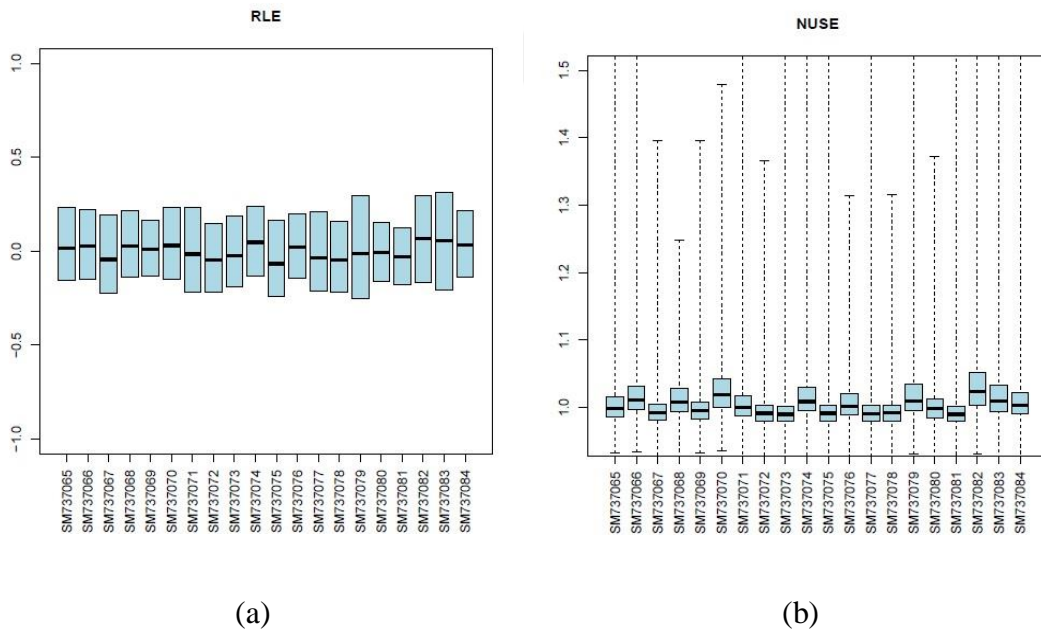
Bu ağlar yardımıyla, ifadesi anlamlı olarak değişen genlerin birbirleri arasındaki ilişkileri, bilinen ve tahmin edilen moleküler etkileşim bilgileri çerçevesinde ortaya konmaya çalışılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

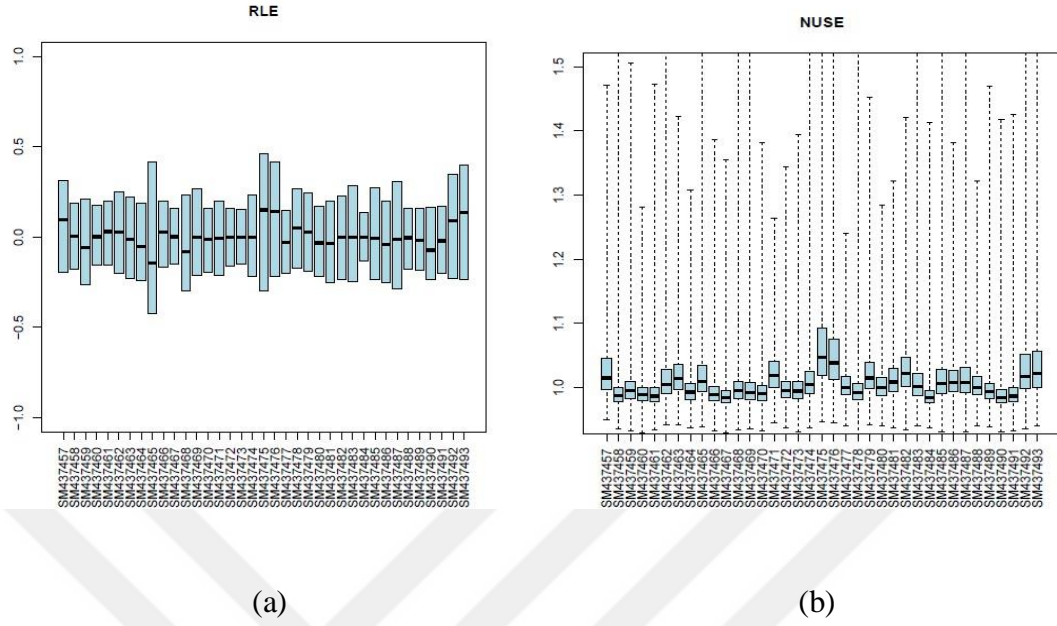
4.1. Mikrodizi Çiplerine Ait Kalite Değerlendirme Sonuçları

Mikrodizi çipleri için kalite değerlendirme araçları olan RLE ve NUSE grafikleri elde edilmiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).

Elde edilen RLE ve NUSE grafikleri incelendiğinde çiplere ait kutuların geniş yayılım göstermediği ve sırasıyla 0 (sıfır) ve 1 (bir) değerleri civarında ortalandığı gözlemlenmiştir. Yani, kalite açısından sorunlu bir mikrodizi çipinin bulunmadığı tespit edilmiş ve tüm çiplere ait veriler analizlere dahil edilmiştir.



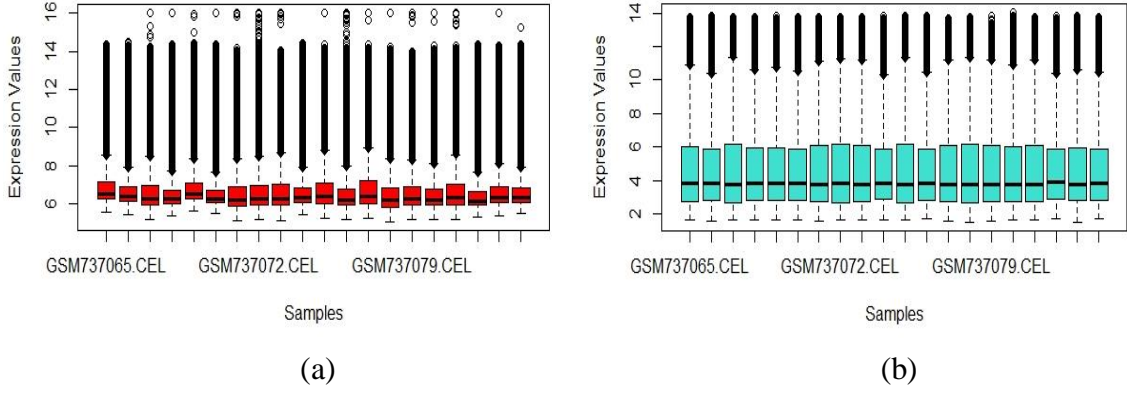
Şekil 4.1. GSE29721 numaralı mikrodizi çiplerine ait a) RLE ve b) NUSE kutu grafikleri



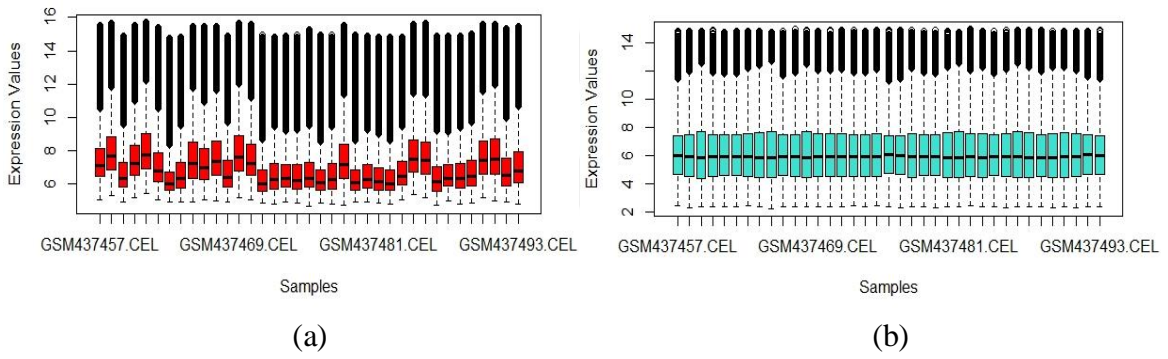
Şekil 4.2. GSE17548 numaralı mikrodizi çiplerine ait a) RLE ve b) NUSE kutu grafikleri

4.2. Normalizasyon Öncesi ve Sonrası İfade Değerleri

Normalizasyon işlemi öncesi \log_2 dönüşümü yapılmış ham ifade verilerinin farklı aralıklarda yayıldığı ve verilere ait medyan değerlerinin sabit olmadığı görülmüştür. Normalizasyon işlemi yapıldıktan sonra ise, GSE29721 nolu veri setindeki ifade değerlerinin medyanının yaklaşık 4 civarında, GSE17548 nolu veri setindeki ifade değerlerinin medyanının da yaklaşık 6 civarında sabitlendiği gözlemlenmiştir. Şekil 4.3 ve Şekil 4.4' te her iki veri setine ait verilerin normalizasyon öncesi ve sonrası gen ifade değerlerini gösteren kutu grafikleri görülmektedir.



Şekil 4.3. GSE29721 numaralı veri setinin a) normalizasyon öncesi ve b) normalizasyon sonrası log-dönüştürülmüş ifade değerlerini gösteren kutu grafikleri



Şekil 4.4. GSE17548 numaralı veri setinin a) normalizasyon öncesi ve b) normalizasyon sonrası log-dönüştürülmüş ifade değerlerini gösteren kutu grafikleri

4.3. Differentially Expressed Genes (DEGs) Analizi Sonuçları

Her bir veri seti (GSE29721 ve GSE17548) için kalite değerlendirmesi ve normalizasyonu yapılarak analize hazır hale getirilen veriler üzerinde, ifadesi değişen genler tespit edilmek üzere DEGs analizi yapılmıştır.

4.3.1. İlk veri seti (GSE29721) için yapılan DEGs analizi sonuçları

Analize tabi tutulan ilk veri seti, 10 sağlıklı ve 10 HCC tümörlü doku örneğinden alınmış mikrodizi verilerinden oluşmaktadır. Toplam gen sayısı 54675' tir.

Bu verilerin analizi sonrasında, 1368 tane genin ifadesinin bir kattan daha fazla arttığı ve 1286 tane genin ifadesinin bir kattan fazla azaldığı tespit edilmiştir. Bunlardan 25 tanesinin ifadesi 3 kattan fazla artış göstermiş, 60 tanesinin ifadesi ise 3 kattan fazla azalış göstermiştir. Bu 85 gen içerisinde tanımlanamayan genler çıkarıldıktan sonra 66 adet gen kalmıştır (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1. GSE29721 nolu veri setinde ifadesi 3 kattan fazla artmış gen listesi

Gen Sembolü	logFC (Kat Değişimi)	Açıklama
COCH	3.03	Cochlin
NUF2	3.03	Kinetochore complex component
CDK1	3.08	Cyclin dependent kinase 1
CENPF	3.11	Centromere protein F
NEK2	3.17	NIMA related kinase 2
MMP12	3.20	Matrix metalloproteinase 12
IGF2BP3	3.26	Insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 3
CTHRC1	3,26	Collagen triple helix repeat containing 1

Çizelge 4.1. GSE29721 nolu veri setinde ifadesi 3 kattan fazla artmış gen listesi (devam)

Gen Sembolü	logFC (Kat Değişimi)	Açıklama
ANLN	3,37	Anillin actin binding protein
REG3A	3,40	Regenerating family member 3 alpha
CCNB1	3.40	Cyclin B1
TOP2A	3.41	Topoisomerase (DNA) II alpha
ASPM	3.41	Abnormal spindle microtubule assembly
CDKN3	3.41	Cyclin dependent kinase inhibitor 3
ACSL4	3.46	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4
SULT1C2	3.46	Sulfotransferase family 1C member 2
CCL20	3.72	C-C motif chemokine ligand 20
GPC3	4.42	Glypican 3
SPINK1	4.55	Serine peptidase inhibitor Kazal type 1
PEG10	4.70	Paternally expressed 10

Çizelge 4.2. GSE29721 nolu veri setinde ifadesi 3 kattan fazla azalmış gen listesi

Gen Sembolü	logFC (Kat Değişimi)	Açıklama
RDH16	-3.00	Retinol dehydrogenase 16 (all-trans)
PCK1	-3.00	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1
ETNPPL	-3.05	Ethanolamine-phosphate phospho-lyase
SRD5A2	-3.07	Steroid 5 alpha-reductase 2
AKR1D1	-3.08	Aldo-keto reductase family 1 member D1
CLTRN	-3.10	Collectrin amino acid transport regulator

Çizelge 4.2. GSE29721 nolu veri setinde ifadesi 3 kattan fazla azalmış gen listesi (devam)

Gen Sembolü	logFC (Kat Değişimi)	Açıklama
CYP26A1	-3.12	Cytochrome P450 family 26 subfamily A member 1
MFSD2A	-3.14	Major facilitator superfamily domain containing 2A
CYP2A6	-3.15	Cytochrome P450 family 2 subfamily A member 6
CLEC4G	-3.17	C-type lectin domain family 4 member G
CLRN3	-3.19	Clarin 3
LCAT	-3.21	Lecithin-cholesterol acyltransferase
BBOX1	-3.26	Gamma-butyrobetaine hydroxylase 1
GLS2	-3.30	Glutaminase 2
SLC25A47	-3.31	Solute carrier family 25 member 47
KCNN2	-3.33	Potassium calcium-activated channel subfamily N member 2
CYP8B1	-3.35	Cytochrome P450 family 8 subfamily B member 1
C9	-3.40	Complement component 9
CLEC4M	-3.41	C-type lectin domain family 4 member M
AFM	-3.41	Afamin
OIT3	-3.41	Oncoprotein induced transcript 3
SDS	-3.42	Serine dehydratase
ADH1B	-3.44	Alcohol dehydrogenase 1B (class I) beta polypeptide
GLYAT	-3.46	Glycine-N-acyltransferase
TAT	-3.48	Tyrosine aminotransferase
HAO2	-3.48	Hydroxyacid oxidase 2
ALDOB	-3.48	Aldolase fructose-bisphosphate B
FCN2	-3.49	Ficolin 2
CRHBP	-3.51	Corticotropin releasing hormone binding protein
GYS2	-3.53	Glycogen synthase 2

Çizelge 4.2. GSE29721 nolu veri setinde ifadesi 3 kattan fazla azalmış gen listesi (devam)

Gen Sembolü	logFC (Kat Değişimi)	Açıklama
CYP1A2	-3.54	Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 2
FCN3	-3.54	Ficolin 3
C3P1	-3.56	Complement component 3 precursor pseudogene
NAT2	-3.59	N-acetyltransferase 2
SLC22A1	-3.60	Solute carrier family 22 member 1
CXCL14	-3.63	C-X-C motif chemokine ligand 14
APOF	-3.68	Apolipoprotein F
LINC01093	-3.69	Long intergenic non-protein coding RNA 1093
CLEC1B	-3.71	C-type lectin domain family 1 member B
MT1M	-3.83	Metallothionein 1M
CNDP1	-3.93	Carnosine dipeptidase 1
TTC36	-3.94	Tetratricopeptide repeat domain 36
GBA3	-3.97	Glucosylceramidase beta 3 (gene/pseudogene)
LINC00844	-4.10	Long intergenic non-protein coding RNA 844
HAMP	-4.31	Hepcidin antimicrobial peptide
THRSP	-4.60	Thyroid hormone responsive

4.3.2. İkinci veri seti (GSE17548) için yapılan DEGs analizi sonuçları

Analize tabi tutulan ikinci veri seti, 20 sirozlu ve 17 HCC tümörlü doku örneğinden alınmış mikrodizi verilerinden oluşmaktadır. Toplam gen sayısı 54675' tir.

Bu verilerin analizi sonrasında, 171 tane genin ifadesinin bir kattan daha fazla arttığı ve 383 tane genin ifadesinin bir kattan fazla azaldığı tespit edilmiştir. Bunlardan 10 tanesinin

ifadesi 2 kattan fazla artış göstermiş, 21 tanesinin ifadesi ise 2 kattan fazla azalış göstermiştir. Bu 31 gen içerisinde tanımlanamayan genler çıkarıldıktan sonra 26 adet gen kalmıştır (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4).

Çizelge 4.3. GSE17548 nolu veri setinde ifadesi 2 kattan fazla artmış gen listesi

Gen Sembolü	logFC (Kat Değişimi)	Açıklama
RRM2	2.05	Ribonucleotide reductase regulatory subunit M2
ANLN	2.06	Anillin actin binding protein
TTK	2.10	TTK protein kinase
MAGEA6	2.13	MAGE family member A6
TOP2A	2.20	Topoisomerase (DNA) II alpha
ASPM	2.51	Abnormal spindle microtubule assembly
DUXAP10	2.64	Double homeobox A pseudogene 10
SPINK1	3.02	Serine peptidase inhibitor, Kazal type 1

Çizelge 4.4. GSE17548 nolu veri setinde ifadesi 2 kattan fazla azalmış gen listesi

Gen Sembolü	logFC (Kat Değişimi)	Açıklama
CLTRN	-2.00	Collectrin amino acid transport regulator
APOF	-2.01	Apolipoprotein F
RIPOR3	-2.01	RIPOR family member 3
SRPX	-2.03	Sushi repeat containing protein X-linked
DCN	-2.08	Decorin
JCHAIN	-2.15	Joining chain of multimeric IgA and IgM
THRSP	-2.15	Thyroid hormone responsive
CLEC4G	-2.16	C-type lectin domain family 4 member G
CYP1A2	-2.18	Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 2

Çizelge 4.4. GSE17548 nolu veri setinde ifadesi 2 kattan fazla azalmış gen listesi (devam)

Gen Sembolü	logFC (Kat Değişimi)	Açıklama
OIT3	-2.25	Oncoprotein induced transcript 3
GREM2	-2.28	Gremlin 2, DAN family BMP antagonist
LINC01093	-2.29	Long intergenic non-protein coding RNA 1093
SLCO1B3	-2.33	Solute carrier organic anion transporter family member 1B3
CRHBP	-2.33	Corticotropin releasing hormone binding protein
FCN3	-2.35	Ficolin 3
FCN2	-2.40	Ficolin 2
C7	-2.41	Complement C7
CXCL14	-2.46	C-X-C motif chemokine ligand 14

4.3.3. Her iki veri seti için yapılan DEGs analizleri sonucunda ifadesi en çok değişmiş genlerin kesişim kümesi

Yapılan analizlerin temel amacı, karaciğerin fiziksel ve işlevsel hasara uğramaya başlaması ile kanser tümörlerinin oluşarak yayılmaya başlaması arasında geçen süreçte ifade değerleri anlamlı olarak değişen hedef genleri tespit etmek olduğundan üzerinde çalışılan iki veri setiyle ilgili DEGs analizlerinin sonucunda ortaya koyulan gen listelerinde yer alan ortak genler seçilmiştir.

Bunun için, analize tabi tutulan ilk veri seti (GSE29721) içerisinde logFC mutlak değeri 3 ve daha fazla olan genler ile analize tabi tutulan ikinci veri seti (GSE17548) içerisinde logFC mutlak değeri 2 ve daha fazla olan genlerin kesişim kümesi alınmıştır. Bu kümede toplam 12 adet gen bulunmakta olup, bunlardan dördünün ifadesi artmış kalan sekiz tanesinin de ifadesi azalmıştır (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Çalışılan iki veri seti (GSE29721 ve GSE17548) için yapılan analiz sonuçlarının kesişim kümesi

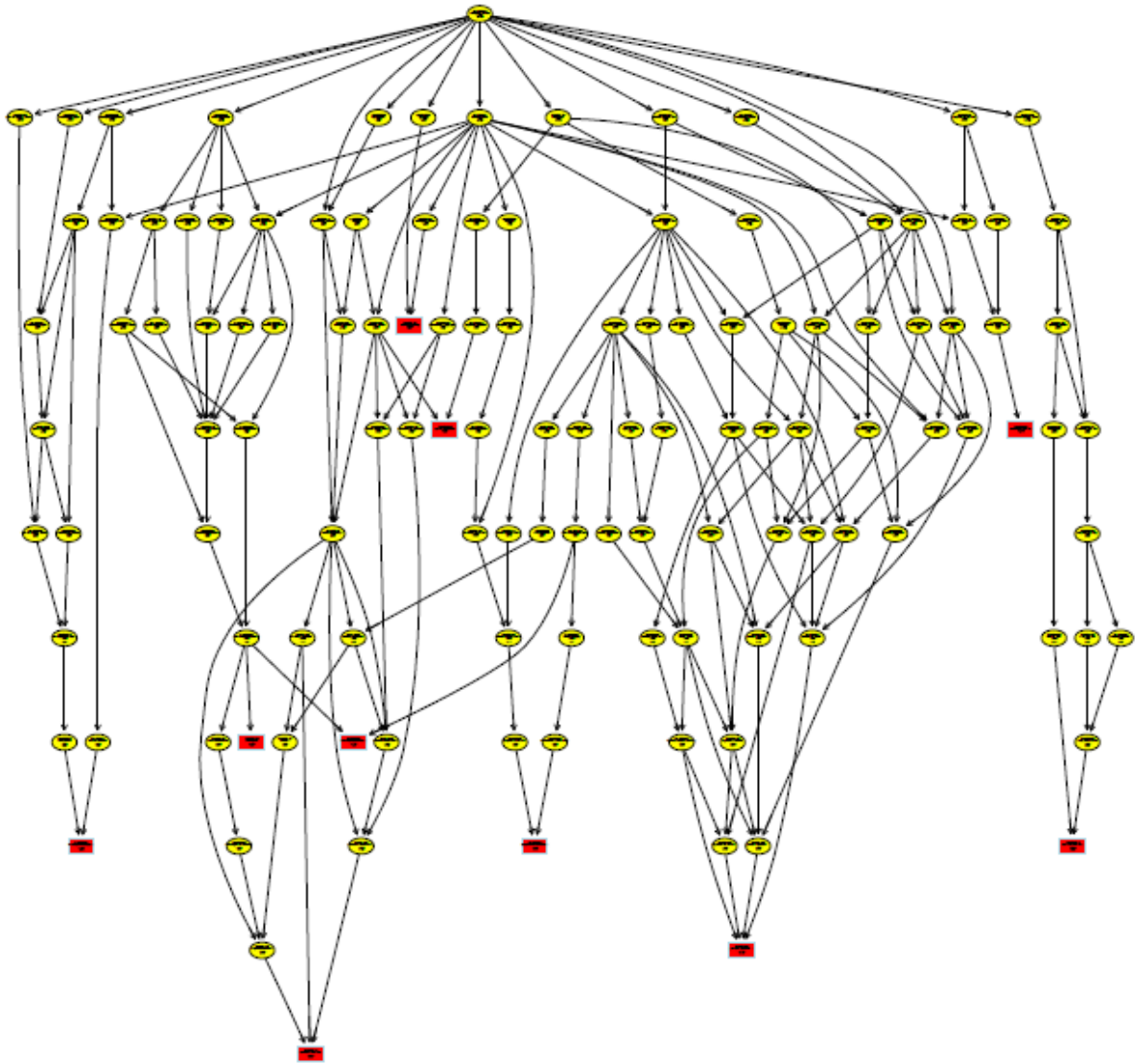
Gen Sembolü	logFC (Kat Değişimi - GSE29721 için)	logFC (Kat Değişimi – GSE17548 için)	Açıklama
ANLN	3.37	2.06	Anillin actin binding protein
TOP2A	3.41	2.20	Topoisomerase (DNA) II alpha
ASPM	3.41	2.51	Abnormal spindle microtubule assembly
SPINK1	4.55	3.02	Serine peptidase inhibitor Kazal type 1
CXCL14	-3.63	-2.46	C-X-C motif chemokine ligand 14
LINC01093	-3.69	-2.29	Long intergenic non-protein coding RNA 1093
OIT3	-3.41	-2.25	Oncoprotein induced transcript 3
CLEC4G	-3.17	-2.16	C-type lectin domain family 4 member G
THRSP	-4.60	-2.15	Thyroid hormone responsive
APOF	-3.68	-2.01	Apolipoprotein F
CLTRN	-3.10	-2.00	Collectrin amino acid transport regulator
FCN3	-3.54	-2.35	Ficolin 3

4.4. Gene Ontology (GO) Analizi Sonuçları

Kullanılan her iki veri seti için de DEGs analizi sonucunda ifadesi anlamlı olarak değişen ve logaritmik kat değişim oranlarına göre sıralanan genler girdi olmak üzere GO analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar ayrı ayrı ve bir bütün halinde incelenmiştir.

4.4.1. İlk veri seti (GSE29721) için yapılan GO analizi sonuçları

GSE29721 nolu veri seti için yapılan GO analizi sonucunda 1194 adet yolak bulunmuştur. Bu yolaclardan en önemli 125 tanesinin birbirleriyle olan ilişkisi Şekil 4.5' te görülmektedir.



Şekil 4.5. En önemli 125 GO yolağının birbirleriyle ilişkisini gösteren şema (Yolak arkaplan renkleri önem derecesine göre açık sarıdan koyu kırmızıya doğru değişmektedir: **açık sarı**: az önemli, **koyu kırmızı**: çok önemli)

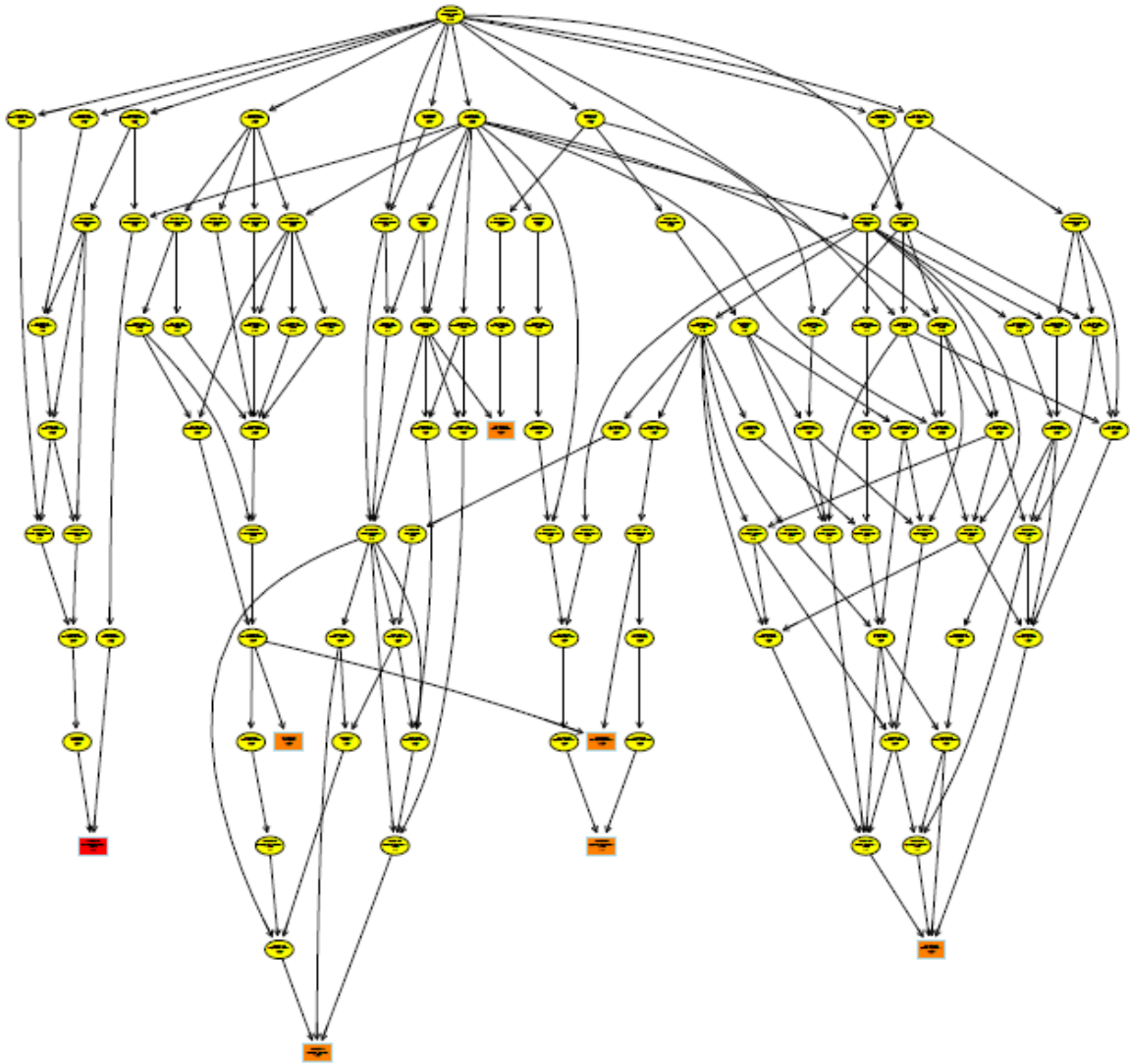
Şekil 4.5 incelendiğinde, en önemli 125 GO yolağı içinde 10 tanesinin istatistikî anlamlılığının yüksek olduğu görülmektedir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. GSE29721 nolu veri seti için yapılan GO analizi sonucunda bulunan en önemli 10 yolak.

Yolak ID	Yolak Tanımı (Annotation)	Ağda Eşleşen Proteinler	Genlerin İfade Değişim Yönü
GO: 0007267	Cell-cell signaling	ASPM, CLTRN, CRHBP, CXCL14	ASPM geninin ifadesi artmış, diğer genlerin ifadeleri azalmıştır.
GO: 0051653	Spindle localization	ASPM	Artmış.
GO: 0006974	Cellular response to DNA damage stimulus	TOP2A	Artmış.
GO: 0006266	DNA ligation	TOP2A	Artmış.
GO: 0006265	DNA topological change	TOP2A	Artmış.
GO: 0046718	Viral entry into host cell	CLEC4G, FCN3	Azalmış.
GO: 0030263	Apoptotic chromosome condensation	TOP2A	Artmış.
GO: 0002244	Hematopoietic progenitor cell differentiation	ANLN, TOP2A	Artmış.
GO: 0035543	Positive regulation of SNARE complex assembly	CLTRN	Azalmış.
GO: 0000712	Resolution of meiotic recombination intermediates	TOP2A	Artmış.

4.4.2. İkinci veri seti (GSE17548) için yapılan GO analizi sonuçları

GSE17548 nolu veri seti için yapılan GO analizi sonucunda 2198 adet yolak bulunmuştur. Bu yolaklardan en önemli 106 tanesinin birbirleriyle olan ilişkisi Şekil 4.6' da görülmektedir.



Şekil 4.6. En önemli 106 GO yolağının birbirleriyle ilişkisini gösteren şema (Yolak arkaplan renkleri önem derecesine göre açık sarıdan koyu kırmızıya doğru değişmektedir: **açık sarı**: az önemli, **koyu kırmızı**: çok önemli)

Şekil 4.6 incelendiğinde, en önemli 106 GO yolağı içinde 7 tanesinin istatistiksel anlamlılığının yüksek olduğu görülmektedir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. GSE17548 nolu veri seti için yapılan GO analizi sonucunda bulunan en önemli 7 yolak

Yolak ID	Yolak Tanımı (Annotation)	Ağda Eşleşen Proteinler	Genlerin İfade Değişim Yönü
GO: 0051653	Spindle localization	ASPM	Artmış.
GO: 0006266	DNA ligation	TOP2A	Artmış.
GO: 0006265	DNA topological change	TOP2A	Artmış.
GO: 0030263	Apoptotic chromosome condensation	TOP2A	Artmış.
GO: 0002244	Hematopoietic progenitor cell differentiation	ANLN, TOP2A	Artmış.
GO: 0035543	Positive regulation of SNARE complex assembly	CLTRN	Azalmış.
GO: 0000712	Resolution of meiotic recombination intermediates	TOP2A	Artmış.

4.4.3. Kullanılan iki veri seti için yapılan GO analizi sonuçları

Her iki veri seti için yapılan GO analizi sonucunda ifadesi en çok artan toplam 23 gen için 31 adet biyolojik süreç zenginleşim yolağı ve 8 adet hücrenel bileşen zenginleşim yolağı bulunmuştur (Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9). İfadesi en çok azalan toplam 47 gen için ise 21 adet biyolojik süreç zenginleşim yolağı, 5 adet hücrenel bileşen zenginleşim yolağı ve 6 adet moleküler fonksiyon zenginleşim yolağı bulunmuştur (Çizelge 4.10, Çizelge 4.11 ve Çizelge 4.12).

Çizelge 4.8. İfadesi en çok artan toplam 23 genin biyolojik süreç zenginleşim analizi sonuçları

Yolak ID	Yolak Tanımı (Annotation)	Gözlenen Protein Sayısı	Ağda Eşleşen Proteinler
GO.0051301	Cell division	8	ANLN, ASPM, CCNB1, CDK1, CENPF, NEK2, NUF2, TOP2A
GO.1903047	Mitotic cell cycle process	9	ANLN, ASPM, CCNB1, CDKN3, CENPF, NUF2, RRM2, TOP2A, TTK
GO.0000278	Mitotic cell cycle	9	ANLN, ASPM, CCNB1, CDKN3, CENPF, NUF2, RRM2, TOP2A, TTK
GO.0000280	Nuclear division	7	ANLN, ASPM, CCNB1, CDK1, CENPF, NUF2, TOP2A
GO.0044772	Mitotic cell cycle phase transition	6	CCNB1, CDK1, CDKN3, CENPF, NEK2, RRM2
GO.0051983	Regulation of chromosome segregation	4	CCNB1, CENPF, NEK2, TTK
GO.0007067	Mitotic nuclear division	6	ANLN, ASPM, CCNB1, CDK1, CENPF, NUF2
GO.0007059	Chromosome segregation	5	CCNB1, CENPF, NUF2, TOP2A, TTK
GO.0051439	Regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in mitotic cell cycle	4	CCNB1, CDK1, CENPF, TTK
GO.0051726	Regulation of cell cycle	8	ANLN, ASPM, CCNB1, CDKN3, CENPF, NEK2, TOP2A, TTK
GO.0042176	Regulation of protein catabolic process	6	CCNB1, CDK1, CENPF, GPC3, TIMP1, TTK

Çizelge 4.8. İfadesi en çok artan toplam 23 genin biyolojik süreç zenginleşim analizi sonuçları (devam)

Yolak ID	Yolak Tanımı (Annotation)	Gözlenen Protein Sayısı	Ağda Eşleşen Proteinler
GO.0022402	Cell cycle process	8	ANLN, ASPM, CCNB1, CDKN3, CENPF, NUF2, RRM2, TOP2A
GO.0007346	Regulation of mitotic cell cycle	6	ANLN, CCNB1, CENPF, NEK2, TOP2A, TTK
GO.0051302	Regulation of cell division	5	ANLN, ASPM, CENPF, NEK2, TTK
GO.0007088	Regulation of mitotic nuclear division	4	ANLN, CENPF, NEK2, TTK
GO.0051340	Regulation of ligase activity	4	CCNB1, CDK1, CENPF, TTK
GO.0000086	G2/M transition of mitotic cell cycle	4	CCNB1, CDK1, CENPF, NEK2
GO.0007093	Mitotic cell cycle checkpoint	4	CDK1, CENPF, TOP2A, TTK
GO.0000082	G1/S transition of mitotic cell cycle	4	CCNB1, CDK1, CDKN3, RRM2
GO.0007049	Cell cycle	8	ANLN, ASPM, CCNB1, CDKN3, CENPF, NUF2, RRM2, TOP2A
GO.0048519	Negative regulation of biological process	13	ACSL4, ASPM, CCNB1, CDKN3, CENPF, CTHRC1, IGF2BP3, NEK2, PEG10, REG3A, TIMP1, TOP2A, TTK
GO.0042127	Regulation of cell proliferation	8	ASPM, CCNB1, CDKN3, CTHRC1, GPC3, REG3A, TIMP1, TTK

Çizelge 4.8. İfadesi en çok artan toplam 23 genin biyolojik süreç zenginleşim analizi sonuçları (devam)

Yolak ID	Yolak Tanımı (Annotation)	Gözlenen Protein Sayısı	Ağda Eşleşen Proteinler
GO.0051782	Negative regulation of cell division	3	ASPM, CENPF, TTK
GO.0051988	Regulation of attachment of spindle microtubules to kinetochore	2	CCNB1, NEK2
GO.0000819	Sister chromatid segregation	3	CCNB1, NEK2, TOP2A
GO.0045786	Negative regulation of cell cycle	5	CDK1, CDKN3, CENPF, TOP2A, TTK
GO.0030162	Regulation of proteolysis	6	CCNB1, CDK1, CENPF, GPC3, TIMP1, TTK
GO.0031145	Anaphase-promoting complex-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	3	CCNB1, CDK1, NEK2
GO.0008284	Positive regulation of cell proliferation	6	ASPM, CCNB1, CTHRC1, REG3A, TIMP1, TTK
GO.0048523	Negative regulation of cellular process	12	ASPM, CCNB1, CDKN3, CENPF, CTHRC1, IGF2BP3, NEK2, PEG10, REG3A, TIMP1, TOP2A, TTK
GO.1901990	Regulation of mitotic cell cycle phase transition	4	ANLN, CCNB1, CENPF, TTK

Çizelge 4.9. İfadesi en çok artan toplam 23 genin hücresel bileşen zenginleşim analizi sonuçları

Yolak ID	Yolak Tanımı (Annotation)	Gözlenen Protein Sayısı	Ağda Eşleşen Proteinler
GO.0005819	Spindle	6	ASPM, CCNB1, CDK1, CENPF, NEK2, TTK
GO.0000793	Condensed chromosome	5	CCNB1, CENPF, NEK2, NUF2, TOP2A
GO.0000777	Condensed chromosome kinetochore	4	CCNB1, CENPF, NEK2, NUF2
GO.0000779	Condensed chromosome, centromeric region	4	CCNB1, CENPF, NEK2, NUF2
GO.0000922	Spindle pole	4	ASPM, CCNB1, CENPF, NEK2
GO.0030496	Midbody	4	ASPM, CDK1, CENPF, NEK2
GO.0000940	Condensed chromosome outer kinetochore	2	CCNB1, CENPF
GO.0044430	Cytoskeletal part	7	ANLN, ASPM, CCNB1, CDK1, CENPF, NEK2, TTK

Çizelge 4.10. İfadesi en çok azalan toplam 47 genin biyolojik süreç zenginleşim analizi sonuçları

Yolak ID	Yolak Tanımı (Annotation)	Gözlenen Protein Sayısı	Ağda Eşleşen Proteinler
GO.0032787	Monocarboxylic acid metabolic process	13	AKR1D1, ALDOB, BBOX1, CYP1A2, CYP26A1, CYP2A6, CYP8B1, DCN, GLYAT, HAO2, PCK1, SDS, SLCO1B3
GO.0019752	Carboxylic acid metabolic process	14	AKR1D1, ALDOB, BBOX1, CYP1A2, CYP26A1, CYP2A6, CYP8B1, DCN, GLYAT, HAO2, PCK1, SDS, SLCO1B3, TAT
GO.0044281	Small molecule metabolic process	20	ADH1B, AKR1D1, ALDOB, APOF, BBOX1, CYP1A2, CYP26A1, CYP2A6, CYP8B1, GBA3, GLYAT, GYS2, HAO2, LCAT, NAT2, PCK1, SDS, SLC22A1, SLCO1B3, TAT
GO.0044710	Single-organism metabolic process	26	ADH1B, AKR1D1, ALDOB, APOF, BBOX1, C7, C9, CYP1A2, CYP26A1, CYP2A6, CYP8B1, FCN2, FCN3, GBA3, GLYAT, GYS2, HAO2, LCAT, NAT2, PCK1, RDH16, SDS, SLC22A1, SLCO1B3, TAT, THRSP
GO.0043436	Oxoacid metabolic process	13	AKR1D1, ALDOB, BBOX1, CYP1A2, CYP26A1, CYP2A6, CYP8B1, GLYAT, HAO2, PCK1, SDS, SLCO1B3, TAT
GO.0006805	Xenobiotic metabolic process	7	ADH1B, CYP1A2, CYP26A1, CYP2A6, CYP8B1, GLYAT, NAT2

Çizelge 4.10. İfadesi en çok azalan toplam 47 genin biyolojik süreç zenginleşim analizi sonuçları (devam)

Yolak ID	Yolak Tanımı (Annotation)	Gözlenen Protein Sayısı	Ağda Eşleşen Proteinler
GO.0071466	Cellular response to xenobiotic stimulus	7	ADH1B, CYP1A2, CYP26A1, CYP2A6, CYP8B1, GLYAT, NAT2
GO.0006629	Lipid metabolic process	13	AKR1D1, APOF, CYP1A2, CYP26A1, CYP2A6, CYP8B1, GBA3, HAO2, LCAT, PCK1, RDH16, SLCO1B3, THRSP
GO.0008202	Steroid metabolic process	7	AKR1D1, APOF, CYP1A2, CYP2A6, CYP8B1, LCAT, SLCO1B3
GO.0044283	Small molecule biosynthetic process	8	AKR1D1, BBOX1, CYP8B1, DCN, GLS2, LCAT, PCK1, SDS
GO.0006956	Complement activation	4	C7, C9, FCN2, FCN3
GO.0055114	Oxidation-reduction process	11	ADH1B, AKR1D1, ALDOB, BBOX1, CYP1A2, CYP26A1, CYP2A6, CYP8B1, GYS2, HAO2, RDH16
GO.1901615	Organic hydroxy compound metabolic process	8	ADH1B, AKR1D1, APOF, BBOX1, CYP8B1, LCAT, PCK1, SLCO1B3
GO.0006959	Humoral immune response	5	C7, C9, FCN2, FCN3, IGJ
GO.0046394	Carboxylic acid biosynthetic process	6	AKR1D1, BBOX1, CYP8B1, DCN, GLS2, SDS
GO.0072330	Monocarboxylic acid biosynthetic process	5	AKR1D1, BBOX1, CYP8B1, DCN, SDS

Çizelge 4.10. İfadesi en çok azalan toplam 47 genin biyolojik süreç zenginleşim analizi sonuçları (devam)

Yolak ID	Yolak Tanımı (Annotation)	Gözlenen Protein Sayısı	Ağda Eşleşen Proteinler
GO.0010038	Response to metal ion	6	ALDOB, CRHBP, CYP1A2, LCAT, MT1M, TAT
GO.1901617	Organic hydroxy compound biosynthetic process	5	AKR1D1, BBOX1, CYP8B1, LCAT, PCK1
GO.0044711	Single-organism biosynthetic process	11	AKR1D1, ALDOB, BBOX1, CYP1A2, CYP8B1, DCN, GLS2, GYS2, LCAT, PCK1, SDS
GO.0050896	Response to stimulus	27	ADH1B, ALDOB, C7, C9, CLEC1B, CLEC4M, CRHBP, CXCL14, CYP1A2, CYP26A1, CYP2A6, CYP8B1, DCN, FCN2, FCN3, GLYAT, GREM2, GYS2, HAMP, IGJ, LCAT, MT1M, NAT2, PCK1, SLC22A1, SRPX, TAT
GO.0044712	Single-organism catabolic process	9	AKR1D1, ALDOB, CYP1A2, CYP26A1, CYP2A6, DCN, GBA3, SDS, TAT

Çizelge 4.11. İfadesi en çok azalan toplam 47 genin hücresel bileşen zenginleşim analizi sonuçları

Yolak ID	Yolak Tanımı (Annotation)	Gözlenen Protein Sayısı	Ağda Eşleşen Proteinler
GO.0072562	Blood microparticle	5	AFM, C9, FCN2, FCN3, IGJ
GO.0005615	Extracellular space	12	AFM, APOF, C9, CRHBP, CXCL14, DCN, FCN2, FCN3, GREM2, HAMP, IGJ, LCAT
GO.0005576	Extracellular region	22	AFM, AKR1D1, ALDOB, APOF, BBOX1, C7, C9, CLEC4M, CLRN3, CNDP1, CRHBP, CXCL14, DCN, FCN2, FCN3, GLYAT, GREM2, HAMP, HAO2, IGJ, LCAT, PCK1
GO.0044421	Extracellular region part	20	AFM, AKR1D1, ALDOB, APOF, BBOX1, C7, C9, CLRN3, CRHBP, CXCL14, DCN, FCN2, FCN3, GLYAT, GREM2, HAMP, HAO2, IGJ, LCAT, PCK1
GO.0005579	Membrane attack complex	2	C7, C9

Çizelge 4.12. İfadesi en çok azalan toplam 47 genin moleküler fonksiyon zenginleşim analizi sonuçları.

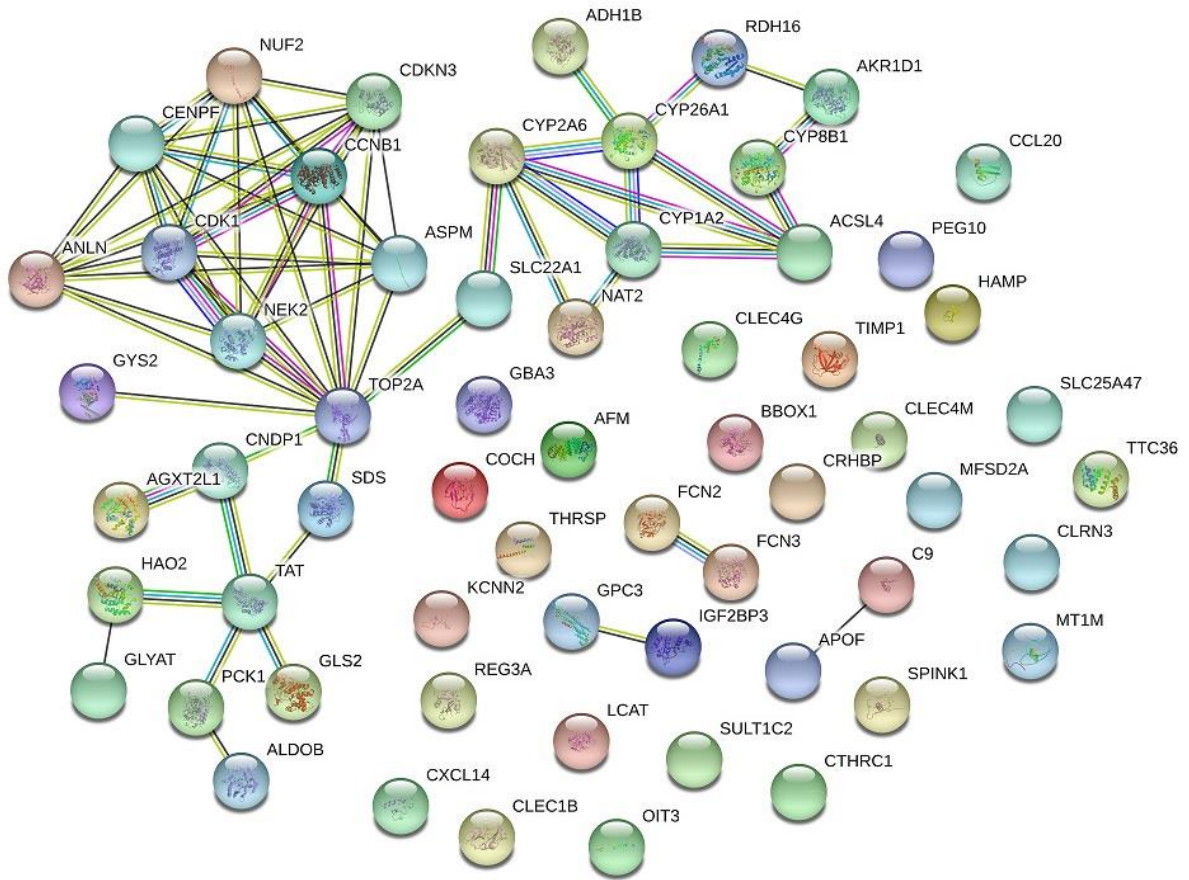
Yolak ID	Yolak Tanımı (Annotation)	Gözlenen Protein Sayısı	Ağda Eşleşen Proteinler
GO.0003823	Antigen binding	4	CLEC4M, FCN2, FCN3, IGJ
GO.0016491	Oxidoreductase activity	9	ADH1B, AKR1D1, BBOX1, CYP1A2, CYP26A1, CYP2A6, CYP8B1, HAO2, RDH16
GO.0005506	Iron ion binding	5	BBOX1, CYP1A2, CYP26A1, CYP2A6, CYP8B1
GO.0016705	Oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	5	BBOX1, CYP1A2, CYP26A1, CYP2A6, CYP8B1
GO.0030246	Carbohydrate binding	6	ALDOB, CLEC1B, CLEC4G, CLEC4M, FCN2, FCN3
GO.0004497	Monooxygenase activity	4	CYP1A2, CYP26A1, CYP2A6, CYP8B1

4.5. Protein - Protein Interaction (PPI) Analizi Sonuçları

Kullanılan her iki veri seti için de DEGs analizi sonucunda ifadesi anlamlı olarak değişen ve logaritmik kat değişim oranlarına göre sıralanan genler girdi olmak üzere protein – protein etkileşim analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar ayrı ayrı ve bir bütün halinde aşağıda incelenmiştir.

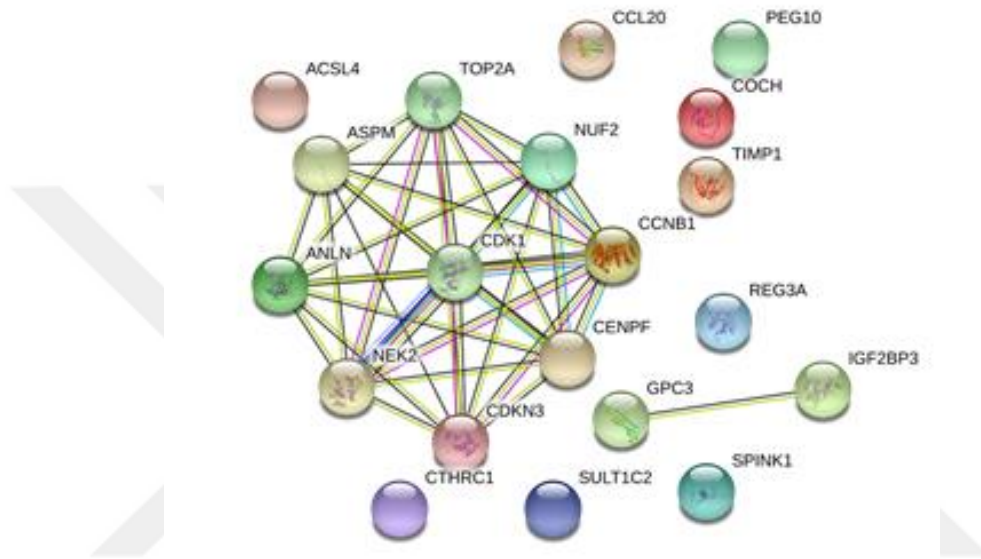
4.5.1. GSE29721 nolu veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok değişen genlerin protein – protein etkileşim analizi sonuçları

GSE29721 nolu veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok artan ve azalan toplam 85 gen tespit edilmişti. Bunlardan tanınan ve diğer genlerle etkileşimleri bilinen 61 tanesinin protein – protein etkileşim haritası Şekil 4.7’ de görülmektedir.

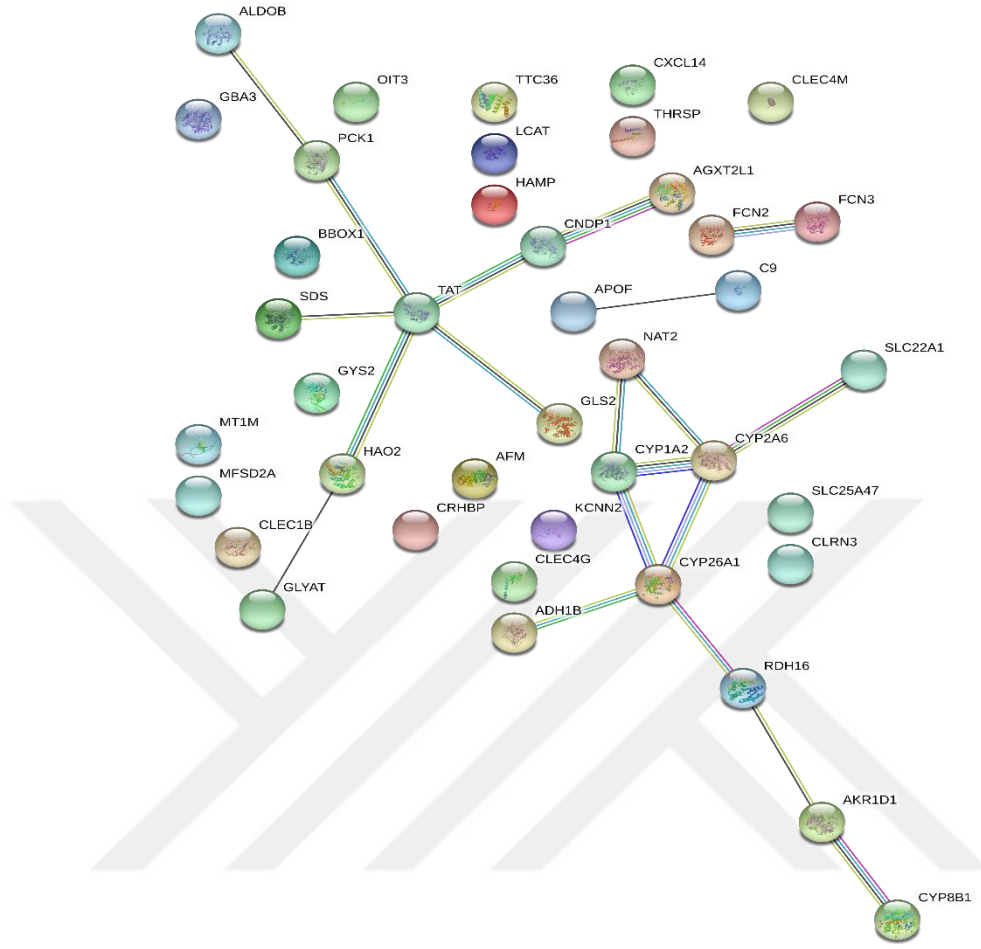


Şekil 4.7. GSE29721 nolu veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok değişen ve tanınan 61 genin protein – protein etkileşim haritası (pembe, turkuaz: bilinen etkileşimler; yeşil, kırmızı, mavi: tahmin edilen etkileşimler, yeşil: gen komşuluğu, siyah: ifade birlikteliği, sarı: metin madenciliği yöntemiyle belirlenmiş etkileşim.)

Bu genlerden, bkz. Çizelge 4.1' de yer alan ifadesi 3 kattan fazla artmış olanlar arasında kurulan protein – protein etkileşim haritası Şekil 4.8' de ve bkz. Çizelge 4.2' de yer alan ifadesi 3 kattan fazla azalmış olanlar arasında kurulan protein – protein etkileşim haritası Şekil 4.9' da görülmektedir.



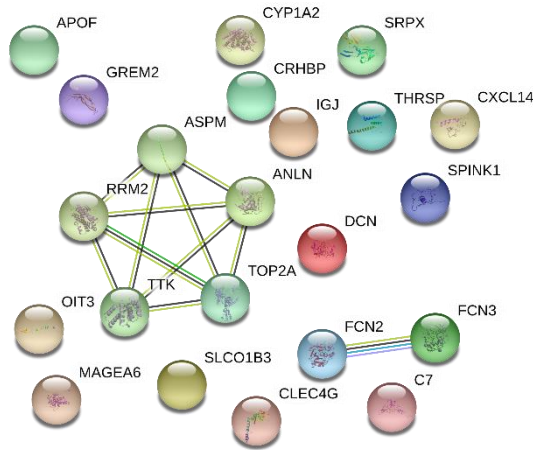
Şekil 4.8. GSE29721 nolu veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok artan 20 genin protein – protein etkileşim haritası (pembe, turkuaz: bilinen etkileşimler; yeşil, kırmızı, mavi: tahmin edilen etkileşimler, yeşil: gen komşuluğu, siyah: ifade birlikteliği, sarı: metin madenciliği yöntemiyle belirlenmiş etkileşim.)



Şekil 4.9. GSE29721 nolu veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok azalan 41 genin protein – protein etkileşim haritası (pembe, turkuaz: bilinen etkileşimler; yeşil, kırmızı, mavi: tahmin edilen etkileşimler, yeşil: gen komşuluğu, siyah: ifade birlikteliği, sarı: metin madenciliği yöntemiyle belirlenmiş etkileşim.)

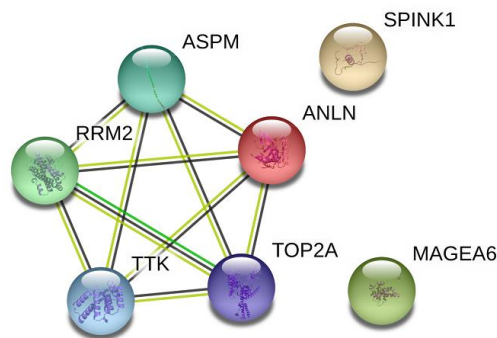
4.5.2. GSE17548 nolu veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok değişen genlerin protein – protein etkileşim analizi sonuçları

GSE17548 nolu veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok artan ve azalan toplam 31 gen tespit edilmişti. Bunlardan tanınan ve diğer genlerle etkileşimleri bilinen 22 tanesinin protein – protein etkileşim haritası Şekil 4.10’ da görülmektedir.



Şekil 4.10. GSE17548 nolu veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok değişen ve tanınan 22 genin protein – protein etkileşim haritası (pembe, turkuaz: bilinen etkileşimler; yeşil, kırmızı, mavi: tahmin edilen etkileşimler, yeşil: gen komşuluğu, siyah: ifade birlikteliği, sarı: metin madenciliği yöntemiyle belirlenmiş etkileşim.)

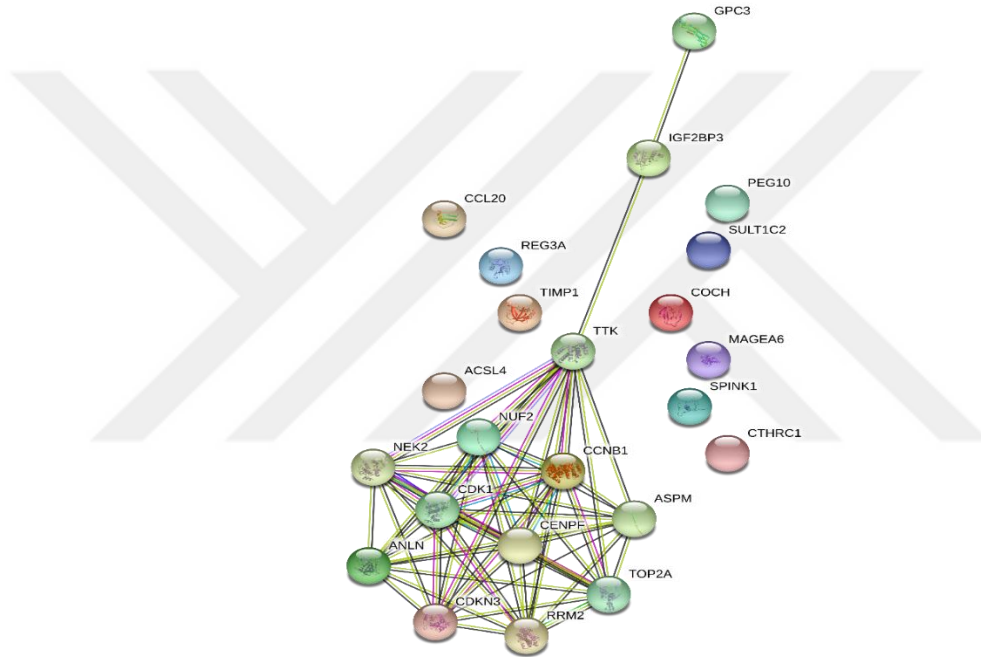
Bu genlerden, bkz. Çizelge 5.3’ te yer alan ifadesi 2 kattan fazla artmış olanlar arasında kurulan protein – protein etkileşim haritası Şekil 4.11’ te görülmektedir (İfadesi 2 kattan fazla azalmış genler arasında herhangi bir etkileşim söz konusu değildir).



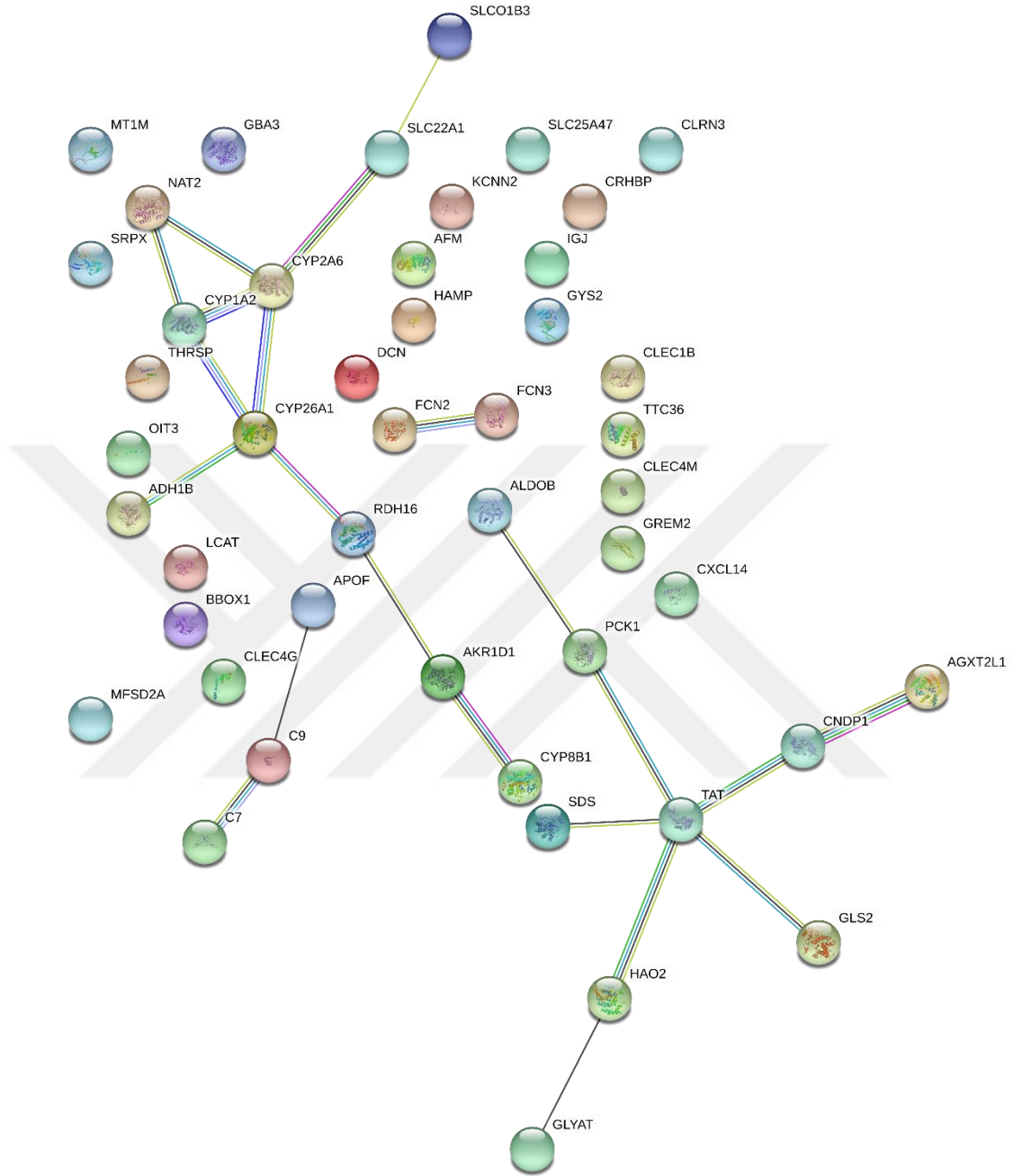
Şekil 4.11. GSE17548 nolu veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok artan 7 genin protein – protein etkileşim haritası (pembe, turkuaz: bilinen etkileşimler; yeşil, kırmızı, mavi: tahmin edilen etkileşimler, yeşil: gen komşuluğu, siyah: ifade birlikteliği, sarı: metin madenciliği yöntemiyle belirlenmiş etkileşim.)

4.5.3. Kullanılan iki veri seti için yapılan, ifadesi en çok değişen ortak genlerin protein – protein etkileşim analizi sonuçları

DEGs analizi yapılan GSE29721 ve GSE17548 nolu veri setlerinin analiz sonuçları birleştirilerek her iki veri setinde ifadesi en çok artan ve azalan genler için PPI ağ analizleri yapılmış olup, etkileşim haritaları Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’ te görülmektedir.



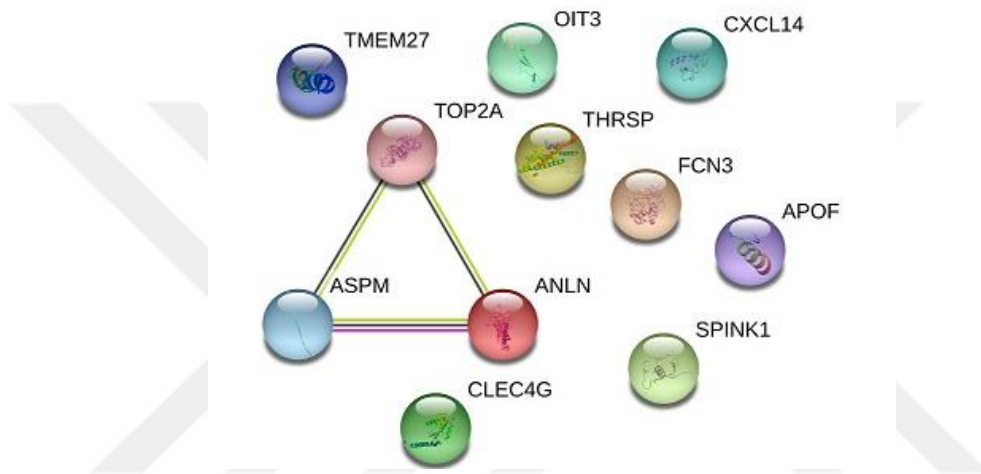
Şekil 4.12. Kullanılan iki veri seti için ifadesi en çok artan 23 genin protein – protein etkileşim haritası (pembe, turkuaz: bilinen etkileşimler; yeşil, kırmızı, mavi: tahmin edilen etkileşimler, yeşil: gen komşuluğu, siyah: ifade birlikteliği, sarı: metin madenciliği yöntemiyle belirlenmiş etkileşim.)



Şekil 4.13. Kullanılan iki veri seti için ifadesi en çok azalan 47 genin protein – protein etkileşim haritası (pembe, turkuaz: bilinen etkileşimler; yeşil, kırmızı, mavi: tahmin edilen etkileşimler, yeşil: gen komşuluğu, siyah: ifade birlikteliği, sarı: metin madenciliği yöntemiyle belirlenmiş etkileşim.)

Ayrıca her iki veri setinin analiz sonuçları karşılaştırıldığında ifadeleri en çok değişen 12 ortak genin mevcut olduğu anlaşılmıştır ve bunların da birbirleriyle olan fiziksel, biyolojik ve moleküler etkileşimleri araştırılmıştır.

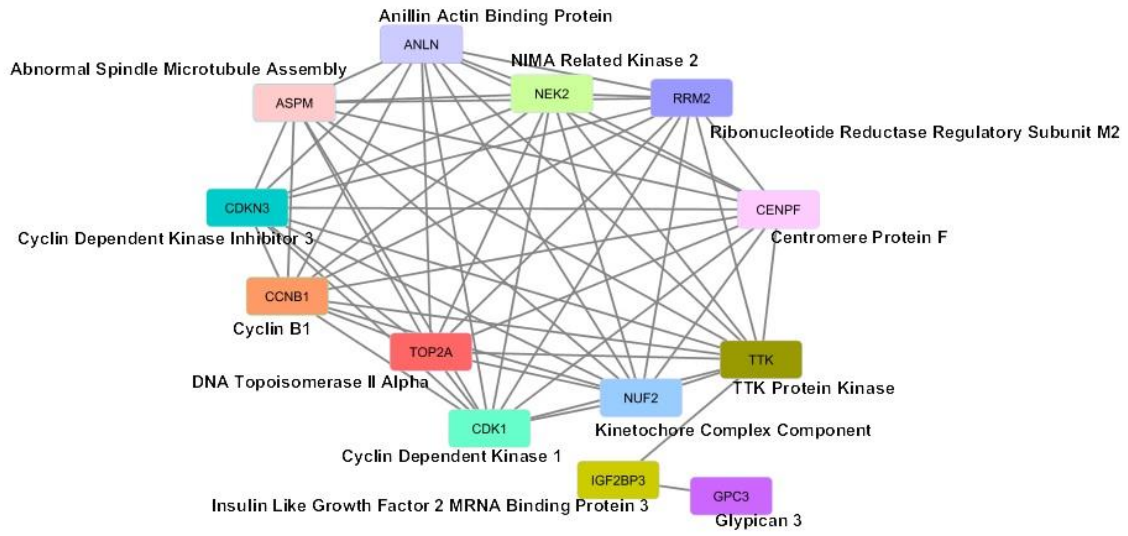
Bu genlerden tanınan ve etkileşimleri bilinen 11 tanesi için kurulan protein-protein etkileşim haritası Şekil 4.14’ te görülmektedir. (TMEM27: CLTRN proteininin eski adı.)



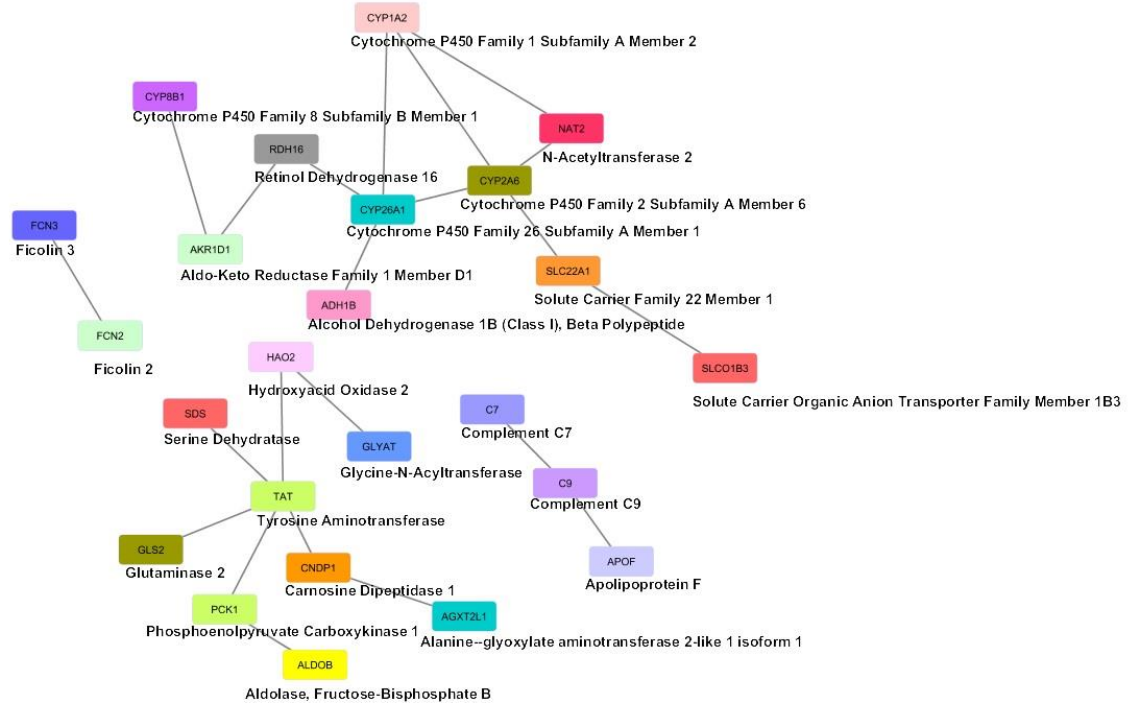
Şekil 4.14. Kullanılan iki veri seti için ifadesi en çok değişen ortak 11 genin protein – protein etkileşim haritası. (pembe, turkuaz: bilinen etkileşimler; yeşil, kırmızı, mavi: tahmin edilen etkileşimler, yeşil: gen komşuluğu, siyah: ifade birlikteliği, sarı: metin madenciliği yöntemiyle belirlenmiş etkileşim.)

4.6. Cytoscape Yazılımı ile Görselleştirilen PPI Analizi Bulguları

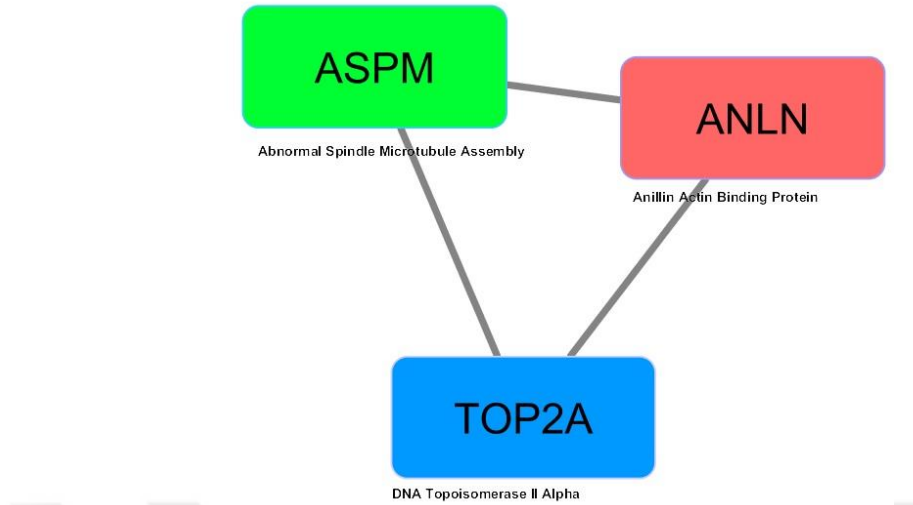
Bir önceki adımda fiziksel, biyolojik ve moleküler etkileşimleri bulunan genler için kurulan PPI ağları verilerini görselleştirmek için kullanılan Cytoscape yazılımı ile Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17 görselleri elde edilmiştir (İfadesi en çok artan ortak genler arasında etkileşim varlığı söz konusu iken, ifadesi en çok azalan ortak genler arasında herhangi bir etkileşimin bulunmadığı tespit edilmiştir).



Şekil 4.15. Her iki veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok arttığı tespit edilen genlerin etkileşim görseli.



Şekil 4.16. Her iki veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok azaldığı tespit edilen genlerin etkileşim görseli



Şekil 4.17. Her iki veri seti için yapılan DEGs analizi sonucunda ifadesi en çok arttığı tespit edilen ortak genlerin etkileşim görseli.

4.7. Elde Edilen Sonuçların Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, siroz/HCC hastası bireylerin genlerinden, sağlıklı bireylerin genlerine kıyasla ifade düzeyi anlamlı olarak değişen bir gen listesi belirlenmiş ve ileri karaciğer hastalıklarıyla ilişkili olabilecek anahtar genlerle önemli biyolojik yolların tespiti amacıyla bir dizi biyoenformatik analizler yapılmıştır. Bu analizler sonucunda, üzerinde çalışılan ilk veri seti için (GSE29721 – kanserli ve normal örnekler) toplam 2654 genin ve diğer veri seti için (GSE17548 – sirozlu ve kanserli örnekler) toplam 554 genin ifade düzeyinde anlamlı değişimler olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu listeler logFC oranına göre sıralanarak ifadesi pozitif ve negatif yönde en çok değişen genler belirlenmiştir.

İlk veri setinde (GSE29721 – kanserli ve normal örnekler) logFC oranlarının 4.5 – 5 aralığına kadar yükseldiği, ancak diğer veri setinde (GSE17548 – sirozlu ve kanserli örnekler) bu oranların en çok 2.5 – 3 aralığına çıktığı gözlemlenmiştir. **Bu sonuç, karaciğer hastası kişilerin siroz evresine geldikten sonra genlerinin ifade düzeylerinin daha fazla değişime uğradığını göstermektedir.**

logFC oranlarının maksimum düzeylerinin farklılığı nedeniyle ilk veri setinde logFC oranının mutlak değeri 3 ve üzeri olan genler ve ikinci veri setinde logFC oranının mutlak değeri 2 ve üzeri olan genler sıralanarak listelenmiş ve her iki listenin kesişimi alınmıştır. Bu kesişimde 12 tane gen yer almıştır:

ANLN Geni: ANLN, sitokinez (hücre bölünmesi) süresince bölünme çizgilerinin birleştirilmesi için gerekli bir aktin bağlayıcı proteindir. Bununla birlikte çeşitli kanser türlerinde ifadesinin aşırı derecede arttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. ANLN geninin ifade düzeyi, HCC hastalarının hayatta kalma olasılığını önemli derecede etkilemekte olup, prognoztik bir biyobelirteç olarak alınabilir (Lian vd., 2018). Nitekim Lian vd. (2018) yaptıkları çalışmada ANLN geninin, sağlıklı komşu dokulardakine kıyasla tümörlü dokularda daha yüksek düzeyde ifade edildiğini tespit etmişler ve ANLN' in apoptoz (hücre ölümü) ve DNA hasar seviyesini düşürerek tümör gelişimini teşvik ettiği sonucuna varmışlardır.

Satow vd. (2010) de HCC için terapötik hedef tespiti amacıyla yaptıkları çalışmada ANLN geninin sağlıklı komşu dokulardakine kıyasla tümörlü dokularda 3 kat üzerinde ifade edildiğini tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada da; daha önce yürütülmüş ilgili çalışmaların sonuçlarına paralel olarak siroz ve HCC hastası bireylerin dokularındaki ANLN geninin, sağlıklı dokularda yer alan aynı genlere göre ifadesinin 2 ila 3 kat arttığı gözlemlenmiştir. Dolayısıyla bu genin kodladığı proteinin vücuttaki miktarı fazlaşmakta ve bu durumun da karaciğerdeki sağlıklı dokuların çoğalmasının yolunu açtığı tahmin edilmektedir.

TOP2A Geni: DNA topoizomerazı. Bu gen, transkripsiyon süresince DNA' nın topolojik durumunu kontrol edip değiştirme işlevini üstlenen proteini kodlar. DNA metabolizmasındaki rolüne rağmen; laboratuvar ortamında yapılan çalışmalar göstermiştir ki, kötü huylu tümörlerin yayılması durumunda TOP2A'nın ifade seviyesi daha az bağımlıdır (Wong vd., 2008).

Wong vd. (2008) yaptıkları mikrodizi analiz çalışmasıyla TOP2A geninin yüksek ifadesinin; ileri HCC tümör histolojisi, mikrovasküler saldırı ve erken evre saldırısı gibi belirtilerle ilişkisi olduğunu tespit etmişlerdir.

Gao vd. (2018) de yaptıkları mikrodizi analiz çalışmasıyla TOP2A geninin yüksek ifadesinin, HCC hastaları için sağ kalım oranını düşüren bir etken olduğunu tespit etmişlerdir.

Nitekim bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, TOP2A geninin ifade seviyesinin ileri safha karaciğer hastalıklarında önemli ölçüde yükseldiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla karaciğer hastalıkları ile ilgili yapılan bu ve bundan önceki gen ifade profili analiz çalışmaları, TOP2A' nın yüksek düzeyde ifadesinin kötü huylu kanser tümörlerinin oluşumu ve gelişimini kolaylaştırdığını göstermektedir.

ASPM Geni: Bu genin; nöron oluşumunu sağlayan, embriyonik sinir hücreleri olan nöroblastların çoğalma sürecini düzenlediği düşünülmekte olup; yapılan çalışmalarda yumurtalık, rahim ve glioblastoma (hızlı yayılan bir beyin tümörü) dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde ifade düzeyinin epey yükseldiği tespit edilmiştir (Horvath vd., 2006).

Horvath vd. (2006) yaptıkları çalışmada, ASPM geninin baskılanması ile sinir kök hücrelerinin yenilenmesinin ve dolayısıyla glioblastoma hücrelerinin gelişiminin engellenmesinin mümkün olduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmada ise, HCC hastalığına giden süreçte, ASPM geninin ivmelenerek normal hücrelerdeki ASPM genlerine kıyasla oldukça yüksek düzeyde ifade edildiği tespit edilmiştir. Bu durum, ASPM' nin hem sirozlu karaciğer dokularındaki hem de ilerleyen aşamada tümör dokularındaki hastalıklı hücrelerin çoğalmasını tetiklediğini düşündürmektedir.

SPINK1 Geni: Bu gen tarafından kodlanan protein, pankreas asiner hücrelerinden pankreas suyuna salgılanan bir tripsin inhibitörüdür. Pankreas ve pankreas kanalı içerisinde tripsin katalizli erken zimojen aktivasyonunun önlenmesinde işlev gösterdiği düşünülmektedir. Bu gendeki mutasyonlar kalıtsal pankreatit ve tropikal kalsifik pankreatit ile ilişkilidir (Liu vd., 2017).

Li vd. (2015) HCC ve HBV-enfekte siroz hastası bireylerden alınan doku örneklerini kullanarak yaptıkları çalışmada, FOXP1 ve SPINK1 genlerinin yüksek ifadelerinin sirozun kanserleşmesinde önemli rol oynadığını ve HCC' nin erken tanısı için önemli potansiyel biyobelirteçler olabileceğini tespit etmişlerdir.

Marshall vd. (2013) farklı karaciğer hastaları ve normal karaciğere sahip bireylerden alınan doku örneklerini kullanarak yaptıkları gen ifade profili analizi çalışmasında SPINK1 geninin ifade düzeyinin karaciğer hastalarının dokularında sağlıklı dokulardakine kıyasla oldukça yüksek seyrettiğini tespit etmişler ve bu genin HCC hastalığı için tanısal bir biyobelirteç olabileceğini vurgulamışlardır.

Nitekim bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, SPINK1 geninin ifade seviyesinin ileri safha karaciğer hastalıklarında önemli ölçüde yükseldiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla karaciğer hastalıkları ile ilgili yapılan bu ve bundan önceki gen ifade profili analiz çalışmaları, SPINK1' in yüksek düzeyde ifadesinin kötü huylu kanser tümörlerinin oluşumu ve gelişimini kolaylaştırdığını göstermektedir.

Ayrıca, yapılan PPI ağ analizi sonucunda **ANLN**, **TOP2A** ve **ASPM** genlerinin ifadesel etkileşime sahip olduğu tespit edildiğinden birinde meydana gelen ifade düzeyi değişiminin diğer iki genin ifade düzeyini de etkilediği düşünülmektedir.

CXCL14 Geni: İnflamasyon, enfeksiyon, doku hasarı, allerji, kardiyovasküler hastalıklar, ayrıca kötü huylu tümör patofizyolojisinde rol alan kemokinlerin aracılık ettikleri hücre göçü ve aktivasyonu için bu moleküllerin hücre üzerindeki özgül reseptörlerine bağlanmaları gerekir. CXCL14 geni de söz konusu reseptörlerdendir (Çıtak vd., 2002). Bu genin kodladığı CXCL14 proteini, yeni kan damarlarının gelişimini

düzenleyen CXC kemokin ailesi üyelerindedir. (Strieter vd., 2006) Birçok normal hücrede ifade edilen CXCL14 geni; baş ve boyun kanseri (HNSCC), prostat ve pankreas kanseri gibi hastalıklara sahip bireylerin dokularında ya hiç ifade edilmemekte ya da çok düşük seviyede ifade edilmektedir (Wang vd., 2013).

Wang vd. (2013) 126 HCC hastasından alınan tümörlü ve tümörsüz doku örneklerini kullanarak yaptıkları kantitatif gen ifade analizi çalışması sonucunda, tümörlü dokuların %88.1' inde yer alan CXCL14 geninin ifade seviyesinin önemli derecede düşüş sergilediğini gözlemlemişlerdir. Böylece, CXCL14 geninin HCC için potansiyel tümör baskılayıcı olarak önemli bir role sahip olduğu sonucuna varmışlardır.

Benzer olarak bu çalışmada da, siroz ve kanser gibi karaciğer hastalıklarında CXCL14 geninin ifade seviyesinin önemli ölçüde düştüğü belirlenmiştir. Böylece, bu genin kodladığı proteinin işlev kaybına uğrayarak tümörün yayılmasını engellemede başarısız olduğu sonucuna varılabilir.

LINC01093 Geni: Bu gen; uzun, protein kodlamayan RNA bölgesinde yer alan bir gen olup, bu gende meydana gelen ifade seviyesi değişimleri HCC hastalığının gelişme evresinde önemli bir rol oynamaktadır (Esposti vd., 2016).

Esposti vd. (2016) normal, sirozlu ve HCC hastası 23 bireyin doku örneklerini analiz ederek yaptıkları çalışmada LINC01093 geninin sirozlu dokulardaki ifade düzeyinin normal dokulardaki ifadesine kıyasla önemli ölçüde düştüğünü gözlemlemişlerdir.

Jovel vd. (2018) HCC tümörünün görüldüğü ve sağlam dokulardan alınan örneklerle yaptıkları lncRNA analizinde LINC01093 geninin ifadesinin tümörlü dokularda sağlıklı dokulara oranla 30 kattan fazla azaldığını gözlemlemişler ve HCC mekanizmasını bu gen aracılığıyla anlamaya çalışmanın, HCC' yi yönetmek için umut verici bir çaba olabileceğini belirtmişlerdir.

Dai vd. (2017) toplam 6 veri seti kullanarak yaptıkları çalışmada; HCC hastalarında LINC01093 geninin seviyesinin oldukça düşük seyrettiğini gözlemlemişler ve LINC01093'

ün HCC hastalarının hayatta kalma oranlarıyla güçlü bir ilişkisi olan 3 genden biri olduğu dolayısıyla HCC için prognostik bir gösterge olabileceği sonucuna varmışlardır.

Benzer olarak bu çalışmada da, siroz ve kanser gibi karaciğer hastalıklarında LINC01093 geninin ifade seviyesinin önemli ölçüde düştüğü belirlenmiştir.

OIT3 geni: Bu gen, moleküler anlamda kalsiyum iyon bağlama ve protein bağlama fonksiyonlarını yerine getirmekte ve karaciğere özgü potansiyel bir negatif biyobelirteç olabilecek bir proteini kodlamaktadır (Xu vd., 2003).

Li vd. (2015) HCC ve HBV-enfekte siroz hastası bireylerden alınan doku örneklerini kullanarak yaptıkları çalışmada, HCC hastası bireylerin dokularındaki OIT3 geninin ifadesinin diğer bireylerinkine göre 2 kat civarında düştüğünü gözlemlemişlerdir.

Agarwal vd. (2017), 423 HCC hastası bireyden alınan tümörlü ve komşu tümörsüz doku örneklerini kullanarak yaptıkları gen ifade analizi çalışmasında OIT3 geninin ifadesinin tümörsüz dokulara kıyasla en fazla düşen 3 genden biri olduğunu gözlemlemişlerdir.

Benzer olarak bu çalışmada da, siroz ve kanser gibi karaciğer hastalıklarında OIT3 geninin ifade seviyesinin önemli ölçüde düştüğü belirlenmiştir. Dolayısıyla bu genin kodladığı protein, işlevini yerine getirmede yetersiz kalmakta ve bu durum karaciğerdeki sağlıklı dokuların çoğalmasının yolunu açmaktadır.

CLEC4G geni: CLEC4G, viral ve bakteriyel patojenleri tanımda yardımcı olma yeteneğine sahip 3 önemli C-tipi lektin protein türünden biridir (Huang ve Meng, 2009). C-tipi lektinler kalsiyuma bağımlı glikan bağlayıcı proteinlerdir ve inflamasyon ve tümörle/viral olarak enfekte olmuş hücrelerin bağıışıklığı dahil olmak üzere çeşitli immün fonksiyonları yerine getirirler (Ho vd., 2015).

Ho vd. (2015) 50 HCC hastası bireyden alınan tümörlü ve komşu tümörsüz doku örneklerini kullanarak yaptıkları gen ifade analizi çalışmasında CLEC4G geninin ifadesinin tümörsüz dokulara kıyasla en fazla düşen gen olduğunu gözlemlemişlerdir.

Benzer şekilde Chen vd. (2017), yaptıkları HCC mikrodizi gen ifade analizi çalışmasında CLEC4G geninin ifadesinin tümörsüz dokulara kıyasla en fazla düşen genlerden biri olduğunu gözlemlemişler ve dolayısıyla C-tipi lektin proteinlerin HCC patogenezinde rol oynayabileceği sonucuna varmışlardır.

Nitekim bu çalışmada da, CLEC4G geninin sirozlu ve HCC hastası bireylerin dokularındaki ifade seviyesinin sağlıklı bireylerdekine kıyasla oldukça düşük seyrettiği belirlenmiştir. Dolayısıyla bu genin kodladığı protein, işlevini yerine getirmede yetersiz kalmakta ve bu durum karaciğerdeki sağlıklı dokuların çoğalmasının yolunu açmaktadır.

THRSP geni: THRSP, öncelikle lipid (yağ) metabolizmasının düzenlenmesi için önemli olan bir nükleer proteindir. Öncelikle göğüs ve karaciğer gibi yağ asitlerini sentezleyen dokularda ifade edilir (Kuemmerle ve Kinlaw, 2011).

Huang vd. (2013) THRSP' nin NAFLD (Alkolik Olmayan Yağlı Karaciğer Hastalığı) patogenezinde önemli bir role sahip olduğunu ve NAFLD tedavisi için potansiyel terapötik bir hedef olabileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada ise, siroz ve kanser gibi karaciğer hastalıklarında THRSP geninin ifade seviyesinin önemli ölçüde düştüğü belirlenmiştir. Bu gözlem, karaciğerin ileri seviye hastalıklarında lipid (yağ) metabolizmasının sağlıklı işleyişinden saptığına işaret etmektedir.

APOF geni: Lipid transferi önleyici protein olan APOF, önemli bir kolesteril ester (esterleşmiş kolesterol) transfer proteini aktivite düzenleyicisidir (Morton vd., 2008).

Cheng vd. (2012) 48 HCV-enfekte siroz hastasından alınan 75 cerrahi karaciğer örneği kullanarak yaptıkları mikrodizi analizi ve yolak zenginleşim analizi sonucunda APOF geninin sağlıklı, sirozlu ve HCC tümörlü dokularda ifade düzeyi değişen 7 genden biri

olduğunu saptamışlardır. Böylece, bu genin HCC hastalığının ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı sonucuna varmışlardır.

Lo Re vd. (2018) yaptıkları mikrodizi veri analizi çalışmasında APOF geninin ifade düzeyinin kontrol grubu hücrelerdeki ifadesine oranla 2 kat civarında düştüğünü gözlemlemişlerdir.

Bu çalışmada da benzer şekilde sirozlu ve tümörlü hücrelerdeki APOF geninin ifade düzeyinin, sağlıklı hücrelerdekine göre 2 ila 3 kat civarında düştüğü gözlenmiştir. Bu durum, karaciğerin ileri safha hastalıklarında lipid metabolizmasının dolayısıyla da kolesterol düzeninin bozulabileceğinin bir işaretidir.

CLTRN geni: Bu gen, amino asit transfer düzenleme işlevini yerine getiren proteini kodlamaktadır (NCBI, 2018).

Bu çalışmada, siroz ve HCC hastası bireylerin hücrelerinde yer alan CLTRN geninin normal hücrelerdeki CLTRN genlerine kıyasla oldukça düşük düzeyde ifade edildiği tespit edilmiştir. Dolayısıyla bu genin anlamlı olarak düşük ifade edilmesi, ileri safha karaciğer hastalıklarında hastalığın ilerlemesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

FCN3 geni: Serum lektin proteini olarak kabul edilen FCN3, özellikle apoptotik (programlı) hücre ölümü prosesinin yürütülmesine aracılık eder (Yu vd., 2017).

Chang vd. (2009) 31 HCC hastasından aldıkları tümörlü ve sağlıklı doku örnekleri ile yaptıkları mikrodizi ve interaktif yolak analizi çalışmasında FCN3 geninin ifadesinin tümörlü örneklerde yer alan dokularda sağlıklı dokulardakine kıyasla oldukça düşük olduğunu tespit etmişlerdir.

Nitekim bu çalışmada da, siroz ve HCC hastası bireylerin hücrelerinde yer alan FCN3 geninin normal hücrelerdeki FCN3 genlerine kıyasla oldukça düşük düzeyde ifade edildiği tespit edilmiştir. Bu durum, FCN3 proteininin işlevini yerine getirmede yetersiz kalarak ileri

aşamada tümörlü hücrelerin artmasına yol açtığı için hastalığın ilerlemesine neden olabileceğini düşündürmektedir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bir biyoenformatik uygulaması olan bu çalışmada, karaciğerin siroz ve HCC gibi ileri safha hastalıklarında vücutta meydana gelen moleküler değişimler, bu değişimlerin yol açtığı hücresel, biyolojik ve fizyolojik problemler ve bunların önlenmesi amacıyla üzerinde çalışılacak hedef proteinler araştırılmıştır. Bu amaçla, genomik veri analizlerinde sıklıkla kullanılan mikrodizi yöntemi tercih edilmiş, böylece hasta ve kontrol grupları arasındaki anlamlı gen ifade farklılıkları ve bu farklılıkların ilgili yollarda meydana getirdiği sorunlar belirlenmeye çalışılmıştır.

Elde edilen bulgular neticesinde gen ifade düzeylerinin siroz oluşumu başladıktan sonra ivmelenerek pozitif ve negatif yönde daha fazla değişime uğradığı saptanmıştır. Bu nedenle, hastanın tedavi ve prognozunun iyi takip edilmesi için karaciğer dokularında HCC tümörü oluşumu başlamadan hastalığın seyrine müdahale etmek oldukça önemlidir.

Bahsi geçen hastalıklara sahip bireylerde, karaciğerin işlevlerini aksatmasına neden olabilecek terapötik hedeflere yönelik yapılacak çalışmalar, tedavinin başarısını doğrudan etkileyecektir.

Mikrodizi veri analizleri sonucunda elde edilen bulguların biyolojik deneylerle doğrulanması ve tanı ve tedavide uygulanabilirliğini sağlamak üzere klinik çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu çalışmada yapılan analizler de mikrodizi verileri kullanılarak bilgisayar ortamında gerçekleştirildiğinden analiz sonuçlarının biyolojik olarak da test edilmesi ve doğrulanmasını gerekmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Agarwal, R., Narayan, J., Bhattacharyya, A., Saraswat, M., Tomar, A.K., 2017, Gene expression profiling, pathway analysis and subtype classification reveal molecular heterogeneity in hepatocellular carcinoma and suggest subtype specific therapeutic targets, Elsevier Incorporated Company, 216-217 (2017), 37–51, <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2210776217301023?token=EE6FBD4D653303D52EC0103C1FAFBE0AA759B5C0AA45DD922D21B8533DD1D92426AAB31D989B1889527A05F62FB57A22>, erişim tarihi: 18.08.2018.
- Alexa, A., Rahnenführer, J., 2014, Gene set enrichment analysis with topGO, <https://bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/topGO/inst/doc/topGO.pdf>, erişim tarihi: 30.10.2018.
- Anonim, 2009, Primer Karaciğer Kanseri, <https://www.memorial.com.tr/saglik-rehberleri/primer-karaciger-kanseri/>, erişim tarihi: 29.12.2018.
- Anonim, 2011, İnsan Vücudu Anatomisi – İnsan Vücudu Resimleri, <http://www.nkfu.com/insan-vucudu-anatomisi-insan-vucudu-resimleri/>, erişim tarihi: 30.01.2018.
- Anonim, 2018, Gen Ontolojisi, https://tr.wikipedia.org/wiki/Gen_ontolojisi, erişim tarihi: 12.12.2018.
- Ashtiani, M., 2018, Introduction to Bioconductor, <https://www.datacamp.com/community/tutorials/intro-bioconductor>, erişim tarihi: 10.02.2018.
- Atış, S., 2014, Meme kanserinde gen ekspresyon verilerinin mikrodizi analizi, Yüksek lisans tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 56 s. (yayımlanmamış).
- Aydın Çil, M., Dokuz, B., Arslan, C. (Derl.), 2017, Karaciğer sirozu ve beslenme tedavisi, Anadolu Hemşirelik ve Sağlık Bilimleri Dergisi, 20, 3, <http://dergipark.gov.tr/download/article-file/348686>, erişim tarihi: 02.09.2018.
- Bioconductor, 2018, About Bioconductor, <http://www.bioconductor.org/>, erişim tarihi: 30.09.2018.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bumgarner, R., 2013, DNA microarrays: types, applications and their future, National Institutes of Health Public Access, 22, Unit-22.1, 1-8, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4011503/pdf/nihms-563981.pdf>, erişim tarihi: 31.12.2018.
- Chang, Q., Chen, J., Beezhold, K.J., Castranova, V., Shi, X. vd., 2009, JNK1 activation predicts the prognostic outcome of the human hepatocellular carcinoma, Biomed Central Limited, 8, 64, 1-12, <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/1476-4598-8-64>, erişim tarihi: 03.11.2018.
- Chen, J., Qian, Z., Li, F., Li, J., Lu, Y., 2017, Integrative analysis of microarray data to reveal regulation patterns in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma, Gut and Liver Journal, 11, 1, 112-120, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5221868/pdf/gnl-11-112.pdf>, erişim tarihi: 03.11.2018.
- Cheng, P., Cheng, Y., Su, M., Li, D., Zhao, G. vd., 2012, Bicluster and pathway enrichment analysis of HCV-induced cirrhosis and hepatocellular carcinoma, Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 13, 8, 3741-3745, http://journal.waocp.org/article_26695_6a74f976cad4bf6a4c747ea819512a65.pdf, erişim tarihi: 07.11.2018.
- Çıtak, F.E, Çıtak, E.Ç., Karadeniz C., 2002, Kemokinler ve hastalıklardaki yeri, Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 22, 210-216, <http://www.turkiyeklinikleri.com/article/tr-kemokinler-ve-hastalıklardaki-yeri-271.html>, erişim tarihi: 07.12.2018.
- Dai, M., Chen, S., Wei, X., Zhu, X., Lan, F. vd., 2017, Diagnosis prognosis and bioinformatics analysis of lncRNAs in hepatocellular carcinoma, Oncotarget Incorporated Company, 8, 56, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5707062/pdf/oncotarget-08-95799.pdf>, erişim tarihi: 07.12.2018.
- Dilek, O.N. (Editör), 2003 a, Karaciğer, Afyon Kocatepe Üniversitesi Klinik Tıp Kitapları Serisi, 1, 1-49.
- Dilek, O.N. (Editör), 2003 b, Karaciğer, Afyon Kocatepe Üniversitesi Klinik Tıp Kitapları Serisi, 2, 349-737.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Esposti, D.D., Hernandez-Vargas, H., Voegelé, C., Fernandez-Jimenez, N, Forey, N. vd., 2016, Identification of novel long non-coding RNAs deregulated in hepatocellular carcinoma using RNA-sequencing, Oncotarget Incorporated Company, 7, 22, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5077982/pdf/oncotarget-07-31862.pdf>, erişim tarihi: 30.10.2018.
- Gao, X., Wang, X., Zhang, S., 2018, Bioinformatics identification of crucial genes and pathways associated with hepatocellular carcinoma, Portland Press Limited, 38, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6239270/pdf/bsr-38-bsr20181441.pdf>, erişim tarihi: 21.09.2018.
- Göksay, E., Kapan, M., 2002, Karaciğerin primer habis tümörleri, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, 28, 159-182, http://www.ctf.edu.tr/stek/pdfs/28/2819EG_MK.pdf, erişim tarihi: 12.10.2018.
- Gümüşay, Ö., Demirtaş, A., Arıcı, A., Gökçe, E., Yılmaz, E.E. vd., 2016, Ekstrakranial skalp metastazi ile prezente olan nadir bir hepatosellüler kanser olgusu, Journal of Contemporary Medicine, 6, 57-60, <http://dergipark.gov.tr/download/article-file/270643>, erişim tarihi: 26.12.2018.
- Hayran, A., 2014, Gen ifade veritabanlarında içerik tabanlı arama, Yüksek lisans tezi, Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 53 s. (yayımlanmamış).
- Ho, D.W.H., Kai, A.K.L., Ng, I.O.L., 2015, TCGA whole-transcriptome sequencing data reveals significantly dysregulated genes and signaling pathways in hepatocellular carcinoma, 9, 3, 322-330, <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11684-015-0408-9.pdf>, erişim tarihi: 25.10.2018.
- Horvath, S., Zhang, B., Carlson, M., Lu, K.V., Zhu, S. vd., 2006, Analysis of oncogenic signaling networks in glioblastoma identifies ASPM as a molecular target, 103, 46, 17402-17407, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1635024/pdf/zpq17402.pdf>, erişim tarihi: 16.09.2018.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Huang, Y.W., Meng, X.J., 2009, Identification of a porcine DC-SIGN-related C-type lectin, porcine CLEC4G (LSEctin), and its order of intron removal during splicing: Comparative genomic analyses of the cluster of genes CD23/CLEC4G/DC-SIGN among mammalian species, Elsevier Limited, 33, 2009, 747-760, https://ac.els-cdn.com/S0145305X09000135/1-s2.0-S0145305X09000135-main.pdf?_tid=1cce2951-603d-47cd-bc93-68af7be71d48&acdnat=1546239691_5ae254191c2dbe27e8dca3e9667a1730, erişim tarihi: 22.11.2018.
- Huang, Y.Y., Gusdon, A.M., Qu, S., 2013, Cross-talk between the thyroid and liver: a new target for nonalcoholic fatty liver disease treatment, *World Journal of Gastroenterology*, 19, 45, 8238-8246, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3857446/pdf/WJG-19-8238.pdf>, erişim tarihi: 22.11.2018.
- Jovel, J., Lin, Z., O'keefe, S., Willows, S., Wang, W. vd., 2018, A survey of molecular heterogeneity in hepatocellular carcinoma, *Hepatology Communications*, 2, 8, 945-959, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6078210/pdf/HEP4-2-941.pdf>, erişim tarihi: 20.09.2018.
- Karakülah, G., 2009, Hepatosellüler karsinoma mikrodizin ekspresyon verilerinin in silico modellenmesi, Yüksek lisans tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 47 s. (yayımlanmamış).
- Kazimi, M., Nalbantoğlu, S.M., Kılıç, M., Berdeli, A., 2010, MMP 1 ve 2 genleri promoter polimorfizmleri ve hepatosellüler karsinom riski: Türk hastalarda olgu-kontrol analizi, *Ulusal Cerrahi Dergisi*, 26, 2, 79-84, <https://www.turkjsurg.com/full-text-pdf/869/tur>, erişim tarihi: 01.08.2018.
- Kızmaz, M.Z., Paylan, İ.C., Erkan, S. (Derl.), 2017, DNA dizilemenin tarihsel gelişimi, *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi (GBAD)*, 6, 2, 47-53, <http://dergipark.gov.tr/download/article-file/336887>, erişim tarihi: 13.05.2018.
- Kuammerle, N.B., Kimlaw, W.B., 2013, THRSP (thyroid hormone responsive), *National Institutes of Health Public Access*, 15, 6, 480-482, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3809912/pdf/nihms503937.pdf>, erişim tarihi: 13.05.2018.
- Kul, S., 2014, İstatistik sonuçlarının yorumu: p değeri ve güven aralığı nedir?, *Türk Toraks Derneği*, 11-13, <http://www.toraks.org.tr/uploadFiles/book/file/1832014154715-113.pdf>, erişim tarihi: 12.06.2018.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, F., Liu, T., Xiao, C.Y., Yu, J.X., Lu, L.G. vd., 2015, FOXP1 and SPINK1 reflect the risk of cirrhosis progression to HCC with HBV infection, Elsevier Masson, 72, 2015, 103-108, https://ac.els-cdn.com/S0753332215000979/1-s2.0-S0753332215000979-main.pdf?_tid=032cbc8b-707e-4a2f-b13b-9f4936522f93&acdnat=1546244048_057d8ec79105b4c1b425599fe456cd9d, erişim tarihi: 13.08.2018.
- Lian, Y.F., Huang, Y.L., Wang, J.L., Deng, M.H., Xia, T.L. vd., 2018, Anillin is required for tumor growth and regulated by miR-15a/miR-16-1 in HBV-related hepatocellular carcinoma, *Aging-Us Journal*, 10, 8, 1884-1901, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6128427/pdf/aging-10-101510.pdf>, erişim tarihi: 27.10.2018.
- Lo Re, O., Douet, J., Buschbeck, M., Fusilli, C., Pazienza, V. vd., 2018, Histone variant macroH2A1 rewires carbohydrate and lipid metabolism of hepatocellular carcinoma cells towards cancer stem cells, *Epigenetics*, 13, 8, 829-845, <https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/15592294.2018.1514239?needAccess=true>, erişim tarihi: 14.09.2018.
- Marshall, A., Lukk, M., Kutter, C., Davies, S., Alexander, G. vd., 2013, Global gene expression profiling reveals SPINK1 as a potential hepatocellular carcinoma marker, *Plos One*, 8, 3, <https://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0059459&type=printable>, erişim tarihi: 02.01.2019.
- Morton, R.E., Gnizak, H.M., Greene, D.J., Cho, K.H., Paromov, V.M., 2008, Lipid transfer inhibitor protein (apolipoprotein F) concentration in normolipidemic and hyperlipidemic subjects, *Journal of Lipid Research*, 49, 2008, 127-135, <http://www.jlr.org/content/49/1/127.full.pdf>, erişim tarihi: 14.09.2018.
- Ortaburun, Y., 2015, Sirozlu hastalarda sağlıkla ilgili yaşam kalitesini belirleyen faktörler-otonom disfonksiyonun etkisi, *Uzmanlık tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi*, 59 s. (yayımlanmamış).
- Özkan, Y., Selçukcan Erol, Ç., 2017, *Biyoformatik DNA Mikrodizi Veri Madenciliği*, Papatya Bilim Yayınevi, s. 1-156.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Qiu, X., Wu, H., Hu, R., 2013, The impact of quantile and rank normalization procedures on the testing power of gene differential expression analysis, Biomed Central Limited, 14, 124, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3660216/pdf/1471-2105-14-124.pdf>, erişim tarihi: 14.09.2018.
- Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W. vd., 2015, Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies, Nucleic Acids Research, 43, 7, 1-13, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4402510/pdf/gkv007.pdf>, erişim tarihi: 14.09.2018.
- Satow, R., Shitashige, M., Kanai, Y., Takeshita, F., Ojima, H. vd., 2010, Combined Functional Genome Survey of Therapeutic Targets for Hepatocellular Carcinoma, American Association for Cancer Research, 1-12, <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/clincanres/16/9/2518.full.pdf>, erişim tarihi: 14.10.2018.
- Shangguan, H., Tan, S.Y., Zhang, J.R., 2015, Bioinformatics analysis of gene expression profiles in hepatocellular carcinoma, European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 19, 11, 2054-2061, <https://www.europeanreview.org/wp/wp-content/uploads/2054-2061.pdf>, erişim tarihi: 15.10.2018.
- Simon, R., 2009, Analysis of DNA microarray expression data, National Institutes of Health Public Access, 22, 2, 271-282, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2757654/pdf/nihms138702.pdf>, erişim tarihi: 15.10.2018.
- Smyth, G.K., 2005, Limma: Linear Models for Microarray Data, Springer Science and Business Media Incorporated Company, e-kitap, 397-398, https://link.springer.com/chapter/10.1007/0-387-29362-0_23, erişim tarihi: 15.10.2018.
- Smyth, G., Thorne, N., Wettenhall, J., 2004, Limma: linear models for microarray data user's guide, The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, 1-71, ftp://ftp.esat.kuleuven.ac.be/sista/marchal/updated_courses_masterfiles_2007/5_Microarray_Preprocessing/Datasets/Bioconductor/usersguide.pdf, erişim tarihi: 16.10.2018.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Strieter, R.M., Burdick, M.D., Mestas, J., Gomperts, B., Keane, M.P. vd., 2006, Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis, Elsevier Limited, 42, 2006, 768-778, https://ac.els-cdn.com/S0959804906000475/1-s2.0-S0959804906000475-main.pdf?_tid=ed8de380-01ca-47dd-be28-9b6b67d155c1&acdnat=1546253074_118fa0af0ba402750b6ca779b2c04768, erişim tarihi: 16.10.2018.
- String Consortium, 2018, Starting Point, <https://string-db.org/cgi/help.pl?sessionId=d1IpbStbKJgT>, erişim tarihi: 30.10.2018.
- Su, C.L., Wu, Y.J., 2008, Markers identified for liver fibrosis and cirrhosis and the microarray panel thereof, United States Patent Application Publication, 2008, 0161203 A1, <https://patentimages.storage.googleapis.com/e5/52/51/c3663589b61fa4/US20080161203A1.pdf>, erişim tarihi: 15.09.2018.
- Szklarczyk, D., Morris, J.H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S. vd., 2016, The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks made broadly accessible, Nucleic Acids Research, 45, 362-368, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5210637/pdf/gkw937.pdf>, erişim tarihi: 15.09.2018.
- Tanyolaç, B., Kaya, H.B., Soya, S., Akkale, C., 2012, Biyoteknoloji ve biyoinformatik, Researchgate, 599-655, https://www.researchgate.net/profile/Bahattin_Tanyolac/publication/280041396_Biyoteknoloji_ve_Biyoinformatik/links/5617722808ae90469c614f39/Biyoteknoloji-ve-Biyoinformatik.pdf, erişim tarihi: 25.08.2018.
- Tarhan, Ö.R., 2018, Karaciğer Hastalıkları, <http://www.turkcerrahi.com/makaleler/karaciger/>, erişim tarihi: 21.11.2018.
- Taş, A., 2010, Hepatosellüler karsinom tanı ve tedavisi, Güncel Gastroenteroloji, 14, 3, 145-148, <http://guncel.tgv.org.tr/journal/34/pdf/362.pdf>, erişim tarihi: 21.11.2018.
- Wang, W., Huang, P., Zhang, L., Wei, J., Xie, Q. vd., 2013, Antitumor efficacy of C-X-C motif chemokine ligand 14 in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo, Japanese Cancer Association, 104, 11, 1523-1531, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/cas.12279>, erişim tarihi: 23.09.2018.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wong, N., Yeo, W., Wong, W.L., Wong, N.L.Y., Chan, K.Y.Y. vd., 2008, TOP2A overexpression in hepatocellular carcinoma correlates with early age onset shorter patients survival and chemoresistance, Wiley Interscience, 124, 644-652, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ijc.23968>, erişim tarihi: 24.09.2018.
- Xu, Z.G., Du, J.J., Zhang, X., Cheng, Z.H., Ma, Z.Z. vd., 2003, A novel liver-specific zona pellucida domain containing protein that is expressed rarely in hepatocellular carcinoma, Hepatology, 38, 3, 735-744, <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1053/jhep.2003.50340>, erişim tarihi: 24.09.2018.
- Yazağan, A., 2014, Biyoinformatik Araştırmaları ve Araçları, <https://ab.org.tr/ab14/sunum/90.pdf>, erişim tarihi: 12.10.2018.
- Yoltaş, A., Karaboz, İ., 2010, DNA mikroarray teknolojisi ve uygulama alanları, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR, 8, 1, 1-19, <http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/DosyaGoster.aspx?DIL=1&BELGEANA H=2999&DOSYASIM=01%20Karaboz.pdf>, erişim tarihi: 12.10.2018.
- Yu, S.J., Kim, H., Min, H., Sohn, A., Cho, Y.Y. vd., 2017, Targeted proteomics predicts a sustained complete-response after transarterial chemoembolization and clinical outcomes in patients with hepatocellular carcinoma: a prospective cohort study, Journal of Proteome Research, 16, 1239-1248, <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jproteome.6b00833>, erişim tarihi: 13.10.2018.