

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA MİKRODİZİN  
EKSPRESYON VERİLERİNİN *IN SILICO*  
MODELLENMESİ**

GÖKHAN KARAKÜLAH

MEDİKAL İNFORMATİK ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2009

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMA MİKRODİZİN  
EKSPRESYON VERİLERİNİN *IN SILICO*  
MODELLENMESİ**

MEDİKAL İNFORMATİK ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

GÖKHAN KARAKÜLAH

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. OĞUZ DİCLE  
Yardımcı Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. ŞERİFE ESRA ERDAL

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Medikal İnfomatik Anabilim Dalı Tıbbi Bilişim Yüksek Lisans programı öğrencisi Gökhan KARAKÜLAH'ın "**Hepatosellüler karsinoma mikrodizin ekspresyon verilerinin *in silico* modellenmesi**" başlıklı yüksek lisans tezi 30.01.2009 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

**Jüri Başkanı**

**Prof. Dr. Oğuz DİCLE**

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Medikal İnfomatik Anabilim Dalı Başkanı

**Jüri Üyesi**

**Prof. Dr. Mustafa SEÇİL**

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi  
Dahili Tıp Bilimleri Bölümü

**Jüri Üyesi**

**Prof. Dr. Neşe ATABEY**

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi  
Temel Tıp Bilimleri Bölümü

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
Tablo Listesi .....	i
Şekil Listesi .....	ii
Kısaltmalar .....	iii
Teşekkür.....	iv
<b>ÖZET</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>3</b>
<b>BÖLÜM 1. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1. Hepatosellüler karsinoma</b> .....	<b>4</b>
1.1.1. Hepatosellüler karsinomanın etiyolojisi .....	5
1.1.2. Hepatosellüler karsinomada genetik değişiklikler.....	8
1.1.3. Hepatosellüler karsinomada gen ekspresyonu değişimleri .....	10
<b>1.2. Ekspresyon mikrodizin yöntemi</b> .....	<b>10</b>
1.2.1. Ekspresyon mikrodizinlerinin kanser araştırmalarında kullanımı.....	13
1.2.2. Ekspresyon mikrodizinleri ve biyokimyasal etkileşim ağları .....	13
1.2.3. Tümüleşik ekspresyon mikrodizini veri çözümlemesi .....	15
<b>BÖLÜM 2. YÖNTEM VE GEREÇLER</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1. Mikrodizin veri çözümlemesi</b> .....	<b>17</b>
2.1.1. Huh7 Ham mikrodizin verileri .....	17
2.1.2. R programlama dili ve ortamı .....	17
2.1.3. Mikrodizin çiplerinin kalite değerlendirmesi .....	18
2.1.4. Ham mikrodizin verilerinin normalizasyonu ve istatistiksel çözümlemesi .....	18
2.1.5. Prob adlarının gen adı ve sembollerine dönüştürülmesi .....	19
2.1.6. İnternet tabanlı biyoinformatik araçları yardımıyla istatistiksel sonuçların çözümlenmesi .....	19

2.1.7. Hiyerarşik kümeleme yöntemi ile ekspresyonel değişimlerin çözömlenmesi .....	20
<b>2.2. Biyomoleküller arası etkileşim ağı</b> .....	20
2.2.1. Biyomoleküller arası etkileşimlerin belirlenmesi .....	20
2.2.2. Biyomoleküller arası etkileşimlerin haritalanması .....	21
<b>BÖLÜM 3. BULGULAR</b> .....	22
<b>3.1. Mikrodizin veri çözömlenmesi</b> .....	22
3.1.1. Mikrodizin çiplerine ait kalite değerlendirme sonuçları .....	22
3.1.2. Normalizasyon öncesi ve sonrası gen ekspresyonu verileri .....	24
3.1.3. Ekspresyonu anlamlı olarak değişen genler .....	24
3.1.4. Ekspresyonel değişim gösteren genlerin fonksiyonel çözömlenmesi .....	25
3.1.5. Hiyerarşik kümeleme yöntemi ile ekspresyonel değişim gösteren genlerin çözömlenmesi .....	33
3.1.6. Biyomoleküller arası etkileşim haritası .....	35
<b>BÖLÜM 4. TARTIŞMA</b> .....	36
<b>BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b> .....	40
<b>BÖLÜM 6. KAYNAKLAR</b> .....	41
<b>BÖLÜM 7. EKLER</b> .....	47

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa no

- Tablo 1.** Mikrodizin çalışmasından elde edilen .CEL dosyalarına verilen isimler ..... 17
- Tablo 2.** Ekspresyonu anlamlı olarak değişen gen setinin ilişkili olduğu yolaklardan istatistiksel anlamlılığı olanlar ve bu yolaklarda bulunan genlerin sayı ve sembolleri ile ilgili yolağa ait olasılık değeri ..... 26
- Tablo 3.** Gen setine ait 3 ayrı sınıftaki istatistiksel açıdan anlamlı GO terimleri ile seviyeleri ve bu terimlerle ilişkili gen sayıları ile olasılık değerleri ..... 28

## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa no

<b>Şekil 1.</b> HCC'de risk faktörleri ve hepatokarsinogenez süreçleri.....	6
<b>Şekil 2.</b> HCC ile ilişkili gelişimsel ve onkojenik yollardaki değişimler.....	8
<b>Şekil 3.</b> Ekspresyon mikrodizin yöntemiyle farklı genlerin ekspresyon seviyelerinin ölçülmesinde izlenen basamaklar.....	12
<b>Şekil 4.</b> Örnek bir biyokimyasal ilişkiler ağı .....	14
<b>Şekil 5.</b> Genomik verilerinin tümleşik çözümlemesine genel bir bakış .....	16
<b>Şekil 6.</b> Mikrodizin çiplerinin psödo görüntüleri .....	22
<b>Şekil 7.</b> Mikrodizin çiplerine ait kalite bulguları.....	23
<b>Şekil 8.</b> Normalizasyon öncesi ve sonrası mikrodizin ekspresyon değerleri .....	24
<b>Şekil 9.</b> Ekspresyonu değişen genlerin, doku tiplerine göre yüzde dağılımı .....	26
<b>Şekil 10.</b> Biyolojik süreçlere ait GO terimlerinin dağılımı.....	30
<b>Şekil 11.</b> Moleküler işlevlere ait GO terimlerinin dağılımı.....	30
<b>Şekil 12.</b> GO hücre bileşeni terimlerinin dağılımı .....	31
<b>Şekil 13.</b> Ekspresyonu 4 kat ve üzerinde artış gösteren genlerin promotor bölgelerinde gözlenen konsensüs diziye ait logo gösterimi.....	32
<b>Şekil 14.</b> Ekspresyonu 4 kat ve üzerinde azalma gösteren genlerin promotor bölgelerinde gözlenen konsensüs diziye ait logo gösterimi .....	32
<b>Şekil 15.</b> Ekspresyonel olarak en çok artma ve azalma gösteren ilk 20 genin hiyerarşik kümeleme çözümlemesine ait dendogram .....	34
<b>Şekil 16.</b> Ekspresyonu anlamlı olarak değişim gösteren genler ile ilk komşuluğundaki biyomoleküller arası etkileşimler haritası.....	35

## **KISALTMALAR**

**HCC:** Hepatocellular Carcinoma (Hepatosellüler karsinoma)

**HBV:** Hepatitis B Virus (Hepatit B Virüsü)

**HCV:** HEpatitis C Virus (Hepatit C Virüsü)

**LOH:** Loss of Heterozygosity (Heterozigosite Kaybı)

**RLE:** Relative Log Expression

**NUSE:** Normalized Unscaled Standart Errors

**SAM:** Significance Analysis of Microarrays (Mikrodizin Anlamlılık Analizi)

**FDR:** False Discovery Rate (Hatalı Keşif Oranı)

**GO:** Gene Ontology (Gen Ontolojisi)

**GSEA:** Gene Set Enrichment Analysis (Gen Seti Zenginleştirme Analizi)

**BIND:** Biomolecular Interaction Network Database (Biyomoleküler Etkileşim Ağı Veri Tabanı)

**KEGG:** Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi)

**DAG:** Directed Acyclic Graph



## TEŞEKKÜR

Bilimselliğini, yapıcı ve yaratıcı düşünme şekli ile davranışlarını örnek almaya çalıştığım tez danışmanım Prof. Dr. Oğuz DİCLE'ye lisansüstü eğitimimin başından sonuna kadar desteğini, eleştirilerini, fikirlerini ve güvenini benden esirgemediği için teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimimin her aşamasında yakın ilgisi ve önerileri beni yönlendiren, tez çalışmamın ortaya çıkmasında ve hazırlanmasında büyük katkıları ve emeği olan tez yardımcı danışmanım Doç. Dr. Şerife Esra ERDAL'a, yaşamım boyunca kullanacağım farklı beceriler kazanmama yardımcı olduğu için teşekkür ederim.

Tez çalışmamın farklı aşamalarında yönlendirmeleri ve yorumları ile bana yol gösteren ve tezimin hazırlanmasında önemli katkıları olan Yrd. Doç. Dr. Özlen KONU'ya teşekkür ederim.

Tez jürisinde yer alan, yorumları ve eleştirileri ile bu teze katkıda bulunan Prof. Dr. Mustafa SEÇİL'e ve Prof. Dr. Neşe ATABEY'e teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim sırasında tanıdığım ve tanımaktan büyük mutluluk ve gurur duyduğum arkadaşlarım Koray Doğan KAYA, Ozan AKÇAY ve Sezgin ATAÇ'a her ne olursa olsun yardımlarını ve desteklerini benden esirgemedikleri için teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her koşulda beni desteklemiş ve güvenmiş olan aileme ve varlığıyla yaşamıma anlam katan Aslı SUNER'e teşekkür ederim.

Gökhan KARAKÜLAH

İzmir, 2009

# Hepatosellüler Karsinoma Mikrodizin Ekspresyon Verilerinin *In Silico* Modellenmesi

**Gökhan Karakulah**

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Medikal İnfomatik Anabilim Dalı  
İnciraltı-İzmir/TÜRKİYE  
gokhan.karakulah@deu.edu.tr

Bu çalışmada, HCC hücrelerinde Lityum etkisi ile meydana gelen proliferasyon inhibisyonunda, ekspresyonu transkript düzeyinde değişen genler ve bu genlerin yer aldığı sinyal yollarının tanımlanması için, Huh7 hücre hattı kullanılarak elde edilen ekspresyon mikrodizini veri setleri çözümlendi. İlk olarak, 48 saat, 20 mM LiCl uygulanmış ve uygulanmamış Huh7 hücrelerinden elde edilen, genom düzeyinde ekspresyon profilleri, Mikrodizin Anlamlılık Analizi yöntemi kullanılarak analiz edildi. İstatistiksel anlamlılık testi sonrası, Huh7 hücre hattında kontrole kıyasla anlamlı olarak artma ve azalma gösteren 1807 genin var olduğunu tespit edildi. (FDR<0.01). Bu genlerin, açıklama analizi sonrası, Huh7 hücre hattındaki değişim gösteren genler ile ilişkili 142 farklı sinyal yolağının olduğu bulundu ve bu yollardan 18 tanesi istatistiksel açıdan anlamlı olarak belirlendi (p<0.01). Ayrıca, Gen Ontolojisi terim analizi anlamlı bir şekilde artma ve azalma yönünde değişen genlerin farklı biyolojik süreçler ve moleküler işlevlerde yer aldığını gösterdi. Ekspresyon seviyeleri 4 ya da 4 kattan daha büyük artma ve azalma şeklinde değişime sahip genlerden oluşan iki ayrı gen kümesinin promotor analizi ile her bir gen kümesine ait genlerin promotor bölgesinde bulunan olası ortak nükleotit motifleri belirlendi. Sonuç olarak, veri setinden elde edilen anlamlı genlerin ek moleküler biyolojik yöntemlerle ileri çözümlenmeleri, Huh7 hücrelerinde proliferasyon inhibisyonu üzerine Lityum etkisinin altında yatan moleküler mekanizmanın anlaşılmasına yardımcı olacağına inanmaktayız.

**Anahtar sözcükler:** Hepatosellüler karsinoma, mikrodizin, biyoinformatik

***In Silico* Modelling of the Hepatocellular Carcinoma  
Microarray Expression Data**

**Gökhan Karakulah**

Department of Medical Informatics, Health Sciences Institute, Dokuz Eylül University

İnciraltı-İzmir/TURKEY

gokhan.karakulah@deu.edu.tr

In this study, the expression microarray data sets were obtained by using Huh7 cell line were analyzed to identify the genes, expressions of those changed at transcript-level during proliferation inhibition by the action of Lithium in HCC cells, and the pathways involving those genes. Firstly, the genome-wide expression profiles obtained from Huh7 cells treated with 20 mM LiCl for 48 hours and untreated, were analyzed using Significance Analysis of Microarray method. After statistical significance testing, it was determined that there were significantly up and down regulated 1807 genes in Huh7 cell line in comparison to control condition (FDR<0.01). After annotation analysis of significantly affected genes, 142 different pathways related to significant genes in Huh7 cell line were found and 18 out of these pathways were determined as statistically significant ( $p<0.01$ ). Also, Gene Ontology term analysis showed that significantly up and down regulated genes were involved in diverse biological processes and molecular functions. Through the promoter analysis of two different gene clusters bearing up and down regulated genes with 4 or greater than 4 fold change, the possible common nucleotide motifs located the promoter regions of the genes in each gene cluster was determined. In conclusion, we believe that further analysis of the significant genes obtained from the data sets with additional molecular biological methods will help to understand the underlying molecular mechanism of Lithium effects on proliferation inhibition in Huh7 cells.

**Keywords:** Hepatocellular carcinoma, microarray, bioinformatics

## **GİRİŞ VE AMAÇ**

Primer karaciğer kanseri olgularının yüzde seksen üçünü oluşturan hepatosellüler karsinoma (HCC), dünya popülasyonunun tamamı üzerinde etkili, neoplazm yapan bir hastalıktır (1). Gerek HCC'li bireylerin sağ kalım oranının oldukça düşük olması, gerekse de moleküler patogenezi ile ilgili bilinmeyenlerin çokluğu, HCC'nin erken tanı ve tedavisi için bu kanser türünün oluşumunda ve gelişiminde rol oynayan moleküler mekanizmaların belirlenmesi ve anlaşılması ile ilgili çalışmaları önemli bir hale getirmiştir (2, 3).

Son yıllarda, kanser gibi oluşumunda çoklu genetik ve epigenetik değişikliklerin bulunduğu multifaktöryel hastalıkların moleküler mekanizmalarındaki karmaşıklığı anlamak için, ekspresyon mikrodizin yöntemi, hücrenin tüm genlerindeki değişimlerin aynı anda gösterilebilir olması nedeniyle üstün bir yöntem olarak kullanımda tercih edilmektedir. Bu yöntem ile hücre transkriptomuna ait tüm mRNA'ların ekspresyon düzeylerinin eş zamanlı olarak ölçülmesi dolayısıyla farklı biyolojik durumlar arasındaki gen ekspresyonu değişimlerinin ve farklılıklarının bir bütün olarak ele alınması ve değerlendirilmesi mümkün olmaktadır (29, 30, 31, 35, 36).

Daha önceki bir çalışmamızda, bipolar bozuklukların sağaltımında uzun yıllardır kullanılan temel bir terapötik ajan olan Lityum'un, beklenmedik bir şekilde HCC hücrelerinde proliferasyon inhibisyonuna neden olduğunu göstermiştik (59). Bu çalışmada da bir HCC hücre hattı olan Huh7 hücrelerinde Lityum etkisinde oluşan G1 hücre döngüsü duraksaması sonucunda meydana gelen genom düzeyindeki değişikliklerin, ekspresyon mikrodizin yöntemi kullanılarak biyoinformatik araçlar yardımı ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda çalışmada Lityum uygulanan ve uygulanmayan Huh7 hücrelerinden elde edilmiş mRNA ekspresyon verileri kullanılarak, HCC'de hücre proliferasyonu inhibisyonu ile ilişkili aday genler, olası yolaklar ve moleküler mekanizmaların belirlenmesi hedeflenmiştir.

## **BÖLÜM 1. GENEL BİLGİLER**

### **1.1. Hepatosellüler karsinoma**

Günümüzde karaciğer kanseri, olgu sayısı bakımından tüm dünyada en sık rastlanan altıncı kanser türü olup, her yıl altı yüz bin civarında yeni karaciğer kanseri olgusuna rastlanmaktadır (1). Mevcut primer karaciğer kanseri olgularının yüzde seksen üçünü oluşturan HCC, karaciğer kanseri türleri arasında en yaygın olanıdır ve HCC'li bireylerin sağkalım oranı yüzde 3 ile yüzde 5 aralığında değişmektedir (1, 2).

Önceleri HCC'nin sadece Afrika ve Asya'da temel bir sağlık problemi olduğu düşünülmüş olsa da, mevcut veriler Avrupa ve Amerika'da da HCC insidansının artmakta olduğunu ortaya koymaktadır (1). Bu açıdan HCC'nin moleküler patogenezi, epidemiyolojisi ve sağaltımı ile ilgili araştırmalar oldukça önem kazanmaya ve dikkat çekmeye başlamıştır (3).

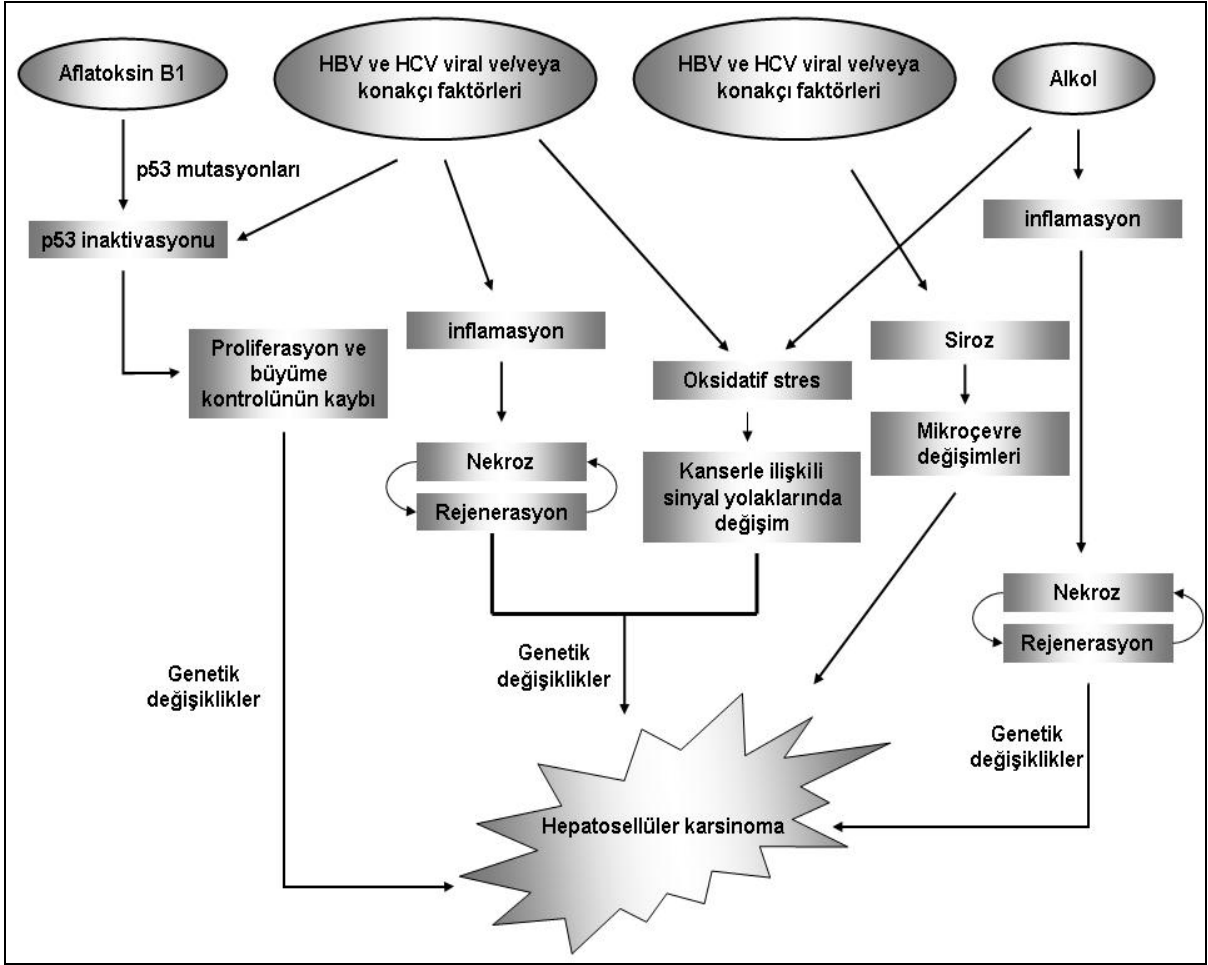
HCC için hepatit B (HBV) ve hepatit C (HCV) viral enfeksiyonları, kronik alkol tüketimi, aflatoksin-B1 ile kontamine olmuş yiyecekler ve siroz oluşumuna yol açan koşullar en çok göze çarpan etkenler olarak bilinirken, kadınlarda uzun dönemli oral kontraseptiv kullanımı, hemokromatozis, diyabet, aşırı demir alımı ve sigara kullanımı daha düşük sıklıkla HCC'ye neden olan diğer etiyolojik faktörler olarak bilinmektedir (4, 5).

Hepatokarsinogenezis olarak adlandırılan HCC fenotipinin gelişim sürecinde, pek çok sayıda genin çok basamaklı bir süreçte genetik ve epigenetik değişimleri rol oynamaktadır (4, 6). Bu uzun preneoplastik evre boyunca, özellikle yukarıda belirtilen faktörler etkisinde oluşan hepatosit ölümleri (nekroz) ve buna karşılık gerçekleşen hepatosit rejenerasyonunun tekrarlayan döngülerinin oluşturduğu mitojenik yollara ait genlerin ifadesindeki değişimler, beraberinde kronik hepatit, siroz ya da her ikisini birden meydana getirmektedir. Yine bu preneoplastik evre, telomer erozyonuna sahip, telomeraz aktivitesi artmış ve bazen de mikrosatellit instabilitesi içeren, anormal ve displastik monoklonal hepatosit popülasyonunun oluşumuna neden olmaktadır (6). Gen ekspresyonunda meydana gelen bu preneoplastik değişimler, DNA metilasyonundaki başkalaşım, HBV ve HCV etkisi, nokta mutasyonları ya da

heterozigosite kayıplarının (LOH) bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (4). Sonuç olarak HCC' de kromozom ve gen düzeyinde meydana gelen geri dönüşümsüz yapısal değişimler, odak ve nodüllerde displastik hepatositlerin gelişimi ve beraberinde HCC'nin oluşumuna neden olmaktadır (6).

### **1.1.1. Hepatosellüler karsinomanın etiyolojisi**

Etnik köken ve özgül etiyolojik faktörlerin prevalansı açısından bölgesel çeşitlilik gösteren ülkelerde, HCC insidansında anlamlı farklar bulunmasına rağmen HCC dünya popülasyonunun tamamı üzerinde etkili olmaktadır (7). HCC oluşumu, kronik karaciğer hasarı ile yakın ilişkili olmakla birlikte nadiren sağlıklı bir karaciğerin normal yaşlanma sürecinde de gözlenebilmektedir (8). Kronik karaciğer hasarı ve beraberinde HCC oluşumunda, kronik HBV ve HCV viral enfeksiyonları, kronik alkol tüketimi, aflatoksin-B1 ve siroz oluşumuna yol açan koşullar en temel etiyolojik faktörler olarak göze çarpmaktadır. 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 (Şekil 1) (4, 7).



**Şekil 1. HCC’de risk faktörleri ve hepatokarsinogenezis süreçleri (7).**

*Hepatokarsinogenezisin viral enfeksiyonlarla indüklenmesi:* HCC oluşumu ile ilişkili olduğu bilinen iki farklı hepatit virüsü bulunmaktadır. Bu virüslerden biri hepadnaviridae familyasına ait, sitopatik olmayan ve kısmen çift iplikli hepatotropik bir DNA virüsü olan HBV’dir. Bir diğeri ise flaviviridae familyasına ait, sitopatik olmayan bir RNA virüsü olan HCV’dir (7).

HBV, sahip olduğu genomunu konakçı DNA’sı ile bütünleştirmesi sonucunda, konakçı DNA’sındaki TERT, PDGFR $\beta$  ve MAPK1 gibi kanser ile ilişkili genlerde mikrolezyonlara neden olmaktadır (8, 9). Ayrıca HBV, kendi yaşam döngüsü ile ilişkili kodladığı pek çok viral proteinin yanında HBx gibi işlevi tam olarak anlaşılamamış olan proteinleri de kodlamaktadır (10). Bu proteinlerden HBx’in transkripsiyonel aktivasyonu, konakçı hücreye ait Ras, SRC, Raf, MAPK, ERK, JNK gibi hücre büyümesi ve çoğalması ile ilişkili genlerin ifade şekillerini değiştirmektedir

(4, 11). Bunun yanında HBX proteinin, *p53* genine bağlanarak *p53* aktivasyonunu engellediği, dolayısıyla konakçı hücrenin hücre sağ kalımını ve çoğalmasını artırdığı bilinmektedir (12).

Bir RNA virüsü olan HCV ise, konakçı genomu ile bütünleşmeden, kodlamış olduğu kor proteini aracılığı ile MAPK sinyal yolağının bileşenleri ERK, MEK ve Raf ile etkileşime girerek, konak hücrenin çoğalmasını modüle etmektedir (13). HCV'nin kodlamış olduğu yapısal olmayan proteinlerden NS5A ise *p53* genini inaktive ederek, bu gen tarafından regüle edilen hücre döngüsü progresyonu ve sağ kalımı, genotipik ve hipoksik strese yanıt ile tümör anjiyogenezi ile ilişkili yolları etkilemektedir. (14). Ayrıca HCV kor proteini, reaktif oksijen radikallerini indükleyerek, hepatosellüler karsinoma fenotipinin gelişimini desteklediği gösterilmiştir (15).

HCV hepatokarsinogenez açısından HBV'den üç önemli kliniko-biyolojik fark ile ayrılmaktadır. Bu farklardan ilki, HCV'nin HBV'ye göre daha fazla kronik enfeksiyon oluşturma eğilimidir. Diğerleri ise HCV'nin daha fazla siroz geliştirme eğiliminde olması ve HCV'nin konakçı genomu ile bütünleşmesidir (7).

*Hepatokarsinogenezisin alkol ile indüklenmesi:* Kronik alkol tüketimi HCC için önemli bir risk faktörüdür. Kronik alkol alımı, kan dolaşımındaki endotoksin yoğunluğunu artırarak küpffer hücrelerini aktive eder ve beraberinde TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  ve prostaglandin E<sub>2</sub> gibi kemokin ve sitokinlerin salınımını artırır (16). Bu durum kronik hepatosit hasarı-yenilenmesi sürecini artırır ve ilerleyen basamaklarda, *stellate* hücrelerinin aktivasyonunu, sirozu ve sonunda HCC fenotipinin oluşumunu uyarır (7). Ayrıca alkol, oksidatif stres mekanizmasını uyararak, fibrozis ve siroz gelişimine olanak sağlar ve HCC mikroçevresinin oluşumuna yardımcı olur (7). Aynı zamanda oksidatif stres, onkogenik mutasyonların birikmesine de olanak sağlayarak HCC oluşumunda rol oynayabilmektedir (7).

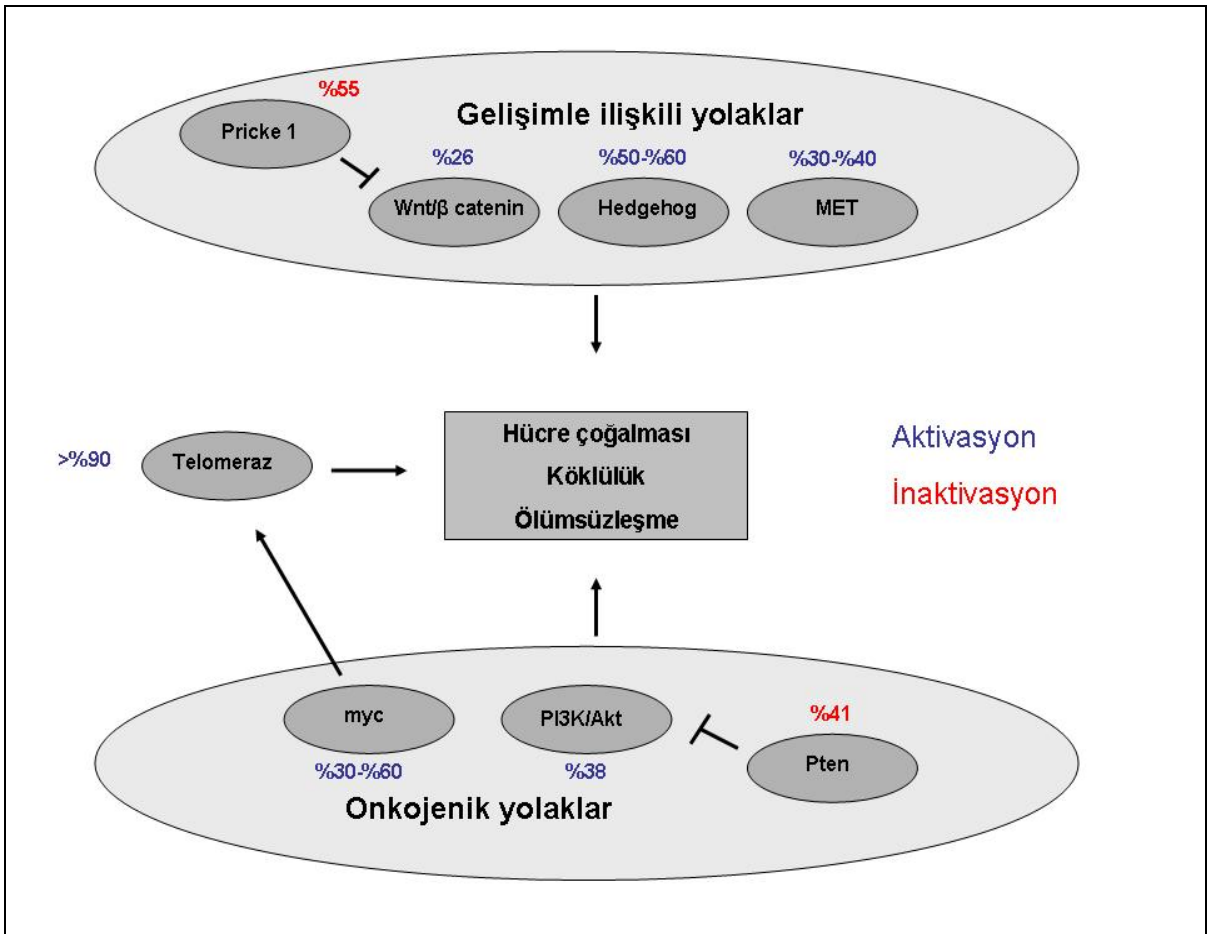
*Hepatokarsinogenezisin aflatoksin-B1 ile indüklenmesi:* Bir fungal toksin olan aflatoksin-B1, HCC gelişimi riskini artırdığı düşünülmektedir. Aflatoksin-B1 mutajen işlevi göstererek, *p53* geninde özgül mutasyon ve H-Ras gibi onkogenlerin aktivasyonunda değişimler meydana getirmektedir (17, 18).



### 1.1.2. Hepatosellüler karsinomada genetik değişiklikler

Translokasyonlar ve kromozom kopya sayısındaki değişikliklerin fazlalığı ile karakterize edilen HCC'de, DNA replikasyonu hatalarının görülme sıklığı oldukça düşüktür ve dolayısıyla replikasyon hatalarından kaynaklanan genetik değişiklikler hepatokarsinogenezisin temel moleküler mekanizmasını oluşturmazlar (19, 20).

Hepatokarsinogenezisde meydana gelen gen ekspresyonu değişiklikleri beraberinde bazı gelişimsel ve onkojenik yolların aktivasyonuna yol açmaktadır (19). İnsan HCC'lerinin yaklaşık yüzde yirmi ile yüzde altmışında Akt, myc,  $\beta$ -catenin, hedgehog ve met yollarında aktivasyon gözlenir (Şekil 2) (19). Bunun yanında her ne kadar telomerazın kendisi bir onkogen olmasa da, tümör hücrelerine sonsuz sayıda bölünme özelliği kazandıran telomerazın (hTERT) aktivasyonu HCC'de oldukça sık olarak gözlenen bir durumdur (19).



Şekil 2. HCC ile ilişkili gelişimsel ve onkojenik yollardaki değişimler (19).

*PI3K/Akt*: PI3K/Akt sinyal yolağı, hücre büyümesi ve sağ kalımı ile hücre içi iskelet elemanlarının düzenlenmesi gibi temel hücresele olayların düzenlenmesinde etkindir (21). İnsan HCC'lerinin yaklaşık olarak yüzde kırk ile yüzde altmışında Akt sinyal yolağının aktivasyonu ve Akt'ın negatif düzenleyicisi olan fosfataz ve tensin homolog geni PTEN'in ekspresyonunda azalma meydana geldiği gösterilmiştir (22). PTEN inaktivasyonu ile gerçekleşen Akt sinyal yolağı aktivasyonu, *transforming growth factor β* ve *CCAAT/enhancer binding protein α*'yı baskılayarak apoptoza karşı direnci artırır ve hücre büyümesini hızlandırır. Böylelikle her iki proteinin etkinliklerinde meydana gelen değişiklikler siroz evresindeki karaciğerde kanser oluşumunu destekler (19).

PI3K/Akt yolağının aktivasyonunu sağlayan ve hücre zarına takılı inositol 3,4,5 trifosfat havuzunun regülasyonunda rolü olan inositol monofosfataz enziminin, Lityum tarafından inhibe edildiği bilinmektedir (62, 63). Erdal E. ve arkadaşları tarafından HCC hücreleri ile yapılan bir çalışmada, Lityum etkisinde ilk olarak, sağkalımdaki önemli rolüyle tanımlanmış olan PI3K/Akt sinyal yolağı inhibisyonu olmasına rağmen, in vitro kültür koşullarında, HCC hücrelerinin apoptoza girmeksizin hücre proliferasyonlarını G1 noktasında durdurduğu gözlenmiştir ve bu durum Lityum'un henüz bilinmeyen mekanizmalarla proliferasyonu durdurduğunu düşündürmüştür (59). Yine aynı çalışmada gösterildiği gibi bu etkinin çalışılan hücre hatlarının neredeyse tamamında gözlenmesi, bu bilinmeyen mekanizmanın HCC hücrelerinde proliferasyonun durdurulmasında geçerli genel bir mekanizma olduğu ihtimalini işaret etmesi bakımından oldukça önemlidir (59).

*Wnt/β-catenin*: Wnt/β-catenin, tümorogenez ve embriyonik gelişimin her ikisinde birden önemli rolleri bulunan bir sinyal yolağıdır (23). Hücrenin Wnt sinyali ile uyarılmasının ardından hücre sitoplazmasında yıkılmadan biriken β-catenin'nin hücre çekirdeğine taşınmasını sağlayacak bir dizi moleküler değişiklikler meydana gelir (23). β-catenin hücre çekirdeğinde Tcf/Lef ailesine ait transkripsiyon faktörlerini aktive eder ve bu şekilde kanser ile ilişkili süreçlerde rol oynayan myc, cyclin D1, COX2 ve matrix metalloproteinase 7 gibi genlerin ekspresyonunda artış sağlar (23). İnsan HCC'de β-catenin sinyal yolağının aktivasyonu sıkça gözlenen bir durumdur ve HCC olgularının yaklaşık yüzde kırkında, β-catenin'in çekirdekte aşırı artışı ve β-catenin

mutasyonlarının varlığı gösterilmiştir (20, 24). Bunun yanında HCC olgularında Wnt sinyal yolağının diğer elemanları olan Axin-1 ve Axin-2'de mutasyonlar ve PIN1 (yüzde elli artış), FZD7 (yüzde doksan artış) ve HDPR1 (yüzde elli sekiz azalma) genlerinde ekspresyonel değişimler gözlenmektedir (25).

Lityum'un,  $\beta$ -catenin yıkım kutusunda ana oyuncu olan GSK3 $\beta$  enziminin inhibisyonuna neden olduğu çeşitli modellerde tanımlanmış olup, Erdal E. ve arkadaşları tarafından HCC hücrelerinde, Lityum etkisi ile GSK3 $\beta$  enziminin inhibe formunda ve Tcf/Lef transkripsiyonel aktivitesinde artış olduğu gösterilmiştir (59). Yine ilginç olarak, Tcf/Lef aktivitesi arttığı halde bu hücrelerde proliferasyonun durması, proliferasyon inhibisyonunda etkin başka karmaşık mekanizmaların olduğunu düşündürmüştür (59).

### **1.1.3. Hepatosellüler karsinomada gen ekspresyonu değişimleri**

Günümüzde, HCC'nin moleküler düzeyde sınıflandırılması ve gen ekspresyon örüntülerinin belirlenmesi ile ilgili pek çok çalışma bulunmaktadır (26, 27, 17). Luo ve ark. tarafından HCC olgusu taşıyan hastalarda yapılan global mRNA ekspresyon profili çalışmasında, normal karaciğer dokusu ile HCC olgusu taşıyan karaciğer dokusu arasında yaklaşık dört bin genin ekspresyonunun anlamlı olarak değiştiği gösterilmiştir (26). Luo ve ark. ekspresyonu en çok artan yüz yirmi genin büyük çoğunluğunun matriks ya da matriks sinyalleme ile ilişkili olduğunu, bunun yanında ekspresyonu azalan genlerin pek çoğunu ise Metallothionein protein ailesi üyelerinin oluşturduğunu belirlemiştir (26).

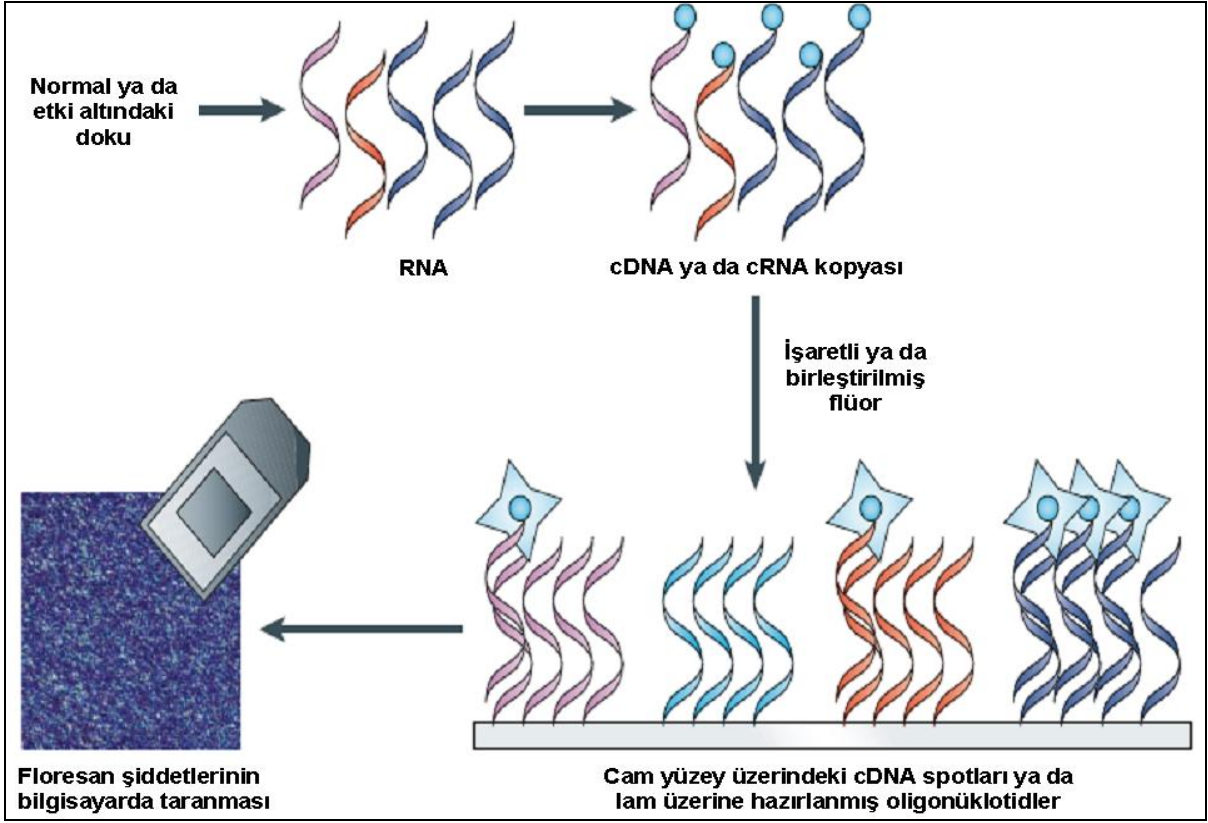
Midorikawa ve ark. tarafından HCC olgusu taşıyan bireylerde yapılan allelik gen dozaj analizlerinde ise PTEN, DMBT1, BRCA2, RB ve DLC2 genlerinde LOH gözlenmiştir (28). İlgi çekici bir diğer bulgu ise apoptotik hücre ölümü ve *G1 arrest* ile tümör hücrelerinin çoğalmasını inhibe eden PLAGL1 geninin HCC'de epigenetik yolla susturulmasıdır (28).

### **1.2. Ekspresyon mikrodizin yöntemi**

Ekspresyon mikrodizinleriyle yapılan ilk çalışmanın 1995 yılında Schena ve ark. tarafından *Science* dergisinde yayımlanmasının ardından, mikrodizin yöntemi,

biyolojik olayların daha geniş bir bakış açısı ile ele alınmasında yeni bir yöntem olarak hızla benimsenmiştir (29, 30). Moleküler biyoloji alanındaki bu teknolojik gelişimin yardımı ile hücre transkriptomundaki mRNA'ların ekspresyon değerlerinin eş zamanlı olarak ölçülmesi olanaklı hale gelmiş ve ekspresyon mikrodizinleri, kanser, nöropsikiyatrik hastalıklar ve astım gibi farklı tipteki olguların gen ekspresyonu değişimlerinin belirlenmesi ve ilişkili moleküler mekanizmaların aydınlatılmasında kullanılmaya başlanmıştır (30, 31).

Temel olarak bir ekspresyon mikrodizin çipi ile farklı genlerin ekspresyon düzeylerinin ölçülmesinde izlenen yol, biyolojik örneklerden izole edilen cRNA ya da cDNA'ların floresan boyalar ile işaretlenmesi ve işaretlenen bu moleküllerin mikrodizin çipi ile hibridizasyonu sonrasında bilgisayarlar ve ilgili yazılımlar aracılığıyla yaydığı ışık şiddetlerinin ölçülmesi şeklindedir (32). Günümüzde farklı amaçlara uygun olarak tasarlanmış değişik mikrodizin platformları ve protokolleri bulunmasına rağmen gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde izlenen yol genel olarak aynıdır (Şekil 3) (31, 32).



**Şekil 3. Ekspresyon mikrodizin yöntemiyle farklı genlerin ekspresyon seviyelerinin ölçülmesinde izlenen basamaklar:** Biyolojik örnekten elde edilen cRNA ya da cDNA, floresan boyalar ile işaretlenir ve işaretli moleküller, mikrodizin yüzeyinde bulunan tamamlayıcı diziler ile hibridize edilir. Hibridizasyon sonununda yıkama işlemi yapılarak artık moleküller uzaklaştırılır ve moleküllere ait floresan şiddetinin yoğunluğu ölçülerek, ilgili genin ekspresyon değeri saptanır (32).

Ekspresyon mikrodizin yönteminin basamakları, hücreye ait mRNA'ların ekspresyon düzeylerinin deneysel yollarla ölçülmesi ile sınırlı olmayıp, elde edilen ölçüm değerlerinin işlenmesi ve çözümlenmesi ile devam etmektedir (33). Genel anlamda ekspresyon mikrodizin yönteminin veri işleme ve çözümlenme basamaklarını, 1) RNA'lara ait ışık şiddetlerinin ölçülmesi ile elde edilen ham ekspresyon verilerinin normalize edilmesi 2) Normalize verilerin istatistiksel anlamlılığının test edilmesi 3) Veriler üzerinde biyolojik yorumlar ve çıkarımların yapılması, oluşturmaktadır (33). Belirtilen basamakların her birinde farklı biyoinformatik araçlar ve istatistiksel çözümlenme yöntemleri yoğun bir şekilde kullanılmakta olup, bu bakımdan

ekspresyon mikrodizin yöntemi yüksek derecede biyoinformatik, matematik ve istatistik disiplinlerine bağımlıdır (33, 34).

### **1.2.1. Ekspresyon mikrodizinlerinin kanser araştırmalarında kullanımı**

Kanser ile ilgili yapılan moleküler genetik çalışmalar, kanser hücrelerinde çoklu genetik ve epigenetik değişikliklerin varlığını ortaya koymaktadır (35, 36). Bu açıdan kanser çalışmalarındaki temel amaçlardan biride, kanserli ve normal hücreler arasındaki karmaşık moleküler farklılıkların tanımlanması ve aydınlatılmasıdır (37). Geniş bir uygulama alanı olan ekspresyon mikrodizinlerinin, kanser biyolojisindeki bilinen en yaygın kullanım şekli kanserli hücrelere ait global gen ekspresyon profillerinin çıkarılması şeklindedir (38).

Günümüzde, ekspresyon mikrodizinleri ile yapılan kanser çalışmalarında izlenen farklı stratejiler temel olarak, 1) Tümör hücrelerinin genom düzeyinde mRNA ekspresyonu seviyelerinin, normal hücrelerden oluşan kontrol grubuna göre kıyaslanması ve her iki fenotipteki benzerlik ve farklılıkların belirlenmesi 2) Aynı kanser türündeki ekspresyon farklılıklarının belirlenerek, kanser türlerinin moleküler düzeyde sınıflandırılması ve 3) Belirli bir kanser tipinin gelişimindeki gözlenen farklı aşamalarının ekspresyon örüntülerinin değerlendirilmesi ile erken ve ilerleyen aşamalardaki farklılıkların ortaya konmasıdır (39).

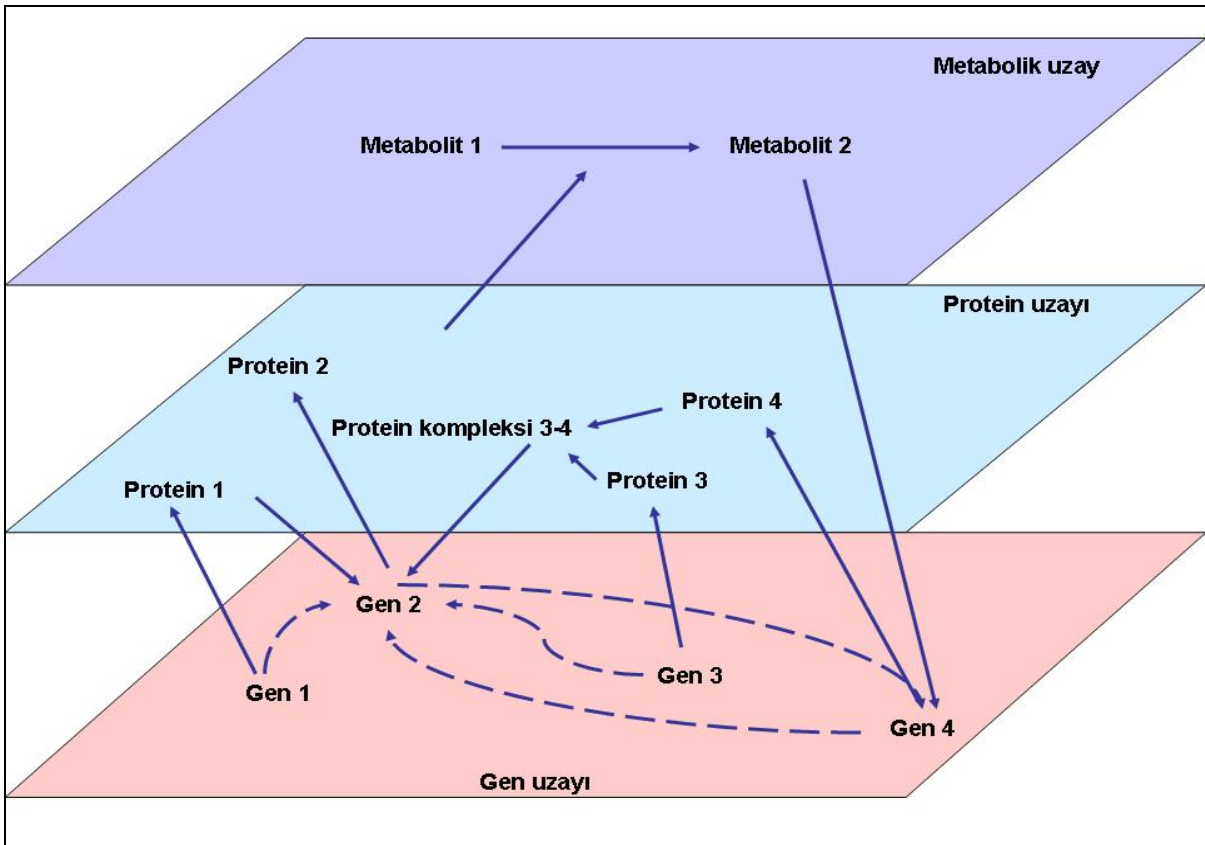
Bunun yanı sıra, mikrodizin teknolojisinin kanser tedavisinde yeni ilaçların keşfi ile hastalığın tanı ve tedavisi için yeni araçların geliştirilmesi gibi geniş bir kullanım alanı da mevcuttur (33).

### **1.2.2. Ekspresyon mikrodizinleri ve biyokimyasal etkileşim ağları**

Genomik ve fonksiyonel genomik alanlarında, *gigabyte*'lerle ifade edilen verilerin elde edilmesini sağlayan ekspresyon mikrodizinleri ve yüksek işlem kapasiteli teknolojilerin gelişimi, tek bir molekül ya da reaksiyona odaklanarak hücre içerisindeki karmaşık etkileşimler ağını anlamaya çalışan klasik moleküler biyolojik yaklaşımların ötesine geçilmesini sağlamıştır (40). Bu açıdan, ekspresyon mikrodizinleri kullanılarak yapılan çalışmalardan elde edilen verilerdeki dinamiklerin

ve karmaşık ilişkilerin anlaşılmasında, biyokimyasal ağların oluşturulması büyük önem taşımaktadır (40).

Basit anlamda biyokimyasal bir ağ, biyomoleküllerden her birinin bir düğümle sembolize edildiği ve ağ elemanları arasındaki ilişkilerin bağlantılarla gösterildiği bir sunum şekli olarak ifade edilebilmekte ve farklı seviyelerde oluşturulmaktadır (Şekil 4) (40, 41). Geleneksel olarak biyokimyasal ağlar, 1) Metabolitler arası kimyasal dönüşümlerin gösterildiği metabolik ağlar 2) Sinyal enzimleri aracılığıyla meydana gelen protein modifikasyonları gibi protein-protein etkileşimlerinin ifade edildiği protein ağları ve 3) Ekspresyonu değişen bir genin diğer genlerin ekspresyon düzeyini etkilemesi gibi genler arası ilişkilerin sunulduğu gen ağları olarak düşünülebilir (40)



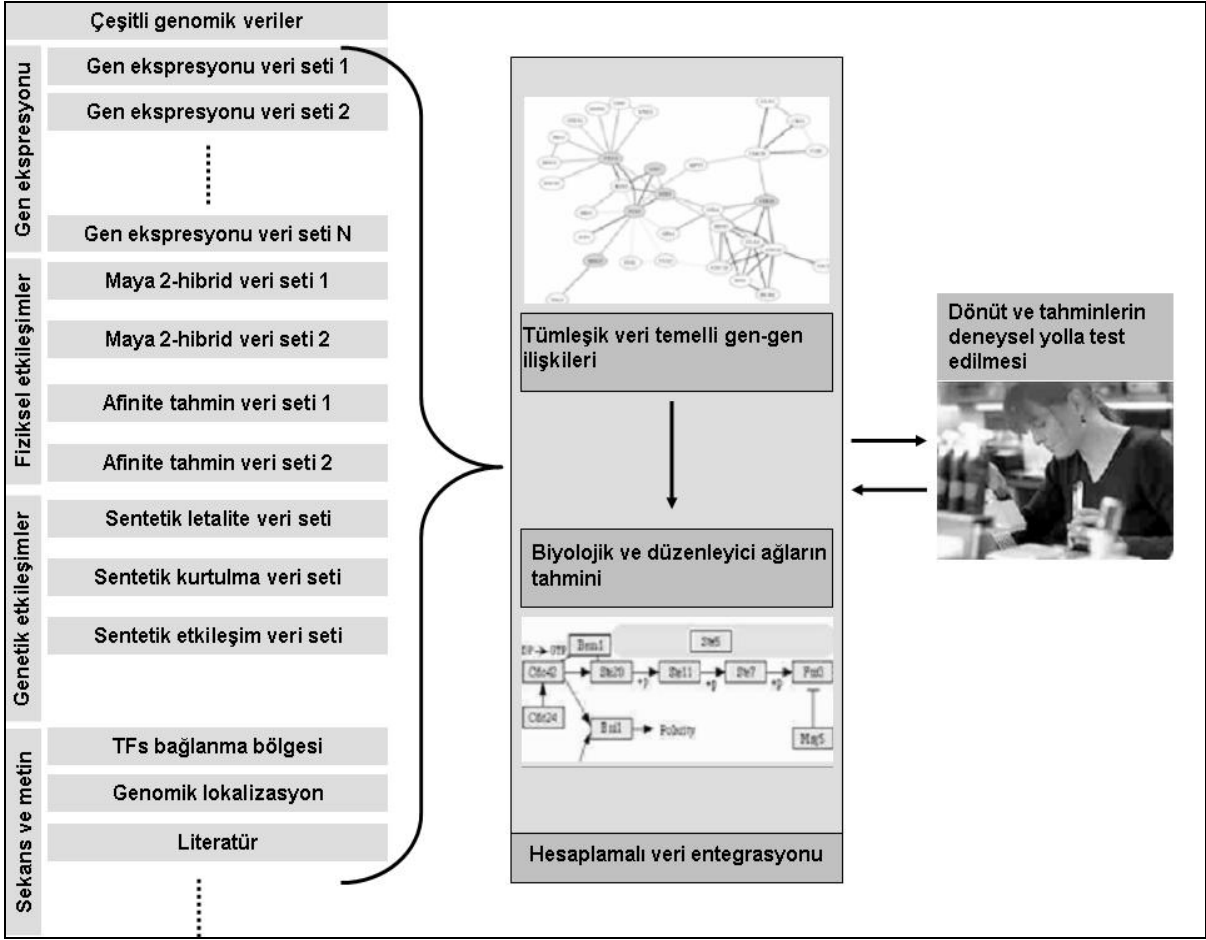
**Şekil 4. Örnek bir biyokimyasal ilişkiler ağı;** Biyokimyasal ağlar farklı seviyelerde tanımlanabilir ve ağ elemanları arasındaki ilişkileri gösterebilir. Kesikli çizgilerle gösterilen oklar genler arası ilişkileri, sürekli çizgiler ise protein-protein, gen-protein ve metabolitler arası etkileşimleri sembolize etmektedir (40).

Biyokimyasal ağ tiplerinden biri olan gen ağları ile farklı tipteki biyolojik veri setlerine ya da bir ekspresyon mikrodizin çalışmasındaki verilere ait ilişkilerin gösterimi ve sembolize edilmesi sağlanabilir (40, 41). Özellikle kanser gibi karmaşık sinyal ileti ve ilişki ağlarının var olduğu olgularda, özgül bir mutasyonun tüm sistemde yarattığı etkiler, gen ağları üzerinden matematiksel modeller aracılığı ile tahmin edilebilir ve bu tahminlerin doğruluğu deneysel yollarla gerçekleştirilebilir (37).

### **1.2.3. Tümleşik ekspresyon mikrodizini veri çözümlemesi**

Günümüzde, aralarında insanında bulunduğu pek çok canlının genomuna ait diziler belirlenmiş olup, yapılan fonksiyonel genomik çalışmalarla bu canlılardaki genlerin işlevleri tanımlanmaya çalışılmaktadır (42, 43). Fonksiyonel genomik alanındaki çalışmalar veri kaynağı açısından yüksek işlem kapasiteli teknolojilere bağımlı durumda olup, bu alanda veri sağlayan önemli araçlardan biriside, farklı durumlardaki biyolojik örneklerin gen ekspresyon seviyelerindeki değişimleri dolayısıyla genlerin işlevlerinin ve davranışlarının belirlenmesine yardımcı olan gen ekspresyonu mikrodizinleridir (30, 44). Ancak ekspresyon mikrodizinlerinden elde edilen veriler görece olarak geleneksel deney yöntemlerinden daha düşük kalitede veri sağlamaktadır (45, 46). Bu durum ekspresyon mikrodizin yöntemi kullanılarak elde edilen verilerin daha gelişmiş yöntemlerle değerlendirilmesini ve yorumlanmasını gerektirmektedir (45). Bu bağlamda mikrodizin verilerinin çözülmesinde, ekspresyon, dizi, etkileşim, hücresel yerleşim ve literatür verileri bütünleştirilerek ele alınmakta ve veriler bir bütün halinde yorumlanmaktadır (Şekil 5) (45).





Şekil 5. Genomik verilerinin tümleşik çözümlemesine genel bir bakış (45).

## **BÖLÜM 2. YÖNTEM VE GEREÇLER**

### **2.1. Mikrodizin veri çözümlemesi**

#### **2.1.1. Huh7 ham mikrodizin verileri**

Lityum'un, Huh7 hücrelerinde meydana getirmiş olduğu gen ekspresyonu değişikliklerinin *in silico* çözümlenmesinde, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Şerife Esra Erdal tarafından yapılmış bir mikrodizin çalışmasına ait ham ekspresyon verileri kullanılmıştır (Ek-1) (47). Bu çalışmada kullanılan veriler, birbirinden bağımsız üç ayrı sette, 48 saat, 20 mM LiCl uygulanarak ve uygulanmayarak çoğaltılan Huh7 hücrelerinde elde edilen cRNA'ların, elli dört bin altı yüz yetmiş beş prob setinden oluşan *Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0* platformu kullanılarak çiplerin üzerine hibridizasyonu sonrasındaki ölçümlerle elde edilmiştir (48). Belirtilen yöntemle elde edilen ve ham ekspresyon verilerini taşıyan CEL dosyaları Tablo 2'de belirtildiği gibi isimlendirilmiş ve sonraki çözümleme basamaklarında bu dosya adları kullanılmıştır.

**Tablo 1. Mikrodizin çalışmasından elde edilen CEL dosyalarına verilen isimler.**

Flask No	Hücre Hattı	Huh7	
		Lityum -	Lityum +
1		Huh7D1.CEL	Huh7D1Li1.CEL
2		Huh7D2CEL	Huh7D2Li2.CEL
3		Huh7D1.CEL	Huh7D3Li3CEL

#### **2.1.2. R programlama dili ve ortamı**

Bu çalışmanın veri çözümleme ile ilgili pek çok basamağı, mikrodizin istatistiksel çözümlenmeleri ile bu çözümlenmelere ait girdi ve çıktılarının resmedilmesinde yaygın bir şekilde kullanılan R programlama dili ve ortamı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (49). Çalışmadaki mikrodizin çiplerinin kalite değerlendirmesi, ham ekspresyon verilerinin normalizasyonu ve normalize ekspresyon verilerinin istatistiksel çözümlenmeleri için R 2.5.1 sürümü kullanılmıştır.

### **2.1.3. Mikrodizin çiplerinin kalite değerlendirmesi**

Mikrodizin çiplerindeki olası kalıntılar, ham ekspresyon verilerinin kalitesini ve beraberinde denemelerden elde edilen sonuçların doğruluğunu etkileyebilmektedir. Bu sebeple ham ekspresyon verilerinin elde edilmesinde kullanılan mikrodizin çiplerinin kalite değerlendirmesi yapılmıştır. Kalite değerlendirme işleminde R ortamı için hazırlanmış olan *affyPLM* paketi kullanılmış ve pakette bulunan *image* fonksiyonu ile her bir çipe ait psödo görüntüler elde edilmiştir. Daha sonra her bir çipe ait kutu-çizgi grafikleri, *Relative Log Expression* (RLE) ve *Normalized Unscaled Standart Errors* (NUSE) araçları ile resmedilmiştir.

### **2.1.4. Ham mikrodizin verilerinin normalizasyonu ve istatistiksel çözümlenmesi**

Huh7 hücrelerine ait ham ekspresyon verilerinin normalizasyonu, *affy* paketindeki *expresso* fonksiyonu kullanılarak R ortamında yapılmıştır. Çalışmada kullanılan 6 .CEL dosyası bir arada normalize edilirken, normalizasyon işlemi için kullanılan *expresso* fonksiyonu; *rma background correction*, *quantile normalization*, *pmonly PM correct* ve *medianpolish summarization* yöntemlerinin bir araya getirilmesi ile oluşturulmuştur. Aynı zamanda normalizasyon öncesi ve sonrası, *boxplot* fonksiyonu kullanılarak ekspresyon verilerine ait kutu-çizgi grafikleri elde edilmiştir.

Lityum'un Huh7 hücrelerinde, gen ekspresyonu düzeyinde meydana getirdiği değişikliklerin istatistiksel anlamlılığının ortaya konması için, *Significance Analysis of Microarray* (SAM) yöntemi ile istatistiksel çözümlenme yapılmıştır. İstatistiksel çözümlenmeler normalize ekspresyon verileri kullanılarak, SAM yönteminin R ortamına uyarlanmış şekli *samr* paketi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (50). İstatistiksel çözümlenme ile veri setine ait delta tablosu hesaplanmış ve *False Discovery Rate* (FDR) değeri 0.01'den küçük olma koşulunu sağlayan  $\delta = 1,22628531732132$  değeri seçilmiştir. Bu yolla Huh7 hücre hattında ekspresyonu, Lityum uygulanmamış hücrelerdekine göre anlamlı olarak artmış ya da azalmış problemler belirlenmiştir.

### **2.1.5. Prob adlarının gen adı ve sembollerine dönüştürülmesi**

Mikrodizin veri çözümlemesinin ilerleyen basamaklarında kullanılmak üzere, kimyasal etken karşısında ekspresyonu anlamlı olarak azalmış ve artmış prob adları, R ortamında hgu133plus2 paketi kullanılarak gen sembolleri, gen adları ve Entrez veri tabanı kayıt numaralarına dönüştürülmüştür.

### **2.1.6. İnternet tabanlı biyoinformatik araçları ile istatistiksel sonuçların çözümlenmesi**

Ekspresyon düzeyleri anlamlı bir şekilde değişmiş problemlerin, biyolojik açıdan taşıdığı anlamların ortaya konması için *WebGestalt*, *Onto-Express* ve *Fatigo+* fonksiyonel açıklama araçları kullanılmıştır (51, 52, 53). Belirtilen web araçları ile ekspresyonu anlamlı olarak değişmiş olan genlerin farklı doku tiplerindeki ekspresyon örüntüleri, sahip olduğu Gene Ontolojisi (GO) terimleri ve ilişkili olduğu yolların belirlenmesi ve bunların istatistiksel anlamlılığının test edilmesi amaçlanmıştır. *WebGestalt* veri tabanı kullanılarak yapılan GO çözümlemesinde, istatistiksel yöntem olarak hipergeometrik test, anlamlılık düzeyi olarak da 0.01 değeri seçilmiştir. *Onto-Express* veri tabanı ile yapılan çözümlemelerde ise istatistiksel anlamlılığın test edilmesinde FDR yöntemi tercih edilmiştir.

Ayrıca gen ekspresyonu verilerinin gen seti düzeyinde yorumlanması ve çözümlenmesinde *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) yöntemi kullanılmıştır (54). GSEA yöntemi ile mikrodizin veri setinde, daha önceden tanımlanmış farklı biyolojik olaylara ait gen setlerinin deney ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak farklılık gösterip göstermediği sorgulanmıştır. Çözümlemede kullanılan gen setleri için c2 gen seti koleksiyonu *Molecular Signature Database* (MSD)'den indirilmiş ve c2 koleksiyonu, Wnt sinyal yolağı hedef genleri ve hücre döngüsü ile ilişkili genlerden oluşan setleride eklemek amacı ile de yeniden düzenlenmiştir (54). GSEA ile yapılan analizde permütasyon sayısı bin olarak alınmış olup, on dokuzdan az ve beş yüzden fazla sayıda gen içeren gen setleri çözümlenmeye dahil edilmemiştir.

Ekspresyonu 4 kat ve üzerinde artma ya da azalma gösteren ve istatistiksel anlamlılığı olan genlerin promotor bölgelerinde ortak bir konsensüs dizinin var olup

olmadığının belirlenmesi için mikrodizin çözümlemelerinde sıklıkla kullanılan Chipster yazılımı aracılığı ile promotor çözümlemesi yapılmıştır (61). Ekspresyonu artan genler bir grupta toplanırken, ekspresyon değişim yönü eksi olan genler ayrı bir grupta toplanmıştır ve her bir grup için ayrı ayrı analiz yapılmıştır. Analiz sırasında promotor bölge uzunluğu olarak her bir genin transkripsiyon başlama noktasının önünde yer alan bin nükleotitlik kısım promotor bölge olarak seçilmiştir.

### **2.1.7. Hiyerarşik kümeleme yöntemi ile ekspresyonel değişimlerin çözümlenmesi**

Huh7 hücre hattında, Lityum'a verilen biyolojik yanıt sonucu ekspresyon değerleri anlamlı olarak artan ve azalan genler arasında benzer ekspresyon örüntülerine sahip genlerin gruplandırılmasında hiyerarşik kümeleme yöntemi kullanılmıştır. Kümeleme işlemi, *Cluster* yazılımının 2.11 sürümü ile gerçekleştirilirken, hesaplamalar sonucu elde edilen sonuçlar *TreeView* sürüm 1.60 ile görüntülenmiştir (55).

## **2.2. Biyomoleküller arası etkileşim ağı**

### **2.2.1. Biyomoleküller arası etkileşimlerin belirlenmesi**

İstatistiksel çözümlene ile elde edilen gen listesinin sistem biyolojisi seviyesinde incelenmesi için *Biomolecular Interaction Network Database* (BIND) veri tabanı kullanılmıştır (56). Daha sonraki çözümlene basamaklarında hızlı ulaşım ve kullanım kolaylığı sağlaması için BIND veri tabanında bulunan veri koleksiyonları arasından, insan biyomoleküllerine ait bilinen tüm etkileşimler indirilmiş ve Mysql 14.7 sürümü kullanılarak yerel bir veri tabanı kurulmuştur. *Entrez* veri tabanı kayıt numaraları yardımıyla, oluşturulan yerel veri tabanından sorgu sözcükleri kullanılarak biyomoleküllerin ilk komşuluğunda bulunan diğer biyomoleküller ile arasındaki etkileşim verileri elde edilmiştir. Bu yolla Lityum'a karşı verilen biyolojik yanıt sonucu ekspresyonu anlamlı olarak değişen genlerin kendi aralarındaki ve ilk komşuluğunda bulunan diğer biyomoleküllerle olan ilişkileri, mevcut moleküler etkileşim bilgileri çerçevesinde ortaya konmaya çalışılmıştır.

### **2.2.1. Biyomoleküller arası etkileşimlerin haritalanması**

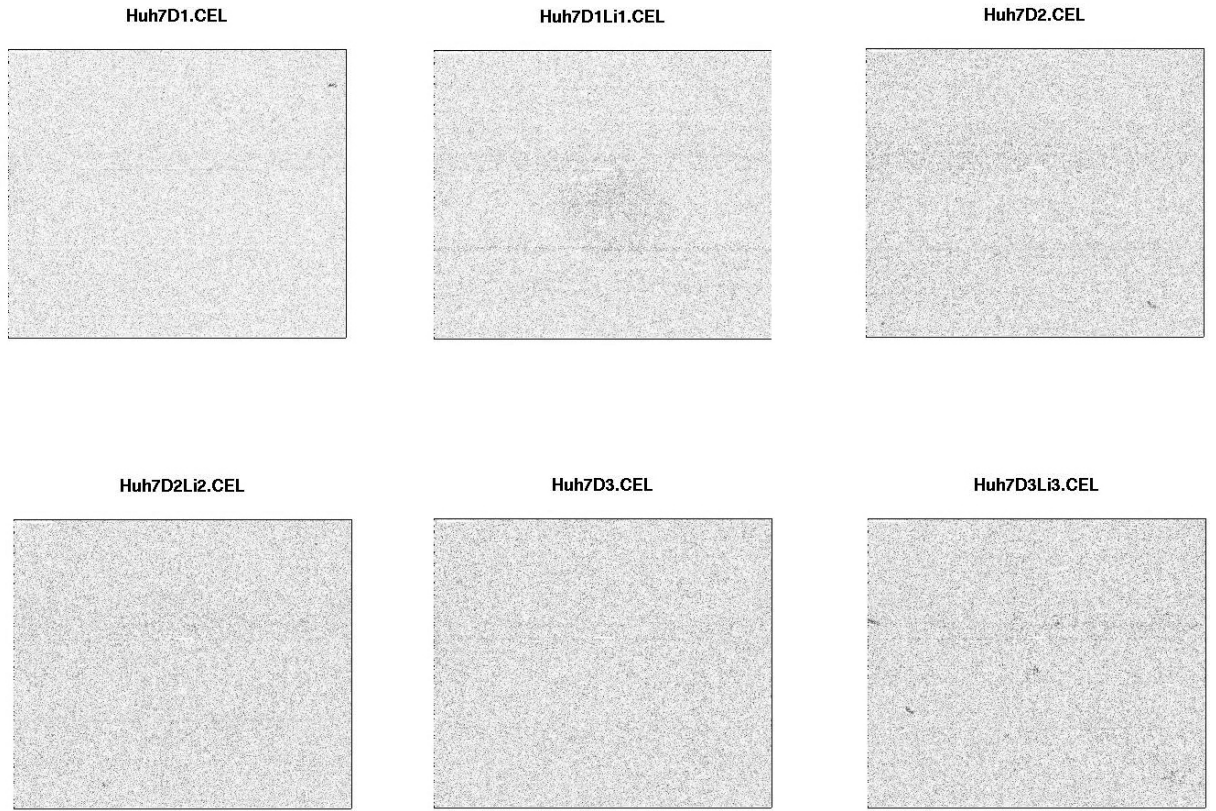
BIND veri tabanı kullanılarak elde edilen ilişkiler ağının resmedilmesinde, günümüz sistem biyolojisi çalışmalarında yaygın bir biçimde yararlanılan *Cytoscape* yazılımının 2.5.1 sürümü kullanılmıştır (57). BIND veri tabanından elde edilen etkileşim haritası *Microsoft Excel* formatında yazılıma yüklenmiş ve biyomoleküller arası etkileşim haritası .sif formatında elde edilmiştir.

## **BÖLÜM 3. BULGULAR**

### **3.1. Mikrodizin veri çözümü**

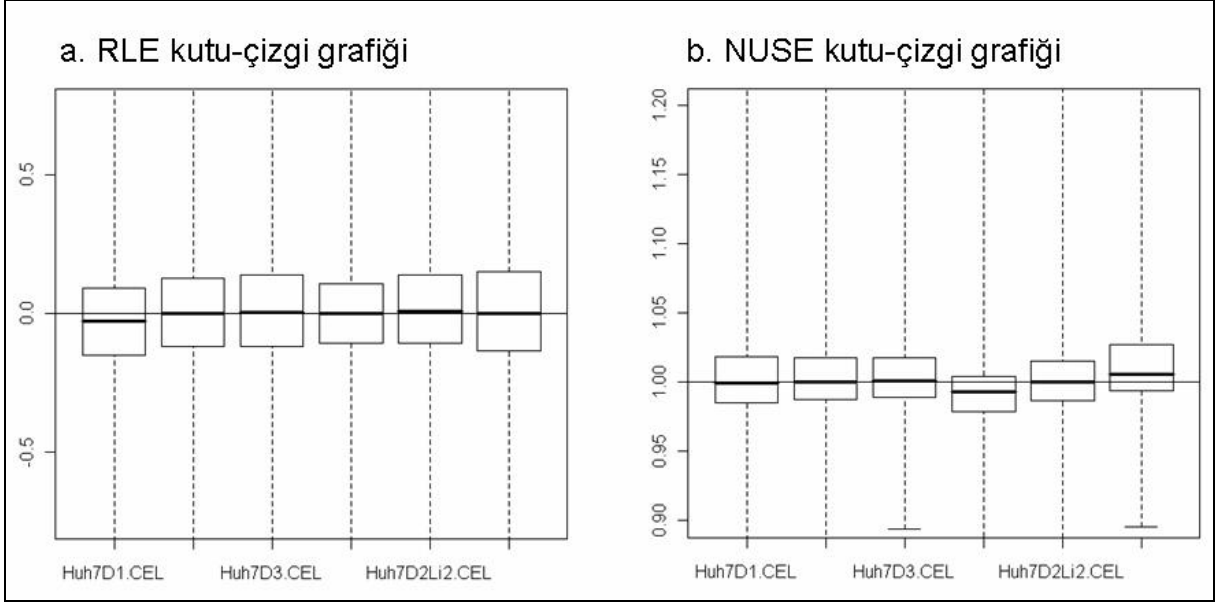
#### **3.1.1. Mikrodizin çiplerine ait kalite değerlendirme sonuçları**

*affyPLM* paketi kullanılarak yapılan kalite değerlendirmesinde, çalışmada kullanılan 3'ü kontrol diğer 3'de deney gurubuna ait olmak üzere toplam 6 mikrodizin çipinin psödo görüntüsü elde edildi. Elde edilen psödo çip görüntülerinde, sonuçlar üzerinde etki yaratacak herhangi bir artifakt gözlenmedi (Şekil 6).



**Şekil 6. Mikrodizin çiplerinin psödo görüntüleri.**

Ayrıca diğer kalite değerlendirme araçları olan RLE ve NUSE ile de mikrodizin çiplerine ait RLE ve NUSE kutu-çizgi grafikleri resmedildi (Şekil 7).



**Şekil 7. Mikrodizin çiplerine ait kalite bulguları a) Mikrodizin gen çiplerine ait RLE kutu-çizgi grafikleri. b) Çalışmada kullanılan 6 çipin NUSE kutu-çizgi grafikleri.**

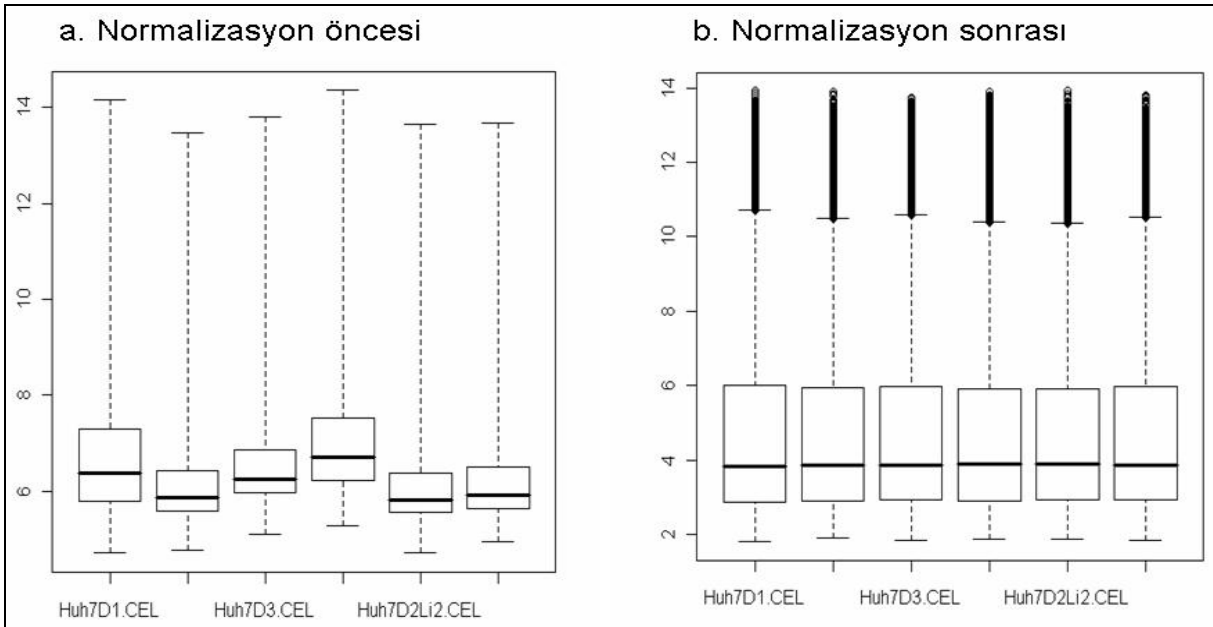
Bir mikrodizin çipindeki, her bir prob setine ait ekspresyon değerinin, bütün çiplerdeki o prob sete ait ekspresyon değerlerinin medyan değerinden sapmasının hesaplanması ile bulunan sonuçları belirten RLE kutu-çizgi grafiğinde, her biri bir mikrodizin çipini ifade eden kutuların, yaklaşık 0 civarında ortalandığı gözlemlendi (Şekil 7.a.). RLE kutu-çizgi grafiklerinde, artifakt taşıyan bir çipe ait kutunun 0'dan uzakta ortalandığı ve daha geniş bir alana yayıldığı düşünülecek olursa, RLE grafiğine göre 6 çipte de sonuçlar üzerinde etkili olacak herhangi bir artifakt gözlenmedi.

Mikrodizin çiplerinin, her bir prob setindeki problemlerin ekspresyon değerleri arasındaki standart hatanın hesaplanmasından sonra, bu standart hataların medyan değeri ile her bir prob setindeki problemler arası standart hatanın bölünmesinden hesaplanan ve çizilen NUSE kutu-çizgi grafiklerinde, mikrodizin denemelerinin 1 değeri civarında ortalandığı gözlemlendi (Şekil 7.b.). İstatistiksel çözümlerinde yanılmalara neden olabilecek mikrodizin ya da mikrodizinlerin 1 değerinden uzakta ortalandığı düşünüldüğünde ise NUSE grafiğine göre 6 mikrodizin çipi arasında kalite açısından sorunlu bir çip gözlenmedi.



### 3.1.2. Normalizasyon öncesi ve sonrası gen ekspresyonu verileri

Normalizasyon işlemi öncesi ham ekspresyon verilerinin yüzde ellilik kısımları birbirlerinden farklı aralıklarda toplanmış ve ham ekspresyon verilerine ait medyan değerleri yaklaşık 5,5 ile 6,5 aralığında değişkenlik göstermiştir (Şekil 8.a.). Deney ve kontrol gruplarından elde edilen 6 mikrodizin çip verisi birlikte normalize edildikten sonra ekspresyon verilerinin yüzde ellilik kısımlarının aynı aralıkta ve medyan değerlerinin ise yaklaşık 4 olduğu gözlemlendi (Şekil 8.b.).



**Şekil 8. Normalizasyon öncesi ve sonrası mikrodizin ekspresyon değerleri a) Normalizasyon öncesi ekspresyon verilerinin kutu-çizgi grafikleri. b) Normalizasyon sonrası ekspresyon verilerine ait kutu-çizgi grafikleri.**

### 3.1.3. Ekspresyonu anlamlı olarak değişen genler

Mikrodizin verilerinin istatistiksel çözümlemesinde sıklıkla kullanılan, t testinin modifiye şekli olan ve farklı FDR seçimlerine olanak tanıyan SAM yöntemi kullanılarak yapılan istatistiksel çözümlemede farklı anlamlılık düzeylerine ait gen sayılarını belirten delta tablosu elde edildi (Ek-2). FDR değerinin 0,01' den küçük olması koşulunu sağlayan  $\delta = 1,22628531732132$  değeri seçilerek yapılan istatistiksel anlamlılık testinde, Lityum uygulanmış Huh7 hücrelerindeki bin dokuz yüz yirmi bir prob setinin ekspresyon düzeyinin, Lityum uygulanmamış hücrelerdekine

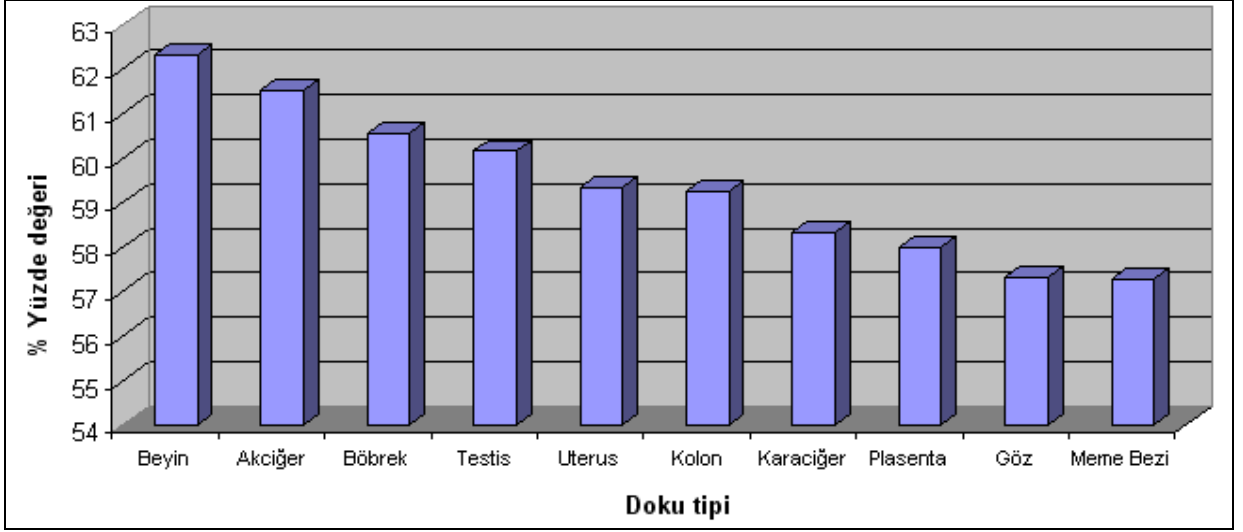
göre anlamlı olarak değiştiği gözlemlendi (FDR<0,01) (Ek-3). Ekspresyonu değişen bin dokuz yüz yirmi bir prob setinin, bin beş yüz otuz ikisinin ekspresyon düzeyi azalmışken, üç yüz sen dokuzunun ekspresyon düzeyi Lityum uygulanmamış hücrelerdekine göre artmış olarak bulundu.

Ekspresyonu anlamlı olarak artan genlerin artış miktarları 16,89 kat ile 1,47 kat aralığında değişim gösterirken, ekspresyonu azalan genlerde ise değişim miktarı 18,00 ile 1,47 aralığında bulundu. Tüm ekspresyonel değişimler göz önüne alındığında ekspresyonu en çok artan gen *BCL2-interacting killer* (16,89 kat), ekspresyonu en çok azalan gen ise *N-acetyltransferase 8* (18,00 kat) geni olarak belirlendi.

#### **3.1.4. Ekspresyonel değişim gösteren genlerin fonksiyonel çözümlenmesi**

Ekspresyonu anlamlı olarak değişim gösteren bin dokuz yüz yirmi bir prob setine karşılık gelen genleri bulmak için R ortamı kullanılarak yapılan açılımıma işleminde yüz on dört tane proba karşılık gelen gen sembolü ve Entrez veri tabanı kayıt numarası bulunamadı.

*WebGestalt* veri tabanı kullanılarak, ekspresyonu anlamlı olarak değişen genlerin farklı dokulardaki ekspresyon örüntüleri incelendiğinde, ekspresyonu değişen genlerin yarısından fazlasının beyin, akciğer, böbrek ve karaciğer gibi farklı doku tiplerinde eksprese olduğu belirlendi. Genlerin %58.33'nün karaciğerde ekspresyonunun var olduğu bulunurken, ekspresyonu değişen genlerin sayıca ve yüzde olarak en çok beyinde eksprese olduğu gözlemlendi (Şekil 9).



**Şekil 9. Ekspresyonu değişen genlerin, doku tiplerine göre yüzde dağılımı.**

Yine aynı veri tabanı kullanılarak, ekspresyonu anlamlı olarak değişmiş gen setinin ilişkili oldukları *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) yolları belirlendi (Ek-4) (58). Ekspresyonu değişen gen setinin ilişkili olduğu yüz kırk iki KEGG yolağından, hypergeometrik test ile yapılan çözümlemede on sekiz yolağın istatistiksel anlamlılığının olduğu belirlendi ( $p < 0,01$ ) (Tablo 3).

**Tablo 2. Ekspresyonu anlamlı olarak değişen gen setinin ilişkili olduğu yollardan istatistiksel anlamlılığı olanlar ve bu yollarda bulunan genlerin sayısı ve sembolleri ile ilgili yolağa ait olasılık değeri.**

KEGG yolak adı	Gen sayısı	İlişkili genler	Olasılık değeri
Pyrimidine metabolism	14	POLR3C, DUT, NT5C, POLD1, PRIM1, POLE4, POLD4, RFC5, RRM2, TYMS, POLR1B, POLR3GL, POLR1C, ENTPD5	0,00382
Complement and coagulation cascades	14	CPB2, CD55, F2, F3, F7, F12, SERPIND1, KNG1, MBL2, SERPINE1	0,000305
Colorectal Cancer	13	ACVR1C, DVL2, AKT1, FOS, APPL1, IGF1R, MAPK9, SOS2, TGFBR1, AXIN2, FZD1, FZD7, ACVR1B	0,00642
PPAR signaling pathway	12	SORBS1, SLC27A2, CPT1A, CPT2, EHHADH, FABP1, ACSL1, ACSL4, PCK2, ACSL5, PPARG, SCP2	0,00326
Regulation of actin cytoskeleton	11	CFL2, IQGAP2, F2, FGFR2, ARHGEF12, GSN, ITGA2, MYLK, PFN2, PAK7, SOS2	N/A
Arginine and Proline metabolism	11	ALDH9A1, GAMT, PYCR2, AOC2, ARG2, MAOA, ASL, ASS1, ALDH7A1, PYCRL, AOC3	0,00105

Glycerolipid metabolism	10	AGPAT1, MGLL, ADH6, ALDH9A1, LIPC, ALDH7A1, AGPAT3, GPAM, DGKD, PPAP2B	0,00665
Fatty acid metabolism	10	ADH6, CPT1A, CPT2, EHHADH, ACSL1, ACSL4, ALDH9A1, HADH, ALDH7A1, ACSL5	0,00109
Neuroactive ligand-receptor interaction	10	P2RY5, CGA, EDNRB, F2, GABRB1, GRIA3, NR3C1, NTS, GAL, SSTR2	N/A
Calcium signaling pathway	10	EDNRB, ERBB2, ERBB3, ITPR1, MYLK, ATP2A2, ATP2B2, PPP3CB, TRPC1, CAMK2D	N/A
Propanoate metabolism	8	EHHADH, ALDH9A1, MLYCD, ALDH6A1, MUT, ALDH7A1, SUCLG2, SUCLG1	0,00155
Glutathione metabolism	7	GCLM, GSTA1, GSTA4, GSTZ1, IDH2, MGST3, GSTO1	0,00450
Urea cycle and metabolism of amino groups	7	GAMT, PYCR2, ARG2, ASL, ASS1, PYCRL, ACY1	0,000712
Glycan structures –biosynthesis 1	7	B4GALT7, D4ST1, MGAT4A, CHST13, ALG6, ST6GAL1, ALG2	N/A
Cytokine – cytokine receptor interaction	7	EPOR, IFNGR2, KITLG, TGFBR1, INHBE, TNFRSF10D, ACVR1B	N/A
Cell adhesion molecules (CAMs)	7	CSPG2, ICAM2, PVRL3, CNTNAP2, SDC1, CLDN1, CDH1	N/A
Beta-Alanine metabolism	6	EHHADH, ALDH9A1, MLYCD, AOC2, ALDH7A1, AOC3	0,00532
Porphyrin and chlorophyll metabolism	6	CP, FTH1, HMBS, MMAB, PPOX, BLVRB	0,00532

*WebGstalt* veri tabanındaki hgu133plus2 referans veri seti kullanılarak yapılan GO terimleri çözümlemesinde ise, ekspresyonel olarak değişim gösteren gen setlerinin ilişkili olduğu biyolojik süreçler, moleküler işlevler ve hücre bileşenleri bilgileri olasılık değerleri ile birlikte *Directed Acyclic Graph* (DAG) formatında elde edildi (Ek-5). Gen setinin ilişkili olduğu elli altı biyolojik süreç, on sekiz moleküler işlev ve on üç hücre bileşeni olmak üzere 3 ayrı GO kategorisinden seksen yedi GO terimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0,01$ ) (Tablo 3).

**Tablo 3. Gen setine ait 3 ayrı sınıftaki istatistiksel açıdan anlamlı GO terimleri ile seviyeleri ve bu terimlerle ilişkili gen sayıları ile olasılık değerleri.**

**Biyolojik süreç terimleri**

Seviye	GO terimi	GO terimi ile ilişkili gen sayısı	Olasılık değeri
3	metabolism	493	1.52E-03
4	cell cycle	68	1.74E-03
4	chromosome segregation	9	9.80E-04
4	blood coagulation	13	5.63E-03
4	urea cycle intermediate metabolism	4	6.48E-03
5	M phase	28	1.66E-04
5	mitotic cell cycle	29	2.33E-04
5	regulation of cell cycle	46	4.25E-03
5	amine metabolism	47	9.79E-07
5	aromatic compound metabolism	16	3.83E-04
5	organic acid metabolism	56	7.51E-07
5	sister chromatid segregation	6	9.89E-04
5	amino acid and derivative metabolism	38	6.73E-06
5	regulation of blood coagulation	4	6.48E-03
5	acute inflammatory response	11	3.15E-03
5	wound healing	14	6.18E-03
6	M phase of mitotic cell cycle	25	4.50E-05
6	regulation of progression through cell cycle	46	3.71E-03
6	amine biosynthesis	12	2.00E-03
6	amine catabolism	11	8.87E-04
6	aromatic compound catabolism	6	2.91E-04
6	nitrogen compound biosynthesis	12	2.00E-03
6	carboxylic acid metabolism	55	1.43E-06
6	mitotic sister chromatid segregation	6	6.82E-04
6	negative regulation of blood coagulation	4	6.48E-03
6	nitrogen compound biosynthesis	12	2.00E-03
7	mitosis	24	9.85E-05
7	amino acid biosynthesis	11	1.75E-04
7	amino acid catabolism	11	5.07E-04
7	amine biosynthesis	12	2.00E-03
7	deoxyribonucleotide metabolism	5	2.16E-04
8	mitotic sister chromatid segregation	6	6.82E-04
8	iron ion homeostasis	7	1.84E-04
8	transition metal ion homeostasis	7	7.59E-04
8	Microtubule cytoskeleton organization and biogenesis	11	1.73E-03
8	glutamine family amino acid biosynthesis	5	6.44E-03
8	aromatic amino acid family catabolism	4	6.48E-03
8	L-phenylalanine metabolism	4	2.79E-03
8	arginine metabolism	4	6.48E-03
8	phospholipid biosynthesis	11	4.72E-03
8	pyrimidine deoxyribonucleotide metabolism	3	3.62E-03
8	transition metal ion transport	8	6.88E-03
8	Microtubule cytoskeleton organization and biogenesis	11	1.73E-03
8	activation of plasma proteins during acute inflammatory response	7	9.32E-03
8	pyrimidine deoxyribonucleotide metabolism	3	3.62E-03

9	positive regulation of mitosis	3	3.62E-03
9	Intracellular sequestering of iron ion	2	5.64E-03
9	spindle organization and biogenesis	6	3.36E-03
9	L-phenylalanine catabolism	4	2.79E-03
9	arginine catabolism	3	3.62E-03
9	glutamine family amino acid biosynthesis	5	6.44E-03
9	RNA splicing, via endonucleolytic cleavage and ligation	2	5.64E-03
9	tRNA splicing	2	5.64E-03
9	complement activation	7	9.32E-03
10	positive regulation of mitotic metaphase/anaphase transition	2	5.64E-03
10	tRNA splicing	2	5.64E-03

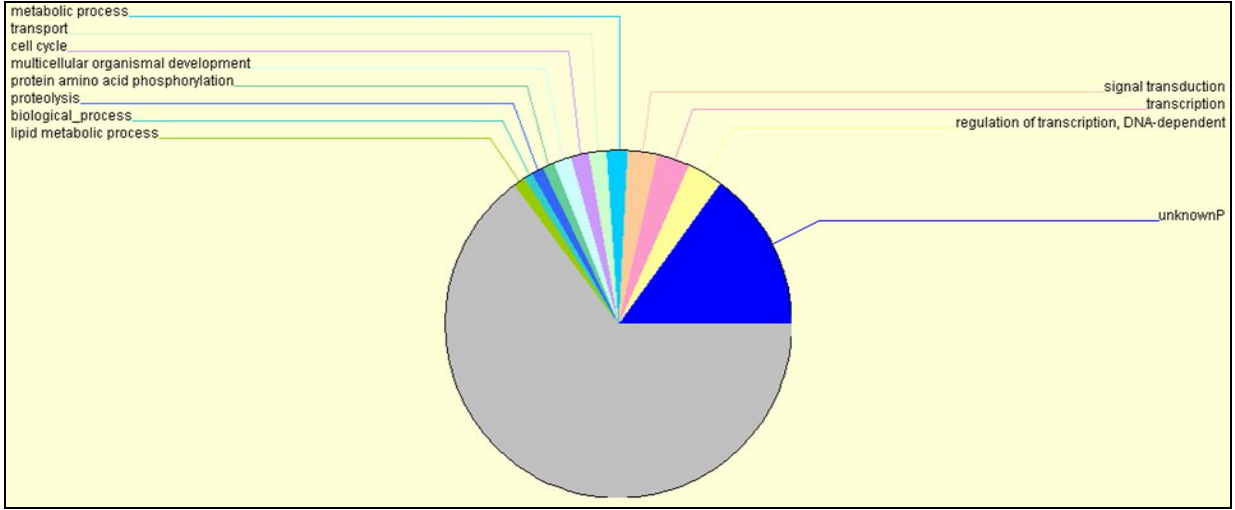
### Moleküler işlev terimleri

Seviye	GO terimi	GO terimi ile ilişkili gen sayısı	Olasılık değeri
2	catalytic activity	363	1.70E-05
3	ligase activity	31	8.45E-03
3	oxidoreductase activity	70	4.87E-05
4	ligase activity forming carbon-sulfur bonds	6	2.99E-04
4	oxidoreductase activity acting on the OH-CH group of donors	8	6.02E-15
4	transferase activity transferring alkyl or aryl (other than methyl groups)	9	1.25E-03
5	fatty acid ligase activity	4	1.68E-03
5	oxidoreductase activity, oxidizing metal ions oxygen as acceptor	2	5.69E-03
5	glutathione transferase activity	5	2.57E-03
6	long chain fatty acid CoA ligase activity	4	1.68E-03
6	NAD(P)H dehydrogenase (quinone) activity	2	5.69E-03
6	2,4 dienoyl CoA reductase (NADPH) activity	2	5.69E-03
6	amine oxidase activity	3	3.67E-03
6	ferroxidase activity	2	5.69E-03
6	N-acetylgalactosamine 4-O-sulfotransferase activity	3	3.67E-03
7	succinate CoA ligase (GDP forming) activity	2	5.69E-03
8	carnitine O acyltransferase activity	3	6.94E-03
9	single stranded DNA specific exodeoxyribonuclease activity	2	5.69E-03

### Hücre bileşeni terimleri

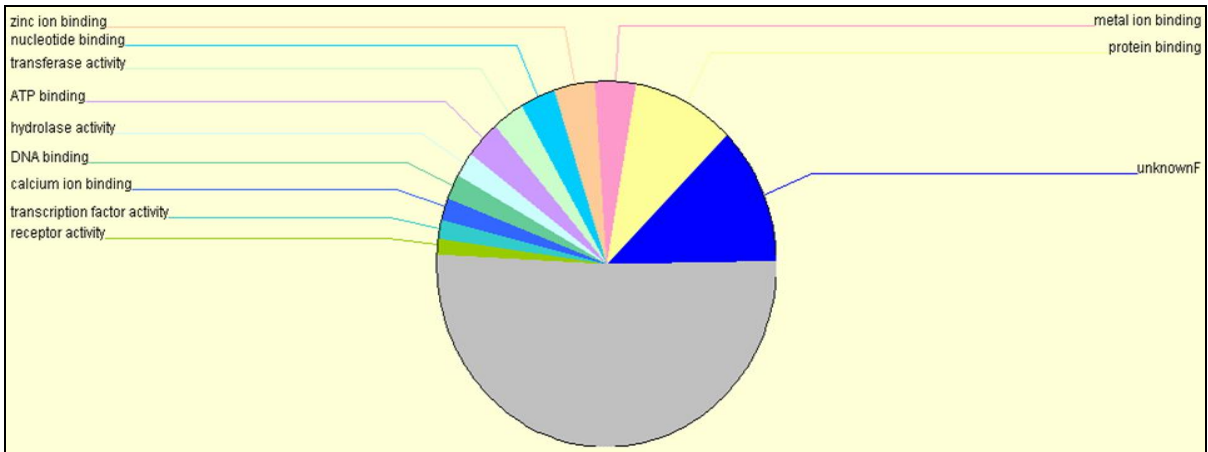
Seviye	GO terimi	GO terimi ile ilişkili gen sayısı	Olasılık değeri
4	Intracellular	536	3.77E-05
5	Intracellular part	504	8.99E-05
5	Organelle	439	1.77E-03
6	Cytoplasm	264	4.84E-05
6	embrane bound organelle	401	2.66E-04
6	intracellular organelle	463	1.74E-03
7	cytoplasmic part	191	3.85E-04
7	intracellular membrane bound organelle	401	2.55E-04
7	FACIT collagen	3	6.97E-03
8	Mitochondrion	69	9.98E-05
8	Microbody	19	5.66E-07
9	Peroxisome	19	5.66E-07
10	BRCA1 BARD1 complex	2	5.61E-03

*Onto-Express* veri tabanı kullanılarak yapılan GO terimleri çözümlemesinde ise 3 farklı GO sınıfı için en sık gözlenen terimler elde edildi. Gen listesinde biyolojik süreçlere ait terimler arasında *regulation of transcription-DNA dependent*, *transcription* ve *signal transduction* en sık gözlenen ilk 3 terim olarak belirlendi (Şekil 10).



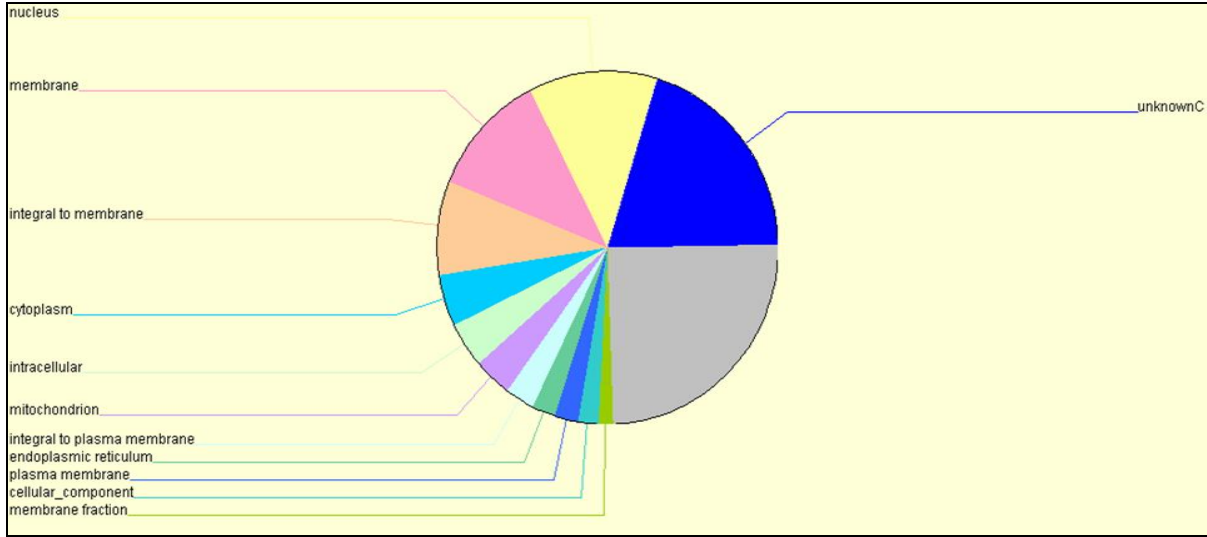
**Şekil 10. Biyolojik süreçlere ait GO terimlerinin dağılımı.**

*Protein binding*, *metal ion binding* ve *zinc ion binding* terimleri ise en sık gözlenen ilk 3 moleküler işlev terimi olarak belirlendi (Şekil 11).



**Şekil 11. Moleküler işlevlere ait GO terimlerinin dağılımı.**

Hücre bileşeni terimleri incelendiğinde ise *nucleus*, *membrane* ve *integral to membrane* GO terimleri ise diğer en çok gözlenen ilk 3 terim olarak gözlemlendi (Şekil 12).

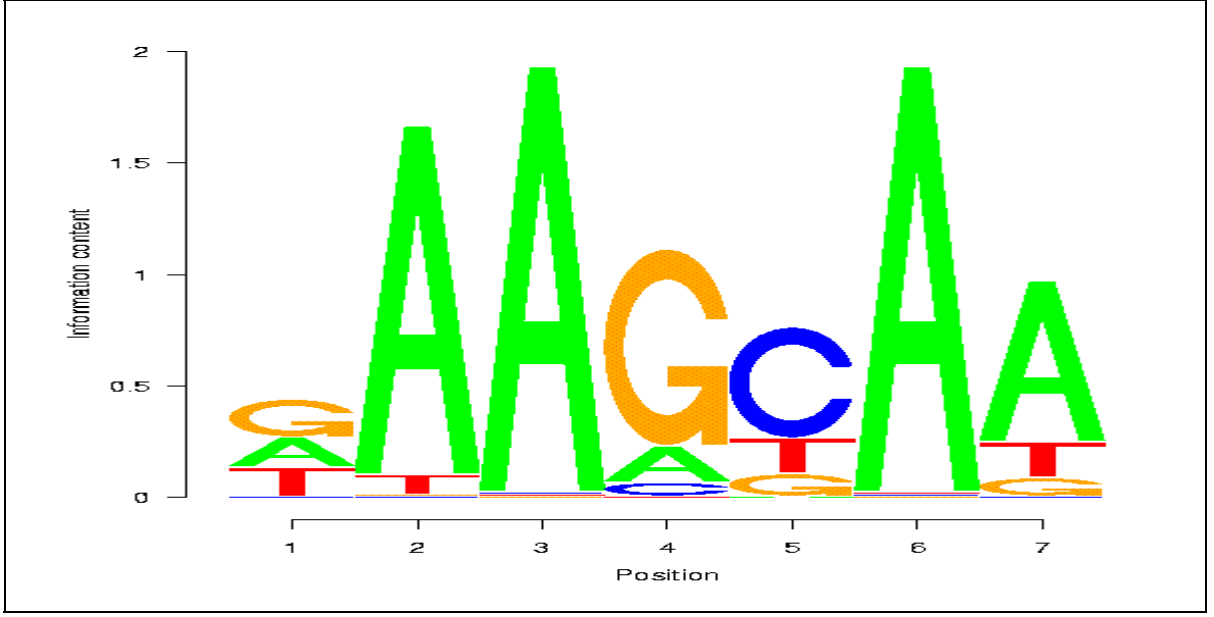


**Şekil 12. GO hücre bileşeni terimlerinin dağılımı.**

GSEA ile yapılan gen seti çözümlemesinde, toplam bin sekiz yüz doksan dört gen setinin altı yüz on iki tanesi çözümleme parametrelerinden dolayı çözümlenmeye dahil edilmedi. Çözümleme sonrası yüz elli sekiz gen seti herhangi bir etkene maruz kalmamış Huh7 hücrelerinin fenotipi ile ilişkili ve istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, yüz gen seti ise Lityum uygulanmış hücrelerin fenotipi için anlamlı bulundu (FDR<0.25) (Ek-6 ve Ek-7). Ayrıca gen seti koleksiyonuna eklenen Wnt sinyal yolağı hedef genleri seti Lityum uygulanmış hücrelere ait fenotip ile ilişkili ve istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, hücre döngüsü gen seti (Ek-8 ve Ek-9) Lityum uygulanmamış hücrelere ait fenotip ile ilişkili ancak istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmadı (FDR<0.25).

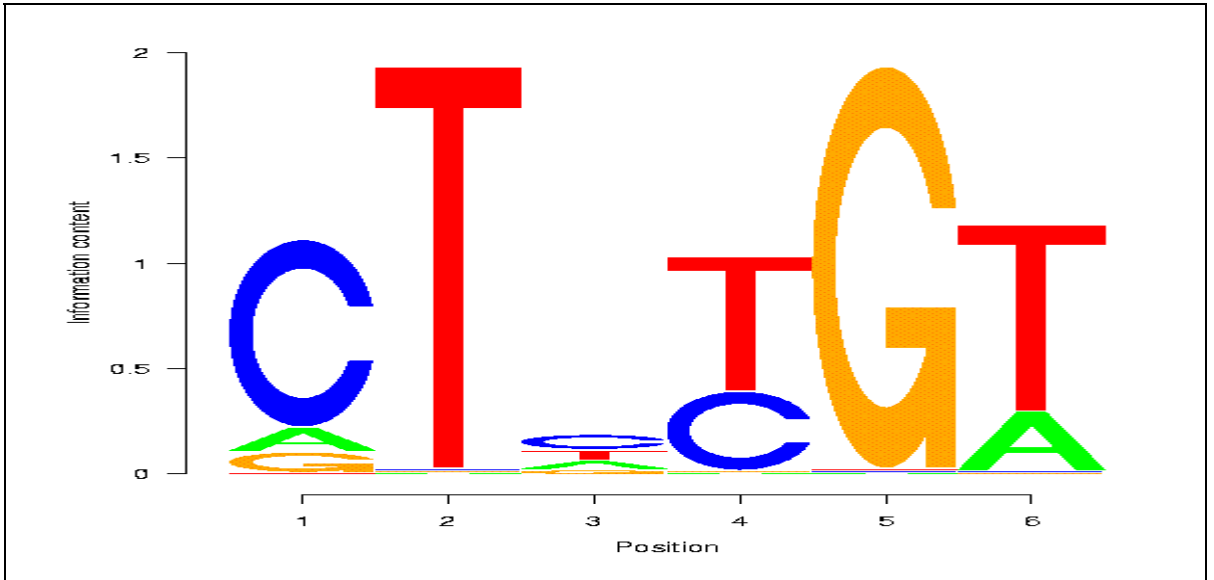
Ekspresyon seviyesi 4 kat ve üzerinde artan ve azalan gen kümelerinde Chipster yazılımı kullanılarak yapılan promotor çözümlemesinde, ekspresyonu artış gösteren kırk yedi prob setinin promotorlarının farklı bölgelerinde gözlenen motif [G-A-T][A-T]A[G-A-C][C-T-G]A[A-T-G] dizisi olarak bulundu (Şekil 13).





**Şekil 13.** Ekspresyonu 4 kat ve üzerinde artış gösteren genlerin promotor bölgelerinde gözlenen konsensüs diziye ait logo gösterimi.

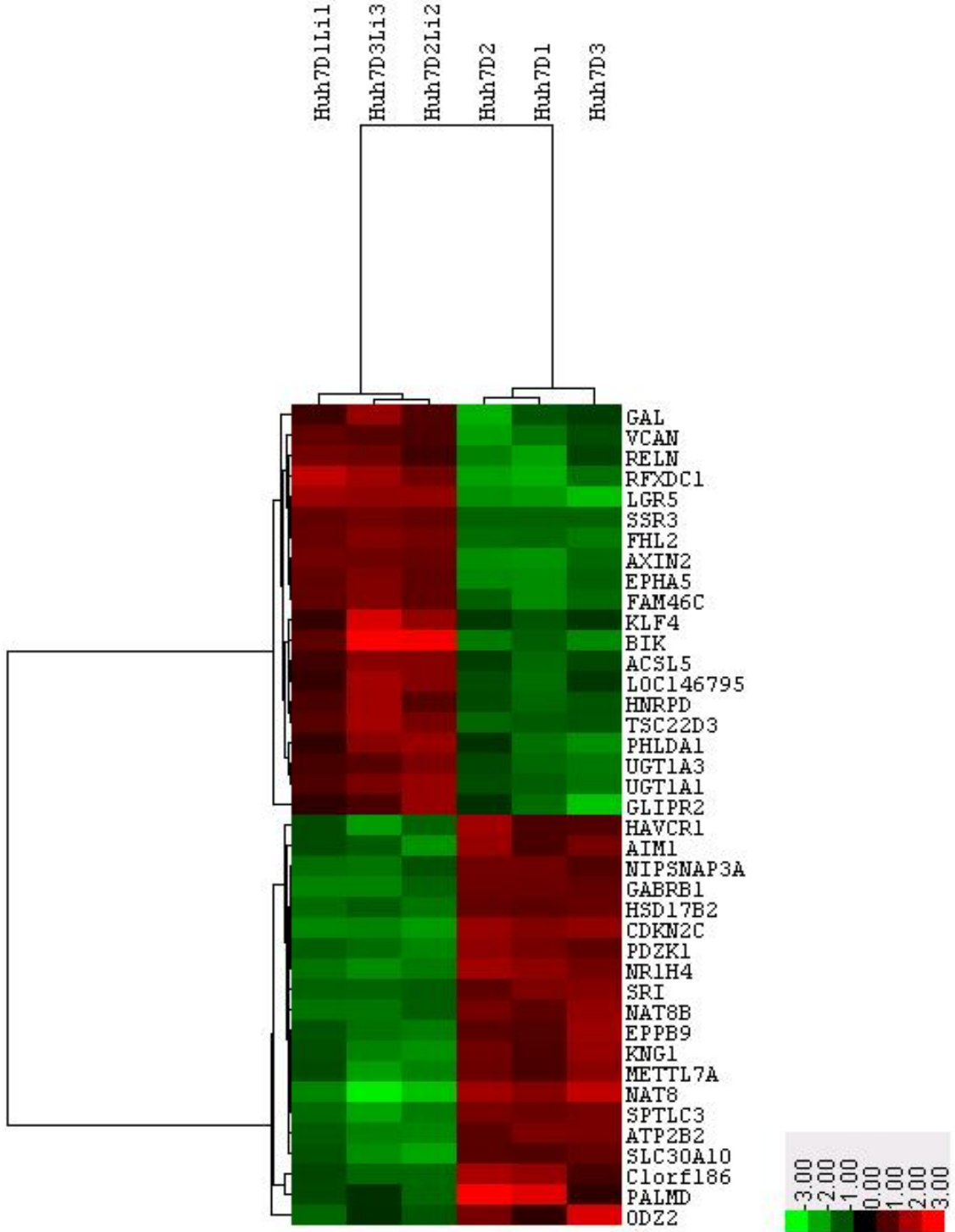
Ekspresyonu 4 kat ya da daha fazla azalan problardan oluşan kümede bulunan 62 prob setine ait olası nükleotit motifi ise [C-A-G]T[C-T-A][T-C]G[T-A] olarak bulundu (Şekil 14).



**Şekil 14.** Ekspresyonu 4 kat ve üzerinde azalma gösteren genlerin promotor bölgelerinde gözlenen ortak diziye ait logo gösterimi.

### ***3.1.5. Hiyerarşik kümeleme yöntemi ile ekspresyonel değişim gösteren genlerin çözümlenmesi***

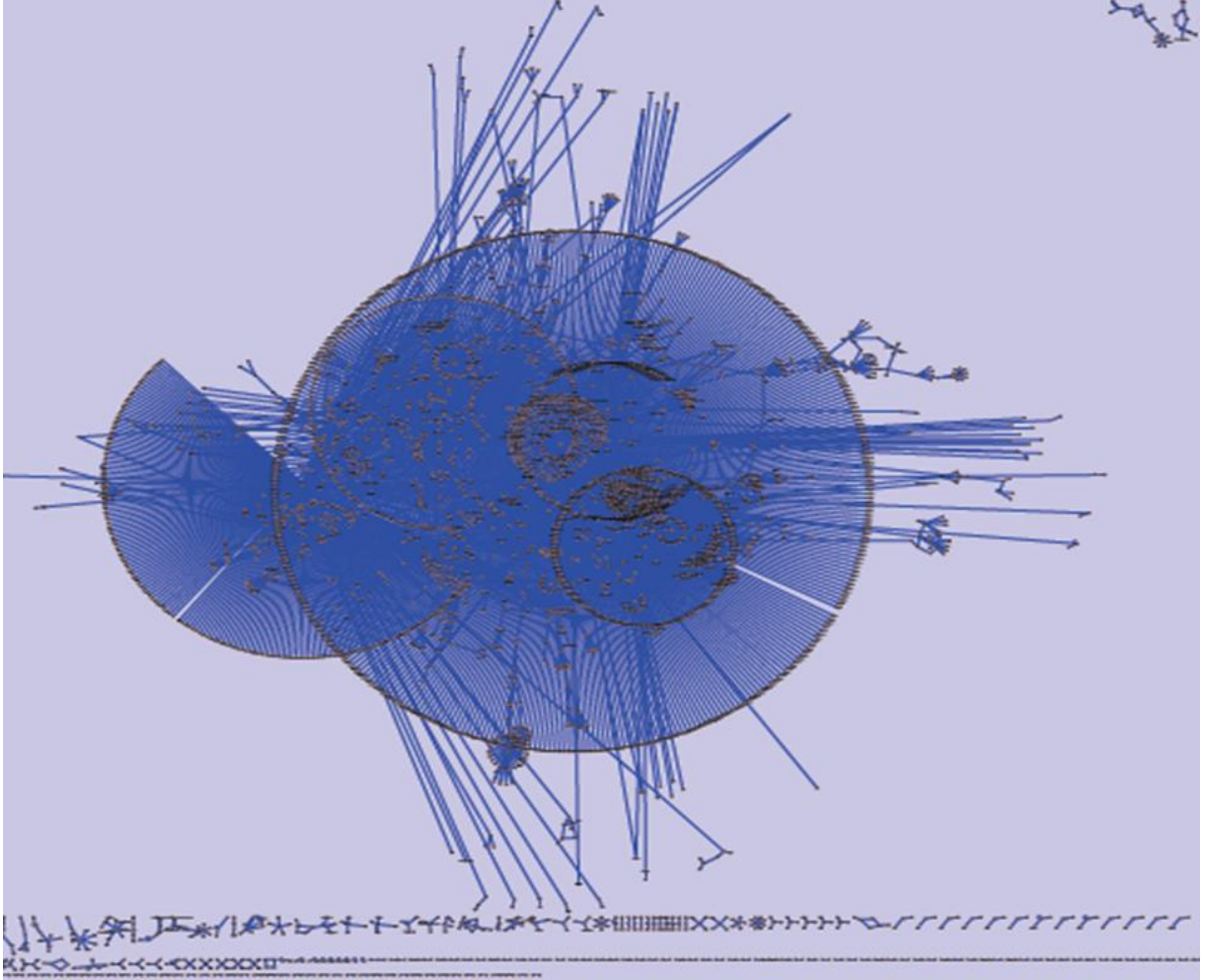
Hiyerarşik kümeleme yöntemi kullanılarak yapılan çözümlenmede, ekspresyonu en çok artan ilk yirmi gen ile en çok azalan ilk yirmi gene ait dendogram görüntüsü elde edildi (Şekil 15). Çözümlenmede, mikrodizin denemeleri arasında ve ekspresyonel artış ile azalış gösteren gen kümelerinin kendi içerisinde anlamlı bir korelasyona sahip olduğu gözlemlendi.



Şekil 15. Ekspresyonel olarak en çok artma ve azalma gösteren ilk 20 genin hiyerarşik kümeleme çözümlemesine ait dendrogram.

### 3.1.6. *Biyomoleküller arası etkileşim haritası*

BIND veri tabanındaki insan biyomoleküller arası etkileşim veri koleksiyonu kullanılarak yapılan veri madenciliğinde, anlamlı olarak bulunan bin sekiz yüz yedi genin ilk komşuluğunda bulunan biyomoleküller ile kendi aralarındaki etkileşimlerin sayısı beş bin yedi yüz yirmi dokuz olarak belirlendi. Bütün etkileşimler göz önüne alındığında p130, BRCA1, TGF-beta-RI, Lsm8 ve p53 başlıca *hub* biyomoleküller olarak gözlendi. *Cytoscape* yazılımı kullanılarak yapılan haritalama işleminde Şekil 16'daki etkileşim haritası elde edildi ve .sif ağ dosyası olarak olası ileri çözümlenelerde tekrar kullanılmak üzere saklandı (Ek-10).



**Şekil 16. Ekspresyonu anlamlı olarak değişim gösteren genler ile ilk komşuluğundaki biyomoleküller arası etkileşimler haritası.**

## **BÖLÜM 4. TARTIŞMA**

DNA mikrodizinleri, hücre transkriptomundaki mRNA seviyelerinin eş zamanlı olarak ölçülmesini olanaklı hale getiren oldukça yeni bir teknolojidir (30, 31). Günümüzde DNA mikrodizinleri, farklı biyolojik olgular arasındaki ya da biyolojik bir etken karşısında hücrede meydana gelen olası gen ekspresyonu değişimlerinin genom düzeyinde belirlenmesi ve değerlendirilmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır ve bu alanda maliyetlerin azalması ile de oldukça popüler bir hale gelmiştir (40). Moleküler biyoloji ve genetik alanında veri üreten yüksek işlem kapasiteli teknolojiler, özellikle mikrodizinler, tek bir reaksiyon ya da molekül üzerine odaklanarak karmaşık bir biyolojik sürecin açıklanmaya çalışılması yerine, biyolojik süreçlerin daha geniş bir bakış açısı ile değerlendirilmesini ve geleneksel yaklaşımların ötesinde, biyolojik olayların bir bütünlük içerisinde ele alınmasını ve anlaşılmasını kolaylaştırmaktadır (40).

Bu çalışmada mikrodizin verileri ve bioinformatik araçlar yardımı ile irdelenmeye çalışılan HCC, sağ kalım oranı oldukça düşük ve insan popülasyonunda oldukça yaygın bir hastalık olarak bilinmektedir (7). HCC sağaltımında başarı oranının oldukça düşük olması, büyük oranda hastalığın mevcut anti-kanser ajanlarına karşı oldukça dirençli olması ve karaciğer sorunlarına bağlı olarak kemoterapötik ilaçların kullanımındaki kısıtlardan kaynaklanmaktadır (7). Bu bağlamda, HCC sağaltımında kullanılabilecek yeni ajanların keşfi ve bu ajanların etki mekanizmalarının aydınlatılması büyük önem taşımaktadır.

Erdal E. ve arkadaşlarının HCC hücreleri ile daha önceden yaptıkları bir çalışmada, Lityum'un HCC hücre hatlarında, hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve karaciğer tümörü sağaltımında kullanılabilme potansiyeli taşıdığı gösterilmiştir (59). Ancak Lityum'un, inositol monofosforaz, fosfomonoesteraz ve GSK-3 $\beta$  gibi kimi moleküler hedefleri tanımlanmış olsa da, hücredeki etki mekanizması ve genom düzeyinde gen ekspresyonu ve davranışları üzerine yarattığı etki tam olarak bilinmemektedir (59, 60).

DNA mikrodizin yöntemi kullanılarak elde edilen verilerin çözümlenmesini içeren bu çalışmada, Huh7 hücrelerinde Lityum'un yaratmış olduğu etki gen

ekspresyonu düzeyinde incelenmiş ve ekspresyonu anlamlı olarak değişim gösteren genlerin ilişkili olduğu yollar ve moleküler mekanizmalar mevcut literatür bilgisi ışığında, biyoinformatik araçlar yardımı ile tahminlenmeye çalışılmıştır.

Mikrodizin verilerinin istatistiksel çözümlemesinden elde edilmiş, ekspresyonu anlamlı olarak değişim gösteren ve bir gen olarak karşılığı bulunan bin sekiz yüz yedi prob setinin farklı dokulardaki ekspresyon örüntüleri incelendiğinde, bu genlerin beyin, akciğer, böbrek, testis ve karaciğer gibi farklı dokularda ekspresyonunun var olduğu gözlemlenmiştir. İstatistiksel açıdan ekspresyonel farklılığı anlamlı bulunan bu genlerin birbirinden farklı dokularda oldukça yaklaşık yüzdelerle dağılması, Lityum'un sadece karaciğer dokusuna özgül genler ile ilişkili olmadığı ve farklı doku tiplerinde de süregelen, hücrenin temel işlevlerinden sorumlu olan genlerle etkileşime girdiğini düşündürmektedir.

Lityum'un farklı deneysel modellerde *PI3K/Akt* ve *Wnt/β-catenin* yollarının düzenlemesinde etkili olduğu iyi bilinmektedir (19). Bunun yanında olası diğer ilişkili yollarında tanımlanması amacı yapılan KEGG yollar analizinde, pirimidin, arjinin ve gliserolipid yolları gibi Lityum ile ilişkisi daha önce ortaya konmamış farklı metabolik yollarında istatistiksel olarak anlamlı bulunması, Lityum'un hücre içerisindeki etki mekanizmasını, farklı yollar aracılığı ile de gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Ancak DNA mikrodizin yönteminin diğer moleküler biyolojik yöntemlere göre düşük kalitede veri üretmesinden dolayı, belirlenen bu yolların deneysel yöntemler aracılığı ile farklı modellerde doğrulanması ve Lityum'un bu yollar üzerinde gerçekten etkili olup olmadığının belirlenmesi gerekmektedir.

Lityum uygulanmış hücrelerde uygulanmamışlara göre ekspresyonu anlamlı bir şekilde değişen genlerin GO terimleri çözümlenmesinde ise *protein binding*, *transcription*, *signal transduction* ve *nucleus* terimleri en sık gözlenen GO terimlerinden bir kaçıdır. Bu bulgular Lityum'un hücre içerisindeki bir takım genlerin ekspresyonundan sorumlu mekanizmalarla ilişkili olabileceği, etkileşime girdiği kimi protein ya da protein kompleksleri aracılığı ile bazı genlerin ekspresyonunu regüle ettiğini düşündürmektedir. Ancak GO terimlerinin çözümlenmesi ile ilgili gerek istatistiksel kısıtlar, gerekse analiz edilen gen setinde yer alan kimi genlere ait GO terimlerinin henüz tanımlanmamış olması ya da düşük kalite de bilgi sağlaması

yapılan çözümlenmenin önündeki en büyük engellerdir ve elde edilen bulguların deneysel yollarla doğrulanmasını gerektirmektedir.

GSEA yazılımı aracılığı ile hazırlanan hücre döngüsü genleri, Wnt sinyal yolağı hedef genleri ve MSD gen setleri birlikte çözümlendiğinde, hücre döngüsü ile ilişkisi bilinen genlerden oluşan setin gruplar arasında istatistiksel anlamlılığının olmadığı gözlemlendi. Bu bulgu gruplar arasında, hücre döngüsünde rol alan kimi genlerin ekspresyonel olarak değişim göstermesine rağmen, Lityum'un proliferasyon üzerinde yarattığı etkiyi hücre döngüsü mekanizması aracılığı ile gerçekleştirmediği fikrini ortaya koymaktadır. Ekspresyon verilerinin istatistiksel çözümlenmesinde anlamlı olarak değişim gösteren ve Wnt sinyal yolağı hedef genleri olarak bilinen AXIN-2, CLDN1, ID2, NOS2A, LGR5, FZD7 ve CSPG2 genlerinin yanında ekspresyonu gruplar arasında anlamlı bir fark göstermeyen diğer Wnt sinyal yolağı genlerinin birleştirilmesinden oluşturulan gen kümesinin ekspresyon değerleri, bir gen kümesi olarak GSEA aracılığı ile çözümlendiğinde Lityum uygulanmış ve uygulanmamış hücreler arasında istatistiksel açıdan fark taşıdığı gözlemlenmiştir. Bu durum, HCC ile yakın ilişkili olmasına karşın etkileri iyi tanımlanmamış bir sinyal yolağı olan *Wnt/β-catenin*'ne ait hedef genlerinin ekspresyonunun, Lityum etkisi ile birlikte yeniden düzenlendiği ve bu yolak tarafından ekspresyonu regüle edilen genlerin hücre proliferasyonunun inhibisyonunda rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan promotor çözümlenmesi ile her iki gen kümesine ait genlerin 5' ucu yönünde yer alan bin nükleotitlik dizilerinde, her bir gruba ait ortak dizilerin var olabileceği belirlendi. Nükleotitlerin görülme sıklığına göre hesaplanarak elde edilen bu bulgu, belirlenmiş bu motiflere bağlanan ve gen kümelerinin ekspresyonel regülasyonunda rol oynayan kimi aktivatör ya da inhibitör proteinler veya transkripsiyon faktörlerinin var olabileceğine işaret etmektedir. Ancak bu olası regülatör proteinlerin belirlenmesi için elde edilen bulgular doğrultusunda yeni veri tabanı sorguları ve literatür taraması gerekmektedir.

Kümeleme çözümlenmesinde elde edilen bulgular ise mikrodizin denemeleri arasında korelasyonun varlığını ortaya koymaktadır. Elde edilen sonuçlara göre Lityum uygulanmamış ve uygulanmış hücrelere ait ekspresyon verileri kendi

içerisinde gruplanmış ve denemeler arasında tutarlı ekspresyon değerleri elde edilmiştir. Ayrıca ekspresyonel olarak değişim gösteren genlerin BIND veri tabanı kayıtları kullanılarak yapılan etkileşim haritasında, beş binin üzerinde etkileşimin varlığı bulunmuştur. Bu durum Lityum'un hücre içerisinde çok sayıda gen ağı ve metabolik yolakla ilişkili olabileceğini göstermektedir. Lityum hücre içerisinde etkisini tek bir molekül ya da belirli bir ortak özelliğe sahip moleküllerle göstermek yerine, farklı özelliklere sahip gen kümeleri üzerinden yaptığı öne sürülebilir. Ancak bu kümelerden hangisi ya da hangilerinin proliferasyon inhibisyonu ile yakın ilişkili olduğunun belirlenmesi gerekmektedir. Bu açıdan etkileşim haritasında belirlenen ve ön plana çıkan *hub* genlerin daha detaylı olarak incelenmesi ve değerlendirilmesi gerekmektedir.



## **BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER**

Bir biyoinformatik uygulaması olan bu çalışmada, HCC hücre hatlarından olan Huh7’de, Lityum’un meydana getirdiği proliferasyon inhibisyonunun, genom seviyesinde gen ekspresyonu üzerine yapmış olduğu etkilerin aydınlatılması amaçlanmış, bu amacı elde etmek üzere uygun bir yöntem olduğu düşünülen mikrodizin teknolojisi ile de Lityum’un hücre içerisinde farklı görevleri olan pek çok metabolik yolak ve gen ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak belirlenen bu gen ve yolakların kaçının hücre proliferasyonu ile gerçekten yakın ilişkili olduğunun belirlenmesi gerekmektedir. Bu doğrultuda planlanacak olası fonksiyonel çalışmalar Lityum’un yarattığı etkinin daha net olarak anlaşılmasını sağlayacaktır.

Mikrodizin teknolojisinin beraberinde getirdiği avantajların yanında en önemli eksikliği sağlamış olduğu verilerin güvenilirliğinin düşük olmasıdır. Bu durum beraberinde hatalı olarak tanımlanmış ya da gerçekte ekspresyon düzeyi Lityum’la değişmesine rağmen denemelerde gösterilememiş genlerin varlığına işaret etmektedir. Bu sebeple, elde edilen gen listesinden belirlenecek kimi aday genlerin daha ileri ve güvenilir moleküler biyolojik yöntemlerle test edilmesi ve doğrulanması gerekmektedir.

## **BÖLÜM 6. KAYNAKLAR**

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J ve ark. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2): 74-108.
2. American Cancer Society: Information and Resources for Cancer. URL: <http://www.cancer.org/docroot/home/index.asp>.
3. Bruix J, Boix L, Sala M ve ark. Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 2004; 5(3): 215-9.
4. Feitelson MA, Sun B, Satiroglu Tufan NL ve ark. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21(16): 2593-604.
5. Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and screening. *Semin Liver Dis* 2005; 25(2): 143-54.
6. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31(4): 339-46.
7. Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(9): 674-87.
8. Tokino T, Tamura H, Hori N ve ark. Chromosome deletions associated with hepatitis B virus integration. *Virology*, 1991; 185(2): 879-82.
9. Murakami Y, Saigo K, Takashima H ve ark. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. *Gut*, 2005; 54(8): 1162-8.
10. Block TM, Mehta AS, Fimmel CJ ve ark. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2003; 22(33): 5093-107.
11. Tarn C, Lee S, Hu Y ve ark. Hepatitis B virus X protein differentially activates RAS-RAF-MAPK and JNK pathways in X-transforming versus non-transforming AML12 hepatocytes. *J Biol Chem*, 2001; 276(37): 34671-80.

- 12.** Ueda H, Ullrich SJ, Gangemi JD ve ark. Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer. *Nat Genet*, 1995; 9(1): 41-7.
- 13.** Macdonald A, Crowder K, Street A ve ark. The hepatitis C virus non-structural NS5A protein inhibits activating protein-1 function by perturbing ras-ERK pathway signaling. *J Biol Chem*, 2003; 278(20): 17775-84.
- 14.** Majumder M, Ghosh AK, Steele R ve ark. Hepatitis C virus NS5A physically associates with p53 and regulates p21/waf1 gene expression in a p53-dependent manner. *J Virol*, 2001; 75(3): 1401-7.
- 15.** Moriya K, Nakagawa K, Santa T ve ark. Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*, 2001; 61(11): 4365-70.
- 16.** Hoek JB, Pastorino JG. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol*, 2002; 27(1): 63-8.
- 17.** Ozturk M. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet*, 1991; 338(8779): 1356-9.
- 18.** Riley J, Mandel HG, Sinha S ve ark. In vitro activation of the human Harvey-ras proto-oncogene by aflatoxin B1. *Carcinogenesis*, 1997; 18(5): 905-10.
- 19.** El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132(7): 2557-76.
- 20.** Kawai H, Suda T, Aoyagi Y ve ark. Quantitative evaluation of genomic instability as a possible predictor for development of hepatocellular carcinoma: comparison of loss of heterozygosity and replication error. *Hepatology* 2000; 31(6): 1246-50.
- 21.** West KA, Castillo SS, Dennis PA. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat*, 2002; 5(6): 234-48.

- 22.** Hu TH, Huang CC, Lin PR ve ark. Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 2003; 97(8): 1929-40.
- 23.** Akiyama T. Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2000; 11(4): 273-82.
- 24.** Ishizaki Y, Ikeda S, Fujimori M ve ark. Immunohistochemical analysis and mutational analyses of beta-catenin, Axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol*, 2004; 24(5): 1077-83.
- 25.** Breuhahn K, Longerich T, Schirmacher P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 2006; 25(27): 3787-800.
- 26.** Luo JH, Ren B, Keryanov S ve ark. Transcriptomic and genomic analysis of human hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Hepatology*, 2006; 44(4): 1012-24.
- 27.** Lee JS, Chu IS, Heo J ve ark. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology*, 2004; 40(3): 667-76.
- 28.** Midorikawa Y, Yamamoto S, Ishikawa S ve ark. Molecular karyotyping of human hepatocellular carcinoma using single-nucleotide polymorphism arrays. *Oncogene*, 2006; 25(40): 5581-90.
- 29.** Schena M, Shalon D, Davis RW ve ark. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 1995; 270(5235): 467-70.
- 30.** Quackenbush J. Microarray analysis and tumor classification. *N Engl J Med*, 2006; 354(23): 2463-72.
- 31.** Expression profiling--best practices for data generation and interpretation in clinical trials. *Nat Rev Genet*, 2004; 5(3): 229-37.

- 32.** Butte A. The use and analysis of microarray data. *Nat Rev Drug Discov*, 2002; 1(12): 951-60.
- 33.** Perco P, Rapberger R, Siehs C ve ark. Transforming omics data into context: bioinformatics on genomics and proteomics raw data. *Electrophoresis*, 2006; 27(13): 2659-75.
- 34.** Brentani RR, Carraro DM, Verjovski-Almeida S ve ark. Gene expression arrays in cancer research: methods and applications. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005; 54(2): 95-105.
- 35.** Yokota J, Sugimura T. Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumor suppressor genes. *Faseb J*, 1993; 7(10): 920-5.
- 36.** Momparler RL. Cancer epigenetics. *Oncogene*, 2003; 22(42): 6479-83.
- 37.** Hornberg JJ, Bruggeman FJ, Westerhoff HV ve ark. Cancer: a Systems Biology disease. *Biosystems*, 2006; 83(2-3): 81-90.
- 38.** Rhodes DR, Chinnaiyan AM. Integrative analysis of the cancer transcriptome. *Nat Genet*, 2005; 37 Suppl: S31-7.
- 39.** Russo G, Zegar C, Giordano A. Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. *Oncogene*, 2003; 22(42): 6497-507.
- 40.** Brazhnik P, de la Fuente A, Mendes P. Gene networks: how to put the function in genomics. *Trends Biotechnol*, 2002; 20(11): 467-72.
- 41.** Schlitt T, Palin K, Rung J ve ark. From gene networks to gene function. *Genome Res*, 2003; 13(12): 2568-76.
- 42.** Ensembl Genome Browser. URL: <http://www.ensembl.org>.
- 43.** Fields S, Kohara Y, Lockharts DJ. Functional Genomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999; 99:8825-26.

- 44.** Oliver DJ, Nikolau B, Wurtele ES. Functional genomics: high-throughput mRNA, protein, and metabolite analyses. *Metab Eng*, 2002; 4(1): 98-106.
- 45.** Troyanskaya OG. Putting microarrays in a context: integrated analysis of diverse biological data. *Brief Bioinform*, 2005; 6(1): 34-43.
- 46.** Grunenfelder B, Winzeler EA. Treasures and traps in genome-wide data sets: case examples from yeast. *Nat Rev Genet*, 2002; 3(9): 653-61.
- 47.** Erdal ŞE. Yayınlanmamış veri, 2007. Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, İnciraltı, İzmir, Türkiye.
- 48.** Affymetrix. URL: <http://www.affymetrix.com/index.affx>.
- 49.** R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing, URL: <http://www.R-project.org>, 2005; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
- 50.** Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001; 98(9): 5116-21.
- 51.** Zhang B, Kirov S, Snoddy J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res*, 2005; 33(Web Server issue): W741-8.
- 52.** Draghici S, Khatri P, Bhavsar P ve ark. Onto-Tools, the toolkit of the modern biologist: Onto-Express, Onto-Compare, Onto-Design and Onto-Translate. *Nucleic Acids Res*, 2003; 31(13): 3775-81.
- 53.** Al-Shahrour F, Diaz-Uriarte R, Dopazo J. FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics*, 2004; 20(4): 578-80.
- 54.** Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK ve ark. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005; 102(43): 15545-50.

- 55.** Eisen Lab. URL: <http://rana.lbl.gov/eisen/>.
- 56.** Gilbert D. Biomolecular interaction network database. *Brief Bioinform*, 2005; 6(2): 194-8.
- 57.** Cytoscape: Analyzing and Visualizing Network Data. URL: <http://www.cytoscape.org/>.
- 58.** KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. URL: <http://www.genome.jp/kegg/>.
- 59.** Erdal E, Ozturk N, Cagatay T ve ark. Lithium-mediated downregulation of PKB/Akt and cyclin E with growth inhibition in hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer*, 2005; 115(6): 903-10.
- 60.** McColl G, Killilea DW, Hubbard AE ve ark. Pharmacogenetic analysis of lithium-induced delayed aging in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*, 2008, 283(1):350-7.
- 61.** Chipster: Software for DNA microarray data analysis. URL: <http://chipster.csc.fi/>
- 62.** Atack JR. Inositol monophosphatase inhibitors--lithium mimetics? *Med Res Rev*, 1997; 17(2): 215-24.
- 63.** Rowe MK, Chuang DM. Lithium neuroprotection: molecular mechanisms and clinical implications. *Expert Rev Mol Med*, 2004; 6(21): 1-18

## **BÖLÜM 7. EKLER**

Bu teze ait ekler [http://web.deu.edu.tr/tb/gokhan\\_tez/EKLER.rar](http://web.deu.edu.tr/tb/gokhan_tez/EKLER.rar) adresinde bulunmaktadır.