T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİ YENİ NESİL DİZİLEME VERİLERİNDE GEN İFADESİ İLE MİKRORNA İFADESİ ARASINDAKİ KARŞILIKLI ETKİLEŞİMİN ANALİZİ

SELCEN ARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ ALPER YILMAZ

İSTANBUL, 2018

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MEME KANSERİ YENİ NESİL DİZİLEME VERİLERİNDE GEN İFADESİ İLE MİKRORNA İFADESİ ARASINDAKİ KARŞILIKLI ETKİLEŞİMİN ANALİZİ

Selcen ARI tarafından hazırlanan tez çalışması 12.12.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Alper YILMAZ

Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Alper YILMAZ

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Tunahan ÇAKIR

Gebze Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Musa TÜRKER

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

ÖNSÖZ

Kanser araştırmalarında düzenlenme mekanizmaları, tanı ve tedavi amaçları taşıyan farklı çalışmalar yürütülmektedir. Geliştirilen yeni nesil teknolojilerle bu alanlarda pek çok bilgi sunulmuş ve bunun üzerine biyoinformatik alanında çalışmalar da zenginleşmiştir.

Bu tez çalışmasında mikroRNA aracılı gen düzenlenmelerinin anlaşılması için yeni nesil dizileme teknolojiler aracılığı ile sunulan bilgiler kullanılarak bir model üretilmiştir.

Öncelikle bu yönde gerçekleştirdiğimiz çalışmada büyük emeği olan değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Alper YILMAZ'a tüm süreç boyunca sabırlı ve yol gösterici tutumundan dolayı teşekkürü borç bilirim.

Aynı zamanda tüm bu süreçlerde yanımda olup desteklerini eksik etmeyen arkadaşlarımdan özellikle Gamze TARI ve Hayati YUKA'ya, aileme ve özellikle kız kardeşim Ecehan ARI'ya teşekkür ederim.

Aralık, 2018

Selcen ARI

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ vii

KISALTMA LİSTESİ viii

ŞEKİL LİSTESİ xi

ÇİZELGE LİSTESİ xiii

ÖZET xv

ABSTRACT xvii

BÖLÜM 1

GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 2
1.3 Hipotez 3

BÖLÜM 2

BİYOİNFORMATİK VE KANSER 4

2.1. Biyoinformatik 4
2.1.1 Biyoinformatik Uygulmalar 5
2.1.2 Biyoinformatik ve Kanser 6
2.1.3 Yeni Nesil Dizileme 10
2.1.3.1 Yeni Nesil Dizileme Uygulamaları 13
2.2 Kanser 14
2.2.1 Kanser Moleküler Düzenlenmesinde Genler 17
2.2.1.1 Protein Kodlayan Genler 18
2.2.1.2 Transkripsiyon Faktörleri 19
2.2.1.3 Uzun Kodlanmayan RNA'lar 19
2.2.1.4 Kısa Kodlanmayan RNA'lar 20
2.2.1.5 MikroRNA'lar 21

2.2.2 Kanserde MikroRNA'nın Düzenleyici Etkinliğinde Anormallikler ve Nedenleri 33
2.3 Kanserde MikroRNA'ların Düzenleyici Fonksiyonu 36
2.3.1 MikroRNA'ların Onkogenik ve Tümör Baskılayıcı Fonksiyonu 40
2.4 Meme Kanseri ve MikroRNA'lar 42
2.4.1 Meme Kanserinde Tümör Baskılayıcı MikroRNA'lar 43
2.4.2 Meme Kanserinde Onkogenik MikroRNA'lar 44
2.5 Yarışmalı Endojen RNA Hipotezi 45
2.6 MikroRNA ve Hedef Gen Etkileşiminin Modellenmesinde Yaklaşımlar 48

BÖLÜM 3

YÖNTEM 55

3.1 Veri Erişimi ve Hazırlaması 55
3.1.1 Meme Kanser Hastalarının Gen İfade Verilerinin İndirilmesi ve Düzenlenmesi 56
3.1.2 Meme Kanser Hastalarının MikroRNA Veri Setlerinin Elde Edilmesi ve Düzenlenmesi 59
3.1.3 MikroRNA ve Hedef Eşleşmelerinin Elde Edilmesi ve Düzenlenmesi 62
3.1.4 Veri Setlerinin Birleştirilmesi 67
3.1.4.1 Gen İfadesi Veri Setlerinin İçeriği 67
3.1.4.2 MikroRNA İfade Veri Setinin İçeriği 68
3.1.4.3 MikroRNA:Hedef Gen Veri Setinin İçeriği 71
3.1.4.4 MikroRNA:Hedef, MikroRNA İfadesi ve Gen İfadesi Veri Setlerinin Birleştirilmesi 71
3.2 Yarışmalı Ağ Tabanlı Model 76
3.2.1 Yarışmalı Ağ Tabanlı Model Teorisi 77
3.2.2 Yarışmalı Ağ Tabanlı Modelin MikroRNA Aktivitesinde Önemli Olan Faktörler ile Genişletilmesi 79
3.2.3 Meme Kanser Hasta Örneklerinde Ağ Tabanlı Modelin Uygulanması 86
3.2.3.1 Meme Kanseri Hasta Örneklerinde Gen İfadesi Değişimi ile Model Uygulanması 86
3.2.3.2 Meme Kanseri Hasta Örneklerinde MikroRNA İfadesi Değişimi ile Model Uygulanması 89

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER 92

4.1 Elde Edilen Veri Setleri ve İçerikleri 93
4.2 Örnek Veri Setleri ile Birleştirme Çalışması 98
4.3 Yarışmalı Ağ Tabanlı Model 100
4.4 Meme Kanseri Hasta Örneklerinde Model Uygulama 106
4.4.1 Meme Kanser Hasta Örneklerinde Modelin Davranışlarının İncelenmesi 107
4.4.1.1 ABCC1 Geninin Pozitif Düzenlenmesi ile Hastalarda Model Davranışlarının İncelenmesi 112

4.4.1.2 Benzer Seviyede Meydana Gelen Pozitif Düzenlenmeler ile Hastalarda Model Davranışlarının İncelenmesi 119
4.4.1.3 MikroRNA İfadesinde Değişikliğiyle Hastada Model Uygulaması 120
4.5 Tartışma 123

KAYNAKLAR 129

EK-A

ALGORİTMALAR 145

A-1 MikroRNA:Hedef mRNA Deneysel Veri Setinin Düzenlenmesi 145
A-2 Yarışmalı Ağ Tabanlı Model Algoritması ve Uygulaması 153
A-3 Ağ Tabanlı Modelin MikroRNA Aktivitesinde Önemli Faktörlerle Genişletilmesi ve Örnek Uygulaması 156
A-4 Tanımlanan Fonksiyonlar 157
A-5 TCGA-E9-A1N5-11A Örneğinde Algoritmanın Uygulanması 163
A-6 MikroRNA İfadesi Değişiminde TCGA-E9-A1N5 Hasta Verisi İnceleme 164
A-7 Gen Pozitif Düzenlenme Çalışma Sonuçlarına Göre Model Uygulanması 167

EK-B

GENEL SONUÇLAR 170

ÖZGEÇMİŞ 175

SİMGE LİSTESİ

S_g	Gen okuma sayısı
S_{pk}	Protein Kodlayan Gen sayısı
L	Fragment uzunluğu
S_{mg}	İfadesine göre gen başına düşen mikroRNA okuma sayısı
S_m	MikroRNA okuma sayısı
STE	Çekirdek tipi etki katsayısı
STE’	Normalize edilmiş çekirdek tipi etki katsayısı
RE	Hedef üzerinde bağlanmanın konum katsayısı
RE’	Normalize edilmiş hedef üzerinde bağlanmanın konum katsayısı
E	Enerji
Eff_g	Gen üzerindeki etkinlik

KISALTMA LİSTESİ

A	Adenin
ABCC1	ATP Binding Cassette Subfamily C Member 1
AGO2	Argonaute2
BCGSC	BC Cancer Agency Canada's Michael Smith Genome Sciences Centre
BET	Bromodomain and Extra-Terminal motif proteins
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CCLE	Cancer Cell Line Encyclopedia
cDNA	Tamamlayıcı DNA
CDS	Kodlanan dizi
ceRNA	Competing endogenous RNA
CGCI	The Cancer Genome Characterization Initiative
CLASH	Crosslinking, Ligation and Sequencing of Hybrids
CLDN1	Claudin 1
CLEAR-CLiP	Covalent Ligation Of Endogenous Argonaute-Bound RNAs-Cross-Linking And Immunoprecipitation
CLiP	Cross-Linking and Immunoprecipitation
MYC	MYC Proto-Oncogene
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
CRAN	The Comprehensive R Archive Network
DAVID	The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
dbSNP	The Database of Short Genetic Variation
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
eIF4	The eukaryotic initiation factor-4
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGFR-TKI	Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitor
EMT	Epitelial Mezenkimal Transition
ER	Östrojen Reseptör
G	Guanin
GAS5	Growth Arrest Specific 5
GB	Giga Bayt
GDV	Genome Data Viewer
GEO	Gene Expression Omnibus

GTP	Guanosine triphosphate
HEK 293	Human Embrionic Kidney 293 Cell
HER	Human Epidermal Growth Factor Receptor
HITS-CLiP	Crosslinking Immunoprecipitation (CLIP), Coupled with High Throughput Sequencing
HMDD	The Human microRNA Disease Database
HOTAIR	HOX Transcript Antisense RNA
HTseq	High-Throughput Sequencing
Huh7.5	Human Hepatoma Cell
FPKM – UQ	Fragments per Kilobase of Exon Model per Million Reads Mapped-Upper Quartile
FPKM	Fragments per Kilobase of Exon Model per Million Reads Mapped
ICGC	International Cancer Genome Consortium
IGSR	Institute for Graduate Studies & Research
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LINCS	Library of Integrated Network-based Cellular Signatures
lncRNA	Long non-coding RNA
miR	MikroRNA
miRNA	MikroRNA
mRNA	Mesajcı RNA
MRP1	Multi Drug Resistance Protein 1
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
ORF	Open Reading Frame
PAR-CLiP	Photoactivatable Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation
pasRNA	Promoter-associated short RNA
PCGP	Pediatric Cancer Genome Project
PDCD4	Programmed Cell Death 4
piRNA	PIWI-interacting RNA
PLSR	Partial Least Squares Regression
PR	Progesteron Reseptör
pre-miRNA	Olgunlaşmamış mikroRNA
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RISC	RNA-Induced Silincing Complex
RNA	Ribonükleik Asit
RNA-seq	RNA-dizileme
rRNA	Ribozomal RNA
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez
shRNA	Small Hairpin RNA
siRNA	Small Interfering RNA
SK1	Sphingosine Kinase 1
snoRNA	Small Nucleolar RNA
SNP	Simple Nucleotide Variation
SOLiD	Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection
STRING	Search Tool For Recurring Instances of Neighbouring Genes

SYT4	Synaptotagmin 4
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TF	Transkripsiyon Faktörü
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta
NIH	The National Institutes of Health
tiRNA	tRNA-derived stress-induced RNA
TP53	Tumor Protein p53
TPM1	Tropomyosin 1
TRBP	The Human İmmunodeficiency Virus Transactivating Response RNA Binding Protein
tRNA	Taşıyıcı RNA
TSSa-RNA	Transcription Start Site Associated RNA
UCSC	University of California Santa Cruz
UTR	Untranslated Region
UV	Ultraviolet
VAPA	VAMP Associated Protein A
ZEB1	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1
ZNF714	Zinc Finger Protein 714

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 Kanser araştırmalarında biyoinformatik uygulamalar. 7
Şekil 2.2 Yeni nesil dizileme yöntemlerinin genel akış şeması. 11
Şekil 2.3 Ökaryotik kromozomal DNA'nın yapısı; ekzon ve intron düzenlenmesi 18
Şekil 2.4 Uzun kodlanmayan RNA'ların düzenleyici cis ve trans mekanizmaları 20
Şekil 2.5 MikroRNA biyogenezi 22
Şekil 2.6 MikroRNA çalışma mekanizması 23
Şekil 2.7 MikroRNA'ların hedefleri üzerindeki aktivitesinde önemli olan faktörler. . 25
Şekil 2.8 MikroRNA:hedef etkileşimlerinde kanonik olmayan bağlanmalar 26
Şekil 2.9 MiR-3140'ın mRNA'ları farklı bölgelerden hedeflemesi 27
Şekil 2.10 MikroRNA hedef tespitinde yeni nesil dizilemeye dayanan yöntemlerin genel basamakları 31
Şekil 2.11 CLASH yöntemiyle mikroRNA:hedef tanımlanmasının süreci 32
Şekil 2.12 CLEAR-CLiP ile mikroRNA:hedef tanımlanmasının aşamaları 33
Şekil 2.13 Kanserde mikroRNA fonksiyonundaki anormalliklerin nedenleri..... 34
Şekil 2.14 MikroRNA'lardaki anormallikler sonucunda onkogenik ve tümör baskılayıcı özellikleri 35
Şekil 2.15 MiR-125b'nin farklı kanser türlerinde düzenlenmesi 41
Şekil 2.16 Kanserde mikroRNA'ların ifadelerine bağlı olarak düzenleyici aktivitesindeki değişiklikler. 41
Şekil 2.17 Yarışmalı endojen RNA'ların düzenlenmesi 46
Şekil 2.18 MikroRNA hedeflerinin yarışmalı davranışları ve düzenlenmeleri. 47
Şekil 2.19 Normal ve tümörlü dokularda yarışmalı endojen RNA'ların farklı düzenlenmesi. 48
Şekil 3.1 Veri setlerinin birleştirilme akışı. 74
Şekil 3.2 Yarışmalı gen hedeflerinin teorik olarak davranışı. 78
Şekil 3.3 Örnek ağ yapısında gruplandırma ve etkileşimler. 80
Şekil 3.4 Örnek ağ yapısında etkileşim katsayılarının derecelendirilmesiyle bağlantı değişkenleri. 82
Şekil 3.5 Örnek ağ yapısında hedef ifadesi, enerji ve çekirdek tipine göre mikroRNA dağılımı. 83
Şekil 3.6 Örnek ağ yapısında mikroRNA dağılımının bölge etkisi faktörü katkısı ile baskılama etkinliği. 83
Şekil 3.7 Örnek ağ yapısında mikroRNA baskılama aktivitesi. 84

Şekil 3.8 MikroRNA aktivitesinde önemli faktörlerin hesaba katılmasıyla örnek veri setinde model uygulama. 85
Şekil 4.1 MikroRNA:hedef oranlarının değiştirilmesiyle örnek ağ yapısında model sonuçları. 102
Şekil 4.2 MikroRNA:hedef ifade oranına dayandırılan ve faktörlerle genişletilmiş modelin örnek veri setinde uygulamasının sonuçları. 103
Şekil 4.3 MikroRNA aktivitesinde önemli olan faktörlerin hesaba katıldığı modelin örnek veri setinde G2 ve G4 ifade artışında uygulanması sonucunda ağ yapıları. 105
Şekil 4.4 TCGA-A7-A0CE örneğinde ABCC1 gen ifadesinin arttırılması durumunda ilk ağ yapısı. 108
Şekil 4.5 TCGA-E9-A1N5 örneğinde ABCC1 gen ifadesinin arttırılması durumunda ilk ağ yapısı. 109
Şekil 4.6 Hasta örneklerinde iterasyona göre değişimden etkilenen gen miktarı ... 111
Şekil 4.7 TCGA-E9-A1N5 örneğinin gen ifadesi değişimi ve ABCC1 geninde meydana getirilen değişiklik sonrasında model sonuçları. 113
Şekil 4.8 TCGA-E9-A1N5 örneğinin gen ifadesi değişimi ve model sonuçlarına göre yakın bulunan genler. 115
Şekil 4.9 TCGA-E9-A1N5 örneğinde ABCC1 geninin ifadesinde değişikle farklı iterasyonlarda çalıştırılan model sonuçlarının gerçek veri ile kıyaslanması 115
Şekil 4.10 TCGA-A7-A0CE örneğinin gen ifadesi değişimi ve ABCC1 geninde meydana getirilen değişiklik sonrasında model sonuçları. 116
Şekil 4.11 TCGA-A7-A0CE örneğinin gen ifadesi değişimi ve model sonuçların göre yakın bulunan genler. 117
Şekil 4.12 TCGA-A7-A0CE örneğinde ABCC1 geninin ifadesinde değişikle farklı iterasyonlarda çalıştırılan model sonuçlarının gerçek veri ile kıyaslanması 117
Şekil 4.13 TCGA-E9-A1N5 hastası için mikroRNA ifadesinin değiştirilmesi sonucunda elde edilen gen ifade profilleri ve gerçek gen ifade profilleri değişimi. 121
Şekil 4.14 TCGA-E9-A1N5 hastasında mikroRNA ifade değişimine bağlı olarak çalıştırılan model sonuçlarında ve gerçek veri setinde benzer ifade değişimi gözlenen genler. 122
Şekil 4.15 TCGA-A7-A0CE hastası için mikroRNA ifadesinin değiştirilmesi sonucunda elde edilen gen ifade profilleri ve gerçek gen ifade profilleri değişimi. 123
Şekil 4.16 GSE119449 veri setinde ağ tabanlı modelin sonuçları. 124
Şekil 4.17 MikroRNA ve transkripsiyon faktörleri döngü mekanizmaları 126
Şekil B.1 TCGA-E9-A1N5 örneğinde kararlı halde mikroRNA ve gen etkileşimi. 174
Şekil B.2 TCGA-A7-A0CE örneğinde kararlı halde mikroRNA ve gen etkileşimi. 174

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 Kanser araştırmalarında kullanılan veri setleri ve araçlar. 8
Çizelge 2.2 Yeni nesil dizileme araçları 11
Çizelge 2.3 2017 istatistiklerine göre tahmini kanser oranları. 15
Çizelge 2.4 Kısa kodlanmayan RNA'ların boyut ve fonskiyonları 21
Çizelge 2.5 MikroRNA hedeflerinin tahmin edilmesinde kullanılan araçlar. 29
Çizelge 2.6 MikroRNA hedeflerine dair veri setleri 30
Çizelge 2.7 Kanser hücrelerinin kritik fonksiyonlarında mikroRNA'lar 37
Çizelge 2.8 Meme kanseri alttipine göre mikroRNA düzenlenmesi 43
Çizelge 2.9 Meme kanserinde tümör baskılayıcı fonksiyon gösteren mikroRNA'lar ve hedefleri 43
Çizelge 2.10 Meme kanserinde onkogenik fonksiyon gösteren mikroRNA'lar ve hedefleri 44
Çizelge 3.1 Algoritma 1 58
Çizelge 3.2 Algoritma 2 59
Çizelge 3.3 Algoritma 3 60
Çizelge 3.4 Algoritma 4 61
Çizelge 3.5 Algoritma 5 61
Çizelge 3.6 CLASH yöntemiyle elde edilmiş mikroRNA veri setinin içeriği. 62
Çizelge 3.7 CLEAR-CLiP yöntemiyle elde edilmiş mikroRNA veri setinin içeriği. 63
Çizelge 3.8 Algoritma 6 64
Çizelge 3.9 Hedef mRNA üzerindeki tamamlayıcı bölgenin konumu ve etki katsayıları 66
Çizelge 3.10 MikroRNA:hedef etkileşiminde çekirdek tipleri ve etki katsayıları. 66
Çizelge 3.11 Algoritma 7 67
Çizelge 3.12 Algoritma 8 69
Çizelge 3.13 Algoritma 9 71
Çizelge 3.14 Algoritma 10 72
Çizelge 3.15 Algoritma 11 74
Çizelge 3.16 Algoritma 12 76
Çizelge 3.17 Örnek veri seti için etkileşimde önemli faktörlerin örneklendirilmesi. 81
Çizelge 3.18 Algoritma 13 87
Çizelge 3.19 Algoritma 14 91

Çizelge 4.1 Meme kanseri hastalarında gen ifadesi verilerinde 17 genin ifadesini içeren örnek veri seti. 94
Çizelge 4.2 Meme kanseri hastalarında mikroRNA ifadesi verilerinde 16 mikroRNA'nın ifadesini içeren örnek veri seti. 95
Çizelge 4.3 İnsan mikroRNA:hedef etkileşimi ve parametreleri örnek veri seti. 96
Çizelge 4.4 Gen ifade veri setinin içeriği. 97
Çizelge 4.5 MikroRNA ifade veri setinin içeriği. 97
Çizelge 4.6 MikroRNA:hedef veri setinin içeriği. 98
Çizelge 4.7 Algoritma 15 114
Çizelge 4.8 ABCC1 geninin iki hasta örneğinde etkileşimde olduğu mikroRNA'lar ve etkileşim faktörleri. 118
Çizelge 4.9 Algoritma 16 120
Çizelge 4.10 Algoritma 17 121
Çizelge A.1 Algoritma A.1 145
Çizelge A.2 Algoritma A.2 153
Çizelge A.3 Algoritma A.3 157
Çizelge A.4 Algoritma A.4 158
Çizelge A.5 Algoritma A.5 163
Çizelge A.6 Algoritma A.6 164
Çizelge A.7 Algoritma A.7 167
Çizelge B.1 Yeni nesil dizileme içeren deneysel yöntemlerden elde edilen verilerin birleştirildiği veri setinin içeriği. 170
Çizelge B.2 TCGA-E9-A1N5 hastasının doku örneklerinin birleştirilmiş veri seti. 172
Çizelge B.3 TCGA-A7-A0CE hastasının doku örneklerinin birleştirilmiş veri seti. 173

ÖZET

MEME KANSERİ YENİ NESİL DİZİLEME VERİLERİNDE GEN İFADESİ İLE MİKRORNA İFADESİ ARASINDAKİ KARŞILIKLI ETKİLEŞİMİN ANALİZİ

Selcen ARI

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Alper YILMAZ

Kanserin moleküler düzenlenmesinde önemli faktörlerden biri mikroRNA'lardır. Güncel çalışmalar, tanı ve tedavi için kullanılma potansiyeli keşfedilen mikroRNA'ların hedef genleriyle etkileşimini açıklamaya çalışmaktadır. Ancak mikroRNA'lar ve hedefleri arasında çoklu etkileşimlerin olması bu çalışmalardaki temel zorluktur.

MikroRNA'lar ve hedefleri arasındaki etkileşimlerin tanımlanması için mikroRNA bağlanma ve etkinlik faktörlerini içeren, ağ tabanlı bir model sistem ile mikroRNA:hedef etkileşimlerinin ve davranışlarının anlaşılması gerekmektedir.

Çalışmada meme kanser hastalarına ait gen ve mikroRNA ifade verileri kullanılmış ve bu veri setleri yeni nesil dizileme yöntemleriyle elde edilen mikroRNA:hedef bağlanmalarına dair veriler aracılığıyla birleştirilmiştir. MikroRNA ve hedef etkişimlerinde önemli olan mikroRNA ifadesi, gen ifadesi, çekirdek tipi, bağlanma enerjisi ve gen üzerindeki hedef bölge konumu gibi faktörler hesaba katılarak bir ağ tabanlı model sistem geliştirilmiştir. Bir mikroRNA'nın birçok hedefinin olabilmesi ve bir gen üzerinde birden fazla mikroRNA'nın baskılayıcı etkinlik gösterebilmesi sebebiyle mikroRNA:hedef etkileşimleri ağ tabanlı sistemle incelenmiştir. MikroRNA hedeflerinde bir değişiklik meydana gelmesi durumunda mikroRNA aracılı olarak, etkileşimde olan tüm hedef genlerin ifade seviyelerinin yeniden düzenlenmesi ağ üzerinde analiz edilmiştir.

Sonuç olarak mikroRNA aracılı hedef genlerin düzenlenme mekanizmalarını ve yarışmalı davranışlarını simüle eden bir model sistem tasarlanmıştır. Geliştirilen ağ tabanlı model sistem iki meme kanser hasta örneği veri setine uygulandığında, ABCC1 geninin pozitif düzenlenmesi sonucunda, etkileşimde olan genlerin %18,6 ve %17,5'inin gen ifade değişiminin yaklaşık olarak bulunabildiği saptanmıştır. Ağ tabanlı model, Septin9 geninin pozitif düzenlenmesinin gerçekleştirildiği bir in vitro çalışma veri setine uygulandığında ise genlerin %36'sının ifade değişimlerinin yaklaşık olarak tahmin edilebildiği tespit edilmiştir. Bu doğrultuda model yaklaşımında önemli olan faktörlerin ve düzenleyici unsurun bilinmesi halinde, bir değişiklik sonrasında etkileşimde olan binlerce gende meydana gelen ifade değişikliklerinin tahmininin yapılabileceği düşünülmektedir. Sunulan modelle hedef genlerin ortak hedefleyici mikroRNA'larına karşı yarışmalı davranışlarının ve ortak hedeflerin düzenlenmesinde kooperatif mikroRNA etkinliklerinin ağ üzerinde incelenmesi, çoklu ve karmaşık mikroRNA:hedef etkileşimlerinin anlaşılmasını kolaylaştıracaktır.

Anahtar Kelimeler: Meme kanseri, ağ tabanlı modelleme, mikroRNA:hedef etkileşimleri

ABSTRACT

ANALYSIS OF INTERPLAY BETWEEN GENE EXPRESSION AND MIRNA EXPRESSION IN BREAST CANCER NEXT GENERATION SEQUENCING DATA

Selcen ARI

Department of Bioengineering

MSc. Thesis

Adviser: Assist. Prof. Dr. Alper YILMAZ

MiRNAs are one of the most important factors in the molecular regulation of cancer. Since the discovery of their potential for diagnosis and treatment, studies attemped to explain interaction of miRNAs with their target genes. However, the fact that miRNAs affect multiple targets poses a challenge in miRNA:target analysis.

It is necessary to be understood of microRNA:target interactions and behaviors via network-based model system which includes microRNA binding and activity factors, for the identification of interactions between microRNAs and their targets.

In this study, gene and miRNA expression data from breast cancer patients were retrieved from TCGA and these data were integrated via miRNA:target binding data retrieved from high throughput immunoprecipitation experiments available at several databases. A network-based model system has been developed taking into account factors that are important in miRNA:target interactions such as miRNA expression levels, gene expression level, seed type, binding energy and target site location on the gene. MiRNA:target interactions have been investigated by a network-based approach because single miRNA can have many targets and multiple miRNAs can exhibit repressive activity on one gene. In the case of a change in expression level of one the

miRNA targets, recalculation of the expression levels of all the target genes interacting with that miRNA were analyzed on the network.

As a result, a model system has been designed that simulates the regulation mechanisms and competitive behaviors of target genes through miRNA. When the network-based model system was applied to ABCC1 gene upregulation in the two breast cancer patient sample data sets, it was found that expression changes of 18.6% and 17.5% of the interacting genes on network could be predicted approximately. When the network-based model was applied to an in vitro study data set in which Septin9 gene was upregulated was performed, it was found that expression changes of 36% of the genes could be estimated approximately. In this context, it is considered that if regulatory element and the factors that are important in the model approach are known, the model can estimate the changes in the expression occurring in thousands of genes interacting after a change.The examination of competing behaviors of target genes against common targets of miRNAs and cooperative activities of miRNA on the regulation of common targets on network by the model developed in this thesis study will facilitate the understanding of complex miRNA: target interactions.

Keywords: Breast cancer, network-based modeling, miRNA:target gene interactions

BÖLÜM 1

GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Tüm dünyada kanser, ölüm sebepleri arasında üst sıralarda yer almaktadır. Kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahaleler kanser tedavisinde en çok kullanılan yöntemlerdir. Ancak tedaviye cevapsızlık veya zayıf cevap, nüks, direnç, gen ifadelerindeki anormal düzenlenmeler gibi sebeplerden dolayı halen etkin kanser tedavileri sağlanamamaktadır. Günümüzde, immün sistemi kanser hücrelerine karşı stimule eden aşı uygulamaları, kanser hücrelerinin spesifik özelliklerini hedefleyen tedavi yöntemleri ve kanser hücreleri için önemli fonksiyonlarında görevli genlerin ifadelerinde değişikliği amaçlayan gen tedavi yöntemleri geliştirilmektedir [1],[2],[3]. Biyoinformatik uygulamalar kanser biyolojisinin anlaşılması, verilerin anlamlandırılması ve yorumlanması için halihazırda kullanılmaktadır [4]. Aynı zamanda kanser hücrelerindeki nükleotit, protein ve transkripsiyon faktörü gibi birimlerin birbirleriyle etkileşimlerinin anlaşılması ve sonuçlarının tahmin edilmesi konusunda da biyoinformatiğe dayanan uygulamalar mevcuttur [5]. Kanserde kullanılacak biyoinformatiğe dayanan yöntemlerle erken tanı koyulması ve etkili tedavi yöntemlerinin gerçekleştirilmesi de yakın gelecekte mümkün olabilecektir.

Kanser hücrelerinin düzenlenmesinde hücre içi ve dışı pek çok faktör rol alırken; kodlanmayan RNA türlerinin geniş bir kolu mikroRNA'lar en önemli düzenleyicilerden biridir[6]. MikroRNA'lar enerji metabolizmasının, büyüme sinyallerinin, apoptozun, anjiyogenezin, metastaz ve invazyonun düzenlenmesinde görevlidir [7]. MikroRNA'lar tarafından gen ifadelerinin düzenlenmesi farklı mekanizmalarla açıklanmakta ve

kompleks etkileşimleri içermektedir. Öyle ki, tek bir mikroRNA'nın binlerce geni düzenlemesinin mümkün olduğu gibi, bir genin çok fazla sayıda mikroRNA tarafından düzenlenebileceği de bilinmektedir [8]. MikroRNA ve hedeflediği genlerin ifadelerinin ilişkisi negatif korelasyon göstermektedir. Ancak mikroRNA'nın hedef bölge ürünlerinin kanser hücrelerindeki fonksiyonuna göre mikroRNA:mRNA etkileşiminin sonucu değişmektedir. Bununla birlikte hücre içindeki mikroRNA etkinliğinin çekirdek tipine, bağlanma enerjisine, bağlanma bölgesinin hedef üzerindeki konumuna [9], mikroRNA ve gen ifadesine [10] bağlı olarak değişebildiği farklı çalışmalar ile gösterilmiştir [11],[12],[13]. Bunun sonucunda kanser türüne göre gen ifadesi ve hücre tipine bağlı olarak mikroRNA'ların onkogenik veya tümör baskılayıcı sonuçları değişebilmektedir[14]. MikroRNA'lar tarafından düzenlenen gen ifadelerininin anlaşılması tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde büyük bir öneme sahiptir [6],[7],[14].

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada meme kanserinde gen ifadelerinin mikroRNA aracılı olarak nasıl düzenlendiğinin ağ tabanlı modelle anlaşılması hedeflenmektedir. Çalışmada meme kanser hastalarının normal doku örneklerinden ve kanser doku örneklerinden yeni nesil dizileme yöntemleriyle elde edilmiş gen ifadesi veri setleri ile yeni nesil dizileme içeren deneysel yöntemlerden elde edilmiş mikroRNA:hedef gen etkileşimlerini içeren veri setleri kullanılmıştır. Veri setleri mikroRNA ve gen etkileşimlerinin sonuçlarını etkileyen temel faktörleri içermektedir.

MikroRNA'ların ve hedeflediği genlerin etkileşimleri ağ yapıları üzerinde gösterildiğinde mikroRNA'ların hedefleriyle etkileşimlerinde etkili olan faktörler (mikroRNA ifadesi, gen ifadesi, mikroRNA çekirtek tipi, enerji, hedef dizinin konumu) mikroRNA ve gen düğümlerinin arasındaki bağlantıların gücü olarak hesaba katılabilmeketedir. Bu sayede kompleks etkileşim ağlarıyla mikroRNA hedeflerinin yarışmalı davranışları ve bu davranışlarda önemli olan faktörlerin etkilerinin anlaşılması amaçlanmıştır. Meme kanseri hastalarının normal doku ifadeleri başlangıç noktası olara kabul edilmiş ve tüm faktörlerin etkisine uygun ağ tabanlı çözümün sunulduğu model saptanmıştır. Modelde başlangıç değerlerine göre bir genin ifadesi tümördeki ifadesine çıkarılmış ve bu gen için

üst sınır olarak belirlenmiştir. Bu sayede normal dokudan temel alınarak bir genin ifadesinin tümör dokusundaki ifadesine çıkarıldığında mikroRNA aracılı olarak etkileşimde olan tüm genlerin ifadelerinin değişiminin anlaşılması amaçlanmışır. Çalışma sonuçları bir gen ifadesindeki değişiklik sonucunda mikroRNA aracılı olarak, etkileşim içindeki tüm gen ifadelerinin düzenlenmesinin nasıl olacağının belli bir çerçevede anlaşılabileceğini göstermiştir. Bu çalışmada:

- MikroRNA:hedef gen etkileşimlerinin yeni nesil dizileme yöntemlerini içeren deneysel çalışmaların sonuçlarına göre sunularak daha kesin şekilde ele alınması,
- MikroRNA ve gen ifadesi arasındaki ilişkinin tüm etkili faktörleri içeren bir ağ tabanlı çözümle sunulması,
- Elde edilen model sayesinde mikroRNA gen etkileşimlerinde yarışmalı davranışların anlaşılıp derecelendirilmesi,
- Meme kanserinde genlerin istenilen yönde düzenlenmesi için aracı olabilecek diğer gen veya mikroRNA'ların önerilmesi konusunda bir yöntem sunulması,
- MikroRNA veya gen düzenlenmesi aracılı olarak geliştirilebilecek kanser tedavi yaklaşımlarında öngörü oluşturabilecek bir araç sunulması amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Yeni nesil dizileme yöntemleri ve bu metotları içeren deneysel yöntemler sayesinde mikroRNA ve gen ilişkilerinin analizi detaylandırılabilmiştir. Bu doğrultuda meme kanserinden elde edilen verilerin birleştirilmiş analizi sonucunda mikroRNA ve hedef gen ifadesi arasındaki ilişkide etkili olabilecek faktörlerle birlikte ağ tabanlı model geliştirilebileceği görülmüştür. MikroRNA:hedef gen etkileşim ağ yapısındaki bir değişiklikle mikroRNA ve gen aracılı olarak etkileşimde olan tüm genlerin düzenlenmelerinin anlaşılabileceği düşünülmektedir. Bu sayede gen veya mikroRNA aracılı olarak gerçekleştirilebilecek tedavi yöntemlerinin sonuçlarının öngörülebileceği düşünülmektedir.

BÖLÜM 2

BİYOİNFORMATİK VE KANSER

2.1. Biyoinformatik

Biyoinformatik, moleküllerle ilgili bilginin anlaşılması ve organize edilmesi için moleküller bazında kavramsal biyoloji ve informatik tekniklerin (matematik, bilgisayar bilimleri ve uygulamalı matematik) uygulanmasıdır [15].

Biyoinformatik, Ulusal Sağlık Enstitüleri (The National Institutes of Health, NIH) tarafından "biyolojik, medikal, davranışsal ve sağlık verilerinin elde edilmesi, depolanması, düzenlenmesi, arşivlenmesi, analiz edilmesi ve görselleştirilmesinde kullanımı için hesapsal araçların ve uygulamaların araştırılması, geliştirilmesi ve uygulanması" olarak tanımlanmıştır. Biyoinformatik çalışmalar farklı amaçlarla gerçekleştirilebilir. Biyoinformatiğin temel amaçları aşağıdaki gibidir [15]:

Biyolojik verilerin sunulması ve bu verilere ulaşılması için düzenlenmesi: DNA veya protein zincirleri, makromolekülleri, fonksiyonel genomik yapıları konu alan çalışmalardan elde edilen deneysel sonuçlar düzenlenerek sunulur ve analiz aşaması için kullanışlı hale getirilir. Veri setleri, deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçların düzenli şekilde sunulması için kullanılan en temel araçtır. Verilerin düzenlenmesi elde edilen sonuçların birlikte gruplandırılmasında ve biyolojik olarak benzerliklerinin anlamladırılabilmesinde önemlidir. Günümüzde, bilginin içeriği veya büyüklüğüne göre çok çeşitli veri yapıları oluşturulabilmektedir [16].

Verilerin analizinde yardımcı olacak araç ve kaynakların geliştirilmesi: Biyolojik olarak önemli olan süreçlerin anlaşılabilmesi, farklı analiz yöntemlerinin geliştirilmesi açısından

önemlidir. Veri setleri, elde edilen bilginin kavranmasında tek başına yeterli değildir [16]. Biyoinformatik çalışmalar yeni araç ve yazılımlar ile analiz yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır. Günümüzde elde edilen verinin anlamlı hale getirilebilmesi için veri madenciliği, makine öğrenmesi gibi farklı hesapsal yöntemler kullanılmaktadır. Örneğin veri setlerinin oluşturulması ve yeni yazılımların kullanılmasıyla genom analizlerinde varyasyonların tespiti ve bu varyasyonların hastalığın genetiği açısından anlamlandırılabilmesi kolaylaşmıştır [17].

Deneysel çalışmalarda elde edilen verilerin ilişkilendirilmesi ve biyolojik olarak anlamlandırılabilmesi: Farklı deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçların kıyaslanması veya birleştirilmesi sayesinde türler arasında veya bir türdeki farklı doku, organ, sistem ve hücresel fonksiyonların ortak özellikleri belirlenebilir. Bu analiz, türlerde anormalliklerin sebeplerinin moleküler açıdan anlamlandırılmasını kolaylaştırmaktadır. Biyoinformatikte en çok kullanılan algoritmalar[18]:

- Diziler arasında benzerliklerin saptanması,
- Diziler içerisinde belirli motiflerin tespiti,
- Filogenetik ilişki haritalarının oluşturulması,
- Bilinen verilere göre yeni elde edilmiş bilginin sınıflandırılması,
- Dizileme verilerinin ve sinyal yolaklarına karşılık gelen davranışların sınıflandırılması amacıyla kullanılmaktadır.

2.1.1 Biyoinformatik Uygulmalar

Deneysel çalışmalarda meydana gelen gelişmelerden dolayı biyolojik veri çeşitliliği artmış ve bunun sonucunda ise farklı çalışma alanlarında çeşitli biyoinformatik uygulamaları ortaya çıkmıştır.

Yapısal Analiz: Hücredeki moleküler yapıların özelliklerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmaları kapsamaktadır. DNA, protein ve RNA'ların bağları, bağ enerjileri, özel tekrarlı bölgeleri ve stereokimyasal verileri biyoinformatik yöntemlerle analiz edilerek yapısal özellikleri anlaşılabilir[19].

Genom Araştırmaları: Genellikle yapısal çalışmalarla birlikte yürütülen genomik çalışmalar DNA dizilerinin nasıl düzenlendiğine odaklanmaktadır.

Gen İfadesi Çalışmaları: Genin ifade miktarının belirlendiği çalışmalarda özellikle genleri ifade profillerine göre gruplandırma ve ilişkilendirme amaçlanmaktadır. Bununla birlikte farklı doku, organ veya sistemlerde gen ifadesindeki değişikliklerin anlaşılması ve bunun fizyolojik işleyişteki farklılıklara etkisi, gen ifade çalışmalarında odak noktalarındandır [16].

Homolog Tespiti: Özellikleri açıkça tanımlanmamış olan moleküllerin yapısal özelliklerinin veya diğer moleküllerle etkileşimlerinin analizi yoluyla benzerlik gösterdiği başka bir molekülle ilişkilendirilmesidir. Bu çalışmalar özellikle protein homologlarının belirlenmesinde gerçekleştirilmektedir.

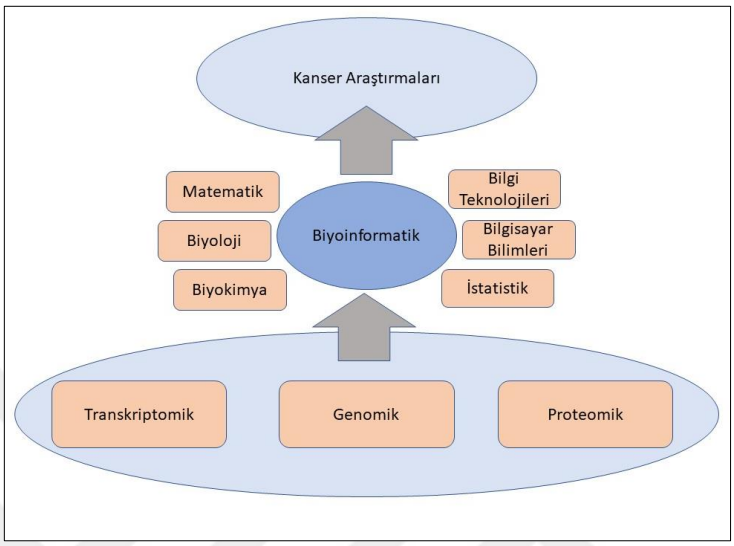
İlaç Tasarımı: Biyoinformatiğe dayanan ilaç tasarımları genellikle bir gen ürünündeki mutasyon sonucunda ortaya çıkan problemleri gidermeyi amaçlamaktadır. İlaç tasarımları yapısal analiz veya homolog tespiti gibi diğer alanlar ile birlikte kompleks süreçler olarak da gerçekleştirilebilir. Örneğin canlıda spesifik bir genin ürünü olan proteinin eksik olması durumunda homoloji çalışmalarıyla ürünün önemi anlaşılabilir ve bu doğrultuda anormalliklerin sonuçlarını giderebilecek yeni yaklaşımlar oluşturulabilir [15],[18].

Geniş Kapsamlı Veri Setleri: Canlı hücrelerinde RNA, DNA veya protein gibi moleküllerin bir bütün olarak ele alındığı çalışmaları ifade etmektedir. Bu çalışmalarda bir protein ele alındığında diğer canlılardaki homologları, yapısı, dizisi, etkileşimleri de sunulmaktadır.

2.1.2 Biyoinformatik ve Kanser

Normal döngüsünün aksine anormal şekilde gelişen hücre topluluğu olarak tanımlanan kanser çeşitli genetik ve epigenetik değişiklikler sonucunda meydana gelmektedir [20]. Kanserin ölüm sebepleri arasında önde gelmesi tanı ve tedavisindeki yetersizlik, hastalığın kontrolsüz ilerlemesinden kaynaklanmaktadır. Kanser moleküler mekanizmalarının protein ve genler arasındaki etkileşimleri ile aydınlanmasıyla birlikte kanser araştırmalarında yeni yaklaşımlar ortaya çıkmıştır. Bu yaklaşımlar omik bazlı teknolojilerin, klinik çalışmaların, sistem biyolojisinin, biyoinformatik ve hesaplamalı

bilimlerin birlikte kullanımıyla güçlendirilmeye çalışılmaktadır (Şekil 2.1) [21]. Kanser biyoinformatiği tanımlanabilecek yeni motif veya etkileşimlerin anlaşılması için verilerin düzenlenmesini ve analiz edilmesini, bunun sonucu olarak ise yeni terapötiklerin, tanı, korunma ve görüntüleme tekniklerinin geliştirilmesini amaçlamaktadır [22].



Şekil 2.1 Kanser araştırmalarında biyoinformatik uygulamalar.

Omik teknolojileri ile elde edilen veriler farklı veri setleri ve araçlar (Çizelge 2.1) aracılığıyla biyoinformatik yöntemlerle analiz edilebilir ve farklı soruların cevapları çeşitli omik yaklaşımlar yardımıyla bulunabilir:

Genomik: DNA dizileme, yeni nesil dizileme, SNP analizleri, genomik hibridizasyon yöntemleri, internet araçları ve veri setleri, BLAST ve başka yazılımların kullanılmasıyla mutasyonların, metilasyon değişimlerinin, kromozomal amplifikasyonların, delesyonların ve polimorfizmlerin tespiti yapılabilmektedir [21].

Transkriptomik: Mikrodizi temelli teknolojiler, PZR teknolojileri, yeni nesil dizileme yöntemleri, BLAST ve farklı yazılımlar kullanılarak ekzon ve intron bölgelerinin belirlenmesi, gen ifadesinin ölçülmesi, transkripsiyon sonrası modifikasyonların belirlenmesi mümkündür [23].

Proteomik: İmmünohistokimya, immünfloresan, kütle spektroskopisi, protein mikrodizi ve yazılımlar veya veri setlerinin kullanılmasıyla protein tanımlanması, protein seviyesini, translasyon sonrası modifikasyonları, protein-protein etkileşimleri belirlenebilir [24].

Çizelge 2.1 Kanser araştırmalarında kullanılan veri setleri ve araçlar.

	Araç	**URL**
Kanser genomik veri setleri	TCGA	https://cancergenome.nih.gov
	ICGC	https://icgc.org
	Cancer Cell Line Project	https://cancer.sanger.ac.uk/cell_lines
	CGCI	https://ocg.cancer.gov/programs/cgci
	CCLE	https://portals.broadinstitute.org/ccle
Gen ifadesi veri setleri	GEO	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo
	Oncomine	https://www.oncomine.org
	ArrayExpress	https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress
Kanser gen ve mutasyonları veri setleri	COSMIC	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic
	Cancer Gene Census	https://cancer.sanger.ac.uk/census
	OMIM	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim
Genom tarayıcılar	UCSC	http://genome.ucsc.edu
	Ensembl	http://www.ensembl.org
	GDV	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv
Biyokimyasal Yolak analiz araçları ve veri setleri	KEGG	https://www.genome.jp/kegg
	DAVID	https://david.ncifcrf.gov
	Reactome	https://reactome.org
	STRING	https://string-db.org
Populasyon polimorfizm veri setleri	dbSNP	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP
	IGSR	http://www.internationalgenome.org
	Database of Genomic Variants	http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home
Terapötik veri setleri	DrugBank	https://www.drugbank.ca
	PharmaGKB	https://www.pharmgkb.org
Programlama dilleri ve biyolojik analiz sağlayan araçlar	Phyon; BioPhyton	https://biopython.org
	Java; BioJava	https://biojava.org
	C++, C++ toolkit	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/toolkit
	Perl, BioPerl	https://bioperl.org
	R, Bioconductor	http://bioconductor.org

Deneysel çalışmalardan elde edilen veriler biyoinformatik metotlar sayesinde kanser araştırmaları için farklı şekillerde değerlendirilebilir:

- **Biyobelirteçlerin saptanması:** Biyobelirteçler kanser tanısı, takibi ve tedavinin izlenmesini sağlayabilecek moleküler yapılar olup, kanser araştırmalarında önemli konulardan biridir. Özellikle kanser ilişkili olan veya olma potansiyeline sahip proteinlerle yapılan çalışmalarda biyoinformatik analizlerin sonucunda tanı, tedavi çıktılarının takibi, görüntüleme alanlarında anlamlı biyobelirteçler elde edilmiştir [25],[26],[27].
- **Aşı geliştirilmesi:** Kanser aşılarının geliştirilmesinde temel prensip kanser hücrelerindeki özel belirteçlere karşı immün sistemin stimüle edilmesidir. Bu çalışmalarda kanser hastalarından elde edilen genomik, transkriptomik ve proteomik verilerin analizi ile tümör ilişkili antijenlerin tespiti gerçekleştirilir [28] ve immün sistemi stimüle edici aşı olarak uygulanabilir. Bununla birlikte aşı sonrası etkinliğin modellenmesi de biyoinformatik yöntemlerle mümkün olabilir [29].
- **İlaç geliştirilmesi:** Kanser hücrelerinin özel reseptör veya moleküllerini hedefleyecek özellikteki anti-kanser ilaçlarının geliştirilmesi mümkündür. Bunun için ise kanser hücrelerinin fizyolojik işleyişlerinde değişiklik meydana getirecek enzim veya reseptörlerin hedeflenmesi temel amaçtır [30]. İlaç geliştirme çalışmalarında geniş çaplı sistem biyolojisi yaklaşımlarını gerçekleştirebilen biyoinformatik yöntemler öne çıkmaktadır [31].
- **Gen ve hastalık tiplemesi (gruplaması):** Kanser hücreleri ve sağlıklı hücreler arasında gerçekleştirilen gen ifadesinde değişim analizleri ile genlerin tanımlanması ve ifade seviyelerine göre gruplandırılması mümkündür. Bu analizlerde tümör gelişiminde rol oynayan, normal dokulara göre farklı ifade edilen genler üzerinde yoğunlaşılır. Aynı zamanda hastalık alttiplerinin belirlenmesi ve bunun sonucunda tanı, tedavi veya hastalığın gelişim takibinin yapılmasını sağlayan bilgi de elde edilebilir [32].
- **Nokta mutasyonlarının, delesyonların, insersiyonların ve yapısal değişikliklerin tespiti:** Pek çok kanser tipinde delesyon, insersiyon, yer değiştirme veya gen füzyonları gibi yapısal değişiklikler gözlenmektedir. Dizileme çalışmalarıyla birlikte referans diziye göre analiz edilen dizideki değişiklikler kolayca tespit edilebilir.

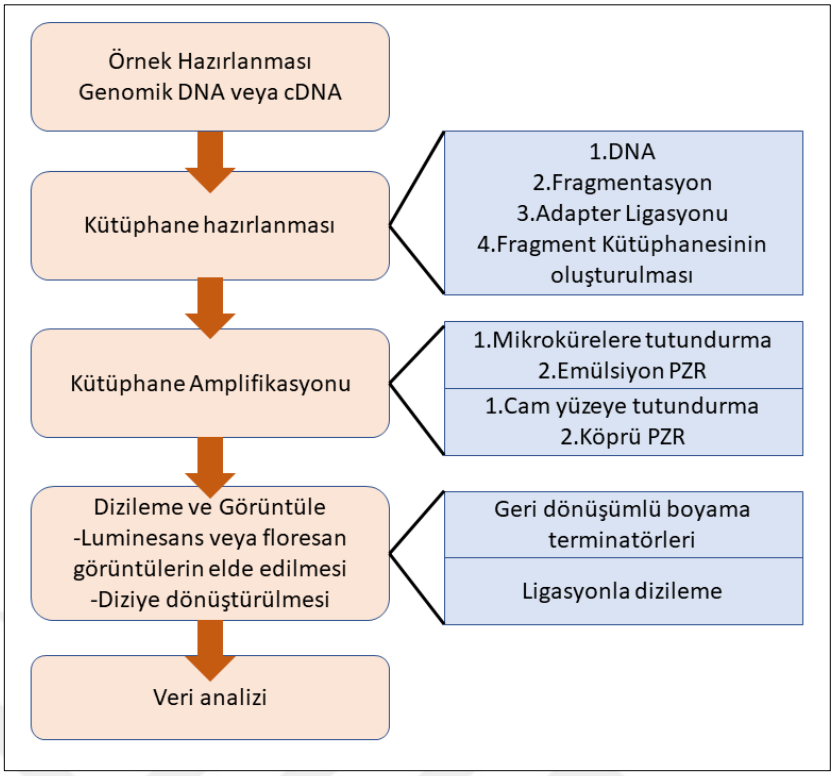
Biyoinformatik yöntemler ile dizileme sonuçlarının anlamlandırılabilmesinin yanında büyük verilerle çalışmanın getirdiği zorluklar ortadan kaldırılmaktadır [32].

2.1.3 Yeni Nesil Dizileme

Bir DNA veya RNA molekülünde bulunan nükleotitlerin sırasının belirlenmesine nükleik asit dizileme denilmektedir. “Birinci nesil dizileme” olarak da kabul edilen nükleik asit dizilemede ilk yaklaşımlar Sanger vd. [33] ve Maxam ve Gilbert [34] tarafından getirilmiştir. Maxam ve Gilbert metoduna göre daha az toksik kimyasal ve radyoizotop içermesi sebebiyle daha çok tercih edilen Sanger yöntemi ile gerçekleştirilen İnsan Genom Projesi 13 yıl sürmüştür [35].

Temel olarak Sanger dizileme zincir sonlandırma prensibine dayandırılarak geliştirilmiştir. Büyüyen DNA zinciri dideoksi nükleotitlerin varlığında farklı reaksiyonlarla sonlandırılır. Amplikonların farklı uzunluktaki fragmentlerinin belirlenmesi için jel üzerinde şeritler halinde yürütülür. Sanger dizilemesi sonucunda tek seferde yalnızca 800-1000 baz çift dizilenebilmektedir [33].

Ulusal İnsan Genom Araştırma Enstitüsü tarafından önerilen programlar sayesinde yeni nesil dizileme metotlarının gelişimi başlamıştır. İlk yeni nesil dizileme, düzenlenmiş Sanger dizileme yöntemidir. Modifiye edilmiş Sanger metodunda bakteri klonlamasına gerek kalmadan paralel dizileme yapılabilen, elektroforez basamağı olmaksızın hücre gereksinimi olmayan bir sistem geliştirilmiştir [36]. Yeni nesil dizileme yöntemleri genellikle aynı temellere dayanmakla birlikte (Şekil 2.2), devam eden süreçte pek çok farklı yaklaşımla yeni nesil dizileme aracı geliştirilmiştir.



Şekil 2.2 Yeni nesil dizileme yöntemlerinin genel akış şeması.

Yeni nesil dizileme araçları milyonlarca DNA parçasının paralel olarak dizilenmesini sağlayabilir. Bir canlının tüm genom veya transkriptomu milyonlarca küçük parçaya bölünür ve birbirinden bağımsız şekilde paralel olarak dizilenebilir. Bu sayede maliyet ve işgücü konusunda yüksek verim sağlamaktadır. Günümüzde farklı teknikleri temel alan pek çok yeni nesil dizileme cihazı bulunmaktadır (Çizelge 2.2) [37].

Çizelge 2.2 Yeni nesil dizileme araçları [37].

Cihaz	**Yöntem**	**Avatajları**	**Dezavantajları**
Roche-454 GS FLX	DNA polimeraz aktivitesi sırasında salınan bir prifosfatın aracı olduğu reaksiyonlar sonucunda ortaya çıkan floresanın karşılık geldiği nükleotitler dizilenir.	-700-1000 baz çifti okuma -Daha uzun eşleştirilmiş sonlanma okuması yapması -23 saatte okuma	-Homopolimer tekrarlarının dizilenmesi zor -Diğer yeni nesil dizileme teknolojilerine göre çalışma başına düşük baz okuması yapması
Illumina Solexa	Akış hücrelerinde sabitlenmiş adaptörler aracılığıyla nükleotitlerin ligasyonu sağlanır ve floresan ışımalarından alınan sinyaller diziye dönüştürülür.	-Büyük veri elde edilmesi (95 GB, HiSeq ile 600 GB'a kadar) -Düşük maliyet	-11-14 günde okuma -Kısa okuma yapılabilmesi (100x2 baz çifti)

Çizelge 2.2 Yeni nesil dizileme araçları (Devamı)

ABI SOLiD	DNA fragmentleri kürelerin yüzeyine tutundurulur ve emülsiyon PZR gerçekleştirilir. Floresan ışıma ile dizilenir.	-Yüksek kalitede veri eldesi	-6-7 günde okuma - Günde 10-15 GB veri eldesi -Kısa okuma yapabilmesi (75 baz çifti)
Pacific Biosciences	Cam yüzeye kaplanmış metal filmden oluşturulmuş oyuğun altına yerleştirilen DNA polmerazın ve yüzey üzerinden geçirilen floresan işaretlenmiş nükleotitlerin de oyuktan geçmesiyle etkileşime girmesi sonucunda elde edilen ışımanın okunmasıyla dizileme yapılır.	-PZR amplifikasyon basamağı gerektirmez. -1000-3000 bazçifti okuma -Bir günden kısa -Polimeraz aktivitesi hakkında veri eldesi	-Bir okuma hücresi başına düşük veri -İnsersiyon ve delesyon hataları fazla
Helicos Bioscience	Özel bir yüzeye DNA tutundurulur. Floresan ile işaretlenmiş nükleotitler polimeraz ile eklenirken görüntüleme yapılır.	-Yüksek kalitede veri -RNA molekülünün direkt olarak dizilenebilmesi	-25-55 baz çifti okuma -Hata oranı yüksek
Ion Torrent	Uzayan DNA zincirindeki hidrojen iyon salımlarının sensörler aracılığıyla diziye çevrilmesini içerir.	-Roche-454 ve PacBio'ya göre düşük maliyet. -Yüksek hızda okuma (~2 saat)	-Veri eldesi az -200 bazçifti okuma
Oxford Nanopore	Bir yüzeye tutturulmuş 1 nm çapındaki transmembran protein yapıdaki pordan geçen nükleotitlerden elde edilen elektriksel sinyallerin diziye dönüştürülmesidir.	-Düşük maliyet -Tek seferde uzun okumalar yapabilme	-Hata oranı yüksek
Polonator	İki akış hücresi içeren sistemde akış hücrelerinde bulunan kürelerin yüzeyinde ligasyona uğrayan DNA biyokimyasal reaksiyonları gerçekleştirirken nükleotit görüntüleme sağlanır.	-Çok düşük maliyet -Analiz için gereken yazılımlara kolay erişim	-Hata oranı -Düşük hızda okuma yapabilmesi (4 gün) -26 baz çifti okuma
Complete Genomics	İki eleman içeren sistem temelde DNA nanoküre ve prob-bağımlı ligasyon işlemlerine dayanarak çalışmaktadır. Reaksiyonlar sırasında floresan ışımanın okunmasıyla dizi çıkarılır.	-Akış hücresi başına okuma sayısı oldukça yüksek - Maliyet ve veri kalitesi açısından diğer teknolojilerden üstün	-Kısa okuma yapılabilmesi (35 baz çifti) -Yalnızca insan genomu için uygun

2.1.3.1 Yeni Nesil Dizileme Uygulamaları

Yeni nesil dizileme yöntemlerinin teknolojik yenilikler aracılığıyla gelişmesi pek çok farklı uygulamada kullanılmasını sağlamıştır.

Evrim araştırmaları: Evrimsel süreçte canlılarda meydana gelen moleküler olaylar adaptasyon genetiğinin anlaşılabilmesi için önemlidir. Yeni nesil dizileme yöntemlerinin geliştirilmesiyle adaptasyondan sorumlu genetik bölgelerin tespiti kolaylaşmıştır [38]. Bununla birlikte antik DNA çalışmalarında, yeni nesil dizileme teknolojileri, kısa okumalardan büyük veri elde etmeye imkan tanıması nedeniyle kullanılmaya başlanmıştır.

Metagenomik: Bir habitat içerisindeki karışık halde bulunan mikroorganizmaların genom çalışmaları olarak nitelendirilen metagenomik çalışmalar, yüksek verim ve kalite sağlayan yeni nesil dizileme yöntemleri sayesinde hızla gelişim göstermiştir [39]. Bu sebeple bir habitattaki mikroorganizmaların kültür ortamında büyütülmesine gerek kalmadan çeşitliliğinin anlaşılmasında önemli bir araç olarak görülmektedir.

Genomik değişikliklerin tespiti: Özellikle kopya sayısı değişiklikleri ve tek nükleotit polimorfizmleri gibi genomik değişiklikler otizm, kanser, şizofreni gibi pek çok hastalıkla ilişkilendirilmektedir. Kopya sayısı değişiklikleri iki örnek genom dizisi arasında 50 ve daha fazla baz çifti farklılık (fazla veya az) gözlenmesi durumu olarak açıklanırken; tek nükleotit polimorfizm ise genom dizisinde bir nükleotidin değişmesi olarak tanımlanmaktadır [40]. Mikrodizi temelli genomik araştırmalarda yalnızca referans genoma karşılık olarak kısmi kopya sayısı artış veya azalış bilgisi elde edilebilirken, yeni nesil dizileme teknolojileri sayesinde yüksek kararlılık ve hassaslıkta kopya sayısı değişikliği elde edilebilmektedir.

Gıda güvenliği ve beslenme: Genetik modifikasyonlar sonucunda elde edilmiş olan hayvansal veya bitkisel ürünlerin tüketimi sonucunda oluşabilecek toksisite, alerjik reaksiyonlar veya biyoaktivite sorunlarının kesin sebeplerinin bilinmesi ve sonuçlarının öngörülebilmesi gerekmektedir. Bununla birlikte gıda tüketim ürünlerinin beraberinde barındırdığı mikroorganizmaların da gıda güvenliği açısından analiz edilmesi gerekmektedir [41]. Yeni nesil dizileme teknolojileri bu analizlerin yapılabilmesi için,

kullanılan teknolojiye bağlı olarak, ekonomik olması ve hızlı cevaplar sunabilmesi açısından avantajlıdır.

Genetiği değiştirilmiş organizma teknolojileri: Transgenik organizmalar farklı alanlarda kullanılmaktadır. Özellikle hastalıkların gen bazında anlaşılması, tanı ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için önemli deneysel araçlar olarak görülmektedir. Örneğin, DNA dizilerinin modifiye edilmesi veya DNA transferi yoluyla proteinler geliştirilebilir ve tedavi amacıyla kullanılabilir [42]. Yeni nesil dizileme teknolojileri ise bu ve benzeri araştırmalar için önemli bir araçtır.

Kişiye özel tedavi: Her birey farklı genetik yapıya sahip olduğu için bireylerin hastalıklara verdikleri tepkiler de farklı olmaktadır. Bu sebeple de bireyler farklı tedavi yöntemlerine ihtiyaç duymaktadır. Bunun yanında genom, hastalıklara karşı taşınan riskin anlaşılması için belirli ipuçları içermektedir. Yeni nesil dizileme yöntemleriyle genomdaki değişikliklerden kaynaklanan farklı hastalık türleri için bilgi edinilebilir [43].

Doğum öncesi tanı: Down sendromu gibi genetik anormalliklerden kaynaklanan hastalıkların hücre dışı DNA dizileme yöntemleriyle doğum öncesi anlaşılması, yeni nesil dizileme yöntemleri ile kısa sürede yüksek hassaslık ve spesifitede gerçekleştirilebilmektedir [44].

Kanser araştırmaları: Kanser fenotipiyle ilgili olan genetik değişikliklerin analiz edilmesi kanser araştırmalarının ana konularından biridir. Bunun için tüm genom dizileme veya düşük maliyetli ekzom dizileme çalışmaları gerçekleştirilmektedir. Farklı çalışma gruplarının uluslararası iş birliği ile yürüttüğü çalışmalarla kanser mutasyonlarının, gen ifadelerinin, miRNA ifadelerinin ve DNA metilasyon bölgelerinin veri setleri oluşturulmuştur. Yeni nesil dizileme yöntemleri sayesinde bu veri setlerinin içeriği hızla genişlemekte ve bunun sonucunda, kanser araştırmalarında tanı ve tedavi için yeni yaklaşımlar da geliştirilmeye çalışılmaktadır.

2.2 Kanser

Kanser, bazı vücut hücrelerinin durmaksızın bölünmesi ve çevre dokulara yayılması olarak tanımlanan genetik bir hastalıktır. Sigara tüketimi, beslenme, fiziksel aktivite, çevresel diğer etmenler bu genetik hastalık için tetikleyici faktörlerdir. Dünyada ölüm

sebepleri arasında ikinci sırada yer alan kanserin 2018 yılında 9.6 milyon insanın hayatını kaybetmesine sebep olduğu düşünülmektedir. Bunlardan en sık gözlenenleri sırasıyla akciğer, meme, kolorektal, prostat, deri ve mide kanserleridir [45]. 2017 verilerine göre tahmini ölüm oranları ise Çizelge 2.3'te gösterilmiştir [46].

Çizelge 2.3 2017 istatistiklerine göre tahmini kanser oranları.

Kanser türü	**Ölüm oranı (Kadın)**	**Kanser türü**	**Ölüm oranı (Erkek)**
Akciğer&Bronş	%25	Akciğer&Bronş	%27
Meme	%14	Kolon&Rektum	%9
Kolon&Rektum	%8	Prostat	%8
Pankreas	%7	Pankreas	%7
Yumurtalık	%5	Karaciğer	%6
Uterin Korpus	%4	Lösemi	%4
Lösemi	%4	Özofagus	%4
Karaciğer	%3	Mesane	%4
Non-Hodgkin Lenfoma	%3	Non-Hodgkin Lenfoma	%4
Beyin ve sinir sistemi	%3	Beyin ve sinir sistemi	%3

Kanser tedavisi kanserin türü, aşaması, hastanın durumuna göre gerçekleştirilmektedir. Temel olarak kanser tedavisi için, cerrahi müdahaleler, radyoterapi veya kemoterapi uygulamaları yapılmaktadır. Cerrahi operasyonlar tümör dokusunun bulunduğu lokasyondan doğrudan alınmasıdır. Bu işlemler sırasında organın bütünü operasyonla alınabildiği gibi sadece bir kısmının alınması da mümkündür. Radyoterapi, X ışınlarının veya gamma ışınlarının kullanılmasıyla etkinlik gösteren tedavi türüdür. Kemoterapi kanser hücrelerinin normal hücrelere göre anormal şekilde gerçekleştirdikleri bölünme faaliyetlerindeki bir takım düzenlenmeleri etkileyecek ajanların kullanılmasıdır. Bu tedavi türleri genellikle evreleme ve hastanın şartları göz önünde bulundurularak tek tek veya kombinasyonlar halinde uygulanabilmektedir.

Kanser başlangıcı çeşitli faktörlerin de etkisiyle hücrede anormalliklerin birikmesi sonucunda gerçekleşmektedir. Bunu takiben çeşitli fazların gelişimi ile bir kanser hücresi

tümör dokusuna dönüşür ve tedavi olmaması durumunda ise invazyon ve metastaz basamaklarıyla gelişmeye devam eder. Kanser başlangıcını tetikleyebilecek hücresel olaylar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

Anti-apoptoz ve programlanmış hücre ölümünde anormallik: Normal bir hücre genetik hasar onarım mekanizmasını sağlayamadığında veya doku spesifik sağ kalım sinyallerini almadığında kendisini ölüme götürmektedir. Farklı şekillerde gerçekleşebilen bu mekanizmalar dokuların kontrolsüz büyümesini engellerken; kanser hücrelerinde bu mekanizmalar genellikle hasarlıdır [47].

Hücre döngüsü kontrol noktaları (tümör baskılayıcılar ve onkogenler): Bir hücrede normalde dışarıdan alınan sinyallerle veya döngü sırasında meydana gelen aksaklıkların kontrolünden sorumlu mekanizmalarla hücre bölünmesi durdurulabilmektedir. Bu mekanizmalarda önemli proteinlerin sentezini sağlayan iki gen grubu bulunmaktadır: tümör baskılayıcılar ve onkogenler. Hücre döngüsünde tümör baskılayıcılar kontrol noktalarından sorumlu olup, bu genlerdeki herhangi bir anormallik kontrolsüz hücre bölünmesini tetikler. Bunun tersine onkogenler ise genellikle hücrelerin dış sinyaller aracılığıyla bölünmek üzere uyarılmasını tetiklemektedir [48],[49].

Hücre yaşlanmasının engellenmesi: Normal bir hücrede, hücre bölünmesinden sonra kromozom uçlarında bulunan telomer bölgeleri DNA replikasyon enzimlerince kopyalanmadıkları için kısalmaktadır. Bu sebeple sağlıklı bir hücre belli bir üst sınıra kadar bölünebilmektedir. Ancak agresif kanser hücrelerinin pek çoğu telomeraz ifadesi gerçekleştirerek telomer oluşumunu desteklemekte ve bölünme sayısı üst limitini elimine etmektedir [50].

Mutasyonlar: Hücre DNA'sında, farklı hücresel veya çevresel faktörlerin veya DNA polimeraz aktivitesinin sonucunda hasarlar meydana gelebilmektedir. Mutasyon olarak nitelendirilen bu hasarlar tek bir nükleotit seviyesinde veya kromozomal seviyede meydana gelebilir. Mutasyonların birikmesi sonucunda genomun düzenlenmesi konusunda kümülatif olarak meydana gelen anormallikler pek çok kanser türünde karşılaşılan bir durumdur [51]. Bu tip mutasyonların sonucunda kromozomal kararsızlıklar da meydana gelebilmektedir.

Kromozomal kararsızlık: Kanser hücrelerinde kromozom sayı ve düzenlenmesinde genellikle anormallikler görülmektedir. Bu anormallikler DNA üzerindeki bir hasar ve bu hasarın onarımının gerçekleşmemesi sonucunda oluşmaktadır. Özellikle kromozom sayısında değişiklik olması, anöploidi, durumunda hücresel pek çok fonksiyonda kritik genlerin kaybedilmesi mümkün olabilmektedir. Kromozomal kararsızlık, kontrolsüz hücre bölünmesini desteklemesinin yanında tümör dokusu içerisinde heterojen yapıda hücre topluluklarının oluşumuna katkıda bulunmaktadır [52].

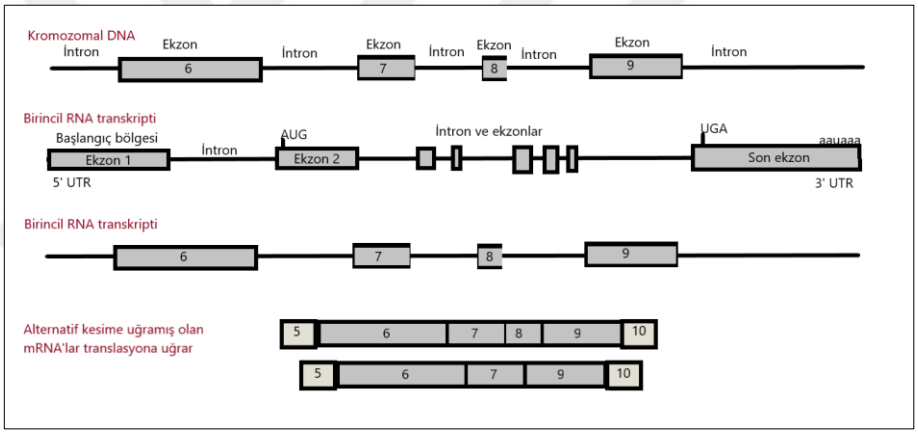
Bu faktörlerin sonucunda, başlama basamağı olarak adlandırılan süreçte, kontrolsüz olarak çoğalmaya başlayan hücreler belirli fazlardan geçmektedir [53],[54]. I) İnvazyon ve göç: bazı hücreler ekstraselüler matriksi bozunmaya uğratacak şekilde litik enzimleri salgılama yoluyla birincil tümör dokusundaki diğer hücrelerle bağlarını koparmaktadır [55]. Bu durum epitelden mezenkimale dönüşüm olarak nitelendirilen, hücre göçünü kolaylaştıracak morfolojik ve biyokimyasal olayları içeren bir süreci kapsamaktadır [56]. II) İntravazasyon: Bu hücreler kan veya lenf damarlarına geçişlerini sağlayacak endotelyal hücrelere tutunma sağladıktan sonra proteolitik enzimleri kullanarak geçişlerini gerçekleştirir [57]. III) Dolaşım: Çok fazla sayıda kanser hücresi kan akışına dahil olur; ancak kanser hücreleri için toksik özellik sergileyen dolaşım ortamında kanser hücrelerinin agresif tipleri dışındakiler elimine olur [58]. IV) Ekstravazasyon: Geriye kalan hücreler herhangi bir dokunun kılcallarına geldiğinde dolaşım sisteminden doku içerisine geçişi gerçekleştirirler [59]. V) Kolonizasyon, proliferasyon ve anjiyogenez: İkincil dokuya ulaşan hücreler kendilerine uygun ortamı sağlayabilmek için öncelikle proliferasyonla çoğalır, sonra ise besin ihtiyaçlarını karşılayabilmek için damar oluşumu (anjiyogenez) sergiler [60].

2.2.1 Kanser Moleküler Düzenlenmesinde Genler

Kanser hücrelerini normal hücrelerden farklı kılan unsurlar farklı moleküler düzenlenmelerin sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu moleküler mekanizmalar ise gen düzenlenmeleri ile çalışmaktadır.

2.2.1.1 Protein Kodlayan Genler

Hücrenin spesifik özelliklerini belirleyen proteinlerin gen dizilerinden sentezlenmesi temel olarak iki basamağı içermektedir; gen dizilerinin mRNA'ya transkripsiyonu ve mRNA'nın protein yapısına translasyonu. Ökaryotik canlılarda kompleks proteinlerin oluşturulmasının nedeni ise kromozomal DNA'nın kodlanan (ekzon) ve kodlanmayan (intron) özel bölgeleri içeren yapısındandır (Şekil 2.3). Kromozomal DNA'nın dizisinden protein sentezi için öncelikle mRNA transkripti oluşturulur, sonra ise alternatif kesim süreci tamamlanır ve DNA'nın ekzon bölgeleri protein sentezinde bir nevi kalıp olarak kullanılır. Genin birincil mRNA transkripsiyonu bir promotör bölge ile başlar ve poliadenil içeren ucunda sonlandırılır. Alternatif kesim sürecinde, farklı ekzon bölgeleri olgun mRNA transkriptine çevirildiği için farklı yapıda ve fonksiyonda protein sentezine olanak sağlanır [61].



Şekil 2.3 Ökaryotik kromozomal DNA'nın yapısı; ekzon ve intron düzenlenmesi [61].

Protein kodlayan DNA bölgelerinin düzenlenmesinde promotör bölge önem taşımaktadır. Promotör bölgede bulunan transkripsiyon başlatıcı bölge, TATA kutusu ve transkripsiyon düzenleyicilerin bağlandığı diziler transkripsiyonun kontrolünü sağlamaktadır. Başlatıcı bölge ile adenin ve timin açısından zengin TATA kutusu doğrudan transkripsiyon başlanmasında görevliyken; transkripsiyon düzenleyicilerin bağlandığı dizi bölgesi ise aktivasyon veya baskılanma cevapları oluşturan moleküllerle bağlanmaların gerçekleştiği bölgedir [62]. Kanser hücrelerinde bu düzenlenmeler, sağlıklı hücrelerle aynı mekanizmalarla gerçekleşmekte ancak aktivatör veya

baskılayıcıların farklı düzenlenmeleri sonucunda protein kodlayan genlerin ifadelerinde anormallikler görülmektedir.

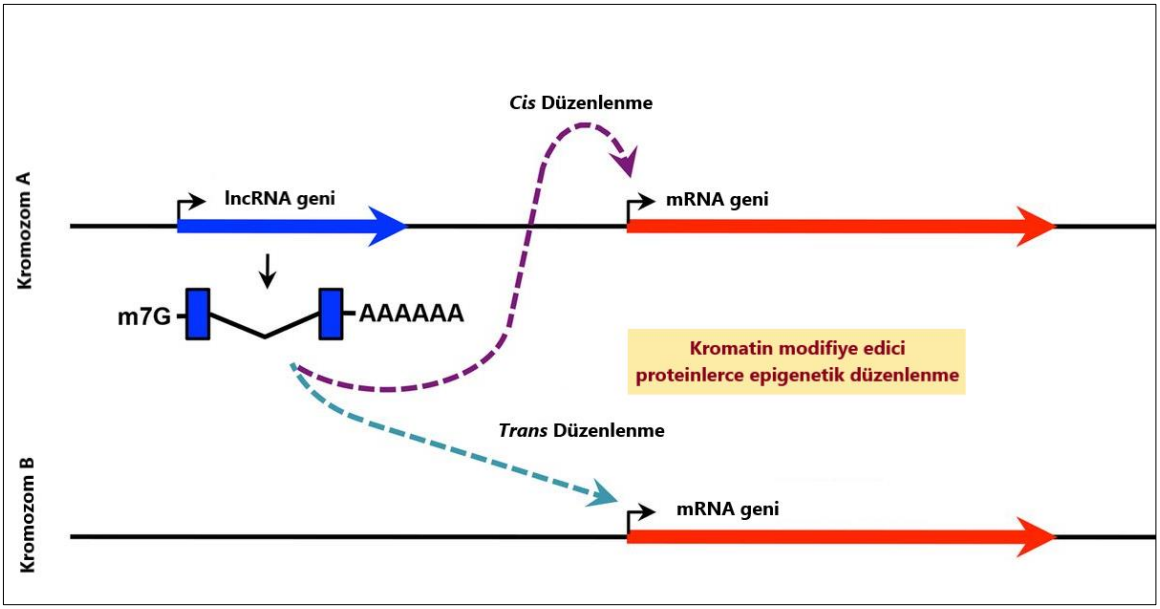
2.2.1.2 Transkripsiyon Faktörleri

Transkripsiyon faktörleri genlerin promotör bölgelerinde güçlendirici (enhancer) elementlerin ve ko-aktivatörlerin bağlanması veya RNA polimeraz II'lerin bağlanması aracılığıyla hedef genlerinin düzenlemesini sağlayan temel faktörlerdendir [63]. Transkripsiyon başlaması ve uzamasında TF'ler ayrı ayrı görev alabilirken, bazı TF'ler hem uzama hem de başlangıç görevlerini yerine getirebilmektedir. Gen ifadelerinin düzenlenmesinde kritik olan bu faktörler üzerine yapılmış çalışmalarda prostat, kolorektal, akciğer ve meme gibi birçok kanser türünde, transkripsiyon faktörlerinin anormal düzenlenmelerinin olduğu ve bu düzelenmelerin kanser başlangıcı, ilerlemesi ve metastazında kritik olduğu belirtilmiştir [64],[65]. Transkripsiyon faktörleri düzenlediği genin kanser için anlamına göre onkogenik ve tümör baskılayıcı olarak tanımlanabilmektedir. En çok çalışılan onkogenik transkripsiyon faktörlerinden olan c-MYC'nin kanser hücrelerinde anormal derecede yüksek ifade sergilediği, bunun sonucunda genlerin promotör bölgelerinde birikerek anormal seviyede ifadelerini desteklediği bilinmektedir [66],[67].

2.2.1.3 Uzun Kodlanmayan RNA'lar

Genomun %2'den azı protein kodlayan genlerden meydana gelmekle birlikte pek çok bölge ise protein kodlamayan RNA'ları oluşturmak üzere transkripsiyona uğramaktadır [68]. Kodlanmayan bölgelerden transkripsiyona uğrayan RNA'lar (tRNA, rRNA gibi) yapısal ve düzenleyici RNA'lar olarak gruplandırılmaktadır. 200 ve daha fazla sayıda nükleotit içeren düzenleyici RNA'lar grubunda bulunan uzun kodlanmayan RNA'lar üst düzey kromozomal dinamiklerde, telomer aktivitelerinde ve hücrede yapısal düzenlemelerde önemli rollere sahiptir. Bunun yanında uzun kodlanmayan RNA'ların çevresinde bulunan protein kodlayan genlerin ifadesini düzenlemesi, en kritik işlevidir [69]. Uzun kodlanmayan RNA'lar gen düzenleme mekanizmalarını farklı şekilde gerçekleştirebilirler. Yakın çevresinde veya aynı kromozomda bulunan bir geni düzenliyor ise cis-düzenleyici, genomik olarak uzak bir geni düzenliyor ise trans-

düzenleyici uzun kodlanmayan RNA olarak nitelendirilir (Şekil 2.4) [70]. Yapılan çalışmalar uzun kodlanmayan RNA'ların önemli bir kısmının gelişimsel olaylar sırasında düzenlendiğini, hücre tipine spesifik olarak ifadesinin değiştiğini, özel hücre altı bölümlerin düzenlenmesinde görevli olduğunu ve kanser gibi hastalıklarla ilişkili olduğunu göstermektedir [68],[71]. Uzun kodlanmayan RNA'lar tümör dokuları için onkogenik ve tümör baskılayıcı olarak fonksiyon sergilemekle birlikte belirteç olarak da kullanılabilme potansiyeline sahiptir. Örneğin, GAS5 uzun kodlanmayan RNA, apoptozu indükleyerek meme kanseri için tümör baskılayıcı özellik gösterirken [72]; HOTAIR metastazı destekleyerek onkogenik özellik sergilemektedir [73].



Şekil 2.4 Uzun kodlanmayan RNA'ların düzenleyici cis ve trans mekanizmaları [74].

2.2.1.4 Kısa Kodlanmayan RNA'lar

Kısa kodlanmayan RNA'lar, 200 nükleotitten kısa, kendi içerisinde yapı ve fonksiyon olarak da alt grupları içeren düzenleyici kodlanmayan RNA'lardır [75] (Çizelge 2.4). Kısa kodlanmayan RNA'lardan en iyi tanımlan grupları mikroRNA'lar, siRNA'lar (small interferin RNA) ve piRNA'lar (PIWI-interacting RNA) Argonaute proteininin, genomik bölgelerde ya da hedef RNA'larda, dizi spesifik şekilde etkili olmasını sağlamaktadır [76]. Kısa nükleolar ribonükleoproteinlerin elemanlarından olan snoRNA'lar (Small Nucleolar RNA) ise rRNA'ların dizi spesifik 2'-*O*- metilasyonundan ve pseudoüridinilasyonundan sorumludur. Fonksiyonu tam olarak aydınlatılamamış TSSa-RNA (Transcription Start Site

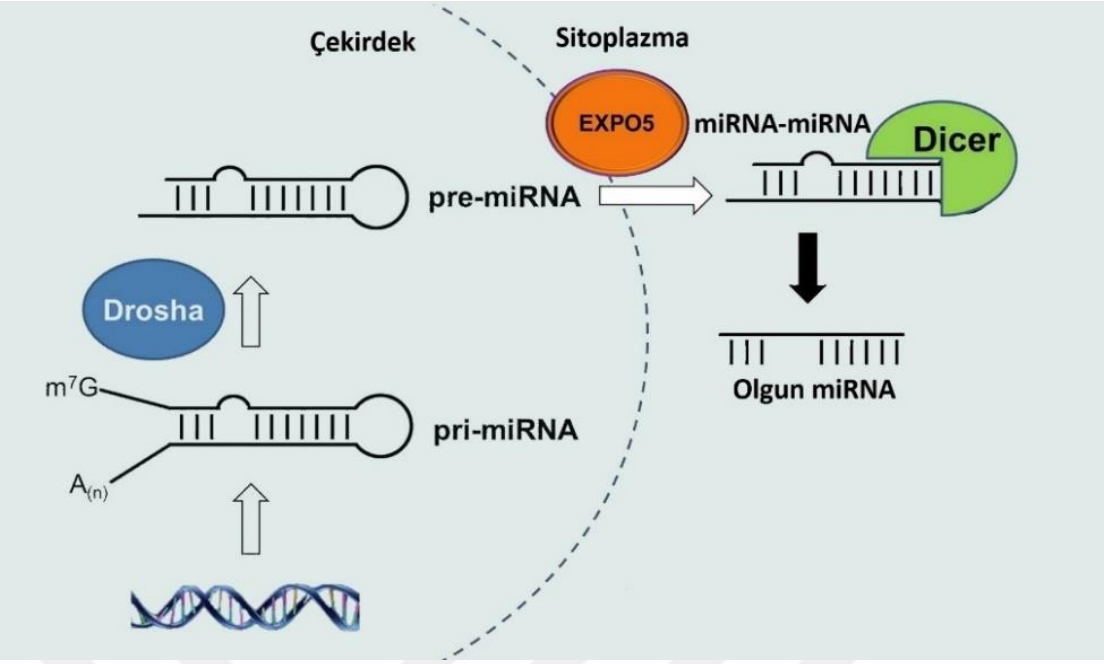
Associated RNA), tiRNA (tRNA-derived stress-induced RNA) ve pasRNA'nın (Promoter-associated short RNA) ise muhtemelen transkripsiyon düzenlenmesinde görevli oldukları düşünülmektedir [77]. Kısa kodlanmayan RNA'lar gelişim, farklılaşma, transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası gen susturma olaylarında etkilidirler. Kısa kodlanmayan RNA'ların protein kodlayan genleri düzenleme mekanizmaları değişmekle birlikte, doku spesifik olarak ifadeleri de değişmektedir. Protein kodlayan genler gibi kanserin aktivatörü veya inhibitörü olarak görev yapabildiği için kısa kodlanmayan RNA'lar, tümör ve normal hücrelerinde farklı ifade edilmektedir [76].

Çizelge 2.4 Kısa kodlanmayan RNA'ların boyut ve fonskiyonları [76],[77].

Türü	**Boyutu (baz çifti)**	**Fonksiyonu**
mikroRNA	19-24	mRNA hedefleme ve düzenleme
siRNA	21-22	Transpozon kontrolü
piRNA	26-31	Transpozon baskılanması ve DNA metilasyonu
tiRNA	17-18	Transkripsiyon düzenlenmesi
snoRNA	60-300	rRNA modifikasyonu
TSSa-RNA	20-90	Transkripsiyon onarımı
PASR	22-200	Gen ifadesini düzenme

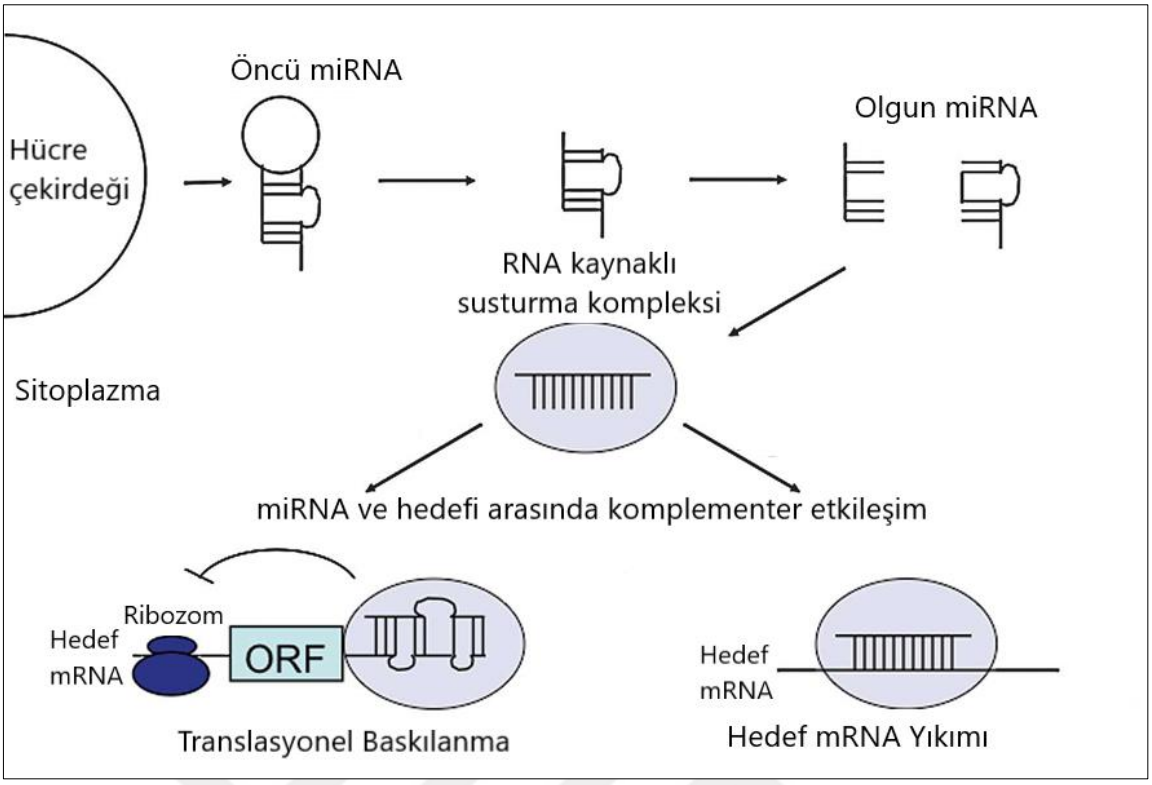
2.2.1.5 MikroRNA'lar

Kodlanmayan RNA'ların büyük bir alt sınıfı olarak tanımlanan 20-24 nükleotit uzunluğundaki mikroRNA'lar hedef mesajcı RNA'ların (mRNA) düzenlenmesini sağlamaktadır [78]. MikroRNA genleri RNA polimeraz II veya III ile birincil miRNA transkripti olan pri-mirna'lara dönüştürülür. Pri-miRNA, RNA-bağlayıcı protein DGCR8 ve RNAaz II Drosha tarafından pre-miRNA'ya dönüştürüldükten sonra Exportin 5/GTP/Ran taşıma kompleksi tarafından çekirdekten sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmaya ulaşan pre-miRNA, RNAaz III Dicer ve TRBP (The Human İmmunodeficiency Virus Transactivating Response RNA- Binding Protein) proteini aracılığıyla miRNA-miRNA çift sarmalına dönüştürülür. Çift sarmalın açılması sonucunda elde edilen miRNA ise hedefleri üzerinde baskılayıcı etki oluşturabilecek olgun miRNA'dır (Şekil 2.5) [79],[80],[81].



Şekil 2.5 MikroRNA biyogenezi [82].

İlk çalışmalar mikroRNA'ların genellikle hedef mRNA'larının 3'UTR bölgesinde bulunan miR düzenleyici element veya kanonik bölge olarak adlandırılan bölgelerine bağlanma gerçekleştirdiğini belirtmiştir [9],[83]. mRNA'nın mikroRNA tarafından translasyonel baskılanması veya yıkımı, mikroRNA'ların 5' ucunun 2.-7. pozisyondaki 6-8 nükleotit uzunluğunda bulunan "*çekirdek*" olarak adlandırılan bölgesine bağlanma sonucunda başlamaktadır [84]. Geliştirilen yeni nesil dizileme içeren deneysel yöntemler ve yeni biyoinformatik analizler sonucunda, mikroRNA'ların aslında hedef mRNA'larıyla farklı etkileşimlerde bulunabileceği gösterilmiştir. Öyle ki, mikroRNA'ların hedefleriyle tümüyle tamamlayıcı çekirdek eşleşmesi gerçekleştirmeyebileceği ve yalnızca hedef mRNA'nın 5' ucundan değil, 3' ve kodlanan diğer bölgeleriyle de etkileşime geçebileceği belirtilmiştir [85],[86]. Bir hedef mRNA'nın 3' uç bölgesiyle mikroRNA'nın eşleşmesi RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) vasıtasıyla gerçekleşir [6]. RISC mRNA baskılanmasında önemli bir rol alırken, AGO2 (Argonaute2) ve TRBP gibi proteinler mRNA yıkımını tetiklemektedir [87].



Şekil 2.6 MikroRNA çalışma mekanizması [88].

MikroRNA'ların mRNA üzerindeki düzenleyici mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamış olsa da süreci açıklayan olası yaklaşımlar mevcuttur. Bu yaklaşımlar, Cap-40S başlama baskılanması, 60S ribozomal birimle inhibisyon, uzama baskılanması, ribozom bırakılması, yeni oluşan proteinin translasyona eş zamanla bozunması, P-body'lerde tutunma, mRNA destabilizasyonu, RNA yıkımı, transkripsiyon inhibisyonu olarak sıralanabilir [13],[80]. Bu yaklaşımlardan en çok kabul görenleri translasyon inhibisyonu ve mRNA yıkımıdır (Şekil 2.6). Translasyon baskılanması eIF4A, eIF4E ve eIF4G (The eukaryotic initiation factor-4) alt birimlerinden oluşmuş eIF4F kompleksi aracılı olarak gerçekleştirilmektedir [89]. mRNA yıkımına sebep olan süreç ise AGO2 proteinin aktivitesine bağlı olarak değişmektedir. Bununla birlikte ekzonükleotik kesim ve deadenilasyon gibi mekanizmaların da mRNA yıkımında etkisinin olduğu belirtilmiştir [90]. mRNA düzenlenmesinin susturulma veya yıkımla sonuçlanmasının belirleyici faktörünün miRNA-mRNA eşleşme düzeyi olduğu belirtilmiştir. mRNA-miRNA nükleotit eşleşme düzeyi iyi olduğunda süreç, mRNA'nın AGO2 proteini aracılı yıkımıyla sonlanırken; düşük seviyede eşleşme translasyonun inhibisyonu ile sonuçlanmaktadır [90]. MikroRNA'ların doğrudan hedefleri ile arasındaki ilişki negatif düzenleme şeklinde

olsa da hedeflerinin baskılanması da farklı sonuçlar ortaya çıkarabilir. Bu doğrultuda son çalışmalar protein kompleksleri aracılı olarak mikroRNA'ların, gen ifadelerini arttırdığını da göstermiştir [91]. Bu durum genellikle gen ifadesini engelleyen bir faktörün mikroRNA aracılı baskılanması ile açıklanmaktadır.

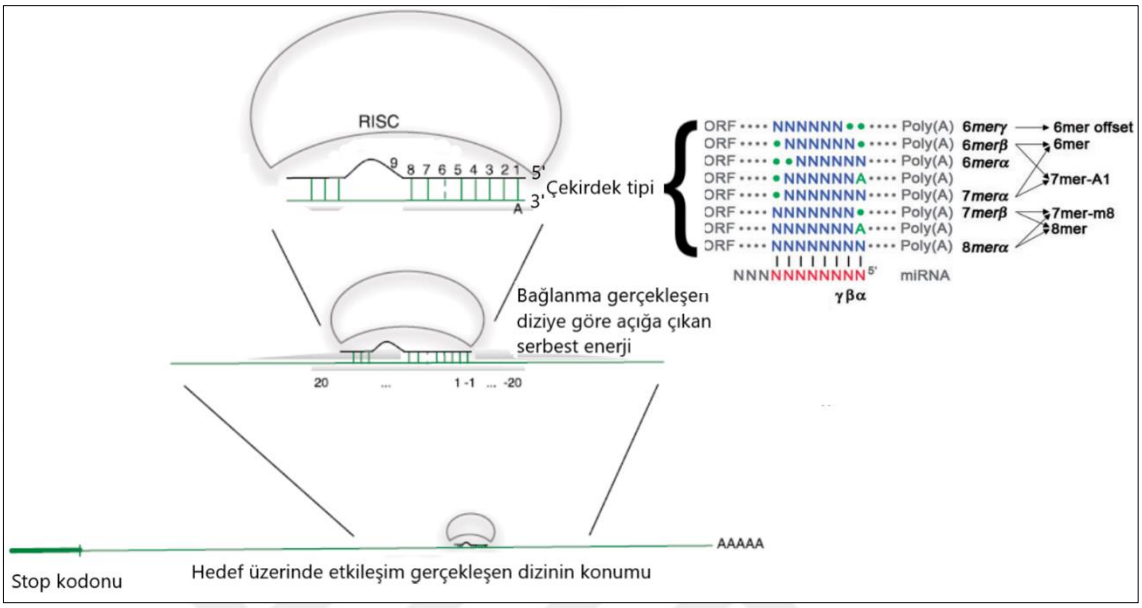
MikroRNA'nın Hedeflerini Düzenlemesinde Önemli Faktörler

MikroRNA'lar hedeflerini, "çekirdek" bölgesi olarak isimlendirilen bir dizi ile mRNA üzerindeki belirli bölgelere bağlanma gerçekleştirerek düzenlemektedir. Ancak mikroRNA'lar pek çok hedefe sahip olsalar da etkinlik düzeyleri bazı faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Yapılan çalışmalara göre mikroRNA aktivitesini belirleyen faktörler aşağıdaki gibidir:

- Hedef gen ifadesi veya konsantrasyonu
- MikroRNA ifadesi veya konsantrasyonu
- Çekirdek bölgesinin yapısı (nükleotit içeriği, tamamlayıcılık seviyesi gibi)
- Bağlanma Enerjisi
- Hedef üzerinde bağlanan bölgenin konumu

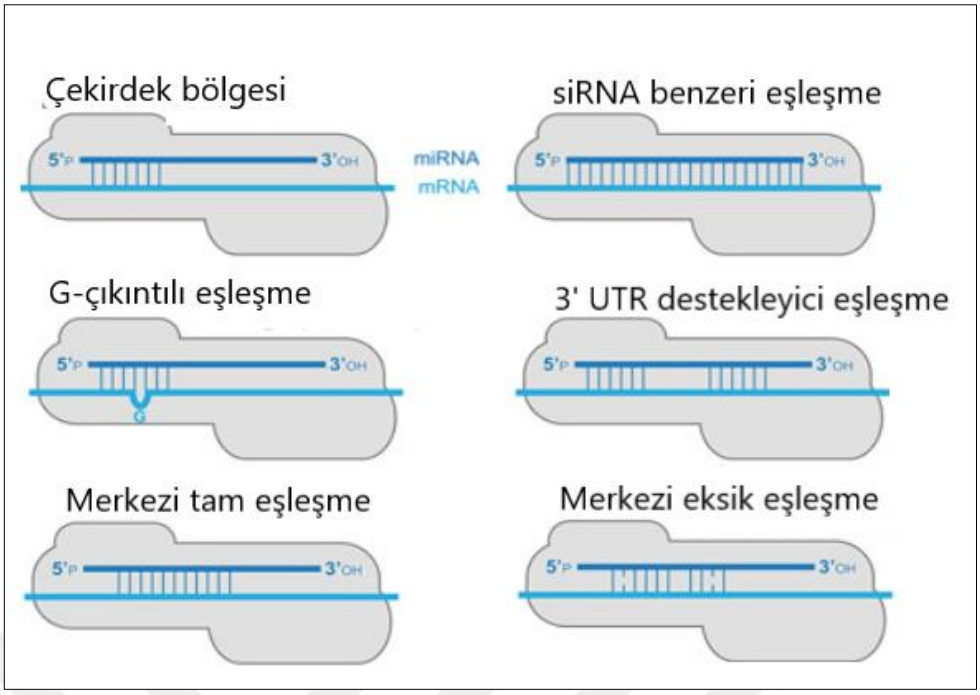
Bilindiği gibi mikroRNA'lar farklı tipte mRNA'ları hedefleyebilir, bunun yanında bir mRNA da farklı mikroRNA'ların hedefi olarak düzenlenebilmektedir. MikroRNA ve hedefleri arasındaki bu kompleks etkileşim sebebiyle bir mikroRNA'nın spesifik bir hedef üzerindeki baskılayıcı etkinliği başka bir hedefinin hücre içinde fazlaca bulunmasından dolayı inhibe edilebilir [92]. Bu durum "yarışmalı endojen RNA" (ceRNA, competing endogenous RNA) hipotezi olarak da nitelendirilir [93]. Yarışmalı endojen RNA hipotezi esasen, aynı mikroRNA tarafından hedeflenen RNA'lardan oluşan kompleks bir etkileşim düşünüldüğünde bu hedeflerden birinde gerçekleşen değişiklik sonucunda diğer tüm hedeflerde de doğru orantılı şekilde değişikliğin gözlenmesidir [93],[94]. Diğer bir deyişle bir mikroRNA tarafından hedeflenen mRNA'lardan herhangi birinin ifadesindeki artış diğerlerinin de ifadesinde artışa, azalış ise diğerlerinin de negatif düzenlenmesine sebep olur. Bu durumun temel sebebi mikroRNA:mRNA ifade oranındaki dengenin bozulmasıdır. Bir mikroRNA'nın hedefleriyle denge halinde olduğu düşünüldüğünde, herhangi bir sebeple hedef mRNA'larından birinin ifadesinde meydana gelen artış

sonrasında mikroRNA bu hedefi üzerinde daha fazla etkinlik oluşturma eğiliminde olur. Bunu takiben mikroRNA'nın diğer hedefleri üzerinde baskılayıcı etkinliği azalır ve diğer hedef mRNA'ların ifadesinde de artış gözlenir.



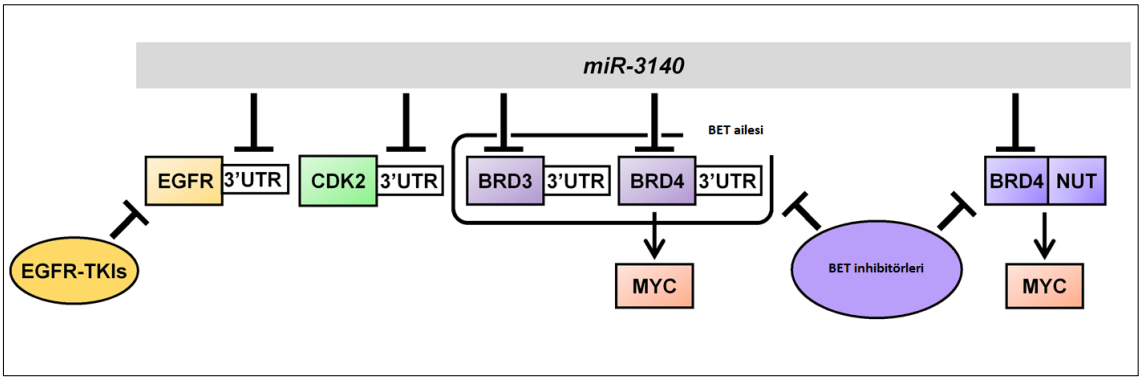
Şekil 2.7 MikroRNA'ların hedefleri üzerindeki aktivitesinde önemli olan faktörler [95],[96].

MikroRNA'nın hedefi üzerindeki etkinliğini belirleyici diğer bir faktör ise çekirdek bölgesinin yapısıdır. İlk çalışmalar, çekirdek bölgesini mikroRNA'nın 5' UTR bölgesinde, hedefe iyi şekilde tamamlayıcılık gösteren 6-8 nükleotit uzunluğundaki bölgeler olarak tanımlamıştır (Şekil 2.7) [9]. Sonradan gerçekleştirilen çalışmalar mikroRNA'ların hedefleriyle tamamen tamamlayıcı olmayan fonksiyonel bağlanmalar da sergileyebileceğini göstermiştir (Şekil 2.8) [85],[86],[97]. Öyle ki mikroRNA:hedef etkileşimlerinde yalnızca mikroRNA 5' UTR bölgesinden 2-8 nükleotit aralığında tamamen eşleşme dışında, farklı eşleşmeler gerçekleşebileceği ve mikroRNA hedeflerinin belirlenmesinde yaklaşımların esnetilmesi gerektiği belirtilmektedir [98]. Bu çalışmalara göre tamamen tamamlayıcı çekirdek etkileşimlerine kıyasla tam tamamlayıcılık göstermeyen bağlanmalar oldukça az düzenleyici etkiye sahiptir [99]. MikroRNA:hedef etkileşimini konu alan pek çok çalışmanın ortak sonucu olarak mikroRNA:hedef eşleşmesinin meydana geldiği baz sayısı ve içeriği de önem taşımaktadır [9],[10],[85],[86]. MikroRNA:hedef arasında gerçekleşebilecek baz eşleşmelerinin sayısı arttıkça baskılama etkinliği artmaktadır.



Şekil 2.8 MikroRNA:hedef etkileşimlerinde kanonik olmayan bağlanmalar [98].

MikroRNA ve hedefi arasındaki etkileşimde enerji de belirleyici bir faktördür. Biyolojik sistemlerin stabilitesinin anlaşılmasında önemli bir parametre olan serbest enerjinin küçük olması artmış kararlılığın göstergesidir. MikroRNA ve hedefleri arasında gerçekleşen etkileşimde serbest enerji, çekirdek dizisinin içeriğine göre değişkenlik göstermekle birlikte, bağlanma sonucunda fazla enerjinin ortaya çıkması güçlü bir bağlanmanın sembolüdür (Şekil 2.7) [100]. MikroRNA:hedef eşleşmesinde ortaya çıkan enerji aktivitede önemlidir, ancak mikroRNA etkinliğinin temel belirleyici faktörü değildir [101]. Helwak vd. [85] , kimerik okumaya dayanan deneysel yöntemlerde elde ettikleri mikroRNA:hedef etkileşimlerinde enerjinin bağlanma gücünü ifade edebileceğini ancak hedef regülasyonuyla korelasyon göstermediğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte serbest enerjiyi mikroRNA'nın hedefe gösterdiği afinite olarak tanımlayan başka bir çalışma grubu ise yüksek afiniteli mikroRNA'ların daha iyi baskılayıcı profil sergilediğini, ancak enerjinin tek başına hedef düzenlenmesini belirlemede yeterli olmadığını belirtmiştir [102]. Doench vd. [103] ise serbest enerjinin hedef baskılama etkinliğinde önemli bir faktör olduğunu, belirli enerji değişimi aralıklarıyla yaklaşık olarak hedef baskılanma etkinliklerinin gruplandırılabileceğini belirtmiştir.



Şekil 2.9 MiR-3140'ın mRNA'ları farklı bölgelerden hedeflemesi [104].

MikroRNA'lara dair yapılan ilk çalışmalar hedeflerinin yalnızca 3' UTR uçlarıyla etkileşim vasıtasıyla baskılama etkinliği gösterdiğini belirtmiştir. Ancak sonraki çalışmalarda mikroRNA'ların hedeflerin kodlanan bölgeleriyle veya hedefin 5' UTR uçlarıyla bağlanma gerçekleştirebileceği belirtilmiştir [85],[86],[101]. Tonouchi vd. [104] MYC onkogeninin aktivasyonunu sağlayabilecek bir aday ajan geliştirmek üzere gerçekleştirdikleri çalışmada, miR-3140 aracılı olarak BET (Bromodomain and Extra-Terminal motif proteins) ailesinin üyelesi olan genlerin kodlanan bölgelerinden hedeflenme sağlayarak ifadelerinde azalma meydana getirilebileceğini belirtmişlerdir (Şekil 2.9). Bununla birlikte EGFR-TKI (Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitor) dirençli olan kanser tiplerinde de aynı mikroRNA'nın EGFR aracılı tedavi için 3' UTR hedeflemesi amacıyla kullanılabileceği belirtilmiştir. Moore vd. [86] yaptıkları çalışmada 3' UTR ve kodlanan bölgeler dışında intron bölgeleriyle dahi mikroRNA etkileşimi gerçekleşebileceğini belirtmişlerdir. Ancak mikroRNA baskılayıcı etkinliğinin bağlanma bölgesinin hedef üzerindeki konumuna bağlı olduğunu, açık şekilde hedef 3' UTR bölgesinde gerçekleşen bağlanmaların daha iyi baskılama etkinliği oluşturduğunu göstermişlerdir. Bu bulguları destekleyen başka çalışmalar da bulunmaktadır. Helwak vd. tarafından [85] gerçekleştirilen çalışmada hedeflerin farklı bölgelerinden mikroRNA bağlanması gerçekleşebileceği belirtilmiştir. Ancak farklı bölgelerde gerçekleşen mikroRNA aktiviteleri kıyaslandığında, kodlanan bölge ve 5' UTR bölgelerinden gerçekleşen bağlanmalarda 3' UTR bölgesine göre çok farklı bir baskılama etkinliği sergilemediği belirtilmiştir.

MikroRNA Hedeflerinin Tespit Edilmesi

İnsan vücudunda binlerce mikroRNA ve gen etkileşimde olduğu için mikroRNA'ların hedeflerinin ve hedef dizilerinin belirlenmesi fonksiyonun anlaşılması açısından önemlidir. MikroRNA'ların hedeflerinin belirlenmesinde günümüze kadar sırasıyla algoritmalara dayanan tahmin metotları, düşük verimli deneysel verilerin analizi ve yüksek kalitede deneysel verilerin elde edilmesi yaklaşımları kullanılmıştır.

MikroRNA hedeflerinin belirlenmesi için geliştirilen ilk yöntemler algoritmalara dayalı tahmin metotlarıdır. MikroRNA hedeflerinin belirlenmesi için geliştirilen algoritmalar genellikle çekirdek eşleşmesi, serbest enerji, hedef bölge ulaşılabilirliği, konservasyon, hedef miktarı parametreleri dikkate alınarak geliştirilmiştir [100],[105] (Çizelge 2.5). Bu yöntemler hem zaman tasarrufu hem de maliyet açısından avantajlıdır.

MikroRNA'lar ve hedefleri arasındaki bağlanmaları tespit eden yeni deneysel yaklaşımların ortaya çıkardığı sonuçlara ve yeni geliştirilen hesapsal yöntemlere göre bu algoritmalar veya veri setlerinde de güncellemeler yapılmaktadır. Bununla birlikte veriler toplu halde indirme ve kullanılma için sunulmaktadır (Çizelge 2.6). Ancak halen bu algoritmaların yanlış pozitif sonuçları önemli bir sorun teşkil etmektedir.

MikroRNA hedef bölgelerinin belirlenmesi için deneysel yöntemlere de başvurulmuştur. Bunun için ilk yaklaşımlar tahmin araçları aracılığıyla elde edilen sonuçlara göre mikroRNA'nın hedefinin doğrulanması şeklindedir. Bunun için yapılan çalışmalarda mikroRNA'nın fonksiyonunun anlaşılması için mikroRNA transfeksiyonunu takiben protein veya gen ifadesindeki değişiklikler araştırılmıştır [106],[107]. Ancak canlı bir hücrede mikroRNA ve hedefler arasında çarpraz etkileşimin görülmesi bu çalışmaların kesin sonuç vermesini engellemektedir. Bir mikroRNA'da meydana gelen ifade değişikliğinin direkt hedeflerinin sonuçları ve hedefleri aracılığıyla dolaylı etkileşimlerinin sonuçları değişkenlik sergileyebilir [106].

Çizelge 2.5 MikroRNA hedeflerinin tahmin edilmesinde kullanılan araçlar.

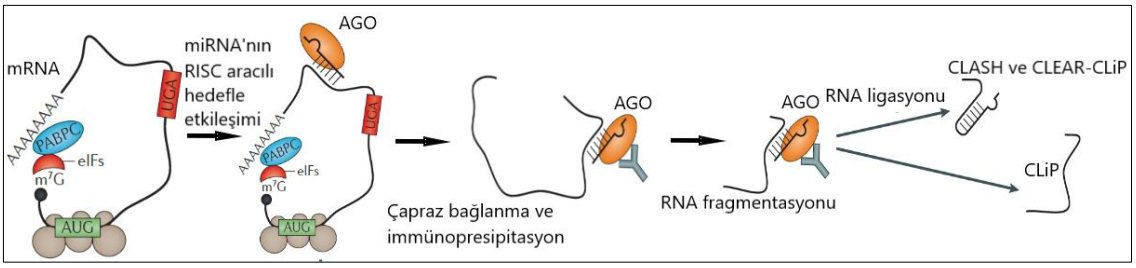
Adı	RNA22	TargetMiner	RNAhybrid	PITA	DIANA	TargetScan	miRanda	miRBase	miRTarBase
Deneysel veri	Düşük verimli deneysel yöntemler	Düşük verimli deneysel yöntemler	-	-	Düşük verimli ve yeni nesil dizileme içeren deneysel yöntemler	-	Düşük verimli ve yeni nesil dizileme içeren deneysel yöntemler	Düşük verimli deneysel yöntemler	Düşük verimli ve yeni nesil dizileme içeren deneysel yöntemler
Tahmin metodu	Çekirdek eşleşmesi, serbest enerji	Çekirdek eşleşmesi, serbest enerji, konservasyon, hedef bölge miktarı	Çekirdek eşleşmesi, serbest enerji, hedef bölge miktarı	Çekirdek eşleşmesi, serbest enerji, konservasyon, hedef bölge miktarı	Çekirdek eşleşmesi, serbest enerji, konservasyon, hedef bölge miktarı	Çekirdek eşleşmesi ve konservasyon	Çekirdek eşleşmesi, serbest enerji ve konservasyon	Deneysel veri tabanlı konservasyon ve çekirdek eşleşmesi	Çekirdek eşleşmesi, serbest enerji
URL	https://cm.jefferson.edu/rna22/	https://www.isical.ac.in/~bioinfo_miu/TargetMiner.html	https://bioserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid/	https://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html	http://diana.imis.athena-innovation.gr/	http://www.targetscan.org/vert_72/	www.microrna.org/microrna/	http://www.mirbase.org/	http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/
Kaynaklar	[118]	[117]	[116]	[115]	[113],[114]	[112]	[96]	[110],[111]	[108],[109]

Çizelge 2.6 MikroRNA hedeflerine dair veri setleri

Adı	miRWalk	doRiNA	miRDB	HMDD	starBase	miRecords
Yararlandığı araçlar	DIANA, miRanda, mirBridge, miRDB, miRmap, miRNAMap, doRiNA ,PicTar, PITA, RNA22, RNAhybrid, Targetscan	TargetScan, PicTar	miRBase	miR2Disease, miRTarBase, TarBase	TargetScan, miRanda, Pictar2, PITA, RNA22	DIANA, MicroInspector, miRanda, MirTarget2, NBmiRTar, PicTar, PITA, RNA22, RNAhybrid, TargetScan
İçeriği	Tahmin ve deneysel olarak onaylanmış mikroRNA:hedef etkileşimleri	Tahmin ve deneysel olarak onaylanmış mikroRNA:hedef etkileşimleri	Tahmin ve deneysel olarak onaylanmış mikroRNA:hedef etkileşimleri	Deneysel olarak onaylanmış mikroRNA hedefleri ve ilişkili olduğu hastalıklar	Deneysel olarak onaylanmış mikroRNA:hedef etkileşimleri, mikroRNA hastalık ilişkileri, mikroRNA:RNA etkileşimleri	Tahmin ve deneysel olarak onaylanmış mikroRNA:hedef etkileşimleri
URL	http://zmf.umm.uniheidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/	https://dorina.mdc-berlin.de/	http://mirdb.org/	http://www.cuilab.cn/hmdd	http://starbase.sysu.edu.cn/	http://c1.accurascience.com/miRecords/doc.php
Kaynaklar	[125]	[124]	[123]	[122]	[120],[121]	[119]

MikroRNA hedef dizilerinin belirlenmesinde biyokimyasal yaklaşımlar da geliştirilmiştir. Biyokimyasal uygulamalar mikroRNA'nın tüm genomdaki hedeflerinin kesin bağlama dizilerinin elde edilmesini sağlar. Bu bilgiler ise mRNA'nın çekirdek eşleşmesi, konservasyonu ve yapısının tespiti için kullanılmaktadır [126]. Bu amaçla geliştirilen çarpraz bağlanma ve immünopresipitasyona dayanan CLiP, PAR-CLiP, HITS-CLiP yöntemleri AGO proteine bağlanmış olan nükleotit yapılarının elde edilmesini sağlamaktadır [101],[127],[128]. Bu eşleştirmeler tanımlandıktan sonra ise biyoinformatik analizler gerekleştirilerek bağlanmanın yapısal özellikleri belirlenir. Bu yöntemlerden elde edilen sonuçlarda, AGO proteininin bağlandığı konuma 2-32 nükleotit yakınlığındaki bağlanmalar fonksiyonel olarak kabul edilirken; 32 nükleotitten daha uzak olanlar ise işlevsiz kabul edilmektedir. Bununla birlikte yalnızca kanonik mikroRNA:hedef eşleşmesi olduğu varsayılarak diziler işlenmektedir [129]. Ancak mikroRNA'ların farklı etkileşimler sergileyebilmesi sebebiyle bu yöntemler de kısıtlı kalmaktadır.

MikroRNA ve hedef etkileşimlerinin çok farklı şekillerde gerçekleşebileceğinin anlaşılması üzerine ligasyona dayanan, hedef ve mikroRNA'nın birlikte okunmasını sağlayan yöntemler de geliştirilmiştir [85],[86]. Temel olarak bu (CLASH ve CLEAR-CLiP) yöntemler AGO ilişkili RNA komplekslerinin saflaştırılması sonrasında, RNA dublekslerinin tek bir dizi olarak elde edilmesini sağlayan ligasyon basamağını içermektedir. DNA kütüphanesinin oluşturulmasından sonra ise dizileme gerçekleştirilir ve biyoinformatik analizler sonucunda kesin çekirdek bölgeleri elde edilebilmektedir [86],[130],[131].



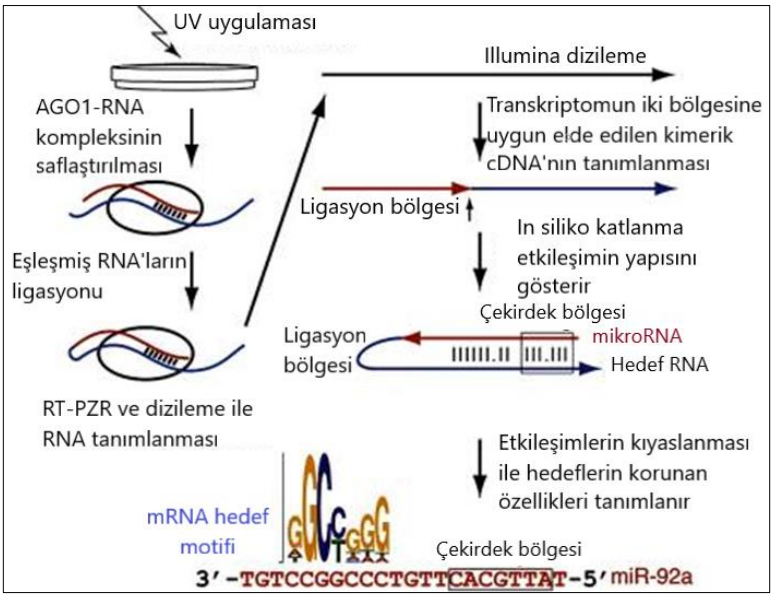
Şekil 2.10 MikroRNA hedef tespitinde yeni nesil dizilemeye dayanan yöntemlerin genel basamakları [84].

Yeni nesil dizilemeye dayanan yöntemlerle mikroRNA hedeflerinin belirlenmesinde genel süreçleri benzer olan yaklaşımlar kullanılmaktadır. Şekil 2.10'da gösterildiği gibi

mikroRNA hedeflerinin tespit edilmesinde mikroRNA-mRNA hibritlerinin oluşumu ile elde edilen kimerik yapıların (CLASH ve CLEAR-CLiP) veya yalnızca AGO ilişkili mikroRNA'nın dizilenmesini sağlayan (CLiP metotları) yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemlerden yalnızca mikroRNA dizisinin elde edilenlerinde çekirdek bölgesi mikroRNA'nın 5' UTR ucundan 2-8 nükleotidi olarak tanımlanmaktadır. Ancak mikroRNA ve hedefinin ligasyonla elde edilen kimerik yapısının dizilenmesine dayanan yöntemlerde mikroRNA ve hedef arasında eşleşme gerçekleşen tüm nükleotitler tanımlanabilmektedir. Kimerik okumaya dayanan yöntemler hücre ortamında kanonik olmayan mikroRNA:hedef etkileşimlerinin belirlenebilmesi açısından avantajlıdır.

CLASH

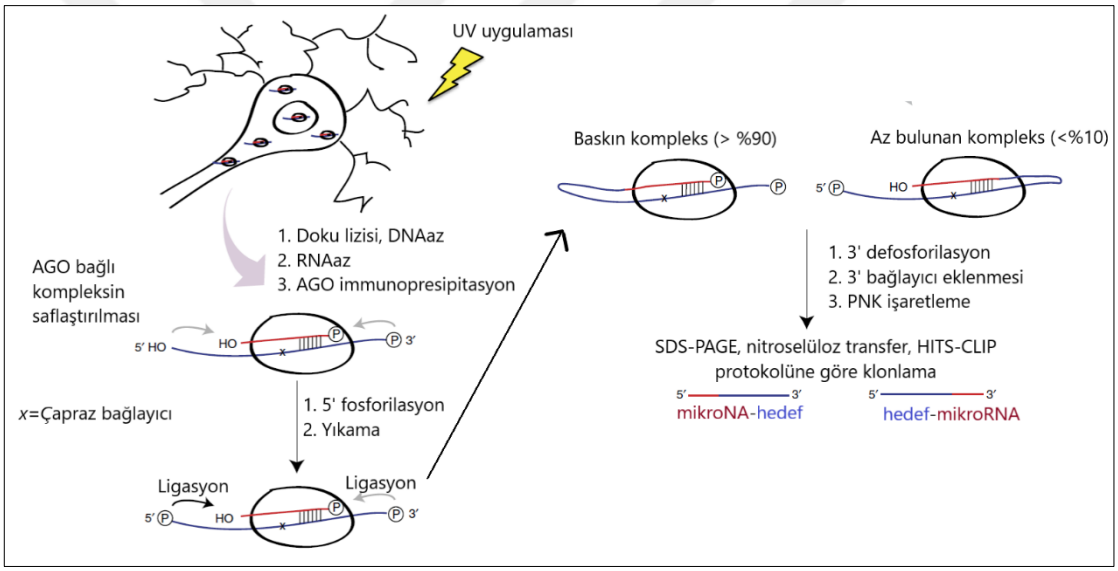
MiRNA:hedef RNA etkileşiminin deneysel olarak tanımlanması için geliştirilen CLASH metodu çarpraz bağlanma, ligasyon ve hibritlerin dizilenmesi anlamına gelmektedir. Yöntemin temelinde canlı hücrede bir araya gelmiş olan UV-stabilize edilmiş AGO-RNA kompleksinin saflaştırılması, sonrasında, AGO ilişkili RNA-RNA dublekslerinden kimerik (mikroRNA:hedef mRNA hibriti) RNA'ların oluşumu için ligasyon basamağı bulunmaktadır. cDNA sentezini takiben DNA kütüphanesi oluşturulması ve yeni nesil dizileme, dizileme verilerinin biyoinformatik analiziyle etkileşimde olan RNA'ların net olarak kimerik okuma olarak tanımlanması gerçekleştirilir (Şekil 2.11). Bu metotla RNA bağlayıcı protein ile bağlanmış çoğu RNA dubleksleri elde edilebilmektedir [85],[130].



Şekil 2.11 CLASH yöntemiyle mikroRNA:hedef tanımlanmasının süreci [85].

CLEAR-CLiP

CLEAR-CLiP yöntemi endojen AGO bağlı RNA'ların kovalent ligasyonu-Çarpraz bağlanma ve immünupresipitasyon metodu olarak tanımlanmaktadır. CLEAR-CLiP yönteminde AGO-hedef etkileşim kompleksinin *in vivo* çarpraz bağlanması UV ışıması le gerçekleştirilmektedir. Sonrasında izole edilen hücreler yıkıma uğratılır ve çarpraz bağlanma gerçekleştirmiş olan kompleksler ayrıştırılır. Ayrıştırma işleminden sonra ise RNA uçları mikroRNA:hedef ligasyonlarının kolaylaştırmak için modifiye edilir ve RNA ligaz muamelesine tabii tutulur. Böylece mikroRNA-mRNA kimerik yapıları elde edilir. SDS-PAGE'de tespit ve ayrıştırma işlemi gerçekleştirildikten sonra dizileme işlemi için Adaptörler eklenir. Bu işlemden sonra yeni nesil dizileme cihazlarıyla dizileme gerçekleştirilir (Şekil 2.12) [86].



Şekil 2.12 CLEAR-CLiP ile mikroRNA:hedef tanımlanmasının aşamaları [86].

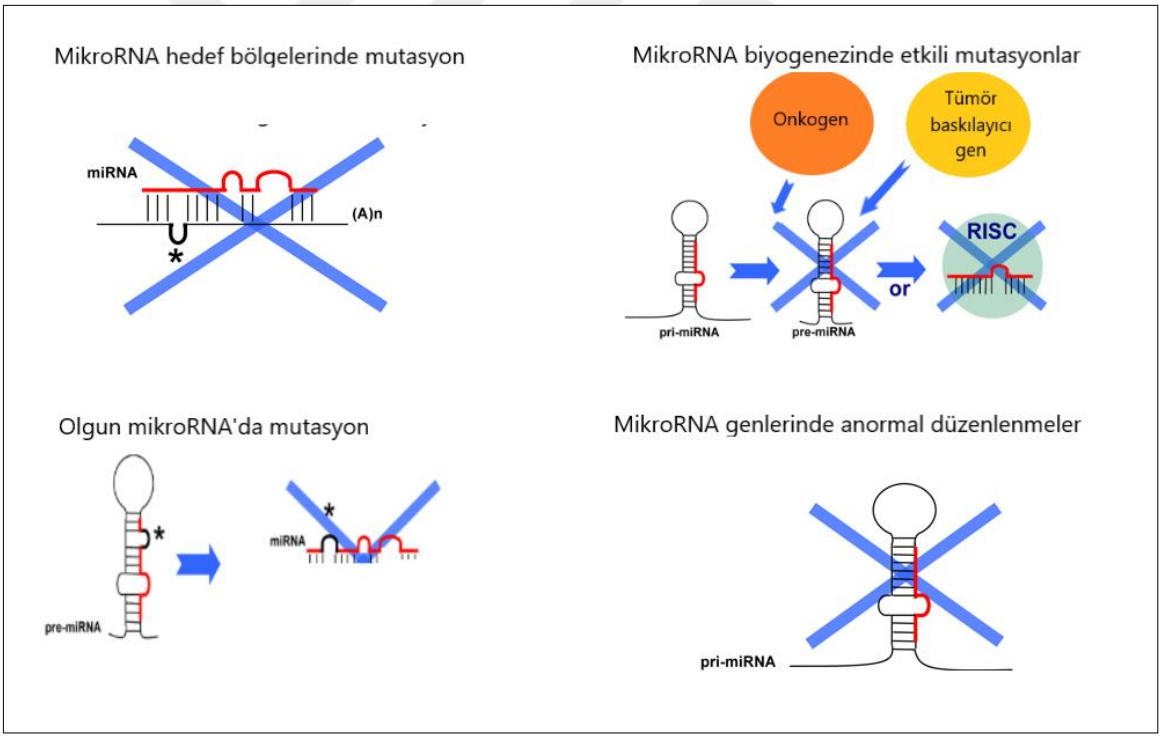
2.2.2 Kanserde MikroRNA'nın Düzenleyici Etkinliğinde Anormallikler ve Nedenleri

MikroRNA'nın kanserde pek çok fonksiyon için önemli genleri düzenlediğinin anlaşılmasıyla birlikte, tümör hücreleri ve normal hücreler arasında değişen düzenlenmeler anlaşılmaya çalışılmıştır. Kanser türlerinde mikroRNA'ların anormal düzenlemeleri çeşitli mekanizmalarla açıklanmaktadır (Şekil 2.13) [79],[132]:

- MikroRNA'ların transkripsiyonel kontrolü
- MikroRNA biyogenezindeki anormallikler

- Epigenetik değişiklikler
- MikroRNA genlerindeki amplifikasyonlar ve delesyonlar
- MikroRNA hedef bölgelerindeki mutasyonlar

MikroRNA kodlayan genler ve mikroRNA transkripsiyonunda ifadeyi kontrol edebilen genler mutasyona uğradığı zaman doğrudan ve dolaylı olarak mikroRNA anormal düzenlenmesi meydana gelebilmektedir [132]. Yapılan çalışmalarda mikroRNA dizilerindeki mutasyonların mikroRNA aracılı translasyonel baskılanmayı azalttığı ve bu durumun pri-miRNA'dan pre-miRNA sentez aşamasında mutasyon kaynaklı meydana gelen anormalliklerden kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Sun vd. [133] mikroRNA dizilerindeki tek nükleotit polimorfizmlerinin genellikle mikroRNA üretimini azaltma yönünde etkisi olduğunu, ancak ilginç şekilde pri-miR-510'da gerçekleşen G/A değişiminin miR-510'in alt tiplerinin üretimini arttırdığını belirtmişlerdir.

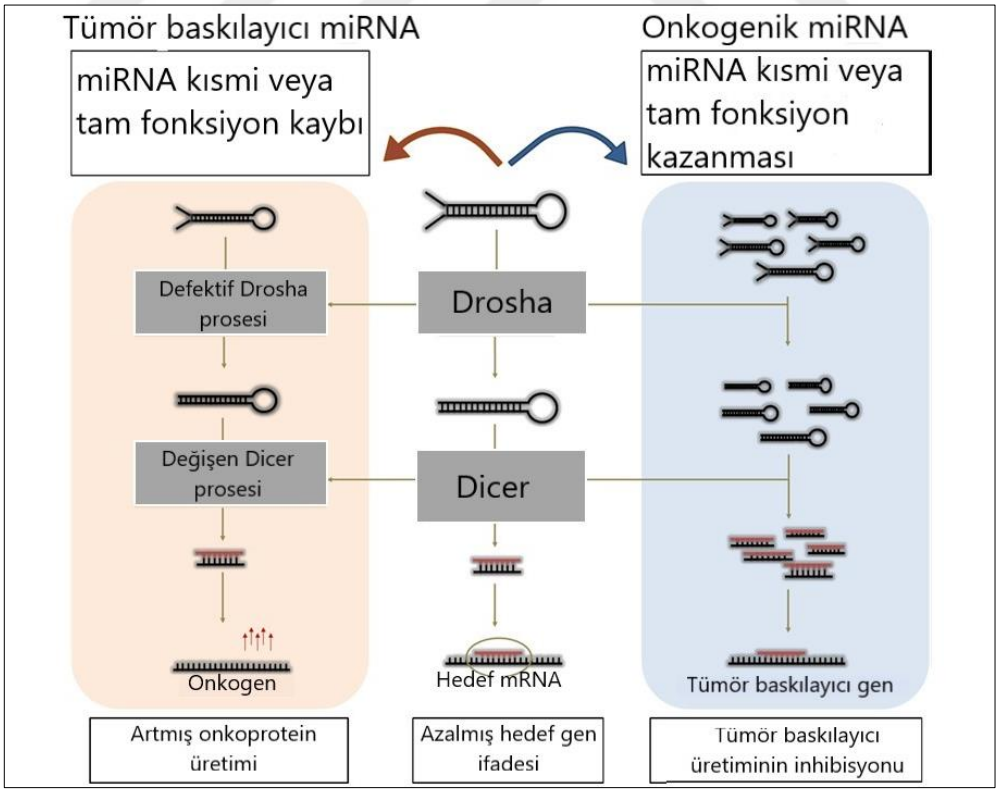


Şekil 2.13 Kanserde mikroRNA fonksiyonundaki anormalliklerin nedenleri [132].

MikroRNA promotör bölgesinde meydana gelen epigenetik değişiklikler TF bağlanmasını etkileyerek miRNA transkripsiyonunun anormal düzenlenmesine yol açabilir. Bununla birlikte onkogenler veya tümör baskılayıcılar da mikroRNA ifadesini transkripsiyonel seviyede etkileyebilmektedir. MYC onkogeninin antitümorogenik, antiproliferatif ve

apoptotik aktiviteleri denetleyen let-7, miR-15a, miR-26a ve miR-34 gibi mikroRNA'ları negatif yönde; metastaz ve anjiyogenezde kritik olan miR-9, miR-18a ve miR-19a/b'yi pozitif yönde düzenlediği belirtilmiştir [134]. Bunun tam tersine tümör baskılayıcılar ve onkogenler mikroRNA'ların hedefleri de olabilir. Örneğin ZEB1 onkogeni miR-144'ün hedefleri arasındadır. miR-144'ün ifadesine meydana gelen azalma, ZEB1 onkogeninin ifadesindeki artışa ve metastaz için kritik olan epitelyalden mezenkimale dönüşümün desteklenmesine sebep olmaktadır [135].

MikroRNA biyogenezinde meydana gelen anormallikler mikroRNA düzenleme mekanizmalarını doğrudan etkilemektedir. Kanserde en çok mutasyon görülen genlerden olan TP53'ün ürünü p53 (tümör baskılayıcı) Drosha kompleksi ile etkileşime geçerek farklı tümör baskılayıcı mikroRNA'ların biyogenezine katkıda bulunmaktadır [136]. Zang vd. [137] mutant p53 içeren meme kanser hücreleriyle yaptıkları çalışmada, mutasyon sonucunda p53'ün düzenlediği mikroRNA türlerinde değişiklik gözlenmiş, birlikte kanser için agresifliğe katkıda bulunan Hippo ve TGF-β üzerinde etkili olan mikroRNA'ların mutant p53 tarafından negatif düzenlendiğini ortaya koymuştur.



Şekil 2.14 MikroRNA'lardaki anormallikler sonucunda onkogenik ve tümör baskılayıcı özellikleri [138].

MİkroRNA'ların anormal düzenlenmeleri sonucunda kanser için kritik olan onkogenik ve tümör baskılayıcı hedef gen transkriptlerinin farklı şekilde düzenlenmesi mümkündür. Örneğin, tümör baskılayıcı gen hedefleri bulunan bir mikroRNA'nın biyosentezindeki bir anormallik sonucunda fazlaca fonksiyon kazanması veya ifade edilmesi durumunda hedef tümör baskılayıcı genin ifadesi azalabilir. Bunun tam tersi şekilde onkogenik özellikte hedefi bulunan bir mikroRNA'nın fonksiyon kaybetmesi onkogenin fazlaca ifadesine yol açmaktadır (Şekil 2.14).

2.3 Kanserde MikroRNA'ların Düzenleyici Fonksiyonu

MikroRNA'lar memeli hücrelerinde hücre bölünmesi, doku farklılaşması, metabolizma, sinyalizasyon ve immünite gibi fonksiyonların düzenlenmesinde görevlidir [139]. Buna bağlı olarak mikroRNA'ların fonksiyonlarında meydana gelen anormallikler pek çok hastalık için önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalar kanser hücrelerinde de mikroRNA'ların anormal düzenlenmeleri ile sıkça karşılaşıldığını göstermektedir [14],[140]. Öyle ki, mikroRNA'lar kanser başlangıcı, ilerlemesi, sağ kalım, farklılaşma veya metastaz gibi pek çok önemli süreçte etkili olabilmektedir. MikroRNA'ların düzenleyici fonksiyonu kompleks etkileşimlerin geniş şekilde analiz edilmesiyle anlaşılabilir. Bunun temel sebebi ise bir genin farklı mikroRNA'lar tarafından düzenlenebilmesi ve bir mikroRNA'nın birden fazla geni düzenleyebilmesidir [79],[80],[141].

Kanserde mikroRNA düzenlemelerine dair çalışmalarda spesifik mikroRNA'ların veya genlerin ele alındığı ve bütün mikroRNA ve genlerin birlikte incelendiği yaklaşımlar mevcuttur.

Zhu vd. [142] meme kanser hücrelerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarda tümör baskılayıcı özellik gösteren TPM1 geninin miR-21'in potansiyel hedefi olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar metastatik özellikteki meme kanser hücrelerinde yaptıkları çalışmada ise invazyon ve metastazda etkili olan PDCD4 ve maspin gen ürünlerinin miR-21 tarafından doğrudan hedeflendiğini göstermişlerdir [143].

Poliseno vd. [144] mikroRNA ve hedefleri arasındaki etkileşimi açıklamak için tümör baskılayıcı PTEN ile prostat kanseri üzerinde bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. PTENP1, PTEN 3' UTR bölgesiyle yüksek derecede homoloji içeren 5' bölgesine sahiptir. Böylece,

PTENP1 5’ bölgesiyle PTEN’i hedefleyen miR-17, miR-21, miR-214, miR-19 gibi mikroRNA’larla etkileşime girer ve PTEN transkriptlerinin mikroRNA’lar tarafından baskılanmasını engellemektedir. Bu durum mikroRNA hedeflerinin dolaylı yollardan nasıl etkileşim içerisinde olduğunu açıklamaktadır.

MikroRNA’ların kanser hücrelerindeki fonksiyonuna dair çalışmalar doku ve hücre tipi veya evresine göre değişkenlik göstermekle birlikte, önemi genel olarak kabul görmüş mikroRNA’lar da bulunmaktadır (Çizelge 2.7). Bu mikroRNA’ların ifade seviyesi, tümör baskılayıcı veya onkogenik özellikleri değişmekle birlikte kanser hücreleri için önemli olan hücresel fonksiyonlarda kritik olduğu bilinmektedir.

Çizelge 2.7 Kanser hücrelerinin kritik fonksiyonlarında mikroRNA’lar [7].

Kanser hücresinin fonksiyonu	**Etkili olan mikroRNA/mikroRNA’lar**
Büyüme sinyallerinin sağlanması	Let-7a,
Gelişim engelleyici sinyallere hassaslığın kaybedilmesi	miR-17-92, miR-96, miR-182, miR-183
Apoptozdan kaçış	miR-25, miR-34, miR-185
Sınırsız bölünme	miR-29, miR-30, miR-373, miR-372
Anjiyogenez	miR-18a, miR-27a, miR-26, miR-107, miR-210
İnvazyon ve metastaz	miR-10b, miR-31
Enerji metabolizmasının düzenlenmesi	miR-23a/b, miR-143, miR-378
İmmün gözetimden kaçış	miR-124

MikroRNA ve hedefleri arasındaki çarpraz etkileşimlerin de ortaya çıkmasıyla birlikte bireysel mikroRNA ve gen çalışmalarının yanında bütüncül yaklaşımlar da ortaya koyulmuştur. Günümüze kadar birden fazla mikroRNA’nın ve birden fazla hedef mRNA’sının etkileşimini omik bilgiler bazında biyoinformatik yaklaşımlar ile ele alan çalışmalar gerçekleştirilerek mikroRNA ve hedefleri arasındaki kompleks etkileşimlerin kanserdeki fonksiyonları anlaşılmaya çalışılmıştır.

Quitadamo vd. [145] yumurtalık kanserinde anlamlandırılabilir özellikleri kodlayan gen bölgelerinin ve mikroRNA’ların ilişkilerinin ağ analizlerini birleştirme çalışması yapmıştır. Kanser genom atlasından elde edilen mikroRNA, gen ve protein veri setleri kullanılarak

gen ve mikroRNA ifadeleri arasında ölçülebilir özellik gösteren bölgelerin (eQTL) analizi gerçekleştirilmiştir. MikroRNA ve gen ilişkilerinin anlaşılması için lineer regresyon ve çoklu test doğrulama modelleri uygulanmıştır. TarBase veri tabanı aracılığıyla mikroRNA farklı hedefleriyle ağ genişletmesi gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda mikroRNA'lar kanser ve yumurtalık kanseriyle olan ilişkisine göre gruplandırılmış ve genler ile ilişkisi açıklanmıştır.

Seo vd. [146] mikroRNA:gen ilişkisini açıklamak için mRNA ve protein ifadesinin birleştirilmiş analizini gerçekleştirmiştir. Kanser ilişkili mikroRNA'ların ilişki düzeylerinin belirlenmesi amacıyla farklı ifade edilen mRNA'lar kullanılarak, örneklerde ortak ifade edilen mRNA ve protein ifade verileri seçilmiş ve derecelendirme yapılmıştır. Yöntemde seçilen mikroRNA, protein ve mRNA'lar için korelasyon katsayıları belirlenmiş ve buna göre glioblastoma ile mikroRNA'ların ilişkileri gruplandırılmıştır. Bu gruplandırmaya dayanılarak miR-504 hasta sağ kalımıyla ilişkilendirilmiş ve çalışmanın deneysel olarak gerçekleştirilen basamağında tümör baskılayıcı olarak fonksiyon gösterdiği kanıtlanmıştır.

Van-Iterson vd. [147] tahmin araçlarının iyileştirilebilmesi için mRNA ve miRNA ifade profillerinin birleştirilmiş analizini gerçekleştirmiştir. Dizileme bilgisine, türler arasında korunan dizi bölgelerine veya mRNA:miRNA etkileşimindeki serbest enerjinin hesaplanmasına dayandırılarak yapılan hedef mRNA tahminlerine, mRNA ve miRNA ifade profillerinin eklenmesiyle, biyolojik olarak uygun hedeflerin saptanabileceğini ve yanlış pozitif tahminlerin azaltılabileceğini belirtmişlerdir. C2C12 fare miyoblast hücre hattından da deneysel olarak elde edilmiş veriler ile sonuçlar doğrulanmıştır. Araştırmanın sonuçları miRNA ve mRNA birleştirilmiş analizlerinin miRNA tahmini için kullanılan internet araçlarının daha anlamlı bir hale getirilmesinde önemli olduğunu göstermiştir.

Zhao vd. [148] mikroRNA ifadelerine ihtiyaç duymadan yalnızca gen ifadelerinden yola çıkarak kanser ilişkili mikroRNA'ları tanımlamak için hesapsal bir yöntem geliştirmişlerdir. Çalışmada tahmin yapan veri tabanlarından en az iki tanesinde aynı şekilde tahmin edilmiş olan gen:mikroRNA etkileşimleri seçilmiş ve deneysel olarak kanıtlanmış olan mikroRNA:gen etkileşimleriyle birleştirilmiştir. MikroRNA'ların

fonksiyonunu tek bir gene değil sinyal yolaklarında etkili olan genler topluluğuna dayandıran çalışmada, fonksiyon kaybetmiş olan sinyal yolakları ve gen topluluklarının birlikte analizi yapılmıştır. Analiz ile mikroRNA'ların dokuya spesifik olup olmadığı, genler ve kanser ile ilişkileri gösterilmiştir. Bununla birlikte kanser başlaması ve ilerlemesinde önemli olan onkogenik veya tümör baskılayıcı mikroRNA'ların sinyal yolakları ile ilişkisi de tanımlanmıştır. Ancak çalışmada birden fazla gen ve mikroRNA'nın etkileşimi durumunda yalnızca en önemli olan mikroRNA'nın ele alındığı ve tanımlanmış olan mikroRNA'ların beş yüz tanesi için yöntemin uygulandığı belirtilmiştir.

Zafari vd. [149] kanser ilişkili mikroRNA'ların tanımlanması için düzenleyici mikroRNA etkileşimleri üzerine çalışmıştır. Ağ yapısı analizi için, araştırmacılar 1049 kan örneğinden elde edilmiş verilerle, 12 önemli hücresel fonksiyon ve 77 mikroRNA arasında ilişki kurmuşlardır. Sonrasında, bu mikroRNA'lardan anahtar rol üstelenenlerin anlaşılması için en yüksek bağlantı sergileyenleri seçmişler ve bunun sonucunda ise 11 negatif ve 9 pozitif düzenlenmiş mikroRNA tanımlamışlardır. Aynı zamanda ise tüm örneklerde ve etkileşimlerde aynı düzenlenmeye sahip "korunmuş" olarak tanımlanan 8 mikroRNA tespit edilmiştir. Bu aşamadan sonra mikroRNA hedef genlerin de bu etkileşimlere dahil edilmesi için deneysel olarak kabul edilen ve tahmini mikroRNA hedeflerini içeren miRecords veri seti kullanılmıştır. Ağ yapısına diğer bir katman olarak ise hedef genlerin ilişkili olduğu sinyal yolakları eklenmiştir. Zafari vd. [149] örnek olarak kanser ilişkili sinyal yolaklarının bu ağ yapısı üzerindeki düzenlenmeleri ele almıştır. Elde ettikleri sonuçlara göre araştırmacılar anormal düzenlenmiş miRNA'ların 58 hedef geninin 25'inin (%43 oranda) en az bir kritik sinyal yolağını düzenlediği; bunun tersine "korunmuş" olarak nitelendirilen benzer şekilde düzenlenmiş mikroRNA'ların 93 hedef geninin yalnızca 17'sinin (%18 oranda) en az bir kritik sinyal yolağını düzenlediğini saptamışlardır.

Li vd. [150] insan kolon kanser hastalarına ait örneklerle gerçekleştirdikleri çalışmada kısmi en küçük kareler regresyon (PLSR) ve istatistiksel yöntemler kullanarak farklı ifade edilmiş mikroRNA ve mRNA birleştirilmiş analizini gerçekleştirmişlerdir. Bu analizle kabul edilebilir nitelikteki mikroRNA hedeflerini saptamışlar, mikroRNA:hedef etkileşim ağ yapılarını oluşturmuşlardır. Bununla birlikte sinyal yolağı analizi gerçekleştirerek mikroRNA ve hedef mRNA'ların fonksiyonlarını belirlemişlerdir. Araştırmacılar, negatif düzenlenmiş mikroRNA'lar ve yüksek seviyede ifade edilen hedeflerin önemli derecede

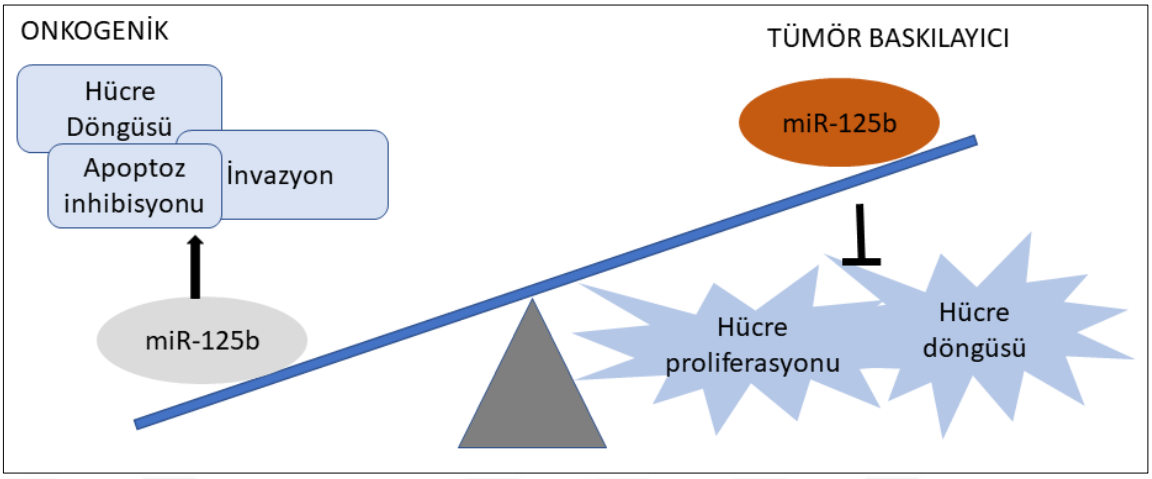
ilişkilendirilebileceğini belirtirken, hedef tahminlerinin TargetScan ve miRanda gibi hedef tahmin algoritmalarıyla kısmi de olsa uyumlu cevap verdiğini vurgulamışlardır. Geliştirdikleri bu teknikle mikroRNA:hedef etkileşimlerinin belirlenmesi ve fonksiyonel sonuçlarının anlaşılmasının kolaylaşacağını beirtmişlerdir.

Aure vd. [151] gerçekleştirdiği çalışmada meme kanseri ile ilişkili olan proteinlerin ve mikroRNA'ların karşılaştırmalı ifade analizi yapılmıştır. 283 meme kanser hastasının genom-boyu mikroRNA ve mRNA ifade profilleri incelenmiş ve modelleme yapılarak birbirleriyle olan ilişkileri tanımlanmıştır. Çalışmada protein ifadesininin etkili bir şekilde baskılanmasını sağlayan veya protein bozulmasını tetikleyen diğer ek faktörler yok sayılarak mRNA ve protein ifadesi arasındaki bağlantı açıklanmaya çalışılmıştır. Gen ifadeleri üzerinde hem tek bir mikroRNA'nın, diğer mikroRNA'lar yok sayılarak, hem de birden fazla mikroRNA'nın etkisinin anlaşılması için iki farklı model oluşturulmuştur. MikroRNA ve protein ifadesi arasında hem negatif hem pozitif ilişki bulunmuştur. Pozitif ilişkinin protein üzerinde baskılayıcı bir faktörün negatif düzenlenmesiyle açıklanabileceği; negatif ilişkinin ise doğrudan mikroRNA hedef mRNA ilişkisiyle bağlantılı olabileceği belirtilmiştir. Elde edilen sonuçlar daha önce belirlenmiş olan mikroRNA:protein etkileşimlerinin ve yeni mikroRNA hedef adaylarının tahminini sağlamıştır.

2.3.1 MikroRNA'ların Onkogenik ve Tümör Baskılayıcı Fonksiyonu

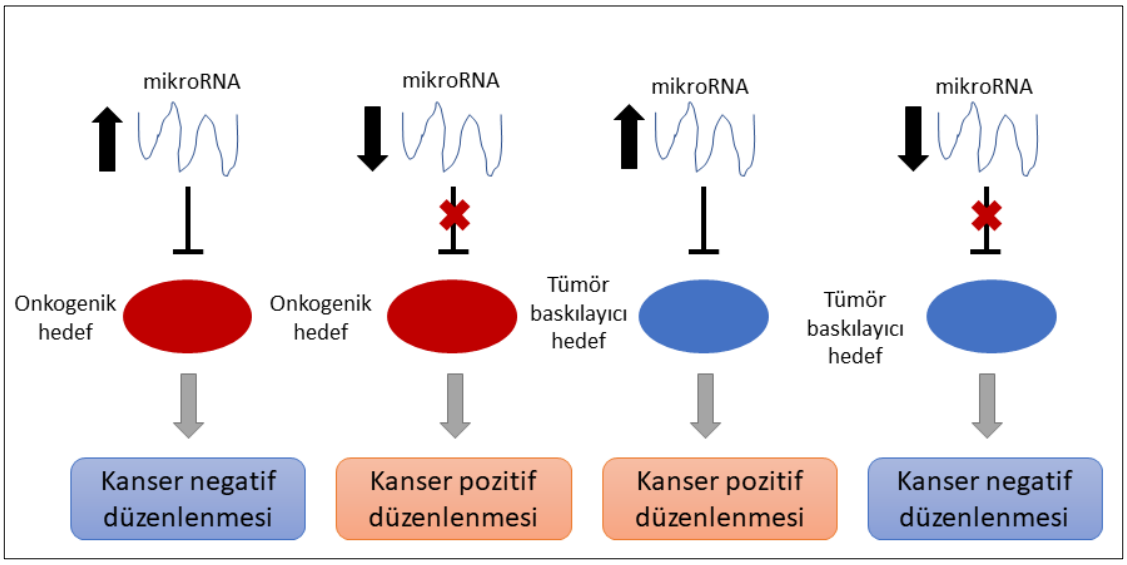
MikroRNA'ların hedeflediği mRNA'ların fonksiyonuna göre hücre içerisindeki işlevi değişkenlik gösterebilmektedir. MikroRNA'lar hücrelerde tümör baskılayıcı sinyalleri inhibe ederek onkogenik, onkogenik özellikteki hedefleri inhibe ederek ise tümör baskılayıcı özellik gösterirler. Aynı zamanda mikroRNA'ların dokuya özel şekilde fonksiyonu da değişebilmektedir. Bu duruma en belirgin örneklerden biri olan miR-155'in lenfomada onkogenik özellik sergilemesinin tersine melanoma'da SK1 geninin baskılanması ve yumurtalık kanserinde ise CLDN1 geninin hedeflenmesi yoluyla tümör baskılayıcı aktivite gösterdiği belirtilmiştir [152]. Buna benzer şekilde miR-125b'nin kanserin tipine ve hücresel içeriğine bağlı olarak farklı fonksiyonlar sergileyebileceği belirtilmiştir. miR-125b prostat, glioblastoma, nöroblastoma ve tiroid kanserlerinde düşük seviyede ifade edilip onkogenik özellik sergilerken; yumurtalık ve meme

kanserlerinde yüksek seviyede ifade edilir ve tümör baskılayıcı özellik göstermektedir (Şekil 2.15) [153], [154].



Şekil 2.15 MiR-125b'nin farklı kanser türlerinde düzenlenmesi [153].

Bu durum esasen mikroRNA'ların tümör dokusundaki ifade profillerine ve hedeflerine dayanmaktadır. MikroRNA'ların yapısal özelliklerinde bir değişiklik (mutasyon gibi) meydana gelmediğinde hedefleri değişmemekte; ancak doku spesifik olarak ifadelerinin değişmesi kanser için anlamını değiştirmektedir. Bu durumda mikroRNA'ların ve hedeflerinin kanserde düzenlenmesi farklı şekillerde gerçekleşebilir (Şekil 2.16).



Şekil 2.16 Kanserde mikroRNA'ların ifadelerine bağlı olarak düzenleyici aktivitesindeki değişiklikler.

2.4 Meme Kanseri ve MikroRNA'lar

Dünya genelinde kadınlarda tahmini %30 oranıyla en fazla tanı konulan kanser türü olan meme kanseri, kanser sebepli ölümler arasında ise ikinci sırada yer almaktadır [46]. Bu sebeple meme kanserinin gelişimi, türleri, moleküler düzenlenmeleri, moleküler düzenlenmelerinin altında yatan faktörler, tanısı ve tedavisi konusunda pek çok çalışma bulunmaktadır. Meme kanserine dair çalışmalarda farklı verilerin sunulmasıyla bu verilerin birlikte analiz edilerek anlamlandırılması mümkün olmaktadır. Bu tez çalışmasında hem en sık karşılaşılan kanser türlerinden olması hem de farklı veri setlerinin sunulması sebebiyle meme kanseri ele alınmıştır. Bu sebeple bu bölümde meme kanserindeki kritik fonksiyonların mikroRNA'lar ile ilişkisi açıklanmıştır.

Meme kanserinin gelişim ve ilerleme aşamaları diğer kanser türleriyle aynı süreci paylaşmakla birlikte bu süreçlerde etkili olan fonksiyonel durumlar farklılık gösterebilmektedir. Bununla birlikte, meme kanseri farklı alttipleri (luminal A, luminal B, bazal benzeri, HER2+ ve normal benzeri) içermekte ve bu alttiplerin moleküler düzenlenmelerinde de farklılıklar gözlenmektedir. Yapılan ilk çalışamalar, meme kanser ve sağlıklı doku arasında mikroRNA ifadeleri açısında farklılıkların ortaya koyulmasıyla gerçekleştirilmiştir [155],[156]. Blenkiron vd. [157] gerçekleştirdikleri çalışmada meme kanseri alttiplerinin mikroRNA ifade profillerinin gruplandırılmasıyla belirlenebileceğini saptamış ve bunun klinik olarak kullanılımının önemini vurgulamıştır. Buna benzer şekilde Baruah ve Sharma [158] yaptıkları çalışmada mikroRNA ve hedeflerinin ifadelerinin analizini gerçekleştirerek alttip spesifik veya ortak ifade edilen mikroRNA'ları belirlemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre meme kanseri alttiplerinde mikroRNA düzenlenmeleri Çizelge 2.8'de sunulmuştur. Çalışma sonucunda alttip belirlenmesinin sağlanabileceği ve alttipe spesifik olarak mikroRNA aracılı tedavi yöntemlerinin geliştirilebileceği belirtilmiştir [158]. Heneghan vd. [156] normal ve meme kanseri hastalarından elde ettikleri kan örneklerinden dolaşımda bulunan mikroRNA profillerinin analizini gerçekleştirdiklerinde diğer çalışmalarla uyumlu sonuçlarının yanı sıra invaziv ve metastatik özellikteki meme kanserinde mikroRNA ifadelerinin değişkenlik gösterdiğini bulmuşlardır.

Çizelge 2.8 Meme kanseri alttipine göre mikroRNA düzenlenmesi [158].

Meme kanseri alttipi	**Pozitif düzenlenmiş**	**Negatif düzenlenmiş**
Luminal A-benzeri	Let-7c, let-7f, miR-26, miR-126, miR-130, miR-100, miR-136, miR-146b, miR-99a, miR-190b, miR-191, miR-10a	miR-206, miR-15b, miR-103, miR-107
Luminal B-benzeri	miR15b, miR-103, miR-107, miR-342	miR-136, miR-146b, miR-99a, miR-100, miR-126, miR-130
ER- PR-/HER2+	miR-142-3p, miR-150	miR-125a/b
Üçlü negatif	miR-93, miR-135b, miR-155, miR-17-92, miR-18a/b	miR-29, miR-190b

2.4.1 Meme Kanserinde Tümör Baskılayıcı MikroRNA'lar

Meme kanserinde önemli fonksiyonlara sahip genleri hedefleyerek tümör baskılayıcı profil sergileyen mikroRNA'lar mevcuttur. Farklı çalışmalarda bir veya birden fazla fonksiyonel olayı düzenleyen mikroRNA'lar Çizelge 2.9'da sunulmuştur. Çizelge 2.9'da sunulan "*" ile işaretlenmiş mikroRNA'lar hücrede birden fazla fonksiyonda görevlidir.

Çizelge 2.9 Meme kanserinde tümör baskılayıcı fonksiyon gösteren mikroRNA'lar ve hedefleri [159],[160].

Tümör Baskılayıcı Fonksiyon	**MikroRNA ve hedefi**
Apoptozdan Kaçış	miR-34, miR-125*&HuR&CYP24, miR-145*&RTKN
Büyüme karşıtı sinyallere hassasiyetin kaybedilmesi ve ilaç direnci	miR-328&ABCG2, miR-326&MRP-1, let-7
Sınırsız çoğalma ve kök hücre özellikleri	miR-200&Bim1, let-7&HRAS/HMNGA2&IL-6

Çizelge 2.9 Meme kanserinde tümör baskılayıcı fonksiyon gösteren mikroRNA'lar ve hedefleri (Devamı)

İnvazyon, metastaz ve EMT	miR-31&RhoA/Integrin-α5/Radixin, miR-126, miR-145&MUC1, miR-146, miR-200&ZEB1/2, miR-205&LRP1, miR-206*, miR-335&SOX4, miR-661&MTA1, miR-7*&Pak1, miR-193*&uPa, miR-125*&HER2/3
Büyüme sinyallerinin sağlanması	miR-7&EGFR, miR-17&AIB1, miR-17/20&Cyclin D1, miR-30&Ubc9, miR-34*, miR-126*&IRS-1 miR-125*&HuR&CYP24, miR-145*&RTKN, miR-7*&Pak1, miR-193*&uPa, miR-125*&HER2/3

2.4.2 Meme Kanserinde Onkogenik MikroRNA'lar

Meme kanserinin başlaması ve ilerlemesini destekleyici yönde fonksiyona sahip mikroRNA'lar farklı çalışmalarda belirlenmiştir. Bu mikroRNA'ların hedefleri ve meme kanserinde düzenleyici fonksiyonları Çizelge 2.10'da gösterilmiştir. Çizelge 2.10'da "*" ile işaretlenmiş mikroRNA'lar hücrede birden fazla fonksiyonda görevlidir.

Çizelge 2.10 Meme kanserinde onkogenik fonksiyon gösteren mikroRNA'lar ve hedefleri [159],[160].

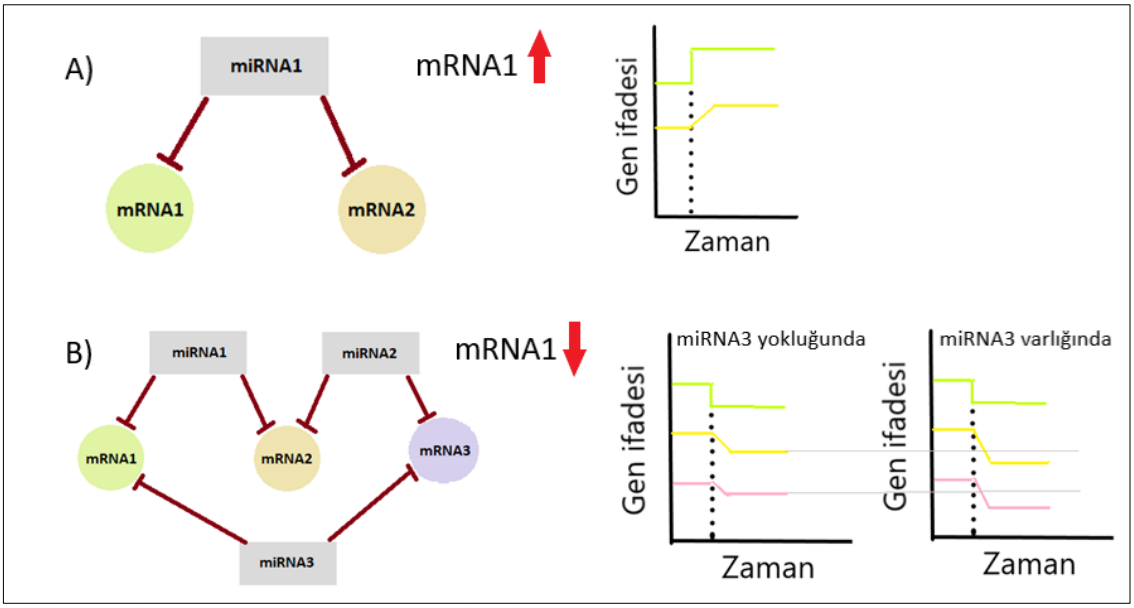
Onkogenik Fonksiyon	**MikroRNA ve hedefi**
Apoptozdan Kaçış	miR-21*&PDCD4, miR-21*&Bcl-2, miR-27*&FOXO1, miR-196*-&ANXA1
Büyüme karşıtı sinyallere hassasiyetin kaybedilmesi ve ilaç direnci	miR-21*&PDCD4, miR-221/222& ERα&p27, miR-27b&CYP1B1
Sınırsız çoğalma ve kök hücre özellikleri	miR-205

Çizelge 2.10 Meme kanserinde onkogenik fonksiyon gösteren mikroRNA'lar ve hedefleri (Devamı)

İnvazyon, metastaz ve EMT	miR-10b&HoxD10, miR-17, miR-21*&PDCD4&PTEN/TPM1/Maspin, miR-29a&TTP, miR-200&ZEB2, miR-204/510&PDEF, miR-373-520c&CD44, miR-27*&ST4
Büyüme sinyallerinin sağlanması	miR-21*&PDCD4, miR-27*&ZBTB10/Myt1, miR-106b&p21, miR-21*&Bcl-2, miR-27*&FOXO1, miR-196*-&ANXA1

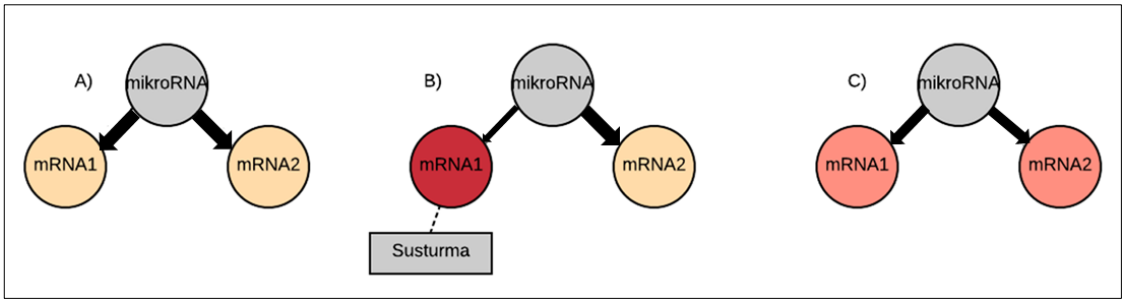
2.5 Yarışmalı Endojen RNA Hipotezi

Bir mikroRNA'nın birden fazla hedefinin olabileceğinin ve bir mRNA'nın birden fazla mikroRNA tarafından düzenlenebileceğinin anlaşılmasını takiben ortak hedefleyici mikroRNA'ların ve mikroRNA'lar tarafından ortak hedeflenen genlerin düzenlenmelerinin anlaşılması önemli bir konu haline gelmiştir. Bu durum yarışmalı endojen RNA (ceRNA, Competing endogenous RNA) hipotezi ile açıklanmaktadır . Bir mikroRNA'nın iki hedefinin olduğu düşünüldüğünde (Şekil 2.17 A) eğer mikroRNA hedeflerinden birinin ifadesinde artış meydana gelirse (mRNA1) mikroRNA baskılayıcı aktivitesinin artan gene doğru yönelmesi sonucunda, diğer hedef (mRNA2) üzerindeki baskılayıcı etkinlik azalmakta ve ifadesinde artış meydana gelmektedir. Bununla birlikte yaklaşım biraz daha kompleks olarak gerçekleşirse (Şekil 2.17 B) iki mikroRNA ve üç hedef mRNA arasındaki etkileşimde (miRNA3 yokluğunda) bir hedefin ifadesinde meydana gelen azalma, mikroRNA baskılayıcı aktivitelerinin diğer hedeflerine doğru yönelmesine ve diğer hedeflerin ifadesinin azalmasına sebep olmaktadır. Üç mikroRNA ve üç hedef arasında meydana gelen etkileşimde (miRNA3 varlığında) aynı genin ifadesinin aynı miktarda azaltılması (mRNA1) sonucunda ise sisteme dahil olan diğer mikroRNA sayesinde diğer hedeflerin (mRNA2 ve mRNA3) ifadelerindeki azalma daha fazla gözlenmektedir (Şekil 2.17 B). Diğer bir deyişle, etkileşimde olan mikroRNA miktarının artması kooperatif bir etki oluşturmaktadır.



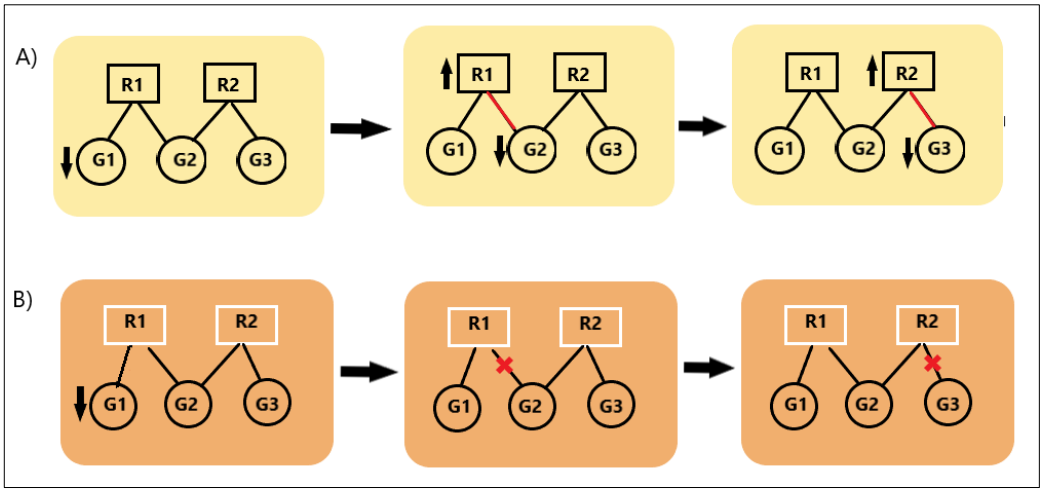
Şekil 2.17 Yarışmalı endojen RNA'ların düzenlenmesi[12].

Yarışmalı endojen RNA hipotezinin daha iyi şekilde anlaşılması için deneysel ve hesapsal yöntemler geliştirilmiştir. Ala vd. [161] PTEN ve VAPA genlerini ortak hedefleyen mikroRNA'larla yarışmalı endojen RNA modelini ve hedefler arasındaki çapraz etkileşimi kinetik modelle açıklamışlardır. Ortak mikroRNA'lardan ve iki mRNA'dan (PTEN ve VAPA transkriptleri) oluşmuş bir sistem ele alındığında, yaklaşık olarak aynı miktarda ifade edilen (Şekil 2.18 A) bu iki genden birinin susturulması durumunda (Şekil 2.18 B) oransal olarak diğer gene düşen mikroRNA ifadesi arttığı için diğer genin ifadesinde de azalma görülmektedir (Şekil 2.18 C). Bu durum ortak mikroRNA'lar tarafından doğrudan hedeflenen yarışmalı endojen RNA'ların konsantrasyonuna bağlı eşik benzeri davranışı olarak değerlendirilmiştir. Aynı şekilde Bosia vd. [162] mikroRNA hedefleri arasındaki dolaylı etkileşimi ele almışlardır. Aynı mikroRNA tarafından hedeflenen iki mRNA'dan fazla ifade edilenine oransal olarak düşen mikroRNA ifade miktarı fazladır. Bu durumda mikroRNA baskılayıcı etkinliğinin azalması sonucunda ifadesi az olan hedefin ifadesinde de artış gözlenir. Bununla birlikte hedeflerin yarışmalı davranışlarını tamamlayıcılık seviyesi (çekirdek tipi) ve hedef üzerinde bağlanmanın konumu gibi faktörlerin belirlediği belirtilmiştir.



Şekil 2.18 MikroRNA hedeflerinin yarışmalı davranışları ve düzenlenmeleri.

Yarışmalı endojen RNA'ların önemine dair bir başka çalışma da Park vd. [163] tarafından gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada meme sağlıklı ve tümör örneklerinden elde edilen gen ifadesi veri setleri ve TargetScanHuman aracından elde edilen mikroRNA:hedef eşleşmelerini içeren veri seti kullanılmıştır. Öncelikle mikroRNA:hedef gen ile tümör ve normal örnekleri için ağ yapıları oluşturulmuş, sonra ise tümör ve normal doku arasındaki yarışmalı endojen RNA düzenlenmeleri incelenmiştir. Normal bir dokuda hedef genlerin mikroRNA aracılı olarak etkileşim içerisinde olduğu düşünülmektedir. Şekil 2.19 A'da gösterildiği gibi normal dokuda hedef genlerden (Şekil üzerinde G ile gösterilmiştir.) birinin ifadesinde meydana gelen azalma sonucunda hedefleyici mikroRNA'ların (Şekil üzerinde R ile gösterilmiştir.) baskılama aktivitesi diğer hedefine doğru yönelim göstermektedir. Böylece bir hedefin ifadesindeki değişiklik, dolaylı yoldan etkileşimdeki diğer hedeflerin ifadesinde azalmaya sebep olmaktadır. Normal dokuda mikroRNA:hedef arasındaki bu etkileşimler, tümör dokusunda meydana gelen herhangi bir anormallik sonucunda değişirse (Şekil 2.19 B, R1:G2 etkileşiminin kaybedilmesi) hedef düzenlenmelerinde anormallikler meydana gelmektedir. Bu durumda ise hedef genlerin ürünlerinin hücredeki fonksiyonlarında aksaklıklar açığa çıkmaktadır. Elde edilen sonuçlarla, bu yarışmalı RNA'ların tümörlere özgü sinyallerle ile ilişkisi açıklanmıştır. Araştırmacılar cePathways olarak tanımladıkları bu yaklaşımla "aracı" yarışmalı RNA'ların özellikle tümör baskılayıcı genlerin düzenlenmesinde önemli olduğunu vurgulamıştır.



Şekil 2.19 Normal ve tümörlü dokularda yarışmalı endojen RNA'ların farklı düzenlenmesi [163].

Chiu vd [164] gerçekleştirdiği çalışmada ise shRNA'lar ile gerçekleştirilmiş gen susturma deneylerinin sonuçlarını içeren veri setleri ile meme ve prostat kanserinde yarışmalı RNA davranışlarını incelemişlerdir. Çalışmada etkileşimlerin kaybedilmemesi için geniş ağ yapılarında analizler gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak bir shRNA transfeksiyonu sonrasında yarışmalı RNA'ların etkileşimlerinin, bütün genlerin ifadesi açısından önemli bir etkisi olduğu gösterilmiştir.

MikroRNA'ların hedefleri üzerindeki kooperatif etkisi ve hedeflerin birbirleri arasındaki yarışmalı davranışları konusunda farklı çalşmalar gerçekleştirilmiştir. Ancak bu çalışmalarda genellikle bir veya birkaç mikroRNA ve bunların sınırlı sayıdaki hedefleri ele alınabilmiştir. Ancak hücrede mikroRNA'ların ortak hedefleri üzerindeki baskılayıcı aktivitelerinin ve hedeflerin mikroRNA'lara karşı yarışmalı davranışlarının anlaşılabilmesi için tüm etkileşimlerin ele alınması gerekmektedir.

2.6 MikroRNA ve Hedef Gen Etkileşiminin Modellenmesinde Yaklaşımlar

MikroRNA'ların gen ifadesini düzenlemedeki aktivitesi keşfedildikten sonra en önemli konulardan biri mikroRNA ve hedef etkileşimlerinin sonucunun tahmin edilmesi olmuştur. Bu bağlamda bir hücredeki mikroRNA'ların ve genlerin etkileşiminin modellenmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır.

Lou vd. [165] mikroRNA baskılama aktivitesinin temel iki mekanizması olarak kabul edilen translasyon inhibisyonu ve hedef bozunması mekanizmalarını, fare embriyonik

kök hücre farklılaşma sürecindeki ifade değişikliği verilerine dayandıran kinetik modelle açıklamaya çalışmışlardır. Çalışmada embriyonik kök hücrelerin farklılaşmasında önemli olan 10 hedef gen ve bunlarla TargetScan ve miRanda veri setlerine göre ilişkili olduğu düşünülen mikroRNA'lar kullanılmıştır. Bununla birlikte seçilen hedef genlerin protein ürünleri de mekanizmaların anlamlandırılması için kullanılmıştır. Translasyon inhibisyonu ve transkript bozunması mekanizmalarına uygun şekilde tanımlanan kimyasal denklemler sonucunda, hedef tahmin algoritmalarına kıyasla mikroRNA: hedef mRNA eşleşmelerinin daha kesin sonuçlarla ilişkilendirilebileceği gösterilmiştir.

MikroRNA'lar ve hedefleri arasındaki düzenlenme mekanizmalarının aydınlatılması için mikroRNA ve hedeflerinin etkileşimlerinde önemli olan faktörlerin ele alındığı modeller de geliştirilmeye çalışılmıştır.

Arvey vd. [166] hedef miktarının mikroRNA'ların aktivitesine olan etkisinin anlaşılmasına yönelik olarak bir yaklaşım geliştirmişlerdir. Bunun için iki hücre hattında 178 mikroRNA ve siRNA transfeksiyon verileri ile mikroRNA'nın hedef ifadesindeki miktar değişikliği sonrasında negatif düzenleme aktivitesinin nasıl değiştiği matematiksel olarak ifade edilmiştir. Araştırmacılar, miR-155 ve miR-128'in ayrı ayrı, aynı hücre hatlarında transfeksiyonunu gerçekleştirdiklerinde tahmini miR-155 hedeflerinin daha fazla negatif düzenlendiğini görmüşlerdir. Bunun hedef miktarının fazla olmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Diğer bir deney setinde ise en yüksek hedef miktarına sahip olan miR-16'ya göre en düşük hedef miktarına sahip olan miR-142-3p neredeyse iki katı kadar (%83 daha fazla) baskılama aktivitesi göstermiştir. Araştırmacılar mikroRNA ve hedefleri arasındaki bu negatif korelasyon sonucunda bozunacak olan toplam hedef mRNA transkriptlerinin miktarını matematiksel olarak Michealis-Menten kinetiği ile açıklamaya çalışmışlardır. Bu eşitlik ile toplam hedef miktarının bir fonksiyonu olarak, hedef negatif düzenlenmesindeki değişikliklerin logaritmik tahminin yapılmasının mümkün olabileceği belirtilmiştir.

MikroRNA hedef konsantrasyonunun mikroRNA aktivitesine olan etkisinin anlaşılması üzerine Denzler vd. tarafından [167] gerçekleştirilen deneysel çalışmada sitokiyometrik olarak mikroRNA:tahmini hedef etkileşimi açıklanmaya çalışılmıştır. Hepatositlerde miR-122 tahmini hedef bölge sayısının artmasıyla gerçekleştirilen çalışmada ancak belli bir

eşik değerinin üzerine çıkılması durumunda değişikliğin diğer miR-122 hedeflerinin de düzenlenmesine yol açacağı belirtilmiştir. Bu durum hedef miktarlarından birinde %5 olarak gerçekleştirilen artışın, önceden %30 oranında baskılanan bir başka hedefte baskılama seviyesinin %28.5'e düşmesi olarak açıklanmıştır. Diğer bir deyişle 0.30'luk baskılama aktivitesinde 0.05'lik bir düşüşe sebep olacağı ve bu küçük değişikliğin sebep olacağı biyolojik sonucun büyük anlamlar taşıyabileceği belirtilmiştir.

Denzler vd. [168] mikroRNA'ların aktivitesini yarışmalı RNA hedeflerinin çekirdek tipi, sayısı ve mikroRNA ifadesi ile açıklamaya çalışmışlardır. Bunun için TargetScan'de tahmin edilmiş olan mikroRNA'ya cevap derecelerine göre hedefler gruplandırılmıştır. Araştırmacılar öncelikle mikroRNA baskılama aktivitesinde önemli olabilecek faktörleri tanımlamışlardır. Bunun için hücrede mikroRNA ifadesini, hedef ifadesini değiştirmişlerdir. Ayrıca çekirdek tipinin de baskılama aktivitesinin düzenlenmesinde eşiğe olan etkisini tanımlamaya çalışmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre hedef bölge miktarının ve mikroRNA seviyesinin hedef baskılanmasına etkisini, bazı kabuller yaparak matematiksel olarak modellemişlerdir. Çalışma sonucunda hedeflerine oranla çok az sayıda bulunan mikroRNA'ların hedeflerinin yeniden düzenlenmesinde etkinliğinin belirlenmesinin zor olduğu, düşük, orta ve yüksek afinite sergileyen mikroRNA'larının bütünü ele alınmadan yarışmalı davranışların gerçeği yansıtamayacağı belirtilmiştir.

Afiniteye ve konsantrasyona bağlı olarak geliştirilen modelde Bosson vd. [10] hedef mRNA'ların yarışmalı davranışlarını ele almışlardır. Çalışmada farklı çekirdek tiplerinin gen ifadesi baskılama düzeyleri kıyaslandığında afinite ile mikroRNA aktivitesi arasında korelasyon görülmüştür. Afinite sıralamasını yalnızca kanonik çekirdek bağlanmaları için 8-mer>7-mer>6-mer olarak saptayan grup, hedefleri çekirdek tipine göre göre ayırarak, mikroRNA'nın üç tipte hedefi oduğunu kabul ederek modeli simüle etmişlerdir. Önceki çalışmalarda 7-mer çekirdek yapısı için elde edilmiş olan afinite değerini kısmi olarak oranlayıp çekirdek tipleri için afinite değerlerini elde etmişlerdir. Model sonucunda affinite kaynaklı çekirdek tiplerinde hiyerarşik bir düzen olduğu ve AGO proteinin 8-mer bölgelerinde yığılma gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca modelle hedef ifade profillerinin mikroRNA:hedef oranına bağlı olarak değiştiği bulunmuştur.

Breda vd. [11] bir mikroRNA hedef tahmin metodunun geliştirilmesini ve aynı mikroRNA tarafından hedeflenen mRNA'lar üzerinde oluşturulacak baskılama etkinliğinin derecelendirilmesini gerçekleştirmiştir. MikroRNA ve hedeflerinin belirlenmesi için geliştirilmiş olan CLiP ve CLASH deneysel verilerine dayanılarak sadece belli tipte çekirdek bölgelerine sahip hedefler için mikroRNA:hedef etkileşimlerinin modelleri oluşturulmuştur. Bu modeller nükleotit içeriğine göre elde edilen enerji miktarlarına bağlı olarak geliştirilmiştir. Yaklaşımlarının temelini, miRNA hedeflerinin kendi transkripsiyonel indüksiyonlarına eşik-lineer olarak verdikleri cevap ve hedef ekspresyonunun miRNA konsantrasyonuna duyarlılığı oluşturmuştur. Çalışmada MIRZA-G olarak adlandırılan bir algoritmayla kolayca hedef ve enerji tahmini yapılabildiği ve sonuçlarının deneysel verilerle örtüştüğü belirtilmiştir. Bununla birlikte tahmin edilen hedeflerden hangisinin daha çok etkileneceği skor olarak sunulmuştur. Yaptıkları çalışmada çoklu mikroRNA ve hedeflerin etkileşimlerinin anlaşılması için ağ yapılarına dayanan yaklaşımların daha verimli sonuçlar ortaya koyabileceğini belirtmişlerdir.

Figliuzzi vd. [169] kararlı halde bulunan sistemler tasarlamış ve çoklu mikroRNA ve hedefleri arasındaki etkileşimleri incelemişlerdir. Araştırmacılar kurdukları sistemlerde, mikroRNA'ların mRNA:mikroRNA kompleksinden sitozole geri verildiği (katalitik aktivite) veya bozunmaya uğradığı (sitokiyometrik aktivite) iki durumu ayrı ayrı kurgulamışlardır. Bu durum kararlı haldeki bir sistemde bir mRNA'da meydana gelen ifade değişikliği sonrasında dengelerin değişmesi ve yeni bir kararlı hale ulaşılması olarak tanımlanmıştır. Yarışmalı mRNA'ların düzenlenmesinde ana belirleyici faktörlerin serbest enerji ve mikroRNA baskılama mekanizmasının olduğunu, düzenlenmenin bir RNA'dan başlayarak tüm diğerlerini etkileyebileceğini belirtmişlerdir. Yapılan çalışmada araştırmacılar iyi şekilde tasarlanmış olan ağ yapıları ile tek mikroRNA içeren rastgele sistemlere oranla hedef mRNA'ların yarışmalı davranışlarının daha etkili şekilde çözümlenebileceğini öneri olarak sunmuşlardır.

MikroRNA ve hedeflerinin etkileşimlerinin karmaşık bir düzende olması sebebiyle ağ yapıları üzerinden mikroRNA ve hedef davranışlarının açıklanması konusunda da çalışmalar yapılmıştır.

Nitzan vd. [170] HEK293 insan hücre hattında gerçekleştirdikleri deneysel çalışma ve matematiksel model ile mikroRNA hedef etkileşimlerini açıklamaya çalışmışlardır. Bunun için öncelikle mikroRNA:mRNA hedef etkileşimlerini tanımlamak için CLASH metodunu kullanmışlar ve miR-92a inhibisyonuna dair bir çalışmanın GEO aracılığıyla verilerini elde etmişlerdir. Ağ yapılarının özelliklerinin anlaşılması için Cytoscape kullanan araştırmacılar mikroRNA:hedef bağlanma enerjilerini belli sınırlar içerisinde ele almıştır. Bununla birlikte mikroRNA:hedef etkileşimlerinde aynı türde olan düğümlerin birbirleri ile doğrudan etkileşimi olmayacak ancak diğer türdeki düğümler ile sağlayacak şekilde tanımlanmıştır (bipartite). Bu durum ağ yapısı üzerinde hedef mRNA'ların birbirleriyle doğrudan bağlanmaması, ancak mikroRNA'lar aracılı ile dolaylı bağlantı sağlaması olarak açıklanabilir. Aynı zamanda iki farklı türdeki düğüm miktarları arasında ters yönlü hareketler gözlendiği belirtilmiştir. Araştırmacılar mikroRNA ve hedefleri arasındaki bu etkileşimleri basit bir sistem üzerinden simüle etmişlerdir. Öyle ki bir mRNA'nın transkripsiyon hızında değişiklik yapılmasıyla mikroRNA aracılı olarak diğer mRNA'ların ifadesindeki değişiklik incelendiğinde değişiklik yapılan mRNA'dan ağ yapısı üzerinde uzaklaşıldıkça etkinin azaldığı belirtilmiştir. Bu durum için ise araştırmacılar aracı mikroRNA'ların ve dolaylı hedeflerin, değişikliğin yapıldığı hedefe olan uzaklıklarına göre gruplandırılmasının faydalı olabileceğini belirtmişlerdir.

Bosia vd. [162] bir mikroRNA:100 hedef mRNA ve bir mikroRNA:2 hedef mRNA olmak üzere iki ağ sistemi üzerinden matematiksel bir modelle yarışmalı hedef davranışlarını incelemişlerdir. Tasarladıkları sistemlerde mikroRNA:hedef etkileşimlerinin aynı kuvvette gerçekleştiği kabulünü yapmışlardır. Çalışmada mikroRNA:hedef etkileşimlerinde eşik davranışın önemi ortaya koyulmuştur. Bunun için mikroRNA ve hedeflerinin dengeli bir şekilde ortamda bulunduğu düşünülürse bu dengeli etkileşimi bozan bir değişiklik sonucunda tüm hedeflerde ifade değişikliği gözlenir. Yaptıkları çalışmada Gillespie algoritmasına göre bir ağ yapısı simüle etmişlerdir. Eşiğin altında bir noktadan bir mRNA'nın transkripsiyon hızını artırmışlar ve sonucunda tüm bir ağ yapısındaki tüm mRNA'ların ifadesinde artışı görmüşlerdir. Bunun yanında bir sonraki zaman diliminde gerçekleştirilen artış ile aynı hedefleyici mikroRNA'lara sahip olmayan başka mRNA'ların ifadesinde de artış görülmüştür. Bununla birlikte çalışmada hedeflerin hiyerarşik bir şekilde düzenlenmesinin afinite ile açıklanabileceğinin de altı çizilmiştir.

Robinson vd. [171] intestinal epitelyal hücresel sinyal yolaklarının düzenlenmesini açıklayan mikroRNA:hedef mRNA etkileşimin ağ yapı modellemesini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada yalnızca hücre morfolojik yapısı, hücre-hücre etkileşimi ve kolorektal kanseri düzenleyen sinyal yolakları ile ilişkili protein kodlayan genler seçilmiştir. Bununla birlikte kolorektal kanserde az ifade edilen mRNA'ların yok sayılmasıyla 196 gen ağ yapısının oluşturulması için kullanılmıştır. MikroRNA hedef gen etkileşimlerinin seçilmesi için ise miRWalk kullanılmıştır. Etkileşimlerin açıklanması için ağ teorisinden faydalanan araştırmacılar, R aracılığıyla sunulmuş sosyal ağları tanımlayan açık kaynak kodundan faydalanarak aynı türler arasında etkileşim olmayacak şekilde ağ yapıları (bipartite) oluşturmuşlardır. Çizge kuramından elde edilen matematiksel verilerin düğümler ve aralarındaki bağlantılarda depolanmasını sağlamışlardır. Her mikroRNA ve mRNA için frekans değerleri belirlenmiştir. Frekans değerleri her mikroRNA tipi için hedef tipi sayısı ve her mRNA için hedefleyen mikroRNA tipi sayısı olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte genler arasındaki ortak hedefleyici mikroRNA'lar ve mikroRNA'lar arasındaki ortak hedeflerin sayıları bağlantı değişkenleri olarak eklenmiş ve etkileşimin kuvvetini simgeleyen "ağırlık" olarak ifade edilmiştir. Bu ağırlık değerlerinin de kullanılmasıyla R paketleriyle oluşturulan ağ yapılarının kullanılmasıyla instestinal epitelyal hücrelerin düzenlenmesinde etkili olan genlerin etkileşimleri gösterilmiştir.

List vd. [172] geliştirdikleri bir yöntemi R programlama dilinde kullanılacak bir paket olarak sunmuşlardır. Paket temel olarak ortak mikroRNA'lar aracılığı ile düzenlenen genlerin analizlerini ve davranışlarını incelemek üzere oluşturulmuştur. Geliştirilen paket ile genler ve mikroRNA'ların farklı hastalara ait ifade değerlerinin matriks yapısı oluşturularak analizin ilk basamağı geliştirilir. MikroRNA:gen eşleşmelerini içeren veri setleri aracılığı ile birleştirilen bu iki matriks yapısında aynı gen ve mikroRNA'lar için farklı hastalardan elde edilmiş tekrarlı veriler sayesinde öncelikle mikroRNA'ların hedeflerini ne yönde düzenlediği bulunur. Bir sonraki basamakta ise ortak mikroRNA'lar tarafından hedeflenen genlerin ifadeleri arasındaki korelasyon istatistiksel yöntemlerle saptanır. Anlamlı sonuçların seçilmesi sonrasında ise yalnızca genler ile oluşturulmuş yarışmalı endojen RNA hedeflerinin toplu sunumu sağlanmaktadır. Bu sayede bir düzenleyici

(mikroRNA) aracılığıyla birlikte düzenlenen genlerin tüm etkileşimler içerisinden kümelenebilmesi ve gözlenebilmesi mümkün olmaktadır.

MikroRNA ve direkt hedeflerinin etkileşiminin negatif korelasyon gösterdiği bilinse de tam olarak sonuçlarının ne olacağının bilinememesi halen temel problemdir. Bir mikroRNA'nın çeşitli hedeflerine karşı sergilediği özelliklerin ve bir mRNA'nın farklı hedeflerine karşı sergilediği davranışların değişmesi modelleme yaklaşımlarında temel zorluklardan biridir. Bunun yanında mikroRNA aktivitesinin belirleyici faktörlerinin etkilerinin tam olarak aydınlatılamamış olması da modelleme yaklaşımlarını zorlaştırmaktadır.

Günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalar mikroRNA ve hedef etkileşimlerini küçük ağ yapılarında çözümlemeye çalışmışlardır. Bu çalışmalar genellikle bir mikroRNA'nın hedeflediği birkaç gen veya birkaç mikroRNA tarafından hedeflenen bir gen üzerine geliştirilen ağ yapıları olarak kullanılmıştır. Gen ve mikroRNA düğümleri arasındaki bağlantıların etkileşim gücü olarak temsil edildiği çok az sayıda çalışma olmakla birlikte, bunlar yalnızca ortak hedef veya mikroRNA sayılarının birer katsayı gibi düşünülmesi ve aynı tipteki elemanların ilişkilendirilmesi üzerine gerçekleştirilmiştir. Ancak canlı hücresinde fizyolojik şartlar, katı kabullere dayanan yaklaşımların uygulanması açısından uygun değildir. Bu amaçla da tez çalışmasında daha esnek uygulama sunabilecek, mikroRNA ve hedefleri arasındaki parametreleri değişkenler olarak kullanabilecek bir yaklaşım geliştirilmeye çalışılmıştır. Bununla birlikte ağ yapıları üzerinde model kullanılmasıyla mikroRNA:hedef etkileşimlerindeki dinamiklerin anlaşılabileceği de düşünülmektedir.

BÖLÜM 3

YÖNTEM

3.1 Veri Erişimi ve Hazırlaması

MikroRNA'lar ve hedefleri arasındaki etkileşimin analizi için meme kanser hastalarının gen ve mikroRNA ifadelerinin eldesi gerçekleştirilmiştir. Gen ve mikroRNA ifadeleri için yüksek verimli yeni nesil dizileme yöntemleriyle gerçekleştirilen çalışmalar seçilmiştir.

Biyoinformatik çalışmalarında açık kaynak kodu sunması ve ulaşılabilirliğinin kolay olması sebebiyle R programlama dili yaygın olarak kullanılmaktadır. R programlama dili sayesinde pek çok veri tabanından veri eldesi ve işlenerek anlamlı hale getirilmesi mümkündür. Paketler halinde sunulan açık kaynaklar, elde edilen verilerin doğru şekilde işlenmesi, birleştirilmiş analizlerinin yapılması, modellemelerin gerçekleştirilmesi ve görselleştirilmesi için zengin komut içeriği sunmaktadır. Bu sebeple tez çalışmasında R (versiyon 3.5.1) ve CRAN tarafından sağlanan paketler verilerin düzenlenmesi, analizi ve verilerden model oluşturulması için kullanılmıştır. Bunun yanında R programlama dilinde kullanılmak üzere TCGA'dan elde edilecek verinin istenilen özelliklerinin komutlar ile belirtilmesini, sorgulanmasını, indirilmesini ve düzenlenmesini sağlayan Bioconductor paketleri mevcuttur.

Dünyada farklı kuruluşlar tarafından gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda kanser hastalarının normal ve tümör doku örneklerine dair mutasyon, gen ifadesi, kodlanmayan RNA ifadesi gibi pek çok bilgi TCGA veri tabanında depolanmaktadır. TCGA verilerin belirli kriterlere göre filtrelenerek incelenmesini ve indirilmesini de internet sayfaları

aracılığıyla sağlamaktadır. TCGA'dan veri eldesi sağlanırken hasta barkod numaralarının anlamlarından da faydalanımıştır. Barkod numaraları elde edilen veri tipine göre ortak ve farklı noktalar içermektedir [173]. Örneğin, elde edilen verilerde barkodların ilk 12 karakteri aynı hastaya ait oldukları zaman aynı kodu içerir. Ancak devamındaki harf ve rakamlar farklı verilerin kısa kodları olduğu için farklılık arzetmektedir. Bu ayrımın yapılması verilerin doğru şekilde birleştirilmesi için önemlidir. Örneklere ait olan bir barkod aşağıdaki gibi açıklanabilir [173]:

TCGA-A7-A13G-01B-04R-A22O-07

TCGA: Projenin adı

A7: Dokunun elde edildiği bölge.

A13G: Hasta kodu

01: Doku tipi (Tümör (01) veya normal (11))

B: Aynı hastadan örnek alındıysa sırası

04: Örnek bölümlerinden hangi kısmında olduğunun kodu.

R: Analitin moleküler tipi

A22O: Örnek flasklarındaki konumu

07: Kuruluş kodu.

3.1.1 Meme Kanser Hastalarının Gen İfade Verilerinin İndirilmesi ve Düzenlenmesi

Tez çalışmasında meme kanseri hastalarının normal ve tümör dokularına ait RNA-seq verileri Bioconductor tarafından sunulan TCGAbiolinks paketi ile indirilmiş ve SummarizedExperiments paketi aracılığıyla işlenmiş ve tablo haline getirilmiştir [174],[175].

Gen İfade Verilerinin Elde Edilmesinde Sorgu Parametreleri

Tez çalışmasında meme kanser hastalarına ait veriler yeni nesil dizileme içeren yöntemlerle elde edilmiş ifade verilerinden indirilmiştir. Ancak gen ifade verilerinin işlenme şekillerine göre sorgu parametreleri değişmektedir. TCGA'da gen ifadesi veri

setleri üç farklı işlem sonucu elde edilmiş olan veri setleri halinde sunulmaktadır: HTseq – Counts, HTseq – FPKM, HTseq – FPKM – UQ.

HTseq - Counts: Yeni nesil dizileme yöntemlerinden elde edilmiş verilerin her bir gen için mevcut okuma sayısıdır.

HTseq – FPKM: Yeni nesil dizileme verilerinin normalize edilmiş halidir. FPKM bir milyon okuma başına her kilobazlık bölümündeki fragman sayısı olarak açıklanabilir. Gen ifadesinin FPKM normalizasyonu aşağıdaki gibi hesaplanmaktadır:

$$FPKM = \frac{S_g}{S_{pk} \times L} \times 10^9 \quad (3.1)$$

- $S_g =$ Gen için okuma sayısı.
- $S_{pk} =$ Tüm protein kodlayan genlerin okuma sayısı.
- $L =$ Gendeki tüm ekzonların toplam uzunluğu.
- 10^9 = Milyon okuma başına kilobazın gösterimi için sabit.

HTseq-FPKM-UQ: FPKM normalizasyonunun bir versiyonu olan FPKM-UQ, örnekteki toplam protein kodlayan bölge okuma sayısı yerine toplam okuma sayısının %75'inin kullanılmasıyla elde edilir. Gen ifadesinin FPKM-UQ normalizasyonu aşağıdaki gibi hesaplanmaktadır:

$$FPKM = \frac{S_g}{S_{g75} \times L} \times 10^9 \quad (3.2)$$

- $S_{g75} =$ Tüm genlerin %75'inin okuma sayısı.

Gen ifadesi bazında gerçekleştirilecek çalışmalarda gen ifade ham verisinin hangi iş akışı ile işlendiği önem taşımaktadır. Örneğin, gen ifadesindeki değişim analizlerinin yapılması için farklı normalizasyon yaklaşımları kullanılması sonucu değiştirmektedir [176].

Tez çalışmasında meme kanser hastalarının gen ifade verilerinin sorgulanması için belli parametreler Çizelge 3.1'de gösterildiği gibidir:

- TCGA farklı projeleri içeren bir veri ortamıdır. Kanser araştırmalarına dair farklı proje ve hastalık tipleri farklı kısaltmalar ile kodlanmaktadır. Tez çalışmasında meme kanser hastalarına ait veriler "TCGA-BRCA" proje adı ile sorgulanmıştır.

- Genlerinin transkriptlerine erişimin sağlanabilmesi için ise “Transcriptome Profiling” kategorisinden “Gene Expression Quantification” veri tipi olarak seçilmiştir.
- Veri seti sorgulamasında en kritik olan nokta ise “workflow.type” parametresidir. Tez çalışması için doğrudan mikroRNA’nın hedef geninin sayısal olarak etkisinin anlaşılması için “HTseq – Counts“ kullanılmıştır.

Çizelge 3.1 Algoritma 1

```
source("https://bioconductor.org/biocLite.R")
biocLite("TCGAbiolinks")
biocLite("SummarizedExperiment")
library(TCGAbiolinks)
library(SummarizedExperiment)
library(biomaRt)
library(dplyr)
library(readr)
library(tidyr)
library(stringr)
library(stringi)

hg38query <- GDCquery(project = "TCGA-BRCA",
                      data.category = "Transcriptome Profiling",
                      data.type = "Gene Expression Quantification",
                      workflow.type = "HTSeq - Counts")
GDCdownload(hg38query)
hg38genedata_htseq_counts <- GDCprepare(hg38query)

expvalue_htseq_counts_hg38 <- as.data.frame(assay(hg38genedata_htseq_c
ounts), row.names = TRUE)

exp_metadata_hseq_counts_hg38 <- as_tibble(colData(hg38genedata_htseq_
counts))

genedatahg38_htseq_counts <- as_tibble(rowRanges(hg38genedata_htseq_co
unts))
```

İndirme işlemi tamamlandığında tüm verileri içeren “RangedSummarizedExperiment” tipinde veri seti elde edilmiştir. Bu aşamadan sonra ise her bir verinin elde edilmesi için

SummarizedExperiment paketi kullanılmıştır. Sonuç olarak; i) her bir hasta için her bir genin ifadesini içeren (expvalue_htseq_counts_hg38), ii) hasta hakkında yaş, cinsiyet, kanser evresi gibi pek çok bilgiyi içeren (exp_metadata_hseq_counts_hg38), iii) insan genomundaki genler hakkında başlangıç, son, yön gibi bilgileri içeren (genedatahg38_htseq_counts) üç veri seti elde edilmiş ve kaydedilmiştir.

Elde edilen veri setlerinden gen ifade değerlerine erişim için büyük bir "data.frame" formatındaki expvaluehg38 veri seti, Çizelge 3.2'de gösterildiği gibi hasta-gen-gen ifadesi formunda bir veri seti elde edilmesi için işlenmiştir.

Çizelge 3.2 Algoritma 2

```
expvaluehg38_htseq_counts <- genedatahg38_htseq_counts%>%
  bind_cols(expvalue_htseq_counts_hg38)

expvaluehg38_htseq_counts <- gather(expvaluehg38_htseq_counts, "barcod
e", "gene_expression", 9:1230)

expressiondata38_htseq_counts <- as_data_frame(exp_metadata_hseq_count
s_hg38)%>%
  select(2,1,3,5)%>%
  inner_join(expvaluehg38_htseq_counts%>%select(ensembl_gene_id, exter
nal_gene_name, barcode, gene_expression), by = "barcode")
```

3.1.2 Meme Kanser Hastalarının MikroRNA Veri Setlerinin Elde Edilmesi ve Düzenlenmesi

Meme kanseri hastalarına ait örneklerden elde edilmiş mikroRNA ifade verileri de TCGA tarafından sunulmaktadır. Bu veriler TCGAbiolinks paketi ile paket talimatlarına göre elde edilmiştir [174]. Ayrıca temel dplyr, stringr ve tdyr paketlerinin komutları kullanılmıştır [177],[178],[179].

MikroRNA İfade Verilerinin Elde Edilmesinde Sorgu Parametreleri

TCGA veri tabanı mikroRNA ifade verilerini iki tipte bulundurmaktadır. Bunlardan "Mirna Expression Quantification" veri setleri öncü mikroRNA ifade bilgisini içermektedir. Bu veri setinde farklı gen bölgelerinden ifade edilen öncü mikroRNA okuma sayısı ve

normalize edilmiş değeri elde edilebilmektedir. Örneğin hsa- let-7a-1 ve hsa- let-7a-2 ele alındığında iki mikroRNA'da aynı öncü mikroRNA'yı ifade eder; ancak bu mikroRNA'lar farklı gen bölgelerinden transkripte olmuşlardır. Bununla birlikte hsa-let-7a mikroRNA'sının hangi olgun mikroRNA izoformuna dönüştüğü bilgisi bu veri setlerinde eksiktir.

TCGA veri tabanının diğer sunduğu veri ise "Isoform Expression Quantification" veri setidir. Bu veri setinde mikroRNA'ların isimleri öncü mikroRNA kodlamasıyla yapılmaktadır. Ancak veri seti daha zengin bilgi içeriğine sahiptir. Veri setinde öncü mikroRNA adının yanı sıra, lokasyon ve mikroRNA bölgesi bilgileri bulunmaktadır. MikroRNA bölgesi değişkeninde mikroRNA'nın öncü veya olgun olduğu ve miRBase veri tabanına uygun olgun mikroRNA kodu bilgisi sunulmaktadır.

TCGA veri tabanından sorgulama işlemi yapılırken belli parametreler kullanılmıştır (Çizelge 3.3):

- Tez çalışmasında meme kanser hastalarına ait mikroRNA ifade verileri "TCGA-BRCA" proje adı ile sorgulanmıştır.
- MikroRNA genlerinin transkriptlerine erişimin sağlanabilmesi için ise "Transcriptome Profiling" kategorisinden "Isoform Expression Quantification" veri tipi olarak seçilmiştir.
- Veri seti sorgulamasında en kritik olan nokta ise "workflow.type" parametresidir. Tez çalışması için mikroRNA ifade verilerinin işlenip anlamdırılarak sunulmasını sağlayan "BCGSC miRNA Profiling " süreç sonuçları, sorgu parametresi olarak seçilmiştir.

Çizelge 3.3 Algoritma 3

```
querymirna <- GDCquery(project = "TCGA-BRCA",
                       data.category = "Transcriptome Profiling",
                       data.type = "Isoform Expression Quantification",
                       workflow.type = "BCGSC miRNA Profiling")

GDCdownload(querymirna, method = "client")
mirnahg38isoforms <- GDCprepare(querymirna)
```

Elde edilen veri seti miRBase tarafından sunulan mikroRNA insan mikroRNA verilerinin özelliklerini içeren veri setleri yardımıyla düzenlenmiştir. Bunun için Çizelge 3.4'te gösterildiği gibi miRBase'ın versiyon 21'inden insan mikroRNA verileri doğrudan indirilmiş ve işlenmiştir [180].

Çizelge 3.4 Algoritma 4

```
# hsa.gff3 -> mirbasehg38.txt olarak kaydedilmiştir.

read.table("mirbasehg38.txt", comment.char = "#")%>%
  filter(V3 != "miRNA_primary_transcript")%>%
  separate(V9, c("ID", "Alias", "Name", "Precusor"), sep = ";")%>%
  mutate(ID = substr(ID, 4, length(ID)), Alias = substr(Alias, 7, leng
th(Alias)), Name = substr(Name, 6, length(Name)), Precusor = substr(Pr
ecusor, 14, length(Precusor)))%>%
  select(chr= V1, start = V4, end = V5, strand = V7, ID, Alias, Name,
Precusor)->mirbasehg38
```

MiRBase versiyon 21'e göre elde edilen veri seti aracılığı ile TCGA-BRCA mikroRNA ifade veri seti Çizelge 3.5'teki gibi işlenmiştir.

Çizelge 3.5 Algoritma 5

```
mirnahg38isoforms%>%
  select(1, 3, 4, 6, 7)%>%
  filter(startsWith(miRNA_region, "mature"))%>%
  separate(miRNA_region, c("type", "mirbase_ID"),  sep = ",")%>%
  inner_join(mirbasehg38, by = c("mirbase_ID"= "ID"))%>%
  select(barcode, mirbase_ID, miRNA = Name, Precusor, read_count, 3) -
> mirnaTCGA

mirnaTCGA%>%
  group_by(barcode, miRNA)%>%
  mutate(total_read = sum(read_count), total_RPM = sum(reads_per_milli
on_miRNA_mapped))%>%
  ungroup()%>%
  select(1,2,3,4,7,8)%>%
  distinct()-> mirnaTCGA
```

İşlem sonucunda mikroRNA ifadesi veri seti hasta barkodu, mikroRNA miRBase kodu, olgun mikroRNA adı, öncü mikroRNA kodu, okuma sayısı, bir milyon mikroRNA'da okuma sayısı bilgilerini içermektedir. MikroRNA ifade veri setinde bir olgun mikroRNA izoformu için birden fazla öncü mikroRNA bulunmaktadır. Birleştirilmiş analizlerde bu her hastadaki her olgun mikroRNA için farklı öncülerden toplam sayı kullanılmıştır.

3.1.3 MikroRNA ve Hedef Eşleşmelerinin Elde Edilmesi ve Düzenlenmesi

MikroRNA ve hedef gen eşleşmelerinin elde edilmesi için ligasyona dayalı olarak mikroRNA ve hedef mRNA'sının kimerik okunmasını sağlayan yeni nesil dizileme içeren deneysel yöntemlerle oluşturulmuş veri setleri indirilmiştir (Çizelge 3.8).

CLASH yöntemiyle elde edilmiş olan deneysel sonuçlar, araştırmacılar tarafından .txt dosyası olarak yayınlanmıştır. Çalışma sonucuda sunulan veri setinin içeriği mikroRNA:hedef etkileşimine ve deneysel süreçlere dair pek çok veri sunmakla birlikte Çizelge 3.6'da tez çalışması için kullanılan veriler sunulmuştur.

Çizelge 3.6 CLASH yöntemiyle elde edilmiş mikroRNA veri setinin içeriği.

Değişken İsmi	**İçeriği**
mikroRNA	mirBase 15'e uyumlu şekilde oluşturulmuş mikroRNA isimleri
mikroRNA dizisi	17-26 nükleotitten oluşturulmuş mikroRNA nükleotit dizisi
mRNA adı	Ensembl gen kodu-Ensembl transkript kodu-Gen adı-Transkript türü (Ensembl 60 uyumlu, İnsan Genom projesi 19)
mRNA dizisi	Biyoinformatik yöntemlerle genişletilmiş mRNA dizisi
Çekirdek tipi	mikroRNA:hedef arasındaki eşleşme tanımı (kanonik ve kanonik olmayan tüm tipleri içerir)
Bağlanma enerjisi	mikroRNA:hedef mRNA arasındaki bağlanmada ortaya çıkan minimum tahmini serbest enerji
Bağlanma Bölgesi	mikroRNA'nın hedef üzerinde bağlama bölgesi

CLEAR-CLiP yöntemiyle elde edilmiş olan deneysel sonuçlar, araştırmacılar tarafından .xlsx dosyası olarak yayınlanmıştır. Araştırmacılar tarafından veri setinde pek çok farklı

deneysel sonuç sunulmakla birlikte, tez çalışması için kullanılan veriler Çizelge 3.7'deki gibidir.

Çizelge 3.7 CLEAR-CLiP yöntemiyle elde edilmiş mikroRNA veri setinin içeriği.

Değişken İsmi	**İçeriği**
Gen numarası	Entrez gen numarası (insan genom projesi 18)
Gen adı	Genin sembolü
Bölge	Hedef üzerinde mikroRNA'nın eşleşme gerçekleştirdiği konum
MikroRNA	mikroRNA adı
MikroRNA dizi haritası	MikroRNA dizisindeki eşleşme gösteren nükleotitler "|", eşleşme göstermeyen nükleotitler "-", çıkıntılar ise "W" olarak ifade edilmiştir.
Hedef dizi haritası	mRNA dizisindeki eşleşme gösteren nükleotitler "|", eşleşme göstermeyen nükleotitler "-", çıkıntılar ise "W" olarak ifade edilmiştir.
Minimum bağlanma enerjisi	Bağlanma için gereken minimum tahmini serbest enerji miktarı
Çekirdek eşleşmesi	Çekirdek tipi (kanonik ve kanonik olmayan tüm tipleri içerir)

Verilerin R'a aktarılması ve düzenlenmesi için temel olarak, dplyr, tidyr, stringr, readr, stringi, readxl ve biomaRt paketlerinden faydalanılmıştır [177],[178],[179],[181],[182],[183],[184]. MikroRNA ve hedef gen eşleşmelerini içeren veri setlerinden CLASH insan genom 19 ve CLEAR-CLiP ise insan genom 18 yapısındadır (Çizelge 3.8). Meme kanser hastalarının gen ifade verileri ise insan genom 38'e göre elde edilmiştir. Tez çalışması için ifade değerleri baz alınsa da birleştirme çalışmasının farklı genom versiyonlarına göre yapılması durumunda ortaya çıkabilecek hataların önlenmesi için tüm veri setlerinin insan genom projesi versiyon 38'e göre düzenlemesi yapılmıştır. Çalışmanın bu aşaması uzun işlem basamakları içerdiği için detaylar Ek-A'da sunulmuştur.

Çizelge 3.8 Algoritma 6

```
library(dplyr)
library(readr)
library(tidyr)
library(stringr)
library(stringi)
library(readxl)
library(biomaRt)
#clash hg19

clashelwak <- read.table("mmc1.txt", comment.char = "#", header = TRUE
, skip = 1)


#Clearclip hg18
clearclip <- read_xlsx("CLEAR-CLIP.xlsx")
```

Elde edilen veri setlerinin içeriğinde hedef mRNA'nın başlangıç ve bitiş lokasyonları verilmiştir. Ancak gen başlangıç ve bitiş lokasyonları gibi eksik olan bilgilerin bulunması, insan genom versiyon 38'e uyumluluğun sağlanması için gereklidir. Bu sebeple öncelikle Ek-A'da sunulduğu gibi biomaRt paketi aracılığı ile insan genom versiyonlarına ait bilgiler sorgulanmış, veri olarak alınmıştır [181].

Bu işlem sonrasında mikroRNA:hedef gen eşleşmelerini içeren veri setlerine genom bilgileri temel dplyr, stringr ve tidyr komutları ile eklenmiş ve bir sonraki basamakta gerçekleştirilecek birleştirme işlemlerinde kolaylık olması için gereken işlemler gerçekleştirilmiştir (Ek-A) [177],[178],[179].

Veri setlerinin insan genom versiyon 38'e uygun olabilmesi için UCSC genom tarayıcısının genom yapısı dönüştürme aracı (Lift) kullanılmıştır [185]. Bu aracın arama sekmesine "kromozom: başlangıç -bitiş" şeklinde arama yapılan veri sonrasında aynı sırada ve biçimde insan genom versiyon 38'e uygun olarak elde edilebilmektedir.

İki deneysel çalışmanın elde edilen veri setleri değişkenlerinin aynı şekilde sıralanmasıyla düzenlenerek "*experimentalmirnagene*" isimli veri setinde birleştirilmiştir (Ek-B). Birleştirme çalışması sonrasında ise mikroRNA:hedef etkileşiminde önemli olan faktörler uyumlu şekilde düzenlenmiştir (Ek-B).

MikroRNA:Hedef Etkileşimlerinde Önemli Olan Faktörlerin Derecelendirilmesi

MikroRNA'ların hedefleri üzerinde aktivitesini belirleyen bazı etkileşim parametreleri bulunmaktadır. Tez çalışmasında bu faktörlerin mikroRNA aktivitesindeki önemleri sayısal olarak ifade edilmiş ve hedef düzenlenmelerinde yarışmalı davranışların anlaşılması için kullanılmıştır.

Enerji: MikroRNA ve hedefleri arasındaki önemli faktörlerden biri enerjidir. MikroRNA:hedef arasında temel belirleyici faktör olmasa da enerji, mikroRNA ve hedef arasındaki afinite veya hedef:mikroRNA hibridizasyonu olasılığı olarak görülmektedir [102],[103],[186]. Tez çalışmasında mikroRNA:hedef etkileşiminin (bağlanmasının) gerçekleşmesinde kullanılan parametre enerjidir. MikroRNA:hedef etkileşiminde düşük serbest enerjinin görülmesi sıkı bir bağlanmanın (güçlü afinitenin) ölçüsüdür. Çalışmanın ilerleyen bölümlerinde her mikroRNA:hedef etkileşiminin gruplar içerisinde derecelendirilmesi için enerji, bu aşamada veri setleri içerisinde değişken olarak tutulmuştur.

Bölge: MikroRNA baskılayıcı aktivitesinin gücünü belirleyecek olan faktör, kimerik okumaya dayanan yeni nesil dizileme yöntemlerinden elde edilmiş veri setlerinde sunulan hedef üzerindeki çekirdek konumudur. İlk çalışmalar mikroRNA ve hedeflerinin etkileşimlerinin hedef mRNA'nın 3' UTR ucundan gerçekleştiğini gösterse de sonrasında gerçekleştirilen çalışmalar 5' UTR ve CDS bölgelerinden de etkileşimlerin gerçekleşebileceği yönünde sonuçlar vermiştir [85],[86]. Bölge faktörü, bağlanmanın gerçekleşmesinin değil mikroRNA aktivitesinin fonksiyonel olup olmayacağının ölçüsüdür [9],[100],[187]. Yapılan çalışmalar özellikle CDS ve 3' UTR bölgelerinden gerçekleşen etkileşimlerin fonksiyonel olduğunu belirtmektedir [187]. Bununla birlikte CDS bölgelerinden gerçekleşen etkileşimlerin translasyon inhibisyonu temelli mekanizmada görevli olduğunu ve 3' UTR bölgelere kıyasla transkript miktarı üzerinde yaklaşık yarısı kadar etkinlik gösterebildiği belirtilmiştir [85]. Ayrıca 5' UTR bölgesinden etkileşimin neredeyse hiçbir fonksiyonel özellik göstermediği belirtilmiştir [85]. Yapılan çalışmalar baz alınarak bölge tiplerine etkinlik katsayıları Çizelge 3.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.9 Hedef mRNA üzerindeki tamamlayıcı bölgenin konumu ve etki katsayıları [187].

Hedef üzerinde bölgenin konumu	**Etkinlik katsayısı**
3’ UTR	0.84
CDS	0.42
5’ UTR	0.01
3’UTR+CDS	0.93

Çekirdek tipi: MikroRNA ve hedefi arasındaki tamamlayıcılığın bir ölçüsü olan çekirdek tipi, mikroRNA aktivitesinin belirlenmesinde temel faktörlerden biridir. İlk çalışmalar mikroRNA:hedef etkileşiminin kanonik olarak isimlendirilen tamamen tamamlayıcı 6-8 nükleotit aracılığıyla gerçekleştiğini belirtmiştir [9]. Ancak geliştirilen deneysel yöntemlerle mikroRNA’ların kanonik olmayan bağlanmalar aracılığıyla da hedeflerinin düzenlenmelerinde etkili olabileceği görülmüştür [86],[96],[101],[188]. Bu etkinlik hem çekirdek dizisinin tipine (6-mer, 7-mer, 8-mer vb.) hem de alttiplerine göre (7mer-A1, 7-mer-8m gibi) değişkenlik göstermektedir. Günümüze kadar yapılan çalışmalar mikroRNA çekirdek tiplerinin hiyerarşik baskılama etkinliği gösterdiğini belirtmektedir [95],[189]. Tez çalışmasında mikroRNA’ların çekirdek tipine göre etkileşim katsayıları önceki çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre Çizelge 3.4’da gösterildiği gibi ele alınmıştır. Bu çalışmalarda 9-mer mikroRNA çekirdek bölgesi ele alınmadığı için 8-mer ve 9-mer çekirdek tipleri için katsayılar aynı kabul edilmiştir.

Çizelge 3.10 MikroRNA:hedef etkileşiminde çekirdek tipleri ve etki katsayıları [9],[96],[188].

Çekirdek Tipi	**Katsayısı**
5-mer	0.05
5-mer_noncanonical	0.04
6-mer	0.07
6-mer_noncanonical	0.05
6-merA1	0.07
6merA1_noncanonical	0.05
7-mer	0.23

Çizelge 3.10 MikroRNA:hedef etkileşiminde çekirdek tipleri ve etki katsayıları (Devamı)

7-mer_noncanonical	0.19
7-merA1	0.19
7-merA1_noncanonical	0.16
7-mer-8m	0.25
7-mer-8m_noncanonical	0.21
8-mer	0.43
8-mer_noncanonical	0.35
9-mer	0.43
9-mer_noncanonical	0.35
none	0.01

3.1.4 Veri Setlerinin Birleştirilmesi

Veri seti birleştirme, farklı verilerin birlikte analiz edilmesini ve ilişkilendirilerek anlamlandırılmasını sağlayan önemli bir süreçtir. Birleştirme süreçlerinde kullanılacak veri setlerinin içeriğinin tanımlanması ve birbirleri ile uyumluluğunun bilinmesi gerekmektedir. Çalışmanın bu aşamasında elde edilen veriler kullanılacak veri setlerinin belirlenmesi ve doğru şekilde birleştirilmesi için analiz edilmiştir.

3.1.4.1 Gen İfadesi Veri Setlerinin İçeriği

Bu işlem için temel dplyr komutları kullanılmıştır [177]. Buna göre TCGA-BRCA projesi 1092 meme kanser hastasını içermektedir. Bu hastalardan 1097 birincil tümör örneği, 113 normal doku örneği, 7 metastatik doku örneği bulunmaktadır. Bazı hastalar için birincil tümör dokularından birden fazla çalışma yapıldığı farklı örnek bölge kodlarından da anlaşılmıştır. Her bir örnekte TCGA-BRCA veri seti 56830 fragment (yaklaşık 20000'i protein kodlayan gen bölgesidir) için ifade verisi içermektedir. Gen ifadesi veri seti Çizelge 3.11'de gösterildiği gibi analiz edilmiştir.

Çizelge 3.11 Algoritma 7

```
expressiondata38_htseq_counts%>%
  group_by(patient)%>%
  count(patient)
```

Çizelge 3.11 Algoritma 7 (Devamı).

```
expressiondata38_htseq_counts%>%
  filter(definition =='Primary solid Tumor')%>%
  select(sample)%>%
  distinct()%>%
  count()

expressiondata38_htseq_counts%>%
  filter(definition =='Solid Tissue Normal')%>%
  select(sample)%>%
  distinct()%>%
  count()

expressiondata38_htseq_counts%>%
  filter(definition =='Metastatic')%>%
  select(sample)%>%
  distinct()%>%
  count()

expressiondata38_htseq_counts%>%
  group_by(barcode)%>%
  count()
```

3.1.4.2 MikroRNA İfade Veri Setinin İçeriği

Meme kanser hastalarının mikroRNA ifade veri setinin içeriğinin anlaşılması için dplyr ve stringr paketlerinin komutları kullanılmıştır (Çizelge 3.12) [177],[178]. TCGA-BRCA projesine göre 1079 hasta için mikroRNA ifade verisi bulunmaktadır. Bu hastaların bir kısmının tümör dokularının yanında sağlıklı veya metastatik özellikteki dokularının mikroRNA ifadelerine ulaşılmıştır. MikroRNA ifade veri setinde doku örneğinin tanımı verilmemektedir. Bu sebeple işlemler sırasında TCGA barkodlama sisteminden faydalanılmıştır. Veri içerisinde "Sample" olarak verilmiş değişkenin 13. ve 16. karakterleri arasındaki ifadeler 01(A-B-C): tümör, 11(A-B-C): normal doku, 06(A-B-C): metastatik doku olarak kodlanmaktadır.

Çizelge 3.12 Algoritma 8

```
mirnaTCGA%>%
  mutate(patient= substr(barcode,1, 12), patient_type = substr(barcode
,1, 16))%>%
  select(patient)%>%
  distinct()%>%
  count()

mirnaTCGA%>%
  select(barcode)%>%
  distinct()%>%
  count()

mirnaTCGA%>%
  mutate(patient= substr(barcode,1, 12), patient_type = substr(barcode
,1, 16))%>%
  filter(endsWith(patient_type,"01A") | endsWith(patient_type,"01B") |
endsWith(patient_type,"01C"))%>%
  select(patient)%>%
  distinct()%>%
  count()

mirnaTCGA%>%
  mutate(patient= substr(barcode,1, 12), patient_type = substr(barcode
,1, 16))%>%
  filter(endsWith(patient_type,"01A") | endsWith(patient_type,"01B") |
endsWith(patient_type,"01C"))%>%
  select(barcode)%>%
  distinct()%>%
  count()
```

Çizelge 3.12 Algoritma 8 (Devamı).

```
mirnaTCGA%>%
  mutate(patient= substr(barcode,1, 12), patient_type = substr(barcode
,1, 16))%>%
  filter(endsWith(patient_type,"11A") | endsWith(patient_type,"11B") |
endsWith(patient_type,"11C"))%>%
  select(patient)%>%
  distinct()%>%
  count()

mirnaTCGA%>%
  mutate(patient= substr(barcode,1, 12), patient_type = substr(barcode
,1, 16))%>%
  filter(endsWith(patient_type,"11A") | endsWith(patient_type,"11B") |
endsWith(patient_type,"11C"))%>%
  select(barcode)%>%
  distinct()%>%
  count()

mirnaTCGA%>%
  mutate(patient= substr(barcode,1, 12), patient_type = substr(barcode
,1, 16))%>%
  filter(endsWith(patient_type,"06A"))%>%
  select(patient)%>%
  distinct()%>%
  count()

mirnaTCGA%>%
  mutate(patient= substr(barcode,1, 12), patient_type = substr(barcode
,1, 16))%>%
  filter(endsWith(patient_type,"06A"))%>%
  select(barcode)%>%
  distinct()%>%
  count()
```

3.1.4.3 MikroRNA:Hedef Gen Veri Setinin İçeriği

Yeni nesil dizileme içeren deneysel yöntemlere dayanarak oluşturulmuş mikroRNA:hedef etkileşimlerini içeren veri seti Ek-A'daki gibi birleştirildikten sonra veri setlerinin birleştirilmesi aşamasındaki hataların önüne geçilmesi için içeriği incelenmiştir. Bu işlemler için temel dplyr paketi komutları Çizelge 3.13'teki gibi kullanılmıştır [177].

Çizelge 3.13 Algoritma 9

```
experimentalmirnagene%>%
  select(Ensembl_Gene_Id)%>%
  distinct()%>%
  count()

experimentalmirnagene%>%
  select(miRNA)%>%
  distinct()%>%
  count()

experimentalmirnagene%>%
  group_by(Ensembl_Gene_Id, miRNA)%>%
  count()

experimentalmirnagene%>%
  group_by(Ensembl_Gene_Id, miRNA)%>%
  count()%>%
  filter(n!=1)
```

3.1.4.4 MikroRNA:Hedef, MikroRNA İfadesi ve Gen İfadesi Veri Setlerinin Birleştirilmesi

Elde edilen veri setleri mikroRNA ve gen ifade düzenlenmelerinin anlaşılabilmesi için birbirlerine entegre edilmiştir. Her veri setinde doğru eşleşmeleri yapmaya olanak sağlayacak ortak değişkenler bulunmaktadır. Veri setlerinin birleştirilmesi için dplyr paketinden faydalanılmıştır [177].

MikroRNA'ları, ifade değerlerini, hedefleri, hedef ifade değerlerini ve etkileşimlerindeki önemli olan katsayıları içeren hasta ayrımı yapabilecek şekilde veri setlerinin birleştirilmesi işleminin, verilerin çok büyük olmasından dolayı zor olduğu görülmüştür. Aynı zamanda tüm hastaların özellikleri aynı olmadığı için bir arada değerlendirmek model tasarımı için doğru bir yaklaşım olmayacaktır.

Birleştirme işlemi esasen bütüncül yaklaşım veya hasta bazlı bireysel yaklaşımla gerçekleştirilse dahi aynı aşamaların izlenmesi gerekmektedir (Şekil 3.1). Tez çalışmasının bu aşamasında öncelikle iki hastadan normal doku örneği seçilmiştir. Örnek seçimi için temel parametreler ise mikroRNA ifadesidir. Bunun nedeni meme kanser hastalarının hepsi için aynı sayıda genin ifadesi belirlenmişken her mikroRNA'nın ifadesi her hasta için belirlenmemiştir. Bu sebeple Çizelge 3.14'teki gibi örnek seçimi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.14 Algoritma 10

```
mirnaTCGA%>%
  group_by(barcode)%>%
  count()%>%
  arrange(desc(n))

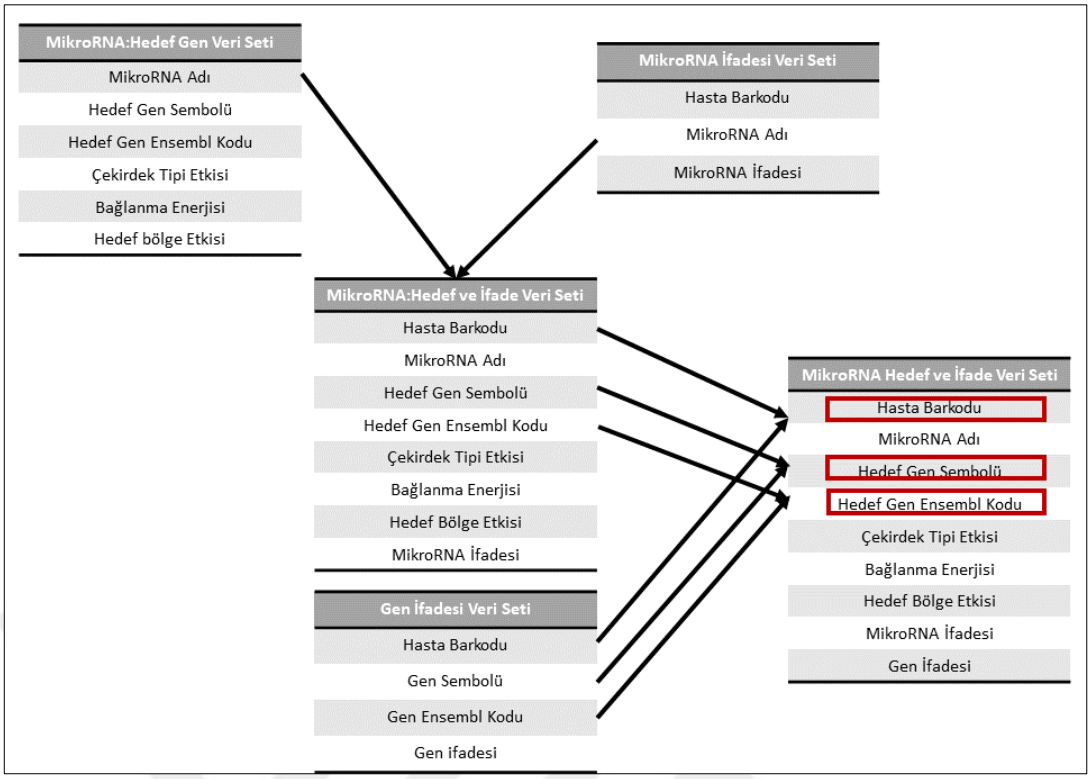
mirnaTCGA%>%
  group_by(miRNA)%>%
  mutate(mean_exp = mean(total_RPM), type = substr(barcode, 14, 16))%>
%
  filter(type == "11A"| type == "11B")%>%
  filter(total_RPM> 1)%>%
  ungroup()%>%
  group_by(barcode)%>%
  count()%>%
  arrange(desc(n))
mirnaTCGA%>%
  group_by(miRNA)%>%
  mutate(mean_exp = mean(total_RPM), type = substr(barcode, 14, 16))%>
%
  filter(type == "11A"| type == "11B")%>%
```

Çizelge 3.14 Algoritma 10 (Devamı).

```
  filter(total_RPM> mean_exp)%>%
  ungroup()%>%
  group_by(barcode)%>%
  count()%>%
  arrange(desc(n))

mirnaTCGA%>%
  group_by(miRNA)%>%
  mutate(mean_exp = mean(total_RPM), type = substr(barcode, 14, 16))%>
%
  filter(type == "11A"| type == "11B")%>%
  filter(total_RPM< mean_exp)%>%
  ungroup()%>%
  group_by(barcode)%>%
  count()%>%
  arrange(desc(n))
```

Hasta seçimi gerçekleştirilikten sonra üç veri setinin birleştirilmesi Şekil 3.1'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Öncelikle mikroRNA ifade verisetine mikroRNA'ların hedefleri ve etkileşimdeki önemli parametreler eklenmiştir. İkinci basamakta ise aynı örneğin gen ifade veri setine bu bilgiler işlenmiştir (Çizelge 3.15). Çalışmanın bu basamağında dplyr, stringr paketlerinden faydalanılmıştır [177],[178].



Şekil 3.1 Veri setlerinin birleştirilme akışı.

Çizelge 3.15 Algoritma 11

```
#Örnek barkodu aracılığıyla mikroRNA ifadesi veri setinin alınması ve
mikroRNA:hedef veri seti ile birleştirilmesi:

mirnaTCGA%>%
  filter(startsWith(barcode, "TCGA-E9-A1N5-11A"))%>%
  inner_join(experimentalmirnagene%>%dplyr::select(hgnc_symbol, Ensemb
l_Gene_Id, miRNA, Energy, region_effect, seed_type_effect), by = "miRN
A")%>%
  distinct()-> TCGA_E9_A1N5_mirna_gene

#Örnek barkodu aracılığı ile gen ifadesi verilerinin seçilmesi:

expressiondata38_htseq_counts%>%
  mutate(sample_barcode = substr(barcode, 1, 12), sample = substr(barc
ode, 1, 16))%>%
  filter(sample_barcode == "TCGA-E9-A1N5", endsWith(sample, "11A"))%>%
  select(sample, sample_barcode, external_gene_name, ensembl_gene_id,
```

Çizelge 3.15 Algoritma 11 (Devamı).

```
gene_expression)%>%
  inner_join(expressiondata38_htseq_counts%>%
  mutate(sample_barcode = substr(barcode, 1, 12), sample = substr(barc
ode, 1, 16))%>%
  filter(sample_barcode == "TCGA-E9-A1N5", endsWith(sample, "01A"))%>%
  select(sample, sample_barcode, external_gene_name, ensembl_gene_id,
gene_expression), by = c("sample_barcode", "external_gene_name", "ense
mbl_gene_id"), suffix = c("_normal_htseq_counts", "_tumor_htseq_counts
"))%>%
  select(sample_barcode, hgnc_symbol = external_gene_name, Ensembl_Gen
e_Id = ensembl_gene_id, gene_expression_tumor_htseq_counts, gene_expre
ssion_normal_htseq_counts)%>%
  distinct()-> TCGA_E9_A1N5_tumorandnormal

#Ortak değişkenler aracılığı ile örnek için tüm verilerin birleştirilm
esi:

TCGA_E9_A1N5_tumorandnormal%>%
  inner_join(TCGA_E9_A1N5_mirna_gene%>% mutate(sample_barcode = substr
(barcode,1,12)), by = c("hgnc_symbol", "Ensembl_Gene_Id", "sample_barc
ode"))%>%
  select(sample=barcode, sample_barcode, Ensembl_Gene_Id, hgnc_symbol,
gene_expression_tumor_htseq_counts, gene_expression_normal_htseq_count
s, miRNA, mirnaexpression_normal = total_RPM, Energy, region_effect, s
eed_type_effect)%>%
  distinct()-> TCGA_E9_A1N5_tumorandnormal_mirnaTCGA
```

Seçilen hasta örneklerinden biri için Çizelge 3.15'te gerçekleştirilen işlem aynı şekilde diğer hasta için de tekrarlanmıştır. Bu işlemlerden sonra ise bu iki örneğin veri içerikleri kıyaslanmıştır.

Yapılan analizler sonucunda hastalarda bir gen ve mikroRNA arasında birden fazla etkileşimin olabileceği görülmüştür. Bu durum ağ tabanlı modelleme yaklaşımlarında etkileşimlerde hatalara sebep olabilmektedir. Bu sebeple iki örnek için elde edilen veri

setleri belli filtrelerden geçirilmiş ve düzenlenmiştir. Eğer bir bağlantıda birden farklı şekilde etkileşim gerçekleşiyor ise belirtilen kabullere göre etkileşime karar verilmiştir:

- Etkileşimde düşük olan enerji baz alınır.
- Yüksek olan çekirdek tipi etkisi hesaba katılır.
- Bölge etkisi yüksek olan etkileşim seçilir.

Bu kabuller temel olarak mikroRNA:hedef arasındaki en kuvvetli etkileşimin seçilmesi için en düşük enerji değerinin, en güçlü bağlanmayı sergileyecek olan çekirdek tipinin ve en iyi baskılama aktivitesini sağlayacak hedef bölgenin seçimine dayanmaktadır. Bu prensiple Çizelge 3.16'daki gibi her iki örneğin veri seti de düzenlenmiştir.

Çizelge 3.16 Algoritma 12

```
TCGA_A7_A0CE_tumorandnormal_mirnaTCGA%>%
  group_by(Ensembl_Gene_Id, miRNA)%>%
  mutate(seed_type_effect= ifelse(seed_type_effect==max(seed_type_effe
ct), seed_type_effect, max(seed_type_effect)), Energy = ifelse(Energy=
=min(Energy), Energy, min(Energy)), region_effect= ifelse(region_effec
t==max(region_effect), region_effect, max(region_effect)))%>%
  distinct()%>%
  ungroup()->TCGA_A7_A0CE_tumorandnormal_mirnaTCGA


TCGA_E9_A1N5_tumorandnormal_mirnaTCGA%>%
  group_by(Ensembl_Gene_Id, miRNA)%>%
  mutate(seed_type_effect= ifelse(seed_type_effect==max(seed_type_effe
ct), seed_type_effect, max(seed_type_effect)), Energy = ifelse(Energy=
=min(Energy), Energy, min(Energy)), region_effect= ifelse(region_effec
t==max(region_effect), region_effect, max(region_effect)))%>%
  distinct()%>%
  ungroup()->TCGA_E9_A1N5_tumorandnormal_mirnaTCGA
```

3.2 Yarışmalı Ağ Tabanlı Model

Yarışmalı modeller iki farklı cinste eleman arasındaki etkileşimlerin anlaşılması için kullanılabilecek genel modellerdir. Buna örnek olarak parazit ve konak ilişkileri

verilebilir. Örneğin farklı türdeki popülasyonlarda etkili olan bir parazit topluluğu ele alındığında, herhangi bir müdahale olmadığında bu etkileşimler teorik olarak kararlı hal olarak nitelendirilebilen denge halindedir. Ancak hedeflerden birinin popülasyonunun arttığı düşünüldüğünde, parazit popülasyonun bu hedefe eğilimi artacak ve bunun ilk sonucu olarak diğer hedef popülasyonları üzerinde azalan parazit aktivitesi gözlenecektir. Bu durum ise diğer hedef popülasyonlarında artışa sebep olacak ve denge halinin bozulması ile sonuçlanacaktır. Bu etkileşimler sürekli artan veya azalan hedef popülasyon miktarlarının yeniden denge haline kavuşmasına kadar devam edecektir. Bu şekilde bir etkileşim ele alındığında eğer parazit popülasyonunda bir değişiklik olmadığı kabulü yapılırsa, hedef popülasyonlarındaki miktarlar aynı yönlü hareket eder. Diğer bir deyişle etkileşimde olan iki türden hedeflerden birinde artış diğerlerinde artışa, azalış ise azalışa sebep olur.

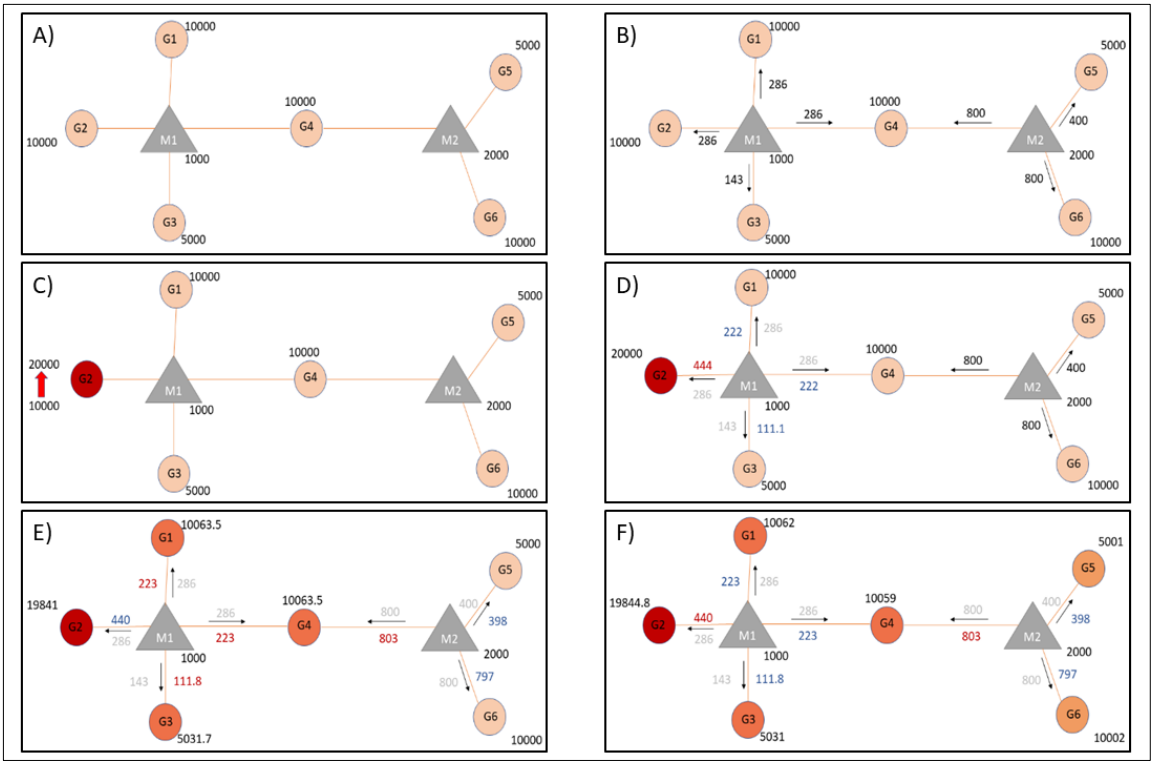
Bu durum mikroRNA ve hedef genlerin arasındaki etkileşimlerin anlaşılması için de kullanılabilir. Pek çok farklı çalışma mikroRNA hedeflerinin yarışmalı davranışlarını ele almıştır [163],[164],[167],[168],[190].

3.2.1 Yarışmalı Ağ Tabanlı Model Teorisi

MikroRNA ve hedeflerinin etkileşimlerinin incelenmesi için tez çalışmasında mikroRNA, gen ifadesi ve etkileşimlerde önemli olan faktörler kullanılarak ağ temelli yeni bir model yaklaşımı geliştirilmiştir. Bir mikroRNA'nın başka mikroRNA'larla etkileşimde olmayan hedeflerinin davranışlarını teorik olarak belirlemek nispeten daha kolaydır. Ancak birden fazla mikroRNA çeşidinin ve gen tipininin bulunduğu düşünüldüğünde etkileşimlerin sonuçlarını belirlemek karmaşıklaşmaktadır. Bu sebeple yeni yaklaşımın anlaşılabilmesi için ilk olarak yalnızca ifade değerlerine dayandırılan küçük bir sistemde teorik içerik açıklanmıştır. Kullanılan algoritmalar Ek-A'da sunulmuştur.

Şekil 3.2'de iki mikroRNA ve 6 genden oluşturulmuş bir ağ yapısı ele alınmıştır. Düğümlerin yanında gösterilen sayısal değerler ifade değerlerini betimlemektedir ve takibinin kolay olması için tam sayı olarak belirtilmiştir. Sistem öncelikle kararlı halde bulunmaktadır (Şekil 3.2 A). Bu şartlarda mikroRNA'ların dağılımının, hedeflediği genlerin ifadelerine bağlı olarak gerçekleştiği düşünülür (Şekil 3.2 B; bağlantılar üzerinde sayısal olarak ifade edilmiştir.).

Bu sistemde bir hedef genin ifadesinin değiştiği düşünüldüğünde (Şekil 3.2 C: G2 ifadesi iki katına çıkmıştır.), kararlı halin bozulması sonucunda etkileşimlerin sonuçları da değişecektir. Bu değişikliği takiben mikroRNA'ların hedeflerine dağılımları değişir (Şekil 3.2 D: bağlantılar üzerinde kırmızı, bir önceki iterasyona göre artış ve mavi, bir önceki iterasyona göre azalış olarak gösterilmiştir.). Bu durum ilk olarak, değişikliğin gözlendiği genin (G2) birincil dereceden etkileşimde olduğu mikroRNA (M1) ile doğrudan etkileşimde olan genlerin (G1, G3, G4) de düzenlenmesiyle sonuçlanır. Diğer hedef genler üzerinde mikroRNA'nın (M1) oransal olarak dağılımının düşmesini sonucunda ise ifadeleri artacaktır (Şekil 3.2 E).



Şekil 3.2 Yarışmalı gen hedeflerinin teorik olarak davranışı.

Bu etki mikroRNA ve hedef gen ifadelerine göre hesaplanmaktadır:

$$S_{mg} = \frac{S_g}{\sum S_g} \times S_m \qquad (3.3)$$

- S_g = Hedef gen için okuma sayısı.
- S_m = MikroRNA için okuma sayısı.
- S_{mg} = Gen başına düşen mikroRNA miktarı

Bu durumda iki mikroRNA'nın ortak hedefi olan genin ifadesinde meydana gelen değişiklik sonucunda sistemdeki diğer alt kümenin de kademeli olarak düzenlemesi gerekir. Bu durumda aynı şekilde M2 mikroRNA'nın da oransal dağılımı değişmekle birlikte (Şekil 3.2 E), bu durum diğer hedeflerin de yeniden düzenlenmesiyle devam eder (Şekil 3.2 F). Bütün bu süreçte Şekil 3.2'de açıklandığı gibi bir kararlı sistemde bir değişiklik, tüm ağ üzerinde bir takım yeniden düzenlenmeler ile sonuçlanmaktadır.

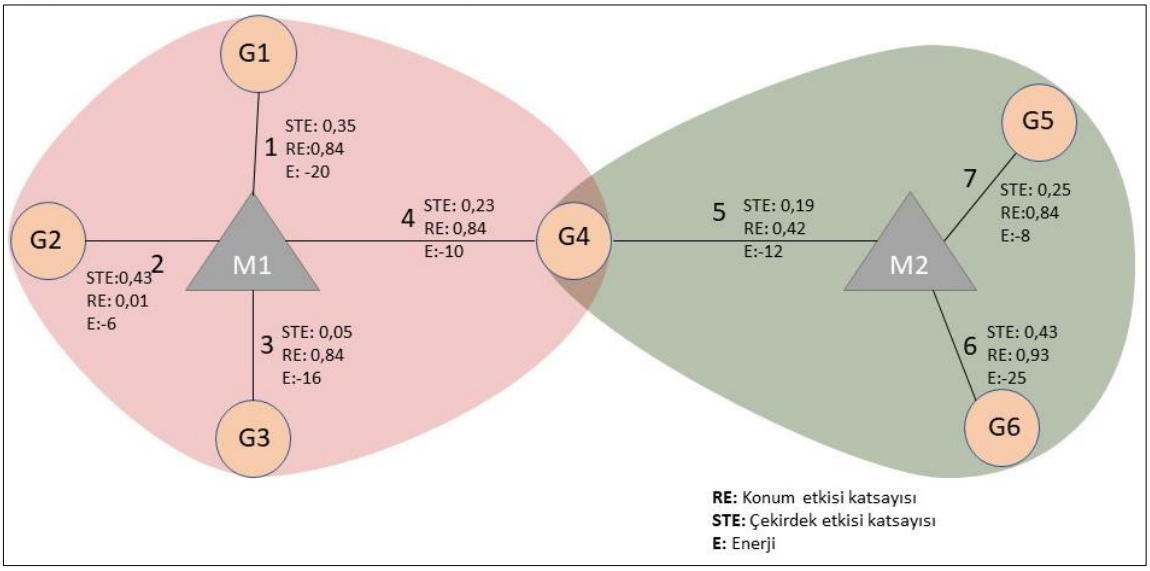
Yarışmalı bir modelin ele alınabilmesi için her aşamada yeniden düzenlenmelerin güncellenmesi ve sonuçlarının diğer aşama için girdi olarak kullanılması gerekmektedir. Buna uygun olarak tez çalışmasında geliştirilen algoritma ve fonksiyonlarla bir değişiklikle kararlı sistem bozulduğunda iteratif olarak her basamakta yeniden faktörlerin hesaplanması ve bunun, etkileşimin sonuçlarına yansıması sağlanmıştır. Modellemenin yapılması için purrr, dplyr, tidygraph, tidyr, svglite, stringr ve ggraph gibi pek çok paketten faydalanılmıştır [177],[178],[179],[191],[192],[193],[194].

3.2.2 Yarışmalı Ağ Tabanlı Modelin MikroRNA Aktivitesinde Önemli Olan Faktörler ile Genişletilmesi

Ağ tabanlı modelde mikroRNA akivitesinde önemli olan parametrelerin de kullanılması için model içeriğinde değişiklikler gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde yaklaşımın anlaşılması için sunulan veri seti örnek verileri içermektedir. Diğer bir deyişle kullanılan değişkenler gerçek verilerle uyumlu şekilde tanımlanmakla birlikte doğrudan hasta veri setlerinden seçilmemiştir. Ağ yaklaşımlarında düğümlerin kümelendirilmesi için farklı fonksiyonlar kullanılmaktadır. Bu fonksiyonlar farklı düğümler ile etkileşimde olsa dahi bir düğümün sadece bir küme üyesi olarak kabul edilmesine sebep olmaktadır. Bu sebeple mikroRNA:hedef etkileşimlerinde ise bir hedef üzerinde iki veya daha fazla mikroRNA'nın aktivitesinin anlaşılması gerektiği için mikroRNA'lara göre gruplandırma işlemi yapılmıştır (Şekil 3.3, STE: çekirdek tipi etkisi, RE: hedef bölgenin konumunun etkisi, E: Enerji).

MikroRNA aracılı olarak gen düzenlenmesini konu alan ağ tabanlı model mikroRNA ve gen ifadesinin yanı sıra mikroRNA aktivitesinde önemli olan faktörleri de içermektedir. Modelde öncelikle mikroRNA ifadesininin hedeflerine dağılımı, gen ifadesine göre çekirdek tipi ve bağlanma enerjisinin hesaba katılmasıyla gerçekleştirilir. Hedefiyle

bağlanma gerçekleştirdiği düşünülen mikroRNA'nın baskılayıcı fonksiyonu ise hedef üzerindeki bağlanma bölgesinin konumunun hesaba katılması ile bulunmaktadır. Bunun sonucunda mikroRNA'nın hedefi üzerindeki baskılayıcı aktivitesi ağ yapısının bağlantı değişkenlerine atanır. Kararlı haldeki sistemde mevcut değişkenlere göre her bir mikroRNA:hedef bağlantısı için baskılama aktivitesi tanımlanmıştır. Kararlı halde bulunan sistemde bir değişiklik (bir genin ifadesinde değişiklik gibi) meydana geldiğinde mikroRNA ifadesinin hedef ifadesine göre dağılımlarında değişiklik ortaya çıkar. Ancak bu değişikliğin etkileşimde olan diğer genleri etkileme gücü, hedef ve mikroRNA arasındaki etkileşim faktörlerine göre değişkenlik gösterir. Kısaca açıklanan model yaklaşımının detayları bu bölümde ele alınmıştır.



Şekil 3.3 Örnek ağ yapısında gruplandırma ve etkileşimler.

Örnek ağ yapısında uygulanacak formülasyonlar için örnek değişkenler Çizelge 3.17'de gösterildiği gibi tanımlanmıştır. Çizelge 3.17 üzerinde bordo ile işaretlenmiş alan M1 mikroRNA'nın bulunduğu grubu temsil ederken, yeşil çerçevelenmiş etkileşimler ise M2 mikroRNA'nın bulunduğu grubu temsil etmektedir. Bununla birlikte 4. ve 5. etkileşim ise (Çizelge 3.17'de mavi ile çerçevelenmiş etkileşimler) G4 geninin M1 ve M2 ile etkileşiminin değişkenlerini göstermektedir.

Çizelge 3.17 Örnek veri seti için etkileşimde önemli faktörlerin örneklendirilmesi.

Etkileşim	MikroRNA ifadesi	Gen ifadesi	Enerji	Çekirdek tipi	Hedef bölge konumu	Çekirdek tipi etkisi	Bölge etkisi
1	1000	10000	-20	8-mer_noncanonical	3’ UTR	0.35	0.84
2	1000	10000	-6	8-mer	5’ UTR	0.43	0.01
3	1000	5000	-16	6-mer_noncanonical	3’ UTR	0.05	0.84
4	1000	10000	-10	7-mer	3’ UTR	0.23	0.84
5	2000	10000	-12	7-merA1	CDS	0.19	0.42
6	2000	10000	-25	9-mer	3’ UTR+CDS	0.43	0.93
7	2000	5000	-8	7-mer-8m	3’ UTR	0.25	0.84

Enerji katsayısı herhangi bir normalizasyon işlemine tabi tutulmadan, doğrudan model içerisinde kullanılmıştır. MikroRNA hedeflerinin gruplandırılmasından sonra mikroRNA aktivitesinde önemli olan çekirdek tipi ve hedef dizi konumu faktörleri, gruplar içerisinde aşağıdaki formülasyonlara göre derecelendirilir:

$$STE' = \frac{STE}{\max(STE_g)} \tag{3.4}$$

- STE = Çekirdek tipi etki katsayısı
- $\max(STE_g)$ = Grup içerisindeki maksimum çekirdek tipi katsayısı

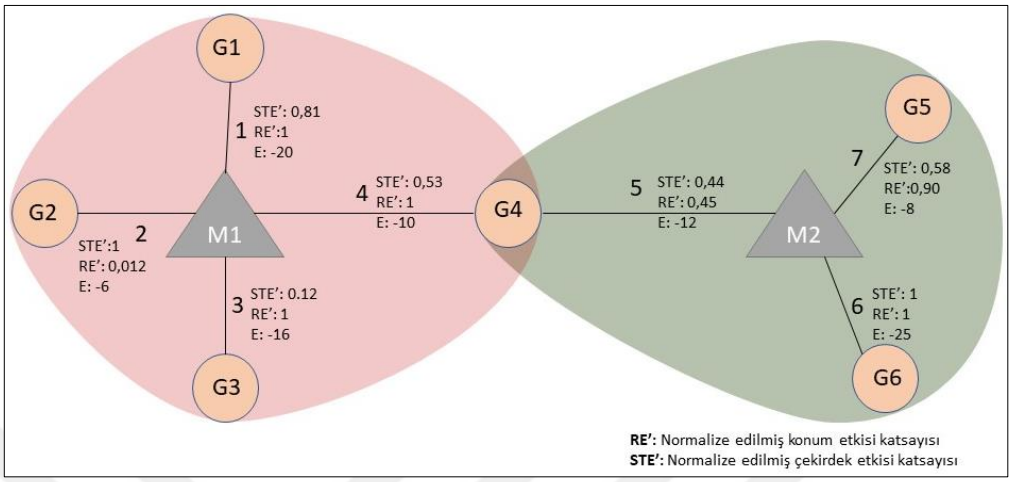
$$RE' = \frac{RE}{\max(RE_g)} \tag{3.5}$$

- RE = Hedef üzerinde bağlanmanın konum katsayısı
- $\max(RE_g)$ = Grup içerisindeki maksimum hedef dizi konumu katsayısı

MikroRNA aktivitesinde önemli olan faktörler gruplar içerisinde derecelendirildiğinde Şekil 3.4’teki şekilde bağlantı değişkenleri güncellenmektedir. Örnek olarak 5. etkileşim, M2 mikroRNA’nın bulunduğu grubun içerisindedir. M2 mikroRNA grubunda çekirdek tipi katsayısı ve bölge katsayısı açısından en yüksek değerler 6. bağlantıda bulunmaktadır. Bu durumda 5. etkileşim için bölge etkisi ve çekirdek tipi etkisi aşağıdaki gibi hesaplanmaktadır.

$$Çekirdek\ tipi\ etkisi_5 = \frac{5.\ Etkileşimin\ çekirdek\ tipi\ etkisi}{6.\ \text{Etkileşimin çekirdek tipi etkisi}} \quad \frac{0.19}{0.43} => 0.44$$

$$Bölge\ etkisi_5 = \frac{5.\ Etkileşimin\ bölge\ etkisi}{6.\ \text{Etkileşimin bölge etkisi}} = \frac{0.42}{0.93} => 0.45$$



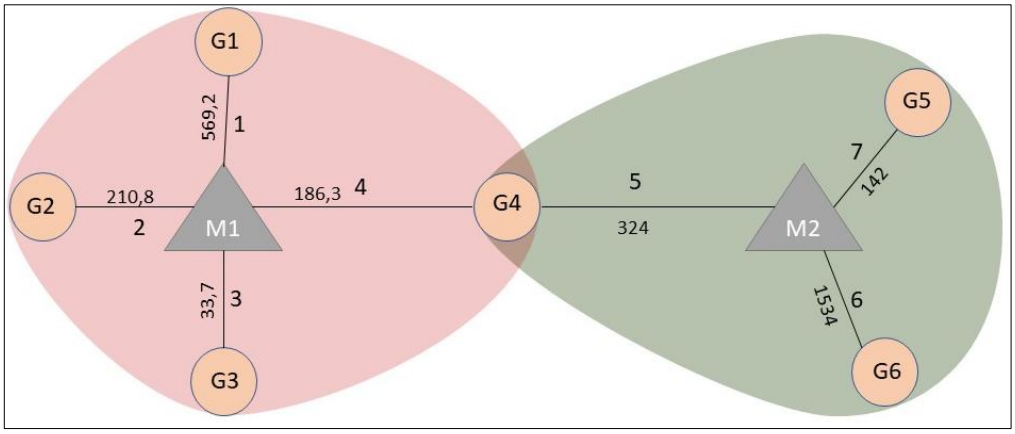
Şekil 3.4 Örnek ağ yapısında etkileşim katsayılarının derecelendirilmesiyle bağlantı değişkenleri.

MikroRNA aktivitesinde önemli olan faktörler düzenlendikten sonra mikroRNA oransal dağılımını etkileyen, mikroRNA:hedef etkileşiminde önemli olan, faktörler ve mikroRNA:hedef eşleşmesinden sonra baskılama fonksiyonunu etkileyen faktörler model içerisinde farklı şekillerde kullanılmaktadır. MikroRNA'nın hedeflerine ifadeleri oranında dağılmasında önemli olan faktörler enerji ve çekirdek tipidir. Bu sebeple 3.3 eşitliği bu değişkenlerle modifiye edilerek yeni bir formülasyon kullanılmıştır:

$$S_{mg} = \frac{S_g \times |E| \times STE'}{\sum(S_g \times |E| \times STE')} \times S_m \qquad (3.6)$$

- $E =$ Enerji
- $S_{mg} =$ Gen başına düşen mikroRNA miktarı
- $S_m =$ MikroRNA için okuma sayısı
- $S_g =$ Hedef gen için okuma sayısı.
- $STE' =$ Normalize edilmiş çekirdek tipi katsayısı

Çekirdek tipi ve enerji faktörünün kullanılması sonrasında ise mikroRNA dağılımı Şekil 3.5'teki gibi gerçekleşmektedir.

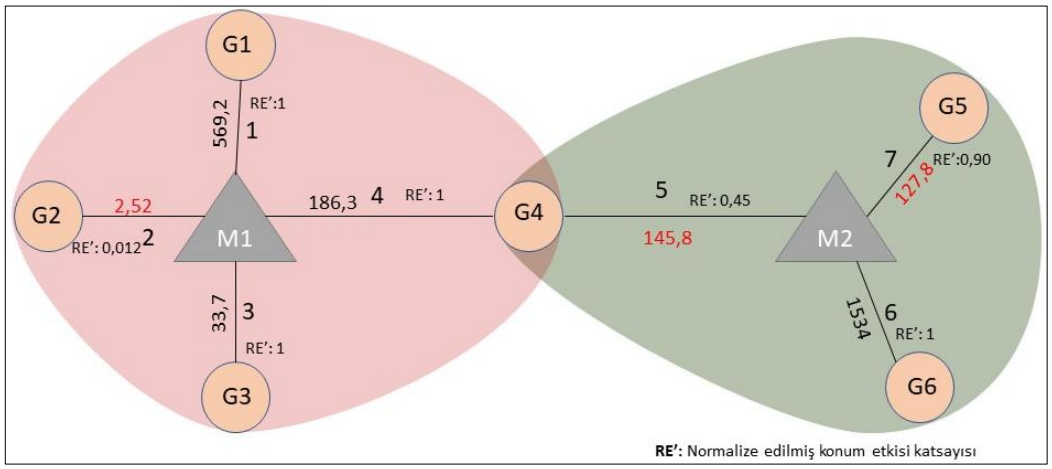


Şekil 3.5 Örnek ağ yapısında hedef ifadesi, enerji ve çekirdek tipine göre mikroRNA dağılımı.

MikroRNA dağılımının hedef genlerin ifadesine, çekirdek tipi ve enerjiye göre dağılımının gerçekleştirilmesinden sonra, hedef gen okuma sayısında mikroRNA dağılımı kadar azalış gözlenmesi beklenir. Ancak mikroRNA ve hedef arasındaki her eşleşme hedef ifadesinde azalmaya sebep olmamaktadır. Bunu ise mikroRNA ve hedef arasında eşleşme gerçekleşen dizinin hedef üzerindeki konumu, bölge etkisi, belirlemektedir. Bölge etkisi hesaba katılarak mikroRNA'nın hedefleri üzerindeki baskılama etkinliği belirlenmektedir:

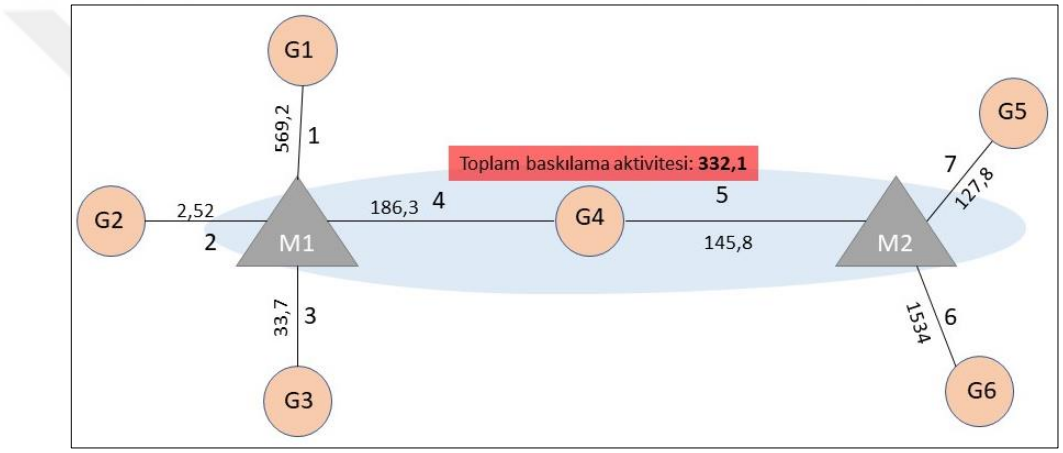
$$Eff_g = S_{mg} \times RE' \quad (3.7)$$

- Eff_g = Gen üzerindeki etkinlik
- S_{mg} = Gen başına düşen mikroRNA miktarı
- RE' = Normalize edilmiş hedef üzerinde bağlanmanın konum katsayısı



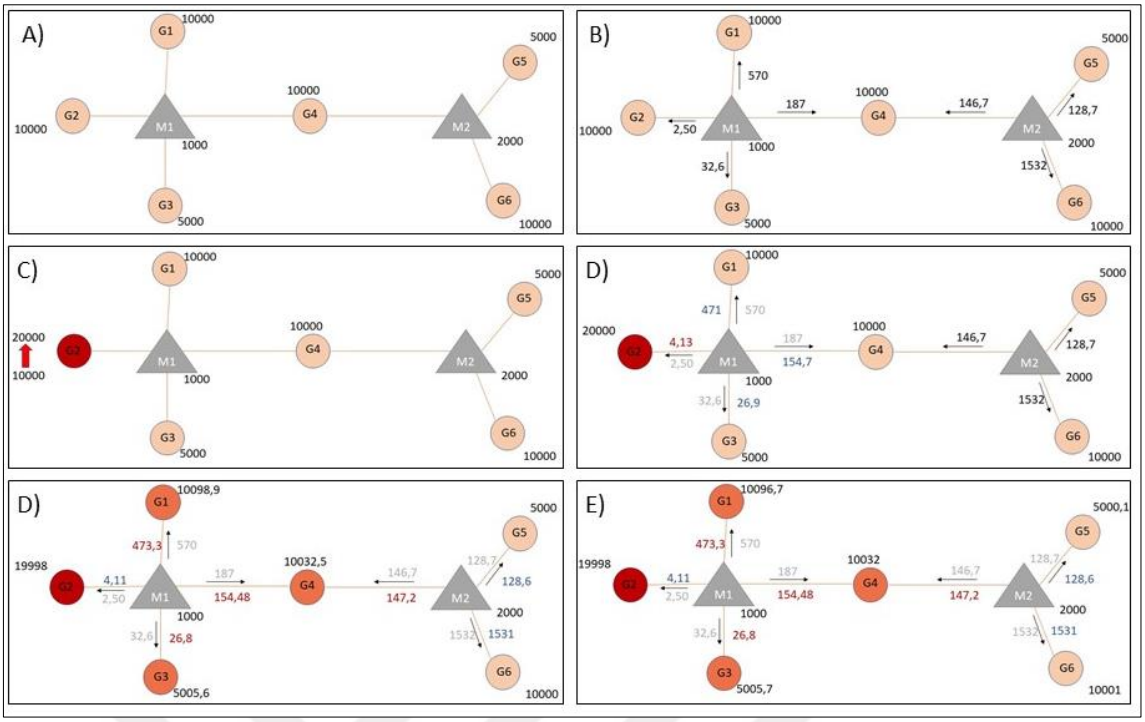
Şekil 3.6 Örnek ağ yapısında mikroRNA dağılımının bölge etkisi faktörü katkısı ile baskılama etkinliği.

Bu işlemler sonucunda elde edilen değerler mikroRNA'nın hedefi üzerinde mevcut baskılama etkinliğini belirtmektedir. MikroRNA'lar tarafından ortak hedeflenen genler üzerindeki baskılama etkinliği ise gruplandırma işlemi sonlandırılan ağ yapısında, genlere göre gruplandırma yapılması ile iki mikroRNA tarafından gerçekleştirilen aktivitenin toplamı olarak ifade edilir ve bu şekilde kooperatif etki de sağlanmaktadır. Şekil 3.7'de gösterildiği gibi ortak hedeflenen G4 geni üzerinde iki hedefleyici mikroRNA'nın baskılayıcı aktivitesi toplam olarak ele alınmaktadır. Kararlı halde gen ifadesi değerlerinin mikroRNA baskılama aktivitesinin sonucundaki hali olarak düşünülmektedir. Diğer bir deyişle kararlı halde G4 geninin ifadesinin 10332,1 olduğu ve mikroRNA baskılama aktivitesi sonucunda 10000 olduğu kabul edilmektedir.



Şekil 3.7 Örnek ağ yapısında mikroRNA baskılama aktivitesi.

Model ağ yapısında bulunan genlerden herhangi birinde meydana gelen değişiklik sonrasında, değişkenlerin kullanılmasıyla hesaplanan, gen okuma sayısı cinsinden elde edilen, mikroRNA baskılayıcı aktivitesi değişmektedir. Bu değişim Bölüm 3.2.1'de bahsedilen prensibe dayandırılarak gerçekleşmektedir (Şekil 3.8). Ancak, mikroRNA ifadesinin hedefe dağılımı ve hedef üzerindeki baskılayıcı aktivitesi bu bölümde anlatıldığı gibi mikroRNA ifadesi, hedef gen ifadesi, çekirdek tipi, enerji ve hedef üzerinde eşleşme dizisi konumuna bağlı olarak hesaplanmaktadır.



Şekil 3.8 MikroRNA aktivitesinde önemli faktörlerin hesaba katılmasıyla örnek veri setinde model uygulama.

Örneğin Şekil 3.8'de gösterildiği gibi gerçekleştirilen bir düzenlenmede G2 hedefinin ifadesinde artış olması sonucunda, kararlı haldeki (Şekil 3.8 B) hedef üzerindeki mikroRNA aktivitelerinde değişiklik meydana gelmektedir. Kararlı halde G4 hedefi ele alınırsa, ifadesinin (10332,1) 332,1'ini M1 ve M2 mikroRNA'ların baskıladığı ve ortamda serbest halde 10000 G2 bulunduğu düşünülür. Meydana gelen değişiklik sonucunda ise G4 üzerinde M1 ve M2 toplam baskılayıcı aktivitesi ~300'e düşmektedir (Şekil 3.8 E). Sabit bir hızla G4 transkripsiyonunun gerçekleştiği düşünülürse 10332,1 olarak ifade edilen G4 üzerinde, azalan toplam M1 ve M2 baskılama aktivitesi sonrasında G4 gen ifadesi ~10032 (10332-300) olarak bulunur[1]. Gerçekleştirilen çalışmanın uygulamasına dair ayrıntılar Ek-A'da sunulmuştur.

[1] Örnek olarak gerçekleştirilen işlemler ve bu işlemlere dayanan görseller, ondalık basamaklarda anlamlı sayı dönüşümleri yapıldığı için yaklaşık (~) değerler olarak sunulmuştur.

3.2.3 Meme Kanser Hasta Örneklerinde Ağ Tabanlı Modelin Uygulanması

Tez çalışmasında gen ifadesindeki herhangi bir değişikliğin, mikroRNA'lar aracılığıyla etkileşimde olan tüm genlerin düzenlenmesindeki etkisi belirlenmeye çalışılmıştır. TCGA veri tabanından elde edilmiş verilerden seçilen TCGA-A7-A0CE ve TCGA-E9-A1N5 hastaları bu amaçla geliştirilen model için kullanılmıştır. Bölüm 3.2.2'de örnek olarak gösterildiği gibi mikroRNA:hedef gen etkileşimlerinin akıbetini belirleyici çekirdek tipi, bağlanma enerjisi ve bağlanma bölgesinin hedef üzerindeki konumu parametreleri de model içerisinde kullanılmıştır.

Geliştirilen modelde hedeflerin, hedefleyici mikroRNA'lara karşı sergilediği yarışmalı davranışların anlaşılabilmesi önemlidir. Bu sebeple sistem, her mikroRNA ve çevresinde konumlanmış hedef genlerin bir küme gibi düşünülmesi ve bu kümelerin ortak genler aracılığıyla etkileşimde olmasına dayandırılarak kurulmuştur. Ayrıca mikroRNA ve hedef arasındaki etkileşimlerde önemli olan faktörler ise bağlantılara değişken olarak yüklenmiştir. Kurulan model için işlem basamakları kısaca aşağıda belirtilmiştir:

- Meme kanser hastalarının normal doku örneklerinin mikroRNA:hedef gen veri setlerinin ağ yapısına dönüştürülmesi,
- Ağ yapısı üzerinde değişkenlerin tanımlanması, değişkenlerin her bir basamak için hesaplanmasını sağlayan formülasyonların eklenmesi,
- Meme kanser hastasının tümör dokusunda ifadesi değişen bir gen belirlenmesi ve bu genin tümör dokusundaki ifade değerinin elde edilmesi,
- Meme kanser hastasının normal doku örneğinin ağ yapısında, önceki basamakta seçilen genin ifadesinin güncel değer olarak değiştirilmesi,
- Bu değişikliğin tetikleyici olarak kullanılması ile yeniden düzenlenme dizisinin başlatılması.

3.2.3.1 Meme Kanseri Hasta Örneklerinde Gen İfadesi Değişimi ile Model Uygulanması

Seçilen iki hasta örneği için uygulama yapılırken geniş bir algoritma kullanılması gerekmektedir. Tez çalışmasında veri setlerinin işlenmesi ve modelin kurulması işlemleri

için bir dizi fonksiyon tanımlanmıştır. İşlemler sırasında kullanılan fonksiyonlar için dplyr, tidygraph, ggraph, tidyr, purrr, svglite paketlerinin komutlarından faydalanılmıştır [177],[179],[191],[192],[193],[194],[195]. Çizelge 3.18'de TCGA- A7-A0CE-11A hasta örneği için uygulama yapılmıştır.

Modelde kritik noktalardan biri çalışmada geliştirilen simulate() fonksiyonunda kullanılan iterasyon sayısıdır. Model uygulamanın yapılacağı ağ yapısındaki etkileşimlere, değişikliğin tetiklendiği gene ve değişik miktarına göre bu sayı değişkenlik göstermektedir. Tez çalışmasında bu sayının ağ yapısına göre elde edilebilmesi için farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bunun sonucunda ise find_iteration() fonksiyonu geliştirilmiştir (Çizelge 3.18).

Çizelge 3.18 Algoritma 13

```
library(tidyr)
library(dplyr)
library(tidygraph)
library(igraph)
library(ggraph)
library(svglite)
library(purrr)

TCGA_A7_A0CE_tumorandnormal_mirnaTCGA%>%
  dplyr::select(genes=Ensembl_Gene_Id, mirna=miRNA, hgnc_symbol, Genee
xpression=gene_expression_normal_htseq_counts, mirnaexpression=mirnaex
pression_normal, seed_type_effect,region_effect,  Energy)%>%
  as_tbl_graph()-> A7_modelgraph

find_iteration(A7_modelgraph, "ABCC1", 2.35) #53

A7_modelgraph%>%
  priming()%>%
  update_nodes(once = TRUE)%>%
  gene_update_how("ABCC1", 2.35)%N>%
  update_nodes()%>%
  simulate(cycle = 53) ->result_graph_A7
```

Çizelge 3.18'de bir hasta için veri setleri "graph" objesine dönüştürülmüştür. Tidygraph paketinde çalıştırılacak verilerin içeriklerinin sırası önemlidir. Bu sebeple, ağ yapısında etkileşimde olan düğümler ilk iki değişken olarak atanmıştır. Hasta için mikroRNA:hedef etkileşimini içeren temel "graph" objesinin elde edilmesinden sonra, tez çalışmasında üretilmiş bir takım fonksiyonlar kullanılmıştır. Kullanılan fonksiyonlar ve işlevleri aşağıdaki gibidir:

- priming: Temel ağ yapısındaki verinin işlenilerek düğüm tiplerinin ve etkileşimlerde önemli olan değişkenlerin tanımlanması.

Priming fonksiyonu temel değişkenleri içeren girdi olarak kullanılan ağ yapısında düğüm tiplerinin "mirna" ve "gen" olarak tanımlanmasını sağlamaktadır. Bunun yanında hedef gen gruplarının oluşumunu, mikroRNA aktivitesinde önemli olan faktörlerin derecelendirilmesini ve bu faktörlerin hesaba katılması ile kararlı halde mikroRNA'ların hedefleri üzerindeki baskılayıcı aktivitesinin tanımlanmasını sağlamaktadır.

- update_nodes: Verilerin bağlantı bölümünde bulunan değişkenler yardımı ile düğüm verilerinin de güncellenmesi.

Geliştirilen modelde mikroRNA ve gen ifadesinin görsel sunumunun ve model takibinin yapılabilmesi için bağlantı değişkenlerinde bulunan gen ve mikroRNA ifadeleri düğüm değişkenlerine atanmaktadır. Bu sayede ifade değişimlerinin takibinin daha kolay olması sağlanmıştır.

- gene_update_how: Düğümler içerisinden seçilen bir genin ifadesinde belirtilen miktarda arttırılması.

Bir gen ifadesindeki değişikliğin bağlantı verilerinde güncellenmesini sağlamaktadır.

- simulate: Model içerisinde bulunan formülasyonlara uygun şekilde iteratif olarak fonksiyonların çalıştırılması.

Simulate fonksiyonu ağ yapısında bir değişiklik meydana gelmesi durumunda mikroRNA dağılımı ve baskılama aktivitesini belirleyen formülasyonların çalıştırılmasını ve sistemdeki genlerin ifadesine yansıtılmasını sağlamaktadır. Bununla birlikte içeriğinde update_nodes() fonksiyonu bulunduğu için bağlantı verilerinden düğüm verilerinin güncellenmesini de sağlamaktadır.

Geliştirilen algoritma ve fonksiyonlar kısaca, normal doku mikroRNA ve gen ifadeleri içeren bir veri setinde, aynı hastanın tümör dokusundaki bir genin ifadesinin, tümör dokusundaki ifadesine getirilmesi durumunda değişikliklerin nasıl gerçekleşeceğini ve nihai durumun ne olacağını belirlemek ve görüntülemek için kullanılmıştır. Bu değişiklikler belirlenirken mikroRNA:hedef etkileşiminde önemli olan tüm faktörler geliştirilen algoritma ile hesaba katılabilmiştir. Bu bölümde kullanılan fonksiyonların içerikleri Ek-A'da bulunmaktadır.

Gen ifadesi değişimine dayanarak gerçekleştirilen model çalışmasında elde edilen sonuçlarla ifade değişim analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz için aşağıdaki formüller kullanılmıştır:

$$\text{İ}fade\ değişimi_{deneysel} = \log_2 \frac{Tümör\ dokusundaki\ gen\ ifadesi}{Normal\ dokudaki\ gen\ ifadesi} \quad (3.8)$$

$$\text{İ}fade\ değişimi_{model} = \log_2 \frac{Model\ sonuçlarında\ gen\ ifadesi}{Normal\ dokudaki\ gen\ ifadesi} \quad (3.9)$$

3.2.3.2 Meme Kanseri Hasta Örneklerinde MikroRNA İfadesi Değişimi ile Model Uygulanması

Geliştirilen modelin esnek bir yapıda olması uygulanabilirlik açısından avantajını oluşturmaktadır. Model içerisinde etkileşimlerde önemli olan herhangi bir değişkende değişiklik yapıldığında model davranışının ne olacağı önem taşımaktadır. Bu yönde mikroRNA:hedef etkileşimlerinde önemli olan diğer faktörlerden mikroRNA ifadesinin değişiminde yeniden düzenlenmelerin tespiti de gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasının bu aşamasında hasta örneklerinin normal dokulardaki mikroRNA ifadelerinin tümör dokusundakine değiştirilmesi sonucunda yeniden düzenlenmeler tespit edilmiştir. Temel işlem basamakları ise aşağıdaki gibidir:

- Meme kanser hasta örneklerinin mikroRNA:hedef gen veri setlerinin ağ yapısına dönüştürülmesi,
- Ağ yapısı üzerinde değişkenlerin tanımlanması, değişkenlerin her bir basamak için hesaplanmasını sağlayan formülasyonların eklenmesi,
- MikroRNA ifade veri setinden aynı hastaların tümör örneklerinden mikroRNA ifadelerinin elde edilmesi,

- Normal dokudaki mikroRNA ifadelerinin, elde edilen tümör dokusu mikroRNA ifade verilerine güncellenmesi,
- MikroRNA ifadesindeki değişikliklerin tetikleyici olarak kullanılması ile yeniden düzenlenmelerin incelenmesi,

Bu işlem basamaklarında algoritma genel itibari ile aynı kalmakla birlikte birtakım değişiklikler ile işlemler gerçekleştirilmiştir. Temel olarak model içerisinde değişikliklerin yansıtılabilmesi için, değişkenlerin bir önceki basamaktaki ve güncel değerleri tutulmalıdır. Gen ifade değişimine dair model uygulamasında gen ifadesinin güncel ve önceki değerleri tutulurken mikroRNA ifadesinin değişiminde ise mikroRNA'lar için de önceki ve güncel değerlerinin model veri setinde tutulması sağlanmıştır. Ancak model gen ifadesi değişimine dayanarak çalıştırıldığında gen ifadesinde sürekli güncelleme gerçekleştirilirken, mikroRNA ifadesindeki değişime dayandırılarak çalıştırıldığında bütün mikroRNA ifadelerinde yalnızca bir kere değişiklik olduğu ve bunun sonucunda gen ifadelerinin iteratif olarak değiştiği prensibi ile işlemler gerçekleştirilmektedir. Bu aşama için kullanılan komutlar ve geliştirilen fonksiyon Ek-A'da sunulmuştur. İşlemler sırasında dplyr [177], tidygraph [191], ggraph [192], igraph [195], tidyr [179], purrr [193] paketlerinin komutlarından faydalanılmıştır. Geliştirilen model yaklaşımında aynı temel prensibe dayandırılarak (mikroRNA aktivitesindeki öenmli faktörler hesaba katılarak, mikroRNA'ların hedeflere oransal olarak dağılımındaki değişiklik) çalıştırılmıştır. Bu amaçla verisetinde normal dokudaki mikroRNA ifade değerleri, tümör dokularındaki ifade değerlerine güncellenmiştir. Aynı anda pek çok mikroRNA'nın ifadesinde meydana gelen değişiklik tetikleyici olarak kullanılmış ve belirli bir sayıda iterasyonla model simüle edilmiştir (Çizelge 3.19).

Çizelge 3.19 Algoritma 14

```
mirnaTCGA%>%
  filter(startsWith(barcode, "TCGA-E9-A1N5-01A"))%>%
  distinct()-> TCGA_E9_A1N5_mirna_gene_tumor

TCGA_E9_A1N5_tumorandnormal_mirnaTCGA%>%
  left_join(TCGA_E9_A1N5_mirna_gene_tumor%>%select(miRNA, total_RPM),
by = "miRNA")%>%
  mutate(mirnaexpression_tumor = ifelse(is.na(total_RPM), 0, total_RPM
))%>%
  select(-total_RPM)->TCGA_E9_mirnachanges_tumor

find_perturbation_bymirna(TCGA_E9_mirnachanges_tumor, 30) ->mirna_chan
ges_E9
```

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yeni nesil dizileme yöntemlerinin geliştirilmesi, pek çok hastalığın sebep ve sonuçlarının açıklanmasını sağlayan verilerin elde edilmesini kolaylaştırmıştır. Dünyada en çok çalışılan konulardan biri olan kanser için yeni nesil dizileme yaklaşımlarının, kanser moleküler düzenlenmelerinin tanı ve tedavi yöntemleri için kullanılması yönünde çalışmalar artmıştır.

Kanserde gen düzenlenmelerinde etkili en önemli faktörlerden biri mikroRNA'lardır. MikroRNA'lar temel olarak hedef gen transkriptleriyle etkileşime girerek, transkriptin yıkımını veya translasyonunun inhibisyonunu sağlamaktadır. Hedefleri üzerinde baskılayıcı etkinlik sergileyen mikroRNA'ların, hedeflerinin tümör baskılayıcı veya onkogenik özellikte olması kanser için kritiktir. MikroRNA'ların hücrede önemli fonksiyonlarının tanımlanmasını takiben mikroRNA hedeflerinin belirlenmesini sağlayan yeni nesil dizileme yöntemlerini içeren yüksek verimli deneysel yaklaşımlar geliştirilmiştir.

MikroRNA'lar ve hedefleri arasındaki etkileşimlerin anlaşılması ve kritik fonksiyonlu mikroRNA veya hedef genlerin belirlenmesi için genellikle dizileme sonuçlarının birlikte analizi gerçekleştirilmektedir. Ancak mikroRNA ve hedefleri arasında çoklu etkileşimlerin gözlenmesi sebebiyle mikroRNA aracılı olarak gen ifadelerinin anlamlandırılması zordur. Bu sebeple güncel yaklaşımlar çoklu etkileşimleri sunabilecek ağ tabanlı modeller ve biyoinformatik analizleri önermektedir.

Tez çalışmasında bu sebeple mikroRNA:hedef etkileşimlerinin modellenmesi ve modelin meme kanser hastalarının yeni nesil dizileme verileri üzerinden testi gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları sunulmuştur.

4.1 Elde Edilen Veri Setleri ve İçerikleri

Veri analizlerinde en kritik aşama, verilerin çalışmanın amacına uygun şekilde düzenlenmesi sürecidir. Özellikle büyük veri setleri ile gerçekleştirilen çalışmalarda veri setindeki kullanılmayacak olan değişkenlerin tutulması hem işlem basamaklarının uzun sürmesine hem de analizlerde hatalara yol açmaktadır. Bu amaçla Bölüm 3.1'de açıklandığı gibi tez çalışmasının amacına uygun değişkenleri içeren veri setleri düzenlenmiştir. İşlemler sonucunda meme kanser hastalarının gen ifadesi (Çizelge 4.1) ve mikroRNA ifadesi (Çizelge 4.2) yeni nesil dizileme verileri, insanda deneysel olarak kanıtlanmış mikroRNA:hedef verileri (Çizelge 4.3) elde edilmiştir.

Çizelge 4.1'de meme kanseri hasta örneklerinde, örnek bilgilerinin yanında gen kodu (ensembl_gene_id), gen sembolü (External_gene_name) ve gen ifadesi değerleri (gene_expression) 17 gen için örnek olarak sunulmuştur. Çizelge 4.2'de meme kanseri hasta örneklerinde, hasta barkodunun yanında mikroRNA mirBase kodu (mirbase_ID), mikroRNA adı (miRNA), öncü mikroRNA kodu (Precusor), farklı mikroRNA gen bölgelerinden toplam olgun mikroRNA okuma sayısı (total_read) ve farklı mikroRNA gen bölgelerinden toplam normalize edilmiş olgun mikroRNA okuma sayısı (total_RPM, toplam milyonda okuma sayısı) 16 mikroRNA için örnek olarak sunulmuştur. Çizelge 4.3'te mikroRNA:hedef veri setlerinin birleştirilmesi sonrasında gen adı (hgnc_symbol), gen kodu (Ensembl_Gene_Id), mikroRNA adı (miRNA), çekirdek tipi (seed_type), bağlanma enerjisi (Energy), bağlanma gerçekleştirilen dizinin hedef üzerindeki konumu (region) çekirdek tipinin mikroRNA aktivitesinde etki katsayısı (seed_type_effect) ve hedef bölgenin mikroRNA aktivitesine etki katsayısı (region_effect) hsa-let-7a-5p'nin gerçekleştirdiği bazı bağlanmalar için örnek olarak sunulmuştur.

Meme kanseri hasta örneklerine dair mikroRNA ve gen ifadesi veri setleri incelendiğinde bu verisetlerinin anlamlı şekilde birleştirilebilecek ortak değişkenleri içerdiği görülmüştür (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te kırmızı ile işaretlenmiş alanlar ile gösterilmiştir.).

Çizelge 4.1 Meme kanseri hastalarında gen ifadesi verilerinde 17 genin ifadesini içeren örnek veri seti.

patient	sample	barcode	definition	ensembl_gene_id	External_gene_name	gene_expression
TCGA-AC-A3W5	TCGA-AC-A3W5-01A	TCGA-AC-A3W5-01A-11R-A22K-07	Primary solid Tumor	ENSG00000000003	TSPAN6	3113
TCGA-AC-A3W5	TCGA-AC-A3W5-01A	TCGA-AC-A3W5-01A -11R-A22K-07	Primary solid Tumor	ENSG00000000005	TNMD	27
TCGA-AC-A3W5	TCGA-AC-A3W5-01A	TCGA-AC-A3W5-01A-11R-A22K-07	Primary solid Tumor	ENSG00000000419	DPM1	1608
TCGA-AC-A3W5	TCGA-AC-A3W5-01A	TCGA-AC-A3W5-01A-11R-A22K-07	Primary solid Tumor	ENSG00000000457	SCYL3	2371
TCGA-AC-A3W5	TCGA-AC-A3W5-01A	TCGA-AC-A3W5-01A-11R-A22K-07	Primary solid Tumor	ENSG00000000460	C1orf112	501
TCGA-AC-A3W5	TCGA-AC-A3W5-01A	TCGA-AC-A3W5-01A-11R-A22K-07	Primary solid Tumor	ENSG00000000938	FGR	1242
TCGA-AC-A3W5	TCGA-AC-A3W5-01A	TCGA-AC-A3W5-01A-11R-A22K-07	Primary solid Tumor	ENSG00000000971	CFH	3113
TCGA-AC-A3W5	TCGA-AC-A3W5-01A	TCGA-AC-A3W5-01A-11R-A22K-07	Primary solid Tumor	ENSG00000001036	FUCA2	2617
TCGA-AC-A3W5	TCGA-AC-A3W5-01A	TCGA-AC-A3W5-01A-11R-A22K-07	Primary solid Tumor	ENSG00000001084	GCLC	1347
TCGA-AC-A3W5	TCGA-AC-A3W5-01A	TCGA-AC-A3W5-01A-11R-A22K-07	Primary solid Tumor	ENSG00000001167	NFYA	2523
TCGA-AC-A3W5	TCGA-AC-A3W5-01A	TCGA-AC-A3W5-01A-11R-A22K-07	Primary solid Tumor	ENSG00000001460	STPG1	532
TCGA-AC-A3W5	TCGA-AC-A3W5-01A	TCGA-AC-A3W5-01A-11R-A22K-07	Primary solid Tumor	ENSG00000001461	NIPAL3	1214
TCGA-AC-A3W5	TCGA-AC-A3W5-01A	TCGA-AC-A3W5-01A-11R-A22K-07	Primary solid Tumor	ENSG00000001497	LAS1L	2430
TCGA-AC-A3W5	TCGA-AC-A3W5-01A	TCGA-AC-A3W5-01A-11R-A22K-07	Primary solid Tumor	ENSG00000001561	ENPP4	947
TCGA-AC-A3W5	TCGA-AC-A3W5-01A	TCGA-AC-A3W5-01A-11R-A22K-07	Primary solid Tumor	ENSG00000001617	SEMA3F	5794
TCGA-AC-A3W5	TCGA-AC-A3W5-01A	TCGA-AC-A3W5-01A-11R-A22K-07	Primary solid Tumor	ENSG00000001626	CFTR	68
TCGA-AC-A3W5	TCGA-AC-A3W5-01A	TCGA-AC-A3W5-01A-11R-A22K-07	Primary solid Tumor	ENSG00000001629	ANKIB1	3087

Çizelge 4.2 Meme kanseri hastalarında mikroRNA ifadesi verilerinde 16 mikroRNA'nın ifadesini içeren örnek veri seti.

barcode	mirbase_ID	miRNA	Precusor	total_read	total_RPM
TCGA-A2-A0ST-01A-12R-A085-13	MIMAT0000062	hsa-let-7a-5p	MI0000061	28247	16791,23
TCGA-A2-A0ST-01A-12R-A085-13	MIMAT0004481	hsa-let-7a-3p	MI0000062	65	38,6388
TCGA-A2-A0ST-01A-12R-A085-13	MIMAT0010195	hsa-let-7a-2-3p	MI0000061	16	9,511088
TCGA-A2-A0ST-01A-12R-A085-13	MIMAT0000063	hsa-let-7b-5p	MI0000063	31868	18943,71
TCGA-A2-A0ST-01A-12R-A085-13	MIMAT0004482	hsa-let-7b-3p	MI0000063	62	36,85547
TCGA-A2-A0ST-01A-12R-A085-13	MIMAT0000064	hsa-let-7c-5p	MI0000064	6241	3709,919
TCGA-A2-A0ST-01A-12R-A085-13	MIMAT0026472	hsa-let-7c-3p	MI0000064	86	51,1221
TCGA-A2-A0ST-01A-12R-A085-13	MIMAT0000065	hsa-let-7d-5p	MI0000065	688	408,9768
TCGA-A2-A0ST-01A-12R-A085-13	MIMAT0004484	hsa-let-7d-3p	MI0000065	373	221,7272
TCGA-A2-A0ST-01A-12R-A085-13	MIMAT0000066	hsa-let-7e-5p	MI0000066	814	483,8766
TCGA-A2-A0ST-01A-12R-A085-13	MIMAT0004485	hsa-let-7e-3p	MI0000066	14	8,322202
TCGA-A2-A0ST-01A-12R-A085-13	MIMAT0000067	hsa-let-7f-5p	MI0000067	6816	4051,724
TCGA-A2-A0ST-01A-12R-A085-13	MIMAT0004486	hsa-let-7f-1-3p	MI0000067	5	2,972215
TCGA-A2-A0ST-01A-12R-A085-13	MIMAT0004487	hsa-let-7f-2-3p	MI0000068	1	0,594443
TCGA-A2-A0ST-01A-12R-A085-13	MIMAT0004584	hsa-let-7g-3p	MI0000433	127	75,49426
TCGA-A2-A0ST-01A-12R-A085-13	MIMAT0000414	hsa-let-7g-5p	MI0000433	1739	1030
TCGA-A2-A0ST-01A-12R-A085-13	MIMAT0000415	hsa-let-7i-5p	MI0000434	912	542

Çizelge 4.3 İnsan mikroRNA:hedef etkileşimi ve parametreleri örnek veri seti.

hgnc_symbol	Ensembl_Gene_Id	Ensembl_Transcript_Id	miRNA	seed_type	Energy	region	region_effect	seed_type_effect
CCNG1	ENSG00000113328	ENST00000340828	hsa-let-7a-5p	6-mer_noncanonical	-25,1	3UTR	0.84	0.05
DICER1	ENSG00000100697	ENST00000343455	hsa-let-7a-5p	9-mer	-24,4	CDS	0.42	0.43
SESN1	ENSG00000080546	ENST00000436639	hsa-let-7a-5p	6-mer_noncanonical	-22,2	3UTRCDS	0.93	0.05
NIPBL	ENSG00000164190	ENST00000282516	hsa-let-7a-5p	6-mer_noncanonical	-22,1	CDS	0.42	0.05
INTS12	ENSG00000138785	ENST00000340139	hsa-let-7a-5p	6-mer_noncanonical	-21,9	CDS	0.42	0.05
FNIP1	ENSG00000217128	ENST00000307968	hsa-let-7a-5p	9-mer	-21,8	3UTR	0.84	0.43
ACAD8	ENSG00000151498	ENST00000281182	hsa-let-7a-5p	6-mer	-21,3	CDS	0.42	0.07
CCNB2	ENSG00000157456	ENST00000288207	hsa-let-7a-5p	6-mer_noncanonical	-21,2	CDS	0.42	0.05
ZNF260	ENSG00000254004	ENST00000523638	hsa-let-7a-5p	6-mer_noncanonical	-21,1	3UTR	0.84	0.05
SYVN1	ENSG00000162298	ENST00000294256	hsa-let-7a-5p	9-mer	-21,1	CDS	0.42	0.43
BCOR	ENSG00000183337	ENST00000397354	hsa-let-7a-5p	8-mer	-21	CDS	0.42	0.43
IARS	ENSG00000196305	ENST00000375643	hsa-let-7a-5p	6-mer_noncanonical	-21	CDS	0.42	0.05
BCOR	ENSG00000183337	ENST00000378444	hsa-let-7a-5p	8-mer	-21	CDS	0.42	0.43
ATXN2L	ENSG00000168488	ENST00000336783	hsa-let-7a-5p	7-mer	-20,6	CDS	0.42	0.23
CTDP1	ENSG00000060069	ENST00000299543	hsa-let-7a-5p	8-mer	-20,5	CDS	0.42	0.43
ZNF264	ENSG00000083844	ENST00000263095	hsa-let-7a-5p	6-mer_noncanonical	-20,5	3UTR	0.84	0.05
CRYBG3	ENSG00000080200	ENST00000182096	hsa-let-7a-5p	8-mer	-20,4	CDS	0.42	0.43
METTL6	ENSG00000206562	ENST00000443029	hsa-let-7a-5p	8-mer	-20,3	3UTR	0.84	0.43
SEL1L3	ENSG00000091490	ENST00000399878	hsa-let-7a-5p	7-mer	-20,2	CDS	0.42	0.23
TRRAP	ENSG00000196367	ENST00000355540	hsa-let-7a-5p	8-mer	-20,1	CDS	0.42	0.43

Elde edilen veri setleri içerik açısından incelendiğinde meme kanser hastalarının örnek sayısı açısından mikroRNA ve gen ifade veri setleri uyumlu bulunmuştur. TCGA veri tabanında 1207 meme kanser hastası için 1222 örnek üzerine gen ifadesi çalışması yapıldığı görülmüştür (Çizelge 4.4). Aynı şekilde mikroRNA ifadesi üzerinden benzer işlemler gerçekleştirildiğinde (Çizelge 4.5) tüm meme kanser hastalarından mikroRNA ifadesi bakılmadığı ve örnek sayısıyla da uyuşmadığı görülmüştür. Bunun sonucunda ise veri birleştirme çalışmasına mikroRNA ifade veri seti aracılığıyla başlanması gerektiği anlaşılmıştır.

MikroRNA:hedef veri seti incelendiğinde çok fazla mikroRNA:hedef etkileşiminin olabileceği, ancak miRBase [180] son versiyona göre 1917 mikroRNA dizisi sunulsa da deneysel yönetemlerde 572 adet mikroRNA'nın hedefiyle etkileşiminin tespit edilebildiği anlaşılmıştır (Çizelge 4.6). Bununla birlikte tek mikroRNA:hedef etkileşiminde bir parametre için birden farklı değer tanımlandığı da saptanmıştır. Buna göre 7710 mikroRNA:gen etkileşim çiftinin farklı etkileşim parametrelerine sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.4 Gen ifade veri setinin içeriği.

Örnek tipi	**Hasta sayısı**	**Örnek sayısı**
Birincil tümör dokusu	1097	1102
Normal doku	113	113
Metastatik doku	7	7
Toplam	1207	1222

Çizelge 4.5 MikroRNA ifade veri setinin içeriği.

Örnek tipi	**Hasta sayısı**	**Örnek sayısı**
Birincil tümör dokusu	1078	1096
Normal doku	104	104
Metastatik doku	7	7
Toplam	1079	1207

Çizelge 4.6 MikroRNA:hedef veri setinin içeriği.

İçerik	**Sayısı**
MikroRNA	572
Gen	8742
MikroRNA:hedef etkileşim	30351
Birden fazla parametre ile gerçekleşen etkileşimler	7710

4.2 Örnek Veri Setleri ile Birleştirme Çalışması

Büyük veri setleriyle gerçekleştirilen çalışmalarda verilerin işlenmesi ve analiz edilmesi zor bir süreçtir. Tez çalışmasında öncelikle tüm meme kanseri hastalarının mikroRNA ve gen ifade profilleri, mikroRNA:hedef veri seti üzerinden birleştirilmeye çalışılmıştır. Ancak kullanılan veri setlerinin büyük olması sebebiyle hasta bazlı model kurulması planlandığı için bu tüm veri setinin birleştirilmesi sonrası hasta seçilmesi yerine, önce hasta seçilip sonra birleştirme çalışması Çizelge 3.15'teki gibi gerçekleştirilmiştir.

MikroRNA:hedef etkileşimleri ve hedefler arasındaki yarışmalı davranışlarında mikroRNA ifadesinin öneminin anlaşılması için mikroRNA ifadesi düşük ve yüksek olacak şekilde iki hasta seçimi gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.14'te gösterildiği gibi gerçekleştirilen işlemde mikroRNA ifadeleri tüm normal dokulardaki mikroRNA ifade ortalamasına kıyasla fazla ifade edilmiş mikroRNA içeren örnekler sıralanmış ve bu şekilde öncelikle "TCGA-E9-A1N5-11A" barkodlu normal örnek seçilmiştir. Bu örnek bazı durumlarda "E9" olarak nitelendirilmiştir. Bunun aksine ortalamaya göre fazla sayıda düşük mikroRNA ifadesi gözlenen hastalar sıralanmış ve bunlardan "TCGA-A7-A0CE-11A" örneği seçilmiştir. Bu örnek bazı durumlarda "A7" olarak nitelendirilmiştir. Çizelge 3.14'te gerçekleştirilen işlem ile mikroRNA ifadesinin, hedef genlerin yarışmalı davranışları sonucunda ifade değişimine olan katkısı daha net şekilde gözlenebilir. Bu hastaların birleştirme çalışmalarının sonucunda içerikleri kıyaslanmıştır. Esasen ifade profili çalışmalarında ortalama değere göre bir durum kıyaslaması yapmak uygun bir yöntem olarak görülmemektedir. Bu sebeple kullanılan algoritmada görüldüğü gibi örnek doku grupları aynı tutulmuş ve normal doku örnekleri arasında kıyaslamaya gidilmiştir.

Hasta veri setlerinin birleştirilme aşamasında mikroRNA:hedef eşleşmelerini içeren veri setinde 572 mikroRNA bulunmasına rağmen hastalarda tüm mikroRNA'ların hedefleriyle eşleşmesi gerçekleşmemiştir. Bunun için hastalar için sunulan mikroRNA ifade veri seti incelendiğinde her mikroRNA için ifade verisinin bulunmadığı görülmüştür.

Örnekler için elde edilen veriler incelendiğinde bazı mikroRNA:hedef etkileşiminin farklı parametrelerle farklı şekilde gerçekleşebildiği görülmüştür. Örneğin bir mikroRNA ve hedef arasındaki etkileşim için farklı bağlanma enerjisi verisi sunulmuştur. Bu durum ağ tabanlı modellemede iki düğüm arasında iki farklı etkileşime sebep olmaktadır. İki farklı etkileşimin bulunması geliştirilen hesapsal modelde hatalara neden olacağı için belli kabuller yapılarak Çizelge 3.16'daki işlemler gerçekleştirilmiştir. Bu kabuller daha güçlü bağlantıyı sağlayacak değişkenin seçilmesine dayandırılmıştır. Bunun sonucunda seçilen örneklerin mikroRNA:hedef ifade profilleri içeriği aşağıdaki gibi bulunmuş, elde edilen veri setinin içeriği ve ağ yapısı Ek-B'de gösterilmiştir.

TCGA-E9-A1N5-11A: 345 farklı türdeki mikroRNA, 7950 farklı gen ile etkileşim halindedir. MikroRNA'lar ve genler arasında toplamda 25813 etkileşim görülmüştür.

TCGA-A7-A0CE-11A: 310 farklı türdeki mikroRNA, 7996 farklı gen ile etkileşim halindedir. MikroRNA'lar ve genler arasında toplamda 26176 etkileşim görülmüştür.

Bu etkileşimler ağ yapıları üzerinden görüntülendiğinde ise çok fazla sayıda genin aslında çok az sayıda mikroRNA tarafından düzenlendiği görülmüştür. Bu durumun hastalar için az sayıda mikroRNA ifadesi tanımlanması, mikroRNA'ların doku spesifik olarak ifade edilmesi veya mikroRNA hedef deneysel çalışmalarında yalnızca anlık etkileşimlerin belirlenebilmesi gibi sebeplerden kaynaklanmış olabilir. Bununla birlikte ağ yapılarından görüldüğü kadarıyla mikroRNA ve genler arasında etkileşimlerin kompleks şekilde gerçekleştiği ve bu sebeple çoklu etkileşimler olarak ele almanın doğru bir yaklaşım olduğu da anlaşılmıştır.

MikroRNA ifadesi verileri her hastada standart mikroRNA'larla sınırlı olmadığı ve ifadeleri değişkenlik gösterdiği için birebir mikroRNA ismi baz alınarak bir karşılaştırılma yapılması mümkün değildir. Ancak seçilen bu iki hastada uygulanan model yaklaşımı ile mikroRNA ve gen isminden bağımsız olarak, gen ve mikroRNA ifade düzeyleri ve etki faktörleri ele alınacağı için ortak değişken içeriğini paylaşması yeterlidir (Ek-B).

Meme kanser hastalarına ait verilerin birleştirme çalışmasında kullanılan veri setlerinin versiyonlarına göre değişmeyen değişkenler kullanılmıştır. Diğer bir deyişle bir gen ele alındığında, insan genom projesine göre genin lokasyonlarında güncelleme gerçekleşebilir. Bu sebeple her versiyon için aynı kodlanmış Ensembl kodları kullanılmıştır. Aynı zamanda mikroRNA'lar için de aynı durum geçerlidir. Veri setlerinde farklı şekilde belirtilmiş mikroRNA adlarında da bu sebeple aynı standart sağlanmıştır. Böylece herhangi bir hataya mahal vermeyecek şekilde meme kanser hastalarına ait mikroRNA:hedef gen veri setleri doğru şekilde birleştirilmiştir.

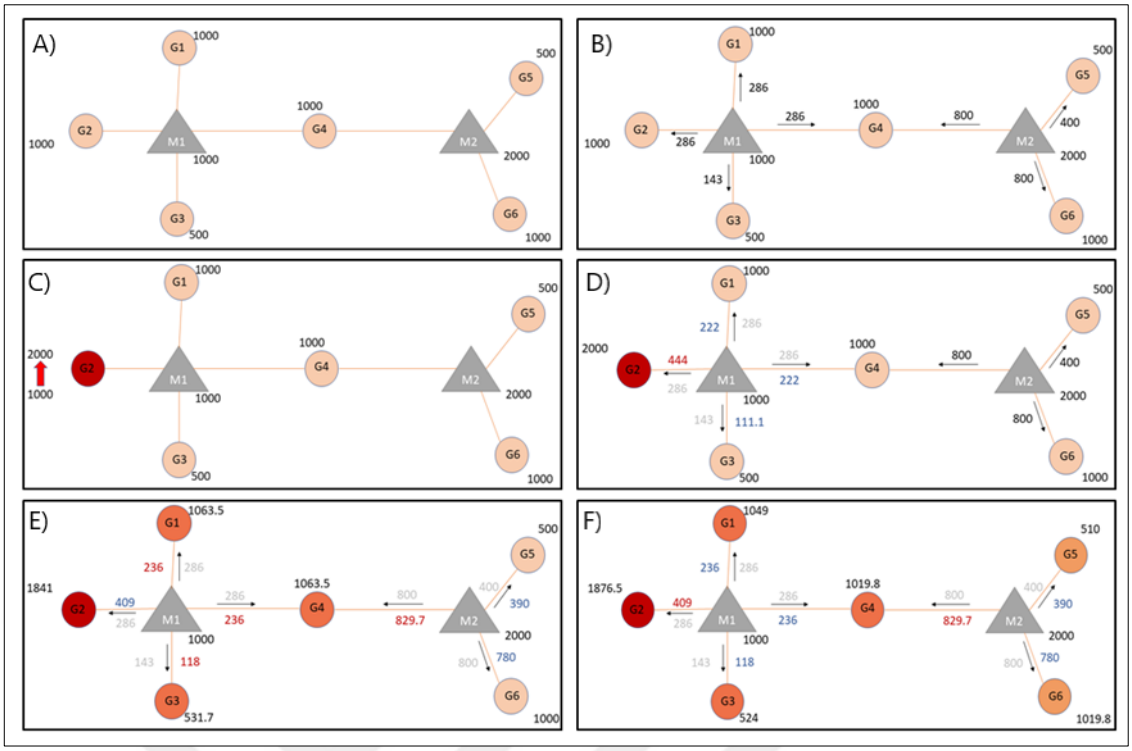
4.3 Yarışmalı Ağ Tabanlı Model

Tez çalışması kapsamında yeni nesil dizileme verilerinden elde edilen veriler aracılığı ile mikroRNA ve hedeflerinin etkileşimleri genel bir modelle açıklanmaya çalışılmıştır. Bunun için oluşturulan model, mikroRNA ve hedefleri arasındaki negatif korelasyonu temel alarak kurulmuştur. Örnek bir model sistemde gerçekleştirilen simülasyonda (Şekil 3.2) genel olarak mikroRNA hedeflerinin yarışmalı davranışları açıklanabilmiştir. Model sonuçlarına bakıldığı zaman mikroRNA'ların doğrudan hedeflerinin birinin ifadesindeki değişikliği takiben diğer hedeflerde de aynı yönde değişiklik meydana gelmiştir. Öyle ki, Ala vd. [161] ve Bosia vd. [162] tarafından gerçekleştirilen çalışmalarla uyumlu sonuçlar ortaya koyulmuştur. Lai vd. [12] tarafından mikroRNA hedeflerinin yarışmalı davranışlarının ele alındığı derlemede de hedeflerinin birinin ifadesinde meydana gelen değişikliğin diğer hedeflerde değişikliğe sebep olacağı ve ortak mikroRNA'larca düzenlenen genler üzerinde daha kuvvetli bir etkinlik sağlanacağı belirtilmiştir. Bununla birlikte farklı mikroRNA'lar tarafından ortak hedeflenen genlerin düzenlenmesinde mikroRNA'ların daha kuvvetli etkinlik oluşturabileceğini belirten başka çalışmalar bulunmaktadır [168]. Model simülasyonu yapıldığında (Şekil 3.2 F'de görüldüğü gibi) M1 ve M2 tarafından ortak hedeflenen genin (G4) ifadesinde birincil düzenlenmeye karşı ikincil düzenlenmeye geçilirken negatif düzenlenme etkinliğinin daha fazla olduğu görülmüştür.

Günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalarda mikroRNA ve hedef düzenlenmelerinde mikroRNA:hedef konsantrasyonunun önemi vurgulanmıştır. Öyle ki, mikroRNA:hedef oranı küçük olan etkileşimlerin herhangi bir yeniden düzenlenmeden daha az

etkileneceği bilinmektedir [10],[168]. Bu çalışmalar genellikle deneysel çalışmalar olmakla birlikte mikroRNA ve hedef konsantrasyonlarını toplam değer olarak ele almışlardır. Bu sebeple Bölüm 3.2.1'de gösterilen modelin daha farklı hedef gen miktarlarıyla simülasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu yönde geliştirilen algoritmanın sonuçları kıyaslanarak incelendiğinde ise (Şekil 3.2 ve Şekil 4.1) mikroRNA:hedef oranının önemi anlaşılmaktadır. Buna göre mikroRNA:hedef oranlarının değişmesi hem hedef havuzunun toplam değişlik oranını hem de gen bazlı meydana gelecek değişiklikleri etkilemektedir. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi mikroRNA:hedef oranın daha yüksek olması durumunda hedeflerin birincil düzenlenmeleri aynı kalsa da, yeniden mikroRNA'ların hedef ifadelerine göre dağıtılmasında meydana gelen değişikliklerden dolayı hedef gen düzenlenme miktarı ve oranı değişmektedir. Aynı zamanda bu oranın mikroRNA'lar tarafından ortak olarak hedeflenen genler üzerindeki baskılayıcı etkinlik açısından da kritik olabileceği görülmüştür. Düşük mikroRNA:hedef oranının ele alındığı simülasyonda ortak hedeflenen gen daha az miktarda baskılanabilmişken, mikroRNA:hedef oranı arttığında daha güçlü bir baskılama etkinliği sergilenmiştir. Buradan ise mikroRNA:hedef oranının artması sonucunda yarışmalı mRNA'ların daha kolay düzenlenebileceği literatüre uyumlu şekilde bulunmuştur.

Geliştirilen modelde yapılan bu uygulama ile meme kanser hastalarından örnek seçiminin de doğru yapıldığı anlaşılmıştır. Meme kanser hastalarından TCGA-A7-A0CE kodlu örnek ortalamaya göre en düşük mikroRNA ifade profili sergileyen örneklerden biriyken; TCGA-E9-A1N5 ise tam tersi şekilde yüksek mikroRNA profili sergileyen örneklerdendir. Çalışmada ele alınan iki örnek için farklı mikroRNA ifade profillerinin olması durumunda mikroRNA:hedef oranı açısından modelin doğru şekilde çalışabildiği gözlenmiştir.



Şekil 4.1 MikroRNA:hedef oranlarının değiştirilmesiyle örnek ağ yapısında model sonuçları.

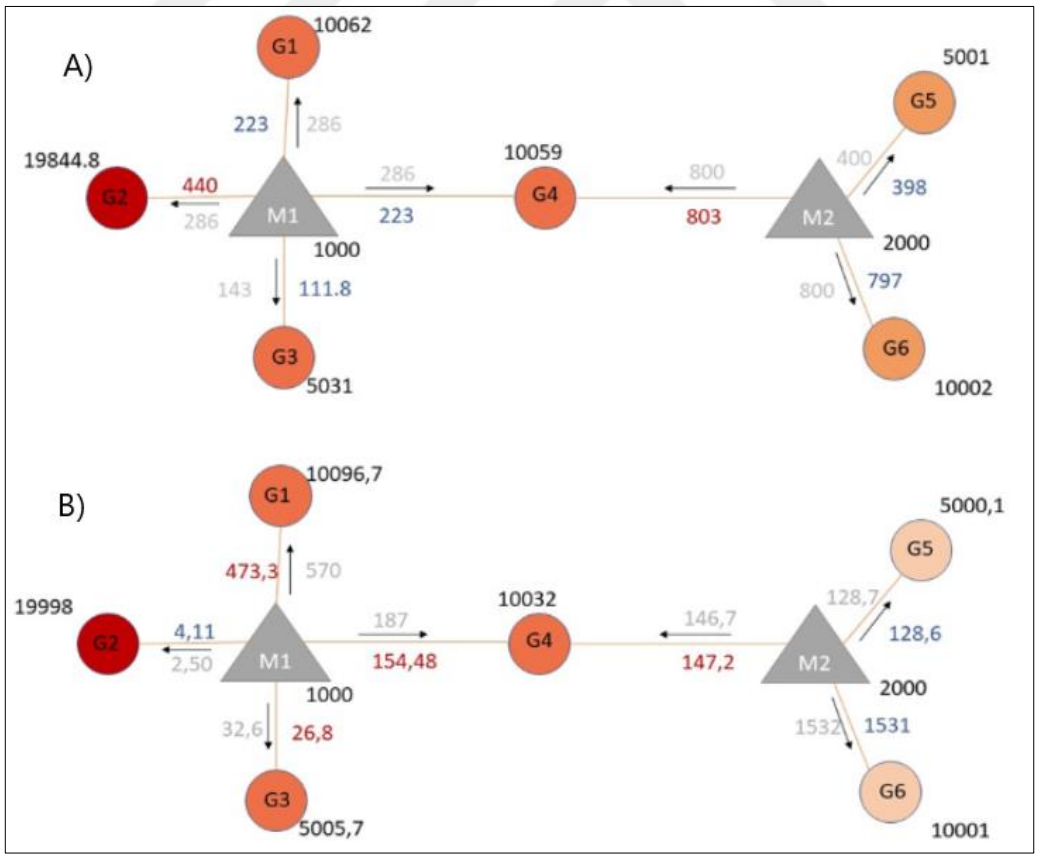
MikroRNA:hedef etkileşimlerinde ve hedeflerin yarışmalı davranışlarında en önemli konulardan biri düzenlenmeler arasındaki farklardır. Bunun temel sebebinin mikroRNA:hedef etkileşimlerindeki faktörler olduğu düşünülmektedir. Çünkü bir mikroRNA, hedeflerine karşı farklı bağlanma ve baskılama davranışı sergileyebilir. Bu nedenle mikroRNA:hedef etkileşimlerinde yarışmalı davranışları incelerken yalnızca hedef ve mikroRNA miktarına bağlı bir yaklaşım tek başına yeterli gelmeyebilir.

Tez çalışmasının bu aşamasında mikroRNA'ların aktivitesine etki eden faktörlerin model içerisinde farklı şekillerde kullanımı sağlanmıştır (Bölüm 3.2.2). Örneğin bağlanma enerjisi esasen bir mikroRNA için düşünüldüğünde hedefle eşleşebilme oranını belirleyen afinitenin ölçüsüdür [103]. Bu sebeple enerji faktörü mikroRNA'ların hedeflerine oransal olarak dağılımında kullanılacak bir parametre olarak düşünülmüştür. Bununla birlikte hedef bölgenin konumu mikroRNA'nın baskılayıcı aktivitesini belirleyen bir faktördür. Diğer bir deyişle hedef bölgeyle etkileşim sağlanabilir ancak hedef miktarındaki değişiklik hedef üzerindeki çekirdek bölgesi konumuna bağlı olarak değişir [187]. Diğer bir faktör olan çekirdek tipinin mikroRNA aktivitesine katkısı ise halen tartışmalı bir konudur [95],[96],[196]. MikroRNA çekirdek tipinin, hedefe afiniteyi veya

baskılama etkinliğini belirlediği tartışmalı olmakla birlikte Werfel vd. [196]'nın yaptığı çalışmaya dayanarak afinitenin belirlenmesindeki katkısı sonucunda baskılayıcı etkinliği belirlediği söylenebilir. Bu sebeple tez çalışmasında mikroRNA:hedef etkileşiminde önemli olan faktörler priming() fonksiyonuyla Ek-A'da gösterildiği gibi tanımlanmıştır.

Geliştirilen fonksiyonlarda mikroRNA'yla etkileşimde olan genler gruplandırılmış ve bu gruplar içerisinde derecelendirme yapılmıştır. Derecelendirme işlemi sonrasında modelin kurulması aşamasında değişkenler farklı şekillerde kullanılmıştır. Burada gerçekleştirilen denemeler sonucunda ise gruplandırma işleminin doğru şekilde yapılmasının etkileşim açısından kritik olduğu görülmüştür.

MikroRNA:hedef etkileşimlerinde önemli olan faktörlerin de hesaba katılması ile model sistem geliştirilmiştir. Yalnızca mikroRNA ifadesinin hedef genlere ifadelerine göre oransal dağılımı sonrasında G2 gen ifadesinin arttırılması (Şekil 4.2 A) ve mikroRNA aktivitesine etki eden faktörlerle gerçekleşen model modifikasyonları sonrasında G2 gen ifadesinin arttırılması (Şekil 4.2 B) durumlarının sonuçları karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.2 MikroRNA:hedef ifade oranına dayandırılan ve faktörlerle genişletilmiş modelin örnek veri setinde uygulamasının sonuçları.

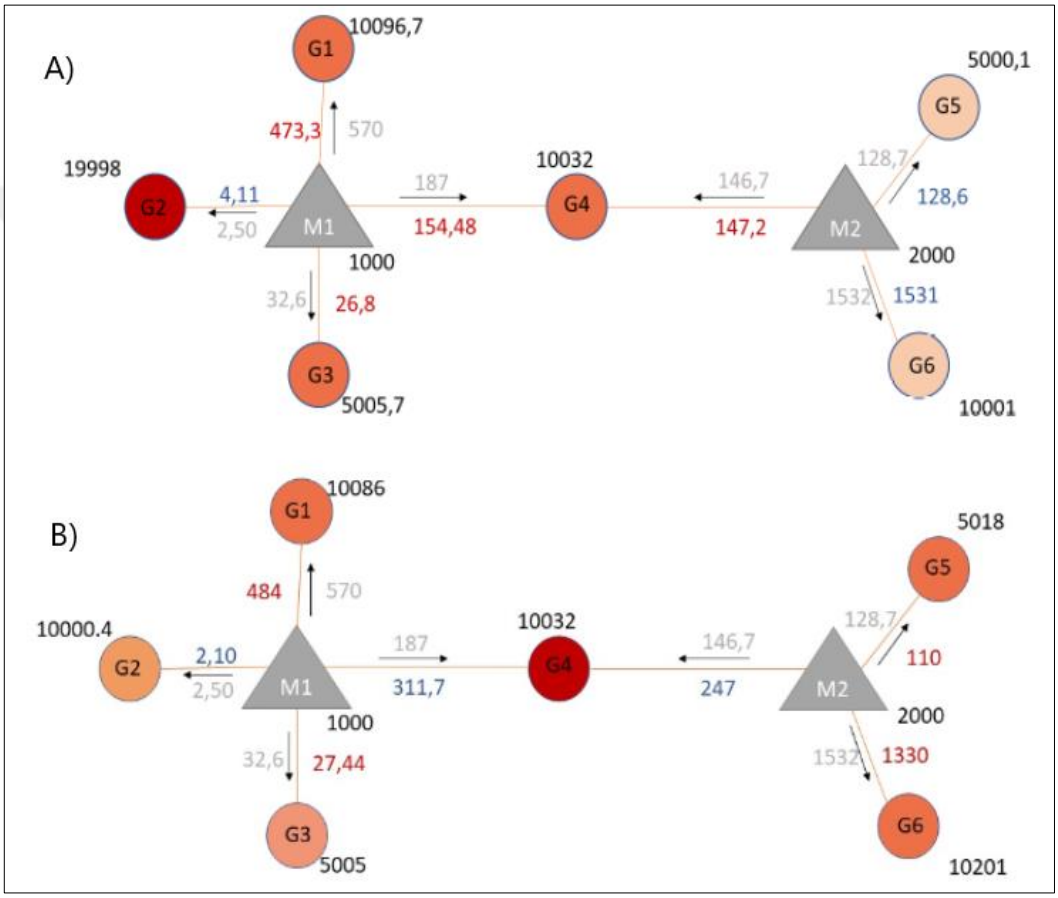
MikroRNA aktivitesinde önemli olan faktörler model içerisinde kullanıldığı zaman hedef genlerin ifadelerinin düzenlenmesinde değişiklikler olduğu görülmektedir. Şekil 4.2 A'da mikroRNA ifadeleri hedeflerine oransal olarak dağıtılmış ve bir hedefteki değişiklik dolaylı etkileşimler sayesinde daha kuvvetli gerçekleşmiştir. Ancak M1 mikroRNA ve hedefi arasındaki etkileşim parametreleri incelendiğinde (Çizelge 3.17) grup içerisinde en yüksek çekirdek katsayısına sahip olmasına rağmen G2, düşük bağlanma enerjisinden dolayı az sayıda eşleşme gerçekleştirebilecektir. Bununla birlikte M1, G2 hedef transkiptinin 5' UTR bölgesine yakın bir konumdan eşleşme gerçekleştirdiği için bağlanma gerçekleşse dahi fonksiyonelliği düşüktür. Bu sebeple G2 aracılı olarak tetiklenen bir değişiklik, diğer genlerin düzenlenmesinde, etkileşim faktörleri hesaba katıldığında farklı yanıtlar oluşturmaktadır (Şekil 4.2 A ve B karşılaştırıldığında).

Bu örnek uygulama üzerinden açıklanırsa, G1:M1 ve G4:M1 etkileşimleri kıyaslandığında, hedef genlerin kararlı haldeki ifadeleri aynıdır. İki hedef de 3'UTR bölgesinden mikroRNA ile etkileşim içerisindedir. Ancak çekirdek tipi ve düşük serbest enerji profili sergilemesinden dolayı M1:G4 eşleşmesinin zayıf kalması ve M1'in G1'e daha fazla yönlenmesi beklenmektedir. Bu durumda G2 ifadesinin artması sonucunda G1, G4'e oranla daha fazla etkilenir.

MikroRNA aktivitesinde önemli faktörlerin literatürle uyumluluğunun anlaşılması için örnek veri setinde, G2 pozitif düzenlenmesinin (Şekil 4.3 A) ve G4 pozitif düzenlenmesinin (Şekil 4.3 B) sonuçları karşılaştırılmıştır. G4 genini hedefleyen mikroRNA'lar, çekirdek tipi, enerji ve hedef bölge konumu parametrelerine göre daha kuvvetli baskılayıcı aktivite sergilemektedir. Bu nedenle G4 geninin ifadesinde meydana gelen değişikliğin diğer genlerin düzenlenmesinde daha etkili olacağı düşünülmektedir. MikroRNA baskılayıcı aktivitesinde önemli olan faktörlerin hesaba katılmasıyla geliştirilen model G4 geninin ifadesinin iki katına çıkarılmasıyla çalıştırıldığında beklenildiği gibi diğer genlerin ifadelerindeki değişimler farklıdır (Şekil 4.3).

Bu karşılaştırmaların yapılmasıyla mikroRNA aktivitesinde önemli olan faktörlerin hesaba katıldığı modelde hedeflerin yarışmalı davranışlarını, mikroRNA'ların kooperatif etkinliklerini simüle edilebilen bir yaklaşım sağlandığı görülmüştür.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda mikroRNA aracılı gen düzenlenmelerinde aslında her genin aynı düzeyde yeniden düzenleme etkinliğine sahip olmadığı görülmüştür. Günümüze kadar gerçekleştirilen deneysel çalışmalar ve modelleme yaklaşımlarında bu durum ele alınmamıştır. Etkileşimde olan binlerce genden en önemli genin anlaşılması bu yaklaşım ile sağlanabilir. Öyle ki, her bir gen için, gen ifade değişimi gerçekleştirilip (örneğin iki katına çıkarılması) model çalıştırılarak elde edilen sonuçların kıyaslanması sonucunda ağ yapısındaki en kritik genin bulunması mümkündür.



Şekil 4.3 MikroRNA aktivitesinde önemli olan faktörlerin hesaba katıldığı modelin örnek veri setinde G2 (A) ve G4 (B) ifade artışında uygulanması sonucunda ağ yapıları.

Günümüze kadar gerçekleştirilen çalışmalarda mikroRNA aktivitesi, genellikle mikroRNA:hedef oranına veya mikroRNA ve hedeflerin transkripsiyon hızlarına dayandırılarak gerçekleştirilmiştir [161],[162],[165],[166],[167]. MikroRNA aktivitesinde önemli olan faktörleden çekirdek tipinin mikroRNA baskılama etkinliğine olan katkısının anlaşılmasına dair yaklaşımlarda Bosson vd. [10] hedefleri çekirdek tipine göre gruplandırarak (8-mer, 7-mer ve 6-mer) bu grupların yarışmalı davranışlarının önemli

olabileceğini, Denzler vd. [168] mikroRNA:hedef etkileşimlerinde mikroRNA düşük, orta ve yüksek afinite profilleri ele alınmadan mikroRNA'ların kooperatif etkilerinin ve hedef yarışmalı davranışlarının anlaşılamayacağını belirtmişlerdir.

MikroRNA:hedef etkileşimlerinin ağ yapıları üzerinden anlaşılması konusunda getirilen yaklaşımlar ise genellikle küçük ağ yapıları (birkaç mikroRNA:birkaç gen) veya çeşitlilik açısından yetersiz sayılabilecek (1 mikroRNA: birden fazla gen veya 1 gen: birden fazla mikroRNA) veri setleri üzerinden gerçekleştirilmiştir. Ancak kararlı haldeki bir sistemde meydana gelen değişiklik mikroRNA ve hedefleri aracılığı ile tüm bir sisteme etki edebilir. Bu sebeple mikroRNA:hedef etkileşimlerinin geniş ağ yapılarında analiz edilmesi daha doğru bir yaklaşımdır. Bununla birlikte mikroRNA hedef etkileşimlerinin farklı düğüm tiplerinin birbiriyle etkileşimde olduğu, aynı düğüm tiplerinin ise doğrudan etkileşim içerisinde olmadığı (bipartite) ağ yapılarında analizinin daha doğru yaklaşımlar sunabileceğini belirten çalışmalar bulunmaktadır [169],[170],[171]. Bu çalışmalarla uyumlu şekilde tez çalışmasında mikroRNA:hedef etkileşimlerinde mikroRNA'lar doğrudan yalnızca genler ile etkileşimdedir.

Tez çalışmasında geliştirilen model, mikroRNA ve hedef ifadesinin, mikroRNA aktivitesinindeki belirleyici rolünün anlaşılması, her bir etkileşimde önemli olan faktörlerin bireysel ve grup içerisinde ele alınabilmesi, mikroRNA aktivitesinde önemli faktörlerin kanonik ve kanonik olmayan tüm etkileşimlerini göz önünde bulundurabilecek şekilde kullanılabilmesi açısından yenilikçi bir yaklaşımdır.

4.4 Meme Kanseri Hasta Örneklerinde Model Uygulama

Örnek veri seti üzerinde modelin doğru şekilde çalışabildiği görüldükten sonra meme kanser hastalarına ait örneklerin veri setlerinde model uygulaması gerçekleştirilmiştir. Model uygulaması yapılırken kullanılan veri seti değişikliklerin tetiklenmesinden önce kararlı halde kabul edilmiştir. Sonrasında ise gen ifadesi değişiminde veya mikroRNA ifadelerindeki değişimlerde gen ifadelerinin düzenlenmeleri tespit edilmiştir.

MikroRNA:hedef gen örnek veri setleri incelendiği zaman bazı değerlerin "0" olduğu görülmüştür. Bu değerlerin algoritma içerisinde belirsiz değerler oluşturmasının önüne geçilmesi için algoritmalarda bazı koşullar koyulmuştur. Bu durum çalışma aşamasında

bir mikroRNA:hedef etkileşimi ile anlaşılmıştır. TCGA-A7-A0CE hasta örneğinde SYT4 geni hsa-let-7b-3p ile etkileşimdedir. Ancak bu etkileşime dahil olmuş başka bir düğüm bulunmamaktadır. SYT4 geninin okuma sayısı normal dokuda "0" olduğu için model içerisinde sürekli belirsiz değişken üretmektedir. Bu sebeple model içerisinde bu gibi belirsizliklerin giderilmesi için modifikasyonlar gerçekleştirilmiştir. Örneğin belirsiz değişkenlerin ortaya çıkmaması için "0" olan değişkenlerin "1" olarak düzenlenmesi sağlanmıştır. Bir mikroRNA için milyonlarca hedef okuma sayısı bulunuğu için bu düzenlenmeler ihmal edilebilir. Bu sayede modelin doğru şekilde ilerlemesi sağlanmıştır.

4.4.1 Meme Kanser Hasta Örneklerinde Modelin Davranışlarının İncelenmesi

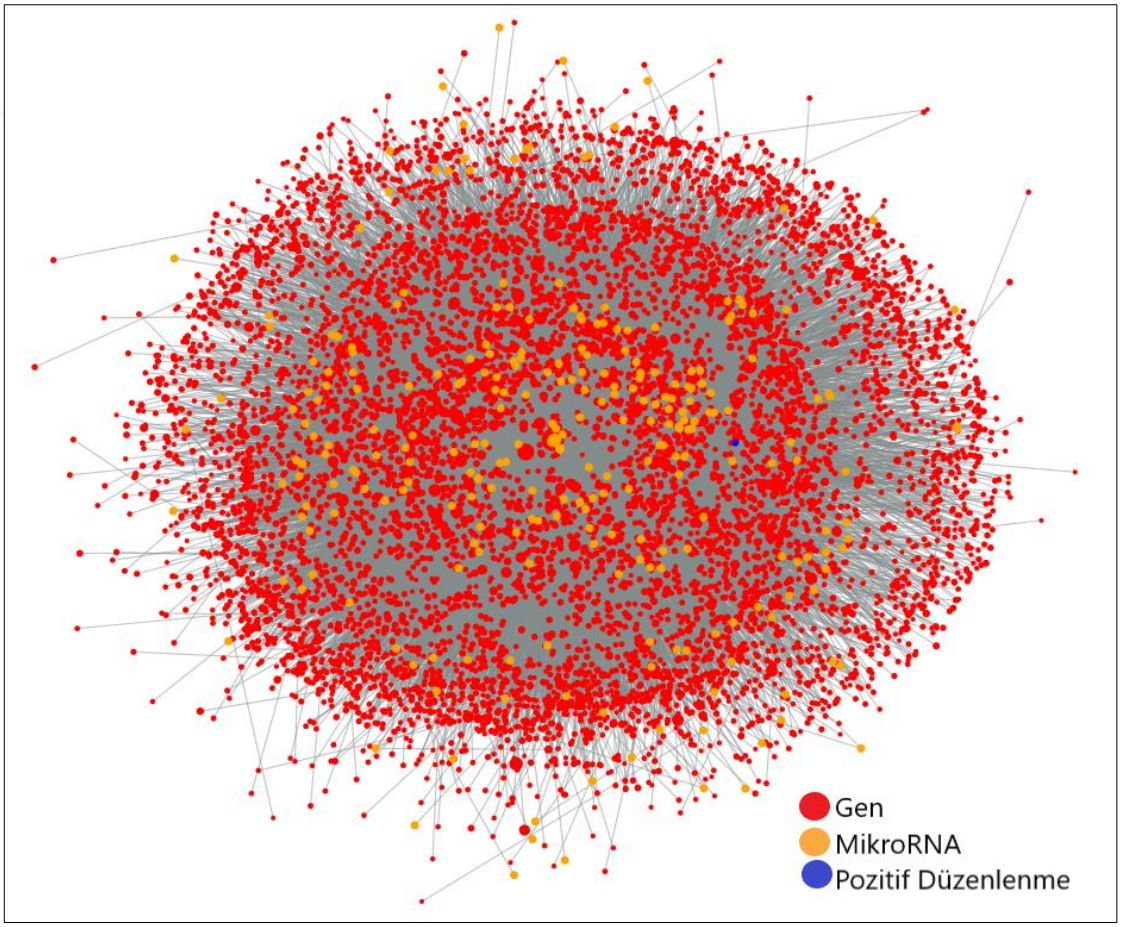
Meme kanser hastalarıdan seçilen TCGA-A7-A0CE-11A ve TCGA-E9-A1N5-11A örnekleri için model uygulaması yapılmıştır. İki hastada etkileşimlerin analizinde aynı gende değişiklikle döngü tetiklenmiştir. Meme kanser hastalarında örnek uygulama için, kanser hastalarında kemoterapötik ajanların hücreden dışarı atılmasına sebep olarak tedaviye direnç gelişimini sağlayan MRP1 [197] (Multi Drug Resistance Protein 1)'in ifadesinden sorumlu ABCC1 geni seçilmiştir. Meme kanser hastalarında genellikle fazla ifade edilen bu genin düzenlenmesine yönelik etkin tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır [198]. Bu yönü ile ABCC1 geni meme kanseri hastaları için büyük önem taşımaktadır.

Model çalışmasında hastaların normal doku örneklerindeki gen ifadesi verileriyle oluşturulmuş ağ yapılarında, ABCC1 geninin ifadesi tümör dokusundaki ifadesine güncellenerek tetikleyici olarak kullanılmıştır.

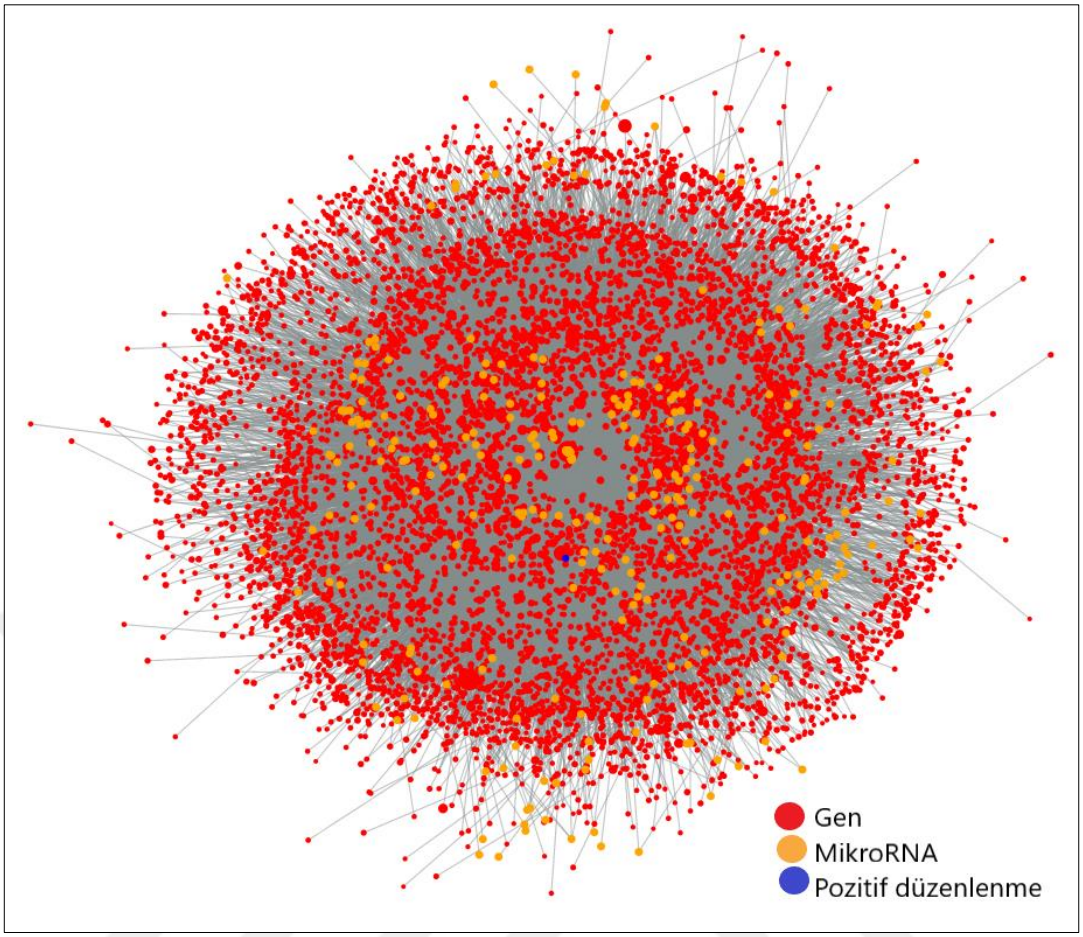
Tetikleyici olarak kullanılan ABCC1 geninin, bir hasta için tümör dokusunda yaklaşık 2.35 (TCGA-A7-A0CE örneği) katına, diğerinde ise yaklaşık olarak 4.10 (TCGA-E9-A1N5 örneği) katına çıkarılması sonucunda model başlatılmıştır (Çizelge 3.18). Model ağ yapısında ABCC1 geninin ifadesinin arttırılması durumunda ağ yapıları Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'teki gibidir. Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'teki ağ yapılarında ABCC1 geni dışındaki genler henüz değişiklikten etkilenmemiştir. Bu sebeple ağ yapısında sadece bir pozitif düzenlenme (ABCC1 geni pozitif düzenlenmesi) mevcuttur.

Görüntüleme algoritmasının sonucunda bir hasta için mikroRNA:hedef etkileşiminin oldukça geniş olduğu, aynı zamanda bir gende yapılan değişikliğin ise oldukça küçük olduğu görülmüştür. Bununla birlikte düğüm büyüklüklerinin gen ve mikroRNA'ların sayısını belirttiği düşünüldüğünde, ifadesi arttırılan gene göre oldukça fazla ifade edilen gen olduğu görülebilmektedir.

Ağ yapılarında gerçekleştirilen analizin, etkileşimlerin öneminin anlaşılmasında faydalı olacağı bilinmektedir ve bununla birlikte Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te görüldüğü gibi fazla sayıda düğümün etkileşim içerisinde olması karmaşık bir görüntüye sebep olmaktadır.



Şekil 4.4 TCGA-A7-A0CE örneğinde ABCC1 gen ifadesinin arttırılması durumunda ilk ağ yapısı.



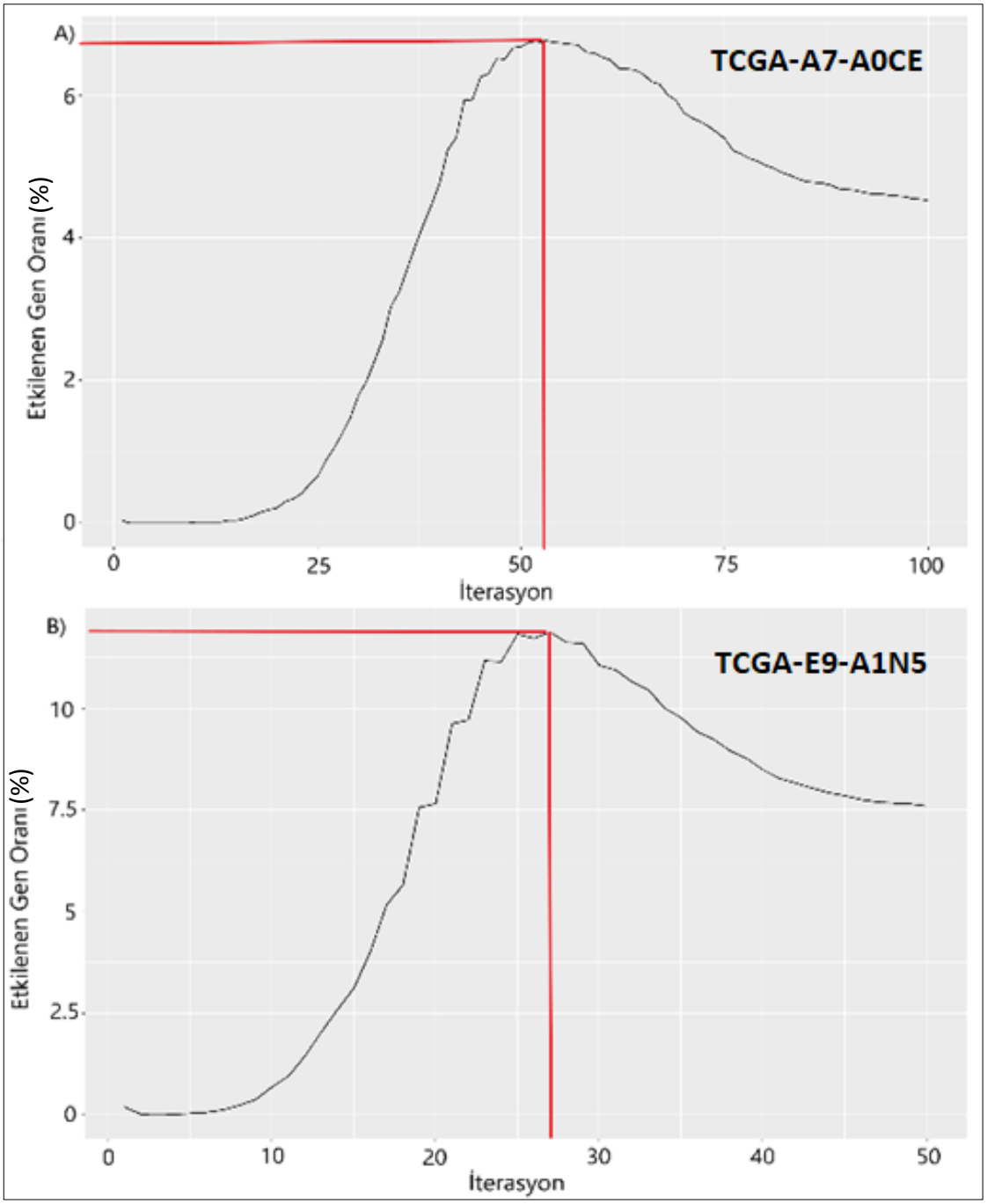
Şekil 4.5 TCGA-E9-A1N5 örneğinde ABCC1 gen ifadesinin arttırılması durumunda ilk ağ yapısı.

Gerçekleştirilen bu değişiklikler sonrasında Çizelge 3.18'deki model çalıştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar kaydedilmiş ve incelenmiştir. Geliştirilen modelin iki ayrı örnek üzerinde sonuçları incelendiğinde modelin bazı özellikleri ve davranışları tespit edilmiştir:

- Model fonksiyonları doğru şekilde çalışabilmektedir.
- Bir basamakta elde edilen sonuç diğer basamakta girdi olarak kullanılabilmektedir.
- MikroRNA hedefleri arasında etkileşimin gücüne göre mikroRNA etkinliği değişmektedir.
- Tetikleyici olarak kullanılan genin ilk yükseltilen ifadesine göre model sonucunda elde edilen ifade değerinin daha az olduğu görülmüştür.

- MikroRNA hedeflerinin düzenlenmesinde her basamakta, yarışmalı davranıştan dolayı ve kararlı hale ulaşılmamasından dolayı negatif ve pozitif düzenlenme seyri değişmektedir.

Model sistemde değişiklik takibi için belirlenecek iterasyon önemlidir. Çalışma kapsamında iterasyonunun belirlenmesinde farklı yöntemler denenmiştir. Örneğin while döngüsü ile değişikliklerin son bulduğu nokta tanımlanmaya çalışılmıştır. Ancak model sistemde değişikliklerin başlangıç düğümünden en uzak düğüme ulaşma hızı çok yüksekken; değişiklik gerçekleşen gen sayısındaki azalma çok yavaş seyretmektedir (Şekil 4.6). Bu durum iterasyon değerinin çok yüksek olmasına sebep olmaktadır. Esasen, while döngüsü yaklaşımında belirli bir iterasyondan sonra genlerdeki ifade değişimleri oldukça küçüktür. Gen ifadesindeki değişikliklerin çok küçük olması koşulunda döngünün durdurulması şartı eklendiğinde ise, başlangıçtaki küçük değişiklikler sonrasında, ağ yapısında tüm genlerde ifade değişimi gerçekleşmeden döngü sona ermektedir. Diğer yandan değişikliğin gerçekleştirildiği başlangıç gen düğümüne en uzak mikroRNA düğümü tanımlanması yoluyla iterasyon belirlenmeye çalışılmıştır. Ancak bu yaklaşımda bir noktadan başlanarak elde edilen yoldaki diğer düğümler arasındaki etkileşimlerin gerçekleşmesini sağlamayacak kadar küçük iterasyonlar elde edilmiştir. Bu sebeple bir sabit iterasyonla (100) simülasyon gerçekleştirerek, elde edilen sonuçlardan en etkili olabilecek iterasyonun seçilmesini sağlayan fonksiyon find_iteration() geliştirilmiştir.



Şekil 4.6 Hasta örneklerinde iterasyona göre değişimden etkilenen gen miktarı

İterasyon tanımlayan fonksiyon sonucunda ise ABCC1 geninin 2.35 katına çıkarılması durumunda A7 hasta örneği için 53 (Şekil 4.6 A); ABCC1 geninin 4.10 katına çıkarılması durumunda E9 örneği için 27 (Şekil 4.6 B) uygun iterasyon değeri elde edilmiştir.

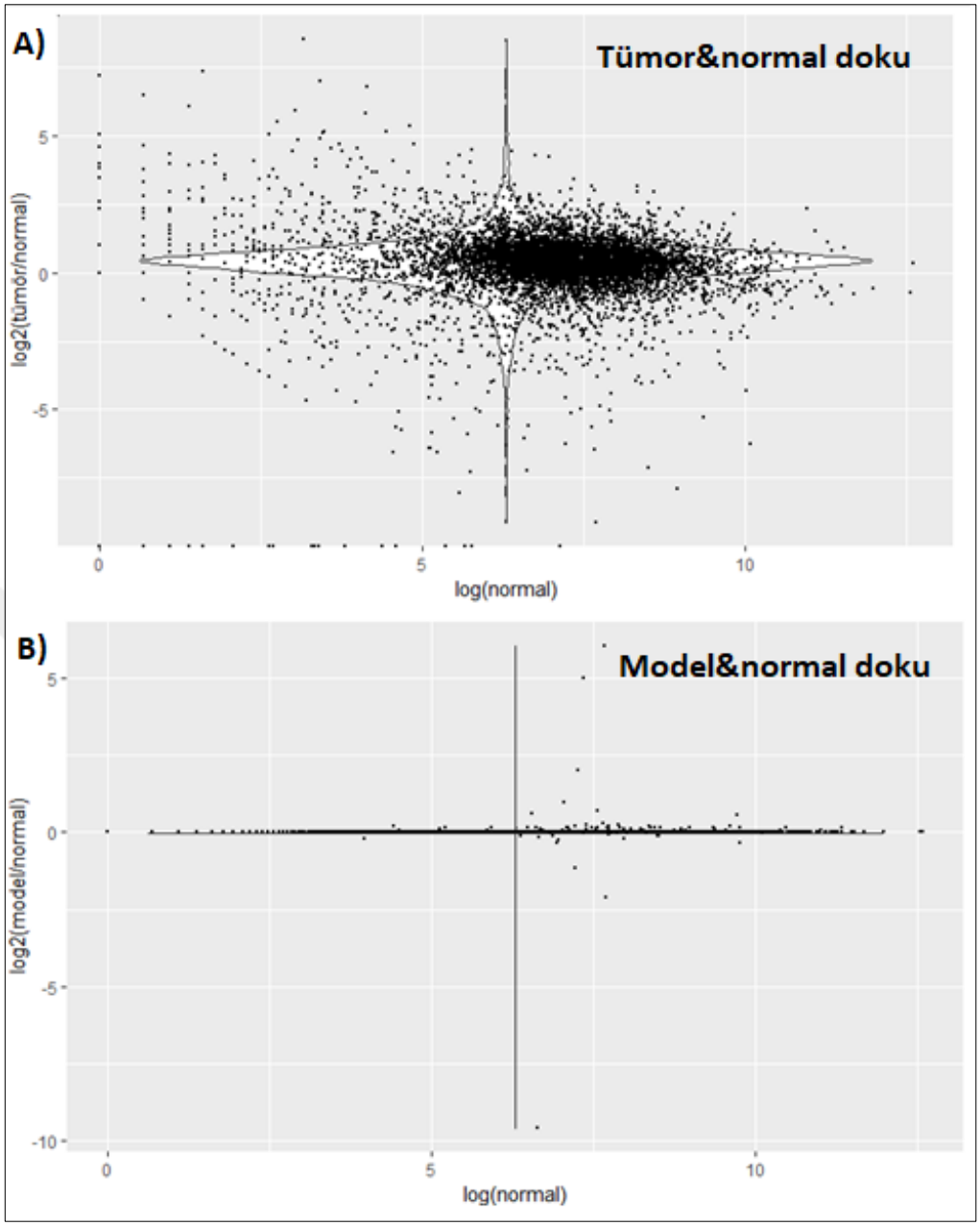
Geliştirilen modelin iki hasta üzerindeki testlerinde elde edilen sonuçlar modelin beklenildiği gibi çalıştığına işaret etmektedir. Bir mikroRNA'nın hedeflerine karşı sergilediği farklı aktivite profilleri model sonucunda simüle edilebilmiştir. Tetikleyici

olarak seçilen genin ifadesinin nihai durumda azalması ise Ala vd. [161] tarafından ortaya atılmış yarışmalı endojen RNA hipoteziyle doğrudan uyuşmaktadır. Bununla birlikte yarışmalı RNA'ların birinin pozitif düzenlenmesi sonucunda diğer hedeflerin de pozitif düzenlenmesinin meydana geleceğini belirten Bosia vd. [162] çalışmalarıyla sonuçlar uyumlu bulunmuştur.

MikroRNA'ların hedeflerini sitokiyometrik aktivite ile düzenlediğini temel alarak Weill vd. [186] tarafından geliştirilen algoritma ile mikroRNA hedeflerinin belirlenmesinde hata payının düşürülebileceği belirtilmiştir. Bu yaklaşım mikroRNA'ların geri dönüşümlü olarak kullanılması ve hedeflerin baskılanmasını içermektedir. Tez çalışmasında geliştirilen model ile mikroRNA miktarı değişmeksizin hedef miktarında değişiklik meydana geldiği için sitokiyometrik davranışın simüle edilebildiği söylenebilir.

4.4.1.1 ABCC1 Geninin Pozitif Düzenlenmesi ile Hastalarda Model Davranışlarının İncelenmesi

Yarışmalı endojen RNA'ları ele alan çalışmalar, hücrede belirli bir konsantrasyon aralığında bulunan hedefler için eşik benzeri davranışı ele almaktadır. Ancak model sonuçlarında bu durum gen ifadeleriyle birlikte mikroRNA ifadelerine ve mikroRNA etkinliğinde önemli olan faktörlere dayandırılabilmiştir. TCGA-E9-A1N5 hastasında ABCC1 geninin ifadesinin 4.10 katına çıkarılması durumunda, aynı veya farklı mikroRNA'lar tarafından hedeflenen diğer genlerden bazılarının ifadelerinin 4.10 kattan fazla şekilde arttığı görülmüştür. Bu durumun genleri hedefleyen mikroRNA'nın ifadesinin fazla olmasından veya bu genlerin aynı kümede bulunduğu genlere karşı mikroRNA'nın gösterdiği aktivitenin düşük olmasından kaynaklanmış olabilir.



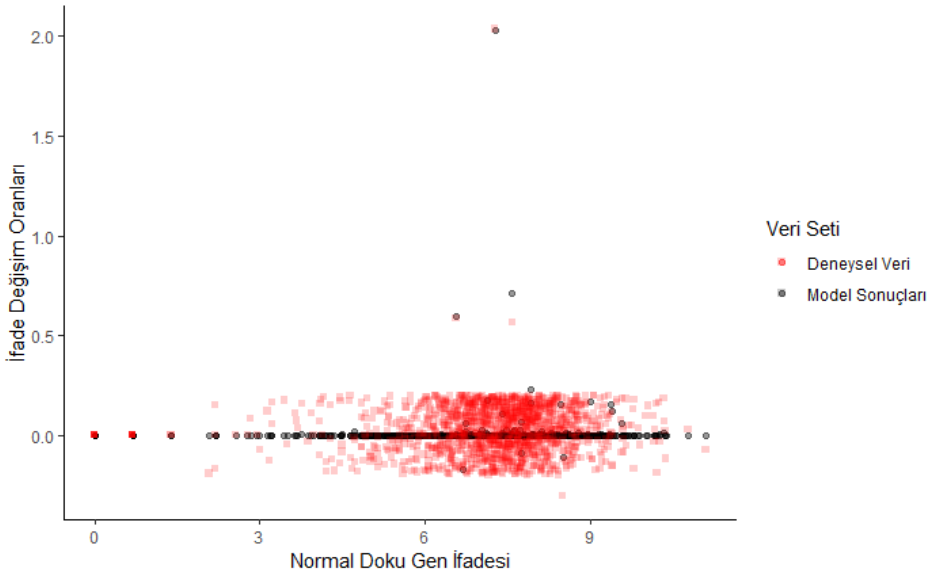
Şekil 4.7 TCGA-E9-A1N5 örneğinin gen ifadesi değişimi ve ABCC1 geninde meydana getirilen değişiklik sonrasında model sonuçları.

TCGA-E9-A1N5 hastasının normal ve tümör dokusu örneklerinden gen ifadesi değişim analizi yapıldığında (Şekil 4.7 A) ve model sonuçlarıyla kıyaslandığında ise gerçek verilerle modelin tam olarak uyuşmadığı görülmüştür (Şekil 4.7 B). Model sonuçlarının gen ifadesindeki değişiklikleri tahminleme konusunda yeterliliğinin anlaşılması için gerçek dizileme verilerinde ve model sonuçlarında normal dokuya göre gen ifadesi değişim analizi yapılmıştır.

Model çalışması gen ifadesini okuma sayısını baz alarak gerçekleştirilmiştir. Bu sebeple birebir tutarlı sonuçların elde edilmesi beklenmemektedir. Ancak gerçek veri setlerinde ve model sonuçlarında gen ifadesi değişim profillerinin yakın olması model sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Model sonucunda ve gerçek verilerde gerçekleştirilen ifade değişim analizlerinden elde edilen sonuçlar arasındaki farkın küçük olduğu ($|\log_2(\text{model/normal}) - \log_2(\text{tümör/normal})| < 0.2$) genler seçilmiştir. Bu işlemin gerçekleştirilmesi ve grafiğin oluşturulması için Çizelge 4.7'deki algoritma kullanılmıştır. Sonucunda ise 1393 genin çok yakın seviyede belirlendiği (<0.2 fark ile) görülmüştür (Şekil 4.8).

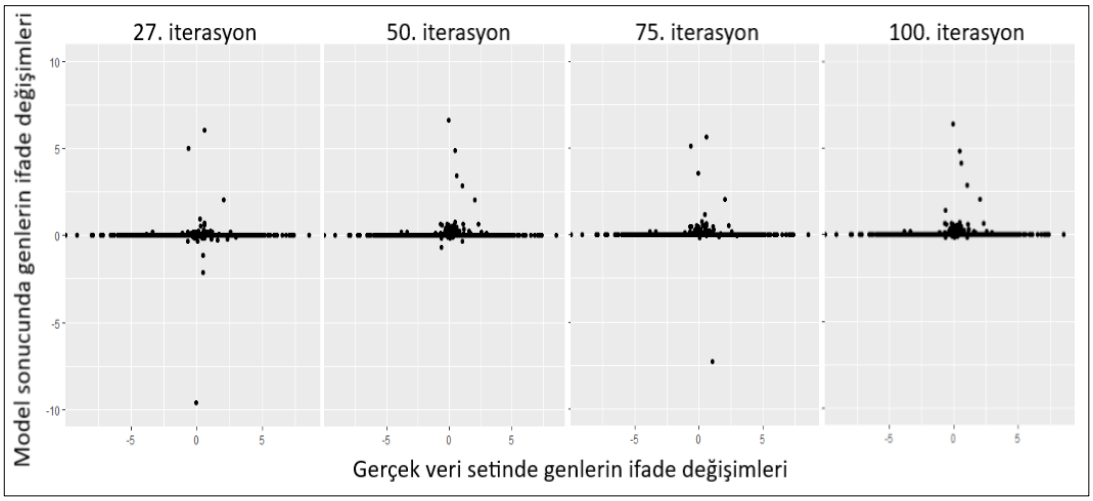
Çizelge 4.7 Algoritma 15

```
TCGA_E9_A1N5_tumorandnormal_mirnaTCGA%>%
  inner_join(as_tibble(result_graph_E9), by = c( "Ensembl_Gene_Id"= "n
ame"))%>%
  select(Ensembl_Gene_Id, gene_expression_normal_htseq_counts, gene_ex
pression_tumor_htseq_counts, expression_current)%>%
  distinct()%>%
  mutate(FC_reel = log2(gene_expression_tumor_htseq_counts/gene_expres
sion_normal_htseq_counts), FC_model = log2(expression_current/gene_exp
ression_normal_htseq_counts))%>%
  filter(abs(FC_model-FC_reel)< 0.2)%>%
  ggplot(aes(x = log(gene_expression_normal_htseq_counts)))+
  geom_jitter(aes(y = FC_model, colour = "Model Sonuçları"), alpha= 0.
4)+
  geom_jitter(aes(y = FC_reel, colour = "Deneysel Veri"), alpha = 0.2,
shape= "square")+
  theme_classic()+
  scale_color_manual(name = "Veri Seti", values= c( 'Model Sonuçları'
= "black", 'Deneysel Veri' = "red" ))+
  ylab("İfade Değişim Oranları")+
  xlab("Normal Doku Gen İfadesi")
```



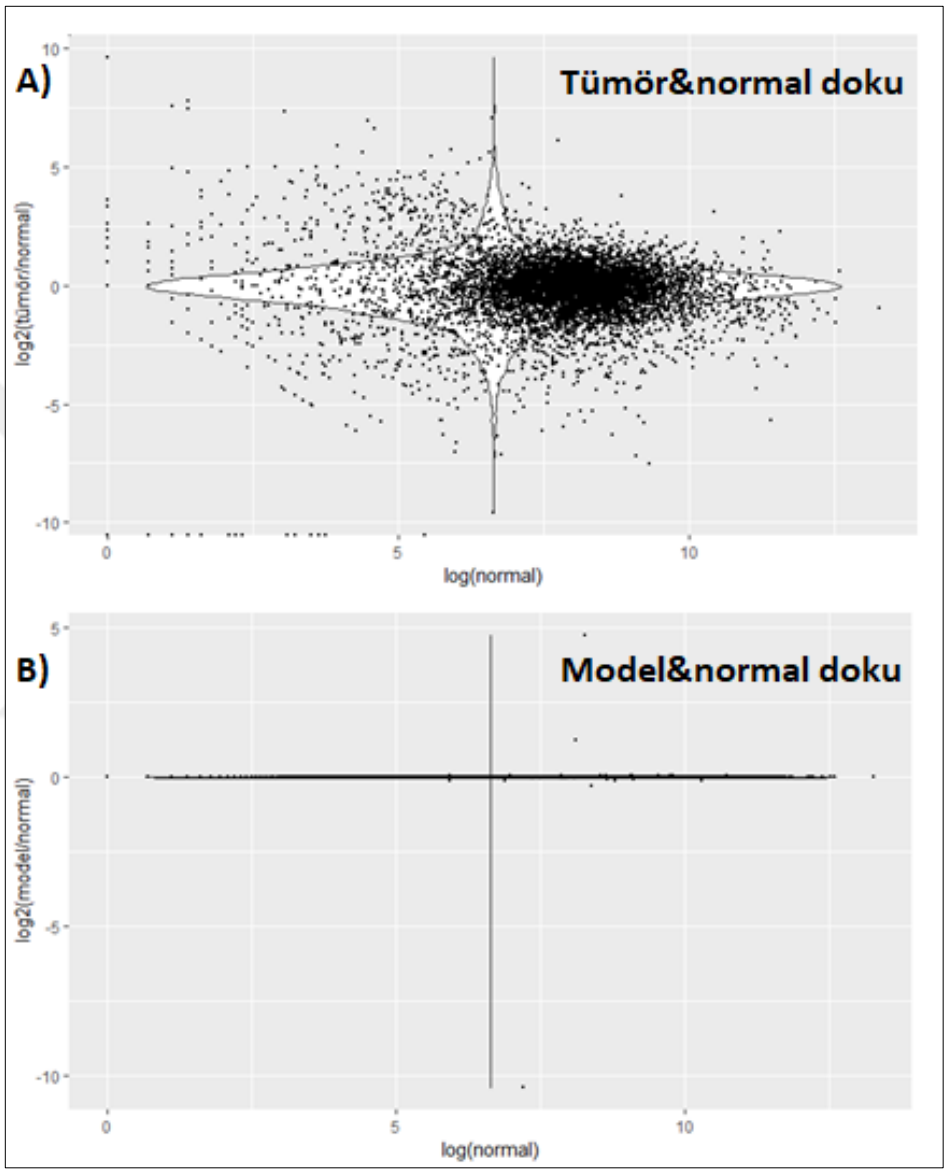
Şekil 4.8 TCGA-E9-A1N5 örneğinin gen ifadesi değişimi ve model sonuçlarına göre yakın bulunan genler.

Bununla birlikte yapılan değişikliğin tüm genlerde etkisinin gözlenmesi için kullanılan iterasyon sayısının uygunluğunun anlaşılması için ABCC1 geninin 4.10 katına çıkarılması durumuda model, farklı iterasyonlarda çalıştırılmış ve sonuçları incelenmiştir. TCGA-E9-A1N5 örneğinde ABCC1 geninin ifade artışında 27. iterasyonun sonucunda elde edilen sonuçların yanı sıra farklı iterasyonlarda model çalıştırılmıştır ve sonuçlar ifade değişim analizi yapılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.9). E9 hastası için farklı iterasyon sonuçları incelendiğinde negatif düzenlenen gen sayısında azalma gözlenmiştir. Ancak elde edilen sonuçlar Şekil 4.9'da da görüldüğü gibi gerçek veri setleri ile uyumlu bulunmamıştır.



Şekil 4.9 TCGA-E9-A1N5 örneğinde ABCC1 geninin ifadesinde değişikle farklı iterasyonlarda çalıştırılan model sonuçlarının gerçek veri ile kıyaslanması

TCGA-A7-A0CE hasta örneğinde ABCC1 geninin ifadesinin 2.35 katına arttırılması sonucunda, gen ifadelerinde diğer örnekteki kadar değişiklik meydana gelmemiştir. Sonuçlar E9 hasta örneği için yapıldığı gibi analiz edilmiştir ve sunulmuştur (Şekil 4.10).



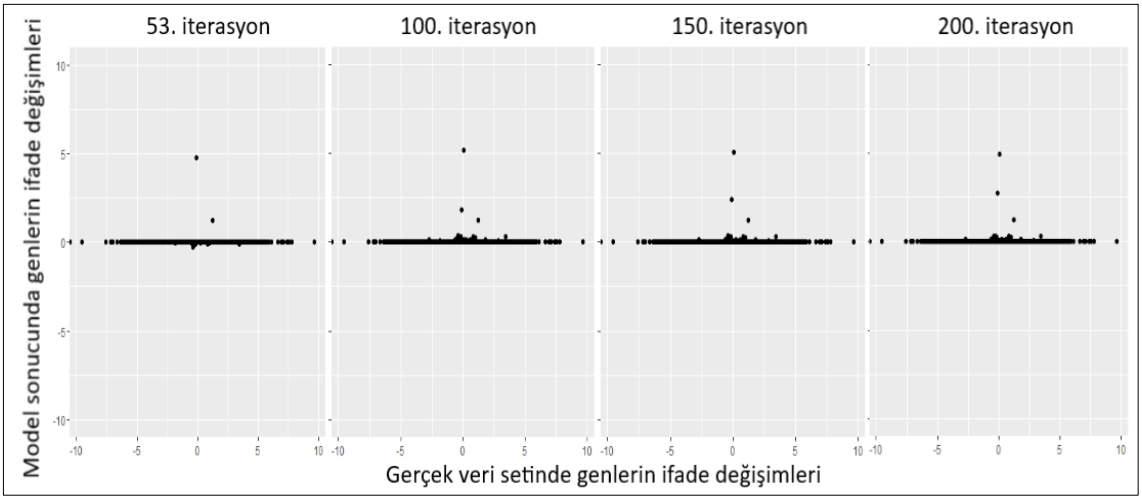
Şekil 4.10 TCGA-A7-A0CE örneğinin gen ifadesi değişimi ve ABCC1 geninde meydana getirilen değişiklik sonrasında model sonuçları.

TCGA-A7-A0CE hasta örneği için model sonuçları ve gerçek veri seti gen ifadesi değişim analizinin sonuçlarına göre kıyaslandığında 1488 genin ifadesindeki değişikliğin yaklaşık olarak bulunduğu görülmüştür (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 TCGA-A7-A0CE örneğinin gen ifadesi değişimi ve model sonuçların göre yakın bulunan genler.

TCGA-A7-A0CE örneğinde ABCC1 geninin ifade artışında 53. iterasyonun sonucunda elde edilen sonuçların yanı sıra farklı iterasyonlarda model çalıştırılmış ve sonuçlar ifade değişim analizi yapılarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.12). Değişen iterasyonlarda model sonuçlarında belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. Aynı zamanda herhangi bir iterasyonda gerçek veri setlerindeki ifade değişim profilleri ile tutarlılık saptanmamıştır.



Şekil 4.12 TCGA-A7-A0CE örneğinde ABCC1 geninin ifadesinde değişikle farklı iterasyonlarda çalıştırılan model sonuçlarının gerçek veri ile kıyaslanması

TCGA-E9-A1N5 ve TCGA-A7-A0CE hasta örnekleri için gerçekleştirilen analizler sonucunda model ve gerçek veri setlerinin tam anlamıyla tutarlı sonuçlar vermediği

görülmüştür. Gen ifade değişim analizlerinde ise E9 örneği için 1393 ve A7 örneği için 1488 genin ifadesindeki değişikliklerin yaklaşık olarak bulunduğu görülmüştür. MikroRNA aracılı gen ifade düzenlenmelerini belirleyen model yaklaşımında gen ifadelerinde belirgin değişiklikler meydana gelmemesi sebebi ile gerçek veri setiyle benzer gen ifade değişim sonuçlarının elde edildiği düşünülmektedir.

İki hastada aynı genin farklı sonuçları ortaya çıkarmasının sebeplerinin anlaşılması için ABCC1 geninin üzerinde etkinlik sağlayan mikroRNA'lar ve etki faktörleri incelenmiştir. Çizelge 4.8'de gösterildiği gibi iki hastada da ABCC1 genin düzenlenmesinde ortak mikroRNA ifadeleri mevcuttur ve etkinliklerindeki önemli olan faktörler değişmemiştir. Ancak hedefleyici mikroRNA'ların ve ABCC1 geninin ifadesinde değişiklik mevcuttur. Gen ifadesi A7 hastası için normal dokuda 3344 iken 7878'e çıkarılmış; E9 örneği için ise 1420'den 5827'ye çıkarılmıştır. A7 örneği için ABCC1 geni hedefleyen toplam mikroRNA miktarı 2318, E9 için ise 4923' tür. ABCC1 geniyle birlikte aynı kümelerde bulunan genlerin miktarları incelendiğinde, E9 örneği için bu altı mikroRNA'nın toplam hedef ifadesi 8474715'tir. A7 hastası için ABCC1 geninin bulunduğu mikroRNA topluluğunun toplam hedef okuma sayısının 18300961 olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.8 ABCC1 geninin iki hasta örneğinde etkileşimde olduğu mikroRNA'lar ve etkileşim faktörleri.

miRNA	**Mirnaexpression normal (A7)**	**Mirnaexpression normal (E9)**	**Energy (E9 ve A7)**	**Seed_type_effect (A7 ve E9)**	**Region_effect (A7 ve E9**
hsa-miR-125b-5p	1177	2629	-16,9	0,43	0,84
hsa-miR-16-5p	297	835	-16,1	0,43	0,42
hsa-miR-186-5p	170	545	-19,3	0,01	0,42
hsa-miR-23b-3p	663	857	-17,2	0,01	0,42
hsa-miR-339-5p	11	49	-16,1	0,01	0,42
hsa-miR-615-3p	0,768	8	-23,8	0,01	0,42

ABCC1 geninin ağ yapısında bulunduğu kümeler incelendiğinde iki hasta için modeldeki davranışları tanımlanabilmiştir. A7 hasta örneğinde ABCC1 gen ifadesi arttırıldığında hedefleyici mikroRNA'ların miktarının az olmasının yanında hedef havuzundaki toplam ifade düzeyinin fazla olmasından dolayı tüm etkileşimlerdeki gen ifadesi değişimi önemli düzeyde gerçekleşmemiştir.

Bunun tersine E9 hasta örneğinde ise ABCC1 geninin bulunduğu kümelerde mikroRNA ifadesinin A7'ye kıyasla yüksek olması ve hedef havuzundaki toplam gen miktarının az olmasından dolayı, gen ifadesindeki değişiklik diğer genler üzerinde daha belirgin bir etki oluşturmuştur. Bosson vd. [10] tarafından yarışmalı hedef RNA modelinde mikroRNA hedef bağlanmasının mikroRNA:hedef havuzu oranına göre belirlendiği ve artan mikroRNA:hedef oranında bağlanmanın hiperbolik olarak arttığı belirtilmiştir. Mullokandov vd. [199] gerçekleştirdikleri çalışmada düşük mikroRNA miktarına karşılık hücrede yüksek hedef konsantrasyonunun bulunması durumunda mikroRNA'ların aktvitesinin zayıf kalacağını belirtmiştir. Bosson vd. [10] deneysel çalışmalarında, diğer yandan çekirdek tipinin etkisini anlamaya çalışmış ancak çekirdek dizilerinin yalnızca kanonik olanlarını ele almaları ve fazla etkileşimden dolayı yığılma sebepli ayrımını yapamadıklarını belirtmişlerdir. Tez çalışmasında geliştirilmiş ağ tabanlı çok faktörlü modelin ise hem hedef miktarı hem de çekirdek tipi yönünden etkinliğin ayrımının yapılmasına olanak sağlayabileceği görülmüştür.

4.4.1.2 Benzer Seviyede Meydana Gelen Pozitif Düzenlenmeler ile Hastalarda Model Davranışlarının İncelenmesi

Düzenlenmede ifadenin değişim oranının, diğer genlerin düzenlenmesinde öneminin tespiti için A7 hastasında da ABCC1 geninin ifadesi 4.10 katına çıkarılmıştır. Örnekte ABCC1 geninin ifadesi 2.35 katına çıkarıldığında 53 olan iterasyon parametresi, 4.10 katına çıkarıldığında 51 olarak bulunmuştur. Buradan örnek için elde edilen ağ yapısındaki etkileşimlerin yanı sıra değişikliğin miktarının da ağ üzerindeki değişiklik hızına etki ettiği anlaşılmaktadır. ABCC1 geninin ifadesi 2.35 katına çıkarıldığında genin diğer genlerin düzenlenmesi üzerindeki maksimum etkinliği 53. iterasyonda sağlanırken; 4.10 katına çıkarıldığında 51. iterasyonda maksimum sayıda gene ulaşmış haldedir. Bu düzenlenme ile model çalıştırıldığında hasta ağ yapısında etkileşimde olan diğer genlerin ifadesinde yine belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir.

Çizelge 4.9 Algoritma 16

```
find_iteration(A7_modelgraph, "ZNF714", 4.10) #60


A7_modelgraph%>%
  priming()%>%
  update_nodes(once = TRUE)%>%
  gene_update_how("ZNF714", 4.10)%N>%
  update_nodes()%>%
  simulate(cycle = 60) ->result_graph_A7
```

Gen ifadesinin artış oranın baskılayıcı etkinlik açısından öneminin anlaşılması için A7 örneğinde ZNF714 geninin ifadesinin 4.11 katına çıkarılması ile model tekrarlandığında (Çizelge 4.9) yarışmalı davranış gözlenmiş ancak E9 hastasında oluşturduğu etki kadar belirgin olmadığı saptanmıştır. ZNF714 genini hedefleyen 9 mikroRNA'nın toplam bir milyonda okuma miktarı yaklaşık 5300 iken, 23330838 gen bu mikroRNA'lar tarafından hedeflenmektedir.

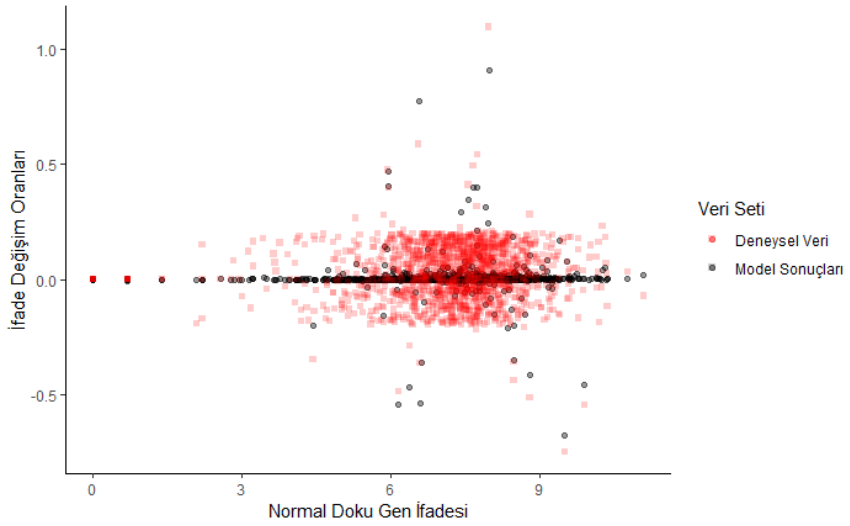
Test edilen iki düzenlenme sonucunda yarışma gösteren gruplar aracılığıyla gerçekleşen yeniden düzenlenmelerin mikroRNA:hedef oranından çok fazla etkilendiği anlaşılmıştır. Bu sebeple de düşük mikroRNA ifadesine karşılık fazla sayıda gen okuma sayısı içeren A7 hastasında herhangi bir gende farklı oranlarda meydana gelen gen ifadesi değişiminin, diğer genler üzerinde belirgin etkisinin olmayacağı düşünülmektedir.

4.4.1.3 MikroRNA İfadesinde Değişikliğiyle Hastada Model Uygulaması

MikroRNA aracılı olarak düzenlenmelere dair modelin test edilmesi için başka bir yöntem olarak da normal dokudaki mikroRNA ifadelerinin, tümör dokusundaki değerlerine güncellenmesi gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen find_perturbation_bymirna() fonksiyonunun sonucu Çizelge 4.10'da gösterildiği gibi işlenmiştir. Sonuç olarak 1381 genin ifadesi gerçek ifadesine yakın olarak bulunmuştur (Şekil 4.13). Benzer seviyede ifade değişimi saptanan genlerin ağ üzerinde konumlarının anlaşılması ve öbek oluşumunun olup olmadığı gözlenmiş ve sonuç Şekil 4.14'te sunulmuştur.

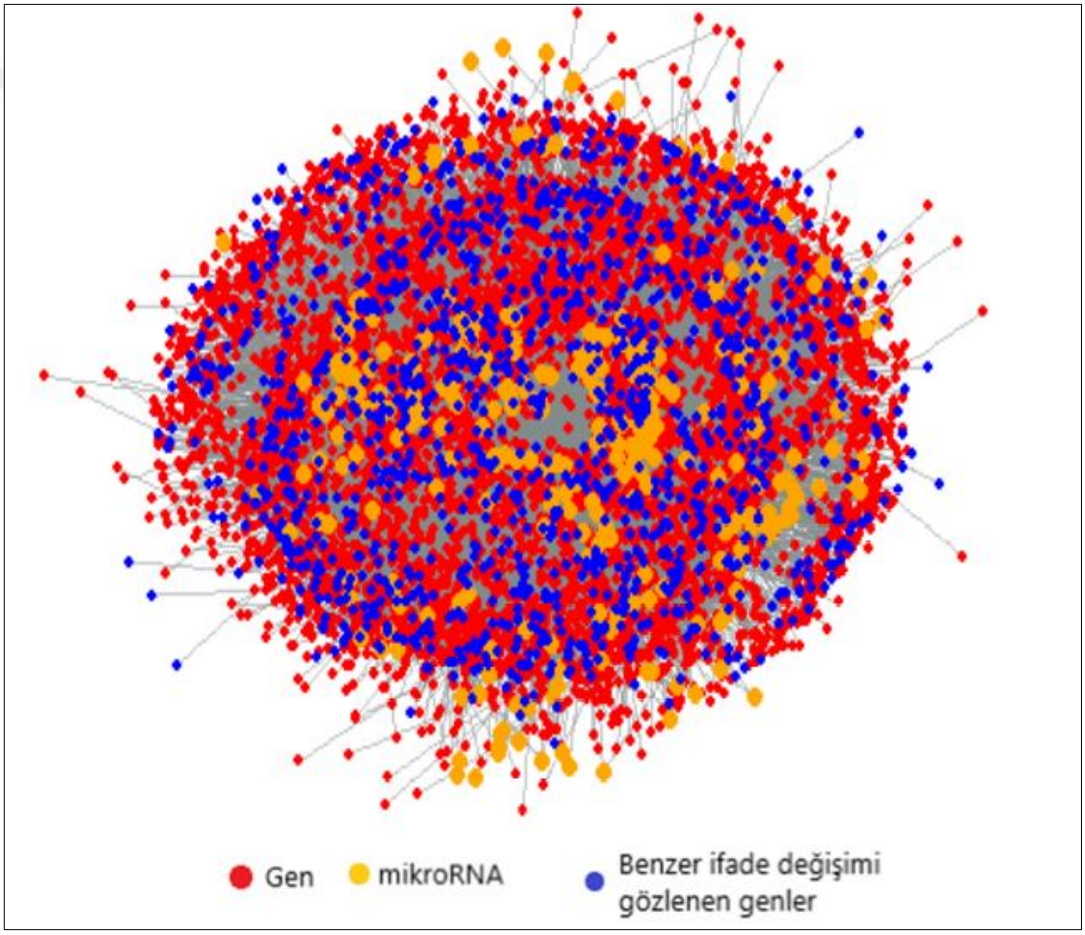
Çizelge 4.10 Algoritma 17

```
TCGA_E9_A1N5_tumorandnormal_mirnaTCGA%>%
  inner_join(as_tibble(mirna_changes_E9), by = c( "Ensembl_Gene_Id"= "
name"))%>%
  select(Ensembl_Gene_Id, gene_expression_normal_htseq_counts, gene_ex
pression_tumor_htseq_counts, expression_current)%>%
  distinct()%>%
  mutate(FC_reel = log2(gene_expression_tumor_htseq_counts/gene_expres
sion_normal_htseq_counts), FC_model = log2(expression_current/gene_exp
ression_normal_htseq_counts))%>%
  filter(abs(FC_reel-FC_model)<0.2)%>%
  ggplot(aes(x = log(gene_expression_normal_htseq_counts)))+
  geom_jitter(aes(y = FC_model, colour = "Model Sonuçları"), alpha= 0.
4)+
  geom_jitter(aes(y = FC_reel, colour = "Gerçek Veri"), alpha = 0.2, s
hape= "square")+
  theme_classic()+
  scale_color_manual(name = "Veri Seti", values= c( 'Model Sonuçları'
= "black", 'Deneysel Veri' = "red" ))+
  ylab("İfade Değişim Oranları")+
  xlab("Normal Doku Gen İfadesi")
```



Şekil 4.13 TCGA-E9-A1N5 hastası için mikroRNA ifadesinin değiştirilmesi sonucunda elde edilen gen ifade profilleri ve gerçek gen ifade profilleri değişimi.

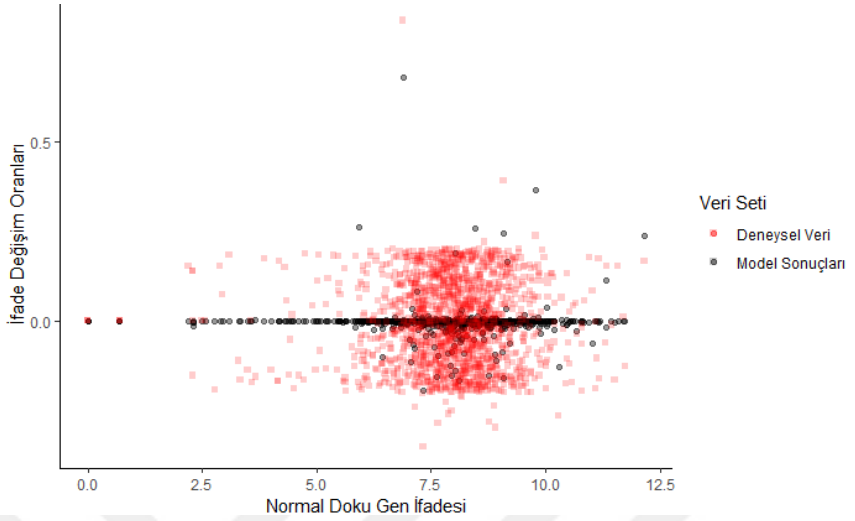
Hastalarda mikroRNA ifadesi değişimi sonrasında model çalıştırıldığında, gen ifade değişimi aracılı model tetiklenmesine kıyasla, bazı genler için çok yakın düzeyde ifade değişimlerinin bulunduğu görülmektedir (Şekil 4.13). Bununla birlikte model sonuçları ve gerçek veri setlerinde gen ifadesi değişim analizi yapılıp ağ üzerinde görüntülendiğinde benzer seviyede ifade edilen genlerin (Şekil 4.14, mavi renk ile gösterilmiştir) öbek yapısı oluşturmadığı ağ üzerinde farklı konumlarda bulunduğu görülmüştür. Gerçek verilerle benzer seviyede ifade değişim profili sergilemeyen genler (Şekil 4.14, kırmızı renk ile gösterilmiştir) için de aynı durum geçerlidir. Bu durum aslında modelin tüm etkileşimde olan genler için çalıştığının da göstergesidir.



Şekil 4.14 TCGA-E9-A1N5 hastasında mikroRNA ifade değişimine bağlı olarak çalıştırılan model sonuçlarında ve gerçek veri setinde benzer ifade değişimi gözlenen genler.

Aynı şekilde A7 hasta örneğinde mikroRNA ifadeleri tümör dokusuyla uyumlu olarak değiştirildiğinde ise 1487 genin ifadesinde değişim yaklaşık olarak bulunmuştur. Bu hasta için gerçek verilerde de gen ifadelerinde çok belirgin ifade değişimi bulunmamakla

birlikte, bu sebepten model aracılığıyla ifade değişimi yakın olarak bulunmuş olabilir. A7 hastası için mikroRNA ifadesi değişiminde elde edilen sonuçlarla gerçek veriler kıyaslandığında Şekil 4.15'te gösterilen sonuçlar elde edilmiştir.



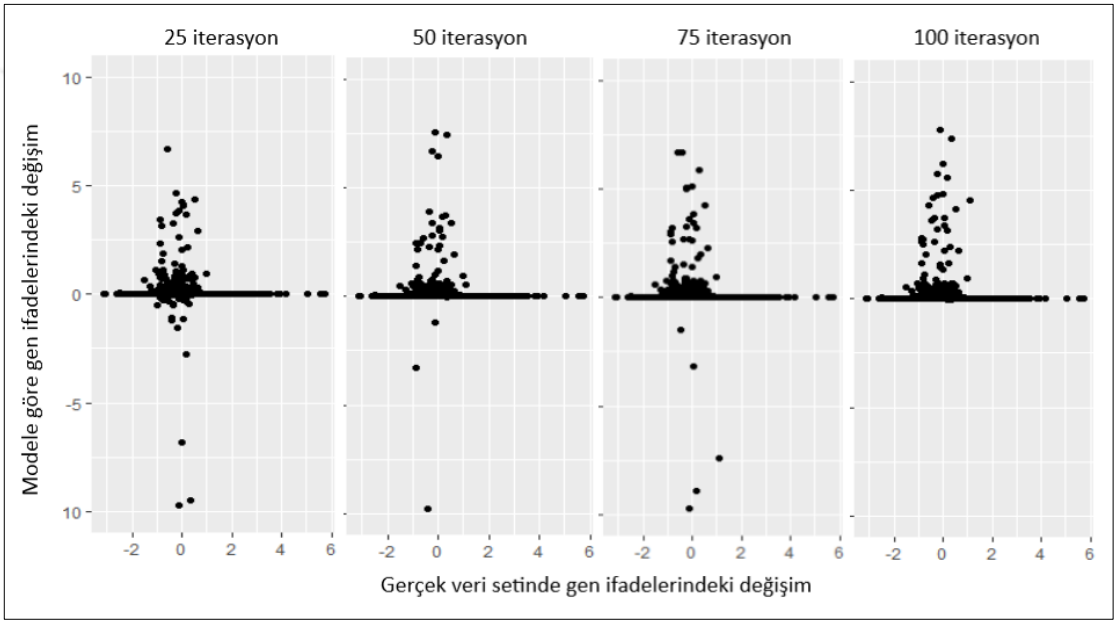
Şekil 4.15 TCGA-A7-A0CE hastası için mikroRNA ifadesinin değiştirilmesi sonucunda elde edilen gen ifade profilleri ve gerçek gen ifade profilleri değişimi.

4.5 Tartışma

Yapılan çalışma sonucunda mikroRNA aracılı hedef gen düzenlenmelerinin anlaşılması için bir model sistem geliştirilmiştir. Geliştirilen sistem, günümüze kadar yarışmalı mikroRNA hedeflerinin düzenlenmelerine dair çalışmalara göre etkileşimleri daha geniş şekilde ele alabilecek esnek bir modeldir. Bu modelin hastalar üzerinde farklı şekillerde uygulamaları yapıldığında doğrudan hedef düzenlenmelerinin sonuçlarını tahmin etmekte yetersiz kalmakla birlikte, mikroRNA hedeflerinin yarışmalı davranışlarının anlaşılması ve etkileşimlerde önemli olan elemanların tespit edilmesi için bir çözüm aracı olabileceği görülmüştür.

MikroRNA:hedef etkileşimlerinin anlaşılmasında hasta örnekleri üzerinden gerçekleştirilen işlemlerde herhangi bir gen düğümü doğrudan tümör dokusundaki ifadesine arttırılmıştır. Böyle bir yaklaşım temelde eksik yönler içermektedir. Öyle ki, tümör dokusundaki gen ifadesi düzenlenmelerinin, model için rastgele seçilen genden başladığı bilinmemektedir. Bununla birlikte tek bir gen ifadesindeki değişikliğin tümör dokusunda değişen gen ifade profilinin oluşmasına sebep olduğu da düşünülmemektedir. Bu amaçla tez çalışmasında GEO veri tabanından Septin9 geninin

pozitif düzenlenmesinin sonuçlarını yeni nesil dizileme araçlarıyla tanımlamış GSE119449 numaralı çalışmanın [200] veri setleri elde edilmiş ve model test edilmiştir. Bu işlemler sırasında çalışmada kullanılan hücre hattında mikroRNA ifadesi belirlenmediği için TCGA veri setindeki tümör örneklerinin mikroRNA ifade değerlerinin ortalaması alınarak işlem Ek-A'daki gibi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veri setinden 482 mikroRNA ve 8557 hedef genin bulunduğu bir ağ yapısı elde edilmiş, sonrasında ise model çalıştırılmıştır. Veri seti için farklı iterasyonlarda model ile elde edilen veriler ve gerçek verilerin log2() dönüşümü yapılarak başlangıç haldeki gen ifadelerine oranla değişimi bulunmuş ve sonuçlar Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.16 GSE119449 veri setinde ağ tabanlı modelin sonuçları.

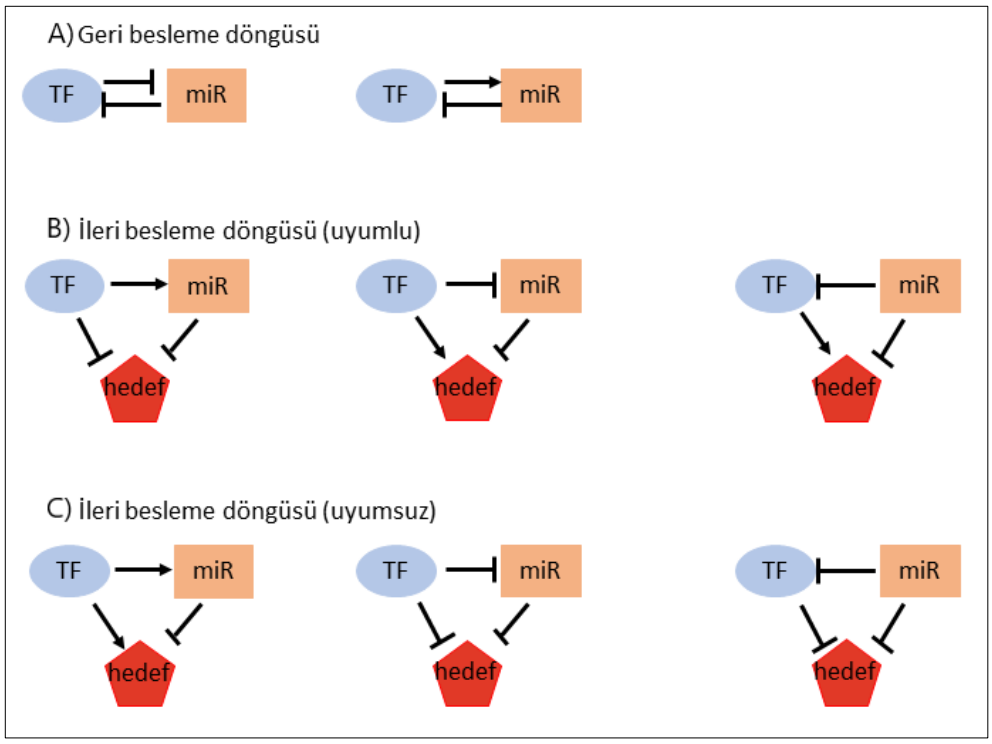
Modelin Septin9 pozitif düzenlenmesiyle tetiklendiği uygulamada gerçek verilerle yaklaşık olarak ifade düzeyi bulunabilen 3000'e yakın gen tespit edilmiştir. Bu uygulamada model ile bulunan değişmiş gen ifadeleri, TCGA veri setlerindekinin aksine yalnızca ifadesi anlamlı şekilde değişmeyenler değildir. Bu yönden mikroRNA ifadesi için yalnızca TCGA-BRCA tümör dokusu örneklerindeki mikroRNA ifadelerinin ortalamasıyla çalıştırılmasına rağmen modelin daha iyi sonuç verdiği söylenebilir. Düzenlenmeleri doğru şekilde simüle edebilen modelin, gerçek verilerle uyuşmamasının farklı sebepleri olabilir.

Model sonuçlarının gerçek verilerle uyuşmamasının en temel nedenlerinden biri kullanılan verilerin aynı örnek için olmaması veya bilinmeyenler içermesidir. Örneğin TCGA veri setlerinde tümör dokusundaki bir genin ifadesi bulunarak ifade artışı simüle edilmiştir. Ancak gerçek verilerde tümör dokusundaki gen ifade profili değişikliğinin seçilen genden kaynaklandığını söylemek imkansızdır. Bunun tam tersi şekilde GEO aracılığı ile elde edilen veri setinde modelin uygulanması konusunda ise eksik bilgi hücrelerdeki mikroRNA ifadesidir. Çalışmada bunun için TCGA tümör doku örneklerinin ortalama mikroRNA ifadesi alınmıştır. Ancak doğrudan bir hücre hattında mikroRNA ve gen ifadesinin belirlenmesini takiben gerçekleştirilecek bir değişikliğin sonuçlarının ve bu değişiklikle çalıştırılan modelin sonuçlarının kıyaslanması temelde daha doğru bir yaklaşım sağlayabilir.

Canlı hücrede mikroRNA hedefleri yalnızca mRNA'lar değildir. MikroRNA'lar aynı zamanda lncRNA gibi kodlanmayan RNA transkriptleriyle de etkileşime girmektedir [201]. Kodlanmayan RNA transkriptleri ve mikroRNA'lar arasındaki etkileşim mikroRNA hedef mRNA düzenleme mekanizmalarının sonuçlarını değiştirmektedir. Bu kodlanmayan RNA transkriptleri bir sünger gibi mikroRNA'ları üzerine çeker ve böylece hedef mRNA'sına erişimini engellemektedir [202]. Öyle ki, mikroRNA'ların mRNA hedeflerinin üzerindeki etkinliğinin kodlanmayan RNA'lar ile inhibe edilmesi yoluyla kanser hücrelerinin bazı fonksiyonlarının kaybettirilmesine dair çalışmalar da bulunmaktadır [203]. Sonuç olarak mikroRNA'ların hedefleri arasındaki yarışmalı RNA davranışları tüm düzenlenmeleri etkileyecek kompleks etkileşimleri içermektedir. Bu etkileşimler çapraz düzenlenmelere sebebiyet vermekle birlikte [93], henüz tanımlanmamış düzenlenmelerin mevcut olması sebebiyle geliştirilen modelin gerçekle tutarlı davramaması muhtemeldir. Ancak tez çalışmasında geliştirilen model esnek bir yapıya sahip olduğu için gelecekte tanımlanacak pek çok değişkenin model içerisinde kullanılması mümkün olabilecektir.

Bununla birlikte mikroRNA'lar halen üzerine çalışmalar devam eden, aydınlatılması gereken pek çok konu içeren moleküllerdir. Bu RNA'ların hedeflerinin belirlenmesi ise hedeflerinin düzenlenmesinin anlaşılmasında en önemli konudur. MikroRNA hedeflerinin belirlenmesi için geliştirilen güncel yöntemler genellikle mikroRNA'nın farklı moleküler tekniklerle izolasyonunu ve yeni nesil dizileme tekniklerini içermektedir.

Ancak bu yeni tekniklere dayanan veri setleri sınırlı sayıdadır. Özellikle mikroRNA ve hücre içerisinde o an etkileşimde bulunduğu hedef mRNA'nın birlikte eldesi ve dizilemesine dayanan CLASH ve CLEAR-CLiP yöntemleri kesin mikroRNA:hedef etkileşimlerinin elde edilmesini sağlamaktadır. Bu sebeple, yöntemlerin hedef ve mikroRNA arasındaki tüm eşleşme bölgelerinin doğru şekilde tanımlanması ve mikroRNA:hedef etkileşimlerinin detaylandırılması için şu ana kadar geliştirilmiş en iyi teknikler olduğu düşünülmektedir. Ancak bu yöntemlerle sunulan mikroRNA:hedef verisi oldukça azdır. Bununla birlikte CLASH deneysel çalışmasında mikroRNA tanımlanması için HEK 293 ve CLEAR-CLiP çalışması için Huh7.5 hücre hatları kullanılmıştır [85],[86]. Ancak mikroRNA'ların ifadesi doku spesifik olarak değişmektedir [204],[205]. Yapılan çalışmalar olgun mikroRNA izoformlarının dahi doku spesifik olarak ifadelerinin değişebileceğini belirtmişlerdir [204]. Bu durum mikroRNA hedeflerini belli bir dokuda anlık izolasyon yöntemleriyle belirleyen CLASH ve CLEAR-CLiP veri setlerinde yetersizliğe sebep olabilir. Bu sebeple tez çalışmasında ele alınmış olan mikroRNA:hedef veri setlerinde dokudaki tüm mikroRNA'lar ele alınamamış olabilir. Esasen meme kanser dokusunda kimerik okumaya dayalı olarak tanımlanmış mikroRNA hedefleriyle model sistem çalıştırılırsa daha tutarlı sonuçlar verebileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.17 MikroRNA ve transkripsiyon faktörleri döngü mekanizmaları [206].

Hücrede gen ifadesinin düzenlenmesi yalnızca mikroRNA'lar tarafından gerçekleştirilmemektedir. Transkripsiyon faktörleri, genlerin mRNA transkriptlerine dönüşümünü sağlarken, mikroRNA'lar mRNA transkript hedeflerini translasyon baskılanması veya yıkım yoluyla baskılamaktadır. Bu durum, mikroRNA ve transkripsiyon faktörlerini ve ileri veya geri besleme döngülerini içeren çok katmanlı gen düzenleyici kompleks ağlar olarak da açıklanır [207],[208]. Kolorektal kanserdeki bu mekanizmaların ele alındığı çalışmada Wang vd. [209] transkripsiyon faktörleri ve mikroRNA'ların ortak genleri ile analizini, ağlar üzerinden yaptıklarında önemli olabilecek mikroRNA-transkripsiyon ilişkilerini tanımlayabilmişlerdir. Aynı şekilde gen ifade değişim analizlerine dayanarak alt ağ yapılarının birlikte analiz edilmesi yöntemiyle prostat kanseri için önemli etkileşimler tanımlanmıştır [210]. Ancak kanser dokularında gerçekleştirilen çalışmalarda aslında çok karmaşık ilişkileri içeren düzenlenmelerin olduğu belirtilmektedir [206]. Transkripsiyon faktörleri ve mikroRNA'lara arasında ileri ve geri besleme döngüleri bulunmaktadır. Örneğin geri besleme döngülerinde bir mikroRNA, hedef transkripsiyon faktörünü inhibe ederek kendi transkripsiyonunu engelleyebilir (Şekil 4.17 A). Bununla birlikte transkripsiyon faktörleri ve mikroRNA'lar ortak bir geni düzenleyebilir. Ortak hedef düzenleme mekanizmaları mikroRNA ve transkripsiyon faktörünün ortak hedeflerine davranışına göre iki şekilde gerçekleşebilmektedir. Örneğin bir transkripsiyon faktörü hem mikroRNA genini hem de aynı genin ürünün (mikroRNA) hedefi olan geni düzenleyebilir. Transkripsiyon faktörü ilgisini mikroRNA geninin transkripsiyonuna yönlendirir ise doğrudan hedef genin transkripsiyonu azalırken, aynı zamanda artan mikroRNA ifadesi sonucunda da hücrede serbest halde bulunan hedef gen miktarı azalmaktadır (Şekil 4.17 B). MikroRNA ve transkripsiyon faktörü bir gen üzerinde ters yönlü etkinlik de oluşturabilmektedir. Örneğin bir transkripsiyon faktörü hem bir mikroRNA'nın hem de aynı mikroRNA'nın hedefinin ifadesini arttırabilir. Bunun sonucunda ise ifadesi artan mikroRNA, hedefi üzerinde daha fazla baskılayıcı etkinlik sergileyerek hedef ifadesini azaltırken, transkripsiyon faktörü ise tam tersi şekilde hedef genin ifadesini arttırabilir (Şekil 4.17 C). Canlı hücrelerde bu düzenlenmelerin bütününün bilinmemesi sonucunda mikroRNA:hedef düzenlenmelerinin sonçlarının tahmin edilmesi zorlaşmaktadır. Be sebeple gelecek çalışmalarla, transkripsiyon faktörlerinin de etkinliğinde önemli olan

mekanizma ve faktörlerin iyi şekilde tanımlanması sonucunda tez çalışmasında ortaya koyulan modelin geliştirilebileceği düşünülmektedir.

MikroRNA:hedef etkileşimlerinde önemli olan faktörlere dair çalışmalar günümüze kadar farklı yaklaşımlarla ele alınmış ve negatif veya pozitif etkileri tanımlanmıştır. Ancak bu çalışmalarda tam olarak mikroRNA etkinliğinde öneminin açıklanması mümkün olmamıştır. Tez çalışmasında geliştirilen yöntem ise mikroRNA aktivitesinde önemli olan faktörlerin, mikroRNA'ların birincil hedef kümelerinde derecelendirilmesi ve doğrudan uygulaması şeklinde bir yaklaşım içermektedir. Gelecekte, çalışmalarla bu faktörlerin matematiksel olarak mikroRNA etkinliğine olan katkısı aydınlatılırsa geliştirilen modelin daha tutarlı yanıtlar oluşturabileceği düşünülmektedir.

Geliştirilen model ile gerçekleştirilen farklı simülasyonlarda, farklı genlerde, aynı oranda gerçekleştirilen ifade değişimlerinin sonuçlarının farklı olacağını göstermiştir. Öyle ki bir gen iki katına çıkarıldığında dolaylı olarak etkileşimde olduğu genleri çok etkilemezken, diğer bir gen belirgin şekilde diğer genlerin ifadesini değiştirebilmektedir. Bu durum ağ yapısında etkileşimde olan genlerin etki güçlerinin farklı olduğunu göstermektedir. Tez çalışmasında geliştirilen yaklaşımla etkileşimde olan genlerde aynı düzenlenme tetiklenip, elde edilen sonuçlar kıyaslanarak en kritik gen düğümü belirlenebilir. Bu yaklaşım aslında kanserde mikroRNA veya gen aracılı olarak geliştirilebilecek tedavi yaklaşımları açısından da önem taşımaktadır.

Kanser tedavisi için mikroRNA aracılı gen hedeflemesi [211] ve RNA aracılı gen susturulmasına [212] dair güncel yaklaşımlar bulunmaktadır. Bu yaklaşımlar kanserde kritik bir genin ürününün eliminasyonu için hedef genin susturulması temeline dayanmaktadır. Ancak bir hedef gen ifadesindeki değişikliğin, diğer genlerin ifade profillerindeki değişikliklerde önemi bilinmemektedir. Örneğin kanser tedavisi için onkogen özellikteki bir gen susturulmaya çalışılırken, tümör baskılayıcı bir gen de dolaylı olarak susturulabilir. Bu ise tedavi yaklaşımında amaçlanan sonuçlara ulaşılamamasına sebep olabilir. Bu yönüyle tez çalışmasında geliştirilen model, mikroRNA ve RNA aracılı olarak geliştirilecek tedavi yöntemlerinde öngörü oluşturma konusunda potansiyele sahiptir.

KAYNAKLAR

[1] Gilboa, E., (2007). "DC-based Cancer Vaccines", The Journal of Clinical Investigation, 117: 1195-1203.

[2] Sharkey, R. M. ve Goldenberg, D. M., (2006). "Targeted Therapy Of Cancer: New Prospects For Antibodies And Immunoconjugates", CA: a cancer journal for clinicians, 56: 226-243.

[3] Husain, S. R.,Han, J.,Au, P.,Shannon, K. ve Puri, R. K., (2015). "Gene Therapy For Cancer: Regulatory Considerations For Approval", Cancer Gene Therapy, 22: 554.

[4] Banwait, J. K. ve Bastola, D. R., (2015). "Contribution Of Bioinformatics Prediction In MicroRNA-Based Cancer Therapeutics", Advanced drug delivery reviews, 81: 94-103.

[5] Doudican, N. A.,Kumar, A.,Singh, N. K.,Nair, P. R.,Lala, D. A.,Basu, K.,Talawdekar, A. A.,Sultana, Z.,Tiwari, K. K.,Tyagi, A.,Abbasi, T.,Vali, S.,Vij, R.,Fiala, M.,King, J.,Perle, M. ve Mazumder, A., (2015). "Personalization of cancer treatment using predictive simulation", Journal of Translational Medicine, 13: 43.

[6] Jansson, M. D. ve Lund, A. H., (2012). "MicroRNA And Cancer", Mol Oncol, 6: 590-610.

[7] Berindan-Neagoe, I.,Monroig, P. d. C.,Pasculli, B. ve Calin, G. A., (2014). "MicroRNAome Genome: A Treasure For Cancer Diagnosis And Therapy", CA: a cancer journal for clinicians, 64: 311-336.

[8] Adams, Brian D.,Kasinski, Andrea L. ve Slack, Frank J., (2014). "Aberrant Regulation And Function Of MicroRNAs In Cancer", Current Biology, 24: R762-R776.

[9] Bartel, D. P., (2009). "MicroRNAs: Target Recognition And Regulatory Functions", Cell, 136: 215-233.

[10] Bosson, Andrew D.,Zamudio, Jesse R. ve Sharp, Phillip A., (2014). "Endogenous miRNA And Target Concentrations Determine Susceptibility To Potential ceRNA Competition", Molecular Cell, 56: 347-359.

[11] Breda, J.,Rzepiela, A. J.,Gumienny, R.,van Nimwegen, E. ve Zavolan, M., (2015). "Quantifying The Strength Of MiRNA–Target Interactions", Methods, 85: 90-99.

[12] Lai, X.,Wolkenhauer, O. ve Vera, J., (2016). "Understanding microRNA-Mediated Gene Regulatory Networks Through Mathematical Modelling", Nucleic Acids Res, 44: 6019-6035.

[13] Zinovyev, A.,Morozova, N.,Gorban, A. N. ve Harel-Belan, A., (2013). "Mathematical Modeling Of microRNA-mediated Mechanisms Of Translation Repression", Adv Exp Med Biol, 774: 189-224.

[14] Volinia, S.,Calin, G. A.,Liu, C.-G.,Ambs, S.,Cimmino, A.,Petrocca, F.,Visone, R.,Iorio, M.,Roldo, C.,Ferracin, M.,Prueitt, R. L.,Yanaihara, N.,Lanza, G.,Scarpa, A.,Vecchione, A.,Negrini, M.,Harris, C. C. ve Croce, C. M., (2006). "A microRNA Expression Signature Of Human Solid Tumors Defines Cancer Gene Targets", Proceedings of the National Academy of Sciences, 103: 2257-2261.

[15] Luscombe, N. M.,Greenbaum, D. ve Gerstein, M., (2001). "What Is Bioinformatics? A Proposed Definition And Overview Of The Field", Methods Inf Med, 40: 346-358.

[16] Raut, S. A.,Sathe, S. R. ve Raut, A., (2010). "Bioinformatics: Trends In Gene Expression Analysis", 2010 International Conference on Bioinformatics and Biomedical Technology, 16-18 April 2010, Chengdu, China.

[17] Moore, J. H.,Asselbergs, F. W. ve Williams, S. M., (2010). "Bioinformatics Challenges For Genome-wide Association Studies", Bioinformatics, 26: 445-455.

[18] Al-Rajab, M. ve Lu, J., (2012). "Bioinformatics: An Overview For Cancer Research", The 2012 World Congress in Computer Science, Computer Engineering & Applied Computing, 16-19 July 2012, Las Vegas, Nevada, USA.

[19] Sharma, M. K.,Dhar, M. K. ve Kaul, S., (2012). "Bioinformatics: An Introduction And Overview", International Journal of Engineering Research and Development, 3: 88-99.

[20] Balmain, A.,Gray, J. ve Ponder, B., (2003). "The Genetics And Genomics Of Cancer", Nat Genet, 33 Suppl: 238-244.

[21] Wu, D.,Rice, C. M. ve Wang, X., (2012). "Cancer Bioinformatics: A New Approach To Systems Clinical Medicine", BMC Bioinformatics, 13: 71-71.

[22] Stransky, B. ve Galante, P., (2010). An Omics Perspective on Cancer Research, 1, Springer Netherlands,Dordrecht.

[23] Irigoien, I. ve Arenas, C., (2018). "Identification Of Differentially Expressed Genes By Means Of Outlier Detection", BMC Bioinformatics, 19: 317.

[24] Salekin, S.,Bari, M. G.,Raphael, I.,Forsthuber, T. G. ve Zhang, J., (2017). "Early Response Index: A Statistic To Discover Potential Early Stage Disease Biomarkers", BMC Bioinformatics, 18: 313.

[25] Oh, J. H.,Craft, J. M.,Townsend, R.,Deasy, J. O.,Bradley, J. D. ve El Naqa, I., (2011). "A Bioinformatics Approach For Biomarker Identification In Radiation-Induced Lung Inflammation From Limited Proteomics Data", Journal of proteome research, 10: 1406-1415.

[26] Lintula, S. ve Hotakainen, K., (2010). "Developing Biomarkers For Improved Diagnosis And Treatment Outcome Monitoring Of Bladder Cancer", Expert Opin Biol Ther, 10: 1169-1180.

[27] Wang, D.-G.,Chen, G.,Wen, X.-Y.,Wang, D.,Cheng, Z.-H. ve Sun, S.-Q., (2015). "Identification Of Biomarkers For Diagnosis Of Gastric Cancer By Bioinformatics", Asian Pac J Cancer Prev, 16: 1361-1365.

[28] Circelli, L.,Petrizzo, A.,Tagliamonte, M.,Tornesello, M. L.,Buonaguro, F. M. ve Buonaguro, L., (2015). "Systems Biology Approach For Cancer Vaccine Development And Evaluation", Vaccines, 3: 544-555.

[29] Sankar, S.,Nayanar, S. K. ve Balasubramanian, S., (2013). "Current Trends In Cancer Vaccines--A Bioinformatics Perspective", Asian Pac J Cancer Prev, 14: 4041-4047.

[30] Gao, C., (2016), Computer-Aided Drug Design Approaches In Developing Anti-Cancer Inhibitors, Thesis for The Degree of Doctor of Philosophy, Department of Chemistry and Molecular Biology Univerisity of Gothenburg, Gothenburg.

[31] Workman, P. ve Collins, I. A. N., (2008). Cancer Drug Design and Discovery, 1, Academic Press,New York.

[32] Kasaian, K.,Li, Y. Y. ve Jones, S. J. M., (2014). Cancer Genomics, 1, Academic Press,Boston.

[33] Sanger, F.,Nicklen, S. ve Coulson, A. R., (1977). "DNA Sequencing With Chain-Terminating Inhibitors", Proceedings of the National Academy of Sciences, 74: 5463-5467.

[34] Maxam, A. M. ve Gilbert, W., (1977). "A New Method For Sequencing DNA", Proceedings of the National Academy of Sciences, 74: 560-564.

[35] Venter, J. C.,Adams, M. D.,Myers, E. W.,Li, P. W.,Mural, R. J.,Sutton, G. G.,Smith, H. O.,Yandell, M.,Evans, C. A.,Holt, R. A.,Gocayne, J. D.,Amanatides, P.,Ballew, R. M.,Huson, D. H.,Wortman, J. R.,Zhang, Q.,Kodira, C. D.,Zheng, X. H.,Chen, L.,Skupski, M.,Subramanian, G.,Thomas, P. D.,Zhang, J.,Gabor Miklos, G. L.,Nelson, C.,Broder, S.,Clark, A. G.,Nadeau, J.,McKusick, V. A.,Zinder, N.,Levine, A. J.,Roberts, R. J.,Simon, M.,Slayman, C.,Hunkapiller, M.,Bolanos, R.,Delcher, A.,Dew, I.,Fasulo, D.,Flanigan, M.,Florea, L.,Halpern, A.,Hannenhalli, S.,Kravitz, S.,Levy, S.,Mobarry, C.,Reinert, K.,Remington, K.,Abu-Threideh, J.,Beasley, E.,Biddick, K.,Bonazzi, V.,Brandon, R.,Cargill, M.,Chandramouliswaran, I.,Charlab, R.,Chaturvedi, K.,Deng, Z.,Francesco, V. D.,Dunn, P.,Eilbeck, K.,Evangelista, C.,Gabrielian, A. E.,Gan, W.,Ge, W.,Gong,

F.,Gu, Z.,Guan, P.,Heiman, T. J.,Higgins, M. E.,Ji, R.-R.,Ke, Z.,Ketchum, K. A.,Lai, Z.,Lei, Y.,Li, Z.,Li, J.,Liang, Y.,Lin, X.,Lu, F.,Merkulov, G. V.,Milshina, N.,Moore, H. M.,Naik, A. K.,Narayan, V. A.,Neelam, B.,Nusskern, D.,Rusch, D. B.,Salzberg, S.,Shao, W.,Shue, B.,Sun, J.,Wang, Z. Y.,Wang, A.,Wang, X.,Wang, J.,Wei, M.-H.,Wides, R.,Xiao, C.,Yan, C.,Yao, A.,Ye, J.,Zhan, M.,Zhang, W.,Zhang, H.,Zhao, Q.,Zheng, L.,Zhong, F.,Zhong, W.,Zhu, S. C.,Zhao, S.,Gilbert, D.,Baumhueter, S.,Spier, G.,Carter, C.,Cravchik, A.,Woodage, T.,Ali, F.,An, H.,Awe, A.,Baldwin, D.,Baden, H.,Barnstead, M.,Barrow, I.,Beeson, K.,Busam, D.,Carver, A.,Center, A.,Cheng, M. L.,Curry, L.,Danaher, S.,Davenport, L.,Desilets, R.,Dietz, S.,Dodson, K.,Doup, L.,Ferriera, S.,Garg, N.,Gluecksmann, A.,Hart, B.,Haynes, J.,Haynes, C.,Heiner, C.,Hladun, S.,Hostin, D.,Houck, J.,Howland, T.,Ibegwam, C.,Johnson, J.,Kalush, F.,Kline, L.,Koduru, S.,Love, A.,Mann, F.,May, D.,McCawley, S.,McIntosh, T.,McMullen, I.,Moy, M.,Moy, L.,Murphy, B.,Nelson, K.,Pfannkoch, C.,Pratts, E.,Puri, V.,Qureshi, H.,Reardon, M.,Rodriguez, R.,Rogers, Y.-H.,Romblad, D.,Ruhfel, B.,Scott, R.,Sitter, C.,Smallwood, M.,Stewart, E.,Strong, R.,Suh, E.,Thomas, R.,Tint, N. N.,Tse, S.,Vech, C.,Wang, G.,Wetter, J.,Williams, S.,Williams, M.,Windsor, S.,Winn-Deen, E.,Wolfe, K.,Zaveri, J.,Zaveri, K.,Abril, J. F.,Guigó, R.,Campbell, M. J.,Sjolander, K. V.,Karlak, B.,Kejariwal, A.,Mi, H.,Lazareva, B.,Hatton, T.,Narechania, A.,Diemer, K.,Muruganujan, A.,Guo, N.,Sato, S.,Bafna, V.,Istrail, S.,Lippert, R.,Schwartz, R.,Walenz, B.,Yooseph, S.,Allen, D.,Basu, A.,Baxendale, J.,Blick, L.,Caminha, M.,Carnes-Stine, J.,Caulk, P.,Chiang, Y.-H.,Coyne, M.,Dahlke, C.,Mays, A. D.,Dombroski, M.,Donnelly, M.,Ely, D.,Esparham, S.,Fosler, C.,Gire, H.,Glanowski, S.,Glasser, K.,Glodek, A.,Gorokhov, M.,Graham, K.,Gropman, B.,Harris, M.,Heil, J.,Henderson, S.,Hoover, J.,Jennings, D.,Jordan, C.,Jordan, J.,Kasha, J.,Kagan, L.,Kraft, C.,Levitsky, A.,Lewis, M.,Liu, X.,Lopez, J.,Ma, D.,Majoros, W.,McDaniel, J.,Murphy, S.,Newman, M.,Nguyen, T.,Nguyen, N.,Nodell, M.,Pan, S.,Peck, J.,Peterson, M.,Rowe, W.,Sanders, R.,Scott, J.,Simpson, M.,Smith, T.,Sprague, A.,Stockwell, T.,Turner, R.,Venter, E.,Wang, M.,Wen, M.,Wu, D.,Wu, M.,Xia, A.,Zandieh, A. ve Zhu, X., (2001). "The Sequence Of The Human Genome", Science, 291: 1304-1351.

[36] Van Dijk, E. L.,Auger, H.,Jaszczyszyn, Y. ve Thermes, C., (2014). "Ten Years Of Next-Generation Sequencing Technology", Trends Genet, 30: 418-426.

[37] Gupta, A. K. ve Gupta, U. D., (2014). Animal Biotechnology, 1, Academic Press,San Diego.

[38] Stapley, J.,Reger, J.,Feulner, P. G. D.,Smadja, C.,Galindo, J.,Ekblom, R.,Bennison, C.,Ball, A. D.,Beckerman, A. P. ve Slate, J., (2010). "Adaptation Genomics: The Next Generation", Trends in Ecology & Evolution, 25: 705-712.

[39] Scholz, M. B.,Lo, C.-C. ve Chain, P. S. G., (2012). "Next Generation Sequencing And Bioinformatic Bottlenecks: The Current State Of Metagenomic Data Analysis", Current Opinion in Biotechnology, 23: 9-15.

[40] Kehrer-Sawatzki, H., (2007). "What A Difference Copy Number Variation Makes", Bioessays, 29: 311-313.

[41] Taboada, E. N.,Graham, M. R.,Carriço, J. A. ve Van Domselaar, G., (2017). "Food Safety In The Age Of Next Generation Sequencing, Bioinformatics, And Open Data Access", Frontiers in Microbiology, 8: 909.

[42] Besaratinia, A.,Li, H.,Yoon, J. I.,Zheng, A.,Gao, H. ve Tommasi, S., (2012). "A High-Throughput Next-Generation Sequencing-Based Method For Detecting The Mutational Fingerprint Of Carcinogens", Nucleic Acids Res, 40: e116.

[43] Gonzalez-Garay, M. L., (2014). "The Road From Next-Generation Sequencing To Personalized Medicine", Personalized medicine, 11: 523-544.

[44] Manegold-Brauer, G.,Hahn, S. ve Lapaire, O., (2014). "What Does Next-Generation Sequencing Mean For Prenatal Diagnosis?", Biomark Med, 8: 499-508.

[45] World Health Organisation, Cancer Key Facts, http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer, 20 Eylül 2018.

[46] American Cancer Society, Cancer Facts & Figures, https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2017.html, 20 Eylül 2018.

[47] Pistritto, G.,Trisciuoglio, D.,Ceci, C.,Garufi, A. ve D'Orazi, G., (2016). "Apoptosis As Anticancer Mechanism: Function And Dysfunction Of Its Modulators And Targeted Therapeutic Strategies", Aging (Albany NY), 8: 603-619.

[48] Lee, E. Y. H. P. ve Muller, W. J., (2010). "Oncogenes And Tumor Suppressor Genes", Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2: a003236.

[49] Fearon, E. R., (1999). "Cancer Progression", Curr Biol, 9: R873-875.

[50] Jafri, M. A.,Ansari, S. A.,Alqahtani, M. H. ve Shay, J. W., (2016). "Roles Of Telomeres And Telomerase In Cancer, And Advances In Telomerase-Targeted Therapies", Genome Medicine, 8: 69.

[51] Loeb, K. R. ve Loeb, L. A., (2000). "Significance Of Multiple Mutations In Cancer", Carcinogenesis, 21: 379-385.

[52] Vargas-Rondón, N.,Villegas, V. E. ve Rondón-Lagos, M., (2018). "The Role Of Chromosomal Instability In Cancer And Therapeutic Responses", Cancers (Basel), 10: 4.

[53] Devi, P. U., (1996). "Basics Of Carcinogenesis", Drug Chem Toxicol, 19: 133-148.

[54] Martin, T. A.,Ye, L.,Sanders, A. J.,Lane, J. ve Jiang, W. G., (2013). Book Metastatic Cancer Clinical Biological Perspectives, 1, Landes Bioscience,United States.

[55] Liotta, L. A. ve Stetler-Stevenson, W. G., (1991). "Tumor Invasion And Metastasis: An Imbalance Of Positive And Negative Regulation", Cancer Res, 51: 5054s-5059s.

[56] Kalluri, R. ve Weinberg, R. A., (2009). "The Basics Of Epithelial-Mesenchymal Transition", The Journal of Clinical Investigation, 119: 1420-1428.

[57] Chiang, S. P. H.,Cabrera, R. M. ve Segall, J. E., (2016). "Tumor Cell Intravasation", American Journal of Physiology-Cell Physiology, 311: C1-C14.

[58] Van Dalum, G.,Holland, L. ve Terstappen, L. W. M. M., (2012). "Metastasis And Circulating Tumor Cells", EJIFCC, 23: 87-97.

[59] Stoletov, K.,Kato, H.,Zardouzian, E.,Kelber, J.,Yang, J.,Shattil, S. ve Klemke, R., (2010). "Visualizing Extravasation Dynamics Of Metastatic Tumor Cells", J Cell Sci: jcs. 069443.

[60] Bielenberg, D. R. ve Zetter, B. R., (2015). "The Contribution Of Angiogenesis To The Process Of Metastasis", Cancer journal (Sudbury, Mass.), 21: 267.

[61] Rowen, L., (2001). "Gene Structure And Organization", eLS: 1-8.

[62] and, T. I. L. ve Young, R. A., (2000). "Transcription Of Eukaryotic Protein-Coding Genes", Annual Review of Genetics, 34: 77-137.

[63] Lelli, K. M.,Slattery, M. ve Mann, R. S., (2012). "Disentangling The Many Layers Of Eukaryotic Transcriptional Regulation", Annual Review of Genetics, 46: 43-68.

[64] Bhagwat, A. S. ve Vakoc, C. R., (2015). "Targeting Transcription Factors In Cancer", Trends in cancer, 1: 53-65.

[65] Moreno-Bueno, G.,Portillo, F. ve Cano, A., (2008). "Transcriptional Regulation Of Cell Polarity In EMT And Cancer", Oncogene, 27: 6958.

[66] Dang, C. V.,Le, A. ve Gao, P., (2009). "MYC-Induced Cancer Cell Energy Metabolism And Therapeutic Opportunities", Clinical Cancer Research, 15: 6479-6483.

[67] Miller, D. M.,Thomas, S. D.,Islam, A.,Muench, D. ve Sedoris, K., (2012). "c-Myc And Cancer Metabolism", Clinical Cancer Research, 18: 5546-5553.

[68] Wilusz, J. E.,Sunwoo, H. ve Spector, D. L., (2009). "Long Noncoding RNAs: Functional Surprises From The RNA World", Genes Dev, 23: 1494-1504.

[69] Mercer, T. R.,Dinger, M. E. ve Mattick, J. S., (2009). "Long Non-Coding RNAs: Insights Into Functions", Nature Reviews Genetics, 10: 155.

[70] Wang, Kevin C. ve Chang, Howard Y., (2011). "Molecular Mechanisms Of Long Noncoding RNAs", Molecular Cell, 43: 904-914.

[71] Prensner, J. R. ve Chinnaiyan, A. M., (2011). "The Emergence Of lncRNAs In Cancer Biology", Cancer Discov, 1: 391-407.

[72] Mourtada-Maarabouni, M.,Pickard, M. R.,Hedge, V. L.,Farzaneh, F. ve Williams, G. T., (2009). "GAS5, A Non-Protein-Coding RNA, Controls Apoptosis And Is Downregulated In Breast Cancer", Oncogene, 28: 195-208.

[73] Gupta, R. A.,Shah, N.,Wang, K. C.,Kim, J.,Horlings, H. M.,Wong, D. J.,Tsai, M.-C.,Hung, T.,Argani, P.,Rinn, J. L.,Wang, Y.,Brzoska, P.,Kong, B.,Li, R.,West, R. B.,van de Vijver, M. J.,Sukumar, S. ve Chang, H. Y., (2010). "Long Noncoding RNA HOTAIR Reprograms Chromatin State To Promote Cancer Metastasis", Nature, 464: 1071-1076.

[74] Sun, M. ve Kraus, W. L., (2013). "Minireview: Long Noncoding RNAs: New “Links” Between Gene Expression And Cellular Outcomes In Endocrinology", Molecular Endocrinology, 27: 1390-1402.

[75] Romano, G.,Veneziano, D.,Acunzo, M. ve Croce, C. M., (2017). "Small Non-Coding Rna And Cancer", Carcinogenesis, 38: 485-491.

[76] Taft, R. J.,Pang, K. C.,Mercer, T. R.,Dinger, M. ve Mattick, J. S., (2010). "Non-coding RNAs: rRegulators Of Disease", J Pathol, 220: 126-139.

[77] Esteller, M., (2011). "Non-coding RNAs In Human Disease", Nature Reviews Genetics, 12: 861.

[78] Saito, T. ve Sætrom, P., (2010). "MicroRNAs – targeting And Target Prediction", New Biotechnology, 27: 243-249.

[79] Peng, Y. ve Croce, C. M., (2016). "The Role Of MicroRNAs In Human Cancer", Signal Transduction And Targeted Therapy, 1: 15004.

[80] Macfarlane, L. A. ve Murphy, P. R., (2010). "MicroRNA: Biogenesis, Function And Role In Cancer", Curr Genomics, 11: 537-561.

[81] Winter, J.,Jung, S.,Keller, S.,Gregory, R. I. ve Diederichs, S., (2009). "Many Roads To Maturity: microRNA Biogenesis Pathways And Their Regulation", Nat Cell Biol, 11: 228-234.

[82] Jung, H. J. ve Suh, Y., (2015). "Regulation Of IGF -1 Signaling By MicroRNAs", Frontiers in Genetics, 5.

[83] Richardson, K.,Lai, C.-Q.,Parnell, L. D.,Lee, Y.-C. ve Ordovas, J. M., (2011). "A Genome-wide Survey For SNPs Altering microRNA Seed Sites Identifies Functional Candidates In GWAS", BMC Genomics, 12: 504.

[84] Hausser, J. ve Zavolan, M., (2014). "Identification and consequences of miRNA-target interactions--beyond repression of gene expression", Nat Rev Genet, 15: 599-612.

[85] Helwak, A.,Kudla, G.,Dudnakova, T. ve Tollervey, D., (2013). "Mapping The Human miRNA Interactome By CLASH Reveals Frequent Noncanonical Binding", Cell, 153: 654-665.

[86] Moore, M. J.,Scheel, T. K. H.,Luna, J. M.,Park, C. Y.,Fak, J. J.,Nishiuchi, E.,Rice, C. M. ve Darnell, R. B., (2015). "miRNA–Target Chimeras Reveal miRNA 3’-End Pairing As A Major Determinant Of Argonaute Target Specificity", Nat Commun, 6: 8864.

[87] Li, Y. ve Kowdley, K. V., (2012). "MicroRNAs in Common Human Diseases", Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 10: 246-253.

[88] Yanokura, M.,Banno, K.,Kobayashi, Y.,Kisu, I.,Ueki, A.,Ono, A.,Masuda, K.,Nomura, H.,Hirasawa, A.,Susumu, N. ve Aoki, D., (2010). "MicroRNA And Endometrial Cancer: Roles Of Small RNAs In Human Tumors And Clinical Applications (Review)", Oncol Lett, 1: 935-940.

[89] Jackson, R. J. ve Standart, N., (2007). "How Do MicroRNAs Regulate Gene Expression?", Science's STKE, 2007: re1-re1.

[90] Wahid, F.,Shehzad, A.,Khan, T. ve Kim, Y. Y., (2010). "MicroRNAs: Synthesis, Mechanism, Function, And Recent Clinical Trials", Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 1803: 1231-1243.

[91] Da Sacco, L. ve Masotti, A., (2012). "Recent Insights And Novel Bioinformatics Tools To Understand The Role Of microRNAs Binding To 5' Untranslated Region", Int J Mol Sci, 14: 480-495.

[92] Mukherji, S.,Ebert, M. S.,Zheng, G. X.,Tsang, J. S.,Sharp, P. A. ve van Oudenaarden, A., (2011). "MicroRNAs Can Generate Thresholds In Target Gene Expression", Nature Genetics, 43: 854-859.

[93] Tay, Y.,Rinn, J. ve Pandolfi, P. P., (2014). "The Multilayered Complexity Of ceRNA Crosstalk And Competition", Nature, 505: 344.

[94] Salmena, L.,Poliseno, L.,Tay, Y.,Kats, L. ve Pandolfi, Pier P., (2011). "A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone Of A Hidden RNA Language?", Cell, 146: 353-358.

[95] Ellwanger, D. C.,Büttner, F. A.,Mewes, H.-W. ve Stümpflen, V., (2011). "The Sufficient Minimal Set Of miRNA Seed Types", Bioinformatics, 27: 1346-1350.

[96] Betel, D.,Koppal, A.,Agius, P.,Sander, C. ve Leslie, C., (2010). "Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites", Genome Biology, 11: R90.

[97] Chi, S. W.,Hannon, G. J. ve Darnell, R. B., (2012). "An Alternative Mode Of microRNA Target Recognition", Nature structural & molecular biology, 19: 321-327.

[98] Cloonan, N., (2015). "Re-thinking miRNA-mRNA interactions: intertwining issues confound target discovery.", Bioessays, 37: 379-388.

[99] Xu, W.,Wang, Z. ve Liu, Y., (2014). "The Characterization Of microRNA-Mediated Gene Regulation As Impacted By Both Target Site Location And Seed Match Type", PLoS One, 9: e108260.

[100] Peterson, S. M.,Thompson, J. A.,Ufkin, M. L.,Sathyanarayana, P.,Liaw, L. ve Congdon, C. B., (2014). "Common Features Of microRNA Target Prediction Tools", Frontiers in Genetics, 5: 23.

[101] Hafner, M.,Landthaler, M.,Burger, L.,Khorshid, M.,Hausser, J.,Berninger, P.,Rothballer, A.,Ascano, M.,Jungkamp, A.-C.,Munschauer, M.,Ulrich, A.,Wardle, G. S.,Dewell, S.,Zavolan, M. ve Tuschl, T., (2010). "Transcriptome-wide Identification Of RNA-Binding Protein And MicroRNA Target Sites By PAR-CLIP", Cell, 141: 129-141.

[102] Cao, S. ve Chen, S.-J., (2012). "Predicting Kissing Interactions In microRNA–target Complex And Assessment Of microRNA Activity", Nucleic Acids Res, 40: 4681-4690.

[103] Doench, J. G. ve Sharp, P. A., (2004). "Specificity Of microRNA Target Selection On Translational Repression", Genes Dev, 18: 504-511.

[104] Tonouchi, E.,Gen, Y.,Muramatsu, T.,Hiramoto, H.,Tanimoto, K.,Inoue, J. ve Inazawa, J., (2018). "MiR-3140 suppresses tumor cell growth by targeting BRD4 via its coding sequence and downregulates the BRD4-NUT fusion oncoprotein.", Sci Rep, 8: 6769.

[105] Rajewsky, N., (2006). "microRNA Target Predictions In Animals", Nature Genetics, 38: S8.

[106] Thomson, D. W.,Bracken, C. P. ve Goodall, G. J., (2011). "Experimental Strategies For microRNA Target Identification", Nucleic Acids Res, 39: 6845-6853.

[107] Liu, B.,Li, J. ve Cairns, M. J., (2014). "Identifying miRNAs, Targets And Functions", Briefings in Bioinformatics, 15: 1-19.

[108] Chou, C.-H.,Shrestha, S.,Yang, C.-D.,Chang, N.-W.,Lin, Y.-L.,Liao, K.-W.,Huang, W.-C.,Sun, T.-H.,Tu, S.-J.,Lee, W.-H.,Chiew, M.-Y.,Tai, C.-S.,Wei, T.-Y.,Tsai, T.-R.,Huang, H.-T.,Wang, C.-Y.,Wu, H.-Y.,Ho, S.-Y.,Chen, P.-R.,Chuang, C.-H.,Hsieh, P.-J.,Wu, Y.-S.,Chen, W.-L.,Li, M.-J.,Wu, Y.-C.,Huang, X.-Y.,Ng, F. L.,Buddhakosai, W.,Huang, P.-C.,Lan, K.-C.,Huang, C.-Y.,Weng, S.-L.,Cheng, Y.-N.,Liang, C.,Hsu, W.-L. ve Huang, H.-D., (2018). "miRTarBase Update 2018: A Resource For Experimentally Validated MicroRNA-Target Interactions", Nucleic Acids Res, 46: D296-D302.

[109] Hsu, S. D.,Lin, F. M.,Wu, W. Y.,Liang, C.,Huang, W. C.,Chan, W. L.,Tsai, W. T.,Chen, G. Z.,Lee, C. J.,Chiu, C. M.,Chien, C. H.,Wu, M. C.,Huang, C. Y.,Tsou, A. P. ve Huang, H. D., (2011). "miRTarBase: A Database Curates Experimentally Validated microRNA-target Interactions", Nucleic Acids Res, 39: D163-169.

[110] Kozomara, A. ve Griffiths-Jones, S., (2014). "miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data", Nucleic Acids Res, 42: D68-D73.

[111] Griffiths-Jones, S.,Grocock, R. J.,van Dongen, S.,Bateman, A. ve Enright, A. J., (2006). "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature", Nucleic Acids Res, 34: D140-D144.

[112] Agarwal, V.,Bell, G. W.,Nam, J.-W. ve Bartel, D. P., (2015). "Predicting Effective microRNA Target Sites In Mammalian mRNAs", Elife, 4: e05005.

[113] Paraskevopoulou, M. D.,Georgakilas, G.,Kostoulas, N.,Vlachos, I. S.,Vergoulis, T.,Reczko, M.,Filippidis, C.,Dalamagas, T. ve Hatzigeorgiou, A. G., (2013). "DIANA-microT Web Server v5.0: Service Integration Into miRNA Functional Analysis Workflows", Nucleic Acids Res, 41: W169-173.

[114] Sethupathy, P.,Corda, B. ve Hatzigeorgiou, A. G., (2006). "TarBase: A Comprehensive Database Of Experimentally Supported Animal microRNA Targets", Rna, 12: 192-197.

[115] Kertesz, M.,Iovino, N.,Unnerstall, U.,Gaul, U. ve Segal, E., (2007). "The Role Of Site Accessibility In microRNA Target Recognition", Nature Genetics, 39: 1278.

[116] Krüger, J. ve Rehmsmeier, M., (2006). "RNAhybrid: microRNA Target Prediction Easy, Fast and Flexible", Nucleic Acids Res, 34: W451-W454.

[117] Bandyopadhyay, S. ve Mitra, R., (2009). "TargetMiner: microRNA Target Prediction With Systematic Identification Of Tissue-Specific Negative Examples", Bioinformatics, 25: 2625-2631.

[118] Miranda, K. C.,Huynh, T.,Tay, Y.,Ang, Y. S.,Tam, W. L.,Thomson, A. M.,Lim, B. ve Rigoutsos, I., (2006). "A Pattern-based Method For The Identification Of MicroRNA Binding Sites And Their Corresponding Heteroduplexes", Cell, 126: 1203-1217.

[119] Xiao, F.,Zuo, Z.,Cai, G.,Kang, S.,Gao, X. ve Li, T., (2009). "miRecords: An Integrated Resource For microRNA-target Interactions", Nucleic Acids Res, 37: D105-110.

[120] Li, J.-H.,Liu, S.,Zhou, H.,Qu, L.-H. ve Yang, J.-H., (2014). "starBase v2.0: Decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA And Protein–RNA Interaction Networks From Large-Scale CLIP-Seq Data", Nucleic Acids Res, 42: D92-D97.

[121] Yang, J.-H.,Li, J.-H.,Shao, P.,Zhou, H.,Chen, Y.-Q. ve Qu, L.-H., (2011). "starBase: a database for exploring microRNA–mRNA interaction maps from Argonaute CLIP-Seq and Degradome-Seq data", Nucleic Acids Res, 39: D202-D209.

[122] Li, Y.,Qiu, C.,Tu, J.,Geng, B.,Yang, J.,Jiang, T. ve Cui, Q., (2014). "HMDD v2.0: a database for experimentally supported human microRNA and disease associations", Nucleic Acids Res, 42: D1070-D1074.

[123] Wong, N. ve Wang, X., (2015). "miRDB: An Online Resource For microRNA Target Prediction And Functional Annotations", Nucleic Acids Res, 43: D146-D152.

[124] Blin, K.,Dieterich, C.,Wurmus, R.,Rajewsky, N.,Landthaler, M. ve Akalin, A., (2015). "DoRiNA 2.0--Upgrading The DoRiNA Database Of RNA Interactions In Post-Transcriptional Regulation", Nucleic Acids Res, 43: D160-167.

[125] Dweep, H. ve Gretz, N., (2015). "miRWalk2.0: A Comprehensive Atlas Of MicroRNA-Target Interactions", Nat Methods, 12: 697.

[126] Ekimler, S. ve Sahin, K., (2014). "Computational Methods For MicroRNA Target Prediction", Genes, 5: 671-683.

[127] Chi, S. W.,Zang, J. B.,Mele, A. ve Darnell, R. B., (2009). "Argonaute HITS-CLIP Decodes microRNA–mRNA Interaction Maps", Nature, 460: 479.

[128] Lu, Y. ve Leslie, C. S., (2016). "Learning To Predict miRNA-mRNA Interactions From AGO CLIP Sequencing And CLASH Data", PLoS Comput Biol, 12: e1005026.

[129] Mittal, N. ve Zavolan, M., (2014). "Seq And CLIP Through The miRNA World", Genome Biology, 15: 202.

[130] Helwak, A. ve Tollervey, D., (2016). Post-Transcriptional Gene Regulation, Methods in Molecular Biology, Springer,New York.

[131] Travis, A. J.,Moody, J.,Helwak, A.,Tollervey, D. ve Kudla, G., (2014). "Hyb: A bioinformatics pipeline for the analysis of CLASH (crosslinking, ligation and sequencing of hybrids) data()", Methods (San Diego, Calif.), 65: 263-273.

[132] Meola, N.,Gennarino, V. A. ve Banfi, S., (2009). "microRNAs And Genetic Diseases", Pathogenetics, 2: 7.

[133] Sun, G.,Yan, J.,Noltner, K.,Feng, J.,Li, H.,Sarkis, D. A.,Sommer, S. S. ve Rossi, J. J., (2009). "SNPs In Human miRNA Genes Affect Biogenesis And Function", Rna, 15: 1640-1651.

[134] Bui, T. V. ve Mendell, J. T., (2010). "Myc: Maestro Of MicroRNAs", Genes & Cancer, 1: 568-575.

[135] Pan, Y.,Zhang, J.,Fu, H. ve Shen, L., (2016). "miR-144 Functions As A Tumor Suppressor In Breast Cancer Through Inhibiting ZEB1/2-Mediated Epithelial Mesenchymal Transition Process", Onco Targets Ther, 9: 6247-6255.

[136] Suzuki, H. I.,Yamagata, K.,Sugimoto, K.,Iwamoto, T.,Kato, S. ve Miyazono, K., (2009). "Modulation Of microRNA Processing By p53", Nature, 460: 529.

[137] Zhang, Y.,Hu, Y.,Fang, J.-Y. ve Xu, J., (2016). "Gain-Of-Function MiRNA Signature By Mutant p53 Associates With Poor Cancer Outcome", Oncotarget, 7: 11056-11066.

[138] Kunej, T.,Godnic, I.,Horvat, S.,Zorc, M. ve Calin, G. A., (2012). "Cross Talk Between MicroRNA And Coding Cancer Genes", Cancer journal (Sudbury, Mass.), 18: 223-231.

[139] Lu, M.,Zhang, Q.,Deng, M.,Miao, J.,Guo, Y.,Gao, W. ve Cui, Q., (2008). "An Analysis Of Human MicroRNA And Disease Associations", PLoS One, 3: e3420.

[140] Hayes, J.,Peruzzi, P. P. ve Lawler, S., "MicroRNAs in Cancer: Biomarkers, Functions and Therapy", Trends in Molecular Medicine, 20: 460-469.

[141] Lujambio, A. ve Lowe, S. W., (2012). "The microcosmos of cancer", Nature, 482: 347-355.

[142] Zhu, S.,Si, M. L.,Wu, H. ve Mo, Y. Y., (2007). "MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1)", J Biol Chem, 282: 14328-14336.

[143] Zhu, S.,Wu, H.,Wu, F.,Nie, D.,Sheng, S. ve Mo, Y.-Y., (2008). "MicroRNA-21 Targets Tumor Suppressor Genes In Invasion And Metastasis", Cell Research, 18: 350.

[144] Poliseno, L.,Salmena, L.,Zhang, J.,Carver, B.,Haveman, W. J. ve Pandolfi, P. P., (2010). "A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology", Nature, 465: 1033-1038.

[145] Quitadamo, A.,Tian, L.,Hall, B. ve Shi, X., (2015). "An Integrated Network Of MicroRNA And Gene Expression In Ovarian Cancer", BMC Bioinformatics, 16 Suppl 5: S5.

[146] Seo, J.,Jin, D.,Choi, C.-H. ve Lee, H., (2017). "Integration of MicroRNA, mRNA, and Protein Expression Data for the Identification of Cancer-Related MicroRNAs", PLoS One, 12: e0168412.

[147] van Iterson, M.,Bervoets, S.,de Meijer, E. J.,Buermans, H. P.,t Hoen, P. A.,Menezes, R. X. ve Boer, J. M., (2013). "Integrated Analysis Of microRNA And mRNA Expression: Adding Biological Significance To microRNA Target Predictions", Nucleic Acids Res, 41: e146.

[148] Zhao, X.-M.,Liu, K.-Q.,Zhu, G.,He, F.,Duval, B.,Richer, J.-M.,Huang, D.-S.,Jiang, C.-J.,Hao, J.-K. ve Chen, L., (2015). "Identifying Cancer-Related MicroRNAs Based On Gene Expression Data", Bioinformatics, 31: 1226-1234.

[149] Zafari, S.,Backes, C.,Leidinger, P.,Meese, E. ve Keller, A., (2015). "Regulatory MicroRNA Networks: Complex Patterns Of Target Pathways For Disease-Related And Housekeeping MicroRNAs", Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 13: 159-168.

[150] Li, X.,Gill, R.,Cooper, N. G.,Yoo, J. K. ve Datta, S., (2011). "Modeling microRNA-mRNA Interactions Using PLS Regression In Human Colon Cancer", BMC Medical Genomics, 4: 44.

[151] Aure, M. R.,Jernström, S.,Krohn, M.,Vollan, H. K. M.,Due, E. U.,Rødland, E.,Kåresen, R.,Ram, P.,Lu, Y.,Mills, G. B.,Sahlberg, K. K.,Børresen-Dale, A.-L.,Lingjærde, O. C. ve Kristensen, V. N., (2015). "Integrated Analysis Reveals microRNA Networks Coordinately Expressed With Key Proteins In Breast Cancer", Genome Medicine, 7: 21.

[152] Svoronos, A. A.,Engelman, D. M. ve Slack, F. J., (2016). "OncomiR Or Tumor Suppressor? The Duplicity Of MicroRNAs In Cancer", Cancer Res, 76: 3666-3670.

[153] Cortez, M. A.,Bueso-Ramos, C.,Ferdin, J.,Lopez-Berestein, G.,Sood, A. K. ve Calin, G. A., (2011). "MicroRNAs In Body Fluids—The Mix Of Hormones And Biomarkers", Nature Reviews Clinical Oncology, 8: 467.

[154] Fabbri, M.,Ivan, M.,Cimmino, A.,Negrini, M. ve Calin, G., (2007). "Regulatory Mechanisms Of microRNAs Involvement In Cancer: The Strange Case Of Dr Jekyll And Mr Hyde", Expert Opin Biol Ther, 7: 1009-1019.

[155] Iorio, M. V.,Ferracin, M.,Liu, C. G.,Veronese, A.,Spizzo, R.,Sabbioni, S.,Magri, E.,Pedriali, M.,Fabbri, M.,Campiglio, M.,Menard, S.,Palazzo, J. P.,Rosenberg, A.,Musiani, P.,Volinia, S.,Nenci, I.,Calin, G. A.,Querzoli, P.,Negrini, M. ve Croce, C. M., (2005). "MicroRNA Gene Expression Deregulation In Human Breast Cancer", Cancer Res, 65: 7065-7070.

[156] Heneghan, H. M.,Miller, N.,Lowery, A. J.,Sweeney, K. J.,Newell, J. ve Kerin, M. J., (2010). "Circulating microRNAs As Novel Minimally Invasive Biomarkers For Breast Cancer", Annals of surgery, 251: 499-505.

[157] Blenkiron, C.,Goldstein, L. D.,Thorne, N. P.,Spiteri, I.,Chin, S.-F.,Dunning, M. J.,Barbosa-Morais, N. L.,Teschendorff, A. E.,Green, A. R. ve Ellis, I. O., (2007).

"MicroRNA Expression Profiling Of Human Breast Cancer Identifies New Markers Of Tumor Subtype", Genome Biology, 8: R214.

[158] Baruah, M. M. ve Sharma, N., (2017). "MicroRNAs In Determining The Subtype Specific Treatment Regimens For Breast Cancer", Indian Journal of Public Health Research & Development, 8.

[159] Le Quesne, J. ve Caldas, C., (2010). "Micro-RNAs And Breast Cancer", Mol Oncol, 4: 230-241.

[160] Shenouda, S. K. ve Alahari, S. K., (2009). "MicroRNA Function In Cancer: Oncogene Or A Tumor Suppressor?", Cancer and Metastasis Reviews, 28: 369.

[161] Ala, U.,Karreth, F. A.,Bosia, C.,Pagnani, A.,Taulli, R.,Léopold, V.,Tay, Y.,Provero, P.,Zecchina, R. ve Pandolfi, P. P., (2013). "Integrated Transcriptional And Competitive Endogenous RNA Networks Are Cross-regulated In Permissive Molecular Environments", Proceedings of the National Academy of Sciences, 110: 7154-7159.

[162] Bosia, C.,Pagnani, A. ve Zecchina, R., (2013). "Modelling Competing Endogenous RNA Networks", PLoS One, 8: e66609.

[163] Park, H. J.,Kim, S. ve Li, W., (2018). "Model-based Analysis Of Competing-endogenous Pathways (MACPath) In Human Cancers", PLoS Comput Biol, 14: e1006074.

[164] Chiu, H.-S.,Martínez, M. R.,Bansal, M.,Subramanian, A.,Golub, T. R.,Yang, X.,Sumazin, P. ve Califano, A., (2017). "High-Throughput Validation Of ceRNA Regulatory Networks", BMC Genomics, 18: 418.

[165] Luo, Z.,Xu, X.,Gu, P.,Lonard, D.,Gunaratne, P. H.,Cooney, A. J. ve Azencott, R., (2011). "miRNA Regulatory Circuits In ES Cells Differentiation: A Chemical Kinetics Modeling Approach", PLoS One, 6: e23263.

[166] Arvey, A.,Larsson, E.,Sander, C.,Leslie, C. S. ve Marks, D. S., (2010). "Target mRNA Abundance Dilutes microRNA And siRNA Activity", Molecular Systems Biology, 6: 363-363.

[167] Denzler, R.,Agarwal, V.,Stefano, J.,Bartel, David P. ve Stoffel, M., (2014). "Assessing The ceRNA Hypothesis With Quantitative Measurements Of miRNA And Target Abundance", Molecular Cell, 54: 766-776.

[168] Denzler, R.,McGeary, Sean E.,Title, Alexandra C.,Agarwal, V.,Bartel, David P. ve Stoffel, M., (2016). "Impact Of MicroRNA Levels, Target-Site Complementarity, And Cooperativity On Competing Endogenous RNA-Regulated Gene Expression", Molecular Cell, 64: 565-579.

[169] Figliuzzi, M.,Marinari, E. ve De Martino, A., (2013). "MicroRNAs As A Selective Channel Of Communication Between Competing RNAs: A Steady-State Theory", Biophysical Journal, 104: 1203-1213.

[170] Nitzan, M.,Steiman-Shimony, A.,Altuvia, Y.,Biham, O. ve Margalit, H., (2014). "Interactions Between Distant ceRNAs In Regulatory Networks", Biophysical Journal, 106: 2254-2266.

[171] Robinson, J. ve Henderson, W., (2018). "Modelling The Structure Of A ceRNA-theoretical, Bipartite microRNA–mRNA Interaction Network Regulating Intestinal Epithelial Cellular Pathways Using R Programming", BMC research notes, 11: 19.

[172] List, M.,Amirabad, A. D.,Kostka, D. ve Schultz, M. H., (2018). SPONGE, Bioconductor Package 1.2.0.

[173] National Cancer Institute, TCGA Barcode, https://docs.gdc.cancer.gov/Encyclopedia/pages/TCGA_Barcode/, 15 Ekim 2018.

[174] Colaprico, A.,Silva, T. C.,Olsen, C.,Garofano, L.,Cava, C.,Garolini, D.,Sabedot, T. S.,Malta, T. M.,Pagnotta, S. M.,Castiglioni, I.,Ceccarelli, M.,Bontempi, G. ve Noushmehr, H., (2016). "TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data", Nucleic Acids Res, 44: e71.

[175] Morgan, M.,Obenchain, V.,Hester, J. ve Pages, H., (2018). "SummarizedExperiment: SummarizedExperiment container. ", Bioconductor Package 1.10.1.

[176] Pereira, M. B.,Wallroth, M.,Jonsson, V. ve Kristiansson, E., (2018). "Comparison Of Normalization Methods For The Analysis Of Metagenomic Gene Abundance Data", BMC Genomics, 19: 274-274.

[177] Wickham, H.,Francois, R.,Henry, L. ve Müller, K., (2018). dplyr, R package version 0.7.7.

[178] Wickham, H., (2018). stringr, R package version 1.3.1.

[179] Wickham, H. ve Henry, L., (2018). Tidyr, R package version 0.8.1.

[180] miRBase, miRBase Sequence Download, http://www.mirbase.org/ftp.shtml, 10 Ekim 2018.

[181] Durinck, S.,Spellman, P. T.,Birney, E. ve Huber, W., (2009). "Mapping Identifiers For The Integration Of Genomic Datasets With The R/Bioconductor Package biomaRt", Nat Protoc, 4: 1184-1191.

[182] Wickham, H. ve Bryan, J., (2018). readxl: Read Excel Files, R package version 1.1.0.

[183] Wickham, H.,Hester, J. ve Francois, R., (2017). readr, R package version 1.1.1.

[184] Gagolewski, M., (2018). stringi: Character String Processing Facilities, R package version 1.2.4.

[185] Lift Genome Annotations Lift Genome Annotations, https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver, 15 Ekim 2018.

[186] Weill, N.,Lisi, V.,Scott, N.,Dallaire, P.,Pelloux, J. ve Major, F., (2015). "MiRBooking Simulates The Stoichiometric Mode Of Action Of microRNAs", Nucleic Acids Res, 43: 6730-6738.

[187] Hausser, J.,Syed, A. P.,Bilen, B. ve Zavolan, M., (2013). "Analysis Of CDS-located miRNA Target Sites Suggests That They Can Effectively Inhibit Translation", Genome Research, 23: 604-615.

[188] Grimson, A.,Farh, K. K.-H.,Johnston, W. K.,Garrett-Engele, P.,Lim, L. P. ve Bartel, D. P., (2007). "MicroRNA Targeting Specificity In Mammals: Determinants Beyond Seed Pairing", Molecular Cell, 27: 91-105.

[189] Wee, L. M.,Flores-Jasso, C. F.,Salomon, W. E. ve Zamore, P. D., (2012). "Argonaute Divides Its RNA Guide Into Domains With Distinct Functions And RNA-binding Properties", Cell, 151: 1055-1067.

[190] Cesana, M. ve Daley, G. Q., (2013). "Deciphering The Rules Of ceRNA Networks", Proceedings of the National Academy of Sciences, 110: 7112-7113.

[191] Pedersen, T. L., (2018). tidygraph, R package version 1.1.0.

[192] Pedersen, T. L., (2018). ggraph, R package version 1.0.1.

[193] Henry, L. ve Wickham, H., (2018). purrr, R package version 0.2.5.

[194] Wickham, H.,Henry, L.,Luciani, T. J.,Decorde, M. ve Lise, V., (2017). svglite, R package version 1.2.1.

[195] Csardi, G., (2017). igraph, R package version 1.1.2.

[196] Werfel, S.,Leierseder, S.,Ruprecht, B.,Kuster, B. ve Engelhardt, S., (2017). "Preferential MicroRNA Targeting Revealed By In Vivo Competitive Binding And Differential Argonaute Immunoprecipitation", Nucleic Acids Res, 45: 10218-10228.

[197] Sun, Y.-L.,Patel, A.,Kumar, P. ve Chen, Z.-S., (2012). "Role of ABC transporters in cancer chemotherapy", Chinese journal of cancer, 31: 51-57.

[198] Kunická, T. ve Souček, P., (2014). "Importance of ABCC1 for cancer therapy and prognosis", Drug Metabolism Reviews, 46: 325-342.

[199] Mullokandov, G.,Baccarini, A.,Ruzo, A.,Jayaprakash, A. D.,Tung, N.,Israelow, B.,Evans, M. J.,Sachidanandam, R. ve Brown, B. D., (2012). "High-Throughput Assessment Of microRNA Activity And Function Using microRNA Sensor And Decoy Libraries", Nature methods, 9: 840-846.

[200] Gene Expression Omnibus, Series GSE119449, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE119449, 2 Aralık 2018.

[201] Ebert, M. S. ve Sharp, P. A., (2010). "Emerging Roles For Natural microRNA Sponges", Current Biology, 20: R858-R861.

[202] Yoon, J.-H.,Abdelmohsen, K. ve Gorospe, M., (2014). "Functional Interactions Among microRNAs And Long Noncoding RNAs", Seminars in cell & developmental biology.

[203] Tay, F. C.,Lim, J. K.,Zhu, H.,Hin, L. C. ve Wang, S., (2015). "Using Artificial MicroRNA Sponges To Achieve MicroRNA Loss-Of-Function In Cancer Cells", Advanced drug delivery reviews, 81: 117-127.

[204] Ludwig, N.,Leidinger, P.,Becker, K.,Backes, C.,Fehlmann, T.,Pallasch, C.,Rheinheimer, S.,Meder, B.,Stähler, C.,Meese, E. ve Keller, A., (2016). "Distribution Of miRNA Expression Across Human Tissues", Nucleic Acids Res, 44: 3865-3877.

[205] Guo, Z.,Maki, M.,Ding, R.,Yang, Y.,zhang, B. ve Xiong, L., (2014). "Genome-wide Survey Of Tissue-specific microRNA And Transcription Factor Regulatory Networks In 12 Tissues", Sci Rep, 4: 5150.

[206] Bracken, C. P.,Scott, H. S. ve Goodall, G. J., (2016). "A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer", Nat Rev Genet, 17: 719-732.

[207] Chen, K. ve Rajewsky, N., (2007). "The Evolution Of Gene Regulation By Transcription Factors And microRNAs", Nature Reviews Genetics, 8: 93.

[208] Wang, S.,Li, W.,Lian, B.,Liu, X.,Zhang, Y.,Dai, E.,Yu, X.,Meng, F.,Jiang, W. ve Li, X., (2015). "TMREC: A Database Of Transcription Factor And MiRNA Regulatory Cascades In Human Diseases", PLoS One, 10: e0125222.

[209] Wang, H.,Luo, J.,Liu, C.,Niu, H.,Wang, J.,Liu, Q.,Zhao, Z.,Xu, H.,Ding, Y.,Sun, J. ve Zhang, Q., (2017). "Investigating MicroRNA And Transcription Factor Co-Regulatory Networks In Colorectal Cancer", BMC Bioinformatics, 18: 388.

[210] Sadeghi, M.,Ranjbar, B.,Ganjalikhany, M. R.,M. Khan, F.,Schmitz, U.,Wolkenhauer, O. ve Gupta, S. K., (2016). "MicroRNA And Transcription Factor Gene Regulatory Network Analysis Reveals Key Regulatory Elements Associated With Prostate Cancer Progression", PLoS One, 11: e0168760.

[211] Shah, M. Y.,Ferrajoli, A.,Sood, A. K.,Lopez-Berestein, G. ve Calin, G. A., (2016). "microRNA Therapeutics in Cancer - An Emerging Concept", EBioMedicine, 12: 34-42.

[212] Mansoori, B.,Sandoghchian Shotorbani, S. ve Baradaran, B., (2014). "RNA interference and its role in cancer therapy", Advanced pharmaceutical bulletin, 4: 313-321.

EK-A

ALGORİTMALAR

Tez çalışması temelde iki aşamadan oluşmaktadır. Birincisi kullanılan veri setlerinin elde edilmesi ve birlikte anlamlı hale getirilebilmesi için işlenmesi, iki aşama ise elde edilen veri setleri aracılığıyla mikroRNA:hedef etkileşimlerini açıklayan bir model ile bu etkileşimlerin incelenmesidir. MikroRNA:hedef etkileşimlerinde önemli olan faktörlerin de ele alındığı çalışmada bu etkileşimlerin yeni nesil dizileme içeren deneysel yöntemlerle sunulmuş sonuçları kullanılmıştır. Bu veri seti Algoritma A.1'de gösterildiği gibi elde edilmiş ve işlenmiştir.

A-1 MikroRNA:Hedef mRNA Deneysel Veri Setinin Düzenlenmesi

Çizelge A.1 Algoritma A.1

```
library(biomaRt)
library(dplyr)
library(readr)
library(tidyr)
library(stringr)
library(stringi)
library(tidyverse)ği
library(readxl)
```

Çizelge A.1 Algoritma A.1 (Devamı).

A.1.1 CLASH Veri Setinin Düzenlenmesi

```
clashelwak <- read.table("mmc1.txt", comment.char = "#", header = TRUE
, skip = 1)

#clash hg19
```

A.1.1.1 İnsan Henom 19'un Sorgulaması

```
#HG19
ensemblgrch37 = useMart(host='http://grch37.ensembl.org',
                        biomart='ENSEMBL_MART_ENSEMBL',
                       dataset='hsapiens_gene_ensembl')
hg19 <- getBM(attributes = c("ensembl_transcript_id","ensembl_gene_id"
,"chromosome_name", "start_position","end_position", "hgnc_symbol", "e
ntrezgene", "strand" ), mart = ensemblgrch37)
str(hg19)
```

A.1.1.2 CLASH Veri Setine İnsan Genom Projesine Göre Lokasyonlarının ve miRBase'e Uygun mikroRNA Adlarının Eklenmesi

```
#CLASH deneysel çalışması insan genom projesi versiyon 19'a uygun olar
ak yapılmakla birlikte, mikroRNA adları ise mirbase versiyon 15'e uygu
n olarak verilmiştir

clashelwak <- clashelwak%>%
 separate(microRNA_name, c("Barcode", "Database", "mirna_name", "type"
), sep = "_")%>%
  separate(mRNA_name, c("Ensembl_Gene_Id", "Ensembl_Transcript_Id", "H
ugo_Symbol", "mRNA_Type"), sep = "_")

#MikroRNA ifade verisetinde mirbase numaralandırılmasına uygun veri su
nulmuştur. Bütün verisetlerinin doğru şekilde birleştirilebilmesi için
verisetleri miRBase'ın son versiyonuna çevirilmiştir. Bu işlemler için
mirbase'ın değişmeyen numaralandırma sistemi üzerinden süreç gerçekleş
tirilmiştir.
```

Çizelge A.1 Algoritma A.1 (Devamı).

```
#mirna_mature.txt veriseti miRBase versiyon 15 tarafından sunulan veri
setidir. Tez çalışmasında tüm verisetlerinin uyumlu versiyonları kulla
nılmıştır. Bunun için miRBase 15 ve 21 versiyonları üzerinden CLASH ve
risetinde mikroRNA adları güncellenmiştir. Kullanılan komutlar aşağıda
ki gibidir:

read_tsv("mirna_mature.txt", col_names = FALSE)%>%
  filter(startsWith(X2, "hsa"))%>%
  select(mirna_ID = X2, mirbase_ID = X3)%>%
  inner_join(mirbasehg38%>% select(ID, Name), by= c("mirbase_ID"= "ID"
))%>%
  select(mirbase_ID, Name)%>%
  distinct()%>%
  inner_join(clashelwak, by = c("mirbase_ID"= "Barcode"))%>%
  dplyr::select(Name, miRNA_seq, Ensembl_Gene_Id, Ensembl_Transcript_I
d, Hugo_Symbol, mRNA_seq_extended, chimeras_decompressed, seed_type, s
eed_basepairs,folding_class, seq_ID, folding_energy, X5.UTR, CDS, X3.U
TR)%>%
  inner_join(hg19, by = c("Ensembl_Gene_Id"= "ensembl_gene_id", "Ensem
bl_Transcript_Id"="ensembl_transcript_id", "Hugo_Symbol"="hgnc_symbol"
))%>%
  mutate(region1 = ifelse(X5.UTR == "1", "5UTR", " "), region2= ifelse
(X3.UTR == "1", "3UTR", " "),region3= ifelse(CDS =="1", "CDS", " "))%>
%
  unite(region, c(region1, region2, region3), sep = "||")%>%
  dplyr::select(chromosome_name, start_position, end_position,strand,
entrezgene, Hugo_Symbol, Ensembl_Gene_Id, Ensembl_Transcript_Id, mRNA_
seq_extended, Name, miRNA_seq, seq_ID, seed_type,seed_basepairs, foldi
ng_class, folding_energy, region)%>%
  as_data_frame() -> clashelwakfinal
```

Çizelge A.1 Algoritma A.1 (Devamı).

A.1.1.3 İnsan Genom Projesi Versiyon 19'un İnsan Genom 38'e Çevirilmesi

```
lift19 <- clashelwakfinal%>%
  dplyr::select(1,2,3)%>%
  unite(start_end, c("start_position", "end_position"), sep = "-")%>%
  mutate(Chromosome = paste0("chr",chromosome_name, ""))%>%
  unite(chromosome_name, c("Chromosome","start_end"), sep = ":")

write_tsv(lift19, "lift19.txt")

#UCSC'den tarama yapılmış ve yeni genom projesinde bazı lokasynların s
ilindiği anlaşılmıştır.

lift19eksik <- read_tsv("lifteksik 19.txt")
colnames(lift19eksik)[1] <- "chromosome_loc"

lift19eksik <- lift19eksik%>%
  dplyr::filter(startsWith(chromosome_loc, "chr"))%>%
  separate(chromosome_loc, c("Chr", "End"), "-", remove = TRUE)%>%
  separate(Chr, c("Chr", "Start"), ":", remove = TRUE)

lift19eksik$Start <- as.numeric(lift19eksik$Start)
lift19eksik$End <- as.numeric(lift19eksik$End)

clashelwakfinal <-clashelwakfinal%>%
  mutate(Chromosome = paste0("chr",chromosome_name, ""))%>%
  dplyr::anti_join(lift19eksik, by = c("Chromosome"="Chr", "start_posi
tion"="Start", "end_position"="End"))

hg38clash <- read.delim("hg38clashcomp.txt", header = FALSE)

clashelwakfinal <- clashelwakfinal%>%
  bind_cols(hg38clash)

colnames(clashelwakfinal)[19] <- "HG38build_loc"
```

Çizelge A.1 Algoritma A.1 (Devamı).

```
clashelwakfinal <- clashelwakfinal%>%
  dplyr::mutate(Genom_build= rep("hg19"))
str(clashelwakfinal)
#CLASH ve CLEAR-CLiP verisetlerini birleştirebilmek için veri setini d
üzenlemesi gerçekleştirilmiştir.

clashelwakfinal%>% dplyr::select(cluster=seq_ID, chromosome = Chromoso
me, start_position, end_position, strand, hgnc_symbol = Hugo_Symbol, E
nsembl_Gene_Id, Ensembl_Transcript_Id, target_seq = mRNA_seq_extended,
miRNA= Name, miR_seq =miRNA_seq, seed_type, seed_type2= seed_basepairs
, seed_type3= folding_class, Energy = folding_energy, HG38build_loc, G
enom_build, region) -> clashelwakfinal

clashelwakfinal$cluster <- as.character(clashelwakfinal$cluster)
clashelwakfinal$strand <- as.character(clashelwakfinal$strand)
clashelwakfinal$target_seq <- as.character(clashelwakfinal$target_seq)
clashelwakfinal$miR_seq <- as.character(clashelwakfinal$miR_seq)
clashelwakfinal$seed_type <- as.character(clashelwakfinal$seed_type)
clashelwakfinal$HG38build_loc <- as.character(clashelwakfinal$HG38buil
d_loc)
clashelwakfinal$seed_type2 <- as.numeric(clashelwakfinal$seed_type2)
clashelwakfinal$seed_type3 <- as.character(clashelwakfinal$seed_type3)
```

A.1.1.4 CLASH Deneysel Çalışmasının Sonuçlarına Göre Sunulan mikroRNA Çekirdek Tipleri Anlamlı Olması İçin Düzenlenmesi

```
clashelwakfinal%>%
  mutate(seed_type= ifelse (seed_type == "noncanonical_seed"& seed_typ
e2 >4 &seed_type3=="I", paste0(seed_type2, "-mer"), seed_type),
         seed_type= ifelse (seed_type == "noncanonical_seed"& seed_typ
e2 >4 &seed_type3=="II", paste0(seed_type2, "-mer_noncanonical"), seed
_type),
         seed_type= ifelse (seed_type == "noncanonical_seed"& seed_typ
e2 >4 &seed_type3=="III", paste0(seed_type2, "-mer_noncanonical"), see
d_type),
```

Çizelge A.1 Algoritma A.1 (Devamı).

```
        seed_type= ifelse (seed_type == "noncanonical_seed"& seed_typ
e2 >4 &seed_type3=="IV", paste0(seed_type2, "-mer_noncanonical"), seed
_type),
        seed_type= ifelse (startsWith(seed_type, "no") ,"none", seed_
type))%>%
  select(-seed_type2, -seed_type3)->clashelwakfinal
```

A.1.2. CLEAR-CLiP Veri Setinin Düzenlenmesi

```
clearclip <- read_xlsx("CLEAR-CLIP.xlsx")

#Clearclip hg18
```

A.1.2.1 İnsan Genom 18'in Sorgulaması

```
#HG18
listEnsemblArchives()
listMarts(host = 'may2009.archive.ensembl.org')
ensembl54 = useMart(host='may2009.archive.ensembl.org',
                    biomart='ENSEMBL_MART_ENSEMBL',
                   dataset='hsapiens_gene_ensembl')
hg18 <- getBM(attributes = c("ensembl_transcript_id","ensembl_gene_id"
,"chromosome_name", "start_position","end_position", "hgnc_symbol", "e
ntrezgene", "strand" ), mart = ensembl54)
```

A.1.2.2 Genom Bilgilerinin Veri Setine Eklenmesi

```
clearclipfinal <- hg18%>%
  inner_join(clearclip, by= c("entrezgene"= "gene.id", "hgnc_symbol"=
"gene.symbol"))%>%
  distinct()
```

A.1.2.3 İnsan Genom Projesi Versiyon 18'in İnsan Genom 38'e Çevirilmesi

```
lift18 <- clearclipfinal%>%
  unite(start_end, c("start_position", "end_position"), sep = "-")%>%
  unite(location, c("chr","start_end"), sep = ":")%>%
  dplyr::select(location)
write_tsv(lift18, "lift18.txt")
```

Çizelge A.1 Algoritma A.1 (Devamı).

```
lift18eksik <- read_tsv("lift18eksik.txt")

colnames(lift18eksik)[1] <- "Chromosome_loc"

lift18eksik <- lift18eksik%>%
  dplyr::filter(startsWith(Chromosome_loc, "chr"))%>%
  separate(Chromosome_loc, c("Chr", "End"), "-", remove = TRUE)%>%
  separate(Chr, c("Chr", "Start"), ":", remove = TRUE)

lift18eksik$Start <- as.numeric(lift18eksik$Start)
lift18eksik$End <- as.numeric(lift18eksik$End)

clearclipfinal <- clearclipfinal%>%
  dplyr::anti_join(lift18eksik, by = c("chr"="Chr", "start_position"="
Start", "end_position"="End"))

hg38clearclip<- read.delim("hg38clearclip.txt", header = FALSE)

clearclipfinal <- clearclipfinal%>%
  bind_cols(hg38clearclip)

colnames(clearclipfinal)[28] <- "HG38build_loc"

clearclipfinal <- clearclipfinal%>%
  dplyr::mutate(Genom_build= rep("hg18"))

clearclipfinal%>%
  dplyr::select(cluster=cluster.ID, chromosome = chr, start_position,
end_position, strand = strand.y, hgnc_symbol, Ensembl_Gene_Id =ensembl
_gene_id, Ensembl_Transcript_Id =ensembl_transcript_id, target_seq = t
arget.map, miRNA, miR_seq = miR.map, seed_type = 'seed match', Energy
= MFE, HG38build_loc, Genom_build, region) -> clearclipfinal
```

Çizelge A.1 Algoritma A.1 (Devamı).

A.1.2.4 CLEAR-CLiP Versetinde Bulunan Çekirdek Tiplerinin Uyumlu Olması İçin Düzenlenmesi.

```
data_frame(seed_type= c("5mer_1","5mer_2", "5mer_3", "6mer", "6mer.ind
el", "6mer.mm", "6mer_off.mm", "6merA1", "6merA1.indel", "6merA1.mm",
"7merA1", "7merA1.indel", "7merA1.mm", "7merm8", "7merm8.indel", "7mer
m8,mm", "8mer", "8mer.indel", "8mer.mm", "NA" ),
           seed_type_com= c("5-mer", "5-mer_noncanonical", "5-mer_nonc
anonical", "6-mer", "6-mer_noncanonical", "6-mer_noncanonical", "6-mer
_noncanonical", "6-merA1", "6-merA1_noncanonical","6-merA1_noncanonica
l", "7-merA1", "7-merA1_noncanonical","7-merA1_noncanonical", "7-mer-8
m", "7-mer-8m_noncanonical", "7-mer-8m_noncanonical", "8-mer", "8-mer_
noncanonical", "8-mer_noncanonical", "none" )) ->clipdata_seed

clearclipfinal%>%
  inner_join(clipdata_seed, by = "seed_type")%>%
  select(1:11, seed_type = seed_type_com, Energy, HG38build_loc, Genom
_build, region)-> clearclipfinal

clearclipfinal$HG38build_loc <- as.character(clearclipfinal$HG38build_
loc)
```

A.1.3 İki Veri Setinin Birleştirilmesi

```
bind_rows(clashelwakfinal, clearclipfinal)%>%distinct() -> experimenta
lmirnagene

saveRDS(experimentalmirnagene,"experimentalmirnagene.RDS")
```

A.1.4 MikroRNA:Hedef Verisetine Etki Faktörlerinin Eklenmesi

A.1.4.1 Hedef Bölge Konumu Eklenmesi

```
experimentalmirnagene <- experimentalmirnagene%>%
  mutate(region2  = str_replace_all(region, "NA", ""), region3 = str_r
eplace_all(region2, "\\|", ""), region = str_replace_all(region3, c("3
'UTR"="3UTR", "5'UTR"="5UTR")))%>%
```

Çizelge A.1 Algoritma A.1 (Devamı).

```
  dplyr::select(-region2, -region3)%>%
  mutate(region_effect = as.double(ifelse(region %in% c("3UTRCDS", "CD
S3UTR", "5UTR3UTR", "CDS5UTR3UTR", "CDS3UTRintron"), "0.93", ifelse(re
gion %in% c("CDS", "CDSintron"), "0.42", ifelse(region %in% c("3UTR","
3UTRintron"), "0.84", ifelse(region %in% c("5UTR", "5UTRintron"), "0.0
1", ifelse(region %in% c("5UTRCDS", "CDS5UTR"), "0.42", ifelse(region
%in% c("intron",""), "0.01", ifelse(region %in% c("exon_unclassified",
""), "0.2", NA)))))))))
```

A.1.4.2 Çekirdek Tipi Katsayısının Belirlenmesi

```
seed_type_effect <- data_frame( seed_type = c("5-mer", "5-mer_noncanon
ical", "6-mer", "6-mer_noncanonical", "6-merA1", "6-merA1_noncanonical
", "7-mer", "7-mer_noncanonical", "7-merA1", "7-merA1_noncanonical", "
7-mer-8m", "7-mer-8m_noncanonical", "8-mer", "8-mer_noncanonical", "9-
mer", "9-mer_noncanonical", "none"),
                                  seed_type_effect= c(0.05, 0.04, 0.07,
0.05, 0.07, 0.05, 0.23, 0.19, 0.19, 0.16, 0.25, 0.21, 0.43, 0.35, 0.43
,0.35, 0.01))

experimentalmirnagene%>%
  inner_join(seed_type_effect, by= "seed_type") -> experimentalmirnage
ne
```

A-2 Yarışmalı Ağ Tabanlı Model Algoritması ve Uygulaması

Yarışmalı modelin içeriğinin anlaşılması için öncelikle bir ideal sistem uygulaması yapılmıştır (Şekil 3.2). Bu sistem için öncelikle örnek bir veri seti üzerinden çalışma gerçekleştirilmiştir. Algoritma A.2'de ise çalışmanın yeniden üretilebilirliğini sunmak amacıyla kullanılan komutlar ve işlem basamakları sunulmuştur.

Çizelge A.2 Algoritma A.2

```
library(tidygraph)
library(purrr)
library(dplyr)
library(ggraph)
```

Çizelge A.2 Algoritma A.2 (Devamı).

```
#Örnek veri seti oluşturulması
data.frame(genes = c("G1", "G2", "G3", "G4", "G4", "G5", "G6"),
           mirna = c("M1", "M1","M1", "M1", "M2", "M2", "M2"),
           Geneexpression = c(10000, 10000, 5000, 10000, 10000, 5000,
10000),
           mirnaexpression = c(1000, 1000, 1000, 1000, 2000, 2000, 200
0), stringsAsFactors = FALSE) -> ornek_data

#Ağ veri yapısı dönüşümü:

as_tbl_graph(ornek_data)->ornek_graph


#Diğer paketlerle ağ yapısı üzerine model algoritmasının işlenmesi:

ornek_graph%N>%
  mutate(type = ifelse(startsWith(name, "G"), "gene", "mirna"), node_i
d = 1:length(.N()$name))%E>%
  mutate(Geneexpression_list = as.list(Geneexpression), Geneexpression
_pre = Geneexpression, Geneexpression_current = Geneexpression)%>%
  group_by(to)%>%
  mutate(mirnacountpergene = mirnaexpression*Geneexpression_current/su
m(Geneexpression_current))%>%
  ungroup()%>%
  mutate(effect_current = mirnacountpergene, effect_pre = effect_curre
nt, effect_list = as.list(effect_current)) -> ornek_graph_initial


#Bir gende ifade değişikliğine gidilmesi:

ornek_graph_initial%E>%
  mutate(Geneexpression_current = ifelse(from == 2, 20000, Geneexpress
ion_current),Geneexpression_list = pmap(list(Geneexpression_list, Gene
expression_current), c)) -> ornek_graph_initial
ornek_graph_initial

#İlk verinin tutulması ve uygun grafik konum planının belirlenmesi
```

Çizelge A.2 Algoritma A.2 (Devamı).

```
ornek_graph_initial ->result_graph

ornek_layout <- create_layout(graph = result_graph, layout = "kk")

#İlk değişiklik sonrasında veri setinin ağ yapısının oluşturulması:

result_graph <- result_graph%N>%
  left_join(bind_rows((as_tibble(result_graph%E>%
  select(Geneexpression_current, Geneexpression_pre, mirnaexpression))
%>%
    mutate(expression = Geneexpression_pre)%>%
   dplyr::select(id = from, expression, expression_pre = Geneexpressio
n_pre,  expression_current = Geneexpression_current)%>%
   dplyr::distinct()),
  (as_tibble(result_graph%E>%
  select(mirnaexpression))%>%
    mutate(expression = mirnaexpression)%>%
   dplyr::select(id= to, expression, expression_pre = mirnaexpression)
%>%
    dplyr::mutate(expression_current = expression_pre)%>%
   dplyr::distinct())), by=c("node_id"="id"))%>%
   mutate(changes_gene = ifelse( expression_current-expression_pre !=
0, "Downregulation", type), changes_gene = ifelse(expression_current-e
xpression_pre > 0, "Upregulation", changes_gene))
#Her bir iterasyon için çıktıların girdiye atanması ve algoritmanın te
krarlanması:

for(i in 1:2){

  result_graph<- result_graph%E>%
    group_by(to)%>%
  mutate(mirnacountpergene = mirnaexpression*Geneexpression_current/su
m(Geneexpression_current))%>%
  ungroup()%>%
  mutate(effect_pre = effect_current, effect_current = mirnacountperge
ne)%>%
```

Çizelge A.2 Algoritma A.2 (Devamı).

```
  group_by(from)%>%
  mutate(Geneexpression_pre = Geneexpression_current, Geneexpression_c
urrent = Geneexpression_pre - (sum(effect_current)-sum(effect_pre)))%>
%
    ungroup()%>%
    mutate(Geneexpression_list = pmap(list(Geneexpression_list, Geneex
pression_current), c), effect_list = pmap(list(effect_list, effect_cur
rent), c))

result_graph <- result_graph%N>%
  select(-expression_pre)%>%
  select(name, type, node_id, expression, expression_pre = expression_
current)%>%
  left_join( bind_rows((as_tibble(result_graph%E>%
  select(Geneexpression_current, mirnaexpression))%>%
   dplyr::select(id = from, expression_current = Geneexpression_curren
t)%>%
   dplyr::distinct()),
  (as_tibble(result_graph%>%
  activate(edges)%>%
  select(Geneexpression_current, mirnaexpression))%>%
   dplyr::select(id= to,  expression_current = mirnaexpression)%>%
   dplyr::distinct())), by=c("node_id"="id"))%>%
  mutate(changes_gene = ifelse( expression_current-expression_pre != 0
, "Downregulation", type), changes_gene = ifelse(expression_current-ex
pression_pre > 0, "Upregulation", changes_gene))

}
```

A-3 Ağ Tabanlı Modelin MikroRNA Aktivitesinde Önemli Faktörlerle Genişletilmesi ve Örnek Uygulaması

Bölüm A-2'deki agoritma ile bir gen ifadesindeki değişim sonucunda yalnızca mikroRNA dağılımındaki değişikliklere dayandırılarak ağ yapısında tüm genlerdeki değişimin bulunması gerçekleştirildikten sonra, hasta örneklerinde gerçekleştirilecek uygulamada

fonksiyonların test edilmesi ve mikroRNA aktivitesinde önemli olan faktörleriin varlığında etkileşimlerin sonuçlarının tespit edilmesi için A.3 algoritmasındaki uygulama yapılmıştır.

Örnek uygulama sırasında mikroRNA aktivitesinde önemli olan faktörler de veri setinde sunulmuştur. Sonrasında ise A-4 bölümünde sunulan, tez çalışmasında geliştirilmiş fonksiyonlar kullanılarak örnek bir uygulama yapılmıştır. Örnek uygulamanın sonuçlarıyla elde edilen ağ yapısının gösterimi ise Şekil 3.8'deki gibidir.

Çizelge A.3 Algoritma A.3

```
data.frame(genes = c("G1", "G2", "G3", "G4", "G4", "G5", "G6"),
           mirna = c("M1", "M1","M1", "M1", "M2", "M2", "M2"),
           hgnc_symbol = c("G1", "G2", "G3", "G4", "G4", "G5", "G6"),
           Geneexpression = c(10000, 10000, 5000, 10000, 10000, 5000,
10000),
           mirnaexpression = c(1000, 1000, 1000, 1000, 2000, 2000, 200
0),
           seed_type_effect= c(0.35,0.43,0.05,0.23,0.19,0.25,0.43 ),
           region_effect = c(0.84,0.01,0.84,0.84,0.42,0.84,0.93),
           Energy = c(-20,-6,-16,-10,-12,-8,-25),stringsAsFactors = FA
LSE) -> ornek_data

ornek_data

as_tbl_graph(ornek_data)->ornek_graph


ornek_graph%>%
  priming()%>%
  update_nodes(once = TRUE)%>%
  gene_update_how("G2",2)%N>%
  update_nodes()%>%
  simulate(cycle = 3)-> result_graph
```

A-4 Tanımlanan Fonksiyonlar

Tez çalışmasında ardışık pek çok algoritmanın kullanılmasını gerektiren bir model yaklaşımı geliştirilmiştir. Bu uygulamalar sırasında hataların önüne geçebilmek ve daha uygulanabilir bir yaklaşım sağlayabilmek amacıyla farklı fonksiyonlar üretilmiş ve uygulanmıştır. Bu bölümde tez çalışmasında geliştirilen fonksiyonlar sunulmuştur.

Çizelge A.4 Algoritma A.4

```
library(dplyr)
library(tidyr)
library(stringr)
library(stringi)
library(tidyverse)
library(tidygraph)
library(igraph)
library(ggraph)
library(purrr)
library(reshape)
```

İşlenmemiş halde bulunan, yalnızca gerekli değişkenleri içeren “graph” objelerinin düzenlenmesi için priming() fonksiyonu geliştirilmiştir.

```
priming <- function(input_graph, pattern = "G"){

  input_graph%N>%
    mutate(type = ifelse(str_detect(name,pattern), "gene", "mirna"), node_id = 1:length(.N()$name))%E>%
    mutate(Geneexpression_list = as.list(Geneexpression), Geneexpression_pre = Geneexpression, Geneexpression_current = Geneexpression)%>%
    group_by(to)%>%
  mutate(seed_type_effect= seed_type_effect/max(seed_type_effect), region_effect = region_effect/max(region_effect))%>%
    mutate(mirnacountpergene = mirnaexpression*Geneexpression_current*abs(Energy)*seed_type_effect/sum(Geneexpression_current*abs(Energy)*seed_type_effect), mirnacountpergene = ifelse(is.na(mirnacountpergene), 0, mirnacountpergene))%>%
    ungroup()%>%
    mutate(effect_current = mirnacountpergene*region_effect, effect_pre = effect_current, effect_list = as.list(effect_current))
}
```

Verinin bağlantı kısmında bulunan değişkenlerin düzenlenmesi ve düğüm değişkenleri olarak atanması için update_nodes() fonksiyonu geliştirilmiştir. Bağlantı verilerinden ilk

Çizelge A.4 Algoritma A.4 (Devamı).

defa düğüm verisi taşınacak ise update_nodes(once=TRUE) olarak işlem gerçekleştirilmelidir.

```
prepare_rhs_once <- function(input_graph){

  bind_rows((as_tibble(input_graph%>%
                         activate(edges)%>%
                         select(Geneexpression_current, Geneexpression
_pre, mirnaexpression))%>%
               mutate(expression = Geneexpression_pre)%>%
               dplyr::select(id = from, expression, expression_pre = G
eneexpression_pre,  expression_current = Geneexpression_current)%>%
               dplyr::distinct()),
            (as_tibble(input_graph%>%
                         activate(edges)%>%
                         select(mirnaexpression))%>%
               mutate(expression = mirnaexpression)%>%
               dplyr::select(id= to, expression, expression_pre = mirn
aexpression)%>%
               dplyr::mutate(expression_current = expression_pre)%>%
               dplyr::distinct()))

}

prepare_rhs <- function(input_graph){

  bind_rows((as_tibble(input_graph%E>%
                         select(Geneexpression_current, mirnaexpressio
n))%>%
               dplyr::select(id = from, expression_current = Geneexpre
ssion_current)%>%
               dplyr::distinct()),
            (as_tibble(input_graph%>%
                         activate(edges)%>%select(Geneexpression_curre
nt, mirnaexpression))%>%
```

Çizelge A.4 Algoritma A.4 (Devamı).

```
                dplyr::select(id= to,  expression_current = mirnaexpres
sion)%>%
                dplyr::distinct()))
}

update_nodes <- function(input_graph, once = FALSE){
  if( once ) {
    rhs_table <- prepare_rhs_once(input_graph)
  } else {
    rhs_table <- prepare_rhs(input_graph)
  }
  if (!once){
    input_graph <- input_graph%>%
      select(-expression_pre)%>%
      select(name, type, node_id, expression, expression_pre = express
ion_current)
  }
  input_graph%>%
    activate(nodes)%>%
    left_join(rhs_table, by=c("node_id"="id"))%>%
    mutate(changes_gene = ifelse( expression_current-expression_pre !=
0, "Downregulation", type), changes_gene = ifelse(expression_current-e
xpression_pre > 0, "Upregulation", changes_gene))%>%
    mutate(percent_dif = expression_current/expression)
}
```

Bir genin ifadesinde meydana gelebilecek bir değişiklik için gene_update_how(), doğrudan gen ifadesinin iki katına çıkarılması için gene_update_up() ve doğrudan yarı ifadesine düşürülmesi için ise gene_update_down() fonksiyonları tanımlanmıştır.

```
gene_update_how <- function (input_graph, node_name, how){

  input_graph%E>%
    mutate(Geneexpression_current = ifelse(hgnc_symbol == node_name, G
eneexpression_current*how, Geneexpression_current))
}
```

Çizelge A.4 Algoritma A.4 (Devamı).

```
gene_update_up <- function (input_graph, node_name){

  input_graph%E>%
    mutate(Geneexpression_current = ifelse(hgnc_symbol == node_name, G
eneexpression_current*2, Geneexpression_current))
}

gene_update_down <- function (input_graph, node_name){

  input_graph%E>%
    mutate(Geneexpression_current = ifelse(hgnc_symbol == node_name, G
eneexpression_current/2, Geneexpression_current))
}
```

Geliştirilen modelde en önemli konulardan biri modelin kaç iterasyon ile çalıştırılacağıdır. Çünkü ağ yapısı üzerindeki tüm düğümlere başlangıçta meydana gelen değişikliğin ulaşması ve cevap değişikliklerinin gerçekleşmesi gerekmektedir. Bu sebeple ağ yapısı üzerindeki değişikliklerin sonuçlarının analizine dayanan find_iteration() fonksiyonu geliştirilmiştir.

```
find_iteration <- function(input_graph, node_name, how){

iteration <- data.frame(iter = seq(1,100, 1), effect= rep(0))

input_graph%>%
  priming()%>%
 update_nodes(once = TRUE)%>%
  gene_update_how(node_name, how)%N>%
  update_nodes()%>%
  simulate(cycle = 100)->result_100

for(i in 1:100){

result_100%E>%
  as_tibble()%>%
```

Çizelge A.4 Algoritma A.4 (Devamı).

```
  dplyr::select(from, Geneexpression_list)%>%
  mutate(dif= abs(map_dbl(Geneexpression_list,i+1) - map_dbl(Geneexpre
ssion_list,i)))%>%
  dplyr::select(-Geneexpression_list)%>%
  distinct()%>%
  mutate(non_zero = ifelse(dif>0.2, 1, 0))%>%
  summarise(per= sum(non_zero)*100/n())%>%pull() -> iteration$effect[i
]

(iteration%>%
    filter(effect== max(effect)))[1,1]

}
```

Ağ yapısı üzerinde yapılan ilk ifade değişikliği sonrasında gerçekleşen düzenlenmeleri takiben iteratif olarak düzenlenme değişikliklerinin gerçekleşmesini sağlayan ve verileri güncelleyen simulate() fonksiyonu geliştirilmiştir.

```
simulate <- function(input_graph, cycle=1){

  for(i in seq_along(1:cycle)){
    print(i)
  input_graph%E>%
    group_by(to)%>%
    mutate(seed_type_effect= seed_type_effect/max(seed_type_effect), r
egion_effect = region_effect/max(region_effect))%>%
    mutate(mirnacountpergene = mirnaexpression*Geneexpression_current*
abs(Energy)*seed_type_effect/sum(Geneexpression_current*abs(Energy)*se
ed_type_effect), mirnacountpergene = ifelse(is.na(mirnacountpergene),
0, mirnacountpergene))%>%
    ungroup()%>%
    mutate(effect_pre = effect_current, effect_current = mirnacountper
gene*region_effect)%>%
    group_by(from)%>%
    mutate(Geneexpression_pre = ifelse(Geneexpression_current< 0, 1, G
```

Çizelge A.4 Algoritma A.4 (Devamı).

```
eneexpression_current), Geneexpression_current = Geneexpression_pre -
(sum(effect_current)-sum(effect_pre)), Geneexpression_current = ifelse
(Geneexpression_current< 0, 1, Geneexpression_current))%>%
    ungroup()%>%
    mutate(Geneexpression_list = pmap(list(Geneexpression_list, Geneex
pression_current), c), effect_list = pmap(list(effect_list, effect_cur
rent), c))%N>%
    update_nodes()-> input_graph
  }
input_graph
}
```

A-5 TCGA-E9-A1N5-11A Örneğinde Algoritmanın Uygulanması

Çizelge A.5 Algoritma A.5

```
E9_modelgraph%>%
  priming()%>%
  update_nodes(once = TRUE)%>%
  gene_update_how("ABCC1", 4.10)%N>%
  update_nodes()%>%
  simulate(cycle = 27)

sample_layout <- create_layout(graph = E9_modelgraph, layout = "kk")

E9_modelgraph%>%
  priming()%>%
  update_nodes(once = TRUE)%>%
  gene_update_how("ABCC1", 4.10)%N>%
  update_nodes()%>%
  ggraph("manual", node.position=sample_layout)+
  geom_edge_link(colour = "#838B8B" , alpha = 0.5)+
  geom_node_point(aes(filter= (changes_gene == "gene"), color = "Gene"
, size= expression_current), shape= 16)+
  geom_node_point(aes(filter= (changes_gene == "mirna"), color = "mirn
a"), shape= 16, size= 2)+
```

Çizelge A.5 Algoritma A.5 (Devamı).

```
  geom_node_point(aes(filter= (changes_gene == "Upregulation"), color=
"Upregulation", size= expression_current), shape= 16)+
  scale_colour_manual(name= "types", values=c("Gene"="red", "mirna"="o
range", "Upregulation"="blue"))+
    ggtitle('TCGA-E9-A1N5') +
    theme_graph()
```

A-6 MikroRNA İfadesi Değişiminde TCGA-E9-A1N5 Hasta Verisi İnceleme

Çizelge A.6 Algoritma A.6

```
find_perturbation_bymirna <- function(input_data, iteration){



result_graph <- input_data%>%
  dplyr::select(Ensembl_Gene_Id, miRNA, hgnc_symbol, miRNA, gene_expre
ssion_normal_htseq_counts, mirnaexpression_normal,mirnaexpression_tumo
r, region_effect, seed_type_effect, Energy)%>%
  as_tbl_graph()%>%
  mutate(type = ifelse(startsWith(name, "ENSG"), "gene", "mirna"), nod
e_id = 1:length(.N()$name))%E>%
  mutate(Geneexpression_list = as.list(gene_expression_normal_htseq_co
unts), Geneexpression_pre = gene_expression_normal_htseq_counts, Genee
xpression_current = gene_expression_normal_htseq_counts)%>%
  group_by(to)%>%
  mutate(seed_type_effect= seed_type_effect/max(seed_type_effect), reg
ion_effect = region_effect/max(region_effect))%>%
  mutate(mirnacountpergene = mirnaexpression_normal*Geneexpression_cur
rent*abs(Energy)*seed_type_effect/sum(Geneexpression_current*abs(Energ
y)*seed_type_effect), mirnacountpergene = ifelse(is.na(mirnacountperge
ne), 0, mirnacountpergene))%>%
  ungroup()%>%
  mutate(effect_current = mirnacountpergene*region_effect, effect_pre
= effect_current, effect_list = as.list(effect_current))
```

Çizelge A.6 Algoritma A.6 (Devamı).

```
result_graph <- result_graph%N>%
  left_join(bind_rows((as_tibble(result_graph%E>%
                                   select(Geneexpression_current, Gene
expression_pre, mirnaexpression_tumor))%>%
                         mutate(expression = Geneexpression_pre)%>%
                         dplyr::select(id = from, expression, expressi
on_pre = Geneexpression_pre,  expression_current = Geneexpression_curr
ent)%>%
                         dplyr::distinct()),
                       (as_tibble(result_graph%E>%
                                   select(mirnaexpression_tumor))%>%
                         mutate(expression = mirnaexpression_tumor)%>%
                         dplyr::select(id= to, expression, expression_
pre = mirnaexpression_tumor)%>%
                         dplyr::mutate(expression_current = expression
_pre)%>%
                         dplyr::distinct())), by=c("node_id"="id"))%>%
  mutate(changes_gene = ifelse( expression_current-expression_pre != 0
, "Downregulation", type), changes_gene = ifelse(expression_current-ex
pression_pre > 0, "Upregulation", changes_gene))%>%
  mutate(percent_dif = expression_current/expression)

for(i in 1:iteration){

  result_graph<- result_graph%E>%
    group_by(to)%>%
    mutate(seed_type_effect= seed_type_effect/max(seed_type_effect), r
egion_effect = region_effect/max(region_effect))%>%
    mutate(mirnacountpergene = mirnaexpression_tumor*Geneexpression_cu
rrent*abs(Energy)*seed_type_effect/sum(Geneexpression_current*abs(Ener
gy)*seed_type_effect), mirnacountpergene = ifelse(is.na(mirnacountperg
ene), 0, mirnacountpergene))%>%
    ungroup()%>%
    mutate(effect_pre = effect_current, effect_current = mirnacountper
```

Çizelge A.6 Algoritma A.6 (Devamı).

```
gene*region_effect)%>%
    group_by(from)%>%
    mutate(Geneexpression_pre = ifelse(Geneexpression_current< 0, 1, G
eneexpression_current), Geneexpression_current = Geneexpression_pre -
(sum(effect_current)-sum(effect_pre)), Geneexpression_current = ifelse
(Geneexpression_current< 0, 1, Geneexpression_current))%>%
    ungroup()%>%
    mutate(Geneexpression_list = pmap(list(Geneexpression_list, Geneex
pression_current), c), effect_list = pmap(list(effect_list, effect_cur
rent), c))

  result_graph <- result_graph%N>%
    select(-expression_pre)%>%
    select(name, type, node_id, expression, expression_pre = expressio
n_current)%>%
    left_join( bind_rows((as_tibble(result_graph%E>%
                                        select(Geneexpression_current, m
irnaexpression_tumor))%>%
                              dplyr::select(id = from, expression_curren
t = Geneexpression_current)%>%
                              dplyr::distinct()),
                          (as_tibble(result_graph%>%
                                        activate(edges)%>%
                                        select(Geneexpression_current, m
irnaexpression_tumor))%>%
                              dplyr::select(id= to,  expression_current
= mirnaexpression_tumor)%>%
                              dplyr::distinct())), by=c("node_id"="id"))
%>%
    mutate(changes_gene = ifelse( expression_current-expression_pre !=
0, "Downregulation", type), changes_gene = ifelse(expression_current-e
xpression_pre > 0, "Upregulation", changes_gene))%>%
    mutate(percent_dif = expression_current/expression)
}
```

Çizelge A.6 Algoritma A.6 (Devamı).

```
 result_graph
}
```

Bu algoritma ile E9 hasta örneği için elde edilen ağ yapısı Ek-B'de sunulmuştur.

A-7 Gen Pozitif Düzenlenme Çalışma Sonuçlarına Göre Model Uygulanması

GEO veri tabanında sunulan meme kanser hücresi örneklerinde gerçekleştirilmiş çalışmanın veri seti doğrudan indirilmiş ve işlenmiştir. Tekrarlı gruplar için ortalama değer alınarak modelin uygulanması için veri seti hazırlanmıştır.

Çizelge A.7 Algoritma A.7

```
read_tsv("GSE119449_DESeq_normalized_count_matrix.txt")-> GSE119449_ex
pression

GSE119449_expression%>%
   separate(ORF, "ensembl_gene_id")-> GSE119449_expression

GSE119449_expression%>%
  dplyr::select(ensembl_gene_id, cntrl_repA= Sample_jz1, upr_repA1= Sa
mple_jz2, upr_repA2= Sample_jz3, upr_repA3= Sample_jz4, cntrl_repB = S
ample_jz5, upr_repB1= Sample_jz6, upr_repB2= Sample_jz7, upr_repB3= Sa
mple_jz8, cntrl_repC = Sample_jz9, upr_repC1= Sample_jz10, upr_repC2=
Sample_jz11, upr_repC3= Sample_jz12 )%>%
  dplyr::mutate(upr_repA = (upr_repA1+ upr_repA2+ upr_repA3)/3, upr_re
pB = (upr_repB1+ upr_repB2+ upr_repB3)/3, upr_repC = (upr_repC1+ upr_r
epC2+ upr_repC3)/3)%>%
  select(ensembl_gene_id, cntrl_repA, upr_repA, cntrl_repB, upr_repB,
cntrl_repC, upr_repC) -> septin9_upregulation
```

Tez çalışmasında kullanılan TCGA mikroRNA ifadesi veri setinden tümör dokularına ait olan ifade değerleri alınmış ve her mikroRNA için ortalama değer bulunmuştur. Elde edilen veri seti deneysel mikroRNA:hedef veri seti aracılığı ile GEO verisetine entegre edilmiştir.

Çizelge A.7 Algoritma A.7 (Devamı).

```
mirnaTCGA%>%
  mutate(type = substr(barcode, 14, 16))%>%
  filter(type == "01A"|type == "01B")%>%
  dplyr::select(mirbase_ID, miRNA, total_read, total_RPM)%>%
  group_by(miRNA)%>%
  mutate(mean_read = mean(total_read), mean_RPM = mean(total_RPM))%>%
  ungroup()%>%
  dplyr::select(mirbase_ID, miRNA, mean_read, mean_RPM)%>%
  distinct() ->mean_tumor_mirna_expression

mean_tumor_mirna_expression%>%
    inner_join(experimentalmirnagene%>%dplyr::select(hgnc_symbol, Ense
mbl_Gene_Id, miRNA, Energy, region_effect, seed_type_effect), by = "mi
RNA")%>%
  inner_join(septin9_upregulation, by = c("Ensembl_Gene_Id"= "ensembl_
gene_id"))-> GSE_expression_data
```

Elde edilen verisetinden model için kullanılacak değişkenlerin seçilmesi sonrasında başlangıç ağ objesi oluşturulmuştur.

```
GSE_expression_data%>%
  dplyr::select(genes=Ensembl_Gene_Id, mirna=miRNA, hgnc_symbol, Genee
xpression=cntrl_repB, mirnaexpression=mean_read, seed_type_effect,regi
on_effect,  Energy)%>%
  group_by(genes, mirna)%>%
  mutate(seed_type_effect= ifelse(seed_type_effect==max(seed_type_effe
ct), seed_type_effect, max(seed_type_effect)), Energy = ifelse(Energy=
=min(Energy), Energy, min(Energy)), region_effect= ifelse(region_effec
t==max(region_effect), region_effect, max(region_effect)))%>%
  distinct()%>%
  ungroup()%>%
  as_tbl_graph()-> GSE_modelgraph
```

Veri setinde Septin9 geninin 1.93 katıa çıkarıldığı görülmüş ve model bu yönde çalıştırılmıştır.

Çizelge A.7 Algoritma A.7 (Devamı).

```
find_iteration(GSE_modelgraph, "SEPT9", 1.93) #26


GSE_modelgraph%>%
  priming()%>%
  update_nodes(once = TRUE)%>%
  gene_update_how("SEPT9", 1.93)%N>%
  update_nodes()%>%
  simulate(26) -> results_GEO
```

EK-B

GENEL SONUÇLAR

Tez çalışması kapsamında farklı veri setlerinin eldesi, işlenmesi ve model uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda elde edilen veri setlerinden bir kısmı sunulmuştur. Çizelge B.1 yeni nesil dizileme yöntemleriyle gerçekleştirilmiş mikroRNA:hedef belirlenmesi çalışmalarının sonuçlarının birleştirilmesiyle elde edilen veri setinin içeriğini göstermektedir.

Çizelge B.1 Yeni nesil dizileme içeren deneysel yöntemlerden elde edilen verilerin birleştirildiği veri setinin içeriği.

Değişken Adı	İçerik
cluster	mikroRNA:mRNA komplekslerinin betimleme değişkeni. CLASH ve CLEAR-CLiP yöntemlerine göre farklı şekilde belirtilmiştir.
chromosome	Genin bulunduğu kromozom
start_position	Gen başlangıç pozisyonu
end_position	Gen sonlanma pozisyonu
strand	Zincir tipi (- veya +)
hgnc_symbol	Gen sembolü
Ensembl_Gene_Id	Ensembl genom tarayıcısına göre gen numarası
Ensembl_Transcript_Id	Ensembl genom tarayıcısına göre transkript numarası
target_seq	Hedef mRNA dizisi

Çizelge B.1 Yeni nesil dizileme içeren deneysel yöntemlerden elde edilen verilerin birleştirildiği veri setinin içeriği (Devamı).

miRNA	mikroRNA adı
miR_seq	mikroRNA dizisi
seed_type	Çekirdek tipi
Energy	Tahmini minimum bağlanma enerjisi
HG38build_loc	İnsan genom versiyon 38'e göre genin kromozom ve lokasyon bilgisi
Genom_build	Esas veri setinin hangi genom versiyonuna göre sunulduğu (hg19 veya hg18)
region	Eşleşme gerçekleştirilen bölgeni hedef üzerindeki konumu
region_effect	Hedef bölgenin konumunun mikroRNA aktivitesine etki katsayısı
seed_type_effect	Çekirdek bölgesinin mikroRNA aktivitesine etki katsayısı

Çizelge B.1'de gösterilen verilerden tez çalışmasında kullanılan bilgiler Bölüm 4.1'de Çizelge 4.3'te sunulmuş olan deneysel veri seti sonuçları kısmında sunulmuştur.

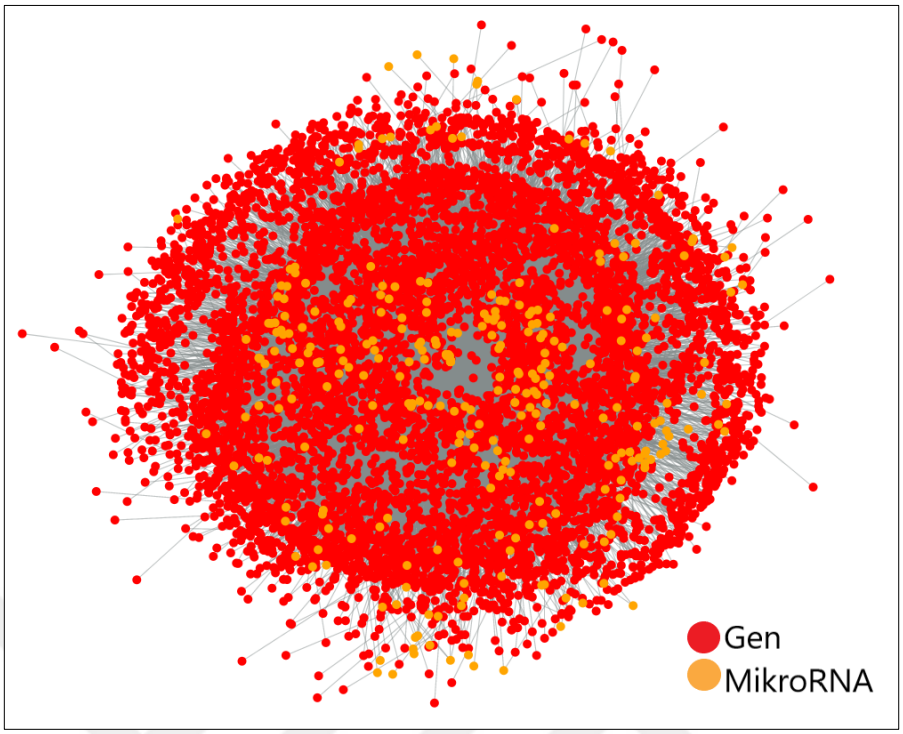
Veri setlerinin birleştirme aşamasında tez çalışmasında iki örnek veri seti elde edilmiştir. Bu örnek veri setleri geliştirilen ağ tabanlı modelin test edilmesi aşamasında kullanılmak üzere Çizelge B.2 ve Çizelge B.3'teki içeriğe sahip olacak şekilde kaydedilmiştir. Çizelge B.2 ve Çizelge B.3 hastalarının tüm veri seti olmamakla birlikte yalnızca veri setlerinin içeriğinin anlaşılması için sunulmuştur. Hasta örnekleri için elde edilen veri setlerinden oluşturulan ilk ağ yapıları ise Şekil B.1 ve Şekil B.2'de sunulmuştur.

Çizelge B.2 TCGA-E9-A1N5 hastasının doku örneklerinin birleştirilmiş veri seti.

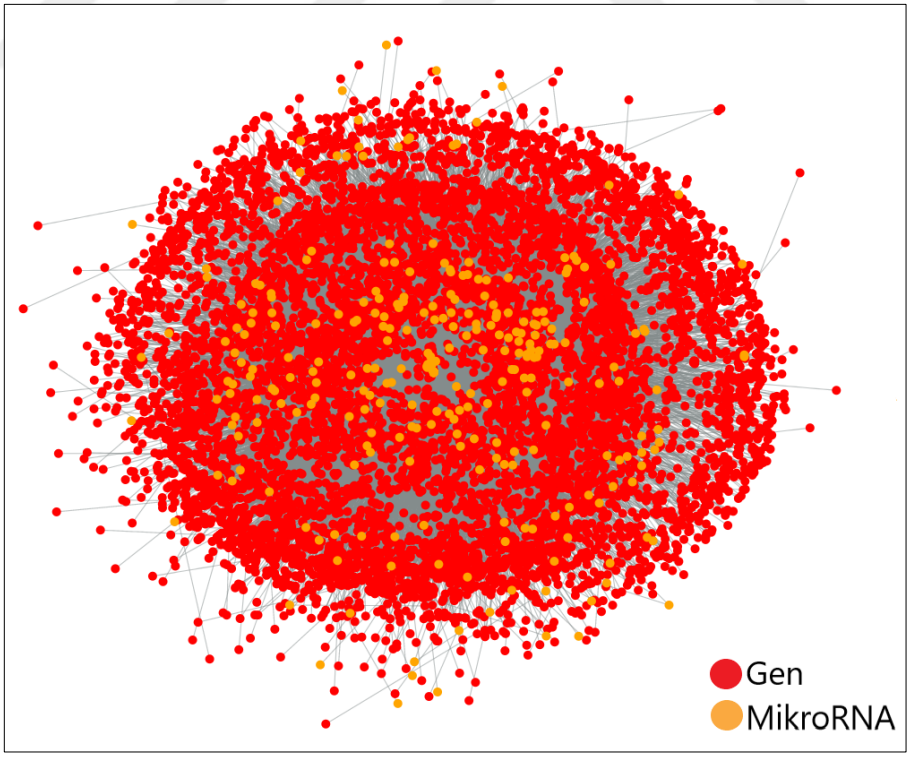
sample	sample_barcode	Ensembl_Gene_Id	hgnc_symbol	gene_expression_tumor	gene_expression_normal	miRNA	mirnaexpression_normal	Energy	region_effect	seed_type_effect
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000000003	TSPAN6	1033	2057	hsa-miR-484	112,00	-21,4	0.42	0.43
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000000457	SCYL3	952	926	hsa-miR-149-5p	55,90	-5,5	0.42	0.01
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000000457	SCYL3	952	926	hsa-miR-30a-5p	60773,00	-13	0.84	0.43
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000000460	C1orf112	404	284	hsa-miR-1296-5p	13,70	-8,1	0.42	0.01
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000000971	CFH	3339	1228	hsa-miR-17-5p	883,90	-17,2	0.42	0.01
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000001084	GCLC	1201	1224	hsa-miR-194-5p	157,93	-18,1	0.01	0.01
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000001084	GCLC	1201	1224	hsa-miR-30a-5p	60773,31	-15	0.42	0.35
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000001167	NFYA	2118	1321	hsa-miR-221-3p	173,28	-22,5	0.42	0.04
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000001497	LAS1L	2005	1541	hsa-miR-17-5p	883,94	-20,8	0.42	0.01
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000001629	ANKIB1	5035	2957	hsa-miR-15b-5p	194,67	-20,8	0.01	0.35
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000001629	ANKIB1	5035	2957	hsa-miR-25-3p	10142,32	-12,1	0.01	0.01
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000001629	ANKIB1	5035	2957	hsa-miR-26a-5p	1952,13	-22,9	0.01	0.07
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000001629	ANKIB1	5035	2957	hsa-miR-30c-5p	1486,03	-18,5	0.01	0.05
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000001630	CYP51A1	290	179	hsa-miR-15b-5p	194,67	-17,6	0.42	0.23
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000001630	CYP51A1	290	179	hsa-miR-192-5p	495,71	-10,9	0.93	0.16
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000001630	CYP51A1	290	179	hsa-miR-27a-3p	642,12	-27,4	0.93	0.43
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000001630	CYP51A1	290	179	hsa-miR-374a-5p	44,96	-17,9	0.01	0.04
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000002330	BAD	918	642	hsa-miR-330-5p	18,64	-19,1	0.01	0.43
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000002549	LAP3	6807	3579	hsa-miR-26b-5p	1076,42	-11,7	0.93	0.01
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000002586	CD99	8363	3487	hsa-let-7b-5p	25918,41	-13	0.42	0.01
TCGA-E9-A1N5-11A-41R-A14C-13	TCGA-E9-A1N5	ENSG00000002586	CD99	8363	3487	hsa-miR-615-3p	8,23	-23,7	0.84	0.04

Çizelge B.3 TCGA-A7-A0CE hastasının doku örneklerinin birleştirilmiş veri seti.

sample	sample barcode	Ensembl_Gene_Id	hgnc_symbol	gene_expression_tumor	gene_expression_normal	miRNA	mirnaexpression_normal	Energy	region_effect	seed_type_effect
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000000003	TSPAN6	8462	5404	hsa-miR-484	23,05881	-21,4	0.42	0.43
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000000419	DPM1	2408	2472	hsa-miR-18b-5p	0,256209	-10	0.84	0.01
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000000457	SCYL3	1518	1483	hsa-miR-149-5p	34,84442	-5,5	0.42	0.01
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000000457	SCYL3	1518	1483	hsa-miR-30a-5p	63031,51	-13	0.84	0.43
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000000460	C1orf112	2056	312	hsa-miR-1296-5p	1,793463	-8,1	0.42	0.01
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000000971	CFH	1663	5760	hsa-miR-17-5p	89,92935	-17,2	0.42	0.01
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000001036	FUCA2	10475	4397	hsa-miR-122-5p	0,256209	-25,2	0.01	0.43
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000001084	GCLC	2330	2775	hsa-miR-194-5p	125,03	-18,1	0.01	0.01
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000001084	GCLC	2330	2775	hsa-miR-30a-5p	63031,51	-15	0.42	0.35
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000001167	NFYA	2776	2060	hsa-miR-221-3p	93,77248	-22,5	0.42	0.04
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000001497	LAS1L	4739	3778	hsa-miR-17-5p	89,92935	-20,8	0.42	0.01
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000001629	ANKIB1	7688	3182	hsa-miR-15b-5p	47,91108	-20,8	0.01	0.35
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000001629	ANKIB1	7688	3182	hsa-miR-25-3p	7770,049	-12,1	0.01	0.01
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000001629	ANKIB1	7688	3182	hsa-miR-26a-5p	1656,903	-22,9	0.01	0.07
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000001629	ANKIB1	7688	3182	hsa-miR-30c-5p	602,6035	-18,5	0.01	0.05
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000001630	CYP51A1	336	227	hsa-miR-15b-5p	47,91108	-17,6	0.42	0.23
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000001630	CYP51A1	336	227	hsa-miR-192-5p	127,5921	-10,9	0.93	0.16
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000001630	CYP51A1	336	227	hsa-miR-27a-3p	493,4585	-27,4	0.93	0.43
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000001630	CYP51A1	336	227	hsa-miR-374a-5p	45,6052	-17,9	0.01	0.04
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000002330	BAD	863	2586	hsa-miR-330-5p	19,47188	-19,1	0.01	0.43
TCGA-A7-A0CE-11A-21R-A090-13	TCGA-A7-A0CE	ENSG00000002549	LAP3	7414	9073	hsa-miR-26b-5p	335,1213	-11,7	0.93	0.01



Şekil B.1 TCGA-E9-A1N5 örneğinde kararlı halde mikroRNA ve gen etkileşimi.



Şekil B.2 TCGA-A7-A0CE örneğinde kararlı halde mikroRNA ve gen etkileşimi.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Selcen ARI

Doğum Tarihi ve Yeri :26.10.1993/Mersin

Yabancı Dili :İngilizce

E-posta :selcenarii@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	**Alan**	**Okul/Üniversite**	**Mezuniyet Yılı**
Lisans	Biyomühendislik Bölümü	Yıldız Teknik Üniversitesi	2016
Lise	-	Niğde Fen Lisesi	2011

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	**Firma/Kurum**	**Görevi**
2017-	Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

YAYINLARI

Makale

1. Arı, S., (2018), "Meme Kanser Kök Hücrelerinde Notch Sinyal Yolağının İnhibisyonunda Güncel Yaklaşımlar", Marmara Fen Bilimleri Dergisi, 30(1): 94-104.

Bildiri

1. Arı, S. ve Kurt, G. A., (2017). "Kanser İlaç Direnç Gelişiminde Etkili P-Glikoproteinlerinin İnhibisyonunda Nanopartiküller", VI. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 5-7 Ekim 2017, Adana.

2. Ari, S. ve Yilmaz, A., (2018). "Multifactorial Modelling of MicroRNA Associated Repression and Its Subsequent Effects on Gene Expression in MicroRNA:Target Network", 7. International Molecular Biology and Biotechnology Congress, 25-27 April 2018.