

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

MEME KANSERİNİN OLUŞUMUNDA VE GELİŞİMİNDE ROL OYNAYAN
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ-miRNA-HEDEF GEN DEVRELERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Yasemin Öztemur Islakoğlu

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

Mayıs

2018

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Yasemin Öztemur Islakoğlu

ONAY

Doç. Dr. Bala Gr Dedeoğlu danışmanlığında Yasemin ztemur Islakoğlu tarafından hazırlanan bu çalışma 25/05/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

ye: Doç. Dr. Yeşim AYDIN SON

İmza:

ye: Doç. Dr. Bala GR DEDEOğLU

İmza:

ye: Prof. Dr. Hasan OğUL

İmza:

ye: Doç. Dr. Erkan YILMAZ

İmza:

ye: Yrd. Doç. Dr. Doruk ENGİN

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Meme Kanserinin Oluşumunda ve Gelişiminde Rol Oynayan *Transkripsiyon Faktörü-miRNA-Hedef Gen* Devrelerinin Araştırılması

Yasemin Öztemur Islakoğlu

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

Çok sebepli, kompleks bir genetik hastalık olan meme kanseri moleküler düzeyde detaylı bir şekilde çalışılmakta ve meme kanserine sebep olan ve gelişiminde rol oynayan pek çok gen, miRNA vb. faktör tespit edilmektedir; ancak hastalığın regülasyonunda rol oynayan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bu eksiklik, meme kanseri oluşumunu ve gelişimini öngörebilecek yeni belirteçlerin aranmasını ve düzenleyici ağların tespit edilmesini zorunlu kılmıştır. Biyolojik süreçlerin kontrolü için önemli bir mekanizma olan gen ifadesinin düzenlenmesinde miRNA'lar post-transkripsiyonel (transkripsiyon sonrası) düzeyde görev yaparken, transkripsiyonel düzeyde bu görevi transkripsiyon faktörleri (TF) üstlenmektedir. mRNA ve miRNA'ların transkripsiyonlarının TF'ler tarafından kontrol edildiği ve TF'lerin ifadelerinin de miRNA'lar tarafından düzenlendiği göz önüne alındığında birbirinden bağımsız şekilde düşünülemeyecek olan bu düzenleyici mekanizmaların karakterize edilmesi (ağlar ve devreler kurgulayarak) ve açığa çıkartılması, hücresel süreçlerin daha iyi anlaşılabilmesi için önem kazanmaktadır.

Bu amaçla tez çalışmasında miRNA ve mRNA ifade verileri ve literatür tabanlı elde edilen bilgiler birlikte kullanarak TF (transkripsiyon faktörü)-miRNA-Hedef gen devrelerini (biological circuits) dinamik olarak (deneye özgü) ortaya çıkartabilecek bir algoritma tasarlanmış, zenginleştirme tabanlı (Enrichment-based) bir devre analizi sistemi oluşturulmuş ve meme kanseri oluşum ve gelişiminde rol oynayan devreler tespit edilmiştir.

2018, 132 sayfa

Anahtar kelimeler: Meme kanseri; miRNA; transkripsiyon faktörü; biyolojik devreler

ABSTRACT

PhD Thesis

The identification of *Transcription factor-miRNA-Target gene* circuits taking roles in the development and progression of breast cancer

Yasemin Oztemur Islakoglu

Ankara University Biotechnology Institute

Assoc. Prof. Dr. Bala Gur Dedeoglu

Breast cancer is a multifactorial and complex genetic disease and it is well studied in molecular level. Although many genes, miRNAs and other factors were identified that are taking roles in the development and progression of the disease there are still uncertainties about the exact mechanism taking roles in regulation of it. So it becomes inevitable to search for new biomarkers and regulatory networks that can predict the formation or prognosis of breast cancer. Transcription factors (TFs) and microRNAs (miRNAs) are key regulators for gene expression regulation. miRNAs are post-transcriptional regulatory elements while TFs are regulators at transcriptional level. Since the transcription of mRNAs and miRNAs are known to be regulated by TFs and TFs are the targets of miRNAs, these two mechanisms cannot be separated from each other. Therefore it is so important to characterize (by building networks and circuits) these regulatory mechanisms to reveal the biological processes in detail.

In this thesis an enrichment-based algorithm, which transforms the miRNA and mRNA expression data obtained from databases and literature was designed to identify TF-miRNA-target gene circuits dynamically. The algorithm was specifically applied to breast cancer data and TF-miRNA-target gene circuits that could be important in the development and the progression of breast cancer were investigated.

2018, 132 pages

Keywords: Breast cancer; miRNA; transcription factor; biological circuits

TEŞEKKÜR

Akademik danışmanım, yol göstericim, dostum ve ailemden biri olan Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu'na tez çalışmasıyla sınırlayamayacağım kadar çok şey için; öğrencisi olduğum her yeni gün bütün cömertliği ile bilgi, akıl, sevgi, saygı, enerji, sabır, emek verdiği için teşekkür ederim. Bir gün inisiyatif alabilen ve denemekten vazgeçmeyen bir araştırmacı, genç bir insanın hayatına dokunabilen bir eğitimci olabilirim en büyük mimarı kesinlikle sevgili hocamdır.

Sayın Hocam Prof. Dr. Hasan Oğul'a çalışma sisteminin tasarımıındaki büyük katkıları için, her takıldığım yerde büyük bir özveriyle zaman ayırdığı için, her zaman pozitif, yapıcı, problem çözücü ve yol gösterici olduğu için çok teşekkür ediyorum.

Dr. Öğr. Üyesi Esmâ Ergüner Özkoç'a kodun yazılmasındaki büyük desteği, gülen yüzü ve sabrı için çok teşekkür ederim.

Tez çalışması boyunca tez izleme komitesi üyeliğini yapan Doç. Dr. Erkan Yılmaz'a farklı bakış açısı ile yaptığı katkılar ve tavsiyeleri için teşekkür ediyorum.

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Ailesine beni sadece bir öğrenci olarak değil aileden biri gibi kucakladıkları için teşekkür ederim.

Sevgili grup arkadaşlarım, Ezel Çilek, Ayşegül Yücel Polat, Senem Noyan ve Alp Aydos'a uzun yıllar boyu tam anlamıyla yol arkadaşım oldukları için; akademik ve özellikle de manevi destekleri için teşekkür ederim. Hakınız ödenmez..

Doktora eğitim sürecimin bana kazandırdığı en özel insanlar olan Özge Cumaoğulları ve Gözde Yalçın'a sundukları mükemmel dostluk için teşekkür ederim.

Sevgili abim Mert, ablam Aslı Öztemur'a; Mine ve Ferhat Hacılibeyoğlu'na; annem Bahar Islakoğlu'na; bundan iki yıl önce genişleyen ve iyi ki genişleyen aileme her an yanımda hissettirdikleri için teşekkür ederim.

Annem Şaziye Öztemur, babam Yaşar Öztemur'a ve teyzem Aliye Kovulmaz'a sayelerinde koşulsuz sevilerek büyüme şansına sahip olduğum için sonsuz teşekkür ederim.

Sevgili kedi-oğlum İz'e *gurgurları* ile tez sürecinin pozitif enerjisi olduğu için teşekkür ederim.

Sevgili eşim Salih Deniz Islakoğlu'na doktoramın son yılında göçebe olarak devam ettirdiğim yaşantımdaki destek için, çalışmam konusundaki motivasyonu ve yardımları için ve en önemlisi her gün kendimizi geliştirerek güzelleştirdiğimiz hayat arkadaşlığı için teşekkür ederim.

Bilimin hayatlarında hep var olması dileği ile bu tez çalışması minik yeğenlerim

AYÇA ÖZTEMUR ve **ELA HACIALİBEYOğLU**'na adanmıştır.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
SEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. ÖKARYOTLARDA GEN İFADESİNİN DÜZENLENMESİ	3
2.1.1. TRANSKRİPSİYONEL DÜZENLENME	3
2.1.1.1. Transkripsiyon faktörü.....	3
2.1.1.2. Transkripsiyon faktörleri ile ilgili veritabanları.....	5
2.1.2. POST-TRANSKRİPSİYONEL DÜZENLENME.....	5
2.1.2.1. miRNA	5
2.1.2.1.1. miRNA Biyogenezi	6
2.1.2.1.2. miRNA'ların isimlendirilmesi.....	9
2.2. TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ-MİRNA-HEDEF GEN DEVRELERİ	10
2.3. BİYOLOJİK SÜREÇLERDE TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ-MİRNA-HEDEF GEN DEVRELERİNİN ARAŞTIRILDIĞI ÇALIŞMALAR.....	11

2.4. MEME KANSERİ.....	13
2.4.1. MEME KANSERİNİN SINIFLANDIRMASI	14
2.4.1.1. Meme Kanserinde Tümör Derecesi	15
2.4.2. MEME KANSERİ VE TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ-MİRNA-HEDEF GEN DEVRELERİ.....	16
<u>3. GEREKÇE VE AMAÇ.....</u>	18
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	19
4.1. MATERYAL	19
4.1.1. MİRNA MİKRODİZİN VERİLERİ	20
4.1.1.1. Meme Kanseri Oluşumunun Araştırılması İçin Kullanılan miRNA Verileri	20
4.1.1.2. Meme Kanseri Gelişiminin Araştırılması İçin Kullanılan miRNA Verileri.....	20
4.1.2. mRNA MİKRODİZİN VERİLERİ	21
4.1.2.1. Meme Kanseri Oluşumunun Araştırılması İçin Kullanılan mRNA Verileri	21
4.1.2.2. Meme Kanseri Gelişiminin Araştırılması İçin Kullanılan mRNA Verileri	21
4.2. YÖNTEM.....	23
4.2.1. MİKRODİZİN ÇALIŞMALARININ BULUNMASINA YÖNELİK LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	23
4.2.2. MİKRODİZİN VERİ ANALİZİ	25
4.2.3. miSEA VE GSEA ANALİZLERİ	25
4.2.4. MİRNA-GEN, TF-GEN, MİRNA-TF VE TF-MİRNA DÜZENLEYİCİ İLİŞKİLERİNİN LİTERATÜRDEN ELDE EDİLMESİ.....	27
4.2.5. MİRNA İSİMLENDİRME SORUNLARININ AŞILMASI.....	27
4.2.6. PROGRAM GELİŞTİRİLMESİ.....	28
4.2.6.1. Sistemin Fayda Analizi	30

5. ARAŞTIRMA BULGULARI..... 31

5.1. İFADESİ ANLAMLI OLARAK DEĞİŞEN miRNA, GEN VE TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ LİSTELERİ..... 31

5.1.1. İFADESİ ANLAMLI OLARAK DEĞİŞEN miRNA'LAR 31

5.1.1.1. Tümör Normal Örnekler Arasında İfadesi Anlamli Olarak Değişen miRNA'lar 31

5.1.1.2. Tümör Örneklerde Farklı Tümör Dereceleri Arasında İfadesi Anlamli Olarak Değişen miRNA'lar..... 32

5.1.2. İFADESİ ANLAMLI OLARAK DEĞİŞEN GENLER VE TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ 33

5.1.2.1. Tümör Normal Örnekler Arasında İfadesi Anlamli Olarak Değişen Genler ve TF'ler 33

5.1.2.2. Tümör Örneklerde Farklı Tümör Dereceleri Arasında İfadesi Anlamli Olarak Değişen Genler ve TF'ler 34

5.2. DEVRE ANALİZİ İÇİN KULLANILAN TF, miRNA VE mRNA LİSTELERİ .. 34

5.2.1. MEME KANSERİ OLUŞUMUNUN ARAŞTIRILMASI İÇİN KULLANILAN LİSTELER..... 34

5.2.2. MEME KANSERİ GELİŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI İÇİN KULLANILAN LİSTELER..... 35

5.3. GELİŞTİRİLEN PROGRAM İLE ELDE EDİLEN TF-MiRNA-HEDEF GEN DEVRELERİ 36

5.3.1. İKİLİ İLİŞKİLER 36

5.3.2. TF-MiRNA-HEDEF GEN ÜÇLÜ DEVRELERİ 37

5.3.2.1. Meme Kanseri Oluşumu İçin Önemli Olan Devreler 38

5.3.2.2. Meme Kanseri Gelişimi İçin Önemli Olan Devreler 42

5.3.2.3. Meme Kanseri Oluşum ve Gelişim Süreçlerinin Devreler Açısından Karşılaştırılması..... 50

5.4. SİSTEMİN FAYDA ANALİZİ SONUÇLARI.....	51
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>52</u>
6.1. TARTIŞMA	52
6.2. SONUÇ.....	57
<u>7. KAYNAKLAR</u>	<u>59</u>
<u>8. EKLER.....</u>	<u>71</u>
<u>9. ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>95</u>
<u>10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>96</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Transkripsiyon faktörü çeşitleri ve bağlanma şekilleri (3).....	4
Şekil 2.2. miRNA biyogenezinin basamaklarını gösteren şekil (18).	7
Şekil 2.3. miRNA'nın hedef mRNA'ların 3' UTR bölgesine bağlanması (28).	8
Şekil 2.4. Aynı kromozomdan sentezlenen miRNA küme (cluster) örnekleri (A) ve çekirdek (seed) bölgeleri aynı olan miRNA aile (family) örnekleri (B) (29).....	9
Şekil 2.5. miRBase veritabanının Mayıs 2018 tarihine ait güncel ekran görüntüsü (31)....	10
Şekil 2.6. <i>Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen</i> devresinin temsili gösterimi	11
Şekil 2.7. Amerikan Kanser Derneği istatistikleri sonucu 2017 yılındaki yeni vaka ve yaşam kaybı sayıları ve oranlarını gösteren grafik (57).	14
Şekil 2.8. Memenin anatomisi ve kanserin geliştiği yapılar (59).	15
Şekil 4.1. Meme kanseri oluşum ve gelişiminde önemli aktif düzenleyici devrelerin belirlenmesi için geliştirilen sistemin mimarisi (Algoritma).....	23
Şekil 4.2. Literatür araştırması için GEO veritabanında örnek bir arama işlemini gösteren ekran görüntüsü.	24
Şekil 4.3. Literatür araştırması için ArrayExpress veritabanında örnek bir arama işlemini gösteren ekran görüntüsü.....	24
Şekil 4.4. GSEA analiz aracında yapılan örnek bir analize ait ekran görüntüsü.....	26
Şekil 4.5. MIRTarBase veritabanından miRNA-gen ve miRNA-TF ikili ilişkilerini içeren dosyaya erişimi gösteren ekran görüntüsü.....	27
Şekil 4.6. miRNAmeConverter kullanılarak miRNA isimlendirmesinin istenilen versiyona göre ayarlanmasını gösteren örnek ekran görüntüsü. hsa-miR-1 isimli miRNA, 21. miRBase versiyonuna göre artık hsa-miR-3p olarak isimlendirilmektedir.	28

Şekil 4.7. Sistem basamaklarını gösteren şema. 1. kod bölümü lokal ikililerin ve global ikililerin kesiştirildiği ve aktif motiflerin bulunduğu basamağı, 2 kod bölümü ise üçlü devrelerin tespit edildiği basmağı temsil etmektedir. Kodun iki basamağından da sonuç listeleri elde edilmiştir.	29
Şekil 4.8. Dev C ++ geliştirme ortamında kodun yazılmasına ve çalıştırılmasına ait örnek ekran görüntüsü.	30
Şekil 5.1. GSE45666 ve GSE32922 kodlu çalışmaların analizinden elde edilen DE listelerin karşılaştırılmasını gösteren venn şeması. İki liste arasında 7 miRNA ortaktır. ...	32
Şekil 5.2. GSE26666, GSE40267, GSE40525 ve GSE59247 kodlu çalışmaların analizinden elde edilen DE listelerin karşılaştırılmasını gösteren venn şeması. Listelerdeki tekrarlar elendiğinde 159 bağımsız miRNA elde edilmiştir.	33
Şekil 5.3. Program sonucunda elde edilen üçlü devre çeşitleri. 1. tip devrede miRNA-TF arasındaki ilişki tek yönlüken 2. tip devre çeşidinde bu ilişki karşılıklı olmaktadır.	37
Şekil 5.4. 2. Tip devrelerinin meme kanserinin oluşum ve gelişim süreçleri açısından karşılaştırılmasına ait venn şeması. 11 tane devrenin meme kanseri oluşumu için, 162 tane devrenin ise meme kanseri gelişimi için önemli olduğu görülmektedir.....	50
Şekil 8.1. Çalışmalardan ayrı ayrı elde edilen DE (ifadesi anlamlı olarak değişen) miRNA listeleri ve tekrarların elenmiş olduğu son miRNA listelerinin bulunduğu Excel tablosuna ait ekran görüntüsü.	87
Şekil 8.2. Çalışmalardan ayrı ayrı elde edilen DE (ifadesi anlamlı olarak değişen) gen listeleri ve tekrarların elenmiş olduğu son gen listelerinin bulunduğu Excel tablosuna ait ekran görüntüsü.	88
Şekil 8.3. Çalışmalardan ayrı ayrı elde edilen DE (ifadesi anlamlı olarak değişen) TF listeleri ve tekrarların elenmiş olduğu son TF listelerinin bulunduğu Excel tablosuna ait ekran görüntüsü.	89
Şekil 8.4. miSEA ve GSEA analizleri sonucunda elde edilen ekstra miRNA ve TF listelerinin bulunduğu Excel tablosuna ait ekran görüntüsü.....	90

Şekil 8.5. DE listeler ile miSEA ve GSEA analizleri sonucunda elde edilen ekstra miRNA ve TF listelerinin birleştirilmesi ve tekrarların elenmesi ile edilen listelerin bulunduğu Excel tablosuna ait ekran görüntüsü. Bu listeler kod için girdi olarak kullanılan miRNA, TF ve gen listeleridir.	91
Şekil 8.6. Meme kanseri oluşum ve gelişiminde aktif ikili motif listelerinin bulunduğu Excel tablosuna ait ekran görüntüsü.	92
Şekil 8.7. Meme kanseri oluşum ve gelişimi için önemli olan 1. tip üçlü devre listelerini içeren Excel tablosuna ait ekran görüntüsü.	93
Şekil 8.8. Sistemin fayda analizi sonucunda elde edilen listelerin olduğu Excel tablosuna ait ekran görüntüsü.	94

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Literatür araştırması sonucunda meme kanserinin oluşumunun araştırılması için seçilen meme kanseri miRNA/mRNA mikrodizin çalışmalarının veri tipi, deneyin gerçekleştirildiği platform, erişim kodu ve örnek sayısı bilgileri.....	19
Çizelge 4.2. Literatür araştırması sonucunda meme kanseri gelişiminin araştırılması için seçilen meme kanseri miRNA/mRNA mikrodizin çalışmalarının veri tipi, deneyin gerçekleştirildiği platform, erişim kodu ve örnek sayısı bilgileri (TD; Tümör Derecesi)...	20
Çizelge 5.1. DE analizleri, GSEA/miSEA analizleri ve analiz sonuçlarının bir araya koyulması ile elde edilen miRNA, TF ve gen sayılarını gösteren çizelge.	36
Çizelge 5.2. Meme kanseri oluşumunda ve gelişiminde rol oynayan aktif ikili motif sayıları.	37
Çizelge 5.3. Meme kanseri oluşumu için önemli 2. tip üçlü devre listesi ve listedeki miRNA'ların aile ve/veya küme bilgileri.	38
Çizelge 5.4. Meme kanseri gelişimi için önemli üçlü devre listesi ve listedeki miRNA'ların aile ve/veya küme bilgileri.	42

SİMGELER DİZİNİ

TF	Transkripsiyon Faktörü
UTR	Untranslated Region/ Translasyonu yapılmayan bölge
CDS	Coding Sequence/ Translasyonu yapılan dizi
miRNA	mikroRNA
DNA	Deoksiribo nükleik asit
RNA	Ribo nükleik asit
DE	Differentially Expressed/ İfadesi farklılık gösteren
ANOVA	Analysis of variance/ Varyans analizi
TD	Tümör derecesi/ Grade
miSEA	microRNA Set Enrichment Analysis/ miRNA zenginleştirme analizi
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis/ Gen zenginleştirme analizi

1. GİRİŞ

Gen ifadesinin düzenlenmesi (regülasyonu) hücredeki biyolojik süreçlerin kontrolü için önemli bir mekanizmadır. Transkripsiyonel düzeyde bu görevi yerine getiren düzenleyiciler transkripsiyon faktörleri (TF) iken post-transkripsiyonel düzeyde bu görevi miRNA'lar üstlenmektedir. TF'ler hedefledikleri genlerin spesifik bölgelerine bağlanarak genin ifadesinde artış ya da azalışa sebep olurlar ve transkripsiyonel düzenleyici ağlar oluşturarak hücrede gen ifadesini global olarak düzenleyebilirler. miRNA'lar düzenleyici rollerini hedeflerinin 3'-UTR bölgelerine (bazı durumlarda 5'-UTR, promotor veya CDS bölgeleri de olabilir) bağlanarak mRNA degradasyonu ya da translasyonel baskılama yolu ile gösterirler. mRNA ve miRNA'ların transkripsiyonlarının TF'ler tarafından kontrol edildiği ve TF'lerin ifadelerinin de miRNA'lar tarafından düzenlendiği göz önüne alındığında sürecin varsayılan birebir ilişkilerin ötesinde olduğu açıktır. Hücrede gerçekleşen bu kombinasyonel düzenleyici mekanizmaların karakterize edilmesi (ağlar ve devreler kurgulayarak) ve açığa çıkartılması, hücresel süreçlerin daha iyi anlaşılabilmesi için önem kazanmıştır.

Bu tez çalışmasında araştırmacıların kendi verilerini zenginleştirerek entegre edebilecekleri bir devre analizi programı ve çalışma sistemi geliştirilmiştir. Bu sistem veritabanlarından elde edilen meme kanseri verilerine uygulanarak meme kanserinin oluşumunda ve gelişiminde rol oynayan *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* devreleri tespit edilmiştir.

Tez çalışmasında yapılan işler aşağıdaki gibidir;

1. Meme kanseri miRNA ve gen ifade mikrodizin çalışmalarının bulunmasına yönelik literatür araştırması
2. Mikrodizin verilerinin biyoinformatik analizinin gerçekleştirilmesi ve iki grup arasında ifadesi farklılık gösteren (DE) miRNA'ların, genlerin ve TF'lerin belirlenmesi
3. DE listelerine ek olarak ve bu listelere özgü düzenleyici olabilecek ek listelerin belirlenmesi için miSEA ve GSEA analizlerinin gerçekleştirilmesi; zenginleştirme çalışması

4. miRNA-gen, TF-gen, miRNA-TF ve TF-miRNA düzenleyici ilişkilerinin literatürden elde edilmesi (Global ağ analizi)
5. miRNA isimlendirme sorunlarının aşılması
6. *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* devrelerini ortaya çıkartmak amacı ile program geliştirilmesi
7. Geliştirilen programın verilere uygulanması
8. Meme kanseri oluşum ve gelişiminde aktif ikili motiflerin (miRNA-Gen, miRNA-TF, TF-miRNA, TF-Gen) belirlenmesi (Lokal ağ analizi)
9. Meme kanseri oluşum ve gelişiminde rol alan aktif düzenleyici *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* devrelerinin belirlenmesi



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. ÖKARYOTLARDA GEN İFADESİNİN DÜZENLENMESİ

İnsan genomu tahminen 20,000–25,000 protein-kodlayıcı gen içermektedir ancak her an ve her hücrede bu genlerin hepsi aktif olarak ifade edilmemektedir. Genlerin hangilerinin ne zaman ifade edileceği biyolojik süreçlerin düzgün işlemesi için çok önemlidir ve bu mekanizma “gen ifadesinin düzenlenmesi” olarak adlandırılmaktadır. Örneğin kas ya da sinir doku hücreleri gibi oldukça özelleşmiş hücreler kendi genlerinin yalnız çok küçük bir bölümünü ifade ederler (1). Gen ifadesinin kontrolü genden proteine giden yoldaki her basamakta olabilir ancak düzenlemenin genel olarak transkripsiyon aşamasında (transkripsiyonel düzenlenme) ya da transkripsiyon sonrasında (post-transkripsiyonel düzenlenme) olduğu söylenebilir.

2.1.1. TRANSKRİPSİYONEL DÜZENLENME

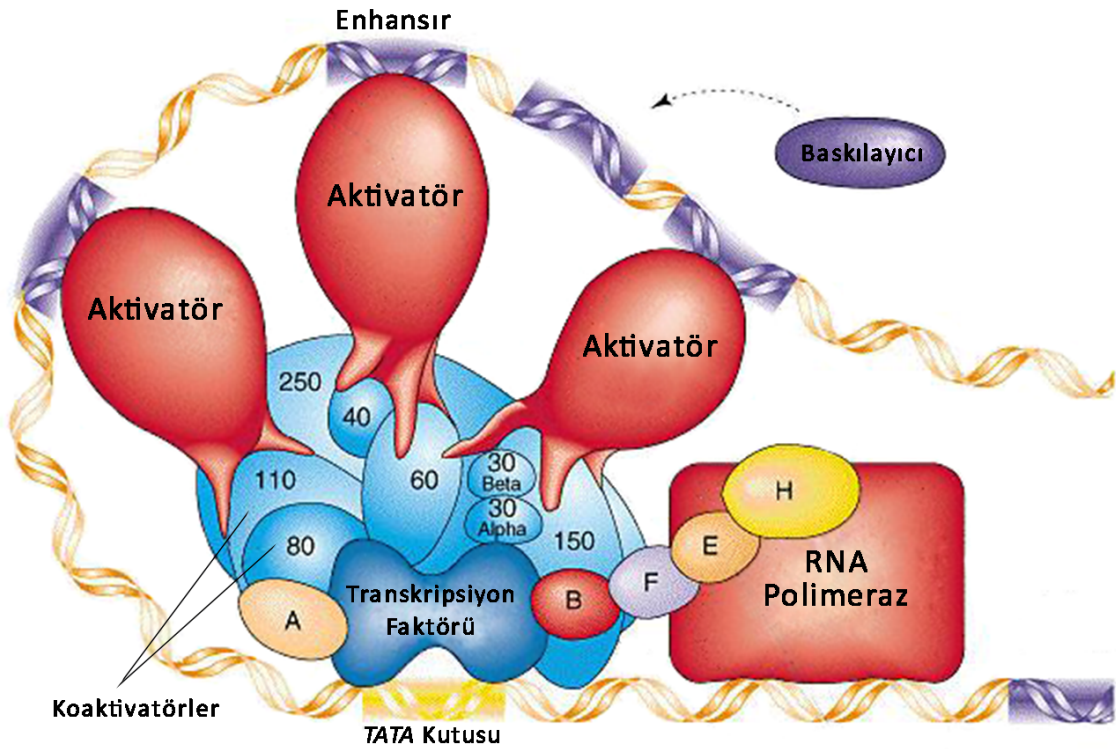
Kromatin yoğunluk seviyesi, DNA metilasyonu, histon asetilasyonu gibi mekanizmaların varlığının yanında transkripsiyon sırasındaki düzenlemenin asıl elemanları transkripsiyon faktörleridir.

2.1.1.1. Transkripsiyon faktörü

Uzun zamandır önemi ve görevi bilinen transkripsiyon faktörleri (TF) transkripsiyon basamağındaki ana düzenleyici elemanlardır ve TF’ler görevlerini hedef genlerinin önündeki (upstream) promotor bölgelerine ya da enhansır bölgelerindeki spesifik DNA dizilerine bağlanarak gerçekleştirmektedir (2). Transkripsiyon faktörleri trans-acting faktörler olarak adlandırılırken bu spesifik proteinlerin bağlandığı promotor ve enhansır gibi DNA kısımları ise cis-acting faktörler olarak adlandırılmaktadır.

Transkripsiyon faktörleri genelde kompleksler içerisinde görev yaparlar. Transkripsiyonu gerçekleştirecek olan RNA polimeraz transkripsiyonu yalnız başına başlatamaz, bu işlem için TF’lere bağımlıdır. TF bağlanma bölgesini tanıyarak bağlanır (DNA-bağlanma bölgesi ile) ve diğer TF’leri çağırarak kompleks oluşturur (protein bağlanma bölgesi ile), bu kompleks ise transkripsiyonu gerçekleştirecek enzim olan RNA polimerazın bağlanmasını sağlar. TF’leri genel TF’ler, aktivatörler ve koaktivatörler olarak 3 kategoride

sınıflandırmak mümkündür. Genel TF'ler promotordaki TATA kutularına bağlanarak RNA polimerazın bağlanabilmesini sağlar fakat bu ancak transkripsiyonun başlaması ve düşük seviyede devam etmesi için yeterlidir. Ökaryotlarda yüksek seviyede seyreden transkripsiyon işlemine ihtiyaç duyulmaktadır ve bu da aktivatör ve koaktivatör olarak adlandırılan diğer TF'lerin görev yapması ile mümkün olmaktadır. Aktivatörler RNA polimeraz-promotor etkileşimini arttırarak transkripsiyon başlatıcı kompleks oluşumunu destekler ve enhansır olarak adlandırılan DNA bölgelerine bağlanarak transkripsiyonun hızını etkiler. Koregülatörler ise aktivatörlerin görevini protein-protein ilişkisi kurarak yapan TF'lerdir. Bunların yanında baskılayıcı (repressor) olarak görev yapan 4. tip transkripsiyon faktörleri de vardır. Baskılayıcı TF'ler aktivatörün bağlanmasını engelleyerek, aktivatörün bağlanma bölgesine kendisi bağlanarak ve genel TF ve aktivatörlerin promotora ulaşmasını engelleyecek şekilde kromatin yapısını değiştirerek transkripsiyonu durdurur (Şekil 2.1) (1,2).



Şekil 2.1. Transkripsiyon faktörü çeşitleri ve bağlanma şekilleri (3).

2.1.1.2. Transkripsiyon faktörleri ile ilgili veritabanları

Transkripsiyon faktörleri ile ilgili birçok veritabanı bulunmaktadır. Bunlardan bazıları (ör: TRANSFAC, DBD, TFSEARCH) eldeki dizi bilgisi ile transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin (TFBS) tespit edilmesine yöneliktir. Bazıları metin olarak TF isminin girilmesiyle bu TF'nin hangi genle ya da hangi miRNA ile ilişkili olduğu bilgisini vermektedir (ör: MIRTFnet, TransmiR) (4,5). Bir kısmı da mevcut genlerin hangilerinin TF olduğunun bilgisine erişmeyi sağlamaktadır (ör: AnimalTFDB) (6–9) . Türler gere TF'lerin depolandığı veritabanlarından biri olan AnimalTFDB 2.0'dan elde edilen listede insanda tanımlanmış 1691 TF bulunmaktadır (10).

2.1.2. POST-TRANSKRİPSİYONEL DÜZENLENME

DNA'nın mRNA'ya çevrilmesinden sonra bu mRNA'ların ne kadarının proteine dönüşeceği de bazı düzenleme mekanizmaları tarafından belirlenir. Bir hücre transkripsiyondan sonra çalışan bu düzenleyici mekanizmaları kullanarak kendi transkripsiyon tarzını değiştirmeksizin çevresel değişikliklere yanıt olarak gen ifadesi üzerinde hızlı ve ince bir ayar yapabilir (1).

Post-transkripsiyonel düzenleme transkripsiyon ile translasyon aşamaları arasındaki alternatif uç birleştirme (splicing), RNA düzenlenmesi, kodlanmayan RNA'lar (ör: miRNA) gibi mekanizmaların hepsini içerir. Hücredeki varlığı 90'lı yıllara kadar bilinmeyen miRNA'lar bu aşamadaki en önemli düzenleyici elemanlardır (11).

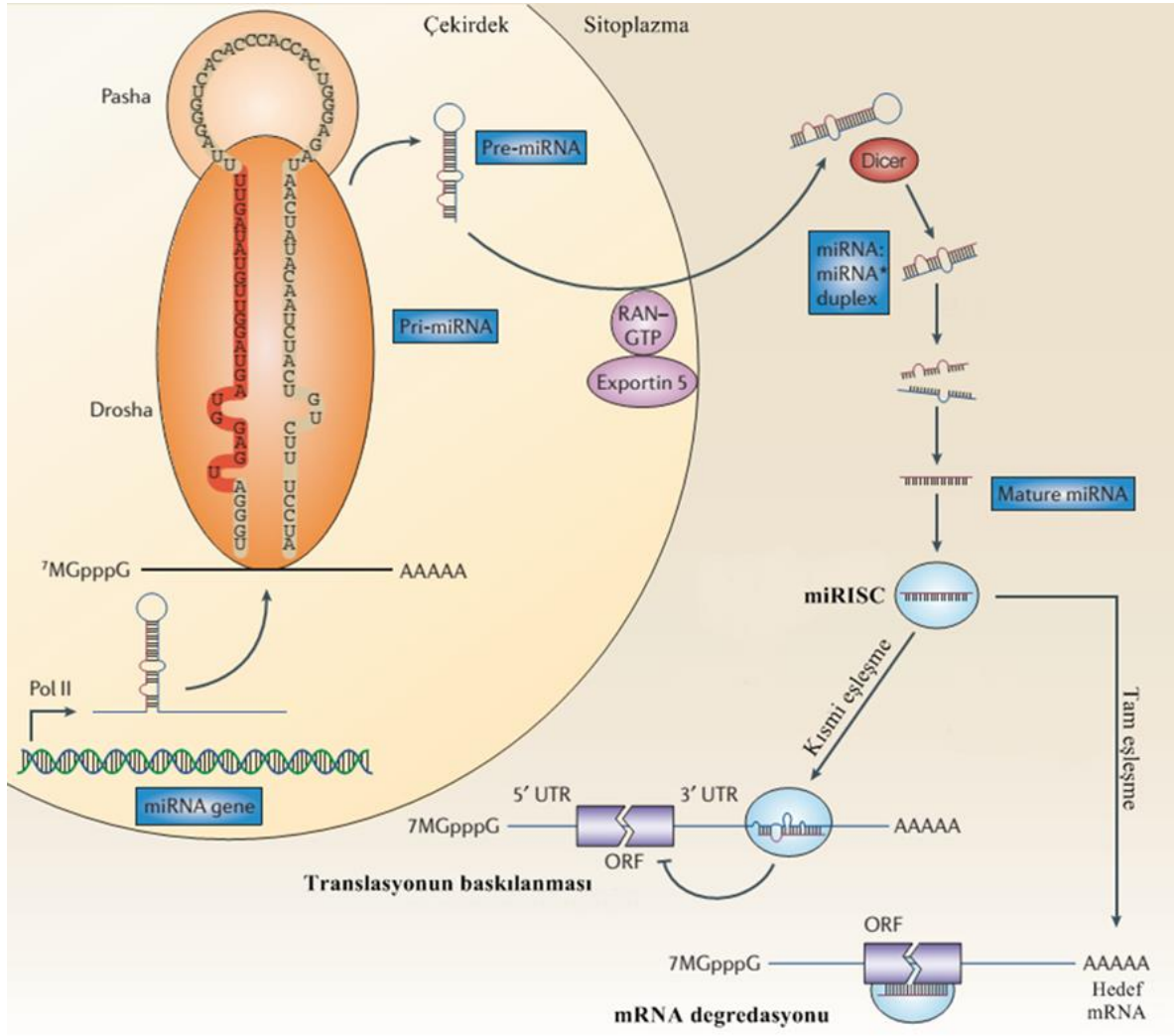
2.1.2.1. miRNA

mikroRNA'lar (miRNA'lar) küçük, evrimsel olarak korunan, yaklaşık 18-25 nükleotid uzunluğunda kodlanmayan RNA'lardır. miRNA'ların varlığına ilişkin ilk veriler 90'lı yılların ortasında ortaya konulmaya başlanmıştır (12,13). İlk olarak Ambros ve ekibi ve başka bir laboratuvar da Ruvkun ve ekibi tarafından *Ceanorhabditis elegans* adlı nematoda keşfedilmiştir ve fonksiyonu ortaya çıkartılmıştır. İki ekibin verilerini bir araya getirmesiyle larval dönemde önemli olan lin-4 geninin protein kodlamadığını ancak 22 nükleotidlik küçük bir RNA ürünü ortaya çıkardığını ve bu ürünün lin-14 geninin ifadesini baskıladığını tespit etmişlerdir (12,14). 2000 yılında ise *Ceanorhabditis elegans*'ın gelişimsel zamanlamasını kontrol eden genlerden biri olan let-7'nin yaklaşık 22

nükleotidlik bir RNA kodladığı ve larval gelişimde etkili olan lin-41 geninin 3'UTR bölgesindeki iki farklı bölgeye komplementer olduğu gözlenmiştir (15). Daha sonra yapılan çalışmalarda let-7 geninin insanı da içeren farklı türler arasında korunduğı anlaşılmış ve miRNA'ların diğ er organizmalarda da önemli olabileceğı ortaya çıkmıştır (16).

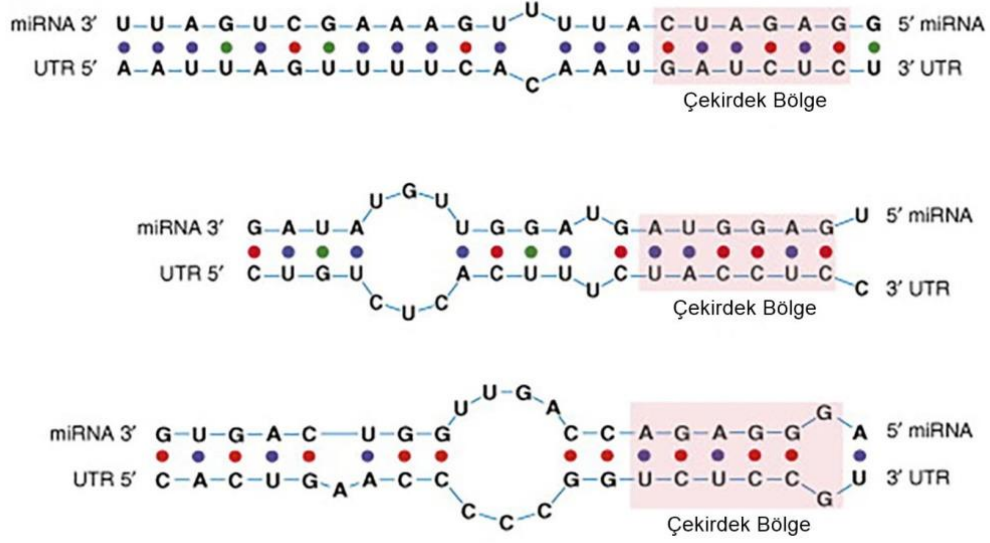
2.1.2.1.1. miRNA Biyogenezi

miRNA'lar RNA polimeraz II tarafından pri-miRNA olarak adlandırılan primer transkriptler halinde çekirdekte sentezlenirler. Bu transkriptler birden fazla miRNA içerebilirler. Pri-miRNA 5' ş apka (cap) ve 3' poli A kuyruğuna sahip sap-ilmik (hairpin) yapısındadır. Daha sonra pri-miRNA bir nükleaz olan Drosha ve çift iplikli RNA bağlayıcı kofakt  r  Pasha (DGCR8) (mikroişlemci kompleks) tarafından pre-miRNA'ya d  n şt r l r (17,18). Pre-miRNA bir nükleer taşıma reseptörü olan Exportin 5 (XPO5) ile RAN- GTP'ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınır (19). pre-miRNA'lar sitoplazmada Dicer adlı endonükleaz ile sap-ilmik yapısından kurtularak çift zincirli miRNA: miRNA dupleksine çevrilir (20). Dicer enzimi eş zamanlı olarak RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu başlatır (21). miRNA:miRNA dupleksinden genelde 5' ucu daha kararlı olanı seçilip RISC kompleksine dahil olur (kılavuz iplik). Diğ er iplik, yolcu iplik olarak adlandırılır ve RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir (Şekil 2.2). Hangi zincirin olgun miRNA olacak şekilde seçildiğı henüz tam olarak açıklanamamış bir durumdur ancak bu seçimde en önemli durumun termodinamik etkileşimler olduğı düşünülmektedir (22). Uzun zaman stabil olan 5' ucun olgun miRNA olarak seçildiğı, diğ er zincirin yıkıldığı d ş n lm ş t r (23) ancak yapılan çalışmalar miRNA* olarak ifade edilen 3' yapının her zaman yıkılmadığını ortaya koymuştur (24).



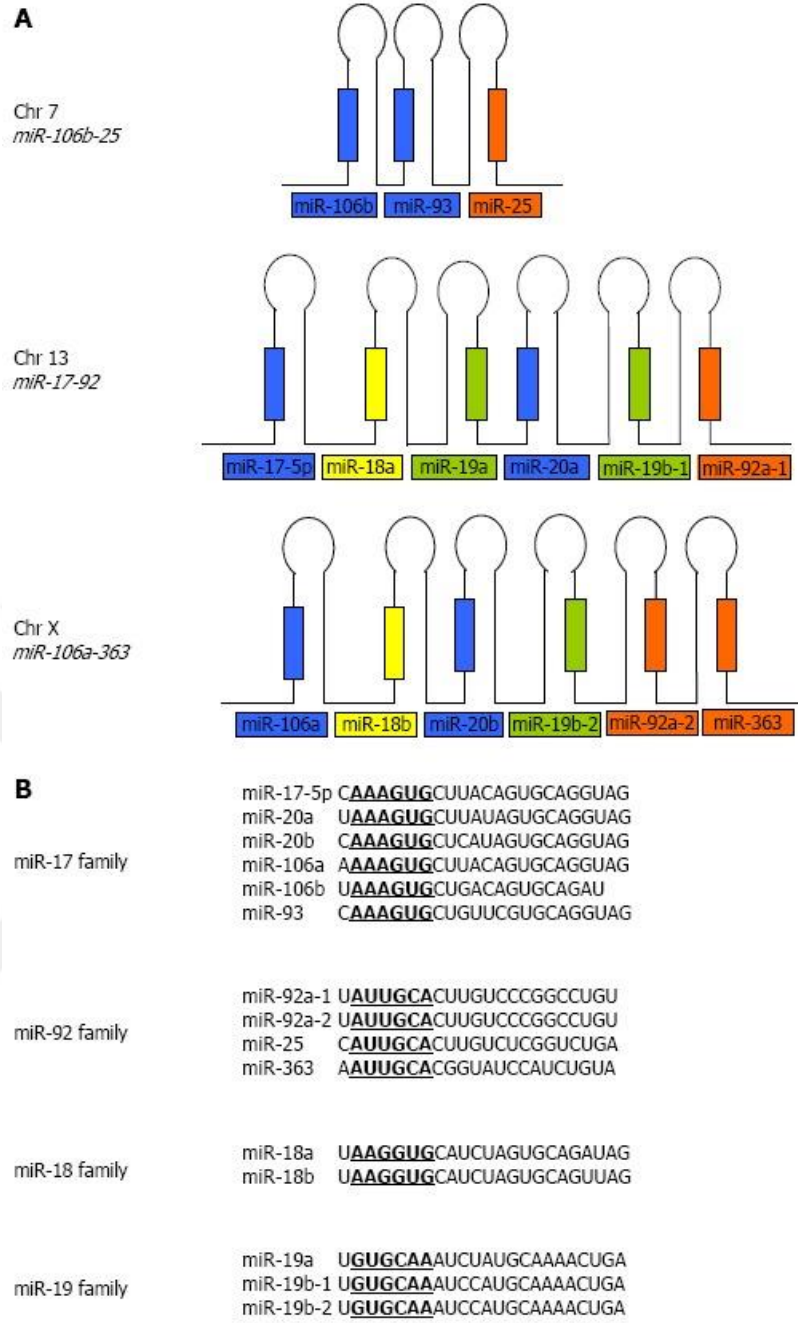
Şekil 2.2. miRNA biyogenezinin basamaklarını gösteren şekil (18).

miRNA'lar RISC kompleksine dahil olduktan sonra etkinliklerini mRNA degradasyonu ya da translasyonel baskılama olmak üzere iki şekilde gösterirler (25,26). 2010 yılına kadar yapılan çalışmalar miRNA'ların daha çok proteine olan etkisi (translasyonel baskılama) üzerinde dururken, 2010 yılında yapılan çalışmada Guo ve arkadaşları miRNA'ların etkisinin çoğunlukla ($\geq 84\%$) mRNA yıkımı (mRNA degradasyonu) ile olacağını öne sürmüş ve miRNA'ların öncelikli hedeflerinin mRNA'lar olduğuna dikkat çekmiştir (27). Bu nedenle miRNA'ların hedef genleri ile ilişkisinin araştırılması hastalıkların teşhis ve tedavisine giden yolda büyük önem taşımaktadır. miRNA'nın 2-8 numaralı nükleotidleri arasındaki bölge çekirdek (seed) bölge olarak adlandırılmaktadır. Bu bölge mRNA ile bağlantının birebir olduğu, biyoinformatik olarak miRNA hedef tahminlerinin yapılmasını sağlayan bölgedir (Şekil 2.3) (28).



Şekil 2.3. miRNA'nın hedef mRNA'ların 3' UTR bölgesine bağlanması (28).

miRNA genleri proteine kodlanmayan transkripsiyon birimlerinde veya protein kodlayan genlerin intronlarında bulunabilir. miRNA'lar bağımsız genlerden teker teker ya da kümeler (cluster) halinde transkribe olabilirler (Şekil 2.4). Bütün miRNA'ların yaklaşık %30'u polisistronik kümelerden yani tek bir birincil transkriptten üretilen miRNA'lardan oluşmaktadır. Bu kümeler içindeki ayrı çekirdek bölgelerine sahip miRNA'lar farklı gen grupları ile ilişki içindedir ancak bu farklı miRNA'ların birlikte sentezlenmesi ortak biyolojik işlevleri paylaşarak paylaşımadıkları sorusunu doğurmaktadır. miRNA aileleri ise farklı genlerden ve kromozom bölgelerinden transkripsiyonu gerçekleştirebilen ancak çekirdek (seed) bölgeleri çok benzer ya da aynı olan üyelerden oluşmaktadır, bunun sonucunda da aynı aile üyeleri çok benzer genleri hedef olarak seçmektedir (29,30).



Şekil 2.4. Aynı kromozomdan sentezlenen miRNA küme (cluster) örnekleri (A) ve çekirdek (seed) bölgeleri aynı olan miRNA aile (family) örnekleri (B) (29).

2.1.2.1.2. miRNA'ların isimlendirilmesi

miRNA ile ilgili bilgilere herkesin doğru ve güncel bir şekilde erişilebilmesi amacıyla “miRBASE” veritabanı oluşturulmuştur. Bu halka açık veritabanının ilk versiyonu (1.0) 2002 yılının Aralık ayında yayımlanmış olup 218 tane girdi içermektedir. 2014 yılının Haziran ayında genel olarak güncellenmiş ve 21. sürümü yayımlanmıştır (28645). Son

olarak ise uzun bir aradan sonra tekrar güncellenmiş ve 38589 girdi ile Mart 2018 tarihinde 22. sürüme geçilmiştir (Şekil 2.5) (31,32).

miRBase

Home Search Browse Help Download Blog Submit

Latest miRBase blog posts

miRBase 22 release
After repeated and unreasonable delay, miRBase 22 is finally released. As you might expect with such a long gap, the number of sequences in the database has jumped significantly — by over a third. The vast majority of the increase comes from new microRNA annotations in species not previously represented in the database. Indeed, there [...] *By sam (March 12, 2018)*

High confidence miRNA set available for miRBase 21
As mentioned previously, we briefly held off from releasing the set of "high confidence" miRNAs for miRBase 21, because of a last-gasp bug. Those data are now available, tagged with the label "high confidence" on the entry pages, and for download on the FTP site. The total number of miRNAs labelled "high confidence" has increased [...] *By sam (July 3, 2014)*

miRBase: the microRNA database

miRBase provides the following services:

- The [miRBase database](#) is a searchable database of published miRNA sequences and annotation. Each entry in the miRBase Sequence database represents a predicted hairpin portion of a miRNA transcript (termed *mir* in the database), with information on the location and sequence of the mature miRNA sequence (termed *miR*). Both hairpin and mature sequences are available for [searching](#) and [browsing](#), and entries can also be retrieved by name, keyword, references and annotation. All sequence and annotation data are also [available for download](#).
- The [miRBase Registry](#) provides miRNA gene hunters with unique names for novel miRNA genes prior to publication of results. Visit the [help pages](#) for more information about the naming service.

To receive email notification of data updates and feature changes please subscribe to the [miRBase announcements mailing list](#). Any queries about the website or naming service should be directed at mirbase@manchester.ac.uk.

miRBase is managed by the [Griffiths-Jones lab](#) at the [Faculty of Biology, Medicine and Health, University of Manchester](#) with funding from the [BBSRC](#). miRBase was previously hosted and supported by the [Wellcome Trust Sanger Institute](#).

References

If you make use of the data presented here, please cite the following articles in addition to the primary data sources:

[miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data.](#)
Kozomara A, Griffiths-Jones S.
NAR 2014 42:D68-D73

[miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data.](#)
Kozomara A, Griffiths-Jones S.
NAR 2011 39:D152-D157

miRNA count: 38589 entries
Release 22: March 2018

Search by miRNA name or keyword
Go Example

Download published miRNA data
Download page | FTP site

Şekil 2.5. miRBase veritabanının Mayıs 2018 tarihine ait güncel ekran görüntüsü (31).

miRNA'lar isimlendirilirken tür isimleri kısaltma ile ismin en önünde yer alır. Örnek olarak insan için (*homo sapiens*) "*hsa*" kısaltması kullanılır. "*hsa-miR-21*" örneğinde olduğu gibi "*miR*" kısaltmasının kullanılması, olgun bir miRNA olduğunu belirtmektedir. (33,34). *miR*" ile simgelenen olgun miRNA, pre-mir adı verilen, sap-ilmik yapısına sahip öncül dizi üzerinden oluşturulmuştur.

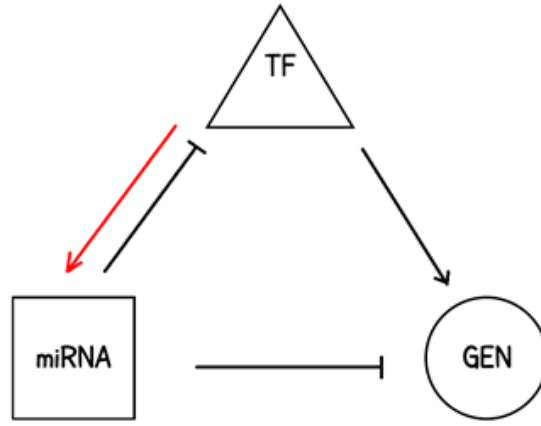
Yukarıda detaylı olarak anlatıldığı gibi miRNA* olarak isimlendirilen yapının her zaman yıkılmadığının ortaya çıkartılması (24) nedeni ile miRNA-miRNA* isimlendirme sistemi Nisan 2011'de yayımlanan 17. miRBASE sürümünde değiştirilmiştir. Yeni sistemde miRNA isimlerinin sonuna pre-miRNA'nın hangi koluna (3' veya 5') ait olduğuna göre -3p ve -5p getirilmeye başlanmıştır. Literatürde daha önce kayıt edilmiş olan her miRNA için bu değişikliğin yapılması mümkün olmadığı için isimlendirme kaynaklı çeşitli karışıklıklar mevcut olabilmektedir (32).

2.2. TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ-MİRNA-HEDEF GEN DEVRELERİ

Transkripsiyon faktörleri gen ifadesinin düzenlenmesini transkripsiyon seviyesinde ve ifadenin artması veya azalması şeklinde yaparken, miRNA'lar post-transkripsiyonel basamakta ve ifadenin azaltılması şeklinde gerçekleştirmektedir. Bir miRNA farklı

hedefleri seçebilir veya bir mRNA birden fazla miRNA tarafından düzenlenebilir ve buna ek olarak TF'lerin etkisi düşünüldüğünde düzenlemenin birebir bir ilişkinin ötesinde karmaşık bir yapısı olduğu açıktır. miRNA'ların da transkripsiyon sonucu oluştuğu, TF'ler gibi hedeflediği genlerin regülasyonunda etkin olduğu ve bir genin ifadesinin düzenlenmesinin tek bir faktöre bağlı olmadığı düşünülürse;

- Bir miRNA'nın ifadesi bir transkripsiyon faktörü ile düzenleniyor olabilir,
- Bir transkripsiyon faktörünün ifadesi de bir miRNA tarafından düzenleniyor olabilir,
- Aynı şekilde transkripsiyon faktörü ve miRNA bir arada hedef genlerin ifadesini düzenliyor olabilir (Şekil 2.6)



Şekil 2.6. *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* devresinin temsili gösterimi

2.3. BİYOLOJİK SÜREÇLERDE TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ-MİRNA-HEDEF GEN DEVRELERİNİN ARAŞTIRILDIĞI ÇALIŞMALAR

Gen ifadesinin düzenlenmesindeki karmaşıklık pek çok veri kaynağını bir araya getirme yollarının aranmasında neden olmuştur. Son yıllarda artmakta olan çalışmalarda birçok araştırmacı transkripsiyon faktörleri, miRNA'lar ve bu elemanların arasındaki ilişkinin transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası aşamadaki görevleri üzerinde çalışmaktadır. Chen ve arkadaşları 2011 yılında yaptıkları çalışmada TF ve miRNA ilişkisinin biyolojik süreçlerdeki önemi ve bu faktörler arasındaki koordinasyon bozukluğunun kansere sebep olabileceği üzerinde durmuştur (35). Yine son yıllarda gündemde olan sistem biyolojisi

yaklaşımları ile dinamik biyolojik süreçlerin bütün halinde düşünülmesi sonucunda *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* ilişkilerinin belirlenmesi için çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Bu çalışmalar daha çok biyoinformatik ve istatistiksel yöntemlerin kullanılması ve/veya geliştirilmesi ile var olan bilgilerin bir araya getirilmesini amaçlamıştır.

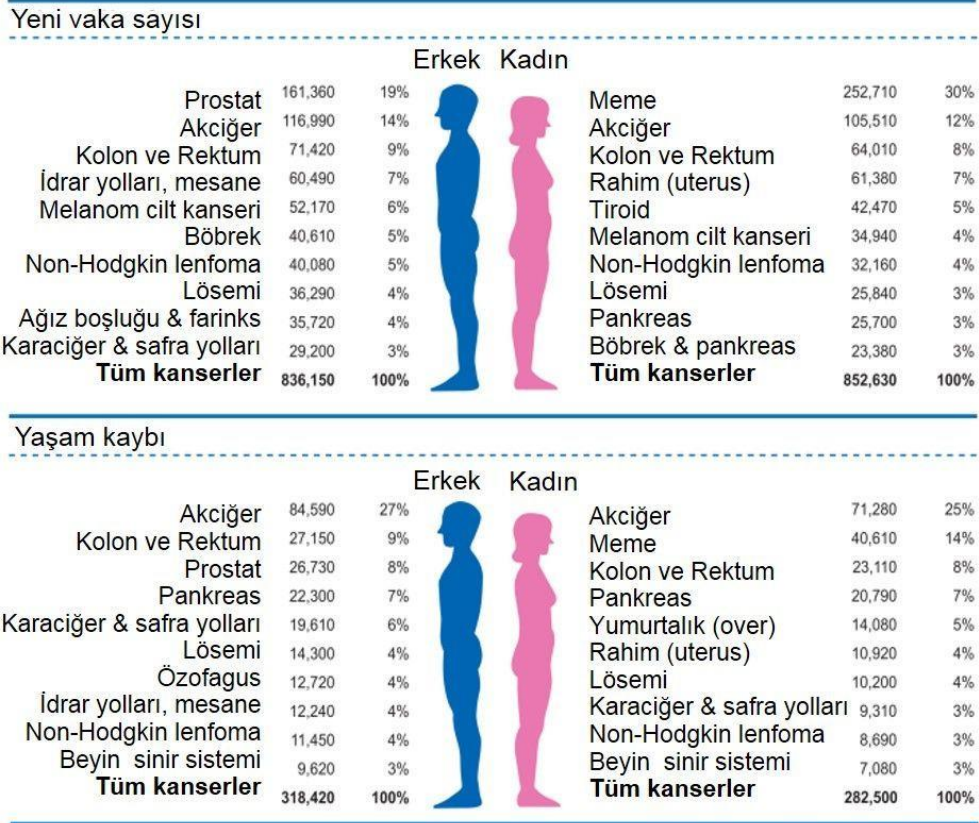
2010 yılında Tran ve arkadaşları kendi geliştirdikleri algoritma ile insandaki önemli *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* devrelerini tespit etmeye çalışmış ve bu modüllerin organ morfogenezi, organ gelişimi, transkripsiyon gibi önemli biyolojik süreçlerde görev yaptığına işaret etmişlerdir. Guo ve arkadaşları ise şizofrenide EGR3-hsa-miR-195 ikilisinin anahtar düzenleyici olduğunu belirtmişlerdir (36,37). Aynı yıl CircuitsDB isimli insan ve fareye spesifik devrelerin bulunduğu veritabanı erişime açılmıştır (38). Daha sonra yapılan iki çalışmada *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* listelerini alarak aralarındaki ilişkiyi görsel ağlara dönüştüren MIR@NT@N ve MIRTfnet isimli web araçları geliştirilmiştir (4,39). mRNA-miRNA ilişkilerini ağlara dönüştürmek amacıyla tasarlanmış diğer web araçları, mirConnX ve MAGIA² ise yine 2011 ve 2012 yıllarında kullanıma sunulmuştur (40,41). Li ve arkadaşları 2013 yılında yaptıkları çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) literatür bilgisini bir araya koyarak miRNA-gen, miRNA-TF, TF-gen, TF- miRNA ilişkilerini belirlemiş ve miR-17 ailesi-E2F1-RB1 devresinin bu kanser tipinin oluşum ve gelişimindeki potansiyel düzenleyici rolü üzerinde durmuştur (42). Yine 2013 yılında yapılan ve devrelerin tespitinde arama algoritmalarının kullanıldığı çalışmada ise alzheimer hastalığının ilerlemesinde hsa-miR-146a-STAT1-MYC devresinin önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (43). 2014 yılında prostat kanserinde yapılan çalışmaya spesifik IntegraMiR isimli bir program geliştirilmiş ve hastalığa spesifik devreler belirlenmiştir (44).

Literatürde miRNA-TF ilişkilerini analiz etmek üzere var olan araçlar özetle üç grupta toplanabilir. Birinci gruptaki araçlar, eşleşen miRNA ve mRNA ifade profillerini kullanarak birlikte hareket eden miRNAların ve/veya miRNAlar tarafından aynı anda düzenlenen gen kümelerinin istatistiksel yöntemlerle analizini amaçlar (45–49). Bu araçlar modülleri (ortak regülasyonu) tahmin etmekle birlikte, ağ ilişkileri için yeterli bilgi sunamazlar (Örneğin; mirConnX ve MAGIA²) (40,41). İkinci gruptaki araçlar yine gen ifade verilerini kullanarak, ikili düzenlenme ilişkilerini tahmin eder. Örneğin, MIRTfNet

sadece miRNA-TF ve TF-gen ikililerini bulabilmektedir (4). Üçüncü gruptaki araçlar ise, deneysel verileri değil, literatür tabanlı elde edilmiş bilgileri ve sekans tabanlı hedef tahminlerini bir veri tabanı üzerinde birleştirerek statik devreler sunarlar (Örneğin; CircuitDB ve MIR@NT@N) (39,50). Bunlar veritabanları gibi işlev görmektedir, devrelerin gen ifade verileri ile ilişkilendirilmesi ve yorumlanması için sunulan bir işlev yoktur. Devreler genellikle deneyi yapan araştırmacıların başka analizleriyle birlikte kullanımı şeklinde anlamlandırılır. Bahsi geçen çalışmalarda olduğu gibi *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* devrelerini tespit etme yolunda adımlar atan araçlar yayımlanmış olsa da bunların çoğu günümüz itibariyle aktif değildir ya da dinamik şekilde kullanılamamaktadır ya da sadece DE analiziyle ve statik ilişkilerle sınırlayarak işlem yapmaktadır (51–54).

2.4. MEME KANSERİ

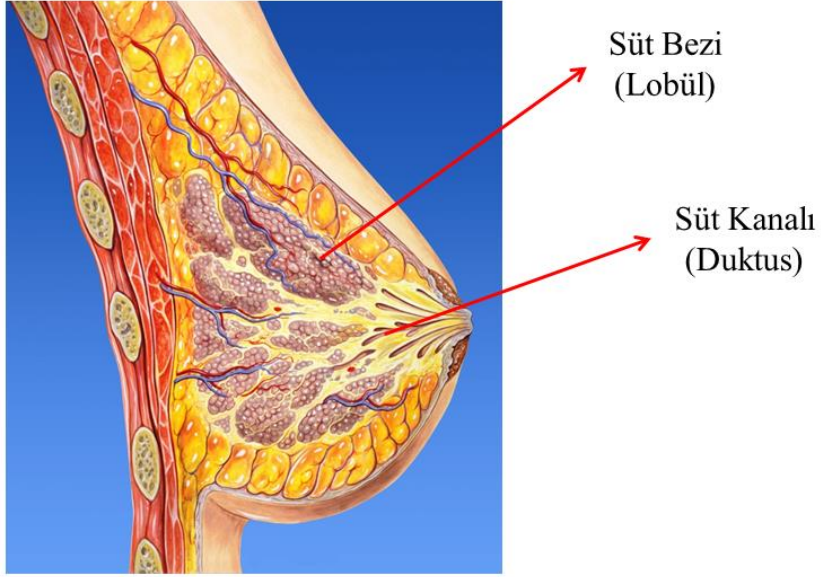
Meme kanseri kompleks ve heterojen bir hastalıktır ve dünyada kadınlarda en sık görülen kanser türüdür (55,56). Amerikan Kanser Derneği'nin son istatistiklerine göre 2017 yılında yaklaşık 40.610 kadın ve 460 erkeğin 2017 yılında meme kanserinden ölmesi beklenmektedir (Şekil 2.7) (55).



Şekil 2.7. Amerikan Kanser Derneği istatistikleri sonucu 2017 yılındaki yeni vaka ve yaşam kaybı sayıları ve oranlarını gösteren grafik (57).

2.4.1. MEME KANSERİNİN SINIFLANDIRMASI

Günümüzde meme kanserinin sınıflandırması 3 şekilde yapılabilmektedir. Bunlardan ilki histolojik sınıflandırmadır. Normal meme dokusu lobül (süt üreten doku) denilen yapıların bir araya gelmesiyle oluşan lob (süt bezi), meme başına süt taşıyan duktus (süt kanalları) ve yağ dokusundan oluşmaktadır (Şekil 2.8). Histolojik sınıflandırma kanserin bu yapıların hangisinden geliştiğine ve yayılma tipine göre olmaktadır ve duktuslardan ya da lobüllerden gelişmesine göre iki tiptir. Bu iki tip de yapının dışına yayılmasıyla invaziv, yapının içerisinde kalmasıyla in situ olarak adlandırılır. Sonuç olarak en yaygın olarak rastlanan 4 farklı histolojik alt tip bulunmaktadır. Bunlar; Duktal Karsinoma in situ (DCIS), İnvaziv Duktal Karsinom (IDC), Lobüler Karsinoma in situ (LCIS) ve İnvaziv lobüler Kanser (ILC)'dir (55,58).



Şekil 2.8. Memenin anatomisi ve kanserin geliştiği yapılar (59).

Bir diğer sınıflandırma patolojik sınıflandırmadır ve bazı reseptörlerin fazlalığına ve azlığına göre yapılır. Östrojen (ER), progesteron (PR) ve HER2 reseptör sayısında fazlalık varsa pozitif, tersi durumda ise negatif, üç reseptör tipini de bulundurmeyen halde ise 3'lü negatif olarak isimlendirilir; ER+, ER-, PR+, PR-, HER2+, HER2- ve 3'lü negatif olmak üzere 7 çeşittir.

Meme kanserinin heterojen bir profil sergilemesi, farklı hastalar arasında (intertümör) ve hatta her tümör içerisinde (intratümör) büyük farklılıklar gösteriyor olması teşhisi ve tedaviyi zorlaştırmaktadır (60–62). Bu eksiklik yeni biyobelirteçlerin tespitini hedefleyen çalışmaların yapılmasına sebep olmuş ve yakın zamanda histolojik ve patolojik sınıflandırmanın yanında meme kanseri son olarak moleküler olarak da sınıflandırılmıştır (63,64). Bu sınıflandırmada ilk olarak 2000 yılında Perou, Sørlie ve arkadaşları tarafından bazal hücre benzeri, HER2+, normal epitel benzeri, ve luminal olarak 4'e ayrılmıştır (63). Daha sonra luminal alt tipin kendi arasında luminal A ve luminal B olarak gruplanması ile 5 alt tipe ayrılmıştır (64). Daha sonra claudin low ve moleküler apokrin alt tiplerinin de eklenmesiyle meme kanseri 7 moleküler alt tip olarak sınıflandırılmıştır (65,66)

2.4.1.1. Meme Kanserinde Tümör Derecesi

Meme kanserinde tümör derecesi kanser hücrelerinin normal hücrelere mikroskopik olarak benzerliğine dayanır. Tümör derecesi ne kadar yüksekse, hücreler normalden o kadar

farklılaşmıştır ve yayılma ihtimali yüksektir. Tümör derecesi belirlenirken iki parametre göz önünde bulundurulur. Bunlardan ilki nükleer derecedir; tümör hücrelerindeki nükleusun boyut ve şekli değerlendirilir. İkincisi ise mitotik hızdır ve bu da tümör hücrelerinin ne kadar hızlı büyüyüp bölündüğünün bir ölçüsüdür. Bir tümörün derecesi belirlenirken bu iki parametre de göz önünde bulundurulmaktadır (56).

2.4.2. MEME KANSERİ VE TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ-MİRNA-HEDEF GEN DEVRELERİ

Yüksek işlem hacimli teknolojilerin (mikrodizin ve yeni nesil dizileme gibi) gelişmesiyle birlikte meme kanserine sebep olan ve gelişiminde rol oynayan pek çok faktör (gen, miRNA, transkripsiyon faktörü vb.) tespit edilmiş olsa da hastalığın regülasyonunda rol oynayan moleküler mekanizmalar hala tam olarak açıklanamamıştır. Meme kanseri heterojen bir yapıya sahip, patolojik, histolojik ve moleküler olarak birçok alt tipe ayrılan kompleks bir hastalıktır. Bu da özellikle tedavide önemli güçlükler sebeptir. Neredeyse bütün biyolojik düzensizliklerde olduğu gibi meme kanserinde de tek bir faktörün etkisinden bahsetmek mümkün değildir. Sistem biyolojisi yaklaşımlarının değer kazandığı günümüzde meme kanserine global bakış açısıyla bakabilmek ve moleküller arasındaki ilişkileri değerlendirebilmek önem arz etmektedir. Bu eksiklik, meme kanseri oluşumunu ve gelişimini öngörebilecek yeni belirteçlerin aranmasını ve düzenleyici ağların tespit edilmesini zorunlu kılmıştır.

Özellikle 2010 yılından itibaren *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* devreleri ile ilgili artan bir ivme ile çalışmalar gerçekleştirilmiş olsa da meme kanseri oluşum ve gelişimine spesifik üçlü devreleri ortaya çıkaran bir çalışma hiç yapılmamıştır. Literatürde meme kanserinde rol alan devre ve motiflerden bahseden iki çalışma bulunmaktadır. 2012 ve 2013 yılında yapılan bu çalışmalarda amaç hastalık spesifik ağların oluşturulabilmesi için algoritma ve web tabanlı araç geliştirmektir ancak bu araçlar da günümüz itibarıyla aktif olarak kullanılamamaktadır (DisTMGneT). Bahsi geçen iki çalışmada da meme kanseri ile ilgili literatür bilgisi algoritma geliştirmek için örnek hastalık olarak kullanılmıştır dolayısı ile meme kanserine özel bir devre belirlenmemiştir (52,67).

Dolayısıyla tez çalışmasının kurgusu literatürdeki önemli bir boşluğu doldurmaktadır. Tez kapsamında meme kanseri oluşumu ve gelişimi özelinde sonuçlar literatürde ilk kez elde

edilmiştir ve daha da önemlisi araştırmacıların kendi verilerini zenginleştirerek entegre edebilecekleri bir sistem geliştirilmiştir. Bu programı dinamik olarak her hastalık veya karşılaştırma durumu (Ör: yaş, cinsiyet, ilaç uygulaması gibi) için kullanmak mümkündür.



3. GEREKÇE VE AMAÇ

Hücrel süreçlere bütünsel olarak yaklaşmanın değerinin anlaşıldığı günümüzde hücrede gerçekleşen kombinasyonel düzenleyici mekanizmaların karakterize edilmesi (ağlar ve devreler kurgulayarak) ve açığa çıkartılması önem kazanmıştır. Bu nedenle çeşitli biyolojik süreçlerde düzenleyici *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* devrelerinin ortaya çıkartılmasını hedefleyen çalışmalar son yıllarda artmaya başlamıştır. 2010 yılından itibaren bu konuda artan bir ivme ile çalışmalar gerçekleştirilmiş olsa da meme kanseri oluşum ve gelişimine spesifik üçlü devreleri ortaya çıkaran bir çalışma hiç yapılmamıştır. Daha da önemlisi araştırmacıların kendi verilerini zenginleştirerek entegre edebilecekleri bir program veya çalışma sistemi bulunmamaktadır. Var olan çalışmalarda geliştirilen araçlar çoğu aktif olarak kullanılamamakta, aktif olanlar yalnızca statik olarak gömülü bilgiyi çağırabilmekte veya sadece DE (ifadesi anlamlı olarak değişen) analizi üzerinden işlem yapmaktadır.

Bu gerekçe ile tez çalışmasında, sistem biyolojisi yaklaşımı ile literatürde daha önce yapılmış meme kanseri ve normal dokuların miRNA, TF ve gen ifade (expression) verilerini üst üste koyarak meme kanseri oluşumunda (tümör&normal) ve gelişiminde (tümör derecesi/ grade) rol alan kombinasyonel düzenleyici mekanizmaları *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* devreleri (biological circuits) olarak ortaya çıkartmak, literatürde olmayan özgün bir sistem ve devre analiz aracı geliştirmek amaçlanmıştır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Tez çalışmasında meme kanseri regülasyonunda önem arz edebilecek *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* devrelerinin tespit edilmesinde literatürden elde edilen miRNA ve mRNA mikrodizin çalışmaları kullanılmıştır.

Meme kanseri oluşumunda rol alan devrelerin araştırılması için; 102 tümör, 30 normal örneği içeren 2 tane miRNA, 101 tümör, 31 normal örneği içeren 3 tane mRNA çalışması seçilmiş ve analizleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.1). Verilerin özellikleri aşağıda detaylı olarak anlatılmıştır.

Çizelge 4.1. Literatür araştırması sonucunda meme kanserinin oluşumunun araştırılması için seçilen meme kanseri miRNA/mRNA mikrodizin çalışmalarının veri tipi, deneyin gerçekleştirildiği platform, erişim kodu ve örnek sayısı bilgileri.

ERİŞİM KODU	ÖRNEK SAYILARI		PLATFORM
miRNA Verileri	Tümör	Normal	
GSE45666	80	15	Agilent-021827 Human miRNA Microarray G4470C
GSE32922	22	15	Exiqon miRCURY LNA microRNA Array v.11.0
<i>Toplam</i>	<i>102</i>	<i>30</i>	
mRNA Verileri	Tümör	Normal	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0
GSE5764	10	20	
GSE17907	51	4	
GSE3744	40	7	
<i>Toplam</i>	<i>101</i>	<i>31</i>	

Meme kanseri gelişiminde rol alan devrelerin araştırılması için; 347 tümör örneği içeren 4 tane miRNA, 711 tümör örneği içeren 7 tane mRNA çalışması seçilmiş ve analizleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.2). Bu verilerin özellikleri aşağıda detaylı olarak anlatılmıştır.

Çizelge 4.2. Literatür araştırması sonucunda meme kanseri gelişiminin araştırılması için seçilen meme kanseri miRNA/mRNA mikrodizin çalışmalarının veri tipi, deneyin gerçekleştirildiği platform, erişim kodu ve örnek sayısı bilgileri (TD; Tümör Derecesi).

ERİŞİM KODU	ÖRNEK SAYILARI			PLATFORM
miRNA Verileri	TD1	TD2	TD3	
GSE26666	4	34	34	Agilent-019118 Human miRNA Microarray 2.0 G4470B
GSE40267	3	20	154	Agilent-021827 Human miRNA Microarray (V3)
GSE40525	3	31	27	Agilent-019118 Human miRNA Microarray 2.0 G4470B
GSE59247	4	15	18	Agilent-031181 Unrestricted Human miRNA V16.0
<i>Toplam</i>	<i>14</i>	<i>100</i>	<i>233</i>	
mRNA Verileri	TD1	TD2	TD3	
E-MTAB-1006	18	34	44	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0
GSE17907	3	10	34	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0
GSE36295	4	17	17	Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array
GSE39004	8	20	25	Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array
GSE42568	11	40	53	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0
GSE58212	43	109	125	Agilent-028004 SurePrint G3 Human GE 8x60K
GSE59246	13	29	54	Agilent-028004 SurePrint G3 Human GE 8x60K
<i>Toplam</i>	<i>100</i>	<i>259</i>	<i>352</i>	

4.1.1. MİRNA MİKRODİZİN VERİLERİ

4.1.1.1. Meme Kanseri Oluşumunun Araştırılması İçin Kullanılan miRNA Verileri

GSE45666 (68), Lee ve arkadaşları tarafından Agilent-021827 Human miRNA Microarray G4470C platformu kullanılarak elde edilmiş bir miRNA mikrodizin verisidir. Bu çalışmadaki 80 tümör ve 15 normal örnek tez kapsamında tekrar analiz edilmiştir.

GSE32922 (69), Tanic ve arkadaşları tarafından Exiqon miRCURY LNA microRNA Array v.11.0 platformu kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve içeriğindeki 22 tümör 15 normal örnek tez kapsamında tekrar analiz edilmiştir.

4.1.1.2. Meme Kanseri Gelişiminin Araştırılması İçin Kullanılan miRNA Verileri

GSE26666 (70), Cimino ve arkadaşları tarafından Agilent-019118 Human miRNA Microarray 2.0 G4470B platformu kullanılarak elde edilmiş bir miRNA mikrodizin verisidir. Bu çalışmadaki 72 tane tümör derecesi bilgisi olan örnek yeniden analiz edilmiştir.

GSE40267 (71), de Rinaldis ve arkadaşları tarafından Agilent-021827 Human miRNA Microarray (V3) platformu kullanılarak elde edilmiş bir miRNA mikrodizin verisidir. Bu çalışmadaki 177 tane tümör derecesi bilgisi olan örnek yeniden analiz edilmiştir.

GSE40525 (72), Biagioni ve arkadaşları tarafından Agilent-019118 Human miRNA Microarray 2.0 G4470B platformu kullanılarak elde edilmiş bir miRNA mikrodizin verisidir. Bu çalışmadaki 61 tane tümör derecesi bilgisi olan örnek yeniden analiz edilmiştir.

GSE59247 (73), Lesurf ve arkadaşları tarafından Agilent-031181 Unrestricted Human miRNA V16.0 Microarray 030840 platformu kullanılarak elde edilmiş bir miRNA mikrodizin verisidir. Bu çalışmadaki 37 tane tümör derecesi bilgisi olan örnek yeniden analiz edilmiştir.

4.1.2. MRNA MİKRODİZİN VERİLERİ

4.1.2.1. Meme Kanseri Oluşumunun Araştırılması İçin Kullanılan mRNA Verileri

GSE5764 (74), Turashvili ve arkadaşları tarafından Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array platformu kullanılarak 10 meme tümör ve 20 normal örnek kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

GSE17907 (75), Sircoulomb ve arkadaşları tarafından Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array ile 51 tümör ve 4 normal örnek ile yapılmıştır.

GSE3744 (76) ise yine Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array platformu ile 40 tümör ve 7 normal örnek kullanılarak yapılmıştır.

4.1.2.2. Meme Kanseri Gelişiminin Araştırılması İçin Kullanılan mRNA Verileri

E-MTAB-1006 (77), Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 platformu kullanılarak 96 tane tümör derecesi bilgisi olan tümör örneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

GSE17907 (75), Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array platformu kullanılarak 47 tane tümör derecesi bilgisi olan tümör örneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu

Çalışma aynı zamanda meme kanseri oluşumunun araştırılması için kullanılan veri setlerinden bir tanesidir.

GSE36295 (78) , Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array platformu kullanılarak 38 tane tümör derecesi bilgisi olan tümör rneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

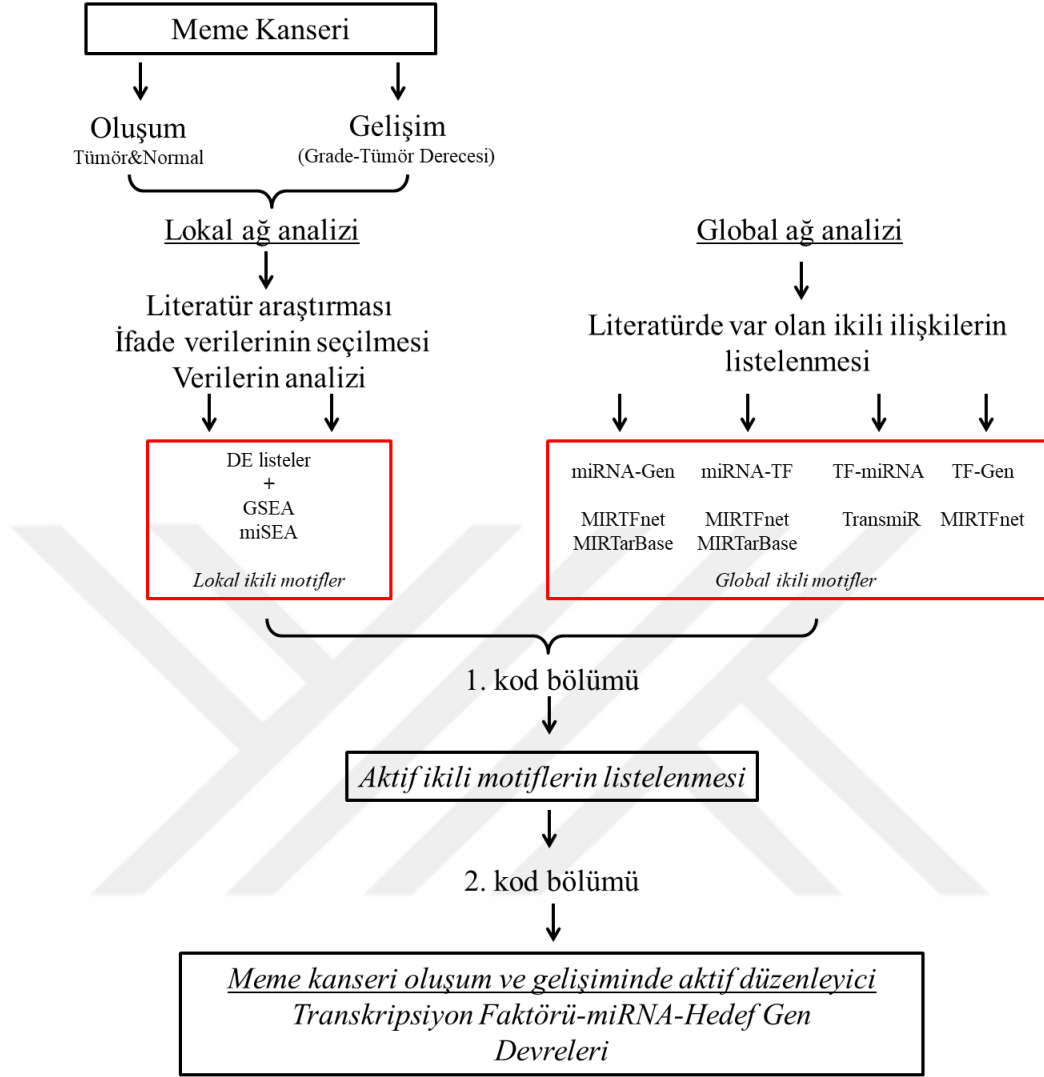
GSE39004 (79), Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array platformu kullanılarak 53 tane tümör derecesi bilgisi olan tümör rneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

GSE42568 (80), Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array platformu kullanılarak 104 tane tümör derecesi bilgisi olan tümör rneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

GSE58212 (81), Agilent-028004 SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray platformu kullanılarak 277 tane tümör derecesi bilgisi olan tümör rneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

GSE5924 (73), Agilent-028004 SurePrint G3 Human GE 8x60K Microarray platformu kullanılarak 96 tane tümör derecesi bilgisi olan tümör rneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2. YÖNTEM

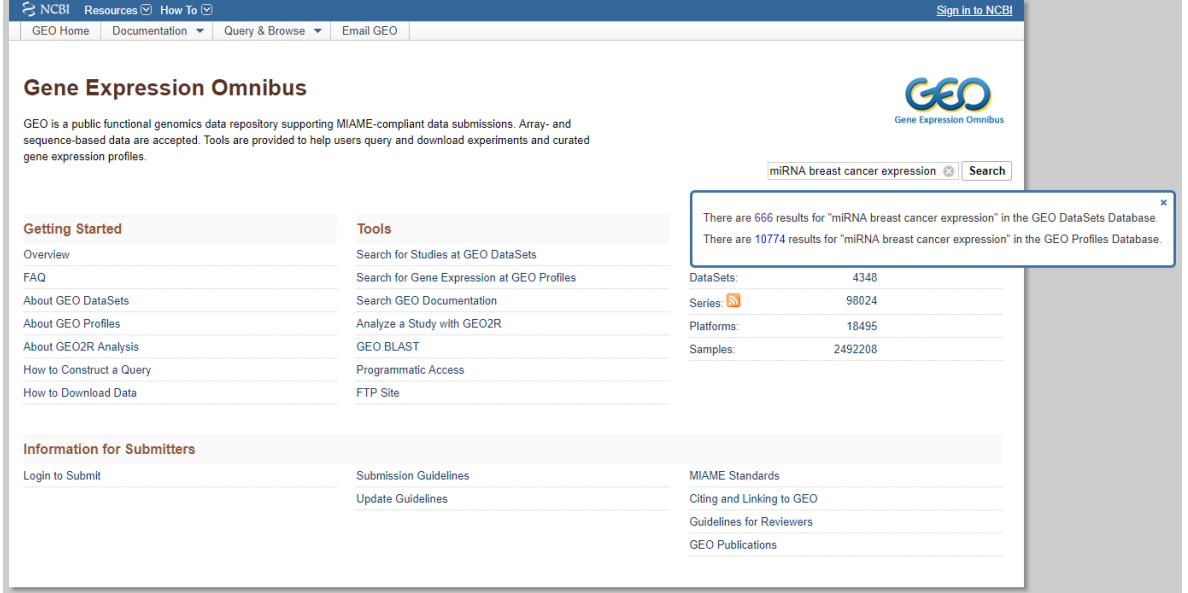


Şekil 4.1. Meme kanseri oluşum ve gelişiminde önemli aktif düzenleyici devrelerin belirlenmesi için geliştirilen sistemin mimarisi (Algoritma).

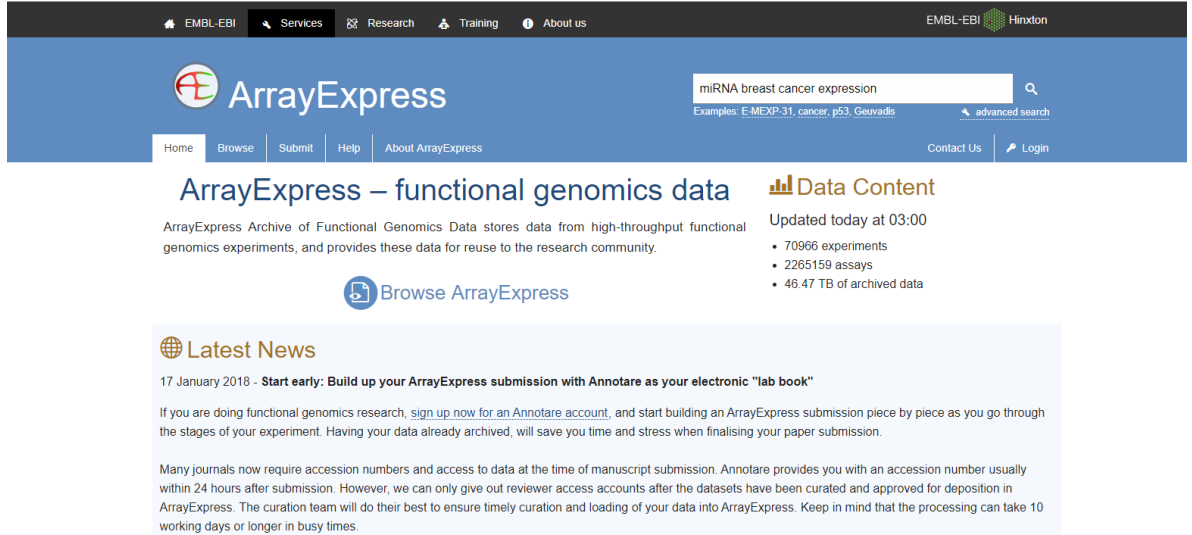
4.2.1. MİKRODİZİN ÇALIŞMALARININ BULUNMASINA YÖNELİK LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Literatür araştırması kapsamında, meme kanseri mikrodizin verilerinin (miRNA ve mRNA) bulunması için daha önce yapılmış olan ve tümör ve normal örnekleri içeren meme kanseri mikrodizin çalışmaları Gene Expression Omnibus; GEO ve ArrayExpress veri tabanları kullanılarak araştırılmıştır (82,83).

GEO ve ArrayExpress veritabanlarında arama yapılırken anahtar kelime olarak “miRNA/microRNA/mRNA/”, “breast cancer” ve “expression” kullanılmıştır (Şekil 4.2, Şekil 4.3). Tez kapsamında sadece tümör ve normal meme primer doku örnekleri kullanılmıştır, kan, hücre hattı, formalin ile fikse edilmiş parafine gömülmüş (FFPE) doku örnekleri çalışmaya dahil edilmemiştir.



Şekil 4.2. Literatür araştırması için GEO veritabanında örnek bir arama işlemini gösteren ekran görüntüsü.



Şekil 4.3. Literatür araştırması için ArrayExpress veritabanında örnek bir arama işlemini gösteren ekran görüntüsü.

Meme kanseri oluşumunun araştırılması amacıyla normal ve tümör örnekler, meme kanserinin gelişiminin araştırılması için ise tümör derecesi (TD, grade) bilgilerine erişilebilen tümör örnekleri seçilmiştir.

4.2.2. MİKRODİZİN VERİ ANALİZİ

Mikrodizin veri analizleri (normalizasyon işlemleri ve istatistiksel analizler), “R” yazılım dilinde “Bioconductor” paketini kullanarak “Microsoft Excel” eklentisi olarak mikrodizin analizi yapılmasına izin veren BRB-ArrayTools (84) programının 4.5.1 (stable) versiyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Normalizasyon teknik farklardan dolayı ortaya çıkabilecek farklılıklar eleyerek biyolojik veri üzerindeki gerçek farkların ortaya çıkarılmasını sağlamaktadır. Bu tez çalışmasında yüksek işlem hacimli verilere sıklıkla uygulanan ve en güvenilir normalizasyon yöntemlerinden birisi olan quantile normalizasyon metodu kullanılmıştır. Quantile normalizasyonda teknikten gelen farkları elemine etmek için veri bir bütün olarak değerlendirilir ve sayısal değerler yerine sıralama değerlerinin farklı örneklerdeki ortalaması kullanılarak karşılaştırılabilir bir sayı değeri verilerek işlem yapılır (85).

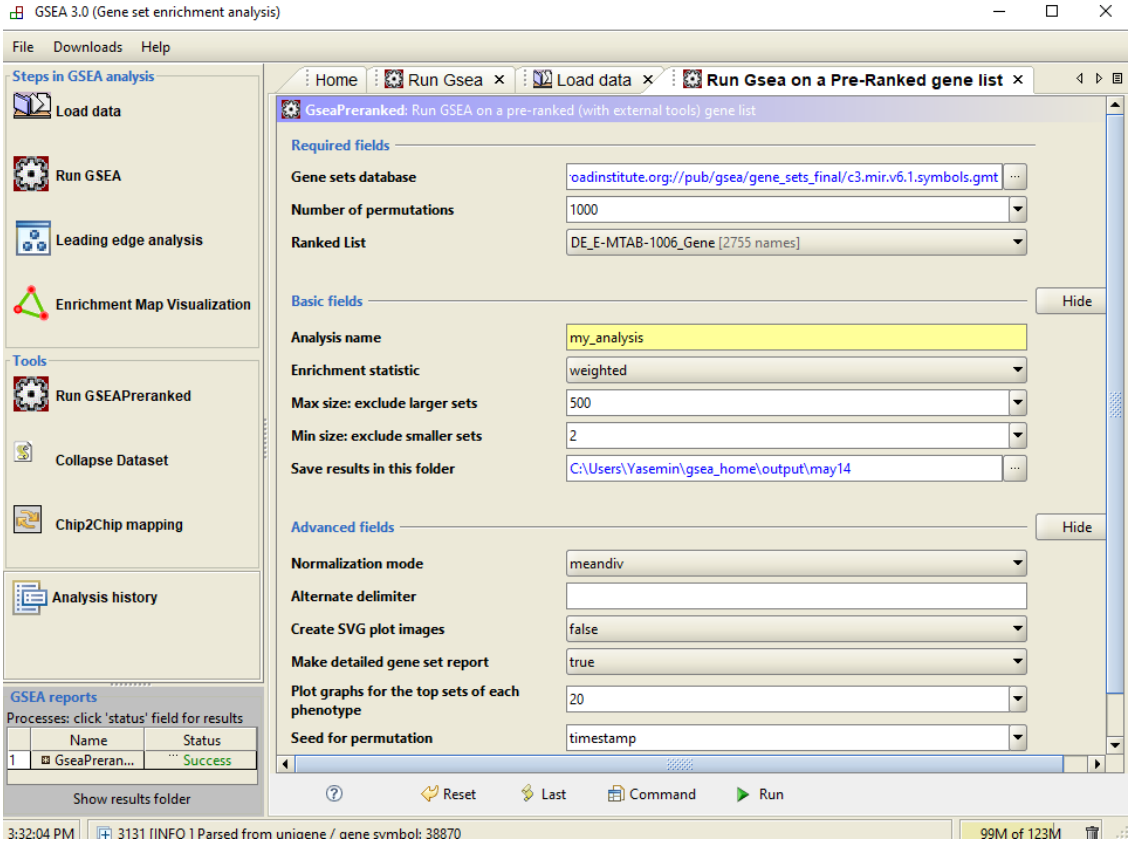
Meme kanserinin oluşumunun araştırıldığı veriler normalize edildikten sonra örnekler 2 gruba (tümör ve normal) ayrılarak BRB programı içindeki sınıf karşılaştırması (Class Comparison) komutu ile kıyaslanmıştır, böylece $p \leq 0.05$ ve tümör normal gruplar arasında kat değişimi en az 2 kat olan bütün miRNA’lar ve mRNA’lar tespit edilmiş ve listelenmiştir.

Meme kanserinin gelişiminin araştırıldığı veriler normalize edildikten sonra örnekler tümör derecesi (grade) bilgilerine göre (ör: grade 1, grade 2, grade 3 gibi) ayrılarak BRB programı içindeki ANOVA komutu ile kıyaslanmıştır. ANOVA iki veya daha fazla grubun ortalamaları arasındaki farkın tespit edilmesine izin veren istatistiksel bir yöntemdir. Böylece tümör dereceleri arasında anlamlı olarak ifade farklılığı gösteren ($p \leq 0.05$) bütün miRNA’lar ve mRNA’lar tespit edilmiş ve listelenmiştir.

4.2.3. MİSEA VE GSEA ANALİZLERİ

Tez çalışması kapsamında seçilen mikrodizin verilerinde DE analizi yapılmış ve $p \leq 0.05$ ve kat değişimi 2’den büyük olan bütün miRNA ve mRNA’lar tespit edilmiştir. Bu analize

göre farklı ifade olan mRNA ve miRNA'lar seçilerek bir sonraki adıma geçerler. Ancak gerek kullanılan istatistiksel yöntemlerin olası hataları gerekse ifadesi iki durum arasında önemli ölçüde değişmeyen miRNA ve TF'lere bağlı olarak önemli devrelerin kaçırılmaması için DE analiziyle tespit edilemeyen TF'lerin belirlenebilmesi için hedef genler, miRNA'lar ve TF'ler üzerinde GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) uygulanmıştır. GSEA belirli bir ölçüte göre (burada kat değişim ve p değerleri) sıralanmış bir liste içerisinde önceden tanımlı ilişkileri istatistiksel olarak tespit eden bir yöntemdir (86). GSEA analiz aracı kullanılarak yapılan analizlerde verdiğimiz gen ve TF listesindeki (DE listeler) elemanlardan minimum 2 tanesi ile ilişkili miRNA ve TF listeleri elde edilmiştir (Şekil 4.4). Buna ek olarak DE analizinden kaçan bütün TF ve miRNA'ları tespit edebilmek için miSEA analizi de sisteme entegre edilmiştir (87). miSEA aracı temel olarak GSEA algoritmasını aynen kullanırken gen kümeleri üzerinde değil miRNA kümeleri üzerinde çalışmaktadır. miSEA analiz aracı kullanılarak yapılan analizlerde verdiğimiz miRNA listesindeki (DE listeler) elemanlardan minimum 2 tanesini regüle eden (regülasyon derecesi) TF listeleri elde edilmiştir.

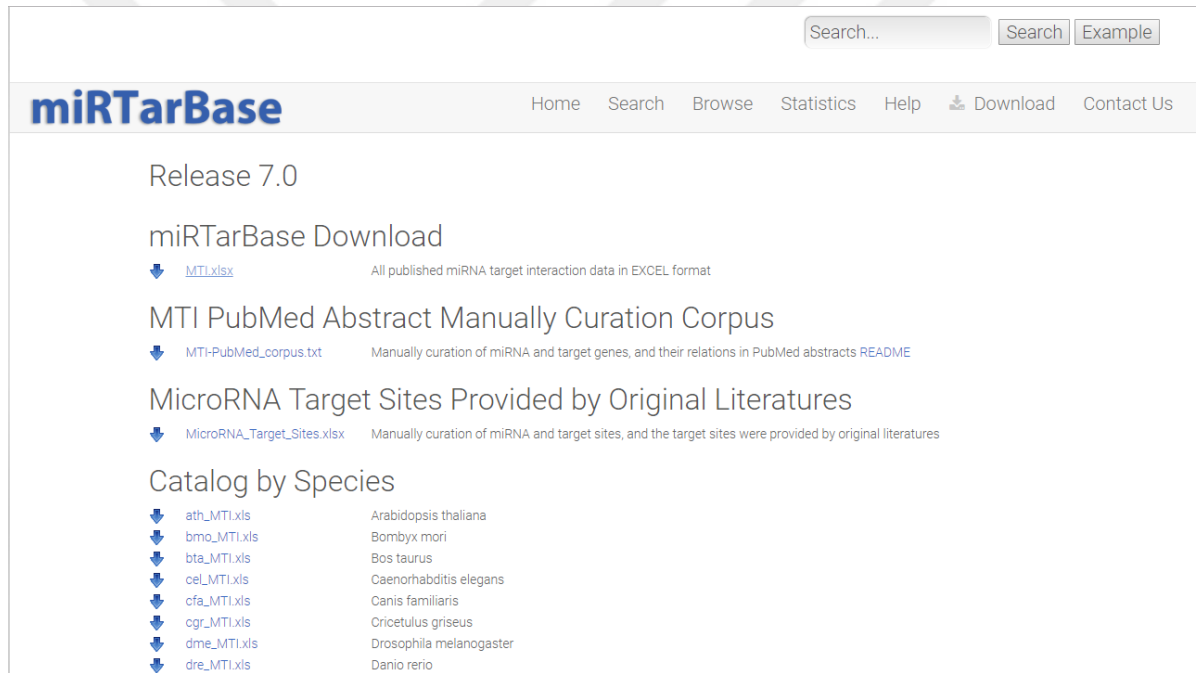


Şekil 4.4. GSEA analiz aracıyla yapılan örnek bir analize ait ekran görüntüsü.

miSEA ve GSEA analiz araçları kullanılarak yapılan analizlerde verdiğimiz miRNA, mRNA ve TF listesindeki (DE listeler) elemanlarla anlamlı şekilde bağlantılı olan ekstra TF ve miRNA listeleri elde edilmiştir ve bunlar *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* devrelerinin tespiti için kullanılacak olan listelere eklenmiştir.

4.2.4. MİRNA-GEN, TF-GEN, MİRNA-TF VE TF-MİRNA DÜZENLEYİCİ İLİŞKİLERİNİN LİTERATÜRDEN ELDE EDİLMESİ

TF-miRNA ikili motifleri için TransmiR (5), miRNA-gen / miRNA-TF ikili motifleri için MIRTFnet (4) ve MIRTarBase (88), TF-gen ikili motifleri için yine MIRTFnet (4) veri tabanları kullanılmıştır. Bu veritabanlarından ikili ilişkileri içeren dosyalar indirilmiş ve düzenlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. MIRTarBase veritabanından miRNA-gen ve miRNA-TF ikili ilişkilerini içeren dosyaya erişimi gösteren ekran görüntüsü.

4.2.5. MİRNA İSİMLENDİRME SORUNLARININ AŞILMASI

Tez çalışmasında farklı kaynaklardan (GSEA, miSEA, TransmiR gibi) ve farklı platformlardan elde edilen miRNA listeleri kullanılmıştır. Bütün listelerin birbiriyle entegrasyonunun miRNA isimlerine göre yapıldığı düşünüldüğünde bu isim listelerinin standardize edilmesi veri kaybetmemek adına çok önemli bir basamaktır. Tez çalışması kapsamında bu sorunu çözmek adına DE listeleri ve global ağ analizi aşamasında statik

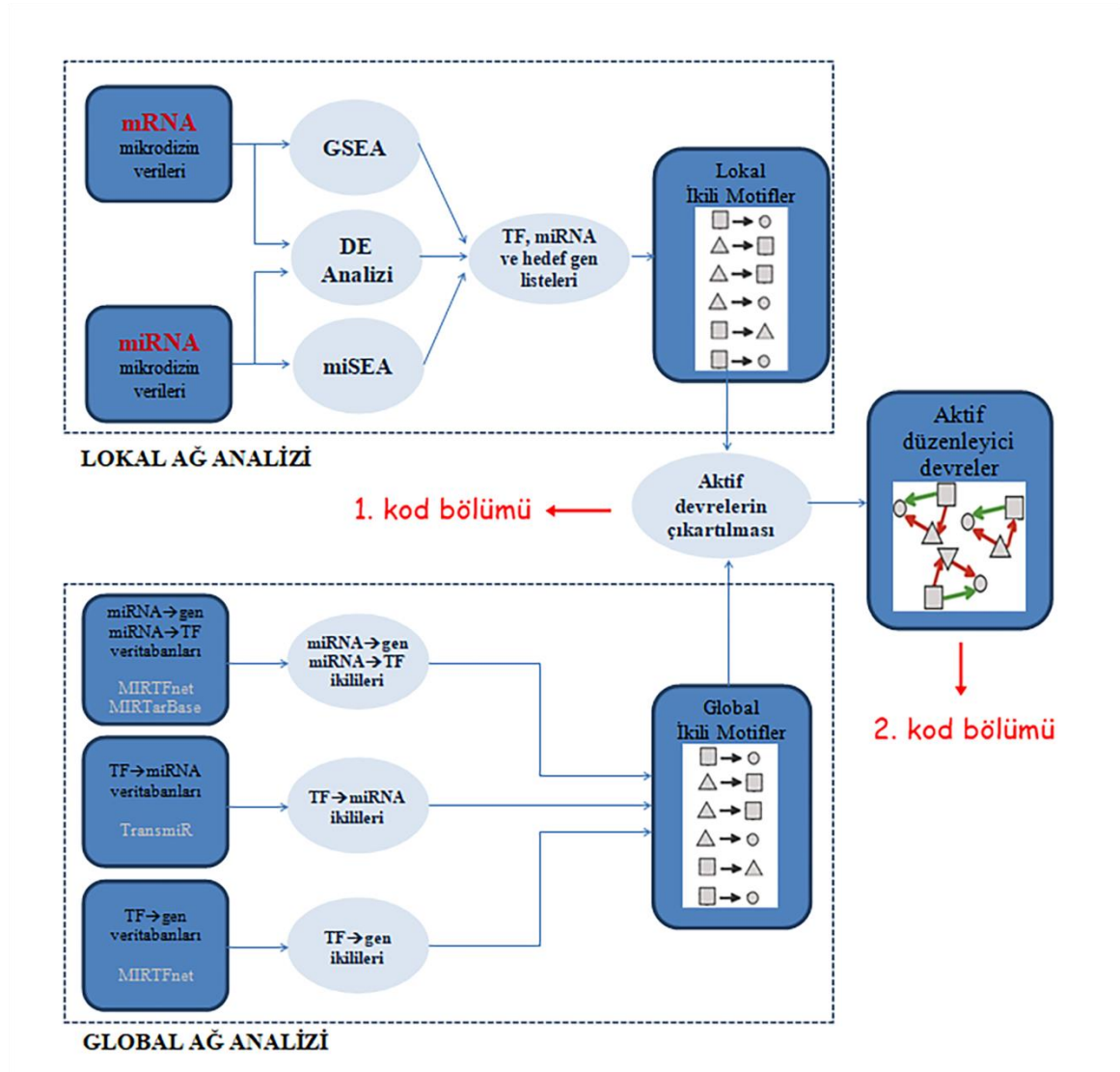
devreleri belirlemek için çeşitli veritabanlarından elde edilmiş olan miRNA-TF, miRNA-hedef gen ikililerindeki miRNA isimlendirmeleri de aynı versiyona (v21) göre ayarlanmıştır (Şekil 4.6). Bu dönüşümlerin gerçekleştirilmesi için miRNAmeConverter analiz aracı kullanılmıştır (89).

The screenshot displays the miRNAmeConverter web application. On the left, a sidebar contains a 'Step by step guideline for translating miRNA names' section. Step 1, 'Enter input values', shows a text box with 'hsa-miR-1' and a dropdown menu set to 'Choice optional'. Step 2, 'Choose target version(s)', shows a dropdown menu set to '21'. The main area on the right has tabs for 'Result - miRNA names', 'Result - Sequences', and 'Result - Description'. Below the tabs, a message states 'The translation results are represented in the table below.' A table with three columns: 'mimat', 'input', and 'v21.0' shows the translation of 'MIMAT0000416' to 'hsa-miR-1' and then to 'hsa-miR-1-3p'. A green notification box at the bottom right says 'Translation successful. Results are now available for download.'

Şekil 4.6. miRNAmeConverter kullanılarak miRNA isimlendirmesinin istenilen versiyona göre ayarlanmasını gösteren örnek ekran görüntüsü. hsa-miR-1 isimli miRNA, 21. miRBase versiyonuna göre artık hsa-miR-3p olarak isimlendirilmektedir.

4.2.6. PROGRAM GELİŞTİRİLMESİ

mRNA ve miRNA ifade verilerinin çeşitli kombinasyonlarla devrelere dönüştürülmesi için özgün bir “sistem” oluşturulmuştur. Sistem manuel olarak gerçekleştirilen ve kod ile gerçekleştirilen basamakları içermektedir (Şekil 4.7). Zenginleştirme tabanlı (Enrichment-based) devre analizi olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 4.7. Sistem basamaklarını gösteren şema. 1. kod bölümü lokal ikililerin ve global ikililerin keşştirildiği ve aktif motiflerin bulunduğu basamağı, 2. kod bölümü ise üçlü devrelerin tespit edildiği basmağı temsil etmektedir. Kodun iki basamağından da sonuç listeleri elde edilmiştir.

Programın ana hedefi, çeşitli kombinasyonlar ile oluşabilecek *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* devre çeşitlerinin araştırılması ve raporlanmasıdır.

mRNA ve miRNA verilerinin analizi ve meme kanserinin oluşum ve gelişiminde aktif düzenleyici devrelerin tespit edilmesi için geliştirilen sistemin mimarisi Şekil 4.7’de görülmektedir. Sistemin iki analiz hattı bulunmaktadır. Bunlardan ilki kullanılan “**lokal ağ analizi**”dir. Sistemin bu aşaması verimize (TF, miRNA ve hedef gen listeleri) spesifik ikili ilişki olasılıklarının belirlenmesini kapsamaktadır. İkinci analiz hattı ise mevcut veri tabanlarından elde edilen global ikili düzenleme motiflerinin elde edildiği “**global ağ**

analizi” kısmıdır. Tez çalışması kapsamında TF-miRNA ikili motifleri için TransmiR (5), miRNA-gen / miRNA-TF ikili motifleri için MIRTfnet (4) ve MIRTarBase (88), TF-gen ikili motifleri için ise yine MIRTfnet (4) veri tabanları kullanılmıştır.

Algoritması belirlenen sistemin kodlanması C++ yazılım dili kullanılmıştır. Kodun yazılmasında ve çalıştırılmasında DEV C++ geliştirme ortamı kullanılmıştır (Şekil 4.8). Kodun tamamı EK-1 olarak verilmiştir.

```

1 #include<stdio.h>
2 #include<stdlib.h>
3 #include<string.h>
4 int main()
5 {
6     FILE *TF_fp, *MI_fp, *Gene_fp, *MIGene_fp, *MIGene_Kontrol_fp, *Sonuc_fp, *TFGene_fp, *MITF_fp, *TFMI_fp;
7     char TF[20], MIRNA[30], Gene[20], MIRNA_K[20], Gene_K[20]; // dosyadan okuyacağımız verileri kaydetmek için değişken tanımlı
8     char TF1[886][20], MIRNA1[351][20], Gene1[11060][20]; // Dosyadan okunan veriler için dizi tanımları
9     //char MI_Gene1[157590][40]; //103 gen X 1530 MIRNA
10     int i=0,j,k;
11
12     TF_fp=fopen("TF.txt","r"); //TF dosyasını okumak için açılıyor
13     MI_Gene_fp=fopen("MIGene.txt","r"); //MIGene dosyasını biz oluşturuyoruz. Çünkü tüm MIRNA ve Gene sembolü ikililerini yazacağız bu dosyaya
14     MI_fp=fopen("MIRNA.txt","r"); // MIRNA dosyasını okumak için açılıyor
15     Gene_fp=fopen("Gene.txt","r"); // Gene dosyasını okumak için açılıyor
16     TFGene_fp=fopen("TFGene.txt","r");
17     MITF_fp=fopen("MITF.txt","r");
18     TFMI_fp=fopen("TFMI.txt","r");
19
20
21
22     //Eğer dosya bulunamazsa hata mesajı verir (Dosyaların program dosyasıyla aynı klasörde bulunması gerekiyor aksi halde yolu vermek gerekir)
23     if((TF_fp==NULL)||((MI_fp==NULL)||((Gene_fp==NULL)||((MIGene_fp==NULL)||((TFGene_fp==NULL)||((MITF_fp==NULL)||((TFMI_fp==NULL)))))))))
24     { printf("dosya açılmadı");
25       return 1;
26     }
27
28     // TF lerin dosyadan okunup dizi (TFi[]) içerisine aktarılması
29     i=0;
30     fscanf(TF_fp, "%s", TF);
31     while(!feof(TF_fp))
32     { strcpy(TFi[i], TF);
33       i++;
34       fscanf(TF_fp, "%s", TF);
35     }
36
37     // MIRNA ların dosyadan okunup dizi (MIRNAi[]) içerisine aktarılması
38     i=0;
39     fscanf(MI_fp, "%s", MIRNA);
40     while(!feof(MI_fp))
41     { strcpy(MIRNAi[i], MIRNA);
42       i++;
43       fscanf(MI_fp, "%s", MIRNA);
44     }
45
46     // Gen sembollerinin dosyadan okunup dizi (Genei[]) içerisine aktarılması
47     i=0;
48     fscanf(Gene_fp, "%s", Gene);
49     while(!feof(Gene_fp))
50     { strcpy(Genei[i], Gene);
51       i++;
52       fscanf(Gene_fp, "%s", Gene);
53     }
54 }

```

Şekil 4.8. Dev C ++ geliştirme ortamında kodun yazılmasına ve çalıştırılmasına ait örnek ekran görüntüsü.

4.2.6.1. Sistemin Fayda Analizi

Tez çalışması kapsamında meme kanseri mRNA ve miRNA verilerinin hastalığın oluşumu ve gelişiminde önemli olabilecek *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* devrelerine dönüştürülmesi için özgün bir “sistem” oluşturulmuştur. Literatürde devre tespiti amacıyla geliştirilmiş olan bütün programlar veri olarak sadece DE listeleri kullanmaktadır. Ancak bu bazı önemli devrelerin kaçırılabilmesine sebep olabilmektedir. Bu amaçla GSEA ve miSEA analiz araçlarını dahil ederek geliştirdiğimiz zenginleştirme tabanlı (Enrichment-based) devre analizi sisteminin veri kaybının engellenmesine olan faydasının tespit edilmesi için sadece DE listeler ile analiz yapılmıştır.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. İFADESİ ANLAMLI OLARAK DEĞİŞEN MİRNA, GEN VE TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ LİSTELERİ

BRB-Array Tools ile gerçekleştirilen analizler sonucunda;

Tümör ve normal örnekler arasında ifadesi anlamlı olarak değişen (DE) miRNA, transkripsiyon faktörü (TF) ve hedef gen listeleri elde edilmiştir.

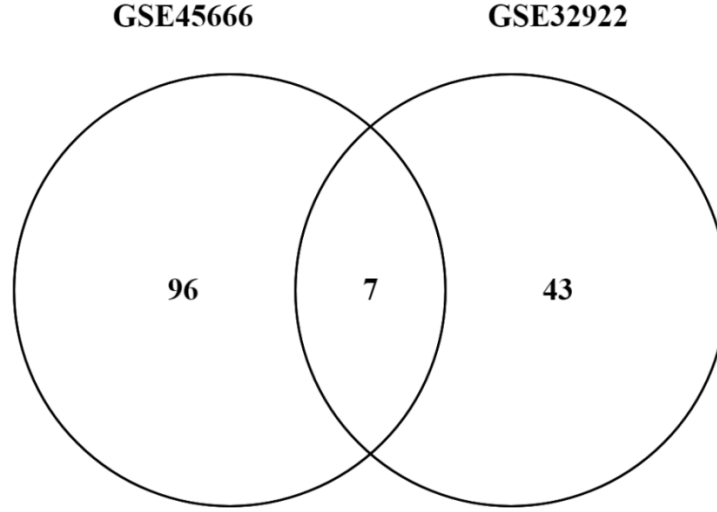
Tümör örneklerinde farklı tümör dereceleri arasında (grade) ifadesi anlamlı olarak değişen (DE) miRNA, transkripsiyon faktörü (TF) ve hedef gen listeleri elde edilmiştir.

5.1.1. İFADESİ ANLAMLI OLARAK DEĞİŞEN MİRNA'LAR

5.1.1.1. Tümör Normal Örnekler Arasında İfadesi Anlamlı Olarak Değişen miRNA'lar

- GSE45666 kodlu çalışmada kat değişimleri 2-10 arasında olan 103 tane DE miRNA bulunmuştur.
- GSE32922 kodlu çalışmada ise kat değişimleri 2-7.7 arasında olan 50 tane DE miRNA bulunmuştur.

Çalışmalardan elde edilen bu listeler Venny 2.1.0 analiz aracı (90) kullanılarak karşılaştırıldığında kesişen miRNA'lar olduğu görülmüştür (Şekil 5.1). Bu tekrarlar elendiğinde son olarak 146 tane DE miRNA listelenmiştir.

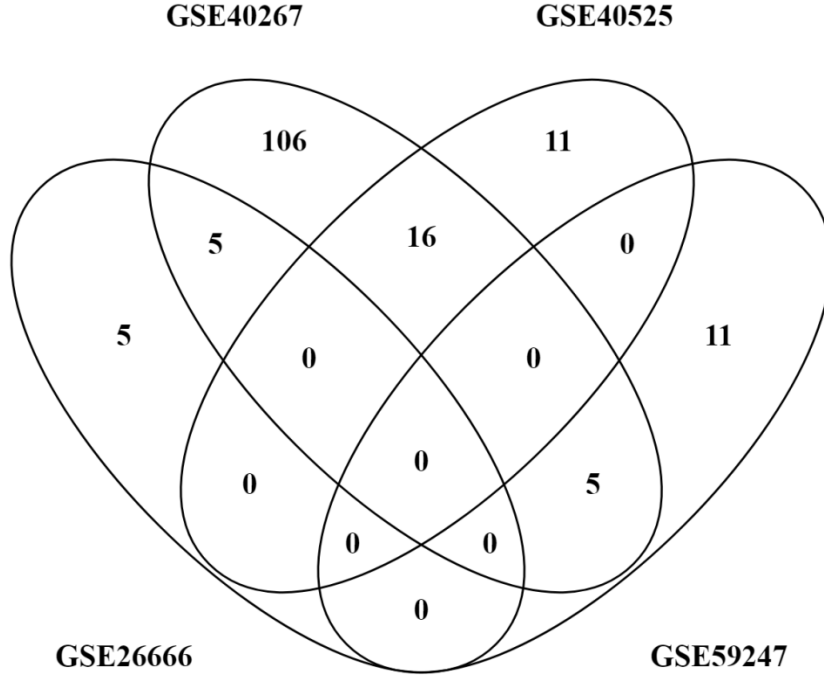


Şekil 5.1. GSE45666 ve GSE32922 kodlu çalışmaların analizinden elde edilen DE listelerin karşılaştırılmasını gösteren venn şeması. İki liste arasında 7 miRNA ortaktır.

5.1.1.2. Tümör Örneklerde Farklı Tümör Dereceleri Arasında İfadesi Anlamlı Olarak Değişen miRNA'lar

- GSE26666 kodlu çalışmada tümör dereceleri arasında anlamlı olarak değişen 10 tane DE miRNA bulunmuştur.
- GSE40267 kodlu çalışmada tümör dereceleri arasında anlamlı olarak değişen 132 tane DE miRNA bulunmuştur.
- GSE40525 kodlu çalışmada tümör dereceleri arasında anlamlı olarak değişen 27 tane DE miRNA bulunmuştur.
- GSE59247 kodlu çalışmada tümör dereceleri arasında anlamlı olarak değişen 16 tane DE miRNA bulunmuştur.

Çalışmalardan elde edilen listeler Venny 2.1.0 analiz aracı (90) kullanılarak karşılaştırıldığında kesişen miRNA'lar olduğu görülmüştür (Şekil 5.2). Bu tekrarlar elendiğinde son olarak 159 DE miRNA listelenmiştir.



Şekil 5.2. GSE26666, GSE40267, GSE40525 ve GSE59247 kodlu çalışmaların analizinden elde edilen DE listelerin karşılaştırılmasını gösteren venn şeması. Listelerdeki tekrarlar elendiğinde 159 bağımsız miRNA elde edilmiştir.

Çalışmalardan ayrı ayrı elde edilen DE (ifadesi anlamlı olarak değişen) miRNA listeleri ve tekrarların elenmiş olduğu son miRNA listeleri EK-2 olarak verilmiştir.

5.1.2. İFADESİ ANLAMLI OLARAK DEĞİŞEN GENLER VE TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ

5.1.2.1. Tümör Normal Örnekler Arasında İfadesi Anlamlı Olarak Değişen Genler ve TF'ler

- GSE5764 kodlu çalışmada kat değişimleri 2 ile 25 arasında değişen 465 tane DE gen, 2-6 kat arasında değişen 38 tane DE transkripsiyon faktörü bulunmuştur.
- GSE17907 kodlu çalışmada kat değişimleri 2 ile 47.6 arasında değişen 2225 tane DE gen, 2-20 kat arasında değişen 193 tane DE transkripsiyon faktörü bulunmuştur.
- GSE3744 kodlu çalışmada kat değişimleri 2 ile 34.6 arasında değişen 1530 tane DE gen, 2-13.8 kat arasında değişen 124 tane DE transkripsiyon faktörü bulunmuştur.

Çalışmalardan elde edilen bu listeler karşılaştırılmıştır ve tekrar eden genler ve TF'ler elenmiştir. Son listelerde 3131 tane DE gen ve 256 tane DE TF bulunmaktadır.

5.1.2.2. Tümör Örneklerde Farklı Tümör Dereceleri Arasında İfadesi Anlamlı Olarak Değişen Genler ve TF'ler

- E-MTAB-1006 kodlu çalışmada tümör dereceleri arasında anlamlı olarak değişen 2755 tane DE gen, 195 tane DE transkripsiyon faktörü bulunmuştur.
- GSE17907 kodlu çalışmada tümör dereceleri arasında anlamlı olarak değişen 694 tane DE gen, 68 tane DE transkripsiyon faktörü bulunmuştur.
- GSE36295 kodlu çalışmada tümör dereceleri arasında anlamlı olarak değişen 1753 tane DE gen, 103 tane DE transkripsiyon faktörü bulunmuştur.
- GSE39004 kodlu çalışmada tümör dereceleri arasında anlamlı olarak değişen 1543 tane DE gen, 91 tane DE transkripsiyon faktörü bulunmuştur.
- GSE42568 kodlu çalışmada tümör dereceleri arasında anlamlı olarak değişen 3393 tane DE gen, 200 tane DE transkripsiyon faktörü bulunmuştur.
- GSE58212 kodlu çalışmada tümör dereceleri arasında anlamlı olarak değişen 7208 tane DE gen, 605 tane DE transkripsiyon faktörü bulunmuştur.
- GSE59246 kodlu çalışmada tümör dereceleri arasında anlamlı olarak değişen 2418 tane DE gen, 190 tane DE transkripsiyon faktörü bulunmuştur.

Çalışmalardan elde edilen bu listeler karşılaştırılmıştır ve tekrar eden genler ve TF'ler elenmiştir. Son listelerde 11067 tane DE gen ve 824 tane DE TF bulunmaktadır.

Çalışmalardan ayrı ayrı elde edilen DE (ifadesi anlamlı olarak değişen) gen ve TF listeleri ve tekrarların elenmiş olduğu son gen ve TF listeleri EK-3 ve EK-4 olarak verilmiştir.

5.2. DEVRE ANALİZİ İÇİN KULLANILAN TF, MİRNA VE MRNA LİSTELERİ

5.2.1. MEME KANSERİ OLUŞUMUNUN ARAŞTIRILMASI İÇİN KULLANILAN LİSTELER

GSEA analiz aracı kullanılarak yapılan analizlerde verdiğimiz mRNA ve TF listesindeki (DE listeler) elemanlardan minimum 2 tanesi ile anlamlı olarak ilişkili miRNA listeleri elde edilmiştir. Bu miRNA'lar ile DE miRNA listesi karşılaştırıldığında 186 farklı miRNA olduğu görülmüştür DE listemizde olmayan bu 186 farklı miRNA verilerimizle anlamlı şekilde ilişki gösterdiği için devre analizinde kullanılacak miRNA listesine eklenmiştir.

miSEA ve GSEA analiz araçları kullanılarak yapılan analizlerde verdiğimiz miRNA, mRNA ve TF listesindeki (DE listeler) elemanlardan minimum 2 tanesini regüle eden TF listeleri elde edilmiştir. Bu TF'ler ile DE TF listesi karşılaştırıldığında 283 farklı TF olduğu görülmüştür. DE listemizde olmayan bu 283 farklı TF de verilerimizle anlamlı şekilde ilişki gösterdiği için devre analizinde kullanılacak TF listesine eklenmiştir.

Sonuç olarak meme kanseri oluşumunda önemli *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* devrelerinin tespiti için kullanılmak üzere 332 tane miRNA, 3131 tane gen ve 539 tane TF içeren 3 ayrı liste elde edilmiştir (Çizelge 5.1).

5.2.2. MEME KANSERİ GELİŞİMİNİN ARAŞTIRILMASI İÇİN KULLANILAN LİSTELER

GSEA analiz aracı kullanılarak yapılan analizlerde verdiğimiz mRNA ve TF listesindeki (DE listeler) elemanlardan minimum 2 tanesi ile anlamlı olarak ilişkili miRNA listeleri elde edilmiştir. Bu miRNA'lar ile DE miRNA listesi karşılaştırıldığında 191 farklı miRNA olduğu görülmüştür. DE listemizde olmayan bu 191 farklı miRNA verilerimizle anlamlı şekilde ilişki gösterdiği için devre analizinde kullanılacak miRNA listesine eklenmiştir.

miSEA ve GSEA analiz araçları kullanılarak yapılan analizlerde verdiğimiz miRNA, mRNA ve TF listesindeki (DE listeler) elemanlardan minimum 2 tanesini regüle eden TF listeleri elde edilmiştir. Bu TF'ler ile DE TF listesi karşılaştırıldığında 61 farklı TF olduğu görülmüştür. DE listemizde olmayan bu 61 farklı TF de verilerimizle anlamlı şekilde ilişki gösterdiği için devre analizinde kullanılacak TF listesine eklenmiştir.

Sonuç olarak meme kanseri gelişiminde önemli *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* devrelerinin tespiti için kullanılmak üzere 350 tane miRNA, 11067 tane gen ve 885 tane TF içeren 3 ayrı liste elde edilmiştir (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. DE analizleri, GSEA/miSEA analizleri ve analiz sonuçlarının bir araya koyulması ile elde edilen miRNA, TF ve gen sayılarını gösteren çizelge.

		DE	miSEA/GSEA	TOPLAM
OLUŞUM	miRNA	146	186	332
	Gen	3131	–	3131
	TF	256	283	539
GELİŞİM	miRNA	156	191	350
	Gen	11067	–	11067
	TF	824	61	885

miSEA ve GSEA analizleri sonucunda elde edilen ekstra miRNA ve TF listeleri EK-5 olarak verilmiştir.

DE listeler ile miSEA ve GSEA analizleri sonucunda elde edilen ekstra miRNA ve TF listelerinin birleştirilmesi ve tekrarların elenmesi ile edilen listeler EK-6 olarak verilmiştir. Bu listeler program için veri olarak kullanılan listelerdir.

5.3. GELİŞTİRİLEN PROGRAM İLE ELDE EDİLEN TF-MİRNA-HEDEF GEN DEVRELERİ

5.3.1. İKİLİ İLİŞKİLER

Şekil 4.7’de **1. kod bölümü** olarak görünen kısım kodun listeler elde edilen ilk kısmıdır. Bu bölümde lokal ağ analizinde verilerimize spesifik (DE analizi, GSEA ve miSEA analizleri ile) elde ettiğimiz ikili ilişkiler ile global ağ analizinde literatürden elde ettiğimiz ikili ilişkilerin kesişimi olan aktif motifler elde edilmiştir. Aktif ikili motifler miRNA-gen, miRNA-TF, TF-gen, TF-miRNA olmak üzere 4 tiptir.

1. kod bölümü sonucunda;

Meme kanseri oluşumu için, 19181 tane aktif miRNA-gen ikilisi, 3627 tane aktif miRNA-TF ikilisi, 1494 tane aktif TF-gen ikilisi ve 254 tane aktif TF-miRNA ikilisi elde edilmiştir (Çizelge 5.2).

Meme kanseri gelişimi için, 58748 tane aktif miRNA-gen ikilisi, 7829 tane aktif miRNA-TF ikilisi, 4403 tane aktif TF-gen ikilisi ve 277 tane aktif TF-miRNA ikilisi elde edilmiştir (Çizelge 5.2).

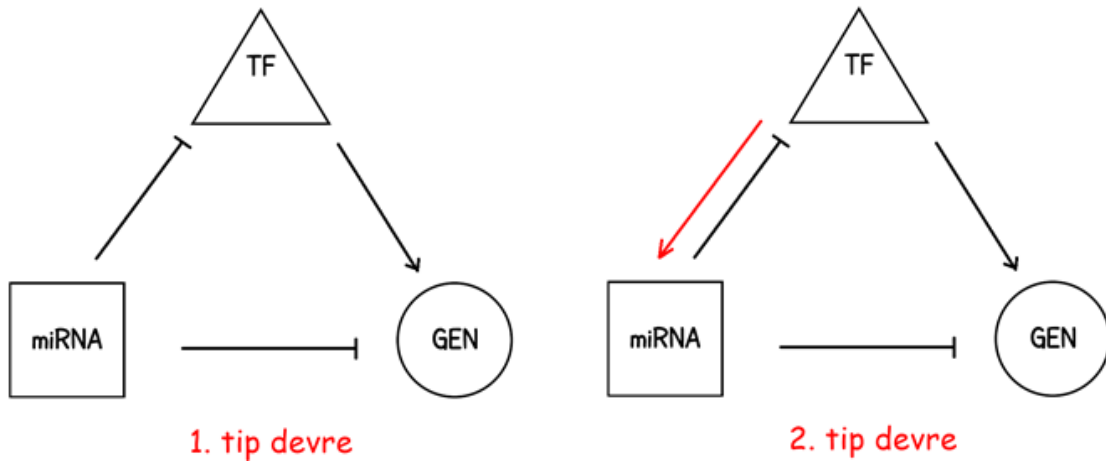
Çizelge 5.2. Meme kanseri oluşumunda ve gelişiminde rol oynayan aktif ikili motif sayıları.

	OLUŞUM	GELİŞİM
miRNA-gen	19181	58748
miRNA-TF	3627	7829
TF-gen	1494	4403
TF-miRNA	254	277

Meme kanseri oluşum ve gelişiminde aktif ikili motifler EK-7 olarak verilmiştir.

5.3.2. TF-MİRNA-HEDEF GEN ÜÇLÜ DEVRELERİ

Tez kapsamındaki nihai hedef olan meme kanseri ile ilişkili olabilecek *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* üçlü devrelerinin tespit edildiği aşama Şekil 4.7’de **2. kod bölümü** olarak gösterilmektedir. Bu kod basamağında 2 tip üçlü devre elde edilmiştir. Bu devreler Şekil 5.3’de şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 5.3. Program sonucunda elde edilen üçlü devre çeşitleri. 1. tip devrede miRNA-TF arasındaki ilişki tek yönlüken 2. tip devre çeşidinde bu ilişki karşılıklı olmaktadır.

5.3.2.1. Meme Kanseri Oluşumu İçin Önemli Olan Devreler

Şekil 5.3’de görülen meme kanseri oluşumu için önemli olan 1. tip üçlü devrelerden (a) 2280 (EK-8 olarak verilmiştir), 2. tip üçlü devreden (b) ise 128 tane (Çizelge 5.3) tespit edilmiştir.

Çizelge 5.3. Meme kanseri oluşumu için önemli 2. tip üçlü devre listesi ve listedeki miRNA’ların aile ve/veya küme bilgileri.

	miRNA	Aile/ Küme Bilgisi	TF	GEN
1	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	AURKB
2	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	BCL2
3	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	CDC7
4	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	DUSP1
5	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	EDEM3
6	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	NCBP1
7	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	RRM2
8	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	UHRF1
9	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	MYC	EZH2
10	hsa-let-7b-5p	let-7 ailesi	MYC	EZH2
11	hsa-let-7c-5p	let-7 ailesi, kromozom 21 kümesi	MYC	EZH2
12	hsa-let-7e-5p	let-7 ailesi	MYC	EZH2
13	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	ATAD2
14	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	ERCC1
15	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	FAM129A
16	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	RACGAP1
17	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	RND3
18	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	RRM2
19	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	VEGFA
20	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	ATAD2
21	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	FAM129A
22	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	GOLT1B
23	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	HMMR
24	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	MCL1
25	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	PTGER4
26	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	RACGAP1
27	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	RRM2
28	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	VEGFA
29	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F3	VEGFA
30	hsa-miR-1-3p	miR-1-133 kümesi	CEBPA	CCL2
31	hsa-miR-1-3p	miR-1-133 kümesi	CEBPA	FN1
32	hsa-miR-1-3p	miR-1-133 kümesi	CEBPA	HSD17B11

33	hsa-miR-1-3p	miR-1-133 kümesi	CEBPA	HSPA4
34	hsa-miR-1-3p	miR-1-133 kümesi	CEBPA	IGF1
35	hsa-miR-1-3p	miR-1-133 kümesi	CEBPA	IL6
36	hsa-miR-155-5p	kromozom 21 kümesi	SMAD4	ZFP36
37	hsa-miR-15a-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F3	CDK1
38	hsa-miR-15a-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F3	VEGFA
39	hsa-miR-15b-5p	–	E2F3	CDK1
40	hsa-miR-15b-5p	–	E2F3	VEGFA
41	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	AURKB
42	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	BCL2
43	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	BIRC5
44	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	CA2
45	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	CCNE1
46	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	CDK1
47	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	CDKN2A
48	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	CHEK1
49	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	CNN3
50	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	DIRAS3
51	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	EPB41L2
52	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	FGFR1
53	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	GOLT1B
54	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	KIF2C
55	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	KLC2
56	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	MCL1
57	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	NAB1
58	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	NPR3
59	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	PDK4
60	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	PIK3R3
61	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	PLK1
62	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	PPM1D
63	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	RACGAP1
64	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	SERPINB5
65	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	SMC2
66	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	TTLL5
67	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	VEGFA
68	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	YPEL5
69	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F3	CDK1
70	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F3	PLK1
71	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F3	VEGFA
72	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	ATAD2
73	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	BCL2
74	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	EPB41L2
75	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	FAM129A

76	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	FANCA
77	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	MCL1
78	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	PTGER4
79	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	RACGAP1
80	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	RND3
81	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	RRM2
82	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	VEGFA
83	hsa-miR-183-5p	miR-183-96-182 kümesi	EGR1	HPSE
84	hsa-miR-191-5p	miR-191-425 kümesi	EGR1	CCND2
85	hsa-miR-195-5p	miR-16 ailesi	E2F3	CDK1
86	hsa-miR-195-5p	miR-16 ailesi	E2F3	VEGFA
87	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	ATAD2
88	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	BCL2
89	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	CCNB1
90	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	FAM129A
91	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	KIF2C
92	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	KIT
93	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	MCL1
94	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	PTGER4
95	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	RACGAP1
96	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	RRM2
97	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	VEGFA
98	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	ATAD2
99	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	FAM129A
100	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	MCL1
101	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	PTGER4
102	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	RACGAP1
103	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	RRM2
104	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	VEGFA
105	hsa-miR-214-3p	–	TWIST1	EZH2
106	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	BCL2
107	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	EGFR
108	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	MMP2
109	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	MMP9
110	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	MUC1
111	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	TGFB1
112	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	TNFRSF10B
113	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	VEGFA
114	hsa-miR-223-3p	–	E2F1	ECT2
115	hsa-miR-223-3p	–	E2F1	STMN1
116	hsa-miR-25-3p	miR-106b-25 kümesi	PTEN	EZH2
117	hsa-miR-26a-5p	–	MYC	EZH2
118	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	ATAD2

119	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	BIRC5
120	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	FAM129A
121	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	MCL1
122	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	PTGER4
123	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	RACGAP1
124	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	RND3
125	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	RRM2
126	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	STC2
127	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	VEGFA
128	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	MYC	EZH2

Meme kanseri oluşumu için önemli 2. tip 128 tane devre detaylı analiz edildiğinde let 7 (**let-7a-5p, let-7b-5p, let-7c-5p ve let-7e-5p**), miR-17 (**miR-106a-5p, miR-106b-5p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p ve miR-93-5p**), miR-16 ailelerine (**miR-15a-5p, miR-16-5p ve miR-195-5p**) (family) ve miR-106a-363 (**miR-106-5p ve miR-20b-5p**), kromozom 21(**let-7c-5p ve miR-155-5p**), miR-106b-25 (**miR-106b-5p, miR-25-3p ve miR-93-5p**), miR-1-133 (**miR-1-3p**), miR-16 (**miR-15a-5p ve miR-16-5p**), miR-17-92 (**miR-17-5p ve miR-20a-5p**), miR-183-96-182 (**miR-183-5p**) ve miR-191-425 (**miR-191-5p**) gibi bazı kümelere (cluster) ait miRNA'ların çoğunlukta olduğu dikkat çekmektedir.

Bu devrelerin elemanlarına bakıldığında hsa-miR-16-5p devrelerde sıklığı en fazla olan miRNA'dır. 128 devrenin 31 tanesinde miRNA olarak miR-16-5p mevcuttur. TF'ler incelendiğinde ise E2F1'in en fazla devrede olan transkripsiyon faktörü olduğu görülmektedir. 128 devrenin 93 tanesinde TF olarak E2F1 bulunmaktadır. E2F1 haricinde transkripsiyon faktörü olarak MYC, E2F3, CEBPA, SMAD4, EGR1, TWIST1, STAT3 ve PTEN bulunmaktadır.

WebGeshtalt (91) analiz aracı kullanılarak devrelerde yer alan hedef genlerin rol aldığı yollara bakıldığında p53, hücre döngüsü (cell cycle), apoptoz gibi önemli yollarda anlamlı şekilde zenginleştikleri görülmektedir. Aynı zamanda listedeki 62 bağımsız genin 29 tanesinin (**HMMR, PLK1, TGFB1, MMP9, ERCC1, TNFRSF10B, PPM1D, RRM2, MCL1, CHEK1, AURKB, VEGFA, CCNB1, FANCA, CDK1, CCNE1, EGFR, EZH2, DIRAS3, MUC1, HPSE, BIRC5, RND3, MMP2, SERPINB5, BCL2, CCND2, KIT ve CDKN2A**) kanser ile 18 tanesinin (**HMMR, TGFB1, MMP9, ERCC1, PPM1D, CHEK1, VEGFA, CCNE1, EGFR, EZH2, DIRAS3, MUC1, BIRC5, MMP2, IGF1,**

SERPINB5, BCL2, UHRF1) ise direkt olarak meme kanseriyle ilişkili olduğu görülmüştür (sırasıyla, $p=1.07e-28$ ve $p=1.67e-20$).

5.3.2.2. Meme Kanseri Gelişimi İçin Önemli Olan Devreler

Şekil 5.3’de görülen meme kanseri gelişimi için önemli olan 1. tip üçlü devrelerden (a) 5977 (EK-8 olarak verilmiştir), 2. tip üçlü devreden (b) ise 279 (Çizelge 5.4) tane tespit edilmiştir.

Çizelge 5.4. Meme kanseri gelişimi için önemli üçlü devre listesi ve listedeki miRNA’ların aile ve/veya küme bilgileri.

	miRNA	Aile/ Küme Bilgisi	TF	GEN
1	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	ACTB
2	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	AURKB
3	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	BCL2
4	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	CALU
5	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	CCND1
6	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	CDC7
7	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	CDKN1A
8	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	DUSP1
9	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	EDEM3
10	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	MYC	EZH2
11	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	HIST2H2BE
12	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	IPO7
13	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	NCBP1
14	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	PEG10
15	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	RAB13
16	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	RRM1
17	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	RRM2
18	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	THBS1
19	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	UBE2Q1
20	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	UHRF1
21	hsa-let-7a-5p	let-7 ailesi	E2F1	UHRF2
22	hsa-let-7b-5p	let-7 ailesi	MYC	EZH2
23	hsa-let-7c-5p	let-7 ailesi, kromozom 21 kümesi	MYC	EZH2
24	hsa-let-7e-5p	let-7 ailesi	MYC	EZH2
25	hsa-let-7e-5p	let-7 ailesi	MYC	NF1
26	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	ATAD2
27	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	CCND1
28	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	CDKN1A
29	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	CHST14

30	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	ERCC1
31	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	FAM129A
32	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	MDM2
33	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	NOTCH2
34	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	NPAT
35	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	RACGAP1
36	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	RB1
37	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	RRM2
38	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	SPRED1
39	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	TP53INP1
40	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	VEGFA
41	hsa-miR-106a-5p	miR-17 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	ZNFX1
42	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	ABCA1
43	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	ATAD2
44	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	CCND1
45	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	CDKN1A
46	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F3	CDKN1A
47	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	FAM129A
48	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	GOLT1B
49	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	HMMR
50	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	IPO7
51	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	MCL1
52	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	MDM2
53	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	NPAT
54	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	PTGER4
55	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	RACGAP1
56	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	RB1
57	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	RHOBTB2
58	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	RPA2
59	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	RRM2
60	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	SPRED1
61	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	TP53INP1
62	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	VEGFA
63	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F3	VEGFA
64	hsa-miR-106b-5p	miR-17 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	ZNFX1
65	hsa-miR-1-3p	miR-1-133 kümesi	CEBPA	CCL2
66	hsa-miR-1-3p	miR-1-133 kümesi	CEBPA	FN1
67	hsa-miR-1-3p	miR-1-133 kümesi	CEBPA	HSD17B11
68	hsa-miR-1-3p	miR-1-133 kümesi	CEBPA	HSPA4
69	hsa-miR-1-3p	miR-1-133 kümesi	CEBPA	IGF1
70	hsa-miR-146a-5p	-	NFKB1	TRIM22
71	hsa-miR-155-5p	kromozom 21 kümesi	SMAD4	ZFP36
72	hsa-miR-15a-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F3	CDK1

73	hsa-miR-15a-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F3	CDKN1A
74	hsa-miR-15a-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F3	TRIM28
75	hsa-miR-15a-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F3	VEGFA
76	hsa-miR-15b-5p	–	E2F3	CDK1
77	hsa-miR-15b-5p	–	E2F3	CDKN1A
78	hsa-miR-15b-5p	–	E2F3	VEGFA
79	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	ABCE1
80	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	ACTB
81	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	AMPD1
82	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	AURKB
83	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	BCL2
84	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	BIRC5
85	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	BMI1
86	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	BRCA1
87	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	C11orf75
88	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	CA2
89	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	CADPS2
90	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	CALU
91	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	CCND1
92	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	CCNE1
93	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	CDCA4
94	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	CDCA7L
95	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	CDK1
96	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F3	CDK1
97	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	CDKN1A
98	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F3	CDKN1A
99	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	CDKN2A
100	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	CHAC1
101	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	CHEK1
102	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	CNN3
103	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	DIRAS3
104	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	DNAJA1
105	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	DUSP5
106	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	FGFR1
107	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	FZD10
108	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	GLCE
109	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	GOLT1B
110	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	HIST2H2BE
111	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	HS6ST3
112	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	HSPA5
113	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	IGF2R
114	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	IPO7
115	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	KDR

116	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	KIF2C
117	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	MAPK8
118	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F3	MAPK8
119	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	MCL1
120	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	MCM5
121	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	MLLT11
122	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	NAB1
123	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	NOTCH2
124	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	NPR3
125	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	OTUD7B
126	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	PDK4
127	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	PIM1
128	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	PLK1
129	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F3	PLK1
130	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	PNRC2
131	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	PPM1D
132	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	PTBP2
133	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	RACGAP1
134	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	RBM15B
135	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	RSL1D1
136	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	SERPINB5
137	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	SERPINE1
138	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	SMC2
139	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	SPRED1
140	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	TMEM109
141	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	NFKB1	TNFAIP3
142	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	TTLL5
143	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	UBE2Q1
144	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	UHRF2
145	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	VEGFA
146	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F3	VEGFA
147	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	VIM
148	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	WNT5A
149	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	YWHAE
150	hsa-miR-16-5p	miR-16 ailesi, miR-16 kümesi	E2F1	YWHAH
151	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	ABCA1
152	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	ATAD2
153	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	BCL2
154	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	CCND1
155	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	CDKN1A
156	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	CHST14
157	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	DNMT1
158	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	FAM129A

159	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	FANCA
160	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	MCL1
161	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	MDM2
162	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	NOTCH2
163	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	NPAT
164	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	PTGER4
165	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	PTPRO
166	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	RACGAP1
167	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	RB1
168	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	RPA2
169	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	RRM2
170	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	SPRED1
171	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	THBS1
172	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	TNF
173	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	TP53INP1
174	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	VEGFA
175	hsa-miR-17-5p	miR-17 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	ZNFX1
176	hsa-miR-183-5p	miR-183-96-182 kümesi	EGR1	CCND1
177	hsa-miR-183-5p	miR-183-96-182 kümesi	EGR1	HPSE
178	hsa-miR-195-5p	miR-16 ailesi	E2F3	CDK1
179	hsa-miR-195-5p	miR-16 ailesi	E2F3	CDKN1A
180	hsa-miR-195-5p	miR-16 ailesi	E2F3	VEGFA
181	hsa-miR-19a-3p	miR-17-92 kümesi	MYC	NF1
182	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	ABCA1
183	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	ATAD2
184	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	BCL2
185	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	CCNB1
186	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	CCND1
187	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	CDKN1A
188	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	DNMT1
189	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	FAM129A
190	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	KIF2C
191	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	MCL1
192	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	MDM2
193	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	NPAT
194	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	PTGER4
195	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	PTPRO
196	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	RACGAP1
197	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	RB1
198	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	RPA2
199	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	RRM2
200	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	SPRED1
201	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	THBS1

202	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	TP53INP1
203	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	VEGFA
204	hsa-miR-20a-5p	miR-16 ailesi, miR-17-92 kümesi	E2F1	ZNFX1
205	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	ABCA1
206	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	ATAD2
207	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	BRCA1
208	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	CCND1
209	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	CDKN1A
210	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	FAM129A
211	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	MCL1
212	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	MDM2
213	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	NPAT
214	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	PTGER4
215	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	RACGAP1
216	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	RB1
217	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	RPA2
218	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	RRM2
219	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	SPRED1
220	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	TP53INP1
221	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	VEGFA
222	hsa-miR-20b-5p	miR-16 ailesi, miR-106a-363 kümesi	E2F1	ZNFX1
223	hsa-miR-210-3p	–	HIF1A	BNIP3
224	hsa-miR-210-3p	–	HIF1A	LDHA
225	hsa-miR-210-3p	–	HIF1A	TFRC
226	hsa-miR-214-3p	–	TWIST1	EZH2
227	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	BCL2
228	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	EGFR
229	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	FAS
230	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	ICAM1
231	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	KAT6A
232	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	MMP2
233	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	MMP9
234	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	MUC1
235	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	MYD88
236	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	PTEN
237	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	SOCS1
238	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	TGFB1
239	hsa-miR-21-5p	–	NFKB1	TNFAIP3
240	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	TNFRSF10B
241	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	USP7
242	hsa-miR-21-5p	–	STAT3	VEGFA
243	hsa-miR-223-3p	–	E2F1	ABCB1
244	hsa-miR-223-3p	–	E2F1	ECT2

245	hsa-miR-223-3p	-	E2F1	MDM2
246	hsa-miR-223-3p	-	E2F1	PTBP2
247	hsa-miR-223-3p	-	E2F1	STMN1
248	hsa-miR-25-3p	miR-106b-25 kümesi	PTEN	EZH2
249	hsa-miR-26a-5p	-	MYC	EZH2
250	hsa-miR-27a-3p	-	RUNX1	FHL2
251	hsa-miR-27a-3p	-	RUNX1	NF1
252	hsa-miR-34a-5p	-	TP53	IKBKB
253	hsa-miR-34a-5p	-	MYC	NF1
254	hsa-miR-424-5p	-	HIF1A	CCND1
255	hsa-miR-424-5p	-	HIF1A	FGF2
256	hsa-miR-424-5p	-	HIF1A	RECK
257	hsa-miR-424-5p	-	HIF1A	VEGFA
258	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	ABCA1
259	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	ATAD2
260	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	BIRC5
261	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	CCND1
262	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	CDKN1A
263	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	MYC	EZH2
264	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	FAM129A
265	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	MCL1
266	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	MCM5
267	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	MDM2
268	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	NPAT
269	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	PTGER4
270	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	RACGAP1
271	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	RB1
272	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	RPA2
273	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	RRM2
274	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	SPRED1
275	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	STC2
276	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	TP53INP1
277	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	UBE2M
278	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	VEGFA
279	hsa-miR-93-5p	miR-16 ailesi, miR-106b-25 kümesi	E2F1	ZNFX1

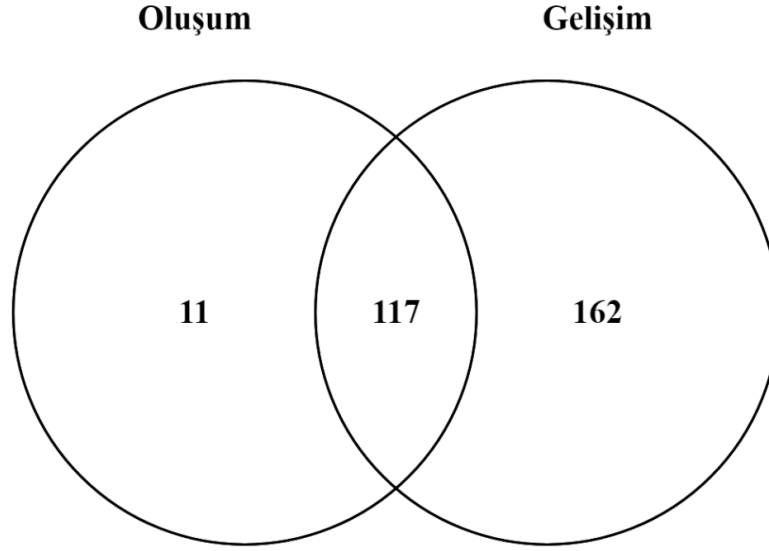
Meme kanseri gelişimi için önemli olan devrelere bakıldığında tıpkı oluşumda önemli devrelerde olduğu gibi bazı aile (family) ve kümeler (cluster) ait miRNA'lar olduğu görülmektedir. Let 7 (**let-7a-5p, let-7b-5p, let-7c-5p ve let-7e-5p**), miR-17 (**miR-106a-5p, miR-106b-5p, miR-17-5p, miR-20a-5p, miR-20b-5p ve miR-93-5p**), miR-16 ailelerine (**miR-15a-5p, miR-16-5p ve miR-195-5p**) (family) ve miR-106a-363 (**miR-106-5p ve**

miR-20b-5p), kromozom 21(**let-7c-5p** ve **miR-155-5p**), miR-106b-25 (**miR-106b-5p**, **miR-25-3p** ve **miR-93-5p**), miR-1-133 (**miR-1-3p**), miR-16 (**miR-15a-5p** ve **miR-16-5p**), miR-17-92 (**miR-19a-3p**, **miR-17-5p** ve **miR-20a-5p**) ve miR-183-96-182 (**miR-183-5p**) gibi bazı kümeler (cluster) ait miRNA'ların çoğunlukta olduğu dikkat çekmektedir.

Bu devrelerin elemanlarına bakıldığında yine hsa-miR-16-5p devrelerde sıklığı en fazla olan miRNA'dır. 279 devrenin 72 tanesinde miRNA olarak miR-16-5p mevcuttur. TF'ler incelendiğinde ise tıpkı meme kanseri oluşumunda önemli devrelerde olduğu gibi E2F1'in en fazla devrede olan transkripsiyon faktörü olduğu görülmektedir. 279 devrenin 215 tanesinde TF olarak E2F1 bulunmaktadır. E2F1 haricinde transkripsiyon faktörü olarak oluşumda da önemli olan MYC, E2F3, CEBPA, SMAD4, EGR1, TWIST1, STAT3, PTEN'e ek ve gelişime spesifik olarak NFKB1, HIF1A, RUNX1 ve TP53 bulunmaktadır.

WebGeshtalt (91) analiz aracı kullanılarak devrelerde yer alan hedef genlerin rol aldığı yollara bakıldığında p53, hücre döngüsü (cell cycle), apoptoz gibi kanserde önemli yollarda anlamlı şekilde zenginleştikleri görülmektedir. Aynı zamanda listedeki 132 bağımsız genin 51 tanesinin (**MMP9, MAPK8, NF, , RECK, KDR, PPM1D, RRM1, CHEK1, CDKN1A, CCNB1, NPAT, CCNE1, THBS1, EZH2, WNT5A, DIRAS3, CCND1, RB1, MDM2, SOCS1, PTEN, MMP2, BCL2, BNIP3, PIM1, DNMT1, HMMR, TGFB1, PLK1, IGF2R, ERCC1, TNFRSF10B, HSPA5, RRM2, VIM, MCL1, BRCA1, AURKB, VEGFA, FANCA, CDK1, EGFR, FAS, MUC1, HPSE, BIRC5, ABCB1, RHOBTB2, SERPINB5, BMI1, CDKN2A**) kanser ile 27 tanesinin (**HMMR, TGFB1, MMP9, ERCC1, PPM1D, CHEK1, CDKN1A, BRCA1, VEGFA, CCNE1, EGFR, EZH2, CCND1, DIRAS3, MUC1, RB1, MDM2, BIRC5, PTEN, MMP2, ABCB1, IGF1, RHOBTB2, SERPINB5, BCL2, BMI1, UHRF1**) ise direkt olarak meme kanseriyle ilişkili olduğu görülmüştür (sırasıyla, $p=2.22e-46$ ve $p=7.92e-27$).

5.3.2.3. Meme Kanseri Oluşum ve Gelişim Süreçlerinin Devreler Açısından Karşılaştırılması



Şekil 5.4. 2. Tip devrelerinin meme kanserinin oluşum ve gelişim süreçleri açısından karşılaştırılmasına ait venn şeması. 11 tane devrenin meme kanseri oluşumu için, 162 tane devrenin ise meme kanseri gelişimi için önemli olduğu görülmektedir.

2. Tip devre listeleri Venny 2.1.0 analiz aracı kullanılarak karşılaştırıldığında 11 tane devrenin sadece meme kanseri oluşum sürecinde öne çıktığı tespit edilmiştir. Bu devreler şuanlardır;

- (1) hsa-miR-1-3p → CEBPA → IL6,
- (2) hsa-miR-106a-5p → E2F1 → RND3,
- (3) hsa-miR-16-5p → E2F1 → EPB41L2,
- (4) hsa-miR-16-5p → E2F1 → KLC2,
- (5) hsa-miR-16-5p → E2F1 → PIK3R3,
- (6) hsa-miR-16-5p → E2F1 → YPEL5,
- (7) hsa-miR-17-5p → E2F1 → EPB41L2,
- (8) hsa-miR-17-5p → E2F1 → RND3,

(9) hsa-miR-20a-5p → E2F1 → KIT,

(10) hsa-miR-93-5p → E2F1 → RND3,

(11) hsa-miR-191-5p → EGR1 → CCND2

5.4. SİSTEMİN FAYDA ANALİZİ SONUÇLARI

Yukarıda detaylı olarak anlatıldığı gibi (4.2.3. miSEA VE GSEA ANALİZLERİ) miRNA, TF ve hedef genler listelerinin belirlenmesinde yalnızca DE analizi ile sınırlanmamak için GSEA ve miSEA araçları sistemimize entegre edilmiştir. Bu araçlar kullanılarak miRNA, mRNA ve TF listelerimizdeki (DE listeler) elemanlarla anlamlı şekilde bağlantılı olan TF ve miRNA'ların gözden kaçırılmaması, listelerimizin DE bağımsız olarak zenginleştirilmesi hedeflenmiştir.

Tez çalışması kapsamında geliştirilen bu zenginleştirme tabanlı (Enrichment-based) devre analizi sisteminin veri kaybının engellenmesine olan faydasının tespit edilmesi için girdi olarak sadece DE listelerin kullanıldığı yeni analizler gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak zenginleştirme tabanlı yöntemimizin tespit edilen devre sayısını önemli ölçüde arttırdığı ve veri kaybını önemli ölçüde engelleyebileceği görülmüştür;

- Meme kanseri oluşumunun araştırılması için kullanılan verilerden zenginleştirme tabanlı (Enrichment-based) devre analizi sistemimiz kullanılarak ikinci tip üçlü devreden 128 tane elde edilmişken yalnızca DE listeler ile yapılan analizde yalnızca 38 tane devre elde edilmiştir.
- Meme kanseri gelişiminin araştırılması için kullanılan verilerden zenginleştirme tabanlı (Enrichment-based) devre analizi sistemimiz kullanılarak ikinci tip üçlü devreden 279 tane elde edilmişken yalnızca DE listeler ile yapılan analizde yalnızca 156 tane devre elde edilmiştir.

Fayda analizi sonuçları EK-9 olarak verilmiştir.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Gen ifadesi hücreye ve zamana göre değişiklik göstermesi ile biyolojik süreçlerdeki en önemli mekanizmalardan birisidir ve düzenlenmesindeki aksaklıkların hastalıklarla olan birebir ilişkisi bilinmektedir. Gen ifadesinin düzenlenmesindeki görevli elemanların (miRNA, transkripsiyon faktörü vb.) arasındaki ilişki de biyolojik mekanizmaların anlaşılmasında oldukça önemlidir.

Bu tez çalışmasında meme kanserinin oluşum ve gelişiminde rol alan gen ifadesi-düzenleyici mekanizmaların sistem biyolojisi yaklaşımı ile ortaya çıkarılması, tanı ve tedavi sürecinde hedef olabilecek düzenleyici devrelerin tanımlanması hedeflenmiştir. Bugüne kadar farklı hastalıklar üzerinde gerçekleştirilen çok sayıda çalışmada özellikle regülatif elemanların birbirleri ile olan ikili ilişkileri ortaya konmuştur ve bu ilişkileri tanımlayabilecek programlar geliştirilmiştir. Ayrıca *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* üçlü devrelerinin araştırıldığı çalışmalar olmakla birlikte özellikle bir hastalığın oluşum ve gelişimi üzerine detaylı analiz yapılmamıştır. Özellikle meme kanserinde hücrede ifade düzenlemesine yönelik devre tanımlaması bugüne kadar yapılan çalışmalarda bulunmamaktadır. Bu tez çalışması bu açıdan literatüre önemli bir katkı sağlamaktadır.

Zenginleştirme tabanlı devre analiz programı

Çalışmanın program geliştirme bölümü iki ana kısımdan oluşmaktadır. Birinci analiz hattını oluşturan süreç probleme özgü lokal düzenleyici ağı oluşturulduğu, mRNA ve miRNA deneylerinin bütünleşik analizinin yapıldığı kısımdır. Meme kanseri oluşumunu araştırabilmek için seçilen mRNA ve miRNA verilerine önce DE (Differential Expression) analizi uygulanmış ve meme tümör ve meme normal dokularında farklılık gösteren gen ve miRNA setleri listelenmiştir. Aynı analiz meme kanseri gelişimi olarak ifade ettiğimiz artan derecelerdeki meme tümörleri arasında gerçekleştirilmiş ve 1., 2. ve 3. derece tümör örnekleri arasında farklılık gösteren mRNA ve miRNA listeleri oluşturulmuştur. Bu analize göre farklı ifade olan genler ve miRNA'lar seçilerek bir sonraki adıma geçilmiştir. Literatürde bu devreler ile ilgili yapılmış bütün çalışmalarda dikkate alınan miRNA, TF ve gen listeleri sadece ya DE analizine dayanarak ya da sadece statik ilişkilere bakılarak

seçilmektedir (38,41,43,92). Ancak gerek kullanılan istatistiksel yöntemlerin olası hataları gerekse ifadesi iki durum arasında önemli ölçüde değişmeyen miRNA ve TF'lere bağlı olarak önemli ağ düğümleri kaçırılıyor olabilir. 2013 yılında alzheimer hastalığında TF-miRNA düzenleyici devrelerini araştıran bir çalışmada araştırmacılar DE listeler ile statik bilgileri birleştirmiş ve bunun sonucunda DE değerinin aktif devrelerin tespiti için yeterli olamayacağını, anlamlı şekilde ifade değişikliği olmayan elemanların da anahtar düzenleyiciler olabileceğini söylemişlerdir (43). Bu nedenle DE analizlerine ek olarak DE listelerinde bulunmayan TF'lerin ve miRNA'ların belirlenebilmesi için hedef genler üzerinde elde ettiğimiz gen ve miRNA listelerini istatistiksel olarak anlamlı şekilde ilişkili olduğu diğer genleri zenginleştiren GSEA (Gene Set Enrichment Analysis), miRNA'lar üzerinde ise miSEA analizleri uygulanmıştır. Bu sayede kendi ifadeleri önemli ölçüde değişmediği halde hedeflediği gen/miRNA kümeleri o deneyde zenginleşen TF ve miRNA'lar da bir sonraki adıma geçebilmiştir. Böylece verilere özgü lokal ağda yer alması beklenen tüm elemanların veri kaybı olmadan belirlenebildiği öngörülmektedir. Tez çalışması kapsamında geliştirilen sistemin DE ile sınırlı olmayan zenginleştirme tabanlı (Enrichment-based) bir sistem olmasının faydası, girdi olarak sadece DE listelerin kullanılmasıyla devre sayısının önemli ölçüde azalmasıyla görülmüştür (zenginleştirme analizi devreden çıkartıldığında; meme kanseri oluşumunda önemli olan listelerde %70, meme kanseri gelişimi için önemli olan listelerde % 44 oranında azalış olmaktadır). Tasarladığımız yöntemin tespit edilen devre sayısını önemli ölçüde arttırdığı ve bu sayede veri kaybını önemli ölçüde engelleyebileceği görülmektedir. Bu da sistemimizi literatürdeki yöntemlerden farklı, önemli ve özgün bir yere koymaktadır ve kurgusu literatürdeki önemli bir boşluğu doldurmaktadır. Tez kapsamında meme kanseri oluşumu ve gelişimi özelinde sonuçlar elde edilmiştir ancak bu sistemi, algoritmayı ve kodu dinamik olarak her hastalık veya karşılaştırma durumu (Ör: yaş, cinsiyet, ilaç uygulaması gibi) için kullanmak mümkündür.

Veri kaybını engellemek için dikkate alınan bir diğer nokta da miRNA isimlendirmelerinden kaynaklanabilecek kayıpların önüne geçmektir. miRBAs'in farklı versiyonlarında isimlendirmede yapılan değişiklikler sonucunda literatürde farklı isimlendirmelerle karşılaşılabilir. "miRNA isimlendirme sorunlarının aşılması" başlığı altında detaylandırılmış olan miRNA isimlendirme sorunlarının aşılması için miRNAmeConverter aracı kullanılarak miRNA isimlendirmeleri miRBase'in 21.

versiyonuna getirilmiştir. Örnek olarak listelerimizde mevcut olan miRNA'lerden bir tanesi olan hsa-miR-1-3p 2011 yılının Nisan ayında miRBase'in 17. Versiyonunda değişmiş olan isimlendirme sisteminden önce hsa-miR-1 olarak isimlendirilmekteydi. Farklı kaynaklardan gelen listeleri kullandığımız bu çalışmada, eğer isimlendirmeler için bir versiyon eşitlenmesi yapılmamış olsaydı aynı sekansı temsil eden bu iki ayrı isim sebebiyle veri kaybı yaşanacaktı. Yani hsa-miR-1-3p'nin düzenleyici olarak var olduğu devreler aktif devre listemizde mevcut olmayacaktı. İsimlendirmelerin standardize edilmesi farklı çalışmalardan gelen verilerin kıyaslanabilir hale getirilmesine olanak sağlamış ve bu sebeple olabilecek veri kaybını sıfıra indirmiştir.

Devre analiz programının meme kanseri verilerine uygulanması

Devre analiz programı meme kanseri oluşum ve gelişim süreçlerinde anlamlı olarak rol alan *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* devrelerinin açığa çıkartılması için tümör – normal veri setlerine ve 1., 2. ve 3. derece tümör veri setlerine uygulanmıştır. Her iki durumda da önemli olan devrelerdeki miRNA'lara bakıldığında belirgin bir örüntü (desen, pattern) gözlemlenmektedir. Bu devreler genellikle miR-106b-25, miR-106a-363 ve miR17-92 gibi miRNA kümelerinin elemanlarını içermektedir. Bu kümelerin E2F'ler ile karşılıklı ilişkisi literatürde kanıtlanmıştır. Örneğin miR-17-92 kümesi tümör oluşumunu düzenler ve E2F1 translasyonunu etkileyerek onkogenler olarak işlev görür [84]. Bunu doğrulayacak şekilde EK-8'de verilen miR-TF ilişkisinin karşılıklı olmadığı (1. tip devre) listelere bakıldığında miRNA çeşitliliğinin arttığı ve bu oranda TF çeşitliliğinin de arttığı gözlemlenmektedir. Bu düşündürmektedir ki belli miRNA'lar TF olarak E2F'ler ile ilişki halindedir ve bu seçim karşılıklı olabilir.

Çizelge 5.3 ve Çizelge 5.4'teki devrelerde (bu devre tipinde karşılıklı bir TF-miR ilişkisi vardır; Şekil 5.3, 2. tip devre) en sık görülen TF'in E2F1 olması bu regülatif elemanın miRNA regülasyonunda seçildiğine işaret etmektedir ki literatürde bunu destekleyen çalışmalar bulunmaktadır. 2010 yılında kanserde E2F-miRNA crosstalk (çapraz konuşma, çapraz etkileşim) üzerine bir derleme makalesi yayımlanmıştır ve hücrenin kaderini belirleyen kararda bu ikili etkileşimin önemine işaret etmiştir. E2F1 ve onun tarafından düzenlenen miRNA'ların düzenleyici görev yaptığı hücresel içeriğe bağlı olarak değişen özgün fonksiyonlara sahip olduğunun altını çizen bu makalede, E2F1- miR-17-92

kümesinin pro-tümörjenik ve anti-tümörjenik aktivite gösterebildiğine dair raporlar detaylandırılmıştır. Meme kanserinde bir örnek olarak miR-17-92 kümesi üyelerinden; miR-17-5p ve miR-20a'nın ifade düzeylerinin, insan meme tümörlerinde ve hücre hatlarında siklin D1 (CCND1) seviyeleri ile ters orantılı olduğu verilmiştir. Cyclin D1'in, hücre döngüsünde G1'den S'e geçişte ve tümör oluşumunda önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. CCND1'in proliferatif fonksiyonunu sınırlandırarak S fazı girişini engelleyen bu miRNA'ların bir hedefi olduğunu gösterilmiştir (93). Çizelge 5.4'teki meme kanseri gelişiminde önemli olan devrelere bakıldığında bu sonuçlarla paralel olarak hsa-miR-17-5p→E2F1→CCND1 ve hsa-miR-17-5p→E2F1→CCND1'in devrelerimiz arasında olduğu görülmektedir. Bu konuda yazılmış bir başka derleme ise E2F1'e bağlı şekilde VEGF ifadesi düzenlenmesinin anjiyogenez yanıtından birebir sorumlu olduğunu belirtmektedir. Tez çalışması kapsamında belirlenen meme kanseri oluşum ve gelişiminde önemli devrelere baktığımızda bu iki elemanın da olduğu birçok devre olduğu görülmektedir. Buna meme kanseri gelişiminde önemli devreler arasında mevcut olan miR-16 ailesi/miR-17 ailesi→E2F1→VEGFA devreleri örnek verilebilir. Anjiyogenezin tümör gelişimindeki en önemli mekanizmalardan biri olduğu düşünüldüğünde bu sonuçlar karşılıklı olarak birbirini doğrular niteliktedir (94).

Çizelge 5.3 ve Çizelge 5.4'teki devrelerde yer alan hedef genler ile yapılan yolak analizleri bu genlerin kanserde önemli olan p53, MAPK, mTOR, Jak-STAT, VEGF sinyal yolları, hücre döngüsü, apoptoz gibi yollarlarda zenginleşmesiyle sonuçlanmıştır. Literatürle uyumlu olarak özellikle E2F1'in yer aldığı regülasyon sistemlerinde anjiyogenez ve apoptoz gibi yolların öne çıktığı veriler mevcuttur (30,93–95).

Araştırma bulgularında da bahsedildiği gibi meme kanseri oluşum ve gelişiminde önemli olan devrelerde sıklığı en fazla olan elemanlar miR-16 ailesi ve miR-16 kümesinin bir üyesi; miR-16-5p ve E2F1'dir. Hedeflerden sıklığı en çok olan gen ise VEGFA'dır. Bu üçlüyü içeren miR-16-5p→E2F1→VEGFA devresi iki listede de mevcuttur. Literatüre bakıldığında bu devrenin elemanlarının birbirleriyle ve meme kanseriyle olan ilişkilerini gösteren birçok çalışma yapılmıştır. hsa-miR-16-5p'nin apoptozu desteklediği, tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı, ifadesindeki artışın hücre büyümesini ve proliferasyonu azalttığı çalışmalarla gösterilmiştir. Aynı zamanda E2F1'in meme kanserinde tümör oluşumunu ve metastazı regüle ettiği de yapılan deneysel çalışmalar ile kanıtlanmıştır (95).

VEGFA ifadesinin ise E2F kaybı ile azaldığı dolayısıyla aralarındaki ikili bir ilişki olduğu gösterilmiştir (95). 2017 yılında meme kanserinde miR-16-5p'nin artışının proliferasyonu ve invazyonu baskıladığı ve bunu VEGFA ilişkili olarak apoptoz yolağını kullanarak gerçekleştirdiğini gösteren bir çalışma bulunmaktadır (96).

Bu karşılaştırmalara bakıldığında literatürle bu kadar paralellik göstermesi listelerimizin doğruluğunu kanıtlar niteliktedir. Bu göstermektedir ki listelerimizdeki diğer elemanlar literatürde daha önce meme kanseriyle ve/veya birbirleriyle ilişkilendirilmemiş biyobelirteç adayları olabilir.

Kıyaslama

Çizelge 5.3'deki meme kanseri oluşumunda önemli (128 tane) ve Çizelge 5.4'teki meme kanseri gelişiminde önemli (279 tane) devreler karşılaştırıldığında 117 devrenin iki durumda da etkin olduğu görülmüştür. Normal hücreden kanser hücresine doğru gidişte giderek artan şekilde bozulan mekanizmaların çoğunlukla sağlıklı hücredeki kontrol mekanizmaları olduğu düşünüldüğünde bu öngörülebilir bir sonuçtur (97,98). 11 tane devre ise meme kanseri oluşumuna spesifik görülmektedir (Şekil 5.4). Bu devreler; hsa-miR-1-3p→ CEBPA→ IL6, hsa-miR-106a-5p→ E2F1→ RND3, hsa-miR-16-5p→ E2F1→ EPB41L2, hsa-miR-16-5p→ E2F1→ KLC2, hsa-miR-16-5p→ E2F1→ PIK3R3, hsa-miR-16-5p→ E2F1→ YPEL5, hsa-miR-17-5p→ E2F1→ EPB41L2, hsa-miR-17-5p→ E2F1→ RND3, hsa-miR-20a-5p→ E2F1→ KIT, hsa-miR-93-5p→ E2F1→ RND3, hsa-miR-191-5p→ EGR1→ CCND2'dir.

Bu devrelerin oluşuma spesifik devreler olduğu göz önünde bulundurulduğunda normal meme hücresi yapısından kanser hücresine dönüşte aktif rolü olan devreler olduğu düşünülebilir. Bu devrelerin elemanlarına bakıldığında genelde apoptoz ve proliferasyonda görev yapan miRNA'lar olduğu görülmektedir (99–102). Kanser oluşma mekanizması düşünüldüğünde ise apoptoz mekanizmasının bozulduğu proliferasyonun kontrolsüzce arttığı göz önünde bulundurulduğunda bu mekanizmalarda rol oynayan elemanların aktif olması beklenebilir. Örneğin bu 11 devredeki miRNA'lardan hsa-miR-93-5p'nin apoptoz, hücre döngüsü, proliferasyon ve diferansiyasyon ile ilişkili olduğu; hsa-miR-17-5p, hsa-miR-20a'nın ise bunlara ek olarak anjiyogeneze de rol aldığı bilinmektedir (102). Listedeki devrelerden hsa-miR-191-5p→ EGR1→ CCND2'yi oluşturan elemanlar detaylı

olarak incelendiğinde miR-191, meme kanserinde iki şekilde etkinlik göstermektedir. yüksek miR-191/425 seviyeleri güçlü bir tümör baskılayıcı genin baskılanmasıyla (EGR1), proliferasyona neden olmaktadır, ifadesinin düşmesi ise agresif meme kanseri hücrelerine bir proliferatif avantaj sağlayan CCND2 gibi önemli modulatorlerin yüksek ifadesi ile sonuçlanmaktadır. Sonuç olarak miR-191/425 kümesinin meme kanseri hücrelerinin kanser başlatılması ve ilerlemesi üzerinde temel bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (101).

6.2. SONUÇ

Bu tez çalışmasında zenginleştirme tabanlı özgün bir sistem ve devre analiz aracı geliştirilmiştir. Bu sistemin mimarisi; miRNA isimlerinin standardize edilmesi, literatürde var olan veri (global) ile kendi verimizi (lokal) bir araya getirme imkanı vermesi, sadece DE ile sınırlı kalmaması zenginleştirme analizlerinin (miSEA, GSEA) de entegre edilmiş olması açısından literatürdeki yöntemlerden farklı ve özgündür. Veri kaybının minimuma indirildiği bu sistemi, algoritmayı ve kodu araştırmacılar her hastalık veya karşılaştırma durumu için kolaylıkla kullanabileceklerdir.

Geliştirilen sistem ve devre analiz aracında literatürde daha önce yapılmış meme kanseri ve normal dokuların miRNA, TF ve gen ifade (expression) verileri girdi olarak kullanılmış ve meme kanseri oluşumunda (tümör&normal) ve gelişiminde (tümör derecesi/ grade) rol alan *Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen* devreleri (biological circuits) olarak ortaya çıkartılmıştır. Meme kanseri oluşum ve gelişiminde önemli devrelerin araştırıldığı bir çalışma literatürde mevcut değildir. Bu nedenle sonuçlar literatürdeki önemli bir boşluğu doldurmaktadır.

Çalışmada elde edilen devreler ile literatür arasında kuvvetli ilişkiler olduğu tespit edilmiştir bu da geliştirmiş olduğumuz sistemin güvenilir olduğuna ve elimizdeki listelerde olan diğer elemanların da literatürde henüz meme kanseri ile ilişkilendirilmemiş potansiyel biyobelirteç adayları ve terapi hedefleri olabileceğine işaret etmektedir.

İleride yapılması düşünülen çalışmalar;

- İlk olarak geliştirilen sistemi kullanıcıya kolaylık sağlayabilecek daha organize bir hale getirmek ve sadece sistemin sunulduğu bir şekilde yayımlamak amaçlanmaktadır. Bu

sayede araştırmacıların kolaylıkla indirip analiz yapabilecekleri ve farklı durumlar için kullanabilecekleri pratik bir araç sunulmuş olacaktır.

- Elde edilen devre listelerinden ön plana çıkan adaylarla ileri düzey fonksiyonel çalışmalar gerçekleştirmek amaçlanmaktadır. Bu sayede literatürde daha önce çalışılmamış biyobelirteç adayları deneysel olarak da tespit edilmiş olacak ve sistem biyolojisi yaklaşımı ile elimizdeki bütün bilgileri yan yana koyarak meme kanseri oluşum ve gelişimi ile ilgili daha kapsamlı sonuçlar elde edilmiş olacaktır.



7. KAYNAKLAR

1. Jane B. Reece, Lisa A. Urry, Michael L. Cain, Steven A. Wasserman, Peter V. Minorsky RBJ. Campbell Biology.
2. Latchman S. INTRODUCTORY Transcription Factors: An Overview. 1997;2725(97).
3. Tjian R. Molecular machines that control genes. Sci Am. 1994;
4. Zimmer R, Naeem H, Ku R. MIRTfnet: Analysis of miRNA Regulated Transcription Factors. 2011;6(8).
5. Wang J, Lu M, Qiu C, Cui Q. TransmiR: a transcription factor-microRNA regulation database. Nucleic Acids Res [Internet]. 2010;38(Database issue):D119-22. Available from: http://nar.oxfordjournals.org/content/38/suppl_1/D119.short
6. TRANSFAC [Internet]. Available from: <http://www.gene-regulation.com/pub/databases/transfac/doc/toc.html>
7. DBD: Transcription factor prediction database [Internet]. Available from: <http://www.transcriptionfactor.org/>
8. TFSEARCH: DNA Transcription Factor Binding Site Prediction [Internet]. Available from: http://www.cbrc.jp/papia/howtouse/howtouse_tfsearch.html
9. Zhang H-M, Chen H, Liu W, Liu H, Gong J, Wang H, et al. AnimalTFDB: a comprehensive animal transcription factor database. Nucleic Acids Res. 2012 Jan;40(Database issue):D144-9.
10. Zhang H-M, Liu T, Liu C-J, Song S, Zhang X, Liu W, et al. AnimalTFDB 2.0: a resource for expression, prediction and functional study of animal transcription factors. Nucleic Acids Res [Internet]. 2014 Sep 27 [cited 2014 Nov 25];1-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25262351>
11. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes

- small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* [Internet]. 1993 Dec 3 [cited 2014 May 29];75(5):843–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8252621>
12. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec;75(5):843–54.
 13. Van Rooij E. The art of MicroRNA research. Vol. 108, *Circulation Research*. 2011. p. 219–34.
 14. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):855–62.
 15. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000 Mar 24;403(6772):901–6.
 16. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000 Nov 2;408(6808):86–9.
 17. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III *Drosha* initiates microRNA processing. *Nature*. 2003 Sep 25;425(6956):415–9.
 18. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 Apr;6(4):259–69.
 19. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* (80-). 2004;303(5654):95–8.
 20. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J*. 2002 Nov;21(21):5875–85.

21. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001 Jan 18;409(6818):363–6.
22. Czech B, Zhou R, Erlich Y, Brennecke J, Binari R, Villalta C, et al. Hierarchical rules for Argonaute loading in *Drosophila*. *Mol Cell* [Internet]. 2009 Nov 13 [cited 2014 May 29];36(3):445–56. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2795325&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
23. Siomi H, Siomi MC. Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Biogenesis in Animals. *Mol Cell* [Internet]. 2010 May 14 [cited 2014 May 29];38(3):323–32. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276510002510>
24. Yang J-S, Phillips MD, Betel D, Mu P, Ventura A, Siepel AC, et al. Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA*. 2011 Feb;17(2):312–26.
25. Bartel D. MicroRNAs Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281–97.
26. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*. 2005 Nov 18;123(4):631–40.
27. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010 Aug 12;466(7308):835–40.
28. Mazière P, Enright AJ. Prediction of microRNA targets. Vol. 12, *Drug Discovery Today*. 2007. p. 452–8.
29. Tan W, Li Y, Lim SG, Tan TMC. miR-106b-25/miR-17-92 clusters: Polycistrons with oncogenic roles in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014;20(20):5962–72.
30. Concepcion CP, Bonetti C, Ventura A. The MicroRNA-17-92 family of MicroRNA

- clusters in development and disease. Vol. 18, Cancer Journal (United States). 2012. p. 262–7.
31. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 1;34(Database issue):D140-4.
 32. miRBase: the microRNA database [Internet]. Available from: <http://www.mirbase.org>
 33. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA.* 2003 Mar 1;9(3):277–9.
 34. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2004 Jan 1 [cited 2014 May 24];32(Database issue):D109-11. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=308757&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 35. Chen C-Y, Chen S-T, Fuh C-S, Juan H-F, Huang H-C. Coregulation of transcription factors and microRNAs in human transcriptional regulatory network. *BMC Bioinformatics.* BioMed Central Ltd; 2011 Jan;12 Suppl 1(Suppl 1):S41.
 36. Guo A-Y, Sun J, Jia P, Zhao Z. A novel microRNA and transcription factor mediated regulatory network in schizophrenia. *BMC Syst Biol.* 2010 Jan;4:10.
 37. Tran DH, Satou K, Ho TB, Pham TH. Bioinformation Computational discovery of miR-TF regulatory modules in human genome *Bioinformation.* 2010;2063(8):371–7.
 38. Friard O, Re A, Taverna D, De Bortoli M, Corá D. CircuitsDB: a database of mixed microRNA/transcription factor feed-forward regulatory circuits in human and mouse. *BMC Bioinformatics.* 2010 Jan;11:435.
 39. Le Béhec A, Portales-Casamar E, Vetter G, Moes M, Zindy P-J, Saumet A, et al. MIR@NT@N: a framework integrating transcription factors, microRNAs and their targets to identify sub-network motifs in a meta-regulation network model. *BMC*

- Bioinformatics. BioMed Central Ltd; 2011 Jan;12(1):67.
40. Huang GT, Athanassiou C, Benos P V. mirConnX: condition-specific mRNA-microRNA network integrator. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jul;39(Web Server issue):W416-23.
 41. Bisognin A, Sales G, Coppe A, Bortoluzzi S, Romualdi C. MAGIA²: from miRNA and genes expression data integrative analysis to microRNA-transcription factor mixed regulatory circuits (2012 update). *Nucleic Acids Res.* 2012 Jul;40(Web Server issue):W13-21.
 42. Li K, Li Z, Zhao N, Xu Y, Liu Y, Zhou Y, et al. Functional analysis of microRNA and transcription factor synergistic regulatory network based on identifying regulatory motifs in non-small cell lung cancer. *BMC Syst Biol [Internet]. BMC Systems Biology*; 2013 Jan [cited 2014 Nov 25];7(1):122. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3843544&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 43. Jiang W, Zhang Y, Meng F, Lian B, Chen X, Yu X, et al. Identification of active transcription factor and miRNA regulatory pathways in Alzheimer's disease. *Bioinformatics.* 2013 Oct 15;29(20):2596–602.
 44. Afshar AS, Xu J, Goutsias J. Integrative identification of deregulated miRNA/TF-mediated gene regulatory loops and networks in prostate cancer. *PLoS One [Internet].* 2014 Jan [cited 2014 Nov 22];9(6):e100806. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4072696&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 45. Yoon S, De Micheli G. Prediction of regulatory modules comprising microRNAs and target genes. *Bioinformatics.* 2005;21(SUPPL. 2).
 46. Joung JG, Hwang KB, Nam JW, Kim SJ, Zhang BT. Discovery of microRNA-mRNA modules via population-based probabilistic learning. *Bioinformatics.* 2007;23(9):1141–7.
 47. Tran DH, Satou K, Ho TB. Finding microRNA regulatory modules in human

- genome using rule induction. *BMC Bioinformatics*. 2008;9 Suppl 12:S5.
48. Joung JG, Fei Z. Identification of microRNA regulatory modules in Arabidopsis via a probabilistic graphical model. *Bioinformatics*. 2009;25(3):387–93.
 49. Nam S, Li M, Choi K, Balch C, Kim S, Nephew KP. MicroRNA and mRNA integrated analysis (MMIA): A web tool for examining biological functions of microRNA expression. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(SUPPL. 2).
 50. Friard O, Re A, Taverna D, De Bortoli M, Cora D. CircuitsDB: a database of mixed microRNA/transcription factor feed-forward regulatory circuits in human and mouse. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2010;11:435. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20731828
 51. Wu JH, Sun YJ, Hsieh PH, Shieh GS. Inferring coregulation of transcription factors and microRNAs in breast cancer. *Gene*. 2013;518(1):139–44.
 52. Sengupta D, Bandyopadhyay S. Topological patterns in microRNA-gene regulatory network: studies in colorectal and breast cancer. *Mol Biosyst*. 2013 Jun;9(6):1360–71.
 53. Calura E, Martini P, Sales G, Beltrame L, Chiorino G, D’Incalci M, et al. Wiring miRNAs to pathways: a topological approach to integrate miRNA and mRNA expression profiles. *Nucleic Acids Res*. 2014 May 6;1–9.
 54. Calura E, Bisognin A, Manzoni M, Todoerti K, Sales G, Morgan GJ, et al. Disentangling the microRNA regulatory milieu in multiple myeloma: integrative genomics analysis outlines mixed miRNA- TF circuits and pathway-derived networks modulated in t (4 ; 14) patients. 2015;
 55. American Cancer Society [Internet]. Available from: <http://www.cancer.org/>
 56. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res*. 2010 Jan;12(4):207.

57. 2017 ABD KANSER İSTATİSTİKLERİ [Internet]. Available from: <https://www.drozdogan.com>
58. Siziopikou KP. Ductal carcinoma in situ of the breast: current concepts and future directions. *Arch Pathol Lab Med*. 2013 Apr;137(4):462–6.
59. Breast anatomy [Internet]. Available from: <http://commons.wikimedia.org/>
60. Bertos NR, Park M. Breast cancer - one term, many entities? *J Clin Invest*. 2011 Oct;121(10):3789–96.
61. Gusterson BA, Ross DT, Heath VJ, Stein T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2005 Jan;7(4):143–8.
62. Turashvili G, Brogi E. Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Front Med* [Internet]. 2017 Dec 8;4. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2017.00227/full>
63. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
64. Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. 2003;100(14):8418–23.
65. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007 Jan;8(5):R76.
66. Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: Classification, prognostication, and prediction. *Lancet*. 2011;378(9805):1812–23.
67. Roqueiro D, Huang L, Dai Y. Identifying transcription factors and microRNAs as key regulators of pathways using Bayesian inference on known pathway structures.

- Proteome Sci [Internet]. BioMed Central Ltd; 2012 Jan [cited 2014 Jul 22];10 Suppl 1(Suppl 1):S15. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3380732&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
68. Lee CH, Kuo WH, Lin CC, Oyang YJ, Huang HC, Juan HF. MicroRNA-regulated protein-protein interaction networks and their functions in breast cancer. *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):11560–606.
 69. TANIĆ M. MicroRNA expression profiles in hereditary breast cancer. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID; 2012.
 70. Cimino D, De Pittà C, Orso F, Zampini M, Casara S, Penna E, et al. miR148b is a major coordinator of breast cancer progression in a relapse-associated microRNA signature by targeting ITGA5, ROCK1, PIK3CA, NRAS, and CSF1. *FASEB J*. 2013;27(3):1223–35.
 71. de Rinaldis E, Gazinska P, Mera A, Modrusan Z, Fedorowicz GM, Burford B, et al. Integrated genomic analysis of triple-negative breast cancers reveals novel microRNAs associated with clinical and molecular phenotypes and sheds light on the pathways they control. *BMC Genomics* [Internet]. 2013;14:643. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24059244>
 72. Biagioni F, Bossel Ben-Moshe N, Fontemaggi G, Canu V, Mori F, Antoniani B, et al. miR-10b*, a master inhibitor of the cell cycle, is down-regulated in human breast tumours. *EMBO Mol Med*. 2012;4(11):1214–29.
 73. Lesurf R, Aure MR, Mørk HH, Vitelli V, Lundgren S, Børresen-Dale A-L, et al. Molecular Features of Subtype-Specific Progression from Ductal Carcinoma In Situ to Invasive Breast Cancer. *Cell Rep* [Internet]. 2016;16(4):1166–79. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124716308051>
 74. Turashvili G, Bouchal J, Baumforth K, Wei W, Dziechciarkova M, Ehrmann J, et al. Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis. *BMC Cancer* [Internet].

- 2007;7:55. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1852112&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
75. Sircoulomb F, Bekhouche I, Finetti P, Adelaide J, Ben Hamida A, Bonansea J, et al. Genome profiling of ERBB2-amplified breast cancers. *BMC Cancer*. 2010;10:539.
 76. Richardson AL, Wang ZC, De Nicolo A, Lu X, Brown M, Miron A, et al. X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer Cell*. 2006;9(2):121–32.
 77. Van der Auwera I, Limame R, van Dam P, Vermeulen PB, Dirix LY, Van Laere SJ. Integrated miRNA and mRNA expression profiling of the inflammatory breast cancer subtype. *Br J Cancer*. 2010;103(4):532–41.
 78. Merdad A, Karim S, Schulten H-J, Dallol A, Buhmeida A, Al-Thubaity F, et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer: MMP-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis. *Anticancer Res* [Internet]. 2014;34(3):1355–66. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24596383>
 79. Terunuma A, Putluri N, Mishra P, Mathé EA, Dorsey TH, Yi M, et al. MYC-driven accumulation of 2-hydroxyglutarate is associated with breast cancer prognosis. *J Clin Invest*. 2014;124(1):398–412.
 80. Clarke C, Madden SF, Doolan P, Aherne ST, Joyce H, O'Driscoll L, et al. Correlating transcriptional networks to breast cancer survival: A large-scale coexpression analysis. *Carcinogenesis*. 2013;34(10):2300–8.
 81. Aure MR, Jernström S, Krohn M, Volla HKM, Due EU, Rødland E, et al. Integrated analysis reveals microRNA networks coordinately expressed with key proteins in breast cancer. *Genome Med*. 2015;7(1).
 82. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus : NCBI gene expression and hybridization array data repository. 2002;30(1):207–10.

83. Rustici G, Kolesnikov N, Brandizi M, Burdett T, Dylag M, Emam I, et al. ArrayExpress update--trends in database growth and links to data analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan;41(Database issue):D987-90.
84. Simon R, Lam A, Li M, Ngan M, Menenzes S, Zhao Y. Analysis of gene expression data using BRB-ArrayTools. Vol. 3, *Cancer informatics*. 2007. p. 11–7.
85. Bolstad BM, Irizarry R a, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* [Internet]. 2003;19(2):185–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538238>
86. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette M a, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005;102(43):15545–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16199517>
87. Çorapçioğlu ME, Oğul H. MiSEA: MicroRNA set enrichment analysis. *BioSystems*. 2015;134:37–42.
88. Hsu S Da, Lin FM, Wu WY, Liang C, Huang WC, Chan WL, et al. MiRTarBase: A database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(SUPPL. 1).
89. Haunsberger SJ, Connolly NMC, Prehn JHM. miRNAmeConverter: an R/bioconductor package for translating mature miRNA names to different miRBase versions. *Bioinformatics* [Internet]. 2016;btw660. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btw660>
90. Oliveros JC. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. 2007.
91. Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jul;41(Web Server issue):W77-83.

92. Le TD, Liu L, Liu B, Tsykin A, Goodall GJ, Satou K, et al. Inferring microRNA and transcription factor regulatory networks in heterogeneous data. BMC Bioinformatics [Internet]. 2013 Jan;14:92. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3636059&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
93. Emmrich S, Pützer BM. Checks and balances: E2F - MicroRNA crosstalk in cancer control. Cell Cycle. 2010;9(13):2555–67.
94. Biyashev D, Qin G. E2F and microRNA regulation of angiogenesis. Am J Cardiovasc Dis [Internet]. 2011;1(2):110–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3244022&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
95. Hollern DP, Honeysett J, Cardiff RD, Andrechek ER. The E2F Transcription Factors Regulate Tumor Development and Metastasis in a Mouse Model of Metastatic Breast Cancer. Mol Cell Biol [Internet]. 2014;34(17):3229–43. Available from: <http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.00737-14>
96. Qu Y, Liu H, Lv X, Liu Y, Wang X, Zhang M, et al. MicroRNA-16-5p overexpression suppresses proliferation and invasion as well as triggers apoptosis by targeting VEGFA expression in breast carcinoma. Oncotarget [Internet]. 2017;8(42):72400–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29069797>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5641140>
<http://www.oncotarget.com/fulltext/20398>
97. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. Cell. 2000 Jan;100(1):57–70.
98. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
99. Hudson RS, Yi M, Esposito D, Watkins SK, Hurwitz AA, Yfantis HG, et al. MicroRNA-1 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in human prostate cancer. Nucleic Acids Res. 2012;40(8):3689–703.

100. Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer. Vol. 482, Nature. 2012. p. 347–55.
101. Di Leva G, Piovan C, Gasparini P, Ngankeu A, Taccioli C, Briskin D, et al. Estrogen Mediated-Activation of miR-191/425 Cluster Modulates Tumorigenicity of Breast Cancer Cells Depending on Estrogen Receptor Status. PLoS Genet. 2013;9(3).
102. Khuu C, Utheim TP, Sehic A. The Three Paralogous MicroRNA Clusters in Development and Disease, miR-17-92, miR-106a-363, and miR-106b-25. Vol. 2016, Scientifica. 2016.



8. EKLER

EK-1

Transkripsiyon faktörü-miRNA-Hedef gen devrelerinin belirlenmesi için geliştirilen kod

```
#include<stdio.h>

#include<stdlib.h>

#include<string.h>

int main()

{

FILE *TF_fp, *Mi_fp,
*Gene_fp,*MiGene_fp,*MiGene_Kontrol_fp,*Sonuc_fp,*TFGene_fp,*MiTF_fp,*TFM
i_fp;

char TF[20], MiRNA[20], Gene[20],MiRNA_K[20], Gene_K[20]; // dosyadan
okuyacağımız verileri kaydetmek için değişken tanımlı

char TF1[886][20], MiRNA1[351][20],Gene1[11068][20]; // Dosyadan okunan
veriler için dizi tanımları

//char Mi_Gene1[157590][40]; //103 gen X 1530 MiRNA

int i=0,j,k;

TF_fp=fopen("TF.txt","r"); //TF dosyası okunmak için açılıyor

MiGene_fp=fopen("MiGene.txt","w+"); //MiGene dosyasını biz oluşturuyoruz
Mümkün olan tüm MİRNA ve Gene sembolü ikililerini yazacağız bu dosyaya

Mi_fp=fopen("MiRNA.txt","r"); // MiRNA dosyasını okumak için açıyoruz

Gene_fp=fopen("Gene.txt","r"); // Gene dosyasını okumak için açıyoruz

TFGene_fp=fopen("TFGene.txt","w+");

MiTF_fp=fopen("MiTF.txt","w+");

TFMi_fp=fopen("TFMi.txt","w+");

//Eğer dosya bulunamazsa hata mesajı verir (Dosyaların program dosyasıyla
aynı klasörde bulunması gerekiyor aksi halde yolu vermek gerekir)
```

```

if((TF_fp==NULL
)|| (Mi_fp==NULL) || (Gene_fp==NULL) || (MiGene_fp==NULL) || (TFGene_fp==NULL) ||
(MiTF_fp==NULL) || (TFMi_fp==NULL))

{ printf("dosya acilamadi");

return 1;

}

// TF lerin dosyadan okunup dizi (TF1[]) içerisine aktarılması

i=0;

fscanf(TF_fp, "%s",TF);

while(!feof(TF_fp))

{ strcpy(TF1[i],TF);

i++;

fscanf(TF_fp, "%s",TF);

}

// MiRNA ların dosyadan okunup dizi (MiRNA1[]) içerisine aktarılması

i=0;

fscanf(Mi_fp, "%s",MiRNA);

while(!feof(Mi_fp))

{ strcpy(MiRNA1[i],MiRNA);

i++;

fscanf(Mi_fp, "%s",MiRNA);

}

// Gen sembollerinin dosyadan okunup dizi (Genel[]) içerisine aktarılması

i=0;

fscanf(Gene_fp,"%s",Gene);

while(!feof(Gene_fp))

{ strcpy(Gene1[i],Gene);

i++;

```

```

fscanf(Gene_fp, "%s", Gene);

}

//Mümkün olan tüm miRNA ve Gene ikililerini bir dosyaya (MiGene.txt)
yazıyoruz

for(i=0; i<11067; i++) //Gene
{
    for(j=0; j<350; j++) //MiRNA
    {
        fprintf(MiGene_fp, "%s\t%s\n", MiRNA1[j], Gene1[i]);
    }
}

for(j=0; j<885; j++) //TF
{
    for(i=0; i<11067; i++) //Gene
    {
        fprintf(TFGene_fp, "%s\t%s\n", TF1[j], Gene1[i]);
    }
}

for(i=0; i<350; i++) //MiRNA
{
    for(j=0; j<885; j++) //TF
    {
        fprintf(MiTF_fp, "%s\t%s\n", MiRNA1[i], TF1[j]);
    }
}

for(j=0; j<885; j++) //TF
{
    for(i=0; i<350; i++) //MiRNA
    {
        fprintf(TFMi_fp, "%s\t%s\n", TF1[j], MiRNA1[i]);
    }
}

//Dosyaların kapatılması

fclose(TF_fp);

fclose(Mi_fp);

fclose(Gene_fp);

fclose(MiGene_fp);

fclose(TFGene_fp);

fclose(MiTF_fp);

```

```

fclose(TFMi_fp);

return 0;

}

#include<stdio.h>

#include<stdlib.h>

#include<string.h>

int main()

{

FILE *TF_fp, *Mi_fp,
*Gene_fp,*MiGene_fp,*MiTF_Kontrol_fp,*Sonuc_fp,*MiTF_fp,*MiGene_Kontrol_f
p;

char TF[20], MiRNA[20], Gene[20],Gene_K[20], MiRNA_K[20]; // dosyadan
okuyacağımız verileri kaydetmek için değişken tanımlı

//char TF1[540][20], MiRNA1[333][20],Gene1[3132][20]; // Dosyadan okunan
veriler için dizi tanımları

//char Mi_Gene1[157590][40]; //103 gen X 1530 MiRNA

int i=0,j,k;

MiGene_Kontrol_fp=fopen("MiGene_kontrol.txt","r"); // Gene dosyasını
okumak için açıyoruz

MiGene_fp=fopen("MiGene.txt","r");

Sonuc_fp=fopen("SonucMiGene.txt","w");

//Eğer dosya bulunamazsa hata mesajı verir (Dosyaların program dosyasıyla
aynı klasörde bulunması gerekiyor aksi halde yolu vermek gerekir)

if((MiGene_Kontrol_fp==NULL )||(MiGene_fp==NULL))

{ printf("dosya acilamadi");

return 1;

}

//rewind(TMiTF_fp);

fscanf(MiGene_Kontrol_fp,"%s %s",MiRNA_K,Gene_K);

k=0;//ortak ikilileri saymak için tutulan değişken

```

```

while(!feof(MiGene_Kontrol_fp))

{

rewind(MiGene_fp);

fscanf(MiGene_fp, "%s %s",MiRNA,Gene);

while(!feof(MiGene_fp))

{

if(strcmp(Gene_K,Gene)==0  && strcmp(MiRNA_K,MiRNA)==0 )

{

fprintf(Sonuc_fp, "%s\t%s\n",MiRNA_K,Gene_K);

k++;

}

fscanf(MiGene_fp, "%s %s",MiRNA,Gene);

}

fscanf(MiGene_Kontrol_fp, "%s %s",MiRNA_K,Gene_K);

}

fprintf(Sonuc_fp, "%d tane ortak \n",k);

//Dosyaların kapatılması

fclose(MiGene_fp);

fclose(MiGene_Kontrol_fp);

fclose(Sonuc_fp);

return 0;

}

#include<stdio.h>

#include<stdlib.h>

#include<string.h>

int main()

{

```

```

FILE *TF_fp, *Mi_fp,
*Gene_fp, *MiGene_fp, *MiTF_Kontrol_fp, *Sonuc_fp, *MiTF_fp, *TFMi_Kontrol_fp;

char TF[20], MiRNA[20], Gene[20], TF_K[20], MiRNA_K[20]; // dosyadan
okuyacağımız verileri kaydetmek için değişken tanımları

//char TF1[540][20], MiRNA1[333][20], Gene1[3132][20]; // Dosyadan okunan
veriler için dizi tanımları

//char Mi_Gene1[157590][40]; //103 gen X 1530 MiRNA

int i=0,j,k;

MiTF_Kontrol_fp=fopen("MiTF_kontrol.txt","r"); // Gene dosyasını okumak
için açıyoruz

MiTF_fp=fopen("MiTF.txt","r");

Sonuc_fp=fopen("SonucMiTF.txt","w");

//Eğer dosya bulunamazsa hata mesajı verir (Dosyaların program dosyasıyla
aynı klasörde bulunması gerekiyor aksi halde yolu vermek gerekir)

if( (MiTF_Kontrol_fp==NULL ) || (MiTF_fp==NULL) )
{ printf("dosya acilamadi");
return 1;
}

//rewind(TMifTF_fp);

fscanf(MiTF_Kontrol_fp,"%s %s",MiRNA_K,TF_K);

k=0;//ortak ikilileri saymak için tutulan değişken

while(!feof(MiTF_Kontrol_fp))
{
rewind(MiTF_fp);

fscanf(MiTF_fp, "%s %s",MiRNA,TF);

while(!feof(MiTF_fp))
{
if(strcmp(TF_K,TF)==0 && strcmp(MiRNA_K,MiRNA)==0 )
{

```

```

fprintf(Sonuc_fp, "%s\t%s\n",MiRNA_K,TF_K);

k++;

}

fscanf(MiTF_fp, "%s %s",MiRNA,TF);

}

fscanf(MiTF_Kontrol_fp, "%s %s",MiRNA_K,TF_K);

}

fprintf(Sonuc_fp, "%d tane ortak \n",k);

//Dosyaların kapatılması

fclose(MiTF_fp);

fclose(MiTF_Kontrol_fp);

fclose(Sonuc_fp);

return 0;

}

#include<stdio.h>

#include<stdlib.h>

#include<string.h>

int main()

{

FILE *TF_fp, *Mi_fp,

*Gene_fp,*MiGene_fp,*MiTF_Kontrol_fp,*Sonuc_fp,*TFGene_fp,*TFGene_Kontrol

_fp;

char TF[20], MiRNA[20], Gene[20],TF_K[20], Gene_K[20]; // dosyadan

okuyacağımız verileri kaydetmek için değişken tanımları

char TF1[540][20], MiRNA1[333][20],Gene1[3132][20]; // Dosyadan okunan

veriler için dizi tanımları

//char Mi_Gene1[157590][40]; //103 gen X 1530 MiRNA

int i=0,j,k;

```

```

TFGene_Kontrol_fp=fopen("TFGene_kontrol.txt","r");// Gene dosyasını
okumak için açıyoruz

TFGene_fp=fopen("TFGene.txt","r");

Sonuc_fp=fopen("SonucTFGene.txt","w");

//Eğer dosya bulunamazsa hata mesajı verir (Dosyaların program dosyasıyla
aynı klasörde bulunması gerekiyor aksi halde yolu vermek gerekir)

if((TFGene_Kontrol_fp==NULL )||(TFGene_fp==NULL))

{ printf("dosya acilamadi");

return 1;

}

rewind(TFGene_fp);

fscanf(TFGene_Kontrol_fp,"%s %s",TF_K,Gene_K);

k=0;//ortak ikilileri saymak için tutulan değişken

while(!feof(TFGene_Kontrol_fp))

{

rewind(TFGene_fp);

fscanf(TFGene_fp, "%s %s",TF,Gene);

while(!feof(TFGene_fp))

{

if(strcmp(TF_K,TF)==0  && strcmp(Gene_K,Gene)==0 )

{

fprintf(Sonuc_fp, "%s\t%s\n",TF_K,Gene_K);

k++;

}

fscanf(TFGene_fp, "%s %s",TF,Gene);

}

fscanf(TFGene_Kontrol_fp, "%s %s",TF_K,Gene_K);

}

```

```

fprintf(Sonuc_fp, "%d tane ortak \n",k);

//Dosyaların kapatılması

fclose(TFGene_fp);

fclose(TFGene_Kontrol_fp);

fclose(Sonuc_fp);

return 0;

}

#include<stdio.h>

#include<stdlib.h>

#include<string.h>

int main()

{

FILE *TF_fp, *Mi_fp,
*Gene_fp,*MiGene_fp,*MiTF_Kontrol_fp,*Sonuc_fp,*TFMi_fp,*TFMi_Kontrol_fp;

char TF[20], MiRNA[20], Gene[20],TF_K[20], MiRNA_K[20]; // dosyadan
okuyacağımız verileri kaydetmek için değişken tanımlı

//char TF1[540][20], MiRNA1[333][20],Gene1[3132][20]; // Dosyadan okunan
veriler için dizi tanımları

//char Mi_Gene1[157590][40]; //103 gen X 1530 MiRNA

int i=0,j,k;

TFMi_Kontrol_fp=fopen("TFMi_kontrol.txt","r"); // Gene dosyasını okumak
için açıyoruz

TFMi_fp=fopen("TFMi.txt","r");

Sonuc_fp=fopen("SonucTFMi.txt","w");

//Eğer dosya bulunamazsa hata mesajı verir (Dosyaların program dosyasıyla
aynı klasörde bulunması gerekiyor aksi halde yolu vermek gerekir)

if((TFMi_Kontrol_fp==NULL )||(TFMi_fp==NULL))

{ printf("dosya acilamadi");

return 1;

```

```

}

//rewind(TFMi_fp);

fscanf(TFMi_Kontrol_fp, "%s %s", TF_K, MiRNA_K);

k=0;//ortak ikilileri saymak için tutulan değişken

while(!feof(TFMi_Kontrol_fp))

{

rewind(TFMi_fp);

fscanf(TFMi_fp, "%s %s", TF, MiRNA);

while(!feof(TFMi_fp))

{

if(strcmp(TF_K, TF)==0 && strcmp(MiRNA_K, MiRNA)==0 )

{

fprintf(Sonuc_fp, "%s\t%s\n", TF_K, MiRNA_K);

k++;

}

fscanf(TFMi_fp, "%s %s", TF, MiRNA);

}

fscanf(TFMi_Kontrol_fp, "%s %s", TF_K, MiRNA_K);

}

fprintf(Sonuc_fp, "%d tane ortak \n", k);

//Dosyaların kapatılması

fclose(TFMi_fp);

fclose(TFMi_Kontrol_fp);

fclose(Sonuc_fp);

return 0;

}

#include<stdio.h>

```

```

#include<stdlib.h>

#include<string.h>

int main()

{

FILE *TF_fp, *Mi_fp,
*Gene_fp,*MiGene_fp,*MiTF_Kontrol_fp,*SonucMiTFGene_fp,*MiTF_fp;

char TF[20], MiRNA[20], Gene[20],TF_K[20],MiRNA1[20]; // dosyadan
okuyacağımız verileri kaydetmek için değişken tanımlı

//char TF1[540][20], MiRNA1[333][20],Gene1[3132][20]; // Dosyadan okunan
veriler için dizi tanımları

//char Mi_Gene1[157590][40]; //103 gen X 1530 MiRNA

int i=0,j,k;

MiGene_fp=fopen("SonucMiGene.txt","r"); // Gene dosyasını okumak için
açıyoruz

MiTF_fp=fopen("SonucMiTF.txt","r");

SonucMiTFGene_fp=fopen("SonucMiTFGene.txt","w");

//Eğer dosya bulunamazsa hata mesajı verir (Dosyaların program dosyasıyla
aynı klasörde bulunması gerekiyor aksi halde yolu vermek gerekir)

if((MiGene_fp==NULL ))

{ printf("dosya acilamadi sonuc2");

return 1;

}

//Eğer dosya bulunamazsa hata mesajı verir (Dosyaların program dosyasıyla
aynı klasörde bulunması gerekiyor aksi halde yolu vermek gerekir)

if((MiTF_fp==NULL))

{ printf("dosya acilamadi MiTF");

return 2;

}

fscanf(MiGene_fp,"%s %s",MiRNA,Gene);

while(!feof(MiGene_fp))

```

```

{

rewind(MiTF_fp);

fscanf(MiTF_fp, "%s %s",MiRNA1,TF);

while(!feof(MiTF_fp))

{

if(strcmp(MiRNA,MiRNA1)==0 )

{

fprintf(SonucMiTFGene_fp, "%s\t%s\t%s\n",MiRNA,TF,Gene);

}

fscanf(MiTF_fp, "%s %s",MiRNA1,TF);

}

fscanf(MiGene_fp,"%s %s",MiRNA,Gene);

}

//Dosyaların kapatılması

fclose(MiGene_fp);

fclose(MiTF_fp);

fclose(SonucMiTFGene_fp);

return 0;

}

#include<stdio.h>

#include<stdlib.h>

#include<string.h>

int main()

{

FILE *TF_fp, *Mi_fp,

*TFGene_fp,*MiGene_fp,*SonucTFGene_fp,*MiTFGene_fp,*Sonuc_fp;

char TF[20], MiRNA[20], Gene[20],TF1[20],MiRNA1[20],Gene1[20]; //

dosyadan okuyacağımız verileri kaydetmek için değişken tanımlı

```

```

//char TF1[540][20], MiRNA1[333][20],Gene1[3132][20]; // Dosyadan okunan
veriler için dizi tanımları

//char Mi_Gene1[157590][40]; //103 gen X 1530 MiRNA

int i=0,j,k;

MiTFGene_fp=fopen("SonucMiTFGene.txt","r");// Gene dosyasını okumak için
açıyoruz

TFGene_fp=fopen("SonucTFGene.txt","r");

Sonuc_fp=fopen("Sonuc.txt","w");

//Eğer dosya bulunamazsa hata mesajı verir (Dosyaların program dosyasıyla
aynı klasörde bulunması gerekiyor aksi halde yolu vermek gerekir)

if((MiTFGene_fp==NULL ))

{ printf("dosya acilamadi sonuc2");

return 1;

}

//Eğer dosya bulunamazsa hata mesajı verir (Dosyaların program dosyasıyla
aynı klasörde bulunması gerekiyor aksi halde yolu vermek gerekir)

if((TFGene_fp==NULL))

{ printf("dosya acilamadi MiTF");

return 2;

}

fscanf(MiTFGene_fp,"%s %s %s",MiRNA,TF,Gene);

while(!feof(MiTFGene_fp))

{

rewind(TFGene_fp);

fscanf(TFGene_fp, "%s %s",TF1,Gene1);

while(!feof(TFGene_fp))

{

if(strcmp(TF,TF1)==0 && strcmp(Gene,Gene1)==0 )

{

```

```

fprintf(Sonuc_fp, "%s\t%s\t%s\n",MiRNA,TF,Gene);

}

fscanf(TFGene_fp, "%s %s",TF1,Genel);

}

fscanf(MiTFGene_fp,"%s %s %s",MiRNA,TF,Gene);

}

//Dosyaların kapatılması

fclose(MiTFGene_fp);

fclose(TFGene_fp);

fclose(Sonuc_fp);

return 0;

}

#include<stdio.h>

#include<stdlib.h>

#include<string.h>

int main()

{

FILE *TF_fp, *Mi_fp,

*TFMi_fp,*MiGene_fp,*SonucTFGene_fp,*MiTFGene_fp,*Sonuc_fp;

char TF[20], MiRNA[20], Gene[20],TF1[20],MiRNA1[20],Genel[20]; //

dosyadan okuyacağımız verileri kaydetmek için değişken tanımları

//char TF1[540][20], MiRNA1[333][20],Genel[3132][20]; // Dosyadan okunan

veriler için dizi tanımları

//char Mi_Gene1[157590][40]; //103 gen X 1530 MiRNA

int i=0,j,k;

MiTFGene_fp=fopen("Sonuc.txt","r"); // Gene dosyasını okumak için

açıyoruz

TFMi_fp=fopen("SonucTFMi.txt","r");

Sonuc_fp=fopen("Sonuc2.txt","w");

```

```

//Eğer dosya bulunamazsa hata mesajı verir (Dosyaların program dosyasıyla
aynı klasörde bulunması gerekiyor aksi halde yolu vermek gerekir)

if((MiTFGene_fp==NULL ))

{ printf("dosya acilamadi sonuc2");

return 1;

}

//Eğer dosya bulunamazsa hata mesajı verir (Dosyaların program dosyasıyla
aynı klasörde bulunması gerekiyor aksi halde yolu vermek gerekir)

if((TFMi_fp==NULL))

{ printf("dosya acilamadi MiTF");

return 2;

}

fscanf(MiTFGene_fp,"%s %s %s",MiRNA,TF,Gene);

while(!feof(MiTFGene_fp))

{

rewind(TFMi_fp);

fscanf(TFMi_fp, "%s %s",TF1,MiRNA1);

while(!feof(TFMi_fp))

{

if(strcmp(TF,TF1)==0 && strcmp(MiRNA,MiRNA1)==0 )

{

fprintf(Sonuc_fp, "%s\t%s\t%s\n",MiRNA,TF,Gene);

}

fscanf(TFMi_fp, "%s %s",TF1,MiRNA1);

}

fscanf(MiTFGene_fp,"%s %s %s",MiRNA,TF,Gene);

```

```
}  
  
//Dosyaların kapatılması  
  
fclose(MiTFGene_fp);  
  
fclose(TFMi_fp);  
  
fclose(Sonuc_fp);  
  
return 0;  
  
}
```



EK-2

Çalışmalardan ayrı ayrı elde edilen DE (ifadesi anlamlı olarak değişen) miRNA listeleri ve tekrarların elenmiş olduğu son miRNA listeleri.

A	B
1	Meme Kanseri Oluşumunda Önemli DE miRNA Listesi
2	1 hsa-miR-204-5p
3	2 hsa-miR-139-5p
4	3 hsa-miR-125b-5p
5	4 hsa-miR-7-5p
6	5 hsa-miR-205-5p
7	6 hsa-miR-183-5p
8	7 hsa-miR-182-5p
9	8 hsa-miR-1290
10	9 hsa-miR-99a-5p
11	10 hsa-miR-96-5p
12	11 hsa-miR-21-5p
13	12 hsa-miR-210-3p
14	13 hsa-miR-142-5p
15	14 hsa-miR-142-3p
16	15 hsa-miR-145-5p
17	16 hsa-miR-335-5p
18	17 hsa-miR-100-5p
19	18 hsa-miR-155-5p
20	19 hsa-miR-130b-3p
21	20 hsa-miR-125b-2-3p

Şekil 8.1. Çalışmalardan ayrı ayrı elde edilen DE (ifadesi anlamlı olarak değişen) miRNA listeleri ve tekrarların elenmiş olduğu son miRNA listelerinin bulunduğu Excel tablosuna ait ekran görüntüsü.

Listelerin tamamı **CD’de EK-2** olarak verilmiştir.

EK-3

Çalışmalardan ayrı ayrı elde edilen DE (ifadesi anlamlı olarak değişen) gen listeleri ve tekrarların elenmiş olduğu son gen listeleri.

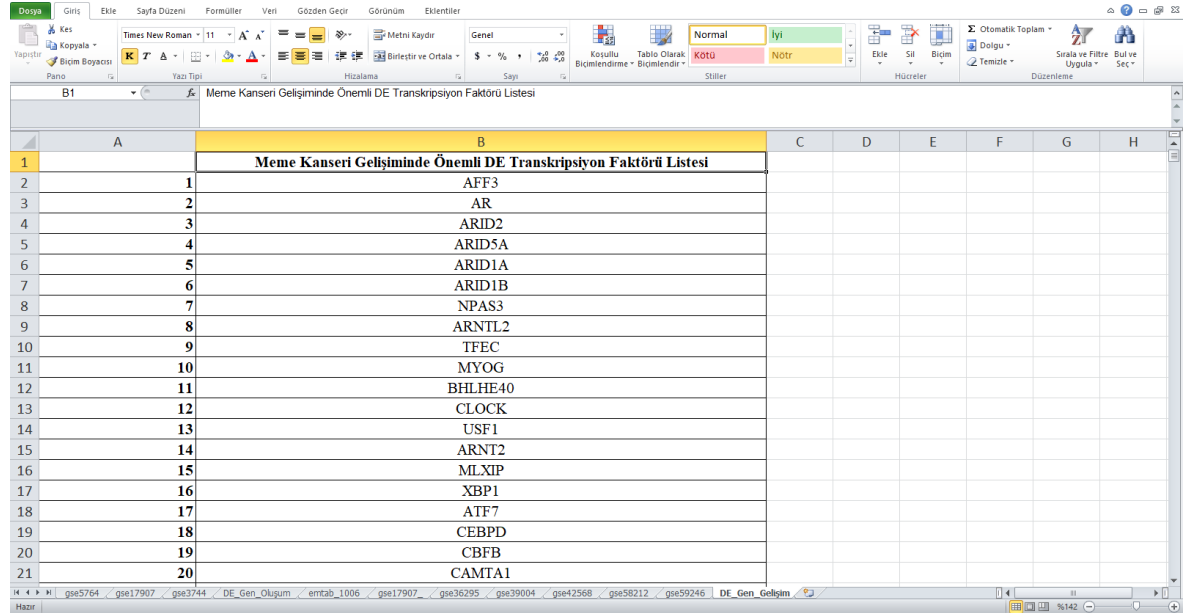
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Meme Kanseri Oluşumunda Önemli DE Gen Listesi										
2	1	A2M									
3	2	AACS									
4	3	ABAT									
5	4	ABCA5									
6	5	ABCA6									
7	6	ABCA8									
8	7	ABCA9									
9	8	ABCC10									
10	9	ABCC11									
11	10	ABCC5									
12	11	ABCD3									
13	12	ABCG2									
14	13	ABHD10									
15	14	ABHD14B									
16	15	ABHD2									
17	16	ABI3BP									
18	17	ABLM1									
19	18	ABLM3									
20	19	ABRACL									
21	20	ACAA2									

Şekil 8.2. Çalışmalardan ayrı ayrı elde edilen DE (ifadesi anlamlı olarak değişen) gen listeleri ve tekrarların elenmiş olduğu son gen listelerinin bulunduğu Excel tablosuna ait ekran görüntüsü.

Listelerin tamamı **CD’de EK-3** olarak verilmiştir.

EK-4

Çalışmalardan ayrı ayrı elde edilen DE (ifadesi anlamlı olarak değişen) TF listeleri ve tekrarların elenmiş olduğu son TF listeleri.



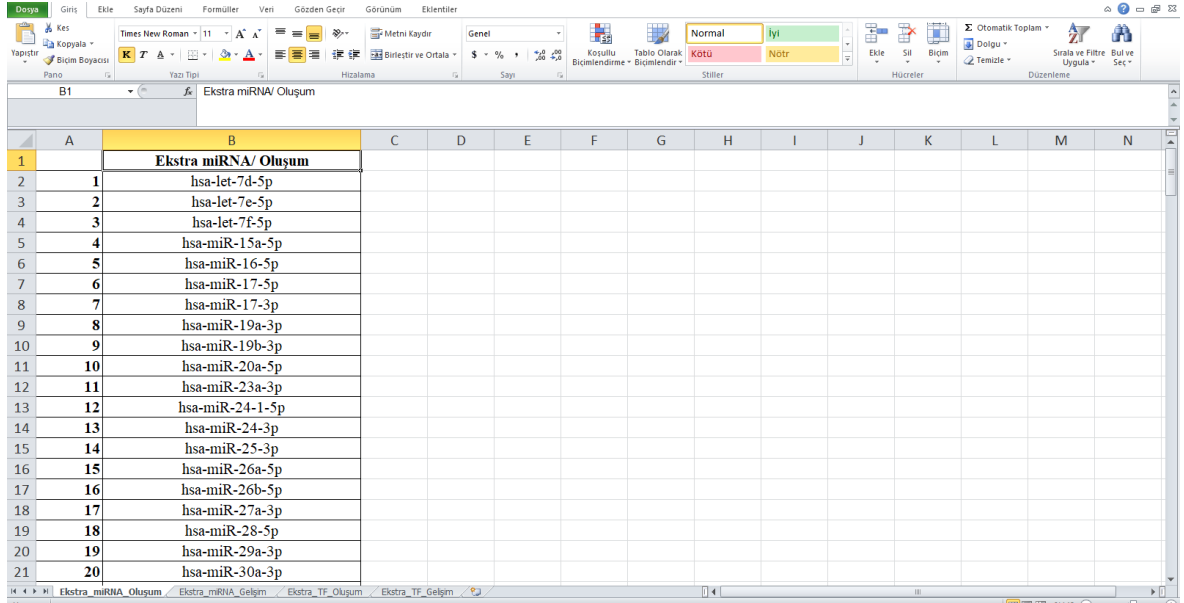
A	B	C	D	E	F	G	H
1	Meme Kanserinde Önemli DE Transkripsiyon Faktörü Listesi						
2	1	AFF3					
3	2	AR					
4	3	ARID2					
5	4	ARID5A					
6	5	ARID1A					
7	6	ARID1B					
8	7	NPAS3					
9	8	ARNTL2					
10	9	TFEC					
11	10	MYOG					
12	11	BHLHE40					
13	12	CLOCK					
14	13	USF1					
15	14	ARNT2					
16	15	MLXIP					
17	16	XBP1					
18	17	ATF7					
19	18	CEBPD					
20	19	CBFB					
21	20	CAMTA1					

Şekil 8.3. Çalışmalardan ayrı ayrı elde edilen DE (ifadesi anlamlı olarak değişen) TF listeleri ve tekrarların elenmiş olduğu son TF listelerinin bulunduğu Excel tablosuna ait ekran görüntüsü.

Listelerin tamamı **CD’de EK-4** olarak verilmiştir.

EK-5

miSEA ve GSEA analizleri sonucunda elde edilen ekstra miRNA ve TF listeleri.



A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	Ekstra miRNA/ Oluşum												
2	1	hsa-let-7d-5p											
3	2	hsa-let-7e-5p											
4	3	hsa-let-7f-5p											
5	4	hsa-miR-15a-5p											
6	5	hsa-miR-16-5p											
7	6	hsa-miR-17-5p											
8	7	hsa-miR-17-3p											
9	8	hsa-miR-19a-3p											
10	9	hsa-miR-19b-3p											
11	10	hsa-miR-20a-5p											
12	11	hsa-miR-23a-3p											
13	12	hsa-miR-24-1-5p											
14	13	hsa-miR-24-3p											
15	14	hsa-miR-25-3p											
16	15	hsa-miR-26a-5p											
17	16	hsa-miR-26b-5p											
18	17	hsa-miR-27a-3p											
19	18	hsa-miR-28-5p											
20	19	hsa-miR-29a-3p											
21	20	hsa-miR-30a-3p											

Şekil 8.4. miSEA ve GSEA analizleri sonucunda elde edilen ekstra miRNA ve TF listelerinin bulunduğu Excel tablosuna ait ekran görüntüsü.

Listelerin tamamı CD’de EK-5 olarak verilmiştir.

EK-6

DE listeler ile miSEA ve GSEA analizleri sonucunda elde edilen ekstra miRNA ve TF listelerinin birleştirilmesi ve tekrarların elenmesi ile edilen listeler.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1		miRNA/ Oluşum													
2	1	hsa-let-7a-5p													
3	2	hsa-let-7b-5p													
4	3	hsa-let-7c-5p													
5	4	hsa-let-7d-5p													
6	5	hsa-let-7e-5p													
7	6	hsa-let-7f-5p													
8	7	hsa-miR-15a-5p													
9	8	hsa-miR-16-5p													
10	9	hsa-miR-17-5p													
11	10	hsa-miR-17-3p													
12	11	hsa-miR-18a-5p													
13	12	hsa-miR-19a-3p													
14	13	hsa-miR-19b-3p													
15	14	hsa-miR-20a-5p													
16	15	hsa-miR-21-5p													
17	16	hsa-miR-22-3p													
18	17	hsa-miR-23a-3p													
19	18	hsa-miR-24-1-5p													
20	19	hsa-miR-24-3p													
21	20	hsa-miR-25-3p													

Şekil 8.5. DE listeler ile miSEA ve GSEA analizleri sonucunda elde edilen ekstra miRNA ve TF listelerinin birleştirilmesi ve tekrarların elenmesi ile edilen listelerin bulunduğu Excel tablosuna ait ekran görüntüsü. Bu listeler kod için girdi olarak kullanılan miRNA, TF ve gen listeleridir.

Listelerin tamamı CD’de EK-6 olarak verilmiştir.

EK-7

Meme kanseri oluşum ve gelişiminde aktif ikili motifler.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1		miRNA	Gen												
2	1	hsa-let-7a-3p	ABCC4												
3	2	hsa-let-7a-3p	ACP1												
4	3	hsa-let-7a-3p	ACVR2B												
5	4	hsa-let-7a-3p	ADH1B												
6	5	hsa-let-7a-3p	ANAPC16												
7	6	hsa-let-7a-3p	APOBEC3A												
8	7	hsa-let-7a-3p	ARAP2												
9	8	hsa-let-7a-3p	ARMC8												
10	9	hsa-let-7a-3p	BRI3BP												
11	10	hsa-let-7a-3p	BRPF3												
12	11	hsa-let-7a-3p	BTF3												
13	12	hsa-let-7a-3p	C1orf52												
14	13	hsa-let-7a-3p	CCND1												
15	14	hsa-let-7a-3p	CDKN1B												
16	15	hsa-let-7a-3p	CREBRF												
17	16	hsa-let-7a-3p	CREBZF												
18	17	hsa-let-7a-3p	CSTF2												
19	18	hsa-let-7a-3p	DIP2A												
20	19	hsa-let-7a-3p	DSG2												
21	20	hsa-let-7a-3p	DUSP6												

Şekil 8.6. Meme kanseri oluşum ve gelişiminde aktif ikili motif listelerinin bulunduğu Excel tablosuna ait ekran görüntüsü.

Listelerin tamamı CD’de EK-7 olarak verilmiştir.

EK-8

Meme kanseri oluşum ve gelişimi için önemli olan 1. tip üçlü devre listeleri.

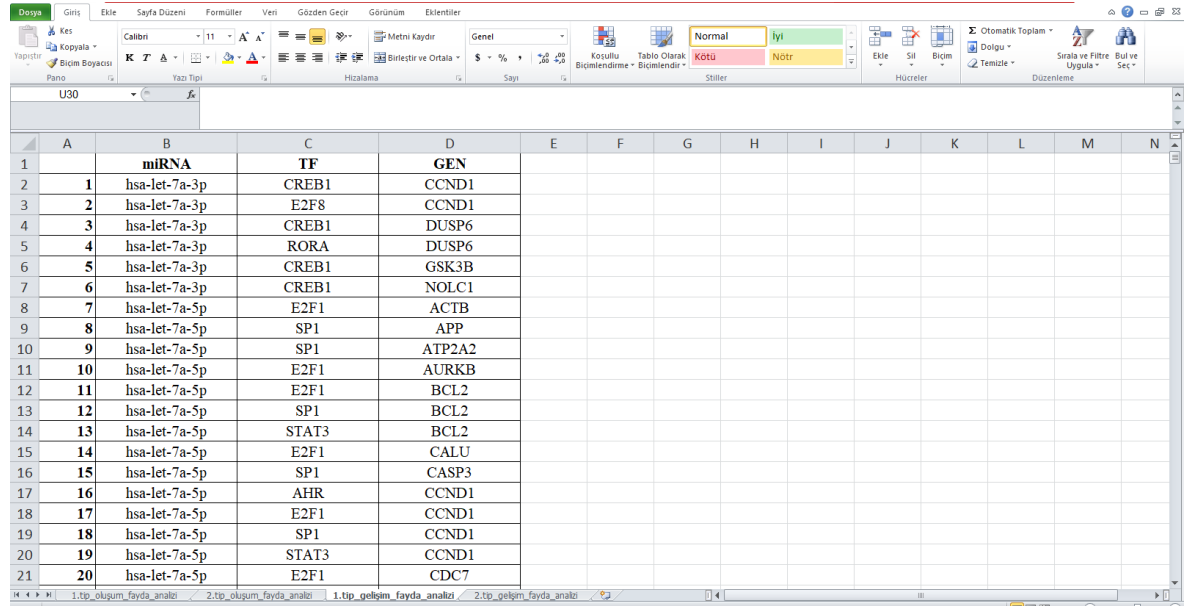
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1		miRNA	TF	GEN										
2	1	hsa-let-7a-3p	CREB1	CCND1										
3	2	hsa-let-7a-3p	E2F8	CCND1										
4	3	hsa-let-7a-3p	CREB1	DUSP6										
5	4	hsa-let-7a-3p	RORA	DUSP6										
6	5	hsa-let-7a-3p	CREB1	GSK3B										
7	6	hsa-let-7a-5p	SP1	APP										
8	7	hsa-let-7a-5p	SP1	ATP2A2										
9	8	hsa-let-7a-5p	SP1	BCL2										
10	9	hsa-let-7a-5p	STAT3	BCL2										
11	10	hsa-let-7a-5p	SP1	CASP3										
12	11	hsa-let-7a-5p	AHR	CCND1										
13	12	hsa-let-7a-5p	SP1	CCND1										
14	13	hsa-let-7a-5p	STAT3	CCND1										
15	14	hsa-let-7a-5p	SP1	CDK6										
16	15	hsa-let-7a-5p	SP1	CDKN1A										
17	16	hsa-let-7a-5p	STAT3	CDKN1A										
18	17	hsa-let-7a-5p	SP1	CDV3										
19	18	hsa-let-7a-5p	SP1	CSNK2A1										
20	19	hsa-let-7a-5p	STAT3	CXCL8										
21	20	hsa-let-7a-5p	SP1	EDN1										

Şekil 8.7. Meme kanseri oluşum ve gelişimi için önemli olan 1. tip üçlü devre listelerini içeren Excel tablosuna ait ekran görüntüsü.

Listelerin tamamı **CD'de EK-8** olarak verilmiştir.

EK-9

Sistemin fayda analizi sonucunda elde edilen listeler.



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1		miRNA	TF	GEN										
2	1	hsa-let-7a-3p	CREB1	CCND1										
3	2	hsa-let-7a-3p	E2F8	CCND1										
4	3	hsa-let-7a-3p	CREB1	DUSP6										
5	4	hsa-let-7a-3p	RORA	DUSP6										
6	5	hsa-let-7a-3p	CREB1	GSK3B										
7	6	hsa-let-7a-3p	CREB1	NOLC1										
8	7	hsa-let-7a-5p	E2F1	ACTB										
9	8	hsa-let-7a-5p	SP1	APP										
10	9	hsa-let-7a-5p	SP1	ATP2A2										
11	10	hsa-let-7a-5p	E2F1	AURKB										
12	11	hsa-let-7a-5p	E2F1	BCL2										
13	12	hsa-let-7a-5p	SP1	BCL2										
14	13	hsa-let-7a-5p	STAT3	BCL2										
15	14	hsa-let-7a-5p	E2F1	CALU										
16	15	hsa-let-7a-5p	SP1	CASP3										
17	16	hsa-let-7a-5p	AHR	CCND1										
18	17	hsa-let-7a-5p	E2F1	CCND1										
19	18	hsa-let-7a-5p	SP1	CCND1										
20	19	hsa-let-7a-5p	STAT3	CCND1										
21	20	hsa-let-7a-5p	E2F1	CDC7										

Şekil 8.8. Sistemin fayda analizi sonucunda elde edilen listelerin olduğu Excel tablosuna ait ekran görüntüsü.

Listelerin tamamı **CD’de EK-9** olarak verilmiştir.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Yasemin ÖZTEMUR ISLAKOĞLU

Doğum Yeri: Ankara/Çankaya

Doğum Tarihi: 06.01.1987

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: MEV Özel Ankara Fen Lisesi (2001-2005)

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü (2007-2011)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Bölümü (2011-2013)

10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Yasemin Öztemur Islakoğlu, Senem Noyan, Bala Gür Dedeoğlu “hsa-miR-301a- and SOX10-dependent miRNA-TF-mRNA regulatory circuits in breast cancer” Turkish Journal of Biology, 42 (2), 103-112, 2018.

Diğer Yayınlar

Araştırma Makaleleri

Ozdogan H, Gur Dedeoglu B, **Oztemur Islakoglu Y**, Aydos A, Kose S, Atalay A, Yegin ZA, Avcu F, Uckan Cetinkaya D, Ilhan O. “DICER1 gene and miRNA dysregulation in mesenchymal stem cells of patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia” Leuk Res. 2017 Oct 31;63:62-71. doi: 10.1016/j.leukres.2017.10.006.

Aydos A, Gurel A, **Oztemur Islakoglu Y**, Noyan S, Gokce B, Ecemis T, Kaya C, Aksu AT, Gur Dedeoglu B (2016), “Identification of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Specific Genes in Cumulus and Mural Granulosa Cells.” PLoS One. 2016 Dec 20;11(12):e0168875. doi: 10.1371/journal.pone.0168875.

Coskunpinar E, Arkan H, Dedeoglu BG, Aksoz I, Polat E, Araz T, Aydos A, **Oztemur Y**, Akbas F, Onaran I. “Determination of effective miRNAs in wound healing in an experimental Rat Model.” Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2015 Dec 24;61(8):89-96. PMID: 26718435

Oztemur Y, Bekmez T, Aydos A, Yulug IG, Bozkurt B, Dedeoglu BG (2015), “A Ranking-Based Meta- Analysis Reveals Let-7 Family as a Meta-Signature for Grade Classification in Breast Cancer.” PLoS ONE 10(5): e0126837. doi:10.1371/journal.pone.0126837.

Derleme Makaleleri

Aydos A, **Öztemur Y**, Gür-Dedeoğlu B. Polikistik over sendromu ve moleküler yaklaşımlar. Turk Hij Den Biyol Derg. 2016; 73(1): 81-88.

Öztemur Y, Aydos A, Gür-Dedeoğlu B. Meme kanseri mikrodizin verilerinin

biyoinformatik yöntemler ile bir araya getirilmesi - Meta-analiz yaklaşımları. Turk Hij Den Biyol Derg, 2015; 72(2): 155-62.

Kitap Bölümü

Bala Gür Dedeoğlu, **Yasemin Öztemur Islakoğlu**, “Sınırsız Bölünme Potansiyeli ve Telomerler”, KANSER MOLEKÜLER BİYOLJİSİ, 2018, Editör: Prof. Dr. Yusuf Baran, Kısayol Yayıncılık.

Ulusal/ Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

A.Yücel Polat, **Y. Oztemur Islakoglu**, A. Aydos, S. Noyan, B. Gur Dedeoglu “Meta-analysis based miRNA signature discriminates cervical cancer from normal samples”, The European Journal of Pathology, Volume 471 Supplement 1, September 2017.

Yasemin Oztemur Islakoglu, Senem Noyan, Bala Gur Dedeoglu, “hsa-miR-501-3p is a Stable Endogenous Control for Breast Tumors”, Turkish Journal of Molecular Biology & Biotechnology Supplement 1, May 2017.

Y. Oztemur, A. Aydos, B. Gur Dedeoglu, “TF-miRNA circuits specific to epithelial cancers”, in *The FEBS Journal Special Issue for the 41st FEBS Congress*, September 2016.

A.Yucel Polat, **Y. Oztemur**, A. Aydos, B. Gur Dedeoglu, “Meta-analysis based miRNA signature discriminates cervical cancer from normal samples”, in *The FEBS Journal Special Issue for the 41st FEBS Congress*, September 2016.

S. Noyan, N. Kilic, **Y. Oztemur**, B. Gur Dedeoglu, D. Cansaran-Duman “Determination of miRNAs of usnic acid lichen seconder metabolite using high-throughput technology”, in *The FEBS Journal Special Issue for the 41st FEBS Congress*, September 2016 (**Sözlü sunum**).

Alp Aydos, **Yasemin Oztemur**, Aykut Gurel, Cemil Kaya, Tarık Aksu, Bala Gur Dedeoglu, “miRNA-TF-Target Gene Circuits in Polycystic Ovary Syndrome”, in *the Proceedings of 4th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey*, Ankara, Turkey, 27-29 November 2015.

Emine Ezel Çilek, **Yasemin Öztemur**, Bala Gür Dedeoğlu, “Meta-Analysis of Gene Expression in Canine Mammary Tumors Reveals Novel Clinical Biomarkers and Biological Mechanisms”, 32nd World Veterinary Congress, İstanbul, Turkey, 13-17 September 2015.

Öztemur Yasemin, Bekmez Tufan, Aydos Alp, Gür Dedeoğlu Bala, “Meme kanseri moleküler alt tipleri için belirteç adayı miRNA’ların meta-analiz yöntemi ile tespit edilmesi”, 14. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Ölüdeniz, Fethiye, Türkiye, 27-30 Ekim 2015.

Aydos Alp, Gürel Aykut, **Öztemur Yasemin**, Kaya Cemil, Aksu Tarık, Gür Dedeoğlu Bala “Polikistik Over Sendromu’nda (PKOS) Granüloza Hücrelerinin mikroRNA (miRNA) İfade Profiline Belirlenmesi” , 14. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Ölüdeniz, Fethiye, Türkiye, 27-30 Ekim 2015 (**Poster ikincilik ödülü**).

Aydos A, Gurel A, **Oztemur Y**, Gokce B, Ecemis T, Kaya C, Aksu AT, Gur-Dedeoglu B, “Meta-analysis of gene expression profiles of cumulus and granulosa cells in polycystic ovary syndrome”, AE-PCOS 2015, Siracusa, Sicily, Italy, 4-6 October 2015.

Aydos, A. Gurel, **Y. Oztemur**, C. Kaya, T. Aksu, B. Gur Dedeoglu, “MicroRNA (miRNA) signature in granulosa cells specific to polycystic ovary syndrome (PCOS)”, Volume 30, Supp 1 2015 Abstract Book ESHRE 2015 – Lisbon, Portugal, 14-17 June 2015.

Y.Oztemur, B.G.Dedeoglu, “miRNA-TF-mRNA Circuits in Breast Cancer”, in the *Proceedings of 3rd International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey*, İzmir, Turkey, 10-12 September 2014.

K.Narci, A.C.Ozketen, A.Andac, B.Demiralay, B.G.Dedeoglu, **Y.Oztemur** and M.S.Akkaya, “Hunting down of the endogenic microRNA like small RNAs in plant pathogenic and symbiotic fungi”, *XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*, Rhodes, Greece, 6-10 July 2014.

Y.Oztemur, T.Bekmez, A.Aydos, I.Yulug, B.G. Dedeoglu, “miRNA-mRNA integrated analysis in breast cancer: Let-7 cluster as a meta-signature for grade classification”,

European Journal of Cancer 50 (Supplement 5), EACR-23, Munich, Germany, 5-8 July 2014.

Y.Öztemur, T.Bekmez, A.Aydos, V.Purutçuoğlu ve B.G.Dedeoğlu, “Meme kanserinin patolojik alt tiplerinin meta-analiz yöntemine dayalı miRNA imzaları ile sınıflandırılması”, *13. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi*, Kuşadası, Aydın, Türkiye, 27-30 Ekim 2013.

A.Aydos, **Y.Öztemur**, ve B.G.Dedeoğlu, “Polikistik over sendromunda kumulus ve granülosa hücrelerinin gen ifade profillerinin belirlenmesi”, *13. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi*, Kuşadası, Aydın, Türkiye, 27-30 Ekim 2013.

Y.Oztemur, T.Bekmez, A.Aydos, V.Purutcuoglu, B.G.Dedeoglu, “Let-7 cluster as a meta-signature for grade classification in breast cancer”, *in the Proceedings of HIBIT'13 8th International Symposium on Health Informatics and Bioinformatics*, Ankara, Turkey, 25-27 November 2013.

hsa-miR-301a- and SOX10-dependent miRNA-TF-mRNA regulatory circuits in breast cancer

Yasemin ÖZTEMUR ISLAÇOĞLU, Senem NOYAN, Bala GÜR DEDEOĞLU*

Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey

Received: 08.08.2017

Accepted/Published Online: 13.01.2018

Final Version: 27.04.2018

Abstract: Breast cancer is the most common cancer among women and the molecular pathways that play main roles in breast cancer regulation are still not completely understood. MicroRNAs (miRNAs) and transcription factors (TFs) are important regulators of gene expression. It is important to unravel the relation of TFs, miRNAs, and their targets within regulatory networks to clarify the processes that cause breast cancer and the progression of it. In this study, mRNA and miRNA expression studies including breast tumors and normal samples were extracted from the GEO microarray database. Two independent mRNA studies and a miRNA study were selected and reanalyzed. Differentially expressed (DE) mRNAs and miRNAs between breast tumor and normal samples were listed by using BRB-Array Tools. CircuitsDB2 analysis conducted with DE miRNAs and mRNAs resulted in 3 significant circuits that are SOX10- and hsa-miR-301a-dependent. The following significant circuits were characterized and validated bioinformatically by using web-based tools: SOX10→hsa-miR-301a→HOXA3, SOX10→hsa-miR-301a→KIT, and SOX10→hsa-miR-301a→NFIB. It can be concluded that regulatory motifs involving miRNAs and TFs may be useful for understanding breast cancer regulation and for predicting new biomarkers.

Key words: Breast cancer, miRNA, mRNA, transcription factor, regulatory circuits

1. Introduction

Breast cancer is a complex genetic disorder that is not controlled by a single factor but is rather controlled by many factors (<http://www.cancer.org/>). Although many factors (genes, microRNAs (miRNAs), transcription factors, etc.) that cause breast cancer and play a role in its development have been identified with the advancement of high-throughput technologies, the molecular mechanisms playing a role in disease regulation have still not been revealed. For this reason, it is important and inevitable to identify the regulatory circuits and networks that will explain the development and progression of breast cancer.

Gene expression regulation is an important mechanism for controlling biological processes in the cell. Transcriptional factors (TFs) are the regulators that function at the transcriptional level, while miRNAs work at the posttranscriptional level. In view of the fact that the transcription of mRNA and miRNAs is controlled by TFs and the expression of TFs is regulated by miRNAs, these two important mechanisms cannot be separated from each other. Therefore, characterization of these combinatorial regulatory mechanisms is important to reveal the biological processes that take part in breast cancer in detail by constructing networks and circuits.

miRNAs are small, noncoding RNA molecules that regulate gene expression in posttranscriptional stages (Lagos-Quintana et al., 2001; Lee and Ambros, 2001). miRNAs play important roles in biological processes such as development, cell division, cell differentiation, and programmed cell death. In this context, it is possible that altered miRNA expression may contribute to the development and progression of diseases such as cancer. The presence of abnormal miRNA expression profiling in many diseases, including breast cancer, has been demonstrated and validated by intensifying miRNA studies (Iorio et al., 2005; Lowery et al., 2009; Enerly et al., 2011; Romero-Cordoba et al., 2012). The finding that miRNA expressions are often dysregulated in cancers has made these molecules important candidates for cancer markers (Calin et al., 2002; Lu et al., 2005). Therefore, the search for the relationship of miRNAs with target genes (this may be an mRNA or a TF) has great importance for the diagnosis and treatment of breast cancer.

TFs are essential regulatory elements in the transcriptional pathway, which work by binding to target genes that have specific DNA sequences, usually in the promoter region (Latchman, 1997). TFs regulate their targets at the transcription level by inhibiting or enhancing

* Correspondence: gurbala@yahoo.com

their expression while miRNAs regulate target mRNAs at the posttranscriptional level in the form of inhibition. miRNAs also undergo the transcription process and they regulate their target genes like TFs. When all these reasons are taken into consideration:

- Expression of a miRNA may be regulated by a transcription factor;
- Expression of a TF may be regulated by a miRNA;
- Similarly, the transcription factor and miRNA may regulate the expression of target genes together.

In recent years, many researchers have been working on TFs, miRNAs, and their regulation mechanism on posttranscriptional and transcriptional levels. With the help of system biology approaches, transcription factor-miRNA-target gene relationships were started to be explored by an increasing number of studies. These studies have mostly used and/or developed bioinformatics and statistical methods and they have reviewed the existing information. The tools that analyze miRNA-TF relationships can be grouped into three subgroups. The tools in the first group are intended to analyze statistically the gene clusters organized by cooperating miRNAs and/or miRNAs using matched miRNA and mRNA expression profiles (Yoon and De Micheli, 2005; Joung et al., 2007; Tran et al., 2008; Joung and Fei, 2009; Nam et al., 2009). The tools in the second group again predict gene expression relationships using gene expression data (Naeem et al., 2011). The tools in the third group provide static circuits, combining statistical data obtained from literature (e.g., CircuitDB) (Friard et al., 2010b).

In light of the above mentioned information, this work aims to identify breast cancer-specific miRNA-TF-mRNA circuits bioinformatically that could be important in breast cancer development. We have identified regulatory circuits and molecule associations that differ between the normal group and breast cancer patients by using previously performed expression studies.

2. Materials and methods

2.1. Selection of miRNA and mRNA microarray studies

It was aimed to obtain miRNA and mRNA microarray data related to breast cancer in the literature. GEO, a publicly

available database at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> (Edgar et al., 2002), was used for this purpose. “miRNA / mRNA”, “microarray”, and “breast cancer” terms were used together when searching in GEO. The datasets were selected from among the ones that have freshly frozen tumor and normal tissue information. Microarray data obtained from blood samples, formalin-fixed paraffin-embedded tissues, and cell lines were excluded from the study to prevent biased expression profiles.

As a result, 2 independent mRNA studies and 1 miRNA study including breast tumors and normal samples were selected to be analyzed (Table 1).

2.2. Class comparison analysis

The raw data were obtained from the microarray database (GEO) and normalized by using quantile normalization in BRB-Array Tools, which is an Excel-integrated package for the visualization and statistical analysis of microarray gene expression data. Quantile normalization, one of the most widely adopted methods for analyzing microarray data, was used as the normalization method. Normalization is important to remove any differences that may arise from technical problems and to make the data comparable. Class comparison tests were performed to find out differentially expressed miRNAs and mRNAs between tumor samples and normal samples ($P \leq 0.05$, 2-fold change). This test provides powerful methods for finding differentially expressed genes when controlling the ratio of false positives. Differentially expressed and common genes (by Venny 2.1.0) were found for tumor vs. normal comparison in GSE3744 and GSE5764 (http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny_old/venny.php). Lastly, differentially expressed miRNAs were found in GSE45666.

2.3. Identification of TFs in DE mRNA lists

Transcription factor lists that have been identified in the human body were accessed by using the Animal Transcription Factor DataBase 2.0 (<http://www.bioguo.org/AnimalTFDB/>) (Zhang et al., 2015) and the TFs that were in the DE genes were determined by comparison with these lists.

2.4. Circuit analysis

The CircuitsDB2 analysis tool was used to identify the breast cancer-specific circuits as regulatory loops among

Table 1. The characteristics of the datasets.

GEO ID	Platform	Normal samples	Tumor samples
GSE3744	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	7	40
GSE5764	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	15	15
GSE45666	Agilent-021827 Human miRNA Microarray G4470C	15	80
GSE17907 (Test data)	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array	4	51

the members of DE miRNAs, mRNAs, and TFs. This user-friendly tool provides static circuits by combining statistical data obtained from the literature. It contains precompiled transcriptional and posttranscriptional networks, the sets of network motifs, and series of functional and biological information, which are based on JASPAR DB and the ENCODE project. Members of the DE miRNAs, mRNAs, and TFs were searched in microRNA-mediated FFLs in which a TF is the master regulator in CircuitsDB2 (Friard et al., 2010b).

2.5. Circuit member analysis in diseases, biological processes, and pathways

For the characterization of the members of the significant circuits three different tools, PhenomiR, WebGeshtalt, and DIANA, were used.

The PhenomiR 2.0 database, completely generated by manual curation of experienced annotators, was used to obtain information about differentially regulated miRNA (circuit member miRNA, hsa-miR-301a here) expression in diseases (breast cancer here) (Ruepp et al., 2010).

WebGestalt is the “WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit”, in which the functional genomic, proteomic, and large-scale genetic studies from large numbers of gene lists (e.g., DE gene list) are continuously generated. Function analysis of the circuit member genes and TFs was performed with the WebGestalt Protein Interaction Network Module (Wang et al., 2013).

DIANA-mirPath v.3 was used to search the pathways of circuit member miRNA. It is a miRNA analysis tool that enables users to find targets of mRNAs by using different algorithms and to find pathways in which these genes are significantly enriched (Maragkakis et al., 2009; Vlachos et al., 2015).

2.6. Validation analysis

For advanced bioinformatics analysis for in silico validation of significant circuits, the mirExTra 2.0 under DIANA was used. Our miRNA and mRNA lists were analyzed using the Central microRNA Discovery Module (CmD) and miRNA-mRNA relationships in the circuits were tried to be validated. This module combines microRNA and mRNA expression data results (names, P-values, fold changes) in order to identify functional microRNAs responsible for changes in mRNA expression by utilizing in silico interactions from DIANA-microT-CDS. In this study, DE miRNA and mRNA lists were used for mirExtra analysis. It enabled us to determine the central regulator miRNAs and their targets and provided us the opportunity to validate our results (Maragkakis et al., 2009; Vlachos et al., 2016).

3. Results

3.1. The miRNA and mRNA datasets

The miRNA microarray studies and mRNA microarray studies were searched to find differentially expressed

miRNAs and mRNAs between breast cancer and normal tissues. Three independent microarray datasets were obtained from GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (Edgar et al., 2002).

One of the datasets was a miRNA microarray study performed with 80 breast cancer samples and 15 normal samples (GSE45666 (Lee et al., 2013)). Two of the datasets were mRNA microarray studies (GSE3744 (Richardson et al., 2006), GSE5764 (Turashvili et al., 2007)). The total number of breast cancer samples and normal samples were 55 and 22, respectively. The details of the platforms and the sample numbers are given in Table 1.

3.2. Differentially expressed miRNA and mRNA lists

The miRNA microarray study and two mRNA studies (Table 1) were independently analyzed by BRB-Array Tools, which is an integrated package for the visualization and statistical analysis of gene expression data (Simon et al., 2007). Quantile normalization was used as the normalization method. All studies consisted of 2 groups, which are tumor and normal. Class comparison tests were performed to find out differentially expressed miRNAs and mRNAs between tumor and normal samples. This test provides powerful methods for finding differentially expressed genes when controlling the ratio of false positives. This method is similar to the significance analysis of microarrays method (Tusher et al., 2001) but provides more control of the false discovery rate (Simon et al., 2007).

As a result of class comparison analysis, miRNA and mRNA lists were obtained. Twenty-three miRNAs (11 upregulated and 12 downregulated; Table S1) were found to be differentially expressed between tumor and normal samples. Since two mRNA studies were performed, the DE mRNAs were listed as common DE genes in both of the studies. A total of 264 mRNAs (187 downregulated and 77 upregulated; Table S1) were found to be differentially expressed between tumor and normal samples and were common for each mRNA study.

3.3. Differentially expressed transcription factors list

To obtain the TFs among DE mRNA lists, which are given in Table S1, AnimalTFDB 2.0 was used (Zhang et al., 2015). This tool has a dataset that consists of 1691 transcription factors in 68 families in humans. When we compared it to the DE list, 18 of the genes in the DE gene list were found to encode proteins functioning as TFs: *ATF3*, *BHLHE41*, *EHF*, *FOSB*, *HOXA3*, *ID4*, *IRX1*, *NFIB*, *SOX10*, *MAFF*, *FOS*, *NR3C2*, *STAT1*, *EGR1*, *JUN*, *ZNF662*, *THRB*, and *ZBTB16*.

3.4. Significant breast cancer-specific circuits

CircuitsDB2 was used to identify important and regulatory circuits that consist of the members of DE miRNA, mRNA, and TF lists. CircuitsDB2 is a web service that includes

data as regulatory loops stored in a relational database that can be accessed through a dynamic web interface (Friard et al., 2010b). With use of this interface it is possible to find different kinds of circuits like feedforward loops (FFLs) in which a TF regulates a miRNA and they both regulate a target gene (Friard et al., 2010a). Members of the DE miRNA, mRNA, and TF lists were searched in microRNA-mediated FFLs in which a TF is the master regulator in CircuitsDB2.

Three significant circuits that are SOX10- and hsa-miR-301a-dependent were identified (Figure 1a) by CircuitsDB2 [5] analysis; in each circuit, hsa-miR-301a was found to be upregulated and its TF target SOX-10 was downregulated. Additionally, the three target genes that were under regulation of both miR-301a and SOX10 were downregulated as expected (Figure 1b).

3.5. Circuit members in diseases, biological processes, and pathways

To characterize the significant circuits in detail, their presence in diseases, biological processes, and signaling pathways were identified in detail by using related web-based tools.

The first step was to search the expression information of miRNA hsa-miR-301a. When breast cancer association data were extracted, concordant with our finding, it was found to be overexpressed in breast tumors. Since the data in PhenomiR (Ruepp et al., 2010) were obtained from independent studies and contain results from both cell lines and tumor samples, our results related to hsa-miR-301a could be accepted as robust for breast cancer (Table 2). Given the pathological, histological, and molecular differences (e.g., MCF-7: ER+; SK-BR-3: HER2+; MDA-MB-231: triple-negative) of the cell lines in Table 2, hsa-miR-301a, which is upregulated in the different cell lines and tumor specimens, may be accepted as a generalized and important marker for breast cancer. Additionally the expression profiles of other members of the circuits, SOX10, HOXA3, KIT, and NFIB, were searched in an independent microarray dataset (GSE17907; 51 tumor and 4 normal breast samples) and compatible to our results found to be significantly downregulated in tumor samples compared to normal ones (SOX10, P-value 1.00E-07, 11-fold downregulation; HOXA3, P-value 0.0004616, 4-fold downregulation; KIT, P-value, 3.00E-07, 11-fold

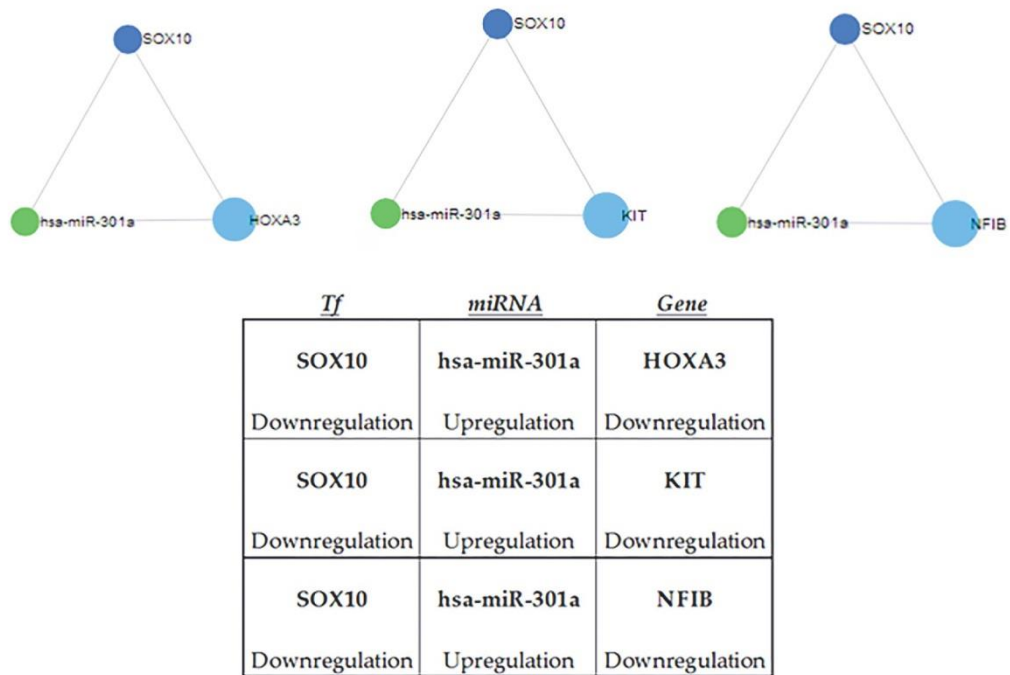


Figure 1. Significant circuits, which were results of CircuitsDB2 analysis. a) The triangular shapes are circuit diagrams taken from CircuitsDB2. The dark blue circles represent the TF, the green circles represent the miRNA, and the light blue circles represent the targets. b) Downregulation and upregulation terms indicate the differentiation of expression according to tumor vs. normal.

Table 2. Expression changes of hsa-miR-301a in previous studies in the literature. The table was created with the information obtained from PhenomiR 2.0 (Ruepp et al., 2010).

No.	ID	miRNA name	Disease	Tissue/cell line	PubMed ID	Regulation	Study design
1	447	hsa-mir-301a	Breast cancer	Breast epithelium	16754881	Up	Patient study, phenotype-control
2	451	hsa-mir-301a	Breast cancer	MCF-7 cell	16192569	Up	Cell culture study
3	366	hsa-mir-301a	Breast cancer	T-47D cell	16192569	Up	Cell culture study
4	481	hsa-mir-301a	Breast cancer	MDA-MB-231 cell	16192569	Up	Cell culture study
5	377	hsa-mir-301a	Breast cancer	SK-BR-3 cell	16192569	Up	Cell culture study
6	482	hsa-mir-301a	Breast cancer	MDA-MB-361 cell	16192569	Up	Cell culture study

downregulation; and NFIB, P-value 0.0012966, 3.7-fold downregulation).

The second step was to find out the pathways in which the targets of hsa-miR-301a were taking part. DIANA-mirPath v.3 was used for this purpose (Maragkakis et al., 2009; Vlachos et al., 2015). This tool aims to find the targets of microRNAs by using 3 different target algorithms (TargetScan, microT-CDS, and Tarbase) and determining the pathways in which these genes are significantly enriched. The members of our circuits, KIT, NFIB, and HOXA3, were among the identified targets (by mirPath) of hsa-miR-301a (data not shown). It was also seen in the HeatMap plotted after the pathway analysis that the targets of this microRNA function in pathways that are known to be important in cancer (Figure 2).

The third step was function analysis of the genes. For the characterization of the members of the significant circuits, which are SOX10, KIT, NFIB, and HOXA3, function analysis was performed for each of them using WebGestalt protein interaction network module-related function analysis (Table 3) (Wang et al., 2013).

3.6. Advanced bioinformatics analysis for in silico validation

To validate the significant circuits, the DIANA-mirExTra 2.0 tool was used (Maragkakis et al., 2009; Vlachos et al., 2016). We used DE miRNA and mRNA lists with fold change and P-value information as an input and the algorithm identified which miRNAs were central regulators (interactions based on microT-CDS and threshold type based on fold change with 2-fold change). Analysis showed that the most regulatory upregulated (tumor vs. normal) miRNA was hsa-miR-301a ($P = 7.3e-$

03), while the most regulatory downregulated (tumor vs. normal) miRNA was hsa-miR-376c ($P = 6.4e-03$), which is also the most downregulated DE miRNA in our list. As can be seen in Figure 3, hsa-miR-301a, which is the regulatory miRNA of the 3 circuits (Figure 1), was expressed as one of the central miRNAs, and as can be seen in the interaction details, *KIT*, *NFIB*, and *HOXA3* are among the regulated target genes (Figure 3). These advanced and independent analysis results confirm and validate our CircuitsDB2 circuit analysis results.

4. Discussion

Breast cancer is a complex genetic disorder that is not controlled by a single factor but is controlled by many variables and is still the most common type of cancer in women today (<http://www.cancer.org/>). Although many scientific studies have been carried out on breast cancer, it is still unclear in many respects. Since breast cancer is a complex disease, to understand the development of breast cancer new biomarkers need to be discovered. In addition to the discovery of new biomarkers, it is also of great importance to investigate their relationships with each other (e.g., miRNA-TF-mRNA circuits). In recent years, systems biology approaches have become more important in the understanding of diseases. The development of the methods that help to understand large molecular data and the molecular mechanisms of breast cancer development is inevitable.

The aim of this study was to analyze the TF-miRNA-target gene relationships in a global perspective in breast cancer samples and to determine miRNA-TF-mRNA circuits that can play a role in breast cancer.

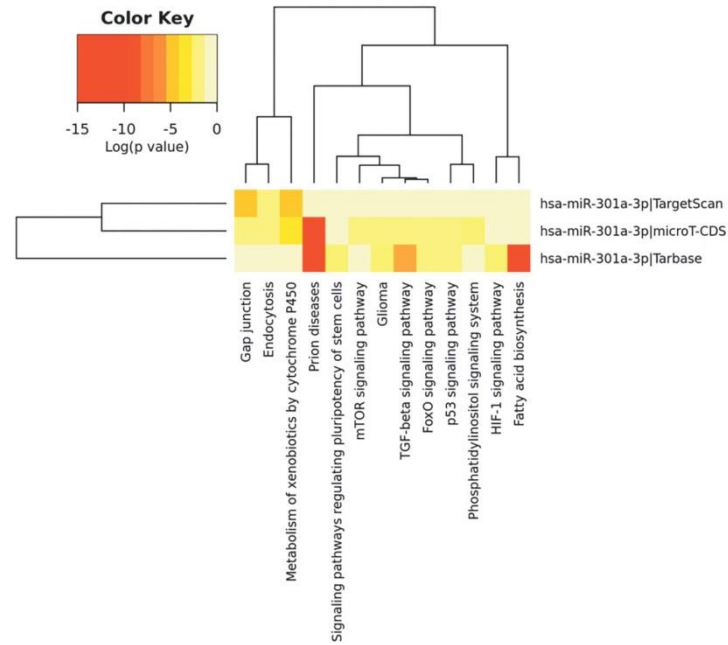


Figure 2. Pathway enrichment results of hsa-miR-301a targets. Targets of the miRNA and KEGG pathway results were used to construct the heat map, which was obtained from DIANA (Maragkakis et al., 2009; Vlachos et al., 2015). The intensity of color represents the logarithmic P-values.

Table 3. Function analysis results for the members of the significant circuits. The table was created with the information obtained from the WebGestalt protein interaction network module and related function analysis (Wang et al., 2013).

Gene name	Biological process	Cellular component	Molecular function
<i>SOX10</i>	Positive regulation of	Extrinsic to mitochondrial	HMG box domain
	gliogenesis	outer membrane	binding
	P = 4.84e-07	P = 9.81e-04	P = 1.91e-11
<i>KIT</i>	Intracellular signal	Cytosol	Signaling adaptor
	transduction		activity
	P = 4.67e-10		P = 1.07e-09
<i>NFIB</i>	Anterior/posterior pattern	Nucleus	Sequence-specific DNA
	specification		binding
	P = 0e+00		P = 0e+00
<i>HOXA3</i>	Negative regulation of	Perinuclear theca	Biotin-[acetyl-CoA-carboxylase]
	DNA replication		ligase activity
	P = 1.54e-03		P = 2.03e-03

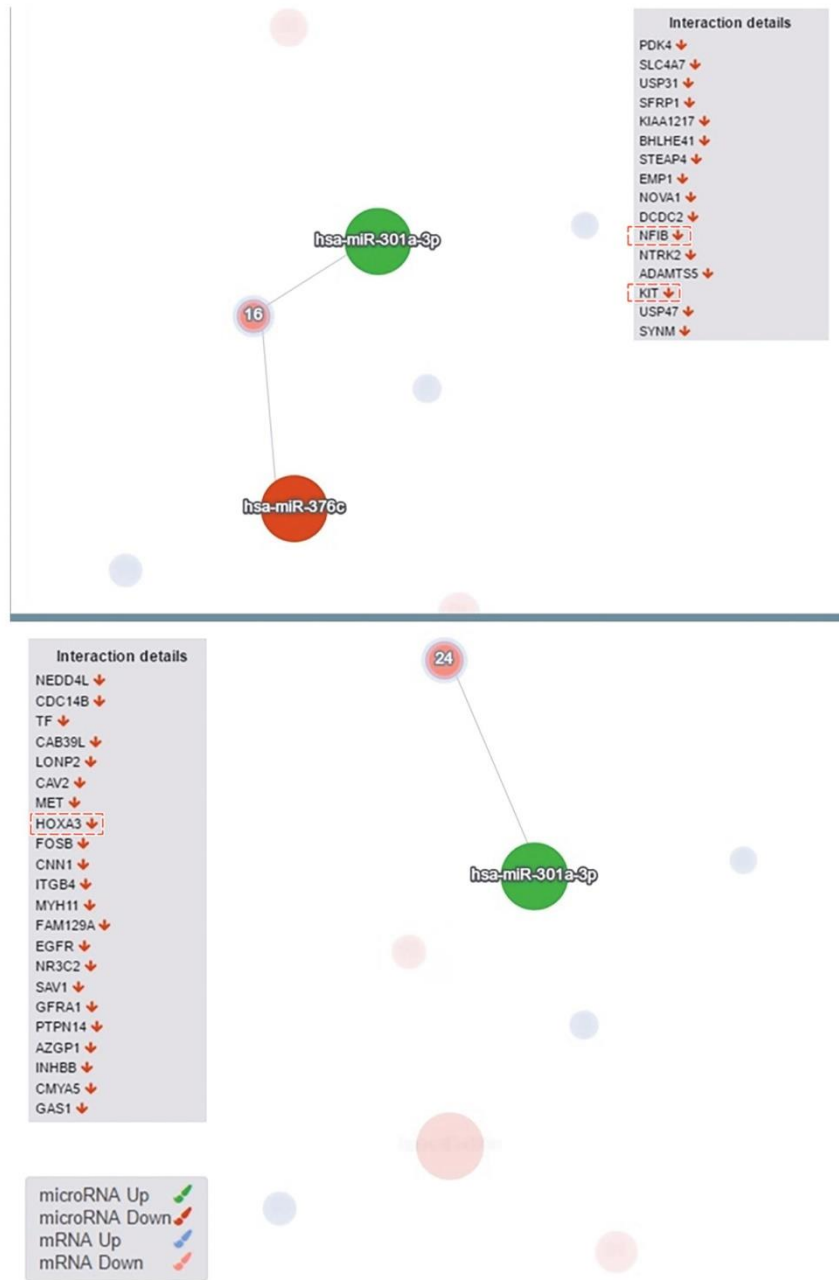


Figure 3. Validation results of the circuits members. hsa-miR-301a (upregulated) and hsa-miR-376c (downregulated) are the central regulator miRNAs for the tumor vs. normal comparison. KIT and NFIB are targeted by hsa-miR-301a and hsa-miR-376c while HOXA3 is targeted by only hsa-miR-301a. The figure was obtained from DIANA-mirExTra 2.0 (Maragkakis et al., 2009; Vlachos et al., 2016).

In this study we focused on finding out regulatory miRNA-TF-mRNA circuits specific to breast cancer with the help of various web-based tools and databases. Through the workflow designed in the study and the bioinformatics methods used, three independent microarray studies (Table 1) were reanalyzed and were converted to circuits that are important in breast cancer development. The whole process enabled us to make more use of the data in the literature, which was achieved by using a microarray that is a high-throughput and expensive method. The tools used in the workflow are not only used to cross-check the data but also to validate the robustness of the results of this work. Such a work flow can also be applied for other diseases (Figure 4).

Circuit analysis revealed 3 significant miRNA-TF-mRNA circuits that are SOX10- and hsa-miR-301a-dependent: $SOX10 \rightarrow hsa-miR-301a \rightarrow HOXA3$, $SOX10 \rightarrow hsa-miR-301a \rightarrow KIT$, and $SOX10 \rightarrow hsa-miR-301a \rightarrow NFIB$ (Figure 1a). hsa-miR-301a, the common member of the circuits, is known to be an important miRNA in breast

cancer. It was found to be upregulated in breast tumors for our circuits (Figure 1b). In 2011, it was reported as a novel oncogene in lymph node-negative breast cancer and it was shown to mediate proliferation, migration, and invasion (Shi et al., 2011). Since then, other studies have been performed regarding the role of miR-301a upregulation in breast cancer (Ma et al., 2014; McDermott et al., 2014). In 2014, upregulation of that miRNA was found to be associated with poor prognosis in triple-negative breast cancers (Yu et al., 2014). When we searched the expression information of miRNA in PhenomiR (Ruepp et al., 2010), it was found to be overexpressed in breast tumors in independent studies (Table 2). Considering the concordance of the literature with our results and the pathological, histological, and molecular variability (e.g., ER+, HER2+, triple-negative) of the samples in Table 2 and in the literature, hsa-miR-301a, which is consistently upregulated in different breast cancer cell lines and tumors, may be accepted as a generalized marker for breast cancer development.

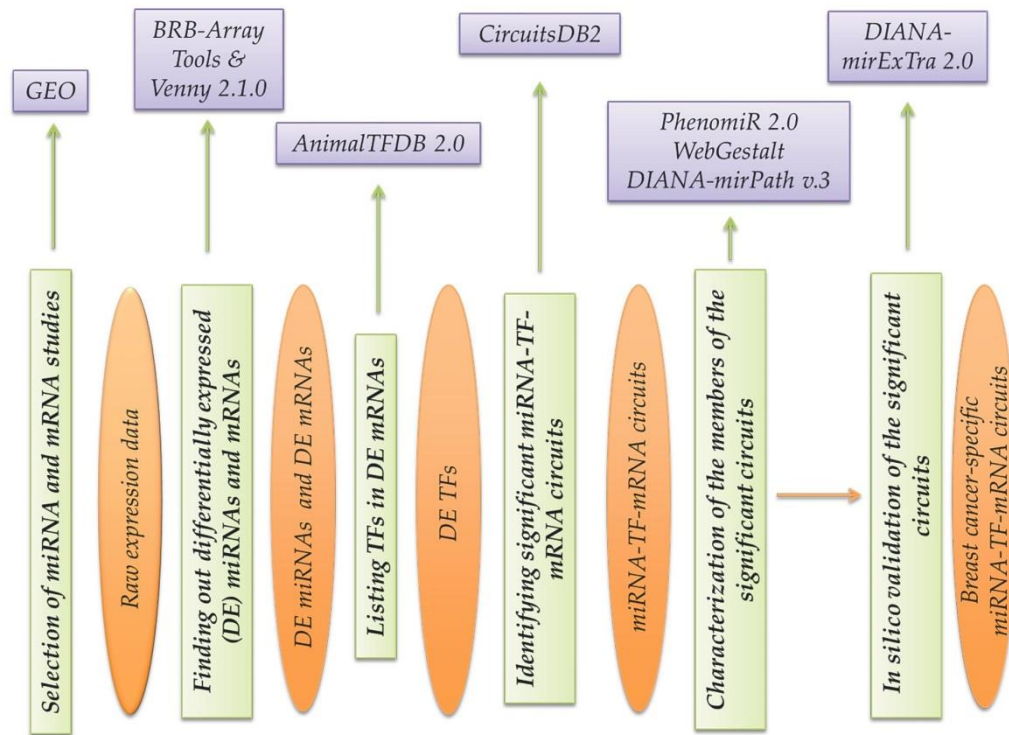


Figure 4. General study design and workflow. Purple boxes represent bioinformatics tools used for the processing of the data, green boxes represent main work steps, and orange ellipses represent input and outputs.

The results of DIANA-mirPath together with WebGestalt may strengthen the role of these significant circuits in breast cancer. The pathway enrichment analysis results showed that the target genes and the target TF SOX10 were found to be members of cancer-specific pathways like TGF-beta, mTOR, and p53 signaling pathways. SOX10, which is the common TF in our circuits, was reported to be one of the regulated TFs in breast cancer by Zang et al. Those authors combined seven studies that conducted next-generation sequencing for breast tumors and normal samples and, concordant with our in silico results, SOX10 was found to be downregulated in breast cancers (Zang et al., 2017).

The two common members of the three circuits in this study are two regulative elements of gene regulation, a miRNA and a TF. The balance of the reciprocal regulation among these two important elements may determine the fate of the cell, which is in our situation cancer progression. In the suggested circuits in this study the regulative effect of miRNA is seen to be dominant and it

is consistently upregulated and negatively regulates the TF (SOX10) expression. This tight regulation among miRNA-TF affected the cancer-related target genes *HOXA3*, *KIT*, and *NFIB*. The well-known regulation of these target genes in different cancers (Moon et al., 2011; Jachetti et al., 2017; Zhang et al., 2017) and validation of them to be downregulated in breast tumor samples by an independent microarray dataset support the idea of the systems biology approach in cancers originating from different tissues.

In summary, the results of this study show that regulatory motifs involving miRNAs and TFs may be useful for understanding breast cancer regulation and for predicting new biomarkers. Characterization of these combinatorial regulatory mechanisms is important to reveal the biological processes that take part in breast cancer in detail by constructing networks and circuits. Finding out new circuits combining miRNAs, TFs, and mRNAs may provide further insight to improve our knowledge of breast cancer development.

References

- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K et al (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *P Natl Acad Sci USA* 99: 15524-15529.
- Edgar R, Domrachev M, Lash AE (2002). Gene Expression Omnibus : NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 30: 207-210.
- Enerly E, Steinfeld I, Kleivi K, Leivonen SK, Aure MR, Russnes HG, Ronneberg JA, Johnsen H, Navon R, Rodland E et al (2011). miRNA-mRNA integrated analysis reveals roles for miRNAs in primary breast tumors. *PLoS One* 6: e16915.
- Friard O, Re A, Taverna D, De Bortoli M, Cora D (2010a). CircuitsDB: a database of mixed microRNA/transcription factor feed-forward regulatory circuits in human and mouse. *BMC Bioinformatics* 11: 435.
- Friard O, Re A, Taverna D, De Bortoli M, Cora D (2010b). CircuitsDB: a database of mixed microRNA/transcription factor feed-forward regulatory circuits in human and mouse. *BMC Bioinformatics* 11: 435.
- Iorio MV, Ferracin M, Liu CG, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M et al (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 65: 7065-7070.
- Jachetti E, Rigoni A, Bongiovanni L, Arioli I, Botti L, Parenza M, Cancila V, Chiodoni C, Festinese F, Bellone M et al (2017). Imatinib spares cKit-expressing prostate neuroendocrine tumors, whereas kills seminal vesicle epithelial-stromal tumors by targeting PDGFR-β. *Mol Cancer Ther* 16: 365-375.
- Joung JG, Fei Z (2009). Identification of microRNA regulatory modules in *Arabidopsis* via a probabilistic graphical model. *Bioinformatics* 25: 387-393.
- Joung JG, Hwang KB, Nam JW, Kim SJ, Zhang BT (2007). Discovery of microRNA-mRNA modules via population-based probabilistic learning. *Bioinformatics* 23: 1141-1147.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294: 853-858.
- Latchman S (1997). Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol* 2725: 1305-1312.
- Lee CH, Kuo WH, Lin CC, Oyang YJ, Huang HC, Juan HF (2013). MicroRNA-regulated protein-protein interaction networks and their functions in breast cancer. *Int J Mol Sci* 14: 11560-11606.
- Lee RC, Ambros V (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 862-864.
- Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren PA, Lemetre C, Benes V, Schmidt S, Blake J, Ball G et al (2009). MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res* 11: R27.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA et al (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834-838.
- Ma F, Zhang J, Zhong L, Wang L, Liu Y, Wang Y, Peng L, Guo B (2014). Upregulated microRNA-301a in breast cancer promotes tumor metastasis by targeting PTEN and activating Wnt / β -catenin signaling. *Gene* 535: 191-197.

- Maragkakis M, Reczko M, Simossis VA, Alexiou P, Papadopoulos GL, Dalamagas T, Giannopoulos G, Goumas G, Koukis E, Kourtis K et al (2009). DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res* 37: W273-W276.
- McDermott AM, Miller N, Wall D, Martyn LM, Ball G, Sweeney KJ, Kerin MJ (2014). Identification and validation of oncologic miRNA biomarkers for luminal A-like breast cancer. *PLoS One* 9: e87032.
- Moon HG, Hwang KT, Kim JA, Kim HS, Lee MJ, Jung EM, Ko E, Han W, Noh DY (2011). NFIB is a potential target for estrogen receptor-negative breast cancers. *Mol Oncol* 5: 538-544.
- Naeem H, Kuffner R, Zimmer R (2011). MIRTfnet: Analysis of miRNA regulated transcription factors. *PLoS One* 6: e22519.
- Nam S, Li M, Choi K, Balch C, Kim S, Nephew KP (2009). MicroRNA and mRNA integrated analysis (MMIA): a web tool for examining biological functions of microRNA expression. *Nucleic Acids Res* 37: W356-W362.
- Richardson AL, Wang ZC, De Nicolò A, Lu X, Brown M, Miron A, Liao X, Iglehart JD, Livingston DM, Ganesan S (2006). X chromosomal abnormalities in basal-like human breast cancer. *Cancer Cell* 9: 121-132.
- Romero-Cordoba S, Rodriguez-Cuevas S, Rebollar-Vega R, Quintanar-Jurado V, Maffuz-Aziz A, Jimenez-Sanchez G, Bautista-Piña V, Arellano-Llamas R, Hidalgo-Miranda A (2012). Identification and pathway analysis of microRNAs with no previous involvement in breast cancer. *PLoS One* 7: e31904.
- Ruepp A, Kowarsch A, Schmidl D, Buggenthin F, Brauner B, Dunger I, Fobo G, Frishman G, Montrone C, Theis FJ (2010). PhenomiR: a knowledgebase for microRNA expression in diseases and biological processes. *Genome Biol* 11: R6.
- Shi W, Gerster K, Alajez NM, Tsang J, Waldron L, Pintilie M, Hui AB, Sykes J, P'ng C, Miller N et al (2011). MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer. *Cancer Res* 71: 2926-2937.
- Simon R, Lam A, Li M, Ngan M, Menenzes S, Zhao Y (2007). Analysis of gene expression data using BRB-ArrayTools. *Cancer Inform* 3: 11-17.
- Tran DH, Satou K, Ho TB (2008). Finding microRNA regulatory modules in human genome using rule induction. *BMC Bioinformatics* 9 (Suppl. 12): S5.
- Turashvili G, Bouchal J, Baumforth K, Wei W, Dziechciarkova M, Ehrmann J, Klein J, Fridman E, Skarda J, Srovnal J et al (2007). Novel markers for differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas by laser microdissection and microarray analysis. *BMC Cancer* 7: 55.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *P Natl Acad Sci USA* 98: 5116-5121.
- Vlachos IS, Vergoulis T, Paraskevopoulou MD, Lykokanellos F, Georgakilas G, Georgiou P, Chatzopoulos S, Karagkouni D, Christodoulou F, Dalamagas T et al (2016). DIANA-miRExTra v2.0: Uncovering microRNAs and transcription factors with crucial roles in NGS expression data. *Nucleic Acids Res* 44: W128-134.
- Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG (2015). DIANA-miRPath v3.0: Deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res* 43: W460-W466.
- Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B (2013). WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic Acids Res* 41: W77-W83.
- Yoon S, De Micheli G (2005). Prediction of regulatory modules comprising microRNAs and target genes. *Bioinformatics* 21 (Suppl. 2): ii93-100.
- Yu H, Li H, Qian H, Jiao X, Zhu X, Jiang X, Dai G, Huang J (2014). Upregulation of miR-301a correlates with poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Med Oncol* 31: 283.
- Zang H, Li N, Pan Y, Hao J (2016). Identification of upstream transcription factors (TFs) for expression signature genes in breast cancer. *Gynecol Endocrinol* 2017; 33: 193-198.
- Zhang HM, Liu T, Liu CJ, Song S, Zhang X, Liu W, Jia H, Xue Y, Guo AY (2015). AnimalTFDB 2.0: a resource for expression, prediction and functional study of animal transcription factors. *Nucleic Acids Res* 43: D76-D81.
- Zhang X, Liu G, Ding L, Jiang T, Shao S, Gao Y, Lu Y (2017). HOXA3 promotes tumor growth of human colon cancer through activating EGFR/Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway. *J Cell Biochem* (in press).

Table S1. Differentially expressed gene and miRNA lists.

Common elements in “GSE5764” and “GSE3744” (upregulated common genes)		
Gene Symbol	GeneBank ID	Gene Name
COL10A1	AI376003	collagen, type X, alpha 1
COL11A1	NM_001854	collagen, type XI, alpha 1
COL1A2	AA788711	collagen, type I, alpha 2
COL1A1	BE221212	collagen, type I, alpha 1
COL5A2	AL575735	collagen, type V, alpha 2
BGN	BC002416	biglycan
INHBA	NM_002192	inhibin, beta A
CTHRC1	AA584310	collagen triple helix repeat containing 1
LRRC15	NM_130830	leucine rich repeat containing 15
HSD17B6	NM_003725	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6 homolog (mouse)
WISP1	NM_003882	WNT1 inducible signaling pathway protein 1
SULF1	AW043713	sulfatase 1
MMP11	AI761713	matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)
GMFB	BC005359	glia maturation factor, beta
FN1	W73431	fibronectin 1
FNDC1	AI345957	fibronectin type III domain containing 1
COMP	NM_000095	cartilage oligomeric matrix protein
TRIM59	N90779	tripartite motif containing 59
CXCL10	NM_001565	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
COL8A1	BE877796	collagen, type VIII, alpha 1
CCNB2	NM_004701	cyclin B2
GPRC5A	NM_003979	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member A
HMMR	NM_012485	hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)
ASPM	NM_018123	asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)
POLE2	NM_002692	polymerase (DNA directed), epsilon 2, accessory subunit
MKI67	AU152107	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
ATP6V1C1	AW024925	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C1
MCM6	NM_005915	minichromosome maintenance complex component 6
IFI44	BE049439	interferon-induced protein 44
IFI6	NM_022873	interferon, alpha-inducible protein 6
ISG15	NM_005101	ISG15 ubiquitin-like modifier
STAT1	NM_007315	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
TP53RK	BG339450	TP53 regulating kinase
KIAA0101	NM_014736	KIAA0101
LYZ	U25677	lysozyme
GNA13	NM_006572	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13
CENPF	NM_016343	centromere protein F, 350/400kDa (mitosin)
OAS1	NM_016816	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa
NEK2	NM_002497	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 2
RAB2A	AA535244	RAB2A, member RAS oncogene family
NCAPG	NM_022346	non-SMC condensin I complex, subunit G

Table S1. (Continued).

KIF15	NM_020242	kinesin family member 15
SMC2	NM_006444	structural maintenance of chromosomes 2
PRR11	NM_018304	proline rich 11
BUB1	AF043294	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)
NUSAP1	NM_016359	nucleolar and spindle associated protein 1
MLF1IP		MLF1 interacting protein
TYMS	AB077208	thymidylate synthetase
MRPL15	NM_014175	mitochondrial ribosomal protein L15
TOP2A	AU159942	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa
SKA2	BG496998	spindle and kinetochore associated complex subunit 2
CXCL11	AF030514	chemokine (C-X-C motif) ligand 11
DCBLD1	NM_173674	discoidin, CUB and LCCL domain containing 1
GJB2	M86849	gap junction protein, beta 2, 26kDa
IFI27	NM_005532	interferon, alpha-inducible protein 27
TACC3	NM_006342	transforming, acidic coiled-coil containing protein 3
DTL	NM_016448	denticless E3 ubiquitin protein ligase homolog (Drosophila)
PNP	NM_000270	purine nucleoside phosphorylase
DHX9	NM_001357	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9
CCNE2	NM_004702	cyclin E2
PRC1	NM_003981	protein regulator of cytokinesis 1
SMC4	NM_005496	structural maintenance of chromosomes 4
IFIT1	NM_001548	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
SQLE	BU754109	squalene epoxidase
CCDC109B	NM_017918	coiled-coil domain containing 109B
ZWINT	NM_007057	ZW10 interactor
EZH2	NM_004456	enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)
CDKN3	AF213040	cyclin-dependent kinase inhibitor 3
CCNB1	BE407516	cyclin B1
TPX2	AF098158	TPX2, microtubule-associated, homolog (Xenopus laevis)
RSAD2	AI337069	radical S-adenosyl methionine domain containing 2
FBXO28	AU154086	F-box protein 28
MAD2L1	AF394735	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)
SMC6	NM_024624	structural maintenance of chromosomes 6
LRR1	AA742244	leucine rich repeat protein 1
RACGAP1	AU153848	Rac GTPase activating protein 1
RRM2	BE966236	ribonucleotide reductase M2
KRT14	BC002690	keratin 14
PI15	NM_015886	peptidase inhibitor 15
SYNM	AK026420	synemin, intermediate filament protein
CNN1	NM_001299	calponin 1, basic, smooth muscle
KRT5	NM_000424	keratin 5
ACTG2	NM_001615	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric
MYLK	AL832211	myosin light chain kinase

Table S1. (Continued).

SERPINB5	BC020713	serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5
LAMB3	L25541	laminin, beta 3
TRIM29	NM_012101	tripartite motif containing 29
SFRP1	AI332407	secreted frizzled-related protein 1
ID4	AW157094	inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein
IFFO2	AK024480	intermediate filament family orphan 2
MYH11	BF510409	myosin, heavy chain 11, smooth muscle
TAGLN	BC010946	transgelin
CX3CL1	NM_002996	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
MIR205HG	AI375939	MIR205 host gene (non-protein coding)
EGFR	AF277897	epidermal growth factor receptor
IRX1	AI870306	iroquois homeobox 1
NDRG2	NM_016250	NDRG family member 2
DAB2IP	AB051530	DAB2 interacting protein
FBXO2	NM_012168	F-box protein 2
KRT15	NM_002275	keratin 15
NFIB	AI700518	nuclear factor I/B
ANG	NM_001145	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5
MYBPC1	BF593509	myosin binding protein C, slow type
ANXA3	M63310	annexin A3
MIR143HG	AL703532	MIR143 host gene (non-protein coding)
AK5	NM_012093	adenylate kinase 5
ST5	NM_005418	suppression of tumorigenicity 5
C2orf40	AF325503	chromosome 2 open reading frame 40
WLS	AA775681	wntless homolog (Drosophila)
CSRP1	NM_004078	cysteine and glycine-rich protein 1
COL17A1	NM_000494	collagen, type XVII, alpha 1
PTN	NM_002825	pleiotrophin
ACTA2	NM_001613	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
PDLIM3	AF002280	PDZ and LIM domain 3
CAB39L	NM_030925	calcium binding protein 39-like
MME	AI433463	membrane metallo-endopeptidase
CCL28	AF110384	chemokine (C-C motif) ligand 28
KLK7	NM_005046	kallikrein-related peptidase 7
MET	BG170541	met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
INHBB	NM_002193	inhibin, beta B
LOC284454	BU617052	uncharacterized LOC284454
PIGR	NM_002644	polymeric immunoglobulin receptor
ZBTB16	NM_006006	zinc finger and BTB domain containing 16
FAM189A2	AA524029	family with sequence similarity 189, member A2
ECHDC2	NM_018281	enoyl CoA hydratase domain containing 2
ZNF395	NM_017606	zinc finger protein 395
OXTR	NM_000916	oxytocin receptor

Table S1. (Continued).

MGP	NM_000900	matrix Gla protein
TGFB11	BC001830	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1
ATF3	AB078026	activating transcription factor 3
NEDD4L	AI357376	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like, E3 ubiquitin protein ligase
KIAA1217	BC018764	KIAA1217
C16orf89	AI823572	chromosome 16 open reading frame 89
SERPINA1	NM_000295	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1
SOX10	AI367319	SRY (sex determining region Y)-box 10
MUCL1	NM_058173	mucin-like 1
SOCS2	AB004903	suppressor of cytokine signaling 2
ANXA1	NM_000700	annexin A1
CHPT1	AK025141	choline phosphotransferase 1
ITGB4	BF305661	integrin, beta 4
KIT	NM_000222	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
LOC100506990	AW192692	uncharacterized LOC100506990
TF	NM_001063	transferrin
EHF	NM_012153	ets homologous factor
SAV1	NM_021818	salvador homolog 1 (Drosophila)
SLC27A6	NM_014031	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 6
RCAN1	NM_004414	regulator of calcineurin 1
GPM6B	AI419030	glycoprotein M6B
DCDC2	AW444617	doublecortin domain containing 2
ARHGEF28	BC012946	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 28
FOLR1	NM_016725	folate receptor 1 (adult)
CLDN8	AL049977	claudin 8
FTO	U79260	fat mass and obesity associated
PTPN14	NM_005401	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 14
ADAMTS5	BI254089	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 5
CGNL1	BC015433	cingulin-like 1
DMKN	AA706316	dermokine
BBOX1	NM_003986	butyrobetaine (gamma), 2-oxoglutarate dioxygenase (gamma-butyrobetaine hydroxylase) 1
PLAT	NM_000930	plasminogen activator, tissue
AZGP1	D90427	alpha-2-glycoprotein 1, zinc-binding
SIK3	BC035583	SIK family kinase 3
CMYA5	AL359338	cardiomyopathy associated 5
PDZK1	NM_002614	PDZ domain containing 1
C1orf168	AI076431	chromosome 1 open reading frame 168
LAMA3	AL708055	laminin, alpha 3
CD59	BF983379	CD59 molecule, complement regulatory protein
FOSB	NM_006732	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B
SNX1	NM_003099	sorting nexin 1
FMO2	BC005894	flavin containing monooxygenase 2 (non-functional)
KIAA1683	AL136867	KIAA1683

Table S1. (Continued).

DUSP4	NM_001394	dual specificity phosphatase 4
ABCA5	BF693921	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 5
GRAMD3	AW575493	GRAM domain containing 3
PLA2R1	NM_007366	phospholipase A2 receptor 1, 180kDa
ITGA2	NM_002203	integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)
GRAMD2	AU158463	GRAM domain containing 2
GAS1	AW611727	growth arrest-specific 1
LYPD6	BF061375	LY6/PLAUR domain containing 6
SORBS2	AF396457	sorbin and SH3 domain containing 2
TFPI2	AL574096	tissue factor pathway inhibitor 2
TACSTD2	AI627697	tumor-associated calcium signal transducer 2
LMOD1	NM_012134	leiomodulin 1 (smooth muscle)
IL20RA	NM_014432	interleukin 20 receptor, alpha
WIF1	NM_007191	WNT inhibitory factor 1
LONP2	AI971258	lon peptidase 2, peroxisomal
PHYHD1	AL545998	phytanoyl-CoA dioxygenase domain containing 1
USP31	BG778320	ubiquitin specific peptidase 31
RND3	BG054844	Rho family GTPase 3
DMD	NM_004010	dystrophin
FHOD3	NM_025135	formin homology 2 domain containing 3
PAMR1	AI671186	peptidase domain containing associated with muscle regeneration 1
CLMN	AW028110	calmin (calponin-like, transmembrane)
EMP1	BC017854	epithelial membrane protein 1
KIAA1324	AB037745	KIAA1324
CDH3	NM_001793	cadherin 3, type 1, P-cadherin (placental)
BHLHE41	BE857425	basic helix-loop-helix family, member e41
RASSF6	AW070877	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 6
CYP4X1	AA557324	cytochrome P450, family 4, subfamily X, polypeptide 1
NTRK2	NM_006180	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
CX3CR1	AI033393	chemokine (C-X3-C motif) receptor 1
THRB	NM_000461	thyroid hormone receptor, beta
MAFF	NM_012323	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)
MAOA	NM_000240	monoamine oxidase A
TSPAN5	AF065389	tetraspanin 5
ZNF662	BE671164	zinc finger protein 662
CAV1	NM_001753	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa
SCGB2A2	NM_002411	secretoglobulin, family 2A, member 2
CXCL14	NM_004887	chemokine (C-X-C motif) ligand 14
GSTT2	NM_000854	glutathione S-transferase theta 2
ARMCX4	NM_152583	armadillo repeat containing, X-linked 4
GPRC5B	AF202640	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B
MYL9	NM_006097	myosin, light chain 9, regulatory
CFI	BC020718	complement factor I

Table S1. (Continued).

SLC4A7	NM_003615	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7
GPC3	L47125	glypican 3
AMIGO2	AC004010	adhesion molecule with Ig-like domain 2
PALMD	NM_017734	palmdelphin
CITED1	NM_004143	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 1
PTPN21	X79510	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 21
PDK4	AL832708	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4
RGS2	NM_002923	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa
CAT	NM_001752	catalase
HSD17B2	NM_002153	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2
HMGCS2	NM_005518	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (mitochondrial)
ISM1	AL133463	isthmin 1 homolog (zebrafish)
CLDN11	BC039437	claudin 11
FOS	BC004490	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
VWA5A	NM_014622	von Willebrand factor A domain containing 5A
CAV2	BF197655	caveolin 2
SSPN	BC041929	sarcospan
MAMDC2	AI862120	MAM domain containing 2
JUN	BG491844	jun proto-oncogene
GFRA1	NM_005264	GDNF family receptor alpha 1
ANPEP	NM_001150	alanyl (membrane) aminopeptidase
N4BP2L1	AF113009	NEDD4 binding protein 2-like 1
TENM2	AB032953	Teneurin Transmembrane Protein 2
NOVA1	NM_002515	neuro-oncological ventral antigen 1
SCGB3A1	AA742697	secretoglobin, family 3A, member 1
FAM129A	NM_022083	family with sequence similarity 129, member A
STEAP4	NM_024636	STEAP family member 4
STC2	AI435828	stanniocalcin 2
USP47	BE966019	ubiquitin specific peptidase 47
CRYAB	AF007162	crystallin, alpha B
ZNF204P	AF033199	zinc finger protein 204, pseudogene
PNISR	AA902326	PNN-interacting serine/arginine-rich protein
EGR1	AV733950	early growth response 1
HOXA3	NM_030661	homeobox A3
FZD7	AI333651	frizzled family receptor 7
ALB	D16931	albumin
APOD	NM_001647	apolipoprotein D
PIP	NM_002652	prolactin-induced protein
SYNPO2	AW009747	synaptopodin 2
HIPK2	R37104	homeodomain interacting protein kinase 2
FAM126A	AB030241	family with sequence similarity 126, member A
SCUBE2	AI424243	signal peptide, CUB domain, EGF-like 2
CDC14B	NM_003671	CDC14 cell division cycle 14 homolog B (S. cerevisiae)

Table S1. (Continued).

TGFB3	NM_003243	transforming growth factor, beta receptor III
ADD3	BE545756	adducin 3 (gamma)
TMX4	AL544094	thioredoxin-related transmembrane protein 4
TM4SF18	AI721164	transmembrane 4 L six family member 18
PLK2	NM_006622	polo-like kinase 2
CXCL2	BC005276	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
NR3C2	NM_000901	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2
FMO5	BC020872	flavin containing monooxygenase 5
upregulated miRNAs		
hsa-miR-720		
hsa-miR-107		
hsa-miR-96		
hsa-miR-155		
hsa-miR-181b		
hsa-miR-1280		
hsa-miR-484		
hsa-miR-141		
hsa-miR-362-3p		
hsa-miR-301a		
hsa-miR-375		
downregulated miRNAs		
hsa-miR-204		
hsa-miR-139-5p		
hsa-miR-551b		
hsa-miR-10b*		
hsa-miR-143		
hsa-miR-145		
hsa-miR-376c		
hsa-miR-654-3p		
hsa-miR-188-5p		
hsa-miR-30a		
hsa-miR-202		
hsa-miR-135a		