

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALLELİK HETEROJENİTENİN GÖZLENDİĞİ KAS
DİSTROFİLERİNİN BİYOENFORMATİK ARAÇLAR
KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI**

Dr. Ayşe Ece ÇALI DAYLAN

**Tıbbi Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2015**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALLELİK HETEROJENİTENİN GÖZLENDİĞİ KAS
DİSTROFİLERİNİN BİYOENFORMATİK ARAÇLAR
KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI**

Dr. Ayşe Ece ÇALI DAYLAN

**Tıbbi Biyoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Pervin DİNÇER**

ANKARA

2015

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sırasında bana yol gsteren, her zaman destek ve yardımcı olan ve beni motive eden tez danışmanım Prof. Dr. Pervin Dinçer'e,

Çalışmam sırasında alternatif yöntemler sunarak ufkumu genişleten, çalışmamın geliştirilmesi için yapıcı geri bildirimlerde bulunan tez izleme komitesi üyeleri Doç. Dr. Özlen Konu'ya ve Doç. Dr. Tolga Can'a,

Çalışmamı değerlendiren ve geliştirmem için önerilerde bulunan tez savunma sınavı jüri üyeleri Doç. Dr. Didem Dayangaç Erden'e ve Yrd. Doç. Dr. Beril Talim'e,

Eğitimime katkıda bulunan tüm Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı hocalarıma, öğrencilerine ve çalışanlarına,

Bana bu zorlu süreçte her zaman moral veren ve yardımcı olabilmek için elinden gelen her şeyi yapan anneme, babama, abime ve benden desteklerini esirgemeyen tüm aile fertlerime,

Bana sonsuz sevgisini sunan, başarılarımla her zaman gurur duyan ve beni her koşulda destekleyen eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Çalı-Daylan, AE. Allelik heterojenitenin gözleendiği kas distrofilerinin biyoenformatik araçlar kullanılarak araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2015. Limb-girdle kas distrofileri (LGMD), pelvik ve omuz kuşağı proksimal kaslarının tutulumuyla başlayan ilerleyici kas dejenerasyonu ile karakterize, klinik ve genetik olarak heterojen bir hastalık grubudur. Otozomal resesif aktarılan LGMD (LGMD2) grubunda son yıllarda birçok yeni gen tanımlanmış olmasına rağmen, hala genetik tanısı konulamayan LGMD fenotipi gösteren hastalar mevcuttur. Bu durum, kas distrofisi fenotipine neden olacak yeni genlerin tanımlanması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Gen tanımlama çalışmalarını takiben, gen ürünlerinin kas doku bütünlüğündeki işlevlerinin de araştırılması gerekmektedir. Hastalık seyrini değiştiren tedavi seçeneklerinin olmaması ve tanımlanan genlerin işlevlerinin halen tam olarak bilinmemesi nedeniyle LGMD2 çalışılması gereken bir hastalık grubudur. Gen işlevlerinin ve hastalık moleküler patogenezinin aydınlatılması, tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır. Bu çalışma, allelik kas distrofilerinden biri olan disferlinopati patogenezinde rol alan temel hücre yolaklarını ve bu yolların anahtar genlerini belirlemeyi amaçlamıştır. Bu amaçla, tez çalışmasında son yıllarda hızla gelişmekte olup, gelecekte biyomedikal alandaki araştırmaların rutin iş akışına girmesi hedeflenen ve literatürde gizlenmiş ilişkileri ortaya koyarak bilgi keşfi yapma avantajı sağlayan metin madenciliği yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca disferlinopati ile ilişkili hücresel yolların ve anahtar genlerin belirlenebilmesi için genlerin birlikte ifade edilme ağı analizi yönteminden yararlanılmıştır. Bu çalışmada, disferlinopati patogenezinin anahtar genlerinden biri olarak, yeni tanımlanmış ve işlevleri tam bilinmeyen kas distrofisi genlerinden *TOR1AIP1* bulunmuştur. Bu durum, benzer transkripsiyon profiline sahip genlerin benzer işlevlerinin olması esasına dayanan *guilt-by-association* prensibinden yararlanarak, birlikte ifade edilme veri analizinin *TOR1AIP1* geninin kasa özgü işlevinin tahmininde kullanılmasına olanak sağlamıştır. *In silico* gen işlev tahmini, protein dizi özelliklerini temel alarak proteinlerin aktif olduğu hücresel süreçleri tahmin eden protein analizi araçlarıyla desteklenmiştir. Bu çalışma, biyoenformatik yaklaşımla disferlinopati patogenezindeki temel yolları belirlemiştir. Bu yolların anahtar genlerini ortaya koyarak, disferlinopati için tedavi hedefi ya da biyobelirteç olabilecek genler saptanmıştır. Ayrıca *TOR1AIP1* geninin, SMAD4 ilişkili sinyal yolağında rolü olabileceğini ileri sürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Kas distrofisi, metin madenciliği, disferlinopati, genlerin birlikte ifade edilme ağı analizi

Destekleyen Kurum: TÜBİTAK, Proje 112S271.

ABSTRACT

Çalı-Daylan, AE. Investigation of muscular dystrophies with allelic heterogeneity using bioinformatics tools. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Medical Biology, Ankara, 2015. Limb-girdle muscle dystrophy (LGMD) is a clinically and genetically heterogeneous group of inherited muscle disorders characterized by progressive muscle degeneration predominantly in proximal muscles of shoulder and pelvic girdle. Despite numerous novel genes recently associated with autosomal recessively inherited LGMD (LGMD2), there are still LGMD patients without a defined genetic cause. This demonstrates the necessity to identify novel genes that can cause muscle dystrophy phenotype. Besides novel gene identification studies, it is necessary to study the roles of these gene products in muscle cell integrity. Since there is no treatment available that can alter the disease progression and that the cellular functions of novel genes are not known, LGMD2 is a disease group that needs further study. Revealing the gene functions and molecular pathogenesis of the disease will help design new treatment methods. This study aims to determine the cellular pathways and their key driver genes that play a role in the pathogenesis of dysferlinopathy, which is one of the allelic muscle dystrophies. Towards this purpose, text mining, which is a recently progressing field that can reveal information hidden in the literature and which is predicted to become the routine tool of biomedical research in near future, has been employed. In addition, in order to determine the cellular pathways and key genes related to dysferlinopathy, weighted gene co-expression network analysis has been used. A poorly characterized gene that has recently been associated with muscle dystrophy, *TOR1AIP1*, has been identified as one of the hub genes in dysferlinopathy pathogenesis. This enabled us to use co-expression network analysis in order to predict muscle specific functions of *TOR1AIP1*, based on guilt-by-association principle that states genes having similar expression profiles have similar functions. *In silico* gene function prediction is enriched by protein analysis tools that predicts biological processes in which the protein is active based on protein sequence features. This study has determined the main cellular pathways in dysferlinopathy pathogenesis using bioinformatics approach. By elucidating the key driver genes, possible therapeutic targets and biomarkers have been identified for dysferlinopathy. In addition, it is suggested that *TOR1AIP1* may have a role in SMAD4 dependent signaling.

Keywords: Muscular dystrophy, literature mining, dysferlinopathy, co-expression analysis

Supporting institution: TÜBİTAK, Project 112S271.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kas Distrofilerinin Tarihçesi	1
1.2. Kas Distrofilerinin Önemi ve Aydınlatılması Gereken Konular	3
1.3. Amaç ve Kapsam	4
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Kas Distrofileri ve Moleküler Patogenezi	7
2.2. Limb-Girdle Kas Distrofileri (LGMD)	10
2.3. Disferlin Proteini ve Disferlinopati	13
2.4. Biyomedikal Metin Madenciliği	19
2.4.1. Bilgi Getirimi	20
2.4.2. Adlandırılmış Varlık Tanıma	21
2.4.3. Bilgi Çıkarımı	23
2.4.4. Bilgi Keşfi	24
2.5. Genlerin Birlikte İfade Edilme Ağı Analizi	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Metin Madenciliği	28
3.2. Ağırlıklandırılmış Gen Birlikte İfade Edilme Ağı Analizi (WGCNA)	31
3.2.1. Mikrodizin Verisinin Ön İşlenmesi	31
3.2.2. Genlerin Birlikte İfade Edilme Ağı Oluşturulması ve Modül Tanımlanması	31
3.2.3. Disferlinopatiyle İlişkili Modüllerin Belirlenmesi	34
3.3. Genlerin Geniş Kapsamlı Birlikte İfade Edilme Veri Tabanları	35
3.4. Protein Dizi Analizi	36
4. BULGULAR	38
4.1. Metin Madenciliği Sonuçları	38

4.2. Ağırlıklandırılmış Gen Birlikte İfade Edilme Ağı Analizi Sonuçları	42
4.3. COXPRESdb Sonuçları	48
4.4. PSIPred Sonuçları	48
5. TARTIŞMA	50
5.1. Disferlinopati Patogenezinin Metin Madenciliğiyle İncelenmesi	52
5.2. Disferlinopatinin Genlerin Birlikte İfade Edilme Ağıyla İncelenmesi	59
5.3. LAP1 Proteini İşlevsel Çıkarımı	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	76
6.1. Sonuçlar	76
6.2. Öneriler	78
KAYNAKLAR	80
EKLER	
EK 1. İş Akışı	

SİMGELER VE KISALTMALAR

<i>AN05</i>	Anoktamin 5
<i>BTQ+</i>	BioTextQuest+
<i>CAPN3</i>	Kalpain 3
<i>DAG1</i>	Distroglikan
<i>DAVID</i>	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
<i>DES</i>	Desmin
<i>DHPR</i>	Dihidropiridin reseptörü
<i>DMD</i>	Duchenne Kas Distrofisi
<i>DYSF</i>	Disferlin
<i>FAST1</i>	<i>forkhead box H1</i>
<i>FKRP</i>	<i>Fukutin related protein</i>
<i>FKTN</i>	Fukutin
<i>GAA</i>	Alfa-1,4-glukozidaz
<i>GEO</i>	<i>Gene Expression Omnibus</i>
<i>GMPPB</i>	GDP-mannoz pirofosforilaz B
<i>GO</i>	<i>Gene Ontology</i>
<i>HDAC6</i>	Histon deasetilaz 6
<i>ISPD</i>	<i>Isoprenoid synthase domain containing</i>
<i>kME</i>	Modül özdeğerini temel alan bağlantısallık
<i>LAP1</i>	<i>Lamina-associated polypeptide 1</i>
<i>LEMD3</i>	<i>LEM domain containing 3</i>
<i>LGMD</i>	Limb-Girdle Kas Distrofisi
<i>LIMS2</i>	<i>Lim and senescent cell antigen-like domains 2</i>
<i>MeSH</i>	<i>Medical Subject Heading</i>
<i>MG53</i>	<i>Mitsugumin 53</i>
<i>MMP</i>	Matris metalloproteaz
<i>Nox2</i>	NADPH oksidaz kompleksi
<i>OXR1</i>	<i>oxidation resistance 1</i>

PECAM-1	Platelet/endotelyal hücre adezyon molekülü-1
PLEC1	Plektin
<i>POMGnT1</i>	Protein O-linked mannoz beta1,2-Nasetilglukozaminil transferaz
POMT1	Protein-O-mannozil transferaz 1
POMT2	Protein-O-mannozil transferaz 2
RYR	Ryanodin reseptörü
<i>SGCA</i>	α -Sarkoglikan
<i>SGCB</i>	β -Sarkoglikan
<i>SGCD</i>	δ -Sarkoglikan
<i>SGCG</i>	γ -Sarkoglikan
TCAP	Teletonin
TIMP1	TIMP metallopeptidaz inhibitörü 1
TRAPPC11	Transport protein partikül kompleks 11
TRIM32	<i>Tripartite motif containing 32</i>
<i>TRIM72</i>	<i>Tripartite motif containing 72</i>
TF-IDF	Terim frekansı – ters doküman frekansı
TNF- α	Tümör nekroz faktör alfa
<i>TOR1AIP1</i>	<i>Torsin A interacting protein 1</i>
<i>TTN</i>	Titin
WGCNA	<i>Weighted Gene Co-expression Network Analysis</i>

ŞEKİLLER

	Sayfa	
2.1.	Kas hücresi, işlev gören proteinler ve ilişkili LGMD lokusları	13
2.2.	Disferlin proteininin yapısı	14
2.3.	Yama mekanizmasıyla hücre zarı tamiri	16
2.4.	Kaveolar internalizasyonla hücre zarı tamiri	17
2.5.	WGCNA yönteminin temel basamakları	26
4.1.	Disferlinle ilişkili protein – protein etkileşim ağı	40
4.2.	Disferlinopati ve kontrol birey örneklerinden oluşturulmuş birlikte ifade edilme modülleri	42
4.3.	Turkuaz modül genlerinin ifade haritası ve modül özdeğerleri grafiği	44
4.4.	Mavi modül genlerinin ifade haritası ve modül özdeğerleri grafiği	44
4.5.	Siyah modül genlerinin ifade haritası ve modül özdeğerleri grafiği	45
4.6.	LAP1 protein dizisinin PSIPred analiz platformu sonuçları	49
5.1.	Metin madenciliği ve mikrodizin analizini birleştiren iş akışı	52
5.2.	LAP1 proteini işlevsel tahmini	68

TABLOLAR

	Sayfa
2.1. LGMD2 hastalığından sorumlu olduğu saptanmış genler	11
4.1. Disferlinle ilişkili BioTextQuest+ aracı ile yapılan metin madenciliği analizi sonucu elde edilen önemli terimler	38
4.2. OnTheFly metin madenciliği aracıyla elde edilen disferlin ilişkili protein listesinin DAVID aracı ile işlevsel zenginleştirilmesi	41
4.3. Modül Korunmuşluğu	43
4.4. Turkuaz modülün DAVID aracı ile elde edilen işlevsel zenginleştirme sonuçları	46
4.5. Mavi modülün DAVID aracı ile elde edilen işlevsel zenginleştirme sonuçları	47
4.6. COXPRESdb'den elde edilen <i>TOR1AIP1</i> ile birlikte ifade edilen genlerin DAVID aracı ile elde edilen işlevsel zenginleştirme sonuçları	49

1. GİRİŞ

Kas distrofileri, ilerleyici kas dejenerasyonu ve güçsüzlükle seyreden, kas dokusunda yıkıma bağlı endomizyal doku artışı görülen genetik ve klinik olarak heterojen bir hastalık grubudur (1).

1.1. Kas Distrofilerinin Tarihçesi

Primer kas patolojisinin görüldüğü hastalıkların önemli bir bölümünü kas distrofileri oluşturmaktadır. Kas distrofilerinden tarihte ilk tanımlanan grup, Duchenne kas distrofisidir (2).

Duchenne kas distrofilerine ait ilk vakalar, 19. yüzyılın ilk yarısında tanımlanmıştır. 1803 yılında, İngiliz doktor Charles Bell ve 1836 yılında İtalyan doktor Gaetano Conte ve L. Gioja ilk kas distrofisi hastalarını tarif etmişlerdir (Aktaran: 2). Bu ilk vakalar, çocukluk çağı başlangıçlı, alt ekstremitede başlayan ve ilerleyici kas güçsüzlüğü gösteren, duyu kaybı ya da spinal kord hastalığını düşündürecek bulgular göstermeyen vakalar olarak tanımlanmıştır. Fakat bu ilk vakaların klinik tarifleri yetersizdir ve patoloji bulguları eksiktir. İlk olarak 1847'de İngiliz doktor Partridge, Duchenne kas distrofisi vakasının patolojik sunumunu yapmıştır (Aktaran: 2). Aynı vaka ve kardeşleri, ilerleyen yıllarda daha detaylı olarak William Little ve Edward Meryon tarafından da incelenmiştir. Fakat, üç aileden oluşan vaka serisi sunumuyla, Duchenne kas distrofisinin ilk detaylı klinik ve patolojik tanımı, 1851 yılında yayınlanan "İstemli kasların granüler ve yağ dejenerasyonu üzerine" adlı makaleyle, tartışmasız Edward Meryon'a aittir (Aktaran: 2). Edward Meryon, ilk başta güçsüzlüğün, spinal korddan kaynaklanabileceğini düşünmüştür. Fakat daha sonra, otopside spinal kord ve sinir dokusunu incelediğinde hastalığa dair bulgu olmadığını saptamıştır. Böylece ilk tahmininde hatalı olduğunu, tarif ettiği hastalığın kas dokusuna özgü olduğunu belirtmiştir. Meryon ilerleyen senelerde, istemli kasların granüler dejenerasyonu adı altında ilerleyici kas güçsüzlüğü gösteren yeni vakalar tanımlamıştır (Aktaran: 2). Maalesef ki bu vakalar ilk tanımladığı vakalardan belirgin farklılıklar göstermekte olup heterojen bir gruptur. Bu yüzden, Meryon'un çalışmaları, Duchenne tarafından

“ilerleyici kas atrofisi” grubu olarak adlandırılmıştır. Meryon’un sonraki dönemde yayınladığı bu vaka sunumları, yeteri kadar klinik detay içermediği için bu vakalara retrospektif olarak tanı konulamamaktadır. Fakat, tarif edilen bazı vakalar limb girdle kas distrofisine (LGMD) daha uygun görünmektedir (2).

Duchenne, ilk kas distrofisi vakasını 1858 yılında görmüş olup, 1861 yılında “serebral kaynaklı, infant çağının hipertrofik paraplejisi” olarak yayınlamıştır (Aktaran: 2). Tarif ettiği vakalarda ilk patoloji incelemesini, ancak 1865 yılından sonra, kas biyopsisi yapmak amacıyla kendi geliştirdiği aleti kullanarak elde ettiği kas dokusunda yapmıştır. Duchenne, Meryon’un vaka sunumlarından haberdar olmasına rağmen, Meryon’un vaka sunumlarının kendi tanımladığı hastalıktan farklı olduğunu ve ilerleyici kas atrofisini temsil ettiğini savunmuştur. Fakat, günümüzde Meryon ve Duchenne’in tarif ettiği hastalıkların aynı hastalık olduğu kabul gören kanıdır. Duchenne, tarif ettiği hastalık için ilk ön gördüğü ismi, kas güçsüzlüğünün sadece alt ekstremitayı etkilememesi ve serebral etyolojinin desteklenememesi üzerine, psödohipertrofik kas paralizi olarak değiştirmiştir. Duchenne, yayınladığı kitaplar ve makalelerde, Duchenne kas distrofisi hastalığının temel klinik ve patolojik özelliklerini çok iyi tarif etmiştir. Duchenne, hastalığı ilk tanımlayan kişi olmamasına rağmen, açık ve detaylı vaka tanımlarıyla bu hastalığın kendi adıyla tanınmasını hak etmiştir. Fakat, Duchenne kas distrofisinin, kalıtılan bir hastalık olduğunu İngiliz doktor Gowers öne sürmüştür. Gowers, bu hastalığın genelde erkekleri etkilediğini, erkeklerde daha ağır seyrettiğini ve aynı ailenin birden çok üyesini etkilediğini fark etmiştir. Bu nedenle, hastalığın kalıtıldığını öne sürmüştür. Ayrıca hastalığın, baba tarafında değil anne tarafında görüldüğünü bu yüzden unilateral kalıtıldığını savunmuştur (Aktaran:2).

Kas distrofilerinin, heterojen bir grup olması nedeniyle, alt gruplarına ayrılması ilk vaka sunumlarından itibaren uzun bir zaman almıştır. Limb-girdle kas distrofilerine benzeyen vakalar, 19. yüzyılın ikinci yarısında Leyden, Möbius ve Erb tarafından tanımlanmıştır. Fakat, LGMD’leri tanımlayan tanısal kriterler konusunda fikir birliği oluşturulamamıştır. Walton ve Natrass 1954’te yayınladıkları sınıflandırma sistemiyle, limb girdle kas distrofilerini, cinsiyet ayrımı yapmayan, genelde hayatın ilk 30 yılında beliren, skapular ve pelvik

kuşağın tutulumuyla karakterize, çoğu zaman otozomal resesif olarak aktarılan kas hastalıkları olarak tanımlanmışlardır (3). Kas hastalıklarının belirlenmesinde kullanılan histopatolojik ve fizyolojik yöntemlerin geliştirilmesiyle, önceden LGMD olarak tanımlanmış hastalıkların önemli bir kısmının spinal kas atrofileri, metabolik hastalıklar ve konjenital miyopatiler gibi farklı hastalıklar olduğu belirlenmiştir (4). LGMD grubunun tanımındaki karmaşanın giderilmesi adına, LGMD grubu 1995 yılında kalıtım şekli ve sorumlu genlere dayanarak yeniden sınıflandırılmıştır (5). Tarihsel süreçte, isimlendirilme ve sınıflandırılma çalışmalarından da anlaşılacağı gibi, kas distrofileri, özellikle de LGMD grubu heterojen bir gruptur (4).

1.2. Kas Distrofilerinin Önemi ve Aydınlatılması Gereken Konular

Kas distrofileri, nadir hastalıklardan sayılsa da, global olarak çok yüksek sağlık yüküne neden olmaktadır. 2014 yılında, Landfeldt ve diğerleri (6) tarafından yapılan çalışma, Duchenne kas distrofisinin yarattığı ekonomik yükü hesaplamıştır. Dört ülkeden, 770 hastanın katıldığı bu çalışmada, sağlık hizmetlerinden yararlanım, hayat kalitesi, hastanın çalışma durumu, ev harcamaları gibi kategoriler incelenmiştir. Böylece, toplum ve hasta ailesi açısından Duchenne kas distrofisinin yarattığı ekonomik yük belirlenmiştir. Bir hastanın, doğrudan hastalıkla ilişkili sağlık harcamalarının, ülke ortalamasının 7-16 kat üzerinde olduğu görülmüştür. Ayrıca hasta başına yıllık toplumsal yük, 80,120 ile 120,910 dolar arasında saptanmıştır. Bu çalışma, kas distrofilerinin ekonomik yükünün hem toplum hem de hasta ailesi açısından çok yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Bu hastalık yükünü azaltabilmek için, kas distrofilerinin patogenezinin aydınlatılması ve böylece yeni tedavi seçeneklerinin araştırılması bir zorunluluktur.

Türkiye’de en sık görülen kas distrofileri Duchenne kas distrofisinin ardından, otozomal resesif aktarılan LGMD (LGMD2) grubudur (7). Coğrafi farklılıklar göstermesine rağmen, kümülatif olarak LGMD2 grubunun prevalansı yaklaşık 15000’de birdir (8). Akraba evliliklerinin sık görüldüğü ülkemizde LGMD2 grubunun prevalansı daha yüksek (1:8250) kabul edilmektedir (7). Bu oran, LGMD2 grubunun ülkemizde sık görüldüğünü göstermektedir.

Kas distrofileri grubunda yeni birçok gen tanımlanmıştır. Fakat, bu yeni tanımlanan genlerin işlevleri henüz tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca, tanımlanmış mutant genlerin nasıl kas distrofisi oluşumuna neden olduğu da detaylı olarak henüz aydınlatılamamıştır. LGMD fenotipi gösteren hastaların %25-40'ına kesin tanı konulamamaktadır (9, 10). Bilinen kas distrofi genlerinden hiçbirinde mutasyon bulunmayan kas distrofisi hastalarının mevcudiyeti, yeni genlerin tespit edilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Kas distrofilerinde destekleyici tedaviler ön plana çıkmakta ve deneysel tedaviler araştırılmaktadır. Fakat, günümüzde kas distrofilerine yönelik yaygın kullanımda olan tedaviler henüz bulunamamıştır (11). Bu nedenle, kas distrofilerinde moleküler patogenezin aydınlatılması, aday genlerin belirlenmesi ve yeni tanımlanmış fakat işlevleri tam olarak bilinmeyen kas distrofisi genlerinin patogenezdaki rollerinin saptanması, gelecekte yeni tedavi seçeneklerinin sunulabilmesi için zorunlu bir basamaktır.

Disferlinopati, disferlin gen mutasyonunun neden olduğu, otozomal resesif olarak aktarılan, klinik olarak farklı fenotipler gösterebilen bir kas distrofisi grubudur. Disferlinopati, proksimal kas gruplarının erken tutulumuyla başlayıp LGMD fenotipiyle ya da erken dönem distal kas tutulumuyla seyreden Miyoshi miyopati fenotipiyle görülebilir (12). Bu heterojenitenin moleküler sebepleri henüz açıklanamamıştır. Disferlinopati hakkında, Duchenne kas distrofisine göre çok daha az bilgi mevcuttur. Hem disferlin proteininin kapsamlı görevleri, hem de disferlinopatide rol alan mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle, ilerleyen dönemde disferlinopati hastalığına yaklaşımı değiştirecek tedavi seçenekleri bulunabilmesi için hastalık patogenezinin aydınlatıcı araştırmalar yapılmalıdır.

1.3. Amaç ve Kapsam

Bu çalışmanın amaçlarından biri, disferlinopati hastalığında rol alan temel biyolojik süreç ve hücresel yolların belirlenmesidir. Bu amaca ulaşmak için, günümüzde biyolojinin vazgeçilmez bir parçası olan biyoenformatik araçların kullanılması uygun bulunmuştur.

Metin madenciliği araçları, üssel olarak artan biyomedikal literatürün hızlı ve etkin bir şekilde takip edilmesini sağlamaktadır. Gelişen doğal dil işleme mekanizmaları sayesinde, metin madenciliği araçları otomatik olarak literatürdeki bilgileri çekebilmektedir. Metin madenciliği analizinin, biyolojik veri tabanlarında depolanan bilgilerle birleştirilmesi, yeni hipotezler oluşturulmasını ve biyolojik bilgi keşfini sağlamaktadır (13). Metin madenciliği bilgilere hızlı ulaşma ve literatürde doğrudan belirtilmeyen bilgileri keşfedilme özellikleri nedeniyle, disferlinopati patogenezini araştırmak için uygun yöntem olarak seçilmiştir.

Metin madenciliğiyle elde edilen bilgilerin zenginleştirilebilmesi ve yeni hipotezler oluşturulabilmesi; genel kullanıma açık yüksek çözünürlükte deney verilerinin iş akışına eklenmesiyle kolaylaşmaktadır. Günümüzde birçok hastalığa dair ifade profilleri ve genom dizileme verileri genel kullanıma açık veri tabanlarında depolanmaktadır. Bu verilerin farklı şekillerde analiz edilmesi, verilerden elde edilebilecek bilgileri arttırmaktadır. Mikrodizin verileri, artmış ya da azalmış ifade gösteren mRNA düzeylerini belirlemek için incelenebileceği gibi, sistem biyolojisi yaklaşımını benimseyerek genlerin birlikte ifade edilme (*co-expression*) ağı analizinde de kullanılabilir (14). Mikrodizin verilerinin birlikte ifade edilme ağı analiziyle işlenmesi, hücre yolaklarının belirlenmesine ve yetersiz karakterize edilmiş genlere işlev atanmasına olanak sağlamaktadır. Disferlinopati patogenezinde bozulmuş olan hücre yolaklarının belirlenmesi ve işlevleri iyi bilinmeyen yeni tanımlanmış genlerin kas işlevindeki rollerinin açıklanabilmesi için, birlikte ifade edilme ağı analizi yapılması uygun görülmüştür.

Bu tez çalışması, disferlinopati moleküler patogenezinde rol oynayan temel mekanizmaları ve bu mekanizmaların anahtar genlerini ortaya koymayı amaçlamaktadır. Literatür araştırması yapıldığında; disferlinopati için metin madenciliği ve disferlinopati hastalarına ait genlerin birlikte ifade edilme ağı analizinin birleşimsel olarak kullanılmadığı görülmüştür. Bu nedenle, bu tez çalışmasında kas distrofilerinde bu iki analizin birlikte kullanımı ile, yeni hipotezlerin ileri sürülmesi planlanmıştır. Bu tez çalışmasında başlangıçta allelik heterojenitenin gözlemlendiği *DYSF*, *POMT1*, *POMT2*, *POMGNT1* ve *ISPD* gen

mutasyonlarının neden olduğu kas distrofilerinin metin madenciliği yöntemiyle incelenmesi planlanmıştır. Seçilen kas distrofileri arasından daha sık görülmesi nedeniyle disferlinopatiler üzerinden çalışmaya başlanmıştır. Fakat disferlinopatiler için yapılan çalışmada, metin madenciliği analizi araçlarının hem biyolojik kavramları tanımadaki yetersizliği hem de daha özgül etkileşimlere ulaşamama gibi eksiklikleri fark edilmiştir. Ayrıca metin madenciliğiyle elde edilen sonuçların doğrulanması ve ıslak laboratuvarında doğrulanabilecek hipotezlerin oluşturulabilmesi için daha detaylı sonuçlara ve aday genlere ulaşılması gerekliliği doğmuştur. Bunun için metin madenciliği analizine, mikrodizin analizinin eklenmesi planlanmıştır. İlk başta belirlenen kas distrofilerinden disferlinopati dışındakiler için birlikte ifade edilme ağı analizine uygun mikrodizin verileri bulunamamış, bu nedenle çalışmanın disferlinopati hastalığı üzerine yoğunlaşması planlanmıştır. Böylece disferlinopati ilk olarak metin madenciliği araçlarıyla daha sonra da birlikte ifade edilme ağı analiziyle araştırılmıştır. Birlikte ifade edilme ağı analizi yöntemiyle, disferlinopatide anahtar genlerden biri olarak saptanmış olan işlevleri tam olarak bilinmeyen, kas distrofisiyle yeni ilişkilendirilmış merkez genlerden birinin işlev tahmini yapılmıştır. Bu tez çalışması; disferlinopati konusunda çalışan araştırma grupları için, hastalık patogenezinde kilit rol oynayan, biyobelirteç ya da tedavi hedefi olarak öncelikli çalışılması gereken genleri ortaya koymuştur. Ayrıca, bu tez çalışması sonunda disferlinopati patogenezinin anahtar genlerinden biri olarak tanımlanan merkez genlerden birinin, kasa özğü işlevine dair yeni bir hipotez oluşturulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kas Distrofileri ve Moleküler Patogenezi

Kas distrofileri, ilerleyici kas dejenerasyonu ile seyreden, kaslarda güçsüzlük ve atrofiye neden olan genetik bir hastalık grubudur. Moleküler biyoloji ve genetik teknolojisinin ilerlemesi sayesinde, kas distrofileri grubu yeni tanımlanan genleriyle hızla büyümektedir. Kas distrofileri, kasın yapısal elemanları, çekirdek proteinleri, vezikül trafiği, sinyal yolları, hücre dışı matris elemanları gibi birçok farklı görev ve kompartmanda bulunan proteinlerin işlevlerinin bozulmasıyla ortaya çıkabilir (15). Kas distrofileri alanındaki bilgiler arttıkça, bu grubun sınıflandırılması da tekrar gözden geçirilmekte, tanı ve tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Kas distrofilerindeki temel patofizyolojik mekanizmalar, özellikle Duchenne kas distrofisi çalışmalarından elde edilmiştir. Bu mekanizmalar, hücre içi kalsiyum artışı, enflamatuar hücrelerin kas dokusunu infiltre etmesi, proinflamatuar ve profibrojenik sitokinlerin birikimi ve protein yıkımıdır (16-20).

Distrofik kas hücrelerinde kalsiyum seviyesinin normal kas hücrelerine göre yüksek olduğu saptanmıştır (19). Distrofik kas hücrelerinde erken dönemde kalsiyum homeostazının bozulduğu ve bunun kas dejenerasyonu için önemli bir basamak olduğu öne sürülmüştür. Distrofik kasta kalsiyum artışının, kalpain proteaz sistemini aktifleştirerek kas proteinlerinin yıkımına sebep olduğu ve kas hücrelerini nekroza götürdüğü gösterilmiştir. Kalpain aktivitesinin inhibe edilmesi, distrofik kasta görülen nekrozu azaltmıştır (16, 21).

Kalpain aktivasyonunun dışında, hücredeki kalsiyum artışı mitokondrinin normalin üstünde kalsiyum ile yüklenmesine yol açmaktadır. Mitokondrideki kalsiyum artışı, mitokondri zarının 1500 Da'dan küçük moleküllere geçirgenliğinin artmasına neden olur. Artan molekül geçişi, mitokondrinin şişmesine ve devamında hücre ölümüne yol açmaktadır (22, 23). Mitokondri, hücrede oksidatif fosforilasyonla ATP üretimi için temel organelidir. Oksidatif fosforilasyon mekanizmasının bazı elemanları kalsiyum tarafından kontrol edilmektedir (24). Bu bilgiler ışığında, mitokondride kalsiyumun

artışıyla, kas distrofisinde ATP üretiminin bozulması olasıdır. Bu doğrultuda, Duchenne kas distrofisinde, glukoz metabolizmasının bozulduğu ve çekirdek genomunda kodlanan mitokondri genlerinin transkripsiyonunun da azaldığı gösterilmiştir (25, 26). Bu değişiklikler, Duchenne kas distrofisinde ATP üretiminin azalmasına ve oksijen radikallerinin artmasına neden olmaktadır. Hem kalpain sistemi üzerinden protein yıkımını arttırması, hem de mitokondri dengesini bozarak ATP üretimini azaltması ve hücreyi ölüme götürmesi nedeniyle, kalsiyum artışı kas distrofisi patogenezinin kardinal özelliklerinden biridir.

Kas distrofilerinde reaktif oksijen türlerinin arttığı gözlenmiştir. Özellikle Duchenne kas distrofisinde oksidatif stresin arttığı ve bu artışın hücre zarı lipidlerini, proteinleri ve DNA'yı hasara uğrattığı gösterilmiştir (27). Oksidatif stresin artmasına yol açan mekanizmalardan bir tanesi, sarkolemmada bulunan NADPH oksidaz kompleksi(Nox2)'dir. Duchenne kas distrofisi fare modelinde (*mdx* fare), Nox2'nin arttığı saptanmıştır. *mdx* farede, antioksidan tedavi ve NF-kappaB inhibisyonunun kas distrofisini azalttığı gözlenmiştir (28). Ayrıca disferlinden yoksun kas hücre kültüründe de oksidatif stresin artmış olduğu gösterilmiştir (18). Bu bulgular, oksidatif stresin distrofinden yoksun kas distrofisi patogenezinde olduğu kadar disferlinden yoksun kas distrofisinde de önemli olduğunu göstermektedir.

NF-κB sinyal yolağı, kas distrofilerinin önemli bir yolağıdır. *mdx* farelerde, NF-κB transkripsiyon faktörünün DNA'ya bağlanma aktivitesinin arttığı ve NF-κB aktivasyonu sonrası enflamatuar sitokinlerden interleukin-1β ve tümör nekroz faktör alfa (TNF-α) ifadesinin yükseldiği gösterilmiştir (17). Benzer şekilde, *mdx* farede aktif makrofajlarda NF-κB sinyal yolağı, enflamasyonun artmasına neden olmaktadır. Distrofik kasta, NF-κB sinyal yolağının kronik aktivasyonu öncül kas hücre popülasyonunu azaltmaktadır ve NF-κB yolağının inhibe edilmesi, rejenerasyonu arttırmaktadır (29).

Ayrıca, NF-κB transkripsiyon faktörü, kas dokusunda ubikitin-proteazom sistemini aktive eder. Disferlin yokluğunda oksidatif stresin artmasıyla NF-κB transkripsiyon faktörünün aktif olduğu gösterilmiştir. NF-κB yolağının

aktivasyonu, disferlinden yoksun hücrelerde protein ubiquitinasyonunun ve yıkımının artmasına neden olmuştur (18, 20). Bu bulgular, NF- κ B sinyal yolağının kas distrofisi patogenezinde birkaç farklı kolu etkileyerek kilit noktada yer aldığını göstermektedir. NF- κ B yolağı, hem enflamatuar sitokinlerin salgılanmasına neden olarak inflamasyonu arttırmakta, hem kas rejenerasyonunu olumsuz etkilemekte, hem de protein yıkımını arttırarak kas atrofisine neden olmaktadır.

Kas distrofileri patogenezinde matris metalloproteazların (MMP) önemli olduğu ileri sürülmüştür. Matris metalloproteazların, hücre dışı matris bileşenlerini yıktıkları, böylece hücre dışı matris kompozisyonunun değişmesine neden oldukları bilinmektedir (30). MMP-9'un Duchenne kas distrofisinde artmış olduğu ve sarkolemmada bulunan beta-distroglikanı proteolitik olarak kestiği gösterilmiştir. Bu nedenle, MMP-9'un hücre dışı matris ile hücre arasındaki bağı bozarak kas dejenerasyonunu arttırabileceği ön görülmüştür (31, 32). Ayrıca MMP artışının, enflamatuar yanıtı ve fibrozisi arttırdığı, kas rejenerasyonunu engellediği saptanmıştır (30, 33). Geniş spektrumlu MMP inhibitörlerinden batimastatin, *mdx* farede inflamasyonu, nekrozu ve fibrozisi azaltarak, kas kasılma gücünü arttırdığı belirlenmiştir (33). Bu çalışmalar, MMP'lerin kas distrofisi patogenezindeki önemini göstermektedir fakat, matris metalloproteazların etki mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Fibrozis,, kas distrofilerinin başlıca patolojik bulgularından biridir. Fibrozis, kronik inflamasyonla beraber profibrotik sitokinlerin artması, hücre dışı matris proteinlerinin aşırı derecede artmasıyla; kas dokusunun işlevlerinin bozulmasına neden olur (34). TGF-beta ailesi sitokinleri, kollajen sentezini arttırıp, matris yıkıcı proteazları azaltmak koşuluyla fibrozis oluşumunda anahtar rol oynamaktadırlar (35, 36). TGF-B1'in, Duchenne kas distrofisi ve disferlinopati hayvan modellerinde artmış olduğu gösterilmiştir (37). TGF-beta artışının, kas distrofisinde miyoblastları fibroblastlara çevirdiği, böylece kas rejenerasyonunu da engellediği ileri sürülmüştür (38). Bu bulgular, TGF-beta'nın kas distrofisi patogenezini hem fibrozisi arttırarak hem de rejenerasyonu azaltarak kötüleştirdiğini göstermektedir.

TGF-beta ailesi sitokinlerinden miyostatin, kas dokusunun kütlesinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır (39). *mdx* farede, miyostatinin antikorla nötralize edilmesi; kas kütlesinin ve gücünün artmasını, ayrıca fibrozisin azalmasını sağlamıştır (40, 41). Miyostatinin, kas kütlesinin belirlenmesindeki rolüne ek olarak; miyoblast kültüründe yapılan çalışmalar, miyostatinin kas satelit hücre aktivasyonunu da engellediğini göstermiştir (42).

Görüldüğü gibi, kas dokusunun normal işlevlerini kaybederek distrofik hale gelmesinde, birden çok moleküler süreç rol oynamaktadır. Ek olarak, kas distrofisinde bozulduğu gösterilen yolakların birbirini etkiliyor olması, moleküler patogenezi daha da karmaşık hale getirmektedir. Günümüzde kas distrofilerinin patofizyolojisi üzerine yapılan çalışmalar yoğunlukla Duchenne kas distrofisi ile ilişkilidir. Duchenne kas distrofisi çalışmalarından elde edilen sonuçlardan yola çıkarak, diğer kas distrofileri hakkında yorum yapmak her zaman doğru sonuçlar vermemektedir. Örneğin, Duchenne kas distrofisinde glukokortikoid tedavisinin kısa dönemde kas kuvvetini arttırdığı gösterilmiştir (43, 44). Ancak, Duchenne kas distrofisinin aksine, enflamasyonun yoğun görüldüğü disferlinopati hastalarında glukokortikoid tedavisi altında kas kuvvetinin daha kötüye gittiği gözlenmiştir (45). Mantiğa aykırı görünen bu bulgunun nedeni henüz açıklanamamıştır. Sonuç olarak, bu farklılıklar, kas distrofilerinin alt gruplarının ayrı ayrı incelenip, tedavi seçeneklerinin belirlenebilmesi için birbirlerinden farklarının çalışılması gerektiğini göstermektedir.

2.2. Limb-Girdle Kas Distrofileri (LGMD)

Limb-girdle kas distrofileri, özellikle omuz ve pelvik kuşak gibi proksimal kasları etkileyen, ilerleyici kas atrofisi ve güçsüzlüğüyle karakterize tek gen hastalıklarındandır. LGMD grubu, klinik bulguları ve hastalığın seyri açısından heterojen bir gruptur. İskelet kas tutulumuna ek olarak, solunum ve kardiyak kaslar da bazı LGMD tiplerinde etkilenebilir. LGMD tipleri, erken başlangıç ve hızlı ilerleme gösteren ağır klinik seyirle gidebileceği gibi, daha geç başlayıp yaşam uzunluğunu pek etkilemeyecek şekilde hafif de seyredebilir (46). LGMD klinik fenotipiyle başvuran hastada; hastalık seyrinin bilinmesi, iskelet kası

dışındaki organ tutulumlarının tahmin edilmesi ve hastalara yaklaşımın belirlenebilmesi için, LGMD alt tipinin tanımlanması gerekmektedir. LGMD klinik teşhisi, üç temel yönetime dayanır. İlk olarak, klinik semptomlar, hastaların yarısında doğru teşhise yönlendirebilir. Klinik fenotipe dayanarak, LGMD teşhisini kolaylaştırmak ve alt tipini belirlemek için, bilgisayar temelli algoritmalar mevcuttur. Örneğin, Jain Foundation, LGMD alt tiplendirme için klinisyenlere yönelik bir araç sunmuştur (47). Klinik fenotiple teşhise gidilemeyen durumlarda, biyopsi yöntemiyle ya da genetik testlerle, hastalığın genetik temeli belirlenmeye çalışılır (11).

Dünya genelinde en sık görülen kas distrofisi tipi; X'e bağlı aktarılan Duchenne kas distrofisidir. Duchenne kas distrofisinin ardından, grup olarak LGMD'ler ikinci en sık kas distrofisi grubudur(48-50).

LGMD'ler kalıtım türüne göre otozomal dominant aktarılanlar (LGMD1) ve otozomal resesif aktarılanlar (LGMD2) olarak gruplandırılır. Yeni nesil DNA dizileme yaklaşımının yaygın hale gelmesiyle, yeni LGMD genleri hızla tanımlanmaya başlanmıştır. Günümüzde LGMD'den sorumlu 8 otozomal dominant ve 23 otozomal resesif kalıtılan olmak üzere 31 mutant gen tanımlanmıştır (51) (Tablo 2.1).

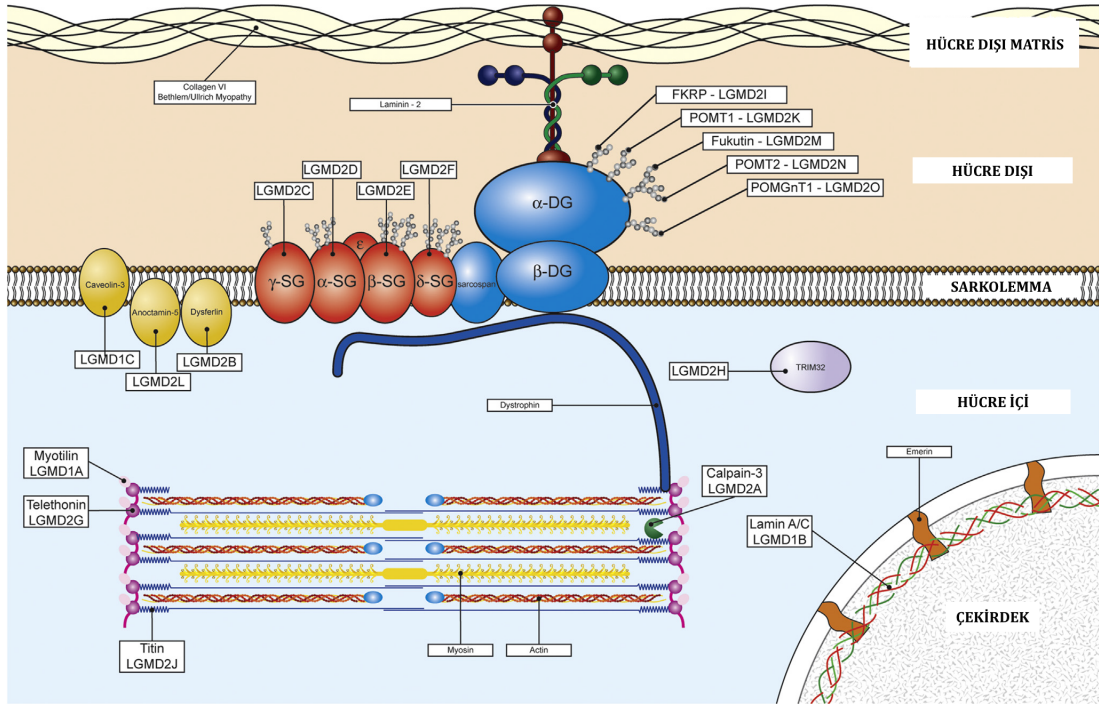
LGMD'ler, hücre dışı matris, sarkoplazma, sarkolemma ve çekirdekte işlev gören proteinlerin işlev kaybıyla oluşabilir (51). Mutant olmaları durumunda farklı tip LGMD'lere sebep olan kasın normal işlevinde görevli olan proteinlerin bir kısmı Şekil 2.1'de gösterilmiştir. En sık görülen LGMD2 alt tipi, kalpain 3 mutasyonu ile oluşan LGMD2A'dır. LGMD2A'nın ardından ise en sık görülen LGMD2 alt tipi, disferlin mutasyonunun neden olduğu LGMD2B'dir (49).

Tablo 2.1 LGMD2 hastalığından sorumlu olduğu saptanmış genler. Nigro ve diğerlerinden (51) uyarlanmıştır.

Hastalık	Lokus	Gen ismi	Protein ürünü	Kaynaklar
LGMD2A	15q15	<i>CAPN3</i>	Kalpain 3	(52-54)
LGMD2B	2p13.2	<i>DYSF</i>	Disferlin	(55-57)
LGMD2C	13q12	<i>SGCG</i>	γ -Sarkoglikan	(58-62)

Tablo 2.1 (Devam) LGMD2 hastalığından sorumlu olduğu saptanmış genler

LGMD2D	17q21.33	<i>SGCA</i>	α -Sarkoglikan	(63-66)
LGMD2E	4q12	<i>SGCB</i>	β -Sarkoglikan	(67-69)
LGMD2F	5q33	<i>SGCD</i>	δ -Sarkoglikan	(70, 71)
LGMD2G	17q12	<i>TCAP</i>	Teletonin	(72, 73)
LGMD2H	9q33.1	<i>TRIM32</i>	<i>Tripartite motif containing 32</i>	(74, 75)
LGMD2I	19q13.3	<i>FKRP</i>	<i>Fukutin related protein</i>	(76, 77)
LGMD2J	2q24.3	<i>TTN</i>	Titin	(78)
LGMD2K	9q34.1	<i>POMT1</i>	Protein-O-mannozil transferaz 1	(79)
LGMD2L	11p13-p12	<i>ANO5</i>	Anoktamin 5	(80-82)
LGMD2M	9q31	<i>FKTN</i>	Fukutin	(83, 84)
LGMD2N	14q24	<i>POMT2</i>	Protein-O-mannozil transferaz 2	(85)
LGMD2O	1p34.1	<i>POMGnT1</i>	Protein O-linked mannoz beta1,2-Nasetilglukozaminil transferaz	(86-88)
LGMD2P	3p21	<i>DAG1</i>	Distroglikan	(89, 90)
LGMD2Q	8q24	<i>PLEC1</i>	Plektin	(91)
LGMD2R	2q35	<i>DES</i>	Desmin	(92)
LGMD2S	4q35	<i>TRAPPC11</i>	Transport protein partikül kompleks 11	(93)
LGMD2T	3p21	<i>GMPPB</i>	GDP-mannoz pirofosforilaz B	(94)
LGMD2U	7p21	<i>ISPD</i>	<i>Isoprenoid synthase domain containing</i>	(95)
LGMD2V	17q25.3	<i>GAA</i>	Alfa-1,4-glukozidaz	(96)
LGMD2W	2q14	<i>LIMS2</i>	<i>Lim and senescent cell antigen-like domains 2</i>	(97)



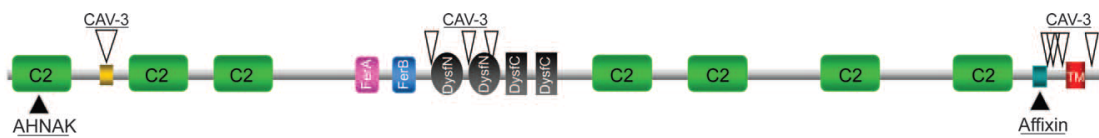
Şekil 2.1 Kas hücresi, işlev gøren proteinler ve ilişkili LGMD lokusları. Wicklund ve diğerlerinden (11) uyarlanmıştır.

2.3. Disferlin Proteini ve Disferlinopati

Disferlinopati, disferlin gen mutasyonundan kaynaklanan bir kas distrofidir. Disferlinopatide temel olarak; hasta bireylerde proksimal kasların erken tutulumuyla karakterize LGMD fenotipi (LGMD2B) gørenbileceđi gibi, erken dönemde gastroknemius gibi distal kasların tutulmasıyla Miyoshi miyopati fenotipi de gørenbilir (12, 98, 99). Bu iki temel fenotipe ek olarak, disferlin gen mutasyonu, anterior tibial tutulum başlangıçlı distal miyopati ve asemptomatik kreatin fosfokinaz yüksekliğine neden olmaktadır (55, 100, 101). Disferlin genindeki mutasyon tipiyle, fenotipik heterojenite arasında bir ilişki kurulamamıŐtır. Hatta aynı mutasyonun, aynı aile içinde bile bir hasta bireyde LGMD2B, diğer hasta bireyde miyoshi miyopati fenotipine yol açtığı da gørenmüŐtür (102, 103). Bu bulgular, disferlinopati patogenezinde rol oynayan düzenleyici genlerin olabileceğini ortaya koymuştur. Fakat, henüz düzenleyici genler tespit edilememiştir.

LGMD2B genel olarak, 15-30 yaşları arasında belirti vermeye başlar. Hastaların bilişsel ve motor gelişimleri normaldir, hatta bazı LGMD2B vakalarının hastalık başlangıcından önce sporla ilgilendiği belirtilmiştir. LGMD2B genelde kliniğe ilk olarak alt ekstremitte tutulumuyla gelmektedir. Çoğu vakada, kas güçsüzlüğü yavaş ilerleme gösterir. Solunum ve kardiyak kasların tutulumu, LGMD2B için tipik değildir (11).

Disferlin geni 55 ekzondan oluşur ve 230 kDa büyüklüğünde transmembran bir proteini kodlar (104). Disferlin proteinin büyük kısmı, kas hücrelerinin sitoplazmasında yer alır. Disferlin protein dizisi incelendiğinde, yedi adet C2 bölgesi ve iki adet DysF bölgesi bulunmuştur (Şekil 2.2) (105, 106). DysF bölgesinin işlevi tam olarak bilinmemektedir. Bu bölgenin oluşturduğu üç boyutlu yapı yakın zamanda belirlenmiştir. Bu bölgede görülen çoğu patojenik mutasyonun, protein katlanmasını engellediği, böylece disferlin proteininin yıkımını arttırdığı düşünülmektedir (107). C2 bölgeleri, genelde Ca^{2+} ve protein bağlanan bölgelerdir. C2 bölgeleri, en iyi veziküler füzyon proteini sinaptotagminlerde çalışmıştır. Sinaptik vezikül döngüsünde, sinaptotagminlerin kalsiyum sensörü olarak görev aldığı düşünülmektedir. C2 bölgesine kalsiyum bağlanmasıyla, asidik amino asitler nötralle olmakta ve fosfolipit ve hedef proteinlerin bağlanması hızlanmaktadır (108-110). Disferlin proteininde C2 bölgelerinin bulunması, disferlinin protein ve fosfolipidlerle etkileşiminin kalsiyuma bağımlı olduğunu düşündürmektedir.



Şekil 2.2. Disferlin proteininin yapısı. Glover ve diğerlerinden (105) alınmıştır

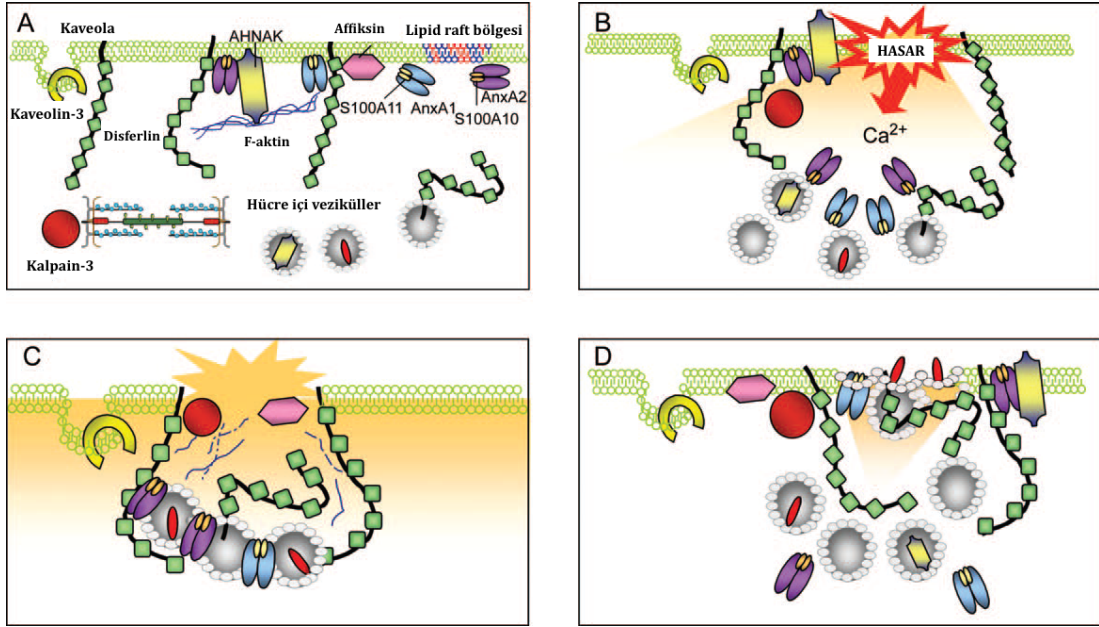
Disferlin proteini farklı dokularda yaygın olarak ifade edilmekte olup, özellikle iskelet ve kalp kasında yüksek düzeyde bulunmaktadır (111). Disferlin proteini tanımlandığında *Caenorhabditis elegans* spermatogenez faktörü, fer-1'e homoloji gösterdiği görülmüştür. "Disferlin" adı, fer-1 homolojisi ve kas distrofisi fenotipi görülmesinden yola çıkarak konulmuştur (56). *C. elegans* fer-1

protein mutasyonu, spermatozoada vezikülün hücre zarıyla füzyonunu engellemektedir (112). Bu nedenle, ilk yapılan çalışmalarda disferlin proteinin vezikül füzyonu için önemli olabileceği düşünülmüştür.

Hücre zarı hasarının görüldüğü bölgede disferlin proteininin arttığı saptanmıştır (113). Ayrıca disferlin yokluğunda, hücre zarı tamirinin belirgin olarak bozulduğu gözlemlenmiştir (114). Bu nedenle, disferlin proteininin hücre zarı tamirinde rol aldığı düşünülmektedir, fakat bu mekanizmadaki rolü henüz tam olarak bilinmemektedir.

Hücre zarı tamir mekanizmasını açıklamak için iki temel hipotez ortaya sunulmuştur. İlk hipotez, hücre zarı hasarının, vezikül-vezikül ve vezikül-sarkolemma füzyonu sayesinde yamalanarak tamir edildiğini ortaya sürmektedir (Şekil 2.3). Hücre zarı hasara uğradığında, lokal olarak artan kalsiyum düzeyi, ekzositotik süreci ve yama tamir mekanizmasını aktive eder. Hasarın görüldüğü bölgede hücre iskeleti yeniden düzenlenir ve veziküller bölgeye taşınır. Bu veziküller birbirleriyle birleşerek geniş zar yamaları oluşturur. Bu endomembranın, plazma zarıyla birleşerek, hasarı tamir ettiği öne sürülmüştür (115-117). Fakat, düzensiz çeperli hücre zarı hasarlarının ekzositoz yoluyla tek bir füzyon odağından kapanması zor bir süreçtir. Bu nedenle, yama mekanizmasıyla hücre zarı tamirinde, hasar etrafından birden çok füzyon odağı oluşabileceği öne sürülmüştür (118).

Hücre zarı hasarıyla oluşan vezikülleri işaretleyen ve bu veziküllerin ekzositotik orijinlerini araştıran çalışmalar yeni bulgulara ulaşmıştır. Bu çalışmalar, hasar sonrası hücre zarında Lamp1 glikoproteini gibi lizozoma ait işaretleyiciler tespit etmiştir (119). Hücrelerde zar hasarı sonrasında, lizozomların hücre zarıyla birleşerek ortama asit sfingomiyelinaz saldığı ve sonrasında endositoz sayesinde hasarlı hücre zarı bölümlerinin kaldırıldığı gözlemlenmiştir (120, 121). Bu gözlemlere dayanan ikinci hipotez, yamalama şeklinde değil endositozla, hücre zarı hasarının hücre içine alınarak tamir edildiğini savunmaktadır.

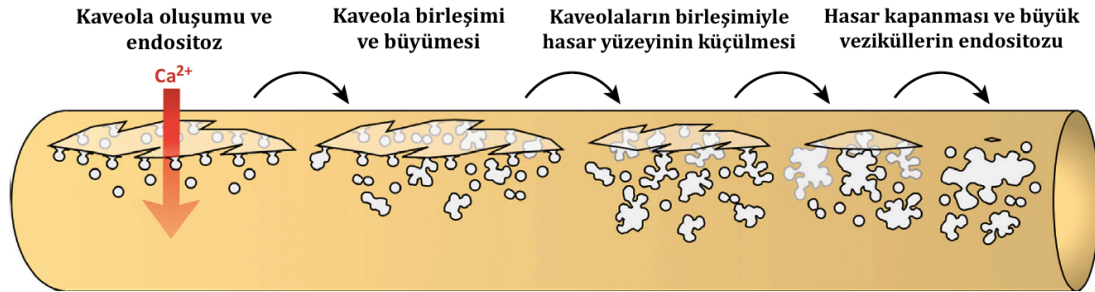


Şekil 2.3. Yama mekanizmasıyla hücre zarı tamiri. Glover ve diğerlerinden (105) uyarlanmıştır.

Hücre zarı hasara uğradıktan sonra lizozomal ekzositozla, asit sfingomiyelinaz etrafa salınır. Sfingomiyelinin fosforilkolin grubunun sfingomiyelinaz tarafından kesilmesiyle oluşan seramitler, zarı invajinasyona meyilli zar mikrobölgeleri oluştururlar (122). *In vitro* çalışmalarda, dev lipozomlarda, asit sfingomiyelinaza maruz kalındıktan sonra, asimetrik seramit birikimi sayesinde hücre zarının yeniden modellendiği ve invajinasyon oluşmasına neden olduğu görülmüştür (123). Asit sfingomiyelinazdan yoksun hücrelerde, hücre zarı hasarı sonrası lizozomal ekzositoz oluşmuş, fakat takiben endositoz ve hücre zarı tamiri gerçekleşmemiştir (120). Bu bulgu, sfingomiyelinaz sayesinde seramit oluşumunun ve endositozun, hücre zarı tamiri için gerekli olduğunu vurgulamaktadır.

Hücre zarı tamir mekanizmasını çalışan gruplar, hücre zarı hasarından birkaç saniye sonra, hücreleri elektron mikroskopıyla incelediklerinde çok sayıda küçük veziküller oluştuğunu görmüşlerdir (Şekil 2.4.). Bu veziküllerin kaveolaya benzediği, hücre içine girdikten sonra birleşerek büyük veziküller oluşturduğu görülmüştür. Bu büyük vezikül zarlarında zaman içinde, endozomal ve lizozomal işaretleyicilerin belirdiği saptanmıştır (124). Bu

durumda ön görüldüğü gibi kaveolalar hücre zarı tamirinde rol alıyorsa; bu mekanizma distrofinopati gibi hücre zarı hassasiyetinin arttığı hastalıklarda kaveolin-3'ün sekonder olarak artmasını açıklayabilir (125).



Şekil 2.4. Kaveolar internalizasyonla hücre zarı tamiri. Hücre hasarıyla artan kalsiyum akımı, sarkolemma ile ilişkili kaveola oluşumunu ve endositozu tetikler. Kaveola birbiriyle birleşerek büyür ve hasar ağzını küçültmeye başlar. Hücre zarı hasarı tamir edilir ve büyük vezikül endositozla alınır. Andrews ve diğerlerinden (118) uyarlanmıştır.

Asit sfingomiyelinaza bağımlı hücre zarı tamir mekanizmasının disferlinle ilişkisi çalışılmıştır. Disferlinden yoksun miyoblastlarda lizozomal ekzositozun ve asit sfingomiyelinaz sekresyonunun azalmış olduğu gösterilmiştir (120, 121). Ayrıca disferlinden yoksun miyoblastlara asit sfingomiyelinaz verilmesi, tamir mekanizmasındaki hatanın düzelmesini sağlamıştır. Bu bulgular ışığında, lizozomdan salınan asit sfingomiyelinaz, disferlin eksikliğinde olası tedavi seçeneği olarak öne sürülmüştür (121). Disferlinin önemli bir rol oynadığı hücre zarı tamir mekanizması henüz detayları aydınlatılmamış bir süreçtir. Bu süreç konusunda yapılan çalışmalar, hem disferlin proteininin işlevi konusunda bilgi sağlarken disferlinopatiler için yeni tedavi seçenekleri oluşturulmasına da yardımcı olacaktır.

Hücre zarı tamiri dışında disferlin proteininin kas hücresinde farklı görevlerinin de olduğu tahmin edilmektedir. Disferlinin, kas hücrelerinde alfa-tübülün ve mikrotübüllerle etkileşime girdiği gösterilmiştir. Disferlin, alfa-

tübüline C2A ve C2B kısımları üzerinden kalsiyumdan bağımsız olarak bağlanmaktadır (126). Bu etkileşim sayesinde disferlinin mikrotübül dinamiklerini ve stabilitesini etkileyerek, miyogenezde rol alabileceği düşünülmüştür. Mikrotübüllerin stabilitesi, translasyon sonrası modifikasyonla kontrol edilir. Özellikle miyojenik farklılaşma sırasında, stabil bir mikrotübül ağının oluşturulması gerekmektedir (127). Mikrotübül stabilitesinin kontrolünde alfa-tübülün asetilasyonu önemli bir rol oynamaktadır. Alfa-tübülünün deasetilasyonunu gerçekleştiren protein, diğer histon deasetilazlardan farklı olarak sitoplazmada bulunan HDAC6 proteindir (128). HDAC6 (Histon deasetilaz 6) proteininin, disferlinle etkileşime girdiğinin gösterilmesi, disferlinin mikrotübül stabilitesini etkileyebileceğini düşündürmüştür. Disferlin, HDAC6'ya ve aynı anda alfa-tübüline bağlanarak, HDAC6'nın alfa-tübülünü deasetillemesini engellemektedir. Miyojenik farklılaşmanın erken döneminde, HDAC6 inhibe edildiğinde, miyogenezin bozulduğu gözlenmiştir. Bu sebeple, mikrotübüllerin stabilitesini etkileyerek disferlinin miyogenezde önemli bir protein olabileceği öne sürülmüştür (129).

Disferlinin, plazma zarı ve vezikül zarı lokalizasyonuna ek olarak tranvers tübülde (t-tübül) de yerleştiği gözlemlenmiştir (130). Disferlin t-tübülde dihidropridin reseptörü (DHPR, diğer adıyla L-tipi Ca^{2+} kanalı-LTCC) ve ryanodin reseptörü (RYR) ile etkileşime girmektedir (130, 131). Disferlinin t-tübüldeki yerleşimi, kalsiyuma bağımlı sinyal yolağında rol alabileceğini düşündürmüştür. Disferlinden yoksun miyofibrillerde, ozmotik stres sonrası t-tübül yapısı bozulmuş ve sitozoldeki kalsiyum seviyesi belirgin şekilde yükselmiştir. Bu sonuçlar, disferlinin kas hücrelerinde DHPR ile etkileşime girerek t-tübülünü hasardan koruduğuna ve kalsiyum homeostazında rol oynadığına işaret etmektedir (132). Bu çalışmalar, disferlinopati patogenezinde, kas hücresinin mekanik stres sırasında kalsiyum dengesini sağlayamadığı, bu nedenle sitozolik kalsiyumun aşırı artmasına neden olduğunu öne sürmektedir.

Disferlinin, endotelial hücrelerde de ifade edildiği saptanmıştır. Bu hücrelerde, disferlinin hücre adezyonunda ve buna bağımlı olarak anjiyogenezde rol alabileceği öngörülmüştür. Hücre kültüründe yüzeyin tam olarak kaplanmadığı dönemde, endotelial hücrelerde disferlin yokluğunda,

hücre adezyonunun bozulmasına bağlı olarak proliferasyonun engellendiği gözlemlenmiştir. Ayrıca disferlinden yoksun fareler anjiyogenezi indükleyen uyaranlara maruz kaldıklarında, azalmış anjiyogenez yanıtı vermişlerdir. *In vitro* çalışmalarda, disferlin yokluğunda, anjiyogenez için gerekli olan, platelet/endotelial hücre adezyon molekülü-1 (PECAM-1) proteininin lokalizasyonunun bozulduğu ve artmış ubikitinasyon sonrası proteazomal yıkıma uğradığı gösterilmiştir. Ek olarak, bu hücrelerde PECAM-1 ifadesi arttırıldığında adezyon hasarı düzelmiştir (133). Bu sonuçlar, disferlin proteininin PECAM-1 üzerinden hücre adezyonunu etkileyerek, anjiyogenez sürecinde rol alabileceğini göstermektedir.

Disferlin proteini, kas hücrelerinin normal işlevi için ana proteinlerden biridir. Temelde hücre zarı tamirinde rol almasına rağmen, disferlinin henüz keşfedilmemiş ya da iyi karakterize edilmemiş birçok farklı rolü bulunmaktadır. Disferlin proteininin işlevlerinin detaylı olarak aydınlatılması, disferlinopati patogenezinin çalışılması ve önemli yolaklardaki anahtar genlerin saptanması, disferlin eksikliğinde oluşan kas distrofisi için yeni tedavi seçeneklerinin ortaya sürülmesini sağlayacaktır.

2.4. Biyomedikal Metin Madenciliği

Biyomedikal literatür ve biyolojik veri depoları günümüzde hızla büyümektedir. MEDLINE, ağırlıklı olarak biyomedikal alanda olmak üzere 21 milyonun üzerinde yayın içermektedir. 2005 yılından bu yana, her gün 2000-4000 arasında referans, MEDLINE veri tabanına eklenmektedir (134). Ayrıca, diğer biyolojik veri tabanları; genler, proteinler ve hücrel yolaklar gibi biyolojik kavramlar hakkında da bilgi depolamaktadır. Üssel büyüme gösteren bilgi havuzunda, ilgili dokümanlara ulaşabilmek ve bunları deneysel verilerle birleştirebilmek; aramalarda anahtar kelime seçimlerinin değiştirilmesi ve düzenlenmesiyle oldukça uzun zaman alan bir süreçtir. Bu uzun süreç çoğu zaman, eksik sonuçlara ulaşılmasına ve veri tabanlarının barındırdığı bilgi gücünün tamamının kullanılamamasına neden olur (135). Bu nedenle, bilgiyi verimli bir şekilde ayıklamak ve kullanabilmek için sistematik analiz yapabilen yazılım araçlarına ihtiyaç duyulmaktadır (136).

Metinlerin otomatik olarak işlenmesi ve analizi, araştırmacılara bilimsel literatürün değerlendirilmesinde yardımcı olmaktadır. Biyomedikal literatür, çok geniş bilgi depoluyor olmasına rağmen; bu bilgi yapılandırılmamış olduğu için, metinlerin yorumlanmasının ve bilgi çıkarımının kolaylaştırılmasının standart bir yolu yoktur. Bu nedenle, metin madenciliği günümüzde metin işleme ve makine öğrenim tekniklerini, biyolojik yolak ve gen ifade veri tabanları madenciliğiyle birleştirmeye başlamıştır (13). Bu sayede, metin madenciliği farklı yazılı kaynaklardan otomatik olarak bilgileri çekip birbirleriyle ilişkilendirerek, önceden bilinmeyen gizlenmiş bilgilerin keşfini amaçlamaktadır (137).

2.4.1. Bilgi Getirimi

Biyomedikal metin madenciliğinin ilk basamağı, ilgilenilen konuyla ilişkili metinlere ulaşabilmektir. Bu basamak, bilgi getirimi (*information retrieval*) olarak adlandırılır. En basit örneği, bibliyografik veri tabanlarının anahtar kelimeler kullanılarak aranmasıdır. Bu basamağın en sık kullanılan bibliyografik veri tabanı PubMed'dir. PubMed, MEDLINE veri tabanındaki özetlere ulaşım sağlamaktadır. Birçok metin madenciliği aracı, genel kullanıma açık olması ve özetlerin Tıbbi Konu Başlıkları - *Medical Subject Heading* (MeSH) ile işaretlenmiş olması nedeniyle MEDLINE veri tabanını kullanır (13).

Anahtar kelime aramasıyla metinlere ulaşılması için iki temel yaklaşım vardır. İlk yaklaşım, aranan kelimelerin içinde geçtiği tüm makaleleri bulup, ulaşılan makale sayısını en yüksekte tutmaktır. Diğer yaklaşım ise, aramada geçen anahtar kelimeler arasında anlamlı bir şekilde ilişkinin tasvir edildiği makaleleri bulup, özgüllüğü arttırmaktır. Bu iki yaklaşım arasındaki dengeyi bulmak önemlidir. Günümüzde en sık kullanılan arama motorları, ilk yaklaşımı benimsemektedir. Bu nedenle, makalelerin sıralandırma algoritmaları için çok çaba harcanmıştır. İkinci yaklaşım, temel olarak metin madenciliği alanına girmektedir. Bu yaklaşım, metinde terimlerin arasında bir ilişki tasvir edilmediğini esas almaktadır. Böylece arama yapıldığında, daha özgül sonuçlara ulaşılabilir (137). İkinci yaklaşıma örnek olarak Quertle (www.quertle.info) arama motoru verilebilir. Quertle, dilbilim metotlarını kullanarak, biyomedikal

dokümanlarda betimlenen bilgileri bulur ve anahtar kelime aramasıyla ilişkili dokümanları sunar. Örneğin, nitrik oksitle ilgili arama yaparken, “*NO affects what?*” yazıldığında, dilbilim metotlarını kullanmayan arama motorları olumsuzluk anlamındaki “no” nedeniyle, nitrik oksitten ilgisiz geniş sonuçlara varmaktadır. Bu sonuçlar arasından, aranan bilgiyi bulabilmek çok uzun zaman almaktadır. Fakat, Quertle, bu arama yapıldığında nitrik oksitle ilişkili makalelere ulaşmaktadır. Ayrıca sonuçlar kısmında, ilişkili anahtar kavramları seçme olanağı tanıyarak, aramanın daha verimli şekilde filtrelenmesine yardımcı olmaktadır (138). Bu arama motoru, metin madenciliği çalışmalarının, literatür tarama sürecinde araştırmacıya zaman kazandırdığının bir örneğidir.

Metin madenciliğinde dokümanların arama kriterlerine göre sıralanması veya benzerliklerinin hesaplanıp kümelenendirilebilmesi için, genelde metinler vektörlerle temsil edilirler. Çoğunlukla kullanılan yöntem, dokümandaki kelimelerin ağırlıklandırılmasına dayanır. Dokümanlarda geçen terimlerin sıklıkları kullanılarak her dokümanı temsil eden kelime seçilebilir. Fakat, sadece kelime sıklıklarını kullanmak, tüm kelimeleri aynı derecede bilgi verici kabul ettiği için önemli terimleri seçmekte başarılı olamaz. Halbuki, dokümanları birbiriyle karşılaştırırken daha az sayıdaki dokümanda beliren nadir kelimeler, o dokümanı daha iyi temsil etmektedir. Bu yüzden kelimeler, terim frekansıyla doğru orantılı, doküman frekansıyla ters orantılı olarak ağırlıklandırılabilirler. Terim frekansı – ters doküman frekansı (TF-IDF) olarak bilinen bu yöntem, metin madenciliğinin temel yöntemlerinden olup, bilgi getirimi aşamasında kullanılabilir(139).

2.4.2. Adlandırılmış Varlık Tanıma

Biyomedikal metin madenciliğinde önemli bir basamak, biyomedikal adlandırılmış varlıkların tanınabilmesidir (*named entity recognition*). Adlandırılmış varlık, bir kavramı temsil eden anahtar kelime ya da anahtar kelimeler grubudur. Bir terim birden çok kavramı temsil edebilir, terimleri doğru tanıyabilmek için bahsedildikleri durumu kavrayabilmek gerekir. Özellikle kısaltmalar, birden farklı anlam alabilir. Örneğin, bir protein birden

fazla isimle ifade edilebilir, buna benzer olarak tek bir terim de kullanıldığı duruma göre farklı proteinleri temsil ediyor olabilir. Bu nedenle, bilimsel metinde gen ve protein isimlerinin tanınması, adlandırılmış varlık tanıma basamağının en büyük zorluklarından biridir (13).

Bu soruna farklı çözümler önerilmiştir. En basit yöntem, kelimelerin eş anlamlılarının da tanımlandığı anahtar terim sözlükleri oluşturup, metindeki terimleri sözlük yardımıyla tanıyabilmektir. Birçok metin madenciliği aracı, adlandırılmış varlık tanıma basamağı için sözlük temelli yaklaşımı kullanmaktadır (13). Fakat bu yöntem için, sözlüğün düzenli olarak güncellenmesi gerekir. Ayrıca birden çok proteinin aynı ismi olduğunda sözlük yöntemi yanlış sonuçlar sunabilir (139). Sözlük yöntemine ek olarak, biyolojik varlık isimlerini tanımak için, ontolojiler de kullanılmaktadır. Ontolojiler; kavramları, bu kavramları temsil eden anahtar kelimeleri tanımlar ve kavramlar arasındaki ilişkileri yapılandırılmış şekilde depolarlar. Ontolojiler, genelde çalışma alanına özgü olarak geliştirilirler. Metin madenciliği iş akışlarına, ontolojilerin eklenmesi alana özgü araştırmalarda bilgi çıkarımı (*information extraction*) basamağının performansını arttırabilir. Ayrıca, ontolojilerin yapısını kullanarak, arama basamağının genişletilmesine yardımcı olabilir (13, 140, 141).

Adlandırılmış varlık tanıma basamağı için, kelimelerin yapısı, cümle içinde buldukları yer veya çevrelerinde bulunan kelimelerden yararlanılabilir. Bu bilgiler birleştirilerek oluşturulan kurallar kullanılarak terimler tanınabilir (139).

Günümüzde makine öğrenim teknikleriyle de biyolojik terimler tanınmaktadır. Bu yöntem için, algoritma önceden oluşturulmuş, varlıkların tanımlanmış olduğu setle eğitilir, sonrasında çalışılmak istenen setteki adlandırılmış varlıkları tanır (13).

Gen, protein isimleri gibi bu biyolojik kavramlar, ilgili veri tabanlarına ulaşarak standardize edilmiş tanımlayıcı kodlarıyla eşleştirilirler. Böylece terimler ve temsil ettikleri biyolojik kavramlar arasındaki belirsizlik giderilmiş olur. Adlandırılmış varlık tanıma, biyomedikal metin madenciliğinin en çok geliştirilen basamaklarından biri olmuştur çünkü algoritmaların biyomedikal

metinlerden bilgi çıkarabilmeleri için, protein ve gen isimlerini doğru tanımları esastır.

2.4.3. Bilgi Çıkarımı

Biyolojik kavramlar arasındaki etkileşimleri bulmak, biyomedikal metin madenciliğinin önemli amaçlarından biridir. Bunun için iki temel yöntem esas alınmıştır. İlk olarak terimlerin aynı paragraf ya da aynı cümlede birlikteliklerinden yola çıkarak etkileşim tahminlerinde bulunulmuştur. Birlikte bulunma yöntemi, adlandırılmış varlık tanıma algoritmalarıyla da birleştirildiğinde; biyolojik varlıklar arasındaki ilişkileri tahmin edebilirler fakat ilişkinin tipine dair bilgi vermezler. Ayrıca her birlikte geçen terim, işlevsel olarak ilişkili olmadığından, bu yöntem geniş sonuçlara ulaşır fakat her sonuç biyolojik olarak ilişkiyi göstermez (142).

Bilgi çıkarımı için, birlikte bulunmanın yanı sıra, doğal dil işleme yöntemleri de geliştirilmiştir. Doğal dil işleme, insan dilinin bilgisayarlar tarafından işlenmesidir. Bu yöntem için, dilin yapısal kurallarının ve bilimsel metinlerde biyolojik bilgilerin nasıl belirtildiğinin bilinmesi gerekmektedir. Doğal dil işleme, metin içindeki ilişki tarif eden ifadeleri tanır, böylece, birlikte bulunma yöntemine ek olarak ilişki tipleri konusunda da bilgi sağlamaktadır. Bu yöntemler, makine öğrenim tekniğinde kullanılan önceden hazırlanmış eğitim setinin kalitesine bağlıdır. Dil işleme yöntemleriyle, birlikte bulunma temelli yaklaşımlara göre daha özgül sonuçlara ulaşmalarına rağmen, kısıtlı sayıda ilişkiyi tespit edilebilir (142).

Biyomedikal bilgi çıkarım araçlarına örnek olarak, BioIE verilebilir. BioIE, kural tabanlı yöntemi kullanarak, biyolojik varlıkların yapısına, işlevine, ilişkili oldukları hastalıklara dair bilgileri çıkarabilir (143). Bu basamak, metin madenciliği araçlarının araştırmacıya sağladığı sonuçlardan biridir. Bilgi çıkarımı sayesinde, biyomedikal literatürde tanımlanan hastalık-gen, protein-protein, ilaç-protein ilişkileri gibi bilgilere ulaşılır.

2.4.4 Bilgi Keşfi

Her yıl biyomedikal literatür üssel olarak büyürken, bir araştırmacının çalıştığı konu hakkında tüm gelişmeleri takip etmesi zorlaşmaktadır. Metin madenciliği, yeni gelişmeleri ve konu hakkında bilinen tüm bilgileri takip etmek için hızlı bir yöntemdir. Fakat buna ek olarak, metin madenciliği araçları metinlerde doğrudan belirtilmeyen gizli bilgileri de bulmayı hedeflemektedir. Metin madenciliğiyle, literatürdeki bilinenlere dayanarak, anahtar terimler arasında doğrudan olmayan ilişkiler keşfedilmeye çalışılmaktadır (137).

Bilgi keşfi için yöntemlerden biri, doğrudan olmayan ilişki çıkarımlarıdır. Bu yöntem Swanson tarafından ortaya atılmıştır. Bu yönteme göre, A ve C arasında doğrudan ilişki olduğu literatürde belirtilmemesine rağmen, eğer A ile C terimleri hep benzer anahtar kelimelerle beraber geçiyorsa bu durumda A ile C terimleri de birbiriyle ilişkili olabilir (142). Swanson bu yöntemi kullanarak, Raynaud hastalığında balık yağının yararlı etkisi olabileceğini öne sürmüştür (144). Bunun ardından bu yöntemi esas alan birçok metin madenciliği aracı oluşturulmuştur. Doğrudan olmayan ilişkileri bulmayı hedefleyen ArrowSmith, yeni bilgilerin keşfedilmesi ve hipotezlerin oluşturulması için kullanılacak metin madenciliği araçlarına örnektir. Eğer araştırmacının, iki farklı kavramın ilişkili olduğuna dair hipotezi varsa, ArrowSmith, bu iki kavramla ilişkili ortak terimleri bularak hipotezi geliştirmekte veya destekleyebilmektedir (145, 146). Bu metin madenciliğini kullanarak bilgi keşfini amaçlayan araçlara bir örnektir.

Sonuç olarak, günümüzde otomatize literatür analizi, metinsel dökümden bilgileri çekebilme, biyomedikal terimleri tanıyabilme ve bu terimleri veri tabanları ile ilişkilendirerek normalize etmektedir. Metin madenciliği araçları, biyolojik kavramlar arasında etkileşim ağları oluşturabilir. Metin madenciliğinden elde edilen bulguların, genel kullanıma açık deneysel verilerin analiziyle birleştirilmesi yeni hipotezler oluşturulmasını ve hazır bulunan veriler işlendiği için bilimsel gelişimin hızlanmasını sağlamaktadır. Günümüzde çok hızlı ilerleyen metin veri analizi ve biyoformatik araçlar kombine edilerek kullanıldığında bilimsel sorulara cevap bulabilmektedirler (147-149).

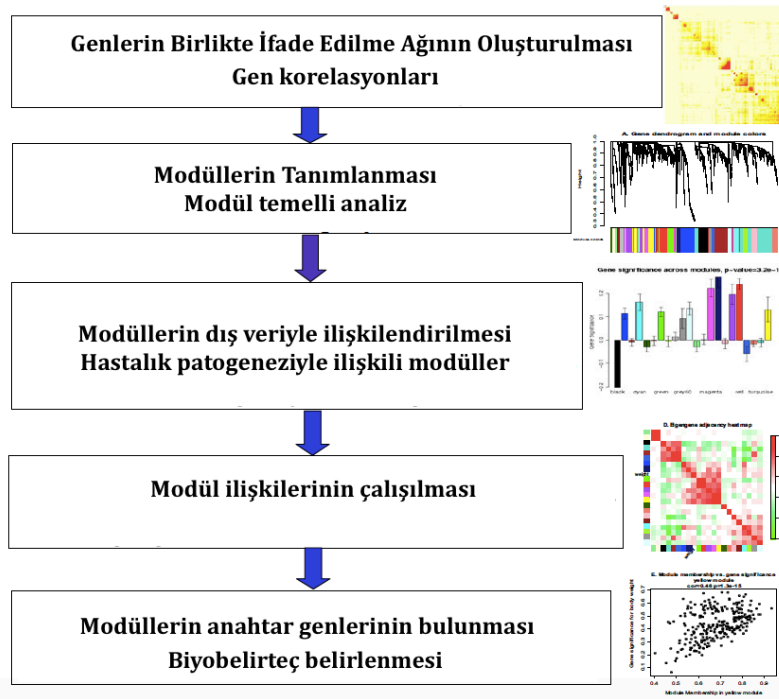
Metin madenciliğinin, hem araştırmacıya zaman kazandırması, hem literatürü sistematik olarak tarayabilmesi, hem de literatürde doğrudan belirtilmeyen gizlenen bilgilere ulaşabilmesi en belirgin avantajlarıdır. Bu avantajları nedeniyle, metin madenciliği disferlinopati patogenezinde yeni ilişkiler kurulabilmesine yardımcı olacaktır.

2.5. Genlerin Birlikte İfade Edilme Ağı Analizi

Yüksek çözünürlükteki deneysel verilerin, genel kullanıma açık veri tabanlarında depolanması; ıslak laboratuvar deneylerine geçilmeden önce yeni hipotezler oluşturulması veya oluşturulan hipotezlerin desteklenmesini sağlamaktadır. Son yıllarda gen ifadesi profil verileri, sistem biyolojisi yaklaşımıyla ağ temelli analiz yöntemleriyle incelenmektedir. Farklı koşullarda ve örneklerde, benzer davranan genler topluluğu ya aynı hücresel yollarda yer alır, ya beraber kompleks oluşturur ya da aynı transkripsiyonel faktörlerle denetlenirler. Buna dayanarak, mikrodizin verilerinde gen korelasyonlarının çalışılması, işlevsel olarak ilişkili gen gruplarının keşfedilmesini sağlamaktadır. Bu yöntem, artmış ya da azalmış gen ifadeleri analizi gibi yalnızca bir gen düzeyinde değil, bütüncül yaklaşımla gen grupları düzeyinde sonuç sunmaktadır. Ağ temelli yaklaşımların, biyolojik olarak ilişkili genleri aynı grupta kümelendirerek, iyi karakterize edilmemiş genlere işlev atamada başarılı olduğu gösterilmiştir (150-152).

Gen işlevi çalışmaları uzun zaman aldığı için, araştırmacılar gen işlevi tahminlerinde *in silico* yaklaşımları sıklıkla kullanmaktadırlar. Gen işlev tahminleri, deneysel sonuçların yerini tutmasa da; gen işlevlerinin belirlenmesi için gerekli olan deneysel yükü kayda değer derecede azaltmaktadır. Gen işlev tahmin metotları temelde *guilt-by-association* prensibine dayanmaktadır. Bu prensibe göre, RNA ifade düzeyleri, DNA dizisi ve üç boyutlu protein yapısı gibi özellikleri benzer olan biyolojik varlıkların işlevlerinin de benzer olması gerekir. Birlikte ifade edilme analizi gen işlev tahminleri için popüler bir yöntemdir (153). Birlikte ifade edilme analizi, genlerin görev aldıkları biyolojik süreçlerin tahmin edilmesini sağlar.

Ağırlıklandırılmış Gen Birlikte İfade Edilme Ağı Analizi/ *Weighted Gene Co-expression Network Analysis* (WGCNA), mikrodizin örneklerinde gen ilişkilerini çalışarak genlerin birlikte ifade edilme ağını oluşturur. Böylece biyolojik olarak anlamlı gen grupları (modül) ve bu grupları en iyi temsil eden merkezi genleri saptayabilir. Tanımlanan gen modülleri, vaka ve kontrol örnekleri arasında karşılaştırılarak hastalıkla ilişkili modüller seçilebilir. Böylece, hastalık patogeneziinde önemli rol oynayan hücresel yollar belirlenmiş olur. Birlikte ifade edilme ağı analizi yönteminin gen düzeyinde değil de modül bazında çalışıyor olması, çoklu hipotez test problemini azaltmaktadır. Bu ağ temelli yaklaşım, nörodejeneratif ve metabolik hastalıklarda önemli hücresel yolların, bu yolların anahtar genlerinin ve tedavi hedeflerinin belirlenmesinde başarıyla kullanılmıştır. WGCNA, genlerin birlikte ifade edilme bilgisi sayesinde proteinlerin işlevlerinin belirlenmesine yardımcı olmuş ve modüllerdeki merkezi genlerin seçimi sayesinde aday gen önceliklendirilmesi için biyolojik olarak anlamlı bir yöntem sunmuştur (14, 154-156). WGCNA yönteminin temel basamakları Şekil 2.5'te özetlenmiştir.



Şekil 2.5. WGCNA yönteminin temel basamakları. Langfelder ve diğerlerinden (14) uyarlanmıştır.

Bu tez çalışmasında disferlinopati patogenezinin aydınlatılması için metin madenciliği ve genlerin birlikte ifade edilme ağı analizi (WGCNA) yöntemlerinin kullanılmasına karar verilmiştir. Metin madenciliği, literatürde gizli kalmış bilgileri çıkarabilme ve WGCNA ise patogeneizde önemli hücre yollarını belirleyebilme avantajları nedeniyle seçilmiştir. Bu çalışmada, metin madenciliği ve WGCNA yöntemiyle, disferlin proteinin işlevleri ve disferlinopati patogenezinde etkilenen hücre süreçleri belirlenmiştir. Ayrıca, disferlinopati patogenezinde kritik rol oynayan genler saptanarak, disferlinopatide tedavi hedefi ya da biyobelirteç olarak araştırılabilecek genler ortaya konmuştur. Genlerin birlikte ifade edilme ağı analizinde, disferlinopatiyle ilişkili gen modüllerinde yeni tanımlanmış fakat işlevi henüz detaylı olarak bilinmeyen merkez genlerden birinin gen işlev tahmini yapılmıştır. Genlerin birlikte ifade edilme verisinin gen işlev tahmini performansının arttırılabilmesi için, kasa özgü ve global birlikte ifade edilme verileri birleştirilmiştir. Birlikte ifade edilen genlerin temsil ettikleri hücresel işlevler incelenmiştir. Ayrıca protein dizisi özelliklerini inceleyerek işlev tahmininde bulunan araçlar kullanılarak, proteinin işlev tahmini desteklenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Metin Madenciliği

Bu tez çalışmasında, disferlinopati hastalıklarına dair literatürün taranması ve bilgi keşfi için öncelikli olarak R yazılım programı üzerinden kelime ağırlıklandırılmasına dayalı metin madenciliği yönteminin kullanılması planlanmıştır. Fakat, biyolojik kavramların tanınması için kullanılan sözlük yöntemi eksik kalmıştır. Bu nedenle, etkileşim tahminlerinde daha güvenilir sonuçlara varabilmek için, geliştirilmiş biyomedikal metin madenciliği araçları araştırılmasına ve kullanılmasına karar verilmiştir.

BioTextQuest+ (BTQ+), bilgi getirimi, biyolojik kavramların tanınması, dokümanların kümelenmesi gibi metin madenciliği basamaklarını, biyolojik veri tabanlarıyla birleştirerek bilgi keşfi yapmayı amaçlayan bir araçtır. Bu araç, ilk olarak 2011 yılında geliştirilmiş olup 2014 yılında güncellenmiştir. Bu araçla, PubMed veya OMIM arama motorları kullanılarak, anahtar kelimelere ilişkin özetler çekilir. Daha sonra bu özetlerdeki cümleler kelimelerin belirlenmesi için işlenir, TF-IDF yöntemiyle kelime ağırlıklandırması yapılır ve her doküman, önemli terimlerin bulunup bulunmamasına bağlı olarak vektörle temsil edilir. Bu vektörler üzerinden dokümanların benzerlikleri hesaplanır ve dokümanlar kümelenir. Benzerlik ve kümelenme basamaklarında farklı yöntemler kullanılabilir. Önemli terimler arasında protein isimleri, Gene Ontology terimleri olan biyolojik süreçler, moleküler işlev ve hücre kompartmanları tanınır. Bu araç sayesinde, literatürden elde edilen önemli biyomedikal terimlerin özet ya da cümle düzeyinde beraber bulunup bulunmadıkları sorgulanabilir, beraber buldukları makalelere erişilebilir. BTQ+, metin madenciliğinden elde ettiği sonuçları, biyolojik kavramlar hakkında bilgi toplayan veri tabanlarıyla entegre edebilmek için BioCompendium veri analiz platformuna bağlanabilir. Böylece metin madenciliğinden elde edilen protein listesi; protein-protein etkileşim ağının oluşturulması ve işlevsel zenginleştirme çalışmaları için kullanılabilir (157).

Bu tez çalışmasında, disferlinopati hakkında literatürde bulunan bilgilere metin madenciliği araçlarını kullanarak etkin ve hızlı bir şekilde

ulaşılması planlanmıştır. Metin madenciliğiyle elde edilen bilgiler; protein-protein etkileşimleri ve genlerin işlevsel bilgilerini depolayan veri tabanlarıyla birleştirilerek yeni bilgi keşfi yapılması planlanmıştır. Hem güncel olması hem de doküman erişimi, dokümanların kümelendirilmesi, adlandırılmış biyolojik kavram tanımı ve diğer biyolojik veri tabanlarıyla kolay entegrasyon basamaklarının hepsini içerdiği için metin madenciliği analizi için, BTQ+'nın kullanılması uygun görülmüştür.

BioTextQuest+ üzerinden disferlinopatiye dair metin madenciliği araştırması yapılmıştır. PubMed veri tabanından, disferlin ve neden olduğu allelik kas distrofisi hastalıklarına dair geniş biyomedikal literatüre ulaşılmıştır. BTQ+ ile özetlerin kümelendirilmesi yapılmıştır. Bu kümelendirme sayesinde, disferlin mutasyonunda görülen farklı klinik fenotipleri açıklayabilecek nedenlere, doküman benzerliklerinden ulaşıp ulaşamayacağı araştırılmıştır. Bilgi getirimi aşamasında elde edilen disferlinopatiyle ilişkili metinlerdeki önemli biyomedikal terimler incelenerek, disferlinopati patogenezinde rol oynayan proteinler, biyolojik süreçler ve hücrel yolaklar ortaya konulmuştur.

Önemli terimlerin incelenmesinden sonra, disferlinle ilişkili metinlerden gen ve protein isimleri elde edilmiştir. Bu proteinler, STRING platformuna aktarılarak disferlinle ilişkili protein - protein etkileşim ağı oluşturulmuştur. STRING, deneysel verileri ve metin madenciliği yaklaşımını birleştirerek, protein - protein etkileşim ağı oluşturan bir programdır. STRING aracı, bir veya birden fazla protein girdisiyle çalışabilmektedir. Proteinler arasında bilinen veya tahmin edilen etkileşimleri ağ şeklinde sunmaktadır. Bu etkileşimler, doğrudan fiziksel etkileşimler olabileceği gibi, işlevsel ilişkiler de olabilir(158). STRING'le oluşturan protein - protein etkileşim ağıyla, disferlinin moleküler işlevlerini gerçekleştirmek için hangi proteinlerle beraber çalıştığı belirlenmesi ve ağın organizasyonun incelenmesiyle anahtar proteinlerin çalışılması amaçlanmıştır.

BTQ+, TF-IDF kelime ağırlıklandırma basamağıyla seçilen önemli terimler arasından protein listesine ulaşmaktadır. Bu nedenle çalışma sırasında görülmüştür ki, BTQ+ disferlinopatiyle ilişkili kısıtlı sayıda proteine ulaşmaktadır. İşlevsel zenginleştirme aşamasında, daha geniş protein

listelerinin kullanılması çalışmanın gücünü arttırıp, daha özgül terimlere ulaşılmasını sağlamaktadır. Bu nedenle, disferlinopati için önemli olabilecek hücresel yollar, işlevler ve biyolojik süreçlere ulaşabilmek için, disferlinopatiyle ilişkili literatürde geçen tüm proteinlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla, BTQ+'da ulaşılan makale özetleri PubMed üzerinden indirilmiş, OnTheFly metin madenciliği aracıyla incelenmiştir. OnTheFly metin madenciliği aracı, BTQ+ gibi metni işleyebilir, adlandırılmış biyolojik kavramları tanıyabilir, STRING veri tabanına bağlanarak protein - protein etkileşim ağı oluşturabilir ve BioCompendium'a bağlanarak işlevsel zenginleştirme analizini kolaylaştırabilir. Fakat OnTheFly, BTQ+'ya göre, disferlinopati ile ilişkili daha geniş bir protein listesine ulaşabildiği için işlevsel zenginleştirme aşamasında OnTheFly'dan elde edilen proteinler kullanılmıştır.

Disferlinopati ile ilişkili proteinlerin rol aldığı yolları keşfedebilmek için işlevsel zenginleştirme analizi yapılmıştır. OnTheFly metin madenciliği aracıyla ulaşılan proteinler, işlevsel zenginleştirme analizi için İşlevsel Annotasyon, Görselleştirme ve Entegre Keşif Veri Tabanı - *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) aracı ile incelenmiştir. DAVID, *Gene Ontology* ve KEGG gibi veri tabanlarına ulaşarak, geniş gen listelerinin biyolojik anlamını keşfetmeyi amaçlar (159, 160). *Gene Ontology* (GO) 1998'de, gen ürünlerinin tanımlarını veri tabanları arasında tutarlı hale getirebilmek için başlatılmış bir projedir. Bu proje kapsamında, gen ürünlerinin işlevini tanımlayabilmek için moleküler işlev, biyolojik süreç ve hücresel kompartman bilgilerini sistematik bir şekilde tarif eden üç adet ontoloji oluşturulmuştur. Gen işlevinin hücre içinde gerçekleştiği yer için hücresel kompartman, genin aktivitesi için moleküler işlev ve genin aktif olduğu hücresel süreci belirtmek için biyolojik süreç bölümleri tanımlanmıştır (161). KEGG veri tabanı ise, küratörler tarafından çizilen, bilinen moleküler etkileşim ağlarını temsil eden hücre yollarını depolar (162, 163). İşlevsel zenginleştirme basamağı sayesinde, disferlinopatiyle ilişkili literatürden elde edilen proteinlerin temsil ettiği yolak ve işlevler belirlenmiştir. Böylece, literatürde doğrudan disferlinopatiyle ilişkilendirilmemiş yolların, protein

işlevsel zenginleştirme analizinden çıkarımla disferlinopatiyle olası ilişkisi incelenmiştir.

3.2. Ağırlıklandırılmış Gen Birlikte İfade Edilme Ağı Analizi (WGCNA)

Metin madenciliği sonuçlarını, deneysel veriyle birleştirmek için kas dokusuna özgü genlerin birlikte ifade edilme ağı oluşturulması ve disferlinopatiyle ilişkili hücre yolaklarının bulunması planlanmıştır.

3.2.1. Mikrodizin Verisinin Ön İşlenmesi

Gen Ekspresyon Omnibus (GEO) veri tabanı, disferlinopati hastalarına dair mikrodizin verisi bulmak için araştırılmıştır (164). 13 farklı kas hastalığının gen ifade profil verisini saklayan GSE3307 serisi seçilmiş ve bu seriye ait Affymetrix İnsan Genomu U133A dizini ham verileri indirilmiştir (165). Veri, R ortamına geçirilip, BioConductor “affy” paketi kullanılarak işlenmiştir. “expresso” fonksiyonu kullanılarak, MAS5 metoduyla, veri ön işleme yapılmıştır. Sonrasında, Miller ve Horvath’ın çalışmasındaki mikrodizin ön işleme basamakları takip edilmiştir (155). R ortamında, mikrodizin örnekleri arasında gen ifadelerinin birbirleri ile olan korelasyonu incelenerek, standard sapmanın iki katı altında kalan aykırı örnekler çıkarılmıştır. Ardından veri kuantil normalizasyonla normalize edilmiş ve problemler filtrelenmiştir. Filtreleme sonrası kalan 8388 gen, birlikte ifade edilme ağı analizi aşamalarında kullanılmıştır.

3.2.2. Genlerin Birlikte İfade Edilme Ağı Oluşturulması ve Modül Tanımlanması

GSE3307 mikrodizin serisinden, disferlinopati ve sağlıklı bireyler seçilmiştir. İşaretli genlerin birlikte ifade edilme ağı (*signed co-expression network*) oluşturabilmek için WGCNA yazılımının “blockwiseModules” fonksiyonu kullanılmıştır (14, 154). Gen çiftleri arasındaki korelasyonu hesaplamak için, aykırı değerlere dirençli bir ölçü olan *biweight midcorrelation* kullanılmıştır (166). Böylece, genlerin birbirleriyle korelasyonlarını belirten birlikte ifade edilme benzerlik matrisi oluşturulmuştur.

WGCNA metodunda, birlikte ifade edilme ağı, genler arasındaki bağlantı kuvvetini gösteren komşuluk matrisi tarafından temsil edilir. Ağırlıklandırılmamış birlikte ifade edilme ağlarında, eşik değeri belirlenir ve korelasyon değeri bu eşik değerin üstünde olan gen çiftlerinin birlikte ifade edildiği kabul edilir. Komşuluk matrisinde, eşik değeri aşan gen çiftleri 1(bir)'le belirtilirken, eşik değerin altında kalan çiftler 0(sıfır) olarak belirtilir. Bu yöntemde, birlikte ifade edilme bilgisi sadece 0 ve 1 gibi aralıklı değerler olabilir. Bu durumda, korelasyon değerleri birbirine çok yakın olsa bile eşik değerin biraz altında ve üstünde kalan gen çiftlerinden biri birlikte ifade ediliyor olarak kabul edilirken, diğeri birlikte ifade edilmiyor olarak kabul edilir. Ancak, WGCNA metodunda ise komşuluk matrisi 0 ve 1 arasında herhangi bir değeri olabilir. Böylece, genlerin birlikte ifade edilme bilgisi ağırlıklandırılmamış ağlara göre daha iyi korunmuş olur. WGCNA metodunda komşuluk matrisi, birlikte ifade edilme benzerlik matrisinin üssü değeri alınmasıyla belirlenir. Bu yöntem sayesinde güçlü korelasyon gösteren genler daha da belirginleşirken, zayıf korelasyon gösteren genlerin önemi karşılaştırmalı olarak azalmaktadır. WGCNA'nın, ağırlıklandırma yöntemi, birlikte ifade edilme bilgisinin daha verimli kullanılmasını sağlamaktadır. Bu aşamada kullanılacak üssü değeri bulmak için, genlerin oluşturduğu ağın serbest ölçekli ağ olduğu kuvvetleri seçmek gerektiği öne sürülmüştür (154). Önceden yapılan çalışmalarda, protein - protein etkileşim ağı, genlerin birlikte ifade edilme ağı gibi biyolojik ağların yapısının rastlantısal ağ değil de serbest ölçekli ağ yapısında olduğu görülmüştür. Serbest ölçekli ağlarda, düğümlerin bağlantı dağılımı, güç kanununu izler. Kısacası, serbest ölçekli ağlarda, az sayıda düğüm çok sayıda bağlantı içerip, ağın merkez düğümlerini oluştururlar (167). Bu merkez düğümler, ağın önemli elemanlarını temsil ederler. Korelasyon matrisinin daha yüksek üssü değerleri alındığında ağ, serbest ölçekli ağa daha çok yaklaşmaktadır, fakat bu durumda düğümlerin ortalama bağlantısallık değeri düşmektedir. Bu yüzden, hem serbest ölçekli ağ kriterinin sağlandığı, hem de ortalama düğüm bağlantısallığının yüksek kaldığı değer olarak, 13 seçilmiştir. Birlikte ifade edilme benzerlik matrisinin onüçüncü kuvveti alınarak, komşuluk matrisi oluşturulmuştur. Komşuluk matrisinin oluşumundan

sonraki basamak, ağdaki modüllerin belirlenmesidir. Modüller, birbirleriyle yoğun olarak bağlantılı gen kümeleridir. Modüller, gerçek biyolojik sinyali gösterebilecekleri gibi gürültüyü de temsil edebilirler (14). Bu nedenle, modüllerin biyolojik olarak anlamlılığını çalışabilmek için, dış veri tabanları kullanılarak işlevsel zenginleştirme analizi yapılabilir.

Genlerin birlikte ifade edilme ağı oluşturulduktan sonra, modüllerin belirlenmesi için en küçük modül büyüklüğü ve *deep split* gibi parametreler değiştirilerek farklı ağlar oluşturulmuştur. *Deep split* parametresi, modüllerin büyüklüğünü belirleyen ana parametredir. Bu parametre, 0 ile 4 arasında değerler alabilir. 0 (sıfır) az sayıda ve büyük modüller oluşmasını sağlarken, 4 fazla sayıda fakat küçük modüllerin oluşturulmasını sağlar. Bu çalışmada, *deepsplit* parametresi 0 ile 4 arasında değiştirilerek, farklı modüller tanımlanmıştır. Küçük ve daha çok sayıda modüller oluşturulduğunda, modüller daha özgül olabilir ya da gürültüyü yansıtabilir. Bu yüzden, modüllerin biyolojik anlamlılığının ve stabilitesinin çalışılması gerekir. Genlerin birlikte ifade edilme ağında, parametreler fazla sayıda fakat küçük modüller oluşturulması için ayarlandığında, modüllerin biyolojik anlamlılığını yitirdiği ve gürültüyü temsil ettiği görülmüştür. Modüllerin stabilitesini belirlemek için yeniden örnekleme çalışmaları yapıldığında küçük modüllerin istikrarlı olmadığı saptanmıştır. Ayrıca küçük modüllerin DAVID aracıyla yapılan işlevsel zenginleştirme çalışmalarında istatistiksel olarak anlamlı biyolojik süreçlere ulaşamamıştır. Bu nedenle, modüllerin daha büyük ve istikrarlı olduğu parametreler seçilmesine karar verilmiştir. Büyük, birbirinden farklı ve dirençli modüller oluşturabilmek için, minimum modül büyüklüğü 30 ve *deepsplit* parametresi 0 (sıfır) olarak ayarlanmıştır.

Birlikte ifade edilme modüllerinin varlığını doğrulamak için, bağımsız bir gen ifade setinde korunduğunu göstermek gerekir. Bu nedenle modüllerin korunmuş ve tekrar oluşturulabilir olduğunu göstermek için, modül korunmuşluk istatistikleri hesaplanmıştır. Bunun için, WGCNA paketinde "modulePreservation" fonksiyonu kullanılmıştır (168). Bu yöntem, ağ temelli istatistik yöntemlerini kullanarak, bağımsız bir mikrodizin setinde modüllerin korunup korunmadığını belirler. Bu çalışmada, test veri seti olarak, aynı seriden

farklı kas hastalıklarından oluşan (mutant kalpain 3, mutant FKRP ve Becker kas distrofisi) hastalarının mikrodizin verileri kullanılmıştır.

3.2.3. Disferlinopatiyle İlişkili Modüllerin Belirlenmesi

Genlerin birlikte ifade edilme ağı oluşturulup modüller tanımlandıktan sonra, bu modüller arasında disferlinopati için önemli olan modüller belirlenmiştir. Bunun için öncelikle her modülün özdeğeri (*eigengen*) hesaplanmıştır. Modül özdeğerleri, modülleri en iyi temsil eden ifade profilleri olarak da düşünülebilir. Modül özdeğerlerine dayanarak, kontrol bireyler ve disferlinopati hastaları arasında farklı olan modüller seçilmiştir. t-testi kullanılarak disferlinopati için önemli modüller bulunmuştur. P değeri, Bonferroni yöntemiyle çoklu hipotez sorgulama yönünden düzeltilmiştir (düzeltilmiş $p < 0.05$, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir).

Disferlinopati için önemli biyolojik yolları temsil eden bu modüllerin anahtar genlerini seçebilmek için hesaplamalar yapılmıştır. Her gen için, modül özdeğerini temel alan bağlantısallık (kME) değeri hesaplanmıştır (169, 170). Ağ temelli yaklaşımlarda, yüksek sayıda bağlantı içeren merkez genlerin, organizma için önemli genler olduğu gösterilmiştir (171). WGCNA metoduyla belirlenen hastalıklarla ilişkilendirilmiş modüllerdeki merkezi genlerin klinik olarak önemli oldukları gösterilmiştir. Örneğin, glioblastoma multiforme çalışmasında, hücre proliferasyonunu temsil eden gen modülünün merkezi genlerinden birinin tedavide moleküler hedef olabileceği gösterilmiştir (172). Bu yüzden, klinik değeri yüksek olacak merkezi genlerin saptanması için, disferlinopatiyle ilişkili modüllerde kME değeri yüksek (merkez genler) genler belirlenmiştir.

Modüllerin biyolojik anlamlarını keşfedebilmek için işlevsel zenginleştirme analizi yapılmıştır. Disferlinopatiyle ilişkili bulunan modüller için, o modüle ait kME değeri 0.7'den yüksek olan genlerin listesi elde edilmiştir. Bu gen listelerinin, DAVID aracı kullanılarak işlevsel anotasyonu yapılmıştır. DAVID aracında, arka plan gen listesi olarak Affymetrix İnsan Genomu U133A dizinindeki tüm genler kullanılmıştır.

Disferlinopatiye özel, diğer kas distrofilerinden farklı özelliklerin araştırılması için disferlinopati ve mutant kalpain 3 (LGMD2A) hasta mikrodizinlerine WGCNA metodu uygulanmıştır. Disferlin mutasyonu limb-girdle tipi kas distrofisine (LGMD) neden olduğu için, fenotipik olarak benzer tipte olan LGMD2A kas distrofisiyle karşılaştırılmıştır. Kalpain-3'ün hücre zarı tamirinde görev alan disferlin protein kompleksini proteolitik olarak kestiği gösterilmiştir (173). Bu nedenle, disferline özgü özelliklerin bulunabilmesi için, disferlin mutasyonunda olduğu gibi LGMD fenotipine neden olan ve hücre zarı tamirinde rol alan disferlin protein kompleksiyle ilişkili kalpain 3 geninin mutasyonu ile oluşan kas distrofisi seçilmiştir. Disferlinopati ve LGMD2A hastalarının mikrodizin verileri birleştirilip, disferlinopati ve kontrol bireyler için yapılan analiz tekrarlanmıştır. LGMD2A ve disferlinopati mikrodizinleri beraber kullanılarak, işaretli ağırlıklandırılmış genlerin birlikte ifade edilme ağı oluşturulmuştur. Gen korelasyonları için *biweight midcorrelation* ölçüsü kullanılmış, serbest ölçekli ağ kriterine uygun olarak üssü değer 10 olarak belirlenmiştir. Modüller, disferlinopati ve sağlıklı bireylerin oluşturduğu ağda olduğu gibi büyük ve stabil olacak şekilde tanımlanmıştır. Modül özdeğerlerine dayanarak, t-testi ile, disferlinopati ve LGMD2A kas distrofisi hastaları arasında istatistiksel olarak farklılık gösteren modüller taranmıştır.

3.3. Genlerin Geniş Kapsamlı Birlikte İfade Edilme Veri Tabanları

WGCNA ile elde edilen kasa spesifik genlerin birlikte ifade edilme verilerini doğrulamak ve desteklemek için geniş kapsamlı birlikte ifade edilme veri tabanlarının kullanılmasına karar verilmiştir. Hastalık veya doku ayırmaksızın genlerin birlikte ifade edilme bilgilerini depolayan veri tabanlarından COXPRESdb kullanılmıştır (174-176). COXPRESdb, 11 farklı türün mikrodizin ve RNA dizileme verilerini birleştirerek birlikte ifade edilme analizi yapmaktadır. Birden fazla tür ve mikrodizin platformundan veri topladığı için, oluşturulan birlikte ifade edilen gen listesinin güvenilirliğini ölçebilmektedir. Birden çok türde korunmuş, birlikte ifade edilen gen çiftlerinin işlevsel olarak birbirleriyle ilişkili olma ihtimalleri daha yüksektir(177). COXPRESdb veri tabanı desteklenebilirlik (güvenilirlik) değerini, farklı

platformlar ve mümkünse farklı türlerden elde edilen birlikte ifade edilme listelerinin birbirlerine benzerliklerini karşılaştırarak belirlemektedir. Böylece, diğer türlerde de korunmuş ve benzer işlev görme ihtimali yüksek gen çiftlerini tespit edebilmektedir.

WGCNA ile elde edilen kasa özgü birlikte ifade edilme ağında, disferlinopatiyle ilişkili bulunan gen modüllerinden birinin merkezi geninin, işlevi tam olarak bilinmeyen yeni tanımlanmış kas distrofisi genlerinden, *TOR1AIP1* (*torsin A interacting protein 1*) olduğu gözlenmiştir. Bunun üzerine, birlikte ifade edilme analizinin gen işlevini tahmin edebilme özelliğine dayanarak, *TOR1AIP1*'in işlevinin araştırılmasına karar verilmiştir. *TOR1AIP1*'in işlevsel olarak ilişkili olduğu genleri bulabilmek için, COXPRESdb veri tabanından *TOR1AIP1* ile birlikte ifade edildiği yüksek derecede desteklenebilir ilk 500 gen seçilmiştir. Bu geniş gen listesinin biyolojik anlamlılığını sorgulamak ve temsil ettiği yolak ve işlevleri belirlemek için, DAVID aracı ile işlevsel zenginleştirme analizi yapılmıştır. Böylece, *TOR1AIP1*'in kasa özgü ve koşuldan bağımsız durumlarda beraber ifade edildiği genlerin rol aldığı hücre yolakları karşılaştırılmıştır.

Ayrıca genlerin global birlikte ifade edilme verisinden elde edilen gen listesi, WGCNA ile elde edilen kasa özgü *TOR1AIP1*'in birlikte ifade edilme modülünün merkez genleri ile karşılaştırılmıştır. Böylece kas dokusundan elde edilen *TOR1AIP1* ile birlikte ifade edilen genlerden; genel birlikte ifade edilme verisi sayesinde belirlenen *TOR1AIP1* ile birlikte ifade edildiği yüksek derecede desteklenebilir genler seçilmiştir. Bu yöntemle, *TOR1AIP1* ile işlevsel olarak ilişkili olabilecek kasa özgü genler bulunmuştur.

3.4. Protein Dizi Analizi

TOR1AIP1'in kodladığı LAP1 proteininin işlev tahminini yapabilmek için protein dizi analizi yapılması planlanmıştır. LAP1 proteininin perinükleer kısmının üç boyutlu yapısı belirlenmiştir, fakat çekirdek içindeki kısmının üç boyutlu yapısı henüz çalışılmamıştır (178). Bu yüzden protein yapısına dayanarak, protein - protein etkileşimi tahmin eden programlar LAP1'in çekirdek içindeki bölgesi için uygun değildir.

PSIPred birden çok biyoenformatik aracı birleştiren protein dizi analizi programıdır. PSIPred protein dizisini çalışarak, proteindeki olası yapısal bölgeleri, düzensiz olduğu tahmin edilen dizileri ve protein işlevini tahmin edebilmektedir (179). PSIPred ara yüzü kullanılarak, LAP1 proteinin sekonder yapısı, düzensiz kısmı ve işlevi tahmin edilmiştir. Protein işlevini tahmin etmek için, PSIPred ara yüzü üzerinden FFPred aracı kullanılmıştır. FFPred, homolojiden bağımsız olarak protein dizi özellikleri temelli protein işlev tahmini yapan bir araçtır. Proteinin amino asit birleşimi, düzensiz bölgelerin uzunluğu ve konumu, transmembran bölümü, sekonder yapısı, sinyal peptidleri, hücre içi konumu, translasyon sonrası modifikasyon bölgeleri gibi bilgileri birleştirir. Gene Ontology servisi veri tabanından yararlanarak, makine öğrenim tekniğiyle protein dizi özelliklerine göre işlev tahmini yapar. Genelde protein dizisinden işlev tahmin eden araçlar, proteinlerin homologlarını tespit edip onların bilinen işlevlerinden çıkarım yaparlar. Fakat FFPred, özellikle homoloğu olmayan ya da homologlarının işlevleri iyi bilinmeyen proteinlerin analizi için avantaj sağlamaktadır. FFPred, girdi olarak verilen protein dizisini analiz ederek, Gene Ontology terimleri üzerinden protein işlevini tahmin etmektedir (180). LAP1 proteini ve homologlarının işlevleri detaylı olarak bilinmediği için, homolojiden bağımsız olarak analiz yapan FFPred aracı, LAP1 proteinin işlev tahmini için avantajlıdır.

4. BULGULAR

4.1. Metin Madenciliği Sonuçları

Disferlin proteini ve mutant disferlin proteininin neden olduğu disferlinopatilere ait literatürün taranması için, BioTextQuest+ programı seçilmiştir. Bu programda yapılan arama sonucunda, Eylül 2014 itibariyle PubMed üzerinden, disferlin ve neden olduğu kas distrofisi hastalıklarına dair 546 özete ulaşılmıştır. Özetlerin benzerlik ve kümelendirme çalışması sonrasında tek küme oluşturduğu görülmüştür. Bu kümenin önemli terimleri tabloda özetlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Disferlinle ilişkili BioTextQuest+ aracı ile yapılan metin madenciliği analizi sonucu elde edilen önemli terimler.

Disferlin	Miyogenez	Sarkoglikan
Disferlinopati	Birleştirilme ("Resealing")	Distroglikan
Pelvik-omuz kuşağı	Hücre iskeleti	Kollajen
LGMD 2B	Ubikitin	Desmin
Miyoshi miyopati	Proteazom	Emerin
Distrofi	Proteoliz	Laminin
Atrofi	Monosit	Merosin
Dejenerasyon	Makrofaj	MG53
Rejenerasyon	İnfiltrat	Teletonin
Transmembran	Kalsiyum - bağımlı	Titin
Sarkolemma	Kalpain 3	T-tübül
Sitoplazma	Kaveolin 3	Fibroblast
Vezikül	Anoktamin 5	Miyoblast
Endositoz	AHNAK	Sarkomer
Ekzositoz	Anneksin	Sinyalleşme

BioTextQuest+ tarafından disferlin araması sonrası elde edilen protein listesi, BioCompendium platformuna aktarılarak daha detaylı şekilde incelenmiştir. Elde edilen protein listesinden, protein – protein etkileşim ağını oluşturmak için STRING programı kullanılmıştır. STRING aracıyla oluşturulan protein – protein ağı incelendiğinde, ilk başta kas distrofileriyle ilişkili diğer proteinler görülmektedir. Bunlara ek olarak, ağda ubikitin etrafında oluşmuş bir protein merkezi daha belirmiştir (Şekil 4.1.). Disferlinle doğrudan bağlantılı görünen proteinler arasında, kaveolin-3, distroglikan, γ -sarkoglikan, δ -sarkoglikan, FKRP, titin, anoktamin 5, miyotilin ve emerlin gibi müsküler distrofilere neden olan proteinler bulunmaktadır. Disferlinle doğrudan bağlantılı görünen proteinlerden AHNAK (AHNAK nükleoprotein) ise henüz herhangi bir kas distrofisiyle ilişkilendirilmemesine rağmen, disferlinle fiziksel etkileşime girdiği bilinen ve hücre zarı tamir mekanizmasında rol aldığı tahmin edilen bir proteindir. Kas distrofileri çevresinde oluşan protein topluluğu, AHNAK, kaveolin ve emerlin üzerinden ubikitin çevresinde oluşan merkezle birleşmektedir.

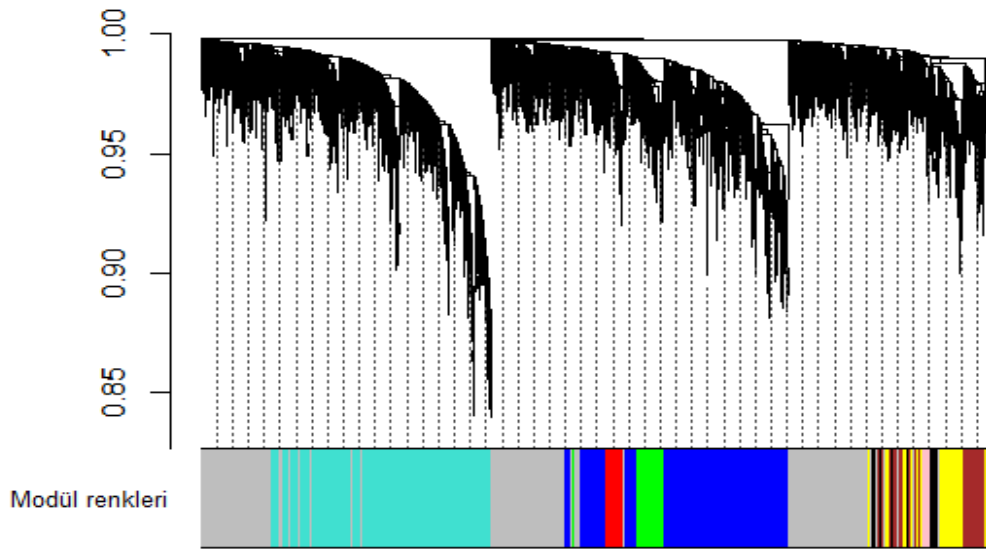
Disferlinopatiyle ilişkili gen listesinin biyolojik anlamını keşfedebilmek için DAVID aracıyla işlevsel zenginleştirme analizi yapılmıştır. BioTextQuest+ aracıyla ulaşılan 29 proteinle yapılan analizde, “kalmoduline bağlanma”, “hücre iskelet proteinlerine bağlanma”, “motor aktivite”, “kasın yapısal bileşenleri” ve “SNARE bağlanma” terimleri istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. Elde edilen bu liste, disferlinle ilişkili proteinlerin kas hücrelerinin motor aktivitesinde ve kalsiyuma bağımlı hücre mekanizmalarında rol aldığını, hücrenin yapısal ve iskelet proteinleriyle ve veziküllerle ilişkili olduğunu belirtmektedir. Bu analiz, metin madenciliği ve işlevsel zenginleştirme sayesinde, disferlinle ilgili temel bilinenlere ulaşılmasını sağlamıştır. Fakat, disferlin hakkında yeni hipotezler oluşturulabilmesi ve daha detaylı bilgiye ulaşılması için, disferlinle ilişkili tüm gen ürünlerinin işlevsel zenginleştirilmesinin yapılması gerekmektedir. BioTextQuest+ programının verdiği protein listesi incelendiğinde, programın tüm özetlere ulaşmasına rağmen disferlinin etkileşime girdiği tüm proteinleri listelemediği görülmüştür. Örnek olarak, program *MG53 (TRIM72)*'yi biyomedikal terim olarak tanımasına rağmen, bunu gen olarak

Tablo 4.2. OnTheFly metin madenciliği aracıyla elde edilen disferlin ilişkili protein listesinin DAVID aracı (159) ile işlevsel zenginleştirilmesi. "GO" ile başlayan terimler Gene Ontology terimlerini, "hsa" ile başlayan terimler KEGG yollarını temsil etmektedir. P değerleri Benjamini Hochberg (181) yöntemiyle düzeltilmiştir.

Anotasyon Terimi	<i>p</i> değeri
GO:0006954~enflamatuar cevap	1.7E-9
GO:0030017~sarkomer	8.6E-12
GO:0006936~kas kasılması	7.6E-10
GO:0060537~kas doku gelişimi	1.2E-10
GO:0005886~plazma zarı	6.9E-9
GO:0015629~aktin hücre iskeleti	4.2E-11
GO:0042981~apoptoz kontrolü	6.8E-10
GO:0030334~hücre göçü kontrolü	4.6E-7
GO:0002684~immün sistem pozitif kontrolü	3.1E-8
GO:0031988~zarla çevrili vezikül	9.2E-7
hsa04620:Toll-like reseptör sinyal yolağı	6.8E-6
GO:0051259~protein oligomerizasyonu	3.9E-5
GO:0008219~hücre ölümü	7.9E-7
GO:0016044~zar organizasyonu	6.0E-6
GO:0009967~sinyal iletiminin pozitif kontrolü	1.5E-6
GO:0001568~damar gelişimi	2.4E-4
GO:0000165~MAPKKK kaskadı	1.3E-2
GO:0010564~hücre siklusu kontrolü	3.3E-3
GO:0005516~kalmoduline bağlanma	1.6E-5
GO:0007155~hücre adhezyonu	9.4E-4
GO:0051341~oksidoredüktaz aktivitenin kontrolü	4.8E-8

4.2. Ağırlıklandırılmış Gen Birlikte İfade Edilme Ağı Analizi Sonuçları

Metin madenciliğiyle elde edilen sonuçların doğrulanması ve yeni hipotezler oluşturulabilmesi için disferlinopatiye dair genel kullanıma açık mikrodizin deneysel verisi genlerin birlikte ifade edilme analizi için kullanılmıştır. Disferlinopati hastaları ve sağlıklı bireylerin mikrodizin verileri kullanılarak, serbest ölçek ağı kriterine uygun olarak ağ oluşturulmuştur. Modüllerin stabil olduğu (167)parametreler belirlendiğinde, genlerin birlikte ifade edilme ağında toplam sekiz modüle ulaşılmıştır. Modülleri gösteren gen kümelenme dendrogramı Şekil 4.2’de görülmektedir.



Şekil 4.2. Disferlinopati ve kontrol birey örneklerinden oluşturulmuş birlikte ifade edilme modülleri. Sekiz farklı gen modülüne ulaşılmıştır. Gri renkle belirtilen genler hiçbir modüle atanamayan genlerdir.

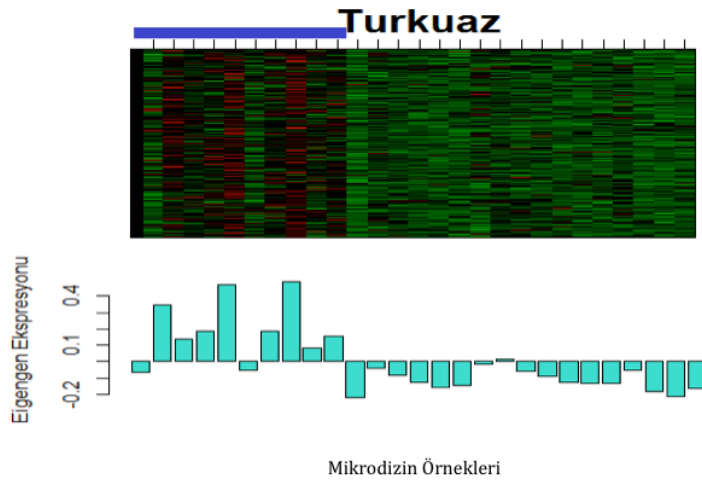
Gen modüllerinin geçerliliğini test edebilmek için, farklı bir mikrodizin setinde modüllerin korunmuşluğu çalışılmıştır. Bu yöntem, test edilecek ağda modül tanımı yapılmadan, referans ağ (disferlinopati-kontrol birlikte ifade edilme ağ) modüllerinin ağ temelli istatistiklerinin (bağlantısallık, yoğunluk gibi) test setinde korunup korunmadığını incelemektedir. Bu yöntemde, yorumu kolaylaştırabilmek için ağ temelli istatistikler, $Z_{\text{özet}}$ istatistik değeri altında

birleştirilmiştir. $Z_{\text{özet}} > 10$ ise yüksek derecede korunmuş, $2 < Z_{\text{özet}} < 10$ ise orta derecede korunmuş ve $Z_{\text{özet}} < 2$ ise modüllerin korunmamış olduğunu göstermektedir (168). Modül korunmuşluk değerlerinden anlaşıldığı gibi pembe hariç tüm modüller yüksek derecede korunmuş, pembe modül ise orta derecede korunmuştur (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Modül Korunmuşluğu.

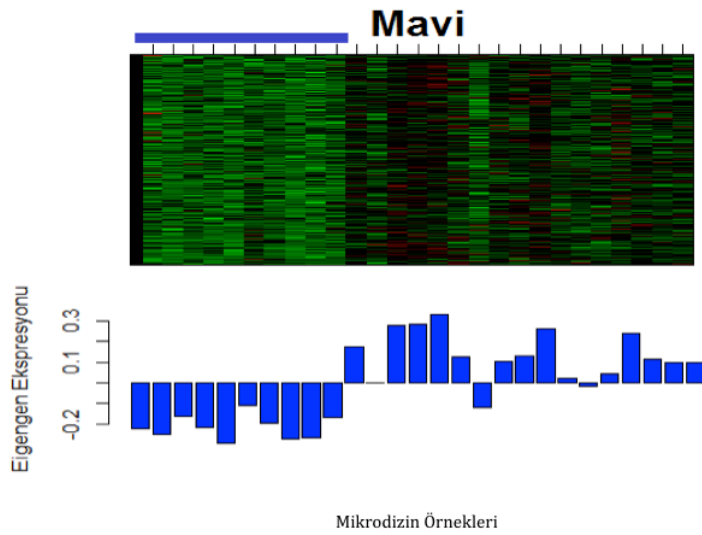
Modül	$Z_{\text{özet}}$
Turkuaz	25.08
Kırmızı	24.52
Sarı	22.34
Mavi	18.42
Yeşil	16.23
Kahverengi	14.99
Siyah	12.20
Pembe	4.96

Disferlinopati için önemli modülleri bulabilmek için, modülleri temsil eden modül özdeğerleri hesaplanmıştır. Modül özdeğerleri kontrol bireyler ve disferlinopati hastaları arasında istatistiksel olarak farklı olan modüller seçilmiştir (Bonferroni metoduyla çoklu hipotez testi düzeltmesi sonrası $p < 0.05$). Bu modüller, turkuaz, mavi ve siyah modüllerdir. Turkuaz, mavi ve siyah modüllere ait genlerin ifade haritaları ve modül özdeğerlerinin grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Bu grafikler incelendiğinde, özellikle turkuaz ve mavi modülde daha belirgin olmak üzere, disferlinopati ve kontrol bireyleri arasında modül özdeğerlerinin farklı olduğu gözlenmektedir.



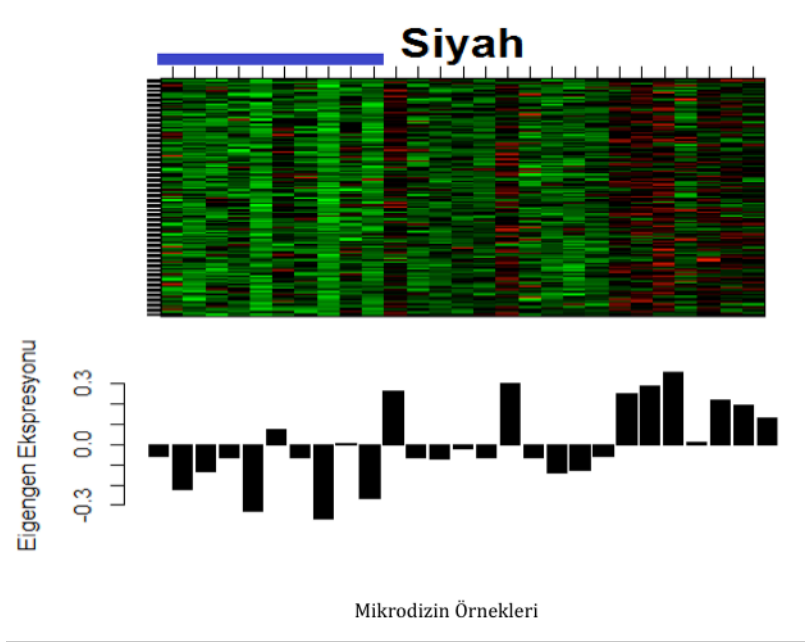
Şekil 4.3 Turkuaz modül genlerinin ifade haritası ve modül özdeğerleri grafiği.

Üst bölümde görünen ifade haritasında satırlar turkuaz modül genlerini, sütunlar ise mikrodizin örneklerini göstermektedir. Alt bölümde, aynı mikrodizin örneklerine denk gelen modül özdeğerleri çizilmiştir. En üstte mavi çubukla işaretlenen örnekler, disferlinopati hastalarını göstermektedir.



Şekil 4.4 Mavi modül genlerinin ifade haritası ve modül özdeğerleri grafiği. Üst

bölümde görünen ifade haritasında satırlar mavi modül genlerini, sütunlar ise mikrodizin örneklerini göstermektedir. Alt bölümde, aynı mikrodizin örneklerine denk gelen modül özdeğerleri çizilmiştir. En üstte mavi çubukla işaretlenen örnekler, disferlinopati hastalarını göstermektedir.



Şekil 4.5 Siyah modül genlerinin ifade haritası ve modül özdeğerleri grafiği. Üst bölümde görünen ifade haritasında satırlar siyah modül genlerini, sütunlar ise mikrodizin örneklerini göstermektedir. Alt bölümde, aynı mikrodizin örneklerine denk gelen modül özdeğerleri çizilmiştir. En üstte mavi çubukla işaretlenen örnekler, disferlinopati hastalarını göstermektedir.

Bu modüllerin biyolojik anlamlarını keşfetmek için DAVID aracıyla işlevsel zenginleştirme çalışması yapılmıştır. Turkuaz ve mavi modülün temsil ettiği temel biyolojik süreçler ve hücre yolları, sırasıyla Tablo 4.4 ve Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

Turkuaz modül genleri, temel olarak hücre dışı matris elemanları, enflamatuar cevap, vezikül, lizozom, zar organizasyonu, kalsiyuma bağlanma ve hücresel iskelet elemanlarını temsil etmektedir. Turkuaz modülün merkez genleri arasında; kollajen genleri (*COL6A3*, *COL6A2*), tübülün alfa 1b (*TUBA1B*), lizozomal transmembran protein 5 (*LAPTM5*), *EGF* İçeren *Fibulin-Like Extracellular Matrix Protein 1* (*EFEMP1*), and *TIMP* metallopeptidaz inhibitörü 1 (*TIMP1*), *CD44*, nöral hücre adhezyon molekülü 1 (*NCAM1*), ve komplement sistem elemanları (*C1S*, *C1R*, *C3*) bulunmaktadır.

Tablo 4.4. Turkuaz modülün DAVID aracı (159) ile elde edilen işlevsel zenginleştirme sonuçları. "GO" ile başlayan terimler Gene Ontology terimlerini, "hsa" ile başlayan terimler KEGG yolaklarını temsil etmektedir. P değerleri Benjamini Hochberg (181) yöntemiyle düzeltilmiştir.

Anotasyon Terimi	p değeri
GO:0044421~hücre dışı bölge	1.1E-12
GO:0007155~hücre adhezyonu	1.9E-8
GO:0006954~inflamatuvar cevap	3.4E-5
GO:0008092~hücre iskeleti protein bağlanması	7.2E-7
GO:0006928~hücre hareketi	6.5E-7
GO:0060205~sitoplazmik zar çevrili vezikül lümeni	4.9E-6
GO:0005764~lizozom	3.5E-5
hsa04512:Hücre dışı matris-reseptör etkileşimi	3.9E-8
GO:0015629~aktin hücre iskeleti	6.2E-5
GO:0030246~karbonhidrata bağlanma	1.2E-5
hsa04610:Kompleman ve koagülasyon kaskadı	1.8E-4
GO:0005788~endoplazmik retikulum lümeni	6.6E-3
GO:0005509~kalsiyum iyon bağlama	9.3E-9
GO:0016044~zar organizasyonu	7.3E-3
GO:0042060~yara iyileşmesi	1.7E-3
GO:0030832~aktin filament uzunluğu kontrolü	2.6E-2

Mavi modülün genleri, mitokondri genleri ve ubikitin konjugasyonu ile ilgili genleri temsil etmektedir. Mavi modülü temsil eden merkez genlerden bazıları; *ATP synthase, H⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit (ATP50)*, magnezyum transportörü (*MRS2*), *oxidation resistance 1 (OXR1)*, NADH dehidrogenaz (ubikinin) 1 alfa altkompleksi, 5 (*NDUFA5*), ubikitin konjugasyon enzimi E2B (*UBE2B*), torsin A etkileşen protein 1 (*TOR1AIP1*) ve SMAD ailesi üyesi 4 (*SMAD4*)'tür.

Tablo 4.5. Mavi modülün DAVID aracı (159) ile elde edilen işlevsel zenginleştirme sonuçları. "GO" ile başlayan terimler Gene Ontology terimlerini, "hsa" ile başlayan terimler KEGG yollarını temsil etmektedir. P değerleri Benjamini Hochberg (181) yöntemiyle düzeltilmiştir.

Anotasyon Terimi	p değeri
GO:0005739~mitokondri	1.3E-12
GO:0015980~organik bileşiklerin oksidasyonu ile enerji oluşumu	4.8E-12
hsa00020:sitrat siklusu	1.2E-5
GO:0030163~protein katabolik süreci	1.7E-5
GO:0004842~ubikitin-protein ligaz aktivitesi	3.6E-3
hsa05012:Parkinson hastalığı	2.3E-3
hsa05016:Huntington hastalığı	2.5E-3
GO:0022904~elektron transport zinciri	2.9E-2
GO:0005977~glikojen metabolik süreci	1.9E-2
hsa00620:piruvat metabolizması	2.2E-3
GO:0006511~ubikitin bağımlı protein katabolik süreci	9.4E-3

Siyah modül işlevsel zenginleştirme çalışması, bu modülün heksoz metabolik süreci, kalmoduline bağlanan proteinler ve çizgili kas hücresi gelişimine dair genleri birleştirdiğini göstermiştir. Fakat, Benjamini Hochberg metoduyla yapılan p değeri çoklu hipotez testi düzeltilmesinden sonra, terimlerden hiçbiri istatistiksel olarak anlamlı saptanmamıştır. Bu modülün merkez genlerinden biri, kalpain 3 (*CAPN3*) genidir.

Disferlinopati ve LGMD2A hastalarının mikrodizin verilerinin birleştirilmesiyle oluşturulan genlerin birlikte ifade edilme ağındaki modüller incelendiğinde, disferlinopati ve LGMD2A kas distrofisini birbirinden ayıran istatistiksel olarak anlamlı bir modül saptanamamıştır.

4.3. COXPRESdb Sonuçları

Mavi modülün merkezi genlerinden birinin yeni tanımlanmış işlevleri iyi bilinmeyen kas distrofisi genlerinden *TOR1AIP1* olması üzerine, *TOR1AIP1*'in işlev tahmini yapılabilmesi için daha detaylı incelenmesine karar verilmiştir.

Genlerin dokuya özgül olmayan birlikte ifade edilme veri tabanı kullanılarak, *TOR1AIP1* hakkındaki işlevsel çıkarımların desteklenmesi amaçlanmıştır. COXPRESdb veri tabanı kullanılarak, *TOR1AIP1*'in yüksek derecede desteklenebilir ilk 500 birlikte ifade edilme partneri belirlenmiştir. Bu gen listesinin temsil ettiği yolaklar DAVID aracı ile incelenmiştir (Tablo 4.6). Genler, golgi apparatus, vezikül, GTP bağlanması, protein yıkım süreci ve endoplazmik retikulum genleri açısından zenginleşmiş olarak tespit edilmiştir. Mavi modülden elde edilen zenginleştirme analizi sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, mavi modülün önemli komponentlerinden ubiquitin konjugasyonu ve protein yıkımı yolağının dokuya özgül olmayan birlikte ifade edilme verisinde doğrulanmış olduğu görülmüştür. Fakat buna ek olarak, kastaki modülde görünmemesine rağmen, genlerin dokuya özgül olmayan birlikte ifade edilme sonuçlarında endoplazmik retikulum, golgi apparatusu, vezikül, katlanmamış protein yanıtı ve protein transportu genlerinin de çoğunlukta olduğu görülmüştür.

COXPRESdb'den elde edilen gen listesi, mavi modülün merkezi genlerinin oluşturduğu listeye karşılaştırılarak, *TOR1AIP1* ile işlevsel olarak ilişkili olabilecek kasa özgü genler seçilmiştir. Bu genler, *OXR1* (*oxidation resistance 1*), *NXPE3* (*Neurexophilin And PC-Esterase Domain Family, Member 3*), *RPRD1A* (*regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 1A*), *UBL3* (*ubiquitin-like 3*), *FBXL5* (*F-box and leucine-rich repeat protein 5*) ve *SMAD4*'tür.

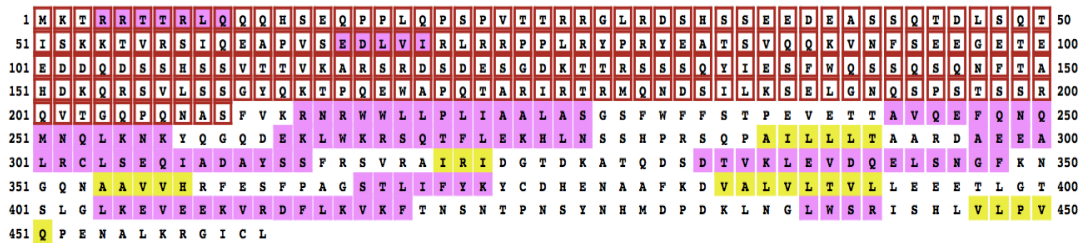
4.4. PSIPred Sonuçları

LAP1 proteinin işlevsel özelliklerini tahmin edebilmek için protein dizi analizi yapılmıştır. PSIPred ara yüzünü kullanarak, LAP1 proteinin sekonder yapısı, düzensiz kısımları ve işlevleri tahmin edilmiştir. LAP1 proteinin çekirdek içinde kalan kısmının büyük bir bölümü (1-211 amino asitleri) düzensiz olarak

tahmin edilmiştir (Şekil 4.6). Bu düzensiz bölüm içinden 4-10 sayılı aminoasit dizisinin ve 66-70 sayılı aminoasit dizisinin sarmal yapısı oluşturabileceği öngörülmüştür. LAP1 proteinin işlevsel tahminleri arasında en yüksek olasılık değerleriyle transkripsiyon regülasyonu (GO:0006355) ve gen ifadesi regülasyonu (GO:0010468) bulunmaktadır.

Tablo 4.6. COXPRESdb'den elde edilen *TOR1AIP1* ile birlikte ifade edilen genlerin DAVID aracı (159) ile elde edilen işlevsel zenginleştirme sonuçları. "GO" ile başlayan terimler Gene Ontology terimlerini temsil etmektedir. P değerleri Benjamini Hochberg (181) yöntemiyle düzeltilmiştir.

Anotasyon Terimi	p değeri
GO:0005794~Golgi apparatus	2.9E-6
GO:0031982~vezikül	2.4E-5
GO:0005525~GTP bağlama	1.6E-6
GO:0044257~hücrel protein katabolik süreci	3.6E-5
GO:0003924~GTPaz aktivitesi	1.3E-6
GO:0042175~çekirdek zarı-endoplazmik retikulum ağı	4.0E-2
GO:0015031~protein transport	9.2E-8
GO:0006986~katlanmamış protein cevabı	0.018



Şekil 4.6. LAP1 protein dizisinin PSIPred analiz platformu (179) sonuçları. Kırmızı kutular, düzensiz aminoasitleri, pembe kutular sarmal yapısını, sarı kutular beta tabakalı protein yapısını göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Son yirmi yılda yüksek çözünürlükte deneysel yöntemlerin biyolojide geniş yer tutması ve bilimsel literatürün üssel olarak artması; verilerin işlenebilmesi ve yorumlanması için işlemsel yaklaşımların gerekliliğini ortaya koymuştur. Bu süreçte, doğası gereği karmaşık olan biyolojik bilginin, moleküler veri tabanlarıyla birleştirilebilmesi için biyolojik ontolojiler oluşturulmuştur. Bu ontolojiler, hem terimlerin anlamlarını hem de terimlerin birbirleriyle ilişkilerini düzen içinde depolamaktadır. Terimlere özgün tanımlayıcılar belirlenmesiyle, veri tabanlarının birleştirilmesi kolaylaştırılmıştır. Doğal dil işleme ve makine öğrenim tekniklerinin biyomedikal alana uygulanmasıyla, biyomedikal literatür madenciliği hızla gelişmiştir. Otomatize literatür analizinden elde edilen bilgilerin, moleküler veri tabanlarıyla bütünleştirilmesi ıslak laboratuvara girmeden, *in silico* yeni hipotezler oluşturulmasını kolaylaştırmıştır. Bu araçların kullanımını kolaylaştırmak ve yaygınlaştırabilmek için, kullanıcı uyumlu ara yüzleri geliştirilmektedir. Bu gelişmeler sayesinde işlemsel biyoloji ayrı bir bilim dalı olmaktan öte günümüz biyolojisinin vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir. Hatta, işlemsel biyolojinin hızla ilerlemesiyle, deneysel ve teorik fiziğe benzer şekilde, “teorik biyoloji”nin geliştiği görülmüştür. Bu süreçte, işlemsel biyolojiyle üretilen model ve tahminlerin deneysel biyolojiyle doğrulanması beklenmektedir (182, 183).

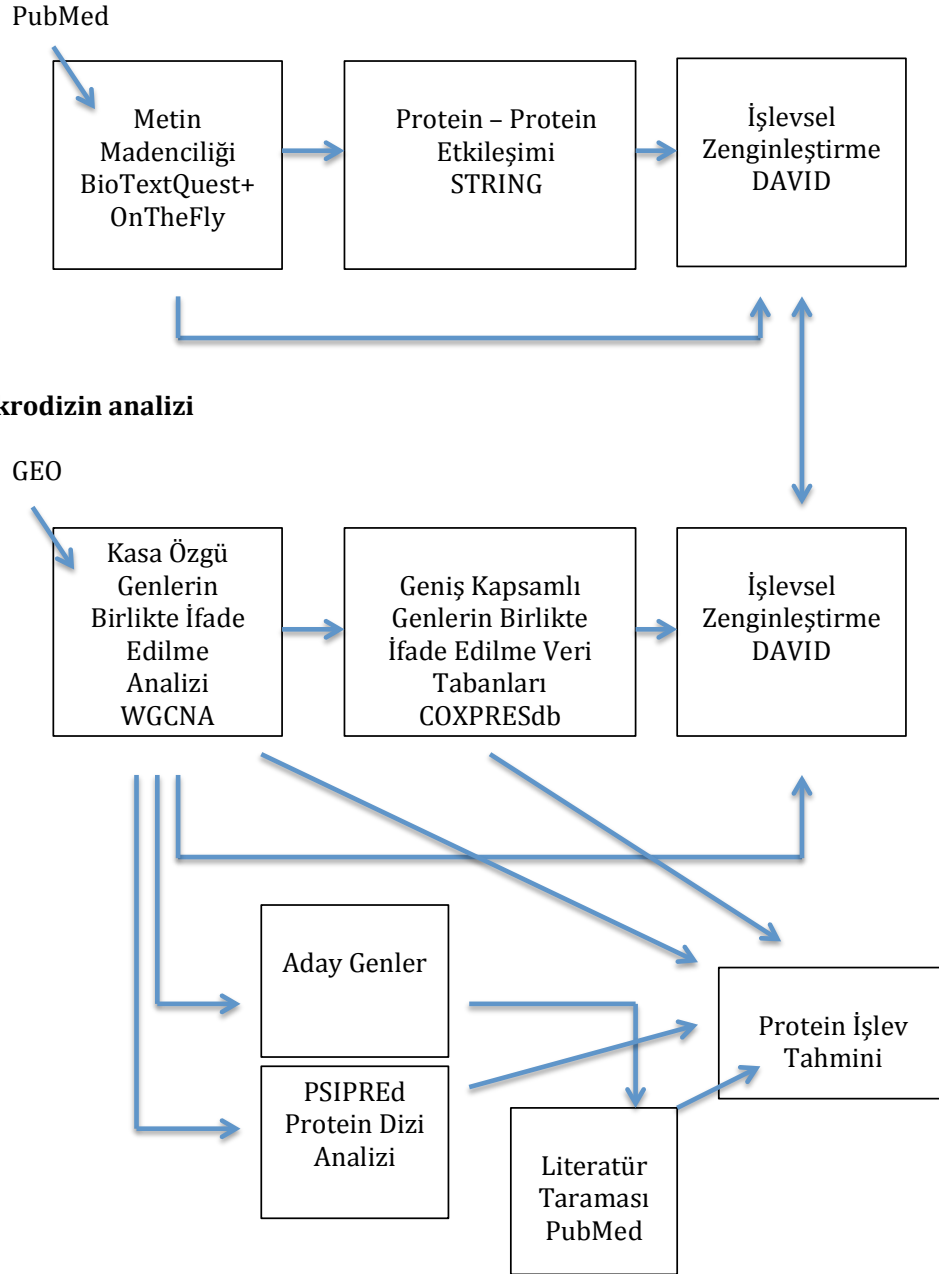
Otozomal resesif aktarılan kas distrofileri, Türkiye gibi akraba evliliklerinin yüksek olduğu (ortalama %21) toplumlarda daha sık görülür (184). Kas distrofileri, heterojen ve geniş bir grup olmasına rağmen, hala sorumlu geni tanımlanamamış hastalar bulunmaktadır. Bu geniş grupta birçok yeni gen tanımlanırken, bu genlerin ürünlerinin işlevlerinin çalışılması da gerekmektedir. Ayrıca, henüz hastalık seyrini değiştirici tedaviler geliştirilememiştir. Bu nedenlerle, kas distrofileri hem moleküler patogenezin aydınlatılması, hem aday genlerin belirlenmesi hem de yeni tanımlanmış genlerin işlevlerinin anlaşılabilmesi için çalışılması gereken bir hastalık grubudur.

Bu tez çalışması, ilerleyici kas dejenerasyonu ile giden, henüz hastalık seyrini değiştirici tedavi seçenekleri bulunmayan tek gen hastalıklarından

disferlinopatiyi temel alarak kas distrofisi araştırmalarına farklı bir yaklaşım getirmektedir. Bu çalışmayla, metin madenciliği ve veri madenciliği analizleri birleştirilerek, disferlinopati patogenezinin önemli yolakları ve anahtar genleri tespit edilmiştir. Ayrıca, genlerin birlikte ifade edilme analizinde disferlinopatiyle ilgili bulunan gen modülünün anahtar genlerinden birinin, yeni tanımlanan bir kas distrofisi geni olan *TOR1AIP1* olarak belirlenmesi üzerine, birlikte ifade edilme verisi, protein dizi özelliklerine dayanarak işlev tahmini yapan analiz araçlarıyla birleştirilerek *TOR1AIP1* tarafından kodlanan LAP1 proteinin kasa özgü işlevine dair yeni bir hipotez geliştirilmiştir. Bu sonuçlara ulaşılmasında kullanılan iş akışı Şekil 5.1’de özetlenmektedir.

Disferlinopati patogenezinin aydınlatılması için metin madenciliği ve genlerin birlikte ifade edilme analizi beraber kullanılmıştır. Metin madenciliği basamağında BioTextQuest+ aracı kullanılmış, bu araçla tespit edilen önemli terimler sayesinde disferlin protein işlevleri ve hastalık patogenezine dair bilgilere ulaşılmıştır. BTQ+’dan elde edilen proteinlerin, STRING aracıyla protein – protein etkileşim ağı oluşturulmuştur. OnTheFly aracı daha geniş protein listesine ulaştığı için, disferlinle ilişkili hücresel yolakların tespit edilmesinde OnTheFly’den elde edilen protein listesi kullanılmıştır. DAVID aracıyla işlevsel zenginleştirme yapılmıştır. Metin madenciliği sonuçlarını doğrulamak ve detaylandırıp kilit genlere ulaşabilmek için, mikrodizin veri analizi iş akışına eklenmiştir. Kasa özgü genlerin birlikte ifade edilme ağı WGCNA yöntemiyle oluşturularak, disferlinopatiyle ilişkili hücresel yolaklar tespit edilmiştir. Disferlinopatideki anahtar genlerden *TOR1AIP1*’in işlevsel tahmini için, kasa özgü birlikte ifade edilme analizi sonuçları, COXPRESdb veri tabanından elde edilen genlerin global olarak birlikte ifade edilme verileriyle birleştirilmiştir. Bu iş akışı sayesinde, hem disferlinopatideki önemli hücresel yolaklara ve genlere ulaşılmış hem de *TOR1AIP1*’in işlevsel tahmini yapılmıştır.

Metin Madenciliği



Şekil 5.1. Metin madenciliği ve mikrodizin analizini birleştiren iş akışı.

5.1. Disferlinopati Patogenezinin Metin Madenciliğiyle İncelenmesi

Disferlin proteini, LGMD2B ve Miyoshi miyopati hastalıklarını kapsayan literatürün metin madenciliği araçlarıyla taranması sistematik bir şekilde ilişkili

proteinlere ve hücresel süreçlere ulaşılmasını sağlamıştır. BTQ+ aracıyla taranan disferlinopatiye ilişkin literatürde doküman kümelenmesi yapıldığında, tek bir küme olduğu görülmüştür. Özetlerin tek bir kümede toplanmış olması, disferlin mutasyonunun neden olduğu farklı klinik fenotiplerin literatürde belirgin olarak farklılaşmadığını göstermektedir. BTQ+ aracının kullandığı kümelenme yöntemleri değiştirilerek, ilgili literatürün birden fazla küme oluşturması sağlandığında da küme ayrımının klinik fenotip ayrımıyla uyumlu olmadığı, kümelerin birbirleriyle iç içe geçmiş olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar, LGMD2B ve Miyoshi miyopati fenotipinin birbirinden klinik olarak farklı olmasına rağmen, bu tez çalışmasında kullanılan metin madenciliği yöntemiyle bu heterojenitenin açıklanamadığı belirlenmiştir.

BTQ+ aracıyla disferlinopatiye dair literatür madenciliğiyle elde edilen önemli biyomedikal terimler incelendiğinde, en önemli terimler olarak disferlin, disferlin mutasyonunun neden olduğu LGMD2B ve Miyoshi miyopati terimleri görülmektedir (Bkz. Tablo 4.1). Bu terimlerin beklenildiği gibi en üst sıralarda çıkması, kullanılan kelime ağırlıklandırma ve önemli terim seçim basamaklarının doğru işlediğini göstermektedir. Dejenerasyon, rejenerasyon, atrofi gibi terimler; kas distrofisi hastalığının temel bileşenlerini oluşturan ilerleyici dejenerasyon ve bunu telafi etmeye çalışan rejenerasyonu belirtmektedir. Sarkolemma ve veziküller, disferlin proteininin bulunduğu bölgelere işaret etmektedir. Disferlin proteini, önceden de açıklandığı gibi kalsiyum bağımlı vezikül aracılı hücre zarı tamirinde rol oynar. Bu yüzden önemli terimler arasında görülen, kalsiyum bağımlı, endositoz, ekzositoz, vezikül ve hücre iskeleti terimleri disferlinin bilinen hücre zarı tamir işleviyle ilişkilendirilebilir.

Metin madenciliği aracılığıyla ulaşılmış olan AHNK (AHNK nükleoprotein), aneksin ve MG53 (*Tripartite motif containing 72*, TRIM72) proteinleri, disferlinin kas dokusundaki işlevini gerçekleştirebilmesi için gerekli proteinlerdir. Literatürde araştırıldığında, bu proteinlerin disferlinle etkileşime girdikleri belirtilmiştir. Anneksinler kalsiyum bağımlı proteinler olup, hücre zarı lipitlerine bağlanmakta ve AHNK'la beraber kompleks kurup vezikül aracılı hücre zarı tamir mekanizmasında rol oynamaktadırlar (185-188). Bunlara ek

olarak, kalpain 3, kaveolin 3, desmin, emerin, laminin, sarkoglikan, distroglikan, kollajen, merosin, teletonin gibi proteinler de önemli terimler arasında bulunmaktadır. Bu proteinler, mutant olmaları durumunda kas distrofilerine neden olan diğer proteinleri göstermektedir. Metin madenciliğiyle ulaşılan monosit, makrofaj, infiltrat gibi terimler ise disferlinopatide görülen belirgin enflamasyonu belirtmektedir.

BTQ+ aracılığıyla yapılan kelime ağırlıklandırmasıyla önemli terim seçimi, disferlinle ilişkili literatürde bilinenlere hızlı şekilde ulaşılmasını sağlamıştır. Fakat yeni hipotezler oluşturulabilmesi için, metin madenciliğinden elde edilen sonuçların veri tabanlarıyla entegre edilmesi gerekir. Bu amaçla, öncelikle STRING veri tabanını kullanarak, disferlinle ilgili literatürden elde edilen proteinlerin etkileşim ağı elde edilmiştir (Bkz. Şekil 4.1). Bu protein - protein ağı temel olarak iki merkez göstermektedir. Bu merkezlerden bir tanesi, kas distrofisiyle ilişkilendirilmiş proteinler tarafından oluşturulmuştur. Diğer merkez ise ubikitin etrafında oluşmuştur. Bu durum, ubikitin proteininin, disferlinopati açısından önemli olduğunu düşündürür. Karşı görüş olarak şu da savunulabilir. Ubikitin birçok proteinle ilişkilidir, bu yüzden disferlinle ilişkili protein - protein etkileşim ağında ubikitin çevresinde bir merkez oluşması anlaşılabilir. Fakat, ağ incelendiğinde bu iki merkezin sadece ubikitin proteini üzerinden birleşmediği görülmektedir. AHNAK ve kaveolin proteinleri de AKT (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*, diğer adıyla protein kinaz B) ve RELA (*v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A*, diğer adıyla, Nükleer Faktör-kappa B p65 altbirimi) ile etkileşim göstererek kas distrofisi proteinlerini, ubikitin etrafındaki proteinlere bağlamaktadır (Bkz. Şekil.4.1). Bu nedenle, ubikitin proteininin disferlin proteiniyle ilişkisinin daha detaylı araştırılması için literatür araması yapılmıştır. Ubikitin - proteazom sisteminin aktivasyonu ve kas atrofisine neden olması özellikle Duchenne kas distrofisinde çalışılmış olmasına rağmen, disferlinopatilerde ubikitin-proteazom sistemi detaylı olarak çalışılmamıştır. Fakat son dönemde bu konuyla ilgili yayınlanan çalışmalara ulaşılmıştır. Bu çalışmalardan biri, disferlinopatilerde oksidatif stres, nükleer faktör kappa B ve ubikitin proteazom yolağının önemini incelemektedir. Bu araştırma, disferlin yokluğunda hücrede oksidatif stresin

arttığını ve reaktif oksijen türlerinin asıl kaynağının mitokondri olduğunu göstermiştir. Oksidatif stresin artmasıyla NF- κ B transkripsiyon faktörü aktifleşerek protein ubiquitinasyonunu arttırmıştır. Bu yolak, disferlinopatilerde kas atrofisine giden mekanizmayı açıklayabilir (18). Ocak 2014'te yayınlanan başka bir çalışma, disferlinopatilerde kas atrofisi, ubiquitin – proteazom ve otofaji yollarını çalışmıştır. Bu çalışma, disferlinopati hasta örneklerinde, ubiquitin-proteazom sisteminin aktif olduğunu göstermiştir. Otofajinin de bazı disferlinopati biyopsilerinde artmış olabileceği saptanmıştır. Fakat, disferlinopatide görülen otofaji artışı, enflamasyona sekonder de olabilir (189). Ayrıca, disferlin proteinin mutasyon tipine göre yıkım yönteminin ubiquitin – proteazom ya da otofajik yolak olabileceği gösterilmiştir (190, 191). Bu çalışmalar, ubiquitin – proteazom sisteminin disferlinopatide hem protein yıkımıyla kas atrofisine neden olabileceğini hem de bazı mutasyon tiplerinde disferlin yıkımında görev alabileceğini göstermektedir. Literatürdeki bu bulgular, disferlinopati patogenezinde ubiquitin proteazom sisteminin önemini belirtmektedir. Disferlinopatiyle ilişkili STRING'den elde edilen protein – protein etkileşim ağında, ubiquitin merkez gen olarak görülmesi, ubiquitin proteazom sisteminin disferlinopati için önemli olduğunu ön görmüştür. Literatürden elde edilen bulgular, protein-protein etkileşim ağından elde edilen sonuçları desteklemektedir.

Metin madenciliği sonrasında elde edilen protein – protein etkileşim ağı, disferlinin fiziksel ve işlevsel olarak ilişkili olduğu diğer proteinleri ortaya koymuştur. Bunlara ek olarak, ubiquitin proteazom sisteminin disferlinopati patogenezinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Fakat, BTQ+ disferlinle ilgili literatür analizi yaparken, disferlinin fiziksel olarak etkileşime girdiği tüm proteinleri seçmemiştir. Bu proteinlerin bir kısmı, önemli terimler arasına girmezken bir kısmı da önemli terim olarak seçilmiş olmasına rağmen protein ismi olarak tanınmamıştır. Bu nedenle, oluşturulan protein – protein etkileşim ağı eksiktir. Daha kapsamlı bir etkileşim ağı oluşturulabilmesi için, duyarlılık ve özgüllük oranları daha yüksek biyolojik varlık tanıma algoritmaları kullanmak gerekmektedir. Ayrıca, protein listesini sadece kelime ağırlıklandırılmasına dayanarak seçmek yerine; doğal dil işleme mekanizmasının ve makine öğrenim

tekniklerinin kullanılması daha detaylı sonuçlar verebilir. Bu sayede, proteinler arasındaki etkileşimleri tarif eden cümlelerin seçilebilmesi literatürden elde edilen bilgiyi arttırabilir ve oluşturulacak protein – protein etkileşim ağına, proteinlerin etkileşim tipleri de eklenebilir.

BTQ+ aracının sınırlı sayıda proteine ulaşması, işlevsel zenginleştirme basamağını kısıtladığı için, OnTheFly aracıyla elde edilen geniş protein listesi kullanılmıştır. Böylece disferlinopati patogenezi hakkında daha geniş bilgiye ulaşmak hedeflenmiştir.

İşlevsel zenginleştirme analizinde ilk sıralarda, kas kasılması, sarkomer ve kas doku gelişimi terimleri görülmüştür (Bkz. Tablo 4.2). Bunlar kas fenotipiyle ilişkilendirilmiş proteinler için beklenen sonuçlardır. İstatistiksel olarak anlamlı çıkan diğer terim grubunda ise, aktin hücre iskeleti, hücre zarı organizasyonu, zarla çevrili vezikül ve kalmoduline bağlanma görülmektedir. Bu terim kümesi, metin madenciliğiyle elde edilen önemli terimlerde de görüldüğü gibi, disferlinin kalsiyum bağımlı vezikül aracılı hücre zarı tamiri işleviyle örtüşmektedir.

Disferlinle ilişkili proteinlerin, enflamatuar cevap, immun sistem kontrolü ve Toll-benzeri reseptör yolağını da temsil ettiği saptanmıştır. Bu terimler, disferlinopati patogenezinde, enflamasyon ve immün sistemin rolünün önemini vurgulamaktadır.

Disferlinopatiyle ilişkili proteinlerin işlevsel zenginleştirmesinin sonuçları, disferlinle ilişkili literatürde ortaya konulan önemli terimlerin sonuçlarını desteklemektedir. Fakat bunlara ek olarak, disferlinle ilişkili proteinler, apoptoz kontrolü kategorisini de temsil etmektedirler. Bu bulgu disferlinin apoptoz mekanizmasında da rolü olabileceğini öne sürmektedir. Disferlinle apoptozun ilişkisini destekleyebilmek için literatür incelendiğinde, disferlinopatide apoptozun rolünün pek aydınlatılmamış olduğu görülmektedir. Distrofin ve sarkoglikandan yoksun kas distrofilerinde apoptozun artmış olduğu ve kas dejenerasyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir (192, 193). Fakat disferlinopatilerde artmış apoptoz ya da apoptoz kontrolünün bozulması rapor edilmemiştir. Buna rağmen, disferlinin apoptozda rolü olabileceğini öne süren gruplar olmuştur. Kas distrofisi fare modellerinde rabdomiyosarkom

oluşumunun arttığına gözlemlenmesi üzerine, disferlin ve distrofinin tümör baskılayıcı gen olarak çalışabileceği düşünülmüştür. Bunu test etmek için, Hosur ve diğerleri (194), disferlin ve distrofin çift mutant fare oluşturmuş ve bu farelerde rabdomiyosarkom insidansının %90'a çıktığını göstermişlerdir. Bu grup, disferlin yoksunluğunda tümör oluşumunun artmasının olası nedenlerinden biri olarak, disferlinin apoptoz düzeneğinin kontrolünde rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir (194, 195). Ayrıca, başka bir çalışma, disferlinden yoksun farelerde kasılma sonrası oluşan hasarın mitokondri aracılı apoptozu arttırdığını göstermiştir (196). Jamieson ve diğerleri (197), glukokortikoid tedavisi sonrası apoptozu uğrayan T hücrelerinde son dönemde disferlin ve diğer vezikül trafik proteinlerinin arttığını gözlemiştir. Bu zamanlamanın, hücre içindeki veziküllerin hücre zarıyla birleştiği zamana denk geldiği görülmüştür. Bu nedenle, Jamieson ve diğerleri (197), disferlin yokluğunda apoptozun bozulmuş olabileceğini öne sürmüştür. Disferlin yokluğunda apoptozun bozulmuş olması, glukokortikoidlerin disferlinopati tedavisinde faydalı olmamasını açıklayabilir (197).

Disferlinin apoptoz kontrolünde rolünün olduğunun belirlenmesi, disferlinopati patogenezinin anlaşılmasında önemli bir adım olacaktır. Eğer disferlin, apoptoz düzeneğinin kontrolünde rol oynuyorsa, disferlinden yoksun kas distrofininde kas rejenerasyonun bozulmuş olmasının nedenlerinden biri bu olabilir. Disferlinopatiyle ilgili metin madenciliği ve işlevsel zenginleştirme çalışması sonuçları, disferlinin apoptozla ilgisi olabileceğini öne sürmüştür. Literatürde, disferlinin apoptoz kontrolündeki rolüne dair doğrudan bir çalışma olmasa da, ipuçları disferlinopatide apoptozun yerinin ve disferlinin apoptoz kontrolündeki rolünün çalışılması gereken bir alan olduğunu vurgulamaktadır.

Metin madenciliği analiziyle elde edilen önemli terimler, disferlin proteininin işlevleri ve mutasyon durumunda oluşan klinik fenotiplerin moleküler patogenezinin açıklayan bilgilere ulaşılmasını sağlamıştır. Metin madenciliği aracı, konu hakkında literatürde bulunan geniş bilgi birikimini daha hızlı bir şekilde analiz ederek önemli noktaları vurgulayabilmiştir. Fakat sadece metin madenciliğiyle elde edilen terimlerin incelenmesi, konu hakkında yeni hipotezlerin oluşturulmasına yetmemektedir. Metin madenciliği araçlarını

kullanarak bilgi keşfi yapabilmek için, analizin farklı veri tabanlarıyla ya da veri madenciliği analizleriyle birleştirilmesi gerekir. Bu çalışmada ilk basamak olarak, metin madenciliğiyle elde edilen protein listesi, genlerin işlevsel anotasyonlarını depolayan veri tabanlarıyla entegre edilmiştir. Bu basamak, literatürde bulunan bilinen bilgileri ortaya koyarken, aynı zamanda disferlinin apoptoz kontrolünde rolü olabileceğine dair hipotez oluşturulmasını sağlamıştır.

Bu çalışmanın metin madenciliği iş akışında, ilk basamakta literatürden ilgili dokümanlar çekilmekte ve bu dokümanlardan önemli terimlerin seçilerek bilgi çıkarımı yapılmaktadır (Bkz. Şekil 5.1). Devamında, ilişkili proteinlerin daha detaylı incelenmesini sağlamak için, biyolojik bilgi depolayan veri tabanlarından yararlanılmaktadır. Protein - protein etkileşim bilgisi için, deneysel ve metin madenciliği verilerini birleştiren STRING veri tabanından yararlanılmıştır. Geniş protein listelerinin temsil ettikleri hücresel yolları keşfetmek için de Gene Ontology ve KEGG gibi veri depolarını birleştiren DAVID aracı kullanılmıştır. Böylece, disferlin proteini hakkında literatürde doğrudan bahsedilmemiş bilgilere ulaşılması amaçlanmıştır. Örneğin, disferlin proteinin A proteiniyle etkileşime girdiği, başka bir makale grubunda ise B proteiniyle ilişkili olduğu belirtilmişse, A ve B proteinleri disferlinle ilişkisi henüz bilinmeyen başka bir yolda görev alıyorsa; bu çalışmada benimsenen iş akışı, disferlinle ilişkisi bilinmeyen hücre yolağına ulaşılmasını sağlayabilir. Nitekim, bu çalışmada apoptoz kontrolünün disferlinle ilişkili proteinler listesinde zenginleşmiş terim olarak belirmesi ama literatürde disferlinin apoptozdaki rolünün açıkça belirtilmemiş olması buna bir örnektir.

Bu iş akışının mikrodizin analizi kısmında, kasa özgü birlikte ifade edilme ağı analizi sayesinde disferlinopatiyle ilişkili hücre yolları ve bu yolların merkez genleri bulunmuştur (Bkz Şekil 5.1). Bu merkez genlerden birinin işlevsel tahminin yapılabilmesi ve güçlendirilmesi için global birlikte ifade edilme verisi iş akışına eklenmiştir. Birlikte ifade edilme analizinden elde edilen gen listeleri DAVID ile incelenmiştir. Ayrıca gen işlev tahminin desteklenmesi için protein dizi analizi iş akışına eklenmiştir. Ulaşılan aday genler hakkında literatür taraması yapılarak gen işlevsel olarak ilişkili olduğu gen

önceliklendirilmesi yapılmıştır. Bu iş akışında kullanılan araçlara erişim için site adresleri ve araçların kullanımında yapılması gereken adımlar ekte detaylı olarak açıklanmıştır (Bkz. EK).

Bu iş akışının eksik ve geliştirilebilecek yönleri, çalışma sırasında fark edilmiştir (Bkz. Şekil 5.1). İlk olarak, kullanılan metin madenciliği aracı BTQ+, özellikle ulaştığı makaleler açısından güncel olması, doküman kümelenme, adlandırılmış biyolojik kavramları tanıma ve dış kaynaklı biyolojik bilgi veri tabanlarına bağlanabilmesi açısından avantajlıdır. Fakat metin madenciliği, henüz hala gelişmekte olan bir alandır, bu yüzden eksikleri vardır. Bu tez çalışması sırasında fark edilen eksikliklerden biri, BTQ+'ın önemli biyolojik kavramları seçerken eksik kalmasıdır. Önemli terim seçiminde sadece kelime ağırlıklandırması yöntemini kullanması, disferlinle fiziksel etkileşimi gösterilmiş olan fakat literatürde çok sık belirmeyen proteinlerin atlanmasına neden olmuştur. Bu nedenle, doğal dil işleme mekanizmalarını kullanarak biyoentitelerin etkileşim bilgilerine ulaşabilen metin madenciliği araçlarının kullanılması, disferlinle fiziksel etkileşime girdiği bilinen proteinlerin yakalanma olasılığını arttırabilir. Ayrıca bunun dışında, BTQ+, bazı proteinleri önemli terim olarak seçmesine rağmen adlandırılmış biyolojik kavram tanıma basamağında bunları protein olarak tanıyamamıştır. Bu da protein - protein etkileşim ağının eksik olmasına neden olmuştur. BTQ+'nın disferlinle etkileşime girdiği bilinen proteinleri yakalayamadığının belirlenmesi üzerine, işlevsel zenginleştirme basamağı için disferlinle ilişkili olabilecek daha geniş protein listesine başka bir araç, OnTheFly, kullanılarak ulaşılmıştır. Bu çözüm, disferlinle ilişkili hücresel yollara daha yüksek oranda ulaşılmasını sağlamıştır. Fakat OnTheFly programının protein seçiminde özgüllüğü yüksek olmadığı için, disferlinle ilişkili ulaşılan geniş protein listesi tek tek protein bazında incelenmemiş, sadece bütüncül olarak biyolojik anlamlılığını incelemek için işlevsel zenginleştirme aşamasında kullanılmıştır.

5.2. Disferlinopatinin Genlerin Birlikte İfade Edilme Ağıyla İncelenmesi

Disferlinopati hastaları ve kontrol bireylerin kas mikrodizin verilerinden oluşturulan genlerin birlikte ifade edilme ağı, disferlinopatiyle ilişkili gen

gruplarının bulunması için analiz edilmiştir. Literatürde disferlinopatide metin madenciliği ve hasta mikrodizin verilerinin birlikte ifade edilme analizini birleşimsel olarak kullanan bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu araştırmada, birlikte ifade edilme ağında sekiz modül oluşmuştur. Sekiz modülden üç tanesi, turkuaz, mavi ve siyah, disferlinopati hastalarıyla kontrol bireyler arasında istatistiksel olarak belirgin fark göstermektedir.

Turkuaz modülün biyolojik anlamlılığının belirlenmesi için, DAVID aracıyla işlevsel zenginleştirme analizi yapılmıştır (Bkz. Tablo 4.4). Turkuaz modül genleri hücre dışı matris elemanları ve hücre adezyonu genleri açısından zengindir. Kas distrofilerinde hücre dışı matris elemanlarının arttığı ve kompozisyonlarının yeniden şekillendiği bilinmektedir (198, 199). Bu modülün merkez genlerinin incelenmesi, disferlinopatide hücre dışı matris değişikliklerindeki önemli genleri belirleyecektir. Merkez genlerden biri olan TIMP-1'in Duchenne kas distrofisinde artmış olduğu gösterilmiştir (200, 201). TIMP-1, yaygın doku dağılımı gösteren, matris metalloproteinaz inhibitörlerindedir. TIMP-1'in kas distrofilerinde artışı, hücre dışı matris birikimini arttırabilir ya da endomizyal fibroblastların çoğalmasına neden olabilir (202, 203). TIMP-1 düzeyi Duchenne kas distrofisinde tedaviye yanıtı ölçmek için biyobelirteç olarak önerilmiştir. Duchenne kas distrofisinin tanısında artmış kreatinin kinaz düzeyi saptanır, fakat hastalık ilerleyip kas kullanımı azalmaya başladığında kreatinin kinaz düzeyi de azalmaktadır. Bu yüzden, tedavi yanıtını takip etmede kreatinin kinaz düzeyi iyi bir belirleyici değildir. Fakat TIMP-1 düzeyinin hastalık ilerlediğinde de yüksek düzeyde kaldığı görülmüştür. Bu nedenle, TIMP-1 düzeyinin tedavi yanıtı ölçmek için kullanılabileceği öne sürülmüştür (204). Fakat, TIMP-1 düzeyi ve işlevi disferlinopati hastalarında detaylı olarak çalışılmamıştır. Matris metalloproteinazlar ve TIMP1 düzeylerinin miyoblast göçü ve farklılaşması sırasında farklı evrelerde arttığı gösterilmiştir (205). Ayrıca in vitro, TIMP1 düzeyi arttırıldığında, hücrelere kas satellit hücrelerini aktifleştirecek uyarılar verilse dahi satellit hücrelerin aktifleşmediği görülmüştür (206). Bu çalışmalar, MMP ve MMP inhibitörü olan TIMP1'in kas rejenerasyonunda önemli olduğunu göstermektedir. TIMP1'in birlikte ifade edilme analizinde disferlinopatide

anahtar gen olarak görülmesi ve literatürün TIMP1'in kas distrofisi patogenezindeki rolünü desteklemesi; TIMP1'in disferlinopati patogenezinde de çalışılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. TIMP1, Duchenne kas distrofisinde olduğu gibi disferlinopatide de tedavi sürecini takip etmek için biyobelirteç ya da kas rejenerasyonunu etkilemesi nedeniyle terapi hedefi olarak araştırılabilir.

Turkuaz modül genleri, hücre göçü, enflamatuar yanıt ve kompleman yolağını temsil etmektedir. Bu terim kümesi, disferlinopatide aktif olan immün sistemi göstermektedir. Aktivasyon mekanizması detaylı olarak bilinmese de, disferlinopatide yaygın enflamasyon görülmektedir. Disferlin yoksunluğunda, komplement sisteminin aktive olduğu ve disferlinden yoksun makrofajların artmış fagositoz gösterdiği gösterilmiştir (207, 208). Turkuaz modülün merkez genlerinden bir tanesi, komplement sistemi merkezi komponenti C3'tür. Disferlinden yoksun farelerde, C3 genetik olarak susturulduğunda, kas patolojisinin iyileştiği gösterilmiştir. Fakat Duchenne kas distrofisi modeli olan *mdx* farede, C3'ün susturulması belirgin bir yarar sağlamamıştır. Komplement sisteminin son basamağında hücre zarı atak kompleksi oluşumu için gerekli olan C5 komplement komponentinin, disferlinden yoksun farede mutasyona uğratılması ise kas distrofisinin azalmasını sağlamamıştır. Böylece, komplement sisteminin disferlinopati patogenezinde merkezi bir rol oynadığı, bunun için de C3 komponentinin asıl olduğu gösterilmiştir (207). Literatürde bulunan bu bulgular, birlikte ifade edilme ağı analiz sonuçlarımızı desteklemektedir. Disferlinopatiyle ilişkili turkuaz modülün merkez genlerinden biri olan C3, disferlinopati için anahtar genlerden biridir. Genetik olarak susturulduğunda disferlinopati patogenezinde belirgin değişiklik sağlamayan C5 komponenti ise, WGCNA metodu ile elde edilen genlerin birlikte ifade edilme ağında hiçbir modüle atanamayarak gri modülde kalmıştır. Bu bulgular, genlerin birlikte ifade edilme ağı ve anahtar gen analizinin disferlinopati için önemli yolları belirleyebildiğini göstermektedir.

Turkuaz modül aynı zamanda lizozom, vezikül ve hücre iskeleti proteinleri açısından zengindir. Bu terimler grubu, disferlinin vezikül formasyonu ile hücre zarı tamir mekanizmasını açıklıyor olabilir. Aynı zamanda lizozomla ilgili genler, lizozom - otofajik sistemi de temsil ediyor olabilir.

Disferlinopatide lizozomal – otofajik sistemin bazı durumlarda artmış olabileceği gösterilmiştir (189).

Mavi modül, disferlinopati için önemli olan diğer bir modüldür. Bu modül, ubikitin konjugasyonu, protein yıkımı ve mitokondri genlerini göstermektedir (Bkz. Tablo 4.5). Kas distrofilerinde, çekirdekte kodlanan mitokondri genlerinin ifadesinin değiştiği gözlenmiştir (26). Kas distrofilerinde mitokondrideki işlev bozukluğunun artmış kalsiyum yükünden kaynaklandığı düşünülmektedir (209). Mavi modüldeki mitokondriye ait genler incelendiğinde, oksidatif fosforilasyon ve sitrik asit siklusu komponentlerinden oluştuğu görülmüştür. Mavi modülün merkez genlerinden biri, mitokondride bulunan *OXR1* genidir. *OXR1* proteini, tam olarak mekanizması bilinmese de oksidatif strese karşı koruma sağlayan bir proteindir (210). *OXR1* proteini özellikle nöronal dokuda çalışılmıştır. *OXR1* proteinin amyotrofik lateral skleroz fare modellerinde düzeyinin artırılması farelerin yaşam süresini uzatmaktadır. *OXR1*'in antioksidan korunma yolağını değiştirdiği ve komplement sistem aktivasyonunu geciktirdiği gösterilmiştir (211). *OXR1*'in p21 sinyal yolağı üzerinden antioksidan genlerin ifadesini arttırarak oksidatif stresi baskıladığı ve mitokondrinin DNA bütünlüğünü koruduğu görülmüştür (212). Bu sonuçlar, *OXR1*'i nöronlarda oksidatif strese karşı korunmada merkezi bir noktaya koymaktadır. Disferlinopatide de oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir. Fakat, *OXR1*'in kas distrofilerinde rolüne dair bir çalışma yoktur. Disferlinopatide oksidatif stresin artmış olması ve antioksidan olduğu gösterilmiş *OXR1*'in disferlinopati ilişkili gen modülünde merkezi gen olarak bulunmasına dayanarak, *OXR1* disferlinopati patogenezinde önemli bir gen olabilir.

Aynı disferlin mutasyonunun farklı klinik fenotipler oluşturan Miyoshi miyopati ve LGMD2B'ye neden olması disferlinopati patogenezinde düzenleyici genlerin işlevi olabileceğini ortaya koymuştur. Fakat, henüz disferlinopatide düzenleyici genler tespit edilememiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan WGCNA metodunun disferlinopati patogenezindeki merkez genleri bulabilme avantajı, klinik olarak önemli genleri ortaya koyduğu için allelik heterojenite için aday genlere de işaret edebilir. Disferlinopati patogenezindeki anahtar genler allelik heterojenitenin oluşmasında rol oynuyor olabilir. Fakat allelik heterojeniteyle

ilişkili genlerin önceliklendirilebilmesi için, LGMD2B ve Miyoshi miyopati gruplarındaki önemli genlerin ayrı ayrı karşılaştırılması gerekir.

Bu tez çalışmasında, diğer kas distrofileriyle karşılaştırıldığında disferlinopatiye özgül hücre yolaklarının bulunabilmesi için disferlinopati mikrodizin verisi, FKRP mutant ve LGMD2A gibi aynı mikrodizin setinde bulunan diğer kas distrofileriyle de birleştirilerek ve ayrı ayrı karşılaştırılmıştır. Fakat, oluşturulan farklı ağlarda örnek sayısının az olması nedeniyle modüllerin stabil olması için büyük modüller oluşturulmuştur. Bu durumda, disferlinopatiyi diğer kas distrofilerinden ayıran özelliklere ulaşamamıştır. Parametreler daha küçük modüller oluşturulması için değiştirildiğinde, disferlinopatiyle diğer kas distrofilerini ayıran modüller bulunmasına rağmen bu modüllerin stabil olmadığı ve biyolojik olarak anlamlılığını yitirdiği görülmüştür. Bu çalışmalarla disferlinopatiye özgü özelliklerin bulunamaması örnek sayısının azlığından kaynaklanabilir. Ayrıca, bu sonuçlar farklı kas distrofilerindeki ortak hücre yolaklarının varlığını da göstermektedir. Kas distrofisi hastalarında, kas patolojisinin temel ortak hücre süreçleri ağır bastığı için primer gen mutasyonuna ilişkin hücresel işlevler mikrodizin analizinde belirlenememiş olabilir.

5.3. LAP1 Proteini İşlevsel Çıkarımı

Mavi modül detaylı incelendiğinde, *TOR1AIP1*'in merkez genlerden biri olduğu görülmektedir. *TOR1AIP1* mutasyonunun, yakın zamanda kas distrofisine neden olduğu gösterilmiştir (213). *TOR1AIP1* tarafından kodlanan LAP1 proteini, çekirdek iç zarı proteinlerindedir. LAP1 proteinin hücre siklusu ilerlemesinde ve çekirdek zarının korunmasında rolü olduğuna dair çalışmalar olsa da, LAP1 proteinin işlevleri tam olarak bilinmemektedir (214). Ayrıca, LAP1 protein işlevinin dokuya özgül olduğu düşünülmektedir. Farelerde kas hücrelerinde LAP1 delesyonu kas distrofisi fenotipine yol açarken, karaciğerde LAP1 delesyonu karaciğer fonksiyonlarını etkilememiştir (215). Bu veriler, LAP1'in dokuya özgül rolü olduğunu göstermektedir. Kas dokusundan elde edilen genlerin birlikte ifade edilme ağı, işlevleri tam olarak bilinmeyen LAP1 proteinin kasa özgül görevine dair çıkarımda bulunulması için uygundur.

Birlikte ifade edilme modülleri, işlevleri tam olarak bilinmeyen proteinlere işlev atamak için başarıyla kullanılmıştır. Wong ve diğerleri (152), *Citrus* familyasında *guilt-by-association* tekniğiyle gen işlev çıkarımı yapabilmek için, genlerin genel ve dokuya özgü birlikte ifade edilme ağlarını birleştirmişlerdir. İki farklı ağın birlikte incelenmesi, fizyolojik durumlara has biyolojik süreçlerin de gen işlev tahmininde kullanılmasını sağlamıştır.

Birlikte ifade edilme analizi, proteinlerin aktif oldukları biyolojik süreçleri tahmin etmek için çok yararlı olmasına rağmen, gürültü yüzünden yanlış pozitif sonuçlar verebilir. Bu dezavantajı en aza indirmek için, farklı türlerden elde edilen birlikte ifade edilme ağları birleştirilebilir. Biyolojik olarak ilişkili genlerin, farklı türlerde de beraber hareket etmeleri beklenirken, yanlışlıkla ilişkilendirilmiş genlerin diğer türlerde beraber görünmemeleri gerekir. Evrim sürecinde, farklı türlerde birlikte ifade edilmekte olan gen çiftlerinin, seçici avantajı olduğu ve bu nedenle işlevsel olarak ilişkili oldukları düşünülmektedir. Farklı türlerde birlikte ifade edilen gen gruplarının, biyolojik süreçlerde önemli rolleri olduğu gösterilmiştir (177). Bu nedenle, işlev tahmini için diğer türlerle karşılaştırmalı birlikte ifade edilme analizleri, tek analizden daha güçlü sonuçlar verir. Hansen ve diğerleri (153) bitkilerde yaptıkları sellüloz biyosentezinde görev alan genler ile ilgili çalışmalarında farklı türlerden elde ettikleri birlikte ifade edilme ağlarını karşılaştırmışlardır. Farklı türlerden elde edilen ağların birbirine benzer olduğunu ve tek birlikte ifade edilme ağından kaynaklanacak gürültünün azaltılması için, işlev tahmininde farklı türlerden elde edilen korunmuş birlikte ifade edilme ağlarının daha yüksek performans sağlayacağını göstermişlerdir.

LAP1'in kas dokusundaki işlevini tahmin edebilmek için, WGCNA metoduyla ve COXPRESdb veri tabanından elde edilen işlevsel zenginleştirme sonuçları karşılaştırılmıştır. WGCNA metoduyla elde edilen *TOR1AIP1*'in merkez genlerden olduğu modülün yoğunlukla mitokondri, ubikitin konjugasyonu ve protein yıkımı genlerini gösterdiği saptanmıştır. Literatürde LAP1 proteininin, mitokondri veya ubikitin-proteazom sistemiyle doğrudan ilişkisini gösteren bulgular saptanmamıştır. Bu nedenle, *TOR1AIP1*'in merkez gen olduğu kasa

özgü genlerin birlikte ifade edilme modülünün, kas distrofisi patogenezini açıklayabilecek yeni bir LAP1 protein işlevi ön görebileceği düşünülmüştür.

Genlerin dokuya özgül olmayan birlikte ifade edilme analizi sonuçları incelendiğinde, *TOR1AIP1*'e benzer ifade düzeyleri gösteren genlerin de kasta birlikte ifade edilen genlere benzer şekilde, protein yıkımı süreci açısından zengin olduğu görülmüştür. Buna karşın, kasa özgü modülde görülen mitokondriyle ilişkili genler, farklı türlerde korunmuş dokuya özgül olmayan birlikte ifade edilme ağında görülmemiştir. Bu sonuç, *TOR1AIP1*'in ubiquitin konjugasyonu ve protein katabolik süreciyle ilişkili olması ihtimalini güçlendirmektedir.

Dokuya özgül olmayan birlikte ifade edilme verileri, ek olarak golgi apparatus, endoplazmik retikulum, protein transportu ve katlanmamış protein cevabı ile ilişkili genlerin *TOR1AIP1*'le beraber ifade edildiğini göstermektedir. LAP1 proteininin, protein etkileşimleri düşünüldüğünde, AAA+ ATPaz ailesinden torsin A'nın protein katlanmasında rol alabileceği savunulabilir. LAP1 ve torsin A'nın etkileşiminin işlevi hakkında son dönemde hipotezler üretilmiştir. LAP1 proteinin, Torsin A'nın ATPaz aktivitesini düzenlediği gösterilmiştir (216, 217). AAA+ ATPaz protein ailesi, ATP hidrolizinden elde ettikleri enerjiyle DNA, RNA ve proteinleri etkileyerek, birçok hücrel aktivitede yer alırlar (216, 218, 219). TorsinA proteini endoplazmik retikulum ve çekirdek zarında yerleşmekte ve sırasıyla LULL1 ve LAP1 proteinleriyle etkileşmektedir (216). Bazı AAA+ ATPazların protein katlanmasında rolü olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, torsinin LAP1 ile etkileşiminin protein katlanmasıyla ilişkisi olup olmadığı bilinmemektedir. LAP1 torsinle etkileşime girerek, perinükleer bölgede heterohekzamerik halka yapısı oluşturmaktadır. Bu halka yapısı, torsinin ATPaz aktivitesi için gereklidir. LAP1'in perinükleer kısmının oluşturduğu katlantı, torsinin ATPaz aktivitesi gösterdiği aktif bölgeyi tamamlamaktadır. Böylece LAP1 torsinin ATPaz aktivitesini gerçekleştirmesini sağlar. LAP1 proteininin kendisinin ATPaz aktivitesi olmamasına rağmen, enzimatik kofaktör olarak torsin A'nın ATPaz aktivitesini arttırmaktadır (178). Torsin inhibe edildiğinde, perinükleer aralıkta megaRNP granüllerinin biriktiği ve çekirdek zarının tomurcuklandığı bölgede vezikül boynunda torsin proteini

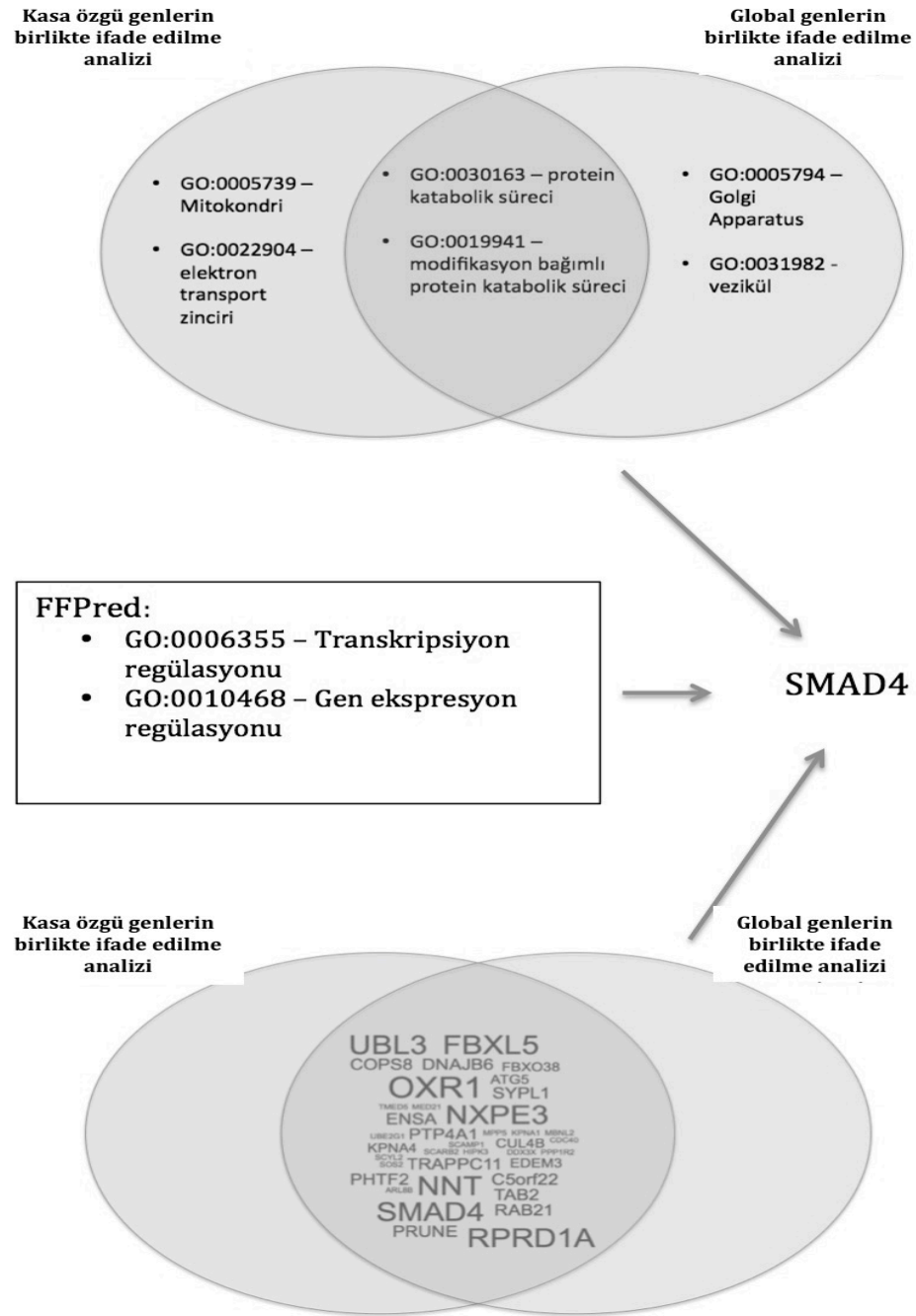
olduğu görülmüştür (220). Herpes virüs kapsidinin çekirdekten tomurcuklanarak çıkmasına benzer şekilde, megaRNP granüllerinin çekirdek zarından vezikül oluşturarak çıkmasında torsinin rolü olduğu öne sürülmüştür. Bu süreçte, torsinin iç çekirdek zarından vezikülün ayrılmasını sağladığı düşünülmektedir (220-223). Son çalışmalar, LAP1'in torsinle ilişkisinin protein katlanma süreciyle ilişkisine dair kanıt göstermemektedir. Böylece, LAP1 proteinin katlanmamış protein yanıtındaki işlevine dair literatürde güçlü kanıt bulunamamıştır.

LAP1 proteinin işlevlerinin dokuya özgü olduğu göz önünde bulundurulduğunda, LAP1 proteini için kasa özgü birlikte ifade edilme açısından yararlanarak işlevsel çıkarım yapmak kas distrofisi patogenezi aydınlatmak için daha yararlı olacaktır. Bu durumda, WGCNA metodunun ön gördüğü mitokondriyel ve ubiquitin konjugasyon süreçlerinden, genlerin genel birlikte ifade edilme ağı sonuçlarıyla da desteklendiği için, LAP1'in protein yıkımı sürecinde rolü olabileceğini öne sürmekteyiz.

LAP1 proteinin ubiquitin proteazom sistemiyle ilişkisi literatürde önceden yayınlanmamıştır. LAP1'in ubiquitinasyonla ilişkisini açıklayabilmek için, WGCNA ve COXPRESdb birlikte ifade edilme sonuçlarının karşılaştırılmasının ardından elde edilen *TOR1AIP1* ile kas dokusunda işlevsel olarak ilişkili merkezi genler listesi incelenmiştir (Şekil 5.2). Listedeki aday genlerin önceliklendirilmesi aşamasında bu çalışmada literatür taraması yöntemi kullanılmıştır. Aday gen listesinde, kas kütlesinin belirlenmesinde ve miyojenik farklılaşma sürecinde rol oynayan TGF/BMP sinyal yolağının önemli bir bileşeni olan SMAD4 (SMAD ailesi üyesi 4) proteini bulunmaktadır. SMAD4, diğer adıyla ko-SMAD, SMAD2/3 veya SMAD1/5/8 ile kompleks kurarak sırasıyla TGF-beta veya BMP sinyal yolağında rol oynar. SMAD kompleksi, çekirdeğe girer, çekirdekte transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girip DNA'ya bağlanarak gen ifadesini etkiler. Miyostatin, TGF-beta ailesinin bir üyesidir. Miyostatin sinyal yolağı, kas kütlesinin ana negatif regülatörü olarak görülmektedir. Miyostatin sinyal yolağı inhibe edildiğinde kas hipertrofiye gider ve kasın ana hipertrofik sinyalinin BMP sinyal yolağı olduğu gösterilmiştir (224, 225). Bu nedenle, SMAD4 iki yolağın da ortak noktası olarak, kas kütlesinin belirlenmesinde kritik

bir rol oynamaktadır. SMAD4, miyostatin ya da BMP sinyal yolağında çalışarak, kas atrofisi ve hipertrofisi arasındaki dengeyi belirleyen kritik bir faktördür. Kas atrofisi, ubikitin proteazom sistemiyle artmış protein yıkımının bir sonucu olduğu için, mavi modüldeki ubikitin proteazom sistemiyle ilişkili genler, SMAD4 sinyal yolağının hedef genleri olabilirler.

SMAD4 ve ubikitinasyon arasındaki bağlantı, kas atrofisiyle ilişkilendirilebilecek protein yıkımı olabileceği gibi, TGF-beta/BMP sinyal yolağının ubikitin aracılı kontrolü de olabilir. TGF-beta/BMP sinyal yolağı, ubikitin aracılı degradasyonla veya translasyon sonrası ubikitinasyonla kontrol edilebilir. Mavi modülün önemli genlerinden biri, F-box E3 ubikitin ligaz ailesinden substratları tam olarak bilinmeyen, FBXO3(*F-box protein 3*)'tür. Bu protein, SMURF1'in poliubikitinasyonunu ve yıkımını artırır (226). SMURF1 (SMAD özgül E3 ubikitin protein ligaz 1) ise SMAD1 ve SMAD5'in poliubikitinasyonu ve yıkımını sağlayan E3 ubikitin protein ligazdır (227). Böylece, FBXO3 proteini dolaylı olarak BMP sinyal yolağını arttırmış olur (226). Bu yöntem, TGF-beta/BMP sinyal yolağının ubikitin aracılı yıkımla kontrolüne bir örnektir. Fakat, ubikitinasyon, yıkımla sonuçlanmadan translasyon sonrası modifikasyonla da TGF-beta/BMP sinyal yolağını kontrol edebilir. SMAD4'ün translasyon sonrasında mono- veya oligo-ubikitine edildiği ve bu modifikasyonların SMAD4'ün R-SMAD'larla kompleks oluşturma verimliliğini değiştirerek sinyal yolağını etkilediği gösterilmiştir (228, 229). Bu bilgiler ışığında, mavi modüldeki ubikitin modifikasyonu; SMAD4 sinyal yolağı sonrası ubikitin proteazom sistemiyle kas protein yıkımını veya TGF/BMP sinyal yolağının ubikitin aracılı kontrolünü temsil ediyor olabilir. LAP1'le kas dokusunda birlikte ifade edilen merkez genler arasından SMAD4, ubikitin proteazom sistemi ile yukarıda açıklandığı gibi ilişkilendirilebileceği için, mavi modülün önemli bir temsili geni olarak görülmektedir.



Şekil 5.2. LAP1 proteini işlevsel tahmini. Şeklin üst kısmında, kasa özgü (WGCNA) ve global (COXPRESdb) olarak *TOR1AIP1*'le birlikte ifade edilen genlerin işlevsel zenginleştirme sonuçları verilmiştir. GO terimleri, istatistiksel olarak anlamlı terimler arasından temsili olarak seçilmiştir. Şeklin alt kısmında gen isimlerinin büyüklüğü, WGCNA metoduyla ulaşılan mavi modüle ait bağlantısallık (kME) değerlerini temsil etmektedir.

Ubikitin proteazom yolağı ve çekirdek iç zarı proteini arasındaki ilişkinin sinyal yolları üzerinden olması ihtimali yüksektir. Birçok çekirdek iç zarı proteininin hücre sinyal yollarını etkilediği bilinmektedir. LAP1 proteini ile fiziksel ilişkisi olduğu bilinen çekirdek iç zarı proteinlerden emerinin de hücre sinyal yollarını etkilemektedir. Emerin, ilerleyici kas atrofisi, kardiyomiyopati ve kontraktürlerle karakterize Emery-Dreifuss kas distrofisi fenotipinden sorumlu genidir (230). Emerin mutasyonu insanda kas distrofisi fenotipi oluşturmaya rağmen, emerinden yoksun fareler fenotipik olarak normaldir (231). Fakat, emerinden yoksun farelerde LAP1 protein düzeyinin azaltılması kas distrofisi fenotipinin oluşmasına neden olmaktadır. Ayrıca iskelet kasına özgül LAP1den yoksun farede emerinin düzeyinin azaltılması kas distrofisini kötüleştirmektedir. Fare ve insanlarda LAP1 düzeyleri karşılaştırıldığında, farede LAP1 protein düzeyinin insana göre çok daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle, farelerde emerinin eksikliğini telafi eden faktörün LAP1 olduğu düşünülmektedir. Aynı çalışma, LAP1 ve emerinin fiziksel olarak etkileşime girdiğini de göstermiştir. Bu sonuçlar, LAP1 ve emerinin ilişkisinin, distrofin ve utrofin ilişkisine benzer olduğunu göstermektedir. Bu bulgulara dayanarak, LAP1 ve emerinin proteinlerinin işlevsel olarak ilişkili olduğu öne sürülmüştür (215). Emerinin hücre sinyal yollarını etkilediği bilinmektedir, örnek olarak, mutant emerinin β -kateninin çekirdek içinde birikmesine neden olarak aktivitesini arttırdığı görülmüştür (232). Bunlara ek olarak, emerinden yoksun miyojenik öncüllerde, Notch, Wnt, TGF-beta ve IGF sinyal yolları komponentlerinin mRNA ve protein ifade düzeylerinin değiştiği ve miyojenik sinyal yolağının düzensizleştiği görülmüştür. Sonuç olarak, emerinin düzenli miyojenik sinyalleşme için esastır (233). Bu nedenle, fare çalışmalarından elde edilen LAP1 ve emerinin arasındaki işlevsel ilişki ve emerinin bilinen sinyalleşme işlevine dayanarak, LAP1'in de hücre sinyal yollarının kontrolünde rolü olabileceğini ileri sürülebilir.

Birlikte ifade edilme bilgisinden yararlanarak yapılan genin işlev tahminini destekleyebilmek için, protein dizi ve yapı analizi de kullanılabilir. Protein dizisi ve yapısı, proteinin işlevlerini ve etkileşim eşlerini tahmin etmek için kullanılabilir. LAP1 proteininin üç boyutlu yapısı veri tabanlarında

araştırıldığında, perinükleer bölgedeki kısmının yapısının belirlendiği fakat çekirdek içine bakan kısmının üç boyutlu yapısının henüz bilinmediği görülmüştür. Bu nedenle, LAP1 proteinin çekirdekteki kısmının protein etkileşim tahminleri hem kısıtlı hem de pek güvenilir değildir. Bu durumda protein – protein etkileşimi tahmini yerine protein dizisi analizi yapılması daha güvenilir sonuçlar verecektir. PSIPred protein dizi analiz platformu, LAP1 proteinin çekirdek içindeki kısmının düzensiz bir yapıya sahip olduğunu tahmin etmiştir. Ökaryotlarda düzensiz proteinler yaygındır ve önemli roller oynamaktadır (234-236). Düzensiz protein dizilerinin, kendiliğinden oluşan stabil üç boyutlu konformasyonu yoktur; fakat hızlıca birçok farklı konformasyon oluşturabilmektedirler. Böylece, düzensiz protein yapıları birçok farklı proteinle etkileşime girebilir. Etkileştikleri proteinlere bağlı olarak, dokuya özgü sinyal yollarında rol alabilir ve biyolojik ağlarda merkez protein olarak ortaya çıkabilirler (234-237). LAP1'in çekirdekteki kısmının düzensiz diziyeye sahip olması, birlikte ifade edilme modülünde merkez gen olarak ortaya çıkmasını ve dokuya özgü etkileşim özelliklerini açıklayabilir. LAP1 protein dizisinin özellikleri FFPred aracıyla incelendiğinde, LAP1 proteinin yüksek olasılıkla transkripsiyon kontrolünde rol alabileceği gösterilmiştir. Protein dizi analizi sonuçları, birlikte ifade edilme verileriyle ulaşılan LAP1 proteinin sinyal yolağı kontrolünde rol alması hipotezini desteklemektedir.

LAP1 proteini işlev tahmini için, kasa özgü ve korunmuş geniş kapsamlı birlikte ifade edilme sonuçları birleştirilerek LAP1'le işlevsel olarak ilişkili proteinler elde edilmiştir. LAP1'in de içinde bulunduğu kasta birlikte ifade edilme modülü, protein yıkımı ve mitokondri genlerini temsil etmektedir. Bu hücrel işlevler, korunmuş global düzeyde genlerin birlikte ifade edilme analizi sonucundan elde edilen işlevlerle karşılaştırıldığında, LAP1 proteininin ubiquitin konjugasyonu ve protein yıkımı sürecinde rolü olabileceği ileri sürülmüştür. Çekirdek iç zarı proteini olan LAP1'in, ubiquitin-proteazom sistemiyle ilişkisi sinyal yolları üzerinden olabilir. Birlikte ifade edilme verisinden elde edilen LAP1'le ilişkili diğer proteinler incelendiğinde, kas kütlesinin belirlenmesinde görevi olduğu bilinen SMAD4 proteinine rastlanmıştır. SMAD4 proteini, hem TGF-beta hem de BMP sinyal yolağının merkezi proteindir. SMAD4'ün kas

atrofisinde rol alması, ubikitin proteazom sistemi genleriyle aynı modülde bulunmasını açıklayabilir. Ayrıca LAP1 proteinin, emerine işlevsel olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir ve emerine proteini hücre sinyal yollarını etkilemektedir. Bu bulgu da, LAP1'in sinyal yolağında rolü olabileceğini desteklemektedir. Bunlara ek olarak, LAP1 proteininin dizi analizi sonuçları, bu proteinin transkripsiyon kontrolünde rol alabileceğini göstermiştir. Bu tez çalışmasında, birlikte ifade edilme ve protein dizi analizi sonuçlarına dayanarak LAP1 proteininin SMAD4 aracılı sinyal yolağını etkileyebileceği öne sürülmüştür.

Birlikte ifade edilme ve protein dizi analizi gibi biyoenformatik yöntemler genlerin işlevsel tahmininde başarıyla kullanılmıştır. Fakat bu yöntemler işlev mekanizmasının detaylarına dair kanıt verememektedir. Bu durumda, çekirdek iç zarı proteinlerinin sinyal yollarını etkileme mekanizmalarına dayanarak, LAP1'in sinyal yolağı kontrolündeki rolüne dair hipotez oluşturulabilir. *LEMD3* (*LEM domain containing 3*) geni tarafından kodlanan MAN1 proteini, TGF-beta sinyal yolağını etkileyen çekirdek zarı proteindir. MAN1, iki yolla TGF-beta sinyal yolağını inhibe eder. MAN1, FAST1 (*forkhead box H1*) transkripsiyon faktörüyle SMAD2 ve SMAD3'e bağlanmak için yarışır. Ayrıca, SMAD2 ve SMAD3'ü, transkripsiyon sonrası değiştiren fosfataz PPM1A (protein fosfataz, Mg²⁺/Mn²⁺ bağımlı, 1A) ile yakınlaştırarak, R-SMAD'ların defosforilasyonunu ve böylece etkisizleştirilmelerini sağlar (238, 239). Bu yöntemle benzer şekilde, LAP1, SMAD4 ve SMAD4'ü değiştiren enzimleri bir araya getirerek SMAD4'ün transkripsiyon sonrası modifikasyonu değiştirip, SMAD4'ün R-SMAD'larla veya diğer transkripsiyon faktörleriyle kompleks kurma verimliliğini etkileyebilir ya da rakip protein gibi davranarak SMAD4'ün transkripsiyonel faktörlerle birleşmesini engelliyor olabilir.

Disferlinopati ile ilişkili modüllerden birinde LAP1 proteinini kodlayan genin merkez gen olarak görülmesi önemli bir bulgudur. Kas distrofisiyle yakın zamanda ilişkilendirilmiş ve işlevleri iyi bilinmeyen bir gen olan *TOR1AIP1*'i, birlikte ifade edilme bulgularına dayanarak, disferlin proteininin hücre zarı tamiri işleviyle ilişkilendirmek zor görünmektedir. Fakat, LAP1 proteininin, disferlin mutasyonuna sekonder olarak oluşan kas distrofisi moleküler patogenezinde kritik bir role sahip olduğunu öne sürmek daha mantıklı

olacaktır. Eğer birlikte ifade edilme ve protein dizi analizi sonuçlarına dayanarak ön görüldüğü üzere, LAP1 proteini, SMAD4 ile ilişkili sinyal yolağının regülasyonunda rol oynuyorsa, bu sayede kas atrofisinden rejenerasyona ve fibrozise kadar kas distrofisi patogenezinin birçok temel basamağını etkileyebilir. Bu yüzden de birlikte ifade edilme ağ analizinde kritik genlerden biri olarak görünebilir. Disferlinopati patogenezinde TGF-beta sinyal yolağının rol aldđı gösterilmiştir. Halofujinon, SMAD3 fosforilasyonunu ve SMAD3'ün çekirdek içine girmesini engelleyerek TGF-beta sinyal yolağını etkiler. Disferlinden yoksun fareler, halofujinona maruz bırakıldığında, fibrozisin ve enflamatuar infiltratın azaldđı, kas performansının arttığı gözlenmiştir (240). Bu bulgular, disferlinopatide TGF-beta yolağının önemini vurgulamaktadır. Bu durumda, eğer LAP1 proteini SMAD4 aracılı sinyal yolağını denetliyorsa, disferlinopati patogenezinde *TOR1AIP1*'in anahtar genlerden biri olması anlaşılabilir. WGCNA ve COXPRESdb'den elde edilen *TOR1AIP1* ile birlikte ifade edilen genler incelendiğinde torsin A geninin bu modüde bulunmadığı görülmektedir. Yine LAP1 ile etkileşime giren emerin proteini incelendiğinde ise, daha düşük modül bağlantısallık değerisi olmasına rağmen emerin proteini kodlayan *EMD* geninin de mavi modüde görüldüğü saptanmıştır. Bu durumda, LAP1 proteininin dokuya özgü işlevleri olduğu göz önünde bulundurulduğunda, LAP1 proteininin kas distrofisindeki rolü torsinle etkileşiminden bağımsız olabilir. Shin ve diğerleri (241), çekirdek zarfı hastalıklarında dokuya özgü patoloji oluşturmasının nedeninin bireysel proteinden öte, proteinlerin kurduğu kompleksler olduğunu öne sürmüştür. LAP1'in sırasıyla nöronal ve kas dokuda önemi gösterilmiş torsin ve emerinle etkileşimine dayanarak, LAP1'in kas dokusuna özgü işlevlerinin torsinden bağımsız daha çok emerinle ilişkili olabileceği düşünülebilir. Bu durumda LAP1'in emerin gibi hücrenel sinyal yolaklarını etkilemesi, disferlinopatide LAP1 proteininin anahtar proteinlerden biri olmasına neden olabilir.

Bu tez çalışmasında kullanılan mikrodizin verisi ilk kez bu çalışmada WGCNA yöntemiyle incelenmiştir. Bu nedenle, bu mikrodizin serisinin birlikte ifade edilme analiziyle yeniden incelenmesi, bu serinin analiz edildiği ilk yayınlara ek olarak yeni bilgiler sunmuştur. Bu mikrodizin verileri kullanılarak

kas rejenerasyonu ile ilişkili yayınlar yapılmıştır (165, 242) (243) Bu mikrodizin serisinin birlikte ifade edilme analiziyle incelenmesi, önceki çalışmalara ek olarak disferlinopati patogeneğinde rol oynayan farklı aday genlerin ortaya konulmasını sağlamıştır. Bu sonuçların protein dizi analiziyle birleştirilmesi, kas distrofisiyle ilişkilendirilen LAP1 proteinin işlev tahmininin yapılmasını sağlamıştır. Ayrıca yıllar içinde yeni genlerin tanımlanıyor olması ve genler hakkındaki literatür bilgisinin artıyor olması nedeniyle, mikrodizin analizleri tekrar incelendiğinde daha fazla bilinen gen olduğu için elde edilen bilgi artmaktadır. Bu nedenle de farklı yöntemle yapılan tekrar edilen mikrodizin analizi literatüre katkıda bulunmuştur.

Bu tez çalışmasının bazı kısıtlamaları vardır. WGCNA ile birlikte ifade edilme ağı oluşturulduğunda modüllerin korunmuşluğu tespit edilerek, oluşturulan modüller doğrulanmıştır. Fakat WGCNA analizini daha fazla sayıda örnekle yapabilmek, modülleri daha stabil hale getirecektir. Eğer analiz için daha fazla örnek kullanılmış olsaydı, gürültü azalacağı için, daha çok sayıda ve daha özgül modüller oluşturulabilirdi. Fakat, disferlinopati hastalığı, tek gen hastalığı olduğu ve diyabet, obezite, kanser gibi kompleks ve daha sık görülen hastalıklar grubundan olmadığı için GEO veri tabanında daha geniş bir disferlinopati hasta serisine ulaşamamıştır. Farklı mikrodizin serilerindeki disferlinopati hasta verilerinin birleştirilerek incelenmesi düşünülmüştür. Fakat bu durumda, hem farklı mikro dizin platformlarının normalize edilmesi sorunu hem de her çalışmada bilimsel soruya uygun olarak oluşturulan farklı deney düzeneklerinde kullanılan kontrol grubu ve hasta seçim kriterlerinin farklılığı nedeni ile mikrodizinlerin beraber işlenmesinin uygun olmadığı ön görülmüştür. Bu sınırlama, tek mikrodizin serisi kullanılmasına ve az örnek sayısı olduğundan güvenilir sonuçlar elde edilebilmesi için, daha büyük ve az sayıda modül oluşturulmasına neden olmuştur. Bu nedenle, WGCNA, disferlinopati ve LGMD2A kas distrofisinin karşılaştırılması için kullanıldığında, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gösteren modüllere ulaşamamıştır. Eğer bu kas distrofileri için daha geniş mikrodizin verilerine ulaşırsa, birlikte ifade edilme ağından biyolojik olarak anlamlı ve daha özgül modüller belirlenerek, kas distrofileri arasındaki farklar çalışılabilir.

Bu tez çalışması biyoenformatik analiz yöntemini kullandığı için, elde edilen sonuçlar ıslak laboratuvarda doğrulanmamıştır. Oluşturulan varsayımların test edilebilmesi için, ıslak laboratuvar deneylerinin yürütülmesi gerekmektedir. Ancak zaten *in silico* analizlerin amacı, ıslak laboratuvar çalışmalarına geçmeden önce desteklenmiş hipotezler oluşturmak ve böylece deneysel yükü azaltıp hedefe yönelik deneyler planlanmasına yardımcı olarak bilimsel ilerlemeyi hızlandırmaktır.

Proteinlerin üç boyutlu yapısı bilindiği takdirde, etkileşim partnerlerini tahmin eden biyoenformatik analiz yöntemleri için seçenekler artmaktadır. Hatta proteinlerin üç boyutlu yapısı bilinmediği takdirde bile, homolog model veri tabanları kullanılarak protein etkileşimleri tahmin edilmeye çalışılmaktadır. Proteinlerin yapısal, işlevsel ya da ifade bilgilerini kullanarak analiz yapan birçok farklı protein – protein etkileşim veri tabanları vardır. Hatta bu farklı yöntemleri birleştirerek tahminlerde bulunan araçlar da mevcuttur, buna örnek PrePPI veri tabanı verilebilir (244, 245). Fakat, LAP1 proteininin çekirdekteki kısmının düzensiz protein dizisi göstermesi, yapı üzerinden protein – protein etkileşim tahmini yapan veri tabanlarının sonuçlarını olumsuz etkilemiştir. Bu nedenle, analizde yapı üzerinden protein etkileşimi tahmin eden veri tabanları yerine protein dizisi özelliklerine dayanarak protein işlevi tahmin eden araç kullanılmıştır. LAP1 proteininin yapısına dair daha detaylı bilgiler edinildiğinde, protein – protein etkileşimleri de *in silico* yöntemlerle tahmin edilebilir.

Zamanın çok değerli olduğu bilim dünyasında, *in silico* analizler moleküler biyoloji ve genetik alanının vazgeçilmez bir parçası haline gelmektedir. Hem bilginin verimli kullanılabilmesi hem de bilimin ilerlemesinde hız kazanılabilmesi için, işlemsel biyolojinin iş akışlarına eklenmesi gerekmektedir. Bu tez çalışması disferlinopati patogenezinin incelenmesinde, metin madenciliği ve genlerin birlikte ifade edilme ağı analizi yöntemlerini birleştirerek yeni bir bakış açısı sunmuştur. Ayrıca yeni tanımlanan kas distrofisi genlerinden *TOR1AIP1*'in, birlikte ifade edilme ve protein dizi analizi yöntemleriyle işlevsel tahmini yapılmıştır. Böylece, disferlinopati ve *TOR1AIP1*

mutasyonuyla giden kas distrofisi çalışma grupları için, patogeneze dair yeni hipotezler kurulmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, kas distrofileri grubundan disferlinopatinin moleküler patogenezi aydınlatmak amacıyla metin madenciliği ve genlerin birlikte ifade edilme ağı analizi yöntemleri kullanılmıştır. Birlikte ifade edilme ağ analizinde, disferlinle ilişkili modülde merkez genlerden biri olarak yeni tanımlanmış kas distrofisi genlerinden *TOR1AIP1*'in saptanması üzerine, birlikte ifade edilme verilerinin *guilt-by-association* yöntemine dayanarak *TOR1AIP1* geninin işlevsel tahmininin yapılması için kullanılmasına karar verilmiştir. *TOR1AIP1*'in kodladığı LAP1 proteininin, birlikte ifade edilme ve protein dizi analizi sonuçlarıyla işlevsel incelemesi yapılmıştır.

6.1. Sonuçlar

- Hastalık moleküler patogenezinin aydınlatılması, anahtar genlerin tespit edilmesi, gen işlev tahmini yapılabilmesi ve yeni hipotezler kurulabilmesi için metin ve veri madenciliğinin birleşimsel kullanımını sağlayan iş akışı ortaya konmuştur.
- Metin madenciliğiyle disferlinopati araştırması, disferlinopati patogenezinde rol oynayan temel hücre yolakları ve disferlinin temel işlevlerini ortaya koymuştur. Disferlinin hücre zarı tamirinde, miyogenezde ve hücre adezyonunda rolü olduğu belirlenmiştir.
- Metin madenciliği sonuçları, disferlinopatide yaygın artmış enflamasyon ve immün sistem aktivasyonunun önemini ortaya koymuştur.
- Metin madenciliğinden elde edilen disferlinle ilişkili proteinlerin işlevsel zenginleştirme sonuçları sayesinde, disferlinin apoptoz düzeneği kontrolünde rolü olabileceğine ulaşılmıştır. Literatürde disferlin proteinin apoptozla ilişkisine dair doğrudan çalışma olmamasına rağmen, disferlinin apoptoz düzeneği kontrolünde rolü olabileceğine dair varsayımda bulunan gruplar olmuştur. Bu nedenle, elde edilen bu sonuç ıslak laboratuvarında çalışılması gereken bir önemli bir bulgudur.
- Metin madenciliği bulgularıyla, disferlinle ilişkili protein – protein etkileşim ağı oluşturulmuştur. Bu sayede, disferlinle ilişkili diğer kas distrofisi proteinlerine ve disferlinin işlevleri yerine getirmek için

beraber çalıştığı proteinlere ulaşılmıştır. Ayrıca, protein – protein etkileşim ağı, ubiquitin proteazom sisteminin disferlinopati patogenezinde önemli olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, literatür bilgisiyle desteklenmiştir.

- Birlikte ifade edilme ağı analizi sayesinde, disferlinopati için kritik hücre yolakları belirlenmiştir. Disferlinopatide hücre dışı matris bileşenlerinin, mitokondriyal genlerin, ubiquitin proteazom sisteminin ve enflamasyonun rolü olduğu bulunmuştur.
- Disferlinopatideki önemli hücre yolaklarının anahtar genleri belirlenmiştir. Disferlinopatide hücre dışı matris yeniden düzenlenmesinde TIMP-1'in önemli genlerden biri olduğu bu çalışmayla ortaya konulmuştur. Ayrıca, bu tez çalışmasında, birlikte ifade edilme ağı analizi sonuçları OXR1'in kas distrofilerinde oksidatif strese karşı önemli bir rolü olabileceğini göstermiştir. Böylece, ıslak laboratuvar çalışmalarında, biyobelirteç ya da tedavi hedefi olabilecek genler ortaya konulmuştur.
- Disferlinopatinin anahtar genlerinden birinin *TOR1AIP1* olarak bulunması üzerine, *in silico* analiz yöntemleri kullanılarak, *TOR1AIP1* geninin işlevinin araştırması yapılmıştır. Korunmuş, global düzeyde genlerin birlikte ifade edilme analizi ve kasa özgü birlikte ifade edilme analizi işlevsel zenginleştirme sonuçları birleştirilerek, *TOR1AIP1* geninin ubiquitin konjugasyonu ve protein yıkımıyla işlevsel olarak ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Global ve kasa özgü birlikte ifade edilme analizindeki genler incelenerek, *TOR1AIP1*'le geniyle olası ilişkili genler listesine ulaşılmıştır. Bu aday gen listesinden, literatür taraması yapılarak, SMAD4 proteininin protein yıkımıyla ilişkilendirilebilecek, kas kütlesi belirlenmesinde temel rol oynayan genlerden biri olduğu görülmüştür. Bu nedenle, öncelikli çalışılması gereken genlerden biri olarak SMAD4 seçilmiştir.
- LAP1 proteininin işlevsel tahmininin yapılabilmesi için, homolojiden bağımsız protein dizi özelliklerine dayanarak işlev tahmini yapan analiz araçları kullanılmıştır. LAP1 protein dizisindeki düzensiz dizilerin

konumu ve uzunluğu, amino asit kompozisyonu, ikincil protein yapıları gibi özelliklere dayanarak, LAP1 proteininin transkripsiyon denetlenmesinde işlevi olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

- LAP1 proteini için global ve kasa özgü birlikte ifade edilme analizi ve protein dizi analizi sonuçları birleştirildiğinde, LAP1 proteininin SMAD4 ilişkili sinyal yolağında rolü olabileceği öne sürülmüştür.

6.2. Öneriler

Bu tez çalışmasında, disferlin proteini işlevleri, disferlinopati patogenezi ve LAP1 proteini işlevleri biyoenformatik yöntemle analiz edilmiştir. *In silico* çalışmalar, biyomedikal alanda deneysel yükün kayda değer şekilde azaltılmasına ve hedefe yönelik deneylerin planlanmasına yardımcı olmaktadır. Bu çalışmanın sonuçları ışığında gelecekte yapılabilecek bazı çalışmalar aşağıda belirtilmiştir.

- Disferlinopatide tespit edilen anahtar genlerin kodladığı proteinlerin düzeyleri çalışılmalıdır. TIMP1 proteini, Duchenne kas distrofisinde tedavi takibi için biyobelirteç olarak önerilmiştir. TIMP1 proteininin disferlinopatide hastalık ağırlığına göre veya tedavi takibinde düzeyleri çalışılmalı ve biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmalıdır. TIMP1 ve matris metalloproteinaz proteinleri (MMP) hücre dışı matris bileşenlerini düzenlediği için kas satellit hücre nişini etkileyerek rejenerasyonu etkileyebilir. Bu nedenle, TIMP1 ve MMP proteinlerini hedefleyen tedavi seçeneklerinin de disferlin yokluğundaki yeri araştırılmalıdır. OXR1 proteini, oksidatif strese karşı koruma sağlamakta fakat mekanizması tam olarak bilinmemektedir. OXR1 proteini özellikle nöronal dokuda amyotrofik lateral sklerozda çalışılmış ve umut verici sonuçlara ulaşılmıştır. OXR1 proteini kas distrofilerinde çalışılmamıştır. Disferlinopatide anahtar genlerden biri olarak bulunan *OXR1* geni, disferlinopatide artmış oksidatif stres görüldüğü için çalışılması gereken bir genidir. Disferlinopatide OXR1 proteinin düzeyi belirlenebilir ve OXR1 protein düzeyinin arttırılmasının kas patolojisini azaltıp azaltmadığı incelenebilir.

- Bu tez çalışmasında LAP1 proteininin işlev tahmini yapılırken, birlikte ifade edilme verisi sayesinde LAP1'le ilişkili olabilecek proteinlere ulaşılmıştır. Bu aday gen listesinden, LAP1'le ilişkili genlerin önceliklendirilmesi aşamasına, literatür taramasına ek olarak biyoenformatik analizler eklenebilir böylece aday gen seçimi güçlendirilebilir. Birlikte ifade edilme analiziyle ulaşılan aday genler, metin madenciliği analiziyle tekrar araştırılarak bu genler arasında distrofi ve protein yıkımıyla ilişkili genler seçilebilir. Ayrıca bu geniş gen listesi kullanılarak DAVID aracıyla işlevsel zenginleştirme analizi yapılabilir ve KEGG üzerinden ulaşılan yolak haritaları incelenerek aday gen önceliklendirilmesi yapılabilir. LAP1 proteininin çekirdek içine bakan kısmının üç boyutlu yapısı belirlendiği takdirde, yapı üzerinden protein etkileşimi tahmini yapan araçlar kullanılarak, olası etkileşim bilgisi sayesinde aday gen seçilebilir.
- LAP1 proteininin SMAD4 ile olası ilişkisi araştırılmalıdır. LAP1 ve SMAD4'ün doğrudan fiziksel etkileşimi olup olmadığı incelenmelidir. LAP1'in TGF-beta veya BMP sinyal yolağındaki etkisini ölçmek için, LAP1 ifadesi susturulduğunda TGF-beta ve BMP sinyal yolağı aktivitesindeki değişim ölçülebilir. Böylece LAP1 ve SMAD4 arasında doğrudan etkileşim olmasa bile, LAP1 yokluğunda TGF-beta ya da BMP yolaklarının etkilenip etkilenmediği görülmüş olur. Sinyal yolağının etkilenmiş olduğu görüldüğü takdirde, sinyal yolağının hangi mekanizmayla etkilendiği araştırılmalıdır. Bunun için, SMAD4 proteininin translasyon sonrası modifikasyonlarında ya da SMAD4'ün R-Smadlarla kompleks kurma etkinliğinde değişim olup olmadığı incelenebilir. Eğer LAP1 proteininin, ön görüldüğü üzere TGF-beta/BMP sinyal yolağını denetleme rolü varsa, LAP1 mutant kas distrofisinde TGF-beta/BMP sinyal yolağındaki değişimin yarattığı sonuçlar araştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Emery, A.E. (1998). The muscular dystrophies. *BMJ*, 317(7164), 991-5.
2. Tyler, K.L. (2003). Origins and early descriptions of "Duchenne muscular dystrophy". *Muscle and Nerve*, 28(4), 402-22.
3. Walton, J.N. ve Nattrass, F.J. (1954). On the classification, natural history and treatment of the myopathies. *Brain*, 77(2), 169-231.
4. Mahmood, O.A. ve Jiang, X.M. (2014). Limb-girdle muscular dystrophies: where next after six decades from the first proposal (Review). *Molecular Medicine Reports*, 9(5), 1515-32.
5. Bushby, K.M. (1995). Diagnostic criteria for the limb-girdle muscular dystrophies: report of the ENMC Consortium on Limb-Girdle Dystrophies. *Neuromuscular Disorders*, 5(1), 71-4.
6. Landfeldt, E., Lindgren, P., Bell, C.F., Schmitt, C., Guglieri, M., Straub, V., ve diğerleri. (2014). The burden of Duchenne muscular dystrophy: an international, cross-sectional study. *Neurology*, 83(6), 529-36.
7. Dincer, P. (2006) Consanguinity and Neuromuscular Disorders in Turkey[Bildir]. 11th International Congress on Neuromuscular Disease (ICNMD). Istanbul, Türkiye.
8. Nigro, V. (2003). Molecular bases of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Acta Myologica*, 22(2), 35-42.
9. Fanin, M., Nascimbeni, A.C., Aurino, S., Tasca, E., Pegoraro, E., Nigro, V., ve diğerleri. (2009). Frequency of LGMD gene mutations in Italian patients with distinct clinical phenotypes. *Neurology*, 72(16), 1432-5.
10. Bushby, K., Straub, V., Lochmuller, H., Eagle, M., Guglieri, M., Hastings, L., ve diğerleri. (2013). Erişim: Nisan 2015, <http://www.musculardystrophyuk.org/app/uploads/2015/02/lgmd-general.pdf>
11. Wicklund, M.P. ve Kissel, J.T. (2014). The limb-girdle muscular dystrophies. *Neurologic Clinics*, 32(3), 729-49, ix.
12. Amato, A.A. ve Brown, R.H., Jr. (2011). Dysferlinopathies. *Handbook of Clinical Neurology*, 101, 111-8.
13. Fleuren, W.W. ve Alkema, W. (2015). Application of text mining in the biomedical domain. *Methods*, 74, 97-106.
14. Langfelder, P. ve Horvath, S. (2008). WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*, 9, 559.
15. Wicklund, M.P. (2013). The muscular dystrophies. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 19(6 Muscle Disease), 1535-70.
16. Alderton, J.M. ve Steinhardt, R.A. (2000). Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent

- proteolysis in dystrophic myotubes. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), 9452-60.
17. Kumar, A. ve Boriek, A.M. (2003). Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. *FASEB Journal*, 17(3), 386-96.
 18. Rajakumar, D., Senguttuvan, S., Alexander, M., ve Oommen, A. (2014). Involvement of oxidative stress, nuclear factor kappa B and the ubiquitin proteasomal pathway in dysferlinopathy. *Life Sciences*, 108(1), 54-61.
 19. Williams, D.A., Head, S.I., Bakker, A.J., ve Stephenson, D.G. (1990). Resting calcium concentrations in isolated skeletal muscle fibres of dystrophic mice. *Journal of Physiology*, 428, 243-56.
 20. Wyke, S.M. ve Tisdale, M.J. (2005). NF-kappaB mediates proteolysis-inducing factor induced protein degradation and expression of the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle. *British Journal of Cancer*, 92(4), 711-21.
 21. Spencer, M.J. ve Mellgren, R.L. (2002). Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. *Human Molecular Genetics*, 11(21), 2645-55.
 22. Millay, D.P., Sargent, M.A., Osinska, H., Baines, C.P., Barton, E.R., Vuagniaux, G., ve diğerleri. (2008). Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. *Nature Medicine*, 14(4), 442-7.
 23. Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochemical Journal*, 341 (Pt 2), 233-49.
 24. Kavanagh, N.I., Ainscow, E.K., ve Brand, M.D. (2000). Calcium regulation of oxidative phosphorylation in rat skeletal muscle mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1457(1-2), 57-70.
 25. Griffin, J.L., Williams, H.J., Sang, E., Clarke, K., Rae, C., ve Nicholson, J.K. (2001). Metabolic profiling of genetic disorders: a multitissue (1)H nuclear magnetic resonance spectroscopic and pattern recognition study into dystrophic tissue. *Analytical Biochemistry*, 293(1), 16-21.
 26. Chen, Y.W., Zhao, P., Borup, R., ve Hoffman, E.P. (2000). Expression profiling in the muscular dystrophies: identification of novel aspects of molecular pathophysiology. *Journal of Cell Biology*, 151(6), 1321-36.
 27. Haycock, J.W., MacNeil, S., Jones, P., Harris, J.B., ve Mantle, D. (1996). Oxidative damage to muscle protein in Duchenne muscular dystrophy. *Neuroreport*, 8(1), 357-61.
 28. Whitehead, N.P., Yeung, E.W., Froehner, S.C., ve Allen, D.G. (2010). Skeletal muscle NADPH oxidase is increased and triggers stretch-induced damage in the mdx mouse. *PLoS One*, 5(12), e15354.
 29. Acharyya, S., Villalta, S.A., Bakkar, N., Bupha-Intr, T., Janssen, P.M., Carathers, M., ve diğerleri. (2007). Interplay of IKK/NF-kappaB signaling

- in macrophages and myofibers promotes muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Clinical Investigation*, 117(4), 889-901.
30. Page-McCaw, A., Ewald, A.J., ve Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 8(3), 221-33.
 31. Matsumura, K., Zhong, D., Saito, F., Arai, K., Adachi, K., Kawai, H., ve diğerleri. (2005). Proteolysis of beta-dystroglycan in muscular diseases. *Neuromuscular Disorders*, 15(5), 336-41.
 32. Roma, J., Munell, F., Fargas, A., ve Roig, M. (2004). Evolution of pathological changes in the gastrocnemius of the mdx mice correlate with utrophin and beta-dystroglycan expression. *Acta Neuropathologica*, 108(5), 443-52.
 33. Kumar, A., Bhatnagar, S., ve Kumar, A. (2010). Matrix metalloproteinase inhibitor batimastat alleviates pathology and improves skeletal muscle function in dystrophin-deficient mdx mice. *American Journal of Pathology*, 177(1), 248-60.
 34. Mann, C.J., Perdiguero, E., Kharraz, Y., Aguilar, S., Pessina, P., Serrano, A.L., ve diğerleri. (2011). Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skeletal Muscle*, 1(1), 21.
 35. Burks, T.N. ve Cohn, R.D. (2011). Role of TGF-beta signaling in inherited and acquired myopathies. *Skeletal Muscle*, 1(1), 19.
 36. Shin, J., Tajrishi, M.M., Ogura, Y., ve Kumar, A. (2013). Wasting mechanisms in muscular dystrophy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(10), 2266-79.
 37. Onofre-Oliveira, P.C., Santos, A.L., Martins, P.M., Ayub-Guerrieri, D., ve Vainzof, M. (2012). Differential expression of genes involved in the degeneration and regeneration pathways in mouse models for muscular dystrophies. *Neuromolecular Medicine*, 14(1), 74-83.
 38. Li, Y., Foster, W., Deasy, B.M., Chan, Y., Prisk, V., Tang, Y., ve diğerleri. (2004). Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. *American Journal of Pathology*, 164(3), 1007-19.
 39. Grobet, L., Martin, L.J., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., ve diğerleri. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-musled phenotype in cattle. *Nature Genetics*, 17(1), 71-4.
 40. Wagner, K.R., McPherron, A.C., Winik, N., ve Lee, S.J. (2002). Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. *Annals of Neurology*, 52(6), 832-6.
 41. Bogdanovich, S., Krag, T.O., Barton, E.R., Morris, L.D., Whittemore, L.A., Ahima, R.S., ve diğerleri. (2002). Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature*, 420(6914), 418-21.

42. McCroskery, S., Thomas, M., Maxwell, L., Sharma, M., ve Kambadur, R. (2003). Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *Journal of Cell Biology*, 162(6), 1135-47.
43. Drachman, D.B., Toyka, K.V., ve Myer, E. (1974). Prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet*, 2(7894), 1409-12.
44. Mendell, J.R., Moxley, R.T., Griggs, R.C., Brooke, M.H., Fenichel, G.M., Miller, J.P., ve diğerleri. (1989). Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in Duchenne's muscular dystrophy. *New England Journal of Medicine*, 320(24), 1592-7.
45. Walter, M.C., Reilich, P., Thiele, S., Schessl, J., Schreiber, H., Reiners, K., ve diğerleri. (2013). Treatment of dysferlinopathy with deflazacort: a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8, 26.
46. Bushby, K.M. (1999). The limb-girdle muscular dystrophies-multiple genes, multiple mechanisms. *Human Molecular Genetics*, 8(10), 1875-82.
47. Jain Foundation. Erişim: Nisan 2015, <http://www.jain-foundation.org/alda/>
48. Emery, A.E. (1991). Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscular Disorders*, 1(1), 19-29.
49. Guglieri, M., Magri, F., D'Angelo, M.G., Prelle, A., Morandi, L., Rodolico, C., ve diğerleri. (2008). Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients. *Human Mutation*, 29(2), 258-66.
50. Norwood, F.L., Harling, C., Chinnery, P.F., Eagle, M., Bushby, K., ve Straub, V. (2009). Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population. *Brain*, 132(Pt 11), 3175-86.
51. Nigro, V. ve Savarese, M. (2014). Genetic basis of limb-girdle muscular dystrophies: the 2014 update. *Acta Myologica*, 33(1), 1-12.
52. Young, K., Foroud, T., Williams, P., Jackson, C.E., Beckmann, J.S., Cohen, D., ve diğerleri. (1992). Confirmation of linkage of limb-girdle muscular dystrophy, type 2, to chromosome 15. *Genomics*, 13(4), 1370-1.
53. Beckmann, J.S., Richard, I., Hillaire, D., Broux, O., Antignac, C., Bois, E., ve diğerleri. (1991). A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série III: Sciences de la Vie*, 312(4), 141-8.
54. Richard, I., Broux, O., Allamand, V., Fougerousse, F., Chiannikulchai, N., Bourg, N., ve diğerleri. (1995). Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Cell*, 81(1), 27-40.
55. Bashir, R., Strachan, T., Keers, S., Stephenson, A., Mahjneh, I., Marconi, G., ve diğerleri. (1994). A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 2p. *Human Molecular Genetics*, 3(3), 455-7.

56. Bashir, R., Britton, S., Strachan, T., Keers, S., Vafiadaki, E., Lako, M., ve diğerleri. (1998). A gene related to *Caenorhabditis elegans* spermatogenesis factor *fer-1* is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nature Genetics*, 20(1), 37-42.
57. Liu, J., Aoki, M., Illa, I., Wu, C., Fardeau, M., Angelini, C., ve diğerleri. (1998). Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nature Genetics*, 20(1), 31-6.
58. Ben Othmane, K., Ben Hamida, M., Pericak-Vance, M.A., Ben Hamida, C., Blel, S., Carter, S.C., ve diğerleri. (1992). Linkage of Tunisian autosomal recessive Duchenne-like muscular dystrophy to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature Genetics*, 2(4), 315-7.
59. Azibi, K., Bachner, L., Beckmann, J.S., Matsumura, K., Hamouda, E., Chaouch, M., ve diğerleri. (1993). Severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy with the deficiency of the 50 kDa dystrophin-associated glycoprotein maps to chromosome 13q12. *Human Molecular Genetics*, 2(9), 1423-8.
60. McNally, E.M., Passos-Bueno, M.R., Bonnemann, C.G., Vainzof, M., de Sa Moreira, E., Lidov, H.G., ve diğerleri. (1996). Mild and severe muscular dystrophy caused by a single gamma-sarcoglycan mutation. *American Journal of Human Genetics*, 59(5), 1040-7.
61. Noguchi, S., McNally, E.M., Ben Othmane, K., Hagiwara, Y., Mizuno, Y., Yoshida, M., ve diğerleri. (1995). Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science*, 270(5237), 819-22.
62. Piccolo, F., Jeanpierre, M., Leturcq, F., Dode, C., Azibi, K., Toutain, A., ve diğerleri. (1996). A founder mutation in the gamma-sarcoglycan gene of gypsies possibly predating their migration out of India. *Human Molecular Genetics*, 5(12), 2019-22.
63. Piccolo, F., Roberds, S.L., Jeanpierre, M., Leturcq, F., Azibi, K., Beldjord, C., ve diğerleri. (1995). Primary adhalinopathy: a common cause of autosomal recessive muscular dystrophy of variable severity. *Nature Genetics*, 10(2), 243-5.
64. Roberds, S.L., Leturcq, F., Allamand, V., Piccolo, F., Jeanpierre, M., Anderson, R.D., ve diğerleri. (1994). Missense mutations in the adhalin gene linked to autosomal recessive muscular dystrophy. *Cell*, 78(4), 625-33.
65. Ljunggren, A., Duggan, D., McNally, E., Boylan, K.B., Gama, C.H., Kunkel, L.M., ve diğerleri. (1995). Primary adhalin deficiency as a cause of muscular dystrophy in patients with normal dystrophin. *Annals of Neurology*, 38(3), 367-72.
66. Carrie, A., Piccolo, F., Leturcq, F., de Toma, C., Azibi, K., Beldjord, C., ve diğerleri. (1997). Mutational diversity and hot spots in the alpha-

- sarcoglycan gene in autosomal recessive muscular dystrophy (LGMD2D). *Journal of Medical Genetics*, 34(6), 470-5.
67. Bonnemann, C.G., Modi, R., Noguchi, S., Mizuno, Y., Yoshida, M., Gussoni, E., ve diğerleri. (1995). Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nature Genetics*, 11(3), 266-73.
 68. Bonnemann, C.G., Passos-Bueno, M.R., McNally, E.M., Vainzof, M., de Sa Moreira, E., Marie, S.K., ve diğerleri. (1996). Genomic screening for beta-sarcoglycan gene mutations: missense mutations may cause severe limb-girdle muscular dystrophy type 2E (LGMD 2E). *Human Molecular Genetics*, 5(12), 1953-61.
 69. Lim, L.E., Duclos, F., Broux, O., Bourg, N., Sunada, Y., Allamand, V., ve diğerleri. (1995). Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nature Genetics*, 11(3), 257-65.
 70. Nigro, V., de Sa Moreira, E., Piluso, G., Vainzof, M., Belsito, A., Politano, L., ve diğerleri. (1996). Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nature Genetics*, 14(2), 195-8.
 71. Passos-Bueno, M.R., Moreira, E.S., Vainzof, M., Marie, S.K., ve Zatz, M. (1996). Linkage analysis in autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (AR LGMD) maps a sixth form to 5q33-34 (LGMD2F) and indicates that there is at least one more subtype of AR LGMD. *Human Molecular Genetics*, 5(6), 815-20.
 72. Moreira, E.S., Vainzof, M., Marie, S.K., Sertie, A.L., Zatz, M., ve Passos-Bueno, M.R. (1997). The seventh form of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy is mapped to 17q11-12. *American Journal of Human Genetics*, 61(1), 151-9.
 73. Moreira, E.S., Wiltshire, T.J., Faulkner, G., Nilforoushan, A., Vainzof, M., Suzuki, O.T., ve diğerleri. (2000). Limb-girdle muscular dystrophy type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nature Genetics*, 24(2), 163-6.
 74. Frosk, P., Weiler, T., Nylén, E., Sudha, T., Greenberg, C.R., Morgan, K., ve diğerleri. (2002). Limb-girdle muscular dystrophy type 2H associated with mutation in TRIM32, a putative E3-ubiquitin-ligase gene. *American Journal of Human Genetics*, 70(3), 663-72.
 75. Weiler, T., Greenberg, C.R., Zelinski, T., Nylén, E., Coghlan, G., Crumley, M.J., ve diğerleri. (1998). A gene for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in Manitoba Hutterites maps to chromosome region 9q31-q33: evidence for another limb-girdle muscular dystrophy locus. *American Journal of Human Genetics*, 63(1), 140-7.
 76. Brockington, M., Yuva, Y., Prandini, P., Brown, S.C., Torelli, S., Benson, M.A., ve diğerleri. (2001). Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of

- congenital muscular dystrophy MDC1C. *Human Molecular Genetics*, 10(25), 2851-9.
77. Driss, A., Amouri, R., Ben Hamida, C., Souilem, S., Gouider-Khouja, N., Ben Hamida, M., ve diğerleri. (2000). A new locus for autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy in a large consanguineous Tunisian family maps to chromosome 19q13.3. *Neuromuscular Disorders*, 10(4-5), 240-6.
 78. Hackman, P., Vihola, A., Haravuori, H., Marchand, S., Sarparanta, J., De Seze, J., ve diğerleri. (2002). Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in TTN, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin. *American Journal of Human Genetics*, 71(3), 492-500.
 79. Balci, B., Uyanik, G., Dincer, P., Gross, C., Willer, T., Talim, B., ve diğerleri. (2005). An autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (LGMD2) with mild mental retardation is allelic to Walker-Warburg syndrome (WWS) caused by a mutation in the POMT1 gene. *Neuromuscular Disorders*, 15(4), 271-5.
 80. Bolduc, V., Marlow, G., Boycott, K.M., Saleki, K., Inoue, H., Kroon, J., ve diğerleri. (2010). Recessive mutations in the putative calcium-activated chloride channel Anoctamin 5 cause proximal LGMD2L and distal MMD3 muscular dystrophies. *American Journal of Human Genetics*, 86(2), 213-21.
 81. Hicks, D., Sarkozy, A., Muelas, N., Koehler, K., Huebner, A., Hudson, G., ve diğerleri. (2011). A founder mutation in Anoctamin 5 is a major cause of limb-girdle muscular dystrophy. *Brain*, 134(Pt 1), 171-82.
 82. Jarry, J., Rioux, M.F., Bolduc, V., Robitaille, Y., Khoury, V., Thiffault, I., ve diğerleri. (2007). A novel autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy with quadriceps atrophy maps to 11p13-p12. *Brain*, 130(Pt 2), 368-80.
 83. Godfrey, C., Escolar, D., Brockington, M., Clement, E.M., Mein, R., Jimenez-Mallebrera, C., ve diğerleri. (2006). Fukutin gene mutations in steroid-responsive limb girdle muscular dystrophy. *Annals of Neurology*, 60(5), 603-10.
 84. Murakami, T., Hayashi, Y.K., Noguchi, S., Ogawa, M., Nonaka, I., Tanabe, Y., ve diğerleri. (2006). Fukutin gene mutations cause dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness. *Annals of Neurology*, 60(5), 597-602.
 85. Biancheri, R., Falace, A., Tessa, A., Pedemonte, M., Scapolan, S., Cassandrini, D., ve diğerleri. (2007). POMT2 gene mutation in limb-girdle muscular dystrophy with inflammatory changes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 363(4), 1033-7.
 86. Clement, E., Mercuri, E., Godfrey, C., Smith, J., Robb, S., Kinali, M., ve diğerleri. (2008). Brain involvement in muscular dystrophies with defective dystroglycan glycosylation. *Annals of Neurology*, 64(5), 573-82.

87. Clement, E.M., Godfrey, C., Tan, J., Brockington, M., Torelli, S., Feng, L., ve diğerleri. (2008). Mild POMGnT1 mutations underlie a novel limb-girdle muscular dystrophy variant. *Archives of Neurology*, 65(1), 137-41.
88. Raducu, M., Baets, J., Fano, O., Van Coster, R., ve Cruces, J. (2012). Promoter alteration causes transcriptional repression of the POMGNT1 gene in limb-girdle muscular dystrophy type 20. *European Journal of Human Genetics*, 20(9), 945-52.
89. Dincer, P., Balci, B., Yuva, Y., Talim, B., Brockington, M., Dincel, D., ve diğerleri. (2003). A novel form of recessive limb girdle muscular dystrophy with mental retardation and abnormal expression of alpha-dystroglycan. *Neuromuscular Disorders*, 13(10), 771-8.
90. Hara, Y., Balci-Hayta, B., Yoshida-Moriguchi, T., Kanagawa, M., Beltran-Valero de Bernabe, D., Gundesli, H., ve diğerleri. (2011). A dystroglycan mutation associated with limb-girdle muscular dystrophy. *New England Journal of Medicine*, 364(10), 939-46.
91. Gundesli, H., Talim, B., Korkusuz, P., Balci-Hayta, B., Cirak, S., Akarsu, N.A., ve diğerleri. (2010). Mutation in exon 1f of PLEC, leading to disruption of plectin isoform 1f, causes autosomal-recessive limb-girdle muscular dystrophy. *American Journal of Human Genetics*, 87(6), 834-41.
92. Cetin, N., Balci-Hayta, B., Gundesli, H., Korkusuz, P., Purali, N., Talim, B., ve diğerleri. (2013). A novel desmin mutation leading to autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy: distinct histopathological outcomes compared with desminopathies. *Journal of Medical Genetics*, 50(7), 437-43.
93. Bogershausen, N., Shahrzad, N., Chong, J.X., von Kleist-Retzow, J.C., Stanga, D., Li, Y., ve diğerleri. (2013). Recessive TRAPPC11 mutations cause a disease spectrum of limb girdle muscular dystrophy and myopathy with movement disorder and intellectual disability. *American Journal of Human Genetics*, 93(1), 181-90.
94. Carss, K.J., Stevens, E., Foley, A.R., Cirak, S., Riemersma, M., Torelli, S., ve diğerleri. (2013). Mutations in GDP-mannose pyrophosphorylase B cause congenital and limb-girdle muscular dystrophies associated with hypoglycosylation of alpha-dystroglycan. *American Journal of Human Genetics*, 93(1), 29-41.
95. Tasca, G., Moro, F., Aiello, C., Cassandrini, D., Fiorillo, C., Bertini, E., ve diğerleri. (2013). Limb-girdle muscular dystrophy with alpha-dystroglycan deficiency and mutations in the ISPD gene. *Neurology*, 80(10), 963-5.
96. Preisler, N., Lukacs, Z., Vinge, L., Madsen, K.L., Husu, E., Hansen, R.S., ve diğerleri. (2013). Late-onset Pompe disease is prevalent in unclassified limb-girdle muscular dystrophies. *Molecular Genetics and Metabolism*, 110(3), 287-9.

97. Chardon, J.W., Smith, A.C., Woulfe, J., Pena, E., Rakhra, K., Dennie, C., ve diğerleri. (2015). LIMS2 mutations are associated with a novel muscular dystrophy, severe cardiomyopathy and triangular tongues. *Clinical Genetics*.
98. Miyoshi, K., Kawai, H., Iwasa, M., Kusaka, K., ve Nishino, H. (1986). Autosomal recessive distal muscular dystrophy as a new type of progressive muscular dystrophy. Seventeen cases in eight families including an autopsied case. *Brain*, 109 (Pt 1), 31-54.
99. Bejaoui, K., Hirabayashi, K., Hentati, F., Haines, J.L., Ben Hamida, C., Belal, S., ve diğerleri. (1995). Linkage of Miyoshi myopathy (distal autosomal recessive muscular dystrophy) locus to chromosome 2p12-14. *Neurology*, 45(4), 768-72.
100. Illa, I., Serrano-Munuera, C., Gallardo, E., Lasa, A., Rojas-Garcia, R., Palmer, J., ve diğerleri. (2001). Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Annals of Neurology*, 49(1), 130-4.
101. Nguyen, K., Bassez, G., Krahn, M., Bernard, R., Laforet, P., Labelle, V., ve diğerleri. (2007). Phenotypic study in 40 patients with dysferlin gene mutations: high frequency of atypical phenotypes. *Archives of Neurology*, 64(8), 1176-82.
102. Vilchez, J.J., Gallano, P., Gallardo, E., Lasa, A., Rojas-Garcia, R., Freixas, A., ve diğerleri. (2005). Identification of a novel founder mutation in the DYSF gene causing clinical variability in the Spanish population. *Archives of Neurology*, 62(8), 1256-9.
103. Weiler, T., Bashir, R., Anderson, L.V., Davison, K., Moss, J.A., Britton, S., ve diğerleri. (1999). Identical mutation in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2B or Miyoshi myopathy suggests a role for modifier gene(s). *Human Molecular Genetics*, 8(5), 871-7.
104. Aoki, M., Liu, J., Richard, I., Bashir, R., Britton, S., Keers, S.M., ve diğerleri. (2001). Genomic organization of the dysferlin gene and novel mutations in Miyoshi myopathy. *Neurology*, 57(2), 271-8.
105. Glover, L. ve Brown, R.H., Jr. (2007). Dysferlin in membrane trafficking and patch repair. *Traffic*, 8(7), 785-94.
106. Therrien, C., Dodig, D., Karpati, G., ve Sinnreich, M. (2006). Mutation impact on dysferlin inferred from database analysis and computer-based structural predictions. *Journal of the Neurological Sciences*, 250(1-2), 71-8.
107. Sula, A., Cole, A.R., Yeats, C., Orengo, C., ve Keep, N.H. (2014). Crystal structures of the human Dysferlin inner DysF domain. *BMC Structural Biology*, 14, 3.
108. Davletov, B.A. ve Sudhof, T.C. (1993). A single C2 domain from synaptotagmin I is sufficient for high affinity Ca²⁺/phospholipid binding. *Journal of Biological Chemistry*, 268(35), 26386-90.

109. Brose, N., Petrenko, A.G., Sudhof, T.C., ve Jahn, R. (1992). Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science*, 256(5059), 1021-5.
110. Davletov, B.A. ve Sudhof, T.C. (1994). Ca(2+)-dependent conformational change in synaptotagmin I. *Journal of Biological Chemistry*, 269(46), 28547-50.
111. Anderson, L.V., Davison, K., Moss, J.A., Young, C., Cullen, M.J., Walsh, J., ve diğeri. (1999). Dysferlin is a plasma membrane protein and is expressed early in human development. *Human Molecular Genetics*, 8(5), 855-61.
112. Achanzar, W.E. ve Ward, S. (1997). A nematode gene required for sperm vesicle fusion. *Journal of Cell Science*, 110 (Pt 9), 1073-81.
113. McNeil, P.L. ve Terasaki, M. (2001). Coping with the inevitable: how cells repair a torn surface membrane. *Nature Cell Biology*, 3(5), E124-9.
114. Lennon, N.J., Kho, A., Bacsikai, B.J., Perlmutter, S.L., Hyman, B.T., ve Brown, R.H., Jr. (2003). Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50466-73.
115. Bi, G.Q., Morris, R.L., Liao, G., Alderton, J.M., Scholey, J.M., ve Steinhardt, R.A. (1997). Kinesin- and myosin-driven steps of vesicle recruitment for Ca²⁺-regulated exocytosis. *Journal of Cell Biology*, 138(5), 999-1008.
116. Steinhardt, R.A., Bi, G., ve Alderton, J.M. (1994). Cell membrane resealing by a vesicular mechanism similar to neurotransmitter release. *Science*, 263(5145), 390-3.
117. Miyake, K. ve McNeil, P.L. (1995). Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption. *Journal of Cell Biology*, 131(6 Pt 2), 1737-45.
118. Andrews, N.W., Almeida, P.E., ve Corrotte, M. (2014). Damage control: cellular mechanisms of plasma membrane repair. *Trends in Cell Biology*, 24(12), 734-42.
119. Reddy, A., Caler, E.V., ve Andrews, N.W. (2001). Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell*, 106(2), 157-69.
120. Tam, C., Idone, V., Devlin, C., Fernandes, M.C., Flannery, A., He, X., ve diğeri. (2010). Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *Journal of Cell Biology*, 189(6), 1027-38.
121. Defour, A., Van der Meulen, J.H., Bhat, R., Bigot, A., Bashir, R., Nagaraju, K., ve diğeri. (2014). Dysferlin regulates cell membrane repair by facilitating injury-triggered acid sphingomyelinase secretion. *Cell Death & Disease*, 5, e1306.

122. Simons, K. ve Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569-72.
123. Holopainen, J.M., Angelova, M.I., ve Kinnunen, P.K. (2000). Vectorial budding of vesicles by asymmetrical enzymatic formation of ceramide in giant liposomes. *Biophysical Journal*, 78(2), 830-8.
124. Corrotte, M., Almeida, P.E., Tam, C., Castro-Gomes, T., Fernandes, M.C., Millis, B.A., ve diğerleri. (2013). Caveolae internalization repairs wounded cells and muscle fibers. *Elife*, 2, e00926.
125. Repetto, S., Bado, M., Broda, P., Lucania, G., Masetti, E., Sotgia, F., ve diğerleri. (1999). Increased number of caveolae and caveolin-3 overexpression in Duchenne muscular dystrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 261(3), 547-50.
126. Azakir, B.A., Di Fulvio, S., Therrien, C., ve Sinnreich, M. (2010). Dysferlin interacts with tubulin and microtubules in mouse skeletal muscle. *PLoS One*, 5(4), e10122.
127. Gundersen, G.G., Khawaja, S., ve Bulinski, J.C. (1989). Generation of a stable, posttranslationally modified microtubule array is an early event in myogenic differentiation. *Journal of Cell Biology*, 109(5), 2275-88.
128. Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., ve diğerleri. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, 417(6887), 455-8.
129. Di Fulvio, S., Azakir, B.A., Therrien, C., ve Sinnreich, M. (2011). Dysferlin interacts with histone deacetylase 6 and increases alpha-tubulin acetylation. *PLoS One*, 6(12), e28563.
130. Ampong, B.N., Imamura, M., Matsumiya, T., Yoshida, M., ve Takeda, S. (2005). Intracellular localization of dysferlin and its association with the dihydropyridine receptor. *Acta Myologica*, 24(2), 134-44.
131. Flix, B., de la Torre, C., Castillo, J., Casal, C., Illa, I., ve Gallardo, E. (2013). Dysferlin interacts with calsequestrin-1, myomesin-2 and dynein in human skeletal muscle. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(8), 1927-38.
132. Kerr, J.P., Ziman, A.P., Mueller, A.L., Muriel, J.M., Kleinhans-Welte, E., Gumerson, J.D., ve diğerleri. (2013). Dysferlin stabilizes stress-induced Ca²⁺ signaling in the transverse tubule membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(51), 20831-6.
133. Sharma, A., Yu, C., Leung, C., Trane, A., Lau, M., Utokaparch, S., ve diğerleri. (2010). A new role for the muscle repair protein dysferlin in endothelial cell adhesion and angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(11), 2196-204.
134. U.S. National Library of Medicine. (2015). Erişim: Nisan 2015, <http://www.nlm.nih.gov/pubs/factsheets/medline.html>

135. Jensen, L.J., Saric, J., ve Bork, P. (2006). Literature mining for the biologist: from information retrieval to biological discovery. *Nature Reviews: Genetics*, 7(2), 119-29.
136. Rodriguez-Esteban, R. (2009). Biomedical text mining and its applications. *PLoS Computational Biology*, 5(12), e1000597.
137. Saffer, J.D. ve Burnett, V.L. (2014). Introduction to biomedical literature text mining: context and objectives. *Methods in Molecular Biology*, 1159, 1-7.
138. Giglia, E. (2011). Quertle and KNALIJ: searching PubMed has never been so easy and effective. *European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine*, 47(4), 687-90.
139. Raychaudhuri, S. (2006). *Computational text analysis for functional genomics and bioinformatics*. Oxford: Oxford University Press.
140. Crespo Azcarate, M., Mata Vazquez, J., ve Mana Lopez, M. (2013). Improving image retrieval effectiveness via query expansion using MeSH hierarchical structure. *Journal of the American Medical Informatics Association*, 20(6), 1014-20.
141. Younesi, E., Toldo, L., Muller, B., Friedrich, C.M., Novac, N., Scheer, A., ve diğ erleri. (2012). Mining biomarker information in biomedical literature. *BMC Medical Informatics and Decision Making*, 12, 148.
142. Faro, A., Giordano, D., ve Spampinato, C. (2012). Combining literature text mining with microarray data: advances for system biology modeling. *Briefings in Bioinformatics*, 13(1), 61-82.
143. Divoli, A. ve Attwood, T.K. (2005). BioIE: extracting informative sentences from the biomedical literature. *Bioinformatics*, 21(9), 2138-9.
144. Swanson, D.R. (1986). Fish oil, Raynaud's syndrome, and undiscovered public knowledge. *Perspectives in Biology and Medicine*, 30(1), 7-18.
145. Smalheiser, N.R., Torvik, V.I., ve Zhou, W. (2009). Arrowsmith two-node search interface: a tutorial on finding meaningful links between two disparate sets of articles in MEDLINE. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 94(2), 190-7.
146. Smalheiser, N.R., Torvik, V.I., Bischoff-Grethe, A., Burhans, L.B., Gabriel, M., Homayouni, R., ve diğ erleri. (2006). Collaborative development of the Arrowsmith two node search interface designed for laboratory investigators. *Journal of Biomedical Discovery and Collaboration*, 1, 8.
147. Zhu, F., Patumcharoenpol, P., Zhang, C., Yang, Y., Chan, J., Meechai, A., ve diğ erleri. (2013). Biomedical text mining and its applications in cancer research. *Journal of Biomedical Informatics*, 46(2), 200-11.
148. Li, C., Liakata, M., ve Rebholz-Schuhmann, D. (2014). Biological network extraction from scientific literature: state of the art and challenges. *Briefings in Bioinformatics*, 15(5), 856-77.

149. Rebholz-Schuhmann, D., Oellrich, A., ve Hoehndorf, R. (2012). Text-mining solutions for biomedical research: enabling integrative biology. *Nature Reviews: Genetics*, 13(12), 829-39.
150. Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O., ve Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), 14863-8.
151. Kommadath, A., Bao, H., Arantes, A.S., Plastow, G.S., Tuggle, C.K., Bearson, S.M., ve diğ erleri. (2014). Gene co-expression network analysis identifies porcine genes associated with variation in Salmonella shedding. *BMC Genomics*, 15, 452.
152. Wong, D.C., Sweetman, C., ve Ford, C.M. (2014). Annotation of gene function in citrus using gene expression information and co-expression networks. *BMC Plant Biology*, 14, 186.
153. Hansen, B.O., Vaid, N., Musialak-Lange, M., Janowski, M., ve Mutwil, M. (2014). Elucidating gene function and function evolution through comparison of co-expression networks of plants. *Frontiers in Plant Science*, 5, 394.
154. Zhang, B. ve Horvath, S. (2005). A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 4, Article17.
155. Miller, J.A., Horvath, S., ve Geschwind, D.H. (2010). Divergence of human and mouse brain transcriptome highlights Alzheimer disease pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(28), 12698-703.
156. Kogelman, L.J., Cirera, S., Zhernakova, D.V., Fredholm, M., Franke, L., ve Kadarmideen, H.N. (2014). Identification of co-expression gene networks, regulatory genes and pathways for obesity based on adipose tissue RNA Sequencing in a porcine model. *BMC Medical Genomics*, 7, 57.
157. Papanikolaou, N., Pavlopoulos, G.A., Pafilis, E., Theodosiou, T., Schneider, R., Satagopam, V.P., ve diğ erleri. (2014). BioTextQuest(+): a knowledge integration platform for literature mining and concept discovery. *Bioinformatics*, 30(22), 3249-56.
158. Snel, B., Lehmann, G., Bork, P., ve Huynen, M.A. (2000). STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene. *Nucleic Acids Research*, 28(18), 3442-4.
159. Huang da, W., Sherman, B.T., ve Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 4(1), 44-57.
160. Huang da, W., Sherman, B.T., ve Lempicki, R.A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*, 37(1), 1-13.

161. Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., ve diğerleri. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics*, 25(1), 25-9.
162. Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., ve Tanabe, M. (2014). Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D199-205.
163. Kanehisa, M. ve Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27-30.
164. Edgar, R., Domrachev, M., ve Lash, A.E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 207-10.
165. Bakay, M., Wang, Z., Melcon, G., Schiltz, L., Xuan, J., Zhao, P., ve diğerleri. (2006). Nuclear envelope dystrophies show a transcriptional fingerprint suggesting disruption of Rb-MyoD pathways in muscle regeneration. *Brain*, 129(Pt 4), 996-1013.
166. Langfelder, P. ve Horvath, S. (2012). Fast R Functions for Robust Correlations and Hierarchical Clustering. *Journal of Statistical Software*, 46(11).
167. Barabasi, A.L. ve Bonabeau, E. (2003). Scale-free networks. *Scientific American*, 288(5), 60-9.
168. Langfelder, P., Luo, R., Oldham, M.C., ve Horvath, S. (2011). Is my network module preserved and reproducible? *PLoS Computational Biology*, 7(1), e1001057.
169. Dong, J. ve Horvath, S. (2007). Understanding network concepts in modules. *BMC Systems Biology*, 1, 24.
170. Horvath, S. ve Dong, J. (2008). Geometric interpretation of gene coexpression network analysis. *PLoS Computational Biology*, 4(8), e1000117.
171. Jeong, H., Mason, S.P., Barabasi, A.L., ve Oltvai, Z.N. (2001). Lethality and centrality in protein networks. *Nature*, 411(6833), 41-2.
172. Horvath, S., Zhang, B., Carlson, M., Lu, K.V., Zhu, S., Felciano, R.M., ve diğerleri. (2006). Analysis of oncogenic signaling networks in glioblastoma identifies ASPM as a molecular target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), 17402-7.
173. Huang, Y., de Morree, A., van Remoortere, A., Bushby, K., Frants, R.R., den Dunnen, J.T., ve diğerleri. (2008). Calpain 3 is a modulator of the dysferlin protein complex in skeletal muscle. *Human Molecular Genetics*, 17(12), 1855-66.
174. Obayashi, T. ve Kinoshita, K. (2011). COXPRESdb: a database to compare gene coexpression in seven model animals. *Nucleic Acids Research*, 39(Database issue), D1016-22.

175. Obayashi, T., Okamura, Y., Ito, S., Tadaka, S., Motoike, I.N., ve Kinoshita, K. (2013). COXPRESdb: a database of comparative gene coexpression networks of eleven species for mammals. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D1014-20.
176. Okamura, Y., Aoki, Y., Obayashi, T., Tadaka, S., Ito, S., Narise, T., ve diğerleri. (2015). COXPRESdb in 2015: coexpression database for animal species by DNA-microarray and RNAseq-based expression data with multiple quality assessment systems. *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue), D82-6.
177. Stuart, J.M., Segal, E., Koller, D., ve Kim, S.K. (2003). A gene-coexpression network for global discovery of conserved genetic modules. *Science*, 302(5643), 249-55.
178. Sosa, B.A., Demircioglu, F.E., Chen, J.Z., Ingram, J., Ploegh, H.L., ve Schwartz, T.U. (2014). How lamina-associated polypeptide 1 (LAP1) activates Torsin. *Elife*, 3, e03239.
179. Buchan, D.W., Minneci, F., Nugent, T.C., Bryson, K., ve Jones, D.T. (2013). Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue), W349-57.
180. Minneci, F., Piovesan, D., Cozzetto, D., ve Jones, D.T. (2013). FFPred 2.0: improved homology-independent prediction of gene ontology terms for eukaryotic protein sequences. *PloS One*, 8(5), e63754.
181. Benjamini, Y. ve Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society*, 57, 289-300.
182. Ouzounis, C.A. (2012). Rise and demise of bioinformatics? Promise and progress. *PLoS Computational Biology*, 8(4), e1002487.
183. Bard, J.B. ve Rhee, S.Y. (2004). Ontologies in biology: design, applications and future challenges. *Nature Reviews: Genetics*, 5(3), 213-22.
184. Tuncbilek, E. ve Koc, I. (1994). Consanguineous marriage in Turkey and its impact on fertility and mortality. *Annals of Human Genetics*, 58(Pt 4), 321-9.
185. Benaud, C., Gentil, B.J., Assard, N., Court, M., Garin, J., Delphin, C., ve diğerleri. (2004). AHNAK interaction with the annexin 2/S100A10 complex regulates cell membrane cytoarchitecture. *Journal of Cell Biology*, 164(1), 133-44.
186. Huang, Y., Laval, S.H., van Remoortere, A., Baudier, J., Benaud, C., Anderson, L.V., ve diğerleri. (2007). AHNAK, a novel component of the dysferlin protein complex, redistributes to the cytoplasm with dysferlin during skeletal muscle regeneration. *FASEB Journal*, 21(3), 732-42.
187. Hayes, M.J., Merrifield, C.J., Shao, D., Ayala-Sanmartin, J., Schorey, C.D., Levine, T.P., ve diğerleri. (2004). Annexin 2 binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on endocytic vesicles is regulated

- by the stress response pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 14157-64.
188. Gerke, V. ve Moss, S.E. (2002). Annexins: from structure to function. *Physiological Reviews*, 82(2), 331-71.
 189. Fanin, M., Nascimbeni, A.C., ve Angelini, C. (2014). Muscle atrophy, ubiquitin-proteasome, and autophagic pathways in dysferlinopathy. *Muscle and Nerve*, 50(3), 340-7.
 190. Fujita, E., Kouroku, Y., Isoai, A., Kumagai, H., Misutani, A., Matsuda, C., ve diğerleri. (2007). Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). *Human Molecular Genetics*, 16(6), 618-29.
 191. Azakir, B.A., Di Fulvio, S., Kinter, J., ve Sinnreich, M. (2012). Proteasomal inhibition restores biological function of mis-sense mutated dysferlin in patient-derived muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 287(13), 10344-54.
 192. Hack, A.A., Ly, C.T., Jiang, F., Clendenin, C.J., Sigrist, K.S., Wollmann, R.L., ve diğerleri. (1998). Gamma-sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin. *Journal of Cell Biology*, 142(5), 1279-87.
 193. Spencer, M.J., Walsh, C.M., Dorshkind, K.A., Rodriguez, E.M., ve Tidball, J.G. (1997). Myonuclear apoptosis in dystrophic mdx muscle occurs by perforin-mediated cytotoxicity. *Journal of Clinical Investigation*, 99(11), 2745-51.
 194. Hosur, V., Kavirayani, A., Riefler, J., Carney, L.M., Lyons, B., Gott, B., ve diğerleri. (2012). Dystrophin and dysferlin double mutant mice: a novel model for rhabdomyosarcoma. *Cancer Genetics*, 205(5), 232-41.
 195. De Luna, N., Gallardo, E., ve Illa, I. (2004). In vivo and in vitro dysferlin expression in human muscle satellite cells. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 63(10), 1104-13.
 196. Roche, J.A., Mueller, A.L., ve Bloch, R.J. (2013) Large-strain In Vivo Lengthening Contractions Induce Mitochondrially-mediated Apoptosis in Dysferlin-null Muscle[Bildirir].
 197. Jain Foundation Inc. (2007) Proceedings of the First Annual Dysferlin Conference[Bildirir]. First Annual Dysferlin Conference. Redmond, WA, USA.
 198. Quirico-Santos, T., Ribeiro, M.M., ve Savino, W. (1995). Increased deposition of extracellular matrix components in the thymus gland of MDX mouse: correlation with the muscular lesion. *Journal of Neuroimmunology*, 59(1-2), 9-18.
 199. Seixas, S.I., Wajsenzon, I.J., Savino, W., ve Quirico-Santos, T. (1994). Altered deposition of extracellular matrix components in the skeletal muscle and

- lymph node of the MDX dystrophic mouse. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 27(9), 2229-40.
200. von Moers, A., Zwirner, A., Reinhold, A., Bruckmann, O., van Landeghem, F., Stoltenburg-Didinger, G., ve diğerleri. (2005). Increased mRNA expression of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -2 in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Neuropathologica*, 109(3), 285-93.
 201. Sun, G., Haginoya, K., Chiba, Y., Uematsu, M., Hino-Fukuyo, N., Tanaka, S., ve diğerleri. (2010). Elevated plasma levels of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and their overexpression in muscle in human and mouse muscular dystrophy. *Journal of the Neurological Sciences*, 297(1-2), 19-28.
 202. Welgus, H.G., Stricklin, G.P., Eisen, A.Z., Bauer, E.A., Cooney, R.V., ve Jeffrey, J.J. (1979). A specific inhibitor of vertebrate collagenase produced by human skin fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 254(6), 1938-43.
 203. Brew, K. ve Nagase, H. (2010). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1803(1), 55-71.
 204. Nadarajah, V.D., van Putten, M., Chaouch, A., Garrood, P., Straub, V., Lochmuller, H., ve diğerleri. (2011). Serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as a biomarker for monitoring disease progression in Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Neuromuscular Disorders*, 21(8), 569-78.
 205. Lewis, M.P., Tippet, H.L., Sinanan, A.C., Morgan, M.J., ve Hunt, N.P. (2000). Gelatinase-B (matrix metalloproteinase-9; MMP-9) secretion is involved in the migratory phase of human and murine muscle cell cultures. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 21(3), 223-33.
 206. Yamada, M., Tatsumi, R., Kikuri, T., Okamoto, S., Nonoshita, S., Mizunoya, W., ve diğerleri. (2006). Matrix metalloproteinases are involved in mechanical stretch-induced activation of skeletal muscle satellite cells. *Muscle and Nerve*, 34(3), 313-9.
 207. Han, R., Frett, E.M., Levy, J.R., Rader, E.P., Lueck, J.D., Bansal, D., ve diğerleri. (2010). Genetic ablation of complement C3 attenuates muscle pathology in dysferlin-deficient mice. *Journal of Clinical Investigation*, 120(12), 4366-74.
 208. Nagaraju, K., Rawat, R., Veszelszky, E., Thapliyal, R., Kesari, A., Sparks, S., ve diğerleri. (2008). Dysferlin deficiency enhances monocyte phagocytosis: a model for the inflammatory onset of limb-girdle muscular dystrophy 2B. *American Journal of Pathology*, 172(3), 774-85.
 209. Ramadasan-Nair, R., Gayathri, N., Mishra, S., Sunitha, B., Mythri, R.B., Nalini, A., ve diğerleri. (2014). Mitochondrial alterations and oxidative stress in an acute transient mouse model of muscle degeneration: implications for muscular dystrophy and related muscle pathologies. *Journal of Biological Chemistry*, 289(1), 485-509.

210. Elliott, N.A. ve Volkert, M.R. (2004). Stress induction and mitochondrial localization of Oxr1 proteins in yeast and humans. *Molecular and Cellular Biology*, 24(8), 3180-7.
211. Liu, K.X., Edwards, B., Lee, S., Finelli, M.J., Davies, B., Davies, K.E., ve diğerleri. (2015). Neuron-specific antioxidant OXR1 extends survival of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*.
212. Yang, M., Luna, L., Sorbo, J.G., Alseth, I., Johansen, R.F., Backe, P.H., ve diğerleri. (2014). Human OXR1 maintains mitochondrial DNA integrity and counteracts hydrogen peroxide-induced oxidative stress by regulating antioxidant pathways involving p21. *Free Radical Biology and Medicine*, 77, 41-8.
213. Kayman-Kurekci, G., Talim, B., Korkusuz, P., Sayar, N., Sarioglu, T., Oncel, I., ve diğerleri. (2014). Mutation in TOR1AIP1 encoding LAP1B in a form of muscular dystrophy: a novel gene related to nuclear envelopathies. *Neuromuscular Disorders*, 24(7), 624-33.
214. Santos, M., Costa, P., Martins, F., da Cruz e Silva, E.F., da Cruz e Silva, O.A., ve Rebelo, S. (2015). LAP1 is a crucial protein for the maintenance of the nuclear envelope structure and cell cycle progression. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 399(1-2), 143-53.
215. Shin, J.Y., Mendez-Lopez, I., Wang, Y., Hays, A.P., Tanji, K., Lefkowitz, J.H., ve diğerleri. (2013). Lamina-associated polypeptide-1 interacts with the muscular dystrophy protein emerin and is essential for skeletal muscle maintenance. *Developmental Cell*, 26(6), 591-603.
216. Zhao, C., Brown, R.S., Chase, A.R., Eisele, M.R., ve Schlieker, C. (2013). Regulation of Torsin ATPases by LAP1 and LULL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), E1545-54.
217. Goodchild, R.E. ve Dauer, W.T. (2005). The AAA+ protein torsinA interacts with a conserved domain present in LAP1 and a novel ER protein. *Journal of Cell Biology*, 168(6), 855-62.
218. Wendler, P., Ciniawsky, S., Kock, M., ve Kube, S. (2012). Structure and function of the AAA+ nucleotide binding pocket. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1823(1), 2-14.
219. White, S.R. ve Lauring, B. (2007). AAA+ ATPases: achieving diversity of function with conserved machinery. *Traffic*, 8(12), 1657-67.
220. Jokhi, V., Ashley, J., Nunnari, J., Noma, A., Ito, N., Wakabayashi-Ito, N., ve diğerleri. (2013). Torsin mediates primary envelopment of large ribonucleoprotein granules at the nuclear envelope. *Cell Reports*, 3(4), 988-95.
221. Rose, A. ve Schlieker, C. (2012). Alternative nuclear transport for cellular protein quality control. *Trends in Cell Biology*, 22(10), 509-14.

222. Speese, S.D., Ashley, J., Jokhi, V., Nunnari, J., Barria, R., Li, Y., ve diğerleri. (2012). Nuclear envelope budding enables large ribonucleoprotein particle export during synaptic Wnt signaling. *Cell*, 149(4), 832-46.
223. McCullough, J. ve Sundquist, W.I. (2014). Putting a finger in the ring. *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(12), 1025-7.
224. McPherron, A.C., Lawler, A.M., ve Lee, S.J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, 387(6628), 83-90.
225. Sartori, R., Schirwis, E., Blaauw, B., Bortolanza, S., Zhao, J., Enzo, E., ve diğerleri. (2013). BMP signaling controls muscle mass. *Nature Genetics*, 45(11), 1309-18.
226. Li, D., Xie, P., Zhao, F., Shu, J., Li, L., Zhan, Y., ve diğerleri. (2015). F-box protein Fbxo3 targets Smurf1 ubiquitin ligase for ubiquitination and degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(4), 941-5.
227. Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J.L., ve Thomsen, G.H. (1999). A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature*, 400(6745), 687-93.
228. Moren, A., Hellman, U., Inada, Y., Imamura, T., Heldin, C.H., ve Moustakas, A. (2003). Differential ubiquitination defines the functional status of the tumor suppressor Smad4. *Journal of Biological Chemistry*, 278(35), 33571-82.
229. Dupont, S., Mamidi, A., Cordenonsi, M., Montagner, M., Zacchigna, L., Adorno, M., ve diğerleri. (2009). FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell*, 136(1), 123-35.
230. Bione, S., Maestrini, E., Rivella, S., Mancini, M., Regis, S., Romeo, G., ve diğerleri. (1994). Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genetics*, 8(4), 323-7.
231. Melcon, G., Kozlov, S., Cutler, D.A., Sullivan, T., Hernandez, L., Zhao, P., ve diğerleri. (2006). Loss of emerin at the nuclear envelope disrupts the Rb1/E2F and MyoD pathways during muscle regeneration. *Human Molecular Genetics*, 15(4), 637-51.
232. Markiewicz, E., Tilgner, K., Barker, N., van de Wetering, M., Clevers, H., Dorobek, M., ve diğerleri. (2006). The inner nuclear membrane protein emerin regulates beta-catenin activity by restricting its accumulation in the nucleus. *EMBO Journal*, 25(14), 3275-85.
233. Koch, A.J. ve Holaska, J.M. (2012). Loss of emerin alters myogenic signaling and miRNA expression in mouse myogenic progenitors. *PloS One*, 7(5), e37262.

234. Dunker, A.K., Cortese, M.S., Romero, P., Iakoucheva, L.M., ve Uversky, V.N. (2005). Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. *FEBS Journal*, 272(20), 5129-48.
235. Uversky, V.N. (2002). Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Science*, 11(4), 739-56.
236. Wright, P.E. ve Dyson, H.J. (2015). Intrinsically disordered proteins in cellular signalling and regulation. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 16(1), 18-29.
237. Kriwacki, R.W., Hengst, L., Tennant, L., Reed, S.I., ve Wright, P.E. (1996). Structural studies of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in the free and Cdk2-bound state: conformational disorder mediates binding diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(21), 11504-9.
238. Lin, F., Morrison, J.M., Wu, W., ve Worman, H.J. (2005). MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, binds Smad2 and Smad3 and antagonizes transforming growth factor-beta signaling. *Human Molecular Genetics*, 14(3), 437-45.
239. Bourgeois, B., Gilquin, B., Tellier-Lebegue, C., Ostlund, C., Wu, W., Perez, J., ve diğerleri. (2013). Inhibition of TGF-beta signaling at the nuclear envelope: characterization of interactions between MAN1, Smad2 and Smad3, and PPM1A. *Science Signaling*, 6(280), ra49.
240. Halevy, O., Genin, O., Barzilai-Tutsch, H., Pima, Y., Levi, O., Moshe, I., ve diğerleri. (2013). Inhibition of muscle fibrosis and improvement of muscle histopathology in dysferlin knock-out mice treated with halofuginone. *Histology and Histopathology*, 28(2), 211-26.
241. Shin, J.Y., Dauer, W.T., ve Worman, H.J. (2014). Lamina-associated polypeptide 1: protein interactions and tissue-selective functions. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 29, 164-8.
242. Dadgar, S., Wang, Z., Johnston, H., Kesari, A., Nagaraju, K., Chen, Y.W., ve diğerleri. (2014). Asynchronous remodeling is a driver of failed regeneration in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Cell Biology*, 207(1), 139-58.
243. Kesari, A., Fukuda, M., Knoblach, S., Bashir, R., Nader, G.A., Rao, D., ve diğerleri. (2008). Dysferlin deficiency shows compensatory induction of Rab27A/Slp2a that may contribute to inflammatory onset. *American Journal of Pathology*, 173(5), 1476-87.
244. Zhang, Q.C., Petrey, D., Garzon, J.I., Deng, L., ve Honig, B. (2013). PrePPI: a structure-informed database of protein-protein interactions. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D828-33.
245. Zhang, Q.C., Petrey, D., Deng, L., Qiang, L., Shi, Y., Thu, C.A., ve diğerleri. (2012). Structure-based prediction of protein-protein interactions on a genome-wide scale. *Nature*, 490(7421), 556-60.

EK 1: İş akışı

Metin Madenciliği

- BioTextQuest+:
 - <http://bioinformatics.med.uoc.gr/cgi-bin/biotextquest/textQuest.cgi> web sitesi adresinden BioTextQuest+'a ulaşılır.
 - Arama kısmına çalışılmak istenen anahtar kelimeler girilir. Arama sırasında *and*, *or* veya *not* gibi boole operatörleri kullanılabilir.
 - Aranmak istenen veri tabanı PubMed veya OMIM seçilir.
 - Çalışma türüne göre analiz edilecek özet sayısı sınırlandırılabilir.
 - Gelişmiş seçenekler tıklanarak, özetlerin benzerlik ve kümelendirme algoritmaları değiştirilebilir. Böylece özetlerden farklı sayılarda kümeler oluşturulabilir.
 - Tüm bu parametreler ayarlandıktan sonra onaylanarak metin analizi başlanır.
 - Analiz sonuçlarında, kümelerdeki önemli terimler incelenebilir. Terimlerin büyüklüğü önem derecesine göre belirtilmiştir.
 - *Co-occurrence analysis* kısmı sayesinde kümede görülen çalışılmak olan önemli terimlerin beraber bulunduğu özetlere ulaşılabilir.
 - Kümelerdeki proteinlerin analizinin yapılabilmesi için, BTQ+ üzerinden BioCompendium servisine protein listesi doğrudan gönderilebilir.
 - BioCompendium sitesinde görülen protein listesinin üzerine tıkladığında, protein – protein etkileşim ağı, moleküler işlevler, hücresel yollar ve birçok farklı biyolojik bilgiye ulaşılabilir.
- OnTheFly:
 - <http://onthefly.embl.de> web sitesi üzerinden OnTheFly'a ulaşılır.
 - Metin madenciliği analizi yapılabilmesi için, çalışılmak istenen metin dosyası sürüklenerek veri tabanına yüklenir.
 - Metin dosyası yüklendikten sonra aşağıda görülen dört seçenekten "bilgi" kısmı tıklanarak, metinde görülen proteinler

BioCompendium veri analiz platformuna aktarılabilir.

BioCompendium üzerinden protein – protein etkileşim ağı, moleküler işlevler, hücresel yollar ve birçok farklı biyolojik bilgiye ulaşılabilir.

- DAVID:
 - <http://david.abcc.ncifcrf.gov> web sitesi adresi üzerinden DAVID aracına ulaşılabilir.
 - İşlevsel anotasyon bölümü tıklanarak zenginleştirme analizi yapılabilir.
 - Çalışılmak istenen gen listesi doğrudan yapıştırılabilir ya da liste olarak yüklenebilir. Gen listesinde genleri temsil etmek için kullanılan belirteç (gen ismi, Entrez ID vb) seçilir.
 - Gen listesi yüklendikten sonra çalışmaya uygun olarak arka plan gen listesi seçilir.
 - Kümelendirilmiş sonuç listesi incelenerek, temsil edilen hücre yolları, moleküler işlevlere ulaşılabilir.

Mikrodizin Analizi

- WGCNA:
 - Bu çalışmada, kasa özgü birlikte ifade edilme analizi R ortamında yapılmıştır.
 - R dilini kullanabilmek için başlangıç öğrencilerine <http://tryr.codeschool.com> adresinden ulaşılabilir.
 - R ortamında, “BioConductor” paketi (<http://www.bioconductor.org/install/>) kullanılarak mikrodizin verilerinin ön işlenmesi yapılabilir.
 - Birlikte ifade edilme ağı analizi için, R ortamında WGCNA (<http://labs.genetics.ucla.edu/horvath/CoexpressionNetwork/Rpackages/WGCNA/>) paketi kullanılabilir.
 - WGCNA paketinin kullanımı ve yapılabilecek çeşitli analizleri örnekleyen öğretici başlangıçlara

<http://labs.genetics.ucla.edu/horvath/CoexpressionNetwork/Rpackages/WGCNA/Tutorials/> adresinden ulaşılabilir.

COXPRESdb:

- <http://coxpresdb.jp> web sitesi üzerinden COXPRESdb veri tabanına ulaşılabilir.
- Gen belirteci arama çubuğuna yazılarak sonuç sayfasına ulaşılır.
- Çalışılmak istenen genin birlikte ifade edildiği gen listesine tıklanır.
- Genler ve türler desteklenebilirlik derecesine göre filtrelenebilir, gen listesinin uzunluğu belirlenebilir. Gen listesi veritabanından bilgisayara indirilebilir.
- Bu gen listesi daha sonra DAVID üzerinden işlevsel zenginleştirme analizi için kullanılabilir.