



ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp.Derg.
2020; 34 (1): 79 - 89
http://www.fusabil.org

İrritabl Bağırsak Sendromunun Teşhisinde Kullanılabilecek Biyobelirteç Adayı Genlerin Biyoinformatik Analizlerle Tanımlanması

Semih DALKILIÇ^{1, a}

¹ Fırat Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü,
Elazığ, TÜRKİYE

^a ORCID: 0000-0002-6892-247X

Amaç: İrritabl bağırsak sendromu (IBS), saptanabilir biyokimyasal ve yapısal anormallikler olmadan karın ağrısı veya rahatsızlık ile kombinasyon halinde bağırsak alışkanlıklarının değişmesiyle karakterize olan gastrointestinal (GI) bir bozukluktur. Hastalığın ortaya çıkma nedenleri kesin olarak bilinmemekle beraber birçok faktörü içermektedir. IBS'nin patogenezinin anlaşılması oldukça önemlidir. Yapılan bu çalışmada IBS transkriptom verisi analiz edilerek bu hastalığın ortaya çıkmasında rol oynayan genler ve moleküler mekanizmaların tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Biyoinformatik analiz için seçilen mikroarray verisi National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (GEO) veri tabanında bulunan GSE36701 koduyla depolanmış olan Gen Ekspresyon verisidir. Bu veri seti kullanılarak gen ifade analizi, fonksiyonel kümeleme analizi, zenginleştirme analizi ve yolak analizleri yapılmıştır.

Bulgular: Çalışma sonucunda konstipasyon baskın IBS alttipinde HLA-DQB1, CAPN8, RAP2C, AGPAT4, GOLGA8A, UNC5CL, CCL13 ve ARHGAP9 genlerinin ifade düzeyinin arttığını, SLC28A2, CPB1, MST1L, ATXN1 ve FABP2 genlerinin ise ifade düzeylerinin düştüğünü belirledik. Diyare baskın IBS alttipinde, ifade düzeyi artış gösteren genler CAPN8, GOLGA8A, CCL13 ve FCRL5. İfade düzeyi azalanlar ise HLA-DQB1, ERAP2, MST1L ve ATXN1 genleridir.

Sonuç: Bu yaklaşım sonucunda IBS'ye özgü moleküler profil ortaya konmuş, kontrol grubuna göre ifade düzeyleri artan veya azalan genler tespit edilmiş, buna ilaveten IBS'nin alttiplerinde kendine özgü bir moleküler profile sahip olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: İrritable bağırsak sendromu, gen ifade analizi, biyoinformatik

Identification of Candidate Biomarker Genes for Diagnosis of Irritable Bowel Syndrome by Bioinformatic Analysis

Objective: Irritable bowel syndrome (IBS) is a gastrointestinal (GI) disorder characterized by altering bowel habits in combination with abdominal pain or discomfort without detectable biochemical and structural abnormalities. Although the reasons for the occurrence of the disease are not known, it contains many factors. Understanding the pathogenesis of IBS is very important. In this study, it was aimed to identify the genes and molecular mechanisms involved in the emergence of this disease by analyzing the IBS transcriptome data.

Materials and Methods: The microarray data selected for bioinformatic analysis is gene expression data stored with the code GSE36701 in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (GEO) database. By using this data set, gene expression analysis, functional cluster analysis, enrichment analysis and pathway analysis were performed.

Results: In our results, we have detected that the expression level of HLA-DQB1, CAPN8, RAP2C, AGPAT4, GOLGA8A, UNC5CL, CCL13 and ARHGAP9 genes increased and expression levels of SLC28A2, CPB1, MST1L, ATXN1 and FABP2 genes decreased in the constipation dominant IBS. In diarrhea dominant IBS subtype, CAPN8, GOLGA8A, CCL13 and FCRL5 are the genes whose expression level increases. Decreasing expression levels are found as the HLA-DQB1, ERAP2, MST1L and ATXN1 genes.

Conclusion: As a result of this approach, IBS-specific molecular profile has been revealed, the genes whose expression levels increased or decreased compared to control group were identified and it has been determined that the subtypes of IBS have a specific molecular profile.

Keywords: Irritable bowel syndrome, gene expression analysis, bioinformatics

Giriş

İrritabl bağırsak sendromu (IBS), saptanabilir biyokimyasal ve yapısal anormallikler olmadan karın ağrısı veya rahatsızlık ile kombinasyon halinde bağırsak alışkanlıklarının değişmesiyle karakterize olan gastrointestinal (GI) bir bozukluktur. IBS, önemli bir sağlık yükü yaratan ve yaşam kalitesini ciddi oranda azaltabilen yaygın bir fonksiyonel bağırsak hastalığıdır. Hastalığın ortaya çıkma nedenleri kesin olarak bilinmemekle beraber birçok faktörü içermektedir. IBS'nin patogenezinin anlaşılması oldukça önemlidir, çünkü günümüzde yeni farmakoterapi ajanları, IBS'nin bilinen patofizyolojik mekanizmalarını hedeflemektedir (1). IBS'nin patogenezi incelendiğinde, gastrointestinal motilitede

Geliş Tarihi : 05.11.2019
Kabul Tarihi : 03.03.2020

Yazışma Adresi Correspondence

Semih DALKILIÇ
Fırat Üniversitesi,
Fen Fakültesi,
Biyoloji Bölümü,
Elazığ - TÜRKİYE

sdalkilic@firat.edu.tr

değişiklik, beyin-bağırsak ekseninde ortaya çıkan etkileşimler, enfeksiyon sonrası görülen reaktivite, viseral aşırı duyarlılık, fekal mikro florada değişim, gıda intoleransı, anormal karbonhidrat emilimi ve bağırsak iltihabı gibi birçok faktörün rol oynadığı görülmektedir. Bununla birlikte, bu mekanizmalar arasında öne çıkan semptomlar karın ağrısı veya rahatsızlık hissi, ishal, kabızlık ve şişkinlikten ibarettir. Ortaya çıkan tüm semptomlar mide-bağırsak ile ilgili olmayabilir. Örneğin, bu semptomlardan birisi olan yorgunluk çok yaygın bir durumdur ve genel olarak bakıldığında ortaya çıkan şikayetler için semptomatik tedaviye odaklanıldığı görülmektedir (2). Bundan dolayı hastalığın teşhisinde bir standart prosedür oluşturmak için Roma Kriterleri adı verilen bir protokol uygulanmaktadır.

Roma IV, iritabl bağırsak sendromunu (IBS), bağırsak alışkanlıklarındaki veya dışkılamalarındaki değişiklik ile ilişkili olan tekrarlayan karın ağrısı ile karakterize olan fonksiyonel bir bağırsak bozukluğu olarak tanımlamıştır.

Düzensiz bağırsak alışkanlıkları, abdominal şişkinlik / şişkinlik belirtileri gibi tipik olarak mevcuttur (diyare, kabızlık veya diyare ve kabızlığın bir karışımı). Semptom başlangıcı tanıdan en az 6 ay önce gerçekleşmeli ve semptomlar son 3 ay içinde mevcut olmalıdır (3).

Roma IV kriterlerine göre IBS dört alttıpe ayrılmaktadır. Bunlar; diyare baskın IBS (IBS-D), konstipasyon baskın IBS (IBS-C), konstipasyon ve diyarenin birlikte görüldüğü mix IBS (IBS-M), ve son olarak alttıpe belli olmayan IBS. Bu tiplendirme tamamen hastanın verdiği bilgiler (dışkılamanın sıklığı ve dışkının kıvamı hakkında) kullanılarak yapılmaktadır (3).

Bu tiplendirmenin gerekçesi, klinik denemelere dahil edilen hastaların homojenliğini geliştirmek, etkili tanı ve tedaviyi yönlendirmek ve potansiyel patofizyolojik mekanizmalar hakkında daha fazla bilgi sahibi olmaktır (4).

Yapılan araştırmalar sonucunda ilginç sonuçlar da elde edilmiştir. Özellikle son yıllarda belirlenen mikrobiyota ve beyin-bağırsak aksı üzerine yapılan çalışmalar sonucunda IBS'nin tedavi seçenekleri arasına antidepresan tedavide girmiştir. Bunun en önemli sebebi ise yapılan çalışmalarda IBS'nin serotonin ile olan bağlantısının tespit edilmesidir.

Serotonin esas olarak bağırsak dokusundaki enterokromaffin hücrelerinde bulunur ve bağırsak refleksinin hareketinde ve bağırsaktaki duyuşal iletimde ana düzenleyici olarak görev yapar (5). IBS'de serotonin düzenlemesinin anormal olduğu görüşünü destekleyen iki ispat çizgisi vardır. Kabızlık baskın IBS (IBS-C) olgularında plazma serotonin düzeylerinde azalma görülürken diyare baskın IBS'de (IBS-D) olgularında ise artış gözlenmektedir (6). Hem IBS'de hem de ülseratif kolitte normal mukozal serotonin ve serotonin taşıyıcı immün reaktivitesinde azalma ile birlikte serotonin sinyal mekanizmasında bozukluklar görülür (7).

IBS'nin kesin frekans oranları hesaplanmamıştır ve ölçülen prevalans tahminleri hem ülkeler arasında hem de ülkeler içinde uluslararası platformda değişkenlik gösterir. Bu fark, materyallerin kullanımında, teşhis kriterlerinde, kullanılan yöntemlerde, incelenen popülasyonlarda ve kültürlerde görülen değişikliklere ve prevalans araştırmalarının heterojenliğine bağlanmıştır (8). Prevalans ölçümlerinde ortaya çıkan farklılıklar bir kenara bırakılırsa, IBS'nin asıl ortaya çıkardığı sorun ölüm oranlarını arttırması değil, ancak doğrudan tıbbi maliyetler, verimlilik kaybı ve sağlıkla ilgili yaşam kalitesinin düşmesi sonucu hastalara ve topluma önemli bir yük getirmesidir (9).

Literatüre bakıldığı zaman IBS ile ilgili olarak genom ebadında transkriptom çalışmalarının çok az olduğu görülmüştür. Bu sağlık probleminin moleküler mekanizmasının açıklığa kavuşturulması hastalığın teşhis edilmesinde, prognozunun değerlendirilmesinde ve yeni tedavi seçeneklerinin ve ilaç hedefi moleküllerin tespit edilmesinde önemli avantajlar sağlayacaktır. Yapılan bu çalışmada IBS transkriptom verisi analiz edilerek bu hastalığın ortaya çıkmasında rol oynayan genler ve moleküler mekanizmaların tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Affymetrix Mikroarray Verisi: Biyoinformatik analiz için seçilen mikroarray verisi National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (GEO) veri tabanında bulunan GSE36701 koduyla depolanmış olan Gen Ekspresyon verisidir (10).

Bu veri seti içerisinde 34 adet konstipasyon baskın-IBS (IBS-C), 53 adet diyare baskın-IBS (IBS-D) ve 40 adet sağlıklı gönüllülerin rektal biyopsi örneklerinin ekspresyon verisi mevcuttur. İşlenmemiş veriler [HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array ile oluşturulmuştur (Affymetrix Inc. Santa Clara, California, USA).

Farklı İfade Edilen Genlerin Analizi (DEG Analizi): Ham veri üzerine yapılan tüm analizler Transcriptome Analysis Console 4.0 (Applied Biosystem) ile yapılmıştır. IBS ve kontrol grubuna ait olan orjinal ekspresyon verisi üzerine robust multi-array average (RMA) metodu ile ön işlemler (Preprocessing) yapılmıştır. Ekspresyon değerleri hesaplandıktan sonra grup karşılaştırması yapılmıştır. IBS-D ve IBS-C grupları ayrı ayrı kontrol grubu ile karşılaştırılmış sonrasında varyans filtreleme uygulanmış ve sonuç olarak karşılaştırılan gruplar arasında ifade düzeyleri farklılık gösteren gen listeleri elde edilmiştir.

Fonksiyonel Kümeleme ve Gene-Set Enrichment Analizleri: Gen listesi fonksiyonel kümeleme analizleri, zenginleştirme analizleri ve yolak analizlerinin yapılması için DAVID Bioinformatic Tools programına yüklenmiştir (11, 12). Bu program ile önce kümeleme analizi yapılmış ve listede bulunan genler fonksiyonlarına göre kümelendi. Program analiz sırasında her bir küme için bir zenginleştirme skoru hesaplanmaktadır. Zenginleşme skoru 1,3 den büyük

olan kümeler anlamlı ve önemli kabul edilmektedir. Bu kümede bulunan genler ayrıca listelenmiştir. Yine aynı program içerisinde verilen liste hiyerarşik kümeleme analizi sonucu heatmap oluşturulmuştur. Heatmap örneklerimizin bu gen listesi kullanılarak birbirlerinden ayrılıp ayrılmadığını göstermektedir. Program ile aynı zamanda yolak analizleri de yapılmıştır. Bu analizler sonucunda verdiğimiz listede bulunan ve anlamlı kümelerdeki genlerin hangi moleküler yollarda bulunduğu belirlenmiş ve bu moleküler yolların hastalıkla ilişkisi değerlendirilmiştir.

Bulgular

Yapılan ilk analizde kullanılan verinin kalite kontrolü yapılmaktadır. Bu analiz sonucu elde edilen dağılım ve volkan grafikleri Şekil 1A ve Şekil 1B'de gösterilmektedir. Bu analizler sonucu dağılım grafiğinde karşılaştırma sonucu elde edilen gen listesinde bulunan her bir genin average log₂ kat değişimi verilmektedir. X eksenini karşılaştırmada kullanılan bir grubu Y eksenine ise diğer grubu göstermektedir. Şekil 1A ve 1B'de sırasıyla IBS-D ile Kontrol karşılaştırmasından elde edilen dağılım grafiği ve IBS-C ile Kontrol grubunun karşılaştırılması sonucu elde edilen dağılım grafiği görülmektedir. Şekil 2A ve Şekil 2B'de verilen volkan grafikleri ise her bir gen için hesaplanan P değerinin kat değişimi değerine göre grafiğini göstermektedir. Bu grafikler sonucu kullanılan yüksek yoğunluklu veri setinin kalite kontrolü yapılmış olmaktadır.

Biyoinformatik analizler sırasında yapılan bir diğer analiz ise grupları karşılaştırmak ve iki grup arasında ifade düzeyleri farklılık gösteren genleri belirlemektir. Bu analiz sırasında ilk önce IBS-D ve kontrol grubu karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sırasında kat değişimi eşik değeri + - 1.2 kat olarak P<0.05 olarak belirlenmiştir. Her bir gen için gruplar arasındaki kat değişimi hesaplanırken p değeri, FDR (false discovery rate) değeri de hesaplanmakta bu şekilde hesaplanan değerlerin istatistiği de yapılmaktadır. Bu değerler üzerine Benjamini-Hochberg düzeltmesi yapılmaktadır. Tablo 1 ve Tablo 2'de grup karşılaştırması sonucu programdan alınan farklı ifade edilen gen listesindeki ilk 50 gen gösterilmektedir. Bu tablolarda her bir genin kontrol grubundaki average log₂ ifade değeri, hasta grubundaki average log₂ ifade değeri, kat değişimi (Fold change) değeri, hesaplanan kat değişiminin p değeri ve FDR değeri, genin sembolü gibi ayrıntılı veriler bulunmaktadır. IBS-D ve Kontrol grubu karşılaştırması sonucunda 704 adet farklı ifade edilen gen belirlenmiştir. Bu 704 genden 176 tanesinin ifade düzeyi artmış, 528 adet genin ifade düzeyi ise azalmıştır. IBS-C ve Kontrol grubu karşılaştırmasında ise toplam 840 adet genin ifade düzeyi değişmiştir. Bu 804 genden 337 tanesinin ifade düzeyi artmış, 503 genin ifade düzeyi ise azalmıştır.

TAC 4.0 programı kullanılarak elde edilen gen listeleri ile hiyerarşik kümeleme analizi yapılmıştır. Bu analiz sonucu elde edilen HeatMapler Şekil 3A ve Şekil 3B'de görülmektedir. Bu analiz yapılırken gruplar arasında farklı ifade edilen genler kullanılmaktadır.

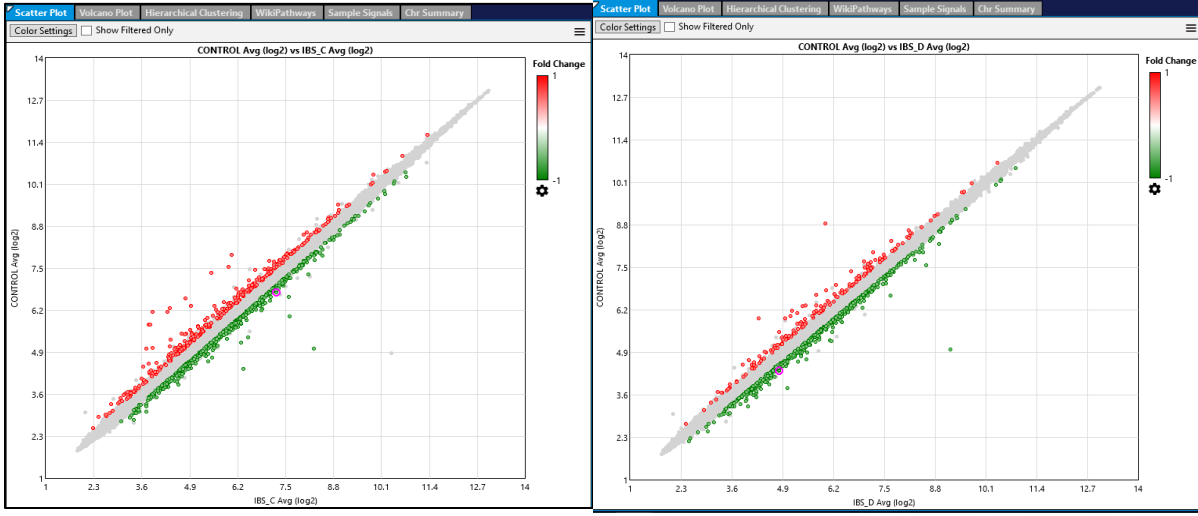
Örneğin IBS-D ve Kontrol grubu karşılaştırmasında 704 gen kullanılarak bu analiz yapılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen ısı haritasında yukarıdaki dendrogram örnekleri temsil etmektedir. Kırmızı ile belirtilenler IBS-D grubundaki örnekleri, mavi renk ile gösterilenler ise kontrol grubunda bulunan örnekleri göstermektedir. Sol taraftaki dendrogram ise genleri göstermektedir. Isı skalasında kırmızıya kayan renk genin ifade düzeyindeki artışı, maviye kayan renk ise ifade düzeyindeki azalmayı göstermektedir. Bu analiz sonuçlarına baktığımız zaman bu genler kullanılarak yapılan kümeleme analizinde tam bir kümeleme elde edilmese de örnekler arasında bir gruplanma tespit edilmiştir. Aynı hastalık içerisinde farklı alt tiplerin karşılaştırması yapıldığında bu tür sonuçların görülmesi normaldir. Şekil 3A IBS-D ve kontrol karşılaştırmasından elde edilen HeatMap'i göstermektedir. Şekil 3B ise IBS-C ve kontrol grubu karşılaştırmasından elde edilen gen listesiyle oluşturulan HeatMap'i göstermektedir.

Daha sonra grup karşılaştırmalarından elde edilen gen listeleri kullanılarak yolak analizleri yapılmıştır. Bu analiz sırasında listede bulunan genler fonksiyonlarına göre buldukları moleküler yollara dağıtılmaktadır. Bu şekilde hem listede bulunan genlerin bir fonksiyonel analizi yapılmakta hem de bu genlerin hangi moleküler yollarda buldukları tespit edilmektedir. Bu şekilde ilgililenen hastalığın ortaya çıkmasında hangi moleküler yolların etkili olduğu tespit edilebilmektedir. Ayrıca listede olmayan ancak belirlenen moleküler yollarda bulunan genlerde bu şekilde tespit edilmektedir. Şekil 4A'da IBS-D ve kontrol grubunun karşılaştırması sonucu elde edilen gen listesi ile yapılan yolak analiz sonucu görülmektedir. Şekil 4B'de ise IBS-C ve kontrol grubunun karşılaştırmasından elde edilen gen listesi ile yapılan yolak analizi gösterilmektedir. Verilen şekillerde yapılan analiz sonucu belirlenen yollar ve bu yolların içerisine outtan genler gösterilmektedir. Analiz sırasında en fazla gen ihtiva eden yolak en önde verilmektedir. Bu durum o moleküler yolağın ilgililenen hastalıkta önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Materyal ve metod kısmında ifade edildiği gibi elde edilen gen listeleri üzerine son olarak Gene-Set Enrichment Analysis (GSEA) yapılmıştır. Bu analiz sırasında DAVID olarak adlandırılan farklı bir bioinformatik algoritması kullanılmıştır. DAVID ile elimizde oldukça yüksek sayıda gen içeren bir listeyi daha az sayıda gen içeren yorumlanabilir bir liste haline dönüştürmekteyiz. Bu analiz sırasında listede bulunan genler fonksiyonlarına göre kümelere ayrılmaktadır. En önemli genler ve kümeler yüksek skor alıp öne çıkmaktadır. Bu şekilde ilgileneceğimiz ve önemli olan genler belirlenmektedir. Şekil 5A'da IBS-D ve kontrol grubunun listesi ile yapılan GSE analizi sonuçları gösterilmiştir. Şekil incelendiğinde 49 küme elde edildiği görülmektedir. Elde edilen en önemli kümenin zenginleşme skoru 2.71 olarak hesaplanmıştır. Bu değer 1.3 den büyük olduğu için bizim için önemlidir. Bu kümenin içerisinde bulunan 32 gen ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Yine Şekil 5B'de IBS-C ve kontrol grubunun listesinde bulunan genler ile yapılan GSE analiz sonucu gösterilmektedir. Bu analiz sonucu

incelendiğinde 86 farklı küme oluştuğu ve en önemli kümenin zenginleşme skorunun 2.41 olduğu görölmektedir. Bu küme içerisinde 64 gen

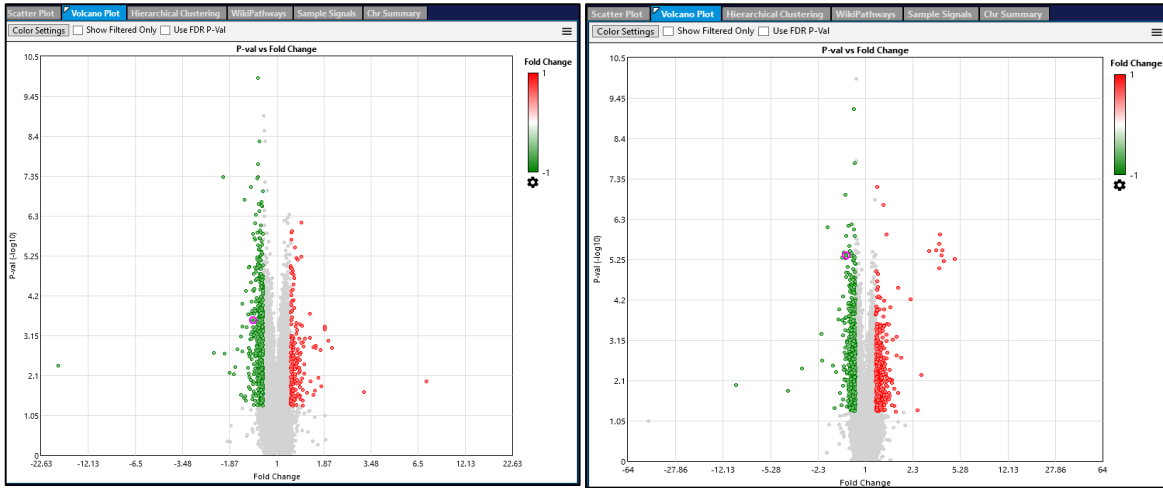
bulunmaktadır. Bu analiz verileri içerisinde zenginleşme skoru 1.3 den büyük bütün kümelerin içerisinde bulunan genler incelenmiştir.



A

B

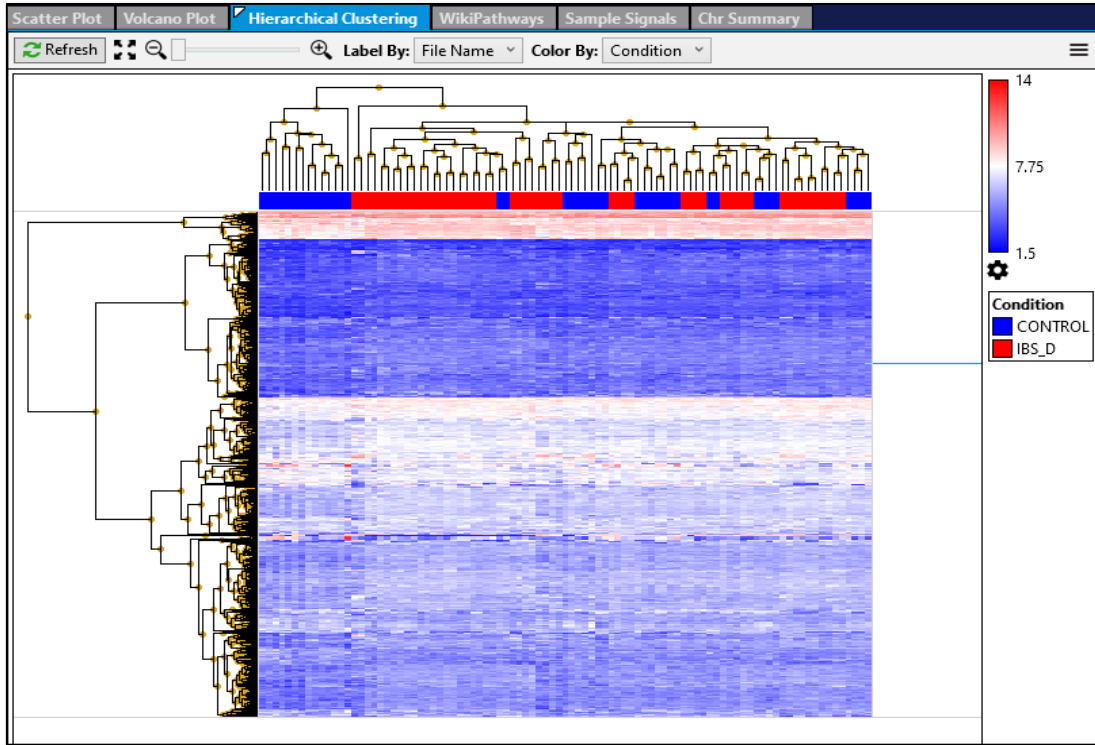
şekil 1. (A) IBS_D ve kontrol karşılaştirmasından elde edilen dağılım grafiği. **(B)** IBS_C ve kontrol karşılaştirması sonucu elde edilen dağılım grafiği



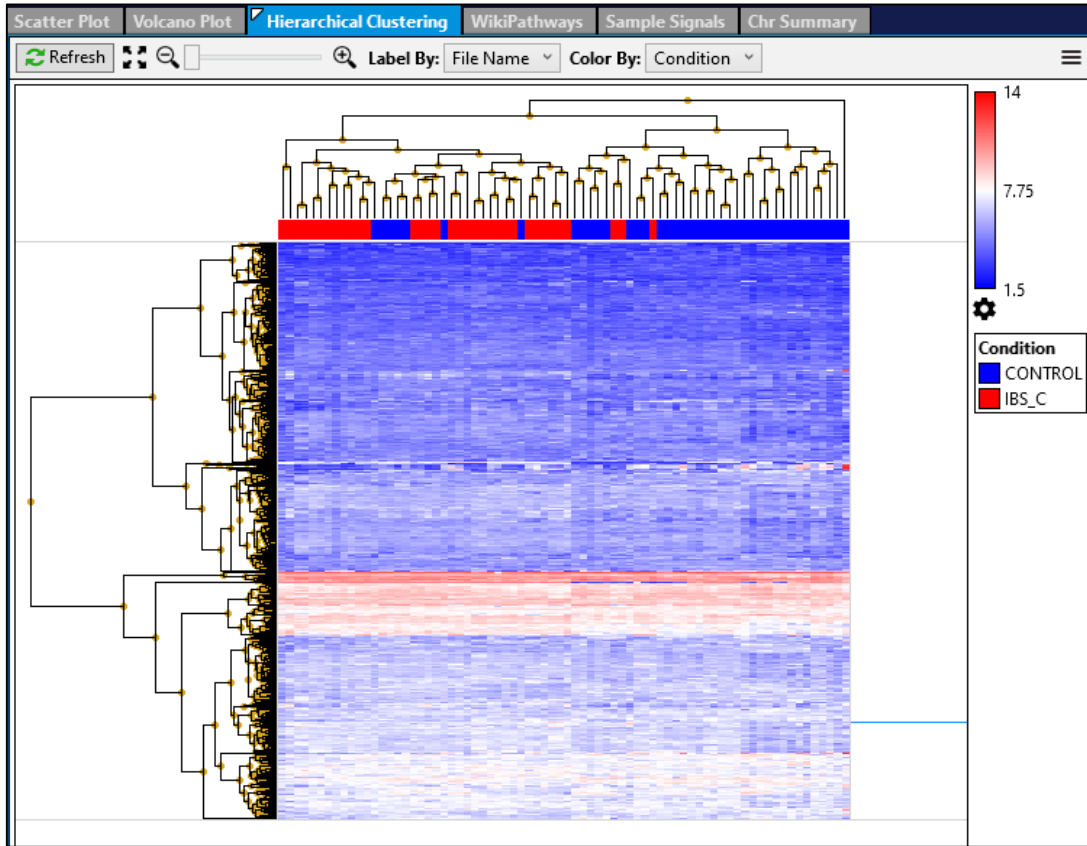
A

B

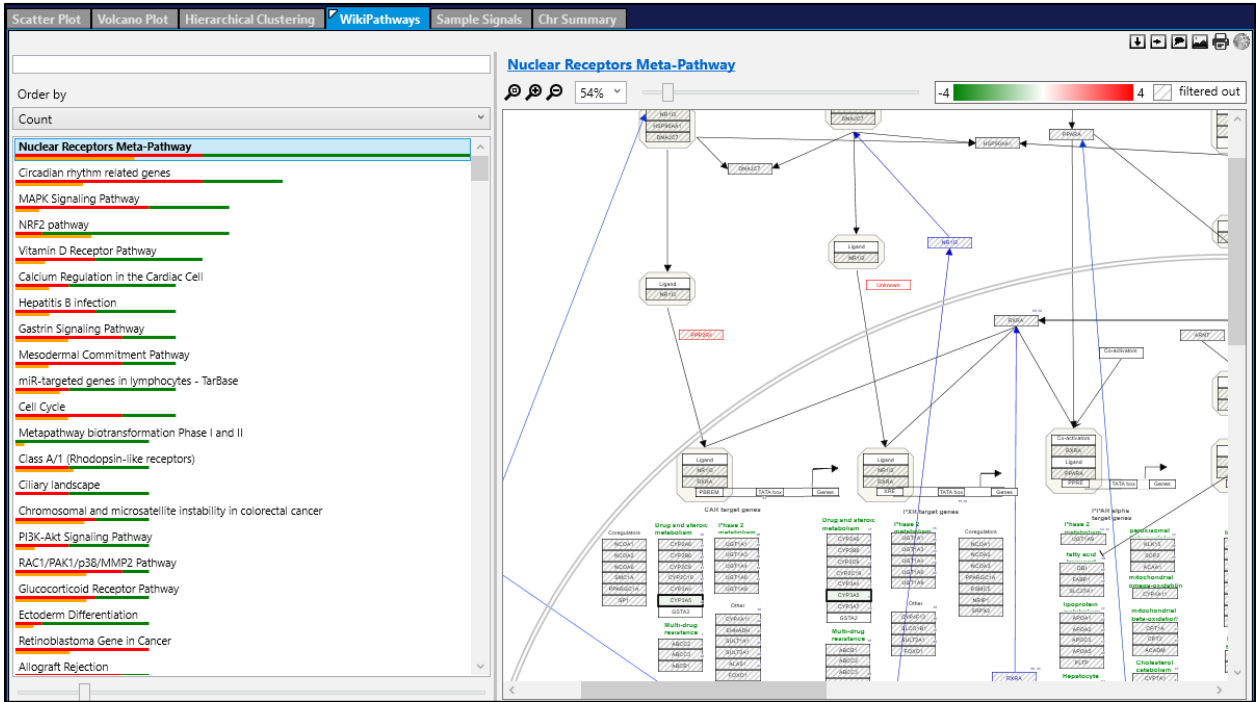
şekil 2. (A) IBS_D ve kontrol karşılaştirmasından elde edilen volkan grafiği. **(B)** IBS_C ve kontrol karşılaştirması sonucu elde edilen volkan grafiği



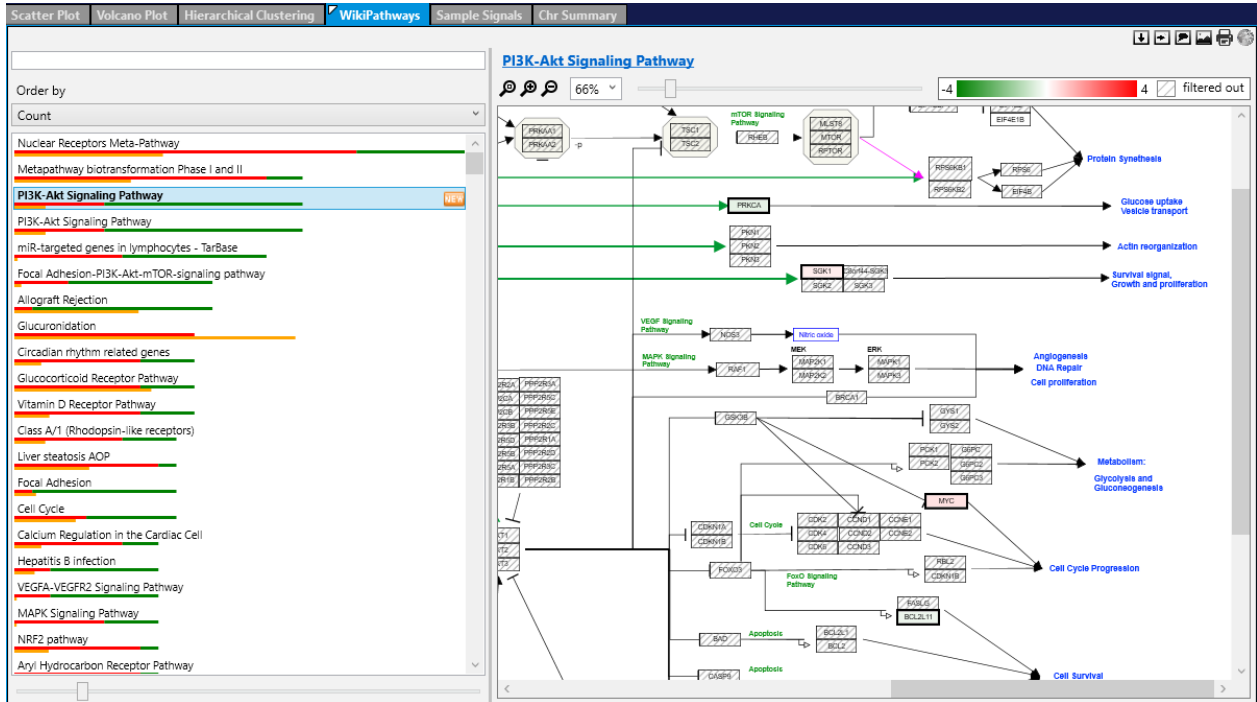
Şekil 3A. IBS-D ve kontrol grubunun karşılaştırmasından elde edilen gen listesi kullanılarak yapılan hiyerarşik kümeleme analizi sonucu elde edilen ısı haritası



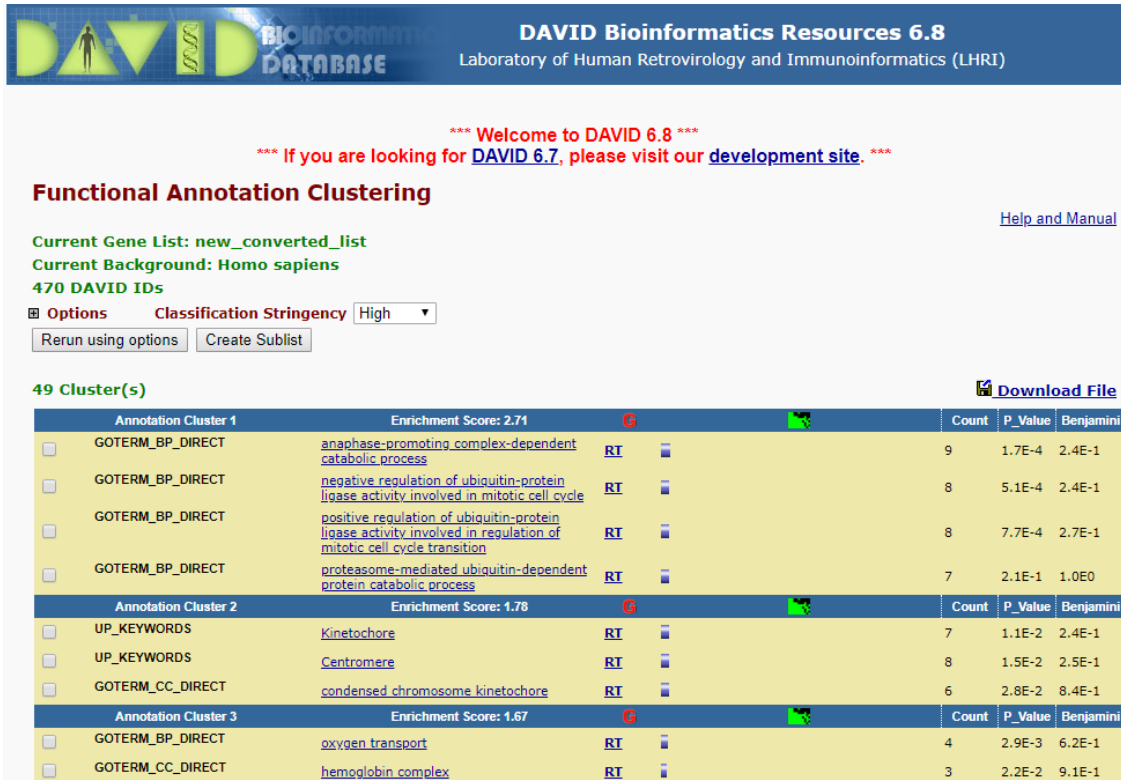
Şekil 3B. IBS-C ve kontrol grubunun karşılaştırmasından elde edilen gen listesi kullanılarak yapılan hiyerarşik kümeleme analizi sonucu elde edilen ısı haritası.



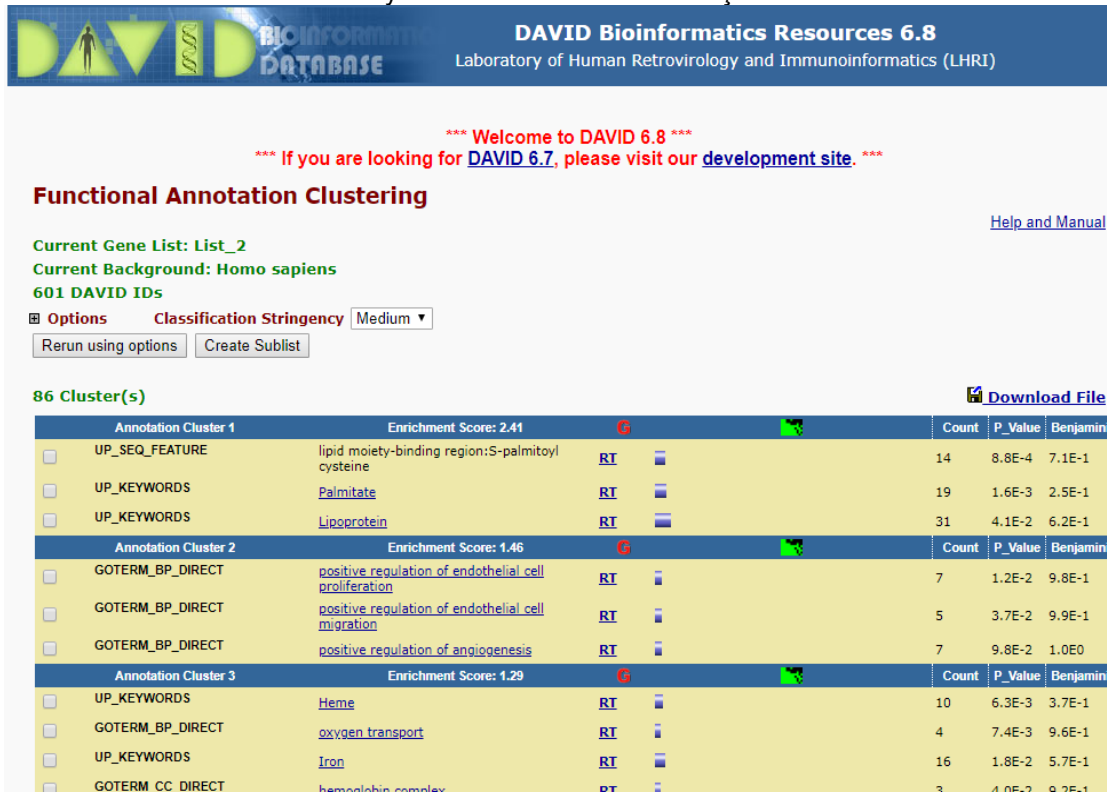
Şekil 4A. IBS_D ve kontrol grubu karşılaştırmasından elde edilen gen listesi ile yapılan yolak analizi.



Şekil 4B. IBS_C ve kontrol grubu karşılaştırmasından elde edilen gen listesi ile yapılan yolak analizi.



Şekil 5A IBS-D ve kontrol grubunun karşılaştırması sonucu elde edilen gen listesinin DAVID ile yapılan Gene-set enrichment analizi ve fonksiyonel kümeleme analiz sonuçları.



Şekil 5B. IBS-C ve kontrol grubunun karşılaştırması sonucu elde edilen gen listesinin DAVID ile yapılan Gene-set enrichment analizi ve fonksiyonel kümeleme analiz sonuçları.

Tablo 1. IBS_D ve kontrol grubu karşılaştırmasından elde edilen farklı ifade edilen gen listesindeki ilk 50 gen

Gene Symbol	IBS_D Avg (log2)	CONTROL Avg (log2)	Fold Change	P-val	FDR P-val
LINC00960	5.01	3.81	2.29	0.002	0.061
CAPN8	7.65	6.63	2.03	4.75E-08	0.0003
LOC101928820	8.56	7.56	2	0.0021	0.0625
DUOX2	6.14	5.24	1.87	0.0068	0.106
PAX8-AS1	5.49	4.69	1.74	0.0048	0.0902
LINC00960; LOC105379476	4.22	3.54	1.61	0.0249	0.1935
SLC16A9	8.9	8.22	1.61	0.0007	0.0395
LOC100288152	6.93	6.27	1.58	0.0018	0.059
LOC101927268; LOC102724851; LOC105374994	5.28	4.63	1.57	0.0001	0.0168
CCDC85A	6.16	5.52	1.56	0.03	0.2106
LOC101927391	4.55	3.93	1.53	1.86E-07	0.0007
ANKRD30B	5.52	4.91	1.52	0.0279	0.2043
CYP2C18	4.2	3.61	1.5	4.59E-05	0.0112
ANKRD30B	5.37	4.78	1.5	0.0357	0.2282
KBTBD12	6.42	5.83	1.5	0.0004	0.0306
DNASE1L3	4.34	3.79	1.46	0.0002	0.0217
MIR155HG	4.22	3.67	1.46	0.0049	0.0915
GOLGA8A	8.49	7.96	1.45	0.0015	0.0529
PNLIPRP2	8.28	7.74	1.45	0.007	0.1077
PAX8-AS1	7.54	7	1.45	0.0156	0.1554
LOC101928068	5.37	4.84	1.45	1.13E-05	0.0056
ATP12A	4.14	3.61	1.45	0.0021	0.0627
LOC100288893; TRAPPC12	5.83	5.3	1.44	1.10E-05	0.0055
SCTR	4.69	4.17	1.44	0.0085	0.1176
SEC31B	6.19	5.67	1.43	0.0009	0.043
FCRL5	3.96	3.46	1.42	0.0182	0.1669
LINC00893	3.54	3.05	1.41	0.0006	0.0367
ERVK13-1	6.37	5.87	1.41	0.0002	0.0213
CCL13	3.8	3.31	1.41	2.74E-05	0.0087
WDR4	6.97	6.48	1.41	8.45E-08	0.0004
NDUFA2	4.49	3.99	1.41	0.0021	0.062
TTC14	5.39	4.9	1.4	0.003	0.0736
UBE3D	4.21	3.73	1.4	0.0008	0.0418
EPHA1-AS1	4.98	4.49	1.4	0.0003	0.0263
SERPINB9P1	3.49	3.01	1.39	8.99E-05	0.0158
EGR3	4.59	4.12	1.39	0.0109	0.1308
ANKRD22	5.44	4.97	1.38	0.0006	0.0342
LOC645513	4.3	3.83	1.38	0.0002	0.0203
FNDC1	5.83	5.37	1.38	0.0325	0.2186
EME2	7.46	7	1.38	4.52E-05	0.0112
UQCC1	5.59	5.13	1.37	1.50E-06	0.0019
PRKXP1	4.46	4	1.37	0.0132	0.143
CCL13	4.8	4.35	1.37	0.0003	0.025
GTF2H2; GTF2H2B; GTF2H2C	6.88	6.43	1.37	0.0262	0.1978
WSB1	4.45	4	1.37	0.0004	0.0307
CATSPER2	6.26	5.81	1.36	4.74E-05	0.0113
FBXO32	4.51	4.06	1.36	0.004	0.0842
RGS8; SDHAP3	5.22	4.78	1.36	0.0007	0.0384
CSAD	4.29	3.85	1.36	0.0006	0.0351
ME1	5.01	4.57	1.36	0.0007	0.0393
CYP2B7P	5.03	4.59	1.36	0.0072	0.1087

Tablo 2. IBS_C ve kontrol grubu karşılaştırmasından elde edilen farklı ifade edilen gen listesindeki ilk 50 gen

Gene Symbol	IBS_C Avg (log2)	Control Avg (log2)	Fold Change	P-val	FDR P-val
HLA-DQB1	6.35	4.38	3.91	0.0143	0.2491
XIST	6.48	5.36	2.18	0.0005	0.0546
DUOX2	6.28	5.19	2.13	0.0024	0.1121
CAPN8	7.58	6.62	1.95	8.22E-07	0.0041
RAP2C	8.13	7.31	1.77	0.0032	0.1277
PAX8-AS1	5.4	4.63	1.71	0.0401	0.3766
AGPAT4	5.5	4.75	1.68	0.0047	0.1534
MIR155HG	4.59	3.91	1.6	0.0002	0.0365
SERPINB9P1	3.72	3.06	1.58	0.0001	0.0263
LOC100288152	6.85	6.21	1.56	0.0168	0.2671
TM4SF20	6.85	6.25	1.52	0.0351	0.3559
GOLGA8A	8.49	7.9	1.51	4.98E-06	0.0062
GOLGA8A; GOLGA8B	7.08	6.51	1.49	4.99E-05	0.0178
GOSR2	4.56	4	1.48	0.0005	0.0561
PABPC1L	5.33	4.79	1.46	3.58E-06	0.0062
TNFAIP2	8.29	7.75	1.46	0.0034	0.1305
LOC645513	5.57	5.03	1.45	0.0003	0.0416
CCL13	4.94	4.4	1.45	0.0015	0.0895
RAP2C	6.43	5.91	1.44	0.0072	0.1864
NID2	6.19	5.68	1.43	0.0022	0.1079
WDR4	6.94	6.43	1.43	1.17E-07	0.0011
CATSPER2	6.28	5.77	1.42	0.0004	0.0493
ZNF493	5.06	4.56	1.42	0.0002	0.0354
CYP2C18	4	3.5	1.42	0.0011	0.08
CADM1	6.89	6.39	1.42	0.0041	0.1428
FOXH1	4.67	4.17	1.42	5.17E-06	0.0063
COL27A1	4.58	4.09	1.41	0.0002	0.0334
UNC5CL	7.24	6.75	1.41	4.35E-06	0.0062
NABP1	7.1	6.61	1.4	1.62E-05	0.0113
LOC284009; METTL16	4.88	4.39	1.4	1.38E-06	0.0047
LOC105374809	3.72	3.24	1.4	0.0018	0.0983
NABP1	8.44	7.96	1.4	1.23E-05	0.0099
HMG20B	4.49	4.01	1.4	0.0081	0.1959
SFXN2	6.14	5.66	1.4	4.85E-06	0.0062
EGR3	4.59	4.12	1.39	0.0381	0.368
LINC00893	3.54	3.06	1.39	0.0017	0.0959
ERVK13-1	6.29	5.81	1.39	0.0048	0.155
HOTAIRM1	6.06	5.6	1.38	0.0052	0.1609
PLXDC1	4.31	3.84	1.38	3.81E-06	0.0062
NEAT1	4.71	4.25	1.38	0.0007	0.0677
SAMD3	4.69	4.23	1.38	0.0008	0.07
RBM19	5.32	4.86	1.38	1.25E-05	0.0099
CTLA4	5.29	4.83	1.37	0.0262	0.3189
ZFAS1	6.69	6.23	1.37	8.63E-06	0.0084
CROCCP2; LOC105369253	7.43	6.98	1.37	0.002	0.1034
LOC100288675	6.8	6.35	1.36	0.0077	0.1924
SLC16A6	6.13	5.7	1.35	0.0018	0.0992
CIITA	5.29	4.86	1.35	8.27E-05	0.0232
B3GLCT	7.64	7.2	1.35	0.0204	0.2902
MYO15B	6.19	5.76	1.35	0.0019	0.1004
JPX	7.3	6.87	1.35	0.0001	0.0261

Tartışma

Yapılan bu çalışmada, NCBI GEO Dataset veritabanında GSE36701 koduyla depolanmış olan IBS hastalarına ait rektal biyopsi dokularında çalışılmış transkriptom verisi biyoinformatik araçlar ile analiz edilmiştir. Analiz sırasında diyare baskın IBS örnekleri, konstipasyon baskın IBS örnekleri ayrı ayrı sağlıklı bireylerin transkriptom verisi ile karşılaştırılmıştır. Bu şekilde IBS hastalarında sağlıklı bireylere göre hangi genlerin ifade düzeylerinin farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.

IBS mortalite riski taşımayan ancak bireylerin yaşam standartını olumsuz etkileyen gastrointestinal bir patolojidir. Teşhis hastanın verdiği bilgilere dayanarak Roma IV kriterlerine göre verilmektedir. Kesin tanı için kullanılabilecek spesifik bir test veya biyobelirteç yoktur. Bundan dolayı hastalığın moleküler mekanizmasının dahi iyi anlaşılması ve teşhisinde kullanılabilecek bir biyobelirtecin geliştirilmesi klinik açıdan oldukça önemlidir.

Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda IBS-D ve kontrol karşılaştırmasında 704 genin ifadesinin değiştiğini, bu 704 genden 176 genin ifade düzeyinin IBS grubunda artış gösterdiği, 528 genin ifade düzeyinin ise azaldığı tespit edilmiştir. IBS-C ve kontrol karşılaştırmasında ise toplam 804 genin ifade düzeyinin değiştiği, bunlardan 337 genin ifade düzeyinin IBS-C grubunda artış gösterdiği, 503 genin ifade düzeyinin ise azaldığı tespit edilmiştir.

Yapılan kesişim analizi sonucunda 307 genin her iki karşılaştırma sonucu elde edilen listede ortak olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Bu IBS'nin genel moleküler profilini gösteren gen listesidir. IBS-D ve IBS-C'ye spesifik olarak değişim gösteren sırasıyla 397 ve 533 gen tespit edilmiştir. Bu genler ise IBS'nin alt tipleri olan diyare ve konstipasyon baskın tiplere özgü olan gen ifade profilidir. Bu sonuç IBS'nin alt tiplerinin de kendine özgü bir moleküler profili olduğunu göstermektedir. Analizler sonucunda biyobelirteç adayı olabilecek birçok gen tespit edilmiştir. Bu genlerden HLA-DQB1 geninin özellikle Çölyak ve Tip I Diyabet gibi otoimmün hastalıklarda rol oynadığı tespit edilmiştir. Özellikle Çölyak hastalarında otoimmün reaksiyon sonucunda bağırsak epitelinde ortaya çıkan inflamasyon sonucu bu durumun oluştuğu ifade edilmiştir (13).

Kalva ve ark (14) yaptıkları çalışmada transkriptom verisini kullanarak biyoinformatik bir yaklaşım ile IBS'nin

patogenezinde rol oynayan ve biyobelirteç adayı olabilecek genleri araştırmışlardır. Çalışma sonucunda FUS, UNC5CL ve BCLAF1 genlerinin biyobelirteç adayı olabileceğini ifade etmişlerdir. Elde edilen sonuçlarda IBS-C grubunda FUS ve UNC5CL geninin ifade düzeyinin arttığını, IBS-D grubunda ise sadece UNC5CL geninin ifade düzeyinin düştüğünü tespit ettik. Konstipasyon ve diyare baskın IBS alttiplerinin sahip oldukları farklı özellikler dolayısı ile UNC5CL geninin bu iki alttipde farklı ekspresyon göstermiş olması belirleyici olabilir. FUS geninin beta katenin ile ilişkiye girdiği ve insan bağırsak epitel dokusunda pre-mRNA splysing mekanizmasını regüle ettiği ve kronik inflamasyona sebep olduğu gösterilmiştir (15, 16).

Buna ilaveten, UNC5CL'in, TNF-alfa / NF-kB'nin aktivasyonuna yol açarak pro-enflamatuar sinyal kaskadı ekspresyonunu indüklelediği ve bağırsak epitel dokusuna zarar verdiği bildirilmiştir (17).

Sonuç olarak yapılan çalışmada konstipasyon baskın IBS alttipinde *HLA-DQB1*, *CAPN8*, *RAP2C*, *AGPAT4*, *GOLGA8A*, *UNC5CL*, *CCL13* ve *ARHGAP9* genlerinin ifade düzeyinin arttığını, *SLC28A2*, *CPB1*, *MST1L*, *ATXN1* ve *FABP2* genlerinin ise ifade düzeylerinin düştüğünü belirledik. Konstipasyon baskın IBS alttipinde öne çıkan moleküler yollar ise Hücre reseptör meta sinyal yolağı, PI3K-Akt Sinyal yolağı ve Focal Adezyon-PI3K-Akt-mTOR sinyal yolağıdır.

Diyare baskın IBS alttipinde ise ifade düzeyi artış gösteren genler genellikle konstipasyon baskın IBS alttipinde öne çıkan genlere benzer genlerdir. Bunlar *CAPN8*, *GOLGA8A*, *CCL13* ve *FCRL5* genleridir. İfade düzeyi azalan genler ise *HLA-DQB1*, *ERAP2*, *MST1L* ve *ATXN1* genleridir. Diyare baskın IBS alttipinde yapılan yolk analizleri sonucu öne çıkan moleküler yollar ise Hücre reseptör meta sinyal yolağı, MAPK sinyal yolağı ve Gastrin sinyal yolağı'dır.

Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda IBS'nin ortaya çıkmasında rol oynayan bazı genler tespit edilmiştir. Ayrıca very setini iki gruba ayırdığımız için konstipasyon baskın IBS ve diyare baskın IBS'nin ayrı ayrı moleküler profili incelenebilmiştir. Bu yaklaşım sonucunda IBS'nin alttiplerinde kendine özgü bir moleküler profili olduğu tespit edilmiştir. Bundan sonraki süreçte çalışma sonucunda elde edilen verilerin ve biyobelirteç adayı olarak tespit edilen genlerin bir hasta grubunda valide edilmesi gerekmektedir.

Kaynaklar

1. Saha L. Irritable bowel syndrome: Pathogenesis, diagnosis, treatment, and evidence-based medicine. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 6759-6773.
2. Occhipinti K, Smith JW. Irritable bowel syndrome: A review and update. *Clin Colon Rectal Surg* 2012; 25: 46-52.
3. Mearin F, Lacy BE, Chang L, et al. Bowel disorders. *Gastroenterology* 2016; 150: 1393-1407.
4. Ford AC, Lacy BE, Talley NJ. Irritable bowel syndrome. *N Engl J Med* 2017; 376: 2566-25678.
5. Talley NJ. Serotonergic neuroenteric modulators. *Lancet* 2001; 358: 2061-2068.
6. Dunlop SP, Coleman NS, Blackshaw E, et al. Abnormalities of 5-hydroxytryptamine metabolism in irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 349-357.
7. Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, et al. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and

- irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004; 126: 1657-1664.
8. Sperber AD, Dumitrascu D, Fukudo S, et al. The global prevalence of IBS in adults remains elusive due to the heterogeneity of studies: A Rome Foundation working team literature review. *Gut* 2017; 66: 1075-1082.
 9. Inadomi JM, Fennerty MB, Bjorkman D. Systematic review: the economic impact of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 671-682.
 10. Swan C, Duroudier NP, Campbell E, et al. Identifying and testing candidate genetic polymorphisms in the irritable bowel syndrome (IBS): Association with TNFSF15 and TNFalpha. *Gut* 2013; 62: 985-994.
 11. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009; 4: 44-57.
 12. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: 1-13.
 13. Farina F, Picascia S, Pisapia L, et al. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 alleles, conferring susceptibility to celiac disease and type 1 diabetes, are more expressed than non-predisposing alleles and are coordinately regulated. *Cells* 2019; 8: 751.
 14. Kalva S, Bindusree G, Alexander V, Madasamy P. Interactome based biomarker discovery for irritable bowel syndrome-A systems biology approach. *Comput Biol Chem* 2018; 76: 218-224.
 15. Sato S, Idogawa M, Honda K, et al. Beta-catenin interacts with the FUS proto-oncogene product and regulates pre-mRNA splicing. *Gastroenterology* 2005; 129: 1225-1236.
 16. Hasler R, Kerick M, Mah N, et al. Alterations of pre-mRNA splicing in human inflammatory bowel disease. *Eur J Cell Biol* 2011; 90: 603-611.
 17. Heinz LX, Rebsamen M, Rossi DC, et al. The death domain-containing protein Unc5CL is a novel MyD88-independent activator of the pro-inflammatory IRAK signaling cascade. *Cell Death Differ* 2012; 19: 722-731.