



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**Tek Hücreli RNA Dizileme Verileriyle Ankilozan Spondilit
Hastalığına Özgü Genom-Ölçekli Metabolik Modellerin
Oluşturulması**

Yüksek Lisans Tezi

Merve Yarıcı

Ağustos 2023



İSTANBUL MEDENİYET ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

**Tek Hücreli RNA Dizileme Verileriyle Ankilozan Spondilit
Hastalığına Özgü Genom-Ölçekli Metabolik Modellerin
Oluşturulması**

Yüksek Lisans Tezi

Merve Yarıcı

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Erkan Karabekmez

Ağustos 2023

TEZ JÜRİSİ ONAYI

Merve Yarıcı tarafından hazırlanan “Tek Hücreli RNA Dizileme Verileriyle Ankilozan Spondilit Hastalığına Özgü Genom-Ölçekli Metabolik Modellerin Oluşturulması” başlıklı bu Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda hazırlanmış ve jürimiz tarafından kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ

İMZA

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Erkan Karabekmez
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Üyeler:

Prof. Dr. Hasan Güçlü
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Prof. Dr. Tunahan Çakır
Gebze Teknik Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 02/ 08 / 2023

BEYANLAR

Yazım ve Kaynak Gösterme Kılavuzu Beyanı

Danışmanlığımda yazılan bu tezin APA yazım ve kaynak gösterme kılavuzunda belirtilen kurallara uygun olarak yapılandırıldığı ve bu kılavuzun metin içi kaynak gösterme standartlarının bu tezde tutarlı olarak uygulandığı tarafımdan incelenerek teyit edilmiştir.

İmza

Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Erkan Karabekmez

Etik İlkelerine Sadakat Beyanı

Hazırladığım bu tezin tamamen kendi çalışmam olduğunu, akademik ve etik kuralları gözeterek çalıştığımı ve her alıntıya kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

İmza

Merve Yarıcı

ÖZET

Tek Hücreli RNA Dizileme Verileriyle Ankilozan Spondilit Hastalığına Özgü Genom-Ölçekli Metabolik Modellerin Oluşturulması

Yarıcı, Merve

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Erkan Karabekmez

Ağustos 2023

Ankilozan Spondilit (AS) başta omurgada olmak üzere eklemleri etkileyerek kronik bir ağrıya neden olan ve en yaygın rastlanan otoimmün hastalıklardan biridir. Hastalık patogenezinin henüz aydınlatılmamış olmasıyla beraber hastalığın erken teşhisinde kullanılan HLA-B27 geni yüksek oranda yalancı pozitiflik içerdiğinden etkili bir biyobelirteç görevi görmemektedir. Heterojen hastalıkların immünolojik mekanizmasının araştırılmasında farklı hücre tiplerinin biyolojik süreçlerdeki rollerinin bilinmesi süreci kolaylaştırmakta ve etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini sağlamaktadır. Son yıllarda kullanımı hızla artan ve her hücre tipini spesifik olarak inceleme fırsatı sunan tek hücreli RNA dizileme tekniği (scRNA-seq) hastalıkların immünolojik mekanizmalarının araştırılmasında kullanılan avantajlı bir yöntemdir. Hücresel metabolizmayı anlamak için genom ölçekli metabolik modellerin scRNA-seq verilerine uygulanması gen-reaksiyon bağlantılarını belirleyerek metabolik akışı tahmin etme ve hastalıkların biyolojik mekanizmalarının anlaşılması için önemli ipuçları sağlayabilme potansiyeli barındırmaktadır. Bu tez çalışmasında AS hastalığına özgü periferik kan mononükleer hücrelerinin (PKMH) scRNA-seq verileri analiz edilmiş ve GIMME algoritması kullanılarak her hücre tipi için ayrı ayrı genom ölçekli metabolik modeller oluşturularak hasta ve sağlıklı koşul arasında değişen reaksiyon akıları analiz edilmiştir. Ayrıca, her hücre tipi için raportör metabolit analizleri gerçekleştirilmiş ve protein-protein etkileşim (PPE) ağları oluşturularak hücre tipine özgü ağlar karşılaştırılmış ve topolojik rolü farklılaşan genler/proteinler bulunmuştur. Sonuç olarak, AS'li hastaların CD14 Monocytes, CD4 Memory, CD4 Naive ve CD8 T hücrelerinde pürin metabolizması, doymamış yağ asitlerinin biyosentezi ve glikoliz üzerindeki akışların sağlıklı bireylere göre diferansiyel olarak arttığı görülmüştür. Ayrıca, ACTB geni AS hastalarında tüm hücre tipleri için yukarı regüle edildiği gözlemlenen en tutarlı merkezi gen/protein olarak bulunmuştur ve yine merkezi genlerden HSPA8 ve HMBG1 genleri ise HLA-B27'ye alternatif potansiyel biyobelirteç olarak ortaya çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ankilozan Spondilit, scRNA-seq, Genom Ölçekli Metabolik Modelleme, GIMME, Biyolojik Ağlar

ABSTRACT

Construction of Ankylosing Spondylitis-Specific Genome-Scale Metabolic Models with Single-Cell RNA Sequencing Data

Yarıcı, Merve

Master's Thesis, Department of Bioengineering

Supervisor: Dr. Muhammed Erkan Karabekmez

August 2023

Ankylosing Spondylitis (AS) is one of the most common autoimmune diseases which affects joints – especially spinal joints - and causes chronic pain. HLA-B27 gene is used as biomarker for diagnosis of the disease, but it carries high rate of false positivity that's why this gene is not approved as an effective biomarker. In the investigation of the immunological mechanism of heterogeneous diseases, knowing the roles of different cell types in biological processes facilitates the process and enables the development of effective treatment methods. Single-cell RNA sequencing technique (scRNA-seq), which has been used increasingly in recent years and offers the opportunity to examine each cell type specifically, is an advantageous method. The application of genome-scale metabolic models to scRNA-seq data to understand cellular metabolism has the potential to predict metabolic flux by identifying gene-reaction links and provide important clues for understanding the biological mechanisms of diseases. In this study, scRNA-seq data of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) specific to AS disease were analyzed and the reaction fluxes varying between patient and healthy condition were analyzed by creating separate genome-scale metabolic models for each cell type using the GIMME algorithm. In addition, reporter metabolite analyses were performed for each cell type and cell type specific networks were compared by forming protein-protein interaction (PPI) networks and genes/proteins with differing topological roles were found. As a result, purine metabolism, biosynthesis of unsaturated fatty acids and fluxes on glycolysis were observed to be differentially increased in CD14 Monocytes, CD4 Memory, CD4 Naive and CD8 T cells of patients with AS compared to healthy individuals. Also, the ACTB gene was found to be the most consistent central gene/protein observed to be up-regulated for all cell types in AS patients, and the central genes HSPA8 and HMBG1 emerged as potential biomarkers alternative to HLA-B27.

Keywords: Ankylosing Spondylitis, scRNA-seq, Genome-Scale Metabolic Modeling, GIMME, Network Biology

TEŞEKKÜR

Eğitim hayatımdaki en büyük şansım ve akademik kariyerimin dönüm noktası olan, her daim yolumu aydınlatarak mükemmel öğretisiyle rol modelim ve tanıdığım en iyi en doğru insanlardan biri olan çok kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Muhammed Erkan Karabekmez'e ne kadar teşekkür etsem az olur. Sabrı, güveni, anlayışı ve bana kattığı her şey için kendisine minnettarım.

Değerli vakitlerini ayıran jüri üyeleri Prof. Dr. Hasan Güçlü ve Prof.Dr. Tunahan Çakır'a ayrıca çok teşekkür ederim.

Üniversite hayatımın en güzel armağanı, canım dostum Aleyna'ya, bu süreçte desteğini hep hissettiğim Hatice'ye ve isimlerini sığdıramadığım hayatımı neşeli kılan tüm arkadaşlarıma teşekkürler.

Hayatımın her anında doğruluğuyla ve başarılarıyla örnek aldığım canım ablama, kendi bilgisayarını hediye ederek analizlerimi kolaylaştıran sevgili enişteme, tespitleriyle yeni bakış açıları kazandıran canım abime, sevgilerini ve maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, ne olursa olsun mutlu ve huzurlu bir hayat geçirmemi sağlayan anneme ve babama sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak bu tez çalışması TÜBİTAK 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı Büyük Veri ve Veri Analitiği kategorisinde desteklenmiştir, destekleri için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Daha nicesi doktora tezime, yeni projelere, yeni yayınlara, akademi dünyasına faydalı bir bilim insanı olmaya inşallah!

İÇİNDEKİLER

• 1.GİRİŞ

- 1.1. Bağışıklık Sistemi ve Otoimmün Hastalıklar.....	1
- 1.2. Ankilozan Spondilit.....	2
- 1.3. Sistem Biyolojisi ve Omik Veriler.....	5
- 1.4. Tek Hücreli Transkriptomik.....	6
- 1.5. scRNA-seq Veri Analizi & Seurat.....	11
- 1.6. Ankilozan Spondilit için scRNA-seq Çalışmaları.....	13
- 1.7. Biyolojik Ağlar.....	14
- 1.8. Genom Ölçekli Metabolik Modelleme.....	16
- 1.9. Omik Veriler ve GÖMM Entegrasyonu.....	17
- 1.10. GIMME.....	19
- 1.11. Raportör Metabolitler.....	20
- 1.12. Çalışmanın Amacı.....	22
• 2. YÖNTEM	
- 2.1. Veri Kümelerinin Tespiti.....	23
- 2.2. scRNA-seq Veri Setlerinin Analizi ve İfadesi Anlamlı Değişen Genlerin Tespiti.....	25
- 2.3. Hücre Tipine Özgü Genom Ölçekli Metabolik Modellerin (GÖMM) Oluşturulması.....	28
- 2.4. Akı Örneklemesi ve Reaksiyon Seti Zenginleştirme Analizleri.....	29
- 2.5. Raportör Metabolit Analizleri.....	29

- 2.6. Her Hücre Tipi için Bağlama Özgü Protein-Protein Etkileşim Ağlarının Oluşturulması.....	30
• 3.BULGULAR	
- 3.1. scRNA-seq Veri Analizi.....	31
- 3.2. Hücre Tipine Özgü Metabolik Modellerin Oluşturulması.....	39
- 3.3. Raportör Metabolit Analizleri.....	51
- 3.4. Her Hücre Tipi için Bağlama Özgü Protein-Protein Etkileşim Ağlarının Oluşturulması.....	56
• 4. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	62
• KAYNAKÇA.....	70
• EKLER.....	87

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1.1. GSE1633314 Kodlu veri setindeki örneklerin özellikleri.....	23
Tablo 2.1.2. GSE194315 kodlu veri setindeki örneklerin özellikleri.....	24
Tablo 3.1.1. VS1’de UMAP ile Belirlenen Her Küme için İfadesi Yukarı Düzenlenmiş İlk 10 Gen.....	36
Tablo 3.1.2. VS2’de UMAP ile Belirlenen Her Küme için İfadesi Yukarı Düzenlenmiş İlk 10 Gen.....	37
Tablo 3.1.3 : VS1’de tespit edilen hücre tipleri için İDG sayıları.....	38
Tablo 3.1.4: VS2’de tespit edilen hücre tipleri için İDG sayıları.....	39
Tablo 3.2.1. VS1’deki 12 hücre tipine özgü GIMME algoritması ile oluşturulan GÖMM’lerin Özellikleri.....	41
Tablo 3.2.2. VS2’deki 22 hücre tipine özgü GIMME algoritması ile oluşturulan GÖMM’lerin Özellikleri.....	42
Tablo 3.2.3. VS1’deki DUF ve DDF sayıları.....	44
Tablo 3.2.4. VS2’deki DUF ve DDF sayıları.....	45
Tablo 3.2.5. VS1’deki hücre tiplerine özgü GÖMM’lerde tespit edilen diferansiyel olarak artan akıların zenginleşim analizleri.....	46
Tablo 3.2.6. VS1’deki hücre tiplerine özgü GÖMM’lerde tespit edilen diferansiyel olarak azalan akıların zenginleşim analizleri.....	47
Tablo 3.2.7. VS2’deki hücre tiplerine özgü GÖMM’lerde tespit edilen diferansiyel olarak artan akıların zenginleşim analizleri.....	48

Tablo 3.2.8. VS2'deki hücre tiplerine özgü GÖMM'lerde tespit edilen diferansiyel olarak azalan akıların zenginleşim analizleri.....	49
Tablo 3.3.1. VS1 hücre tiplerinin İDG'leri ile tespit edilen Raportör Metabolitler.....	51
Tablo 3.3.2. VS2 hücre tiplerinin İDG'leri ile tespit edilen Raportör Metabolitler.....	54
Tablo 3.4.1. Hücre Tiplerine ait İDG Sayıları.....	56
Tablo 3.4.2. Hücre tipine özgü PPE ağlarının topolojik analizleri.....	57

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.2.1. Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PKMH).....	5
Şekil 1.4.1. scRNA-seq ve toplu RNA dizileme karşılaştırması.....	7
Şekil 1.4.2. Yıllara göre scRNA-seq çalışmaları.....	8
Şekil 1.4.3. scRNA-seq deneylerinde kullanılan teknolojiler ve protokoller	9
Şekil 1.4.4. scRNA-seq tekniği genel iş akışları.....	10
Şekil 1.10.1. GIMME algoritması çalışma prensibi.....	20
Şekil 1.11.1. Raportör Metabolitler.....	21
Şekil 3.1.1. Kalite kontrol işlemi öncesi ve sonrasını gösteren grafikler.....	32
Şekil 3.1.2. Kalite kontrol işlemi öncesi ve sonrasını gösteren grafikler.....	32
Şekil 3.1.3. Kalite kontrol işlemi öncesi ve sonrasını gösteren grafikler.....	33
Şekil 3.1.4. Kalite kontrol işlemi öncesi ve sonrasını gösteren grafikler.....	33
Şekil 3.1.5. VS1 ve VS2 için dirsek grafikleri.....	34
Şekil 3.1.6. VS1 için UMAP görselleri.....	35
Şekil 3.1.7. VS2 için UMAP görselleri.....	35
Şekil 3.1.8. VS1 ve VS2 için kümeleri temsil eden Hücre Tipleri.....	38
Şekil 3.2.1. VS1 sıklık grafiği.....	40
Şekil 3.2.2. VS2 sıklık grafiği.....	40
Şekil 3.4.1. DyNet ile yedi hücre tipinin birleştirilmiş PPE ağlarının görselleştirilmesi.....	58
Şekil 3.4.2. 57 ortak İDG'nin zengileşim analizleri.....	59
Şekil 3.4.3. 11 Merkezi gen/protein zengileşim analizleri.....	60
Şekil 3.4.4. Hücre tipi kombinasyonlarında ACTB'nin komşularındaki değişim.....	61

KISALTMALAR

AS	: Ankilozan Spondilit
axSpA	: Aksiyal Spondiloartrit
BASDAI	: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index
cDNA	: complementary DNA
FBA	: Flux Balance Analysis
fTINIT	: Fast Task-driven Integrative Network Inference for Tissues
GEO	: Gene Expression Omnibus
GIMME	: Gene Inactivity Moderated by Metabolism and Expression
GÖMM	: Genom Ölçekli Metabolik Model
GWAS	: Genome-Wide Association Studies
HLA-B27	: Human Leukocyte Antigen B27
iMAT	: Integrative Metabolic Analysis Tool
MADE	: Metabolic Adjustment by Differential Expression
PCA	: Principal Component Analysis
PKMH	: Periferik Kan Mononükleer Hücreleri
popFBA	: Population Flux Balance Analysis
PPE	: Protein-Protein Etkileşimleri
PROM	: Probabilistic Regulation of Metabolism
RNA-seq	: RNA sequencing
RT-PCR	: Real Time Polymerase Chain Reaction
scFBA	: Single Cell Flux Balance Analysis
scRNA-seq	: Single Cell RNA Sequencing
SPA	: Spondiloartirit
tINIT	: Task-driven Integrative Network Inference for Tissues
tSNE	: t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding
UMAP	: Uniform Manifold Approximation and Projection
UMI	: Unique Molecular Identifiers

1. GİRİŞ

1.1. Bağışıklık Sistemi ve Otoimmün Hastalıklar

Bilindiği üzere insan vücudu birçok kompleks sistem içermektedir, bu sistemlerden belki de en önemlisi çok hassas bir şekilde çalışan bağışıklık (immün) sistemidir. Bağışıklık sistemi hastalıklara karşı bir kalkan görevi görerek patojenlerin ve tümör hücrelerinin çoğalmasını ve yayılmasını engeller veya geciktirir. Bu sistem yabancı moleküllerle bir savaş halindeyken kendisine ait olan doku ve molekülleri korumaktadır (Sompayrac L. M., 2022). Bağışıklık sistemi vücudun kendisine ait olmadığını algıladığı pek çok şey tarafından etkinleşebilir, bu yabancı maddelere antijen denmektedir. Antijenler bakteri, virüs ya da mantar hücrelerinin protein yapılı molekülleridir. Bağışıklık sistemi bir antijeni algıladığında o antijene karşı bir bağışıklık yanıtı geliştirerek antikor oluşturur; oluşturulan her bir antikor sadece kendisiyle uyumlu olan antijeni tanıyabilir ve bağışıklık yanıtı oluşturabilir (Nicholson., 2016). Kemik iliğinde üretilen beyaz kan hücreleri, bağışıklık sisteminin kritik bir bileşeni olarak önemli bir rol oynayarak vücudu enfeksiyonlara ve hastalıklara karşı korurlar, ayrıca doku onarımında ve enflamasyonun kontrolünde de görev alırlar. Bu hücreler lenfositler, nötrofiller, eozinofiller, bazofiller ve monositler olmak üzere farklı tiplere ayrılırlar (Tang vd., 2020). Bazı durumlarda, bağışıklık sistemi vücudun kendi sağlıklı hücrelerini yabancı hücrelerden ya da moleküllerden ayırt edemeyerek kendi hücrelerine saldırır ve otoimmün hastalıklar meydana gelir. 80'den fazla otoimmün hastalığın olduğu bilinmekle beraber bu hastalıklardan bazıları sadece bulunduğu hücre tipinin oluşturduğu doku ve organları etkilerken bazıları ise pek çok organı etkileyebilmektedir. Sık rastlanılan Tip 1 diyabet, multipl skleroz, lupus ve sedef gibi bazı otoimmün hastalıkların

teşhisi kolay olabilirken, henüz patogenezi aydınlatılmamış birçok otoimmün hastalık da bulunmaktadır (Hodson., 2021).

1.2. Ankilozan Spondilit

En yaygın görülen otoimmün hastalıklardan biri olan Ankilozan Spondilit (AS) geniş bir iltihabi romatizmal hastalıklar grubu olan Spondiloartrit'in (SPA) yaygın görülen bir tipidir (Alber vd., 2022). Esas olarak Omurga eklemlerini etkileyerek karakteristik bir kronik ağrıya neden olabilir ve yaşam kalitesini düşürebilmektedir (Hwang vd., 2021). Kadınlara oranla erkeklerde daha sık rastlanılan bu hastalıkta hastaların %80 gibi büyük bir oranı ilk semptomlarını 30 yaşın altındayken görmektedir (Braun ve Sieper, 2007). Dean ve arkadaşları tarafından 2014'te yapılan bir çalışmaya göre AS'nin küresel olarak görülme sıklığı %0,1 ile % 1,4 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Aynı çalışmada birkaç farklı çalışmanın verileri analiz edilerek 10.000 nüfus başına ortalama AS prevalansının Avrupa'da 23,8, Asya'da 16,7, Kuzey Amerika'da 31,9, Latin Amerika'da 10,2 ve Afrika'da 7,4 olduğu sonucuna varılmıştır (Dekan vd., 2014). Türkiye özelinde bakıldığında literatürde son yıllara ait güncel bir veri olmamasıyla beraber Prof. Dr. Nurullah Akkoç tarafından 2010 yılında yapılan bir çalışmada AS'nin Türkiye'de görülme sıklığı %0,49 olarak belirtilmiştir (Akkoç, 2010).

AS'nin başlangıcında çoklu immünolojik, genetik ve genetik olmayan risk faktörleri rol oynamaktadır ancak hastalık patogenezi henüz aydınlatılmamıştır, bu nedenle hastalığın erken teşhisinde kullanılabilecek biyoberlirteçlerin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. AS'nin erken teşhisinde kullanılan HLA- B27'nin hastalıkla güçlü bir ilişkisi olduğu bilinmekte ancak yüksek

oranda yalancı pozitiflik içerdiğinden dolayı kullanışlı bir biyobelirteç görevi görmemektedir (Linden vd., 1984). Ayrıca, AS için kullanılan kesin bir tedavi yöntemi henüz geliştirilmemiştir, mevcut tedavi yöntemleri semptomları azaltarak hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak için kullanılmaktadır (Zhu vd., 2019).

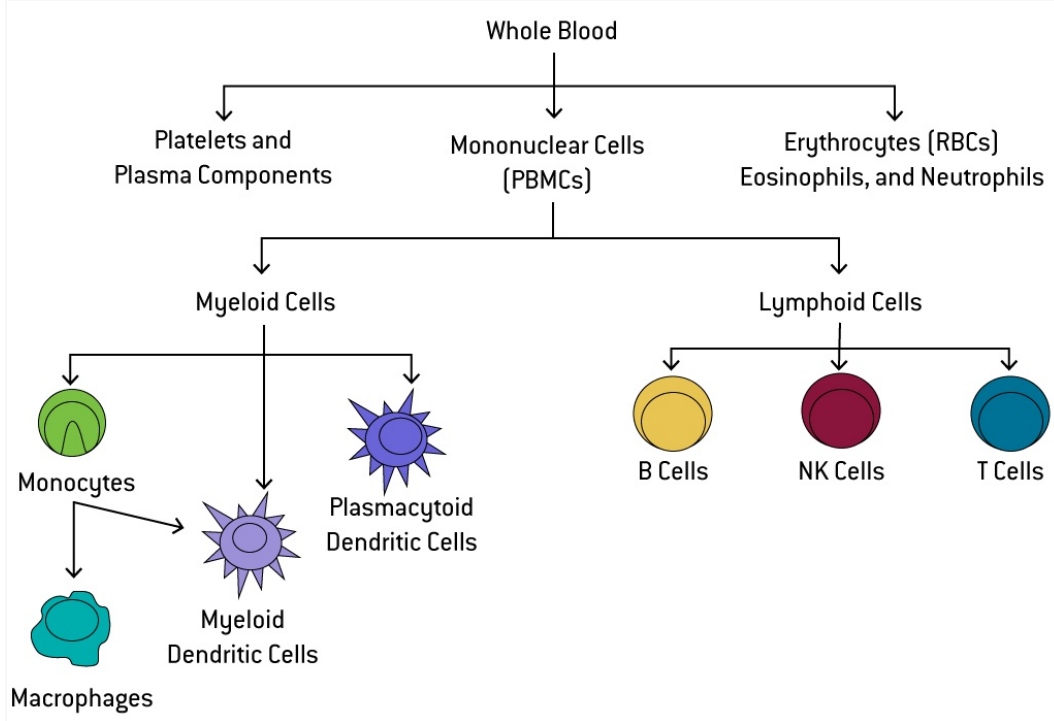
AS hastalarında hastalık şiddetini ve aktivitesini ölçmek ya da değerlendirmek için BASDAI (Bath Ankilozan Spondilit Hastalık Aktivite İndeksi) indeksi kullanılmaktadır (Calin vd., 1994). Hastalığın yaygın görülen semptomlarından yorgunluk, eklem ağrısı, şişlik ve sabah tutukluğu gibi semptomlar 0-10 arasında değişen bir skorla değerlendirilir (Acar vd., 2019).

AS başlangıcına neden olan risk faktörleri ve immünolojik yönler göz önünde bulundurulduğunda halihazırda hastalığın erken teşhisinde kullanılan HLA- B27 geninin varlığı AS gelişimi ile yakın ilişkilidir (Linden vd., 1984). İmmün sistem tarafından tanınarak bağışıklık sistemini düzenleyen proteinlerin bir grup kompleksi olan HLA-B27 geni HLA (Human Leukocyte Antigen) sınıf I moleküllerinin bir alt tipidir ve immün yanıtın düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir (Kavadichanda vd., 2021). Bu genin AS gelişimine etkisi tam olarak bilinmemekle birlikte çoğu sağlıklı bireyde de HLA-B27 geni pozitif olabilmektedir ancak yapılan çalışmalar HLA-B27 pozitif olan bireylerde AS gelişme riskinin daha yüksek olduğunu göstermektedir (Chatzikyriakidou vd., 2011); AS teşhisi konmuş hastaların yaklaşık %94'ünde HLA-B27 pozitif olarak gözlemlenmiştir (McMichael ve Bowness, 2002).

AS'nin mevcut tedavi yöntemlerini geliştirmek ve hastalık mekanizmasını aydınlatmak için HLA-B27'ye alternatif yeni biyobelirteçlerin bulunması ve ilaç yeniden konumlandırma çalışmaları

umut verici olabilmektedir. Literatürde yer alan Ankilozan Spondilit çalışmalarındaki transkriptomik, metilomik, interaktomik ve regülojik gibi farklı verilerin bütünleşik meta analizi geliştirilerek potansiyel ilaç hedefleri belirlemek ve yeni biyobelirteç adayları tespit etmek mümkündür. Ankilozan Spondilit hastaları ve sağlıklı kontrol grubu arasında diferansiyel olarak anlamlı değişen genleri tespit etmek ve bu genlerin ifade seviyelerini AS'li hastalardan ve sağlıklı kontrol grubundan alınan PKMH (Periferik Kan Mononükleer Hücreleri) örneklerini bir takım deneysel (örn. qRT-PCR gibi moleküler yöntemler) ve hesaplamalı yöntemlerle (örn. toplu RNA-seq ve tek hücreli RNA-seq veri analizi) doğrulamak mümkün olabilmektedir (Zheng vd., 2021; Pimentel-Santos vd., 2011).

PKMH'ler (lenfositler:T hücreleri, B hücreleri, NK hücreleri; monositler ve dendritik hücreler) (Şekil 1.2.1.) immün sistemin önemli bileşenlerini içeren bir hücre popülasyonu olduğu için AS hastalarında immünolojik değişikliklerin belirlenmesinde önemli bir kaynak olarak kullanılmaktadır (Vanaki vd., 2018; Wang vd., 2009; Li vd., 2020). Örneğin AS patogenezinde, farklı savunma hücre tiplerinin (NK hücreleri, CD4+ T hücreleri, Th17 hücreleri) rolü olduğu bilinmektedir (Alber vd., 2022). Deneysel ve hesaplamalı yöntemler kullanılarak bu hücre tiplerinin hastalık patogenezindeki rolleri incelenebilmektedir. Ancak, literatürde sıkça karşılaşılan ve yaygın olarak kullanılan toplu RNA-seq analizleri bu hücre tiplerini ayrı ayrı incelemek için yeterli ayrıntıyı sağlamamaktadır. Bu nedenle, tek hücreli RNA-seq (scRNA-seq) tekniği özellikle immün hücre tipleri üzerinde ayrıntılı incelemeler yapmak için büyük önem taşımaktadır.



Şekil 1.2.1. Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PKMH) / PBMCs – *the One Stop Immune Cell Shop*. Lonza. (n.d.). https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/CH/en/pbmcs-the-one-stop-immune-cells-shop

1.3. Sistem Biyolojisi ve Omik Veriler

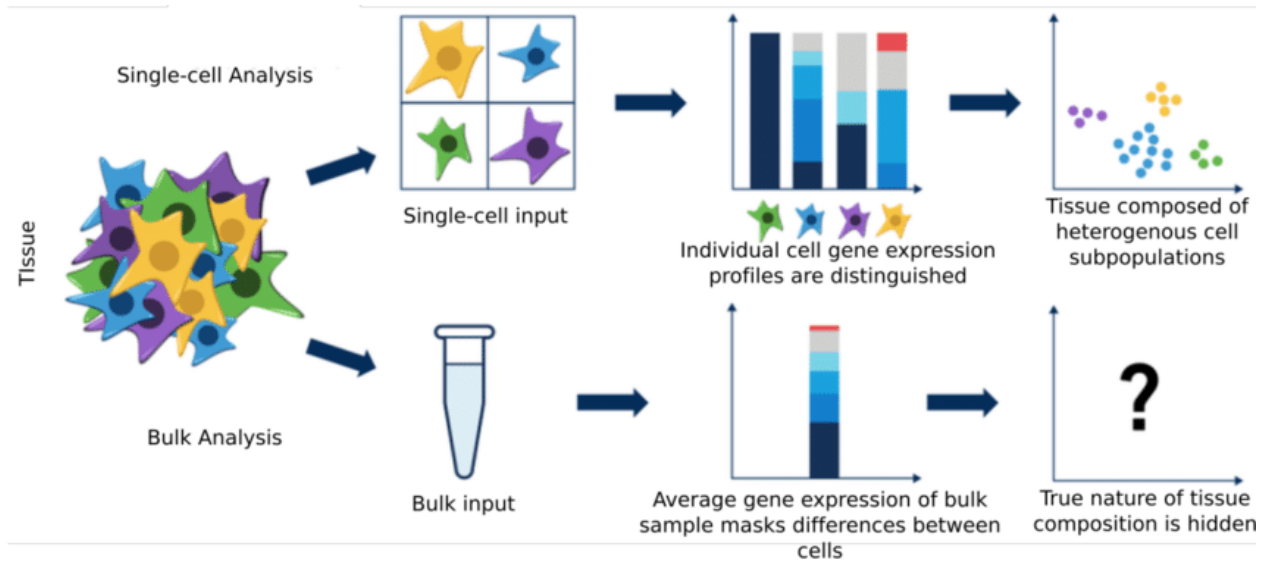
Sistem biyolojisi bir organizmanın yapısını, metabolizmasının genel işleyişini bütüncül olarak sistem seviyesinde ifade etmeye çalışarak bir takım matematiksel modellemeleri, hesaplamalı simülasyonları, veri analitiğini ve yüksek verimli deney sonuçlarını birleştiren bir bilim dalıdır (Forero vd., 2007; Kasap vd., 2010). Sistem biyolojisi yaklaşımları transkriptomik, genomik, proteomik, metabolomik ve epigenetik olmak üzere çoklu omik verilerin analizini kapsayarak geniş bir çapta değerlendirilebilmektedir. Ankilozan Spondilit gibi patogenezi henüz aydınlatılmamış otoimmün hastalıkların, karmaşık biyolojik süreçlerin veya yolların analizleri bu tür çoklu omik yaklaşımlarla aydınlatılabilmekte ve hastalıkların tedavi süreçlerinde

kullanılabilecek yeni ve nitelikli biyobelirteçlerin keşfi mümkün olabilmektedir (Kim vd., 2014). Örneğin, literatürde AS patogenezini aydınlatmak için sistem biyoloji yaklaşımlarını kullanan çalışmalar mevcuttur, bu çalışmalarda genel olarak RNA dizileme ve mikro dizi veri analizleri gerçekleştirilerek AS'li hastalarda sağlıklı bireylere göre diferansiyel olarak ifadesi artan genler tespit edilmiş ve ıslak laboratuvarında RT-PCR gibi yöntemler kullanılarak validasyon çalışmaları yapılmıştır (Lari vd., 2021; Berlinberg vd., 2021; Pimentel-Santos vd., 2011; AlEjlat vd., 2021). Ayrıca bu çalışmalara ek olarak, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS: Genome-wide association studies) büyük ölçekte genetik varyasyonları tarayarak karmaşık hastalık mekanizmalarıyla ilişkili genetik belirleyicileri ya da risk bölgelerini belirlemeye çalışarak varyasyonların genotiplerini sağlıklı bireylerle karşılaştırarak istatistiksel bir değerlendirme sağlamaktadır. Mesela AS için yapılan GWAS çalışmaları HLA-B27 gibi belirli gen bölgeleri ile hastalık arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak için önemli olmuştur (Li ve Brown, 2017; Reveille vd., 2010)

1.4. Tek Hücreli Transkriptomik

Bilindiği üzere bağışıklık sistemi vücuttaki organ ve dokularda bulunan periferik kanda ve lenfatik sistemlerde yer alan farklı hücre soylarından oluşmaktadır. Ortamda meydana gelen anormal durumlarda bağışıklık hücreleri birincil yanıtı vermektedir, bu nedenle bir hastalık özelinde hücre tiplerinin spesifik rolünü ve immünolojik yanıtını anlamak için her hücre tipini biyolojik bağlama özel olarak incelemek önemli ipuçları sağlayabilmektedir (Stubington vd., 2017). Ancak tam kandan PKMH'leri izole etmeye nazaran hücre tiplerini tek tek izole etmek hem maliyeti artırıp hem verimi düşürebilmektedir (Bondar vd., 2014 ; Pourahmad ve Salimi, 2015). Literatürde yeni

bir teknik olan ve sadece son birkaç yıldır kullanımı her geçen gün hızla artan tekniklerden biri olan tek hücreli RNA dizileme (scRNA-seq) tekniği toplu RNA dizileme gibi bütüncül analiz yöntemlerinin aksine hücreleri teker teker analiz etmeye olanak tanıyarak hücre tiplerindeki genlerin ifade seviyelerini hastalıklı ve sağlıklı koşullar arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirmeyi sağlayan avantajlı bir yöntemdir (Kulkarni vd., 2019) (Şekil 1.4.1.). scRNA-seq tekniği ile tek tek hücre tiplerini izole etmeye de gerek kalmamaktadır.



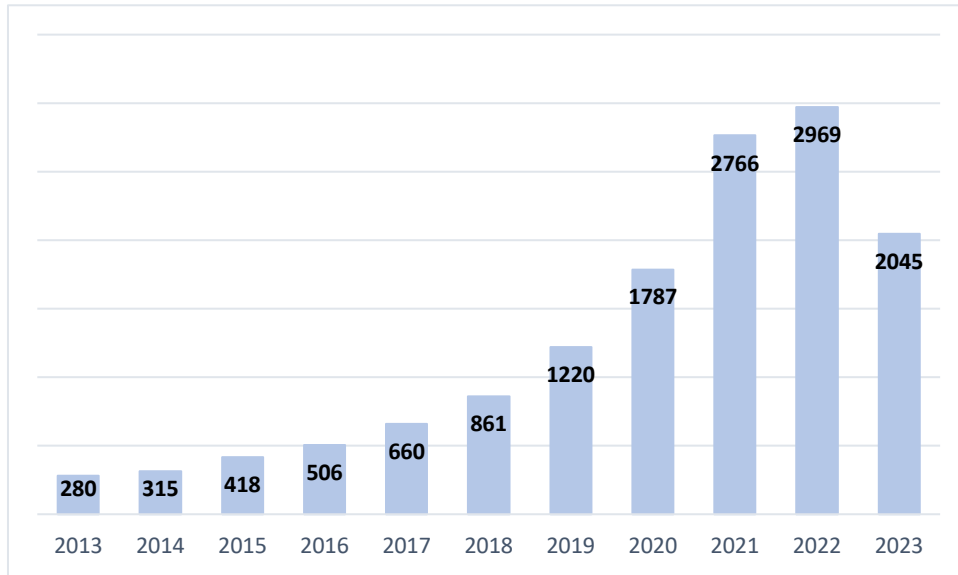
Şekil 1.4.1. scRNA-seq ve toplu RNA dizileme karşılaştırması

Clark, S. (n.d.). *Single Cell RNA-seq: An introductory overview and tools for getting started*. 10x Genomics. <https://www.10xgenomics.com/blog/single-cell-rna-seq-an-introductory-overview-and-tools-for-getting-started>

Tümör gibi heterojen hücre kompozisyonlarından meydana gelen karmaşık yapılarda ya da immünolojik ve genetik faktörlerin neden olduğu patogenezi henüz aydınlatılmamış otoimmün hastalıkların tedavi geliştirme sürecinde farklı hücre tiplerinin rolünün bilinmesi süreci daha efektif kılmaktadır. scRNA-seq yöntemi ile hücreleri tek tek analiz ederek ilgili hastalıkla ilişkili hücrelerin karakterizasyonunu belirlemek ve farklı hücre popülasyon grupları oluşturmak bu

yöntemle mümkün olabilmektedir (Hwang vd., 2018). Bu teknik ile beraber hücre tipleriyle ilişkili gen ifadelerinin incelenmesi, biyobelirteçlerin belirlenmesi ve tedavi geliştirme sürecinde hastalık mekanizmasının daha doğru bir şekilde aydınlatılması sağlanabilmektedir (Kim vd., 2021).

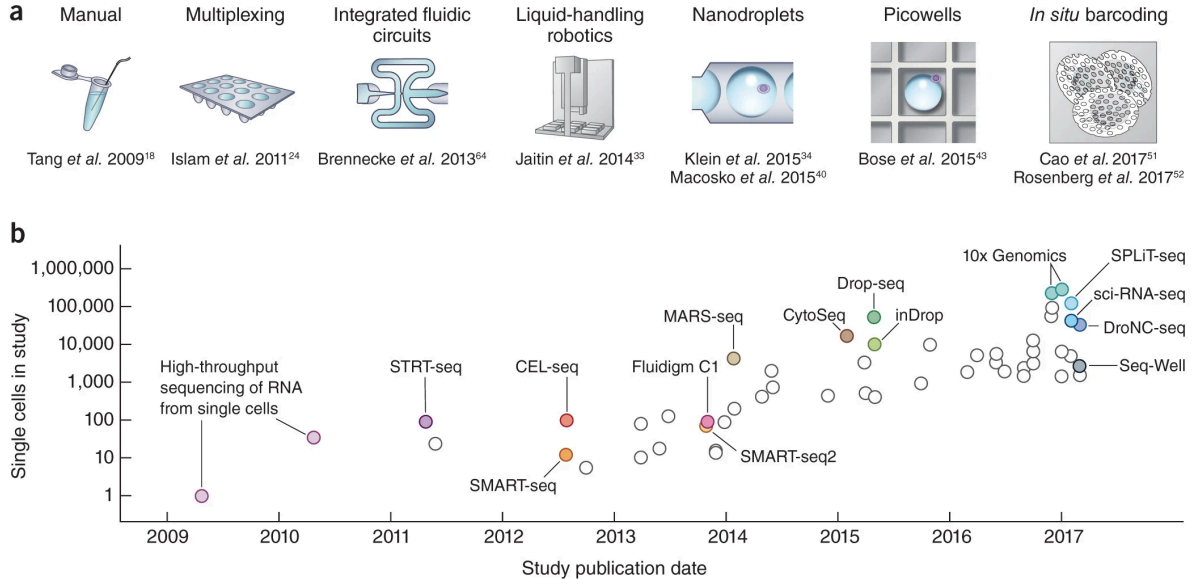
scRNA-seq yöntemi ilk olarak 2009 yılında Tang ve arkadaşları tarafından tanıtılmış (Tang vd., 2009) ve daha sonra popüler bir yöntem olarak literatürde yerini almıştır (Şekil 1.4.2). Bu yöntemin esası tek bir hücreden transkriptom bilgisi elde etmeye dayanmaktadır (Hwang vd., 2018).



Şekil 1.4.2. Yıllara göre scRNA-seq çalışmaları – Grafikteki veriler 11.07.2023 tarihinde Pubmed’ten alınmıştır / U.S. National Library of Medicine. (n.d.). Scrnaseq - search results - pubmed. National Center for Biotechnology Information. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=scrnaseq>

scRNA-seq deneyleri için literatürde çeşitli teknolojiler ve protokoller mevcuttur. Temel olarak bu prosedürlerin işleyişinde ilk olarak ilgili dokudan hücreler izole edilerek elde edilebilecek maksimum miktarda RNA molekülünün yakalanması için parçalanır, daha sonra RNA molekülleri ters transkripsiyonla cDNA’ya (complementary DNA) dönüştürülerek cDNA amplifikasyonu yapılır ve sekans kütüphanesi hazırlanır. Literatürde scRNA-seq yönteminin kullanıldığı

çalışmalarda yaygın olarak damlacık tabanlı teknolojilerin kullanıldığı görülmüştür (Svensson vd., 2018) (Şekil 1.4.3.).

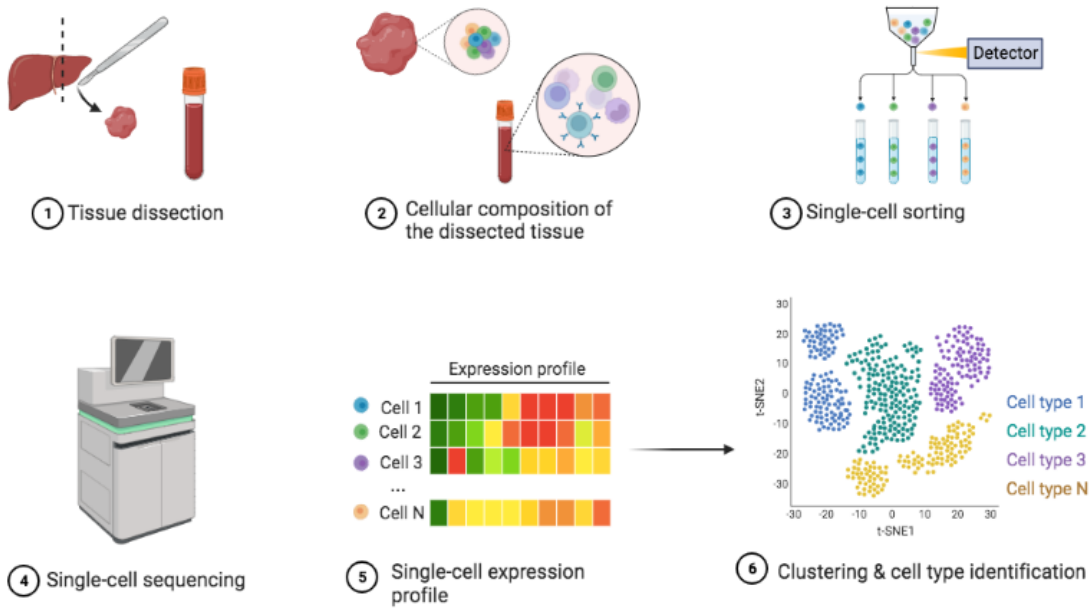


Şekil 1.4.3. scRNA-seq deneylerinde kullanılan teknolojiler ve protokoller

Svensson, V., Vento-Tormo, R., & Teichmann, S. A. (2018). Exponential scaling of single-cell RNA-seq in the past decade. *Nature protocols*, 13(4), 599-604.

Damlacık tabanlı protokollerde ilgili dokudan izole edilen hücreler mikro akışkan düzeneğine sahip tek bir hücrenin geçebileceği kadar genişliğe sahip mikro borular düzeneğinden damıtılır. Bu mikro ince borulardan tek tek damıtılan hücreler bir yağ damlacığına hapsedilir. Hücreler yağ damlacığına hapsedilirken aynı zamanda her hücreye benzersiz bir tanımlayıcı dizi olan özel tasarlanmış barkodlar eklenir, bu barkodlar genellikle hücre içindeki mRNA moleküllerine entegre edilen DNA veya RNA oligonükleotitlerinden oluşmaktadır. Yağ damlacıklarına hapsedilen hücrelerin hücre zarları çözülerek mRNA izolasyonu yapılır. İzole edilen mRNA'ların poli-A kuyruklarına bağlı olan poli-T oligonükleotitleri ters transkriptaz enzimi ile cDNA'ya dönüştürülür ve her bir hücreye özgü barkodlar cDNA moleküllerine entegre edilerek daha sonra dizileme için kullanılacak olan cDNA kütüphanesi oluşturulur. Ardından, cDNA moleküllerinin

amplifikasyonu için PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) adımları uygulanır. Bu aşamada poli-T oligonükleotidlerin yanı sıra benzersiz moleküler tanımlayıcılar "Unique Molecular Identifiers (UMI)" içeren başka bir oligonükleotid de reaksiyona eklenir ve her bir cDNA molekülüne benzersiz bir UMI atanmış olur, böylece her bir cDNA molekülü, üzerindeki UMI ile birlikte etiketlenir. UMI'lar, her bir mRNA molekülüne rasgele olarak atanarak aynı mRNA molekülünden birden fazla kopya oluştuğunda bile her bir kopyayı ayırt etmeyi sağlamaktadır. Böylece, hücre içindeki transkriptomal varyasyonlar ve hücreler arasındaki heterojenlik daha doğru bir şekilde tespit edilebilir (Jovic vd., 2022). cDNA kütüphanesi oluşturulduktan sonra yüksek verimli dizileme teknikleri (örn. Illumina) kullanılarak dizileme gerçekleştirilir ve dizileme sonrası veriler biyoenformatik yaklaşımları kullanılarak analiz edilir. Bu analizler kalite kontrol, normalizasyon, boyut küçültme, entegrasyon, kümeleme ve diferansiyel olarak ifade edilen genlerin belirlenmesi gibi temel iş akışlarını içermektedir (Şekil 1.4.4.).



Şekil 1.4.4. scRNA-seq tekniği genel iş akışları / BioRender ile oluşturulmuştur.

scRNA-seq veri analizi için yaygın olarak kullanılan R ve Python yazılım dillerinde geliştirilmiş yazılım araçları mevcuttur. Örneğin scRNA-seq veri analizi için en popüler algoritma olan Seurat (Hao vd., 2021), Liger (Liu vd., 2020), SingleCellExperiment (Amezquita vd., 2019), Monocle3 (Trapnell vd., 2014) ve Scater (McCarthy vd., 2017) için R paketleri mevcutken, Scanpy (Wolf vd., 2018) paketi Python’da kullanılabilmektedir.

1.5. scRNA-seq Veri Analizi & Seurat

scRNA-seq veri analizi için en popüler yazılım aracı olan Seurat ilk olarak Satija ve arkadaşları tarafından 2015 yılında geliştirilmiştir (Satija vd., 2015). scRNA-seq verilerinin kapsamlı analizini sağlayan bu R paketi çeşitli tek hücreli veri türlerinin entegre edilmesini sağlamaktadır.

Seurat ile scRNA-seq veri analizi ham veriyi okutarak başlar, ham veriler okunarak benzersiz bir moleküler tanımlı (UMI) sayım matrisine dönüştürülür, matristeki sütunlar hücreleri satırlar ise genler için molekül sayısını temsil etmektedir. Daha sonra veriler için standart ön işleme adımları gerçekleştirilmelidir. Bu adımlar sırasıyla kalite kontrol, normalizasyon, veri ölçeklendirme, doğrusal boyut küçültme, entegrasyon ve kümeleme olarak sıralanabilir.

Standart ön işleme adımlarının ilk basamağı olan kalite kontrolün amacı bir hücreyi temsil etmeyen barkodları filtrelemektir. Tek hücre izolasyonu yapılırken bazı durumlarda bir yağ damlacığına birden fazla hücre girebilmekte ya da damlacık tamamen boş kalabilmektedir, bu nedenle bir hücreyi temsil etmeyen barkodları elimine etmek için kalite kontrol önemli bir adımdır (Andrews vd., 2021)

Tek hücreli RNA dizileme sonucunda elde edilen dizilerin sayısı hücreler arasında farklılık göstermektedir, aynı hücre tipi olsa bile hücre başına düşen RNA miktarı hücre döngüsü fazı ya da diğer biyolojik faktörlerden dolayı değişebilmektedir. Biyolojik faktörler dışında farklı damlacık boyutları gibi bazı teknik nedenler de elde edilen dizi okumalarını etkileyebilmektedir. Bu durumu düzeltmek amacıyla her hücre için gen ifadesi ölçümlerini toplam ifadeyle normalleştiren “LogNormalize” yöntemi kullanılır. Daha sonra boyut indirgeme tekniklerinden biri olan doğrusal dönüşüm ile ölçeklendirme yapılır ve ifade matrislerinin yüksek boyutlu olmasından kaynaklanabilecek olumsuz etkileri azaltmak için ölçeklenmiş veriler üzerine temel bileşen analizi (PCA: principal component analysis) uygulanarak boyut azaltma gerçekleştirilir (Andrews vd., 2021).

Farklı koşullara ait olan örneğin hasta ve sağlıklı kişilere ait verilerinin olduğu çalışmalarda veri entegrasyonu yapmak gerekmektedir. Veri entegrasyonundaki amaç farklı deneysel koşullar, dokular veya bireyler arasındaki hücresel heterojenlik ve gen ifadelerinin birleştirilip analiz edilmesini sağlamaktadır. Veri entegrasyonu için Seurat (Hao vd., 2021), Scanorama (Hie vd., 2019), Harmony (Korsunky vd., 2019) ve LIGER (Liu vd., 2019) gibi çeşitli algoritmalar mevcuttur. Bu algoritmalar kullanılarak yapılan veri entegrasyonları yeni hücre tiplerinin keşfi, nadir hücre popülasyonlarının tanımlanması ve çeşitli koşullar arasında gen ifadelerindeki değişikliklerin tespiti gibi konularda yardımcı olarak tek hücre düzeyinde karmaşık biyolojik süreçlerin anlaşılmasında önemli ipuçları sağlamaktadır (Andrews vd., 2021).

Analiz edilen scRNA-seq verilerini görselleştirmek için UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) (McInnes vd., 2019) ve tSNE (t-Distributed Stochastic Neighbor

Embedding) (Maaten ve Hinton, 2008) gibi doğrusal olmayan boyut indirgeme teknikleri mevcuttur. Bu teknikler yüksek boyutlu veriyi düşük boyutlu bir uzayda temsil ederek hücreleri kümelerdir ve benzer hücreleri birbirlerine yakın, farklı hücreleri birbirlerine mesafeli şekilde konumlandırır. Böylece hücre kümelerinin tanımlanması, gen ifadesi analizi, hücre farklılaşması veya hücre geçişleri gibi analizler daha kolay bir şekilde yapılabilir. Son olarak her küme için diferansiyel olarak ifade edilen genler bulunarak hücre tipleri tanımlanır.

1.6. Ankilozan Spondilit için scRNA-seq Çalışmaları

Literatürde mevcut olan Ankilozan Spondilit (AS) ile ilişki tek hücreli transkriptom analizi çalışmalarının sayısı oldukça azdır, mevcut olan çalışmaların birinde transkriptom veriler ve hücre yüzeyi proteinlerini araştıran multi-omik bir yaklaşımla AS hastalığı incelenmiştir. Çalışmada kullanılan PKMH (Periferik Kan Mononükleer Hücreleri) örnekleri 6'sı erkek 4'ü kadın olmak üzere 10 tane AS'li hasta ve 29 adet sağlıklı kontrol grubundan alınarak çalışmada tanımlanan CITE-seq teknolojisi ile analiz edilmiştir. Sonuç olarak, AS ile ilişkili bir dizi moleküler özellik belirlenmiş olup CD52 geninin AS'li hastalarda çeşitli hücre tiplerinde RNA ve yüzey proteini ifadesinde aşırı ifade edildiği belirtilmiştir. Ayrıca, AS'de CD16, CD161, CD38'i ve sitotoksik genler ile yolları aşırı ifade eden bir NK hücre alt kümesi tanımlanmıştır (Alber vd., 2022).

Literatürde yer alan bir diğer çalışmada ise Crohn hastaları, Spondiloartrit hastaları ve her iki hastalığa sahip bireylerin kolon ve periferik kan dokusundaki immünolojik imzalarının ilişkisi araştırılmıştır. Ankilozan Spondilit'in erken evrelerini kapsayan Aksiyal spondiloartrit (axSpA) ve inflamatuvar bağırsak hastalığı olan Crohn hastalığının (CD) ayırt edici immünolojik

mekanizmaları tek hücreli RNA dizilme tekniği kullanılarak aydınlatılmıştır. Çalışma, 17 sağlıklı kontrol örneği, 24 CD⁺li birey, 18 axSpA ve 13 CD-axSpA'lı bireylerden alınan PMBC örnekleri üzerinden yürütülmüştür. Çalışma sonucunda CD-axSpA'lı bireylerin PKMH örnekleri tek hücreli RNA dizileme ve akış sitometrisi ile analiz edildiğinde hem CD4⁺ hem de CD8⁺ soylarının granzim B⁺ T hücrelerinde önemli bir artış gösterdiği belirtilmiş olup ayrıca CD-axSpA'ya sahip bireylerde özellikle CD4⁺ granzim B⁺ popülasyonunda T hücresi olgunlaşmasının daha yüksek olduğu görülmüştür. Son olarak, araştırma bulguları sitotoksik T hücrelerinin genişlemesi ile karakterize edilen CD-axSpA'lı kişilerde kronik bir interferonopatinin varlığını destekler nitelikte olmuştur (Lefferts vd., 2021).

1.7. Biyolojik Ağlar

Henüz mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamış oto-immün hastalıkların ya da kanser gibi heterojen hastalıkların immünolojik mekanizmalarını araştırılması için hücre içindeki ve hücreler arası meydana gelen etkileşim ağlarını anlamak etkili tedavi yöntemleri geliştirmek için önemli bir adımdır. Biyolojik ağlar, hücre içinde ve hücre dışında meydana gelen karmaşık süreçlerin anlamlandırılabilmesi için biyolojik süreçleri karakterize ederek bu süreçler hakkında önemli ipuçları vermektedir (Barabasi ve Oltvai, 2004). Bilindiği üzere, insan genomunda 22.000'den fazla protein kodlayan gen vardır, bu proteinlerin birbirleriyle ve diğer moleküllerle etkileşime geçmesi birçok biyolojik süreci meydana getirmektedir. Bir protein farklı bir proteinle etkileşime geçerek birçok biyolojik aktiviteyi tetikler, yani protein etkileşimleri birçok biyolojik sürecin temelini oluştururlar (Silverbush ve Sharan, 2019; Yeager-Lotem ve Sharan, 2015).

Bir biyolojik bağlamda hangi proteinin hangi proteinlerle etkileşime girdiğini görmek, merkezi düğümleri belirleyerek ağın topolojik özelliklerini belirlemek ağın davranışının etki mekanizmasını ilişkilendirmeyi kolaylaştırmaktadır . Bir PPE ağında merkezilik derecesi yüksek olan proteinlere merkezi (hub) denmektedir, bir düğümün merkezi olması biyolojik süreçteki rolünü de arttırmaktadır (Gursoy vd., 2008). Bir PPE ağının yapısını karakterize etmek için ağın topolojisini bilmek gerekmektedir. Farklı biyolojik durumlarda ağ topolojisi değişmektedir, bu nedenle farklı bağlamlarda topolojisi en çok değişen yani en çok yeniden bağlanan düğümleri bulmak biyolojik ilişkilendirmeler için önemlidir. Ağ topolojileri farklı hücre tiplerinde de farklılık göstermektedir, heterojen bir hastalığın immünolojik mekanizmasını incelerken veya kişiye özel spesifik hastalık durumları araştırılırken yeniden bağlanmış merkezi genleri/proteinleri hücre tipine özel ağları karşılaştırarak tanımlamak daha doğru olmaktadır (Cha ve Lee, 2020). PPE ağlarını oluşturan etkileşimlerin statik olmadığı ve koşuldan koşula değiştiği bilindiğinden diferansiyel etkileşimler de araştırma konusu olabilmektedir (Gulfıdan vd., 2020). Bu bağlamda ağ analizi ve görselleştirme konusunda yaygın olarak kullanılan Cytoscape platformunun (Shannon vd., 2003) bir aracı olan DyNet ile de PPE ağları karşılaştırılarak bağlanma örüntüsü önemli ölçüde değişen merkezi düğümleri bulmak mümkündür (Goenawan vd., 2016).

1.8. Genom Ölçekli Metabolik Modelleme

Genom ölçekli metabolik modeller (GÖMM), belirli bir organizmanın metabolizmasının matematiksel simülasyonudur. GÖMM'ler genomik, metabolomik ve transkriptomik gibi farklı büyük veri türlerini bağlamsallaştırarak genotip ve fenotip arasındaki ilişkiyi nicel olarak tanımlama imkânı yaratır ve böylece tıptan biyoteknolojiye kadar uzanan geniş bir alanda sistem

biyolojisi yaklaşımlarının uygulanabileceği bir çerçeve oluşturmaktadır (Passi vd., 2022; Bernstein vd.,2021). Kısaca organizmada bilinen tüm metabolik genler ve reaksiyonlar dahil olacak şekilde yeniden yapılandırılmış bir model olarak tanımlanan GÖMM'ler genellikle metabolizmanın transkripsiyonel düzenlenmesi hakkında bilgi sahibi olmak, hücre içi işleyişi anlamak, metabolik bozukluklara sebep olan durumları incelemek ve hastalık mekanizmalarını detaylı bir şekilde araştırmak için kullanılırlar (Becker ve Palsson, 2008). Ayrıca, genom ölçekli metabolik modellerin kullanılması, gen-reaksiyon bağlantılarını belirlemek ve metabolik akışı tahmin etmek için deneysel süreçlere göre daha hızlı sonuçlar vermektedir (Gu vd., 2019). Tam genom dizileri kullanılarak karmaşık hücresel fonksiyonların in-silico modellerinde genom ölçeği oluşturularak hücresel metabolizma ve hücre davranışı ilgili reaksiyonlar genom ölçekli metabolik model üzerinde simüle edilebilmektedir (Covert ve Palsson, 2002). Ek olarak, metabolik modeller, bir hastalık durumunda metabolik değişiklikler hakkında yorum yapabilmek ve gen ifadesindeki değişiklikleri incelemek için alternatif bir yaklaşım sağlamaktadır (Dougherty vd., 2021). Örneğin, insan için bugüne kadar oluşturulmuş en kapsamlı metabolik ağ modeli Recon3D (Brunk vd., 2018) insan metabolizmasının moleküler mekanizmalarını araştırmak için kullanılan önemli bir modeldir.

GÖMM'leri incelemek için çeşitli yaklaşımlar vardır, bunlardan en yaygını akı denge analizi (FBA) yaklaşımıdır. FBA, doğrusal programlama yaklaşımını kullanarak yapılandırılmış metabolik ağ üzerinde metabolitler üzerinden geçen akışları analiz eder, ayrıca mümkün olan en yüksek büyüme oranını ya da spesifik bir metabolitin üretimi için gerekli olan davranışlar gibi sınırlandırılmış çözüm alanı içindeki belirli davranışları tahmin için kullanılabilir ve çözüm alanı içerisinde optimal akı dağılımını hesaplayabilir (Covert ve Palsson, 2002). Kısaca FBA'nın temel

amacı, sitokiyometrik matrislerde belirli kısıtlarla daraltılmış çözüm uzayında amaç fonksiyonunu optimize etmektir.

1.9. Omik Veriler ve GÖMM Entegrasyonu

GÖMM simülasyonlarını daha gerçekçi hale getirmek için farklı omik verilerle bütünleşik olarak inceleyerek çözüm uzayını daraltmak mümkündür. Bu bağlamda son yıllarda transkriptomik veriler ve mRNA ifade verilerini entegre etme çalışmaları önemli bir ilerleme kaydetmiştir. İfade verilerini genom ölçeğinde metabolik ağ rekonstrüksiyonlarına entegre etmek için geliştirilen, FBA'nın analitik bir platform olarak uygulandığı farklı algoritmalar literatürde mevcuttur. Bu algoritmalar akı dağıtım çözüm alanını daha da kısıtlamak için ifade verilerini FBA modellerine dahil edebilmektedir. Geliştirilen platformlardan bazıları gen ifadesi seviyelerini dikkate alarak model üretmeyi amaçlamaktadır, GIMME (Gene Inactivity Moderated by Metabolism and Expression), MADE (Metabolic Adjustment by Differential Expression) ve iMAT (Integrative Metabolic Analysis Tool) bu algoritmalara örnek olarak gösterilebilir (Blazier vd., 2012).

Ayrıca, maksimum akışı sınırlayarak ifade verilerini FBA modellerine entegre eden algoritmalar da mevcuttur, E-flux ve PROM (Probabilistic Regulation of Metabolism) bu algoritmalar arasında yer almaktadır (Blazier vd., 2012).

Genom ölçekli metabolik modeller ile biyolojik bir bağlamdaki metabolitleri tespit etmek ve metabolik ağlar boyunca akışı tahmin etmek mümkündür ancak tümör gibi bazı heterojen hücre popülasyonlarında, ortalama akışı tahmin etmek popülasyonu anlamak için yeterli değildir ve

heterojenliği yansıtmamaktadır. Tek hücreli transkriptomik verilerin ve genom ölçekli metabolik modellerin entegre edildiği çalışmalar, tümör gibi heterojen dokuların metabolik akışlarını analiz etmek, popülasyon içerisindeki farklı büyüme oranlarına sahip hücre tiplerini belirlemek ve hücreler arasındaki metabolik etkileşimleri anlamak için avantajlı bir yaklaşımdır. Kanseri gibi hedefe yönelik tedavi geliştirilmesi zor olan hastalıklarda, tümördeki hücre tiplerinin metabolik özelliklerini anlamak umut verici tedavi geliştirme süreçleri için önemli bir adımdır (Damiani vd., 2019).

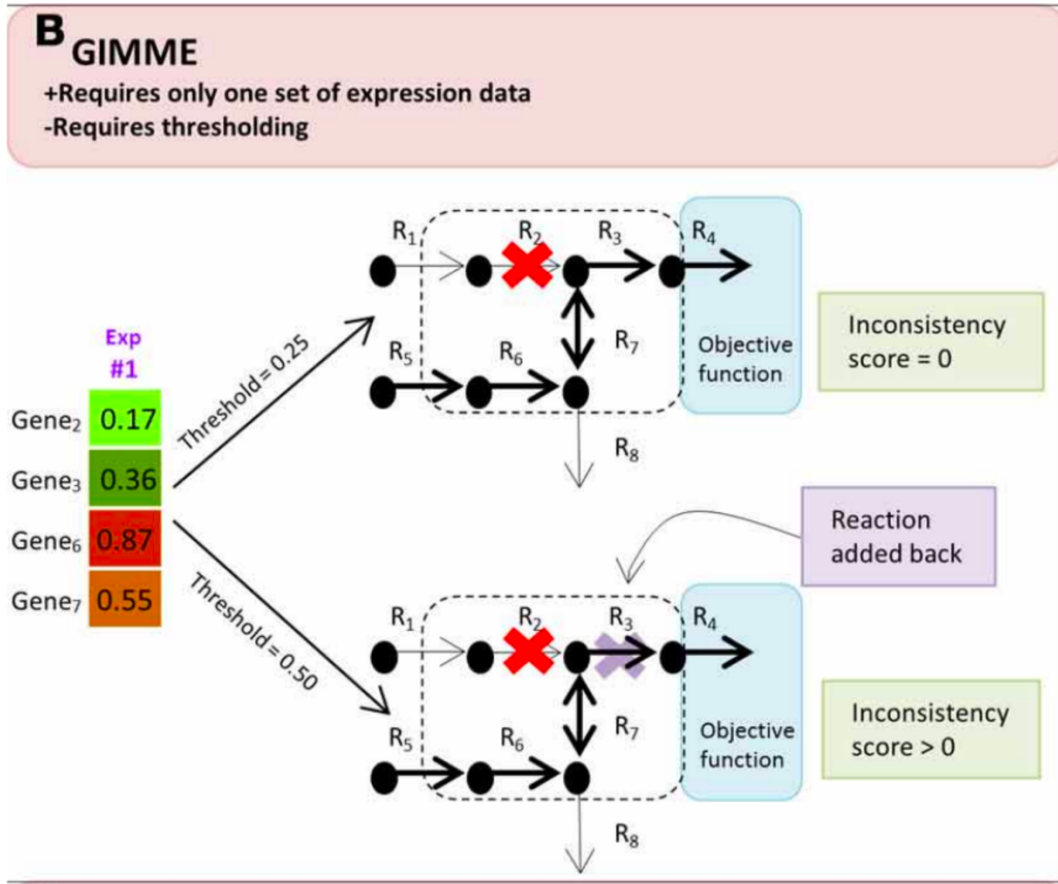
Tek hücreli RNA dizilerinin sitokiyometrik modellere entegre edilerek yapılandırılmış olan genom ölçekli metabolik modeller ile heterojen bir popülasyonda tek hücre tipindeki akı dağılımları ve hücre tiplerinin büyüme oranları tahmin edilebilir. Örneğin heterojen bir hücre popülasyonunun metabolik modelini oluşturarak popülasyon akışını tahmin ettikten sonra (popFBA) (Damiani vd., 2017), popülasyonda yer alan her hücre tipi için akışı analiz etmenin mümkün olduğu yaklaşımlar mevcuttur (scFBA) (Damiani vd., 2019). Gustafsson ve ark. (2023) tarafından yapılan güncel bir çalışmada ise akciğer kanseri tümör hücreleri ve fare nöron hücreleri için hücrelere özgü metabolik modeller oluşturulmuş ve modeller oluşturulurken tINIT algoritmasının optimize edilmiş versiyonu olan ftINIT (fast tINIT) kullanılmıştır.

Ayrıca literatürde iMAT algoritmasının scRNA-seq verilerine uygulandığı çalışmalar da mevcuttur (Zhao vd., 2022; Cheng vd., 2021; Lee vd., 2022).

1.10. GIMME

Gen ifadesi seviyelerini dikkate alarak model üretmeyi amaçlayan yöntemlerden biri olan GIMME (Gene Inactivity Moderated by Metabolism and Expression), kantitatif gen ifade verilerini ve bir veya daha fazla varsayılan metabolik hedefi kullanarak en tutarlı bağlama özgü yeniden yapılandırmayı oluşturmayı hedefler. Bu algoritma mRNA transkript seviyelerini kullanıcı tarafından belirlenen bir eşik ile karşılaştırarak transkript seviyeleri verilen eşğin altına düşen reaksiyonları modelden geçici olarak kaldırır ve eğer belirlenen amaç işlevine ulaşılmasa reaksiyonları geri ekler (Becker ve Palsson, 2008; Blazier ve Papin, 2012) (Şekil 1.10.1). Oluşturulan nihai model, gen ifade verileriyle tutarlı olan ve belirli koşullar altında hücrenin metabolik aktivitesini tahmin etmek için kullanılabilen bağlama özgü bir metabolik ağdır. GIMME, farklı koşullarda hücrelerin metabolik aktivitesini anlamak ve genlerin metabolik durum ve diğer etkenlerle modüle edilmiş etkinliklerini belirlemek için için kullanışlı bir algoritmadır. Metabolik değişikliklerden sorumlu genleri ve reaksiyonları belirlemek, genetik mutasyonların metabolik sonuçlarını tahmin etmek ve metabolik mühendislik stratejileri tasarlamak için kullanılabilir. Böylece genlerin metabolik aktivitelere yanıt verme şekilleri biyolojik süreçlerin anlaşılması kolaylaşır.

GIMME algoritmasının gen aktivite seviyelerini göz önünde bulundurarak belirli bir hücre tipinde aktif olması, muhtemel metabolik reaksiyonların alt kümesini tanımlanması ve hücrenin metabolizmasının daha gerçekçi bir şekilde modellenmesi için gen inaktivite kavramını da içermesi, yani tüm genlerin aynı anda aktif olmadığını kabul ederek metabolik modeli buna göre ayarlaması bu algoritmayı diğerlerine göre avantajlı kılmaktadır.

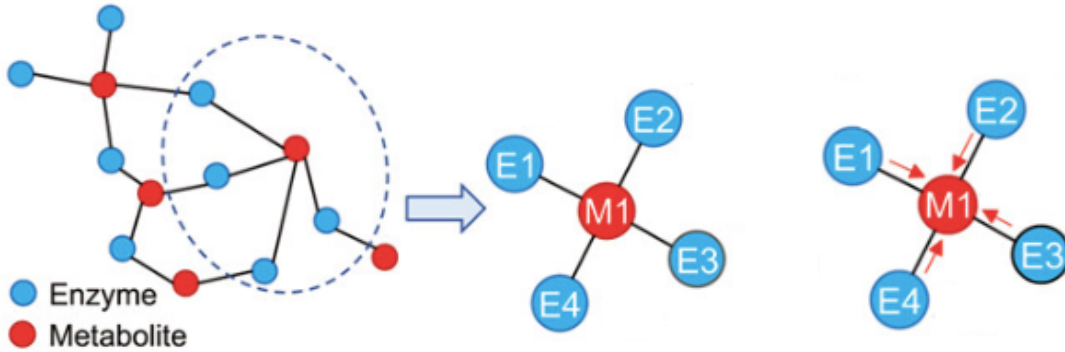


Şekil 1.10.1. GIMME algoritması çalışma prensibi / Blazier, A. S., & Papin, J. A. (2012). Integration of expression data in genome-scale metabolic network reconstructions. *Frontiers in physiology*, 3, 299

1.11. Raportör Metabolitler

Genom ölçekli metabolik ağ üzerindeki her bir metabolit düğümü komşu enzimlerin normalleştirilmiş transkripsiyonel yanıtına bağlı olarak puanlandırılmaktadır ve bir biyolojik bağlamda çevresinde önemli değişiklikler olan metabolitlere yani metaboliti üreten veya tüketen reaksiyonları katalize eden enzimlerin ifadeleri anlamlı bir şekilde değişen metabolitlere raportör metabolit denmektedir (Şekil 1.11.1), dolayısıyla metabolitlerin raportör olarak adlandırılması

bağlama göre değişebilmektedir (Seggewiß vd., 2006). Bir metabolit bir bağlamda raportör olabilirken başka bir bağlamda farklı bir metabolit raportör olabilmektedir. Transkripsiyon verilerini bir metabolik ağ üzerine haritalayarak çevresinde önemli düzenlemelerin meydana geldiği raportör metabolitleri belirlemek mümkündür (Çakır, 2015). Raportör metabolitlerin analiz edilmesi hedef organizma metabolizmasını detaylı bir şekilde inceleyerek metabolizma-gen bağlantılarını kapsamlı olarak anlamaya yardımcı olmaktadır. Bu nedenle, moleküler mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamış oto-immün hastalıklar gibi karmaşık biyolojik bağlamları anlamak için raportör metabolitlerin analiz edilmesi önemli bir adımdır (Sevimoğlu, 2019).



Şekil 1.11.1. Raportör Metabolitler / Liu, L., Zhu, R., & Wu, D. Misuse of reporter score in microbial enrichment analysis. *iMeta*, e95.

1.12. Çalışmanın Amacı

Tedavi geliştirme süreçlerinde hastalıkların hücre içi işleyiş mekanizmasının belirlenmesi ve moleküler düzeyde incelenmesi çok önemlidir. Ayrıca, hastalıkla ilgili biyolojik süreçlerin aydınlatılmasıyla tayin edilen biyobelirteçler hastalıkların erken tanı ve tedavisinde hayati önem taşımaktadır. Bu nedenle hücreleri tek tek analiz ederek hücrelerin karakterizasyonunu yapmak ve farklı hücre popülasyon grupları oluşturmak avantajlı bir yöntemdir. Bu çalışmada, Ankilozan Spondilit hastalığının biyolojik mekanizmasının daha anlaşılır bir şekilde aydınlatılması ve tedavi geliştirme süreçlerinde kullanılacak etkili biyobelirteçlerin belirlenmesi amaçlanarak AS hastalığına özgü scRNA-seq veri setleri Seurat paketi kullanılarak analiz edilmiştir. Ayrıca metabolizmanın matematiksel simülasyonunu oluşturmayı hedefleyen genom ölçekli metabolik modelleme yaklaşımı bu çalışmada kullanılarak Seurat ile belirlenen her hücre tipi için GIMME algoritması ile hücre tiplerine özgü metabolik modeller oluşturulmuş ve gen-reaksiyon bağlantıları belirlenerek metabolik akışlar tahmin edilmiştir. Ek olarak, hücre içindeki ve hücreler arası meydana gelen etkileşim ağlarını anlamak için belirlenen her hücre tipi için spesifik PPE ağları oluşturulmuş ve Cytoscape aracı DyNet ile PPE ağlarının ikli kombinasyonları karşılaştırılarak diferansiyel PPE'ler belirlenmiştir. Ayrıca, her hücre tipi için raportör metabolitler tespit edilmiştir. Sonuç olarak, AS hastalığının biyolojik mekanizması aydınlatılmaya çalışılmış ve potansiyel biyobelirteçler belirlenmiştir.

2. YÖNTEM

2.1. Veri Kümelerinin Tespiti

Literatürde yer alan Ankilozan Spondilit PKMH hücrelerinde çalışılmış iki adet scRNAseq veri seti GEO veritabanından (Barret vd., 2012) temin edilmiştir (Alber vd., 2022: GSE194315 ve Lefferts vd., 2021: GSE163314).

GSE163314 erişim kodlu veri setinde (VS1) yer alan 2 sağlıklı bireyden ve 2 adet AS'nin alt tipi olan axSpA'li bireyden alınan periferik kan mononükleer hücrelerinin (PKMH) verisi ve GSE194315 erişim kodlu veri setinde (VS2) yer alan 10 adet AS'li ve 29 adet sağlıklı bireyden alınan PKMH scRNA-seq verisi ikincil veri analizi için kullanılmıştır.

VS1'deki örneklerin özellikleri Tablo 2.1.1'de, VS2'deki örneklerin özellikleri ise Tablo 2.1.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1.1. GSE163314 kodlu veri setindeki (VS1) örneklerin özellikleri

Örnek	Durum	Cinsiyet	Yaş	HLAB27	BASDAI (Hastalık Şiddeti) (1-10)	İlaç Kullanımı
HASTA 3	Sağlıklı Kontrol	Erkek	51	Negatif	-	-
HASTA 27	Sağlıklı Kontrol	Erkek	51	Negatif	-	-
HASTA 5	axSpA	Erkek	32	Pozitif 7 yıl AS	2,2	infliximab
HASTA 21	axSpA	Erkek	42	Pozitif 19 yıl AS	2,2	infliximab

Tablo 2.1.2. GSE194315 kodlu veri setindeki (VS2) örneklerin özellikleri

Örnek	Durum	Cinsiyet	Yaş	HLA-B27	BASDAI (Hastalık Şiddeti) (1-10)
AS02	AS	Erkek	50	Pozitif	3,9
AS03	AS	Erkek	28	Pozitif	1,4
AS04	AS	Kadın	26	Pozitif	5,8
AS05	AS	Erkek	35	Pozitif	4
AS06	AS	Kadın	30	Pozitif	0,4
AS07	AS	Kadın	26	Pozitif	2,7
AS08	AS	Kadın	26	Negatif	3,7
AS09	AS	Kadın	43	Negatif	2,6
AS10	AS	Kadın	57	Pozitif	5,2
AS11	AS	Erkek	42	Pozitif	2
HC01	Sağlıklı	Erkek	61	-	-
HC02	Sağlıklı	Erkek	64	-	-
HC03	Sağlıklı	Kadın	37	-	-
HC04	Sağlıklı	Erkek	28	-	-
HC05	Sağlıklı	Kadın	26	-	-
HC06	Sağlıklı	Kadın	72	-	-
HC07	Sağlıklı	Erkek	41	-	-
HC08	Sağlıklı	Erkek	57	-	-
HC09	Sağlıklı	Kadın	49	-	-
HC10	Sağlıklı	Erkek	38	-	-
HC11	Sağlıklı	Erkek	59	-	-
HC12	Sağlıklı	Erkek	35	-	-
HC13	Sağlıklı	Kadın	37	-	-
HC14	Sağlıklı	Erkek	26	-	-
HC15	Sağlıklı	Kadın	22	-	-
HC16	Sağlıklı	Kadın	26	-	-
HC17	Sağlıklı	Erkek	32	-	-
HC18	Sağlıklı	Erkek	47	-	-
HC19	Sağlıklı	Kadın	41	-	-
HC20	Sağlıklı	Kadın	48	-	-
HC21	Sağlıklı	Erkek	64	-	-
HC22	Sağlıklı	Kadın	34	-	-
HC23	Sağlıklı	Erkek	28	-	-
HC24	Sağlıklı	Kadın	25	-	-
HC25	Sağlıklı	Kadın	36	-	-
HC26	Sağlıklı	Erkek	33	-	-
HC27	Sağlıklı	Kadın	46	-	-
HC28	Sağlıklı	Kadın	48	-	-
HC29	Sağlıklı	Kadın	52	-	-

2.2.scRNA-seq Veri Setlerinin Analizi ve İfadesi Anlamlı Değişen Genlerin Tespiti

Her iki veri seti için sağlıklı ve hasta grubunun PKMH scRNA-seq veri analizi GEO veri tabanından “matrix”, “features” ve “barcodes” dosyaları indirilerek R 4.2.3 platformunda Seurat 4.3.0 paketi (Hao vd., 2021) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Veri setlerindeki sağlıklı ve hasta bireylerin PKMH verileri için ayrı ayrı Seurat objesi oluşturulmuş, standart ön işleme, kalite kontrol ve normalizasyon işlemleri veri setlerindeki her bireyden elde edilen veriler için ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir.

Kalite kontrol aşamasında gerçekleştirilen filtreleme işleminin parametreleri veri setinin özelliklerine göre değişebilmektedir. Veri setlerinde yer alan her bireyin scRNA-seq verisi için hücrelerin kalite kontrol öncesi grafiklerindeki değerler göz önünde bulundurularak grafiklerle uyumlu olacak şekilde filtreleme parametreleri belirlenmiştir (Bulgular Bölümü : Şekil 3.1.1, Şekil 3.1.2, Şekil 3.1.3, Şekil 3.1.4). Filtrelme işlemi belirli bir hücrede tespit edilen benzersiz gen sayısını (nFeature_RNA), RNA moleküllerinin toplam sayısını (yani gen ifadesi düzeyini) (nCount_RNA) ve her bir hücredeki mitokondriyal gen ekspresyonunun yüzdesini ifade eden (percent.mt) metriklere göre gerçekleştirilmektedir.

Genel olarak %5'ten fazla mitokondriyal sayıya sahip hücreler filtrelenmektedir çünkü daha yüksek mitokondriyal gen ekspresyonuna sahip hücreler, canlılık, bütünlük veya hücrel stres açısından tehlikeye girebilmektedir.

VS1 için kalite kontrol adımı axSpa'lı ilk birey (Hasta 5) için filtreleme işlemi 3000'den fazla veya 200'den az benzersiz gen sayısına sahip hücreler, 20000'den az toplam molekül sayısı ve mitokondriyal RNA yüzdesi %5'ten büyük olan hücreler filtrelenerek gerçekleştirilmiş, axSpa'lı

diğer birey (Hasta 27) için filtreleme işlemi; 4000'den fazla veya 200'den az benzersiz gen sayısına sahip hücreler, 20000'den az toplam molekül sayısı ve mitokondriyal RNA yüzdesi %5'ten büyük olan hücreler filtrelenecek şekilde gerçekleştirilmiştir. Sağlıklı kontrol grubu için ise ilk birey (Hasta 3) için filtreleme işlemi için 3000'den fazla veya 200'den az benzersiz gen sayısına sahip hücreler, 15000'den az toplam molekül sayısı ve mitokondriyal RNA yüzdesi %5'ten büyük olan hücreler filtrelenecek şekilde ve diğer sağlıklı birey (Hasta 21) için filtreleme işlemi için 3000'den fazla veya 200'den az benzersiz gen sayısına sahip hücreler, 20000'den az toplam molekül sayısı ve mitokondriyal RNA yüzdesi %5'ten büyük olan hücreler filtrelenecek şekilde gerçekleştirilmiştir.

VS2 için kalite kontrol işlemi veri setinde bulunan tüm bireylerin (29 sağlıklı kontrol ve 10 adet AS'li hasta) PKMH verileri için 4000'den fazla veya 200'den az benzersiz gen sayısına sahip hücreler, 20000'den az toplam molekül sayısı ve mitokondriyal RNA yüzdesi %5'ten büyük olan hücreler filtrelenecek şekilde gerçekleştirilmiştir.

Her iki veri setindeki tüm hasta ve tüm sağlıklı bireylerin Seurat objeleri her veri setinde tek bir sağlıklı ve hasta objesi olacak şekilde birleştirilmiştir. Sağlıklı ve hasta bireylerin PKMH verilerini içeren iki Seurat objesi de daha sonra birleştirilerek tek bir obje oluşturulmuştur. Böylece analizler her iki veri seti için ayrı ayrı olmak üzere tek bir Seurat objesiyle, VS1' de 22440 ve VS2'de 47414 hücre ile gerçekleştirilmiştir.

VS1 ve VS2 için birleştirilen Seurat Objelerinin boyutunu belirlemek için hücreler PCA (principal component analysis) puanlarına göre kümelendirilmiş ve her iki veri seti için de 20 PC (principal component) seçilmiştir.

Sağlıklı bireylerin ve hasta bireylerin PKMH verilerini içeren Seurat objeleri farklı bireylerin verilerini içerdiğinden dolayı aynı hücre popülasyonları farklı PKMH veri setlerinde yer alabilmektedir. Bu nedenle aynı objede farklı veri kümeleri arasında paylaşılan hücre popülasyonlarını eşleştirmek ve toplu etkinin (batch effect) düzeltilmesi için Seurat Data Entegrasyonu uygulanmıştır. “FindIntegrationAnchors” fonksiyonu kullanılarak aynı Seurat objesindeki farklı veri kümelerindeki hücreler arasında “anchors” olarak bulunan ve aynı temel biyolojik varlığı temsil eden hücreler bulunarak IntegrateData fonksiyonu ile veri entegrasyonu gerçekleştirilmiştir.

VS1’de veri entegrasyonu $\text{dims}=1:20$ ve $\text{res}=0.1$, VS2’de $\text{dims}=1:20$ ve $\text{res}=0.6$ olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Her iki veri setinde kümeleme işlemi gerçekleştirildikten sonra Wilcoxon rank sum testi uygulanarak ilk önce her küme teker teker diğer kümelerle karşılaştırılarak marker genler tespit edilmiş ve kümelerin hangi hücre tipini tespit ettiği bulunmuştur. Daha sonra her hücre tipi için sağlıklı kontrol grubu ve AS’li hasta verileri arasındaki ifadesi anlamlı olarak değişen genler (İDG) tespit edilmiştir. Düzeltilmiş p-değeri (adjusted p-value) 0,05’ten küçük olan genler İDG olarak seçilirken, logFC değeri sıfırdan büyük olan İDG’ler yukarı düzenlenmiş (upregulated), logFC değeri sıfırdan küçük olan genler aşağı düzenlenmiş (downregulated) genler olarak tanımlanmıştır.

2.3. Hücre Tipine Özgü Genom Ölçekli Metabolik Modellerin (GÖMM) Oluşturulması

VS1 ve VS2'deki her grup için (AS hasta ve kontrol) GIMME (Becker ve Palsson, 2008) algoritması kullanılarak her hücre tipine özgü ayrı genom ölçekli metabolik modeller (GÖMM) oluşturulmuştur. GIMME algoritması kullanmadan önce her hücre tipine ait gen ifadesi değerlerine log normalizasyonu uygulanmış ve toplam ifadesi sıfır olan genler çıkarılmıştır, daha sonra her hücre tipine ait gen listeleri Recon3D (Brunk vd., 2018) ile eşleştirilmiş ve sadece Recon3D'de yer alan genlerin ifade verileri kullanılmıştır.

GIMME algoritmasının eşik değerinin tespit edilmesi için, her hücre tipindeki her genin tüm örneklerdeki ifade değerlerinin ortalaması alınmış ve ortalama değerler 100 eşit aralığa yerleştirilmiştir. Eşik değeri, bir veri setindeki tüm hücre tiplerinin aynı aralıktaki ortalama frekans değerlerinin toplanarak oluşturulan sıklık histogramında ortanca değeri olacak şekilde belirlenmiştir.

Her hücre tipi için oluşturulan bağlama özgü hasta ve kontrol GÖMM'lerinde metabolik ağ içindeki biyokimyasal reaksiyonların akışlarını (hızlarını) analiz etmek ve biyokütle üretimini tahmin etmek için akı denge analizi (FBA) (Covert ve Palsson, 2002) analizi gerçekleştirilmiştir. GIMME algoritması ve akı analizleri için Matlab (Matlab 2022) platformunda Cobra Toolbox 2.39.0 (Heirendt vd., 2019) yazılım aracı ve Gurobi optimizasyon paketi kullanılmıştır.

2.4. Akı Örneklemesi ve Reaksiyon Seti Zenginleştirme Analizleri

Anlamlı bir şekilde azalan ve artan akıların teşhis edilmesi amacıyla VS1 ve VS2’de yer alan her hücre tipi için oluşturulmuş GÖMM’lere akı örneklemesi yapılmıştır. Akı örneklemesi için Cobra Toolbox (Heirendt vd., 2019) yazılım aracı ve örnekleyici olarak ACHR (artificially centered hit-and-run) algoritması kullanılmıştır. Akı örneklemesi her hücre tipinde her iki koşul (hasta ve sağlıklı) için ayrı ayrı gerçekleştirilmiş, iki koşulda akı dağılımları için örneklem ortalaması ve örneklem standart sapması hesaplanmış ve bağımsız iki örneklem t-testi uygulanarak her hücre tipi için hasta ve sağlıklı koşul arasında anlamlı bir şekilde artan (DUF: Differentially Up Flux) ve azalan (DDF: Differentially Down Flux) akılar tespit edilmiştir.

Her iki veri setinde, her hücre tipi için belirlenen DUF ve DDF’lerin zenginleştirme analizleri RSEA (Reaction Set Enrichment Analysis) yazılım aracı (Aydın ve Karabekmez, 2023) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.5. Raportör Metabolit Analizleri

VS1 ve VS2’de scRNA-seq veri analizleri sonucu belirlenen her hücre tipi için İDG’ler Recon3D genleri ile eşleştirilmiştir. Recon3D ile eşleşen genler ve bu genlerin düzeltilmiş p-değerleri raportör metabolit analizinde kullanılmıştır. Raportör metabolit analizleri RAVEN Toolbox (Wang vd., 2018) yazılım aracı kullanılarak MATLAB platformunda gerçekleştirilmiştir.

2.6. Her Hücre Tipi için Bağlama Özgü Protein-Protein Etkileşim Ağlarının Oluşturulması

VS2 için scRNA-seq ham veri analizlerine başlanmadan önce Alber ve arkadaşları (2022) tarafından gerçekleştirilen çalışmanın sonuçları yazarlardan talep edilmiş ve yazarlar tarafından iletilen her hücre tipine ait İDG listelerinden İDG sayısı 200'den fazla olan hücre tipleri için bağlama özgü protein-protein etkileşim (PPE) ağları kurulmuş ve bu ağların karşılaştırmalı topolojileri incelenerek biyolojik ağ karşılaştırmaları yapılmıştır.

VS2'nin yazarlardan talep edilen İDG listelerinde, düzeltilmiş p-değeri 0,05'ten az olan en fazla İDG sayısına sahip hücre tipleri seçilmiştir.

Hücre tipine özgü İDG listeleri arasındaki benzerliği hesaplamak için Sørensen-Dice Katsayısı (SDC) kullanılmıştır (Denklem 1).

$$SDC_{1,2} = \frac{2 \times n(\{IDG-List1\} \cap \{IDG-List2\})}{n(\{IDG-List1\}) + n(\{IDG-List2\})} \quad (1)$$

İDG'lerin kodladığı proteinler için PPE ağları APID veri tabanından (Alonso-López vd., 2019) indirilen insan protein etkileşim ağları kullanılarak oluşturulmuştur. Oluşturulan ağlar Cytoscape 3.9.0 platformu (Shannon vd., 2003) kullanılarak görselleştirilmiş ve ağların topolojik incelemeleri yapılmıştır. Ayrıca yine bir Cytoscape aracı olan DyNet (Goenawan vd., 2016) hücre tiplerinin ikişerli kombinasyonu arasında topolojik rolü en fazla farklılaşan merkezi düğümler tespit edilmiştir. Hücre tiplerinin ikili kombinasyonları aracılığıyla, topolojik rolde en fazla farklılaşmaya sahip merkezi düğümler, DyNet Yeniden Bağlanma Puanına (Dn-skor) göre belirlenmiştir. En yüksek Dn skorlarına sahip ilk on merkezi düğüm, her bir hücre tipi kombinasyonu için merkezi gen olarak tanımlanmıştır. Merkezi genlerin/proteinlerin zenginleştirme analizi g:Profiler aracı (Raudvere vd., 2019) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.BULGULAR

3.1. scRNA-seq Veri Analizi

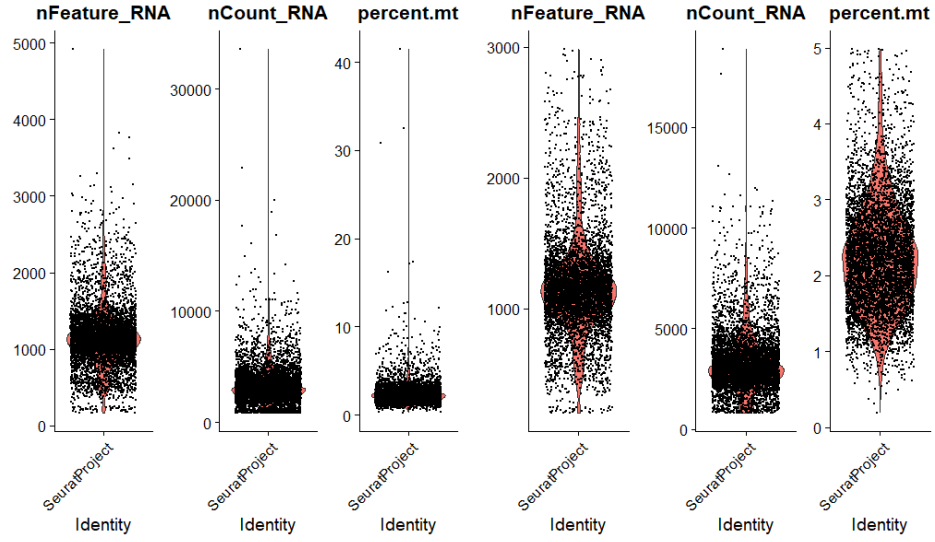
VS1’de bulunan iki adet axSpa’li birey (hasta 3 ve hasta 27) ve iki adet sağlıklı bireyden (hasta 5 ve hasta 21) toplanan PKMH verilerine hücrelerin filtrelenip seçilmesi için kalite kontrol işlemi uygulanmıştır.

Filtreleme öncesi ve sonrası sırasıyla toplam gen, molekül ve mitokondriyal RNA yüzdesini gösteren grafikler Şekil (3.1.1, 3.1.2, 3.1.3, 3.1.4)’te gösterilmiştir. Kalite kontrol işlemi öncesini gösteren grafiklerdeki y-ekseni filtreleme işlemi için toplam gen sayısını, toplam molekül sayısını ve mitokondriyal RNA yüzdesini göstermektedir. X-ekseni ve y-ekseni arasındaki noktalar ise bireylerin seurat objesindeki hücreleri göstermektedir. Kalite kontrol işlemi sonrasını gösteren grafikler ise hücrelerin belirlenen parametreler arasında olduğunu göstermektedir.

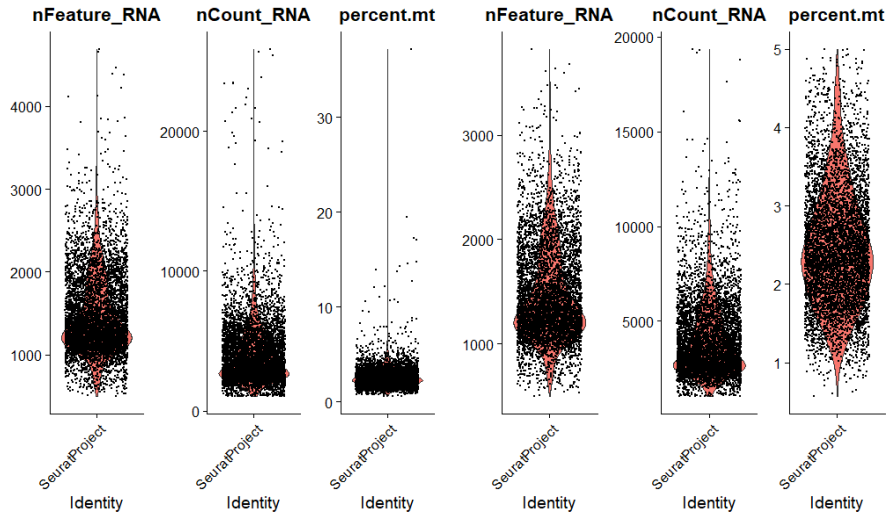
VS2 için kalite kontrol işlemi öncesi ve sonrasını gösteren grafikler veri setindeki örneklem çokluğundan dolayı ekler kısmında verilmiştir (Ek-Şekil 1).

VS1 ve VS2 için birleştirilen Seurat Objelerinin boyutunu belirlemek için hücreleri PCA puanlarına göre kümelenmiş ve dirsek grafiği oluşturulmuş ve her iki veri seti için de 20 PC seçilmiştir (Şekil 3.1.5.)

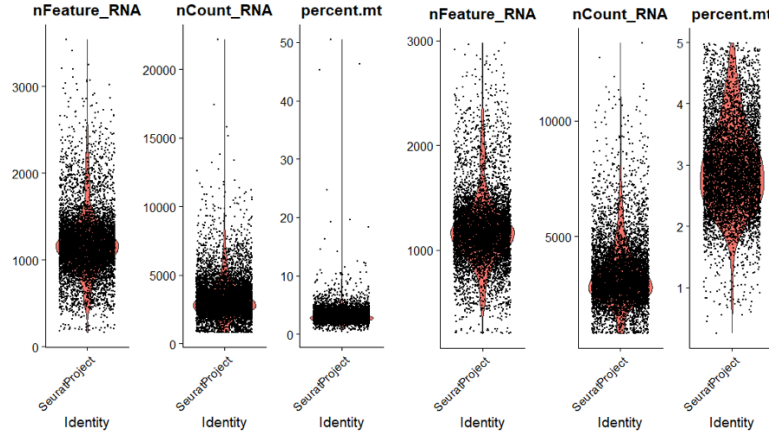
Veri setlerinin görselleştirilmesi için UMAP kullanılmış ve benzer hücreler kümelendirilmiştir; VS1’de 12, VS2’de ise 22 küme oluşturulmuştur (Şekil 3.1.6 & Şekil 3.1.7).



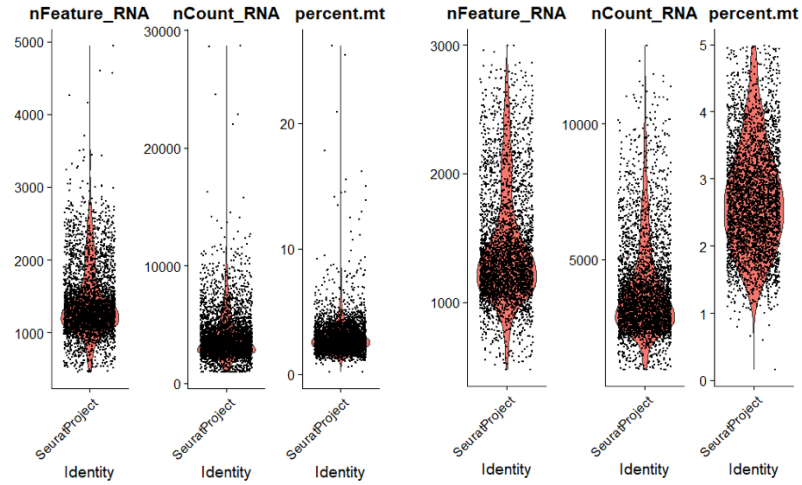
Şekil 3.1.1. Kalite kontrol işlemi öncesi ve sonrasını gösteren grafikler: axSpa'lı birey (hasta 5) için toplam gen sayısı (nFeature_RNA), toplam molekül sayısı (nCount_RNA) ve mitokondriyal RNA yüzdesi (percent.mt) filtreleme işlemi öncesi ve sonrası olacak şekilde gösterilmiştir.



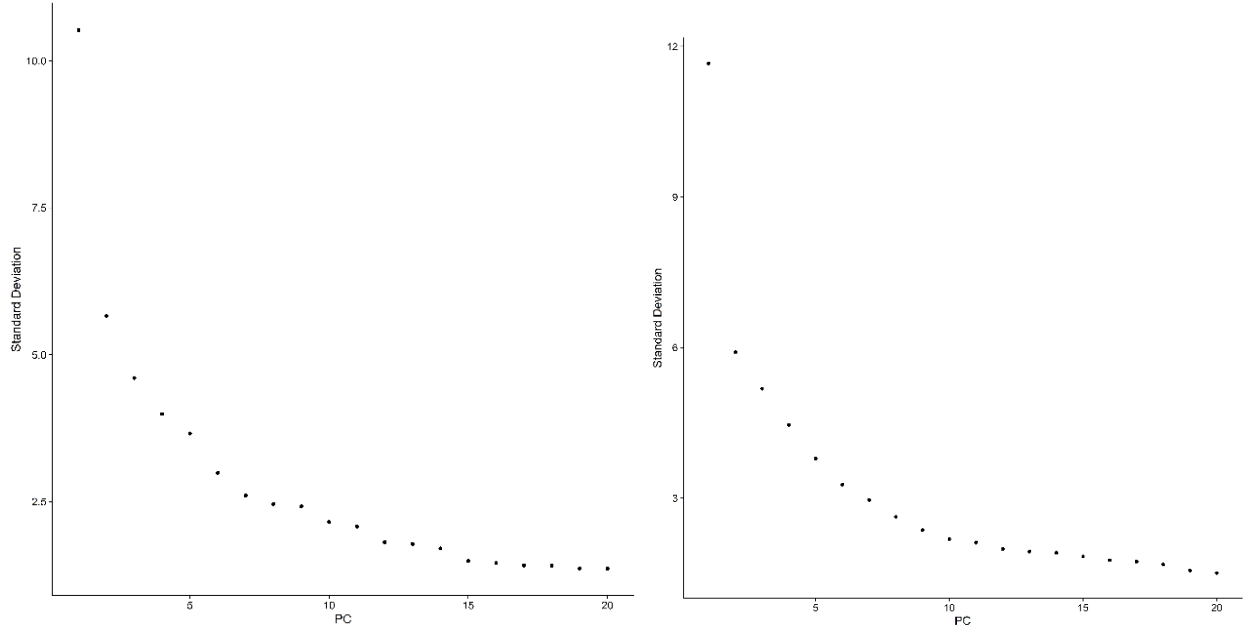
Şekil 3.1.2. Kalite kontrol işlemi öncesi ve sonrasını gösteren grafikler: axSpa'lı birey (hasta 27) için toplam gen sayısı (nFeature_RNA), toplam molekül sayısı (nCount_RNA) ve mitokondriyal RNA yüzdesi (percent.mt) filtreleme işlemi öncesi ve sonrası olacak şekilde gösterilmiştir.



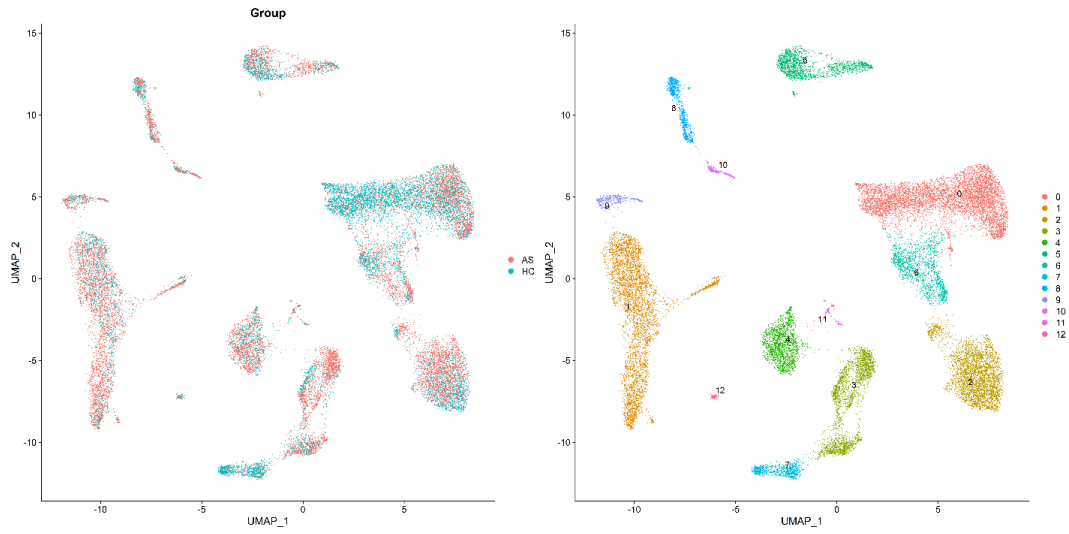
Şekil 3.1.3. Kalite kontrol işlemi öncesi ve sonrasını gösteren grafikler: sağlıklı birey (hasta 5) için toplam gen sayısı (nFeature_RNA), toplam molekül sayısı (nCount_RNA) ve mitokondriyal RNA yüzdesi (percent.mt) filtreleme işlemi öncesi ve sonrası olacak şekilde gösterilmiştir.



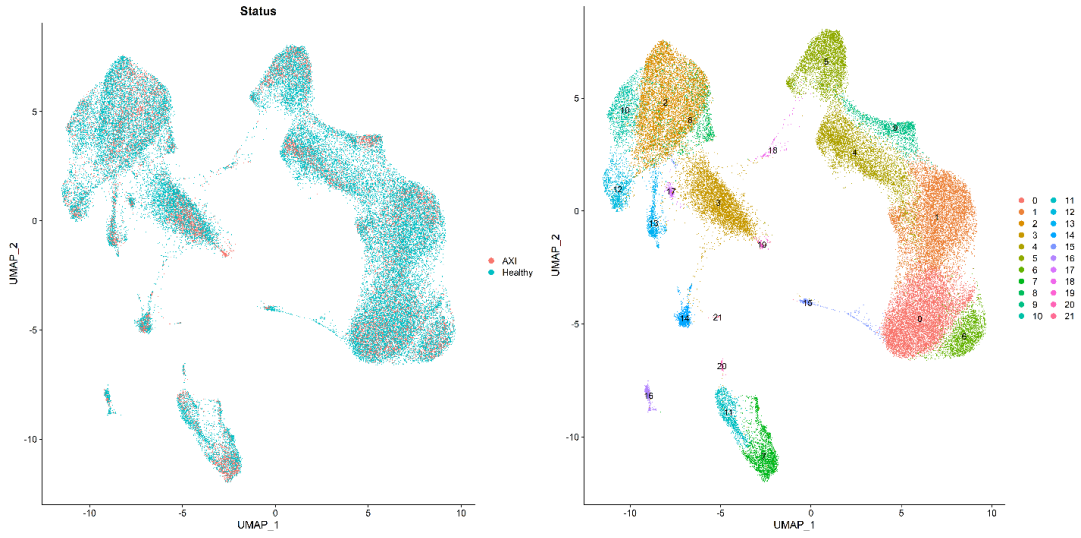
Şekil 3.1.4. Kalite kontrol işlemi öncesi ve sonrasını gösteren grafikler: sağlıklı birey (hasta 21) için toplam gen sayısı (nFeature_RNA), toplam molekül sayısı (nCount_RNA) ve mitokondriyal RNA yüzdesi (percent.mt) filtreleme işlemi öncesi ve sonrası olacak şekilde gösterilmiştir.



Şekil 3.1.5. VS1 ve VS2 için dirsek grafikleri



Şekil 3.1.6. VS1 için UMAP görselleri: soldaki grafik hücrelerin hasta ve sağlıklı koşul arasındaki dağılımı, sağdaki görsel ise belirlenen 12 hücre kümesinin dağılımını göstermektedir.



Şekil 3.1.7. VS2 için UMAP görselleri: soldaki grafik hücrelerin hasta ve sağlıklı koşul arasındaki dağılımı, sağdaki görsel ise belirlenen 22 hücre kümesinin dağılımını göstermektedir.

Kümeleme işlemi gerçekleştirildikten sonra hangi kümenin hangi hücre tipini temsil ettiğini belirlemek için diferansiyel olarak ifadesi yukarı yönde değişen genlere bakılmış ve bu genlerin tespiti için Wilcoxon rank-sum testi uygulanmıştır. Oluşturulan her kümeyi diğer küme gruplarıyla kıyaslayarak her küme için İDG'ler tespit edilmiştir (Tablo 3.1.1 & Tablo 3.1.2).

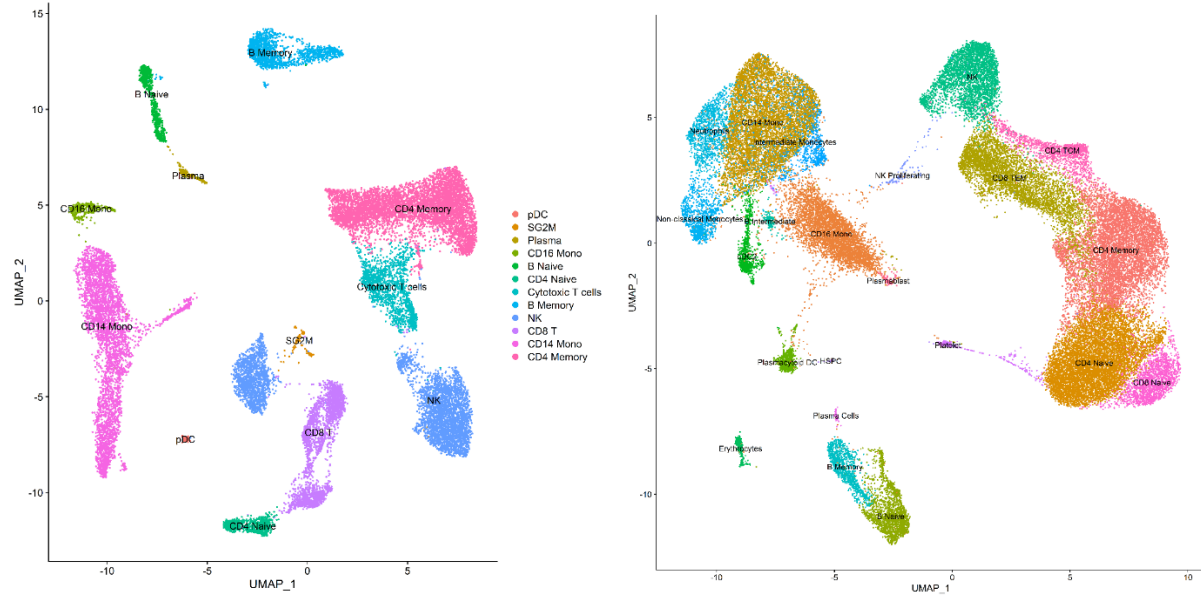
VS1'de 2 numaralı ve 4 numaralı kümenin İDG analizleri sonucu aynı hücre tipini temsil ettiği bulunmuş ve analizlere 12 hücre tipi ile devam edilmiştir (Şekil 3.1.8).

Tablo 3.1.1. VS1’de UMAP ile belirlenen her küme için ifadesi yukarı düzenlenmiş ilk 10 gen

Küme	Hücre Tipi	Yukarı Düzenlenmiş İlk 10 İDG
0	CD4 Memory	TRAC, RP3-476K8.4, CCR7, IL7R, LTB, AC007969.5, LDHB, RP11-425L10.1, RP11-864N7.2, RPL18AP3
1	CD14 Mono	LYZ, CST3, FTH1P10, LST1, AIF1, FCN1, CTSS, S100A9, S100A8, MNDA
2	NK (Natural Killer)	FGFBP2, SPON2, PTGDS, NKG7, KLRF1, PRF1, KLRD1, CST7, GNLY, CLIC3
3	CD8 T Cells	TRGC2, CCL5, TRGC1, IL32, RP11-761N21.2, CD3G, CD3D, KLRG1, RP11-632C17--A.1, RP4-706A16.3
4	NK (Natural Killer)	GNLY, GZMB, PRF1, CTSW, CLIC3, KLRD1, NKG7, KLRF1, GZMA, CCL4
5	B Memory	HLA-DRB6, TCL1A, MS4A1, CD79A, IGHD, CD79B, HLA-DQA1, CD74, IGHM, HLA-DRB5
6	Cytotoxic T Cells	GZMK, KLRG1, CCL5, TRGC2, CD3D, LYAR, IL32, AC092580.4, HLA-J, CD3E
7	CD4 Naive	CCR7, RPL7P9, RP11-761N21.2, EEF1G, RPS3AP6, RP11-632C17--A.1, RP4-706A16.3, RPL10P3, RP11-51O6.1, RP11-572P18.1
8	B Naive	MS4A1, CD79A, CD79B, IGHD, BANK1, IGHM, CD74, HLA-DQB1, HLA-DQA1, HLA-DRA
9	CD16 Mono	RP11.1143G9.4, S100A12, VCAN, CYP1B1, CD14, HLADRB6, MNDA, CSTA, TMEM176B, FCN1
10	Plasma Cells	JCHAIN, IGHA2, AL928768.3, MZB1, DERL3, RGS1, TNFRSF17, IGHA1, SSR4, ANKRD28
11	SG2M	KIAA0101, TYMS, TK1, MKI67, RRM2, TOP2A, UBE2C, BIRC5, GINS2, ZWINT
12	Plasmacytoid Dendritic Cells (pDCs)	LILRA4, ITM2C, PLD4, SERPINF1, TCF4, MZB1, APP, UGCG, PPP1R14B, DERL3

Tablo 3.1.2. VS2’de UMAP ile belirlenen her küme için ifadesi yukarı düzenlenmiş ilk 10 gen

Küme	Hücre Tipi	Yukarı Düzenlenmiş İlk 10 İDG
0	CD4 Naive	TCF7, LEF1, CCR7, MAL, PIK3IP1, LDHB, RCAN3, NOSIP, RPS3A
1	CD4 Memory	IL7R, LTB, IL32, TRAC, ITGB1, CD69, LDHB, TRBC2, AQP3, TNFAIP3
2	CD14 Monocytes	S100A8, S100A9, LYZ, S100A12, VCAN, CXCL8, MND A, FCN1, CTSS, CD14
3	CD16 Monocytes	AP000769.1, NEAT1, VCAN, PSAP, CTSS, LYZ, FCN1, S100A9, HLA-DRA, CST3
4	CD8 TEM (Effector Memory T cells)	CCL5, GZMH, NKG7, GZMK, CD8A, TRGC2, CD8B, GZMA, CST7, DUSP2
5	NK (Natural Killer Cells)	GNLY, NKG7, GZMB, FGFBP2, PRF1, KLRD1, KLRF1, CST7, SPON2, GZMA
6	CD8 Naive	CD8B,RP11-291B21.2, CD8A, OXNAD1, NUCB2, LEF1, RPS12, EEF1B2, NELL2, RPS3A
7	B Naive	IGHD,CD79A,IGHM,IGKC,MS4A1,IGLC2,CD79B,TCL1A,RALGPS2,BANK1
8	Intermediate Monocytes	S100A8,CXCL8,IL1B,S100A9,S100A12,LYZ,MND A,EGR1,VCAN,FCN1
9	CD4 TCM (central memory T cells)	KLRB1, GZMK, DUSP2, TRDC, TRGC1, CCL5,KLRG1,LYAR,GZMA,NCR3
10	Neutrophil	IFITM3, TYMP, LYZ, CTSS, ISG15, S100A9, FCN1, APOBEC3A, DUSP6, CD14
11	B Memory	MS4A1,CD79A, IGKC, IGLC2, IGLC3, BANK1, RALGPS2, CD74, IGHM, CD79B
12	Non-classical Monocytes	IFITM3, FCGR3A, CDKN1C, LST1, AIF1, MS4A7, LINC01272, SAT1, FCER1G, COTL1
13	CDC1 (Conventional dendritic cells type 1)	HLA-DQA1, HLA-DPB1, HLA-DPA1, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DQB1, CST3, FCER1A, HLA-DRB5, CD74
14	Plasmacytoid DC (dendritic cells)	PTGDS, TCF4, JCHAIN, CCDC50, PPP1R14B, IRF8, UGCG, PLD4, ITM2C, GZMB
15	Platelet	PPBP, PF4, NRGN, GNG11, TUBB1, SDPR, HIST1H2AC, TSC22D1, CLU, GP9
16	Erythrocytes	HBB, HBA2, HBA1, HBD, ALAS2, AHSP, HBM, SNCA, CA1, SLC4A1
17	B Intermediate	MS4A1, CD79A, IGH D, CD22, BANK1, LINC00926, IGHM, VPREB3, PAX5, FCRL1,
18	NK Proliferating	MKI67, KIAA0101, CENPF, TOP2A, TYMS, NUSAP1, BIRC5, ASPM, MCM4, TPX2
19	Plasmablast	MT-CO3, MT-ND5, MT-ND3, MT-ND4, MT-ND1, MT-ND2, MT-CYB, MT-ATP6, MT-CO2, MT-CO1
20	Plasma Cells	MZB1, IGHA2, DERL3, TNFRSF17, AL928768.3, TXNDC5, TNFRSF13B, DENND5B, NT5DC2, IGF1
21	HSPC (Hematopoietic Stem Cells)	PRSS57, CYTL1, CPA3, EGFL7, RP11-354E11.2, GATA2, SMIM24, HPGDS, CRHBP, NPR3



Şekil 3.1.8. VS1 ve VS2 için kümeleri temsil eden Hücre Tipleri (sol:VS1, sağ:VS2)

Her veri seti tespit edilen hücreler için iki koşul arasında (hasta ve sağlıklı) ifadesi diferansiyel olarak değişen genler tespit edilmiş ve düzeltilmiş p-değeri 0,05'in altında olan genler İDG olarak kabul edilmiştir (Tablo 3.1.3 & Tablo 3.1.4).

Tablo 3.1.3. VS1'de tespit edilen hücre tipleri için İDG sayıları

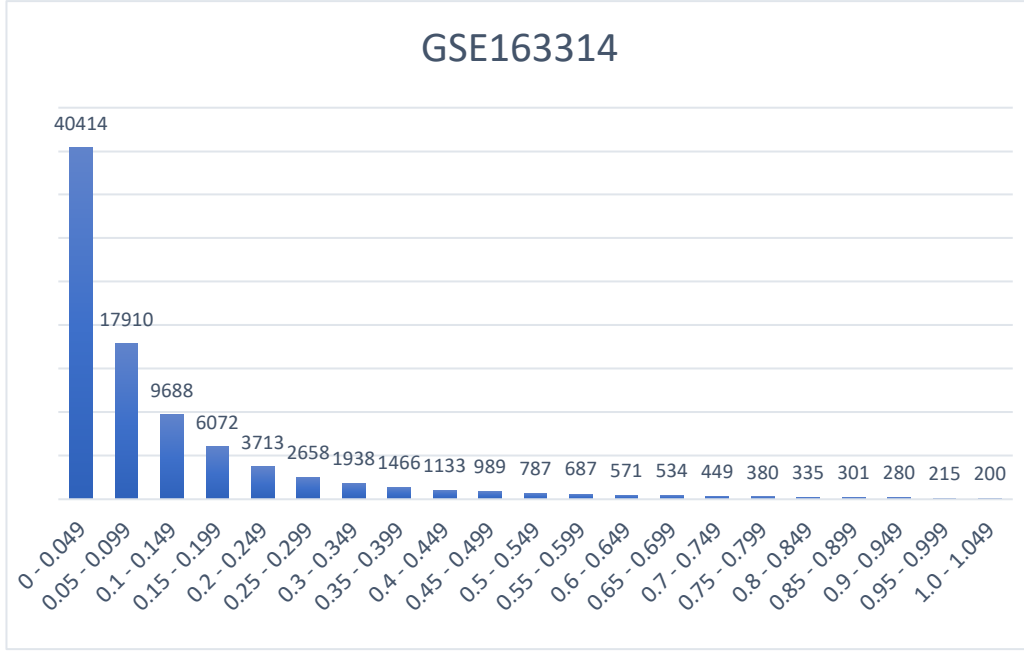
VS1- GSE163314				
Hücre Tipi	İDG	Yukarı Düzenlenmiş İDG	Aşağı Düzenlenmiş İDG	Recon3D ile eşlesen İDG
CD14 Mono	411	245	166	58
CD16 Mono	55	25	30	7
CD4 Memory	636	447	189	97
CD4 Naïve	51	32	19	6
CD8 T Cells	264	160	104	29
Cytotoxic T cell	171	82	89	19
B Naïve	86	47	39	7
B Memory	184	88	96	21
NK	245	145	100	29
Plasma	0	0	0	0
SG2M	2	0	2	0
PDC	11	7	4	0

Tablo 3.1.4. VS2’de tespit edilen hücre tipleri için İDG sayıları

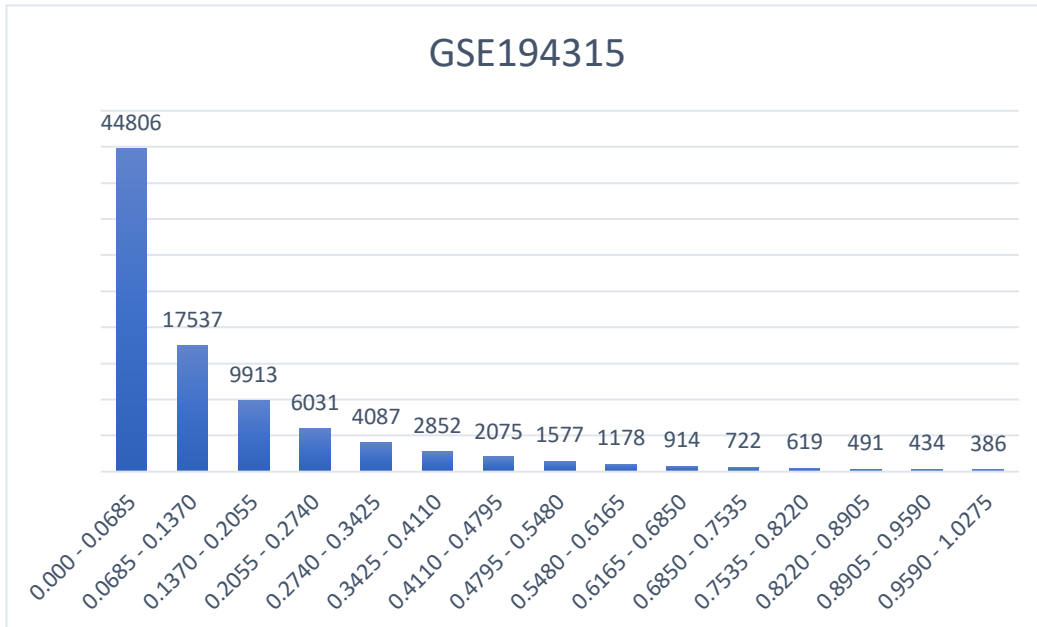
VS2- GSE194315				
Hücre Tipi	İDG	Yukarı Düzenlenmiş İDG	Aşağı Düzenlenmiş İDG	Recon 3D ile eşleşen İDG
B Intermediate	9	1	8	5
B Memory	24	6	18	9
B Naive	158	110	48	18
CD4 Memory	342	277	65	52
CD4 Naive	406	329	77	69
CD4 TCM	115	54	61	16
CD8 NAIVE	156	103	53	16
CD8 TEM	200	124	76	21
CD14 Mono	461	344	117	87
CD16 Mono	3	2	1	1
cDC2	131	69	62	20
Erythrocytes	0	0	0	0
HSPC	0	0	0	0
Intermediate Monocytes	49	26	23	13
Neutrophils	175	62	113	31
NK	149	95	54	21
NK Proliferating	1	0	1	1
Non Classical Mono	33	13	20	10
Plasmablast	63	0	63	11
Plasma cells	1	0	1	0
Plasmacytoid DC	26	9	17	8
Platelet	12	0	12	3

3.2. Hücre Tipine Özgü Metabolik Modellerin Oluşturulması

VS1 ve VS2 veri setlerinde belirlenen hücre tipleri için GIMME algoritması kullanılarak genom ölçekli metabolik modeller oluşturulmuştur. GIMME algoritması için eşik değerleri VS1 için 0,066 ve VS2 için 0,08 olarak belirlenmiştir. Eşik değerlerinin belirlendiği ortalama ifade değerlerinin sıklık histogram grafikleri Şekil 3.2.1 ve Şekil 3.2.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2.1. VS1 sıklık grafiği: Bu grafikte ortanca değer 0,066 olarak bulunmuş ve eşik değeri olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.2.2. VS2 sıklık grafiği: Bu grafikte ortanca değer 0,08 olarak bulunmuş ve eşik değeri olarak belirlenmiştir.

İki veri setinde her iki koşul için (Sağlıklı Kontrol: HC ve Hasta: AS) için tespit edilmiş her hücre tipi için GIMME algoritması kullanılarak hücre tipine özgü modeller oluşturulmuştur. Modeller oluşturulurken Recon3D ile başlanmış ve amaç fonksiyonu biyokütle üretimi olarak belirlenmiştir. Tablo 3.2.1 ve Tablo 3.2.2 oluşturulan modellerin özelliklerini göstermektedir. Tablolarda yer alan f-değerleri FBA uygulanarak tahmin edilmiş (objective value) amaç değerini göstermektedir.

Tablo 3.2.1. VS1'deki 12 hücre tipine özgü GIMME algoritması ile oluşturulan GÖMM'lerin Özellikleri

	Model	Reaksiyon Sayısı	Metabolit Sayısı	f Değeri
	Recon3D	13543	3399	1000
1	B Memory HC	1822	2092	913,7638
	B Memory AS	2386	2495	924,9099
2	B Naïve HC	2123	2400	907,131
	B Naïve AS	1951	2348	921,2313
3	CD4 Memory HC	2008	2345	914,1136
	CD4 Memory AS	2362	2858	909,5265
4	CD4 Naïve HC	2148	2546	929,412
	CD4 Naïve AS	2020	2446	903,6246
5	CD8 T cells HC	1901	2210	915,4959
	CD8 T cells AS	2109	2417	931,1086
6	CD14 Mono HC	2484	3155	931,7199
	CD14 Mono AS	2950	3514	916,5521
7	CD16 Mono HC	2254	2801	907,5492
	CD16 Mono AS	2363	2831	910,8496
8	Cytotoxic T cells HC	2572	3070	911,1195
	Cytotoxic T cells AS	2378	2513	917,811

Tablo 3.2.1. VS1’deki 12 hücre tipine özgü GIMME algoritması ile oluşturulan GÖMM’lerin Özellikleri. *Tablo devam ediyor.*

9	NK HC	2100	2438	901,5228
	NK AS	2003	2373	920,0392
10	pDC HC	2796	3240	943,3716
	pDC AS	2898	3279	910,5651
11	Plasma HC	1628	1807	915,9172
	Plasma AS	1659	1854	906,7904
12	SG2M HC	2306	2769	918,6278
	SG2M AS	2568	3090	915,8453

Tablo 3.2.2. VS2’deki 22 hücre tipine özgü GIMME algoritması ile oluşturulan GÖMM’lerin Özellikleri

	Model	Reaksiyon Sayısı	Metabolit Sayısı	f Değeri
	Recon3D	13543	3399	1000
1	B Intermediate HC	3904	3976	913,922
	B Intermediate AS	2566	3004	925,7838
2	B Memory HC	2324	2682	911,1362
	B Memory AS	2014	2422	906,9231
3	B Naive HC	1789	2039	913,1086
	B Naive AS	1976	2329	913,9713
4	CD4 Memory HC	2484	2779	917,9958
	CD4 Memory AS	1958	2246	916,7864
5	CD4 Naive HC	1998	2324	913,9496
	CD4 Naive AS	2147	2470	916,2672

Tablo 3.2.2. VS2'deki 22 hücre tipine özgü GIMME algoritması ile oluşturulan GÖMM'lerinÖzellikleri. *Tablo devam ediyor.*

6	CD4 TCM HC	1969	2304	908,1778
	CD4 TCM AS	2257	2633	913,0434
7	CD8 NAIVE HC	2329	2709	921,2313
	CD8 NAIVE AS	2087	2438	914,6527
8	CD8 TEM HC	2330	2596	902,7085
	CD8 TEM AS	2202	2467	913,4596
9	CD14 Mono HC	2687	3302	908,0394
	CD14 Mono AS	3227	3819	920,5096
10	CD16 Mono HC	2107	2413	914,6779
	CD16 Mono AS	3155	3515	906,4793
11	cDC2 HC	3356	3784	913,8243
	cDC2 AS	3716	4063	905,2899
12	Erythrocytes HC	1921	2277	915,1359
	Erythrocytes AS	2872	3382	904,2712
13	HSPC HC	2424	2944	914,0566
	HSPC AS	2894	3407	903,3667
14	Intermediate Monocytes HC	2718	3174	906,7805
	Intermediate Monocytes AS	2480	2920	902,4623
15	Neutrophils HC	3087	3470	903,8981
	Neutrophils AS	3520	4026	904,6132
16	NK HC	2074	2476	920,4254
	NK AS	2530	3007	900,8549
17	NK Proliferating HC	3338	3611	901,8572
	NK Proliferating AS	3120	3341	900,7405

Tablo 3.2.2. VS2’deki 22 hücre tipine özgü GIMME algoritması ile oluşturulan GÖMM’lerin Özellikleri. *Tablo devam ediyor.*

18	Non Classical Mono HC	2782	3275	939,1991
	Non Classical Mono AS	2953	3471	926,4364
19	Plasmablast HC	1719	1944	907,0243
	Plasmablast AS	1683	1719	904,9657
20	Plasmacells HC	2939	3308	902,8864
	Plasmacells AS	3754	3949	907,8364
21	PlasmacytoidDC HC	3872	4032	940,5682
	PlasmacytoidDC AS	3589	3694	910,757
22	Platelet HC	2381	2890	913,4428
	Platelet AS	1786	2050	918,1812

Her iki verisetinde belirlenen hücre tiplerine özgü oluşturulmuş GÖMM’lerde tespit edilen akılar için aynı hücre tipinde sağlıklı ve hasta koşulu arasında diferansiyel olarak artan (DUF) ve azalan akılar (DDF) tespit edilmiş (Tablo 3.2.3 & Tablo 3.2.4 ve RSEA yazılım aracı kullanılarak yolak zenginleşim analizleri yapılmıştır (Tablo 3.2.5 & Tablo 3.2.6 & Tablo 3.2.7 & Tablo 3.2.8).

Tablo 3.2.3. VS1’deki DUF ve DDF sayıları

VS1- GSE163314		
Hücre Tipi	DUF	DDF
CD14 Mono	380	378
CD16 Mono	373	369
CD4 Memory	333	365
CD4 Naïve	380	432
CD8 T Cells	366	363

Tablo 3.2.3. VS1'deki DUF ve DDF sayıları. *Tablo devam ediyor*

Cytotoxic T cells	429	414
B Naïve	369	384
B Memory	376	336
NK	389	401
Plasma	380	415
SG2M	391	353
PDC	393	430

Tablo 3.2.4. VS2'deki DUF ve DDF sayıları

VS2- GSE194315		
Hücre Tipi	DUF	DDF
B Intermediate	469	438
B Memory	325	355
B Naïve	352	363
CD4 Memory	397	397
CD4 Naïve	392	403
CD4 TCM	380	364
CD8 NAIVE	367	405
CD8 TEM	348	372
CD14 Mono	395	385
CD16 Mono	378	421
cDC2	466	445
Erythrocytes	340	345
HSPC	382	397
Intermediate Monocytes	336	333
Neutrophils	451	443
NK	418	361
NK Proliferating	387	445
Non Classical Mono	406	424
Plasmablast	343	333
Plasma cells	405	467
Plasmacytoid DC	386	435
Platelet	275	320

Tablo 3.2.5. VS1'deki hücre tiplerine özgü GÖMM'lerde tespit edilen diferansiyel olarak artan akıların zenginleşim analizleri

GSE163314- DUF		
Hücre Tipi	Yolak ismi	Bonferroni
B Memory	Citrate cycle (TCA cycle)	2,92E-04
	Carbon fixation pathways in prokaryotes	4,93E-03
	Pyruvate metabolism	2,32E-02
B Naïve	Citrate cycle (TCA cycle)	1,10E-02
CD4 Memory	Purine metabolism	4,84E-03
CD4 Naïve	Arachidonic acid metabolism	1,54E-03
	Glycolysis / Gluconeogenesis	1,08E-02
CD8 T Cells	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	2,04E-03
	Pyrimidine metabolism	2,91E-02
CD14 Mono	Purine metabolism	1,53E-05
	Pyrimidine metabolism	9,56E-02
CD16 Mono	Arachidonic acid metabolism	1,53E-04
Cytotoxic T Cells	Purine metabolism	3,75E-07
	Arachidonic acid metabolism	2,43E-02
NK	Pyrimidine metabolism	2,08E-03
PDC	Pyrimidine metabolism	8,41E-05
	Purine metabolism	1,06E-03
	Glycolysis / Gluconeogenesis	4,50E-03
	Citrate cycle (TCA cycle)	1,42E-02
SG2M	Purine metabolism	6,47E-04
	Citrate cycle (TCA cycle)	3,96E-02

Tablo 3.2.6. VS1'deki hücre tiplerine özgü GÖMM'lerde tespit edilen diferansiyel olarak azalan akıların zenginleşim analizleri

GSE163314- DDF		
Hücre Tipi	Yolak İsmi	Bonferroni
B Naïve	Purine metabolism	1,06E-03
CD4 Memory	Pyrimidine metabolism	1,37E-05
	Glycerophospholipid metabolism	2,18E-01
CD4 Naïve	Propanoate metabolism	9,77E-03
	Purine metabolism	2,46E-02
CD8 T Cells	Purine metabolism	8,17E-04
CD14 Mono	Pyrimidine metabolism	8,26E-04
	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	1,27E-02
	Propanoate metabolism	3,10E-02
	Citrate cycle (TCA cycle)	4,31E-02
CD16 Mono	Arachidonic acid metabolism	7,54E-04
	Purine metabolism	2,46E-02
Cytotoxic T Cells	Pyrimidine metabolism	1,68E-03
	Arachidonic acid metabolism	1,13E-02
	Citrate cycle (TCA cycle)	1,26E-02
NK	Arachidonic acid metabolism	4,85E-07
PDC	Pyrimidine metabolism	7,04E-07
	Purine metabolism	4,30E-03
	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	3,36E-02
Plasma Cells	Arachidonic acid metabolism	3,24E-04
	Purine metabolism	6,23E-04
SG2M	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	4,60E-03
	Arachidonic acid metabolism	2,11E-02

Tablo 3.2.7. VS2'deki hücre tiplerine özgü GÖMM'lerde tespit edilen diferansiyel olarak artan akıların zenginleşim analizleri

GSE194315-DUF		
Hücre Tipi	Yolak İsmi	Bonferroni
B intermediate	Pyrimidine metabolism	3,86E-10
	Arachidonic acid metabolism	5,94E-05
	Glycolysis / Gluconeogenesis	3,93E-04
B Memory	Arachidonic acid metabolism	7,87E-03
	Purine metabolism	8,67E-03
B Naïve	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	3,39E-03
	Purine metabolism	2,03E-02
CD4 Memory	Purine metabolism	7,33E-05
	Propanoate metabolism	8,37E-03
	Pyrimidine metabolism	4,77E-02
CD4 Naïve	Pyrimidine metabolism	4,00E-04
	Arachidonic acid metabolism	1,81E-03
	Glycolysis / Gluconeogenesis	1,23E-02
CD4 TCM	Purine metabolism	8,17E-04
	Pyrimidine metabolism	1,68E-03
CD8 Naïve	Glycolysis / Gluconeogenesis	2,78E-04
	Arachidonic acid metabolism	2,43E-02
	Purine metabolism	3,50E-02
CD8 Tem	Glycolysis / Gluconeogenesis	8,13E-05
	Arachidonic acid metabolism	3,24E-04
CD14 Mono	Pyrimidine metabolism	4,89E-05
	Purine metabolism	1,09E-02
CD16 Mono	Purine metabolism	2,66E-03
	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	5,31E-03
	Glycolysis / Gluconeogenesis	8,26E-03
CDC2	Purine metabolism	1,66E-04
	Pyrimidine metabolism	4,48E-03
	Glycolysis / Gluconeogenesis	8,26E-03
Eryth	Purine metabolism	5,27E-03
	Pyrimidine metabolism	1,64E-02
HSPC	Purine metabolism	4,01E-03
Neutrophil	Arachidonic acid metabolism	6,49E-07
	Pyrimidine metabolism	1,38E-04

Tablo 3.2.7. VS2'deki hücre tiplerine özgü GÖMM'lerde tespit edilen diferansiyel olarak artan akıların zenginleşim analizleri. *Tablo devam ediyor.*

NK	Purine metabolism	2,20E-03
	Arachidonic acid metabolism	8,31E-02
NK Proliferating	Purine metabolism	4,84E-03
	Pyrimidine metabolism	7,37E-03
Non-classical Monocytes	Pyrimidine metabolism	1,15E-03
	Arachidonic acid metabolism	4,32E-03
	Glycolysis / Gluconeogenesis	2,45E-02
Plasma Cells	Purine metabolism	4,68E-04
Plasmacytoid DC	Purine metabolism	6,32E-06
	Pyruvate metabolism	3,13E-02
Platelet	Arachidonic acid metabolism	3,39E-03

Tablo 3.2.8. VS2'deki hücre tiplerine özgü GÖMM'lerde tespit edilen diferansiyel olarak azalan akıların zenginleşim analizleri

GSE194315- DDF		
Hücre Tipi	Yolak İsmi	Bonferroni
B intermediate	Purine metabolism	5,27E-07
B memory	Pyrimidine metabolism	2,16E-04
	Purine metabolism	3,50E-02
CD4 memory	Pyrimidine metabolism	1,41E-05
	Citrate cycle (TCA cycle)	2,74E-02
CD4 NAİVE	Pyrimidine metabolism	2,91E-02
CD8 NAİVE	Pyrimidine metabolism	2,16E-04
	Purine metabolism	3,50E-02
CD8 Tem	Purine metabolism	4,26E-05
	Pyrimidine metabolism	6,96E-04
CD16 MONO	Purine metabolism	1,71E-03
	Pyrimidine metabolism	3,10E-03
CDC2	Arachidonic acid metabolism	2,11E-04
	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	6,40E-04
	Purine metabolism	1,16E-03
	Pentose phosphate pathway	2,13E-02
	Glycolysis / Gluconeogenesis	2,45E-02

Tablo 3.2.8. VS2'deki hücre tiplerine özgü GÖMM'lerde tespit edilen diferansiyel olarak azalan akıların zenginleşim analizleri. *Tablo devam ediyor.*

ERYTH	Pyrimidine metabolism	1,64E-02
HSPC	Purine metabolism	7,31E-07
	Pyrimidine metabolism	3,29E-04
	Citrate cycle (TCA cycle)	2,74E-02
Inermediate mono	Purine metabolism	1,36E-02
neutrophil	Pyrimidine metabolism	1,53E-09
	Citrate cycle (TCA cycle)	1,89E-05
	Glycolysis / Gluconeogenesis	2,43E-05
	Pyruvate metabolism	4,69E-03
	Purine metabolism	8,26E-03
Nk	Pyrimidine metabolism	8,41E-05
	Purine metabolism	1,67E-02
Nkproliferating	Pyrimidine metabolism	8,41E-05
	Purine metabolism	1,67E-02
Nonclassicalmono	Pyrimidine metabolism	7,37E-03
	Propanoate metabolism	1,94E-02
	Citrate cycle (TCA cycle)	3,02E-02
plasmablast	Purine metabolism	2,62E-02
plasmacells	Pyrimidine metabolism	1,99E-06
	Purine metabolism	1,36E-02
plasmacytoiddc	Pyrimidine metabolism	8,53E-06
	Arachidonic acid metabolism	1,09E-03
	Carbon fixation in photosynthetic organisms	1,79E-02
platelet	Pyrimidine metabolism	1,06E-03

3.3. Raportör Metabolit Analizleri

VS1 ve VS2 ‘de tespit edilen her hücre tipinde bulunan İDG’ler Recon3D genleri ile eşleştirilmiş ve RAVEN Toolbox Yazılım aracı kullanılarak raportör metabolit analizleri gerçekleştirilmiştir. Her hücre tipi için p-değeri 0,05’ten küçük olan raportör metabolitler Tablo 3.3.1 ve Tablo 3.3.2’de gösterilmiştir. Analiz sonucunda genel olarak her hücre tipinde aminoasitler, su, proton ve oksijen gibi metabolitler raportör metabolit olarak tespit edilmiştir.

Tablo 3.3.1. VS1 Hücre tiplerinin İDG’leri ile tespit edilen raportör metabolitler

HÜCRE TİPİ	METABOLİT İSMİ	P-DEĞERİ
B NAİVE	Nicotinamide Adenine Dinucleotide - Reduced	4,85E-02
	Nicotinamide Adenine Dinucleotide	4,85E-02
	3-Phospho-D-Glyceroyl Phosphate	4,85E-02
	Glyceraldehyde 3-Phosphate	4,85E-02
B MEMORY	Water	1,17E-02
	Oxygen	1,17E-02
	Ferrocytochrome C	1,17E-02
	Superoxide	2,91E-02
CD14 MONO	Proton	1,92E-04
	Water	2,06E-03
	Oxygen	2,06E-03
	Ferrocytochrome C	2,06E-03
	Ferricytochrome C	2,06E-03
	Superoxide	3,33E-03
	Proton	3,61E-03
	Ubiquinone-10	4,04E-03
	Ubiquinol-10	4,04E-03
CD16 MONO	Orthophosphate	3,75E-02
	Protein-Tyrosine	3,75E-02
	Protein Tyrosine Phosphate	3,75E-02
	Protein	3,75E-02
	Phosphoprotein	3,75E-02

Tablo 3.3.1.VS1 hücre tiplerinin İDG'leri ile tespit edilen raportör metabolitler.*Tablo devam ediyor*

CD4 MEMORY	Cytidine 5-Monophosphate	1,40E-04
	Cytidine-5-Triphosphate	1,40E-04
	Cytidine-5-DIphosphate	1,40E-04
	Deoxyguanosine-5-Triphosphate	1,40E-04
	Deoxyguanosine-5-Diphosphate	1,40E-04
	Deoxycytidine-5-Diphosphate	1,40E-04
	Deoxycytidine-5-Triphosphate	1,40E-04
	Deoxyadenosine Triphosphate	1,40E-04
	Deoxyadenosine Diphosphate	1,40E-04
	Guanosine-5-Triphosphate	1,40E-04
	Guanosine-5-Diphosphate	1,40E-04
	Uridine-5-Monophosphate	1,40E-04
	Ubiquinone-10	2,91E-04
	Ubiquinol-10	2,91E-04
	Proton	7,49E-04
	Nicotinamide Adenine Dinucleotide - Reduced	1,14E-03
	Nicotinamide Adenine Dinucleotide	1,14E-03
	Proton	1,47E-03
	Adenosine Triphosphate	9,73E-03
	Deoxycytidylic Acid	9,73E-03
	Uridine Diphosphate	9,73E-03
	Uridine-5-TrIphosphate	9,73E-03
	Adenosine Diphosphate	9,73E-03
	Uridine Diphosphate	1,14E-02
	Guanosine-5-Diphosphate	1,14E-02
	Deoxyadenosine Triphosphate	1,14E-02
	Deoxyadenosine Diphosphate	1,14E-02
	Cytidine-5-DIphosphate	1,14E-02
	Deoxyguanosine-5-Triphosphate	1,14E-02
	Deoxyguanosine-5-Diphosphate	1,14E-02
	Deoxycytidine-5-Diphosphate	1,14E-02
	Deoxycytidine-5-Triphosphate	1,14E-02
	Oxygen	1,16E-02
	Ferrocytochrome C	1,16E-02
	Superoxide	2,24E-02
CD4 NAİVE	Superoxide	2,21E-02
CD8 T CELLS	Orthophosphate	1,82E-02
	L-Alanine	1,82E-02
	L-Glutamate	1,82E-02
	Glycine	1,82E-02
	L-Proline	1,82E-02
	L-Isoleucine	1,82E-02

Tablo 3.3.1.VS1 hücre tiplerinin İDG’leri ile tespit edilen raportör metabolitler.*Tablo devam ediyor*

	Adenosine Triphosphate	1,82E-02
	Adenosine Diphosphate	1,82E-02
	L-Threonine	1,82E-02
	L-Arginine	1,82E-02
	L-Asparagine	1,82E-02
	L-Aspartate	1,82E-02
	L-Cysteine	1,82E-02
	L-Glutamine	1,82E-02
	L-Histidine	1,82E-02
	L-Leucine	1,82E-02
	L-Lysine	1,82E-02
	L-Methionine	1,82E-02
	L-Phenylalanine	1,82E-02
	L-Serine	1,82E-02
	L-Tryptophan	1,82E-02
	L-Tyrosine	1,82E-02
	L-Valine	1,82E-02
	Gm2A	1,82E-02
	Star	1,82E-02
	Apocytochrome-C	1,82E-02
	ApoB48	1,82E-02
	PPARA (EnsG00000186951)	1,82E-02
	Water	2,31E-02
	Proton	2,40E-02
	Ubiquinone-10	3,41E-02
	Ubiquinol-10	3,41E-02
	Proton	3,72E-02
	Water	4,54E-02
	Oxygen	4,54E-02
	Ferrocyclochrome C	4,54E-02
	Ferricytochrome C	4,54E-02
CYTOTOXIC T CELLS	Water	1,49E-02
	Oxygen	1,49E-02
	Ferrocyclochrome C	1,49E-02
	Ferricytochrome C	1,49E-02
	Proton	3,57E-02

Tablo 3.3.1.VS1 hücre tiplerinin İDG'leri ile tespit edilen raportör metabolitler.*Tablo devam ediyor*

NK	Ferrocyclochrome C	6,86E-04
	Ferricycyclochrome C	6,86E-04
	Superoxide	5,18E-03
	Oxygen	5,66E-03
	Proton	5,83E-03
	Water	2,40E-02
	Prostaglandin D2	4,78E-02
	Prostaglandin H2	4,78E-02

Tablo 3.3.2.VS2 hücre tiplerinin İDG'leri ile tespit edilen raportör metabolitler

HÜCRE TİPİ	METABOLİT İSMİ	P-DEĞERİ
B NAİVE	Diglyceride	5,38E-03
	1D-Myo-Inositol 1-Phosphate	5,38E-03
	1D-Myo-Inositol 1,4,5-Trisphosphate	5,38E-03
	(1R,2R,3R,4R,5R,6S)-2,3,5,6-Tetrahydroxy-4-(Phosphonatoxy)Cyclohexyl Phosphate	5,38E-03
	1,2-Diacylglycerol-Ld-Pi-Pool	5,38E-03
	Oxygen	1,04E-02
	Ferrocyclochrome C	1,04E-02
	Ferricycyclochrome C	1,04E-02
	Superoxide	1,04E-02
CD14 MONO	Proton	1,04E-04
	Ubiquinone-10	2,44E-04
	Ubiquinol-10	2,44E-04
	Nicotinamide Adenine Dinucleotide - Reduced	1,10E-03
	Nicotinamide Adenine Dinucleotide	1,10E-03
	Proton	3,56E-03
	Ferrocyclochrome C	6,42E-03
	Ferricycyclochrome C	6,42E-03
	Superoxide	8,13E-03
	Oxygen	1,39E-02
CD4 MEMORY	Proton	7,43E-07
	Proton	3,21E-05
	Superoxide	7,10E-05
	Ubiquinone-10	2,11E-04
	Ubiquinol-10	2,11E-04
	Ferrocyclochrome C	4,34E-04

Tablo 3.3.2.VS2 hücre tiplerinin İDG'leri ile tespit edilen raportör metabolitler.
Tablo devam ediyor.

	Ferricytochrome C	4,34E-04
	Nicotinamide Adenine Dinucleotide - Reduced	4,65E-03
	Nicotinamide Adenine Dinucleotide	4,65E-03
	Oxygen	1,13E-02
	Water	2,72E-02
CD4 NAİVE	Proton	6,21E-07
	Water	6,67E-07
	Oxygen	6,67E-07
	Ferrocyclochrome C	6,67E-07
	Superoxide	1,14E-05
	Ubiquinone-10	9,80E-04
	Nicotinamide Adenine Dinucleotide - Reduced	7,42E-03
	Nicotinamide Adenine Dinucleotide	7,42E-03
CD4 TCM	Proton	3,43E-02
CD8 NAİVE	Proton	1,27E-02
	Superoxide	2,18E-02
	Water	2,40E-02
	Oxygen	2,40E-02
	Ferrocyclochrome C	2,40E-02
CDC2	Proton	1,14E-02
	Water	3,90E-02
	Oxygen	3,90E-02
	Ferrocyclochrome C	3,90E-02
	Ubiquinone-10	4,14E-02
	Ubiquinol-10	4,14E-02
NEUTROPHIL	Proton	1,20E-03
	Water	1,20E-03
	Iron (Fe2+)	1,20E-03
	Oxygen	1,20E-03
	Iron (Fe3+)	1,52E-03
	N-Acetyl-D-Glucosamine 6-Phosphate	9,22E-03
	N-Acetyl-D-Glucosamine	9,22E-03
	N-Acetyl-D-Mannosamine 6-Phosphate	9,22E-03
	N-Acetyl-D-Mannosamine	9,22E-03
	Leukotriene A4	2,68E-02
	Leukotriene B4	2,68E-02

Tablo 3.3.2. VS2 hücre tiplerinin İDG'leri ile tespit edilen raportör metabolitler.

Tablo devam ediyor.

NK	Superoxide	4,47E-03
	Water	6,49E-03
	Oxygen	6,49E-03
	Ferrocyclochrome C	6,49E-03
	Proton	1,46E-02
PLASMABLAST	Uridine Diphosphate	5,10E-03
	N,N-Diacetylchitobiosyldiphosphodolichol, Human Liver Homolog	5,10E-03
	Uridine-5-Diphosphate-N-Acetyl-Alpha-D-Glucosamine	5,10E-03
	N-Acetyl-D-Glucosaminyldiphosphodolichol, Human Liver Homolog	5,10E-03

3.4. Her Hücre Tipi için Bağlama Özgü Protein-Protein Etkileşim Ağlarının Oluşturulması

GSE194315 veri seti için yazarlardan talep edilen İDG listesinde yedi hücre tipinin 200'den fazla İDG'ye sahip olduğu görülmüştür (Tablo 3.2.1). Bu yedi hücre tipinin İDG sayıları Tablo 3.4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.4.1. Hücre tiplerine ait İDG sayıları

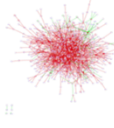
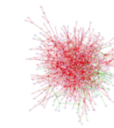
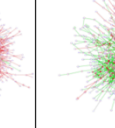
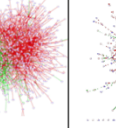
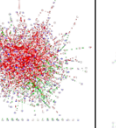
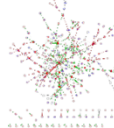
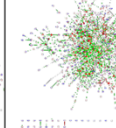
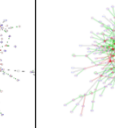
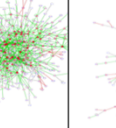
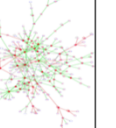
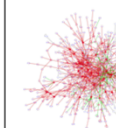
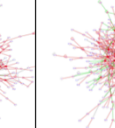
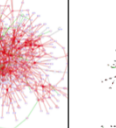
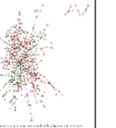
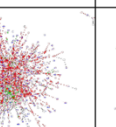
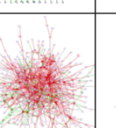
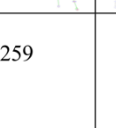
Hücre Tipi	İDG Sayısı
CD14 MONO	1262
B Naive	363
NK	391
CD4 TCM	873
CD4 Naive	895
CD8 TEM	500
CD8 Naive	562

APID veri tabanından alınan etkileşimler kullanılarak yedi hücre tipi için PPE ağları oluşturulmuştur. PPE ağları Cytoscape 3.9.0 kullanılarak görselleştirilmiş ve bağlantısız düğümler ağlardan çıkarıldıktan sonra temel topolojik parametreler hesaplanmıştır (Tablo 3.4.2).

Tablo 3.4.2. Hücre tipine özgü PPE ağlarının topolojik analizleri

	CD14 Mono	B Naive	NK	CD4 TCM	CD4 Naive	CD8 TEM	CD8 Naive
Düğüm Sayısı	799	148	196	487	510	259	289
Kenar Sayısı	1600	186	274	875	954	372	437
Ağ Çapı	12	12	14	12	11	14	13
Kümeleme Katsayısı	0,046	0,029	0,0470	0,072	0,065	0,028	0,043
Ağ Yoğunluğu	0,005	0,024	0,017	0,007	0,007	0,012	0,012

DyNet ile oluşturulan yedi hücre tipinin ikili kombinasyonları için oluşturulan PPE ağları, Şekil 3.4.1'in üst üçgeninde gösterilmektedir. Ağlarda kalan düğümlerin sayısı, şeklin köşegeninde gösterilmiştir. Şeklin alt üçgeninde, hücre tiplerinin her bir kombinasyonunun hizalanmış düğüm sayısı ve Sørensen-Dice katsayısı istatistikleri kullanılarak hesaplanan hücreye özgü İDG listelerinin benzerlik katsayısı gösterilmiştir (Şekil 3.4.1). En yüksek benzerlik CD4 Naive ve CD4 TCM hücreleri arasında gözlemlenmiş ve en belirgin farklılık CD14 monocyte hücrelerinin İDG'lerinde bulunmuştur. CD14 Monocyte hücrelerinin İDG'lerinde belirgin farklılığın nedeni bu hücre tipinin diğer hücre tiplerine göre fazla sayıda İDG'ye sahip olmasından dolayı SDC'nin boyut bağımlılığından kaynaklanmış olabilir.

Hücre Tipi	CD14 MONO	B NAIVE	NK	CD4 TCM	CD4 NAIVE	CD8 TEM	CD8 NAIVE
CD14 MONO	799						
B NAIVE	61 (0,19)	148					
NK	84 (0,21)	62 (0,43)	196				
CD4 TCM	146 (0,25)	105 (0,41)	114 (0,40)	487			
CD4 NAIVE	149 (0,24)	106 (0,40)	113 (0,40)	334 (0,73)	510		
CD8 TEM	88 (0,19)	80 (0,43)	103 (0,52)	153 (0,47)	157 (0,46)	259	
CD8 NAIVE	95 (0,21)	93 (0,48)	94 (0,43)	225 (0,66)	226 (0,64)	113 (0,46)	289

Şekil 3.4.1. DyNet ile yedi hücre tipinin birleştirilmiş PPE ağlarının görselleştirilmesi: Hücre tiplerinin ikili kombinasyonlarının ağ görüntüleri (üst üçgen) ve kombinasyondaki düğüm sayısı (alt üçgen) ve düğüm sayısı (ortak köşegen) ağ görüntüleri Şekil 3.4.1.'de gösterilmiştir. İDG listelerinin Sørensen–Dice katsayıları, değerlerle orantılı bir yazı tipi ile her hücre tipi kombinasyonu için parantez içinde belirtilmiştir.

Tüm hücre tiplerinde 57 tane ortak İDG'ye rastlanılmıştır. Bu İDG'lerin gen ontolojisi (GO) zenginleştirme analizleri, g:Profiler aracılığıyla gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4.2.)

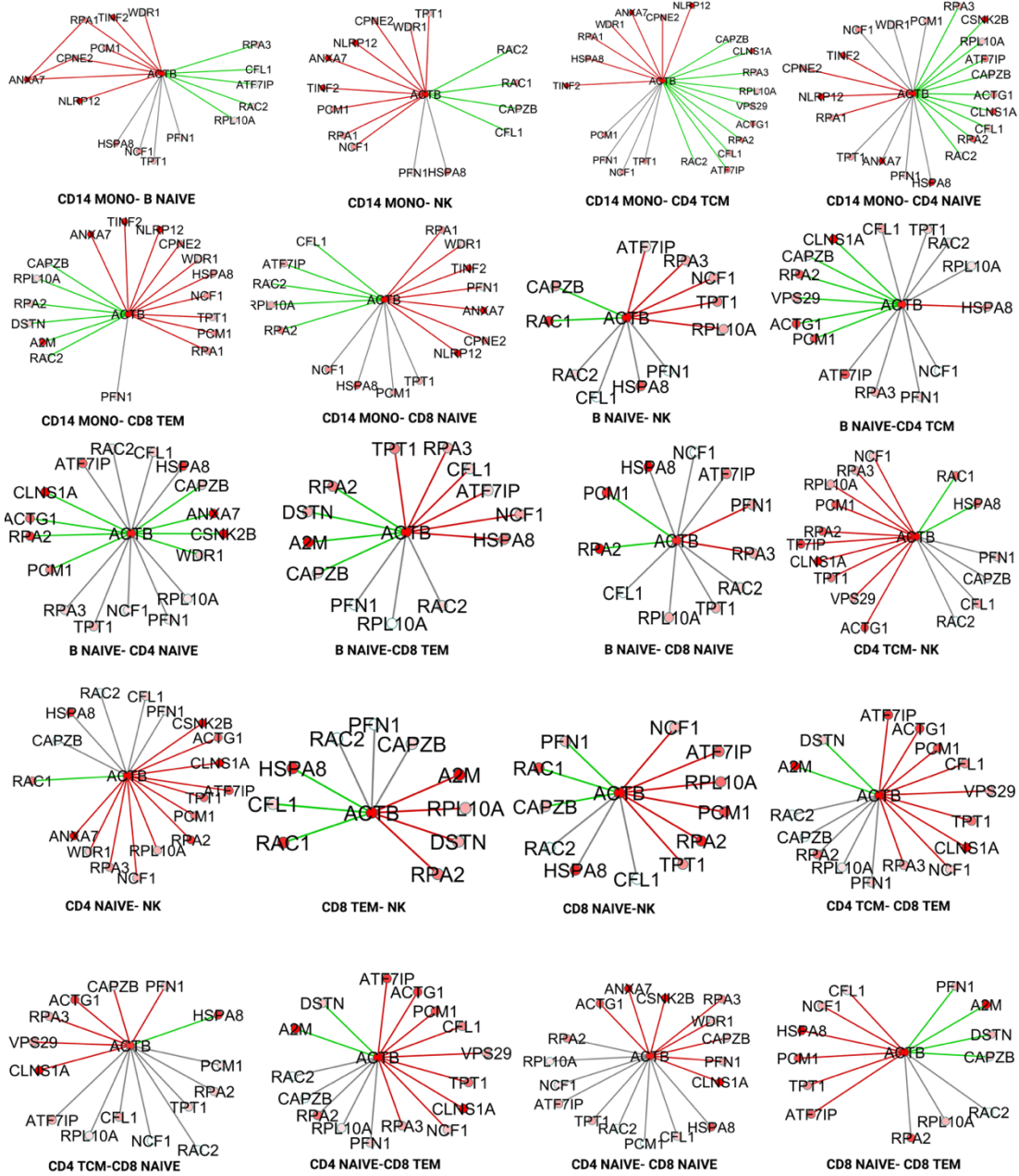
GO:BP		stats		
Term name	Term ID	P _{adj}	-log ₁₀ (P _{adj})	
			0	≤16
cytoplasmic translation	GO:0002181	3.351×10 ⁻¹⁷		
organonitrogen compound biosynthetic process	GO:1901566	8.652×10 ⁻¹⁰		
translation	GO:0006412	1.435×10 ⁻⁹		
peptide biosynthetic process	GO:0043043	2.648×10 ⁻⁹		
amide biosynthetic process	GO:0043604	3.288×10 ⁻⁸		
peptide metabolic process	GO:0006518	4.714×10 ⁻⁸		
amide metabolic process	GO:0043603	2.721×10 ⁻⁶		
cellular macromolecule biosynthetic process	GO:0034645	2.862×10 ⁻⁶		
ATP biosynthetic process	GO:0006754	1.171×10 ⁻⁵		
cellular nitrogen compound biosynthetic process	GO:0044271	1.724×10 ⁻⁵		
purine ribonucleoside triphosphate biosynthetic process	GO:0009206	2.335×10 ⁻⁵		
purine nucleoside triphosphate biosynthetic process	GO:0009145	2.478×10 ⁻⁵		
ribonucleoside triphosphate biosynthetic process	GO:0009201	3.308×10 ⁻⁵		
nucleoside triphosphate biosynthetic process	GO:0009142	5.991×10 ⁻⁵		
aerobic electron transport chain	GO:0019646	1.646×10 ⁻⁴		
ATP synthesis coupled electron transport	GO:0042773	2.712×10 ⁻⁴		
mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport	GO:0042775	2.712×10 ⁻⁴		
respiratory electron transport chain	GO:0022904	8.414×10 ⁻⁴		
cellular biosynthetic process	GO:0044249	1.128×10 ⁻³		
purine ribonucleotide biosynthetic process	GO:0009152	1.977×10 ⁻³		
ATP metabolic process	GO:0046034	1.977×10 ⁻³		
biosynthetic process	GO:0009058	2.335×10 ⁻³		
ribonucleotide biosynthetic process	GO:0009260	3.310×10 ⁻³		
purine ribonucleoside triphosphate metabolic process	GO:0009205	4.000×10 ⁻³		
ribose phosphate biosynthetic process	GO:0046390	4.000×10 ⁻³		
oxidative phosphorylation	GO:0006119	4.320×10 ⁻³		
purine nucleoside triphosphate metabolic process	GO:0009144	4.563×10 ⁻³		
ribonucleoside triphosphate metabolic process	GO:0009199	4.806×10 ⁻³		
organic substance biosynthetic process	GO:1901576	6.491×10 ⁻³		
nucleoside triphosphate metabolic process	GO:0009141	7.345×10 ⁻³		
electron transport chain	GO:0022900	7.498×10 ⁻³		
purine nucleotide biosynthetic process	GO:0006164	8.276×10 ⁻³		
purine-containing compound biosynthetic process	GO:0072522	1.020×10 ⁻²		
mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone	GO:0006120	1.281×10 ⁻²		
cellular macromolecule metabolic process	GO:0044260	1.631×10 ⁻²		
organonitrogen compound metabolic process	GO:1901564	1.889×10 ⁻²		
nucleotide biosynthetic process	GO:0009165	1.990×10 ⁻²		
aerobic respiration	GO:0009060	2.007×10 ⁻²		
nucleoside phosphate biosynthetic process	GO:1901293	2.115×10 ⁻²		
mitochondrial respiratory chain complex I assembly	GO:0032981	2.629×10 ⁻²		
NADH dehydrogenase complex assembly	GO:0010257	2.629×10 ⁻²		
proton motive force-driven mitochondrial ATP synthesis	GO:0042776	4.052×10 ⁻²		
KEGG		stats		
			0	≤16
Term name	Term ID	P _{adj}	-log ₁₀ (P _{adj})	
Ribosome	KEGG:03010	2.365×10 ⁻¹⁶		
Coronavirus disease - COVID-19	KEGG:05171	6.817×10 ⁻¹⁵		
Oxidative phosphorylation	KEGG:00190	2.178×10 ⁻⁴		
Thermogenesis	KEGG:04714	7.714×10 ⁻³		
Amyotrophic lateral sclerosis	KEGG:05014	2.036×10 ⁻²		
Diabetic cardiomyopathy	KEGG:05415	2.855×10 ⁻²		
Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species	KEGG:05208	4.597×10 ⁻²		
Phagosome	KEGG:04145	4.881×10 ⁻²		

Şekil 3.4.2. 57 ortak İDG'nin zengileşim analizleri

DyNet kombinasyonlarında her bir hücre tipi çifti için en yüksek Dn skoruna sahip yeniden bağlanmış ilk on merkezi gen/protein belirlenmiş ve kümülatif olarak 86 merkezi gen/protein bulunmuştur. En az sekiz hücre tipi çiftinde görülen 11 yeniden bağlanmış merkezi gen/protein seçilmiştir. Bu merkezi genler/proteinler sırasıyla ACTB, PSMB8, SOD1, PPIA, EEF1A1, JUN, LAMTOR5, HSPA8, RAN, HMGB1 ve PPP1CA olarak sıralanabilir. Bu genlerin zenginleştirme analizleri Şekil 3.4.3'te gösterilmiştir. En tutarlı merkezi gen/protein olan ACTB hücre tipi kombinasyonlarındaki topolojik değişimi Şekil 3.4.4'te gösterilmiştir.

GO:BP		stats		
Term name	Term ID	p _{adj}	-log ₁₀ (p _{adj})	
viral process	GO:0016032	4.577×10 ⁻⁷		
regulation of binding	GO:0051098	1.615×10 ⁻⁵		
regulation of molecular function	GO:0065009	5.026×10 ⁻⁵		
regulation of protein metabolic process	GO:0051246	3.197×10 ⁻⁴		
viral life cycle	GO:0019058	4.095×10 ⁻⁴		
biological process involved in symbiotic interaction	GO:0044403	4.358×10 ⁻⁴		
viral genome replication	GO:0019079	5.232×10 ⁻⁴		
regulation of apoptotic process	GO:0042981	2.447×10 ⁻³		
regulation of programmed cell death	GO:0043067	2.796×10 ⁻³		
organonitrogen compound metabolic process	GO:1901564	3.259×10 ⁻³		
regulation of catalytic activity	GO:0050790	3.760×10 ⁻³		
regulation of macromolecule metabolic process	GO:0060255	5.454×10 ⁻³		
regulation of cell death	GO:0010941	5.463×10 ⁻³		
modulation by host of symbiont process	GO:0051851	1.153×10 ⁻²		
positive regulation by host of viral genome replication	GO:0044829	1.165×10 ⁻²		
regulation of metabolic process	GO:0019222	1.248×10 ⁻²		
apoptotic process	GO:0006915	1.445×10 ⁻²		
protein metabolic process	GO:0019538	1.521×10 ⁻²		
phosphate-containing compound metabolic process	GO:0006796	1.581×10 ⁻²		
phosphorus metabolic process	GO:0006793	1.690×10 ⁻²		
cellular response to stress	GO:0033554	1.701×10 ⁻²		
programmed cell death	GO:0012501	1.743×10 ⁻²		
regulation of nitrogen compound metabolic process	GO:0051171	2.311×10 ⁻²		
regulation of localization	GO:0032879	2.881×10 ⁻²		
cell death	GO:0008219	2.991×10 ⁻²		
regulation of primary metabolic process	GO:0080090	3.008×10 ⁻²		
biological process involved in interaction with symbiont	GO:0051702	3.390×10 ⁻²		
regulation of DNA binding	GO:0051101	3.847×10 ⁻²		
chaperone-mediated autophagy	GO:0061684	3.876×10 ⁻²		
cellular response to endogenous stimulus	GO:0071495	4.564×10 ⁻²		

Şekil 3.4.3. 11 Merkezi gen/proteinin zengileşim analizleri



Şekil 3.4.4. Hücre tipi kombinasyonlarında ACTB'nin komşularındaki değişim: İkili kombinasyon ağlarında, belirtilen ilk hücre tipi kırmızı kenarlarla, ikinci hücre tipi yeşil kenarlarla temsil edilmiştir. Gri kenarlar, her iki hücre tipi ağda bulunan ortak kenarları temsil etmektedir. Düğüm renkleri, DyNet yeniden bağlanma Dn skoruna göre vurgulanmıştır ve koyu kırmızı tonu daha yüksek bir yeniden kablolama puanını belirtmektedir.

4. SONUÇ VE TARTIŞMA

Ankilozan Spondilit en çok rastlanan otoimmün hastalıklardan biri olmasına rağmen hastalığın tedavisi için kesin bir tedavi yöntemi henüz geliştirilmemiştir ve halihazırda mevcut tedavi yöntemleri semptomları azaltarak hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak için kullanılmaktadır (Zhu vd., 2019). Hastalık teşhisinde kullanılan ve yüksek yalancı pozitiflik içerdiğinden dolayı etkili bir biyobelirteç olmayan HLA-B27'ye alternatif biyobelirteçlerin bulunması tedavi geliştirme süreçleri için önemlidir. Heterojen hastalıkların immünolojik mekanizmasının araştırılmasında farklı hücre tiplerinin biyolojik süreçlerdeki rollerinin bilinmesi süreci kolaylaştırmakta ve etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini sağlamaktadır.

Bu çalışmada Ankilozan Spondilit PKMH scRNA-seq verileri Seurat paketi ile analiz edilmiş ve tespit edilen her hücre tipine spesifik genom ölçekli metabolik modeller GIMME algoritması kullanılarak oluşturulmuştur. GIMME algoritması gen aktivite seviyelerini göz önünde bulundurarak belirli bir hücre tipinde aktif olması muhtemel metabolik reaksiyonların alt kümesini tanımlamaktadır ve ayrıca hücresel metabolizmanın daha gerçekçi bir şekilde modellenmesi için gen inaktifliği kavramını da içererek aktif metabolik yolların daha doğru bir temsilini sağlamaktadır. Ayrıca , hızlı çalışan bir algortima olduğu ve amaç fonksiyonunu optimizasyonunu sağladığı için GIMME hücre tiplerine özgü genom ölçekli metabolik modeller üretmek ve hücre metabolizmasının simülasyonunu gerçekleştirmek için avantajlı bir yöntem olarak görülmüştür (Vlassis vd., 2014).

Oluşturulan metabolik modellerde AS'li hastalar ve sağlıklı kontrol grubu arasında diferansiyel olarak artan ve azalan akıllar tespit edilmiştir. scRNA-seq veri analizleri sonucu elde edilen İDG'ler ile raportör metabolit analizleri gerçekleştirilmiş ve ayrıca her hücre tipi için bağlama özgü protein-protein etkileşim ağları oluşturulmuştur. Böylece Ankilozan Spondilit hastalığı özelinde hücre metabolizmayı anlamak için genom ölçekli metabolik modeller scRNA-seq verilerine uygulanarak literatürde de henüz çok yeni olan hastalıkların biyolojik mekanizmalarının anlaşılması için önemli ipuçları sağlayabilme potansiyeli barındıran bir yöntem kullanılmıştır.

scRNA-seq veri analizlerinde kalite kontrol ve normalizasyon işlemleri her iki veri setinde de başarılı olmuş ve benzer hücreler kümelendirilmiştir. VS1'de UMAP sonucu 12 küme tespit edilmiş ancak İDG analizleri sonucu 2 ve 4 numaralı kümelerin her ikisinin de NK hücrelerini temsil ettiği görülmüş ve tek bir küme olarak kabul edilmiştir. UMAP görsellerinde 2 ve 4 numaralı kümelerin farklı yerlerde konumlanması UMAP ile çok boyutlu bir verinin iki boyuta indirilirken verilerde bozulmaya yol açmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir, bu durumu destekler nitelikte olan çalışmalar literatürde mevcuttur (Chari vd., 2021).

scRNA-seq veri analizleri sonucu her iki veri setinde de İDG sayısı 200'den fazla olan 4 hücre tipi tespit edilmiştir bunlar VS1 için CD14 Monocytes, CD4 Memory, CD8 T ve NK hücreleri iken VS2'de CD14 Monocytes, CD4 Memory, CD4 Naive ve CD8 TEM (memory t cells) hücreleridir. CD8 T hücreleri CD8 TEM hücrelerini de kapsadığı için İDG'si 200'den fazla olan hücre tiplerinden 3 tanesi her iki veri setinde de ortak olarak bulunmuştur.

CD14 Monocyte hücrelerinin AS başlangıcında yer aldığı ve hastalık patogenezinde önemli bir rol oynadığı literatürde bildirilmiştir (Martínez-Ramos vd., 2022). Ayrıca yine başka çalışmalarda CD14 Monocyte hücrelerinin AS hastalarının periferik kanında sağlıklı bireylere göre arttığı

bulunmuştur (Ciccio vd., 2018 ; Conrad vd., 2015). Sonuç olarak CD14 Monocytes hücrelerinin AS'deki enflamatuvar yanıtta yer aldığı ve AS patogenezinin katkıda bulunduğu kanısına varılmıştır. AS ve sağlıklı kontrol koşulları için CD14 Monocytes hücrelerine özgü oluşturulmuş genom ölçekli metabolik modeller ile belirlenen reaksiyonlarda her iki veri setinde de pürin ve pirimidin metabolizmasındaki akışların diferansiyel olarak arttığı gözlemlenmiştir (Tablo 3.2.3-Tablo 3.2.5). Pürinler, birçok temel biyokimyasal süreç için vücuttaki tüm hücreler tarafından kullanılan moleküllerdir (Jinnah vd., 2013). AS'li fareler üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada pürin metabolizmasının AS'li denekler üzerinde önemli ölçüde değiştiği ve pürin metabolizmasındaki metabolitlerin aşırı arttığı gözlemlenmiş ve bu durumun eklem ve kıkırdak doku hasarını ağırlaştırabileceği kanısına varılmıştır (Xu vd., 2021). CD14 Monocyte hücreleri AS'deki enflamatuvar yanıtta yer aldığından dolayı AS hastalarının CD14 Monocyte hücrelerinde pürin metabolizmasının sağlıklı kontrol grubuna kıyasla diferansiyel olarak artış göstermesi DNA, RNA sentezi ve enerji metabolizması için gerekli olan pürin nükleotidlerinin artan sentezini gösterebilir. Yani bu durum, AS'de enflamasyon veya immün aktivasyon ile ilişkili artan metabolik taleplere bir yanıt olabilir.

CD14 Monocyte hücrelerinde AS'li hastalar ve kontrol grubu arasında TCA döngüsü metabolizmasındaki akışın diferansiyel olarak azaldığı görülmüştür. Bu durum, CD14 Monocyte hücrelerinde metabolik aktivite ve enerji üretim yollarında değişiklikler olabileceğini destekler niteliktedir çünkü TCA döngüsü, enerji üretimi ve çeşitli hücresel süreçlerde yer alan önemli bir metabolik yoldur. AS'nin bilinen en karakteristik özelliklerinden biri olan kronik enflamasyon hücresel metabolizmayı büyük ölçüde etkileyebilmektedir. Genel olarak enflamatuvar durumlar anaerobik metabolizmaya ve glikolize neden olabilmektedir ve bu durum TCA döngüsünün

aktivitesinin azalmasına yol açabilir (Soto-Herederro vd., 2020). CD14 Monocytes hücrelerinde TCA döngü metabolizmasındaki akışın aşağı regülasyonu enflamatuvar durumlardaki değişikliklere yanıt olarak değişen metabolik yolların bir sonucu ya da hücresel enerji gereksinimlerindeki değişikliklere adaptif bir yanıt olabilir. Ayrıca yine aynı şekilde hücresel metabolizmada önemli rolleri olan ve çeşitli metabolik yollarla hücreler tarafından metabolize edilebilen bir yağ asidi olan propanoat'ın kullanımı, sentezi ve parçalanması gibi biyolojik süreçleri kapsayan propanoat metabolizmasındaki akış AS hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla diferansiyel olarak aşağı düzenlenmiştir. Propanoat ilk olarak bağırsakta mikrobiyal fermantasyonla bağırsak mikrobiyotasının metabolik aktivitelerinin yan ürünü olarak üretilmektedir. AS hastalarının bağırsak mikrobiyota bileşimi ve işlevindeki değişiklikler göz önünde bulundurulduğunda AS hastalarının bağırsak mikrobiyotasındaki propanoat gibi kısa zincirli yağ asitlerinin üretimi ve kullanılabilirliği etkilenebilir ve AS hastalarında bağırsak mikrobiyotasındaki değişiklikler, propanoatın mevcudiyetinin azalmasına neden olabilir (Asquith vd., 2019 ; Wen vd., 2017). Ayrıca, CD4 Memory, CD4 Naive ve CD8 T hücreleri AS'li hastalarda sağlıklı bireylere göre daha az apoptoza uğradığı için AS'li bireylerde prevalansı daha yüksektir (Duftner vd., 2003). Literatürde yer alan bir çalışmada AS'li hastaların sinoviyal sıvısında, periferik kanında ve bağırsaklarında yerleşik bellek T hücrelerinin sağlıklı bireylere göre fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bu hücrelerin çoğu periferik kana ve iltihaplı eklemlere devridaim yapmaktadır (Samat vd., 2021; Lejon vd., 2022). Özellikle antijenlere maruz kaldığında immünolojik hafıza geliştirebilen T lenfositlerin bir alt kümesi olan CD4 Memory hücreleri diğer bağışıklık hücreleri ile beraber AS'de gözlenen enflamatuvar süreçlerde yer alır ve AS'de görülen kronik enflamasyona ve doku hasarına katkıda bulunan TNF-alfa, IL-17 ve IL-23 gibi proinflamatuvar sitokinleri salgırlar. Bu nedenle TNF- α inhibitör tedavisi, AS'de CD4+ T hücrelerinin ve negatif düzenleyici hücrelerin immün

dengelessizliğini iyileştirebilir (Yang vd., 2020). Bu hücre tipleri için oluşturduğumuz metabolik modeller ile belirlenen metabolik yollara bakıldığında CD14 Monocytes hücrelerinde olduğu gibi CD4 Memory, CD4 Naive ve CD8 T hücrelerinde de AS'li hastalarda pürin metabolizması, doymamış yağ asitlerinin biyosentezi ve glikoliz üzerindeki akışların sağlıklı bireylere göre diferansiyel olarak arttığı gözlemlenmiştir. Ek olarak, doymamış bir yağ asidi olan araşidonik asit sentezi yolağındaki akışların AS'li hastaların CD4 Naive ve CD8 Tem hücrelerinde yukarı düzenlendiği görülmüştür. Literatürdeki bazı çalışmalarda AS'li bireylerdeki araşidonik asit metabolizmasındaki farklılıkların, hastalıkla ilişkili enflamatuvar süreçlere ve hastalık patogeneğine katkıda bulunabileceği bildirmiştir (Sundström vd., 2011 ; Sundström vd., 2012; Ou vd., 2021). Çalışmaların birinde AS'li hastaların plazma fosfolipitlerindeki araşidonik asit seviyeleri ile hastalık aktivitesini ölçen BASDAI indeksindeki artışın arasında pozitif bir korelasyon olduğunu bulunmuştur (Sundström vd., 2012). Bu nedenle araşidonik asit metabolizmasındaki değişikliklerin AS patogeneğine katkı sağlayabileceği göz önünde bulundurulursa, yolda yer alan spesifik enzimleri veya reseptörleri hedeflemek terapötik bir yaklaşım olabilecek potansiyeldedir.

Ek olarak, hücre tiplerinin İDG'leri ile rapörtör metabolit analizi gerçekleştirdiğimizde genel olarak her hücre tipinde aminoasitler, su, proton ve oksijen gibi metabolitler rapörtör metabolit olarak tespit edilmiştir. Bu metabolitler birçok sayıda reaksiyona dahil olan yaygın metabolitler olmasından kaynaklı ön plana çıkmış olabilir. Ayrıca proteinlerin rapörtör metabolit olarak tespit edilmesi inflamatuvar süreçlerde protein katabolizmasından dolayı ve bağışıklık hücrelerinin bölgede bulunan proteinlere zarar vermesinden kaynaklanabilir. Bu nedenle, proteinlerin parçalanması ve amino asitlerin serbest bırakılması artabilir. Rapörtör metabolit analizlerinde amino asitlerin sık görülmesi, bu protein katabolizmasının bir göstergesi olabilmektedir.

Ayrıca su, proton ve oksijen gibi metabolitlerin neredeyse her hücre tipinde sık görülmesi, iltihabik durumlarda hücrelerin aktivasyonun ve metabolik reaksiyonların artmasından dolayı olabilir çünkü bu artışlar, enerji üretimi ve metabolik yolların hızlanması anlamına gelmektedir. Su, protonlar ve oksijen gibi metabolitler bu metabolik reaksiyonlar için gerekli olan temel bileşenlerdir ve raportör metabolit analizlerinde sık görülmesi beklenen bir durumdur (Tablo 3.3.1 & Tablo 3.3.2).

scRNA-seq veri analizleri ve hücre tiplerine özgü metabolik modellerin oluşturulması dışında her hücre tipi için protein-protein etkileşim ağları oluşturularak farklı hücre tiplerinde topolojik değişiklikler incelenmiş ve hücre tipleri arasında topolojisi önemli ölçüde değişerek yeniden bağlanmış merkezi genler/proteinler bulunmuştur. Tez çalışmasına ilk olarak bu adımla başlandığı için bu süreç ham veriler analiz edilmeden önce Alber ve arkadaşları (2022) tarafından yapılan çalışmanın (VS2) sonuçları yazarlardan talep edilerek hücre tiplerinin İDG listelerinin tarafımıza iletilmesiyle gerçekleştirilmiştir. İletilen veride yedi farklı hücre tipinin hepsinde diferansiyel olarak ifade edilmiş 57 ortak İDG gen belirlenmiştir. Yedi hücre tipinin ikili kombinasyonları için DyNet ile PPE ağları oluşturulmuş ve her bir hücre tipi çifti için DyNet Rewiring Score'a (Dn-Skor) göre en farklı topolojik rollere sahip topolojik rolü en çok değişen ilk on merkezi gen/protein belirlenerek kümülatif olarak 86 merkezi gen/protein bulunmuştur. En az sekiz hücre tipi çiftinde görülen 11 yeniden bağlanmış merkezi gen/proteinin zenginleşim analizlerine bakıldığında bu merkezi genlerin/proteinlerin protein lokalizasyonu ve bağlanma ile ilgili olduğu görülmüştür (Şekil 3.4.2).

Hücre bütünlüğü ve hücreler arası sinyalleşmeden sorumlu Aktin proteinlerini kodlayan ACTB, 20 kombinasyonda önemli ölçüde yeniden düzenlenen ve AS hastalarında tüm hücre tipleri için yukarı regüle edildiği gözlemlenen en tutarlı merkez gen/protein olarak bulunmuştur. ACTB'nin topolojik rolüne bakıldığında sadece CD4 hücre tipleri arasında ve NK ve CD14 mono hücreleri arasında önemli ölçüde değişmediği görülmektedir, ayrıca ACTB'nin etkileşen çiftleri, AS hastalarında CD8+ T hücreleri ve NK hücrelerine kıyasla CD4+ T hücrelerinde daha farklı şekilde ifade edilmiştir (Şekil 3.4.3).

Belirlenen 11 merkezi gen/protein arasında yer alan PSMB8 ve HSPA8'in AS ile ilişkili olduğu bilgisi literatürde yer almaktadır. Literatürdeki bir çalışmada proteazom ilişkili PSMB8 mutasyonlarının otoinflamatuvar hastalıklara neden olduğu ve bu hastalıklardan birinin de AS olduğu belirtilmiştir (Chen vd., 2021; Yu vd., 2022).

Bir diğer merkezi gen olarak bulunan HSPA8 geninin HLAB27 negatif deneklere kıyasla HLA-B27 pozitif AS hastalarında aşırı ifade edildiği literatürde yer almaktadır (Amborus vd., 2018). Yakın tarihli bir proteomik çalışmada ise HSPA8'in AS hastalarında yüksek oranda ifade edilen bir protein olduğu bildirilmiştir (Yu vd., 2022).

Merkezi genlerden biri olan HMGB1'e bakıldığında ise DNA onarımı, gen transkripsiyonu ve iltihaplanma dahil olmak üzere çeşitli hücresel işlevlerde yer aldığı görülmektedir. Bazı çalışmalar, HMGB1'in AS ile ilişkili inflamatuvar yanıtta rol oynayabileceğini göstermiştir. Özellikle AS hastalarının serumunda ve sinovyal sıvısında HMGB1'in yukarı regüle edildiği ve etkilenen eklemlerde inflamatuvar yanıt ve doku hasarına katkıda bulunabileceği bulunmuştur (Wang vd., 2016; Dong vd., 2022). Bu nedenle, AS hastalarında daha yüksek serum seviyesi nedeniyle HMGB1 bir biyobelirteç olarak kullanılabilecek potansiyele sahip olabilir.

Sonuç olarak bu çalışmada henüz yeni bir teknik olan ve sadece son birkaç yılda çalışılmış olan scRNA-seq tekniği kullanılarak literatürde çok az sayıda çalışmada yer alan Ankilozan Spondilit özelinde scRNA-seq veri analizi gerçekleştirilmiş ve tespit edilen her hücre tipi için genom ölçekli metabolik modeller oluşturularak ve ayrıca protein etkileşim ağları üzerinden bütünleşik analizler gerçekleştirilerek AS hastalığının biyolojik mekanizmasını araştırılmış ve tedavi geliştirme süreçleri için alternatif hedefler belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmayla otoimmün hastalıklar ve kanser gibi karmaşık biyolojik süreçler için yeni biyobelirteçler bulmaya yönelik bir yaklaşım önerilmiştir.

KAYNAKÇA

Akkoç, N. (2010). Türkiye’de romatizmal hastalıkların epidemiyolojisi ve diğer ülkelerle karşılaştırılması *RAED dergisi*, 2, 1-8

Alber, S., Kumar, S., Liu, J., Huang, Z. M., Paez, D., Hong, J., ... & Liao, W. (2022). Single Cell Transcriptome and Surface Epitope Analysis of Ankylosing Spondylitis Facilitates Disease Classification by Machine Learning. *Frontiers in immunology*, 13.

AlEjlat, R., Khaleel, A., & Tarkhan, A. H. (2021). Differential gene expression analysis of ankylosing spondylitis shows deregulation of the HLA-DRB, HLA-DQB, ITM2A, and CTLA4 genes. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 22(1), 42

Alonso-López, D., Campos-Laborie, F. J., Gutiérrez, M. A., Lambourne, L., Calderwood, M. A., Vidal, M., & De Las Rivas, J. (2019). APID database: redefining protein–protein interaction experimental evidences and binary interactomes. *Database*, 2019

Ambarus, C. A., Yeremenko, N., & Baeten, D. L. (2018). Altered cytokine expression by macrophages from HLA-B27-positive spondyloarthritis patients without evidence of endoplasmic reticulum stress. *Rheumatology advances in practice*, 2(1), rky014.

Amezquita, R. A., Lun, A. T., Becht, E., Carey, V. J., Carpp, L. N., Geistlinger, L., ... & Hicks, S. C. (2020). Orchestrating single-cell analysis with Bioconductor. *Nature methods*, 17(2), 137-145.

Andrews, T. S., Kiselev, V. Y., McCarthy, D., & Hemberg, M. (2021). Tutorial: guidelines for the computational analysis of single-cell RNA sequencing data. *Nature protocols*, 16(1), 1-9.

Asquith, M., Sternes, P. R., Costello, M. E., Karstens, L., Diamond, S., Martin, T. M., ... & Brown, M. A. (2019). HLA alleles associated with risk of ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis influence the gut microbiome. *Arthritis & rheumatology*, 71(10), 1642-1650.

Aydın, H. N., Karabekmez M.E. (2023). Metabolik Reaksiyon Seti Zenginleştirme Analiz Aracı. [Manuscript in Preparation].

Barabasi, A. L., & Oltvai, Z. N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature reviews genetics*, 5(2), 101-113.

Barrett, T., Wilhite, S. E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I. F., Tomashevsky, M., ... & Soboleva, A. (2012). NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic acids research*, 41(D1), D991-D995

Becht, E., McInnes, L., Healy, J., Dutertre, C. A., Kwok, I. W., Ng, L. G., ... & Newell, E. W. (2019). Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nature biotechnology*, 37(1), 38-44.

Becker, S. A., & Palsson, B. O. (2008). Context-specific metabolic networks are consistent with experiments. *PLoS computational biology*, 4(5), e1000082.

Berlinberg, A. J., Regner, E. H., Stahly, A., Brar, A., Reisz, J. A., Gerich, M. E., ... & Kuhn, K. A. (2021). Multi ‘Omics analysis of intestinal tissue in ankylosing spondylitis identifies alterations in the tryptophan metabolism pathway. *Frontiers in immunology*, 12, 587119.

Bernstein, D. B., Sulheim, S., Almaas, E., & Segrè, D. (2021). Addressing uncertainty in genome-scale metabolic model reconstruction and analysis. *Genome Biology*, 22, 1-22.

Blazier, A. S., & Papin, J. A. (2012). Integration of expression data in genome-scale metabolic network reconstructions. *Frontiers in physiology*, 3, 299.

Bondar, G., Cadeiras, M., Wisniewski, N., Maque, J., Chittoor, J., Chang, E., ... & Deng, M. (2014). Comparison of whole blood and peripheral blood mononuclear cell gene expression for evaluation of the perioperative inflammatory response in patients with advanced heart failure. *PloS one*, 9(12), e115097.

Braun, J., & Sieper, J. (2007). Ankylosing spondylitis. *The Lancet*, 369(9570), 1379-1390.

Brunk, E., Sahoo, S., Zielinski, D. C., Altunkaya, A., Dräger, A., Mih, N., ... & Palsson, B. O. (2018). Recon3D enables a three-dimensional view of gene variation in human metabolism. *Nature biotechnology*, 36(3), 272-281

Calin, A., Garrett, S., Whitelock, H., Kennedy, L. G., O'hea, J., Mallorie, P., & Jenkinson, T. (1994). A new approach to defining functional ability in ankylosing spondylitis: the development of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index. *J rheumatol*, 21(12), 2281-2285.

Cha, J., & Lee, I. (2020). Single-cell network biology for resolving cellular heterogeneity in human diseases. *Experimental & molecular medicine*, 52(11), 1798-1808

Chatzikyriakidou, A., Voulgari, P. V., & Drosos, A. A. (2011). What is the role of HLA-B27 in spondyloarthropathies?. *Autoimmunity reviews*, 10(8), 464-468.

Chari, T., Banerjee, J., & Pachter, L. (2021). The specious art of single-cell genomics. *BioRxiv*, 2021-08.

Chen, D., Jin, C., Dong, X., Wen, J., Xia, E., Wang, Q., & Wang, O. (2021). Pan-cancer analysis of the prognostic and immunological role of PSMB8. *Scientific reports*, 11(1), 1-19.

Cheng, K., Martin-Sancho, L., Pal, L. R., Pu, Y., Riva, L., Yin, X., ... & Ruppin, E. (2021). Genome-scale metabolic modeling reveals SARS-CoV-2-induced metabolic changes and antiviral targets. *Molecular systems biology*, 17(11), e10260.

Ciccia, F., Guggino, G., Zeng, M., Thomas, R., Ranganathan, V., Rahman, A., ... & Haroon, N. (2018). Proinflammatory CX3CR1⁺ CD59⁺ tumor necrosis factor-like molecule 1A⁺ interleukin-23⁺ monocytes are expanded in patients with ankylosing spondylitis and modulate innate lymphoid cell 3 immune functions. *Arthritis & Rheumatology*, 70(12), 2003-2013.

Clark, S. (n.d.). Single Cell RNA-seq: An introductory overview and tools for getting started. 10x Genomics. <https://www.10xgenomics.com/blog/single-cell-rna-seq-an-introductory-overview-and-tools-for-getting-started>

Conrad, K., Wu, P., Sieper, J., & Syrbe, U. (2015). In vivo pre-activation of monocytes in patients with axial spondyloarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 17(1), 1-12

Covert, M. W., & Palsson, B. Ø. (2002). Transcriptional Regulation in Constraints-based Metabolic Models of Escherichia coli* 210. *Journal of Biological Chemistry*, 277(31), 28058-28064.

Çakır, T. (2015). Reporter pathway analysis from transcriptome data: metabolite-centric versus reaction-centric approach. *Scientific Reports*, 5(1), 1-10.

Damiani, C., Di Filippo, M., Pescini, D., Maspero, D., Colombo, R., & Mauri, G. (2017). popFBA: tackling intratumour heterogeneity with Flux Balance Analysis. *Bioinformatics*, 33(14), i311-i318.

Damiani, C., Maspero, D., Di Filippo, M., Colombo, R., Pescini, D., Graudenzi, A., ... & Mauri, G. (2019). Integration of single-cell RNA-seq data into population models to characterize cancer metabolism. *PLoS computational biology*, 15(2), e1006733.

Dean, L. E., Jones, G. T., MacDonald, A. G., Downham, C., Sturrock, R. D., & Macfarlane, G. J. (2014). Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatology*, 53(4), 650-657.

Dong, Y., Ming, B., & Dong, L. (2022). The Role of HMGB1 in Rheumatic Diseases. *Frontiers in Immunology*, 13

Dougherty, B. V., Rawls, K. D., Kolling, G. L., Vinnakota, K. C., Wallqvist, A., & Papin, J. A. (2021). Identifying functional metabolic shifts in heart failure with the integration of omics data and a heart-specific, genome-scale model. *Cell Reports*, 34(10), 108836.

Duftner, C., Goldberger, C., Falkenbach, A., Würzner, R., Falkensammer, B., Pfeiffer, K. P., ... & Schirmer, M. (2003). Prevalence, clinical relevance and characterization of circulating cytotoxic CD4⁺ CD28-T cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther*, 5(5), 1-9.

Forero, I. M., Ibarrola, A. S., & Díaz, P. V. (2007). Treatment of autoimmune diseases: A systems biology approach. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 4(1), 57-62.

Goenawan, I. H., Bryan, K., & Lynn, D. J. (2016). DyNet: visualization and analysis of dynamic molecular interaction networks. *Bioinformatics*, 32(17), 2713-2715

Gustafsson, J., Anton, M., Roshanzamir, F., Jörnsten, R., Kerkhoven, E. J., Robinson, J. L., & Nielsen, J. (2023). Generation and analysis of context-specific genome-scale metabolic models derived from single-cell RNA-Seq data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(6), e2217868120.

Gu, C., Kim, G. B., Kim, W. J., Kim, H. U., & Lee, S. Y. (2019). Current status and applications of genome-scale metabolic models. *Genome biology*, 20(1), 1-18.

Gulfidan, G., Turanli, B., Beklen, H., Sinha, R., & Arga, K. Y. (2020). Pan-cancer mapping of differential protein-protein interactions. *Scientific reports*, 10(1), 3272.

Gursoy, A., Keskin, O., & Nussinov, R. (2008). Topological properties of protein interaction networks from a structural perspective. *Biochemical Society Transactions*, 36(6), 1398-1403.

Hao, Y., Hao, S., Andersen-Nissen, E., Mauck, W. M., Zheng, S., Butler, A., ... & Satija, R. (2021). Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell*, 184(13), 3573-3587.

Heirendt, L., Arreckx, S., Pfau, T., Mendoza, S. N., Richelle, A., Heinken, A., ... & Fleming, R. M. (2019). Creation and analysis of biochemical constraint-based models using the COBRA Toolbox v. 3.0. *Nature protocols*, 14(3), 639-702.

Hie, B., Bryson, B., & Berger, B. (2019). Efficient integration of heterogeneous single-cell transcriptomes using Scanorama. *Nature biotechnology*, 37(6), 685-691.

Hie, B., Bryson, B., & Berger, B. (2019). Efficient integration of heterogeneous single-cell transcriptomes using Scanorama. *Nature biotechnology*, 37(6), 685-691.

Hodson, R. (2021). Autoimmune disease. *Nature*, 595(7867), S45-S45.

Hwang, B., Lee, J. H., & Bang, D. (2018). Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Experimental & molecular medicine*, 50(8), 1-14.

Hwang, M. C., Ridley, L., & Reveille, J. D. (2021). Ankylosing spondylitis risk factors: a systematic literature review. *Clinical rheumatology*, 40, 3079-3093.

Jinnah, H. A., & Van Den Berghe, G. (2013). Metabolic disorders of purine metabolism affecting the nervous system. In *Handbook of clinical neurology* (Vol. 113, pp. 1827-1836). Elsevier.

Jovic, D., Liang, X., Zeng, H., Lin, L., Xu, F., & Luo, Y. (2022). Single-cell RNA sequencing technologies and applications: A brief overview. *Clinical and Translational Medicine*, 12(3), e694.

Kasap, H., Pazarcı, P., & Erkoç, M. A. (2010). Sistem Biyolojisi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 19(1), 25-35.

Kavadichanda, C. G., Geng, J., Bulusu, S. N., Negi, V. S., & Raghavan, M. (2021). Spondyloarthritis and the human leukocyte antigen (HLA)-B* 27 connection. *Frontiers in immunology*, 12, 601518.

Kim, H. Y., Kim, H. R., & Lee, S. H. (2014). Advances in systems biology approaches for autoimmune diseases. *Immune network*, 14(2), 73-80.

Kim, J., Xu, Z., & Marignani, P. A. (2021). Single-cell RNA sequencing for the identification of early-stage lung cancer biomarkers from circulating blood. *NPJ genomic medicine*, 6(1), 1-15.

Korsunsky, I., Millard, N., Fan, J., Slowikowski, K., Zhang, F., Wei, K., ... & Raychaudhuri, S. (2019). Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony. *Nature methods*, 16(12), 1289-1296.

Kulkarni, A., Anderson, A. G., Merullo, D. P., & Konopka, G. (2019). Beyond bulk: a review of single cell transcriptomics methodologies and applications. *Current opinion in biotechnology*, 58, 129-136.

Lee, J. W., Su, Y., Baloni, P., Chen, D., Pavlovitch-Bedzyk, A. J., Yuan, D., ... & Heath, J. R. (2022). Integrated analysis of plasma and single immune cells uncovers metabolic changes in individuals with COVID-19. *Nature biotechnology*, 40(1), 110-120.

Lefferts, A. R., Regner, E. H., Stahly, A., O'Rourke, B., Gerich, M. E., Fennimore, B. P., ... & Kuhn, K. A. (2021). Circulating mature granzyme B⁺ T cells distinguish Crohn's disease-associated axial spondyloarthritis from axial spondyloarthritis and Crohn's disease. *Arthritis research & therapy*, 23(1), 1-12

Lejon, K., Hellman, U., Kumar, A., & Forsblad-d'Elia, H. (2023). Decreased levels of T follicular helper (CD4⁺ CXCR5⁺) cells and CD27⁺ CD38⁺ and CD27⁺ CD38⁻ B cells in ankylosing spondylitis patients correlate with markers of inflammation. *Scandinavian Journal of Immunology*, 97(1), e13235.

Li, M., Zhou, X., Zhou, L., Yu, Z., Fu, L., & Yang, P. (2020). Meta-analysis of changes in the number and proportion of regulatory T cells in patients with ankylosing spondylitis. *BioMed Research International*, 2020.

Li, Z., & Brown, M. A. (2017). Progress of genome-wide association studies of ankylosing spondylitis. *Clinical & translational immunology*, 6(12), e163.

Liu, J., Gao, C., Sodico, J., Kozareva, V., Macosko, E. Z., & Welch, J. D. (2020). Jointly defining cell types from multiple single-cell datasets using LIGER. *Nature protocols*, 15(11), 3632-3662.

Martínez-Ramos, S., Rafael-Vidal, C., Pego-Reigosa, J. M., & García, S. (2022). Monocytes and macrophages in spondyloarthritis: Functional roles and effects of current therapies. *Cells*, 11(3), 515.

McCarthy, D. J., Campbell, K. R., Lun, A. T., & Wills, Q. F. (2017). Scater: pre-processing, quality control, normalization and visualization of single-cell RNA-seq data in R. *Bioinformatics*, 33(8), 1179-1186.

McMichael, A., & Bowness, P. (2002). HLA-B27: natural function and pathogenic role in spondyloarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 4, 1-6.

Nicholson, L. B. (2016). The immune system. *Essays in biochemistry*, 60(3), 275-301.

Ou, J., Xiao, M., Huang, Y., Tu, L., Chen, Z., Cao, S., ... & Gu, J. (2021). Serum metabolomics signatures associated with ankylosing spondylitis and TNF inhibitor therapy. *Frontiers in Immunology*, 12, 630791.

Passi, A., Tibocha-Bonilla, J. D., Kumar, M., Tec-Campos, D., Zengler, K., & Zuniga, C. (2022). Genome-scale metabolic modeling enables in-depth understanding of big data. *Metabolites*, 12(1), 14.

Pimentel-Santos, F. M., Ligeiro, D., Matos, M., Mourão, A. F., Costa, J., Santos, H., ... & Thomas, G. P. (2011). Whole blood transcriptional profiling in ankylosing spondylitis identifies novel

candidate genes that might contribute to the inflammatory and tissue-destructive disease aspects. *Arthritis research & therapy*, 13(2), 1-8.

Pourahmad, J., & Salimi, A. (2015). Isolated human peripheral blood mononuclear cell (PBMC), a cost effective tool for predicting immunosuppressive effects of drugs and xenobiotics. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 14(4), 979.

Reveille, J. D., Sims, A. M., Danoy, P., Evans, D. M., Leo, P., Pointon, J. J., ... & Brown, M. A. (2010). Australo-Anglo-American Spondyloarthritis Consortium (TASC). Genome-wide association study of ankylosing spondylitis identifies non-MHC susceptibility loci. *Nat Genet*, 42(2), 123-127.

Raudvere, U., Kolberg, L., Kuzmin, I., Arak, T., Adler, P., Peterson, H., & Vilo, J. (2019). g: Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic acids research*, 47(W1), W191-W198.

Samat, A. A. K., van der Geest, J., Vastert, S. J., van Loosdregt, J., & van Wijk, F. (2021). Tissue-Resident Memory T Cells in Chronic Inflammation—Local Cells with Systemic Effects?. *Cells*, 10(2), 409.

Satija, R., Farrell, J. A., Gennert, D., Schier, A. F., & Regev, A. (2015). Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nature biotechnology*, 33(5), 495-502.

Seggewiß, J., Becker, K., Kotte, O., Eisenacher, M., Yazdi, M. R. K., Fischer, A., ... & von Eiff, C. (2006). Reporter metabolite analysis of transcriptional profiles of a *Staphylococcus aureus* strain with normal phenotype and its isogenic *hemB* mutant displaying the small-colony-variant phenotype. *Journal of bacteriology*, 188(22), 7765-7777.

Sevimoğlu, T. (2019). Transkriptom Verisi ve Omik Araçları Kullanılarak Otoimmün Hastalıklar ile İnsan Bağırsak Mikrobiyotası Arasındaki İlişkinin Analizi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 23(1), 20-29.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., ... & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13(11), 2498-2504.

Silverbush, D., & Sharan, R. (2019). A systematic approach to orient the human protein–protein interaction network. *Nature communications*, 10(1), 1-9.

Sompayrac, L. M. (2022). *How the immune system works*. John Wiley & Sons.

Soto-Herederó, G., Gomez de las Heras, M. M., Gabandé-Rodríguez, E., Oller, J., & Mittelbrunn, M. (2020). Glycolysis—a key player in the inflammatory response. *The FEBS journal*, 287(16), 3350-3369.

Stuart, T., Butler, A., Hoffman, P., Hafemeister, C., Papalexi, E., Mauck, W. M., ... & Satija, R. (2019). Comprehensive integration of single-cell data. *Cell*, 177(7), 1888-1902.

Stubbington, M. J., Rozenblatt-Rosen, O., Regev, A., & Teichmann, S. A. (2017). Single-cell transcriptomics to explore the immune system in health and disease. *Science*, 358(6359), 58-63.

Sundström, B., Wållberg-Jonsson, S., & Johansson, G. (2011). Diet, disease activity, and gastrointestinal symptoms in patients with ankylosing spondylitis. *Clinical rheumatology*, 30, 71-76.

Sundström, B., Johansson, G., Kokkonen, H., Cederholm, T., & Wållberg-Jonsson, S. (2012). Plasma phospholipid fatty acid content is related to disease activity in ankylosing spondylitis. *The Journal of Rheumatology*, 39(2), 327-333.

Svensson, V., Vento-Tormo, R., & Teichmann, S. A. (2018). Exponential scaling of single-cell RNA-seq in the past decade. *Nature protocols*, 13(4), 599-604.

Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., ... & Surani, M. A. (2009). mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nature methods*, 6(5), 377-382.

Trapnell, C., Cacchiarelli, D., Grimsby, J., Pokharel, P., Li, S., Morse, M., ... & Rinn, J. L. (2014). The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nature biotechnology*, 32(4), 381-386.

Van der Linden, S. M., Valkenburg, H. A., De Jongh, B. M., & Cats, A. (1984). The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. A comparison of relatives of spondylitis patients with the general population. *Arthritis and rheumatism*, 27(3), 241-249.

Van der Maaten, L., & Hinton, G. (2008). Visualizing data using t-SNE. *Journal of machine learning research*, 9(11).

Vanaki, N., Golmohammadi, T., Jamshidi, A., Akhtari, M., Vojdanian, M., Mostafaei, S., ... & Mahmoudi, M. (2018). Increased inflammatory responsiveness of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to in vitro NOD2 ligand stimulation in patients with ankylosing spondylitis. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 40(5), 393-400.

Wang, X., Lin, Z., Wei, Q., Jiang, Y., & Gu, J. (2009). Expression of IL-23 and IL-17 and effect of IL-23 on IL-17 production in ankylosing spondylitis. *Rheumatology international*, 29, 1343-1347.

Wang, C., Miao, Y., Wu, X., Huang, Y., Sun, M., Zhu, Y., ... & Dong, L. (2016). Serum HMGB1 serves as a novel laboratory indicator reflecting disease activity and treatment response in ankylosing spondylitis patients. *Journal of immunology research*, 2016

Wen, C., Zheng, Z., Shao, T., Liu, L., Xie, Z., Le Chatelier, E., ... & Ehrlich, S. D. (2017). Quantitative metagenomics reveals unique gut microbiome biomarkers in ankylosing spondylitis. *Genome biology*, 18, 1-13.

Wolf, F. A., Angerer, P., & Theis, F. J. (2018). SCANPY: large-scale single-cell gene expression data analysis. *Genome biology*, 19, 1-5.

Xu, X., Shi, Y. N., Wang, R. Y., Ding, C. Y., Zhou, X., Zhang, Y. F., ... & Sun, Q. H. (2021). Metabolomic analysis of biochemical changes in the tissue and urine of proteoglycan-induced spondylitis in mice after treatment with moxibustion. *Integrative Medicine Research*, 10(1), 100428.

Yasemin, ACAR., Gerçek, CAN., & İLÇİN, N. (2019). Ankilozan Spondilit Hastalarında Hastalığa Özgü İndeksler, Yorgunluk ve Yaşam Kalitesi Arasındaki İlişkinin İncelenmesi. *İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 4(1), 19-23.

Yang, M., Lv, Q., Wei, Q., Jiang, Y., Qi, J., Xiao, M., ... & Gu, J. (2020). TNF- α inhibitor therapy can improve the immune imbalance of CD4⁺ T cells and negative regulatory cells but not CD8⁺ T cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis Research & Therapy*, 22, 1-11.

Yeger-Lotem, E., & Sharan, R. (2015). Human protein interaction networks across tissues and diseases. *Frontiers in genetics*, 6, 257.

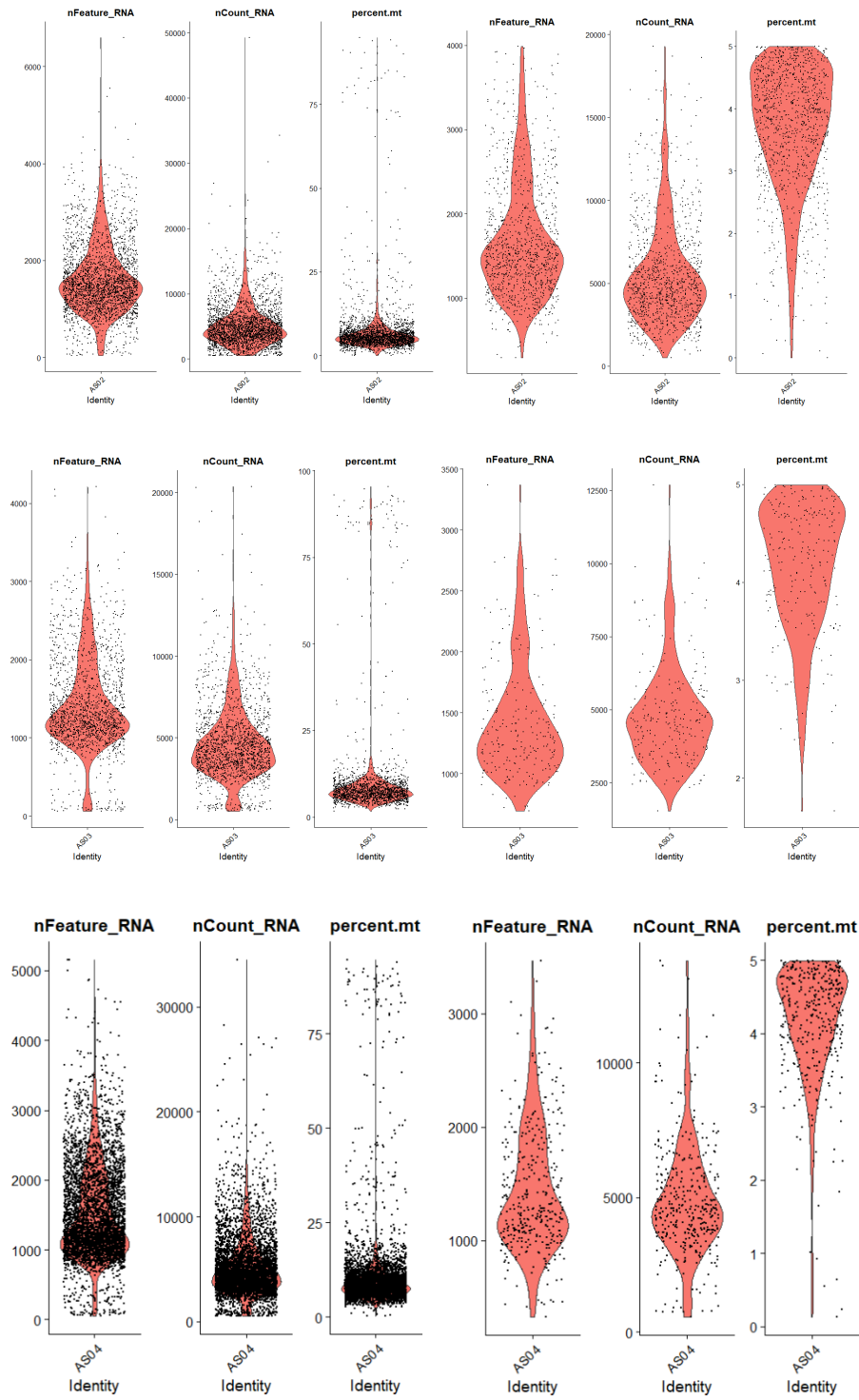
Yu, Z., Hong, X., Zhang, X., Zheng, F., Liu, F., Xu, H., ... & Dai, Y. (2022). Global Proteomic Analyses Reveals Abnormal Immune Regulation in Patients With New Onset Ankylosing Spondylitis. *Frontiers in Immunology*, 1078.

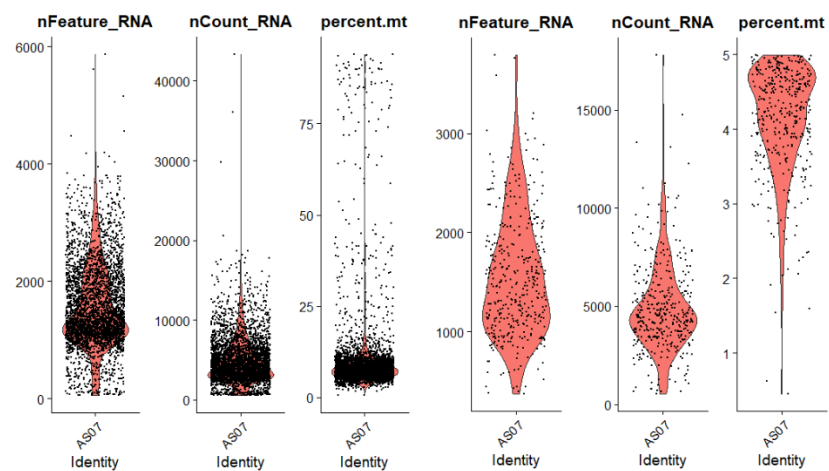
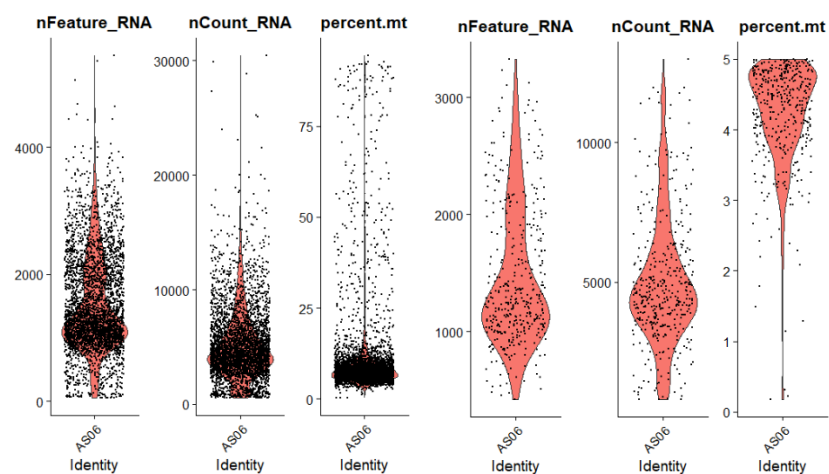
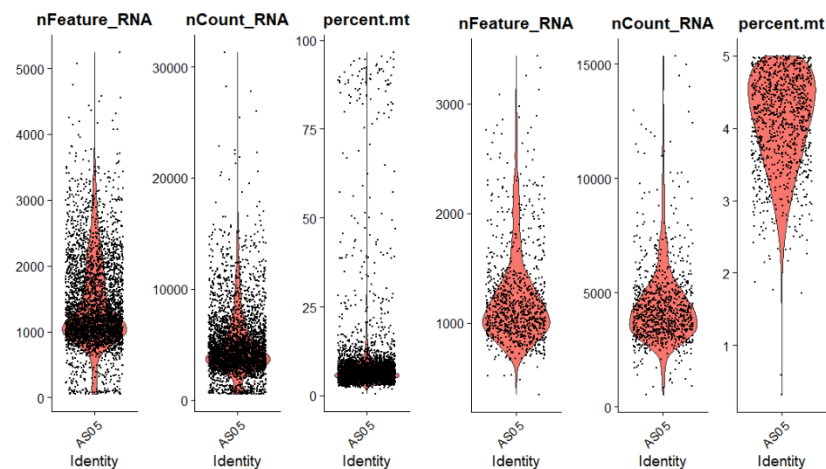
Zhao, Q., Zhang, T., & Yang, H. (2022). ScRNA-seq identified the metabolic reprogramming of human colonic immune cells in different locations and disease states. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 604, 96-103.

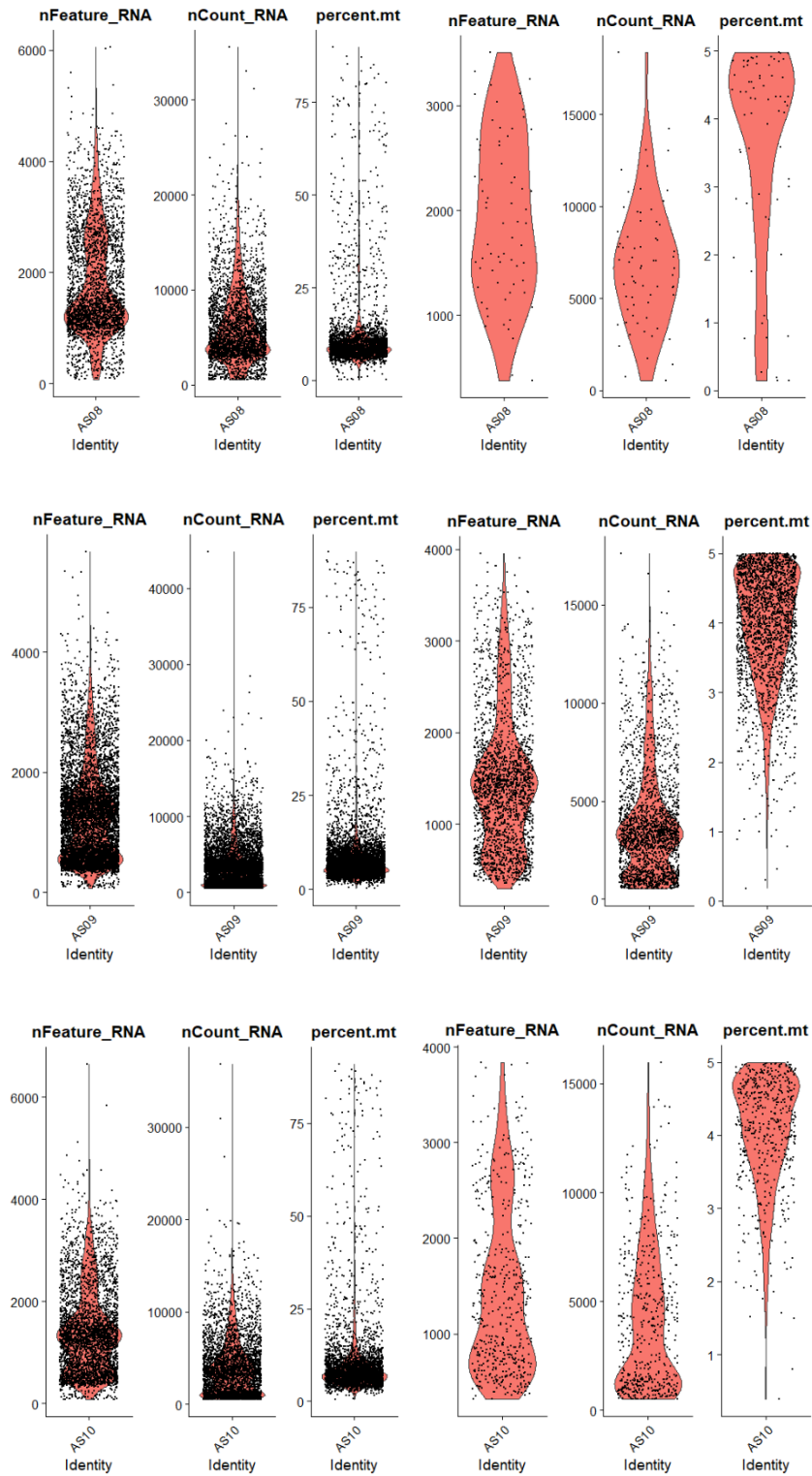
Zheng, Y., Cai, B., Ren, C., Xu, H., Du, W., Wu, Y., ... & Quan, R. (2021). Identification of immune related cells and crucial genes in the peripheral blood of ankylosing spondylitis by integrated bioinformatics analysis. *PeerJ*, 9, e12125.

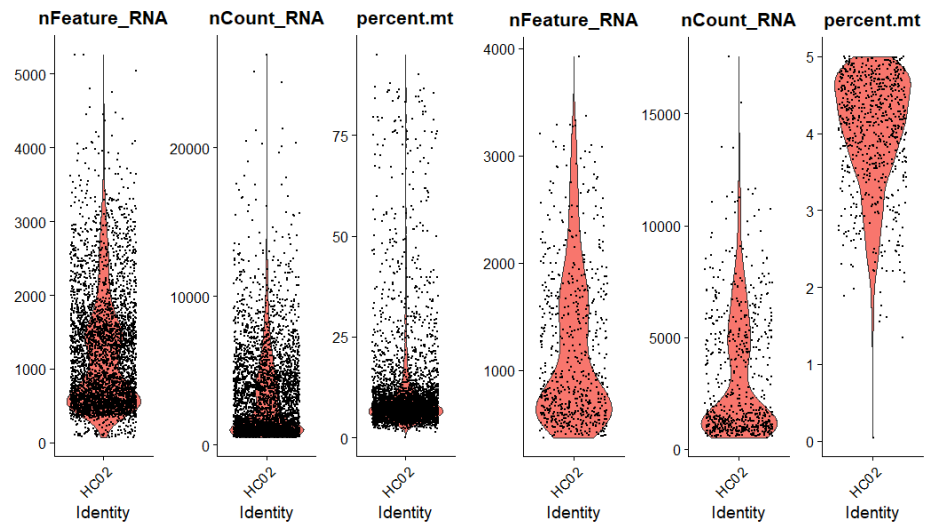
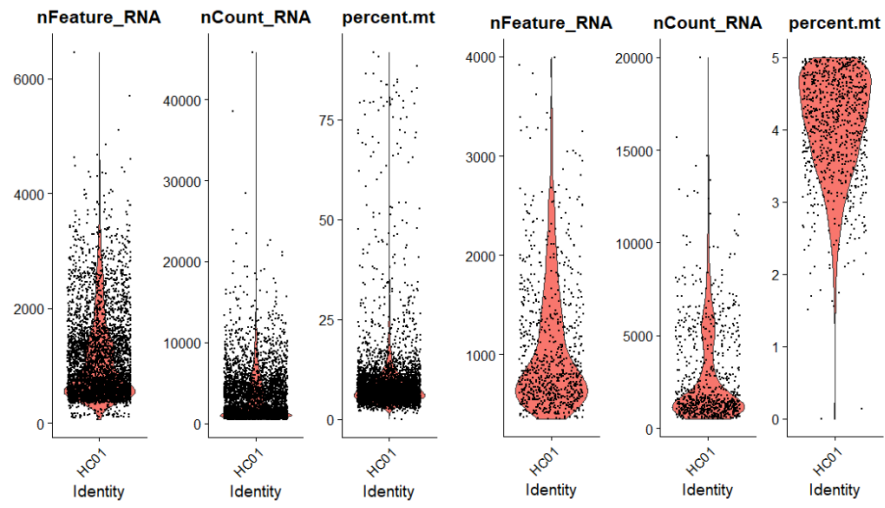
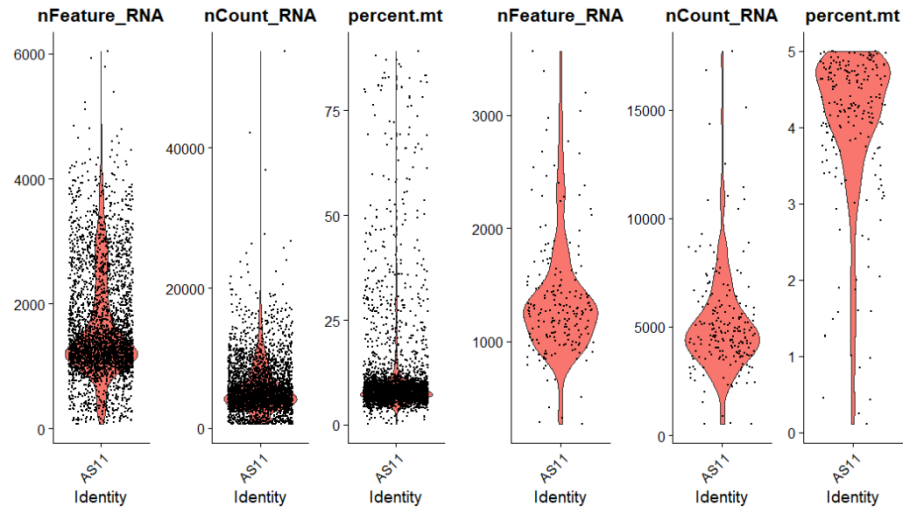
Zhu, W., He, X., Cheng, K., Zhang, L., Chen, D., Wang, X., ... & Weng, X. (2019). Ankylosing spondylitis: etiology, pathogenesis, and treatments. *Bone research*, 7(1), 1-16.

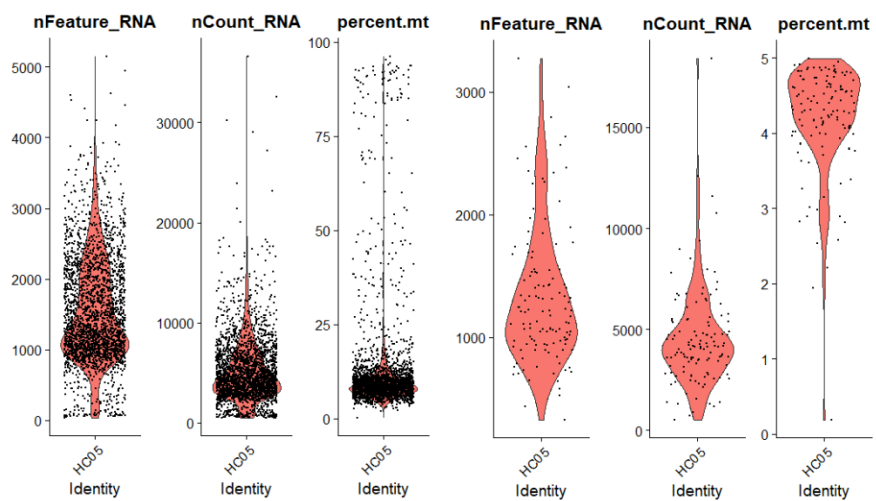
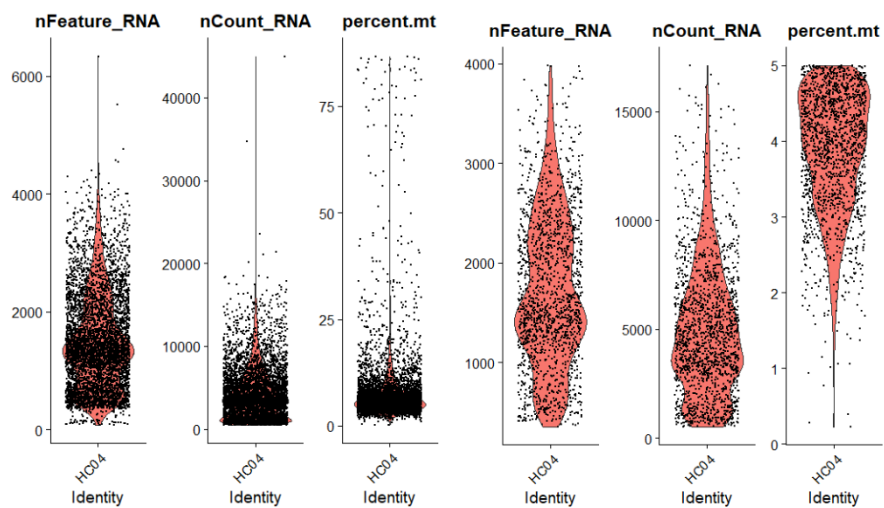
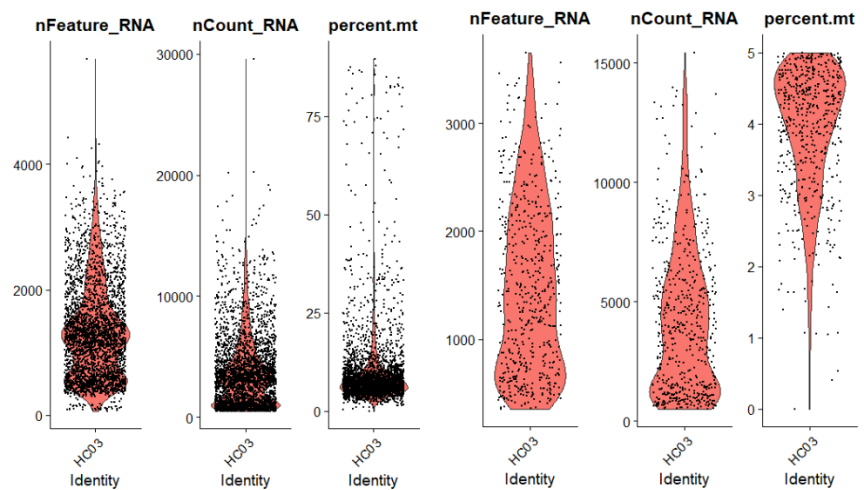
EKLER

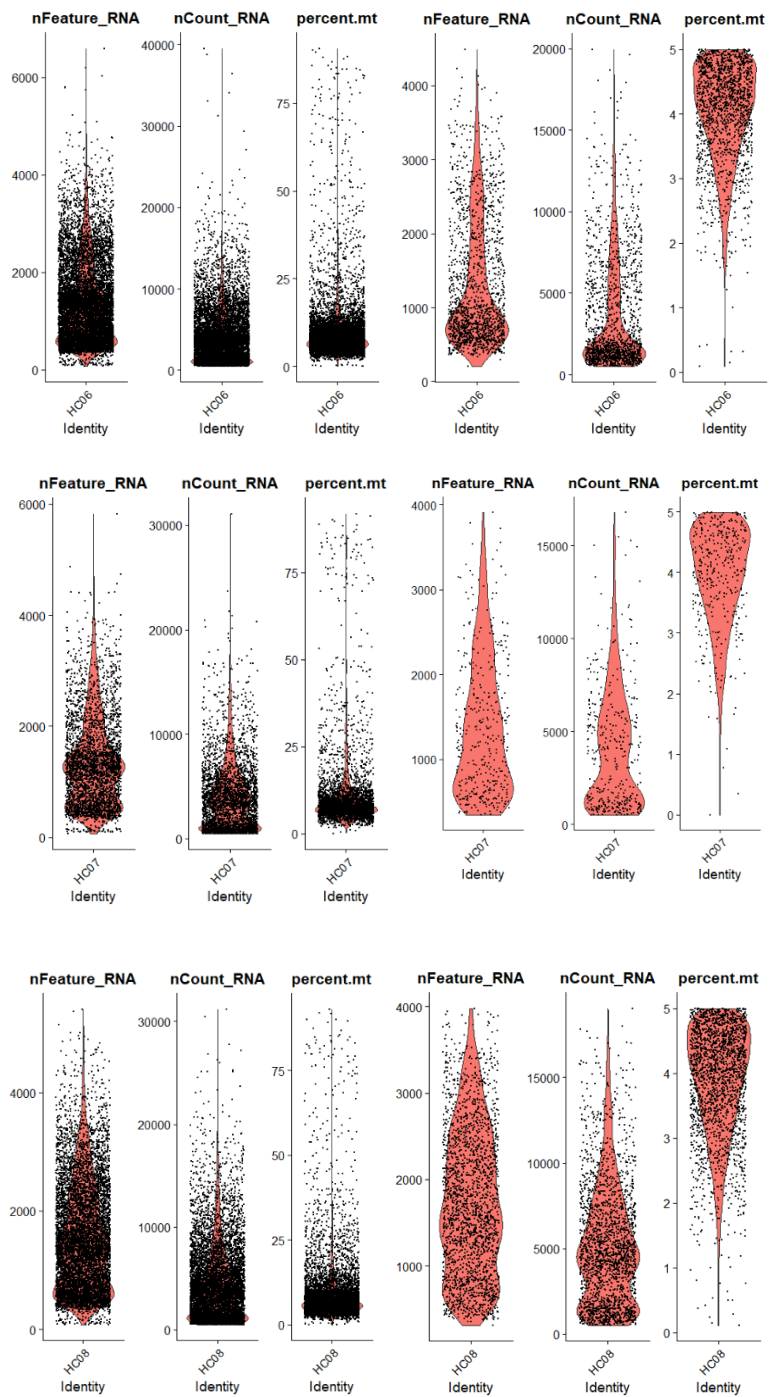


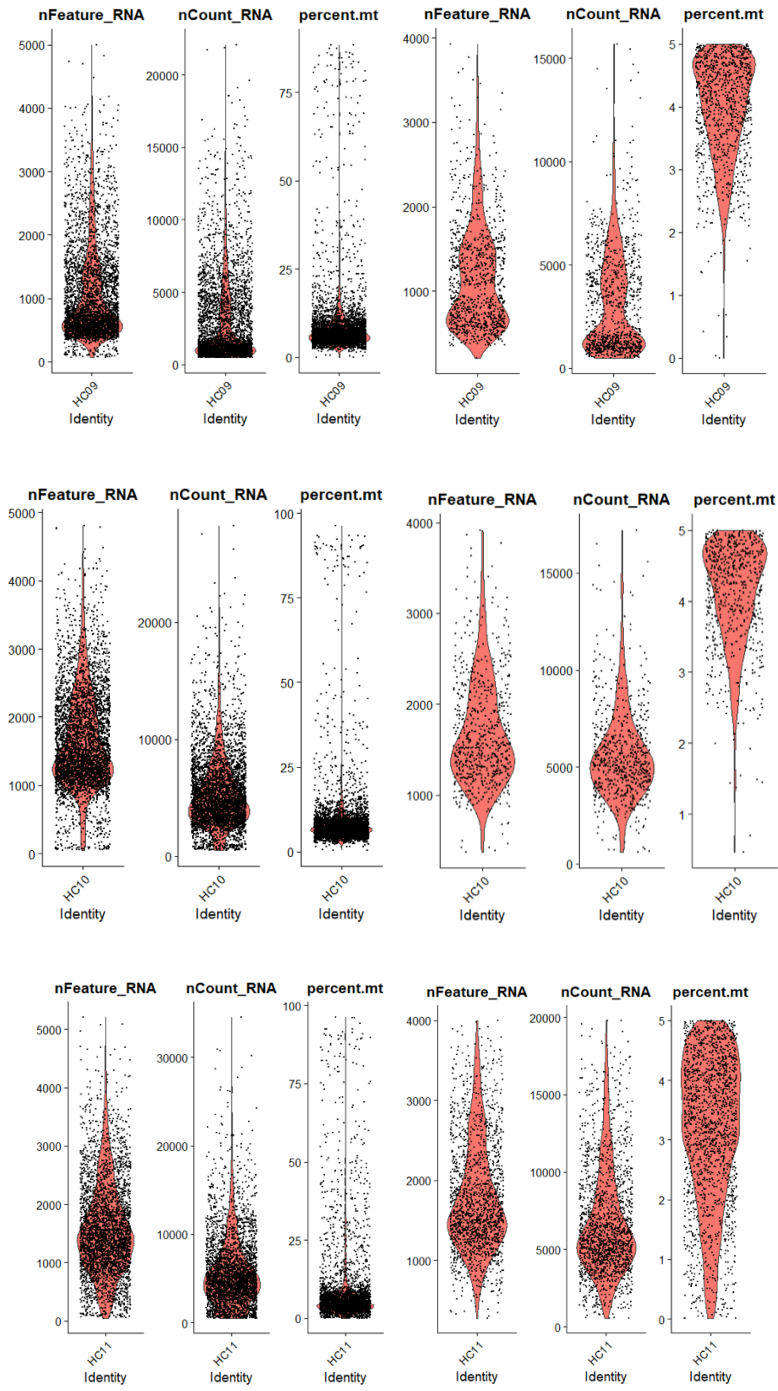


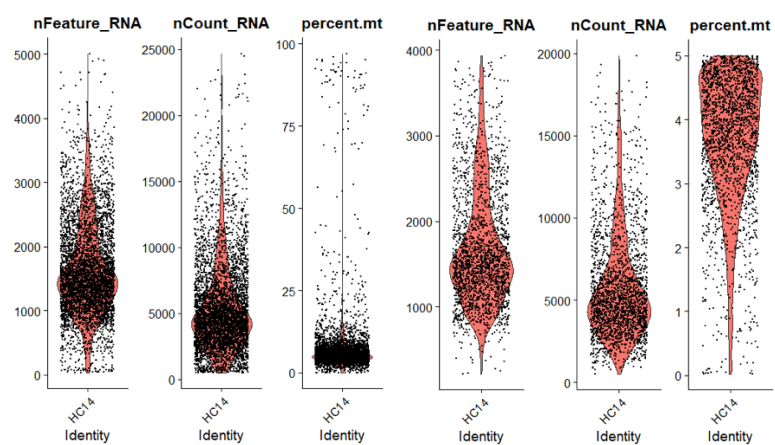
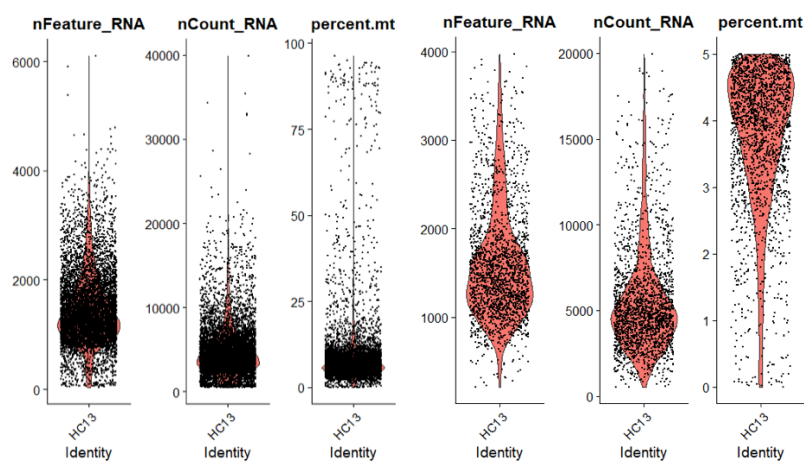
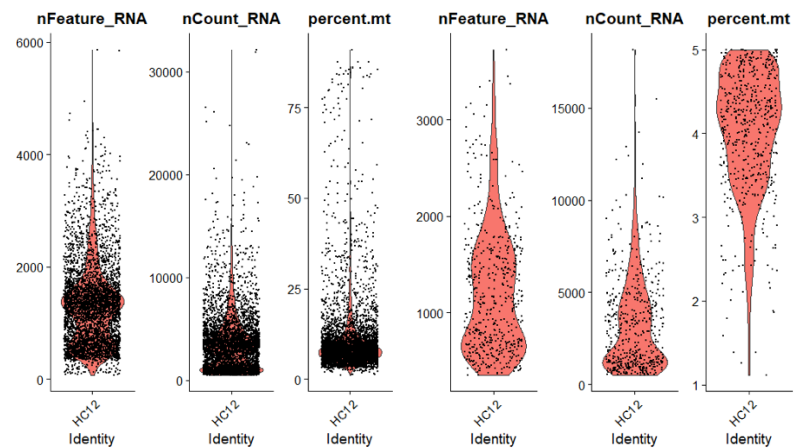


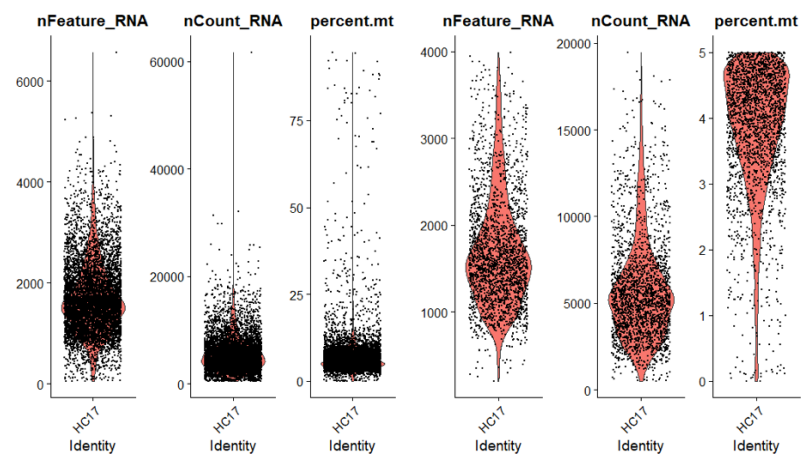
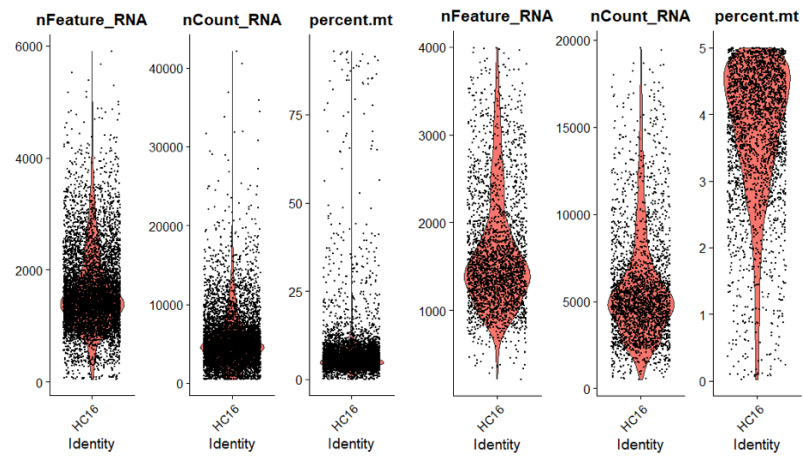
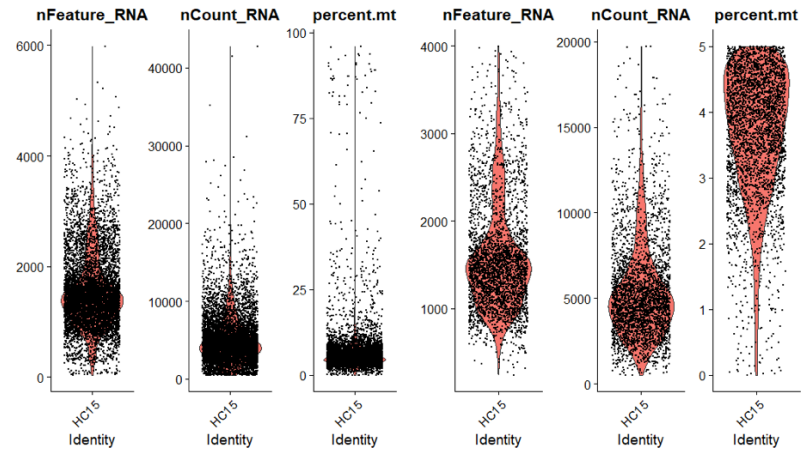


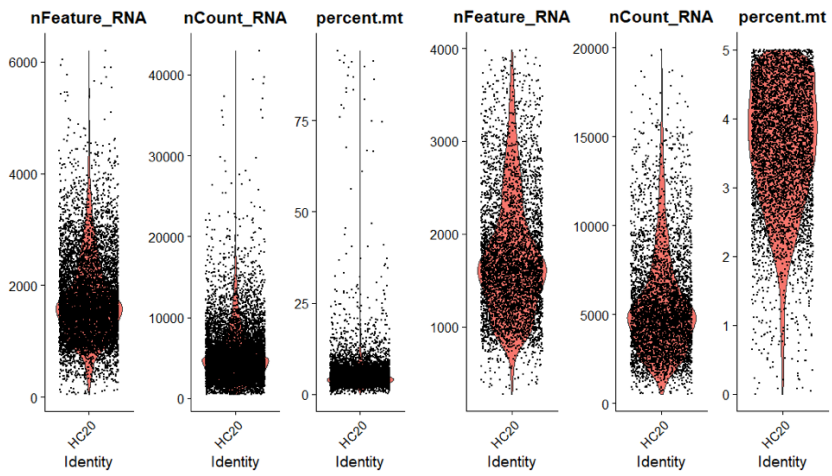
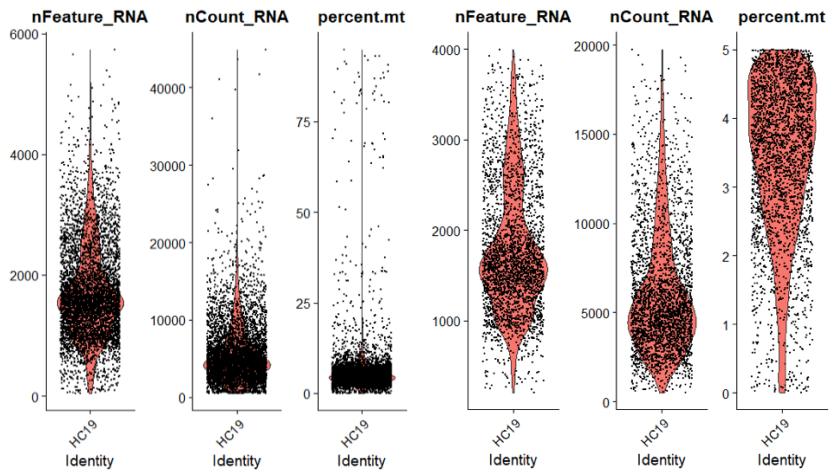
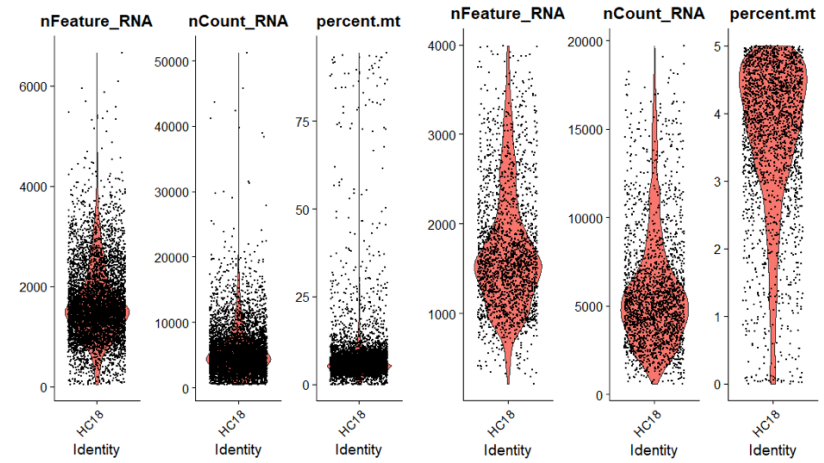


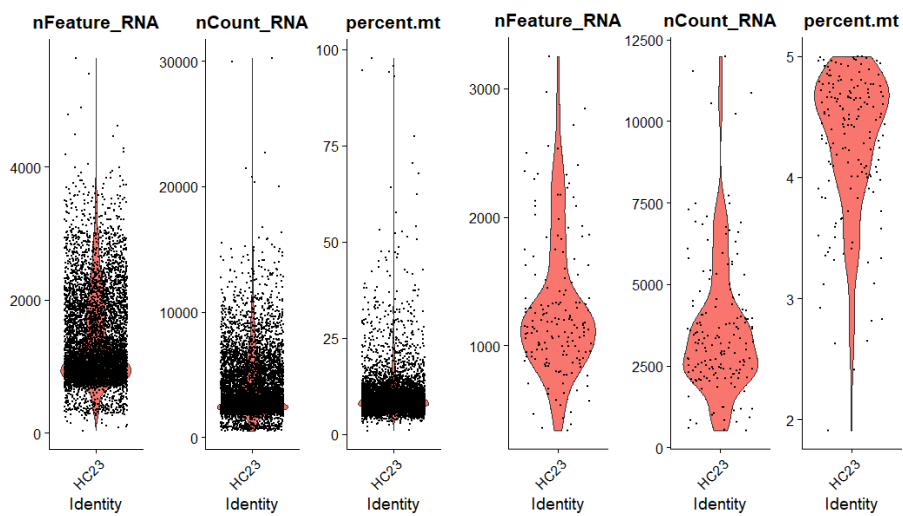
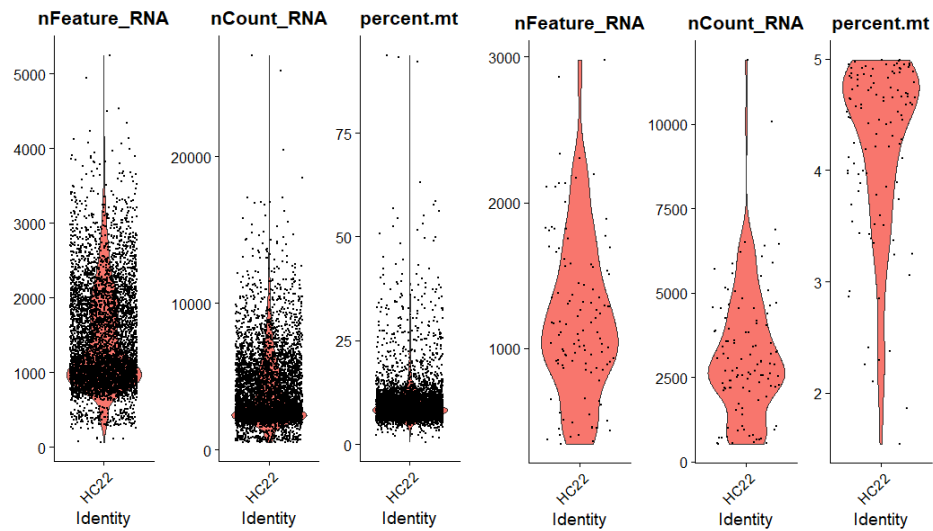
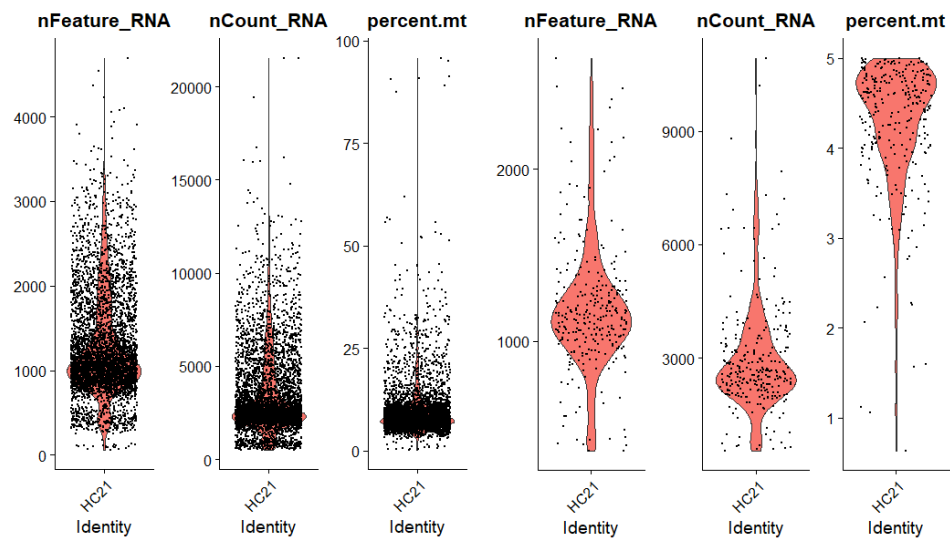


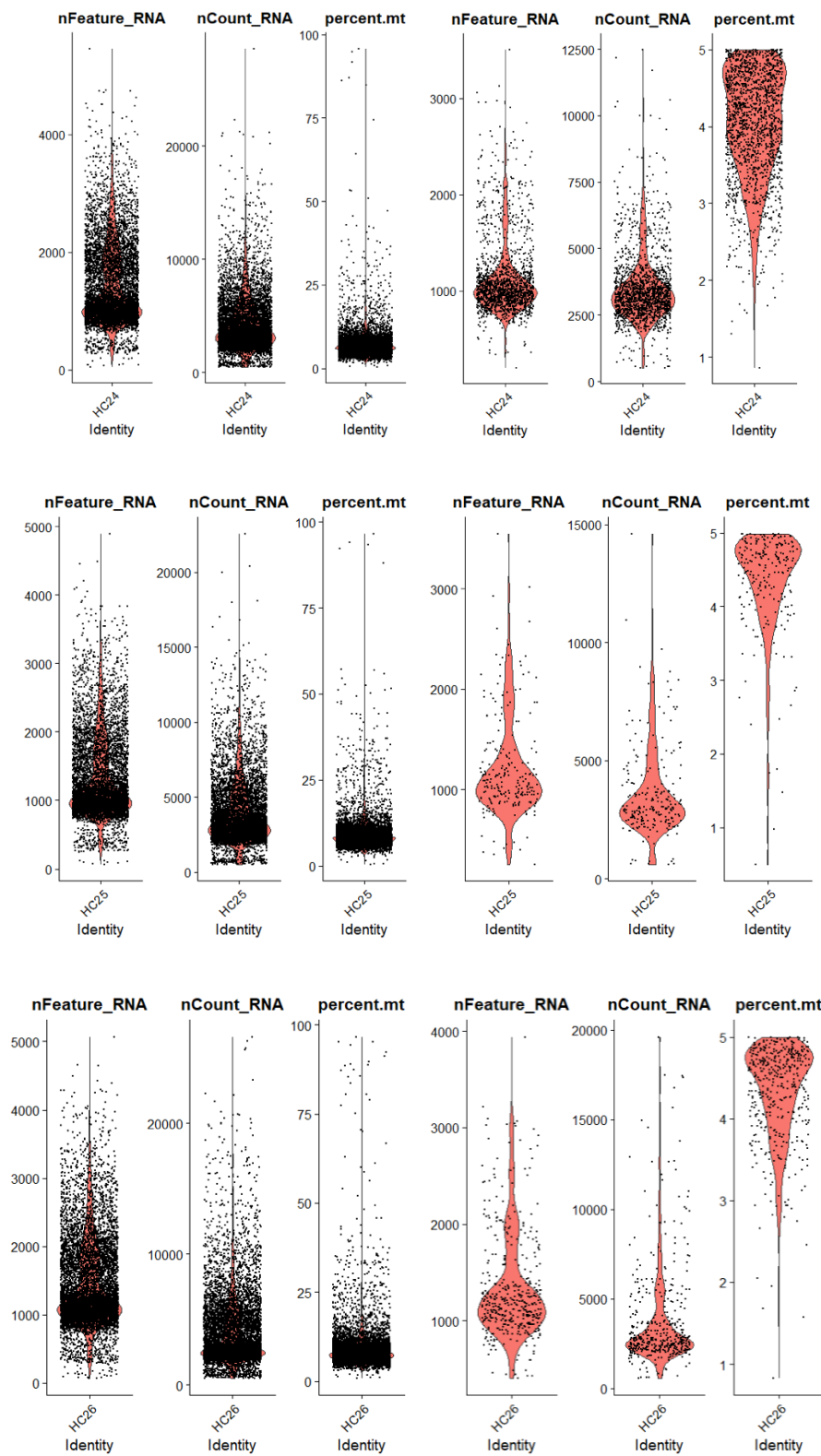


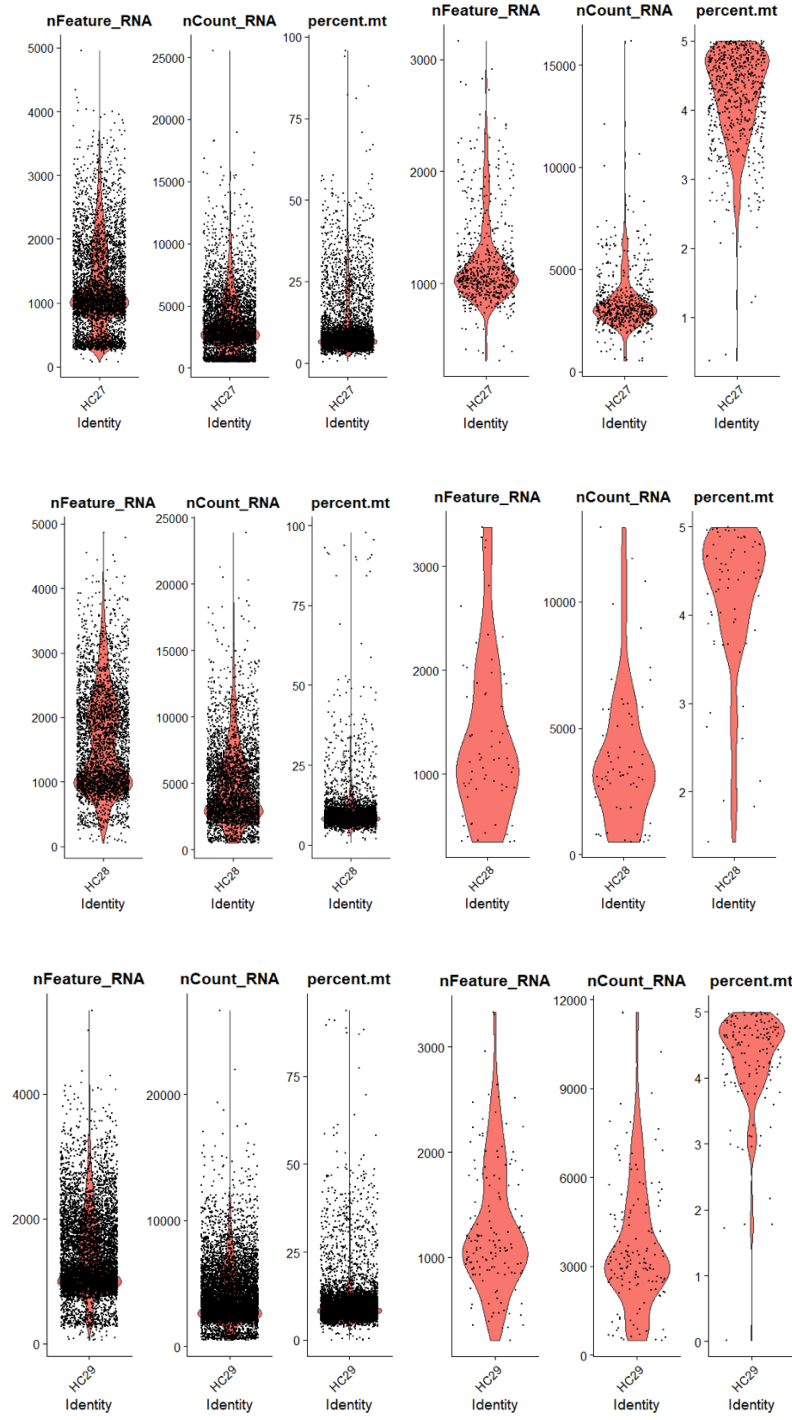












Ek Şekil-1: VS2 bireylerin (10 adet AS'li hasta ve 29 sağlıklı kontrol) PKMH verilerinin hepsi için kalite kontrol işlemi öncesi ve sonrası tespit edilmiş toplam gen, molekül ve mitokondriyal RNA yüzdesi grafikleri.