



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**KARACİĞER KANSER KÖK HÜCRE
BELİRTEÇLERİNİ TEK HÜCRE RNA DİZİLİMİ (SCRNA-
SEQ) ANALİZİ İLE SAPTAMA**

Ebru KOCAKAYA

**DİSİPLİNLER ARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Kâmil Can AKÇALI**

ANKARA

2022

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARACİĞER KANSER KÖK HÜCRE
BELİRTEÇLERİNİ TEK HÜCRE RNA DİZİLİMİ (SCRNA-
SEQ) ANALİZİ İLE SAPTAMA**

EBRU KOCAKAYA

**DİSİPLİNLER ARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Kâmil Can AKÇALI**

ANKARA

2022

Ankara Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Karaciğer Kanseri Kök Hücre Belirteçlerini Tek Hücre RNA Dizilimi (ScRNA-Seq) Analizi ile Saptama” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:



Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Kök Hücre ve Yenileyici Tıp Anabilim Dalı'nda
Ebru KOCAKAYA tarafından hazırlanan
“Karaciğer Kanseri Kök Hücre Belirteçlerini Tek Hücre RNA Dizilimi
(ScRNA-Seq) Analizi ile Saptama” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 22/06/2022


Dr.Öğr.Üyesi Nihal TERZİ ÇİZMECİOĞLU
ODTÜ
Jüri Başkanı


Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Altay ÜNAL
Ankara Üniversitesi
Raportör


Prof. Dr. Kamil Can AKÇALI
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	ix
Çizelgeler	xi
1. GİRİŞ	1
1.1 Karaciğer ve Anatomisi	1
1.2 Karaciğer Rejenerasyonu	2
1.3. Karaciğer Sirozu	4
1.4. Karaciğer Kanseri	4
1.5. Kanser Kök Hücre Teorisi ve Literatürde Olan Belirteçler	6
1.6. Kök Hücre	7
1.7. Tek Hücreli RNA Dizilimi Prensip Ve Analizi	8
1.7.1. Örnek Hazırlama	9
1.7.2. Tek Hücre Yakalama ve cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması	9
1.7.3. Sekanslama	11
1.7.4. Biyoinformatik Analiz	11
2. GEREÇ ve YÖNTEM	15
2.1. Veri Setleri	15
2.2 Tek Hücre Rna Dizilimi Analizi	16
2.2.1 Seurat Paketi Ile R’da Tek Hücre RNA Analizi	17
2.2.2. Kök Hücre Skoru Algoritması	19
2.2.3. Aday Belirteç Gen Analizi	20
2.4. Hücre Kültürü	20
2.5. Primer Dizaynı	21
2.6. Total RNA İzolasyonu	22
2.7. cDNA Sentezi	22
2.8. Kantitatif Eş Zamanlı	22
2.9. İstatistiksel Analiz	23
3. BULGULAR	24
3.1. Biyoinformatik Analiz: Tek Hücreli RNA Dizilimi Analizi	25
3.2. Validasyon Deneyleri	46
3.3. İleri Analizler Tek Hücre Rna Dizilimi Analizi	49

4. TARTIŞMA	54
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	59
ÖZET	60
SUMMARY	61
KAYNAKLAR	62
EKLER	67
Ek-1. Kullanılan Hücre Hatları ve Genel Özellikleri	67
Ek-2. GSE112271 Veri Setine Ait UMAP Grafiği	68
Ek-3. GSE112271 Veri Setine Ait Kök Hücre Skoru Grafiği	68
Ek-4. Ham kPZR Sonuçları	69
ÖZGEÇMİŞ	70



ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında karaciğer kanser kök hücrelerinin tespitine katkı sağlamak için yeni aday belirteçlerin bulunması hedeflenmiştir. Bu amaçla tek hücre RNA dizilimi analizi yapılmıştır. Kanser kök hücreleri, tümör hücrelerinin küçük bir kısmını oluşturduğu için ve tümör dokusu heterojen olduğu için bu hücrelerin tespitinde tek hücreli RNA dizilimi analizinden yararlanılmasına karar verilmiştir. Kanser kök hücrelerinin diğer hücrelerden ayırt edilebilmesi için de literatürde halihazırda ifade edilen kanser kök hücre belirteçlerinden yararlanarak “Kök Hücre Skoru” algoritması kullanılmıştır. Bu hücreler belirlendikten sonra gen ifade profiline bakılarak aday belirteçler belirlenip, HepG2 ve Huh7 karaciğer kanser hatları ile fibrotik karaciğer hücre hattı Lx2 kullanılarak valide edilmiştir.

Öncelikle danışman hocam Prof. Dr. Kâmil Can Akçalı’ya, yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda destekleyip motive ettiği için, kapısını her zaman bizim için açık bıraktığı için, bize güvendiği için teşekkür ederim. Dr. Ceylan Verda Bitirim’e sadece tecrübe ve değerli bilgilerini paylaşmakla kalmayıp bir arkadaş olduğu; hatalarımdan ders çıkarmamı sağladığı, her zaman destekleyip, yol gösterdiği ve laboratuvar dışında da her konuda yanımda olduğu için sonsuz teşekkür ederim. Dr. Yasin Kaymaz’a hiçbir karşılık beklemeden, kitaplar dolusu bilgiyi bana aktardığı için, sabırla yılmadan yardım ettiği için çok teşekkür ederim. Akçalı Grup’un diğer üyelerine bu zorlu süreçte yol arkadaşı oldukları için teşekkür ederim. Bize ablalık yapan, her konuda bizim iyiliğimiz için elinden geleni ve fazlasını yapan, deneyim ve tecrübelerini paylaşan Zeynep Büşra Özer’e çok teşekkür ederim. Son olarak, attığım her adımda daima yanımda olan, sevincimi paylaşıp, yorulduğumda yılmadan beni ayağa kaldıran, hiçbir konuda desteklerini esirgemeyen başta annem Gülsüm Kocakaya ve babam Salih Kocakaya olmak üzere tüm aileme; gelmek için tezimi bitirmemi bekleyen biricik yeğenime; beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan çocukluk arkadaşlarıma; lisans eğitimimde tanıştığım harika dostlarıma, “*Arginine Fan Club*”a ve Melike Tombaz’a çok teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
ASH	Alkole bağlı steatohepatit (Alcoholic SteatoHepatitis)
bp	Baz çifti
BSA	Bovine Serum Albümin
CAF	Kanser-ilişkili fibroblast
cDNA	Komplementer DNA
DMEM	Dulbecco'nun Modifiye Eagle Besiyeri
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ESM	Ekstrasellüler matriks
FACS	Floresanla Aktive Hücre Ayırma (Flourescence Activated Cell
Sorting)	
FBS	Fetal bovine serum
HBV	Hepatit B Virüsü
HCC	Hepatosellüler karsinoma
HCV	Hepatit C Virüsü
HSH	Hepatik stellat hücreler
KHS	Kök Hücre Skoru
KKH	Kanser Kök Hücresi
KKKH	Karaciğer Kanser Kök Hücresi
KNN	En Yakın k Komşusu
kPZR	Kantitatif Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu
ml	Mililitre
mRNA	Mesajcı RNA
NASH	Alkole bağlı olmayan steatohepatit (Non-Alcoholic
SteatoHepatitis)	
PBS	Fosfat salin tamponu
PC	Temel Bileşen- Principal Component
PS	Penisilin-Streptomisin
RNA	Ribonükleik Asit
RPM	Dakika dönüş sayısı
ScRNA-Seq	Tek Hücre RNA Dizilimi Analizi
siRNA	Susturucu RNA
TAM	Tümör ilişkili makrofaj
TBA	Temel Bileşenler Analizi
TEC	Timik epitelyal hücreleri

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Kök Hücre Skoru denklemi.	19
Şekil 3.1.1. GSE166635 veri setinin ön analiz grafikleri.	25
Şekil 3.1.2. GSE151530 veri setinin ön analiz grafikleri.	25
Şekil 3.1.3. GSE125449 veri setinin ön analiz grafikleri.	25
Şekil 3.1.4. GSE166635 veri setinin TBA analizinin 1s1 haritası.	27
Şekil 3.1.5. GSE151530 veri setine ait Temel Bileşen 1'in (PC1) 1s1 haritası.	28
Şekil 3.1.6. GSE151530 veri setinin TBA analizinin 1s1 haritası.	29
Şekil 3.1.7. GSE125449 veri setine ait Temel Bileşen 1'in (PC1) 1s1 haritası.	30
Şekil 3.1.8. GSE125449 veri setinin TBA analizinin 1s1 haritası.	31
Şekil 3.1.9. GSE166635 veri setinin temel bileşenlerinin dirsek grafiği.	32
Şekil 3.1.10. GSE151530 veri setinin temel bileşenlerinin dirsek grafiği.	33
Şekil 3.1.11. GSE125449 veri setinin temel bileşenlerinin dirsek grafiği.	33
Şekil 3.1.12. GSE166635 veri setine ait UMAP grafiği.	34
Şekil 3.1.13. GSE166635 veri setine ait, hücre türlerinin bilgisinin UMAP üzerine projekte edilmiş grafiği.	35
Şekil 3.1.14. GSE151530 veri setine ait UMAP grafikleri.	36
Şekil 3.1.15. GSE151530 veri setine ait ek bilgilerin UMAP grafiği üzerine projekte edilmiş grafikleri.	37
Şekil 3.1.16. GSE151530 veri setine ait ek bilgilerin UMAP grafiği üzerine projekte edilmiş grafikleri.	38
Şekil 3.1.17. GSE125449 veri setine ait UMAP grafikleri.	39
Şekil 3.1.18. GSE125449 veri setine ait hücre türlerinin bilgisinin UMAP üzerine projekte edilmiş grafikleri.	40
Şekil 3.1.19. GSE125449 veri setine ait hücre türlerinin bilgisinin UMAP üzerine projekte edilmiş grafikleri.	41
Şekil 3.1.20. GSE151530'a ait kök hücre skor grafikleri.	42

Şekil 3.1.21. GSE125449’a ait kök hücre skor grafikleri.	43
Şekil 3.1.22. GSE166635’e ait kök hücre skor grafikleri.	44
Şekil 3.1.23. Her veri setine ait belirteç gen sayısı şemaları.	45
Şekil 3.1.24. Her veri setine ait belirteç genlerin kesişim şeması.	46
Şekil 3.2.1. Aday belirteçlerin mRNA düzeyindeki ifadelerinin HepG2 ve Huh7 hücre hatlarında Lx2'deki ifadesine göre kat değişimleri (ddCT).	47
Şekil 3.2.2. Aday belirteçlerin mRNA düzeyindeki ifadelerinin HepG2 ve Huh7 hücre hatlarında Lx2'deki ifadesine göre kat değişimleri (ddCT).	48
Şekil 3.3.1. Aday belirteçlerin ilişkisi.	49
Şekil 3.3.2. Aday belirteç Cav2, Tceal8 ve Crip1’in veri setlerindeki malign hücrelerde ifadesi.	50
Şekil 3.3.3. Aday belirteç Tinagl1, LDHB ve Timp1’in veri setlerindeki malign hücrelerde ifadesi	51
Şekil 3.3.4. Aday belirteç Tpm1, Phlda1 ve CD44’ün veri setlerindeki malign hücrelerde ifadesi	52

ÇİZELGELER:

Çizelge 1.1. Tek hücre yakalama yöntemleri.	10
Çizelge 2.1. Analizi yapılacak veri setleri.	16
Çizelge 2.2. Primer listesi.	21
Çizelge 2.3. kPZR reaksiyonu koşulları.	23



1.GİRİŞ

1.1 Karaciğer ve Anatomisi

İnsan vücudunda bulunan en büyük organ olan karaciğer, vücut ağırlığının yüzde 2'sini oluşturur. Karın boşluğunun sağ üst kısmında bulunur ve göğüs kafesi tarafından korunur. Diğer organlardan farklı olarak kalpten 1 dakika içinde pompalanan kanın %25'i karaciğerden geçer (Abdel-Misih ve Bloomston, 2010)

Metabolizmada çok önemli yeri olan karaciğerin; serum proteinlerinin üretilmesi, safra sentezi, pıhtılaşma faktörlerinin üretilmesi, glikojen depolanması, bilirubin metabolizması, kandaki glikoz seviyesinin kontrol edilmesi, ilaç vb. kimyasalların metabolize edilmesi, vücuda alınan kimyasalların metabolize edilmesi gibi çok çeşitli kritik görevleri vardır. (Grijalva ve Vakili, 2013)

Karaciğer “Glisson kapsülü” adlı zarın için büyük sağ lob ve küçük sol lob olmak üzere 2 ana lobdan oluşur, her lob kendi içinde farklı bölümlere ayrılmıştır. Karaciğere giren kanın %75'ini gastrointestinal sistemden hepatik portal ven taşır. Kalpten oksijen açısından zengin kanı ise hepatik arter karaciğere getirir. Karaciğere gelen kanlar, karaciğer içindeki sağ, orta ve sol hepatik damarlar ile karaciğerden ayrılır. (Society, 2015)

Karaciğer lobları binlerce lobülден (küçük loblar) oluşan sekiz bölüme ayrılır ve lobüller karaciğer oluşturan yapıtaşlarıdır. Lobüllerin hepsinin fonksiyonu aynı olduğu için karaciğer homojen bir organdır. Bu lobüllerin her biri, safranın toplandığı hepatik kanala doğru bir kanala sahiptir. (Surgery) Lobüller, merkeziden çevreye doğru yayılan sinüzoidal kılcal damarlarla kaplı hepatosit plakalardan oluşur. Lobüllerin yapısı altıgene benzemektedir. Karaciğer lobülleri; portal ven, safra kanalı ve hepatik arterden oluşan üçlü kanal/damar yapısına sahiptir. Lobüllerin ortasından merkezi damar geçer. Hem portal ven hem de hepatik arter lobüle kan sağlar, bu da lobülден santral venden ayrılmadan önce sinüzoidal kılcal damarlardan akar. (Si-Tayeb ve ark., 2010)

Gün içinde tükettiğimiz yağların sindirimi için gerekli olan tuzları içeren safra karaciğerden salgılanır. Salgılanan safranın miktarı 800 ml ile 1L arasında değişir. Kanal sistemi, salgılanan safrayı depolanması için karaciğerden safra kesesine taşır. Aynı kanal sistemi, safrayı ince bağırsağın duodenumuna boşaltır. Safra ile metabolik atıklar, toksik maddeler, ilaç ve kimyasal atıklar da ince bağırsaktan atılır. (Britannica, 2020)

1.2 Karaciğer Rejenerasyonu:

Kısmi hepatektomiden sonra hepatositlerdeki hücre içi sinyal yolları dakikalar içinde çok hızlı bir şekilde aktive olur. Bu yolları tetikleyen mekanizmalar net değildir. Karaciğer rejenerasyonunda kök hücreler görev almaz; karaciğere ait bütün hücre tipleri, karaciğer rejenerasyonu sırasında hücre proliferasyonuna katılır. Yapılan çalışmalar hepatositlerin sınırsız bölünme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir. Tüm bu özelliklerine rağmen hepatositlerin normal hücre döngüsü yavaştır. Rejenerasyon sırasında hepatosit veya kolanjiyosit proliferasyonu ciddi şekilde sekteye uğrarsa, iki hücre tipi birbirine transdiferansiye olur. Bu diferansiyasyon sonucu fakültatif kök hücre olarak işlev görmeye başlayıp, karaciğer yapısını eski normal haline getirmek için birbirlerine farklılaşırlar. (Michalopoulos ve Bhushan, 2021) Kronik karaciğer hastalıklarında meydana gelen hepatosit kaybı, eksiği kapatmaya çalışan hepatositlerin proliferasyonunu tetikler ve onları tümör oluşumuna yol açabilecek, DNA veya DNA replikasyon enzimlerine bağlanarak, genotoksik hasara maruz bırakır. (Fausto ve Campbell, 2003)

Sitokeratin 7 ve sitokeratin 19 kolanjiyosit endotelial hücrelerin belirteciyken, albümin ve alfa-fetoproteinler hepatositlerin belirtecidir. Hepatositler karaciğerin yüzde 75'ini oluşturur. Geriye kalan yüzde 25'ini ise endotelial hücreler, Kupffer hücreleri, lenfositler (B hücreleri, T hücreleri ve Doğal Öldürücü Hücreler), hepatik stellat hücreler ve safra kanallarını oluşturan kolanjiyositler oluşturur. (Racanelli ve

Rehermann, 2006) Embriyonik gelişim döneminde, hepatoblastlar hepatosit ve safra hücrelerine farklılaşarak karaciğeri oluşturur. (Fausto ve Campbell, 2003)

Ekstrasellüler matriksin (ESM) birikmesi sonucu karaciğer dokusunun bozulmasına fibroz denir. Hepatik stellat hücreler sitoplazmalarında yağ damlacıkları depolayan uyku (*quiescent*) halinde, yıldız şeklinde hücrelerdir. Karaciğerde oluşan hasar sonucu inaktif durumdaki hepatik stellat hücreler aktive olup miyofibroblast hücrelere dönüşürler. Bu dönüşüm esnasında içindeki yağ damlacıklarını ve yıldız şekillerini kaybedip ESM'yi oluşturan Tip I, III ve IV kolajen, fibronektin, proteoglikan, proinflamatuvar sitokinler vb. molekülleri ifade etmeye başlarlar.

Miyofibroblastlar karaciğerde oluşabilecek herhangi bir hasar sonucu ESM'nin yeniden oluşturulmasından sorumludur. Hepatik stellat hücrelerin aktive olup miyofibroblasta dönüşmesini alkol tüketimi, Hepatit B ve Hepatit C enfeksiyonu, otoimmün hastalıklar, kolestatik karaciğer hastalıkları, alkole bağlı steatohepatit (*Alcoholic SteatoHepatitis-ASH*) veya alkole bağlı olmayan steatohepatit (*Non-Alcoholic SteatoHepatitis- NASH*) ve toksinler gibi birçok faktör tetikleyebilir.

Hepatik stellat hücrelerin aktivasyonu iki ana aşamadan oluşur: başlangıç ve perpetuasyon yani devam evresi. Başlangıç evresinde hepatik stellat hücreleri sitokinlerle ve diğer stimüllerle aktive olur ve gen ifadesinde ve ESM yapısında değişimler başlar. Başlangıç evresi, preinflammatuar evre olarak da adlandırılır. Perpetuasyon evresinde ise bu aktivasyon ve gen ifade değişimleri artarak çoğalır. Sitokin salınımı, proinflammatuar salınımı, kemoatraktan salınımı, ESM'nin yapısının değişmesi, hücrelerin proliferasyonu artar. Sentezlenen ESM proteinleriyle, salgılanan kemoatraktanlar ve proinflammatuarlardan dolayı Kupffer hücreleri, endotel hücreler, makrofajlar, trombositlerle birikmeye başlayarak inflamasyona sebep olur. (Aydın ve Akcalı, 2018; Friedman, 2000; ve Parola ve Pinzani, 2019)

Son yapılan çalışmalara göre karaciğer fibrozu; fibrozu tetikleyen etken ortadan kaldırıldığında geri dönüşümü olan bir hasardır. Fakat fibroz patolojisi düzelmezse

karaciğer önce siroz, ardından hepatosellüler karsinom (*Hepatocellular Carcinoma-HCC*) meydana gelebilir. (Roehlen ve ark., 2020)

1.3. Karaciğer Sirozu:

Siroz, sağlıklı karaciğer dokusunun fibrotik doku ve rejeneratif nodüllerle yer değiştirmesiyle sonuçlanan uzun inflamasyon döneminden sonra gelişen, organ yetmezliğine yol açabilen hastalıktır. Karaciğer fibrozunun son evresi olarak da bilinir. Progresif portal hipertansiyon, sistemik inflamasyon ve karaciğer yetmezliği sirozun sonuçlarındandır. Sirozu fibrozdan ayıran özellikler fibroza kıyasla ESM'nin çok daha fazla birikmesi ve hepatosit sayısının çok düşük olmasıdır. Kronik karaciğer inflamasyonu tüm hastalarda siroza dönüşmez. Safra kanalının tamamen tıkalı olması durumunda haftalar içinde; Hepatit C gibi viral enfeksiyonların olması durumunda on yıllar içinde siroz gelişebilir. Karaciğer nakli, siroz tedavisinde en çok kullanılan yöntemdir. Fakat, uygun donör bulmanın ve nakil ameliyatının zorluğu hücresel düzeyde yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Hücresel tedavinin odak noktası hepatosit sayısını artırmak ve ESM miktarını dengelemektir. (Gines ve ark., 2021; Lanthier, 2018)

1.4. Karaciğer Kanseri

2020 yılı verilerine göre dünyada en sık görülen 6.kanser türü ve ölüme en çok sebep olan 3.kanser türü karaciğer kanseridir. (International, 2020; WHO, 2021) Karaciğer kanseri primer ve sekonder olarak iki başlık altında incelenir. Hepatosellüler karsinom ve kolanjiyokarsinom, safra yolu kanseri, iki ana primer karaciğer kanser türüdür. Sekonder kanser ise metastaz sonucu karaciğerde oluşan kanserdir. Kolorektal kanser, melanoma (cilt kanseri) ve sindirim sistemi kanserleri en çok karaciğere metastaz yapan kanser türleridir. (UPMC, 2022) HCC erkeklerde kadınlara göre daha sık görülürken, en çok teşhis 50 ile 60 yaşları arasında konmaktadır.

Siroza bağlı olarak karaciğerin işlevini yerine getirmemeye başlaması hepatoselüler karsinom oluşum riski arttırır. Özellikle Hepatit B (HBV) taşıyan hastaların hepatoselüler karsinom olma riski, hastanın vucudundaki viral yik ile doğru orantılıdır. Hepatoselüler karsinomun oluşması cok aşamalı ve karmaşık bir sereçtir. Suregelen inflamasyon, fibroz dokusunun artarak birikmesi, hepatositlerin nekroza uğraması ve anormal hepatosit rejenerasyonu hepatoselüler karsinomun oluşmasına sebep olur (Forner ve ark., 2018)

Kalıtsal hemokromatoz, alkole bağlı olmayan steatohepati (NASH) sonucu gelişen sirozla birlikte, obezite, diyabet ve aflatoksine maruz kalmak da hepatosellüler karsinom oluşumunu tetikleyebilir. (Hartke ve ark., 2017)

Kronik karaciğer rahatsızlığı olan hastalarda hepatik inflamasyon surek, fibrozis ve anormal hepatosit rejenerasyonu vardır.

Karaciğer kanserinin karakteristik ozellikleri arasında anti-apoptotik sinyallerin artması, buyume faktörlerinin gen ifadelerinin artması sonucu anjiyonezin artması, hücre döngüsünden sorumlu retinoblastoma, p53, siklin D1, p16 genlerinde, TERT promotöründe, Wnt / β -katenin sinyal yolağına ait CTNNB1 ve AXIN1 genlerinde, kromatinlerin yeniden organizasyonunda görev alan ARID2 ve ARID1A genlerinde mutasyon görölmesi vardır. (Farazi ve DePinho, 2006; Villanueva, 2019; Villanueva ve ark., 2007) HCC oluşumunda epigenetik faktörlerin ve karaciğer kanser kök hücrelerinin rol aldığı düşünölmektedir. HCC için kullanılan belirteçler CD133, OV6, CD45, CD90 ve EpCAM'dir. (Chiba ve ark., 2006; Yamashita ve ark., 2009; Yin ve ark., 2007)

Serum AFP (*alpha fetoprotein*), AFP-L3 ve DCP (*Des-gamma-carboxyprothrombin*) seviyeleri hepatoselüler karsinom belirteci olarak kullanılmaktadır. Serum APF-L3 ve DCP değerleri; hepatoselüler karsinomu malign olmayan diğer karaciğer hastalıklarından ayırmada, hastalığın seyrini öngörme AFP'den daha güçlüdür. (Forner ve ark., 2018; Villanueva, 2019)

1.5. Kanser Kök Hücre Teorisi ve Literatürde olan Belirteçler

Tümör dokusunun farklı türde hücrelerden oluşması (heterojen tümör dokusu), kanserin kemoterapiye ve radyoterapiye direnç göstermesi ve tümörlerden alınan hücrelerin ksenotransplantasyon sonucu yeniden tümör oluşturması kanser kök hücrelerinin araştırılmasına yol açmıştır. Kanser kök hücrelerinin kaynağı hakkında literatürde farklı görüşler vardır:

-Vücutta uyku halinde (*dormant/dormancy*) kanser kök hücrelerinin halihazırda var olması, (Talukdar ve ark., 2019)

-Progenitör hücrelerin mutasyona uğraması sonucu kök hücre durumuna geri farklılaşması sonucu kanser kök hücresi haline gelmesi,

-Vücutta hali hazırda bulunan sağlıklı kök hücrelerin kansere sebep olan birden fazla mutasyonun genomunda birikmesi sonucu kanser kök hücrelerine dönüşmesi. (Walcher ve ark., 2020)

Yapılan çalışmalar kanser kök hücrelerinin radyoterapiye ve apoptoza dirençli olduklarını göstermiştir. Ayrıca kanser kök hücrelerinde DNA hasar kontrolünden sorumlu proteinlerin sürekli aktif olmasından dolayı genomlarında meydana gelen DNA çift sarmal hasarlarını daha çabuk tamir ettiği gösterilmiştir. (Pajonk ve ark., 2010) Kanser hastalarına kemoterapi ve radyoterapi uygulanmasına karşın hastalığın nüksetmesinin veya metastaz oluşmasının sebebi kanser kök hücrelerinde bulunan bu direnç mekanizmaları olabilir. Kanser kök hücrelerinin tanımlanmasını sağlayacak belirteçler bulunması; kanserin teşhis edilip, tedavi edilmesi için çok büyük önem taşımaktadır. Tümör dokusu içinde hücre çeşitliği çok fazla olduğu için her hücre ayrı ayrı değerlendirilmelidir. Bu tür bir inceleme çok güçlü bir biyoinformatik araç olan Tek Hücre RNA Dizilimi analizi ile yapılabilir.

Belirli bir hücrede, belirli bir zamanda spesifik olarak ifade edilen, hücrelerin büyüme ve farklılaşma durumunu yansıtan; hücreleri tanımlamak, izlemek için kullanılabilen işaretlere hücre belirteci denir. (Mallard ve Tiralongo, 2017)

Karaciğer kanser kök hücre belirteci olarak CD44, CD133, Lgr5, KRT19 literatürde tanımlanmıştır. (Lee ve ark., 2022) Literatürde belirtilen bu belirteçler sadece karaciğer kanser kök hücrelerine özgü değildir. Örneğin CD44 akciğer, sinir sistemi, karaciğer ve deri hücrelerinde de ifade edilirken (Senbanjo ve Chellaiah, 2017), Lgr5 ince bağırsak kök hücre belirtecidir (Barker ve Clevers, 2010). Bu sebeple karaciğer kanser kök hücrelerini tanımak için onlara özgü daha etkin belirteçlerin bulunmasına ihtiyaç vardır.

1.6. Kök Hücre:

Kendilerini yenileyebilen ve başka hücrelere dönüşebilen hücrelere kök hücre denir. Kök hücreler farklılaşabilme potansiyellerine göre dörde ayrılır: totipotent kök hücreleri, pluripotent kök hücreler, multipotent kök hücreler ve unipotent kök hücreler.

Totipotent kök hücreler bir organizmadaki tüm hücreleri oluşturabilecek potansiyele sahip hücrelerdir; yumurta ve spermin birleşmesi sonucu oluşan zigot buna örnektir. Zigot hem organizmayı hem de organizmayı koruyup, geliştiren plasenta, yolk kesesi gibi embriyodışı dokuları (*extra-embryonic structure*) da oluşturur. Blastosistin iç kısmında bulunan embriyonik kök hücreler pluripotent kök hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler üç germ tabakasına da farklılaşabilir. Embriyonik kök hücreler, araştırmalarda kullanılan ilk kök hücre türü olmakla beraber, klinik araştırmalarda hala yaygın olarak kullanılmaktadırlar. (Liu ve ark., 2020) Multipotent kök hücreler ait oldukları organ veya dokudaki hücrelere farklılaşabilme potansiyeline sahip hücrelerdir, farklılaşma potansiyelleri pluripotent kök hücrelerden daha azdır. Hematopoietik ve mezenkimal kök hücreler multipotent kök hücreye örnektir. Unipotent kök hücreler ise farklı hücrelere dönüşme potansiyeli en düşük hücrelerdir; sadece tek tip hücreye farklılaşabilirler. (Zakrzewski ve ark., 2019) Testiste bulunan spermatogonyum hücreleri, sadece sperme farklılaşarak unipotent kök hücrelere örnektir. (S.C. Lin, 2014)

2006 yılında 24 tane transkripsiyon faktörü denenerek somatik hücreleri kök hücre haline getirilmeye çalışılmıştır. Çalışma sonucu dört tane transkripsiyon

faktörünün, c-Myc, Klf4, Oct3/4 ve Sox2, kök hücre benzeri haline dönmek için yeterli olduğu bulunmuştur. Bu dört transkripsiyon faktörüne “Yamanaka Faktörleri” denmiştir. Proto-onkogen olan c-Myc; hücre proliferasyonu, hücre büyümesi, farklılaşma/diferansiyasyon ve apoptoz gibi çeşitli hücresel süreçte görev alır. (Pelengaris ve ark., 2002) Oct4 (*Octamer-binding transcription factor 4*) erken gelişim döneminde gereklidir ve hücrelerdeki kök hücre özelliğinin sürdürülmesi için gerekli en önemli elemanlardandır. (Okumura-Nakanishi ve ark., 2005) 1996’da keşfedilen Klf4 (*Krüppel-like factor 4*); çinko parmak motifi içeren, hücre farklılaşması, çoğalması ve büyümesi gibi önemli hücresel faaliyetleri düzenleyen transkripsiyon faktörüdür. (Ghaleb ve Yang, 2017) Embriyonik gelişim ve kök hücre halinin korunması için önemli olan Sox2 (*SRY-box transcription factor 2*), hücre kaderinin belirlenmesinde de rol alır. (Holmes ve ark., 2020; Nambirajan ve ark., 2021) Fare fibroblastlarının retrovirüs sistemi kullanılarak yukarıda bahsi geçen transkripsiyon faktörleriyle enfekte edilmesi sonucu hücreler yeniden programlanmıştır. Embriyonik kök hücrelere benzeri bu hücrelere “İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre-iPSC” denilmektedir. Bu çalışmalarından ötürü Shinya Yamanaka ve John Gurdon 2012 yılı Nobel Tıp Ödülü’nü kazanmıştır. (Liu ve ark., 2020; Takahashi ve Yamanaka, 2006)

1.7. Tek Hücreli RNA Dizilimi Prensipli ve Analizi

Tek Hücre RNA diziliminin (*scRNA-seq*) her bir hücrenin epigenomunu, transkriptomunu ve genomunu karakterize etmeyi mümkün kılarak, her bir hücrenin genetiği hakkında derinlemesine bilgi edinmeyi sağlar. RNA dizilim analizi (tek hücre veya total RNA), RNA'nın cDNA'ya çevrilmesinin ardından DNA dizilimi ve genlerin ifade seviyeleri hakkında bilgi veren etkili bir yöntemdir. Gen ifadesi yüksek olan genler, daha az ifade edilen genlere oranla daha fazla miktarda DNA sekansı okuma sinyali, cDNA ve RNA üretir. Bu sayede RNA dizilimi analizi; analiz yapılan örnekteki her bir genin ifade seviyesine karşılık gelen sayısal bir ifade sunar. Tek hücre dizilim analizi, bir hücrenin ifade ettiği bütün genler hakkında bilgi verebilir. Bu yöntem kanser araştırmaları, kök hücre araştırmaları, gelişimsel biyoloji vb. alanlarda

sıklıkla kullanılmaktadır. Kanser alanındaki kullanımı sayesinde tümör mikro çevresi (Tumor Micro Environment-TME), kemoterapi direnci ve mekanizması, tümör hücrelerini hedefleyen bağışıklık sistemi hücreleri ve tümör içi çeşitlilik hakkında bilgiler edinilebilir. (Sun ve ark., 2021)

scRNA-seq'in iş akışını örnek hazırlama, ters transkripsiyon ve cDNA kütüphanesinin oluşturulması, sekanslama ve biyoinformatik analiz aşamalarından oluşur.

1.7.1. Örnek hazırlama

Analizi yapılacak örneğe ait hücrelerin tek tek ayrılmış bir şekilde süspansiyonda olmalıdır. Hücreleri tek tek ayırmak için enzimatik yöntem veya mikropipetleme kullanmak mümkündür fakat bu yöntemler mekanik ve kimyasal strese sebep olabileceği için örneklerin verimi düşürebilir. Bu sebeple FACS, Floresanla Aktive Hücre Ayırma (Flourescence Activated *Cell Sorting*), yöntemi kullanılarak tek hücrelerin elde edilmesi daha uygundur.

1.7.2. Tek Hücre Yakalama ve cDNA Kütüphanesinin Oluşturulması

Hücreleri tek tek yakalama metodu, kullanılacak olan scRNA-seq platformuna bağlı olarak değişebilir. Kullanılan teknikler: damlacık tabanlı mikroakışkan sistem, lazer mikrodiseksiyon, FACS ile ayırma sistemi ve manuel olarak elle ayırma yöntemidir. (Hwang ve ark., 2018)

Yapılan bir ankete göre metotların kullanım sıklığı sırasıyla FACS ile ayırma sistemi, lazer mikrodiseksiyon, manuel hücre toplama ve damlacık tabanlı mikroakışkan sistem şeklindedir. (Gross ve ark., 2015)

FACS ile tek hücreli yakalama yöntemi, 96 veya 384 kuyucuklu plaka kullanımına göre değişir. Ters transkripsiyon ve cDNA kütüphane hazırlığı için Smart-

seq2 tabanlı kitler kullanılabilir. Özetle; hipotonik hücre liziz tamponu ve ters transkripsiyon primerleri içeren 384 kuyucuklu plakalara, FACS ile ayrıştırılan tek hücreler tek tek ekilir. Ters transkripsiyon primeri, poli(dT), UMI, hücre barkodu ve bir T7 RNA polimeraz promotöründen oluşur. Ardından cDNA sentezi ve kütüphanesi oluşturulur. (Kim ve ark., 2020)

Çizelge 1.1. Tek hücre yakalama yöntemleri. Tek hücre yakalama yöntemlerinin, verim avantaj ve dezavantaj parametrelerine ait bilgiler çizelgede gösterilmiştir.

Teknik	Verim	Avantaj	Dezavantaj
FACS (Floresanla Aktive Hücre Ayırma)	Yüksek	Çoklu parametre kontrolü ile yüksek ayırma verimi	Hücrelerin önceden ayrılmış halde olması gerekir, çok fazla malzeme harcanır
LCM (Lazer yakalama mikrodiseksiyonu)	Düşük	Canlı hücreler	Çevredeki hücrelerle kontaminasyon riski, doku örneklerinin fiksasyon veya kriyoprezervasyon ile hazırlanması
Manuel hücre toplama	Düşük	Bozulmamış canlı doku	Düşük verim, ustalık gerekir
Damlacık Bazlı Mikroakışkan yöntem ile izolasyon	Yüksek	Az örnek harcama, amplifikasyon seçeneği	Ustalık gerekir, hücrelerin önceden ayrılmış halde olması gerekir

Lazer yakalama mikrodiseksiyonu (LCM), doku örneklerinden tek hücre yakalamak için en ideal bir yöntemdir. LCM, görsel olarak hedeflenen hücrelerin ve doku parçalarının, düşük enerjili bir kızılötesi lazer darbesi ile aktive edilen termoplastik membrana yapışmasına dayanır. LCM, doğal bir durumda bozulmamış dokulardan hücrelerin yakalanmasını sağlar ve yakalanan hücrelerin RNA bütünlüğü

korunur. LCM'nin karmaşık çalışma prensibi ve doku örneklerinin fiksasyon veya kriyoprezervasyon ile hazırlanması dezavantajlarındandır. Ayrıca, hücre ayrılması ve doku kesilmesi sırasında diğer hücrelerden RNA kontaminasyonu meydana gelebilir. (Huang ve ark., 2018)

Manuel hücre toplama; motorlu mekanik düzey üzerinde edebilen mikropipet ve mikroskoptan oluşan mikromanipülatörlerle yapılır. Mikropipetler, bir aspiratör ve dağıtım ünitesine bağlı ultra ince cam kılcal pipetten yapılmıştır. Hücreler kültür tabağı ya da kuyucuklu plaka içinde süspansiyon halinde olmalıdır. Operatör mikroskoptan bakarak bir hücre seçer, mikropipeti onun yakınına hareket ettirir ve mikropipete çekerek tek bir hücreyi aspire eder. Aspire edilen hücre ve içinde olduğu sıvı, toplama kabına (örn., bir plakanın kuyusu) aktarılır. Bu işlem genellikle manuel olarak gerçekleştirilir. (Gross ve ark., 2015)

DropSeq ve 10X Genomics platformları dahil olmak üzere damlacık tabanlı tek hücreli yaklaşımlar, tek hücreleri yağ kapsüllü damlacıklardaki tek boncuklara bağlamak için mikroakışkan çipler kullanır. Her boncuğun üzerinde hücrelerin tanımlamasını sağlayan bir barkod dizisi, mRNA okumalarını ölçmek için benzersiz birer moleküler tanımlayıcı (UMI) ve poliadenile sekansa karşılık gelen poli-dT primerinden oluşan DNA oligoları vardır. Her bir boncuk tek bir hücreye bağlanır ve yağ fazlı kanallarda yağ damlasının içine girer. Damlacık bazlı mikroakışkanlar en çok kullanılan yöntemdir. Yağ damlalarının içindeki boncuğa bağlı tek hücreler sistemden toplanır. Daha sonra, Illumina adaptörleri, 10X barkodları, UMI'ler ve oligo(dT) dizileri içeren primerler ile her boncuk ve hücre içeren yağ damlası içinde ters transkripsiyonlar başlatılır. Daha sonra, yağ damlası dağıtılır ve barkodlu cDNA'lar amplifikasyon ve kütüphane oluşturma için havuzlanır. (Kim ve ark., 2020)

1.7.3. Sekanslama

Günümüzde sekanslama için en çok Illumina'nın ürünleri kullanılmaktadır, Illumina Hiseq4000, MiSeq ve NextSeq500 sistemleri revaçtadır. Hangi transkriptin

hangi hücreden geldiğini belirlemek için barkod adlı etiketler ve her transkripte has UMI (*Unique molecular identifiers*- Özgün Moleküler Etiketler) kullanılır. Sekanslama cihazından çıkan ilk ham veri önce “*preprocessing*” adı verilen ön işleme adımlarından geçer. Cihazdan alınan BCL uzantılı dosya FASTQ dosyasına çevirilir, ve asıl analizde kullanılacak gen matrisi oluşturulur. Alınan okumalar referans genomu hizalanır.

1.7.4. Biyoinformatik Analiz

a. Ön işleme, boyutluluk azaltma ve kümeleme

Parçalanmış hücreler, ölmekte olan hücreler veya tek tek ayrılmamış çift, yapışık hücreler gibi istenmeyen hücrelere ait okumalar analiz yapılacak olan matristen çıkarılmalıdır. Parçalanmış hücreler veya hücre parçaları düşük UMI sayısı veya gen çeşitliliği ile karakterize edilir. Ayrılmamış hücreler yüksek UMI sayılarına sahiptir. Bu nedenle, çok yüksek ve çok düşük UMI değerlerine sahip hücreler filtrelenmelidir. Stresli veya ölmekte olan hücreler, bol miktarda mitokondriyal kaynaklı gen ifade ederler. Onları ortadan kaldırmak için %10-20'den fazla mitokondriyal transkript içeren hücreler de matristen çıkarılır. (Hwang ve ark., 2018)

b. Normalizasyon

Normalizasyon, teknik gürültüyü veya hücreler arasındaki yanlılığı önlemek için çok önemli bir adımdır. Normalleştirme, toplam UMI sayısında hücreye özgü farklılıklar için verileri ayarlar ve hücreler arasındaki gerçek gen ekspresyonu farklılıklarını ortaya çıkarır, değişken genler arasındaki gen ekspresyon büyüklüğünün etkisini ortadan kaldırmak için verileri ayarlar. Örneğin, Satija Lab tarafından geliştirilen Seurat (Hao ve ark., 2021) (paketi, her hücre için gen ifadesi ölçümlerini toplam ifadeyle normalleştiren ve ölçek faktörü 10000 ile çarpan bir küresel ölçeklendirme normalleştirme yöntemi kullanır.

c. Kümeleme (*Clustering*)

Normalizasyondan sonraki adım, tarafsız kümeleme için kullanılacak olan değişken genleri seçmektir. Temsili bir doğrusal boyutluluk azaltma algoritması olan TBA, Temel Bileşen Analizi (Principal Component Analysis-PCA) kullanılır. TBA, gen kümelerini tahmin etmek ve verilerdeki varyansı açıklamak için sıklıkla kullanılır. Optimum sayıda temel bileşen seçildikten sonra, scRNA-seq'in görselleştirilmesi genellikle t-dağıtılmış stokastik komşu yerleştirme (t-SNE) veya tek tip manifold yaklaşımı ve projeksiyonu (UMAP) gibi doğrusal olmayan boyutsal indirgeme yöntemleriyle elde edilir. Bu indirgeme yöntemleri kullanılırken biyolojik bilgi kaybolabilir, buna dikkat edilmelidir.

Küme sayısının belirlenirken optimum çözünürlük ve biyolojik olarak açıklanabilir kümelenmeye dayalı olarak seçilmelidir. İkincil düzeyde daha fazla alt kümeleme, biyolojik olarak anlamlı alt kümeleri keşfetmek için kullanılabilir. Kümeler tanımlanırken, kümelerin ayırt edici gen ifadelerine (*Differentially Expressing Genes-DEGs*) veya bilinen belirteçler kullanılarak kullanılabilir. İki grup arasındaki ayırt edici genler, Wilcoxon Rank Sum testi (Seurat (Hao ve ark., 2021) paketinin kullandığı yöntem) veya *DESeq2* algoritması gibi çeşitli istatistiksel yöntemler kullanılarak hesaplanabilir. (Hao ve ark., 2021) Kümeler belirlendikten sonra elde edilmek istenilen bilgiye göre farklı analizler yapılabilir: hücre hiyerarşisinin izlenmesi, yeni hücre alt kümelerinin bulunması, gen düzenleyici ağların oluşturulması, kümeler arası gen ifadelerinin karşılaştırılması, yeni belirteçlerin bulunması. (Haque ve ark., 2017; Kim ve ark., 2020)

Araştırmacılar, tek hücre analizini kullanarak, tümör evrimi, dolaşımdaki tümör hücreleri (CTC'ler), nöron heterojenitesi, erken embriyo gelişimi dahil olmak üzere birçok biyolojik süreci ve hastalığı tek hücre düzeyinde profillendirilebilir. (Hwang ve ark., 2018)

Hipotezimize göre: Tek Hücre RNA Dizilimi analizi kaynak alınıp, biyoinformatik araçların geliştirilerek kullanılmasıyla karaciğer kanser kök hücre belirteçleri bulunabilir. Halka açık ham karaciğer kanseri tek hücre RNA dizilimi veri setlerini biyoinformatik araçlarla analiz ederek aday karaciğer kanser kök hücre belirteçlerinin bulunması hedeflenmektedir. Bu amaca ulaşmak için NCBI GEO'da

(Sayers ve ark., 2022) bulunan GSE125449, GSE151530, GSE166635 ve GSE112271 veri setleri kullanılacaktır. Bu veri setleriyle Tek Hücre RNA Dizilimi analizi yapılacaktır, ardından bulunan aday belirteçlerin RNA düzeyinde gen ifadelerine bakılacaktır. Fibrotik karaciğer hücre hattı ile karaciğer kanser hücre hatlarında karşılaştırılarak valide edilmesi amaçlanmıştır. Validasyon deneyleri için kanser kök Hücre özelliğine en çok sahip, insan hepatoselüler kanser hattı olan Huh7 ve HepG2 hücre hatları ile fibrotik karaciğer hücre hattı olan Lx2 kullanılacaktır. (Ji ve Wang, 2012; Wang ve ark., 2018)



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Veri Setleri:

Analiz edilecek veri setleri NCBI (Sayers ve Ark., 2022) 'ın GEO veri tabanından alınmıştır. Veri setleri seçilirken birçok kritere dikkat edilmiştir: hücre sayısının fazla olması, sekanslama platformunun Illumina olması, GEO'ya yüklenen verinin ham veri olması, örnek sayısının çok ve çeşitli olması, 10X Genomics'in tek hücre kitinin kullanılması, nasıl bir çalışmada kullanıldığı ve yakın zamanda yapılmış olması. Bu kriterlerden göz önünde bulundurulduğunda dört tane veri seti analiz edilmiştir: GSE112271, GSE166635, GSE151530 ve GSE125449. GSE112271 veri setine ait sonuçlar Ek-2 ve Ek-3'tedir.

Analiz edilmesi planlanan GSE180665 kodlu veri setinin analiz tamamlanamamıştır. Üç farklı hastaya ait örnekleri içeren veri setinde üç adet tümör dokusuna ait veri, iki adet sağlıklı karaciğer dokusuna ait veri bulunmaktadır. Analiz programı olan R Studio (RStudio Team, (2020)) "*Error: vector memory exhausted (limit reached?)*" yani bilgisayarın/programının hafıza limitine ulaştığını belirten uyarıyı vermiştir. Bunu çözmek için öncelikle bilgisayarın hafızasında ve programın hafızasında yer açılmıştır, ardından veri seti hastaya ve doku türüne göre parçalanarak, önce o küçük parçalarla analize başlanıp, normalizasyon vb. aşamaların yapılmasından sonra birleştirilmesi planlanmıştır. Buna rağmen aynı hata yeniden alınmıştır. Analiz tamamlanamadığı için GSE180665 yerine GSE107747 kodu veri setinin analiz edilmesine karar verilmiştir. GSE107747 veri seti HCV ile enfekte, iki tane HCC hastası erkeğe aittir. Bu veri seti kandan izole edilen toplam 10.000 hücreden oluşmaktadır. Bu veri setinde 10X Genomics'e ait Chromium sistemi ile tek hücreler elde edilmiş ve Illumina'nın HiSeq 2500 sistemi kullanılarak sekanslama yapılmıştır. Bu veri setinin analizi yapılmıştır fakat bu veri setini hazırlayan araştırmacılar kanda dolaşan kanser hücrelerini bulmayı hedefledikleri için HCC'ye ait hücreler bu veri setinde tespit edilememiş olabilir. Diğer yedek veri seti olan GSE112271, iki hastadan alınan yedi tane örneğe aittir. Bu veri setinin analizi tamamlanmıştır böylece dört tane veri setinin analizi yapılabilmektedir.

Çizelge 2.1. Analizi yapılacak veri setleri. Analizi yapılacak olan veri setlerine ait bilgiler aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir.

Veri Seti	Platform	Hücre Sayısı	Örnek sayısı	Veri Biçimi	Tek Hücre Teknolojisi
GSE112271	Illumina HiSeq 2500	38553	2	Ham	10X-Chromium
GSE166635	Illumina NovaSeq 6000	25189	2	Ham	10X-Chromium
GSE151530	Illumina NovaSeq 6000 NextSeq500	56721	46	Ham	10X-Chromium
GSE125449	Illumina NextSeq500	9946	19	Ham	10X-Chromium

2.2 Tek hücre RNA Dizilimi Analizi:

Bu çalışmada R (R Studio Team, (2020)) yazılım diline ait Seurat (Hao ve ark., 2021), dplyr (Wickham ve ark., 2022) ve patchwork (Pedersen, 2022) veri işleme paketleri analiz yaparken kullanılmıştır. Seurat paketi (Hao ve ark., 2021), literatürde tek hücreli RNA dizilimi analizi için en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Seurat (Hao ve ark., 2021); tek hücreli RNA-seq verilerinin incelenmesi, kalite kontrolünün yapılması ve analiz edilmesi için tasarlanmış bir R veri işleme paketidir. Seurat (Hao ve ark., 2021) paketi, kullanıcılarının yapılan transkriptomik analizler sonucunda hücresel çeşitlilik kaynaklarını tanımlamasını ve yorumlamasını yapmasını sağlamakla beraber çeşitli tek hücre veri türlerini de analize entegre etmesini sağlar. (Hao ve ark., 2021)

Dplyr paketi (Wickham ve ark., 2022) ise veri düzenlemeyi sağlayan bir veri işleme paketidir. Bu paket mevcut değişkenlere ek yeni değişkenler eklemeye,

değişkenleri isimlerine göre çağırmaya, verileri filtrelemeye ve verilerin satır ve sütunlarını düzenlemeye yarar.

Patchwork, (Pedersen, 2022) grafik kompozisyonunu son derece basit ve güçlü hale getirmek için tasarlanmış bir veri işleme paketidir. Bu paket kullanılarak grafik düzenlenir, grafiklere açıklamalar yazılıp ve başlık yazılabilir, çoklu grafikler gösterimleri hazırlanıp, grafiğin şekli üzerinde değişiklikler yapılabilir.

2.2.1 Seurat Paketi ile R’da Tek Hücre RNA Analizi:

- a. **Seurat Objesi Oluşturma:** Seurat (Hao ve ark., 2021) objesi, analiz edeceğimiz veri setinin matrisini ve metadata denilen veri hakkındaki ek bilgilerin depolandığı objedir. Analizin ilerleyen basamaklarında üretilen her yeni veri, yapılan her bir işlem bu Seurat (Hao ve ark., 2021) objesinde saklanacaktır. “CreateSeuratObject()” fonksiyonu kullanılarak yapılmıştır.
- b. **Standart Ön İşleme:** Verinin içindeki ölmekte olan hücrelerin, yapışık halde kalmış hücrelerin çıkarılması için yapılmıştır. Kalite kontrol bu aşamada yapılmıştır. Toplam RNA sinyali 200 ile 2500 arasında tutulmuştur. Çünkü, sinyali 200’den küçük analiz için yeterli gen sayısına sahip değildir ve 2500’den fazla sinyal yapışık hücreleri işaret eder. Ayrıca ölmekte olan hücrelerin mitronkondriyal gen yüzdesi yüksektir. O hücrelerden kurtulmak için mitokondriyal gen yüzdesi 5’ten büyük olanları veri setinden çıkarılır. Bunu yapmak için “subset()” fonksiyonu kullanılmıştır.
- c. **Normalizasyon:** “LogNormalize()” fonksiyonu ile veriler global normalizasyon yöntemi olan logaritmik dönüştürme kullanılmıştır, bu sayede tüm veriler aynı skalada değerlendirilebilecektir.
- d. **Çok Değişken Genlerin Tanımlanması (Gen Seçimi):** Verinin içindeki hücreden hücreye yüksek varyasyon gösteren (Bazı hücrelerde çok fazla, bazı hücrelerde çok az ifade edilen genler) genlerin bir alt kümesi oluşturulur. Bu genlere odaklanmak veri kümelerindeki biyolojik sinyali vurgulamaya yardımcı olur. Bu

genler, ilerleyen analizlerde işe yarayacaktır. “FindVariableFeatures()” fonksiyonu kullanılarak bu genler bulunmuştur.

- e. **Veri Ölçekleme ve Doğrusal Boyut Küçültme (TBA):** “ScaleData()”fonksiyonu ile Temel Bileşenler Analizi’nden (TBA) önce standart bir ön işleme adımı olan doğrusal bir dönüşüm ("ölçeklendirme") yapılmıştır. Ardından “RunPCA()” fonksiyonu ile lineer boyut küçültme yapılır. “VizDimReduction()”, “DimPlot()” ve “DimHeatmap()”olmak üzere TBA'yı tanımlayan hücreleri ve genleri görselleştirmenin birkaç farklı yolu kullanılmıştır.
- f. **Veri Setinin "Boyutluluğunu" Belirleme:** Teknik gürültünün azaltılması ve hücreler arasında varyansa katkısı olmayan bileşenlerin analizden çıkarılması gerekir. Bunu yapmanın iki farklı yolu vardır ama bu çalışmada “ElbowPlot()” fonksiyonu kullanılmıştır. Bu fonksiyonla her bir bileşenin varyansa katkısını grafiği çizilir ve trend çizgisinin yön değiştirdiği, dirsek görüntüsünü aldığı yerdeki bileşenden sonra gelen bileşenlerin varyansa katkısını çok azdır.
- g. **Hücrelerin Kümelenmesi:** Hücreleri bir grafik yapısına entegre etmek için kullanılır. Benzer gen ifade profiline sahip hücreler arasında bir doğru (*edge*) çizilir. Böylece her hücre için “En Yakın k Komşusu (KNN)” grafiği oluşturulur ve bu grafiği birbirine bağlı "topluluklara" ayırır. Burada “k”, her hücrenin bağlantı kurduğu hücre sayısını temsil eder. Bir önceki aşamada seçilen TBA miktarından ilerlenerek yapılmıştır. “FindClusters()” ve “FindNeighbors()” fonksiyonları kullanılarak yapılmıştır.
- h. **Doğrusal Olmayan Boyut Küçültme (UMAP- Uniform Manifold Approximation and Projection):** Seurat (Hao ve ark., 2021) bir önceki aşamada oluşturulan veri kümelerini görselleştirmek ve keşfetmek için birkaç doğrusal olmayan boyut indirgeme tekniği sunar. Bu analizde “UMAP” tekniği kullanılmıştır. Bu algoritmaların amacı, benzer hücreleri düşük boyutlu uzayda bir araya getirmek için verilerin altında yatan çeşitliliği (*manifold*) öğrenmektir. “RunUMAP()” fonksiyonu kullanılarak yapılmıştır. Ardından “DimPlot()” fonksiyonu ile bu kümelendirme görselleştirilmiştir. Ayrıca, örneklerin alındığı donörlerle alakalı ek bilgiler (donörün yaşı, ırkı vb. bilgiler) veri setinde varsa; bu bilgiler kümelerin üzerine projekte edilmiştir. Bu ek bilgilerin projeksiyonu

hücrelerin gen ifade profillerine etki eden farklı parametreleri görmeye yardımcı olur. Buradan yola çıkarak hastanın yaşının gen ifade profiline etkisi hakkında çıkarımlarda bulunulabilir.

- i. **Diferansiyel olarak ifade edilen genleri bulma (Küme Belirteçleri):** Kümelerin hangi hücre türüne/grubuna ait olduğunu saptamak için o kümenin ifade ettiği belirteçler bulunur. Tüm kümelerin belirteçlerini bulmak için “FindAllMarkers()” fonksiyonu kullanılmıştır. Belli bir kümenin belirteçlerini bulmak için ise “FindMarkers()” fonksiyonu kullanılmıştır. Belirteçlerin belirlenmesinin ardından hangi genin veya genlerin, hangi kümede, hangi seviyede ifade edildiğini görselleştirmek için “VlnPlot()” fonksiyonu kullanılmıştır. Ayrıca, her kümeye has ilk 20 belirteci ısı grafiği ile görüntülemek için de “DoHeatmap()” fonksiyonu kullanılmıştır.
- j. **Kümelere Kimlik Atanması:** Hücre kümelerine ait belirteçler bulunduğundan sonra hangi kümenin ne hücresi olduğu tespit edilmiştir. Tespit edildikten sonra kümeleri adlandırmak için “RenameIdents()” fonksiyonu kullanılmıştır.

2.2.2. Kök Hücre Skoru Algoritması

Literatürde halihazırda var olan karaciğer kanser kök hücre belirteçlerinde faydalanılarak KKKH’lerin olduğu küme bulunmuştur. Bu belirteçler: PROM1, ANPEP, CD24, TFF2, KRT19, ALDH1A1, CACNA2D1, CD47, THY1, EPCAM, CD44, ICAM1, LGR5’tir. (Bu belirteçlerden yola çıkarak KKKH diye adlandırdığımız hücrelerin Kök Hücre Skoru bulunmuştur:

$$\text{Kök Hücre Skoru (KHS)} = \frac{\sum (\text{Belirteç Genlerin İfade Seviyeleri})}{\sum (\text{Tüm Genlerin İfade Seviyeleri})}$$

Şekil 2.1. Kök Hücre Skoru denklemi.

Bu sayede ait kök hücre skoru bulunmuştur. Bu skor bulunduğundan sonra KKKH olma ihtimali en yüksek hücreler bulunmuştur ve bu hücreler diğer hücrelerden ayrılıp, yeni bir obje altında saklanmıştır.

2.2.3. Aday Belirteç Gen Analizi:

KKKH'lerinin apoptoza, kemoterapiye ve radyoterapiye direnç gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca DNA hasar kontrol genlerinin ifade seviyelerin de yüksek olduğu bilinmektedir. Buradan yola çıkan ayıştırdığımız KKKH'lerin diferansiyel gen ifade profili incelenmiştir: "Yukarıda bahsedilen mekanizmalara ait hangi genlerin ifade seviyeleri öne çıkmaktadır?", "Bu grubu hangi genler temsil etmektedir?". Bu incelemeler için Reactome (Gillespie ve ark., 2022) veri tabanı kullanılmıştır. Gen listelerinin Reactome'a (Gillespie ve ark., 2022) yüklenmesi sonucu gen zenginleştirilmesi yapılmıştır; hangi hücresel yollarda anlamlı değişim vardır, hangi genler hangi hücresel süreçleri etkilemiştir bunlar incelenmiştir. Bu incelemeler sonucu aday KKKH belirteçleri belirlenmiştir:

2.4. Hücre Kültürü

Bu çalışmada insan HCC hücre hattı HepG2 ve Huh7 hücre hatları ile insan hepatik stellat hücre hattı olan Lx2 hücre hattı kullanılmıştır. HepG2 hücre hattı, 15 yaşında, karaciğer kanseri hastası bir erkekten alınan örnekten üretilmiştir. Huh7 hücre hattı ise 57 yaşındaki Japon karaciğer kanseri hastası erkeğe aittir. HepG2 ve Huh7 hücre hatları %10 Fetal sıgır serumu (Millipore- ES009-B), 1X Penisilin/Streptomisin (Millipore - TMS-AB2-C) ve 1X Glutamin (Millipore - TMS-002-C) içeren DMEM düşük glikozlu (Merck- D2902) besi yeri içinde büyütülüp, çoğalma durumlarına göre yaklaşık üç günde bir pasajlanmıştır. Lx2 hücre hattı ise %10 Fetal sıgır serumu (Millipore - ES009-B), 1X Penisilin/Streptomisin (Millipore - TMS-AB2-C) ve 1X Glutamin (Millipore - TMS-002-C) içeren DMEM yüksek glikozlu (Millipore - SLM-021-B) besi yeri içinde büyütülüp, çoğalma durumlarına göre yaklaşık üç günde bir pasajlanmıştır. Hücreler %5 CO₂ içeren, 37°C sıcaklıkta ortamda kültürlenmiştir.

Hücreleri dondurarak saklamak için, ilk olarak hücre süspansiyonu 1200 RPM'de beş dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası hücre pelletinin üzerine 1 ml besi yeri ve %1 DMSO konup, kriyoviale aktarılmıştır. Hücreler bir gece -80°C'de saklandıktan sonra uzun süreli saklama için sıvı nitrojene aktarılmıştır.

2.5. Primer Dizaynı:

Primerler tasarlanırken Primer3 çevrimiçi aracı (<http://primer3.ut.ee/>) kullanılmıştır. Primerler tasarlanırken üç ana kritere dikkat edilmiştir: Ürün boyutunun 100-200 bp olmasına, ekzonlar arasındaki mesafeye, ileri ve geri primerlerin tavlama sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına. Tasarlanan bu primerlerin sadece istenilen genlere komplementar olup olmadığını kontrol etmek için NCBI Primer Blast (Ye ve ark., 2012) çevrimiçi veri tabanı kullanılmıştır.

Çizelge 2.2. Primer listesi. Kullanılacak olan primerler ve sekanslarının listesi aşağıdadır.

TIMP1	İleri:	5'-GGCTTCTGGCATCCTGTTGTG-3'
	Geri:	5'-CGCTGGTATAAGGTGGTCTGGTTG-3'
TINAGL1	İler:	5'-CCAGAACCTGCTGTCTTGTG-3'
	Geri:	5'-AGAAGGGGTAGCAGTGGTCA-3'
CAV2	İleri:	5'-ATGCCCTCTTTGAAATCAGC-3'
	Geri:	5'-CTCGTACACAATGGAGCAAT-3'
CRIP1	İleri:	5'-GCTGAGCACGAAGGCAAACC-3'
	Geri:	5'-AAGGGAGCCCTGGGCATCT-3'
TCEAL8	İleri:	5'-TCGAGGTGAGGGAAGAGAGA-3'
	Geri:	5'-CTTCTGCCTCCTGTGGTACA-3'
LDHB	İleri:	5'-TTGTGGTTTCCAACCCAGTGGACA-3'
	Geri:	5'-AAAATCCATCCATGGCAGCTGCTG-3'
LGALS3BP	İleri:	5'-AGAGAGACGCTGGTGTGGTCT-3'
	Geri:	5'-GCTGGCTGTCAAAGATCTGG-3'
PHLDA1	İleri:	5'-TGCCTGAAAGGGGCAGCTCC-3'
	Geri:	5'-TGATCTGGTGCGGGGCGGA-3'
CAVIN3	İleri:	5'-CAGGACACCGAGGAAGAT-3'
	Geri:	5'-TCAGGCTACACTCTCCATT-3'
TPM1	İleri:	5'-GCCGACGTAGCTTCTCTGAAC-3'
	Geri:	5'-TTTGGGCTCGACTCTCAATGA-3'
CD44	İleri:	5'-GCAGTCAACAGTCGAAGAAGG-3'
	Geri:	5'-TGTCCCTCCACAGCTCCATT-3'

2.6. Total RNA İzolasyonu

İzolasyon için altı kuyucuklu kültür kabına ekilen hücrelerin en az %80 konfluent olmaları beklenmiştir. Ardından hücreleri kaldırmak için 37°C’de üç dakika 1X tripsin muamelesi ((TrypLE™ Select Enzyme, 12563029)) yapılmıştır. Hücrelerin tripsinle kalkmasının ardından, tripsin aktivasyonunu sonlandırmak için hücre hattına göre besi yeri eklenmiştir. Hücreleri pellet haline getirmek için 1200 RPM’de beş dakika santrifüj edilmiştir. Pellet halindeki hücreler 1X PBS ile çözülüp, bahsi geçen koşullarda tekrar santrifüj edilip yeniden pellet haline getirilmiştir. NucleoSpin II kitinin kendi protokolüne uyarak (MACHEREY-NAGEL, #740955,50, GERMANY) pellet halindeki hücrelerden total RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA’ların konsantrasyonunu ve A260/A230 değerlerini ölçmek için Epoch cihazı (Epoch Microplate Spectrophotometer, Biotek, ABD) kullanılmıştır.

2.7. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA’lardan cDNA üretmek için ProtoScript First Strand cDNA sentez kiti (New England Biolabs, ABD) kullanılmıştır. İlk olarak her bir örnek için 1 µg RNA’ya 2 µL OligoDT ve 8 µL nükleaz içermeyen su konarak ilk reaksiyon karışımı hazırlanmıştır ve 70°C’de beş dakika inkübe edilerek denatürasyon yapılmıştır. Ardından her bir reaksiyon karışımına 10 µL M-MuLV reaksiyon karışımı ve 2 µL M-MuLV enzim eklenerek son hacim 20 µL’ye tamamlanıp, cDNA üretimi için 42°C’de bir saat inkübe edilmiştir. Reaksiyon bittikten sonra 80°C’de beş dakika daha inkübe edilerek enzim inaktive hale getirilmiştir.

2.8. Kantitatif Eş Zamanlı PZR

Kantitatif eş zamanlı için PZR GoTaq kPZR master mix (Promega, A6002, ABD) ve onun kendi protokolü kullanılmıştır. Reaksiyonu kurarken her bir ileri ve geri primerden 1 pmol, 0,5 µL kullanılmıştır, final hacim 16 µL olmuştur. Analiz

yapılırken GAPDH referans geni olarak seçilmiştir. Tüm gen ifade sonuçları kendine ait GAPDH geninin ifade seviyelerine göre normalize edilmiştir.

Karşılaştırmalı metot ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) kullanılarak, genlerdeki ifade kat değişimlerinin analizleri yapılmıştır. Amplifikasyon saflığını kontrol etmek için her reaksiyonun erime eğrisi alınmıştır.

Çizelge 2.3. kPZR reaksiyonu koşulları. Deneylerde kullanılan kPZR reaksiyonunun aşamalarıyla birlikte çalışma koşulları aşağıda verilmiştir.

Başlangıç Denatürasyonu	95°C	5 dk.	} (40 siklus)
Denatürasyon	95°C	30 sn.	
Bağlanma	60°C	20 sn.	
Uzama	72°C	1 dk.	
Final Uzama	72°C	5 dk.	

2.9. İstatistiksel Analiz

Deneyler “n=3” olacak şekilde tekrarlanmıştır. Deneylerin istatistiksel analizi için GraphPad (Prism 5.0 - (“Home - GraphPad”, 2022)) yazılımı kullanılmıştır. Sonuçlar deneye göre parametrik ve non-parametrik testler ile (Student t test ve ANOVA) ile analiz edilmiştir. Veriler ortalama (standart sapmalı) olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analizler, $p < 0.05$ anlamlılık düzeyine göre değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

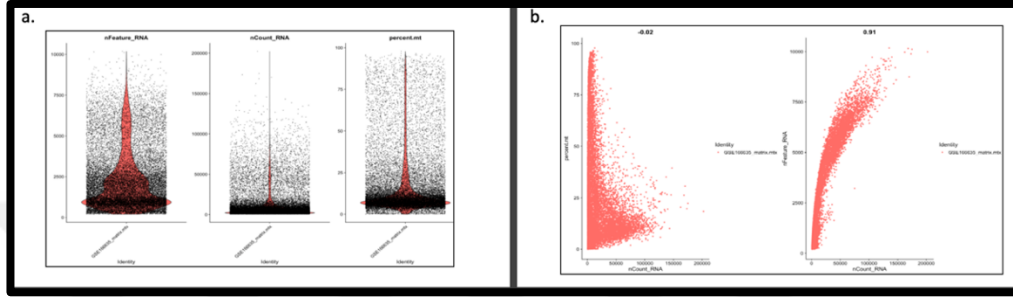
Karaciğer kanser kök hücrelerinin tanımlanmasına katkı sağlamak için aday kök hücre belirteçlerin belirlenmesi hedeflenen bu çalışmada, NCBI'daki (Sayers ve Ark., 2022) halka açık tek hücre RNA dizilimi veri setlerinden ham veri setleri seçilmiştir. Ardından R Studio'daki (R Studio Team, (2020)) Seurat (Hao ve ark., 2021) paketi ile tek hücreli RNA dizilimi analizi yapılmıştır. Analiz sonrasında elde edilen gen ifadelerine bakılarak aday belirteçler belirlenmiştir.

NCBI GEO'dan (Sayers ve Ark., 2022) veri setleri seçilirken, örneklerin hazırlanma sürecinde kullanılan gereç ve yöntemlerden kaynaklanabilecek varyasyonu en aza indirmek için tek hücre elde etme yöntemini ve sekanslama yapılan platformu olabildiğince aynı olmasına dikkat edilmiştir. Tek hücre elde etme yöntemi olarak 10X Genomics'in yöntemi tercih edilmiş olup, sekanslama platformu olarak da Illumina tercih edilmiştir. Ayrıca hücre sayısının fazla olması, GEO'da verilerin hangi türde olduğu, örnek sayısı gibi parametreler de dikkate alındığında ilk başta 10 tane veri seti seçilmiştir. Analiz için normalize edilmiş veriden ziyade ham verinin kullanılması tercih edildiği için dört veri seti elenmiştir. Ardından bu veri setleri içinden dört tanesi (GSE166635, GSE151530, GSE125449 ve GSE180665) analiz için seçilip geriye kalan iki veri seti (GSE107747 ve GSE112271) yedek olarak seçilmiştir. Bu iki veri setinde örnek sayısı düşüktür, iki donörden alınan örnekler veri setini oluşturmuştur. Bu sebepten ötürü, bu veri setleri yedek veri seti olarak karar verilmiştir.

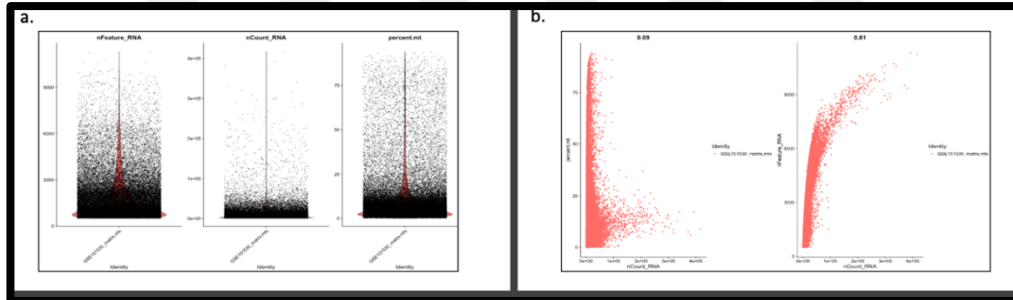
Aday belirteçler belirlendikten sonra belirteçlerin validasyonu için fibrotik karaciğer hücre hattı olan Lx2 ile karaciğer kanser kök hücrelerinin yoğun olduğu Huh7 ve HepG2 hücre hatlarında mRNA düzeyinde gen ifade değişimine bakılmıştır.

3.1 Biyoinformatik Analiz: Tek Hücreli RNA Dizilimi Analizi

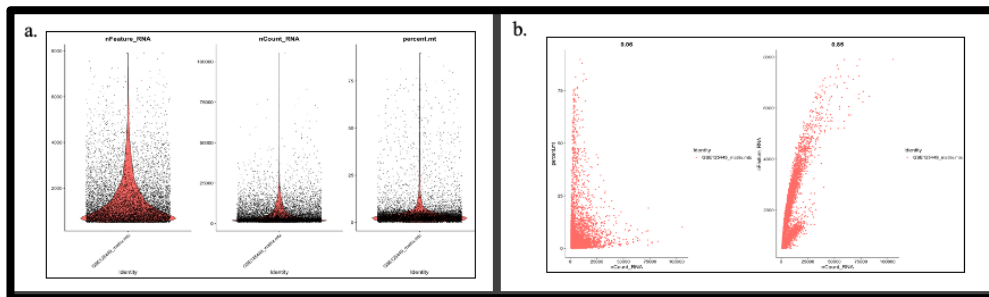
Veri setlerinin R Studio (RStudio Team, (2020))’ya yüklenmesiyle analize başlanmıştır. Analiz boyunca Seurat (Hao ve ark., 2021) paketinin kendi analiz adımları takip edilmiştir. “CreateSeuratObject()” fonksiyonu ile her veri setine özgü objeler oluşturulduktan sonra ön analiz aşamaları (*preprocessing*) yapılmıştır.



Şekil 3.1.1. GSE166635 veri setinin ön analiz grafikleri. a. GSE166635 veri setinin genleri ve genlerin ifadesine karşılık gelen sinyallerin sayısı yukarıda verilmiştir. b. Gen sayısı ile gen ifade miktarının grafiği verilmiştir.

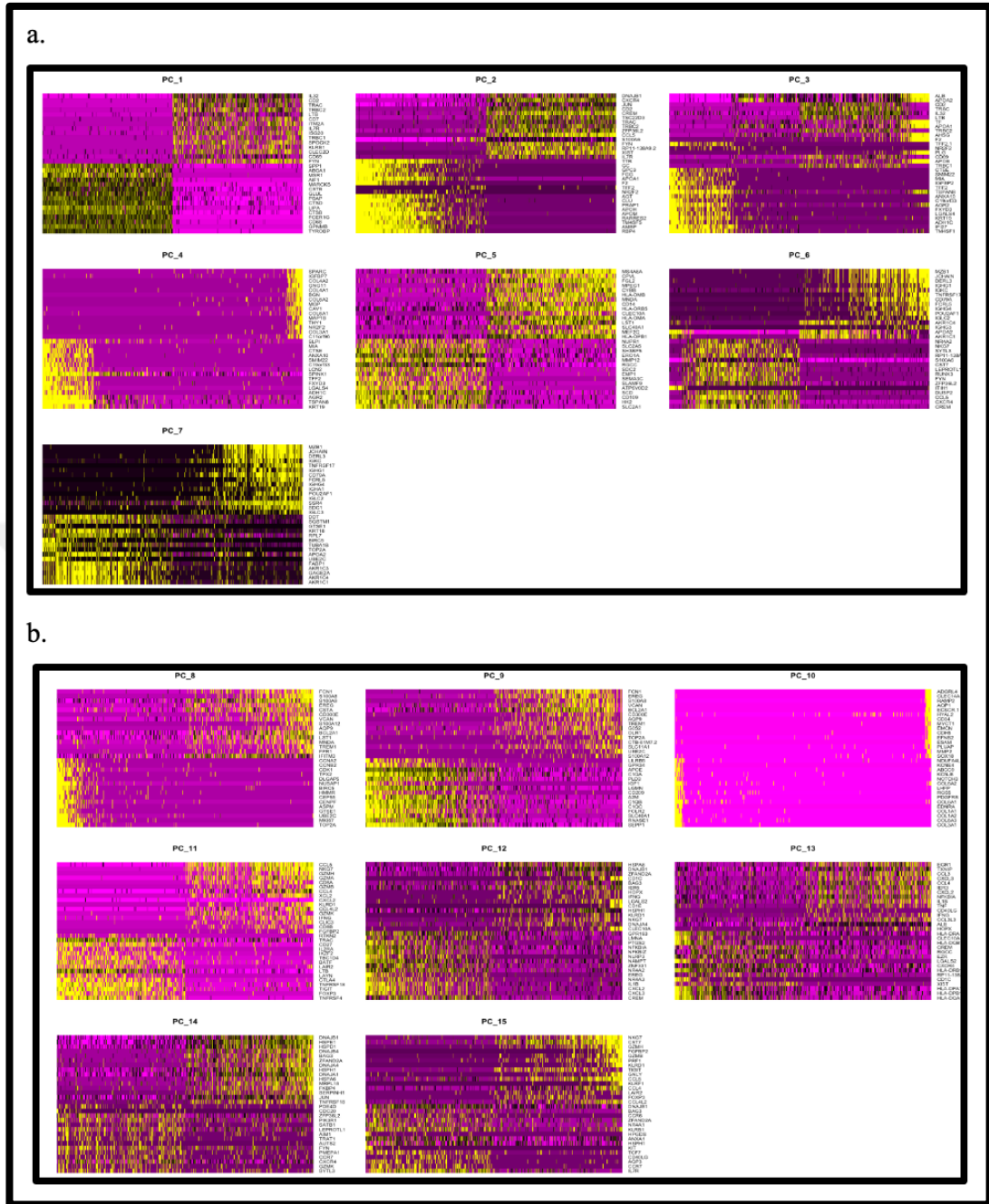


Şekil 3.1.2. GSE151530 veri setinin ön analiz grafikleri. a. GSE151530 veri setindeki genleri ve genlerin ifadesine karşılık gelen sinyallerin sayısı yukarıda verilmiştir. b. Gen sayısı ile gen ifade miktarının grafiği verilmiştir.

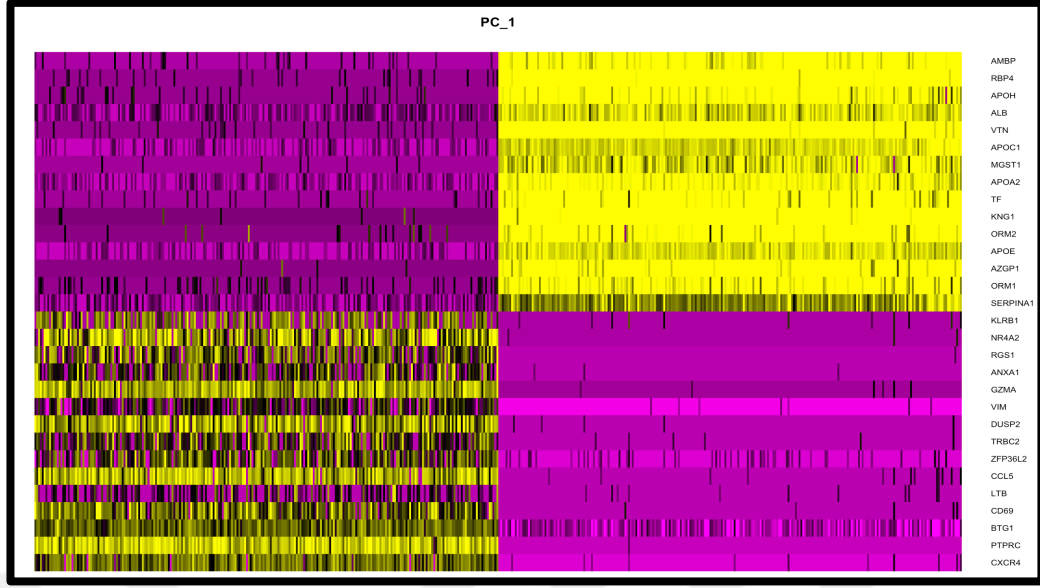


Şekil 3.1.3. GSE125449 veri setinin ön analiz grafikleri. a. GSE125449 veri setindeki genleri ve genlerin ifadesine karşılık gelen sinyallerin sayısı yukarıda verilmiştir. b. Gen sayısı ile gen ifade miktarının grafiği verilmiştir.

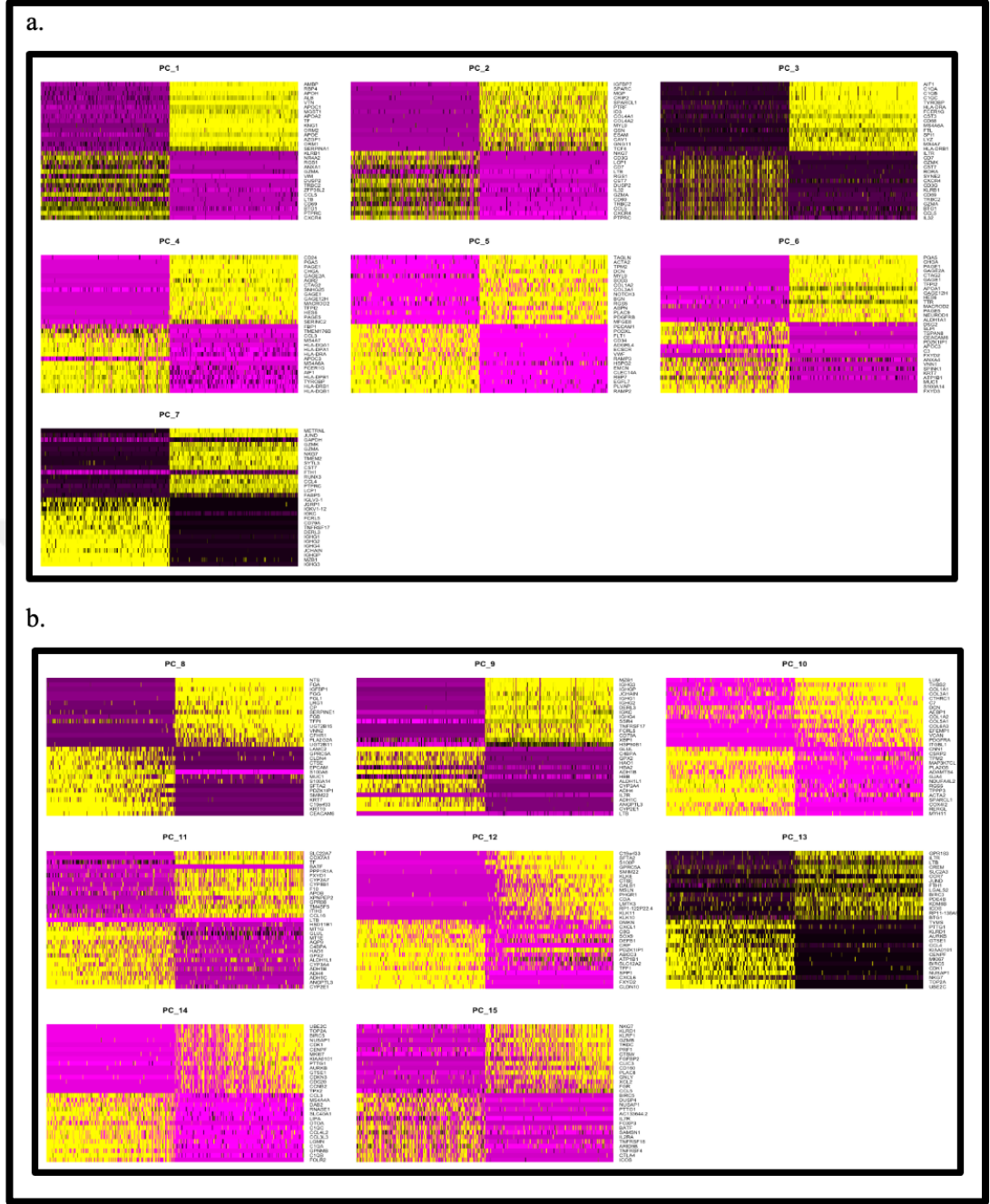
Ön analiz adımları tamamlandıktan sonra veri setleri normalize edilmiştir. Normalizasyon için “LogNormalize()” fonksiyonu kullanılmıştır. Veri setleri normalize edildikten sonra çok değişkenlik gösteren genlerin bulunması için “FindVariableFeatures()” fonksiyonu kullanılmıştır. Bu aşamadan sonra verileri az boyutlu bir ortamda görüntüleyebilmek için Temel Bileşenler Analizi (TBA) yapılmıştır. “RunPCA()” fonksiyonu ile lineer küçültme yapılmasıyla TBA yapılır. Temel bileşenlerin belirlenmesi için çok önemli bir adımdır. TBA’nın sonucu çok farklı şekilde projekte etmek mümkündür. “*Principal Component*” yani Temel Bileşen anlamına gelen PC kısaltması kullanılmıştır. En önemli temel bileşen olarak kabul edilen “Temel Bileşen 1” yani “PC1”den “PC15” e kadar olan temel bileşenler “DimHeatmap()” fonksiyonu ile ısı haritası olarak görüntülenmiştir.



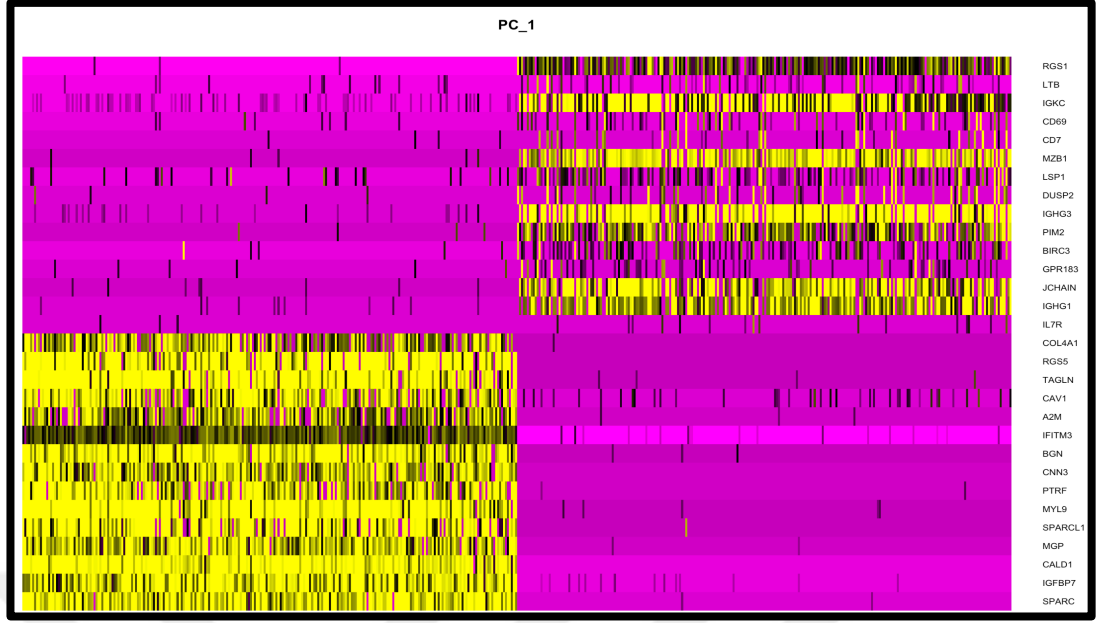
Şekil 3.1.4. GSE166635 veri setinin TBA analizinin ısı haritası. a. GSE166635 veri setinin Temel Bileşen 1’den (PC1) Temel Bileşen 7’ye (PC7) kadar olan ısı haritaları yukarıdadır. b. GSE166635 veri setinin Temel Bileşen 7’den (PC7) Temel Bileşen 15’ye (PC15) kadar olan ısı haritaları yukarıdadır.



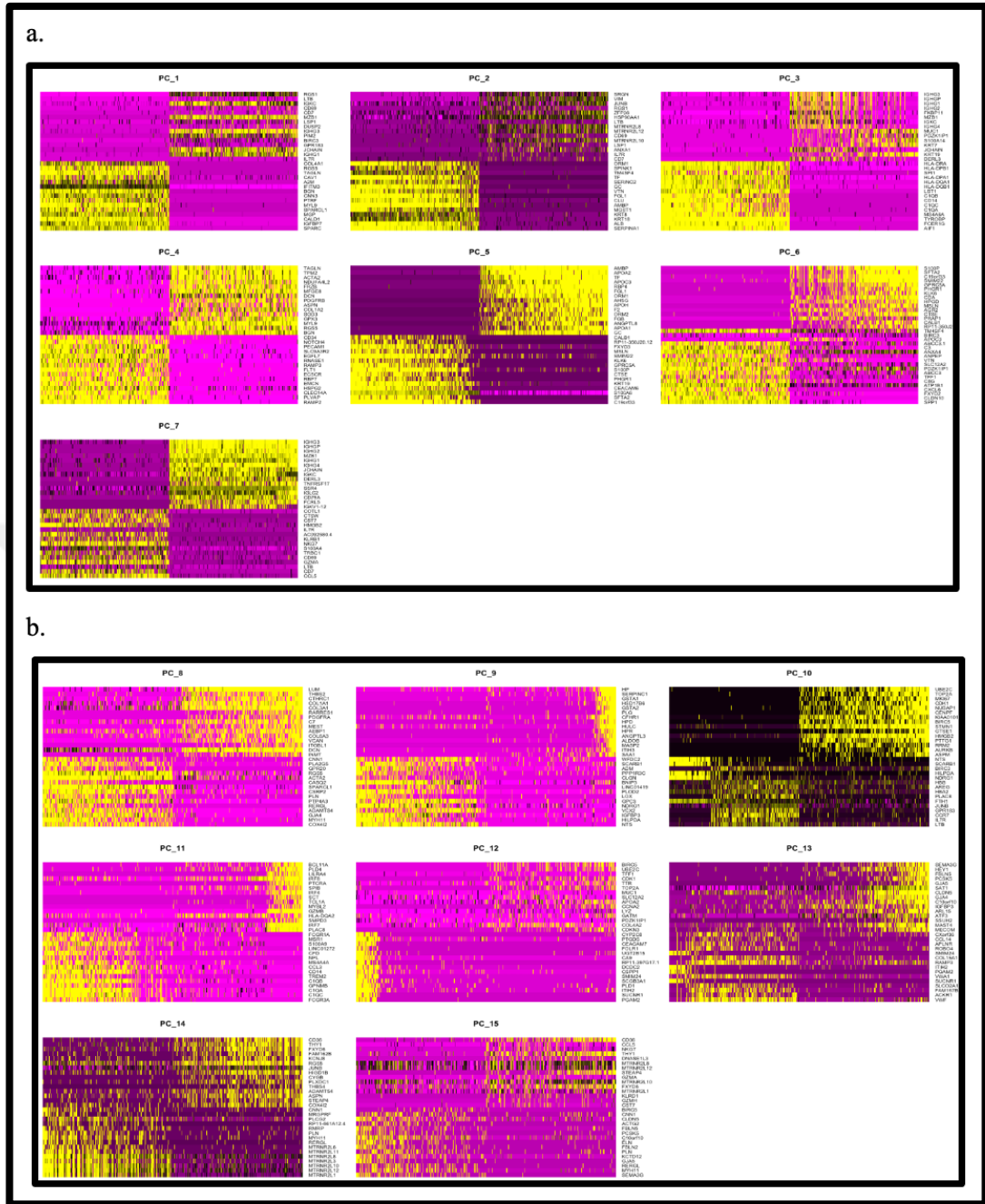
Şekil 3.1.5. GSE151530 veri setine ait Temel Bileşen 1'in (PC1) ısı haritası.



Şekil 3.1.6. GSE151530 veri setinin TBA analizinin ısı haritası. a. GSE151530 veri setinin Temel Bileşen 1’den (PC1) Temel Bileşen 7’ye (PC7) kadar olan ısı haritaları yukarıdadır. b. GSE151530 veri setinin Temel Bileşen 7’den (PC7) Temel Bileşen 15’ye (PC15) kadar olan ısı haritaları yukarıdadır.



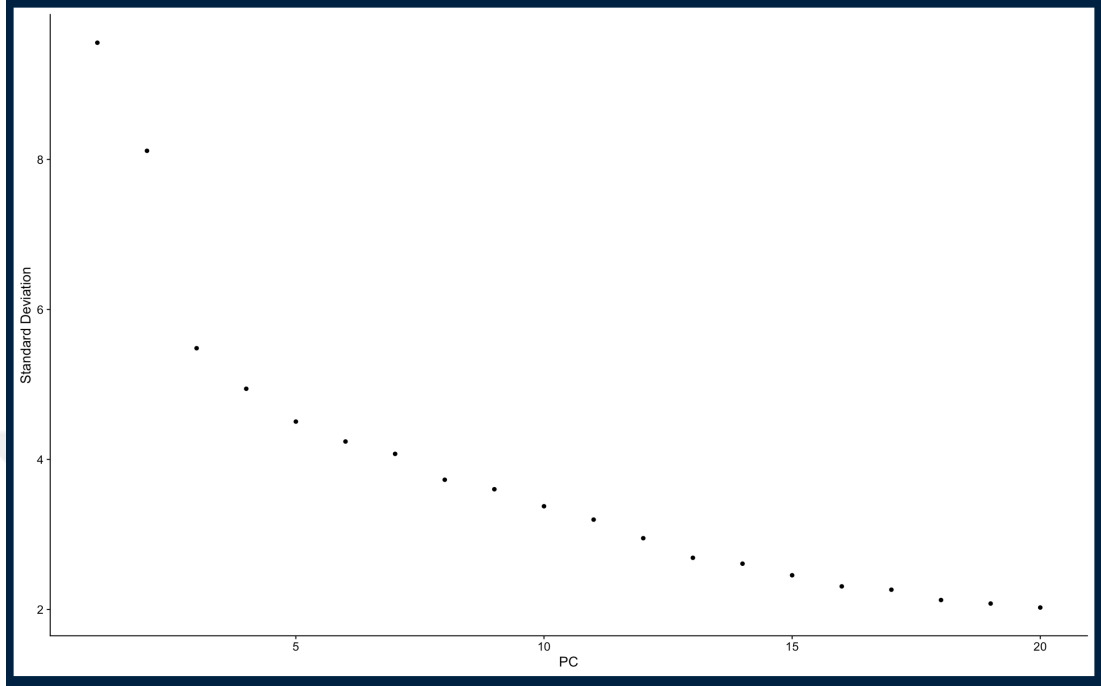
Şekil 3.1.7. GSE125449 veri setine ait Temel Bileşen 1'in (PC1) ısı haritası.



Şekil 3.1.8. GSE125449 veri setinin TBA analizinin ısı haritası. a. GSE125449 veri setinin Temel Bileşen 1’den (PC1) Temel Bileşen 7’ye (PC7) kadar olan ısı haritaları yukarıdadır. b. GSE125449 veri setinin Temel Bileşen 7’den (PC7) Temel Bileşen 15’ye (PC15) kadar olan ısı haritaları yukarıdadır.

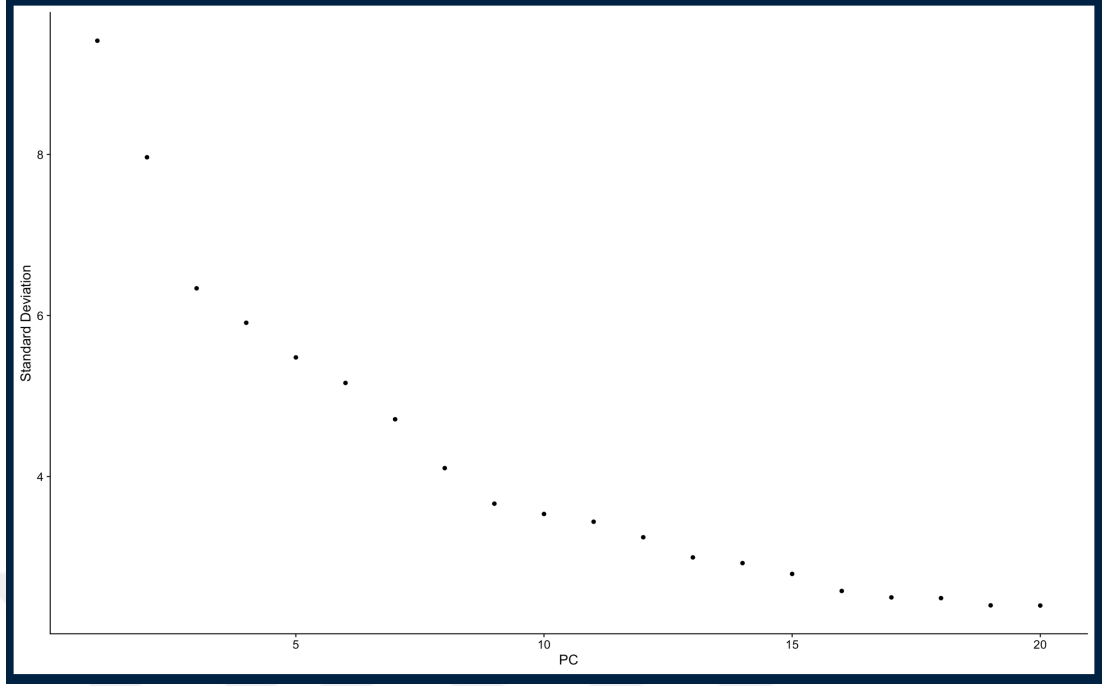
Temel bileşenler belirlendikten sonra teknik gürültüyü azaltılmak ve hücreler arasında varyansa katkısı olmayan bileşenlerin analizden çıkarılması için “ElbowPlot()” fonksiyonu kullanılmıştır. Bu grafiklerde, grafik trendinin x eksenine paralel gitmeye başladığı yere karşılık gelen temel bileşen belirlenir ve ondan sonra

gelen temel bileşenler analizin devamı için kullanılmaz. Bu bileşenlerin varyasyona katkısı çok azdır.



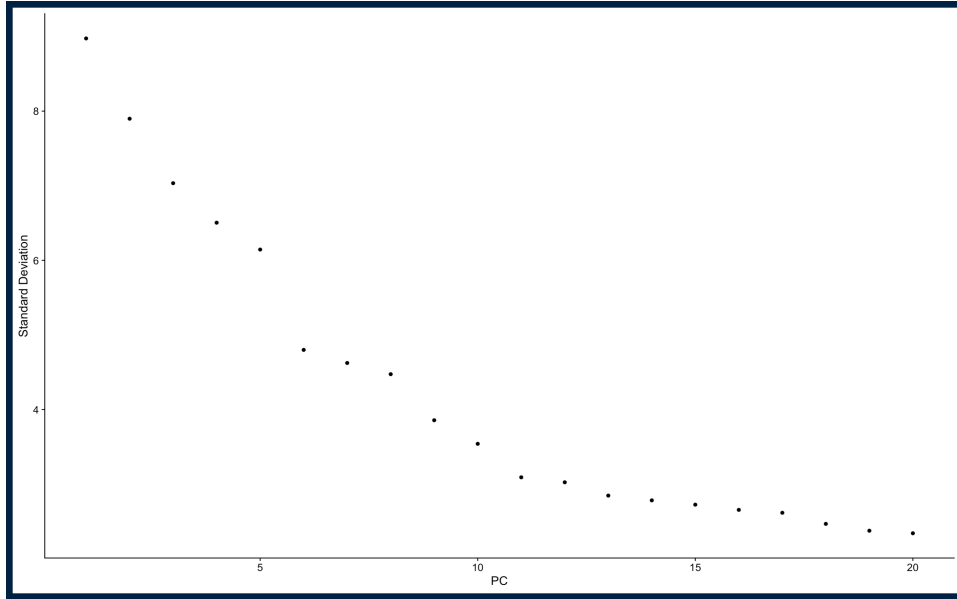
Şekil 3.1.9. GSE166635 veri setinin temel bileşenlerinin dirsek grafiği.

Bu grafiğe göre GSE166635 için PC17 yani temel bileşen 17'den sonraki gelen PC'lerin varyasyona katkısı yok denecek kadar azdır. Bu sebeple analize PC1 ile PC17 arasındaki temel bileşenlerle devam edilecektir.



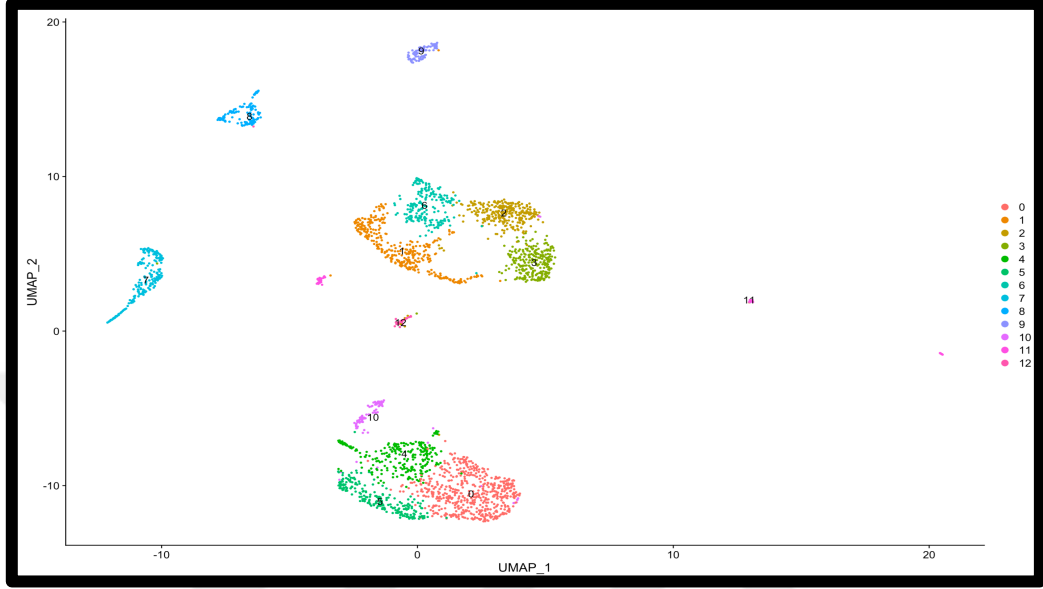
Şekil 3.1.10. GSE151530 veri setinin temel bileşenlerinin dirsek grafiği.

Bu grafiğe göre GSE151530 için PC15 yani temel bileşen 15'ten sonraki gelen PC'lerin varyasyona katkısı yok denecek kadar azdır. Bu sebeple analize PC1 ile PC15 arasındaki temel bileşenlerle devam edilecektir.



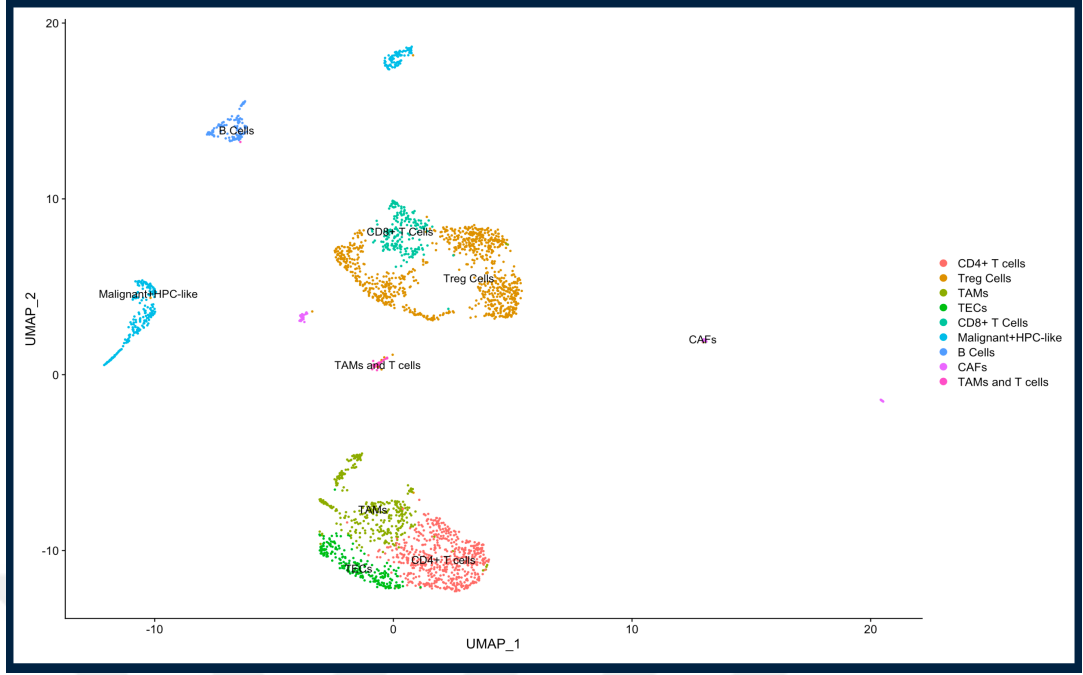
Şekil 3.1.11. GSE125449 veri setinin temel bileşenlerinin dirsek grafiği.

Bu grafiğe göre GSE125449 için PC15 yani temel bileşen 15'ten sonraki gelen PC'lerin varyasyona katkısı yok denecek kadar azdır. Bu sebeple analize PC1 ile PC15 arasındaki temel bileşenlerle devam edilecektir.

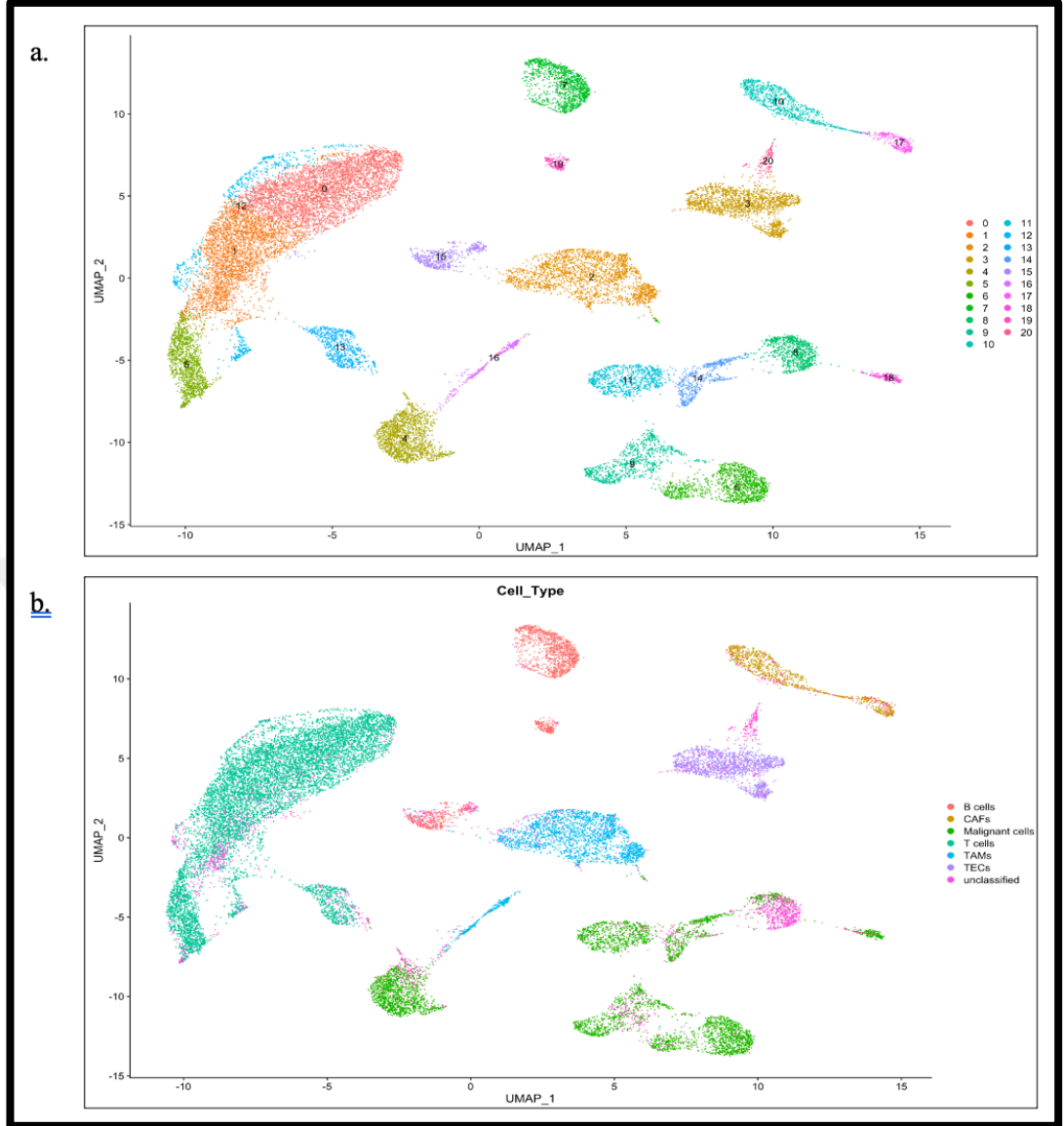


Şekil 3.1.12. GSE166635 veri setine ait UMAP grafiği. Bu grafikte hücreler ifade profillerine göre 12 kümeye ayrılmışlardır. Benzer özelliklerdeki hücreler benzer kümelere toplanmıştır.

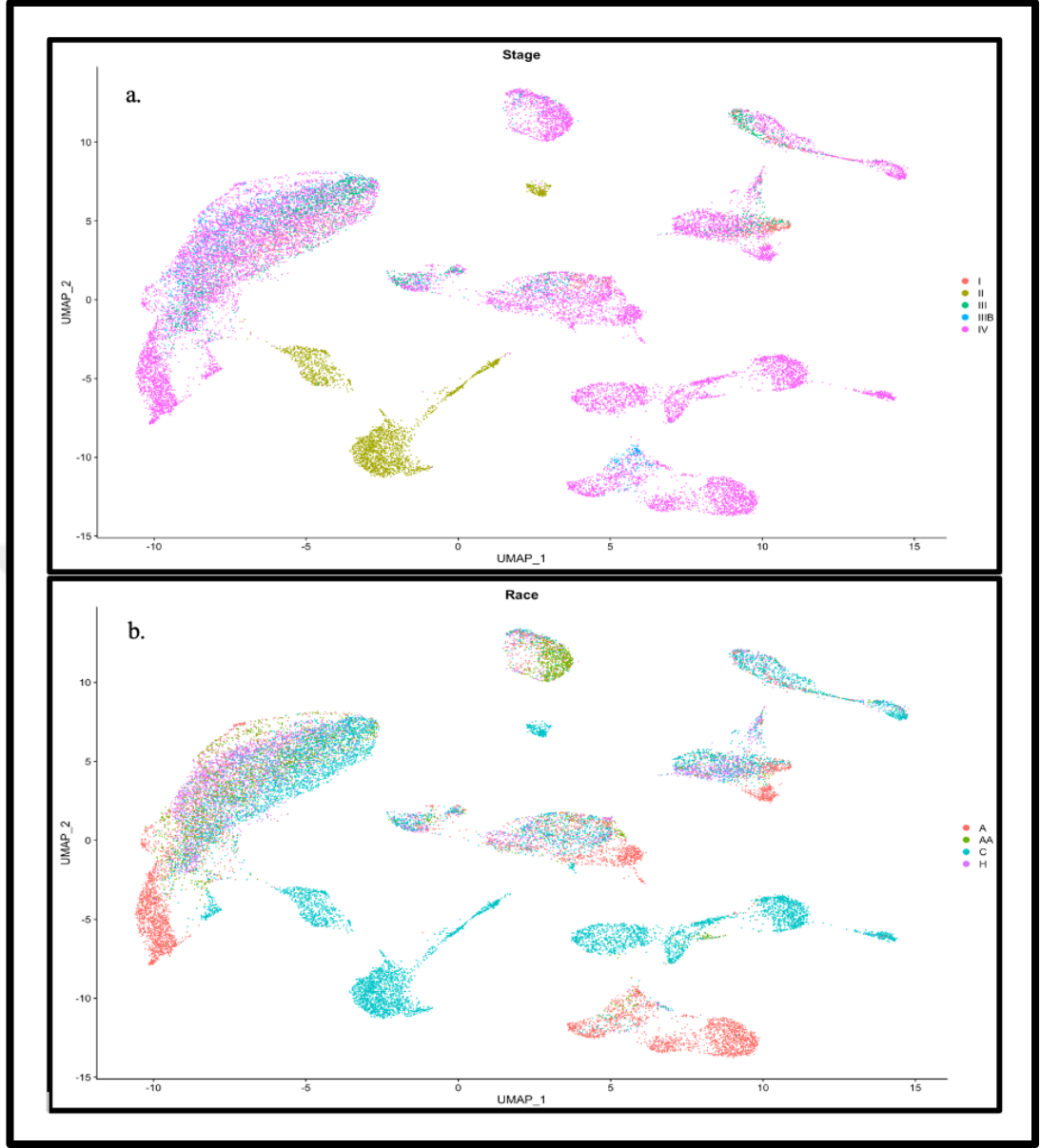
Hücre grupları tayin edilirken T hücreleri için CD4, CD3E, CD3D, CD3G, CD8A, CD8B belirteçleri; B hücreleri için CD79A, SLAMF7, BLNK, FCRL5 belirteçleri; timik epitelyal hücreleri (TEC) için PECAM1, ENG belirteçleri; kanser-ilişkili fibroblast hücreleri (CAF) için COL1A2, BGN, ACTA2 belirteçleri; tümör ilişkili makrofajlar (TAM) için CD14, CD163, C1QA belirteçleri, HCC hücreleri içinse CD133, CD45, CD90 belirteçleri kullanılmıştır.



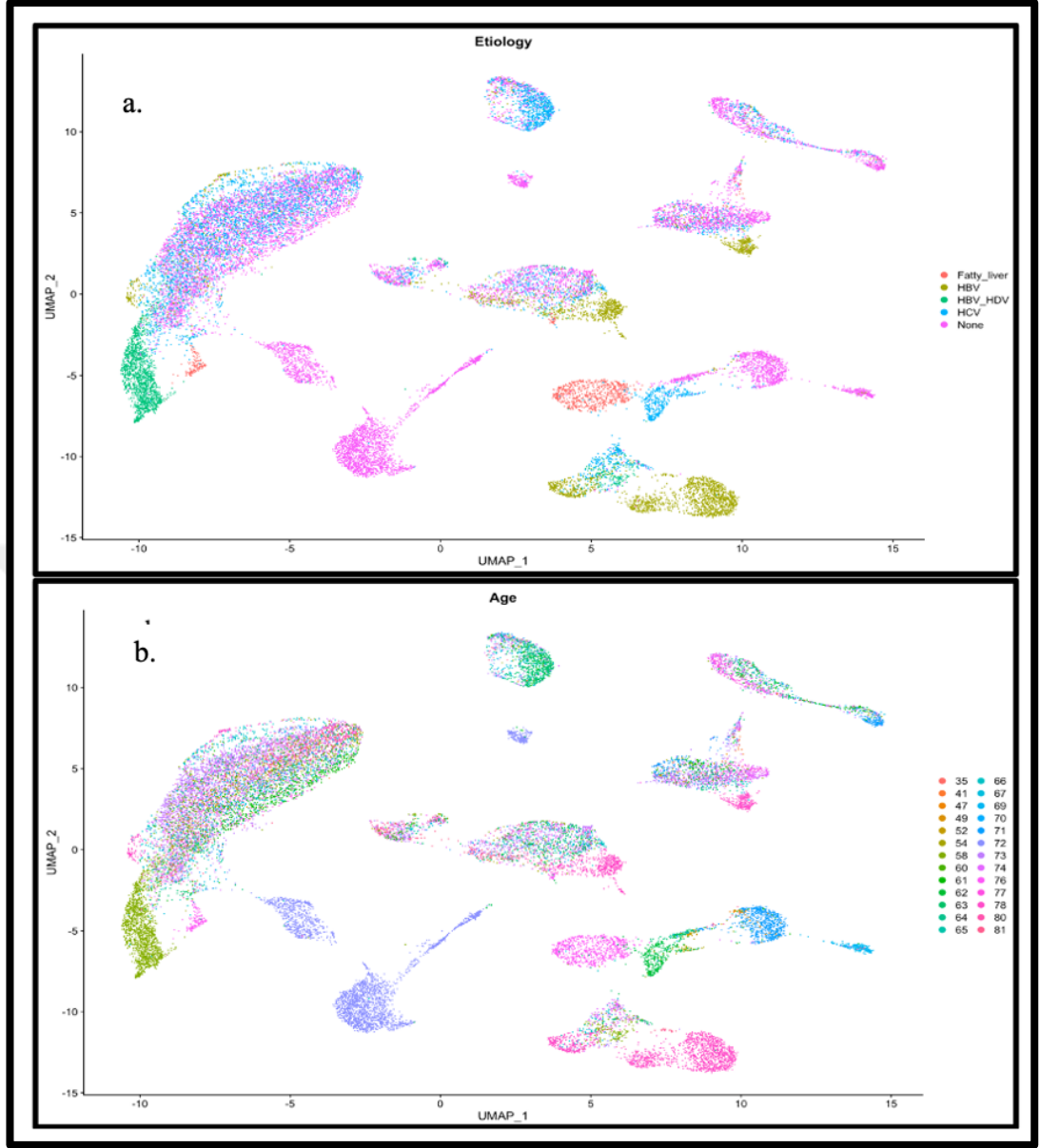
Şekil 3.1.13. GSE166635 veri setine ait, hücre türlerinin bilgisinin UMAP üzerine projekte edilmiş grafiği. Bu projeksiyon yapılırken literatürde kanıtlanmış belirteçlerden yararlanılmıştır. *CD4+ T cells*: CD4+ T hücreleri, *CD8+ T cells*: CD8+ T hücreleri, *B Cells*: B hücreleri, *TECs*: timik epitelyal hücreleri, *CAFs*: kanser-ilişkili fibroblast hücreleri, *TAMs*: tümör ilişkili makrofajlar, *Treg Cells*: Düzenleyici T hücreleri, *Malignant+HPC-like*: Malign ve hepatik progenitör benzeri hücre, *TAMs and T cells*: tümör ilişkili makrofajlar ile T hücreleri.



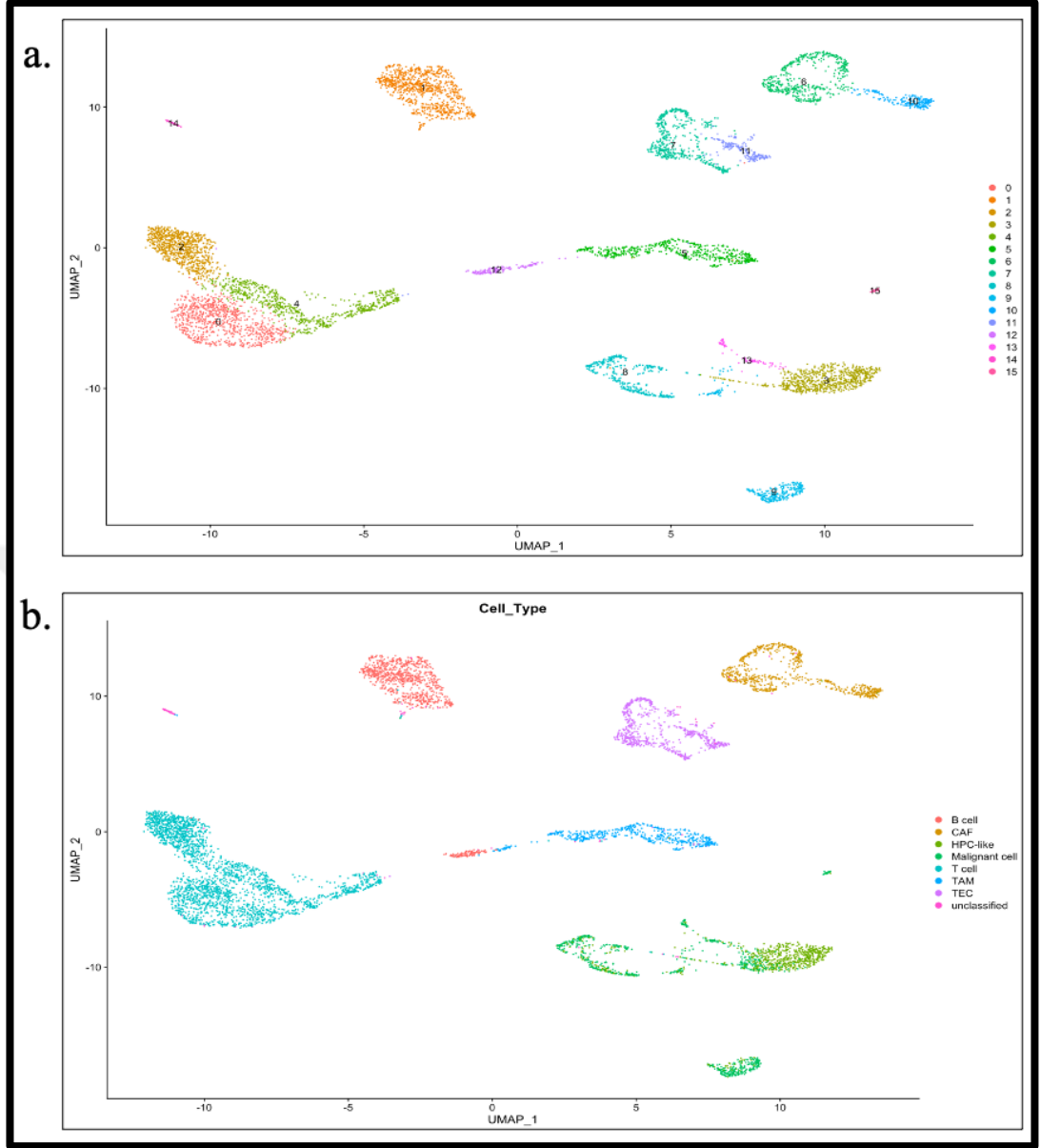
Şekil 3.1.14. GSE151530 veri setine ait UMAP grafikleri. a. GSE151530 veri setine ait UMAP yukarıda verilmiştir. Bu aşamaya göre hücreler ifade profillerine göre 20 kümeye ayrılmışlardır. Benzer özelliklerdeki hücreler benzer kümelere toplanmıştır. b. GSE151530 veri setine ait, hücre türlerinin bilgisinin UMAP üzerine projekte edilmiş hali yukarıda verilmiştir. Bu projeksiyon yapılırken literatürde kanıtlanmış belirteçlerden yararlanılmıştır. *CD4+ T cells*: CD4+ T hücreleri, *CD8+ T cells*: CD8+ T hücreleri, *B Cells*: B hücreleri, *TECs*: timik epitelyal hücreleri, *CAFs*: kanser-ilişkili fibroblast hücreleri, *TAMs*: tümör ilişkili makrofajlar, *Treg Cells*: Düzenleyici T hücreleri, *Malignant+HPC-like*: Malign ve hepatik progenitör benzeri hücre, *TAMs and T cells*: tümör ilişkili makrofajlar ile T hücreleri.



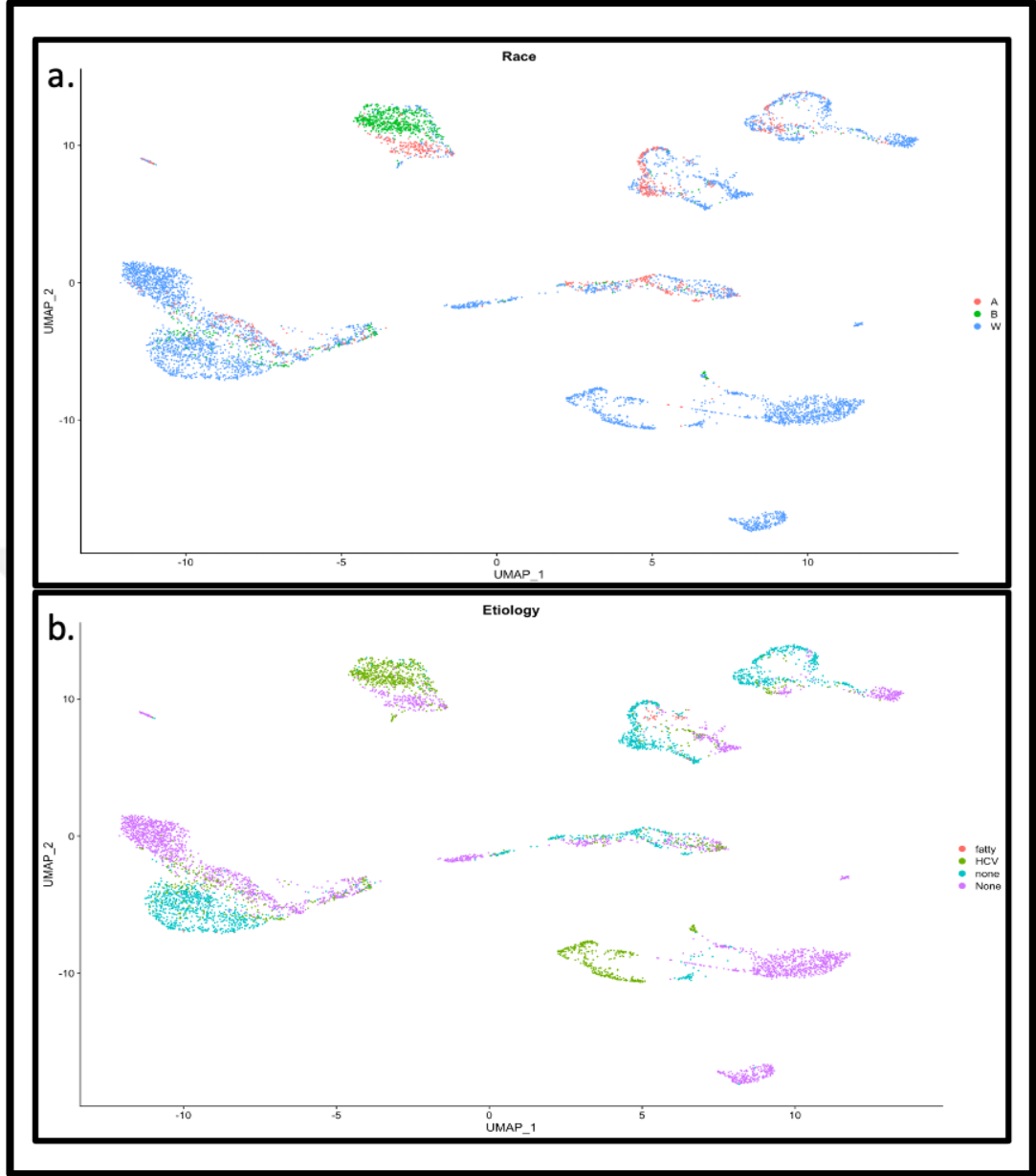
Şekil 3.1.15. GSE151530 veri setine ait ek bilgilerin UMAP grafiği üzerine projekte edilmiş grafikleri. GSE151530 veri setine ait UMAP grafiği üzerine a. kanserin aşaması, b. donörlerin ırkına ait bilgiler projekte edilmiştir.



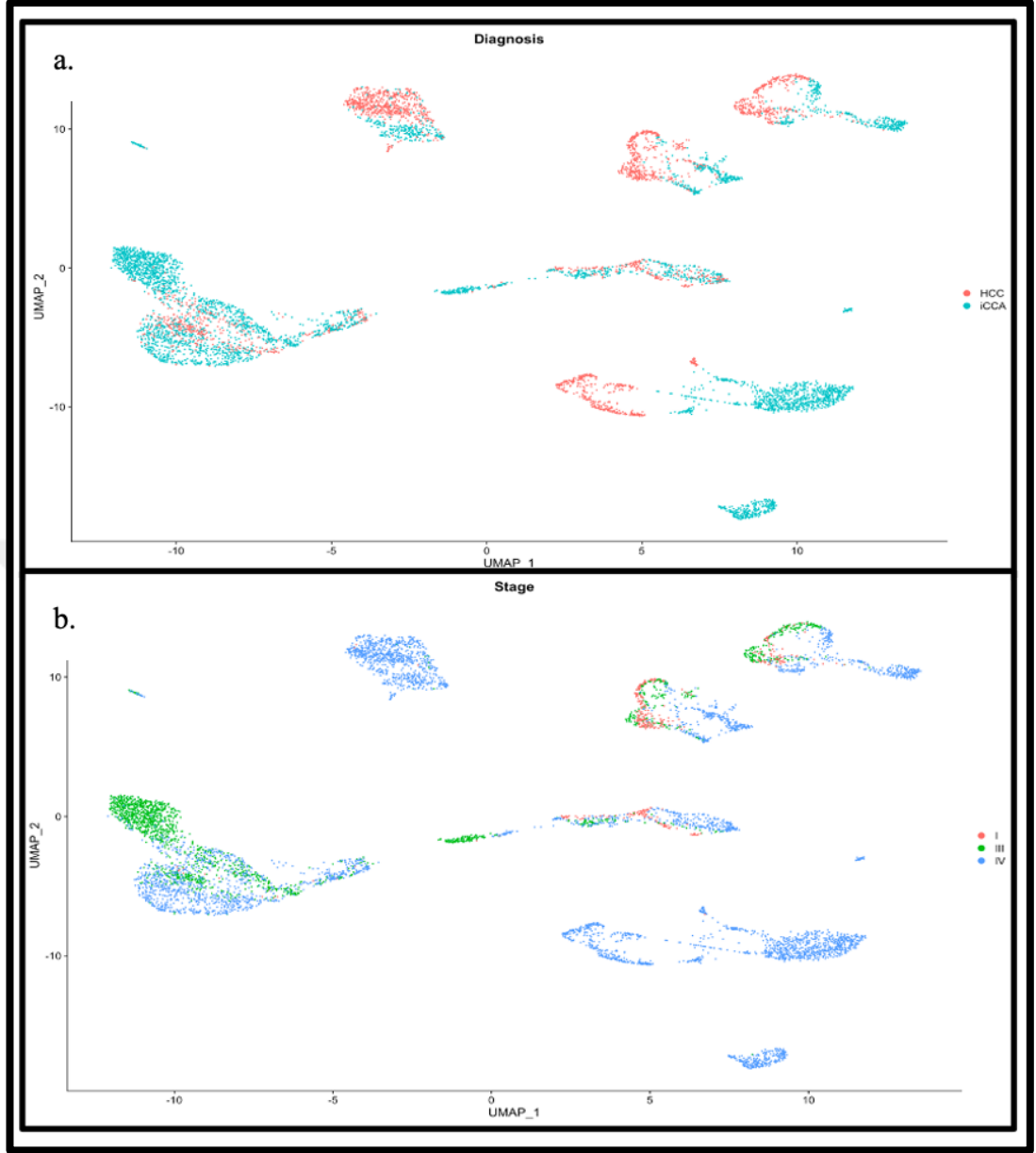
Şekil 3.1.16. GSE151530 veri setine ait ek bilgilerin UMAP grafiği üzerine projekte edilmiş grafikleri. GSE151530 veri setine ait UMAP grafiği üzerine a. donörlerin sahip olduğu diğer karaciğer hastalıkları, b. donörlerin yaşına ait bilgiler projekte edilmiştir.



Şekil 3.1.17. GSE125449 veri setine ait UMAP grafikleri. a. GSE125449 veri setine ait UMAP yukarıda verilmiştir. Bu aşamaya göre hücreler ifade profillerine göre 15 kümeye ayrılmışlardır. Benzer özelliklerdeki hücreler benzer kümelere toplanmıştır. b. GSE125449 veri setine ait, hücre türlerinin bilgisinin UMAP üzerine projekte edilmiş hali yukarıda verilmiştir. Bu projeksiyon yapılırken literatürde kanıtlanmış belirteçlerden yararlanılmıştır. *CD4+ T cells*: CD4+ T hücreleri, *CD8+ T cells*: CD8+ T hücreleri, *B Cells*: B hücreleri, *TECs*: timik epitelyal hücreleri, *CAFs*: kanser-ilişkili fibroblast hücreleri, *TAMs*: tümör ilişkili makrofajlar, *Treg Cells*: Düzenleyici T hücreleri, *Malignant+HPC-like*: Malign ve hepatik progenitör benzeri hücre, *TAMs and T cells*: tümör ilişkili makrofajlar ile T hücreleri.

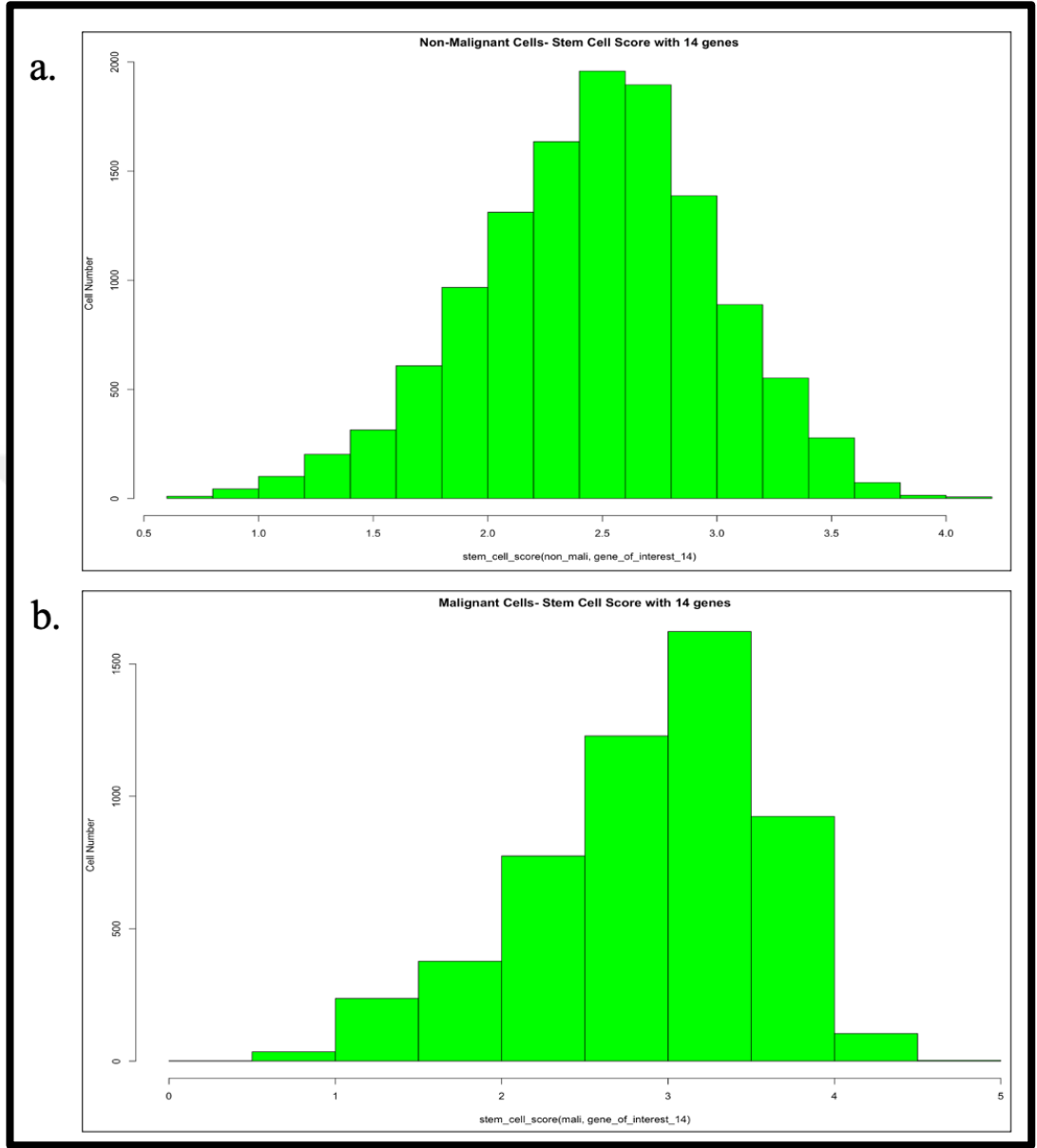


Şekil 3.1.18. GSE125449 veri setine ait, hücre türlerinin bilgisinin UMAP üzerine projekte edilmiş grafikleri. GSE125449 veri setine ait UMAP grafiği üzerine a. donörlerin ırkı, b. donörlerin sahip olduğu diğer karaciğer hastalıklarına ait bilgiler projekte edilmiştir.

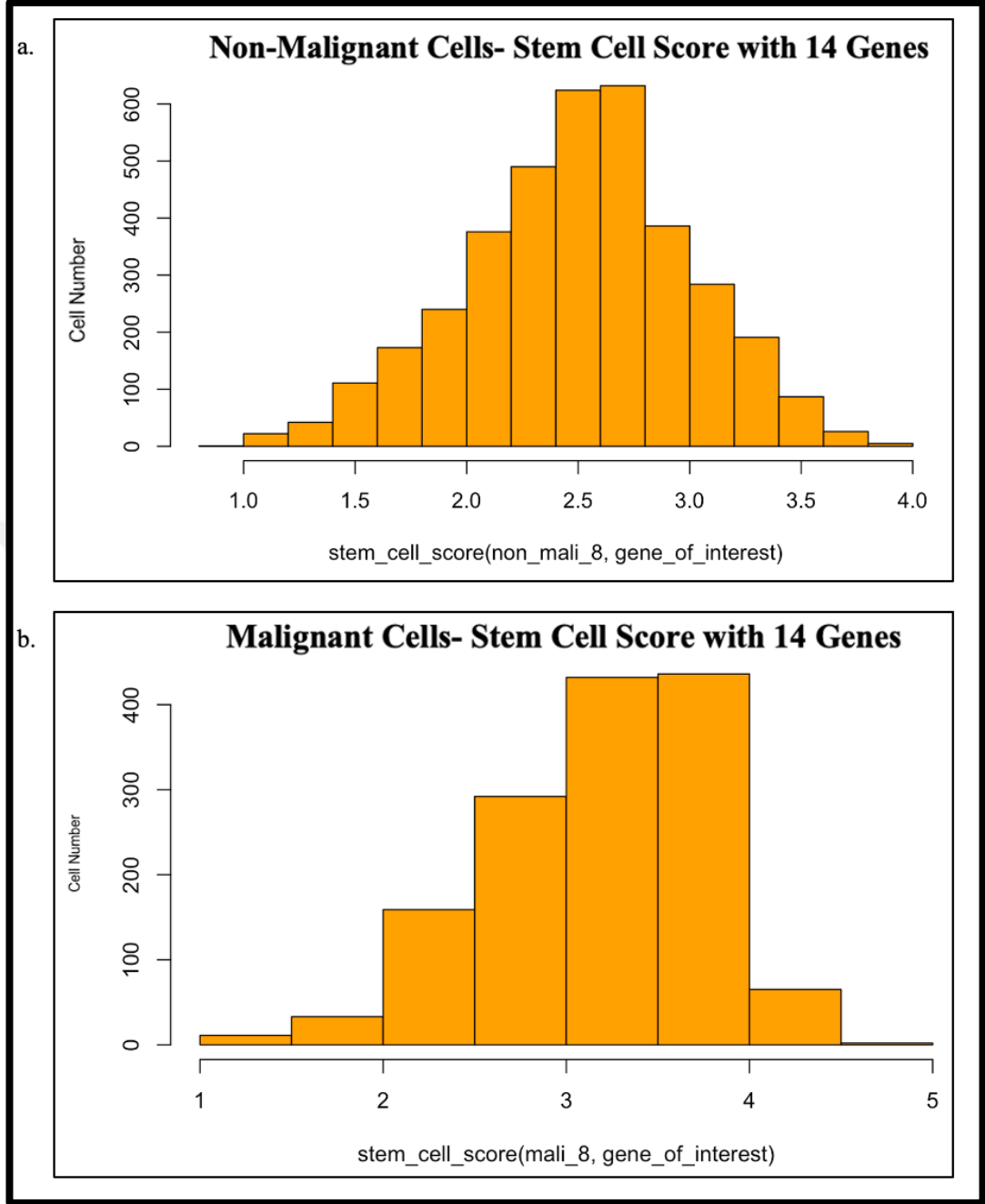


Şekil 3.1.19. GSE125449 veri setine ait, hücre türlerinin bilgisinin UMAP üzerine projekte edilmiş grafikleri. GSE125449 veri setine ait UMAP grafiği üzerine a. donörlerin ırkı, b. donörlerin sahip olduğu diğer karaciğer hastalıklarına, c. hepatosellüler kanser olup olmadığı, d. kanserin aşamasına ait bilgiler projekte edilmiştir.

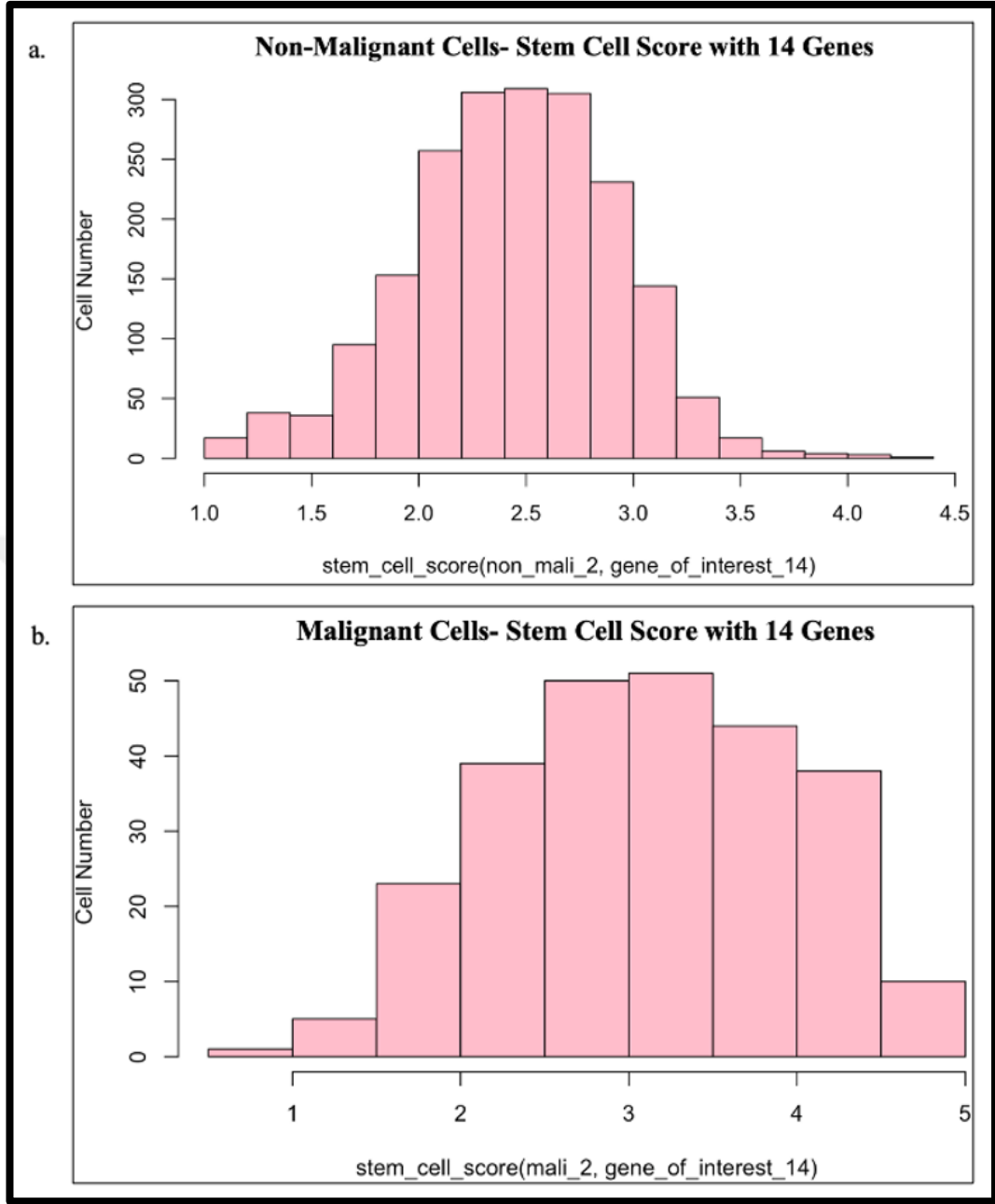
Hücreler kümelenip, hücre türleri kümelere atandıktan sonra malign hücrelerin kümesi ile malign olmayan hücrelerin kümeleri ayrıştırılmıştır. Bu ayrıştımdan sonra malign hücreler ile malign olmayan hücrelerin “Kanser Kök Hücre Skoru” hesaplanmıştır. Bu skor hesaplamasına göre skoru 3,75’ten büyük olan hücreler karaciğer kanser kök hücresi olarak kabul edilip, analize devam edilmiştir. Hesaplanan skorlar çubuk grafiği ile gösterilmiştir.



Şekil 3.1.20. GSE151530'a ait kök hücre skor grafikleri. GSE151530'nin a. malign olmayan hücrelerine ait, b. malign hücrelerine ait kök hücre skorlarının çubuk grafiği yukarıda gösterilmiştir.



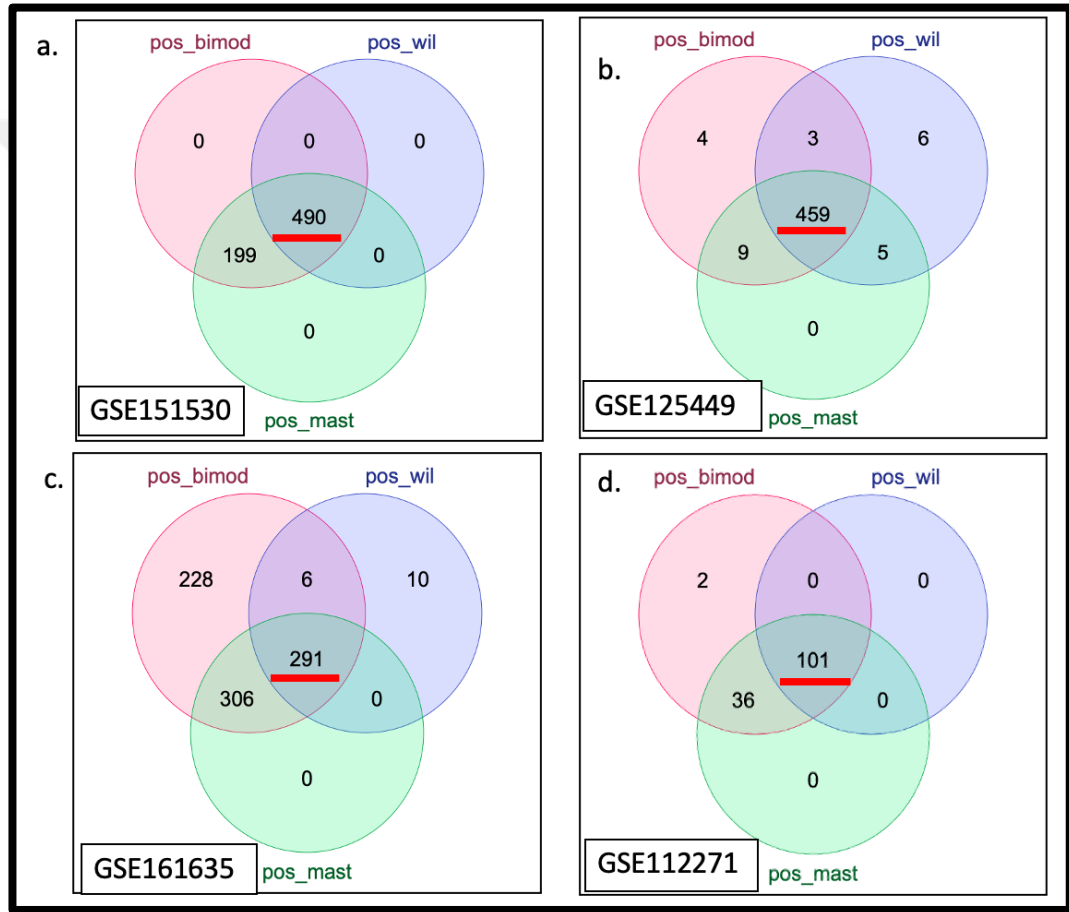
Şekil 3.1.21. GSE125449'a ait kök hücre skor grafikleri. GSE125449'a ait a. malign olmayan hücrelerine ait, b. malign hücrelerine ait kök hücre skorlarının çubuk grafiği yukarıda gösterilmiştir.



Şekil 3.1.22. GSE166635'e ait kök hücre skor grafikleri. GSE166635'e ait a. malign olmayan hücrelerine ait, b. malign hücrelerine ait kök hücre skorlarının çubuk grafiği yukarıda gösterilmiştir.

Kanser kök hücre olarak seçilen hücreler gruplandırılıp etiketlendikten sonra, aday belirteçlerin bulunması için “FindAllMarkers()” fonksiyonu tekrar kullanılmıştır. Bu fonksiyon kendi içinde gömülü birkaç farklı hesaplama yöntemi barındırır. Analizi güçlendirmek için bu fonksiyon kullanılırken üç farklı hesaplama yöntemi kullanılmıştır: Wilcoxon, bimod ve MAST. Wilcoxon yöntemi, Wilcoxon Rank Sum testi kullanarak iki hücre grubu arasında diferansiyel olarak ifade edilen

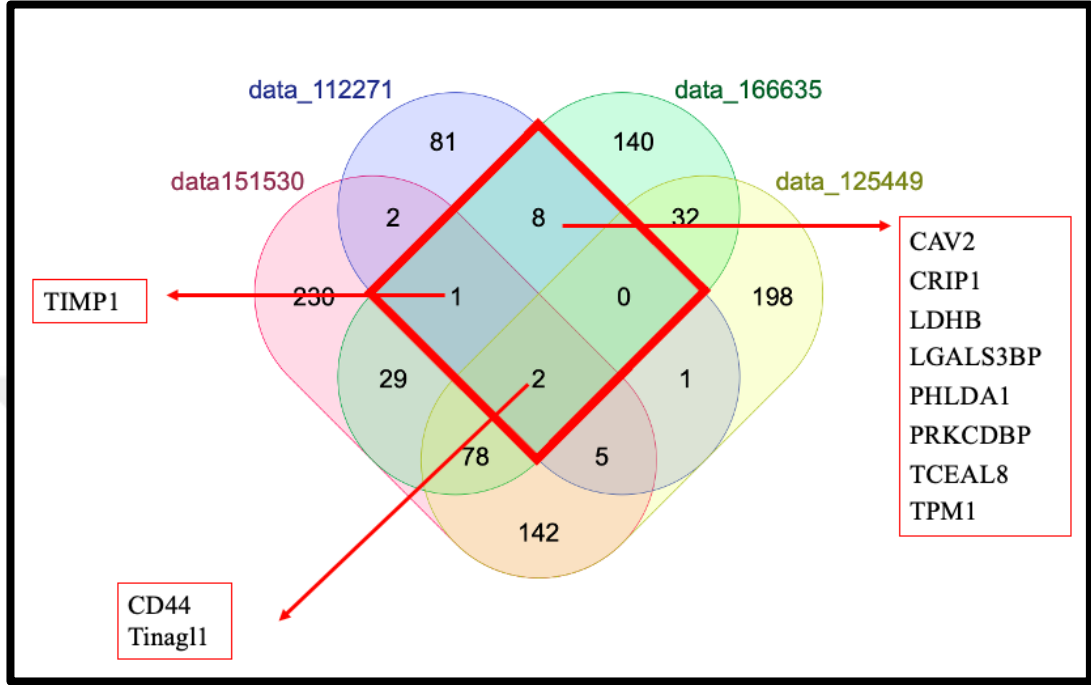
genleri tanımlar. Bimod yöntemi ise tek hücreli gen ekspresyonu için olasılık-oran testidir. MAST yönteminde ise bir engel modeli kullanılarak iki hücre grubu arasında diferansiyel olarak ifade edilen genler tanımlanır. Üç farklı yöntemle belirteç genler bulunduğundan sonra her veri seti için bu genlerin kesişimi alınmıştır ve üçünde de ortak olan genler o veri setine ait belirteç olarak belirlenmiştir. Bu analiz sonucunda GSE151530 için 490 gen, GSE125449 için 459 gen, GSE166635 için 291 gen ve GSE112271 için 101 gen belirteç olarak belirlenmiştir. (Şekil 3.1.23)



Şekil 3.1.23. Her veri setine ait belirteç gen sayısı şemaları. Wilcoxon, bimod ve MAST yöntemleri ile belirlenen, a. GSE151530, b. GSE125449, c. GSE166635 ve d. GSE112271 veri setlerine ait belirteç genlerin sayısı yukarıda gösterilmiştir.

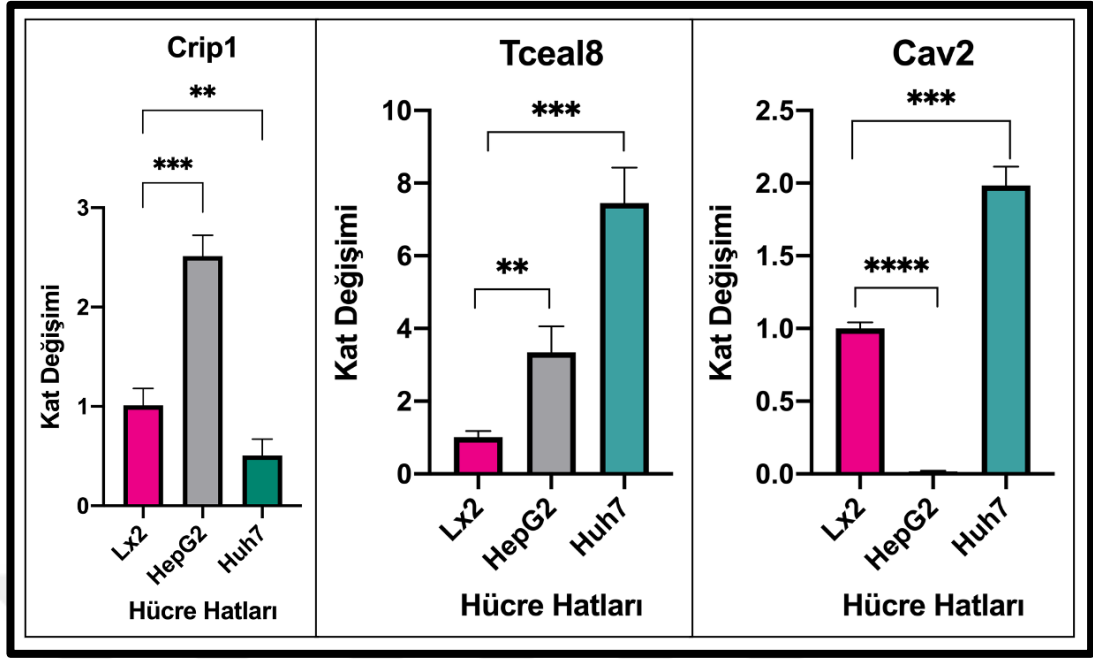
Her bir veri setine ait belirteç genler belirlendikten sonra dört veri setinde de ortak olan belirteçlerin kesişimi alınarak hepsinde ortak olan belirteçler belirlenmiştir. Bunun sonucunda hepsinde ortak olan genler CD44 ve Tinagl1'dir. (Şekil 3.1.24.) GSE112271, GSE151530 ve GSE166635'te ortak olan tek gen Timp1 genidir.

GSE166635 ve GSE112271’de ortak olan genler: Cav2, Crip1, Ldhb, Lgals3bp, Phlda1, Prkcdbp, Tceal8 ve Tpm1’dir. Bu genlerin ifadelerinin mRNA düzeyinde kontrolü kPZR ile yapılmıştır.



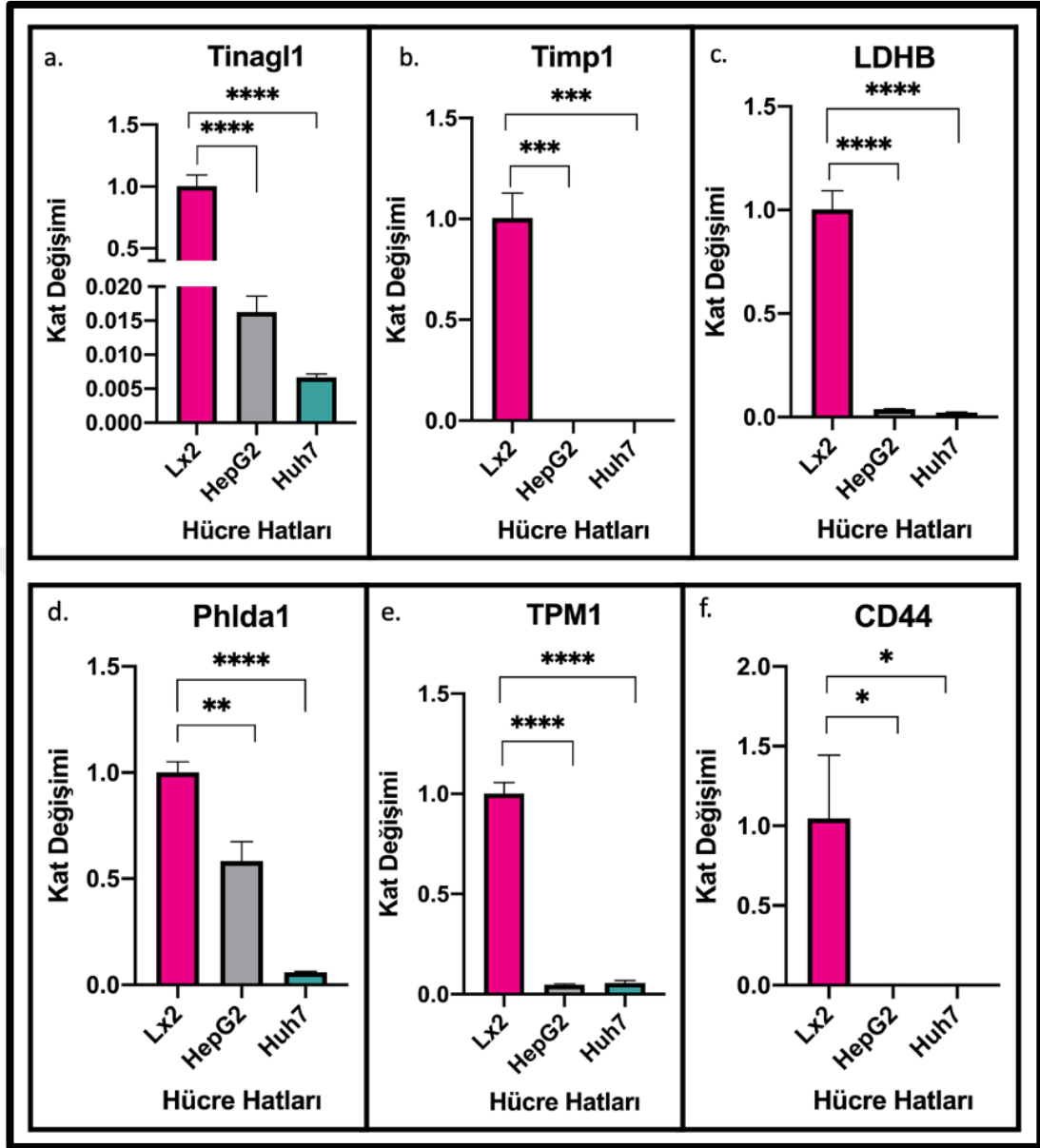
Şekil 3.1.24. Her veri setine ait belirteç genlerin kesişim şeması. Wilcoxon, bimod ve MAST yöntemleri ile belirlenen, GSE151530, GSE125449, GSE166635 ve GSE112271 veri setlerine ait belirteç genlerin sayısı yukarıda gösterilmiştir.

3.2 Validasyon Deneyleri



Şekil 3.2.1. Aday belirteçlerin mRNA düzeyindeki ifadelerinin HepG2 ve Huh7 hücre hatlarında Lx2'deki ifadesine göre kat değişimleri (ddCT). Aday belirteçler grafiklerin üst orta kısımlarında yazmaktadır.

Tceal8 ve Cav2 genlerinin mRNA düzeyinde kontrole göre HepG2'de ve Huh7'de anlamlı artış görülmektedir. Crip1 geninin mRNA düzeyinde ifade artışı, kontrole göre HepG2'de Huh7'ye göre daha fazla artışı beklenemedik bir sonuçtur.

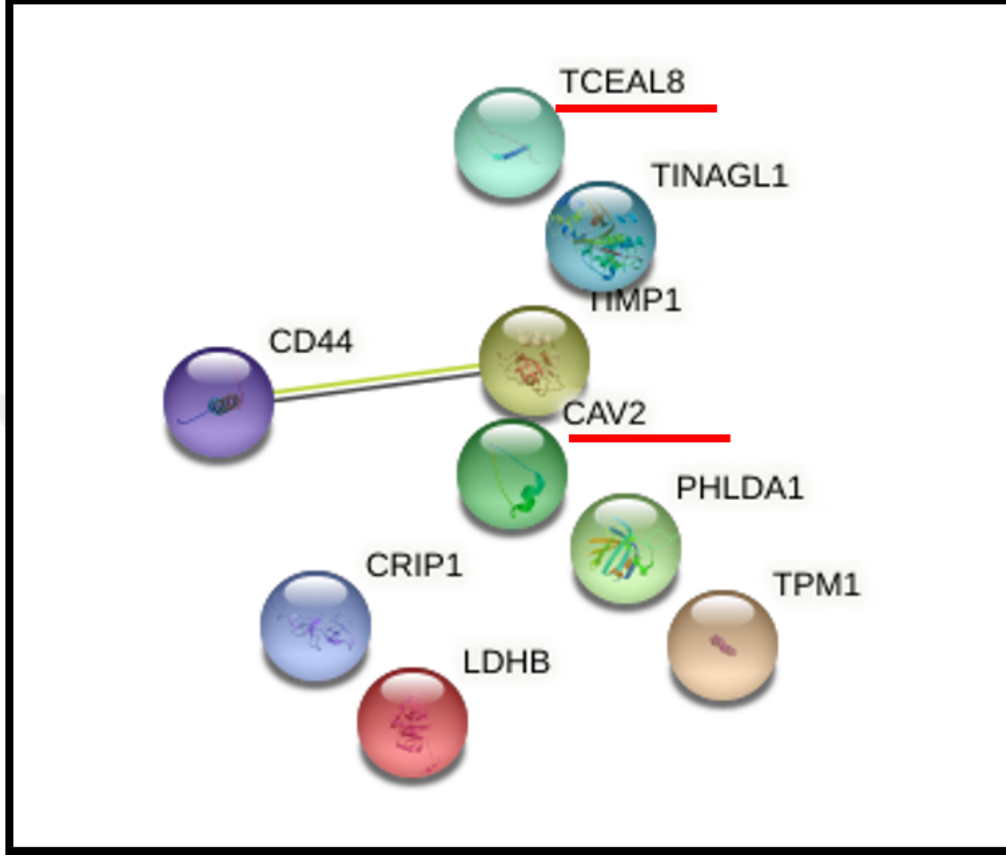


Şekil 3.2.2. Aday belirteçlerin mRNA düzeyindeki ifadelerinin HepG2 ve Huh7 hücre hatlarında Lx2'deki ifadesine göre kat değişimleri (ddCT). Aday belirteçler grafiklerin üst orta kısımlarında yazmaktadır.

Analiz sonucu araştırılan diğer genlerin mRNA seviyesinde gen ifadeleri kontrole göre her iki hücre hattında da azalmıştır.

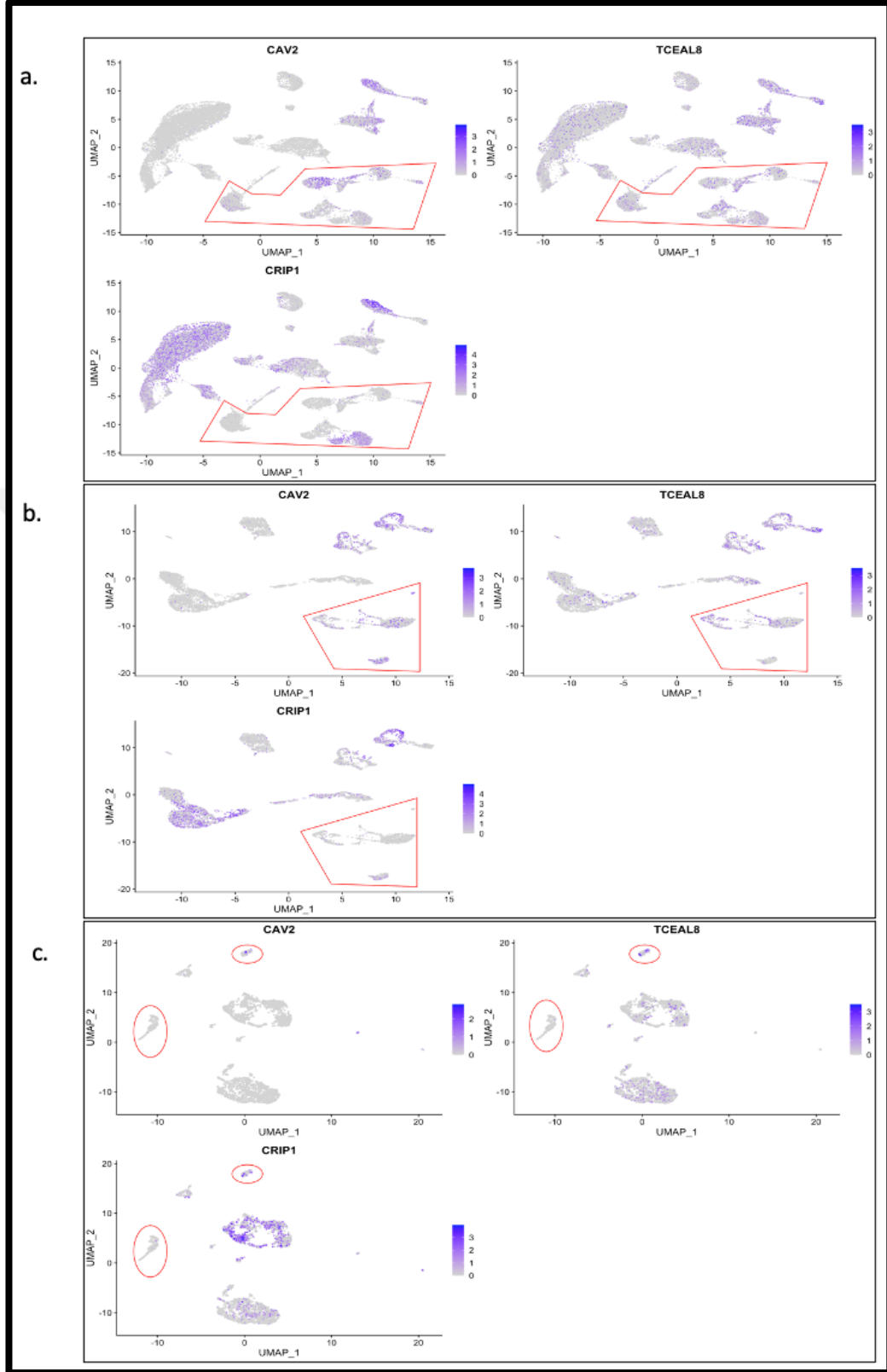
kPZR analizinden sonra belirteç genler arasındaki ilişkiyi araştırmak için STRING veri tabanı kullanılarak hücre ilişki şeması çıkarılmıştır.

3.3 İleri Analizler

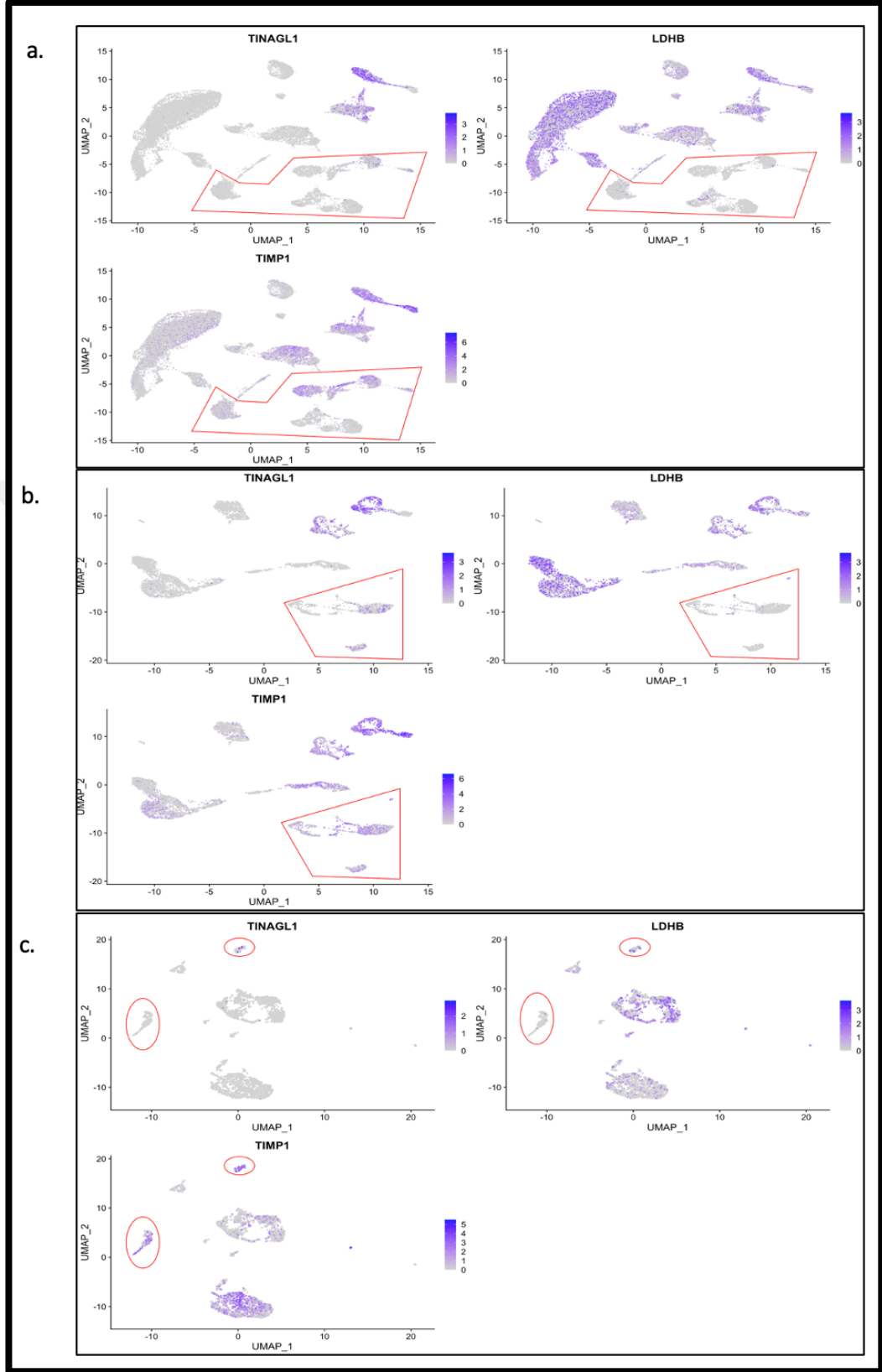


Şekil 3.3.1. Aday belirteçlerin ilişkisi. STRING veri tabanı kullanılarak aday belirteç genler arasındaki ilişki şeması yukarıda gösterilmiştir.

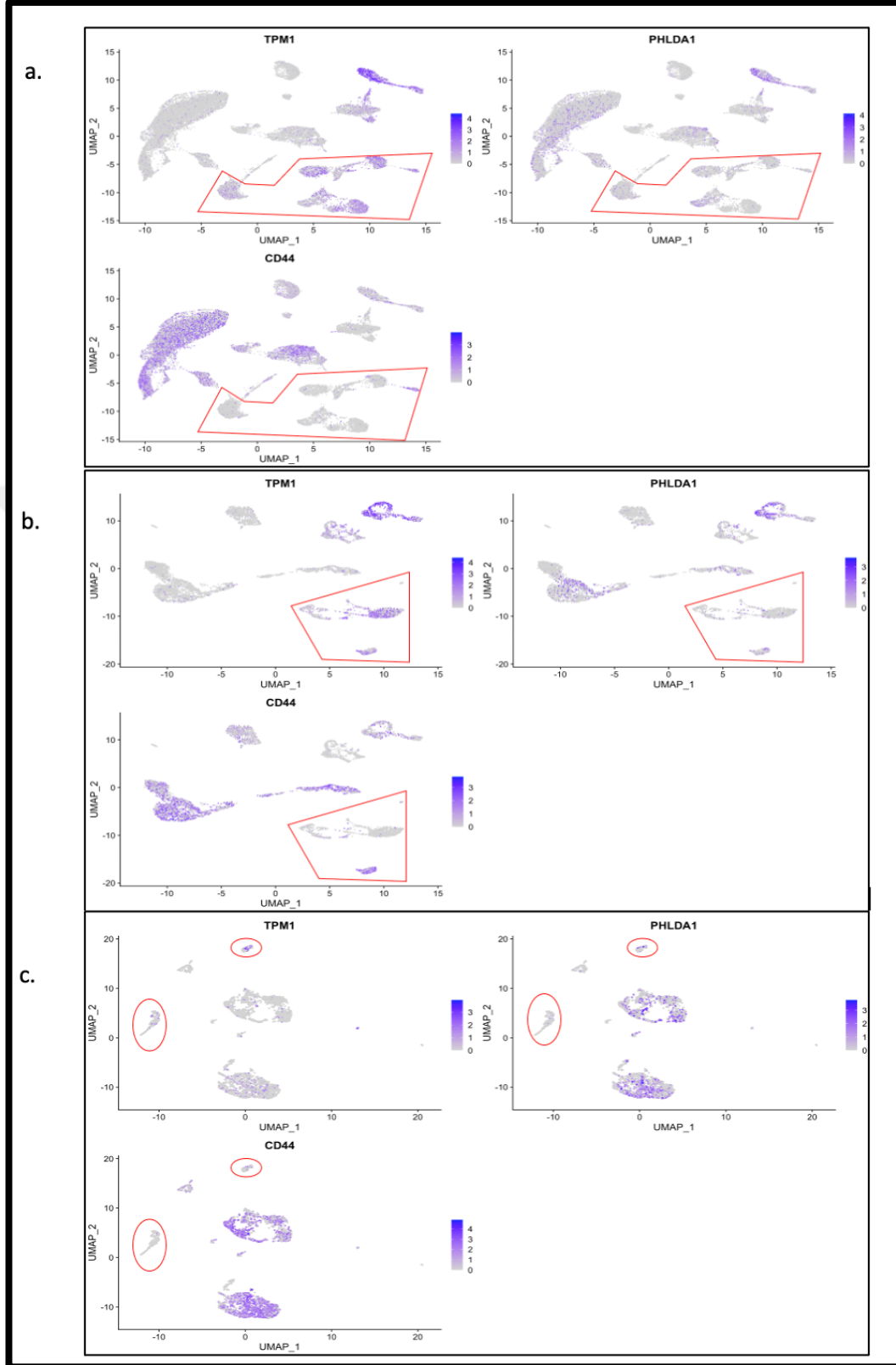
Genlerin hücre içi sinyal yollarındaki rollerinin araştırılması için Reactome (Gillespie ve ark., 2022) veri tabanına başvurulmuştur. Analize göre Tceal8, Tinagl1 ve Crip1 genlerine hücre içi sinyal yollarında atfedilen bir rol bulunmamıştır. CD44 geninin RNA metabolizmasında, interferon gama salınımında rol aldığı görülmüştür. TIMP1 ve CD44'in ECM organizasyonu, sitokin salınımında görev aldığı görülmüştür. TIMP1'in IL-10, IL-4 ve IL-13 mekanizmasında; LDHB'nin piruvat metabolizmasında rol aldığı görülmüştür. TPM1'in kas kasılmasında rol aldığı görülmüştür. PHLDA1'nin hücre bölünmesinde G2'den M evresine geçişte rol aldığı görülmüştür. Cav2'nin östrojen sinyalinde rol aldığı görülmüştür.



Şekil 3.3.2. Aday belirteç Cav2, Tceal8 ve Cripl1'in veri setlerindeki malign hücrelerde ifadesi. a.GSE15130, b.GSE125449 ve c.GSE166635 veri setlerindeki ifadeleri yukarıda gösterilmiştir.



Şekil 3.3.3. Aday belirteç *Tinagl1*, *LDHB* ve *Timp1*'in veri setlerindeki malign hücrelerde ifadesi. a.GSE15130, b.GSE125449 ve c.GSE16635 veri setlerindeki ifadeleri yukarıda gösterilmiştir.



Şekil 3.3.4. Aday belirteç Tpm1, Phlda1 ve CD44'ün veri setlerindeki malign hücrelerde ifadesi. a.GSE15130, b.GSE125449 ve c.GSE166635 veri setlerindeki ifadeleri yukarıda gösterilmiştir.

Aday belirteç olarak belirlenen Cav2, Tceal8, Crip1, Tinagl1, LDHB, Timp1, TPM1, Phlda1 ve CD44 genlerinin hepsi GSE151530, GSE125449 ve GSE166635 veri setlerindeki malign hücre gruplarında ifade edilmektedir. CD44 geni GSE166635 veri setindeki malign hücrelerin küçük bir grubunda ifade edilmektedir. Phlda1 geni GSE166635 veri setindeki malign hücrelerin küçük bir grubunda ifade edilmektedir. LDHB geni tüm veri setlerinde çok az hücrede ifade edilmektedir. Tinagl1 geni GSE166635 veri setindeki malign hücrelerin küçük bir grubunda ifade edilmektedir.



4. TARTIŞMA:

Kanser kök hücreleri, tümör hücre popülasyonunda Total RNA dizilimi analizinde (Bulk RNA Sequencing) kendi gen ifade profilini gösteremeyeceği için Tek Hücre RNA-dizilim analizi yapmak bu hücreleri araştırmak için daha yararlı olacaktır. Örneğin; tümör popülasyonunun %1-3'lük kısmında CD133 pozitif karaciğer kanser kök hücreleri (Wilson et al. 2013) bulunmaktadır. Bu oran Total RNA Diziliminde tayin edilemeyecek kadar düşüktür, bu hücreler ancak tek hücre diziliminde analiz edilebilir.

Analizler R Studio (RStudio Team, (2020))'da Seurat (Hao ve ark., 2021) paketi ile analiz edilmiştir. Analiz için öncelikle her veri setine ait Seurat (Hao ve ark., 2021) objesi oluşturulmuştur. Ardından standart ön analiz ve normalizasyon yapılmıştır. Normalizasyonlar sonrasında çok değişken genler tanımlanıp, veriyi tek boyutlu düzlemde görmeyi sağlayan Temel Bileşenler Analizi (TBA) yapılmıştır. TBA'dan sonra hangi temel bileşenlerin varyasyona katkısı olduğu belirlenip, analize onlarla devam edilmiştir. Hücre gruplarının kümelendirilmesinin ardından doğrusal olmayan boyut küçültme UMAP ile yapılmıştır ve hücre gruplarının ifade ettiği gen profillerine göre hücre gruplarını kimliği belirlenmiştir. Hücre grupları tayin edilirken T hücreleri için CD4, CD3E, CD3D, CD3G, CD8A, CD8B belirteçleri; B hücreleri için CD79A, SLAMF7, BLNK, FCRL5 belirteçleri; timik epitelyal hücreleri (TEC) için PECAM1, ENG belirteçleri; kanser-ilişkili fibroblast hücreleri (CAF) için COL1A2, BGN, ACTA2 belirteçleri; tümör ilişkili makrofajlar (TAM) için CD14, CD163, C1QA belirteçleri, HCC hücreleri içinse CD133, CD45, CD90 belirteçleri kullanılmıştır. (Meng ve ark., 2021)

Hücre gruplarının kimlikleri bulunduktan sonra, kanser kök hücrelerinin bulunması için literatürde tanımlı kanser kök hücre belirteçleri kullanılarak geliştirdiğimiz “Kök Hücre Skoru” algoritması ile kanser kök hücreleri bulunup diğer hücrelerden ayrılmıştır. Bu hücreler “Kanser Kök Hücresi” olarak etiketlendikten sonra o gruba ait belirteç genler Seurat (Hao ve ark., 2021) paketi kullanılarak analiz

edilmiştir. Belirteç gen bulmak için üç farklı istatistik yöntemi, Bimod, MAST ve Wilcoxon kullanılmıştır. Her veri seti için üç ayrı yöntemle belirteç genler bulunduktan sonra üç analiz yönteminde de ortak olan genler seçilmiştir. GSE151530 için 490 gen, GSE166635 için 291 gen, GSE125449 için 459 gen ve GSE112271 için 101 gen üç analiz yönteminden elde edilen ortak belirteç genlerdir. Her veri setine ait belirteç genler bulunduktan sonra veri setlerinin hepsinde ortak olan belirteç genler bulunmuştur. Dört veri setinde de CD44 ve Tinagl1 genleri ortaktır. CD44 geni halihazırda karaciğer kanser kök hücre belirteci olarak literatürde yer almaktadır. Tinagl1, Tubulointerstisyel nefrit antijen benzeri 1, hücre adezyonunda önemli rol oynayan ve bu nedenle hücre çoğalmasını, göçünü ve farklılaşmasını modüle eden bir ekstrasellüler matriks proteinidir. Wnt hücre yolağında görev almasının yanı sıra embriyonik dönemde kalpte ve böbreküstü bezlerinde ifade edilmektedir. (Musetti ve Huang, 2021) Literatürde bu geni karaciğer kanseri ile ilişkilendiren birkaç çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar SMCC-7712 hücre hattında Tinagl1 geninin susturulmasının apoptozu indükleyip, hücre proliferasyonunu azaltırken; HCC-LM3 hücre hattında tam ters etkilere sebep olmuştur. (Sun ve ark., 2019) Ayrıca çalışmalar Tinagl1 geninin inhibisyonunun ksenograft tümör oluşumunu yavaşlattığını göstermiştir. Ayrıca yapılan çalışmalar Tinagl1 geninin ifade artışının mide kanserinin büyümesine ve metastaz oluşumuna sebep olduğunu göstermiştir. (Shan ve ark., 2021) Bunun yanı sıra üçlü negatif meme kanseri hastalarına Tinagl1 muamelesi sonucu tümör büyümesinin yavaşlatıldığı gösterilmiştir. (Musetti ve Huang, 2021) Fakat yapılan deneyler sonucu Tinagl1 geninin ifadesi mRNA düzeyinde HepG2 ve Huh7 kanser hücre hatlarında fibrotik Lx2 hücre hattına göre azalmıştır. Bu beklenmeyen bir sonuçtur, Tinagl1 geni aday belirteç olma potansiyeli taşımamaktadır.

GSE112271, GSE166635 ve GSE151530 veri setlerinde sadece Timp1 geni ortaktır. Timp1 geninin ifadesinde HepG2 ve Huh7'de Lx2 hücre hattına göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmüştür fakat bu beklenmedik bir sonuçtur. Timp1 geninin ifade seviyesinin hepatik apoptozla indüklendiği ve Timp1 geni siRNA ile susturulduğunda fibrotik yanıtın azaldığı yapılan çalışmalar tarafından gösterilmiştir. (Wang ve ark., 2013) Bundan yola çıkarak Timp1 ve HCC ilişkisinin daha detaylı incelenmesi gerekmektedir.

Crip1 beyin, dalak ve timus bezinde ifade edilmesinin yanında en çok ince bağırsakta ifade edilir. Crip1 proteini çinko parmak motifine sahiptir. Hücre için çinko taşınmasında ve absorbe edilmesinde görev alır. Yapılan çalışmalar Crip1 geninin epitel kaynaklı yumurtalık kanserinde ifadesinin çok yüksek olduğunu ve bunun patolojik evre, kanserin seviyesi ve lenfatik metastaz ile ilişkisi olduğunu göstermiştir. (Liu ve ark., 2021) Ayrıca, hepatik hasar sonucunda Crip1 ifadesinin önemli ölçüde arttığı yapılan çalışmalar tarafından gösterilmiştir. (He ve Hu, 2022) Crip1 GSE112271 ve GSE166635 veri setlerinde belirteç olarak ortaktır. Yapılan deneyler sonucu gen ifadesi hem HepG2’de hem de Huh7’ de istatistiksel olarak anlamlı şekilde fazladır, HepG2’deki ifade seviyesi Huh7’den fazladır. Huh7’deki ifadesinin HepG2’den daha fazla olması beklendiği için Crip1 geni aday belirteç olma potansiyeline sahip değildir.

Tceal8 (*transcription elongation factor A like 8*) GSE112271 ve GSE166635 veri setlerinde belirteç olarak ortaktır. Yapılan deneyler sonucu gen ifadesi hem HepG2’de hem de Huh7’ de Lx2’ye oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. Tceal8’in homoloğu olan Tceal1’in kanser hücrelerinin apoptoz mekanizmasında görev aldığı bilinmektedir. (Huang ve ark., 2013) Tceal8’in aynı role sahip olup olmadığı araştırılmalıdır.

Cav2, hücre zarında bulunan kaveola denilen girintilerde ve endoplazmik retikulumun içi zarlarında, Golgi aygıtında ve eksozomlarda bulunan integral membran proteinidir. Cav2 geni fibroblastlarda, endotel hücrelerde, lipositlerde ve tip I pnömositlerde ifade edilirler. Hücre büyümesinden apoptoza, hücre içi sinyal iletiminin yanı sıra membran trafiği gibi çeşitli mekanizmalarda da görev alır. Ayrıca kanserin başlaması ve metastaz ile ilgili birçok süreçte yer almıştır. (Gerstenberger ve ark., 2018) Cav2, GSE112271 ve GSE166635 veri setlerinde belirteç olarak ortaktır. Yapılan deneyler sonucu gen ifadesi Huh7’ de Lx2’den istatistiksel olarak anlamlı şekilde fazlayken, HepG2’de daha düşüktür. Huh7’nin kanser kök hücre özelliğini daha çok gösterdiği göz önünde bulundurulursa, kanserin başlaması konusunda etkili

olan bir genin ifadesinin fazla olması beklenen bir sonuçtur. Ayrıca yapılan çalışmalara göre mir-199a-3p ile Cav2 ifadesi baskımlarken, TGF- β sinyal yolağını aktive ederek hepatik stellat hücrelerin aktivasyonunun başlatıldığı görülmüştür. (Yang ve ark., 2020) Bundan yola çıkarak, Cav2'nin stellat hücrelerin aktivasyonunda yol alması sebebiyle fibrozdan HCC'ye geçişte rolü olduğu düşünülebilir ve Cav2 aday belirteç olarak değerlendirilmelidir.

Analizleri yapılan diğer genlerin mRNA seviyesinde gen ifadesi hem HepG2'de hem de Huh7'de kontrole göre azalmıştır. Bundan yola çıkarak Timp1, Tinagl1, LDHB, Phlda1 ve TPM1 genleri aday belirteç olma potansiyeli göstermemektedirler. Bunun yanı sıra, literatürde halihazırda karaciğer kanser kök hücre belirteci olarak geçen CD44'ün gen ifadesinin Huh7 ve HepG2'de azalması beklenmedik bir sonuçtur. Fakat HepG2 ve Huh7 ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarıdır. Ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarını kullanmanın en büyük dezavantajı, bu hücrelerin süresiz olarak bölündükleri ve bazen in vivo herhangi bir hücre tipinde bulunmayan benzersiz gen ifade profillerine sahip oldukları için normal olarak kabul edilememesidir. Bu nedenle, normal hücrelere ait niteliklere veya işlevlere sahip olmayabilirler. Ayrıca, birkaç kez pasajlandıktan sonra hücre özellikleri değişebilir ve normal hücreninkinden daha da farklı hale gelebilir. Bu nedenle, kültürlenmiş hücrelerin özelliklerini periyodik olarak doğrulamak ve çok fazla pasajlanmış hücreleri kullanmamak önemlidir. (Matt Carter, 2015) Ölümsüz hücre hattı üretmek için hücrelere hTERT veya SV40 genlerini ifade ettirmek kullanılan yöntemlerdendir. Simian Virüs 40 T antijeni (SV40) hücrelerin proliferasyonunu kısıtlayan genlerin ifadesini azaltır. (Fan ve ark., 2018) Telomeraz, hücrelerin yaşlanma sürecinden kaçınarak sonsuz hücre bölünme yetisine sahip olmalarını sağlayan telomerlerin DNA dizisini uzatabilen ribonükleoproteindir. Bu Telomeraz Ters Transkriptaz (TERT) ekspresyonu, çoğu somatik hücrede genellikle inaktiftir. Hücre içinde eksojen olarak ifade edildiğinde, hücrelerin replikatif yaşlanmasını önlemek için yeterli telomer uzunluklarını korunmasını sağlar. Telomeraz kullanarak ölümsüz hücre hattı elde etme yöntemi, günümüzde en yaygın olarak kullanılan yaklaşımdır. (Wang ve ark., 2019) Validasyon deneyleri sonucunda görülen düşük CD44 ifadesi, ölümsüzleştirilmiş hücre hatları oluşturulurken kanser kök hücrelerinin karakteristik gen ifadeleri kaybolmasından kaynaklı olabilir.

Validasyon deneyleri sonucu aday belirteç olarak değerlendirilen Cav2 ve Tceal8 arasında bir ilişki kurmak için STRING (Szklarczyk ve ark., 2021) veri tabanı kullanılmıştır fakat sadece Cav2 ve CD44 arasında bir bağlantı bulunmuştur, Tceal8 ve Cav2 arasında bir ilişki bulunamamıştır. (Şekil 3.1.27.) Reactome (Gillespie ve ark., 2022) veri tabanı da bu genlerin hücre içindeki rollerini araştırmak için kullanılmıştır. Fakat bu analizler sonucu Tceal8 genine atfedilmiş bir fonksiyon bulunamamıştır. Bundan yola çıkarak, bu tez çalışmasında Cav2 geninin karaciğer kanser kök hücresi için aday belirteç olabileceği düşünülmektedir. Genlerin ifade profilleri ile örneklerin alındığı hastaların yaşı arasındaki bağlantı araştırılmıştır. Fakat hücrelerin gen ifadelerine göre dağılımına ait UMAP grafiğine yaş bilgileri projekte edildiğinde, aday belirteçlerin yaşa bağlı dağılımı gözlemlenememiştir. Hastaların yaşı ile aday belirteçlerin gen ifadeleri daha detaylı araştırılmalıdır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER:

Sonuç olarak, bu çalışmada farklı HCC hastalarına ait tek hücreli kanser verileri analiz edilmiştir. Analizler yapılırken literatürde var olan belirteçlerden yola çıkılarak yeni aday belirteçlerin bulunması hedeflenmiştir. Bu çalışma sonucu Cav2 aday belirteç olarak belirlenmiştir.

Kanser tedavisinde tedavinin daha etkili olması için kanser kök hücrelerin hedeflenmesi çok büyük önem taşımaktadır. Kanser kök hücrelerinin hedeflenerek ortadan kaldırılması, metastaz oluşumunu veya kanserin tekrar nüksetmesini büyük oranda azaltabilir. Bu sebeple bu çalışma çok büyük önem taşımaktadır. Tek hücreli RNA dizilimi analizi için halihazırda kullanılmakta olan Seurat (Hao ve ark., 2021) paketinin üzerine eklenen kök hücre skoru algoritması ve onu takip eden hücresel yolak analizleri diğer kanser türlerine uyarlanabilir. Böylece akciğer kanseri, kolon kanseri, meme kanseri gibi farklı kanser türlerinin de kanser kök hücre belirteçleri bulunması tedavilere çok büyük katkı sağlayabilir. Dahası, bu analiz sayesinde tüm kanserlerde ortak veya belli grup kanserlerde ortak “evrensel kanser kök hücre belirteci” bile bulunabilir. Böyle bir belirtecin bulunması kanserin erken teşhisine fayda sağlamakla birlikte tedavinin daha kısa süreli ve daha etkili olmasını sağlayabilir.

ÖZET

Karaciğer Kanseri Kök Hücre Belirteçlerini Tek Hücre RNA Dizilimi (ScRNA-Seq) Analizi ile Saptama

2020 yılı verilerine göre en ölümcül üçüncü kanser türü karaciğer kanseridir. Kanser türüne değil, hastaya göre şekillenen kişiselleştirilmiş tedavi planı gibi yaklaşımlarla son yıllarda kanser tedavisinde önemli yol kat edilmiştir. Fakat tümör dokusu heterojendir; bağışıklık sistemi hücreleri, bağ doku hücreleri, kanser hücreleri vb. çok farklı hücre tiplerini içinde barındırır. Bu heterojen tümör dokusunu kanser kök hücresi adı verilen, bölünme yeteneğine sahip hücrelerin meydana getirdiği düşünülmektedir. Bu teoriye kanser kök hücre teorisi denir. Günümüzde kanser kök hücrelerinin tespitinde kullanılan evrensel bir belirteç yoktur; belirteçler kişiden kişiye ve kanser bazında değişiklik gösterir. Bundan yola çıkarak, bu tezde kanserin tedavisi için evrensel belirteç veya belirteçlerin bulunması hedeflenmiştir. Yeni belirteç bulmak için biyoinformatik araçlardan faydalanılacaktır. Her hücrenin gen ifade profiline tek tek ulaşmayı sağlayan Tek Hücre RNA Dizilimi analizi, çok büyük verilerin analizini hızlı bir şekilde yapabilen çok güçlü bir biyoinformatik araçtır. Tek Hücre RNA Dizilimi analizi yapılarak heterojen hücre topluluğu içinden kanser kök hücrelerini saptayıp, yeni aday belirteçler bulunacaktır. Belirlenen aday belirteçler karaciğer kanser hücre hatları ile fibrotik karaciğer hücre hattında karşılaştırılarak valide edilecektir.

Anahtar Kelimeler: Belirteç, Kanser kök hücresi (KKH), Karaciğer Kanseri, Tek Hücre RNA Dizileme

SUMMARY

Detection of Liver Cancer Stem Cell Markers by Single Cell RNA Sequence (ScRNA-Seq) Analysis

Liver cancer is the third most deadly cancer type in the world according to the study done in 2020. In recent years, significant progress has been made in cancer treatment with approaches like personalized medicine, which is planned according to the patient, not the type of cancer. However, tumor tissue is heterogenous: it contains various cell types like immune system cells, connective tissue cells, cancer cells, etc. According to the cancer stem cell theory, this heterogeneous tumor tissue is formed by cells with the ability to divide, called cancer stem cells. Currently, there are no universal marker used for the detection of cancer stem cells; the markers vary from person to person and on the type of cancer. So, in this thesis, it is aimed to find a universal marker or markers for the treatment of cancer. Bioinformatic tools will be used to find new markers. Single Cell RNA Sequencing analysis, which provides access to the gene expression profile of each cell individually, is a powerful bioinformatics tool that can quickly analyze large data. By performing Single Cell RNA Sequencing analysis, cancer stem cells will be detected from the heterogeneous cell population and new candidate markers will be identified. Following the identification, gene expression levels of these candidate markers will be validated by comparing them in liver cancer cell lines and fibrotic liver cell line.

Keywords: Cancer stem cell (CSC), Liver Cancer, Marker, ScRNA-Seq, Single Cell RNA Sequencing

KAYNAKLAR

- ABDEL-MISIH S. R. ve BLOOMSTON M. (2010). Liver anatomy. *Surg Clin North Am.* **90**: 643-653
- AYDIN M. M. ve AKCALI K. C. (2018). Liver fibrosis. *Turk J Gastroenterol.* **29**: 14-21
- BARKER N. ve CLEVERS H. (2010). Leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors as markers of adult stem cells. *Gastroenterology.* **138**: 1681-1696
- BRITANNICA THE EDITORS OF ENCYCLOPAEDIA. (2020). Liver.
- CHIBA T., KITA K., ZHENG Y. W., YOKOSUKA O., SAISHO H., IWAMA A., NAKAUCHI H. ve TANIGUCHI H. (2006). Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology.* **44**: 240-251
- FAN Y., SANYAL S. ve BRUZZONE R. (2018). Breaking Bad: How Viruses Subvert the Cell Cycle. *Front Cell Infect Microbiol.* **8**: 396
- FARAZI P. A. ve DEPINHO R. A. (2006). Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat Rev Cancer.* **6**: 674-687
- FAUSTO N. ve CAMPBELL J. S. (2003). The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev.* **120**: 117-130
- FORNER A., REIG M. ve BRUIX J. (2018). Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* **391**: 1301-1314
- FRIEDMAN S. L. (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* **275**: 2247-2250
- GERSTENBERGER W., WRAGE M., KETTUNEN E., PANTEL K., ANTTILA S., STEURER S. ve WIKMAN H. (2018). Stromal Caveolin-1 and Caveolin-2 Expression in Primary Tumors and Lymph Node Metastases. *Anal Cell Pathol (Amst).* **2018**: 8651790
- GHALEB A. M. ve YANG V. W. (2017). Kruppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene.* **611**: 27-37
- GILLESPIE M., JASSAL B., STEPHAN R., MILACIC M., ROTHFELS K., SENFF-RIBEIRO A., GRISS J., SEVILLA C., MATTHEWS L., GONG C., DENG C., VARUSAI T., RAGUENEAU E., HAIDER Y., MAY B., SHAMOVSKY V., WEISER J., BRUNSON T., SANATI N., BECKMAN L., SHAO X., FABREGAT A., SIDIROPOULOS K., MURILLO J., VITERI G., COOK J., SHORSER S., BADER G., DEMIR E., SANDER C., HAW R., WU G., STEIN L., HERMJAKOB H. ve

- D'EUSTACHIO P. (2022). The reactome pathway knowledgebase 2022. *Nucleic Acids Res.* **50**: D687-D692
- GINES P., KRAG A., ABRALDES J. G., SOLA E., FABRELLAS N. ve KAMATH P. S. (2021). Liver cirrhosis. *Lancet.* **398**: 1359-1376
- GRIJALVA J. ve VAKILI K. (2013). Neonatal liver physiology. *Semin Pediatr Surg.* **22**: 185-189
- GROSS A., SCHOENDUBE J., ZIMMERMANN S., STEEB M., ZENGERLE R. ve KOLTAY P. (2015). Technologies for Single-Cell Isolation. *Int J Mol Sci.* **16**: 16897-16919
- HAO Y., HAO S., ANDERSEN-NISSEN E., MAUCK W. M., 3RD, ZHENG S., BUTLER A., LEE M. J., WILK A. J., DARBY C., ZAGER M., HOFFMAN P., STOECKIUS M., PAPALEXIE., MIMITOU E. P., JAIN J., SRIVASTAVA A., STUART T., FLEMING L. M., YEUNG B., ROGERS A. J., MCEL RATH J. M., BLISH C. A., GOTTARDO R., SMIBERT P. ve SATIJA R. (2021). Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell.* **184**: 3573-3587 e3529
- HAQUE A., ENGEL J., TEICHMANN S. A. ve LONNBERG T. (2017). A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications. *Genome Med.* **9**: 75
- HARTKE J., JOHNSON M. ve GHABRIL M. (2017). The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Semin Diagn Pathol.* **34**: 153-159
- HE H. Y. ve HU L. (2022). Cysteine-rich intestinal protein 1 enhances the progression of hepatocellular carcinoma via Ras signaling. *Kaohsiung J Med Sci.* **38**: 49-58
- HOLMES Z. E., HAMILTON D. J., HWANG T., PARSONNET N. V., RINN J. L., WUTTKY D. S. ve BATEY R. T. (2020). The Sox2 transcription factor binds RNA. *Nat Commun.* **11**: 1805
- HUANG C. Y., CHEN Y. M., ZHAO J. J., CHEN Y. B., JIANG S. S., YAN S. M., ZHAO B. W., PAN K., WANG D. D., LV L., LI Y. F., WANG W., ZHOU Z. W. ve XIA J. C. (2013). Decreased expression of transcription elongation factor A-like 7 is associated with gastric adenocarcinoma prognosis. *PLoS One.* **8**: e54671
- HUANG X. T., LI X., QIN P. Z., ZHU Y., XU S. N. ve CHEN J. P. (2018). Technical Advances in Single-Cell RNA Sequencing and Applications in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Front Oncol.* **8**: 582
- HWANG B., LEE J. H. ve BANG D. (2018). Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp Mol Med.* **50**: 1-14
- INTERNATIONAL WORLD CANCER RESEARCH FUND (2020).
- JI J. ve WANG X. W. (2012). Clinical implications of cancer stem cell biology in hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol.* **39**: 461-472
- KIM D., CHUNG K. B. ve KIM T. G. (2020). Application of single-cell RNA sequencing on human skin: Technical evolution and challenges. *J Dermatol Sci.* **99**: 74-81

- LANTHIER N. (2018). Haemopoietic stem cell therapy in cirrhosis: the end of the story? *Lancet Gastroenterol Hepatol.* **3**: 3-5
- LEE T. K., GUAN X. Y. ve MA S. (2022). Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma - from origin to clinical implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* **19**: 26-44
- LIU G., DAVID B. T., TRAWCZYNSKI M. ve FESSLER R. G. (2020). Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev Rep.* **16**: 3-32
- LIU Y., LI W., LUO J., WU Y., XU Y., CHEN T., ZHANG W. ve FU F. (2021). Cysteine-Rich Intestinal Protein 1 Served as an Epithelial Ovarian Cancer Marker via Promoting Wnt/beta-Catenin-Mediated EMT and Tumour Metastasis. *Dis Markers.* **2021**: 3566749
- MALLARD B. W. ve TIRALONGO J. (2017). Cancer stem cell marker glycosylation: Nature, function and significance. *Glycoconj J.* **34**: 441-452
- MATT CARTER JENNIFER SHIEH (2015), "Cell Culture Techniques," in Guide to Research Techniques in Neuroscience (Second ed.), pp. 295-310.
- MENG Y., ZHAO Q., AN L., JIAO S., LI R., SANG Y., LIAO J., NIE P., WEN F., JU J., ZHOU Z. ve WEI L. (2021). A TNFR2-hnRNPK Axis Promotes Primary Liver Cancer Development via Activation of YAP Signaling in Hepatic Progenitor Cells. *Cancer Res.* **81**: 3036-3050
- MICHALOPOULOS G. K. ve BHUSHAN B. (2021). Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* **18**: 40-55
- MUSETTI S. N. ve HUANG L. (2021). Tinagl1 Gene Therapy Suppresses Growth and Remodels the Microenvironment of Triple Negative Breast Cancer. *Mol Pharm.* **18**: 2032-2038
- NAMBIRAJAN A., SINGH V., BHARDWAJ N., MITTAL S., KUMAR S. ve JAIN D. (2021). SMARCA4/BRG1-Deficient Non-Small Cell Lung Carcinomas: A Case Series and Review of the Literature. *Arch Pathol Lab Med.* **145**: 90-98
- OKUMURA-NAKANISHI S., SAITO M., NIWA H. ve ISHIKAWA F. (2005). Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J Biol Chem.* **280**: 5307-5317
- PAJONK F., VLASHI E. ve MCBRIDE W. H. (2010). Radiation resistance of cancer stem cells: the 4 R's of radiobiology revisited. *Stem Cells.* **28**: 639-648
- PAROLA M. ve PINZANI M. (2019). Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. *Mol Aspects Med.* **65**: 37-55
- PELENGARIS S., KHAN M. ve EVAN G. (2002). c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer.* **2**: 764-776
- RACANELLI V. ve REHERMANN B. (2006). The liver as an immunological organ. *Hepatology.* **43**: S54-62

- ROEHLEN N., CROUCHET E. ve BAUMERT T. F. (2020). Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells*. **9**:
- S.C. LIN P. TALBOT (2014), *Encyclopedia of Toxicology* (3 ed.).
- SAYERS E. W., BOLTON E. E., BRISTER J. R., CANESE K., CHAN J., COMEAU D. C., CONNOR R., FUNK K., KELLY C., KIM S., MADEJ T., MARCHLER-BAUER A., LANCZYCKI C., LATHROP S., LU Z., THIBAUD-NISSEN F., MURPHY T., PHAN L., SKRIPCHENKO Y., TSE T., WANG J., WILLIAMS R., TRAWICK B. W., PRUITT K. D. ve SHERRY S. T. (2022). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res.* **50**: D20-D26
- SENBANJO L. T. ve CHELLAIAH M. A. (2017). CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol.* **5**: 18
- SHAN Z. G., SUN Z. W., ZHAO L. Q., GOU Q., CHEN Z. F., ZHANG J. Y., CHEN W., SU C. Y., YOU N., ZHUANG Y. ve ZHAO Y. L. (2021). Upregulation of Tubulointerstitial nephritis antigen like 1 promotes gastric cancer growth and metastasis by regulating multiple matrix metalloproteinase expression. *J Gastroenterol Hepatol.* **36**: 196-203
- SI-TAYEB K., LEMAIGRE F. P. ve DUNCAN S. A. (2010). Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell.* **18**: 175-189
- SOCIETY CANADIAN CANCER (2015). Anatomy and Physiology of the Liver.
- SUN G., LI Z., RONG D., ZHANG H., SHI X., YANG W., ZHENG W., SUN G., WU F., CAO H., TANG W. ve SUN Y. (2021). Single-cell RNA sequencing in cancer: Applications, advances, and emerging challenges. *Mol Ther Oncolytics.* **21**: 183-206
- SUN L., DONG Z., GU H., GUO Z. ve YU Z. (2019). TINAGL1 promotes hepatocellular carcinogenesis through the activation of TGF-beta signaling-mediated VEGF expression. *Cancer Manag Res.* **11**: 767-775
- SURGERY COLUMBIA The Liver and Its Functions.
- SZKLARCZYK D., GABLE A. L., NASTOU K. C., LYON D., KIRSCH R., PYYSALO S., DONCHEVA N. T., LEGEAY M., FANG T., BORK P., JENSEN L. J. ve VON MERING C. (2021). The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. *Nucleic Acids Res.* **49**: D605-D612
- TAKAHASHI K. ve YAMANAKA S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* **126**: 663-676
- TALUKDAR S., BHOOPATHI P., EMDAD L., DAS S., SARKAR D. ve FISHER P. B. (2019). Dormancy and cancer stem cells: An enigma for cancer therapeutic targeting. *Adv Cancer Res.* **141**: 43-84
- UPMC. 2022. Liver Cancer Types and Stages.
- VILLANUEVA A. (2019). Hepatocellular Carcinoma. *N Engl J Med.* **380**: 1450-1462

- VILLANUEVA A., NEWELL P., CHIANG D. Y., FRIEDMAN S. L. ve LLOVET J. M. (2007). Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis.* **27**: 55-76
- WALCHER L., KISTENMACHER A. K., SUO H., KITTE R., DLUCZEK S., STRAUSS A., BLAUDSZUN A. R., YEVS A T., FRICKE S. ve KOSSATZ-BOEHLERT U. (2020). Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front Immunol.* **11**: 1280
- WANG K., LIN B., BREMS J. J. ve GAMELLI R. L. (2013). Hepatic apoptosis can modulate liver fibrosis through TIMP1 pathway. *Apoptosis.* **18**: 566-577
- WANG N., WANG S., LI M. Y., HU B. G., LIU L. P., YANG S. L., YANG S., GONG Z., LAI P. B. S. ve CHEN G. G. (2018). Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: an overview and promising therapeutic strategies. *Ther Adv Med Oncol.* **10**: 1758835918816287
- WANG Y., CHEN S., YAN Z. ve PEI M. (2019). A prospect of cell immortalization combined with matrix microenvironmental optimization strategy for tissue engineering and regeneration. *Cell Biosci.* **9**: 7
- WHO (2021).
- YAMASHITA T., JI J., BUDHU A., FORGUES M., YANG W., WANG H. Y., JIA H., YE Q., QIN L. X., WAUTHIER E., REID L. M., MINATO H., HONDA M., KANEKO S., TANG Z. Y. ve WANG X. W. (2009). EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology.* **136**: 1012-1024
- YANG X., MA L., WEI R., YE T., ZHOU J., WEN M., MEN R., AQEILAN R. I., PENG Y. ve YANG L. (2020). Twist1-induced miR-199a-3p promotes liver fibrosis by suppressing caveolin-2 and activating TGF-beta pathway. *Signal Transduct Target Ther.* **5**: 75
- YE J., COULOURIS G., ZARETSKAYA I., CUTCUTACHE I., ROZEN S. ve MADDEN T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* **13**: 134
- YIN S., LI J., HU C., CHEN X., YAO M., YAN M., JIANG G., GE C., XIE H., WAN D., YANG S., ZHENG S. ve GU J. (2007). CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer.* **120**: 1444-1450
- ZAKRZEWSKI W., DOBRZYNSKI M., SZYMONOWICZ M. ve RYBAK Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther.* **10**: 68
- WICKHAM H., FRANÇOIS R., HENRY L., MÜLLER K (2022). dplyr: A Grammar of Data Manipulation. <https://dplyr.tidyverse.org>, <https://github.com/tidyverse/dplyr>.
- PEDERSEN T, (2022) patchwork: The Composer of Plots <https://patchwork.data-imaginist.com/index.html>, <https://github.com/thomasp85/patchwork/>.

EKLER

Ek-1: Kullanılan Hücre Hatları ve Genel Özellikleri

Lx2

Tür: İnsan (Homo sapiens)

Hücre tipi: Hepatik karaciğer hücre hattı

Hücre hattı referans numarası: SCC064 (ATCC - American Type Culture Collection, Virginia, ABD)

Kullanılan besiyeri: %10 fetal sığır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren yüksek glikozlu DMEM

HepG2

Tür: İnsan (Homo sapiens)

Hücre tipi: Hepatoselüler karaciğer kanser hücre hattı

Hücre hattı referans numarası: ATCC HB-8065™ (ATCC - American Type Culture Collection, Virginia, ABD)

Kullanılan besiyeri: %10 fetal sığır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren düşük glikozlu DMEM

Huh7

Tür: İnsan (Homo sapiens)

Hücre tipi: Hepatoselüler karaciğer kanser hücre hattı

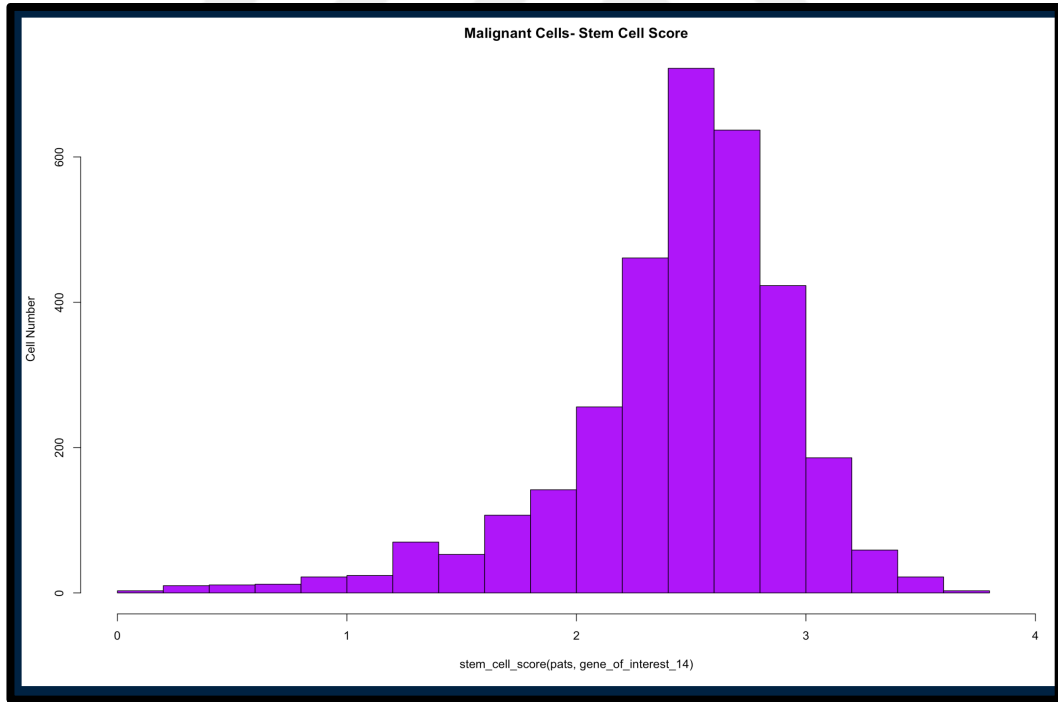
Hücre hattı referans numarası: CVCL_0336 (Expasy – İsviçre Biyoinformatik Portalı)

Kullanılan besiyeri: %10 fetal sığır serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren düşük glikozlu DMEM

Ek-2: GSE112271 Veri Setine Ait UMAP Grafiği



Ek-3: GSE112271 Veri Setine Ait Kök Hücre Skoru Grafiği



Ek-4: Ham kPZR Sonuçları

	Pos	Cp		Pos	Cp		Cp	
Timp1 Lx2	A1	17,82	LDHB Lx2	A1	26,75	Tceal8 Lx2	G1	30,54
	A2	17,79		A2	26,82		G2	29,63
	A3	17,64		A3	26,77		G3	30,32
	A4	17,5		A4	26,42		G4	30,9
	A5	17,76		A5	26,73		G5	30,49
	A6	17,8		A6	26,52		G6	29,73
Timp1 HepG2	A7	21,84	LDHB HepG2	A7	22,76	Tceal8 HepG2	G7	19,88
	A8	22,43		A8	22,7		G8	19,83
	A9	21,94		A9	22,67		G9	19,88
	A10	22,59		A10	22,62		G10	19,87
	A11	22,58		A11	22,82		G11	19,99
	A12	22,64		A12	22,97		G12	19,95
Timp1 Huh7	B1	27,28	LDHB Huh7	B1	23,57	Tceal8 Huh7	H1	18,53
	B2	27,36		B2	23,64		H2	18,75
	B3	27,24		B3	23,48		H3	18,71
	B4	26,97		B4	23,38		H4	18,66
	B5	27,24		B5	23,48		H5	18,62
	B6	27,27		B6	23,4		H6	18,62
Tinag1 Lx2	B7	25,2	Phlda1 Lx2	B7	24,66	GAPDH Lx2	H7	23,96
	B8	25,35		B8	24,74		H8	23,75
	B9	25,3		B9	24,75		G1	23,94
	B10	25,4		B10	24,79		G2	23,91
	B11	25,5		B11	24,95		G3	23,85
	B12			B12	24,68		G4	23,84
Tinag1 HepG2	C1	22,71	Phlda1 HepG2	C1	16,94	GAPDH HepG2	H9	14,95
	C2	22,78		C2	16,86		H10	15,37
	C3	22,79		C3	16,91		G7	15,21
	C4	22,46		C4	17,14		G8	15,29
	C5	22,7		C5	16,94		G9	15,25
	C6	22,66		C6	16,64		G10	15,31
	C7	23,76		C7	20,18		H1	15,33
Tinag1 Huh7	C8	23,99	Phlda1 Huh7	C8	20,04	GAPDH Huh7	H2	15,28
	C9	23,85		C9	20,09		H3	15,16
	C10	23,89		C10	20,06		H4	14,99
	C11	23,91		C11	20,03		H5	14,99
	C12	23,88		C12	20,24		H6	15,11
	Cav2 Lx2	D1		30,29	TPM1 Lx2		D1	24,12
D2		29,86	D2	23,96		E8	33,09	
D3		30,48	D3	24,09		E9	32,65	
D4		29,77	D4	23,91		E10	31,19	
D5		29,73	D5	23,89		E11	33,22	
D6		30,59	D6	23,84		E12	32,59	
Cav2 HepG2	D7	27,61	TPM1 HepG2	D7	19,46	CD44 HepG2	F1	31,65
	D8	27,31		D8	19,74		F2	31,79
	D9	26,87		D9	19,64		F3	31,79
	D10	27,51		D10	19,84		F4	32,74
	D11	27,42		D11	19,75		F5	31,42
	D12	27,53		D12	19,87		F6	32,27
Cav2 Huh7	E1	20,43	TPM1 Huh7	E1	19,36	CD44 Huh7	F7	32,16
	E2	20,46		E2	19,45		F8	31,86
	E3	20,4		E3	19,45		F9	30,96
	E4	20,37		E4	19,31		F10	32,18
	E5	20,37		E5	19,42		F11	31,97
	E6	20,37		E6	19,37		F12	30,97
Crip1 Lx2	E7	29,64	Crip1 HepG2	F1	19,68	Crip1 Huh7	F7	21,55
	E8	29,55		F2	19,48		F8	21,59
	E9	29,33		F3	19,61		F9	21,74
	E10	29,27		F4	18,74		F10	21,59
	E11	28,96		F5	19,22		F11	21,68
	E12	29,23		F6	19,42		F12	21,62