

TC.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİRKADİYEN RİTMİN AŞI İLE EDİNİLEN BAĞIŞIKLIK
YANITINA ETKİSİNİN CRISPR/CAS9 TEKNİĞİYLE
ARAŞTIRILMASI**

Müh. Aybüke OKAY

**Aşı Çalışmaları Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2023

TC.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİRKADİYEN RİTMİN AŞI İLE EDİNİLEN BAĞIŞIKLIK
YANITINA ETKİSİNİN CRISPR/CAS9 TEKNİĞİYLE
ARAŞTIRILMASI**

Müh. Aybüke OKAY

**Aşı Çalışmaları Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Semra AYDIN**

**ANKARA
2023**

ONAY SAYFASI**SİRKADİYEN RİTMİN AŞI İLE EDİNİLEN BAĞIŞIKLIK YANITINA ETKİSİNİN
CRISPR/CAS9 TEKNİĞİYLE ARAŞTIRILMASI****Öğrenci: Aybüke Okay****Danışman: Doç. Dr. Semra AYDIN**

Bu tez çalışması 07.06.2023 tarihinde jürimiz tarafından " Aşı Çalışmaları Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN*
(Ankara Üniversitesi)

Tez Danışmanı: *Doç. Dr. Semra AYDIN*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Dr. Öğr. Üyesi Gamze VARAN*
(Hacettepe Üniversitesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

1.3 Haziran 2023

9.

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

16.05.2023

Müh. Aybüke OKAY

1“*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

- (1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*
- (2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*
- (3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir*

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Semra AYDIN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yazım Yönergesi'ne göre yazıldığını beyan ederim.

16.05.2023

Müh. Aybüke OKAY

TEŞEKKÜR

İlk olarak, bu çalışmanın gerçekleştirilmesine olanak sağlayan, tezimdiki fikirleri geliştirmeme yardımcı olan, ilgisini, bilgisini ve deneyimlerini benden esirgemeyen değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Semra AYDIN'a, yüksek lisans öğrenimim boyunca desteklerini esirgemeyen, bir nevi ikinci danışmanım olan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gamze VARAN'a, Hacettepe Üniversitesi Aşı Enstitüsü'nün tüm çalışanlarına ve Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü'ne içtenlikle teşekkür ederim.

Attığım her adımda beni motive eden, her zaman yanımda olan, bilgileriyle, tecrübeleriyle rehberlik eden, yol gösteren ve beni yetiştiren hocalarım; Sayın Prof. Dr. E. Sümer ARAS ve Sayın Doç. Dr. İlker BÜYÜK'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Nefes aldığım her an desteklerini hissettiğim, en değerlim aileme, annem Gönül OKAY, babam Sebahattin OKAY ve ablam M. Ecem OKAY'a minnettarım, şükranlarımı sunarım.

Her zaman yanımda olan, desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşlarıma yani Ankara Üniversitesi BMBL üyelerine, fikirlerini ve görüşlerini paylaşarak beni motive eden, araştırmalarımın ve çalışmalarımın kalitesini arttıran, lisans sürecinden beri ayrılmadığımız çok kıymetli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak, çalışmamız TYL-2022-20000 numaralı proje ile desteklenmiştir, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetimi Koordinatörlüğü Birim Başkanlığı'na teşekkür ederim.

ÖZET

Okay A., Sirkadiyen Ritmin Aşı İle Edinilen Bağışıklık Yanıtına Etkisinin CRISPR/Cas9 Tekniğiyle Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Aşı Çalışmaları Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023.

Sirkadiyen ritimler, gen ekspresyonunun zaman içinde düzenlenmesiyle ortaya çıkan biyolojik süreçlerdir. Bu süreçler, uyku ve uyanıklık döngüsü, hormonal salım, metabolizma ve bağışıklık fonksiyonları gibi birçok biyolojik süreci etkiler. Bu nedenle sirkadiyen ritimler, genlerin düzenli bir şekilde ifade edilmesi ve vücudun uygun bir şekilde düzenlenmesi için önemlidir. Bir sirkadiyen gen olan TIMELESS, hücre döngüsü, DNA hasar yanıtı gibi çeşitli biyolojik süreçlerde de rol oynadığından, geniş bir araştırma alanı oluşturmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında, TIMELESS sirkadiyen geninin bağışıklık sistemiyle ilişkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, öncelikle *in silico* yöntemler kullanılarak TIMELESS'in fizikokimyasal özellikleri, hücre içi lokalizasyonu ve 3 boyutlu protein yapısı incelenmiştir. Ardından filogenetik ağaç ve motif analizi yapılarak TIMELESS'in evrimsel ilişkileri belirlenmiştir. Daha sonra *in silico* yollarla TIMELESS'i hedefleyen 52 miRNA tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların kanserle, bağışıklık ve enfeksiyonla ilişkili olduğu biyoinformatik yollarla belirlenmiştir. Ek olarak, CRISPR/Cas9 yöntemi kullanılarak, HEK293 hücrelerinde TIMELESS geni nakavt edilmiş ve BCG aşısı aracılığıyla innate ve adaptif 84 genin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Edinilen bulgular sonucunda TIMELESS geninin bağışıklık sistemi fonksiyonlarıyla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu tez çalışması TIMELESS geni ve diğer sirkadiyen genlerin fonksiyonlarının daha iyi anlaşılması, sağlık ve hastalık üzerindeki sirkadiyen ritimlerin etkilerinin daha iyi araştırılması ve tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine yardımcı olabilir.

Anahtar Kelimeler: sirkadiyen ritim, TIMELESS, miRNA, bağışıklık, BCG aşısı, qRT-PCR

ABSTRACT

Okay A., Investigation of the Effect of Circadian Rhythm on Vaccine-Acquired Immune Response with CRISPR/Cas9 Technique, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Vaccinology Program Master Thesis, Ankara, 2023. Circadian rhythms are biological processes that occur through the regulation of gene expression over time. These processes influence many biological processes such as the sleep and wake cycle, hormonal release, metabolism and immune functions. Circadian rhythms are therefore important for the regular expression of genes and the proper regulation of the body. Since TIMELESS, a circadian gene, is also involved in various biological processes such as cell cycle and DNA damage response, it constitutes a broad research area. In this thesis, the relationship between the TIMELESS circadian gene and the immune system was investigated. For this purpose, firstly, the physicochemical properties, subcellular localization and 3D protein structure of TIMELESS were examined using in silico methods. Then, the evolutionary relationships of TIMELESS were determined by phylogenetic tree and motif analysis. Then, 52 miRNAs targeting TIMELESS were identified by in silico methods. These miRNAs were bioinformatically identified to be associated with cancer, immunity and infection. In addition, using the CRISPR/Cas9 method, the TIMELESS gene was knocked out in HEK293 cells and the expression levels of 84 innate and adaptive genes were examined by BCG vaccination. As a result of the findings, it was determined that the TIMELESS gene is associated with immune system functions. This thesis study may help to better understand the functions of the TIMELESS gene and other circadian genes, to better investigate the effects of circadian rhythms on health and disease, and to develop therapeutic approaches.

Key words: Circadian rhythm, TIMELESS, miRNA, immune system, BCG vaccine, qRT-PCR.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Sirkadiyen Saatlerin Çalışma Mekanizmaları ve Etki Alanları	4
2.1.1. Fizyolojik Süreçlerin Sirkadiyen Düzenlenmesi: Saat ve Diğer Düzenleyici Ağlar Arasında Karşılıklı Sinyalleşme	6
2.1.2. Metabolizmanın Sirkadiyen Kontrolü	6
2.1.3. Komensal mikrobiyota ve sirkadiyen ritimler	7
2.1.4. Kardiyovasküler sistemde sirkadiyen ritimler	7
2.1.5. Sinir Sisteminde Sirkadiyen Ritimler	8
2.1.6. Yaşlanmada sirkadiyen ritimler	8
2.1.7. Kanserde Sirkadiyen Bozulma	9
2.1.8. Konak-Patojen Etkileşimlerinin Sirkadiyen Kontrolü	9
2.1.9. Bağışıklık Sisteminin Sirkadiyen Kontrolü	10
2.2. TIMELESS Geni, Diğer Sirkadiyen Genler ve Etkileşimleri	11
2.3. Genom Düzenleme Teknikleri	15
2.3.1. CRISPR Teknolojisi	16
2.3.2. Nakavtlar ve Knock-in'ler	22
2.4. Transfeksiyon	25
2.4.1. Fiziksel/mekanik Transfeksiyon	26
2.4.2. Kimyasal transfeksiyon	27

2.5. Bağışıklık (immün sistem), Tüberküloz ve Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Aşısı	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM	38
3.1. Kimyasal Malzemeler ve Biyolojik Materyaller	38
3.2. TIMELESS Proteininin <i>in silico</i> Yollarla Karakterize Edilmesi, Tahmini Hücre Altı Lokalizasyonunun Belirlenmesi, 3D Protein Yapısı ve Evrimsel İlişkileri	39
3.3. TIMELESS'e Özgü miRNA Hedeflerinin Tahmini	39
3.4. TIMELESS'a özgü genom düzenleme	39
3.4.1. Kılavuz RNA (gRNA) Seçimi ve pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) Vektörüne Klonlama Çalışmaları	39
3.4.2. gRNA Oligolarının Hibridize Edilmesi ve Fosforilasyonu	40
3.4.3. pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plasmidinin BbsI Enzimi ile Kesilmesi ve Defosforilasyonu	40
3.4.4. Hibridize Edilmiş Oligoların pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) Plasmidi ile Ligasyonu ve Transformasyonu	42
3.4.5. gRNA'nın Vektör İçine İnsersiyonunun Kontrolü	42
3.5. Hücre Kültürü ve Gen Ekspresyonunun Kontrolü	43
3.6. Hücre hattına gRNA1 ve gRNA2 İçeren Plazmitlerin Transfeksiyonu	46
3.7. T7 Endonükleaz Testi	47
3.8. Aşı ile Muamele	49
3.9. qRT-PCR ile Gen İfadesinin Ölçülmesi Ve İstatistik Analiz	50
4. BULGULAR	53
4.1. TIMELESS Proteininin <i>In Silico</i> Yollarla Karakterize Edilmesi, Tahmini Hücre Altı Lokalizasyonunun Belirlenmesi, 3D Protein Yapısı ve Evrimsel İlişkileri	53
4.2. miRNA Hedefleme Analizi ile TIMELESS Geninin Regülasyonu	58
4.3. TIMELESS'a Özgü Genom Düzenleme	59
4.4. gRNA Taşıyan pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) Plasmidinin HEK293 Hücre Hattına Transfeksiyonu	63
4.5. TIMELESS ve KO TIMELESS'ın Gen İfade Sonuçları	64
4.6. TIMELESS Nakavt Mutantlarının Tanımlanması için Indel Tespiti	66

4.7. TIMELESS nakavt hücrelerin BCG Aşısına Karşı Gösterdiği Bağışıklık Yanıtının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi	67
5. TARTIŞMA	70
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	77
7. KAYNAKLAR	78
8. EKLER	
EK 1. TIMELESS genini hedefleyen miRNA'lar	
EK 2. Normal Hücreler Üzerinde Gerçekleştirilen BCG Aşısının Gen İfade Analizlerinin İstatistikî Değerlendirmesi	
EK 3. BCG Aşılı Normal HEK293 Hücreleri ve BCG aşılı TIMELESS Nakavt Edilmiş BCG Aşılı HEK293 Hücreleri Arasındaki Gen İfade Analizlerinin İstatistikî Değerlendirmesi	
EK 4. Nakavt TIMELESS Hücreleri Üzerinde BCG aşılı ve Aşısız Gen İfade Analizlerinin İstatistikî Değerlendirmesi	
EK 5. Tez Çalışması Orjinallik Raporu	
EK6. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMP	Adenosin 3',5' monofosfat
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
cAMP	Siklik AMP
Cas9	CRISPR ile ilişkili nükleaz
CFU	Koloni oluşturan birim
CK1ε/δ	Kazein kinaz 1ε δ
CRISPR	Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar
DC	Dendritik hücre
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSB	Çift iplik kopmalarına
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
dTIM	Drosophila TIMELESS
FBXL3	Zengin Tekrar Protein 3
GFP	Yeşil floresan protein
GRE	Glukokortikoid yanıt elemanları
H1N1	İnfluenza A
HCC	Hepatoselülerkarsinom
HIF	Hipoksi ile indüklenebilir faktörler
HDR	Homolojiye yönelik onarım
HBV	Hepatit B Aşısı
HPV	İnsan Papilloma Virüs
hTIM	İnsan TIMELESS
IBV	Bulaşıcı Bronşit Virüsü
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
IpRGC	Işığa duyarlı fotoreseptif retinal ganglion hücreler
MHC	Majör Histokompatibilite Kompleksi
mTIM	Memeli TIMELESS
NAFLD	Alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı
NHEJ	Homolog olmayan uç birleştirme
NSCLC	Küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) dışındaki herhangi bir epitelyal akciğer kanseri türü

SeV	Sendai virüsü
SCF	Lösin içeren Skp1-Cullin-F kutu protein
SCN	Hipotalamik suprakiazmatik çekirdek
REV ERBα	Nükleer reseptör alt ailesi 1, grup D, üye 1, NR1D1
REV ERBβ	Nükleer reseptör alt ailesi 1
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
ROR	Orphan ilişkili reseptör
RORE	Orphan reseptör yanıt elemanları
PPARγ	Peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör gama
PiBO	Post-enfeksiyöz Bronşiolit Obliterans
RSV	Respiratuar Sinsisyal Virüs
PRR	Pattern Recognition Receptors - model tanıma reseptörleri
TALEN	Transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleazlar
TIPIN	Tim etkileşimli protein
TLR	Toll Benzeri Reseptörler
tof1	Maya homolog topoizomeraz 1 ile ilişkili faktör 1
TTFL	Sahip transkripsiyon-çeviri geri besleme döngüsü
ZFN	Çinko parmak nükleazlar
β-TrCP	β -Transducin Tekrar İçeren E3 Ubiquitin Protein Ligaz

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
1.1. Işık, retinadan başlayarak hipotalamusta bulunan suprakiazmatik çekirdek (SCN) bölgesini uyarır ve böylece biyolojik ritim düzenlenir. Şekil BioRender kullanılarak oluşturulmuştur.	2
2.1. Memelilerde sirkadiyen gen ağı.	5
2.2. TIMELESS her iki döngünün moleküler mekanizmalarına doğrudan katılır ve sonuç olarak bu tür proteinin ortadan kaldırılması, her iki döngünün de çökmesine neden olabilir. (Şekil BioRender aracılığıyla oluşturulmuştur).	13
2.3. TIMELESS ve diğer sirkadiyen genlerin kromozomal lokasyonu	15
2.4. CRISPR-Cas9 genom düzenlemesi	17
2.5. CRISPR Cas9 sistemi, birlikte bir ribonükleoprotein (RNP) kompleksi oluşturan bir kılavuz RNA (gRNA) ve Cas9 nükleazından oluşur.	18
2.6. İki parçalı ve tek kılavuzlu RNA formatları.	19
2.7. CRISPR-Cas bileşenleri çift zincirli bir kopma oluşturur. sgRNA ve Cas9 kompleksi bir ribonükleoprotein oluşturur. sgRNA, genomik hedefe bağlanır ve Cas9, DNA'da çift zincirli bir kırılma (DSB) yapar.	20
2.8. Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) onarımı. NHEJ, hedef DNA zincirinde eklemeler veya silmeler (indeller).	21
2.9. CRISPR Cas kaynaklı HDR yolu. Hedef dizideki belirli bir bölgede CRISPR-Cas kaynaklı DSB, HDR yolunu başlatır. Bu, homolog bölgeler içeren donör şablonunun ve nakavt sekansının mevcudiyetinde meydana gelir. Homolog rekombinasyon, hasarlı hedef zinciri onarır.	22
2.10. Gen düzenlemesi sonrası oluşan onarım mekanizmaları. Şekil BioRender aracılığıyla oluşturulmuştur.	24
2.11. T7 endonükleaz kullanılarak genom düzenlemenin değerlendirilmesi. Şekil BioRender aracılığıyla oluşturulmuştur.	25
2.12. Doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık sistemine ait yapılar. Şekil BioRender tarafından oluşturulmuştur.	30
2.13. Tüberküloz enfeksiyonu ve hastalığının spektrumu. IGRA=interferon- γ salınım testi. TST=tüberkülin cilt testi.	33

2.14.	BCG aşısı intrakutan olarak enjekte edildikten sonra monositler, makrofajlar ve DC'ler (dendritik cell) aşı yerinde BCG'yi tanır ve güçlü bir bağışıklık tepkisi oluşturur. BCG, DC'ler veya makrofajlar tarafından tanınır ve içselleştirilir. BCG'nin hücre duvarı veya diğer bileşenleri, farklı ligandlara bağlanan, uyarılmış hücrelerin kostimülatör moleküllerini yukarı regüle eden ve TB'ye karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkisini aktive eden PRR'ler (Model tanıma reseptörleri) olarak işlev görür. Aktive edilmiş DC hücreleri, mikobakteriyel spesifik CD4+ ve CD8+ T hücrelerini bir Th1 profili ile aktive etmek için lenf düğümlerine göç eder ve ardından IFN-gama ve granzim gibi yüksek seviyelerde sitokinlerin salgılanmasını indükler. Aynı zamanda BCG antijenlerine yanıt veren B hücreleri, hafıza hücrelerinin, plazma hücrelerinin ve antijene özgü antikorların üretimine yol açar. Şekil BioRender kullanılarak oluşturulmuştur.	36
3.1.	pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plazmitine ait harita	41
3.2.	HEK293 hücre hattının yetiştirilmesi (Şekil BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).	44
4.1.	TIMELESS proteinine ait tahmini lokalizasyon	53
4.2.	TIMELESS proteinine ait 3D yapı	55
4.3.	ML yöntemi kullanılarak 1000 tekrarlı şekilde oluşturulan filogenetik ağaç	57
4.4.	Sirkadiyen proteinlerin korunmuş 20 motifine ait şematik gösterim. Motifleri tanımlamak için MEME çevrimiçi aracı kullanılmıştır. Her motif tipi farklı renkteki kutularla gösterilmiştir ve kutulardaki sayılar (1-20) motifleri ifade etmektedir. Her renkli kutunun uzunluğu ve konumu boyuta göre ölçeklendirilmiş ve motif konsensüsü sağlanmıştır.	58
4.5.	TIMELESS'ı hedefleyen miRNA'lar	59
4.6.	pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plasmidi BbsI enzimi ile muamele edildikten sonra kesilip uzaklaştırılan sekans	60
4.7.	gRNA1 ve gRNA2 sekansının plasmid içine insersiyonunun kontrol PCR'ı.	60
4.8.	TIMELESS sekansında bulunan gRNA1'in pozisyonu	61
4.9.	gRNA1 sekansının pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plasmidine istenilen bölgeye doğru oryantasyonda klonlandığını gösteren sanger sonucu. (kullanılan sonuç: gRNA1-U6-fwd.ab ; sekansı kontrol etmek için kullanılan primer dizisi:U6 forward primer)	61
4.10.	TIMELESS sekansında bulunan gRNA1'in pozisyonu	62
4.11.	gRNA2 sekansının pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plasmidine istenilen bölgeye doğru oryantasyonda klonlandığını gösteren sanger sonucu. (kullanılan sonuç: gRNA3-U6-fwd.ab ; sekansı kontrol etmek için kullanılan primer dizisi: U6 forward primer)	62
4.12.	Transfeksiyon sonucu TIMELESS nakavtı ve GFP oluşumunun şematize edilmesi	63

- 4.13.** Transfeksiyon işleminin ardından HEK294 hücre hattının ilk 168 saatlik GFP görüntüleri. 0. saat hücrenin ters ışık mikroskop görüntülemeleri (20x büyütme) 24. saat -168. saat floresan mikroskop görüntülemeleri (20x büyütme). 64
- 4.14.** Aşılı ve aşısız elde edilen normal ve nakavt RNA'lara ait jel görüntüleri (KO: nakavt, N: Normal, A'lı: aşılı, A'sız: aşısız) 64
- 4.15.** HEK293 hücre hattından izole edilen TIMELESS ve nakavtTIMELESS'in qRT-PCR gen ifade sonuçları. 14,21-14,26 normal HEK293 hücrelerine ait ACT geni (Grup II), 17,15-17,26 TIMELESS nakavt HEK293 hücrelerine ait ACT geni (Grup IV), 24,06-24,17 normal HEK293 hücrelerine ait TIMELESS geni (Grup II), KO ile gösterilen ise TIMELESS nakavt HEK293 hücrelerine (Grup IV) ait gen ifade sonuçları 66
- 4.16.** İndel sonucunda elde edilen bant görüntüleri (+): T7 içeren (-): T7 içermeyen, kontrol 67
- 4.17.** HEK293 hücre hattı üzerinde BCG aşısının doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık sistemine ait ifadesi artan veya azalan genlerin değişim profilinin gösterildiği Heat Map (ısı haritası). Mavi renkten kırmızı renge gen ifadesi artışı söz konusudur. (Grup I – Grup II). Veriler ortalama \pm SD olarak hesaplanmıştır. $p < 0.05$. 69
- 4.18.** Aşılı normal hücreler ve aşılı nakavt hücreler arasında BCG aşısının doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık sistemine ait ifadesi artan veya azalan genlerin değişim profilinin gösterildiği Heat Map (ısı haritası). (Mavi renkten kırmızı renge gen ifadesi artışı söz konusudur) (Grup I – Grup III). Veriler ortalama \pm SD olarak hesaplanmıştır. $p < 0.05$. 69
- 4.19.** Aşılı nakavt ve aşısız nakavt hücre hattı üzerinde BCG aşısının doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık sistemine ait ifadesi artan veya azalan genlerin değişim profilinin gösterildiği Heat Map (ısı haritası). (Mavi renkten kırmızı renge gen ifadesi artışı söz konusudur) (Grup III – Grup IV). Veriler ortalama \pm SD olarak hesaplanmıştır. $p < 0.05$. 70

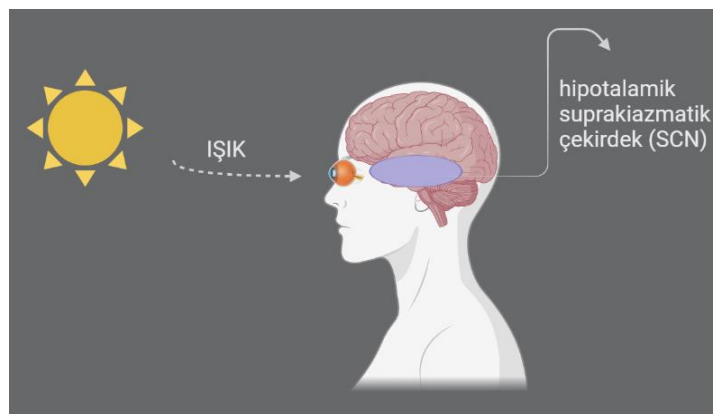
TABLOLAR

Tablo	Sayfa
3.1. gRNA'lar için dizayn edilmiş sense ve antisense oligoların sekansları	40
3.2. gRNA oligolarının hibridizasyonu ve fosforilasyonu için kullanılan reaksiyon bileşenleri	40
3.3. pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plasmitinin BbsI Enzimi ile Kesilmesi ve Defosforilasyonu	41
3.4. Hibridize edilmiş oligoların pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plasmidi ile ligasyonu ve transformasyonu	42
3.5. gRNA'nın vektör içine insersiyonunun kontrolü	43
3.6. cDNA sentezi için kullanılan bileşenler ve reaksiyon koşulları	45
3.7. TIMELESS'a özgü primer çiftleri ve gen ifadesinin ölçülmesine dair reaksiyon bileşenleri/koşulları	46
3.8. T7 endonükleaz sırasında kullanılan primer çiftleri	48
3.9. Elde edilen DNA'ların saflık ve miktarları, PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler, miktarlar ve reaksiyon koşulları	48
3.10. T7 Endonükleaz reaksiyon bileşenleri, T7 Endonükleaz I testi için hibridizasyon koşulları	49
3.11. Aşılama sonucu elde edilen hücre grupları	50
3.12. RT2 Profiler PCR kitinin yerleşimi	51
3.13. Gen ifadesini ölçmek için kullanılan bileşenler ve qRT-PCR için kullanılan reaksiyon koşulları	52
4.1. TIMELESS proteinine ait fizikokimyasal sonuçlar	53
4.2. TIMELESS proteininde görülen içerikler	56
4.3. Aşı ile muamele edilen normal ve nakavt hücrelere ait konsantrasyon ve saflık miktarları. Sunulan datalar ikişer biyolojik tekrarın ortalamasını ifade eder.	65
4.4. İzole edilen DNA'lara ait saflık ve miktarlar	66

1. GİRİŞ

Sirkadiyen saatler çoğu canlı organizmada bulunan, fizyolojik ve davranışsal işlevleri gündüz-gece döngülerine uyarlamak için 24 saatlik moleküler salımları yönlendiren bir mekanizmadır. Sirkadiyen ritim terimi, ilk olarak Halberg tarafından dünyanın günlük dönüşü ile organizmalardaki biyolojik süreçlerin yaklaşık 24 saatlik endojen salımları belirtmek için kullanılmıştır (1). Fotosentetik prokaryotlardan yüksek ökaryotlara kadar değişen organizmalarda gözlenen bu tür içsel ritimler, iç ortamı dış ipuçlarıyla koordine etme ve uyarlama işleviyle birlikte fizyolojik ve davranışsal süreçleri geçici olarak düzenleyen içsel bir sirkadiyen saatin varlığını yansıtır (2, 3). Dış uyaranlarla bağlantılı oluşan sirkadiyen ritimler, ışık düzeni ve gıda alımı gibi dış faktörlerle ilişkilidir. Memelilerde ışık, göz yoluyla işlenir ve retinohipotalamik yoluyla ana iç kalp pili olan hipotalamik suprakiazmatik çekirdeğe (SCN) iletilir (Şekil 1.1). Retinada, fotopigment melanopsini eksprese eden, ışığa duyarlı fotoreseptif retinal ganglion hücreleri (ipRGC), SCN saatlerini oluşturmak için fototik bilgiyi iletir (4). SCN, her biri hücreden bağımsız bir sirkadiyen ritim sergileyen yaklaşık 10.000 nöron içeren iki taraflı çekirdeklerden oluşur (5). SCN nöronları, birbirleriyle senkronize kalmalarına izin veren farklı ve topografik olarak organize edilmiş bağlantı mekanizmalarına sahiptir. Vücuttaki diğer hücreleri senkronize etmelerini sağlayan belirgin bir sirkadiyen-nöronal frekans ritmi oluştururlar. Merkezi kalp pili saati (central pace maker clock), hemen hemen her memeli organında (yani akciğerler, karaciğer, kalp gibi) ifade edilen çoklu çevresel saatleri senkronize eder. Periferik saatlerin senkronizasyonu, hipotalamik ana saat tarafından periferik sinir sistemi aracılığıyla yalnızca hiyerarşik ve dikey olarak kontrol edilmez, aynı zamanda hem hümorale hem de hümorale olmayan yollarla sağlanır. Özellikle, SCN, periferik dokuların otonomik innervasyonu, endokrin sinyalleme (glukokortikoidler, vücut ısısı ve beslenmeyle ilgili ipuçları) yoluyla periferik osilatörleri kontrol eder. Glukokortikoid yanıt elemanları (GRE'ler), çekirdek saat bileşenlerinin promotör bölgelerinde mevcut olduğundan, saat genlerinin ve saatle ilgili genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu düzenler (6, 7). Genomun yaklaşık %20'si sirkadiyen düzenleme altındadır. İnsanlarda neredeyse tüm fizyolojik ve davranışsal işlevler ritmik bir temelde gerçekleşir ve bu da insan performans yeteneklerinde dramatik günlük ritimlere yol açar. İster gönüllü (örn. vardiyalı çalışma

veya zaman dilimleri arasında hızlı seyahat) ister istemsiz (örn. hastalık veya ileri yaş) koşullardan kaynaklansın, insanlarda bozulmuş bir sirkadiyen ritmiklik, çeşitli zihinsel ve fiziksel bozukluklarla ilişkilendirilerek güvenliği, performansı ve üretkenliği olumsuz etkiler. Bozulmuş sirkadiyen ritmikliğin birçok olumsuz etkisi aslında uyku-uyanıklık döngüsündeki bozukluklarla bağlantılı olabilir (8). Bazı ritmik süreçler sirkadiyen saatten uyku-uyanıklık durumundan daha fazla etkilenirken, diğer ritimler uyku-uyanıklık durumuna daha fazla bağımlıdır. Çoğu hayvan için, doğal koşullar altında uyku ve uyanıklık zamanlaması, uyku döngüsünün sirkadiyen kontrolü ve diğer tüm sirkadiyen kontrollü ritimlerle senkronizedir. Bununla birlikte, insanlar, içsel biyolojik saatlerini ve onun ritmik çıktılarını bilişsel olarak geçersiz kılma konusunda benzersiz bir yeteneğe sahiptir. Uyku-uyanıklık döngüsü, sirkadiyen saat tarafından kontrol edilen ritimlerle faz dışı olduğunda, olumsuz etkiler ortaya çıkabilir (9). Sirkadiyen ritimler (24 h döngüleri), genlerin ifadesinden karmaşık fizyolojik süreçlere kadar memeli fonksiyonunun hemen hemen tüm yönlerinde gözlenir. Çekirdek saat mekanizmasının bileşenleri, çeşitli biyolojik süreçleri düzenleyen genom çapında mRNA ifadesindeki sirkadiyen ritimleri düzenler. Sirkadiyen ritimlerin bozulması, metabolik sendrom, inflamatuvar hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere çeşitli bozuklukların nedeni veya sonucu olabilir. Ayrıca, gen ifadesindeki sirkadiyen ritimler, çeşitli ilaçların hem etkisini hem de dağılımını düzenler ve dozlama süresine bağlı olarak terapötik etkinlik ve toksisiteyi etkiler (10).



Şekil 1.1. Işık, retinadan başlayarak hipotalamusta bulunan suprakiazmatik çekirdek (SCN) bölgesini uyarır ve böylece biyolojik ritim düzenlenir. Şekil BioRender kullanılarak oluşturulmuştur.

TIMELESS ise bir sirkadiyen gen olup son zamanlarda potansiyel rolüne ilişkin tartışmalar yeniden canlandırmıştır. Çalışmalar sonucunda TIMELESS'in sirkadiyen olmayan rolleri de belirlenmiştir (11).

Bu tez çalışması kapsamında;

- TIMELESS'in özellikle kanserle olan ilişkisi araştırılırken ilk kez kapsamlı bir biçimde bağışıklıkla olan ilişkisi irdelenmiştir.
- İlk olarak çeşitli veritabanları ve *in silico* araçlar kullanılarak TIMELESS proteinin fizikokimyasal özellikleri, protein yapısı hücre altı lokalizasyonu tanımlanmıştır.
- Ardından TIMELESS ve diğer sirkadiyen genler arasındaki evrimsel ilişkileri saptamak üzere filogenetik ağaç ve motif analizi gerçekleştirilmiştir.
- Biyoinformatik araştırmaların son bölümünde ise TIMELESS gen transkriptleri kullanılarak miRNA hedefleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler hem birbirini destekler nitelikte olup, literatür ile de paralel çıktılar sağlanmıştır. Aynı zamanda *in silico* yollarla TIMELESS'in bağışıklık ve enfeksiyonla olan ilişkisi belirlenmiştir.
- Tez çalışmasının deneysel sürecinde ise TIMELESS geni CRISPR/Cas9 sistemi ile nakavt edilerek genin işlevini belirlemeye yönelik araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Gen düzenleme sürecinde transfeksiyon işleminin ardından floresan görüntüleme ve indel mutasyon testleri sağlanarak doğruluğu belirlenmiştir.
- Son aşamada ise TIMELESS nakavtının gen ifadesine yansıdığı belirlenerek 84 'innate ve adaptif' gen üzerinden BCG aşısı aracılığıyla TIMELESS'in bağışıklık genleri karşısında gerekliliği ortaya konmuştur.

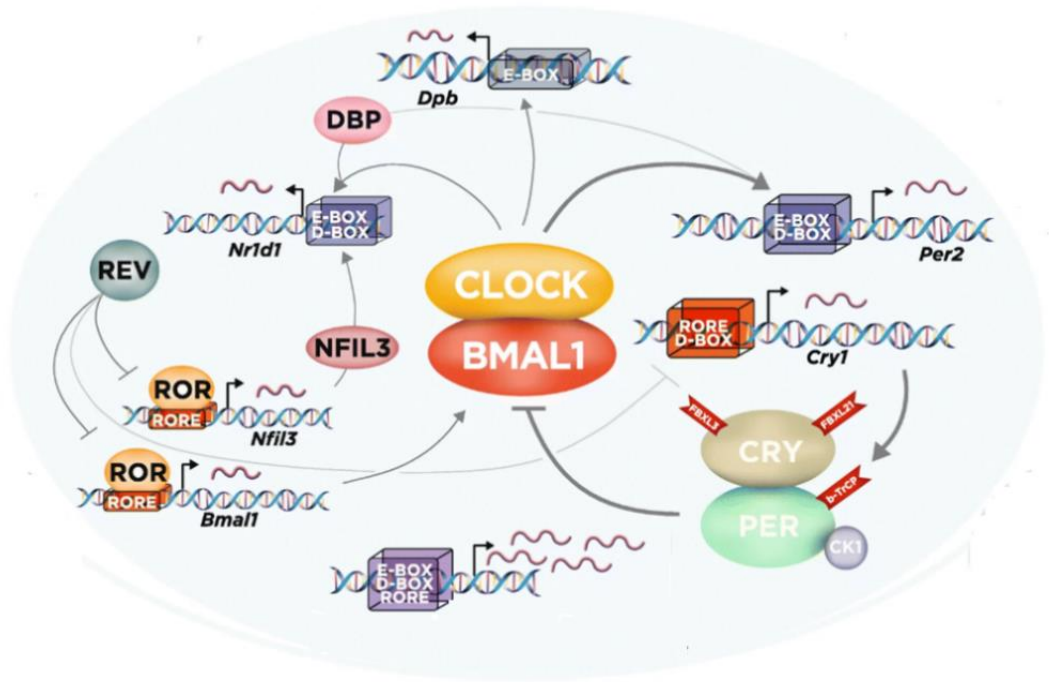
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sirkadiyen Saatlerin Çalışma Mekanizmaları ve Etki Alanları

Sirkadiyen saatlerin temel özelliği, pozitif ve negatif düzenleyicilere sahip transkripsiyon-çeviri geri besleme döngüsüdür (TTFL). Pozitif düzenleyiciler (transkripsiyon faktörleri), negatif düzenleyici mRNA'ların ifadesini yönlendirerek bir eşik seviyesine ulaştıklarında, kendi transkripsiyonlarını bastırırlar. Moleküler düzeyde sirkadiyen saat, memelilerde sirkadiyen saatin temel mekanizmasını temsil eden çok sayıda transkripsiyon faktörü setinden oluşur. Pozitif transkripsiyon faktörlerinden, SAAT (CLOCK) ve Arnt-benzeri protein 1'den (ARNTL, BMAL1 olarak da bilinir) oluşur (Şekil 2.1.). Aralarında ise heterodimerik bir bağlantı bulunmaktadır (12-14).

Sirkadiyen gen ağı ve genom çapında düzenlemeler incelendiğinde ise, transkripsiyon faktörü bağlanması, histon modifikasyonları ve bunların yanı sıra RNA polimeraz II'nin (Pol II) işlevlerinde sirkadiyen ritimlerin görevlerinin bulunduğu saptanmıştır (15). Özellikle ön beyinde eksprese edilen BMAL1 - CLOCK genlerinin ve ilişkili gen NPAS2'nin (protein-2 içeren nöronal PAS alanı) transkripsiyonu, translokasyon yapan BMAL1:CLOCK kompleksinin heterodimerizasyonuna yol açar. CACGTG konsensüs dizisini içeren E Kutusu dizilerine veya saatle düzenlenen genlerin E Kutularına bağlanır (16). Farklı hedef genler arasında BMAL1 ve CLOCK, periyot (PER1, PER2, PER3) ve kriptokrom (CRY1, CRY2) gibi moleküler saatin negatif kolunun bileşenlerinin ekspresyonunu destekler. PER ve CRY, sitoplazmada bir kompleks oluşturur. PER ve CRY, çevirilerini ve nükleer birikimlerini takiben BMAL1:CLOCK kompleksinin transkripsiyonel aktivitesini inhibe eder (17). Transkripsiyon sonrası seviyede, PER ve CRY proteinlerinin stabilitesi, β -TrCP (β -Transducin Tekrar İçeren E3 Ubiquitin Protein Ligaz), F Box, SCF (Lösin içeren Skp1-Cullin-F kutu proteini) ve E3 ubiquitin ligaz kompleksleri tarafından düzenlenir. Sırasıyla Zengin Tekrar Protein 3 (FBXL3), Kazein kinaz $1\epsilon/\delta$ (CK1 ϵ/δ) ve adenosin 3',5' monofosfat (AMP) kinaz (AMPK) PER ve CRY proteinlerini fosforile eder. PER ve CRY protein seviyelerindeki azalma, BMAL1:CLOCK aktivitesinin baskılanmasını hafifleterek yeni bir salım döngüsünün kurulmasına izin verir (18). Bu çekirdek döngüye ek olarak, nükleer reseptörler REV ERB α (nükleer reseptör alt ailesi

1, grup D, üye 1, NR1D1 olarak da bilinir) ve REV ERB β (nükleer reseptör alt ailesi 1 olarak da bilinir) gibi sirkadiyen saatin diğer anahtar düzenleyicileri, (grup D, üye 2, NR1D2, REV ERB'ler) ve ayrıca ROR (orphan ilişkili reseptör) (ROR α , ROR β ve ROR γ) başka bir geri besleme döngüsü oluşturur (19). Özellikle, REV-ERB'ler BMAL1 ekspresyonunun transkripsiyonel baskılayıcıları olarak hareket ederken, ROR'lar BMAL1 gen promotöründeki retinoik asitle ilişkili - orphan reseptör yanıt (RORE) elemanlarına bağlanarak BMAL1'in ifadesini pozitif olarak düzenler (Şekil 2.1.). Öte yandan, biyolojik saat sadece transkripsiyonel mekanizmalara dayanmaz, aynı zamanda membran depolarizasyonu, hücre içi kalsiyum akışı ve siklik AMP (cAMP) sinyalinin aktivasyonu, memeli transkripsiyonel saatinin önemli düzenleyicileridir (20-22). Endojen hücresel saatler, genlerin ritmik ifadesini yönlendirir (23, 24). CRY genleri ise bir başka sirkadiyen gen TIMELESS ile etkileşime girerek kontrol noktası aktivasyonu sağlar. TIMELESS'in sirkadiyen diğer genlerden farklı özellikleri ise sirkadiyen ritme daha geniş bir kontrol alanı sağlar (25).



Şekil 2.1. Memelilerde sirkadiyen gen ağı (15).

2.1.1. Fizyolojik Süreçlerin Sirkadiyen Düzenlenmesi: Saat ve Diğer Düzenleyici Ağlar Arasında Karşılıklı Sinyalleşme

Biyolojik saat, sirkadiyen ritmin oluşturucusu olarak birincil rollerine ek olarak, hemen hemen tüm doku ve organların fizyolojik işlevlerini iki ana yolla kontrol etmede kilit bir rol oynar. İlk olarak, SCN'den gelen merkezi çıktılar ve/veya hücre-otonom periferik osilatörlerden gelen yerel çıktılar, ritmik bir tarzda çeşitli fizyolojik yollarda sirkadiyen ritimleri yönlendirir. İkincisi, çekirdek saat bileşenlerinin birçok hücre içi yolda anahtar moleküler oyuncular olarak hareket ettiği ve ek fizyolojik rollere hizmet ettiği gözlemlenmiştir. Sirkadiyen tarafından düzenlenen fizyolojik yolların örnekleri arasında hücre büyümesi, DNA onarımı ve hasarı, anjiyogenez, apoptoz, metabolizma, redoks durumu ve ayrıca bağışıklık ve enflamatuar süreçler bulunur (26).

2.1.2. Metabolizmanın Sirkadiyen Kontrolü

Sirkadiyen saat günlük aktivite-dinlenme ritimlerinin ve dolayısıyla beslenme düzenlerinin (vardiyalı çalışanlarda olduğu gibi) tekrarlayan bozulması, metabolik sendrom ile ilişkilidir (27). Saat, belirli metabolik yollar için transkripsiyonel programları çalıştırarak doğrudan metabolizmayı kontrol eder. Örneğin, CRY1, cAMP/CREB sinyalleşmesinin düzenlenmesi, glukokortikoid reseptör geninin ritmik baskılanması ve nükleer FOXO1'in baskılanması yoluyla açlık sırasında hepatik glukoneogenezi baskılar ve bu da glukoneogenezi aşağı regüle eder (28-30). Başka bir saat baskılayıcı olan PER2, peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör gama (PPAR γ) ve mitokondriyal hız sınırlayıcı enzimlerin doğrudan düzenlenmesi yoluyla lipid metabolizmasını kontrol eder (31, 32). Nükleer hormon reseptörleri, REV ERB'ler, yağ asidi ve kolesterol metabolizması için birkaç anahtar hız sınırlayıcı enzimin transkripsiyonunu da doğrudan düzenler (33, 34). CLOCK ve BMAL1'in bozulması ayrıca obezite, hiperinsülinemi ve diyabet ile ilişkilendirilmiştir (35, 36). Sirkadiyen transkripsiyon sonrası düzenleyici geceleyin ayrıca lipid ve kolesterol metabolizmasını da kontrol eder (37). Memeli metabolizmasının doğrudan modülasyonuna ek olarak, saat tarafından dolaylı kontrol, davranışın düzenlenmesi, gıda alımı ve insülin, glukagon, peptit YY, glukagon benzeri peptit 1, kortikosteron, leptin ve grelin gibi hormonların salımı yoluyla gerçekleşir (38).

2.1.3. Komensal mikrobiyota ve sirkadiyen ritimler

Bağırsak ve mikrobiyomu arasındaki metabolik etkileşimler, son on yılda önemli bir araştırma odağı olmuştur ve hem konak hem de mikrobiyota ritimleri birbirini etkilemektedir. Öte yandan yapılan çalışmalar bağırsak mikroplarının yokluğunda fare karaciğerindeki sirkadiyen saat genlerinin ekspresyonunu bozduğunu ortaya koymaktadır (39, 40). Vücut kompozisyonunun bağırsak mikrobiyotası tarafından transkripsiyon faktörü NFIL3 aracılığıyla düzenlendiği tespit edilmiştir. NFIL3, bağışıklık hücrelerinde ifade edilen bir sirkadiyen bazik lösin fermuar transkripsiyon faktörüdür. Seviyeleri ayrıca bağırsak epitel hücrelerinde günlük olarak salınır ve mikropsuz hayvanlarda NFIL3 ekspresyonu azaldığından ritimler mikrobiyota tarafından artırılır. Yakın tarihli bir çalışma ayrıca bağırsak hücrelerindeki sirkadiyen saatin bağırsak enfeksiyonuna ve lipit metabolizmasına duyarlılığı düzenlemede önemli olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, bu çalışmalar da henüz mekanizma tam olarak aydınlatılmasa da memeli sirkadiyen ritimleri ve kommensal mikrobiyotanın homeostaz ve vücut kompozisyonuyla ilişkili olduğunu göstermektedir (41).

2.1.4. Kardiyovasküler sistemde sirkadiyen ritimler

Kardiyovasküler komplikasyonların insidansı sabahları daha yüksektir. Birçok farklı çalışma, saati kan basıncındaki günlük değişim ve hatta aspirine verilen yanıt dahil olmak üzere kardiyovasküler fonksiyonla ilişkilendirmiştir (42, 43). Bazı çalışmalar, REV ERB'nin farmakolojik hedeflemesinin farelerde aterosklerotik plak yükünü azalttığını göstermektedir. Öte yandan, diğer çalışmalar miyeloid hücrelerde BMAL1'in silinmesinin monosit alımını ve ateroskleroz lezyon boyutunu arttırdığını göstermektedir (44). Yapılan bir çalışmada BMAL1 kaybının, farelerde yaşlanmanın hızlanmasına ve yaşam süresinin kısılmasına neden olduğu ve kardiyovasküler sistemin, yaşlanmadan etkilenen sistemler arasında yer aldığı için BMAL1^{-/-} nakavt (iKO) farelerin ateroskleroz geliştirmeye yatkın olduğu ortaya konmuştur (45).

2.1.5. Sinir Sisteminde Sirkadiyen Ritimler

Suprakiazmatik çekirdekteki (SCN) sirkadiyen ritimler, uzun yıllar süren araştırmaların odak noktası olmuştur; ancak SCN'nin vücutta (hatta beyinde lokal olarak) ritmikliği nasıl empoze ettiği tam olarak anlaşılmamıştır. Son çalışmalar, odağı nöronlardan astrositlere genişleterek, glial hücrelerin sirkadiyen ritmin korunmasındaki önemli rolünü ortaya koymuştur (46, 47). Kan-beyin bariyeri (KBB), beyne ne girmesine izin verdiği konusunda oldukça seçicidir ve geçirgenliği (kısmen) sirkadiyen saat tarafından düzenlenir. Hem CNS'de hem de periferik sinir sisteminde BMAL1 bulunmayan fareler, beyindeki kan damarlarının perisit kaplamasında yaşa bağlı bir kayıpla birlikte KBB aşırı geçirgenliği sergiler, bu da sirkadiyen saatin KBB homeostazını düzenlediğini düşündürür. Yapılan çalışmada geceleri, perinöralglia saatinin boşluk bağlantılarını arttırdığını ve Mg^{2+} 'yi düşürdüğünü gösterilmiştir. Ek olarak çalışmada nöbet önleyici bir ilacın gece uygulandığında daha etkili olduğu gösterilmiştir. Böcek ve memeli KBB'si birçok yapısal ve işlevsel benzerliği paylaştığından, bu insan fizyolojisi için potansiyel olarak önemli bir bulgu olarak kabul görmüştür (48, 49).

2.1.6. Yaşlanmada sirkadiyen ritimler

Sirkadiyen ritimler, SCN'deki ana saatte yaşa bağlı bir düşüş gösteren nöronal aktivite ritimleri sergilemektedir (50). Ek olarak, BMAL1'in ablasyonu yoluyla sirkadiyen ritimlerin bozulması, farelerde erken yaşlanmaya yol açar (51). Yaşlı kök hücreler ve karaciğer üzerine yapılan son çalışmalar, yaşlanan hücrelerdeki sirkadiyen transkripsiyonel profillerin yeniden düzenlendiğini göstermektedir (52, 53). Yaşlı epidermal ve iskelet kası kök hücreleri, çekirdek saat genlerinin ritimlerini koruduğu bir stres tepkisi, iltihaplanma ve DNA hasarına doğru gen ekspresyonunun yeniden programlandığını gösterir (54). Zwihaft vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışma ile poliamin metabolizmasını, saati ve yaşlanmayı birbirine bağlayarak sirkadiyen saatin poliamin seviyelerini kontrol ettiğini ve buna karşılık poliaminlerin sirkadiyen periyodu düzenlediği gösterilmiştir (55). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, farelerde sitozinlerin büyük bir bölümünün sirkadiyen bir metilasyon paterni gösterdiğini ve yakındaki genlerin mRNA seviyelerinin, karaciğer ve akciğer dokularında DNA metilasyonundaki karşılık gelen salınımlarla pozitif olarak ilişkili olduğunu ortaya

koymuştur. Yaşla birlikte belirli transkriptlerin sirkadiyen salımının azalmasıyla uyumlu olarak, salımlı sitozin modifikasyonları (ve genel olarak DNA metilasyonu) da yaşlı hayvanlarda azalmaktadır (56).

2.1.7. Kanserde Sirkadiyen Bozulma

Epidemiyolojik çalışmalar, sirkadiyen bozulmayı tüm önemli organ sistemlerinde artan kanser duyarlılığıyla ilişkilendirmiştir (57-59). PER1, PER2 ve PER3 çekirdek sirkadiyen genlerindeki polimorfizmlerin insan kanserlerinde sıklıkla bulunduğunu, bu genlerin ekspresyonunun azalmasına yol açtığını ve onkojenik MYC'nin saati baskıladığı bilinmektedir (60). Yapılan çalışmalar PER2 ve BMAL1'in genetik kaybının, farelerde akciğer tümör oluşumunu teşvik ederek c-Myc ekspresyonunun ve proliferasyonun artmasına ayrıca metabolik düzensizliğe sebep olduğunu göstermiştir (61). Benzer şekilde, hepatoselülerkarsinom (HCC), farelerde kronik jet gecikmesi ile obez insanlarda gözlenene benzer bir şekilde indüklenir: non-alkol yağlı karaciğer hastalığı (NAFLD) ile başlar, daha sonra steatohepatit ve fibrozise ve nihayetinde HCC'ye ilerler (62). Ayrıca CLOCK ve BMAL1'i baskılayan microRNA miR-211'in de tümör ilerlemesini desteklediği bilinmektedir (63). Katı tümörlerdeki düşük oksijen seviyeleri, tümör mikro ortamını asitleştiren transkripsiyon faktörleri olan hipoksi ile indüklenebilir faktörleri (HIF'ler) stabilize eder. Son araştırmalar, HIF'lerin çeşitli saat transkriptlerini etkileyebildiğini göstermiştir (64-66).

2.1.8. Konak-Patojen Etkileşimlerinin Sirkadiyen Kontrolü

Bir enfeksiyonun sonucunun (bakteriyel, viral veya parazitik) enfeksiyonun başladığı günün saatine bağlı olduğunu bilinmektedir (67-70). Örneğin, *S. typhimurium* seviyeleri, farelerde aktif fazın ortasında başlatılan enfeksiyonla karşılaştırıldığında, dinlenme fazı sırasında bir enfeksiyonu takiben daha yüksektir (67). Yapılan çalışmalarda Herpes, influenza A ve Paramyxoviridae familyasından oluşan solunum virüslerinin viral enfeksiyonları, BMAL1 genini bozarak konakçı sirkadiyen ritimleri ortadan kaldırdığında arttığı belirlenmiştir. Ayrıca kronik jet lag yoluyla sirkadiyen ritimlerin yanlış hizalanmasının, farelerde Sendai virüsünün (SeV) veya influenza A virüsünün neden olduğu akut viral bronşiti şiddetlendirdiği

bilinmektedir (71). Aynı zamanda parazit enfeksiyonun da konakçı sirkadiyen döngüsünün zamanlamasına bağlı olduğu bilinmektedir. Leishmania parazit yükü doğada sirkadiyendir ve lenfosit olmayan immün hücrelerdeki (monositler) BMAL1 Leishmania enfeksiyonunun büyüklüğünü modüle etmekten sorumludur (68). Benzer bulgular, aktif fazın başlangıcında enfekte olmuş farelerin enfeksiyona karşı gecikmiş direnç gösterdiği bağırsak parazitik helminti *Trichuris muris* için de bildirilmiştir. Bu nedenle, sirkadiyen saat (bugüne kadar esas olarak BMAL1'e odaklanılmıştır) bakterilere, virüslere ve parazitlere karşı hücresel bağışıklığı düzenleyebilir. Enfeksiyonlar veya ortaya çıkan iltihaplanma, sirkadiyen genleri önemli ölçüde azaltarak sirkadiyen saati de bozabilir. Chagas hastalığı (*Trypanosoma cruzi*), uyku hastalığı (*Trypanosoma brucei*) ve sıtmanın (*Plasmodium chabaudi*) enfeksiyonları ile sirkadiyen ritmin ilişkili olduğu da bilinmektedir (72, 73).

2.1.9. Bağışıklık Sisteminin Sirkadiyen Kontrolü

Sabah ve akşam arasında endotoksinlere duyarlılıkta dramatik zamansal değişiklik ilk olarak 1960'larda keşfedildi; ancak sadece son on yılda bağışıklık sistemi üzerindeki saat kontrolü işleyişinde büyük ilerlemeler kaydedildi. Sirkadiyen saat kontrolü, doğuştan gelen ve adaptif bağışıklığın aktivasyonuna ve konak-patojen etkileşimlerine kadar bağışıklık tepkisinin birçok yönünü etkiler (74). Nötrofiller ve monositler gibi doğuştan gelen bağışıklık sisteminin hücreleri, kandan dokulara sirkadiyen göç modelleri sergiler (75). Ayrıca, adaptif bağışıklık sisteminin hücreleri olan T ve B lenfositlerinin de son zamanlarda kanda güçlü sirkadiyen salınımlar sergiledikleri ve sayıları bir organizmanın dinlenme evresinde zirveye ulaştığı gösterilmiştir. Lenfositler lenf düğümlerine taşınırken bu ritmiklik devam eder. Bu ritmiklik, lenfositlerin lenf düğümlerine taşınmasıyla lenfositlerin aktivite başlangıcında zirveye ulaşması ve hücrelerin dinlenme periyodunda dokudan ayrılmasıyla devam eder (76-78). Bağışıklık hücrelerinin ritmik ilişkisi de kemokin reseptörü CXCR4 ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir ve glukokortikoidler tarafından düzenlenmektedir (79). T hücre dağılımındaki günlük varyasyon, geceleri çözünür antijenlere ve sistemik bakteriyel enfeksiyona karşı bağışıklık tepkilerini artırır (15). Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin birincil efektör hücreleri olan makrofajlarda ve BMAL1'in arasında ilişki olduğu bilinmektedir (80). Son zamanlarda yapılan

çalışmalar ile sirkadiyen bozulmanın artan otoimmün hastalık insidansı ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. Örneğin, Multipl skleroz otoimmün hastalık modelinde, BMAL1 mutasyonunun, merkezi sinir sisteminde (CNS) inflamatuvar bir ortam oluşturduğunu bilinmektedir (81). Makrofajlarda, reaktif oksijen türleri (ROS), aşağı akış proinflamatuvar moleküllerin ekspresyonunu indükleyen HIF-la'nın stabilizasyonu yoluyla sitokin IL 1 β üretimini teşvik eder (82). Öte yandan, NRF2, hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan bir transkripsiyon faktörüdür. Yapılan çalışmalar, NRF2'nin genetik veya farmakolojik yöntemlerle aktivasyonunun, BMAL1 $-/-$ makrofajların proinflamatuvar fenotipini oluşturduğunu göstermektedir. Bu bulgular, enflamatuvar yanıtı kontrol etmek için doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinde NRF2'yi düzenlemede moleküler saatin bir rolü olduğunun kanıtı olarak kabul edilmektedir (81). TIMELESS içermeyen *Drosophila* mutantlarının *S. pneumoniae* enfeksiyonuna duyarlı olduğu bilinmektedir (83). Yakın zamanda Zhang vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada TIMELESS'ın COVID-19 hastalarında trombotik fenotipin düzenlenmesinde potansiyel bir rol oynadığı tespit edilmiştir (84).

Sirkadiyen ritim ve bulaşıcı hastalıklar arasındaki ilişki günümüzde önemli araştırma alanlarından ve gelecekte tedavi ile ilgili araştırmalarına yön verebileceği düşünülmektedir. Günün farklı saatlerinde uygulanan aşılardan etki düzeylerinin daha farklı olabileceği anlaşılmıştır (85, 86). Yapılan bir çalışmada sabah yapılan grip aşısı uygulamasının 65 yaş üstü kişilerde öğleden sonra aşılama yanıtına göre antikor yanıtını iyileştirdiği gösterilmiştir (87).

2.2. TIMELESS Geni, Diğer Sirkadiyen Genler ve Etkileşimleri

TIMELESS genleri sekans benzerlikleri nedeniyle, mTIM'de (memeli TIMELESS) ilk olarak 1990'ların sonlarında dTIM'in (*Drosophila* TIMELESS) homoloğu olarak tanımlanmıştır (88-90). Memeli beynindeki ritmik mRNA ekspresyonu ve çekirdek saat proteinleri mPER1/2/3 ve CRY1/2 ile fiziksel etkileşimi nedeniyle bir saat proteini olarak tanımlanmaktadır. Ek olarak, kısa süreli mTIM yıkımı faz sıfırlamasına neden olurken, uzun süreli mTIM yıkımı sirkadiyen nöronal aktivite ritimlerini bozmaktadır (91).

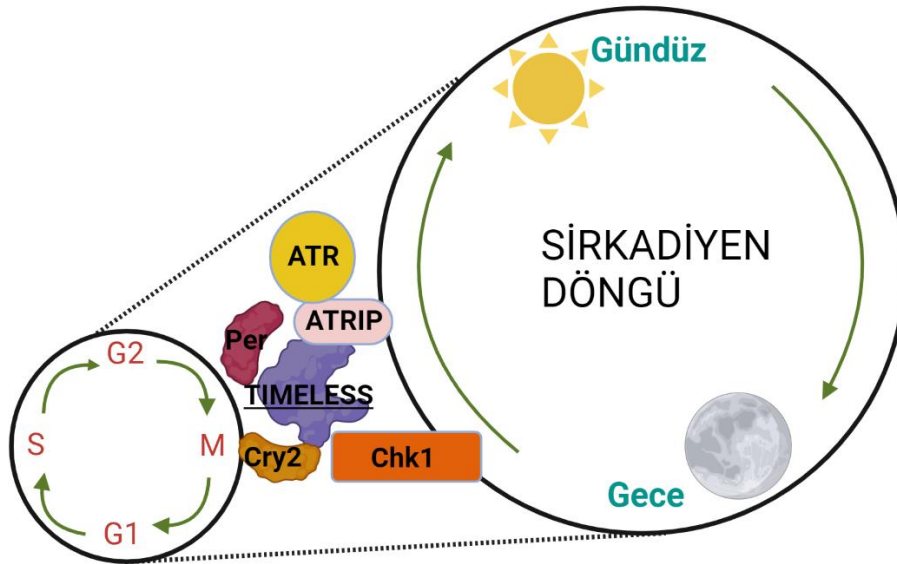
Son zamanlarda, Kurien vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada hTIM'de (insan TIMELESS) neden olan bir mutasyon bildirerek, mTIM'in memeli saat

çalışmalarındaki potansiyel rolüne ilişkin tartışmayı yeniden canlandırmıştır. Bu mutasyon, TIM nükleer birikimini inhibe ederek, moleküler düzeyde PER/CRY2 baskılayıcı kompleksini kararsız hale getirmektedir (11). mTIM'in CRY1/2'ye bağlanması, CRY1/2'nin sirkadiyen olmayan süreçlere de katıldığı göz önüne alındığında, mTIM'in sirkadiyen olmayan rolünde araştırılmasına sebep olmuştur. CRY1 ve CRY2'nin DNA hasarı tepkisini ve hücre proliferasyonunu modüle ettiği bilinmektedir ve mTIM-CRY1 ile mTIM-CRY2'nin etkileşimi, kontrol noktası aktivasyonu için kritik öneme sahiptir (92).

Sirkadiyen ritim ve hücre döngüleri, organizma ve hücrel fizyoloji üzerinde yaygın etkileri olan iki düzenleyici sistemdir. Sirkadiyen ritim, organizmaların fizyoloji ve davranışlarında 24 saatlik bir periyodik salınım olarak tanımlanmaktadır (8, 93, 94). Ritim, günün evreleriyle örtüşen aydınlık ve karanlık evrelerden oluşur. Hücre döngüsü kontrol noktaları, sonraki aşamaların başlamasından önce hücre döngüsünün her aşamasına (çoğalan memeli hücrelerinde G1, S, G2 ve M) özgü biyokimyasal reaksiyonların tamamlanmasını sağlayan düzenleyici yollardır (95-98). Bu iki düzenleyici sistem farklı mekanizmalar içerse de bu döngülerin bağlantılı olduğuna dair bazı kanıtlar vardır (Şekil 2.2.); çoğu memeli diploid hücresi, yaklaşık 24 saatlik bir hücre döngüsü periyodu sergiler ve sirkadiyen saat, hücre bölünmesinin fazlarının düzenlenmesinde rol oynar (99). Ortaya çıkan kronoterapi alanı da, terapötik etkinliği optimize ederken yan etkileri en aza indirmek için kemoterapötik ilaçların sirkadiyen ve hücre döngüleri ile verilmiş zamanını koordine etmeyi amaçlar (100). Yapılan çalışmalar sirkadiyen ritim ve hücre döngüsü kontrol noktaları arasındaki doğrudan bağlantı ve bu bağlantıya TIMELESS proteinlerinin aracılık ettiğini göstermektedir. İnsan TIMELESS proteininin hem sirkadiyen saat proteini CRY2 hem de hücre döngüsü kontrol noktası proteinleri Chk1 ve ATR-ATRIP kompleksi ile etkileşime girdiğini ve DNA hasarı kontrol noktası yanıtında önemli bir rol oynadığını bilinmektedir. TIMELESS'in S, G2 ve M fazlarında yüksek seviyeler, G0 ve G1 fazlarında düşük ifade gösterdiği bilinmektedir (92).mTIM'in sirkadiyen olmayan rollerine odaklanan kapsamlı araştırmalar neticesinde, maya homolog topoizomera 1 ile ilişkili faktör 1'e (tof1) benzer şekilde, mTIM ve onun evrimsel olarak korunmuş ortağı Tim etkileşimli protein (TIPIN), replizom stabilitesini korur ve çoğaltılması zor bölgelerde çatal ilerlemesini destekler. DNA hasarına yanıt olarak mTIM, kardinal

sinyal kinazları ataksi telanjiektazi mutasyona uğramış kontrol noktası kinaz 1 (ATR-CHK1), ataksi telanjiektazi, Rad3 ile ilişkili kontrol noktası kinaz 2 (ATM-CHK2), poli [ADP-riboz] polimeraz 1 (PARP1) ile etkileşime girerek DNA onarımını sağlar. İnsan meme ve kolorektal kanserin tüm genomlarındaki mutasyonlar için yapılan son taramalarda TIM mutasyonlarını tanımlamıştır (101). Doksorubisin (Dox), en sık kullanılan antikanser ajanlarından biridir. Dox, topoizomeraz II'yi stabilize eder, DNA içinde araya girer ve DNA çift sarmal kopmalarını indükleyen reaktif oksijen türleri üretir. Dox, ATM-Chk2 DNA hasar yanıt yolunu aktive eder ve hücre döngüsünü G2/M fazında durdurur. ATM aktivasyonu için TIM gerekli olmasa da Chk2 ve G2/M kontrol noktası ATM'ye bağlı aktivasyonu için gereklidir. TIM'in aşağı regülasyonu, kanser hücrelerini doksorubisin toksisitesine duyarlı hale getirir (102, 103).

Genom onarımındaki rolü nedeniyle, mTIM düzensizliğinin yukarıda da belirtildiği gibi birçok kanser türünde yaygın olarak bulunmaktadır (104). Bu nedenle mTIM, antikanser tedavisi için umut verici bir hedef gibi görünmektedir. Bununla birlikte, sirkadiyen saati etkileme yeteneği göz önüne alındığında, saat bozulması, metabolik bozukluklar ve kanserler de dahil olmak üzere birçok hastalık riskinin artmasıyla bağlantılıdır (103).



Şekil 2.2. TIMELESS her iki döngünün moleküler mekanizmalarına doğrudan katılır ve sonuç olarak bu tür proteinin ortadan kaldırılması, her iki döngünün de çökmesine neden olabilir. (Şekil BioRender aracılığıyla oluşturulmuştur).

mTIM proteini, *Drosophila* anahtar sirkadiyen saat proteini TIM ile dizi benzerliğini paylaşır. Bununla birlikte, sirkadiyen saat kontrolünde memeli TIM'in rolü net değildir. Ancak özetle şu ana kadar yapılan çalışmalarla TIMELESS'in DNA replikasyonunun kontrolünde, DNA onarımında ve sirkadiyen saatin düzenlenmesinde önemli rol oynadığı, TIPIN ile bir kompleks oluşturarak hem normal hem de stres koşullarında replikasyon çatalının stabilizasyonunu sağladığı, genotoksik strese yanıt olarak hem CHEK1 fosforilasyonunu hem de intra-S faz kontrol noktasını etkilediği, DNA onarımını teşvik ederek DNA hasarı veya replikasyon stresinden sonra hücrenin hayatta kalma süreçlerine katıldığı bilinmektedir. Ayrıca çift iplik kopmalarına da (DSB'ler) yanıt olarak, DNA hasar bölgelerinde birikir ve PARP1 ile etkileşimi yoluyla homolog rekombinasyon onarımını destekler (91, 105).

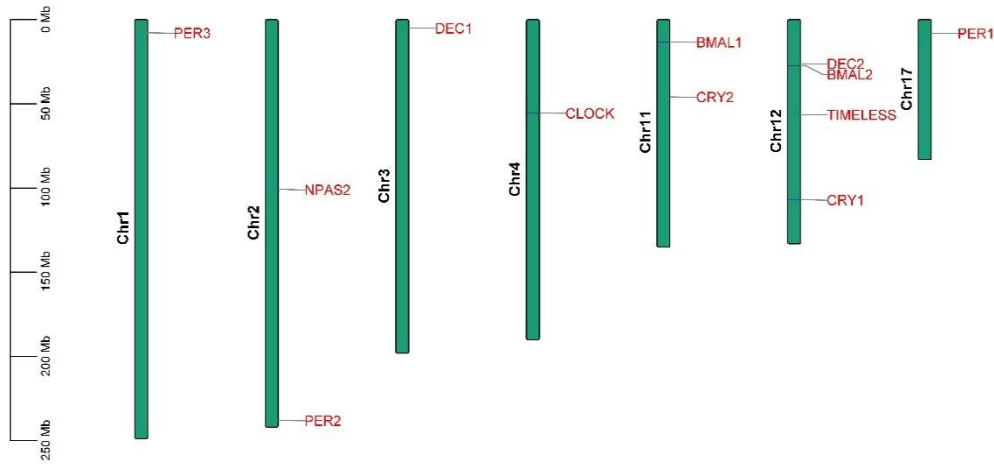
BMAL1, saat kontrollü genlerin karmaşık sirkadiyen ekspresyonunu yöneten, kromozom 11'de lokasyon gösteren sirkadiyen saat döngüsünün temel bir bileşenidir (Şekil 2.3.). BMAL1 proteini CLOCK ve NPAS2 (CLOCK-BMAL1, NPAS2-CLOCK) ile heterodimerler oluşturur (106). PERIOD (PER) ailesi, sırasıyla kromozom 17, 2 ve 1'de yer alan PER1, PER2 ve PER3 olmak üzere 3 gen içerir (Şekil 2.3.). PER1, NSCLC (küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) dışındaki herhangi bir epitelyal akciğer kanseri türüdür) hücrelerinin büyümesini, klonal çoğalma yeteneklerini, DNA hipermetilasyonunu ve histon H3 asetilasyonunu inhibe eder (107). Bir anti-onkogen olan PER2'nin fonksiyon kaybı ise, tümör ilerlemesini hızlandırır ve DNA hasarı onarımını azaltır. PER2'nin ayrıca akciğer adenokarsinom hücrelerinde apoptozu teşvik ederek PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunun aktivitesini azalttığı bilinmektedir (108). PER3'ün aşırı ekspresyonu ise, NSCLC'nin proliferasyonunu inhibe ederek apoptozu indükler ve hücrelerin göç-istila yeteneklerini bastırır (109). Dolayısıyla, PER ailesi genlerinin silinmesi, kanser hücrelerinin proliferasyon ve invazyon yeteneklerini arttırabilir ve apoptozunu inhibe edebilir (110).

CLOCK geni kromozom 4 üzerinde bulunur (Şekil 2.3.). CLOCK, BMAL1 ile heterodimer oluşturur. CLOCK-BMAL1 heterodimerleri, transkripsiyonel salınımların pozitif bileşenini çalıştırır. CLOCK'un silinmesi, kanser hücrelerinin çoğalma, göç ve istila yeteneklerini etkileyebilir (111). BMAL2 -ARNTL-2 (Beyin ve kas ARNT benzeri protein 2) kodlayan gen kromozom 12'de bulunur ve çeşitli

kanserlerin metastatik kapasitesi ile ilişkilidir (Şekil 2.3.) (19). NPAS2 (MOP4 olarak da tanımlanan nöronal PAS alan proteini 2) geni, kromozom 2’de bulunur (Şekil 2.3.). NPAS2 ve BMAL1 polipeptitleri ayrıca pozitif saat geninin ekspresyonunu düzenlemek için heterodimerik transkripsiyon faktörü oluşturur (112).

Bir diğer sirkadiyen gen olan DEC ailesi, farklılaşmış embriyonik kondrosit hücreleri tarafından eksprese edilen genleri içerir. DEC1 kromozom 3, DEC2 ise kromozom 12 üzerinde bulunur (Şekil 2.3.). DEC1, DEC2’nin negatif bir transkripsiyonel düzenleyicisidir (112).

CRY (Kriptokrom) ailesi ise bir başka sirkadiyen genidir. CRY gen ailesi üyeleri; CRY1 ve CRY2 sırasıyla 12. ve 11. kromozom üzerinde bulunur (Şekil 2.3.). CRY2, c-myc (transkripsiyon faktörlerini kodlayan bir regülör gen ve proto-onkogenler ailesindedir) bozunmasını uyararak F-box aracılığıyla NLRP3 (lösin bakımından zengin tekrar proteini 3) ile sinerji oluşturur. Buna bağlı olarak CRY2 delesyonu tümör hücresi çoğalmasını teşvik edebilir (113).



Şekil 2.3. TIMELESS ve diğer sirkadiyen genlerin kromozomal lokasyonu

2.3. Genom Düzenleme Teknikleri

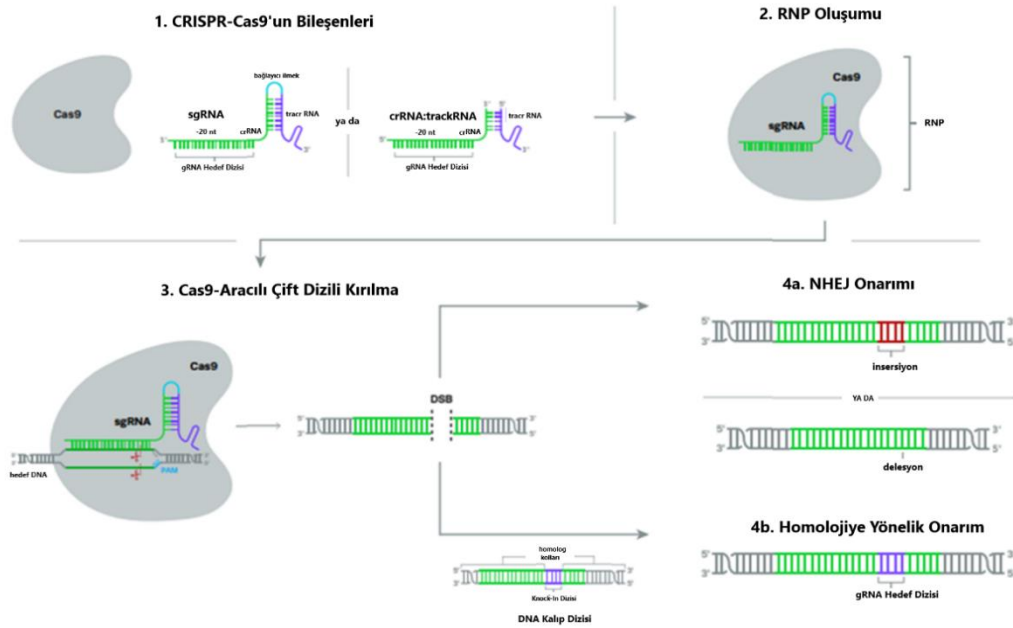
Genom düzenleme teknolojisi, DNA'nın diziye özgü bir şekilde değiştirildiği (eklemeleri, silmeleri, entegrasyonları ve dizi ikameleri) bir mühendislik türüdür. DNA hasarının altında yatan onarım mekanizmaları ve DNA'da meydana gelen yapısal değişiklikler üzerine yapılan çalışmalar, hedeflenen genom düzenlemesinin temelini oluşturmaktadır (114). Genom düzenleme, genomdaki spesifik DNA dizilerinin

silinmesini, eklenmesini veya değiştirilmesini içermektedir. Uzun yıllardır araştırmacılar, geniş bir alan yelpazesindeki sorunları çözmek için kolay ve uygun maliyetli genom düzenleme araçları geliştirmeye çalışmışlardır. Çeşitli endüstriyel uygulamalarda ürün verimlerini artırmak için bakteri genomları manüpile edilebilir. Son olarak, araştırmacıların çabaları, DNA'yı neredeyse her yerde düzenleyebilen sağlam bir molekül aracı olan CRISPR'nin geliştirilmesiyle karşılığını vermiştir (115). CRISPR teknolojisi hızla birçok moleküler laboratuvarlarda standart bir araç haline gelmiştir. Ayrıca, diziyi tanımlanabilen programlanabilir nükleazlar ve düzenleyici proteinlerin birleştirilmesiyle bölgeye özgü genetik veya epigenetik düzenlemeler mümkün hale gelmiştir. Genom düzenleme teknolojisindeki gelişmeler, gene ait hedeflenebilir dizi tanımlayıcılarının karmaşık mühendisliği ile yapılmaktadır (116).

2.3.1. CRISPR Teknolojisi

Genetik kodun bu tekrarlanan bölümleri, Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar veya CRISPR olarak adlandırılmaktadır (117). CRISPR, belirli bir genomik diziyi hedeflemek ve ardından DNA'da bir kesim yapmak için kullanılabilen iki bileşenli basit bir sistemdir. Gen manipülasyonlarına olanak sağlayarak bir genin ve mutasyon içeren bir sekansının etkisiz hale getirilmesini sağlar. Teknolojinin geliştirilmesine yol açan temel keşifler, prokaryotlarda genetik materyalin diğer fragmanları ile aralıklı DNA'nın tekrarlayan palindromik bölümlerinin tanımlandığı 1993 yılına kadar izlenebilir (118). 2007 yılında, yıllarca süren çalışmalardan sonra araştırmacılar, CRISPR'ın işlevinin prokaryotik bağışıklık ile ilgili olduğu sonucuna varmışlardır (119). Bakteriler ve arkeler kendilerini istilacı virüslere (bakteriyofajlar) karşı savunmak için CRISPR-Cas9 sistemini kullanmaktadırlar. Prokaryotik hücre, bir viral enfeksiyonla karşılaştığında hedef lokuslarında çift zincirli bir kırılma (DSB) oluşturarak viral DNA parçasını koparmak için özel bir CRISPR ile ilişkili endonükleaz (Cas9) kullanmaktadır. Kılavuz RNA (gRNA) olarak bilinen kısa bir RNA fragmanı ile hedef diziyeye yönlendirilir. Kılavuz RNA, Cas9'un DNA'yı yüksek derecede özgüllükle parçalamasına izin veren viral genomun bir bölümünün tamamlayıcısıdır. DNA'nın parçalanması yalnızca virüsü yok etmekle kalmaz, aynı zamanda "aralayıcı" olarak adlandırılan yabancı DNA'nın bir parçası, geçmiş enfeksiyonların genetik hafızasını korumanın bir yolu olarak CRISPR

dizisinin palindromik dizileri arasında saklanabilir. Virüs yeniden istila ederse, CRISPR-Cas9 sistemi onu hızla hedef alıp yok edebilir. Bu viral fragman kütüphanesi, bu nedenle, gelecekteki enfeksiyonlara hazırlanmak için antijenleri depolayan bağışıklık sistemimize esasen eşdeğerdir. Keşfedilmesinden bu yana bilim adamları artık mikroplar, bitkiler ve hayvanlar gibi çeşitli genomlarda çeşitli uygulamalar için CRISPR teknolojisini kullanmaktadır (120) (Şekil 2.4.).

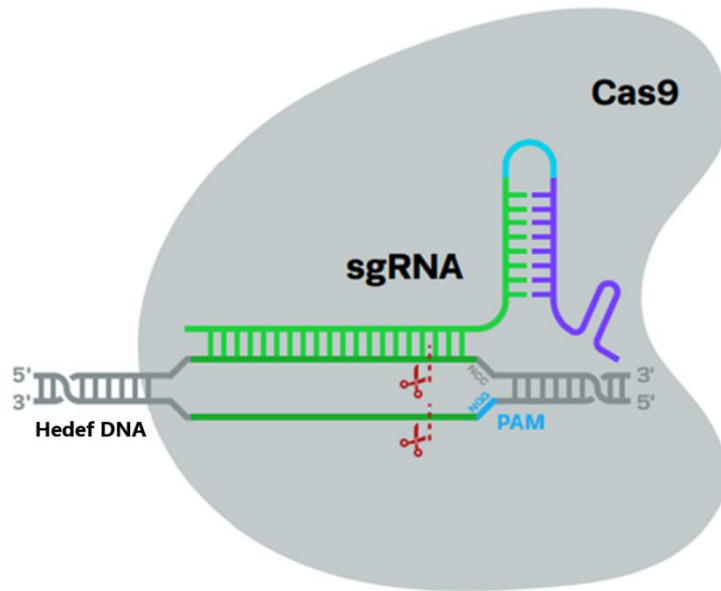


Şekil 2.4. CRISPR-Cas9 genom düzenlemesi

1) CRISPR'nin bileşenleri bir kılavuz RNA (sgRNA veya cr:tracr) ve bir Cas9 endonükleazıdır. 2) Kılavuz RNA ve Cas9, bir ribonükleoprotein (RNP) oluşturur. 3) Hücrenin içinde, RNP genomik hedefte bir çift zincirli kırılma (DSB) oluşturur. İki endojen onarım mekanizmasından biri kırılmayı onarabilir. 4a) Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) onarımı, sıklıkla nükleotitleri (indel) ekleyen veya silen hataya açık bir yoldur. 4b) Bir DNA şablonu sağlanırsa, homolojiye yönelik onarım (HDR) yolu, homolog rekombinasyon yoluyla kırılmayı onarabilir (121).

CRISPR sistemi iki bileşenden oluşur: hedef DNA dizisine özgü bir kılavuz RNA (gRNA) ve bir CRISPR ile ilişkili nükleaz (Cas). CRISPR deneyleri için, kılavuz RNA ve Cas endonükleaz, bir ribonükleoprotein (RNP) kompleksi oluşturmak üzere birleştirilir (Şekil 2.4.). Ribonükleoprotein (RNP) kompleksi Şekil 2.5 detaylı bir biçimde verilmiştir. Genomik DNA'da spesifik bir protospacer bitişik motifinin (PAM) varlığı, gRNA'nın hedef diziyeye bağlanması için gereklidir. Cas9 endonükleazı daha sonra DNA'da (makasla gösterilen) bir çift zincir kırılması yapar. Çift iplik

kopması tarafından tetiklenen endojen onarım mekanizmaları, bir DNA şablonu mevcutsa, çerçeve kayması mutasyonu veya istenen bir dizinin nakavt edilmesi yoluyla gen nakavtına neden olabilir (122). Cas proteini bir çift moleküler makas işlevi görürken gRNA, onu uygun bölgeye yönlendiren GPS'tir. Prokaryotlarda gRNA, nükleazı viral DNA'ya yönlendirir, ancak biyoteknolojik bir araç olarak, gRNA'nın tasarım özellikleri, herhangi bir organizmanın genomunu hemen hemen her yerde hedef alacak şekilde değiştirilebilir (123). Birçok genom mühendisliği uygulaması için Cas9 proteini (*Streptococcus pyogenes*'ten) kullanılır. gRNA'nın genomik hedefe bağlanması, hedefin doğrudan aşağı akışında (karşıt DNA zinciri üzerinde; Şekil 2.5.) bulunan kısa bir protospacer bitişik motifin (PAM) varlığına bağlıdır (124). Farklı prokaryotik türlerden gelen Cas proteinleri, farklı PAM motiflerini tanır. Cas9 için PAM, N'nin herhangi bir nükleotit olduğu 5' NGG-3' dir (125).

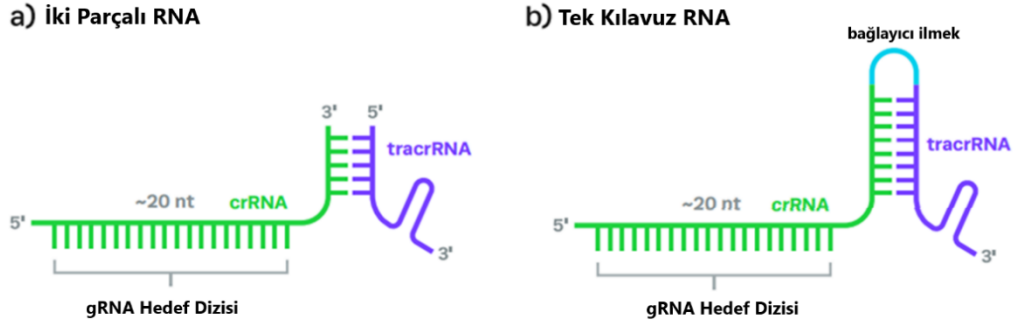


Şekil 2.5. CRISPR Cas9 sistemi, birlikte bir ribonükleoprotein (RNP) kompleksi oluşturan bir kılavuz RNA (gRNA) ve Cas9 nükleazından oluşur (122).

Kılavuz RNA Formatları (gRNA)

Doğal formunda gRNA, iki farklı RNA segmentinden oluşur (Şekil 2.6.): CRISPR RNA (crRNA) ve transaktif edici CRISPR RNA (tracrRNA). crRNA, genomik hedefe bağlanan 18-20 bp'lik bir dizidir. tracrRNA, crRNA-Cas9 etkileşimi için bir iskele görevi görür. Doğal bağlamlarda, kılavuz RNA'lar, crRNA ve tracrRNA bölümlerinin birlikte bağlandığı (cr:tracrRNA olarak gösterilir) bir çift yönlü molekül

oluşturur. Bununla birlikte, kılavuz RNA'lar artık bir bağlayıcı döngü ile bağlanan crRNA ve tracrRNA ile sentetik olarak üretilebilir. Bu kesintisiz moleküllere tek kılavuz RNA'lar (sgRNA'lar) denir.

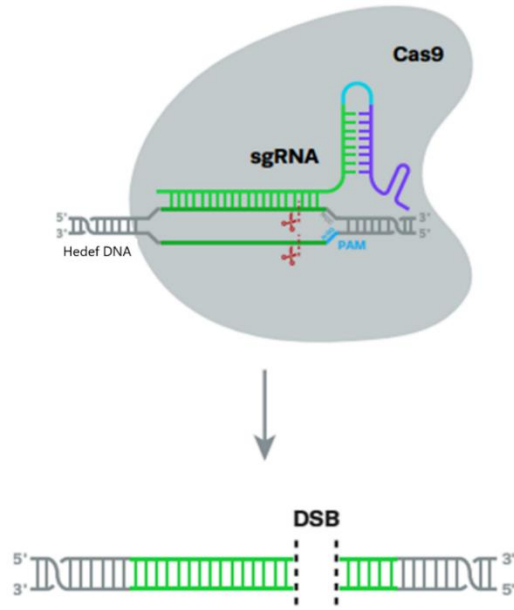


Şekil 2.6. İki parçalı ve tek kılavuzlu RNA formatları.

Kılavuz RNA'lar iki biçimde oluşturulabilir. a) crRNA (yeşil) ve tracrRNA (mor) bileşenleri, iki parçalı bir kılavuz (cr:tracrRNA) oluşturmak için birlikte bağlanabilir veya, b) sürekli bir molekül oluşturmak için bir bağlayıcı döngü (mavi) ile bağlanabilirler (tek kılavuz RNA veya sgRNA). (LubiaScience'dan düzenlenmiştir- <https://www.lubio.ch/applications/crispr-genome-editing/crispr-cas9-system>).

CRISPR ile ilişkili endonükleaz (Cas)

Birçok CRISPR-Cas deneyi için Cas9, bakteri ve arkelerde meydana gelene benzer şekilde DNA'da bir DSB oluşturarak gen düzenleme sürecini kolaylaştırır (Şekil 2.7.). Bir DSB oluşturmak, CRISPR düzenleme yolundaki ilk adımdır. Takip eden onarım mekanizması, meydana gelen gen düzenleme türünü belirleyerek istenilen düzenleme sonucunu etkileyecektir (122).



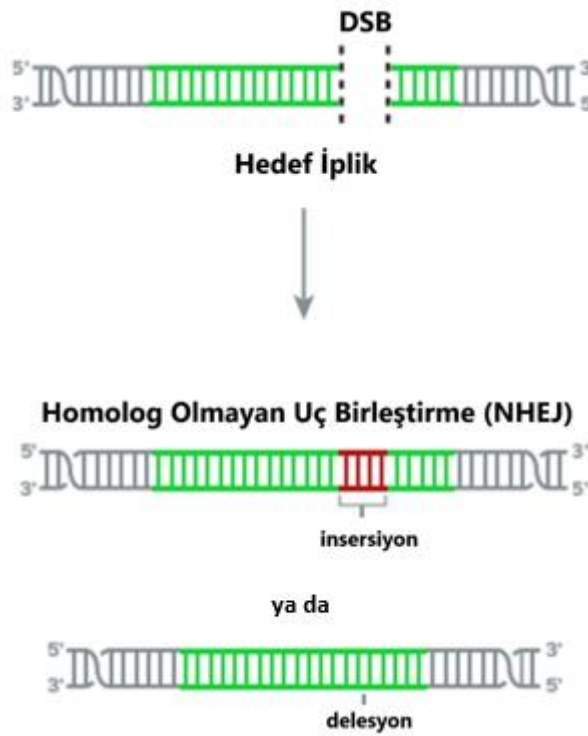
Şekil 2.7. CRISPR-Cas bileşenleri çift zincirli bir kopma oluşturur. sgRNA ve Cas9 kompleksi bir ribonükleoprotein oluşturur. sgRNA, genomik hedefe bağlanır ve Cas9, DNA'da çift zincirli bir kırılma (DSB) yapar (122).

CRISPR Nedenli Kırılmaları Onarma

CRISPR, genomdaki belirli konumlarda DSB'lerin oluşturulmasını kolaylaştırmaktadır. Ancak bu eylem tek başına bir genin düzenlenmesine neden olmaz. Bunun yerine, kırılmayı onarma süreci, hedef gende değişiklik yapılmasını sağlar. Bir DSB yapıldıktan sonra, hücre içinde doğuştan gelen DNA onarım mekanizmaları otomatik olarak tetiklenir. Aşağıda, genleri düzenlemek için sıklıkla kullanılan iki ana onarım yolu türünü verilmiştir: homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ve homolojiye yönelik onarım (HDR) (126).

Homolog Olmayan Uç Birleştirme (NHEJ)

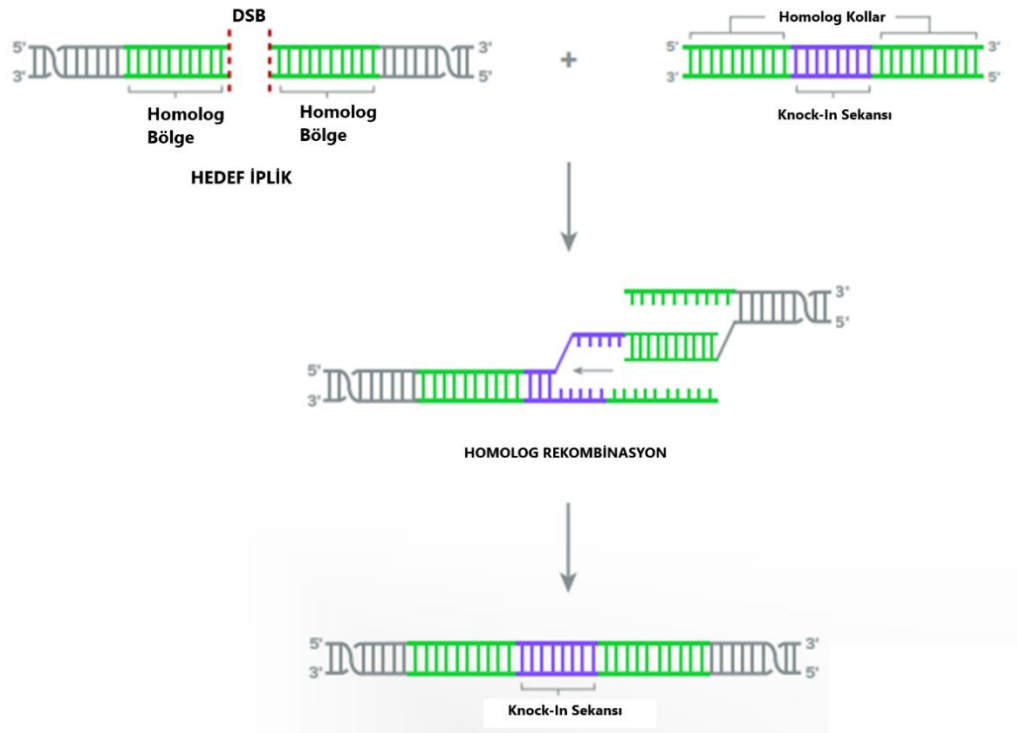
Deneyisel amaç, bir geni kalıcı olarak bozmak ve böylece hiçbir fonksiyonel protein yapılmayacaksa (bir nakavt), o zaman homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) onarım mekanizmasından yararlanılabilir (Şekil 2.8.). NHEJ, DNA uçlarını tekrar birbirine bağlar, ancak hataya eğilimlidir ve süreçte nükleotitleri (indeller olarak adlandırılır) ekleyebilir veya silebilir. Eklenen veya silinen nükleotitlerin sayısı üçe bölünemiyorsa, çerçeve kayması mutasyonuna neden olarak ortaya çıkan proteinin işlevini sonlandıracaktır (127, 128).



Şekil 2.8. Homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) onarımı. NHEJ, hedef DNA zincirinde eklemeler veya silmeler (indeller) (129).

Homolojiye Yönelik Onarım (HDR)

Deneyin amacı, hedeflenen genetik elemanı farklı bir sekansla değiştirmekse (bir nakavt), hücre, homolojiye yönelik onarım (HDR) yoluna yönlendirilebilir (Şekil 2.9.). Homoloji bölgeleriyle çevrili istenen diziyi taşıyan bir DNA donör şablonu, hücrelere CRISPR bileşenleriyle birlikte yerleştirilmelidir. Hücreler, homolog rekombinasyon yoluyla kırık diziyi onarmak için bu şablonu kullanacak ve böylece istenen değişiklikleri hedef bölgeye dahil edecektir (130, 131).



Şekil 2.9. CRISPR Cas kaynaklı HDR yolu. Hedef dizideki belirli bir bölgede CRISPR-Cas kaynaklı DSB, HDR yolunu başlatır. Bu, homolog bölgeler içeren donör şablonunun ve nakavt sekansının mevcudiyetinde meydana gelir. Homolog rekombinasyon, hasarlı hedef zinciri onarır (132).

2.3.2. Nakavtlar ve Knock-in'ler

Baz düzenleme, bir DNA veya RNA zincirinde kesin, tek nükleotit ikameleri sağlar. Nakavtların aksine, temel düzenleme DSB'ler oluşturmaz ve bu nedenle HDR onarımından kaynaklanan hataları önler. DNA baz düzenlemesi, kesin nokta mutasyonları oluşturmak için katalitik olarak aktif olmayan bir enzimi (ölü Cas9) ve bir nükleobazdeaminazı (örneğin APOBEC1) içerir. Geleneksel olarak, bu geçiş ikameleri, benzer yapıları paylaşan nükleobazların değiştirilmesiyle sınırlıdır. Sitozin baz düzenleyicileri (CBE) C>T veya T>C geçişlerini sunar ve adenin baz düzenleyicileri (ABE) A>G ve G>A değişikliklerini başlatır (133, 134).

Bir geni kalıcı olarak çalışmaz hale getirmek (işlevsel bir proteini kodlamaz), nakavt olarak adlandırılır. CRISPR'nin gen işlevini bozma yeteneği, NHEJ mekanizmasının hataya açık doğasına dayanır. Yukarıda açıklandığı gibi, bir genin okuma çerçevesinde kaymalara neden olan indeller muhtemelen genin işlevini

sonlandıracaktır. Bu, özellikle erken durdurma kodonlarına neden olan çerçeve kaymaları için geçerlidir (135).

Çok kılavuzlu sgRNA (aynı geni hedefleyen çoklu grRNA'lar) kullanılarak bir nakavt da elde edilebilir. DNA'da birden çok eşzamanlı kesim yaparak, sgRNA'lar hedef genlerde bir veya daha fazla büyük parça delesyonunu indükler. Bu silme işlemleri birkaç amino asidi ortadan kaldırdığı için, genellikle hedeflenen geni tamamen çalışmaz hale getirir. Araştırmacılar, bir genin (ve karşılık gelen mRNA ve proteinin) dizisini kasıtlı olarak bozarak, nakavtın bir hücre veya organizmanın fenotipi üzerindeki etkisini açıklayabilirler. Dolayısıyla bu teknik, potansiyel ilaç hedeflerinin tanımlanması ve doğrulanması, hücresel yolların analizi ve antikorların doğrulanması dahil olmak üzere çeşitli uygulamalar için faydalıdır (136).

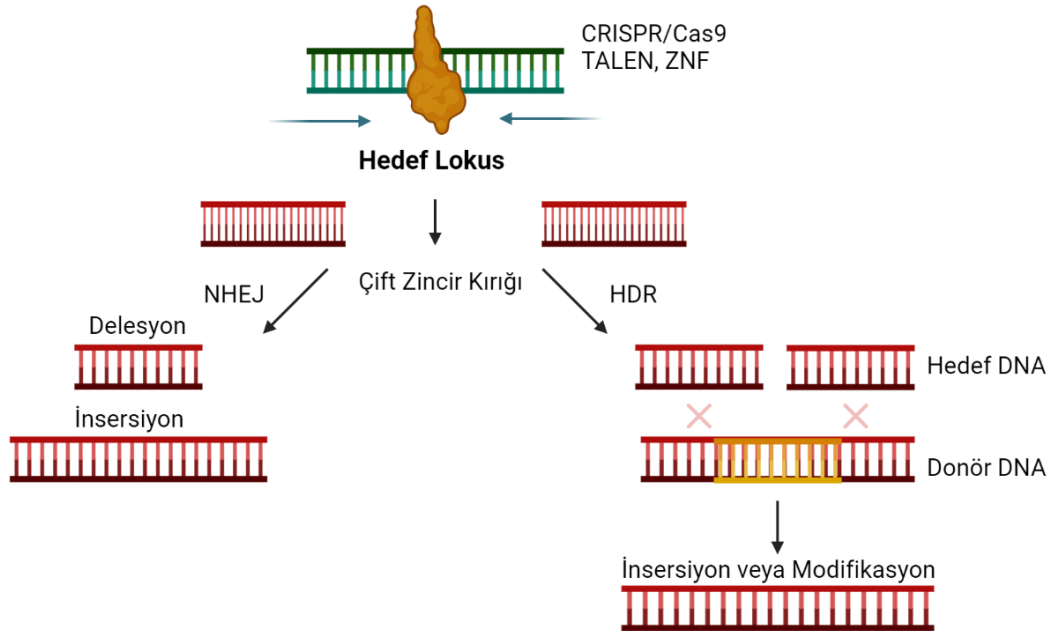
Genetik materyalin bir hücrenin genomuna dahil edilmesine Knock-in denir. Bu düzenlemeler, hücreleri HDR aracılığıyla DSB'leri onarmaya teşvik ederek elde edilir. HDR deneyleri için, homoloji bölgeleriyle çevrelenmiş knock-in sekansını içeren bir DNA şablonu, CRISPR bileşenleriyle birlikte hücrelere yerleştirilmelidir. Şablon, kopan hedef diziyi kesin olarak onarmak için kullanılır ve bu sırada devreye sokma dizisini de sürece dahil eder (136, 137). HDR, sayısız genomik yeniden yazma uygulamasının tek nokta mutasyonlarını tanıtmaktan seçilebilir işaretler eklemeye kadar olanak tanır. HDR tekniği daha fazla iyileştirme gerektirirken, araştırmacılar, farelerde kataraktlara neden olan genetik olarak kodlanmış bir mutasyonu düzeltmek ve dolayısıyla genetik temelli hastalıkları düzeltmek için bir yöntem olarak HDR konseptini kanıt olarak göstermişlerdir (138).

CRISPR sistemi, genomik bölgeleri görselleştirmek için de kullanılabilir. Bu, floresan proteinlerin (yeşil floresan protein; GFP gibi) dCas9 proteinlerine bağlanması veya RNA'lara rehberlik edilmesi ve genomun istenen kısımlarını etiketlemek için CRISPR sisteminin kullanılmasıyla elde edilir. Bu teknoloji bilim adamlarının nükleik asitleri gerçek zamanlı olarak görselleştirmelerini sağlamaktadır (139).

Nakavt Mutantlarının Tanımlanması için indel tespiti

Genom düzenleyici nükleazlar, genomda istenen bölgede çift sarmallı bir kırılma (DSB) oluşturarak işlev görür ve hücrenin endojen onarım yollarının aktivasyonuna yol açar. Hataya meyilli homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) yolu

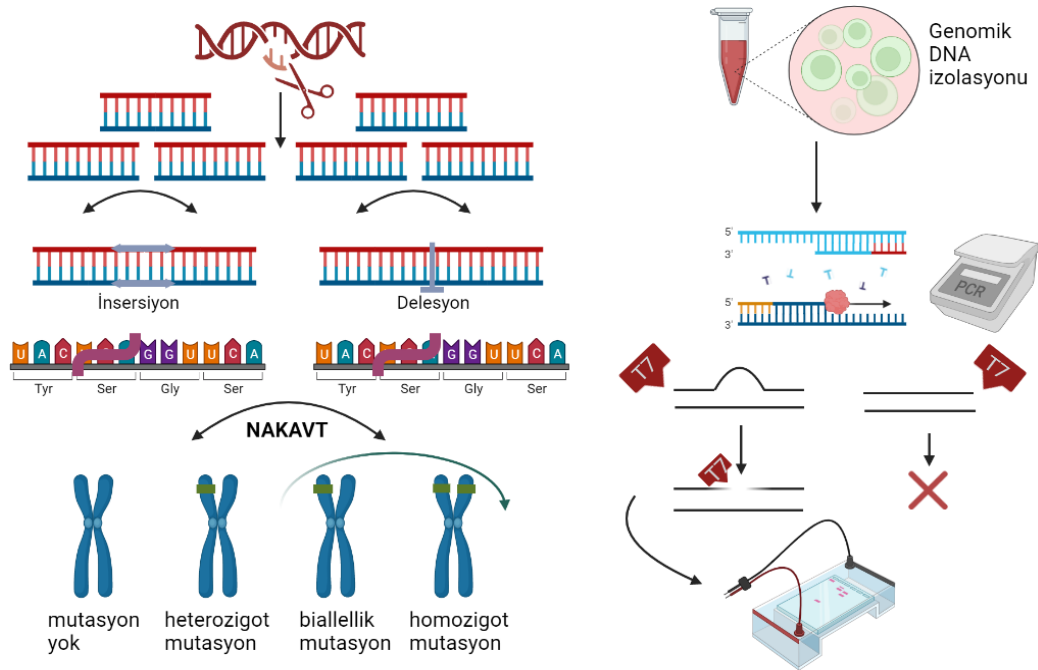
ile DSB'lerin onarımı, hedef bölgede indellerle sonuçlanır (140). Genom düzenleyici nükleazlar tarafından indüklenen indelleri tanımlamak için etkili yöntemler bulunmaktadır. İşleme sonrası PCR ürünlerinin analizine dayalı yöntemler arasında bulunan T7 Endonükleaz I (T7EI) Sindirim Testi ile Indel Tespiti bu çalışmada kullanılmıştır. T7EI testi, CRISPR reaktiflerini doğrulamak için uygun maliyetli, teknik olarak basit ve yorumlanması kolay bir yöntemdir. Genom düzenleme sırasında, enzimler, DNA dizisindeki belirli yerlerde çift zincir kırıklarına neden olur, bu da nükleotitlerin eklenmesine (insersiyon) veya silinmesine (delesyon) yol açan hataya meyilli homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) ile sonuçlanır (Şekil 2.10.) (141).



Şekil 2.10. Gen düzenlemesi sonrası oluşan onarım mekanizmaları. Şekil BioRender aracılığıyla oluşturulmuştur.

Çift sarmallı DNA'daki uyumsuzlukları ve ekstrahelikal loop yapılarını tanıyan bir enzim olan T7 endonükleaz, hatalı zinciri kesmede rutin olarak kullanılır. Bu çalışmada, potansiyel olarak indel (ekleme-silme) mutasyonu içeren DNA dizileri ve aynı zamanda indel mutasyonu içermeyen, hedeflenen hücrelerden alınan yabancı DNA, ilk olarak bölgeye özgü primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılır. PCR sırasında, bu sekanslar denatüre olarak bir hatalı eşleşme içeren heterodubleksler oluşturmaktadır (yabancı tip DNA iplikçığı ve indel içeren DNA iplikçığı melezleşerek

bir uyumsuzlukla sonuçlanır). Çoğaltılmış DNA daha sonra hatalı eşleşmeleri tanıyan ve hatalı eşleşmelerin upstream kısmından kesen T7 endonükleaz ile inkübe edilirken yabancı tip çift sarmallı DNA bozulmadan (kesilmeden) kalmaktadır. Yabancı tip DNA iplikleri ve ortaya çıkan fragmanlar (iki veya daha fazla) daha sonra elektroforez yoluyla bir agarozda jelde yürütülerek DNA bant yoğunluğunun görüntülenmesi ve ölçülmesiyle indel frekansı nicel olarak ölçülebilir hale gelmektedir (Şekil 2.11.) (141).



Şekil 2.11. T7 endonükleaz kullanılarak genom düzenlemenin değerlendirilmesi. Şekil BioRender aracılığıyla oluşturulmuştur.

2.4. Transfeksiyon

1990'dan beri insanlar üzerindeki gen tedavisi girişimlerinde gen transfer yöntemleri kullanılmaktadır. Transfeksiyon, konakçı hücrenin genetik yapısını değiştirmek için yabancı nükleik asitlerin ökaryotik hücreye verildiği bir işlemdir (142, 143). Son 30 yılda, hücresel süreçleri ve hastalıkların moleküler mekanizmalarını incelemek için geniş uygulaması nedeniyle transfeksiyon artan bir popülerlik kazanmıştır (143, 144). Günümüzde yaşam bilimleri teknolojisindeki ilerlemeler, farklı nükleik asit türlerinin (Deoksiribonükleik asitler (DNA'lar), Ribonükleik asitler (RNA'lar), siRNA'lar, miRNA'lar, shRNA) memeli hücrelerine

transfekte edilmesine olanak tanır. Genel olarak transfeksiyon, stabil ve geçici transfeksiyon olmak üzere iki tipte sınıflandırılabilir (142, 145). Stabil transfeksiyon, yabancı DNA'yı konak nükleer genomuna entegre ederek veya ekstra kromozomal bir element olarak konakçı çekirdekte bir epizomal vektörü koruyarak bir transgenin uzun süreli ekspresyonunun sürdürülmesini ifade eder (146). Transgen daha sonra hücrelerin replikasyonu ile yapısal olarak eksprese edilebilir (142, 147). Buna karşılık, geçici transfeksiyon, nükleik asitlerin konakçı hücre genomuna entegre edilmesini gerektirmez (148).

Nükleik asitler, bir plazmit şeklinde veya oligonükleotitler halinde transfekte edilebilir. Bu nedenle, konakçı hücreler çoğaldıkça transgen ekspresyonu sonunda kaybolacaktır (149, 150). Geçici transfeksiyon genellikle belirli bir genin devrilme/düşürme etkilerini araştırmak için kısa süreli çalışmalarda uygulanır. Buna karşılık, stabil transfeksiyon, büyük ölçekli protein üretiminin gerekli olduğu uzun vadeli genetik ve farmakoloji çalışmalarında faydalıdır (150).

2.4.1. Fiziksel/mekanik Transfeksiyon

Viral tabanlı olmayan transfeksiyon yaklaşımı fiziksel/mekanik yöntem ve kimyasal yöntem olarak sınıflandırılabilir. Yaygın olarak kullanılan fiziksel/mekanik transfeksiyon yöntemi, elektroporasyon, sonoporasyon, manyetofection, gen mikroenjeksiyon ve lazer ışınlamayı içerir (151). Elektroporasyon, yabancı nükleik asidin girişine izin vermek için hücre zarı geçirgenliğini geçici olarak artırmak üzere elektrik voltajı kullanan yaygın olarak kullanılan bir fiziksel transfeksiyon yöntemidir (152). Bu yöntem yaygın olarak birincil hücreler, kök hücreler ve B hücre hatları gibi transfekte edilmesi zor hücreleri transfekte etmek için kullanılır (153). Bununla birlikte, yüksek voltaj kullanımı hücre nekrozu, apoptoz ve kalıcı hücre hasarına neden olabilir (154). Ultrason destekli transfeksiyon veya sonoporasyon, genetik materyallerin transferini kolaylaştırmak için hücre zarı üzerinde delikler oluşturmak için mikro-kabarcıklar tekniğinin kullanımını içerirken, lazer ışınımı destekli transfeksiyon, yabancı genetik maddelerin girişine izin vermek için plazma zarı üzerinde küçük delikler oluşturmak için bir lazer ışını kullanır. Elektroporasyon gibi hem sonoporasyon hem de lazer destekli transfeksiyon da hücre zarına zarar verme ve geri döndürülemez hücre ölümü riski taşır (155-157). Nispeten, yabancı genetik

materyallerin transferine yardımcı olmak için manyetik kuvvet kullanan mıknatıs destekli transfeksiyon veya manyetofection, düşük verimliliğine rağmen konakçı hücreye daha az zarar veriyor gibi görünmektedir. Gen mikroenjeksiyonu ise, istenen nükleik asitleri konakçı hücrenin çekirdeğine enjekte etmek için hücreyi delmek üzere özel bir iğnenin kullanılmasını içerir. Ancak bu teknik, hücre hasarını önlemek için prosedürü yüksek hassasiyetle gerçekleştirebilen ve dolayısıyla gen tedavisi gibi klinik uygulamalarda büyük değer taşıyan özel eğitilmiş personel veya robotik sistem gerektirir. Fiziksel veya mekanik transfeksiyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında, kimyasal transfeksiyon, yabancı çekirdek asidinin konakçı hücrelere aktarılmasına yardımcı olmak için özel olarak tasarlanmış kimyasalların veya bileşiklerin kullanılmasını içerir (143, 158).

2.4.2. Kimyasal transfeksiyon

Kimyasal transfeksiyon, lipozom bazlı veya lipozom bazlı olmayan olarak kategorize edilebilir (142). Lipozomal bazlı transfeksiyon reaktifi, yabancı genetik materyallerin minimum dirençle girişine izin vermek için konak hücrenin fosfolipit çift tabakası ile sorunsuz bir şekilde birleşebilen pozitif yüklü lipit agregatlarının oluşumunu sağlayan bir kimyasaldır. Öte yandan, lipozomal olmayan transfeksiyon reaktifleri ayrıca kalsiyum fosfat, dendrimerler, polimerler, nanopartiküller ve lipozomal olmayan lipitler dahil olmak üzere birkaç sınıfa ayrılabilir (159).

Katyonik polimerler ayrıca, endositoz yoluyla hücreler tarafından genetik materyallerin alınmasına yardımcı olan negatif yüklü nükleik asitlerle kompleksler oluşturabilir. Viral vektörler ve lipofeksiyon ile karşılaştırıldığında, katyonik polimerler daha az sitotoksik üretirler ancak aynı zamanda daha düşük verimlilikle de tehlikeye girerler. Son zamanlarda nanopartiküller, nükleik asitlerin konakçı hücreye girişini artıran küçük boyutları nedeniyle lipozomal olmayan transfeksiyonda alternatif bir seçenek olarak ortaya çıkmaktadır. Lipozomal olmayan lipit bazlı nanotaşıyıcı, nükleik asitlerin ökaryotik hücrelere hızlı ve etkili bir şekilde verilmesine izin veren lipit formüllü bir nanotaşıyıcı türüdür. Lipozomal lipit nanotaşıyıcılarla karşılaştırıldığında, bu nanotaşıyıcının daha güvenli olduğu iddia edilse de hazırlanması pahalıdır (142, 160).

2.5. Bağışıklık (immün sistem), Tüberküloz ve Bacillus Calmette-Guérin (BCG) Aşısı

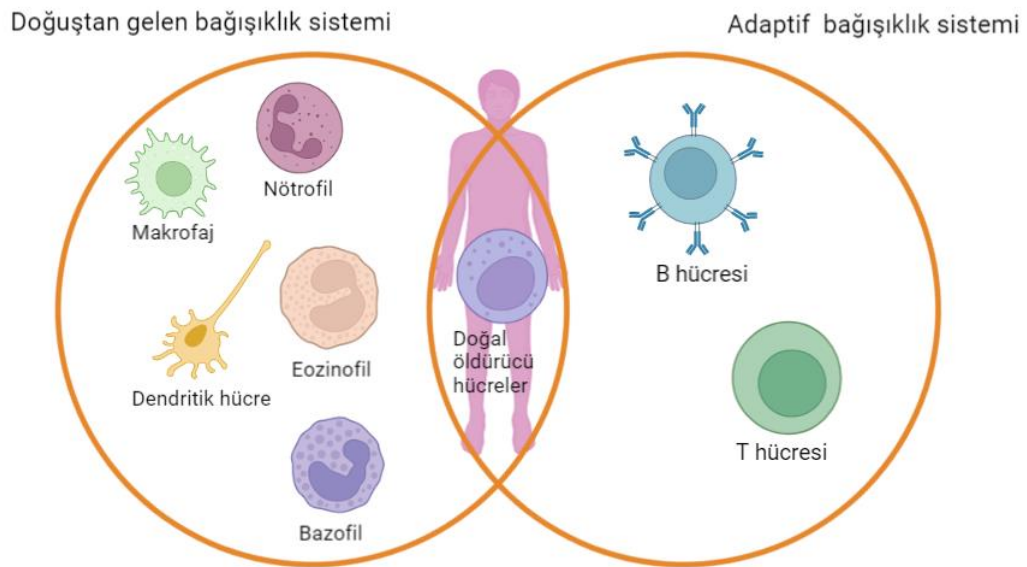
Bağışıklık, vücudun patojenlerin istilasını önleme yeteneğini ifade eder. Patojenler, bakteri ve virüsler gibi hastalığa neden olan yabancı maddelerdir ve insanlar her gün bunlara maruz kalmaktadır. Antijenler, patojenlerin yüzeyine bağlanır ve vücutta bir bağışıklık tepkisi uyarır (161). Bağışıklık sistemi iki bölümden oluşur: doğuştan gelen (genel) bağışıklık sistemi ve uyarlanabilir (adaptif) bağışıklık sistemi (Şekil 2.12.). Bu iki sistem birlikte çalışır ve farklı görevler üstlenir. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, vücuda giren mikroplara karşı vücudun ilk savunma hattıdır (162). Doğuştan gelen bağışıklık, fiziksel engeller (cilt, vücut kıllı), savunma mekanizmaları (tükürük, mide asidi) ve genel bağışıklık tepkileri (iltihap) dahil olmak üzere genel bir korumadır. Tüm mikroplara ve yabancı maddelere aynı şekilde tepki verir, bu nedenle bazen "spesifik olmayan" bağışıklık sistemi olarak adlandırılır. Bağışıklık sistemi, vücudu ne tür bir antijenin istila ettiğini tam olarak bilmesede, herhangi bir patojene karşı savunmak için hızlı tepki verebilir (163). Örneğin küçük bir yaradan deriye giren bakterilerin birkaç saat içinde yerinde tespit edilip yok edilmesini sağlar (164). Bazı proteinler (enzimler) de doğuştan gelen bağışıklık tepkisine yardımcı olmak için aktive edilir. Vücuda giren bakteri veya virüsler, çöpçü hücreler (fagositler) tarafından hemen durdurulabilir. Çöpçü hücreler, beyaz kan hücrelerinin (lökositler) özel türleridir. Bu hücreler mikropları içine alır ve onları "sindirir". Bu mikropların kalıntıları, adaptif bağışıklık sistemi tarafından tespit edilmek üzere çöpçü hücrelerin yüzeyine hareket eder (163).

Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, çok çeşitli patojenleri hızla algılayacak ve ortadan kaldıracak şekilde evrimleşmiş olsa da tanıyabileceği yaygın patojenik moleküler modellerin aralığı sınırlıdır. Antijenik yapıların ezici değışkenliği ve ayrıca patojenlerin konak tespitinden kaçınmak için mutasyona uğrama yeteneği, adaptif bağışıklık sisteminin evrimini yönlendirmiştir (165). Vücut (bir patojene bağlı olan) belirli bir antijene maruz kalır ve bu spesifik antijene karşı antikorlar geliştirir. Sözü edilen antijenin bir sonraki istilasında, vücut spesifik antijenin hafızasına sahip ve zaten onunla savaşmak için antikorlara sahip olur (166). Edinilmiş bağışıklık, bir kişinin bir hastalığa yakalandığı ve sonuç olarak bağışıklık geliştirdiği bir enfeksiyona maruz kalmaktan kaynaklanabilir. Edinilmiş bağışıklık ayrıca, aşının belirli bir

hastalığı taklit ettiği ve aşılanmış bireyde hastalanmadan bir bağışıklık tepkisine neden olduğu aşılama meydanı gelir (167).

Adaptif bağışıklık sisteminin mikropla ilk temas ettiğinde tepki vermesi birkaç gün sürebilir, ancak bir dahaki sefere vücut hemen tepki verebilir. İkinci enfeksiyon daha sonra hastalık etkisi yaratmaz veya hastalık hafif seyreder. Adaptif bağışıklık sisteminin oluşturan yapılar; T lenfositleri, B lenfositleri ve antikorlardır. T lenfositleri (ayrıca T hücreleri olarak da adlandırılır) kemik iliğinde üretilir ve daha sonra kan dolaşımı yoluyla timusa taşınır ve burada olgunlaşır. Adlarındaki "T", "timus"tan gelir (168). T hücrelerinin üç ana görevi vardır: 1) Adaptif bağışıklık sisteminin (T yardımcı hücreleri) başlatmak için diğer bağışıklık sistemi hücrelerini aktive etmek üzere kimyasal haberciler kullanırlar. 2) Virüsler veya tümörlü hücreler tarafından enfekte olmuş hücreleri tespit eder ve onları yok eder (sitotoksik T hücreleri). 3) Bazı T yardımcı hücreleri, enfeksiyon yenildikten sonra hafıza T hücreleri haline gelir. Hangi mikropların yenildiğini "hatırlayabilirler" ve daha sonra aynı enfeksiyon durumunda uyarlanmış bağışıklık sisteminin hızla etkinleştirmeye hazır olurlar (169). T hücrelerinin yüzeylerinde, belirli bir anahtarın sığacağı bir kilit gibi, mikroplara bağlanabilen algılama özellikleri vardır. Bağışıklık sistemi, bir enfeksiyondaki her bir mikrop için birkaç gün içinde eşleşen bir T hücre tipi üretebilir. Daha sonra bir mikrop eşleşen bir T hücresine bağlanırsa, T hücresi çoğalmaya başlar ve bu mikrop için özelleşmiş daha fazla T hücresi oluşturur. Sadece mikropla eşleşen hücreler çoğaldığı için, bağışıklık tepkisi özelleştirilmiştir (169). B lenfositleri (B hücreleri) kemik iliğinde yapılır ve daha sonra özel bağışıklık sistemi hücreleri olmak üzere orada olgunlaşır. Adlarını "kemik iliği"ndeki (Bone Marrow) "B" harfinden alırlar. T hücreleri gibi, belirli mikroplarla eşleşen birçok farklı B hücresi türü vardır. B hücreleri, T yardımcı hücreleri tarafından aktive edilir: T yardımcı hücreleri, yaptıkları aynı mikroplarla eşleşen B hücreleriyle temas eder. Bu, B hücrelerini çoğalmak ve kendilerini plazma hücrelerine dönüştürmek için harekete geçirir. Bu plazma hücreleri hızla çok büyük miktarda antikor üretir ve kana salınır. Yalnızca saldıran mikroplarla eşleşen B hücreleri etkinleştirildiğinden, yalnızca ihtiyaç duyulan tam antikorlar üretilecektir (170). Aktive edilmiş B hücrelerinin bir kısmı hafıza hücrelerine dönüşür ve adaptif bağışıklık sisteminin "hafızasının" bir parçası haline gelir. Antikorlar, mikropları ve diğer potansiyel olarak zararlı maddeleri hızlı bir şekilde tespit edebilir

ve ardından onlara bağlanabilir. Bu, "davetsiz misafirleri" etkisiz hale getirir ve yardım için diğer bağışıklık sistemi hücrelerini çeker. Antikor oluşumunu tetikleyebilen mikroplar ve diğer maddelere de "antijenler" denir (171). Bir antikor, bir antijene ancak tam olarak eşleşirse bağlanır. Antikorlar, adaptif bağışıklık sisteminden hızlı bir yanıt başlatmak için eşleşen mikropları bu şekilde algılar (171). Antikorların üç ana işlevi vardır: 1) Virüslerin veya bakterilerin hücre yüzeylerine doğrudan bağlanarak veya toksinlerine bağlanarak mikropları nötralize ederler. Bu, mikropların vücudun normal hücrelerine tutunmasını ve onları enfekte etmesini önler. 2) Yüzeylerine yapışarak diğer bağışıklık sistemi hücrelerini aktive ederler. Çöpçü hücreler de antikorlarla yüklü mikroplarla daha iyi savaşabilir. 3) Bağışıklık sistemi tepkisine yardımcı olan proteinleri aktive ederler. Adaptif bağışıklık sisteminin antikorları da doğuştan gelen bağışıklık sistemini destekler. Adaptif bağışıklık sisteminin çeşitli hücreleri ya doğrudan ya da sitokinler (küçük proteinler) gibi çözünür kimyasal haberciler aracılığıyla iletişim kurar. Bu kimyasal haberciler çoğunlukla proteinlerdir ve vücuttaki farklı hücreler tarafından üretilirler (171). Antikorlar, kan dolaşımında dolaşan protein ve şeker bileşikleridir (171).



Şekil 2.12. Doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık sistemine ait yapılar. Şekil BioRender tarafından oluşturulmuştur.

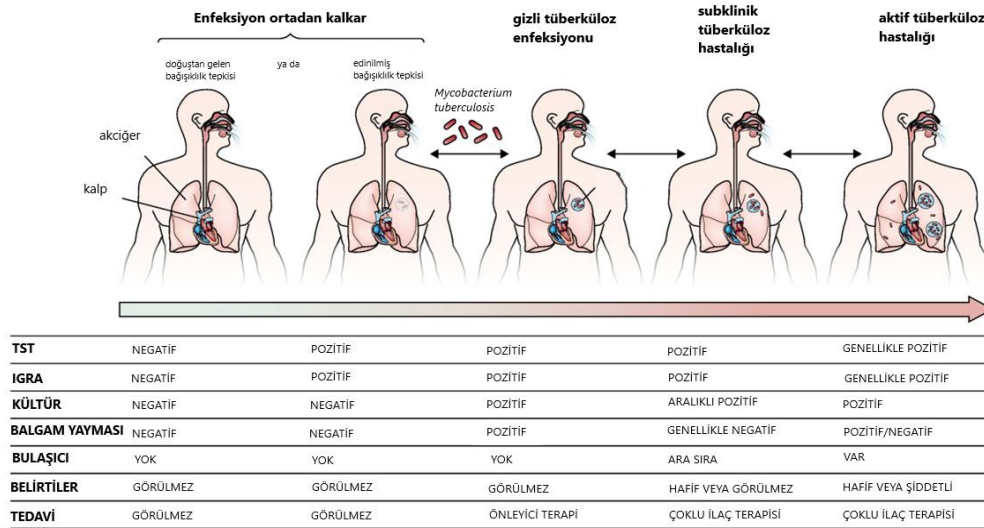
Uzun bir süre, bağışıklık hafızası, adaptif bağışıklık sisteminin özel bir özelliği olarak kabul edilmiştir . Bununla birlikte, aşılarda hedef enfeksiyonlarının ötesindeki etkilerini gösteren, giderek artan sayıda epidemiyolojik ve immünolojik çalışma birikmeye başlamıştır. Bu heterolog etkiler, antijene özgü adaptif immün belleğin uyarılmasıyla açıklanamaz. Aşının bu hedef dışı etkilerine dahil olan bir mekanizma, antijenlerin çoklu ve farklı ligandları tanıyabilen çapraz reaktif T hücrelerinin oluşumuna yol açtığı heterolog T hücre bağışıklığı ile temsil edilir (172). Doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinde, fiili bir doğuştan gelen bağışıklık belleğiyle oluşan bu tür adaptif özellikler, spesifik değildir ve gelişmiş konak savunması ile sonuçlanır. Doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin sonraki bir saldırıya karşı gelişmiş bağışıklık tepkileri gösterdiği süreç, eğitilmiş bağışıklık olarak adlandırılmaktadır (173, 174). Eğitilmiş bağışıklık, birincil bir uyarı ile karşılaştıktan sonra doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin uzun vadeli işlevsel yeniden programlanmasıdır ve bu ikincil bir zorlanmaya karşı artırılmış bir yanıtla sonuçlanır. Eğitilmiş bağışıklığın uyarılması birçok hücre tipinde gözlenmiştir ayrıca kapsamlı metabolik ve epigenetik yeniden şekillenme aracılığı eder (175). Eğitilmiş bağışıklığın uyarılmasıyla ilişkili fonksiyonel değişikliklerin en az bir yıl sürdüğü gösterilmiştir; öte yandan, epidemiyolojik çalışmalar, aşılamanın neden olduğu spesifik olmayan koruma durumunda 5 yıla kadar uzun vadeli etkiler göstermiştir (175, 176). Eğitilmiş bağışıklığın uyarılması, hem monositler, makrofajlar , dendritik hücreler ve nötrofiller gibi mononükleer miyeloid hücrelerde hem de doğal öldürücü (NK) gibi lenfoid hücrelerde gösterilmiştir (177-180).

Tüberküloz ve BCG aşısı

Bulaşıcı bir hastalık ve dünya çapında önde gelen ölüm nedeni olan tüberküloz, son 25 yıldır küresel bir halk sağlığı acil durumu olarak kabul edilmektedir. Tüberküloza yönelik halk sağlığı yaklaşımları on milyonlarca hayatı kurtarmış olsa da tüberkülozu kontrol etmek için mütevazı bir ilerleme kaydedilmiştir. İlaça dirençli tüberküloz türleri, şu anda dünyanın en ölümcül patojenleri olma yolundadır ve antimikrobiyal direnç nedeniyle ölümlerin dörtte birinden sorumludur. Tüberkülozun epidemiyolojisi, risk faktörleri ve patofizyolojisine ilişkin çok sayıda ilerleme kaydedilmiştir (Şekil 2.13.) (181). Bunun bir sonucu olarak tüberküloz enfeksiyonu ve

hastalığının tüm biçimleri için yeni teşhis ve tedaviler ufukta belirmektedir. Tüberküloz, dünya çapında önemli morbidite ve mortaliteye neden olmaya devam etmektedir. DSÖ'ye (Dünya Sağlık Örgütü) göre, 2017'de tahminen 10 milyon insan yeni tüberküloz hastası olmuştur. Bu bireylerin 8,7 milyonu (%87) hastalık yükünün yüksek olduğu 30 ülkede bulunmaktadır. Bu 10 milyon kişiden sadece 6.4 milyonu teşhis edilmiş ve resmi olarak bildirilmiştir (182). Her yıl 1.3 milyon insanın tüberkülozdan öldüğü tahmin edilmektedir. Tüberküloz bir yoksulluk hastalığıdır. Çoğu yüksek gelirli ülkenin tüberküloz insidansını yılda 100.000 nüfustan daha az olarak tahmin etmesine rağmen, yüksek tüberküloz yükü olan 30 ülkede (ağırlıklı olarak düşük gelirli ve orta gelirli ülkelerdir) tahmini toplu tüberküloz insidansı 100'de 183'tür (183). TB için Küresel Hastalık, Yaralanma ve Risk Faktörleri yükü verileri (1990–2016), insidanstaki mevcut eğilimler devam ederse, çok az ülkenin BM (Birleşmiş Milletler) Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri'nin 2030 yılına kadar salgını sona erdirmeye hedefini karşılamasının muhtemel olduğunu göstermektedir (182, 184, 185). Bireysel bazda, tüberküloza karşı bağışıklığın, tek bir konakçı içinde bile zamanla dalgalandığı görülmektedir (186). Yakın tarihli bir çalışmada, bireysel granülomlarda bulunan bağışıklık yanıtları, enfeksiyon bölgesindeki yerel bağışıklık tepkilerinin tüberkülozu kontrol etmede önemli olduğunu düşündürmektedir (187). Veriler ayrıca, tüberküloza maruz kalan bazı kişilerin enfekte olmadığını, diğerlerinin ise minimum düzeyde maruz kalsa bile enfeksiyona ve hastalığa hızla yenik düştüğünü göstermektedir (188). Tüberküloz ilaç direnci açısından veriler, ilaca dirençli tüberkülozla başvuran birçok kişinin ilaca dirençli suşlarla enfekte olduğunu göstermektedir (189). Bilim camiasında uzun süredir *M. tuberculosis* ile yeni enfekte olmuş kişilerin enfeksiyondan sonraki ilk birkaç yıl içinde hastalığa ilerleme riskinin en yüksek olduğu konusunda ortak bir inanç olmasına rağmen, tarihsel verilerin analizi *M. tuberculosis* inkübasyonunun muhtemelen daha kısa olduğunu doğrulamıştır (190). Bu bulgu, yakın zamanda maruz kalan ve yüksek progresyon riski taşıyan bireyleri (örn. yakın temaslılar) belirlemenin ve onlara önleyici tedavi sunmanın, hastalığın ilerlemesini önlemek için etkili bir strateji olabileceğini düşündürmektedir. Bazı biyobelirteçler, en yüksek ilerleme riski taşıyan bireyleri belirleme konusunda umut vaat etmektedir (191). Yerel bağışıklık tepkileri ve hastalık toleransı dahil olmak üzere patojen ve konak faktörlerinin tüberküloz hastalığının patogenezi ve gelişmekte olan

risk faktörlerini nasıl açıklayabileceğine ve sosyoekonomik risk faktörleri üzerinde de önemli çalışmalar yapılmıştır. Sosyoekonomik düzeyi düşük nüfuslardan gelen kişilerin tüberküloz hastalığına yakalanma riskinin yüksek olduğu bilinmektedir (192) TB yükünün düşük olduğu ülkelerde, genel yaşam koşullarındaki iyileşmenin bir sonucu olarak TB morbidite ve mortalitesinde önemli düşüşler meydana geldiği bilinmektedir (193). Peru'nun gecekondü mahallelerinde yapılan bir çalışmada, iç mekan hava kirliliği, oda başına az sayıda pencere bulunan bir evde yaşama ve hane halkının sosyoekonomik konumu dahil olmak üzere bazı değiştirilebilir sosyoekonomik risk faktörlerinin TB enfeksiyonu ve hastalığının güçlü belirleyicileri olabileceğini ortaya koymuştur (194). Ayrıca, bir kez TB geçirmiş kişilerde tekrar TB gelişme riski yüksektir, bu da yoksulluk ve TB kısır döngüsünü daha da kötüleştirir. TB enfeksiyonunun anlaşılmasını geliştirmek için kontrollü bir insan enfeksiyon modeli, bu alanda karşılanmamış bir ihtiyaçtır (Şekil 2.13.) (195).

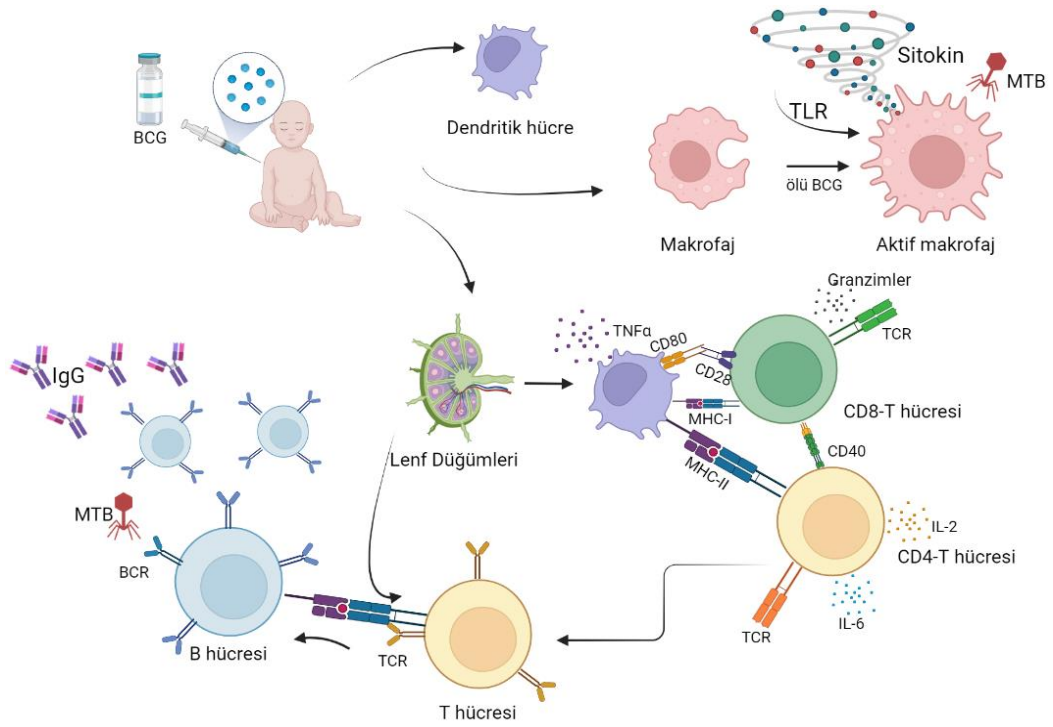


Şekil 2.13. Tüberküloz enfeksiyonu ve hastalığının spektrumu (196).
IGRA=interferon- γ salgın testi. TST=tüberkülin cilt testi.

Bacillus Calmette-Guérin (BCG) aşısı, tüberkülozu (TB) önlemek için 1921'den beri kullanılmaktadır ve dünyanın en yaygın kullanılan aşısı olarak kabul edilmektedir. Bu aşı, TB akciğer hastalığının ilerlemesini azaltmak için önemli bir profilaktik önlemdir. BCG çoğu durumda yaşamın ilk günlerinde uygulanmakta ve

neonatal TB ölümlerinde azalmaya yol açmaktadır (197). Robert Koch tarafından 1882'de keşfedilen *M. tuberculosis* (Mtb), diğer insan patojenlerine kıyasla daha fazla ölümden sorumludur (198, 199). BCG, dört milyardan fazla dozla TB'ye karşı şu anda mevcut olan tek ve en yaygın uygulanan aşıdır. BCG bağışıklama kapsamı ise tahmini olarak %85 'dir (200). BCG'nin etkinliği ise değişken olup, bebeklerde yayılmış TB'nin şiddetli formları ile enfeksiyondan korusa da, en yaygın form olan akciğer tüberkülozuna karşı koruma sağlamaz (201). Koruyucu tepkisini artırmak için, rekombinant canlı aşılardan yanı sıra alt birim aşılardan (viral vektörlü veya adjuvanlanmış rekombinant proteinlere dayalı) dahil olmak üzere çeşitli alternatif aşı adayları geliştirilmektedir (202). Şu anda her yıl 140 milyon bebeğe BCG aşısı yapılmaktadır (203). Piyasaya sürülmesinden yüz yıl sonra, canlı atenüe BCG aşısı halen kullanımda olan en eski aşıdır ve BCG aşısının spesifik olmayan immünolojik etkisi, eğitilmiş bağışıklığın iyi tanımlanmış bir örneğidir. Bu immün yanıt, epigenetik sinyalleme içerir ve temel olarak monositler/makrofajlar ve doğal öldürücü (NK) hücreler aracılığıyla eder (Şekil 2.14) (204). BCG aşılması yoluyla indüklenen adaptif bağışıklık tepkisi, makrofajlar tarafından sergilenen anti mikobakteriyel aktiviteyi artıran, CD4+ ve CD8+ T hücresi aktivasyonunu ve yüksek seviyelerde interferon gama (IFN- γ) içerir. IFN- γ ayrıca B hücrelerinin aktivasyonuna ve plazma hücreleri tarafından antijen özgü antikorların üretilmesine de katkıda bulunur. BCG aşılması, bağışıklık hazırlayan uzun kodlayıcı ribonükleik asit (RNA) ve artan haberci RNA (mRNA) ekspresyonunun yukarı regülasyonuna yol açar ve BCG tarafından eğitilmiş makrofajlar tarafından artan sitokin üretimi, yüksek seviyelerde tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) ile sonuçlanır. Bu yanıtların süresi belirsizdir ancak bir yıl veya daha uzun sürebilir. Biriken veriler, hedef dışı bağışıklığı indüklemeye BCG aşısının rolüne dair mekanik bir anlayış sağlar (205-209). 1920'lerde kullanıma sunulmasından hemen sonra BCG aşısının TB üzerindeki etkisinden bağımsız olarak bebek ölümlerini azalttığı bilinmektedir. BCG aşısının viral enfeksiyonlara karşı hedeflenmemiş koruyucu etkilere sahip olabileceği de düşünülmektedir. Bunlar arasında RSV'nin (Respiratuar Sinsiyal Virüs) neden olduğu akut alt solunum yolu enfeksiyonları da yer almaktadır. Yapılan bazı çalışmalar BCG aşılması ile solunum yolu enfeksiyonlarında neredeyse üç kat azalma olduğunu bildirmiştir (210). Enfeksiyonlara karşı profilaktik koruma sağlamanın yanı sıra, BCG'nin virüs aracılığıyla

linik durumlarda spesifik olmayan immünoterapi olarak da etkili olduğu gösterilmiştir. Bu etkilerin bilinen bir örneği, HPV'nin (İnsan Papilloma Virüs) neden olduğu kutanöz ve genital siğillere karşı BCG'nin olumlu etkisidir. Ayrıca BCG, viral enfeksiyonlara yönelik aşılarla verilen yanıtı da iyileştirebilir. 40 sağlıklı gönüllü üzerinde yapılan randomize kontrollü bir çalışma, influenza aşılamasından önce BCG aşısının 2009 pandemik H1N1 (İnfluenza A) aşısı suşuna karşı antikor titresini arttırdığını göstermiştir (211). Ayrıca, BCG HBV aşısı (Hepatit B Aşısı) gibi diğer aşılarla yanıt verme üzerindeki etkisine yönelik etkiler gözlenmiştir (212, 213). On yıldan daha kısa bir süre öncesine kadar sadece B ve T lenfositlerinin hafıza tepkileri oluşturabildiği düşünülüyordu. Bununla birlikte, son zamanlarda yapılan çok sayıda çalışma, doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin fonksiyonel programının, belirli enfeksiyonlar veya aşılar üzerine değiştirildiğini ve bunun, hücreler ikincil bir uyararla karşılaştığında artan bir bağışıklık tepkisi ile sonuçlandığını göstermiştir. Doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinde spesifik olmayan bir hafızanın uyarılmasına 'eğitilmiş bağışıklık' adı verilmektedir (214). Kanıtlar, BCG'nin spesifik olmayan etkilerini indüklediği anahtar mekanizmanın, muhtemelen T hücresi ve B hücresi bazlı adaptif yoldan ziyade, doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinde, özellikle doğal öldürücü (NK) hücrelerde, monositler ve makrofajlarda immünolojik hafızanın uyarılması yoluyla olduğunu göstermektedir (Şekil 2.14.). Fonksiyonel T ve B hücrelerine sahip olmayan SCID (Şiddetli Kombine İmmün Yetmezlik) görülen farelerde BCG aşılmasının, bu etkiye aracılık etmede doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin önemini ortaya koymaktadır (215-217).



Şekil 2.14. BCG aşısı intrakutan olarak enjekte edildikten sonra monositler, makrofajlar ve DC'ler (dendritik cell) aşı yerinde BCG'yi tanıır ve güçlü bir bağışıklık tepkisi oluşturur. BCG, DC'ler veya makrofajlar tarafından tanıır ve içselleştirilir. BCG'nin hücre duvarı veya diğer bileşenleri, farklı ligandlara bağlanan, uyarılmış hücrelerin kostimulatör moleküllerini yukarı regüle eden ve TB'ye karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkisini aktive eden PRR'ler (Model tanıma reseptörleri) olarak işlev görür. Aktive edilmiş DC hücreleri, mikobakteriyel spesifik CD4+ ve CD8+ T hücrelerini bir Th1 profili ile aktive etmek için lenf düğümlerine göç eder ve ardından IFN-gama ve granzim gibi yüksek seviyelerde sitokinlerin salgılanmasını indükler. Aynı zamanda BCG antijenlerine yanıt veren B hücreleri, hafıza hücrelerinin, plazma hücrelerinin ve antijene özgü antikorların üretimine yol açar (218). Şekil BioRender kullanılarak oluşturulmuştur.

Bu tez çalışması kapsamında öncelikle insanda tanımlanan TIMELESS proteini karakterize edilerek fizikokimyasal özellikleri, tahmini hücre altı lokalizasyonu ve 3D protein yapısı belirlenmiş ve diğer sirkadiyen genlerle olan evrimsel ilişkisi filogenetik analizlerle tanımlanmıştır. Sirkadiyen genler ve bağışıklık arasındaki ilişkide TIMELESS'in rolünü araştırmak için hedef miRNA'lar *in silico* yollarla araştırılmıştır. Ardından, BCG aşısı 84 doğuştan gelen ve adaptif gen üzerinden qRT-PCR tekniği ile incelenerek gen ekspresyonu ve bağışıklık yolları hakkında yeni bulgular elde edilmiştir. Daha sonra CRISPR/Cas9 teknolojisi

aracılığıyla HEK293 hücresinde TIMELESS geni nakavt edilerek BCG aşısının etkinliği 84 doğuştan gelen ve adaptif gen üzerinde qRT-PCR teknolojisi ile araştırılmıştır. Sonuç olarak TIMELESS geni ile immün yanıtlar arasında yeni bulgular elde edilmiştir. Bu çalışma ile sadece mevcut tekniklerin optimize edilerek laboratuvar ortamında kullanılması sağlanmamış, aynı zamanda TIMELESS geninin insanlardaki önemi de ilk kez bu kadar kapsamlı bir şekilde tespit edilmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kimyasal Malzemeler ve Biyolojik Materyaller

Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM)	Biochrom AG, Almanya
Penisilin/Streptomisin	Sigma, İsrail
SYBR Green Gerçek zamanlı PCR kiti	ThermoFisher, ABD
Tripan mavisi	Sigma, ABD
Tripsin-EDTA	Sigma, Almanya
NEAA (Non-Essential Amino Acid)	ThermoFisher, ABD
HEPES (N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)	ThermoFisher, ABD
Pyruvate (Pirüvik asit),	ThermoFisher, ABD
L-glutamine	ThermoFisher, ABD
Fetal sığır serumu	Sigma, Almanya
İnsan embriyonik böbrek hücre hattı (HEK293)	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC), ABD
T4 Ligasyon Bufferi	New England Biolabs, ABD
T4 Polinükleotit Kinaz	New England Biolabs, ABD
pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458)	Addgene, ABD
Reaksiyon Bufferi (NEB)	New England Biolabs, ABD
Q5 Polimeraz (NEB)	New England Biolabs, ABD
5x iScript Reaksiyon Karışımı	Biorad, ABD
iScript Ters Transkriptaz	Biorad, ABD
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (Quick CIP) (NEB#M0525S)	New England Biolabs, ABD
Tissue DNA Mini Kit	FavorPrep™, Tayvan
Tissue RNA Mini Kit	FavorPrep™, Tayvan
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (2x)	Biorad, ABD
Genomic DNA Extraction Mini Kiti	FavorPrep™
Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	New England Biolabs, ABD
T7 Endonükleaz I (M0302)	Biorad, ABD
RT2 Profiler PCR Arrays (RT ² Profiler™ PCR Array Human Innate & Adaptive Immune Responses)	Qiagen, Almanya

3.2. TIMELESS Proteininin *in silico* Yollarla Karakterize Edilmesi, Tahmini Hücre Altı Lokalizasyonunun Belirlenmesi, 3D Protein Yapısı ve Evrimsel İlişkileri

NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veritabanı kullanılarak TIMELESS peptid ve CDS sekansları indirilmiştir. TIMELESS proteinlerine ait fizikokimyasal özellikler ExPASy ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) kullanılarak elde edilmiştir (219). Tahmini hücre altı lokalizasyonları WoLF PSORT: Protein Subcellular Localization Prediction Tool (<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>) kullanılarak belirlenmiştir. TIMELESS proteininin 3D yapısı AlphaFold Protein Structure Database (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>) kullanılarak belirlenmiştir (220). MEGA11 programı kullanılarak Maximum likelihood (ML) metodu (bootstrap değeri=1000) ile filogenetik ağaç oluşturulmuştur (221). Multiple EM for Motif Elicitation (MEME 4.11.1; <https://meme-suite.org/>) çevrimiçi aracı kullanılarak sirkadiyen genlere ait protein yapıları analiz edilmiştir (222).

3.3. TIMELESS'e Özgü miRNA Hedeflerinin Tahmini

miRDB (<https://mirdb.org/>) çevrimiçi aracı kullanılarak TIMELESS genine özgü hangi miRNA'ların hedeflendiği analiz edilmiştir (223). Daha sonra Cytoscape 3.9.1 (<https://cytoscape.org/download.html>) yazılımı kullanılarak elde edilen veriler sonucunda ilişki ağı görselleştirilmiştir (224).

3.4. TIMELESS'a özgü genom düzenleme

3.4.1. Kılavuz RNA (gRNA) Seçimi ve pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) Vektörüne Klonlama Çalışmaları

Kılavuz RNA'ların tasarımı için <https://benchling.com/editor> online program kullanılarak sense ve antisense oligolar tasarlanmıştır (Tablo 3.1.): Sense iplikçik, fonksiyonel bir proteini kodlayan mRNA'nın tam nükleotit dizisini içerir. Antisens zinciri, transkripsiyon için şablon görevi görür ve kopyalanan mRNA'ya tamamlayıcı nükleotit sekansı içerir. Bu nedenle antisens iplik, proteinlerin translasyonundan sorumludur.

Tablo 3.1. gRNA 'lar için dizayn edilmiş sense ve antisense oligoların sekansları

<i>Primer</i>	Sekans
<i>TIMELESS gRNA Forward 1</i>	CACCGCTAGCCACATGTAGTGCCCT
<i>TIMELESS gRNA Reverse 1</i>	AAACAGGGCACTACATGTGGCTAGC
<i>TIMELESS gRNA Forward 2</i>	CACCGCAACCAGCCTTGCTCTGTTT
<i>TIMELESS gRNA Reverse 2</i>	AAACAAACAGAGCAAGGCTGGTTGC

3.4.2. gRNA Oligolarının Hibridize Edilmesi ve Fosforilasyonu

gRNA için sense ve antisense oligolar hibridize ve fosforile edilmiştir (Tablo 3.2.). Vektör içine klonlamada kullanılmak üzere ddH₂O kullanarak 1:200 oranında seyreltilmiştir.

Tablo 3.2. gRNA oligolarının hibridizasyonu ve fosforilasyonu için kullanılan reaksiyon bileşenleri

<i>Reaksiyon bileşenleri:</i>
<i>1ul sense gRNA oligo (100uM)</i>
<i>1ul antisense gRNA oligo (100uM)</i>
<i>1ul T4 Ligasyon Bufferı (NEB)</i>
<i>0,5ul T4 Polinükleotit Kinaz (T4 PNK) (NEB# M0201S)</i>
<i>6,5 ul ddH₂O</i>
<i>Toplam 10 ul</i>

Reaksiyon karışımı PCR cihazı kullanılarak inkübe edilmiştir: 37 °C 30 dakika; 95 °C 5 dakika; ve dakikada 5 °C düşecek şekilde 25 °C'ye düşürülmüştür.

3.4.3. pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plazmidinin BbsI Enzimi ile Kesilmesi ve Defosforilasyonu

Çalışma için pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plazmiti seçilmiş ve ticari olarak elde edilmiştir (Şekil 3.1.). Plazmit BbsI enzimi ile kesilerek defosforilasyonu gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.3).

3.4.4. Hibridize Edilmiş Oligoların pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) Plasmidi ile Ligasyonu ve Transformasyonu

Ayrı ayrı hibridize edilmiş gRNA1 ve gRNA2 ile ayrı ayrı reaksiyon kurulmuştur (Tablo 3.4.).

Tablo 3.4. Hibridize edilmiş oligoların pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plasmidi ile ligasyonu ve transformasyonu

<i>Reaksiyon bileşenleri:</i>
<i>100ng/ul kesilmiş pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plasmid</i>
<i>1ul T4 Ligasyon Bufferı(NEB)</i>
<i>1ul T4 DNA Ligaz (NEB#0202S)</i>
<i>X ul ddH₂O</i>
<i>Toplam 10 ul</i>

1ul hibridize olmuş ve fosforile edilmiş oligolar(gRNA)(1:200) (gRNA1 ve gRNA2 için ayrı ayrı kuruldu)

Reaksiyon karışımı 25°C de 1 saat boyunca inkübe edilmiş ve gRNA1 ve gRNA2 için hazırlanan ligasyon ürünleri ayrı ayrı *E.coli* DH5 α 'ya transforme edilmiştir.

3.4.5. gRNA'nın Vektör İçine İnsersiyonunun Kontrolü

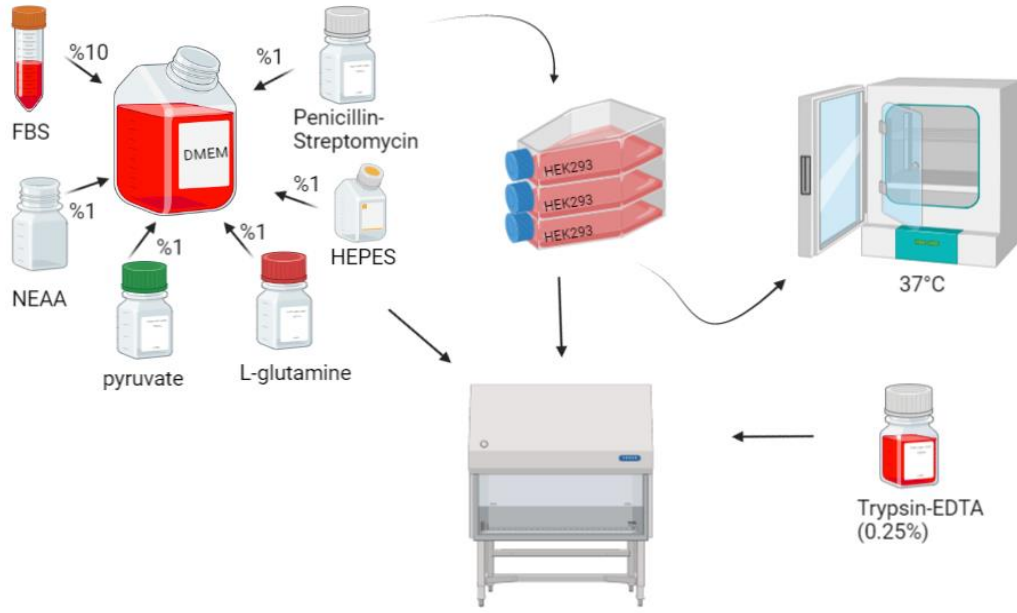
Transformasyondan sonra seçilen ve kültürü yapılan kolonilerden plazmit izole edildikten sonra, hU6 forward primeri ve gRNA1- gRNA2 antisense oligosu kullanılarak ~260bp lik bir alan standart PCR ile çoğaltılmış ve gRNA1 ve gRNA2 dizisinin plazmit içindeki varlığı PCR ürünün jelde yürütülmesi ile test edilmiştir (Tablo 3.5.)

Tablo 3.5. gRNA'nın vektör içine insersiyonunun kontrolü

<i>Reaksiyon bileşenleri:</i>	
5ul	5X Q5 PCR Reaksiyon Bufferı (NEB)
0,5ul	dNTPs 10 mM
1,25ul	10 uM hU6 Forward Primeri (evrensel primer)
1,25ul	10 uM gRNA1 / gRNA2 Reverse Primeri
1ul	Plazmit (~100ng/ul)
0,25ul	Q5 Polimeraz (NEB)
15,75ul	ddH ₂ O
<i>Toplam 25ul</i>	
<i>PCR koşulları:</i>	
<i>Denatürasyon</i>	98°C 30 saniye. (1 tur)
<i>(35 döngü)</i>	98°C 10 saniye 60°C 20 saniye 72°C 20 saniye
<i>DNA Sentezi</i>	72°C 10 dakika. (1 tur) +4°C ∞

3.5. Hücre Kültürü ve Gen Ekspresyonunun Kontrolü

Hem temel hem de uygulamalı çalışmalarda yaygın olarak kullanılan HEK293 (İnsan embriyonik böbrek) hücreleri bu çalışma için seçilmiştir ve Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC), ABD'den temin edilmiştir. %10 glikozlu DMEM'e %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 Penicillin-Streptomycin, %1 NEAA (Non-Essential Amino Acid), %1 HEPES (N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)), %1 pyruvate (Pirüvik asit), %1 L-glutamine eklenerek 37 C'de inkübe edilmiştir. Hücreler pasajlanırken (Trypsin-EDTA (0.25%)) kullanılmıştır (Şekil 3.2.) *In silico* olarak TIMELESS geninin HEK293 hücre hattında ifade edildiği belirlenmiş (<https://maayanlab.cloud/Harmonizome/>).



Şekil 3.2. HEK293 hücre hattının yetiştirilmesi (Şekil BioRender kullanılarak oluşturulmuştur).

Daha sonra genin ifadesini deneysel anlamda doğrulamak üzere HEK293 hücre hattından RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılarak uygun primerler tasarlanmış ve gen ifadesi kesin olarak kontrol edilmiştir. FavorPrep™ Tissue RNA Mini Kit kullanılarak üreticinin protokolüne uygun bir şekilde RNA elde edilmiştir;

Hücreler $1\sim 5 \times 10^6$ arasında sayılarak $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika boyunca $300 \times \text{g}$ 'de santrifüjlenerek toplandı. Süpernatantı atıldı.

Hücre peletine $350\ \mu\text{l}$ FARB Tamponu ve $3,5\ \mu\text{l}$ β Merkaptotanol eklenerek kuvvetlice vortekslendi.

Toplama Tüpüne bir Filtre Kolonu yerleştirilerek ve numune karışımı Filtre Kolonuna aktarıldı ve 2 dakika boyunca $18.000 \times \text{g}$ 'de santrifüjlendi.

Süpernatant Toplama Tüpünden yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve süpernatantın hacmini ölçüldü. Ardından hacme göre %70 RNaz içermeyen etanol eklendi ve vortekslenerek iyice karıştırıldı.

FARB Mini Kolon Toplama Tüpüne yerleştirildi ve etanol eklenmiş numune karışımı FARB Mini Kolona aktarıldı. FARB Mini Kolona $500\ \mu\text{l}$ Yıkama Tamponu eklendi. 30 saniye boyunca $18.000 \times \text{g}$ 'de santrifüjlendi. Akışı atıldı ve FARB Mini Kolonu Toplama Tüpüne tekrar takıldı.

FARB Mini Kolona 750 µl Yıkama Tamponu 2 eklendi. 30 saniye boyunca 18.000 x g'de santrifüjlendi. Akışı atıldı ve FARB Mini Kolonu Toplama Tüpüne tekrar takıldı ve bu işlem yinelenildi.

Tüpler 3 dakika boyunca 18.000 x g'de santrifüjlendi. Akışı atıldı ve FARB Mini Kolonu Toplama Tüpüne geri takıldı. FARB Mini Kolonu bir Elüsyon Tüpüne yerleştirildi.

FARB Mini Kolonunun membran merkezine 30 ~ 50 µl RNaz içermeyen ddH₂O eklendi. 1 dakika boyunca sıcaklığında bekletildikten sonra tipler 18.000 x g'de 30 saniye santrifüjlendi.

Elde edilen RNA'yı -80 °C'de saklanabilir hale getirildi. Saflık ve miktarları nanodrop ile ölçülüp ardından çalışma boyunca elde edilen RNA ve kontrolünü sağlamak üzere %1'lik agaroz jelde yürütüldü.

Jel için; Tris-asetik asit-EDTA (TAE) tamponuna, 4 µl EtBr jel boyası eklenerek elektroforez tankına döküldü. Örnekler 4 µl RNA örneği, 2 µl DNA jel yükleme boyası (DNA Loading Dye) ile karıştırılarak jele yüklenmiştir ve 120 voltta 40 dakika yürütülerek UV-Jel görüntüsü sistemi ile görüntüler elde edilmiştir. Ardından gen ifadesini ölçmek üzere tek iplikli RNA cDNA'ya dönüştürülmüştür (Tablo 3.6.). cDNA eldesi için BIO-RAD iScript™ cDNA Synthesis Kiti kullanılmıştır

Tablo 3.6. cDNA sentezi için kullanılan bileşenler ve reaksiyon koşulları

<i>Bileşenler</i>	<i>Hacim</i>	<i>Döngü</i>	<i>Süre</i>	<i>Sıcaklık</i>
<i>5x iScript Reaksiyon Karışımı</i>	4	Hazırlık	25°C	5
<i>iScript Ters Transkriptaz</i>	1	Ters Transkripsiyon	46°C	20
<i>Nükleaz olmayan su</i>	12	RT inaktivasyon	95°C	1
<i>RNA</i>	3	Opsiyonel	4 °C	sınırsız

Ardından OligoAnalyzer™ Tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) kullanılarak qRT-PCR yapılmış gen ifadesi kontrol edilmiştir ve 40 döngülük qRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.7.).

Tablo 3.7. TIMELESS'a özgü primer çiftleri ve gen ifadesinin ölçülmesine dair reaksiyon bileşenleri/koşulları

TIMELESS'a özgü tasarlanan primer çiftleri		
<i>TIM Forward</i>	CAACCAGAGGAAGGAACAGAAG	
<i>TIM Reverse</i>	TGTGCTCGGTGGCTCTCTTTAC	
<i>qRT-PCR bileşenleri</i>		
Bileşenler	Hacim miktarları	
<i>iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (2x)</i>	5 µl	
<i>İleri Primer (10 µM)</i>	0.5 µl	
<i>Geri Primer (10 µM)</i>	0.5 µl	
<i>cDNA</i>	1 µl	
<i>Nükleaz olmayan su</i>	3 µl	
<i>Toplam Reaksiyon Hacmi</i>	10 µl	
qRT-PCR reaksiyon koşulları		
<i>Döngü</i>	°C	Süre (s)
<i>Ön denatürasyon</i>	95 °C	30
<i>Denatürasyon</i>	95 °C	15
<i>Bağlama/Uzama</i>	60 °C	30
<i>Melting Curve Analysis</i>	60 °C → 95 °C	

3.6. Hücre hattına gRNA1 ve gRNA2 İçeren Plazmitlerin Transfeksiyonu

Amaxa 4D-Nucleofector Protokolüne uygun olarak gerçekleştirilen transfeksiyon süspansiyonu hazırlanmıştır. Bunun için V4XC-2024 kiti kullanılmıştır. Hücreler protokole uygun bir biçimde 1×10^6 sayılarak 90g'de 10 dk oda sıcaklığında santrifüjlenmiştir. Süpernatant tamamen çıkarılarak her numuneye uygun mixler eklenerek hücreler Nucleofector solüsyonu ile süspansiyon edilmiştir. Oluşturulan solüsyon; 1×10^6 hücre, 1 ul plasmid DNA VE SF 4D-Nucleofector X Solition içermektedir. Elde edilen karışım Nucleocuvette damarlarına aktarılmıştır ve HEK293'e özgü CM-130 programı kullanılarak transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon işleminden sonra hücreler önceden oda sıcaklığına getirilmiş ortamla yeniden süspansiyon edilmiştir.

3.7. T7 Endonükleaz Testi

gCntrl ve gRNA1/2 transfekte edilmiş hücreler, hedeflenen bölgelerde uygulanan indel mutasyonlarını doğrulamak için T7 endonükleaz testine tabi tutulmuştur.

Hücreler, tripsinizasyon ve santrifüjleme ile toplanmıştır. FavorPrep™ Genomic DNA Extraction Mini Kiti kullanılarak üreticinin talimatlarına göre genomik DNA izolasyonu yapılmıştır;

Numune bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Numuneye 4 µl 100 mg/ml RNaz A eklendi ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

Numuneye 20 µl Proteinaz K ve 200 µl FABG Tamponu eklendi ve vortekslendi. Örneği parçalamak için 60 °C'de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sırasında numune her 3-5 dakikada bir vortekslendi.

Numuneye 200 µl etanol (%96-100) eklendi. 10 saniye vortex ile karıştırıldı. FABG Mini Kolonu Toplama Tüpüne yerleştirildi ve dikkatlice FABG Mini Kolona aktarıldı.

6.000 x g'de 1 dakika santrifüjlendi, ardından FABG Mini Kolonu yeni bir Toplama Tüpüne yerleştirildi.

FABG Mini Kolona 400 µl W1 Tampon eklendi ve 30 saniye boyunca tam hızda (18.000 x g) santrifüjlendi, ardından süpernatant atıldı.

FABG Mini Kolona 750 µl Yıkama Tamponu eklendi ve 30 saniye boyunca tam hızda santrifüjlendi ardından süpernatant atıldı.

Kolonu kurutmak için 3 dakika daha tam hızda santrifüjlendi. FABG Mini Kolonu bir Elüsyon Tüpüne yerleştirildi.

FABG Mini Kolonun membran merkezine 80 µl Elüsyon Tamponu eklendi. FABG Mini Kolonu 3 dakika bekletildi. Toplam DNA'yı elute etmek için 1 dakika boyunca tam hızda santrifüjlendi.

T7 Endonükleaz I (M0302) kullanılarak genom hedefleme verimliliği belirlenmiştir; Şablon olarak ~100 ng genomik DNA kullanarak verilen sıcaklıklarda 50 µl PCR reaksiyonu kurulmuştur (Tablo 3.8.).

Tablo 3.8. T7 endonükleaz sırasında kullanılan primer çiftleri

İleri Primer	CATGAGGATGAGACACGAGATG
Geri Primer	GAGACAATGAAGGAGGGAGAAG

Primerler OligoAnalyzer™ Tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) kullanılarak tasarlandı ve 40 döngülük qRT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Kontrol gRNA için insanda ifade olmayan GFP geni seçilerek hazır temin edilmiştir. PCR ürününün konsantrasyonu 200 ng olacak şekilde, T7 endonükleaz testine tabi tutuldu ve PCR ürünlerini aşağıdaki koşulları kullanarak bir termocycler içinde inkübe edildi (Tablo 3.9.).

Tablo 3.9. Elde edilen DNA'ların saflık ve miktarları, PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler, miktarlar ve reaksiyon koşulları

Bileşenler	Reaksiyon hacmi	
Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (M0494)	25 ul	
10 uM İleri Primer	2.5 ul	
10 uM Geri Primer	2.5 ul	
Kalıp DNA	100 ng	
Nuclease-free su	50 µl'ye kadar	
PCR için gereken reaksiyon koşulları		
ADIM	SICAKLIK	ZAMAN
İlk Denatürasyon	98°C	30 saniye
35 döngü	98°C	5 saniye
	*50-72°C	10 saniye
	72°C	20 saniye
Son Uzatma	72°C	2 dakika
Tutma	4-10°C	

5 ul PCR ürünü, amplifikasyonu doğrulamak için %1.5 agaroz jel üzerinde çalıştırıldı. PCR ürünlerine T7 Endonükleaz I eklendi ve protokle uygun olarak reaksiyon gerçekleştirildi (Tablo 3.10.). Daha sonra 1.5 µl 0.25 M EDTA ekleyerek reaksiyonu durduruldu. Ardından %1,5'lük jelde yürütülerek indel mutasyonu doğrulandı.

Tablo 3.10. T7 Endonükleaz reaksiyon bileşenleri, T7 Endonükleaz I testi için hibridizasyon koşulları

<i>BİLEŞENLER</i>		<i>19 µl bağlanma reaksiyonu</i>	
<i>DNA</i>		200 ng	
<i>10X NEBuffer 2</i>		2 ul	
<i>Nükleazsız Su</i>		19 µl'ye kadar	
<i>T7 Endonükleaz I testi için hibridizasyon koşulları</i>			
<i>ADIM</i>	<i>SICAKLIK</i>	<i>HIZ</i>	<i>ZAMAN</i>
<i>İlk Denatürasyon</i>	95 °C		5 dakika
<i>Bağlanma</i>	95-85 °C 85-25°C	-2°C/saniye -0.1°C/saniye	
<i>Tutma</i>	4°C		-
<i>Bağlanmış PCR ürünlerine T7 endonükleaz I</i>			
<i>BİLEŞEN</i>		20 µl REAKSİYON	
<i>Tavlı PCR ürünü</i>		19 ul	
<i>T7 Endonükleaz I (M0302)</i>		1 ul	
<i>İnkübasyon süresi</i>		15 dakika	
<i>İnkübasyon Sıcaklığı</i>		37°C	

3.8. Aşı ile Muamele

Deneyleerde SII BCG aşısı (Hindistan Serum Enstitüsü), kullanılmıştır. Aşı, zayıflatılmış bir canlı organizma olan *Mycobacterium bovis*'in, Bacillus of Calmette ve Guerin suşlarını içermektedir. Dondurularak kurutulmuş BCG, tam ortam içinde sulandırıldı ve her 0,1 ml sulandırılmış BCG konsantrasyonu, üreticinin belirttiği 2×10^5 ila 8×10^5 C.F.U aralığına göre tahmini ortalama 5×10^5 C.F.U. (C.F.U.). 1×10^5 HEK293 hücre süspansiyonu (gRNA ekspresyon plazmidi içerir), 24 oyuklu mikro titre plakasına ekilmiştir. Yirmi dört saat sonra hücreler, 72 saat boyunca 20 ul (1.2×10^4 C.F.U) yeniden yapılandırılmış BCG aşısı ile muamele edilmiştir (225). 72. saatte dayanıklı kalabilen maximum konsantrasyondaki hücreden FavorPrep™ Tissue RNA Mini Kit yukarıda değinildiği gibi kullanılarak üreticinin protokolüne uygun bir şekilde RNA elde edilmiştir ve ardından BIO-RAD iScript™ cDNA Synthesis Kiti kullanılarak gen ifadesinde kullanılmak üzere cDNA elde edilerek nanodropta ölçülmüştür.

Tablo 3.11. Aşılama sonucu elde edilen hücre grupları

Hücre Numaraları	Hücre Grupları
I	Aşılı Normal HEK293
II	Aşısız Normal HEK293
III	Aşılı Nakavt TIMELESS HEK293
IV	Aşısız Nakavt TIMELESS HEK293

3.9. qRT-PCR ile Gen İfadesinin Ölçülmesi Ve İstatistik Analiz

Gen ifadesini ölçmek için RT2 Profiler PCR Arrays (RT² Profiler™ PCR Array Human Innate & Adaptive Immune Responses) kullanılmıştır (Tablo 3.12.). İçeriği tüpün dibine getirmek için RT2 SYBR® Green Mastermix (10–15 s) kısa süre santrifüjlenmiştir. PCR bileşen karışımını RT2 Profiler PCR Array formatına bağlı olarak yükleme rezervuarında hazırlanmıştır (Tablo 3.14.). Aşağıda açıklandığı gibi, RT2 Profiler PCR Array formatına bağlı olarak PCR karışımı RT2 Profiler PCR Array içine dağıtılmıştır. Bu çalışma verilerin normalizasyonunda kullanılmak üzere 5 adet housekeeping gen (ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1 ve RPLP0) içermektedir. qRT-PCR verilerinin normalizasyonu ve istatistiksel analizleri RT² Profiler PCR Array (Qiagen, Katalog Numarası: PAHS-052Z) üreticisinin talimatlarına uygun şekilde yapılmıştır. Bu kapsamda verilerin analizi için RT² Profiler PCR Data Analysis (<https://dataanalysis2.qiagen.com/pcr>) programından yararlanılmıştır. Verilerin analizi üreticinin talimatları doğrultusunda belirtilen şekilde 2^{-delta delta Ct} formülasyonu ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.12. RT2 Profiler PCR kitinin yerleşimi

	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	APCS	C3	CASP1	CCL2	CCL5	CCR4	CCR5	CCR6	CCR8	CD14	CD4	CD40
B	CD40LG	CD80	CD86	CD8A	CRP	CSF2	CXCL10	CXCR3	DDX58	FASLG	FOXP3	GATA3
C	HLA-A	HLA-E	ICAM1	IFNA1	IFNAR1	IFNB1	IFNG	IFNGR1	IL10	IL13	IL17A	IL18
D	IL1A	IL1B	IL1R1	IL2	IL23A	IL4	IL5	IL6	CXCL8	IRAK1	IRF3	IRF7
E	ITGAM	JAK2	LY96	LYZ	MAPK1	MAPK8	MBL2	MPO	MX1	MYD88	NFKB1	NFKBIA
F	NLRP3	NOD1	NOD2	RAG1	RORC	SLC11A1	STAT1	STAT3	STAT4	STAT6	TBX21	TICAM
G	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TNF 4	TRAF6	TYK2

Tablo 3.13. Gen ifadesini ölçmek için kullanılan bileşenler ve qRT-PCR için kullanılan reaksiyon koşulları

Reaksiyon Bileşenleri	96'lı well için toplam hacim	
<i>2x RT2 SYBR® Green Mastermix</i>	1350 µl	
<i>cDNA</i>	102 µl	
<i>RNase-free water</i>	1248 µl	
Total Hacim	2700 µl	
Döngü	Süre	Sıcaklık
<i>1</i>	10 dk	95 °C
<i>40</i>	15 sn	95 °C
	1 dk	60 °C

4. BULGULAR

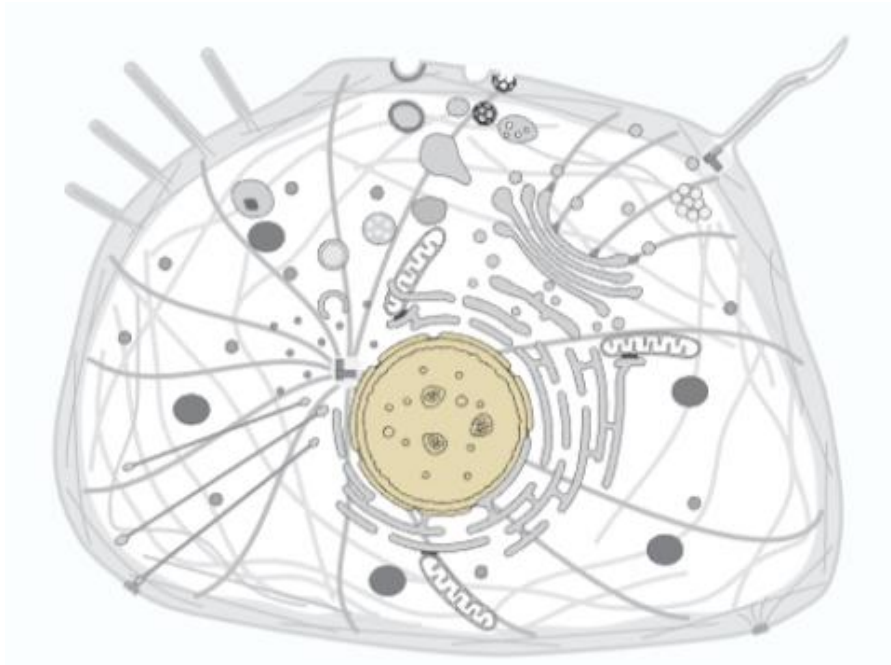
4.1. TIMELESS Proteininin *In Silico* Yollarla Karakterize Edilmesi, Tahmini Hücre Altı Lokalizasyonunun Belirlenmesi, 3D Protein Yapısı ve Evrimsel İlişkileri

Bu tez çalışması kapsamında TIMELESS proteinin karakterizasyonu ve fizikokimyasal özellikleri araştırılmıştır. Amino asit uzunluğu, moleküler ağırlığı, izoelektrik noktası (pI), kararsızlık indeksi, alifatik indeksi ve GRAVY değeri belirlemiştir (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. TIMELESS proteinine ait fizikokimyasal sonuçlar

Amino Asit	Moleküler Ağırlık	İzoelektrik Nokta	Kararsızlık indeksi	Kararlı/karasız	Alifatik index	GRAVY
1207	13.8 kDa	5.26	61.93	Stabil değil	89.82	-0.519

Genomda 12q13.3 üzerinde yer alan TIMELESS'in Wolf Psort çevrimiçi aracı (<https://wolfsort.hgc.jp/>) kullanılarak, öngörülen hücre altı lokalizasyonu belirlenmiş ve çekirdekte lokalize olduğu tahmin edilmiştir (nucl: 31.5, cyto_nucl: 16.5).



Şekil 4.1. TIMELESS proteinine ait tahmini lokalizasyon

İçerdiği yapılara göre TIMELESS proteinine ait 3 boyutlu homoloji görüntüsü elde edilmiştir (Tablo 4.2). Elde edilen verilere sonucunda TIMELESS'in helix, beta strand ve turn için özellikler gösterdiği anlaşılmıştır (Şekil 4.2.). İçerdiği protein yapıları X-Ray, NMR ve EM'den elde edilerek hazırlanmış verilere dayalı olarak Alpha Fold aracılığıyla uygun zincir ve pozisyonlarına ait 3 boyutlu homoloji görüntüsü elde edilmiştir (Tablo 4.2.). Sekans benzerliklerinden çıkarılan ve literatürden elde edilen deneysel çıktılara göre; pozisyon 1-309 bölgesinin homodimerizasyon, CRY1 ve CHEK1 ile etkileşim için gerekli alan, 816-954'ün DNA bağlama alanı, 1000-1098'in PARP1 ile etkileşim, 1182-1199'un nükleer lokalizasyon için gerekli bölge olduğu geri kalanların ise düzensiz, polar ya da asisik/bazik kalıntı içerdiği anlaşılmıştır. DNA bağlama alanı (816-954 kalıntıları) hem tek sarmallı DNA'ya (ssDNA) hem de çift sarmallı DNA'ya (dsDNA) bağlanır ve G-dörtlü (G4) yapıları oluşturan guanin bakımından zengin DNA dizileri için yüksek afiniteye sahiptir. DNA bağlama alanını ve PARP1 bağlama bölgesini içeren C-terminal alanı, G-dörtlü (G4) yapıları oluşturan genomik guanin açısından zengin DNA dizilerinin kopyalanması için gereklidir. Kalıntı 1182-1199'un, farazi bir nükleer lokalizasyon sinyali içerdiği; sirkadiyen saatin periyot uzunluğunun düzenlenmesi için ise nükleer lokalizasyonun gerekli olduğu bilinmektedir (11, 226, 227).

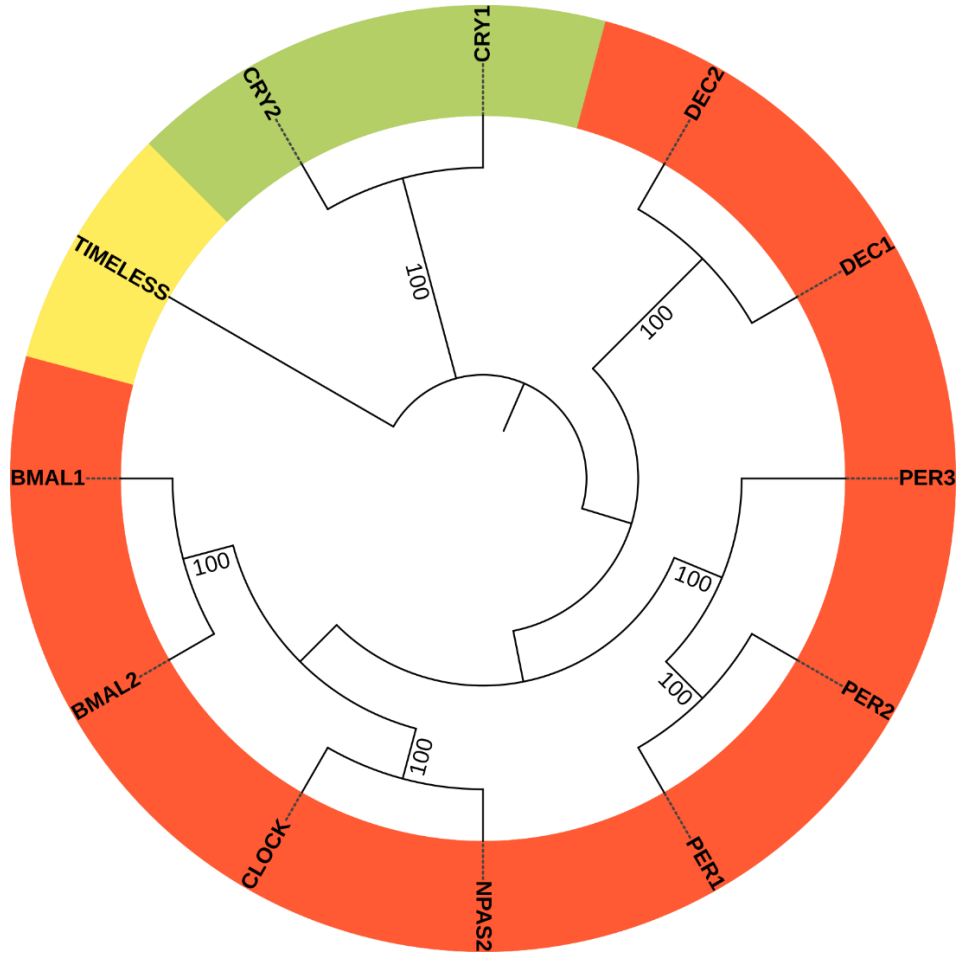


Şekil 4.2.TIMELESS proteinine ait 3D yapı

Tablo 4.2. TIMELESS proteininde görülen içerikler

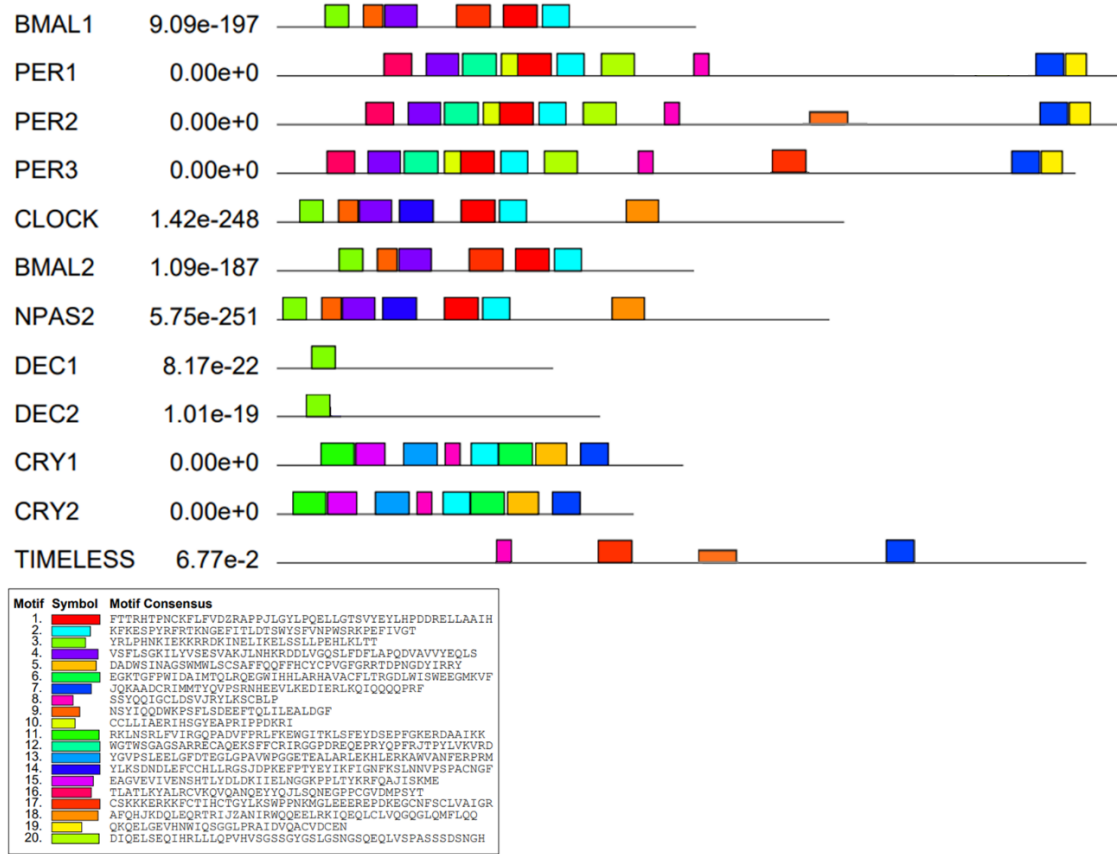
İsim	Method	Resolution (Å)(elektron yoğunluğu)	Zincir	Pozisyon
4XHT	X-ray	1.65 Å	A/B/C/D	1000-1098
4XHU	X-ray	2.09 Å	B/D	1000-1098
4XHW	X-ray	2.85 Å	A/B/C/D	1000-1098
5MQI	X-ray	1.85 Å	-	-
6T9Q	X-ray	1.15 Å	A	883-947
6TAZ	NMR	-	B	816-954
7PFO	EM	3.20 Å	K	1-1208
7PLO	EM	2.80 Å	K	1-1208

Tez çalışması kapsamında TIMELESS geninin diğer sirkadiyen genlerden farklı özellikleri olmasından yola çıkarak peptid sekansları kullanılmış ve öncelikle motif, ardından filogenetik ağaç elde edilerek evrimsel ilişkileri incelenmiştir (Şekil 4.3.). Edinilen bulgulara göre sirkadiyen genlerin filogenetik ağaçta 3 ana gruba ayrıldığı görülmüştür. TIMELESS'in diğer tüm genlerden farklı bir grupta bulunduğu, CRY1 ve -2'nin aynı grupta bulunduğu, geri kalan DEC1, -2, PER1,-2, -3, BMAL1, -2 ve CLOCK ile NPAS2'nin aynı grupta yer aldığı görülmüştür. Benzer içeriklere sahip DEC, PER ve BMAL'nin ise aynı dal altında toplandığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. ML yöntemi kullanılarak 1000 tekrarlı şekilde oluşturulan filogenetik ağaç

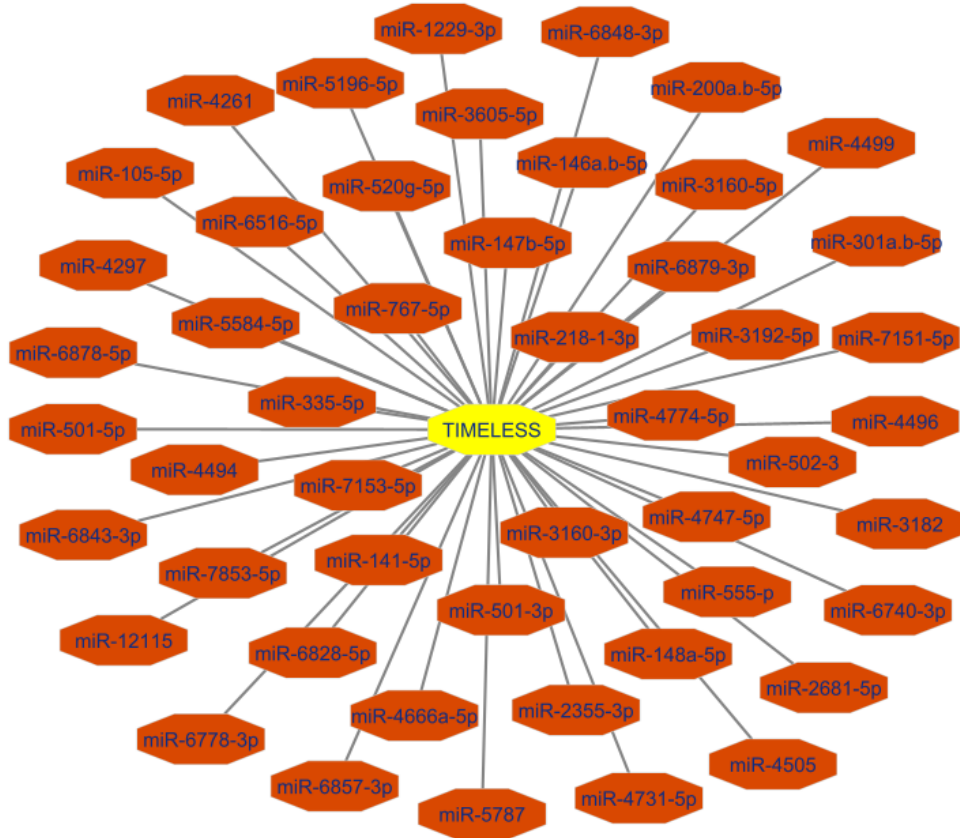
Sirkadiyen genlerde toplam 20 farklı korunmuş motif tanımlanarak amino asit dizileri Şekil 4.4.'te gösterilmiştir. Motif analizi incelendiğinde ise, aynı gruplarda bulunan alt türlerin benzer motif yapısı içerdiği anlaşılmıştır. BMAL1 ve BMAL2, PER1 ve PER3, CRY1 ve CRY 2, DEC1 ve DEC2'nin birebir aynı motif içeriğine sahip olduğu anlaşılmıştır. Aynı şekilde aynı dal altında toplanan CLOCK ve NPAS2 genin de birebir aynı motif içeriğine sahip olduğu anlaşılmıştır. Elde edilen bulgular filogenetik ağacı doğrular niteliktedir. PER ve CRY alt ailelerinin tamamında bulunan Motif 7'nin ve Motif 8'in, PER3'te bulunan Motif 9'un, PER2'de bulunan Motif 17'nin, TIMELESS geninde de bulunan ortak motifler olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 4.4. Sirkadiyen proteinlerin korunmuş 20 motifine ait şematik gösterim. Motifleri tanımlamak için MEME çevrimiçi aracı kullanılmıştır. Her motif tipi farklı renkteki kutularla gösterilmiştir ve kutulardaki sayılar (1-20) motifleri ifade etmektedir. Her renkli kutunun uzunluğu ve konumu boyuta göre ölçeklendirilmiştir ve motif konsensüsü sağlanmıştır.

4.2. miRNA Hedefleme Analizi ile TIMELESS Geninin Regülasyonu

MikroRNA'lar (miRNA'lar), küçük endojen kodlamayan RNA'ların ana sınıfını temsil eder ve tüm insan genlerinin neredeyse üçte birini kontrol eder (228, 229). Proliferasyon, farklılaşma, hayatta kalma ve apoptozda miRNA'lar için temel roller öneren veriler biriktikçe, miRNA'ların tümörjenezde önemli olduğunun bulunması ve yeni kanser tedavileri için umut verici terapötik hedefler olarak kabul edilmesi şaşırtıcı değildir (230). Bu tez çalışması kapsamında TIMELESS gen transkriptlerine ait 52 miRNA hedefi tanımlanmıştır (Şekil 4.5., EK 1).



Şekil 4.5. TIMELESS'ı hedefleyen miRNA'lar

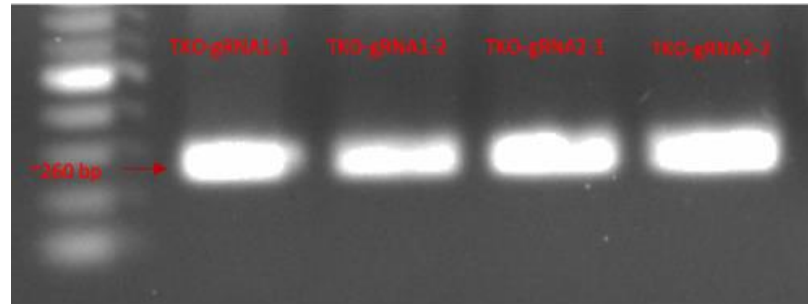
4.3. TIMELESS'a Özgü Genom Düzenleme

BbsI restriksiyon enzimi ile pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plazmiti 245-267'den kesim yapılarak Şekil 4.6.'da gösterilen sekans uzaklaştırıldı. gRNA1 ve gRNA2 ayrı ayrı gRNA scaffold sekansının önüne yerleştirildi.



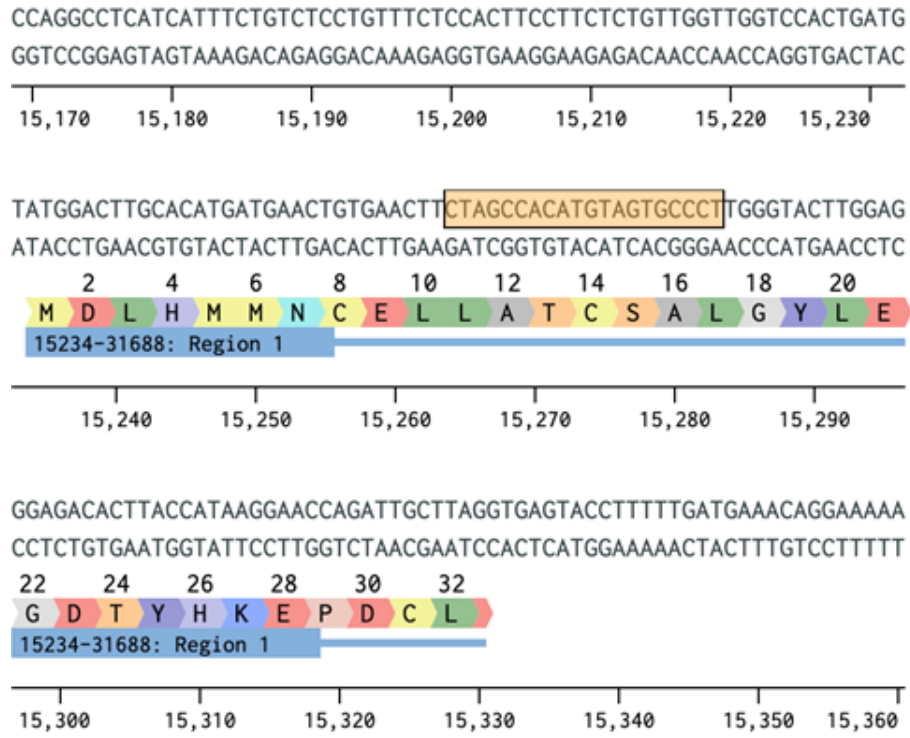
Şekil 4.6. pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plasmidi BbsI enzimi ile muamele edildikten sonra kesilip uzaklaştırılan sekans

gRNA1 ve gRNA2 dizisinin plazmit içindeki varlığı PCR ürünün jelde yürütülmesi ile test edildi (Şekil 4.7.).

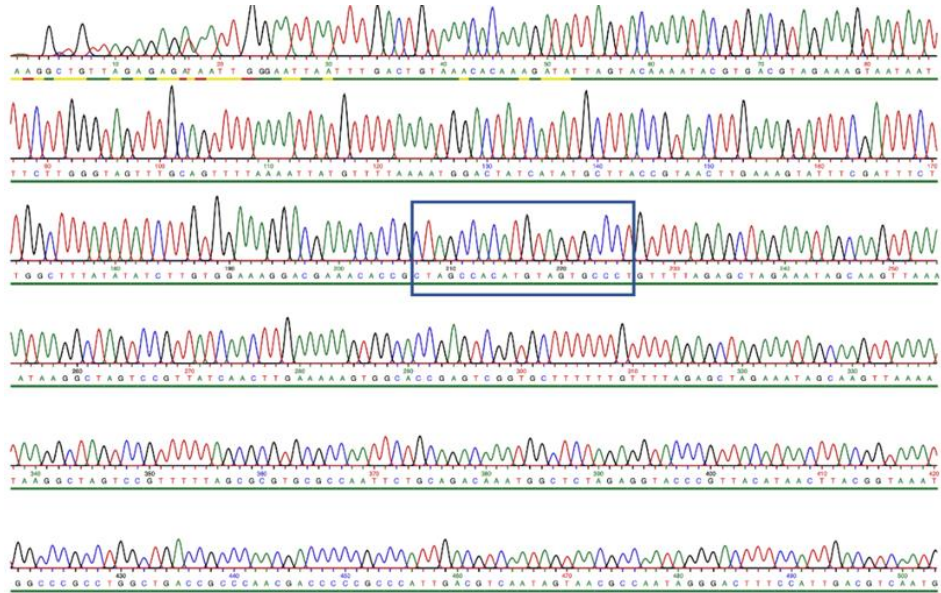


Şekil 4.7. gRNA1 ve gRNA2 sekansının plazmid içine insersiyonunun kontrol PCR'ı.

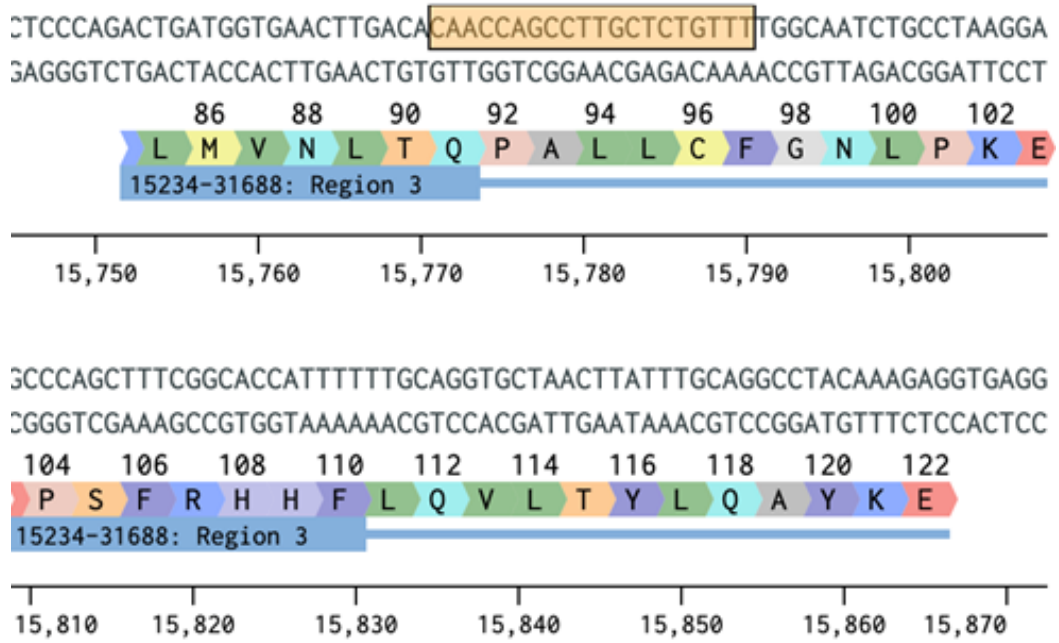
PCR ürününün jelde yürütülmesi ve ~260 bp'lik bölgenin varlığının tespit edilmesinden sonra, sekans insersiyonunun doğrulanması için Sanger sekanslanmıştır.



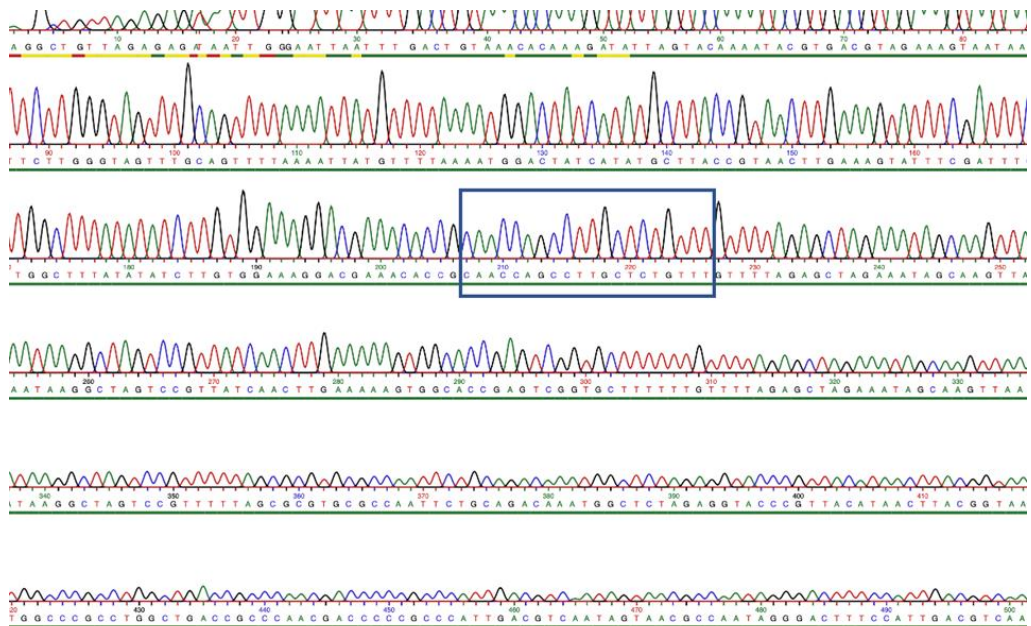
Şekil 4.8. TIMELESS sekansında bulunan gRNA1'in pozisyonu



Şekil 4.9. gRNA1 sekansının pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plasmidine istenilen bölgeye doğru oryantasyonda klonlandığını gösteren sanger sonucu. (kullanılan sonuç: gRNA1-U6-fwd.ab ; sekansı kontrol etmek için kullanılan primer dizisi:U6 forward primer)



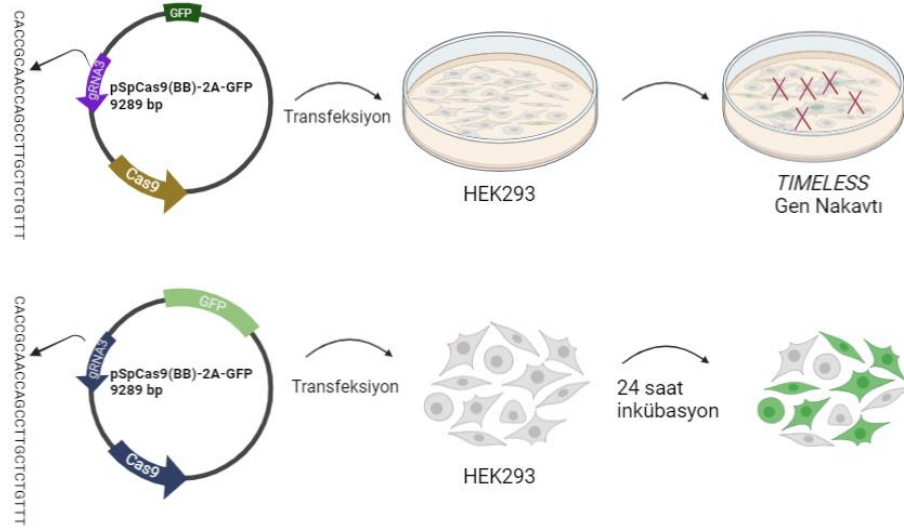
Şekil 4.10. TIMELESS sekansında bulunan gRNA1'in pozisyonu



Şekil 4.11. gRNA2 sekansının pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) plasmidine istenilen bölgeye doğru oryantasyonda klonlandığını gösteren sanger sonucu. (kullanılan sonuç: gRNA3-U6-fwd.ab ; sekansı kontrol etmek için kullanılan primer dizisi: U6 forward primer)

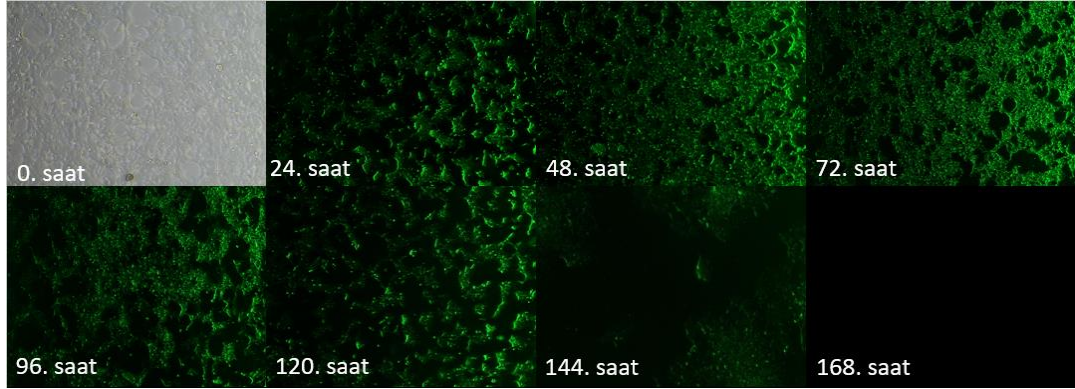
4.4. gRNA Taşıyan pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) Plasmidinin HEK293 Hücre Hattına Transfeksiyonu

İndel mutasyon sonucuna göre gRNA2 tercih edilerek transfeksiyon gerçekleştirilmiştir ve GFP ile kontrol sağlanmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Transfeksiyon sonucu TIMELESS nakavtı ve GFP oluşumunun şematize edilmesi

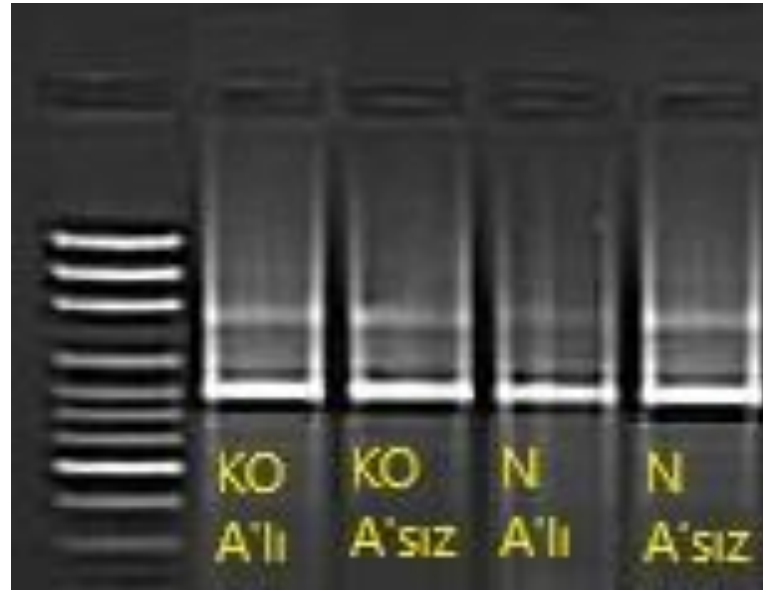
Elde edilen bulgulara göre ilk 168 saatlik görüntüler kaydedilmiştir (Şekil 4.13.). 48. saatte aşı ile muamele gerçekleştirilerek 120. saatte RNA elde edilmiştir. 144 ve 168. saatlerde ise GFP görüntüsü giderek azalmış ve yok olmuştur.



Şekil 4.13. Transfeksiyon işleminin ardından HEK294 hücre hattının ilk 168 saatlik GFP görüntüleri. 0. saat hücrenin ters ışık mikroskop görüntülemeleri (20x büyütme) 24. saat -168. saat floresan mikroskop görüntülemeleri (20x büyütme).

4.5. TIMELESS ve KO TIMELESS'in Gen İfade Sonuçları

Normal ve TIMELESS nakavt HEK293 hücre hattından elde edilen RNA'lar öncelikle jel üzerinde yürütülmüş (Şekil 4.14.) ve cDNA'ya dönüştürmüştür.

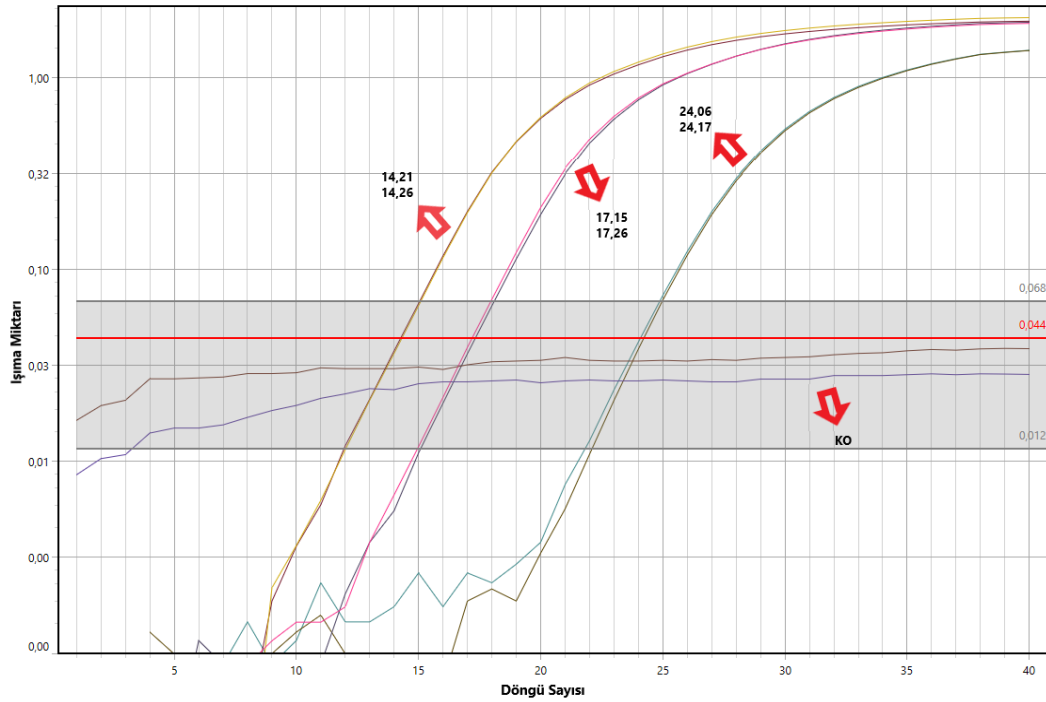


Şekil 4.14. Aşılı ve aşısız elde edilen normal ve nakavt RNA'lara ait jel görüntüleri (KO: nakavt, N: Normal, A'lı: aşılı, A'sız: aşısız)

Tablo 4.3. Aşı ile muamele edilen normal ve nakavt hücrelere ait konsantrasyon ve saflık miktarları. Sunulan datalar ikişer biyolojik tekrarın ortalamasını ifade eder.

	RNA Saflık Oranı (260/280)	RNA Konsantrasyon (ng/ µl)	cDNA (260/280)	cDNA Konsantrasyon (ng/ µl)
Aşılı Normal HEK293 – Grup I	2.03	779.7 ng/µl	1.91	1242.4 ng/µl
Aşısız Normal HEK293 – Grup II	2.07	789.3 ng/µl	1.90	1141.4 ng/µl
Aşılı Nakavt TIMELESS HEK293 - Grup III	2.10	746.5 ng/µl	1.93	1598.7 ng/µl
Aşısız Nakavt TIMELESS HEK293 – Grup IV	2.11	725.2 ng/µl	1.94	1634.8 ng/µl

TIMELESS'a özgü tasarlanan primerler aracılığıyla qRT-PCR ile gen ifadeleri ölçülmüştür (Grup II Grup IV). Elde edilen sonuçlara göre HEK293 hücre hattında, housekeeping gen (ACT) ve TIMELESS geni ifade oluyorken, TIMELESS nakavt edilmiş hücre hattında ACT ifade oluyorken TIMELESS'a iat gen ifadesi gözlenmeyerek genin susturulduğu kanıtlanmıştır (Şekil 4.15.).



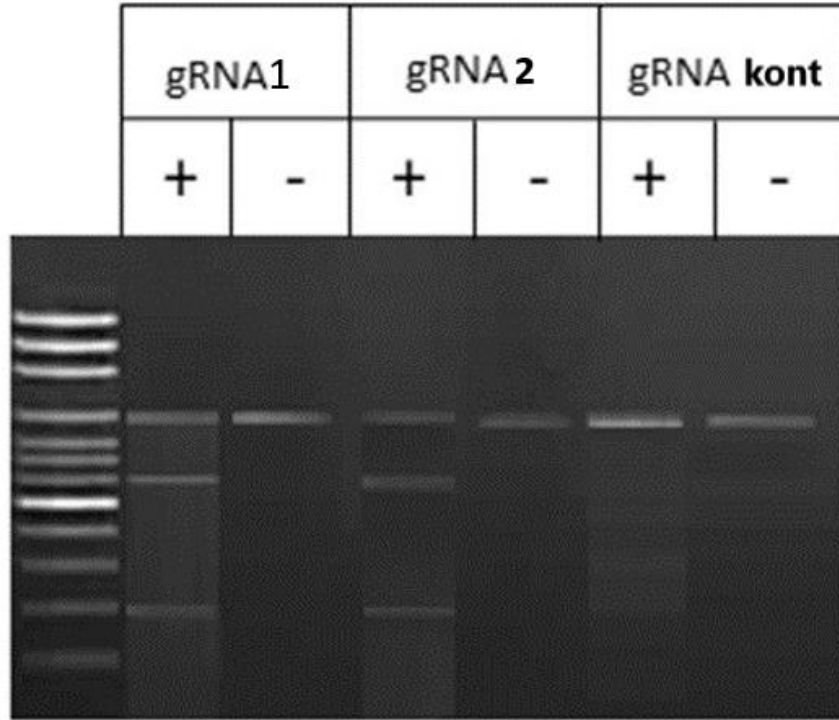
Şekil 4.15. HEK293 hücre hattından izole edilen TIMELESS ve nakavtTIMELESS'in qRT-PCR gen ifade sonuçları. 14,21-14,26 normal HEK293 hücrelerine ait ACT geni (Grup II), 17,15-17,26 TIMELESS nakavt HEK293 hücrelerine ait ACT geni (Grup IV), 24,06-24,17 normal HEK293 hücrelerine ait TIMELESS geni (Grup II), KO ile gösterilen ise TIMELESS nakavt HEK293 hücrelerine (Grup IV) ait gen ifade sonuçları

4.6. TIMELESS Nakavt Mutantlarının Tanımlanması için Indel Tespiti

İzole edilen genomik DNA'nın saflığı ve miktarı nanodrop ile ölçülerek T7 testine tabi tutulmuş ve jel üzerinde yürütülmüştür (Tablo 4.4., Şekil 4.16.).

Tablo 4.4. İzole edilen DNA'lara ait saflık ve miktarlar

İsim	(260/280 nm) Saflık	Miktar (ng/µl)
gRNA1	1.92	138.2
gRNA2	1.92	163.1
gKont	1.93	154.4



Şekil 4.16. İndel sonucunda elde edilen bant görüntüleri (+): T7 içeren (-): T7 içermeyen, kontrol

4.7. TIMELESS nakavt hücrelerin BCG Aşısına Karşı Gösterdiği Bağışıklık Yanıtının Gen İfadesi Düzeyinde İncelenmesi

BCG aşısına karşın bağışıklık yanıtında TIMELESS geninin nakavt edilmesi ile oluşan fonksiyonel bilgileri edinebilmek üzere qRT-PCR teknolojisinden faydalanılmıştır. Gen ifadesinin değerlendirildiği yolaklar aşağıda verilmiştir;

Doğuştan Gelen Bağışıklık Genleri:

Kalıp tanıma reseptörleri: (PRRs)DDX58, NLRP3, NOD1 (CARD4), NOD2, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9.

Sitokinler: CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CSF2 (GM-CSF), CXCL10 (INP10), CXCL8 (IL8), IFNA1, IFNB1, IL18, IL1A, IL1B, IL2, TNF.

Diğer Doğuştan Bağışıklık Genleri: APCS, C3, CASP1 (ICE), CD14, CD4, CD40 (TNFRSF5), CD40LG, CD8A, CRP, HLA-A, HLA-E, IL1R1, IRAK1, IRF3, IRF7, ITGAM, LY96 (MD-2), LYZ, MAPK1 (ERK2), MAPK8 (JNK1), MBL2,

MPO, MX1, MYD88, NFKB1, NFKBIA (I κ B α , MAD3), STAT1, TICAM1 (TRIF), TRAF6.

Adaptif Bağışıklık Genleri :

Th1 Belirteçleri ve Bağışıklık Yanıtı: CCR5, CD80, CXCR3, IFNG, IL18, IL23A, SLC11A1, STAT4, TBX21, TLR4, TLR6.

Th2 Belirteçleri ve Bağışıklık Yanıtı: CCR4, CCR8, CD86, GATA3, IFNB1, IL10, IL13, IL18, IL4, IL5, IL6, NOD2, STAT6.

Th17 İşaretleyicileri: CCR6, IL17A, RORC, STAT3.

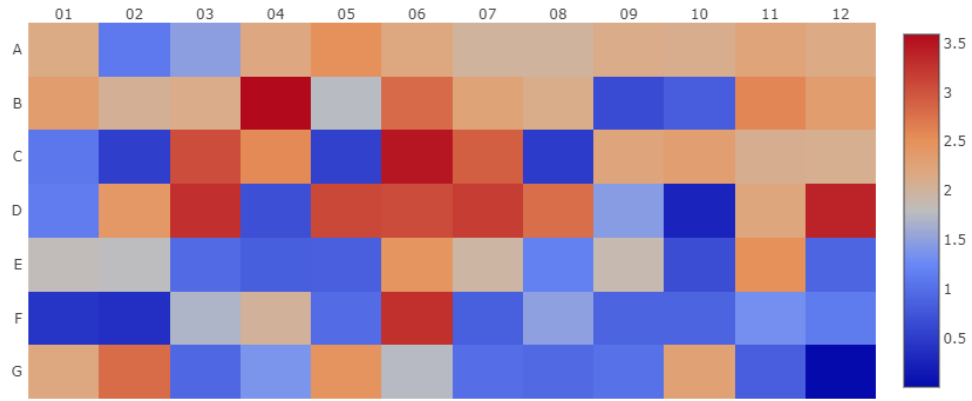
Treg İşaretleyicileri: CCR4, CCR8, FOXP3, IL10.

T-Hücre Aktivasyon Genleri: CD80, CD86, ICAM1, IFNG, IL23A, IL6, SLC11A1.

Sitokinler: CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CSF2 (GM-CSF), CXCL10 (INP10), CXCL8 (IL8), IFNA1, IFNG, IL10, IL13, IL17A, IL18, IL2, IL23A, IL4, IL5, IL6, TNF.

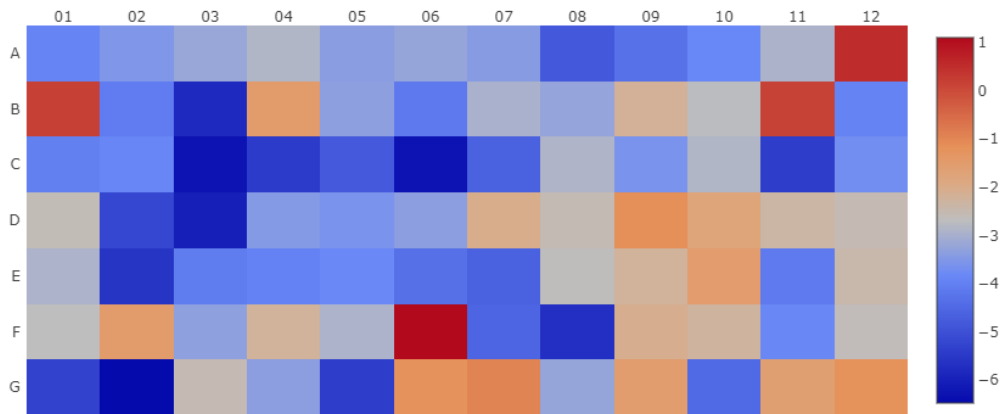
Diğer Adaptif Bağışıklık Genleri: CD4, CD40 (TNFRSF5), CD40LG, CD8A, CRP, FASLG (TNFSF6), HLA-A, IFNAR1, IFNGR1, IL1B, IL1R1, IRF3, IRF7, ITGAM, JAK2, MAPK8 (JNK1), MBL2, MX1, NFKB1, RAG1, STAT1.

Yapılan qRT-PCR analizlerinin sonucunda normal hücreler – Grup I / Grup II (TIMELESS nakavt edilmemiş) üzerinde BCG aşısının karşılaştırılması yapılmıştır (Ek 2). Analiz sonuçlarına göre gen ifadelerinin tamamında aşılama sonrası artış saptanmıştır (Şekil 4.17). Heat-map haritası üzerinde genlerin yerleşimi Tablo 3.12 üzerinde verilmiştir. 10 kat ve üzeri artış saptanan genler ise; CD8A, IFNB1, IRF7’dir. İstatistiksel olarak anlamlı artışların yaşandığı genlerin tamamı ise adaptif bağışıklık genleri olarak nitelendirilmektedir.



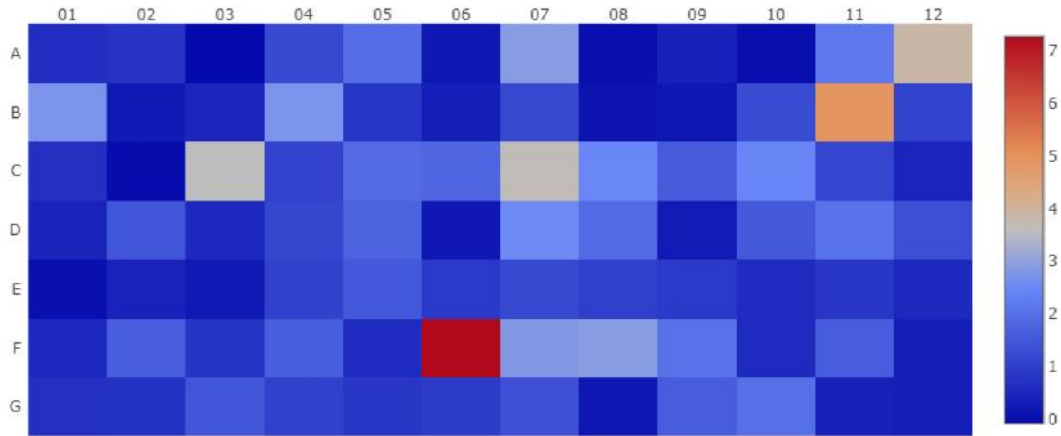
Şekil 4.17. HEK293 hücre hattı üzerinde BCG aşısının doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık sistemine ait ifadesi artan veya azalan genlerin değişim profilinin gösterildiği Heat Map (ısı haritası). Mavi renkten kırmızı renge gen ifadesi artışı söz konusudur. (Grup I – Grup II). Veriler ortalama \pm SD olarak hesaplanmıştır. $p < 0.05$.

Aşılı normal hücreler (Grup I) ve aşılı TIMELESS nakavt hücreler (Grup III) arasında gen ifade analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.18). Sonuçlara göre ise CD40, CD40LG, FOXP3, SLC11A1 genleri dışında nakavt olmuş hücrelerin tamamının gen ifadesinde azalma olduğu tespit edilmiştir (EK 3). Bu genlerin tamamı ise adaptif bağışıklık genleri grubunda yer almaktadır. Heat-map haritası üzerinde genlerin yerleşimi Tablo 3.12 üzerinde verilmiştir.



Şekil 4.18. Aşılı normal hücreler ve aşılı nakavt hücreler arasında BCG aşısının doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık sistemine ait ifadesi artan veya azalan genlerin değişim profilinin gösterildiği Heat Map (ısı haritası). (Mavi renkten kırmızı renge gen ifadesi artışı söz konusudur) (Grup I – Grup III). Veriler ortalama \pm SD olarak hesaplanmıştır. $p < 0.05$.

Aşılanmış ve aşılanmamış TIMELESS nakavt hücre hatları arasında incelenen genlerin tamamında aşılama sonrasında gen ifadelerinin artış gösterdiği anlaşılmıştır (Şekil 4. 19). En yüksek katsayı artışının ise SLC11A1 geninde meydana geldiği anlaşılmıştır (EK 4).



Şekil 4.19. Aşılı nakavt ve aşısız nakavt hücre hattı üzerinde BCG aşısının doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık sistemine ait ifadesi artan veya azalan genlerin değişim profilinin gösterildiği Heat Map (ısı haritası). (Mavi renkten kırmızı renge gen ifadesi artışı söz konusudur) (Grup III – Grup IV). Veriler ortalama \pm SD olarak hesaplanmıştır. $p < 0.05$.

5. TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında öncelikli olarak TIMELESS ve diğer sirkadiyen genler arasındaki ilişki incelenmiştir. Yapılan motif analizi ve filogenetik analizler sonucunda elde edilen bulgular, literatür ile uyumlu olarak TIMELESS'in evrimsel ilişkilerinin doğru bir şekilde belirlendiğini göstermektedir. TIMELESS'in CRY genleri ve PER genleri ile etkileşimde olduğu ve bu etkileşimler sonucunda sirkadiyen gen olarak kabul edildiği bilinmektedir (91). Bu doğrultuda TIMELESS, CRY ve PER genlerinin ortak motif barındırdığı tespit edilmiştir. Filogenetik ağaçta aynı dal altında bulunan ve aralarında heterodimerler olduğu bilinen CLOCK ve NPAS2 genlerinin de benzer şekilde aynı motif içeriğine sahip olduğu anlaşılmıştır (106). Aynı alt aileler filogenetik analizlerde aynı dallar altında bulunurken TIMELESS'in bağımsız bir dalda olduğu tespit edilmiştir. TIMELESS'in DNA replikasyonunun kontrolü ve DNA onarımında sirkadiyen olmayan özellikler barındırması bu farklılığı destekler

niteliktedir (25- 31).

Tez çalışması kapsamında TIMELESS genini hedefleyen miRNA'lar analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre 52 miRNA tespit edilmiştir. Genom onarımındaki rolü nedeniyle, mTIM düzensizliğinin birçok kanser türünde yaygın olarak bulunduğu bilinmektedir. Bu doğrultuda elde edilen bulgulara göre tüm miRNA'ların kanserle ilişkili olduğu anlaşılmıştır (104).

TIMELESS'ı hedefleyen 52 miRNA arasından tespit edilen miR-6740, miR-555, miR-6516-3p, miR-335, miR-200, miR-4261, miR-4496, miR-146, miR-147, miR-5584, miR-4666 üzerinde yapılan çalışmalar incelendiğinde TIMELESS'in bağışıklık ve enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiş çeşitli miRNA'lar tarafından hedeflendiği *in silico* olarak tespit edilmiştir. Pepe vd. (2022) tarafından insanlarda SARS genomlarının potansiyel miRNA etkilerini değerlendiren bir çalışmada miR-6740 ekspresyonunun hastalık şiddeti ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (378). Shim vd. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada miR-555'in poliovirüse karşı güçlü antiviral özelliklere sahip olduğunu bildirmiştir (379). Duan vd. (2020) tarafından yapılan çalışmada, IBV (infectious bronchitis virus) ile enfekte gruplarda miR-6516-3p ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (380). Duecker vd. (2022) tarafından yapılan çalışmada PiBO'nun (post-enfeksiyöz bronşiolit obliterans) inflamasyon ve fibrozisin düzenlenmesinden sorumlu yolları etkileyen miRNA ekspresyon profilleri ortaya çıkarılarak miR-335'in biyobelirteçler arasına girdiği saptanmıştır (231). Guan vd. (2018) tarafından yapılan bir başka çalışmada miR-200 ailesinin CD8⁺ T hücrelerini düzenlemede etkili olduğu ortaya konmuştur (232). miR-200'ün ayrıca, tümör endotelial ve kanser hücreleri tarafından salgılanan interlökin-8 ve CXCL1'i hedefleyerek doğrudan ve dolaylı mekanizmalar yoluyla anjiyogenezi inhibe ettiği bilinmektedir (233). Zhou vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada miR-4496'nın bakteriyel enfeksiyonda bağışıklığı ve inflamatuvar yanıtları yeniden şekillendirebileceği ortaya konmuştur (234). miR-147'nin koroner ateroskleroz ve inflamatuvar bağırsak hastalığı ile korele olduğu ve TLR-4 aracılığıyla makrofaj fonksiyonlarını ve inflamasyonu modüle ettiği gösterilmiştir. Değişen miR-147 seviyesi, bulaşıcı hastalık, kanser, kardiyovasküler hastalık, nörodejeneratif bozukluk vb. dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarında gösterilmiştir (235). miR-5584'ün mide kanserinde bağışıklıkla ilişkili mRNA düzenleyici ağının bir parçası olduğu

bilinmektedir (236). miR-4666'nın ise TGF- β /Smad hedefleme yoluyla kolorektal kanser hücrelerini sinerjik olarak bastırıldığı bilinmektedir (237). Hem patojenik enfeksiyonlara hem de patojenik olmayan inflamasyona karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesinde ise miR-146'nın rol oynadığı bilinmektedir (238). Wang vd. (2014) tarafından yapılan bir çalışma miR-146a'nın IRAK1'i hedefleyerek modüle ettiği bilinmektedir (239). Çalışmamız doğrultusunda edindiğimiz bilgilere göre miR-146a TIMELESS genini de hedefleyen miRNA'lar arasındadır. İşlevi bozulan TIMELESS geni sonrasında miR-146A'nın IRAK1'in regülasyonunu düzenleyerek daha fazla ifade göstermesini sağlayabileceği düşünülmektedir. Jiao vd. (2017) tarafından yapılan çalışmaya göre miR-4261'in kolorektal kanserde aşırı eksprese edildiği ortaya konmuştur. Ayrıca, miR-4261'in aşırı ekspresyonunun hücre proliferasyonunu artırabildiği ve hücre döngüsünün G1/S faz geçişi ve HCT116 ve HT29 hücrelerinde hücre göçünü teşvik ettiği belirlenmiştir (240). TIMELESS'ında benzer şekilde hücre döngüsü ile ilişkili olduğu bilinmektedir (92).

Normal HEK293 hücrelerinin aşılınması sonrası gen ifadesi düzeyleri incelenmiştir (Grup I – Grup II). 84 doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık geni arasından CD8A gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır. CD8A genleri bağışıklık yanıtında temel bir rol oynayan ve hem dış hem de iç saldırılara karşı yanıtlarda çoklu işlevlere hizmet eden bütünleşik zar glikoproteinidir (241). CD8A, T-hücrelerinde, öncelikle MHC sınıf I molekül: peptid kompleksi için bir yardımcı reseptör olarak işlev görür (241). Kwon vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada bir kronik tüberküloz modelinde BCG ile karşılaştırıldığında artan bellek CD8 + T hücresi ile ilişkili immünojenisite değerlendirilmiştir. Çalışma neticesinde T hücresi analizi için CD8A varlığı saptanmıştır (242). CD8A ile aynı anda MHC'ler ile etkileşime giren APC's'nin BCG yolağında bağışıklık yanıtının başlatılması/modülasyonunda yer aldığı bilinmektedir. Benzer şekilde bu tez çalışmasından elde edilen bulgular neticesinde de APC's geninde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır (243). BCG aşılması ile birlikte ayrıca RAG1 gen ekspresyon seviyesinin 2 kattan fazla arttığı saptanmıştır. Vazquez vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada da; RAG1 eksikliği olan insanlarda Kawasaki hastalığı (KD), çocuklarda çoklu sistem inflamatuvar sendromu (MIS-C) dahil olmak

üzere çeşitli otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların ve şiddetli COVID-19 formlarının geliştiği ortaya konmuştur (244). Bu tez çalışmasında BCG aşılması sonrasında normal hücrelerde SLC11A1 geninin ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. SLC11A1 üzerinde Zheng vd. (2022) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise ağır SARS-CoV-2 hastalarından alınan nötrofillerde SLC11A1'in düşük eksprese olduğu belirlenmiştir (245). Çalışmamızdan edindiğimiz verilere göre; CXCL-8'in gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. Hamldar vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada COVID-19 hastalarında enflamasyonla ilişkili genlerin ekspresyonunun incelendiği bir çalışmada CXCL-8'in seçilen diğer tüm genlerden daha yüksek mRNA seviyesi gösterdiği belirlenmiştir (246). Çalışmamızdan edindiğimiz verilere göre benzer şekilde IL-4 geni üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. IL-4'ün alerji, astım araçları ve CD4 T-yardımcı (Th₂) bağışıklığının düzenleyicileri olduğu bilinmektedir (247). ICAM-1'in TNF-alfa, tarafından uyarıldığı bilinmektedir (248). Çalışmadan edinilen bulgulara göre her iki genin de ifade seviyesinde paralel bir artış saptanmıştır.

Çalışmamız kapsamında IL10 gen ifadesi seviyesinde BCG aşılması sonrası istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. Montero-Blay vd. (2023) tarafından yapılan bir çalışmada IL-10'un *Pseudomonas aeruginosa* akciğer enfeksiyonu üzerinde güçlü bir anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır (249). Çalışmamızda IL5 üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. Maglio vd. (2023) tarafından yapılan bir çalışmada IL5/IL5r'yi hedefleyen biyolojik ilaçların neden olduğu astım remisyonlarının etkinliği doğrulanmıştır (250). Çalışmamızda aşılama sonrası IL6 miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. COVID-19 pandemisi sırasında, IL6 reseptörleri üzerine yapılan çalışmaların az hastaneye yatış ve az şiddetli COVID-19 ile paralel olduğu anlaşılmıştır (251). Çalışmamızda IL13 üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. Finan vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada ise bebekler üzerinde Bacillus Calmette-Guerin (BCG) aşısına karşı bağışıklık tepkileri incelenmiş olup, IL13 seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir (252). TLR'lar (Toll benzeri reseptörler), bağışıklık sistemi tarafından tanınan moleküllerdir ve enfeksiyonlara karşı savunma yanıtının başlatılmasında önemli bir rol oynarlar. BCG aşısı, TLR'ların aktivasyonunu artırarak bağışıklık sistemini uyarmaya yardımcı olur ve bu da enfeksiyonlara karşı

koruma sağlayabilir. Ayrıca, TLR gen ailesi, BCG aşısının etkinliği ile de ilgilidir. Bazı çalışmalar, BCG aşısının etkinliğinin, kişilerin TLR gen varyasyonlarına bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir (253). Çalışmamız kapsamında TLR ailesinin tamamında artış gözlenirken TLR1 TLR2 TLR4 TLR5 TLR6 TLR7 ve TLR9'da istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. TLR genleri, HIV enfeksiyonu da dahil olmak üzere enflamatuar ve bulaşıcı hastalıklara karşı değişen duyarlılıkla bağlantılı birkaç tek nükleotit polimorfizmi (SNP'ler) içerir (254). Yapılan çalışmaların sonucunda, TLR4 geni içinde SNP bulunduran insanlarda bulaşıcı hastalık oranlarının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (255). TLR9'un, rahim ağzı kanseri, HPV ve konakçı bağışıklık tepkisi arasındaki etkileşimler gibi çeşitli kanser türlerinin ilerlemesiyle ilişkili olduğu bilinmektedir (256, 257).

TIMELESS geninin fonksiyonlarını incelemek üzere aşılı normal ve aşılı TIMELESS nakavt hücreler (Grup I – Grup III) arasındaki ifade profillerinin incelenmesi neticesinde ise CD40, TLR4, FOXP3 ve SLC11A geni dışında tüm genlerin ifade seviyesinde azalma söz konusudur;

CD40 geninin promotör bölgesinde, sirkadiyen ritimlerin kontrolünde önemli bir rol oynayan CLOCK geni tarafından hedeflenen cis-regülatör bölgeler keşfedilmiştir. Ayrıca, CD40 sinyalizasyonunun, sirkadiyen ritimlerin uygun işleyişi için gerekli olduğu öne sürülmüştür (258).

Doğuştan gelen ve edinilmiş bağışıklık sisteminin hücresel bileşenlerinin günlük salınımlar gösterdiği bilinmektedir. Bir B hücresi aynı antijenle karşılaşmışsa, B hücrelerinin immünoglobülin salgılayan plazma hücrelerine dönüşümünü sağlayan T hücresine bağlı B hücresi aktivasyonu (CD40-CD40 ligand etkileşimi yoluyla) meydana gelebilir (259). Kumar vd. (2022) tarafından sirkadiyen saatin endokannabinoid sinyalinin rolü araştırıldığı bir çalışmada CD40 reseptörünün ekspresyonunda ve sinyallenmesinde etkili olduğu anlaşılmıştır (260). Dolayısıyla bulgular CD40'ın sirkadiyen saatin TIMELESS dışında diğer genler ile ilişkili olduğu yönünde olabilir. Mendez-Samperio (2001) tarafından BCG sonucunda CD40 ligand ekspresyonunun incelendiği bir çalışmada BCG stimülasyonu sonucunda, CD4+ T hücreleri üzerinde önemli miktarda CD40L ekspresyonu ortaya çıktığı görülmüştür (261). SLC11A1'in insanda bulaşıcı ve otoimmün hastalıklara duyarlılığı kontrol ettiği bilinmektedir (262). Alm vd. (2002) yapılan çalışmada BCG aşısı ve SLC11A1

genlerinin ilişkili olduğu ve BCG'ye karşı hücre içi makrofaj patojenine yanıtı kontrol eden elemanlardan biri olduğu ortaya konmuştur. Ek olarak BCG'nin cüzzama karşı korumadaki etkinliğinin SLC11A1'deki polimorfizmle ilişkili olduğu bilinmektedir. SLC11A1'in genomik bölgesindeki polimorfizm(ler)i sonucunda altta yatan immünolojik mekanizmayı doğrulamak için daha fazla çalışmanın gerekli olduğu vurgulanmıştır (263). SLC11A1 CXC kemokin KC, interlökin 1 β (IL-1 β), indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf II molekülleri, tümör nekrozu dahil olmak üzere makrofaj aktivasyonu üzerinde birçok pleiotropik etkiye sahiptir (264, 265). Bu çalışmanın sonuçları, nakavt TIMELESS hücrelerindeki anormal SLC11A1 artış mekanizmasının TIMELESS'in yanı sıra diğer sinyal ağlarıyla ilişkili olabileceğini göstermektedir. TLR4, immün yanıtın başlatılması ve regülasyonunda önemli bir rol oynayan bir yüzey reseptörüdür. Bazı çalışmalar, TLR4 geninin promotor bölgesinde sirkadiyen ritimlerin kontrolünde önemli bir rol oynayan CLOCK geni tarafından hedeflenen cis-regülatör bölgeler olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, TLR4 sinyalizasyonunun sirkadiyen ritimlerin uygun işleyişi için gerekliliği öne sürülmüştür (266). Sun vd. (2022) tarafından yapılan bir çalışmada sirkadiyen ritim bozukluklarının, TLR4'ü düzenleyerek makrofajların lipid alımını ve sitokin salgılanmasını teşvik ettiğini ve makrofajların parakrin etkisi yoluyla VSMC göçünü ve proliferasyonunu arttırdığı ortaya konmuştur (267). Heldwein vd. (2003), tarafından yapılan çalışmada BCG'ye karşı normal bir Th1 yanıtının geliştirilmesi için TLR4'ün gerekli olduğu ve BCG'ye karşı adaptif bağışıklığı düzenlediği tespit edilmiştir (268).

FoxP3, regülatör T hücrelerinin (Treg) gelişimi ve fonksiyonunda kritik bir rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Sirkadiyen ritimler ise birçok biyolojik süreçte önemli bir rol oynayan iç saat sistemleridir. Bir çalışmada, FoxP3 geninin promotor bölgesinde CLOCK ve BMAL1 gibi sirkadiyen ritimlerin kontrolünde önemli bir rol oynayan genler tarafından hedeflenen cis-regülatör bölgeler keşfedilmiştir ve FoxP3 geninin sirkadiyen ritimler tarafından düzenlenen bir gen olduğunu gösterilmiştir. Benzer şekilde, başka bir çalışmada, Treg hücrelerinin sirkadiyen ritimlerinin olduğu ve Treg hücrelerinin fonksiyonunun sirkadiyen ritimlerin regülasyonu tarafından düzenlendiği ve bu hücrelerin aktivitesinin sirkadiyen ritimlere bağlı olarak değiştiği öne sürülmüştür (266). He vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada sirkadiyen gen

Arntl2'nin (BMAL2) aşırı ekspresyonunun FoxP3'ün ifadesini arttırdığını gösterilmiştir (269). Hanekom vd. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada doğumda BCG ile aşılanmış 10 haftalık bebeklerden alınan tam kanlar üzerinde FoxP3 ifadesinin bu verileri ile benzer şekilde arttığı görülmüştür (270). Tüm tez çalışması bulguları ve literatür bilgileri ışığında *TLR4*, *FOXP3*, *CD40* ve *SLC11A* genlerinin nakavt TIMELESS hücrelerinde BCG aşısına karşı normalde olduğundan daha fazla ekspresyon gösterdiği anlaşılmıştır.

Çalışma kapsamında Grup III – Grup IV arasında bir karşılaştırma yapılarak TIMELESS nakavt hücre hatlarının BCG aşısına karşı gen ifadesi değerleri karşılaştırılmıştır; Aşılama sonrası en yüksek katsayı artışının ise *SLC11A1* geninde meydana geldiği tespit edilmiştir. *SLC11A1*, demir metabolizması ve bağışıklık sistemi ile ilişkili bir gen olup, *Mycobacterium tuberculosis* gibi mikroorganizmaların üremesi ve yayılmasını engelleyen bir protein olan NRAMP1'i kodlar. Bazı araştırmalar, BCG aşısının *SLC11A1* geni ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu çalışmalar, BCG aşısının *SLC11A1* genindeki bazı varyantlarla etkileşime girerek bağışıklık sisteminin tepkisini artırabileceğini ve TB enfeksiyonunun önlenmesinde daha etkili olabileceğini öne sürmektedir (271, 272). Thye vd. (2009) tarafından Batı Afrika'da yaşayan insanlar üzerinde yapılan genetik bir çalışmada, *SLC11A1* genindeki bazı varyantların TB hastalığına olan duyarlılığı artırdığı bulunmuştur (273).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hücre döngüsü ve DNA onarımında işlevi olduğu bilinen TIMELESS'in tez çalışmasından elde edilen veriler neticesinde çeşitli biyolojik süreçlerde de önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir. *In silico* araçlar kullanılarak yapılan araştırmalar neticesinde TIMELESS'in kanser ve bağışıklıkla ilişkili miRNA'lar tarafından düzenlenebileceği belirlenmiştir. Ayrıca, TIMELESS, CRY ve PER genleri arasındaki etkileşimlerin ve ortak motiflerin belirlenmesi, sirkadiyen ritimlerin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasına yardımcı olabilecek niteliktedir. İlerleyen çalışmalar neticesinde diğer düzenleyici mekanizmaların (örneğin, transkripsiyon faktörleri) rolü hakkında bilgi sağlanarak, TIMELESS'in kanser gelişimi ve ilerlemesi üzerine daha ayrıntılı araştırmalar yapılabilir.

Bu çalışmanın sonuçları, BCG aşısının insan hücrelerindeki gen ekspresyonlarını nasıl etkilediğine dair yeni ve önemli bilgiler sağlamıştır. Elde edilen veriler BCG aşısının immün yanıtı nasıl modüle ettiğimizi daha iyi anlamamıza yardımcı olabilir. Bu bilgiler, BCG aşısının bağışıklık sistemi üzerindeki etkisini daha iyi anlamamıza ve potansiyel olarak farklı hastalıkların tedavisinde kullanılmasına yardımcı olabilir. BCG aşısının farklı hastalıkların tedavisindeki potansiyel kullanımını incelemek için daha fazla araştırma yapılabilir. Ayrıca, çalışma sonuçları, diğer aşılar veya immün modülatörlerin immün yanıt üzerindeki etkilerini daha iyi anlamamıza yardımcı olmaktadır. Bu çalışma, TIMELESS geninin bağışıklık sistemi üzerindeki etkisini değerlendiren önemli bir araştırmadır. Sonuçlar, TIMELESS geninin bağışıklık sistemi üzerine gen ekspresyonunu düzenleyebileceğini ve BCG aşısının bağışıklık yanıtını modüle etmek için TIMELESS geninin gerekliliğini göstermiştir. Bu bilgiler, TIMELESS geninin bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerini daha kapsamlı bir şekilde incelememize ve farklı hastalıkların tedavisinde kullanılabilirliğini değerlendirmemize yardımcı olabilir. TIMELESS geninin hastalıklar üzerine moleküler mekanizmalarının daha iyi anlaşılması veya biyobelirteç olarak kullanılması üzerine katkı sağlayabilir ancak bunun için daha fazla klinik çalışma yapılması gerekebilir. Ayrıca, çalışma sonuçları, diğer sirkadiyen genlerin bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerini de yorumlamamıza yardımcı olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Halberg F. Physiologic 24-hour periodicity; general and procedural considerations with reference to the adrenal cycle. *Z Vitamin-, Hormon-u Fermentforsch.* 1959;10:225.
2. Harmer SL, Panda S, Kay SA. Molecular bases of circadian rhythms. *Annual review of cell and developmental biology.* 2001;17(1):215-53.
3. Jagannath A, Taylor L, Wakaf Z, Vasudevan SR, Foster RG. The genetics of circadian rhythms, sleep and health. *Human molecular genetics.* 2017;26(R2):R128-R38.
4. Chen S-K, Badea T, Hattar S. Photoentrainment and pupillary light reflex are mediated by distinct populations of ipRGCs. *Nature.* 2011;476(7358):92-5.
5. Webb AB, Angelo N, Huettner JE, Herzog ED. Intrinsic, nondeterministic circadian rhythm generation in identified mammalian neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2009;106(38):16493-8.
6. Reddy AB, Maywood ES, Karp NA, King VM, Inoue Y, Gonzalez FJ, et al. Glucocorticoid signaling synchronizes the liver circadian transcriptome. *Hepatology.* 2007;45(6):1478-88.
7. So AY-L, Bernal TU, Pillsbury ML, Yamamoto KR, Feldman BJ. Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2009;106(41):17582-7.
8. King DP, Takahashi JS. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annual review of neuroscience.* 2000;23:713.
9. Lowrey PL, Takahashi JS. Genetics of the mammalian circadian system: Photic entrainment, circadian pacemaker mechanisms, and posttranslational regulation. *Annual review of genetics.* 2000;34(1):533-62.
10. Sukumaran S, Almon RR, DuBois DC, Jusko WJ. Circadian rhythms in gene expression: Relationship to physiology, disease, drug disposition and drug action. *Advanced drug delivery reviews.* 2010;62(9-10):904-17.
11. Kurien P, Hsu P-K, Leon J, Wu D, McMahan T, Shi G, et al. TIMELESS mutation alters phase responsiveness and causes advanced sleep phase. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2019;116(24):12045-53.
12. Darlington TK, Wager-Smith K, Ceriani MF, Staknis D, Gekakis N, Steeves TD, et al. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science.* 1998;280(5369):1599-603.
13. Rutila JE, Suri V, Le M, So WV, Rosbash M, Hall JC. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* *period* and *timeless*. *Cell.* 1998;93(5):805-14.
14. Huang N, Chelliah Y, Shan Y, Taylor CA, Yoo S-H, Partch C, et al. Crystal structure of the heterodimeric CLOCK: BMAL1 transcriptional activator complex. *Science.* 2012;337(6091):189-94.

15. Rijo-Ferreira F, Takahashi JS. Genomics of circadian rhythms in health and disease. *Genome medicine*. 2019;11(1):1-16.
16. Kawamoto T, Noshiro M, Sato F, Maemura K, Takeda N, Nagai R, et al. A novel autofeedback loop of *Dec1* transcription involved in circadian rhythm regulation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004;313(1):117-24.
17. Gachon F, Nagoshi E, Brown SA, Ripperger J, Schibler U. The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology. *Chromosoma*. 2004;113(3):103-12.
18. Correia SP, Chan AB, Vaughan M, Zolboot N, Perea V, Huber A-L, et al. The circadian E3 ligase complex SCFFBXL3+ CRY targets TLK2. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-9.
19. Guillaumond F, Dardente H, Giguère V, Cermakian N. Differential control of *Bmal1* circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *Journal of biological rhythms*. 2005;20(5):391-403.
20. Lundkvist GB, Kwak Y, Davis EK, Tei H, Block GD. A calcium flux is required for circadian rhythm generation in mammalian pacemaker neurons. *Journal of Neuroscience*. 2005;25(33):7682-6.
21. Nahm S-S, Farnell YZ, Griffith W, Earnest DJ. Circadian regulation and function of voltage-dependent calcium channels in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neuroscience*. 2005;25(40):9304-8.
22. O'Neill JS, Maywood ES, Chesham JE, Takahashi JS, Hastings MH. cAMP-dependent signaling as a core component of the mammalian circadian pacemaker. *Science*. 2008;320(5878):949-53.
23. Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, et al. Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell*. 2002;109(3):307-20.
24. Storch K-F, Lipan O, Leykin I, Viswanathan N, Davis FC, Wong WH, et al. Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature*. 2002;417(6884):78-83.
25. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology E-book: Elsevier Health Sciences*; 2014.
26. Maemura K, Takeda N, Nagai R. Circadian rhythms in the CNS and peripheral clock disorders: role of the biological clock in cardiovascular diseases. *Journal of pharmacological sciences*. 2007:0702130009-.
27. Karlsson B, Knutsson A, Lindahl B. Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27 485 people. *Occupational and environmental medicine*. 2001;58(11):747-52.
28. Zhang EE, Liu Y, Dentin R, Pongsawakul PY, Liu AC, Hirota T, et al. Cryptochrome mediates circadian regulation of cAMP signaling and hepatic gluconeogenesis. *Nature medicine*. 2010;16(10):1152-6.

29. Jang H, Lee GY, Selby CP, Lee G, Jeon YG, Lee JH, et al. SREBP1c-CRY1 signalling represses hepatic glucose production by promoting FOXO1 degradation during refeeding. *Nature communications*. 2016;7(1):1-14.
30. Lamia KA, Papp SJ, Yu RT, Barish GD, Uhlénhaut NH, Jonker JW, et al. Cryptochromes mediate rhythmic repression of the glucocorticoid receptor. *Nature*. 2011;480(7378):552-6.
31. Grimaldi B, Bellet MM, Katada S, Astarita G, Hirayama J, Amin RH, et al. PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPAR γ . *Cell metabolism*. 2010;12(5):509-20.
32. Neufeld-Cohen A, Robles MS, Aviram R, Manella G, Adamovich Y, Ladeuix B, et al. Circadian control of oscillations in mitochondrial rate-limiting enzymes and nutrient utilization by PERIOD proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(12):E1673-E82.
33. Cho H, Zhao X, Hatori M, Yu RT, Barish GD, Lam MT, et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by REV-ERB- α and REV-ERB- β . *Nature*. 2012;485(7396):123-7.
34. Panda S. Circadian physiology of metabolism. *Science*. 2016;354(6315):1008-15.
35. Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, Ko CH, et al. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*. 2010;466(7306):627-31.
36. Shimba S, Ishii N, Ohta Y, Ohno T, Watabe Y, Hayashi M, et al. Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(34):12071-6.
37. Stubblefield JJ, Gao P, Kilaru G, Mukadam B, Terrien J, Green CB. Temporal control of metabolic amplitude by nocturnin. *Cell reports*. 2018;22(5):1225-35.
38. Froy O. Metabolism and circadian rhythms—implications for obesity. *Endocrine reviews*. 2010;31(1):1-24.
39. Thaiss CA, Levy M, Korem T, Dohnalová L, Shapiro H, Jaitin DA, et al. Microbiota diurnal rhythmicity programs host transcriptome oscillations. *Cell*. 2016;167(6):1495-510. e12.
40. Leone V, Gibbons SM, Martinez K, Hutchison AL, Huang EY, Cham CM, et al. Effects of diurnal variation of gut microbes and high-fat feeding on host circadian clock function and metabolism. *Cell host & microbe*. 2015;17(5):681-9.
41. Godinho-Silva C, Domingues RG, Rendas M, Raposo B, Ribeiro H, da Silva JA, et al. Light-entrained and brain-tuned circadian circuits regulate ILC3s and gut homeostasis. *Nature*. 2019;574(7777):254-8.
42. Montaigne D, Marechal X, Modine T, Coisne A, Mouton S, Fayad G, et al. Daytime variation of perioperative myocardial injury in cardiac surgery and

- its prevention by Rev-Erba antagonism: a single-centre propensity-matched cohort study and a randomised study. *The Lancet*. 2018;391(10115):59-69.
43. Curtis AM, Cheng Y, Kapoor S, Reilly D, Price TS, FitzGerald GA. Circadian variation of blood pressure and the vascular response to asynchronous stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(9):3450-5.
 44. Huo M, Huang Y, Qu D, Zhang H, Wong WT, Chawla A, et al. Myeloid Bmal1 deletion increases monocyte recruitment and worsens atherosclerosis. *The FASEB Journal*. 2017;31(3):1097-106.
 45. Yang G, Chen L, Grant GR, Paschos G, Song W-L, Musiek ES, et al. Timing of expression of the core clock gene Bmal1 influences its effects on aging and survival. *Science translational medicine*. 2016;8(324):324ra16-ra16.
 46. Brancaccio M, Patton AP, Chesham JE, Maywood ES, Hastings MH. Astrocytes control circadian timekeeping in the suprachiasmatic nucleus via glutamatergic signaling. *Neuron*. 2017;93(6):1420-35. e5.
 47. Tso CF, Simon T, Greenlaw AC, Puri T, Mieda M, Herzog ED. Astrocytes regulate daily rhythms in the suprachiasmatic nucleus and behavior. *Current Biology*. 2017;27(7):1055-61.
 48. Zhang SL, Yue Z, Arnold DM, Artiushin G, Sehgal A. A circadian clock in the blood-brain barrier regulates xenobiotic efflux. *Cell*. 2018;173(1):130-9. e10.
 49. Nakazato R, Kawabe K, Yamada D, Ikeno S, Mieda M, Shimba S, et al. Disruption of Bmal1 impairs blood-brain barrier integrity via pericyte dysfunction. *Journal of Neuroscience*. 2017;37(42):10052-62.
 50. Nakamura TJ, Nakamura W, Yamazaki S, Kudo T, Cutler T, Colwell CS, et al. Age-related decline in circadian output. *Journal of Neuroscience*. 2011;31(28):10201-5.
 51. Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Vykhovanets OV, Antoch MP. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes & development*. 2006;20(14):1868-73.
 52. Solanas G, Peixoto FO, Perdiguero E, Jardí M, Ruiz-Bonilla V, Datta D, et al. Aged stem cells reprogram their daily rhythmic functions to adapt to stress. *Cell*. 2017;170(4):678-92. e20.
 53. Sato S, Solanas G, Peixoto FO, Bee L, Symeonidi A, Schmidt MS, et al. Circadian reprogramming in the liver identifies metabolic pathways of aging. *Cell*. 2017;170(4):664-77. e11.
 54. Horvath S, Raj K. DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nature Reviews Genetics*. 2018;19(6):371-84.
 55. Zwihaft Z, Aviram R, Shalev M, Rouso-Noori L, Kraut-Cohen J, Golik M, et al. Circadian clock control by polyamine levels through a mechanism that declines with age. *Cell metabolism*. 2015;22(5):874-85.

56. Oh G, Ebrahimi S, Carlucci M, Zhang A, Nair A, Groot DE, et al. Cytosine modifications exhibit circadian oscillations that are involved in epigenetic diversity and aging. *Nature communications*. 2018;9(1):1-11.
57. Fu L, Kettner NM. The circadian clock in cancer development and therapy. *Progress in molecular biology and translational science*. 2013;119:221-82.
58. Fu L, Lee CC. The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(5):350-61.
59. Elizabeth AY, Weaver DR. Disrupting the circadian clock: gene-specific effects on aging, cancer, and other phenotypes. *Aging (Albany NY)*. 2011;3(5):479.
60. Altman BJ, Hsieh AL, Sengupta A, Krishnanaiah SY, Stine ZE, Walton ZE, et al. MYC disrupts the circadian clock and metabolism in cancer cells. *Cell metabolism*. 2015;22(6):1009-19.
61. Papagiannakopoulos T, Bauer MR, Davidson SM, Heimann M, Subbaraj L, Bhutkar A, et al. Circadian rhythm disruption promotes lung tumorigenesis. *Cell metabolism*. 2016;24(2):324-31.
62. Kettner NM, Voicu H, Finegold MJ, Coarfa C, Sreekumar A, Putluri N, et al. Circadian homeostasis of liver metabolism suppresses hepatocarcinogenesis. *Cancer cell*. 2016;30(6):909-24.
63. Bu Y, Yoshida A, Chitnis N, Altman BJ, Tameire F, Oran A, et al. A PERK–miR-211 axis suppresses circadian regulators and protein synthesis to promote cancer cell survival. *Nature cell biology*. 2018;20(1):104-15.
64. Peek CB, Levine DC, Cedernaes J, Taguchi A, Kobayashi Y, Tsai SJ, et al. Circadian clock interaction with HIF1 α mediates oxygenic metabolism and anaerobic glycolysis in skeletal muscle. *Cell metabolism*. 2017;25(1):86-92.
65. Wu Y, Tang D, Liu N, Xiong W, Huang H, Li Y, et al. Reciprocal regulation between the circadian clock and hypoxia signaling at the genome level in mammals. *Cell metabolism*. 2017;25(1):73-85.
66. Adamovich Y, Ladeuix B, Golik M, Koeners MP, Asher G. Rhythmic oxygen levels reset circadian clocks through HIF1 α . *Cell metabolism*. 2017;25(1):93-101.
67. Bellet MM, Deriu E, Liu JZ, Grimaldi B, Blaschitz C, Zeller M, et al. Circadian clock regulates the host response to Salmonella. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(24):9897-902.
68. Kiessling S, Dubeau-Laramée G, Ohm H, Labrecque N, Olivier M, Cermakian N. The circadian clock in immune cells controls the magnitude of Leishmania parasite infection. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-11.
69. Edgar RS, Stangherlin A, Nagy AD, Nicoll MP, Efstathiou S, O'Neill JS, et al. Cell autonomous regulation of herpes and influenza virus infection by the circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(36):10085-90.

70. Hopwood TW, Hall S, Begley N, Forman R, Brown S, Vonslow R, et al. The circadian regulator BMAL1 programmes responses to parasitic worm infection via a dendritic cell clock. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-13.
71. Ehlers A, Xie W, Agapov E, Brown S, Steinberg D, Tidwell R, et al. BMAL1 links the circadian clock to viral airway pathology and asthma phenotypes. *Mucosal immunology*. 2018;11(1):97-111.
72. Fernández Alfonso T, Celentano AM, Cappa SMG, Golombek DA. The circadian system of Trypanosoma cruzi-infected mice. *Chronobiology international*. 2003;20(1):49-64.
73. Rijo-Ferreira F, Carvalho T, Afonso C, Sanches-Vaz M, Costa RM, Figueiredo LM, et al. Sleeping sickness is a circadian disorder. *Nature communications*. 2018;9(1):1-13.
74. Ince LM, Weber J, Scheiermann C. Control of leukocyte trafficking by stress-associated hormones. *Frontiers in Immunology*. 2019;9:3143.
75. Nguyen KD, Fentress SJ, Qiu Y, Yun K, Cox JS, Chawla A. Circadian gene Bmal1 regulates diurnal oscillations of Ly6Chi inflammatory monocytes. *Science*. 2013;341(6153):1483-8.
76. Suzuki K, Hayano Y, Nakai A, Furuta F, Noda M. Adrenergic control of the adaptive immune response by diurnal lymphocyte recirculation through lymph nodes. *Journal of Experimental Medicine*. 2016;213(12):2567-74.
77. Shimba A, Cui G, Tani-Ichi S, Ogawa M, Abe S, Okazaki F, et al. Glucocorticoids drive diurnal oscillations in T cell distribution and responses by inducing interleukin-7 receptor and CXCR4. *Immunity*. 2018;48(2):286-98. e6.
78. Druz D, Matveeva O, Ince L, Harrison U, He W, Schmal C, et al. Lymphocyte circadian clocks control lymph node trafficking and adaptive immune responses. *Immunity*. 2017;46(1):120-32.
79. Abe A, Tani-ichi S, Shitara S, Cui G, Yamada H, Miyachi H, et al. An enhancer of the IL-7 receptor α -chain locus controls IL-7 receptor expression and maintenance of peripheral T cells. *The Journal of Immunology*. 2015;195(7):3129-38.
80. Gibbs JE, Blaikley J, Beesley S, Matthews L, Simpson KD, Boyce SH, et al. The nuclear receptor REV-ERB α mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(2):582-7.
81. Early JO, Menon D, Wyse CA, Cervantes-Silva MP, Zaslona Z, Carroll RG, et al. Circadian clock protein BMAL1 regulates IL-1 β in macrophages via NRF2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(36):E8460-E8.
82. Zaslona Z, Pålsson-McDermott EM, Menon D, Haneklaus M, Flis E, Prendeville H, et al. The induction of pro-IL-1 β by lipopolysaccharide requires endogenous prostaglandin E2 production. *The Journal of Immunology*. 2017;198(9):3558-64.

83. Stone EF, Fulton BO, Ayres JS, Pham LN, Ziauddin J, Shirasu-Hiza MM. The circadian clock protein timeless regulates phagocytosis of bacteria in *Drosophila*. *PLoS pathogens*. 2012;8(1):e1002445.
84. Zhang W, Di L, Liu Z, Sun Q, Wu Y, Wang N, et al. TIMELESS is a key gene mediating thrombogenesis in COVID-19 and antiphospholipid syndrome. *Scientific Reports*. 2022;12(1):17248.
85. Ruben MD, Smith DF, FitzGerald GA, Hogenesch JB. Dosing time matters. *Science*. 2019;365(6453):547-9.
86. Cederroth CR, Albrecht U, Bass J, Brown SA, Dyhrfeld-Johnsen J, Gachon F, et al. Medicine in the fourth dimension. *Cell metabolism*. 2019;30(2):238-50.
87. Long JE, Drayson MT, Taylor AE, Toellner KM, Lord JM, Phillips AC. Morning vaccination enhances antibody response over afternoon vaccination: a cluster-randomised trial. *Vaccine*. 2016;34(24):2679-85.
88. Koike N, Hida A, Numano R, Hirose M, Sakaki Y, Tei H. Identification of the mammalian homologues of the *Drosophila* timeless gene, Timeless1. *Febs Letters*. 1998;441(3):427-31.
89. Sangoram AM, Saez L, Antoch MP, Gekakis N, Staknis D, Whiteley A, et al. Mammalian circadian autoregulatory loop: a timeless ortholog and mPer1 interact and negatively regulate CLOCK-BMAL1-induced transcription. *Neuron*. 1998;21(5):1101-13.
90. Zylka MJ, Shearman LP, Levine JD, Jin X, Weaver DR, Reppert SM. Molecular analysis of mammalian timeless. *Neuron*. 1998;21(5):1115-22.
91. Barnes JW, Tischkau SA, Barnes JA, Mitchell JW, Burgoon PW, Hickok JR, et al. Requirement of mammalian Timeless for circadian rhythmicity. *Science*. 2003;302(5644):439-42.
92. Unsal-Kaçmaz K, Mullen TE, Kaufmann WK, Sancar A. Coupling of human circadian and cell cycles by the timeless protein. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(8):3109-16.
93. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 2002;418(6901):935-41.
94. Young MW, Kay SA. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nature Reviews Genetics*. 2001;2(9):702-15.
95. Nasmyth K. Putting the cell cycle in order. *Science*. 1996;274(5293):1643-5.
96. Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, Weinert TA. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annual review of genetics*. 2002;36:617.
97. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry*. 2004;73(1):39-85.
98. Zhou B-BS, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. 2000;408(6811):433-9.

99. Bjarnason GA, Jordan R. Circadian variation of cell proliferation and cell cycle protein expression in man: clinical implications. *Progress in cell cycle research*. 2000;193-206.
100. Canaple L, Kakizawa T, Laudet V. The days and nights of cancer cells. *Cancer Research*. 2003;63(22):7545-52.
101. Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *science*. 2006;314(5797):268-74.
102. Kurz EU, Douglas P, Lees-Miller SP. Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(51):53272-81.
103. Yang X, Wood PA, Hrushesky WJ. Mammalian TIMELESS is required for ATM-dependent CHK2 activation and G2/M checkpoint control. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(5):3030-4.
104. Foss EJ. Tof1p regulates DNA damage responses during S phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2001;157(2):567-77.
105. Gotter A, Manganaro T, Weaver DR, Kolakowski LF Jr, Possidente B, Sriram S, MacLaughlin DT, Reppert SM. A time-less function for mouse timeless *Nat Neurosci*. 2000;3:755-6.
106. Liu F, Li X, Liu P, Quan X, Zheng C, Zhou B. Association between three polymorphisms in *BMAL1* genes and risk of lung cancer in a Northeast Chinese population. *DNA and Cell Biology*. 2019;38(12):1437-43.
107. Gery S, Komatsu N, Kawamata N, Miller CW, Desmond J, Virk RK, et al. Epigenetic silencing of the candidate tumor suppressor gene *Per1* in non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research*. 2007;13(5):1399-404.
108. Chen B, Tan Y, Liang Y, Li Y, Chen L, Wu S, et al. *Per2* participates in AKT-mediated drug resistance in A549/DDP lung adenocarcinoma cells. *Oncology letters*. 2017;13(1):423-8.
109. Tang W, Peng W, Zhang H, Zhang Y, Li B, Duan C. *Period 3*, a tumor suppressor in non-small cell lung cancer, is silenced by hypermethylation. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2018;11(1):120.
110. Zhang H, Liu R, Zhang B, Huo H, Song Z. Advances in the Study of Circadian Genes in Non-Small Cell Lung Cancer. *Integrative Cancer Therapies*. 2022;21:15347354221096080.
111. Jiang P, Xu C, Zhang P, Ren J, Mageed F, Wu X, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits self-renewal ability of lung cancer stem-like cells through inhibition of *CLOCK*. *International journal of molecular medicine*. 2020;46(6):2216-24.
112. Li Y, Xie M, Song X, Gragen S, Sachdeva K, Wan Y, et al. *DEC1* negatively regulates the expression of *DEC2* through binding to the E-box in the proximal promoter. *Journal of biological chemistry*. 2003;278(19):16899-907.

113. Yu Y, Li Y, Zhou L, Yang G, Wang M, Hong Y. Cryptochrome 2 (CRY2) suppresses proliferation and migration and regulates clock gene network in osteosarcoma cells. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. 2018;24:3856.
114. Guha TK, Wai A, Hausner G. Programmable genome editing tools and their regulation for efficient genome engineering. *Computational and structural biotechnology journal*. 2017;15:146-60.
115. Redman M, King A, Watson C, King D. What is CRISPR/Cas9? *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*. 2016;101(4):213-5.
116. Lippow SM, Aha PM, Parker MH, Blake WJ, Baynes BM, Lipovšek D. Creation of a type IIS restriction endonuclease with a long recognition sequence. *Nucleic acids research*. 2009;37(9):3061-73.
117. Çetintas VB, Kotmakçi M, Kaymaz BT. Bagisiklik Yanitindan Genom Tasarimina; CRISPR-Cas9 Sistemi/From the Immune Response to the Genome Design; CRISPR-Cas9 System. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 2017;37(1):27.
118. Mojica FJ, Juez G, Rodriguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular microbiology*. 1993;9(3):613-21.
119. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007;315(5819):1709-12.
120. Li Y, Man S, Ye S, Liu G, Ma L. CRISPR-Cas-based detection for food safety problems: Current status, challenges, and opportunities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2022;21(4):3770-98.
121. Zhao Z, Li C, Tong F, Deng J, Huang G, Sang Y. Review of applications of CRISPR-Cas9 gene-editing technology in cancer research. *Biological procedures online*. 2021;23(1):1-13.
122. Isa HS, Dumas C. An Analysis of SARS-CoV-2 on the Molecular and Subatomic Levels through Applied I-Theory. *Advances in Microbiology*. 2021;11(2):75-89.
123. Allemailem KS, Alsahli MA, Almatroudi A, Alrumaihi F, Alkhaleefah FK, Rahmani AH, et al. Current updates of CRISPR/Cas9-mediated genome editing and targeting within tumor cells: an innovative strategy of cancer management. *Cancer Communications*. 2022.
124. Le Rhun A, Escalera-Maurer A, Bratovič M, Charpentier E. CRISPR-Cas in *Streptococcus pyogenes*. *RNA biology*. 2019;16(4):380-9.
125. Minkenberg B, Zhang J, Xie K, Yang Y. CRISPR-PLANT v2: An online resource for highly specific guide RNA spacers based on improved off-target analysis. *Plant Biotechnology Journal*. 2019;17(1):5.

126. Zheng Y, Li J, Wang B, Han J, Hao Y, Wang S, et al. Endogenous type I CRISPR-Cas: from foreign DNA defense to prokaryotic engineering. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2020;8:62.
127. Burma S, Chen BP, Chen DJ. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA repair*. 2006;5(9-10):1042-8.
128. Bennardo N, Cheng A, Huang N, Stark JM. Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS genetics*. 2008;4(6):e1000110.
129. Bennett EP, Petersen BL, Johansen IE, Niu Y, Yang Z, Chamberlain CA, et al. INDEL detection, the ‘Achilles heel’ of precise genome editing: a survey of methods for accurate profiling of gene editing induced indels. *Nucleic acids research*. 2020;48(21):11958-81.
130. Liu M, Rehman S, Tang X, Gu K, Fan Q, Chen D, et al. Methodologies for improving HDR efficiency. *Frontiers in genetics*. 2019;9:691.
131. Singh S, Chaudhary R, Deshmukh R, Tiwari S. Opportunities and challenges with CRISPR-Cas mediated homologous recombination based precise editing in plants and animals. *Plant Molecular Biology*. 2022:1-20.
132. Singh S, Chaudhary R, Deshmukh R, Tiwari S. Opportunities and challenges with CRISPR-Cas mediated homologous recombination based precise editing in plants and animals. *Plant Molecular Biology*. 2023;111(1-2):1-20.
133. Wells KD, Prather RS. Genome-editing technologies to improve research, reproduction, and production in pigs. *Molecular Reproduction and Development*. 2017;84(9):1012-7.
134. Nakamuta M, Chang BH-J, Zsigmond E, Kobayashi K, Lei H, Ishida BY, et al. Complete phenotypic characterization of apobec-1 knockout mice with a wild-type genetic background and a human apolipoprotein B transgenic background, and restoration of apolipoprotein B mRNA editing by somatic gene transfer of Apobec-1. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(42):25981-8.
135. Malzahn A, Lowder L, Qi Y. Plant genome editing with TALEN and CRISPR. *Cell & bioscience*. 2017;7(1):1-18.
136. Minkenberg B, Wheatley M, Yang Y. CRISPR/Cas9-enabled multiplex genome editing and its application. *Progress in molecular biology and translational science*. 2017;149:111-32.
137. Ding Y, Li H, Chen L-L, Xie K. Recent advances in genome editing using CRISPR/Cas9. *Frontiers in plant science*. 2016;7:703.
138. Wu Y, Liang D, Wang Y, Bai M, Tang W, Bao S, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell stem cell*. 2013;13(6):659-62.
139. Prasher DC. Using GFP to see the light. *Trends in Genetics*. 1995;11(8):320-3.
140. Varshney GK, Sood R, Burgess SM. Understanding and editing the zebrafish genome. *Advances in genetics*. 2015;92:1-52.

141. Xie K, Yang Y. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR–Cas system. *Molecular plant*. 2013;6(6):1975-83.
142. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2010;397(8):3173-8.
143. Chow YT, Chen S, Wang R, Liu C, Kong C-w, Li RA, et al. Single cell transfection through precise microinjection with quantitatively controlled injection volumes. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-9.
144. Arnold A, Laporte V, Duont S, Appert– Cillin A, Erbacher P, Coupin G, Levy R, Poindron P, Gies JP: Comparing reagents for efficient transfection human primary myoblasts: FuGENE 6, Effectene and ExGen 500. *Fundam Clin Pharmacol*. 2006;20:81-9.
145. Stepanenko AA, Heng HH. Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off-target effects, artifacts. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2017;773:91-103.
146. Lufino MM, Edser PA, Wade-Martins R. Advances in high-capacity extrachromosomal vector technology: episomal maintenance, vector delivery, and transgene expression. *Molecular Therapy*. 2008;16(9):1525-38.
147. Recillas-Targa F. Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Molecular biotechnology*. 2006;34(3):337-54.
148. Riedl SA, Kaiser P, Raup A, Synatschke CV, Jérôme V, Freitag R. Non-viral transfection of human T lymphocytes. *Processes*. 2018;6(10):188.
149. Nejepinska J, Malik R, Moravec M, Svoboda P. Deep sequencing reveals complex spurious transcription from transiently transfected plasmids. 2012.
150. Igoucheva O, Alexeev V, Yoon K. Differential cellular responses to exogenous DNA in mammalian cells and its effect on oligonucleotide-directed gene modification. *Gene therapy*. 2006;13(3):266-75.
151. Du X, Wang J, Zhou Q, Zhang L, Wang S, Zhang Z, et al. Advanced physical techniques for gene delivery based on membrane perforation. *Drug Delivery*. 2018;25(1):1516-25.
152. Prasanna GL, Panda T. Electroporation: basic principles, practical considerations and applications in molecular biology. *Bioprocess Engineering*. 1997;16(5):261-4.
153. Stroh T, Erben U, Kühl AA, Zeitz M, Siegmund B. Combined pulse electroporation—a novel strategy for highly efficient transfection of human and mouse cells. *PloS one*. 2010;5(3):e9488.
154. Mali S. Delivery systems for gene therapy. *Indian journal of human genetics*. 2013;19(1):3.
155. Meng L, Liu X, Wang Y, Zhang W, Zhou W, Cai F, et al. Sonoporation of cells by a parallel stable cavitation microbubble array. *Advanced Science*. 2019;6(17):1900557.

156. Pylaev T, Vanzha E, Avdeeva E, Khlebtsov B, Khlebtsov N. A novel cell transfection platform based on laser optoporation mediated by Au nanostar layers. *Journal of biophotonics*. 2019;12(1):e201800166.
157. Wang Y, Shang S, Li C. Comparison of different kinds of nonviral vectors for gene delivery to human periodontal ligament stem cells. *Journal of Dental Sciences*. 2015;10(4):414-22.
158. Hamann A, Nguyen A, Pannier AK. Nucleic acid delivery to mesenchymal stem cells: a review of nonviral methods and applications. *Journal of Biological Engineering*. 2019;13(1):1-16.
159. Kouassi GK, Irudayaraj J, McCarty G. Examination of cholesterol oxidase attachment to magnetic nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*. 2005;3(1):1-9.
160. Al-Dosari MS, Gao X. Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *The AAPS journal*. 2009;11(4):671-81.
161. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. *New England journal of medicine*. 2000;343(1):37-49.
162. Jerne NK. The immune system. *Scientific American*. 1973;229(1):52-63.
163. Medzhitov R, Janeway Jr C. Innate immunity. *New England Journal of Medicine*. 2000;343(5):338-44.
164. Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010;125(2):S24-S32.
165. Cooper MD, Alder MN. The evolution of adaptive immune systems. *Cell*. 2006;124(4):815-22.
166. Keller MA, Stiehm ER. Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*. 2000;13(4):602-14.
167. Binder CJ, Chang M-K, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A, et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nature medicine*. 2002;8(11):1218-26.
168. Sprent J, Gao E-K, Kanagawa O, Webb SR, editors. T-cell selection in the thymus. *Princess Takamatsu Symposia*; 1988.
169. Rouse BT, Sarangi PP, Suvas S. Regulatory T cells in virus infections. *Immunological reviews*. 2006;212(1):272-86.
170. Parker DC. T cell-dependent B cell activation. *Annual review of immunology*. 1993;11(1):331-60.
171. Conejo-Garcia JR, Biswas S, Chaurio R, Rodriguez PC, editors. Neglected no more: B cell-mediated anti-tumor immunity. *Seminars in Immunology*; 2023: Elsevier.
172. de Bree LCJ, Koeken VA, Joosten LA, Aaby P, Benn CS, van Crevel R, et al., editors. Non-specific effects of vaccines: current evidence and potential implications. *Seminars in immunology*; 2018: Elsevier.

173. Quintin J, Saeed S, Martens JH, Giamarellos-Bourboulis EJ, Ifrim DC, Logie C, et al. *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell host & microbe*. 2012;12(2):223-32.
174. Netea MG, Quintin J, Van Der Meer JW. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell host & microbe*. 2011;9(5):355-61.
175. Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2020;20(6):375-88.
176. Bekkering S, Domínguez-Andrés J, Joosten LA, Riksen NP, Netea MG. Trained immunity: reprogramming innate immunity in health and disease. *Annual review of immunology*. 2021;39:667-93.
177. Saeed S, Quintin J, Kerstens HH, Rao NA, Aghajani-refah A, Matarese F, et al. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *science*. 2014;345(6204):1251086.
178. Hole CR, Wager CML, Castro-Lopez N, Campuzano A, Cai H, Wozniak KL, et al. Induction of memory-like dendritic cell responses in vivo. *Nature communications*. 2019;10(1):1-13.
179. O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH. T cell–and B cell–independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nature immunology*. 2006;7(5):507-16.
180. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*. 2009;457(7229):557-61.
181. Zumla AI, Gillespie SH, Hoelscher M, Philips PP, Cole ST, Abubakar I, et al. New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. *The Lancet infectious diseases*. 2014;14(4):327-40.
182. Mehra M, Cossrow N, Kambili C, Underwood R, Makkar R, Potluri R. Assessment of tuberculosis burden in China using a dynamic disease simulation model. *The International journal of tuberculosis and lung disease*. 2013;17(9):1186-94.
183. Organization WH. *Global Tuberculosis Report*. 2012 [http. apps who int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/137094/1/9789241564809_eng.pdf). 2014.
184. Law S, Piatek AS, Vincent C, Oxlade O, Menzies D. Emergence of drug resistance in patients with tuberculosis cared for by the Indian health-care system: a dynamic modelling study. *The Lancet Public Health*. 2017;2(1):e47-e55.
185. Trauer JM, Denholm JT, McBryde ES. Construction of a mathematical model for tuberculosis transmission in highly endemic regions of the Asia-Pacific. *Journal of theoretical biology*. 2014;358:74-84.
186. Michelsen SW, Soborg B, Diaz LJ, Hoff ST, Agger EM, Koch A, et al. The dynamics of immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* during different stages of natural infection: A longitudinal study among Greenlanders. *Plos one*. 2017;12(6):e0177906.

187. Torrelles JB, Schlesinger LS. Integrating lung physiology, immunology, and tuberculosis. *Trends in microbiology*. 2017;25(8):688-97.
188. Seshadri C, Sedaghat N, Campo M, Peterson G, Wells RD, Olson GS, et al. Transcriptional networks are associated with resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PloS one*. 2017;12(4):e0175844.
189. Shah NS, Auld SC, Brust JC, Mathema B, Ismail N, Moodley P, et al. Transmission of extensively drug-resistant tuberculosis in South Africa. *New England Journal of Medicine*. 2017;376(3):243-53.
190. Behr MA, Edelstein PH, Ramakrishnan L. Revisiting the timetable of tuberculosis. *Bmj*. 2018;362.
191. Zak DE, Penn-Nicholson A, Scriba TJ, Thompson E, Suliman S, Amon LM, et al. A blood RNA signature for tuberculosis disease risk: a prospective cohort study. *The Lancet*. 2016;387(10035):2312-22.
192. Oxlade O, Murray M. Tuberculosis and poverty: why are the poor at greater risk in India? *PloS one*. 2012;7(11):e47533.
193. Ortblad KF, Salomon JA, Bärnighausen T, Atun R. Stopping tuberculosis: a biosocial model for sustainable development. *The Lancet*. 2015;386(10010):2354-62.
194. Saunders MJ, Wingfield T, Tovar MA, Baldwin MR, Datta S, Zevallos K, et al. A score to predict and stratify risk of tuberculosis in adult contacts of tuberculosis index cases: a prospective derivation and external validation cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2017;17(11):1190-9.
195. Batista JdAL, de Albuquerque MdFPM, Maruza M, Ximenes RAdA, Santos ML, Montarroyos UR, et al. Incidence and risk factors for tuberculosis in people living with HIV: cohort from HIV referral health centers in Recife, Brazil. *PloS one*. 2013;8(5):e63916.
196. Furin J, Cox H, Pai M. Tuberculosis. *The Lancet*. 2019;393(10181):1642-56.
197. Soto JA, Gálvez NM, Andrade CA, Ramírez MA, Riedel CA, Kalergis AM, et al. BCG vaccination induces cross-protective immunity against pathogenic microorganisms. *Trends in Immunology*. 2022.
198. Hershkovitz I, Donoghue HD, Minnikin DE, Besra GS, Lee OY, Gernaey AM, et al. Detection and molecular characterization of 9000-year-old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean. *PloS one*. 2008;3(10):e3426.
199. Kaufmann SH, Winau F. From bacteriology to immunology: the dualism of specificity. *Nature immunology*. 2005;6(11):1063-6.
200. Dow CT, Kidess L. BCG Vaccine—The Road Not Taken. *Microorganisms*. 2022;10(10):1919.
201. Andersen P, Kaufmann SH. Novel vaccination strategies against tuberculosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2014;4(6):a018523.

202. Kaufmann SH. The Tuberculosis Vaccine Development Pipeline: Present and Future Priorities and Challenges for Research and Innovation. *Essential tuberculosis*: Springer; 2021. p. 395-405.
203. mondiale de la Santé O, Organization WH. BCG vaccines: WHO position paper—February 2018—Vaccins BCG: Note de synthèse de l’OMS—Février 2018. *Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire*. 2018;93(08):73-96.
204. Bettencourt PJ, Joosten SA, Arlehamn CSL, Behr MA, Locht C, Neyrolles O. 100 years of the Bacillus Calmette-Guérin vaccine. *Vaccine*. 2021;39(50):7221.
205. Covián C, Fernández-Fierro A, Retamal-Díaz A, Díaz FE, Vasquez AE, Lay MK, et al. BCG-induced cross-protection and development of trained immunity: implication for vaccine design. *Frontiers in immunology*. 2019;10:2806.
206. Novakovic B, Habibi E, Wang S-Y, Arts RJ, Davar R, Megchelenbrink W, et al. β -Glucan reverses the epigenetic state of LPS-induced immunological tolerance. *Cell*. 2016;167(5):1354-68. e14.
207. Fanucchi S, Fok ET, Dalla E, Shibayama Y, Börner K, Chang EY, et al. Immune genes are primed for robust transcription by proximal long noncoding RNAs located in nuclear compartments. *Nature genetics*. 2019;51(1):138-50.
208. DiNardo AR, Netea MG, Musher DM. Postinfectious epigenetic immune modifications—a double-edged sword. *New England Journal of Medicine*. 2021;384(3):261-70.
209. Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Benn CS, Joosten LA, Jacobs C, et al. Long-lasting effects of BCG vaccination on both heterologous Th1/Th17 responses and innate trained immunity. *Journal of innate immunity*. 2014;6(2):152-8.
210. Nemes E, Geldenhuys H, Rozot V, Rutkowski KT, Ratangee F, Bilek N, et al. Prevention of *M. tuberculosis* infection with H4: IC31 vaccine or BCG revaccination. *New England Journal of Medicine*. 2018;379(2):138-49.
211. Leentjens J, Kox M, Stokman R, Gerretsen J, Diavatopoulos DA, van Crevel R, et al. BCG vaccination enhances the immunogenicity of subsequent influenza vaccination in healthy volunteers: a randomized, placebo-controlled pilot study. *The Journal of infectious diseases*. 2015;212(12):1930-8.
212. Ritz N, Mui M, Balloch A, Curtis N. Non-specific effect of Bacille Calmette-Guerin vaccine on the immune response to routine immunisations. *Vaccine*. 2013;31(30):3098-103.
213. Ota MO, Vekemans J, Schlegel-Haueter SE, Fielding K, Sanneh M, Kidd M, et al. Influence of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin on antibody and cytokine responses to human neonatal vaccination. *The Journal of Immunology*. 2002;168(2):919-25.

214. Chen J, Gao L, Wu X, Fan Y, Liu M, Peng L, et al. BCG-induced trained immunity: history, mechanisms and potential applications. *Journal of Translational Medicine*. 2023;21(1):106.
215. Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science*. 2016;352(6284):aaf1098.
216. Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Joosten LA, Ifrim DC, Saeed S, et al. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(43):17537-42.
217. Moorlag S, Arts R, Van Crevel R, Netea M. Non-specific effects of BCG vaccine on viral infections. *Clinical microbiology and infection*. 2019;25(12):1473-8.
218. Li J, Zhan L, Qin C. The double-sided effects of *Mycobacterium Bovis* bacillus Calmette–Guérin vaccine. *NPJ vaccines*. 2021;6(1):14.
219. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud Se, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server: Springer; 2005.
220. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Tunyasuvunakool K, et al. AlphaFold 2. In *Fourteenth Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction (Abstract Book)*. 2020.
221. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*. 2021;38(7):3022-7.
222. Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research*. 2009;37(suppl_2):W202-W8.
223. Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic acids research*. 2015;43(D1):D146-D52.
224. Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang P-L, Ideker T. Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics*. 2011;27(3):431-2.
225. Chen F, Zhang G, Iwamoto Y, See WA. BCG directly induces cell cycle arrest in human transitional carcinoma cell lines as a consequence of integrin cross-linking. *BMC urology*. 2005;5(1):1-10.
226. Lerner LK, Holzer S, Kilkenny ML, Šviković S, Murat P, Schiavone D, et al. Timeless couples G-quadruplex detection with processing by DDX 11 helicase during DNA replication. *The EMBO journal*. 2020;39(18):e104185.
227. Xie S, Mortusewicz O, Ma HT, Herr P, Poon RY, Helleday T, et al. Timeless interacts with PARP-1 to promote homologous recombination repair. *Molecular cell*. 2015;60(1):163-76.
228. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*. 2004;116(2):281-97.

229. Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*. 2012;148(6):1172-87.
230. Garofalo M, Croce CM. microRNAs: Master regulators as potential therapeutics in cancer. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2011;51:25-43.
231. Duecker RP, De Mir Messa I, Jerkic SP, Kochems A, Gottwald G, Moreno-Galdó A, et al. Epigenetic regulation of inflammation by microRNAs in post-infectious bronchiolitis obliterans. *Clinical & translational immunology*. 2022;11(2):e1376.
232. Guan T, Dominguez CX, Amezquita RA, Laidlaw BJ, Cheng J, Henao-Mejia J, et al. ZEB1, ZEB2, and the miR-200 family form a counterregulatory network to regulate CD8⁺ T cell fates. *Journal of Experimental Medicine*. 2018;215(4):1153-68.
233. Pecot CV, Rupaimoole R, Yang D, Akbani R, Ivan C, Lu C, et al. Tumour angiogenesis regulation by the miR-200 family. *Nature communications*. 2013;4(1):1-14.
234. Zhou X, Li X, Wu M. miRNAs reshape immunity and inflammatory responses in bacterial infection. *Signal transduction and targeted therapy*. 2018;3(1):1-13.
235. Lin L, Hu K. MiR-147: functions and implications in inflammation and diseases. *MicroRNA*. 2021;10(2):91-6.
236. Wu Z, Liu P, Zhang G. Identification of circRNA–miRNA–Immune-Related mRNA Regulatory Network in Gastric Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2022;12.
237. Ye J, Lei J, Fang Q, Shen Y, Xia W, Hu X, et al. miR-4666-3p and miR-329 synergistically suppress the stemness of colorectal cancer cells via targeting TGF- β /Smad pathway. *Frontiers in oncology*. 2019;9:1251.
238. Lee H-M, Kim TS, Jo E-K. MiR-146 and miR-125 in the regulation of innate immunity and inflammation. *BMB reports*. 2016;49(6):311.
239. Wang Q, Bozack SN, Yan Y, Boulton ME, Grant MB, Busik JV. Regulation of retinal inflammation by rhythmic expression of MiR-146a in diabetic retina. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2014;55(6):3986-94.
240. Jiao G, Huang Q, Hu M, Liang X, Li F, Lan C, et al. Therapeutic suppression of miR-4261 attenuates colorectal cancer by targeting MCC. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2017;8:36-45.
241. Addison EG, North J, Bakhsh I, Marden C, Haq S, Al-Sarraj S, et al. Ligation of CD8 α on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity. *Immunology*. 2005;116(3):354-61.
242. Kwon KW, Aceves-Sánchez MdJ, Segura-Cerda CA, Choi E, Bielefeldt-Ohmann H, Shin SJ, et al. BCG Δ BCG1419c increased memory CD8⁺ T cell-associated immunogenicity and mitigated pulmonary inflammation compared

- with BCG in a model of chronic tuberculosis. *Scientific reports*. 2022;12(1):1-14.
243. Bevers R, Kurth K, Schamhart D. Role of urothelial cells in BCG immunotherapy for superficial bladder cancer. *British journal of cancer*. 2004;91(4):607-12.
244. Vazquez SE, Mann SA, Bodansky A, Kung AF, Quandt Z, Ferré EM, et al. Autoantibody discovery across monogenic, acquired, and COVID-19-associated autoimmunity with scalable PhIP-seq. *Elife*. 2022;11:e78550.
245. Zheng X-S, Wang Q, Min J, Shen X-R, Li Q, Zhao Q-C, et al. Single-cell landscape of lungs reveals key role of neutrophil-mediated immunopathology during lethal SARS-CoV-2 infection. *Journal of Virology*. 2022;96(9):e00038-22.
246. Hamldar S, Kiani SJ, Khoshmirsafa M, Nahand JS, Mirzaei H, Khatami A, et al. Expression profiling of inflammation-related genes including IFI-16, NOTCH2, CXCL8, THBS1 in COVID-19 patients. *Biologicals*. 2022;80:27-34.
247. Ranasinghe C, Trivedi S, Wijesundara DK, Jackson RJ. IL-4 and IL-13 receptors: Roles in immunity and powerful vaccine adjuvants. *Cytokine & growth factor reviews*. 2014;25(4):437-42.
248. Wang R, Jaw JJ, Stutzman NC, Zou Z, Sun PD. Natural killer cell-produced IFN- γ and TNF- α induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *Journal of leukocyte biology*. 2012;91(2):299-309.
249. Montero-Blay A, Blanco JD, Rodriguez-Arce I, Lastrucci C, Piñero-Lambea C, Lluch-Senar M, et al. Bacterial expression of a designed single-chain IL-10 prevents severe lung inflammation. *Molecular Systems Biology*. 2023:e11037.
250. Maglio A, Vitale C, Pelaia C, D'Amato M, Ciampo L, Sferra E, et al. Severe Asthma Remissions Induced by Biologics Targeting IL5/IL5r: Results from a Multicenter Real-Life Study. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(3):2455.
251. Comarmond C, Drumez E, Labreuche J, Hachulla E, Thomas T, Flipo R-M, et al. COVID-19 presentation and outcomes in patients with inflammatory rheumatic and musculoskeletal diseases receiving IL6-receptor antagonists prior to SARS-CoV-2 infection. *Journal of Translational Autoimmunity*. 2023:100190.
252. Finan C, Ota MO, Marchant A, Newport MJ. Natural variation in immune responses to neonatal *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG) Vaccination in a Cohort of Gambian infants. *PLoS One*. 2008;3(10):e3485.
253. Branger J, Leemans JC, Florquin S, Weijer S, Speelman P, Van Der Poll T. Toll-like receptor 4 plays a protective role in pulmonary tuberculosis in mice. *International immunology*. 2004;16(3):509-16.
254. Rozman M, Zidovec-Lepej S, Jambrosic K, Babić M, Drmić Hofman I. Role of TLRs in HIV-1 Infection and Potential of TLR Agonists in HIV-1 Vaccine Development and Treatment Strategies. *Pathogens*. 2023;12(1):92.

255. Vidyant S, Chatterjee A, Dhole T. A single-nucleotide polymorphism in TLR4 is linked with the risk of HIV-1 infection. *British journal of biomedical science*. 2019;76(2):59-63.
256. Janeway Jr C. JR., Medzhitov R. Innate immune recognition *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216.
257. Sharma U, Singhal P, Bandil K, Patle R, Neyaz K, Bose S, et al. Genetic variations of TLRs and their association with HPV/EBV, co-infection along with nicotine exposure in the development of premalignant/malignant lesions of the oral cavity in Indian population. *Cancer Epidemiology*. 2019;61:38-49.
258. Li S, Wang M, Ao X, Chang A, Yang C, Zhao F, et al. CLOCK is a substrate of SUMO and sumoylation of CLOCK upregulates the transcriptional activity of estrogen receptor- α . *Oncogene*. 2013;32(41):4883-91.
259. Gray KJ, Gibbs JE, editors. Adaptive immunity, chronic inflammation and the clock. *Seminars in Immunopathology*; 2022: Springer.
260. Kumar D, Sharma A, Taliyan R, Urmera MT, Herrera-Calderon O, Heinbockel T, et al. Orchestration of the circadian clock and its association with Alzheimer's disease: Role of endocannabinoid signaling. *Ageing research reviews*. 2022;73:101533.
261. Méndez-Samperio P, García-Martínez E. CD40 ligand expression in *Mycobacterium bovis* BCG infection and its regulation by cytokines: A direct role of interleukin 12. *Archives of Medical Research*. 2001;32(2):108-12.
262. Shaw M, Collins A, Peacock C, Miller E, Black G, Sibthorpe D, et al. Evidence that genetic susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* in a Brazilian population is under oligogenic control: Linkage study of the candidate genes NRAMP1 and TBFA. *Tubercle and Lung Disease*. 1997;78(1):35-45.
263. Alm J, Sanjeevi C, Miller E, Dabadghao P, Lilja G, Pershagen G, et al. Atopy in children in relation to BCG vaccination and genetic polymorphisms at SLC11A1 (formerly NRAMP1) and D2S1471. *Genes & Immunity*. 2002;3(2):71-7.
264. Blackwell JM, Searle S. Genetic regulation of macrophage activation: understanding the function of Nramp1 (= Ity/Lsh/Bcg). *Immunology letters*. 1999;65(1-2):73-80.
265. Blackwell JM, Searle S, Goswami T, Miller EN. Understanding the multiple functions of Nramp1. *Microbes and infection*. 2000;2(3):317-21.
266. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*. 2010;11(5):373-84.
267. Sun Z, Yuan W, Li L, Cai H, Mao X, Zhang L, et al. Macrophage CD36 and TLR4 Cooperation Promotes Foam Cell Formation and VSMC Migration and Proliferation Under Circadian Oscillations. *Journal of cardiovascular translational research*. 2022;15(5):985-97.

268. Heldwein KA, Liang MD, Andresen TK, Thomas KE, Marty AM, Cuesta N, et al. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of leukocyte biology*. 2003;74(2):277-86.
269. He CX, Avner P, Boitard C, Rogner UC. Downregulation of the circadian rhythm related gene *Arntl2* suppresses diabetes protection in Idd6 NOD. C3H congenic mice. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2010;37(12):1154-8.
270. Hanekom WA. The immune response to BCG vaccination of newborns. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005;1062(1):69-78.
271. Behr MA, Waters WR. Is tuberculosis a lymphatic disease with a pulmonary portal? *The Lancet infectious diseases*. 2014;14(3):250-5.
272. Cellier M, Prive G, Belouchi A, Kwan T, Rodrigues V, Chia W, et al. *Nramp* defines a family of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(22):10089-93.
273. Coenen M, Gregersen P. Rheumatoid arthritis: a view of the current genetic landscape. *Genes & Immunity*. 2009;10(2):101-11.

8. EKLER

EK 1. TIMELESS genini hedefleyen miRNA'lar

hsa-miR-520g-5p	5' - ucuagaggaagcacuuucuguuu - 3' (uzunluk = 23)
hsa-miR-6516-5p	5' - uuugcaguaacaggugugagca - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-4496	5' - gaggaacugaagcugagaggg - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-4774-5p	5' - ucugguauaguagguauuaa - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-4494	5' - ccagacuguggcugaccagagg - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-4261	5' - aggaaacagggacca - 3' (uzunluk = 16)
hsa-miR-12115	5' - uaguggagcugggaggcagcucgg - 3' (uzunluk = 24)
hsa-miR-3192-5p	5' - ucugggagguuguagcaguggaa - 3' (uzunluk = 23)
hsa-miR-147b-5p	5' - uggaaacauuucugcacaacu - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-6879-3p	5' - ugucacccgcuccuugcccag - 3' (uzunluk = 21)
hsa-miR-4505	5' - aggcugggcugggacgga - 3' (uzunluk = 18)
hsa-miR-5787	5' - gggcuggggcgggggaggu - 3' (uzunluk = 20)
hsa-miR-4499	5' - aagacugagaggaggga - 3' (uzunluk = 17)
hsa-miR-6740-3p	5' - ugucuucucuccuccaaacag - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-200a-5p	5' - caucuaccggacagugcugga - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-200b-5p	5' - caucuacugggcagcauugga - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-3182	5' - gcuucuguaguaguaguc - 3' (uzunluk = 17)
hsa-miR-335-5p	5' - ucaagagcaauaacgaaaaugu - 3' (uzunluk = 23)
hsa-miR-501-3p	5' - aaugcaccgggcaaggauucu - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-502-3p	5' - aaugcaccugggcaaggauuca - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-7151-5p	5' - gauccaucucugccuguauuggc - 3' (uzunluk = 23)
hsa-miR-767-5p	5' - ugcaccaugguugucugagcaug - 3' (uzunluk = 23)
hsa-miR-3160-3p	5' - agagcugagacuagaaagcca - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-4747-5p	5' - agggaaggaggcuuggucuuaag - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-6848-3p	5' - guggucucuuggcccccag - 3' (uzunluk = 19)
hsa-miR-218-1-3p	5' - augguuccgucaagcaccaugg - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-6878-5p	5' - agggagaaagcuagaagcugaag - 3' (uzunluk = 23)
hsa-miR-6843-3p	5' - auggucuccuguucucugcag - 3' (uzunluk = 21)
hsa-miR-6778-3p	5' - ugccuccugacauuccacag - 3' (uzunluk = 21)

hsa-miR-6857-3p	5' - ugacugagcuucuccccacag - 3' (uzunluk = 21)
hsa-miR-6828-5p	5' - aggaagcaagagaaccugugg - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-1229-3p	5' - cucucaccacugcccuccacag - 3' (uzunluk = 23)
hsa-miR-5584-5p	5' - cagggaauagggaagaacuaga - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-555	5' - aggguaagcugaaccucugau - 3' (uzunluk = 21)
hsa-miR-2355-3p	5' - auuguccuugcuguuuggagau - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-4666a-5p	5' - auacaugucagauuguugcc - 3' (uzunluk = 21)
hsa-miR-4731-5p	5' - ugcuggggggccacaugagugug - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-501-5p	5' - aauccuuugucccugggugaga - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-141-5p	5' - caucuuccaguacaguguugga - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-5196-5p	5' - agggaaggggacgaggguuggg - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-2681-5p	5' - guuuuaccaccuccaggagacu - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-3160-5p	5' - ggcuuucuagucucagcucucc - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-148a-5p	5' - aaaguucugagacacuccgacu - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-4297	5' - ugccuuccugucugug - 3' (uzunluk = 16)
hsa-miR-146a-5p	5' - ugagaacugaaauccauggguu - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-7153-5p	5' - ugagaacugacaaaugugguagg - 3' (uzunluk = 23)
hsa-miR-301a-5p	5' - gcucugacuuuauugcacuacu - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-7853-5p	5' - ucaaaugcagauccugacuuc - 3' (uzunluk = 21)
hsa-miR-105-5p	5' - ucaaaugcucagacuccuguggu - 3' (uzunluk = 23)
hsa-miR-3605-5p	5' - ugaggauggauagcaaggaagcc - 3' (uzunluk = 23)
hsa-miR-301b-5p	5' - gcucugacgagguugcacuacu - 3' (uzunluk = 22)
hsa-miR-146b-5p	5' - ugagaacugaaauccauaggcug - 3' (uzunluk = 23)

EK 2. Normal Hücreler Üzerinde Gerçekleştirilen BCG Aşısının Gen İfade Analizlerinin İstatistikî Değerlendirmesi

Gen Sembolleri	AVG Delta Ct		2 [^] (-Delta Ct)		Kat Düzenlemesi
	Aşılı Normal	Aşısız Normal	Aşılı Normal	Aşısız Normal	Aşılı/Aşısız Grup
APCS	1.03	3.17	0.488580	0.110766	4.41
C3	1.91	3.00	0.266879	0.124618	2.14
CASP1	1.85	3.32	0.277971	0.099828	2.78
CCL2	1.06	3.24	0.478664	0.105520	4.54
CCL5	0.71	3.21	0.613097	0.107737	5.69
CCR4	0.44	2.64	0.735528	0.159938	4.60
CCR5	-0.37	1.62	1.296009	0.324342	4.00
CCR6	1.34	3.34	0.394278	0.098454	4.00
CCR8	1.04	3.16	0.487303	0.111537	4.37
CD14	0.66	2.75	0.634684	0.148197	4.28
CD4	0.44	2.68	0.738229	0.155565	4.75
CD40	-0.32	1.84	1.244465	0.278469	4.47
CD40LG	-0.19	2.15	1.141177	0.224625	5.08
CD80	1.84	3.89	0.278416	0.067246	4.14
CD86	1.36	3.48	0.390439	0.089349	4.37
CD8A	3.09	6.67	0.117833	0.009790	12.04
CRP	1.30	3.06	0.405988	0.119542	3.40
CSF2	1.34	4.16	0.394906	0.055768	7.08
CXCL10	1.36	3.61	0.390355	0.081650	4.78
CXCR3	0.40	2.52	0.755454	0.173811	4.35
DDX58	2.39	3.03	0.191181	0.122054	1.57
FASLG	2.03	2.85	0.244394	0.138273	1.77
FOXP3	-1.40	1.20	2.631471	0.433946	6.06
GATA3	1.37	3.71	0.386747	0.076182	5.08
HLA-A	-0.40	0.68	1.319382	0.622260	2.12
HLA-E	1.56	2.08	0.339807	0.235792	1.44
ICAM1	0.26	3.31	0.835412	0.100522	8.31
IFNA1	1.23	3.79	0.427622	0.072072	5.93
IFNAR1	1.47	2.01	0.362145	0.247515	1.46
IFNB1	-0.01	3.48	1.009160	0.089349	11.29
IFNG	1.32	4.23	0.400343	0.053127	7.54
IFNGR1	1.13	1.62	0.456237	0.324342	1.41
IL10	1.72	3.94	0.303326	0.064955	4.67
IL13	-1.54	0.78	2.900499	0.580589	5.00
IL17A	1.17	3.25	0.445424	0.104791	4.25
IL18	1.43	3.51	0.369873	0.087510	4.23
IL1A	1.24	2.37	0.423142	0.192855	2.19
IL1B	0.15	2.56	0.899872	0.169058	5.32
IL1R1	0.02	3.30	0.985160	0.101222	9.73
IL2	3.35	4.04	0.098256	0.060605	1.62
IL23A	0.24	3.33	0.847741	0.099138	8.55
IL4	-0.06	3.00	1.043801	0.124618	8.38
IL5	-0.48	2.70	1.390259	0.153423	9.06

IL6	0.55	3.34	0.682324	0.098454	6.93
CXCL8	1.63	3.08	0.322072	0.117896	2.73
IRAK1	2.76	3.02	0.147937	0.122903	1.20
IRF3	-1.50	0.71	2.830676	0.609454	4.64
IRF7	2.98	6.36	0.127145	0.012137	10.48
ITGAM	1.25	3.07	0.421897	0.118716	3.55
JAK2	3.24	5.03	0.105536	0.030513	3.46
LY96	2.89	3.85	0.134778	0.069136	1.95
LYZ	2.92	3.75	0.131784	0.074099	1.78
MAPK1	0.51	1.35	0.702327	0.391094	1.80
MAPK8	-0.54	1.92	1.449260	0.263448	5.50
MBL2	1.82	3.78	0.283612	0.072574	3.91
MPO	2.18	3.36	0.220346	0.097098	2.27
MX1	0.58	2.47	0.668052	0.179940	3.71
MYD88	1.52	2.18	0.348950	0.220002	1.59
NFKB1	0.33	2.84	0.797496	0.139235	5.73
NFKBIA	1.42	2.32	0.372600	0.199656	1.87
NLRP3	4.25	4.68	0.052507	0.038891	1.35
NOD1	2.99	3.36	0.125867	0.097098	1.30
NOD2	2.47	4.17	0.180117	0.055383	3.25
RAG1	1.38	3.40	0.383665	0.094443	4.06
RORC	1.77	2.74	0.292913	0.149228	1.96
SLC11A1	0.48	3.76	0.718492	0.073587	9.76
STAT1	1.49	2.33	0.355109	0.198277	1.79
STAT3	-0.13	1.35	1.097406	0.391094	2.81
STAT4	2.82	3.71	0.141894	0.076182	1.86
STAT6	1.81	2.70	0.285676	0.153423	1.86
TBX21	2.03	3.35	0.244742	0.097774	2.50
TICAM1	1.41	2.53	0.377505	0.172610	2.19
TLR1	1.85	4.05	0.276719	0.060187	4.60
TLR2	0.37	3.17	0.774478	0.110766	6.99
TLR3	2.07	2.99	0.238436	0.125485	1.90
TLR4	0.03	1.39	0.982165	0.380400	2.58
TLR5	0.43	2.89	0.744797	0.134492	5.54
TLR6	1.44	3.19	0.367541	0.109241	3.36
TLR7	2.43	3.42	0.185614	0.093143	1.99
TLR8	2.70	3.65	0.153483	0.079417	1.93
TLR9	1.74	2.77	0.298400	0.146157	2.04
TNF	0.84	3.13	0.557018	0.113880	4.89
TRAF6	1.43	2.26	0.371442	0.208135	1.78
TYK2	2.89	2.89	0.135053	0.134492	1.00

EK 3. BCG Aşılı Normal HEK293 Hücreleri ve BCG aşılı TIMELESS Nakavt Edilmiş BCG Aşılı HEK293 Hücreleri Arasındaki Gen İfade Analizlerinin İstatistiki Değerlendirmesi

Gen Sembolleri	AVG Delta Ct		2 ⁻ (-Delta Ct)		Kat Düzenlemesi Nakavt/Kontrol Grup
	BCG aşılı TIMELESS nakavt HEK293 hücreleri	BCG aşılı normal HEK293 hücreleri-Kontrol	BCG aşılı TIMELESS nakavt HEK293 hücreleri	BCG aşılı normal HEK293 hücreleri	
APCS	7.89	3.98	0.004220	0.063236	-14.99
C3	8.39	3.86	0.002988	0.069084	-23.12
CASP1	8.19	3.80	0.003425	0.071955	-21.01
CCL2	6.86	4.71	0.008595	0.038136	-4.44
CCL5	8.03	4.66	0.003833	0.039676	-10.35
CCR4	6.60	3.79	0.010277	0.072147	-7.02
CCR5	5.00	3.58	0.031338	0.083870	-2.68
CCR6	8.12	3.89	0.003597	0.067336	-18.72
CCR8	7.30	4.99	0.006359	0.031535	-4.96
CD14	6.43	3.61	0.011569	0.082146	-7.10
CD4	6.31	3.80	0.012621	0.071799	-5.69
CD40	3.09	3.63	0.117408	0.080535	1.46
CD40LG	2.55	3.26	0.170645	0.104440	1.63
CD80	7.87	4.79	0.004275	0.036035	-8.43
CD86	9.12	4.61	0.001801	0.041046	-22.79
CD8A	6.48	5.03	0.011191	0.030502	-2.73
CRP	8.58	4.25	0.002615	0.052546	-20.09
CSF2	7.43	5.29	0.005814	0.025556	-4.40
CXCL10	6.26	4.31	0.013068	0.050523	-3.87
CXCR3	5.59	4.35	0.020796	0.048889	-2.35
DDX58	6.52	4.34	0.010923	0.049489	-4.53
FASLG	6.70	3.98	0.009650	0.063263	-6.56
FOXP3	3.37	3.55	0.096473	0.085147	1.13
GATA3	7.27	5.32	0.006499	0.025028	-3.85
HLA-A	5.56	3.55	0.021250	0.085383	-4.02
HLA-E	7.37	3.51	0.006035	0.087961	-14.57
ICAM1	8.48	4.21	0.002799	0.054063	-19.31
IFNA1	8.62	5.18	0.002542	0.027673	-10.89
IFNAR1	8.22	3.42	0.003343	0.093744	-28.04
IFNB1	9.21	4.94	0.001691	0.032653	-19.31
IFNG	7.90	5.34	0.004189	0.024681	-5.89
IFNGR1	5.96	3.08	0.016028	0.118100	-7.37
IL10	7.27	4.67	0.006479	0.039259	-6.06
IL13	3.26	3.41	0.104567	0.093852	1.11
IL17A	8.50	4.12	0.002755	0.057651	-20.92
IL18	7.08	4.38	0.007370	0.047872	-6.50
IL1A	5.77	3.19	0.018286	0.109533	-5.99
IL1B	7.30	4.10	0.006358	0.058235	-9.16
IL1R1	7.98	3.97	0.003959	0.063754	-16.10
IL2	8.74	5.30	0.002340	0.025434	-10.87
IL23A	8.38	4.19	0.003004	0.054861	-18.26
IL4	7.24	3.89	0.006602	0.067549	-10.23
IL5	6.49	3.47	0.011115	0.089970	-8.09

IL6	6.04	4.20	0.015238	0.054362	-3.57
CXCL8	4.70	3.58	0.038508	0.083370	-2.16
IRAK1	6.43	4.71	0.011584	0.038294	-3.31
IRF3	5.90	2.45	0.016747	0.183185	-10.94
IRF7	7.45	5.93	0.005722	0.016456	-2.88
ITGAM	6.11	4.19	0.014498	0.054605	-3.77
JAK2	10.77	6.19	0.000574	0.013659	-23.80
LY96	8.91	4.84	0.002078	0.034888	-16.79
LYZ	8.83	4.87	0.002192	0.034113	-15.56
MAPK1	6.27	2.46	0.012920	0.181802	-14.07
MAPK8	5.75	3.41	0.018566	0.093788	-5.05
MBL2	8.40	4.77	0.002969	0.036708	-12.36
MPO	6.77	4.13	0.009141	0.057038	-6.24
MX1	4.73	3.53	0.037658	0.086465	-2.30
MYD88	4.97	3.47	0.032005	0.090328	-2.82
NFKB1	6.41	5.28	0.011796	0.025805	-2.19
NFKBIA	5.80	3.37	0.017967	0.096450	-5.37
NLRP3	8.87	6.20	0.002139	0.013592	-6.35
NOD1	6.40	4.94	0.011872	0.032581	-2.74
NOD2	7.74	6.42	0.004670	0.011656	-2.50
RAG1	5.54	4.33	0.021560	0.049657	-2.30
RORC	6.63	3.72	0.010131	0.075822	-7.48
SLC11A1	1.31	3.43	0.404396	0.092993	4.35
STAT1	8.01	3.44	0.003867	0.091922	-23.77
STAT3	7.51	2.82	0.005498	0.142036	-25.83
STAT4	6.83	4.77	0.008786	0.036730	-4.18
STAT6	6.02	3.76	0.015392	0.073949	-4.80
TBX21	7.81	3.98	0.004448	0.063353	-14.24
TICAM1	5.96	3.36	0.016009	0.097720	-6.10
TLR1	9.10	5.80	0.001829	0.017908	-9.79
TLR2	8.79	4.32	0.002267	0.050120	-22.11
TLR3	6.55	4.02	0.010703	0.061721	-5.77
TLR4	5.33	3.98	0.024852	0.063560	-2.56
TLR5	7.76	3.37	0.004597	0.096398	-20.97
TLR6	4.58	3.39	0.041736	0.095140	-2.28
TLR7	7.32	4.38	0.006258	0.048047	-7.68
TLR8	8.87	4.65	0.002139	0.039730	-18.58
TLR9	6.20	3.69	0.013560	0.077243	-5.70
TNF	9.28	4.19	0.001609	0.054637	-33.95
TRAF6	5.96	3.38	0.016100	0.096150	-5.97
TYK2	7.01	4.84	0.007761	0.034959	-4.50

EK 4. Nakavt TIMELESS Hücreleri Üzerinde BCG aşılı ve Aşısız Gen İfade Analizlerinin İstatistiki Değerlendirmesi

Gen Sembolleri	AVG Delta Ct		2 ^(-Delta Ct)		Kat Değişimi
	TIMELESS nakavt BCG aşılı HEK293 hücreleri	TIMELESS nakavt BCG aşısız HEK293 hücreleri-Kontrol	TIMELESS nakavt BCG aşılı HEK293 hücreleri	TIMELESS nakavt BCG aşısız HEK293 hücreleri-Kontrol	
APCS	2.08	2.80	0.236998	0.143974	1.65
C3	2.57	3.43	0.167839	0.092885	1.81
CASP1	2.38	4.97	0.192373	0.031806	6.05
CCL2	1.05	3.35	0.482772	0.098329	4.91
CCL5	2.22	4.24	0.215297	0.052882	4.07
CCR4	0.79	2.08	0.577228	0.236792	2.44
CCR5	-0.82	0.14	1.760145	0.905848	1.94
CCR6	2.31	3.13	0.202057	0.114387	1.77
CCR8	1.49	2.97	0.357188	0.127612	2.80
CD14	0.62	2.71	0.649816	0.152454	4.26
CD4	0.50	2.75	0.708879	0.148746	4.77
CD40	-2.72	1.24	6.594367	0.422862	15.59
CD40LG	-1.26	0.54	2.396119	0.689694	3.47
CD80	2.06	3.37	0.240125	0.096393	2.49
CD86	3.30	4.88	0.101181	0.034034	2.97
CD8A	0.67	4.47	0.628546	0.045067	13.95
CRP	2.77	3.66	0.146877	0.078885	1.86
CSF2	1.61	3.06	0.326577	0.120260	2.72
CXCL10	0.45	1.71	0.733967	0.305301	2.40
CXCR3	-0.22	1.97	1.168049	0.255578	4.57
DDX58	0.70	1.96	0.613507	0.257723	2.38
FASLG	0.88	2.22	0.542015	0.214271	2.53
FOXP3	-2.44	-2.43	5.418507	5.388482	1.01
GATA3	1.45	2.60	0.365029	0.165232	2.21
HLA-A	-0.26	0.51	1.193534	0.703381	1.70
HLA-E	1.56	2.61	0.338979	0.164222	2.06
ICAM1	2.67	3.53	0.157211	0.086490	1.82
IFNA1	2.81	3.96	0.142767	0.064132	2.23
IFNAR1	2.41	3.39	0.187768	0.095462	1.97
IFNB1	3.40	4.47	0.094961	0.045062	2.11
IFNG	2.09	2.83	0.235272	0.140479	1.67
IFNGR1	0.15	0.68	0.900220	0.622916	1.45
IL10	1.46	3.12	0.363925	0.115321	3.16
IL13	-2.55	-2.04	5.873167	4.123268	1.42
IL17A	2.69	2.91	0.154758	0.132914	1.16
IL18	1.27	1.82	0.413945	0.282295	1.47
IL1A	-0.04	0.48	1.027047	0.716200	1.43
IL1B	1.49	3.03	0.357095	0.122791	2.91
IL1R1	2.17	2.81	0.222376	0.142951	1.56
IL2	2.93	4.13	0.131444	0.056944	2.31
IL23A	2.57	3.79	0.168713	0.072098	2.34
IL4	1.43	2.70	0.370829	0.154077	2.41
IL5	0.68	2.30	0.624282	0.203548	3.07
IL6	0.22	1.18	0.855877	0.441660	1.94

CXCL8	-1.11	-0.77	2.162871	1.704722	1.27
IRAK1	0.62	2.21	0.650613	0.216357	3.01
IRF3	0.09	1.11	0.940604	0.461728	2.04
IRF7	1.64	3.02	0.321388	0.122914	2.61
ITGAM	0.30	0.41	0.814307	0.753518	1.08
JAK2	4.96	5.46	0.032238	0.022671	1.42
LY96	3.10	3.42	0.116720	0.093504	1.25
LYZ	3.02	4.16	0.123136	0.056048	2.20
MAPK1	0.46	2.03	0.725673	0.245022	2.96
MAPK8	-0.06	0.91	1.042792	0.531973	1.96
MBL2	2.58	3.84	0.166741	0.069637	2.39
MPO	0.96	2.06	0.513431	0.239969	2.14
MX1	-1.08	-1.11	2.115132	2.155425	-1.02
MYD88	-0.85	-1.17	1.797620	2.247724	-1.25
NFKB1	0.59	1.49	0.662564	0.355573	1.86
NFKBIA	-0.01	0.62	1.009140	0.652667	1.55
NLRP3	3.06	3.67	0.120144	0.078444	1.53
NOD1	0.58	2.29	0.666789	0.204662	3.26
NOD2	1.93	2.80	0.262270	0.143714	1.82
RAG1	-0.28	0.44	1.210937	0.739306	1.64
RORC	0.81	0.52	0.569044	0.699266	-1.23
SLC11A1	-4.51	0.83	22.713414	0.561070	40.48
STAT1	2.20	3.10	0.217207	0.116429	1.87
STAT3	1.70	2.67	0.308814	0.157010	1.97
STAT4	1.02	2.14	0.493471	0.227352	2.17
STAT6	0.21	0.88	0.864492	0.543681	1.59
TBX21	2.00	2.69	0.249851	0.155297	1.61
TICAM1	0.15	1.58	0.899179	0.335625	2.68
TLR1	3.28	4.05	0.102705	0.060503	1.70
TLR2	2.97	3.77	0.127315	0.073271	1.74
TLR3	0.73	2.27	0.601137	0.207535	2.90
TLR4	-2.48	-1.36	5.583475	2.570412	2.17
TLR5	1.95	2.86	0.258224	0.137826	1.87
TLR6	-1.23	-0.21	2.344185	1.156881	2.03
TLR7	1.51	2.93	0.351503	0.131300	2.68
TLR8	3.06	4.34	0.120119	0.049453	2.43
TLR9	0.39	3.08	0.761635	0.118439	6.43
TNF	3.47	5.54	0.090379	0.021551	4.19
TRAF6	0.15	1.63	0.904292	0.324118	2.79
TYK2	1.20	1.62	0.435924	0.325827	1.34

EK 5. Tez Çalışması Orjinallik Raporu

SİRKADİYEN RİTMİN AŞI İLE EDİNİLEN BAĞIŞIKLIK YANITINA
ETKİSİNİN CRISPR/CAS9 TEKNİĞİYLE ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 7	% 6	% 3	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

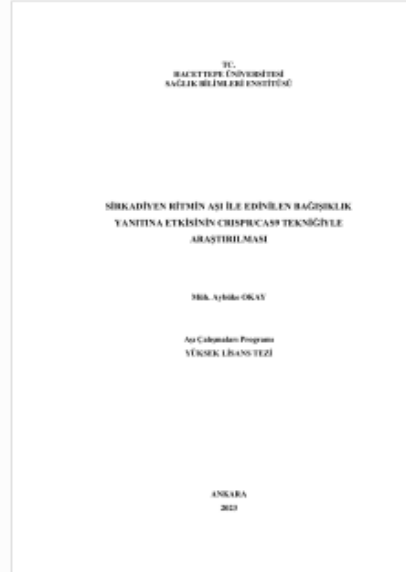
1	fullsepp.com İnternet Kaynağı	% 1
2	bibliotecadigital.exactas.uba.ar İnternet Kaynağı	<% 1
3	Submitted to University of Nottingham Öğrenci Ödevi	<% 1
4	ppg.cirtranslacional.sites.unifesp.br İnternet Kaynağı	<% 1
5	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	Submitted to Mersin Āniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
7	earsiv.kastamonu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
8	dspace.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
9	www.bezelyedergi.net İnternet Kaynağı	<% 1

EK6. Dijital Makbuz**Dijital Makbuz**

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Aybüke Okay
Ödev başlığı: Tezler
Gönderi Başlığı: SİRKADİYEN RİTMİN AŞI İLE EDİNİLEN BAĞIŞIKLIK YANITINA E...
Dosya adı: Aybu_ke_OKAY_13.06.23.docx
Dosya boyutu: 5.9M
Sayfa sayısı: 128
Kelime sayısı: 26,763
Karakter sayısı: 177,009
Gönderim Tarihi: 13-Haz-2023 12:08ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2115135595



9. ÖZGEÇMİŞ