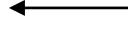


BERKAY TOKCAN

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

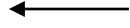
YÜKSEK LİSANS DOKTORA
TEZİ

İSTANBUL- 2021



Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**MİYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLERDE JAK2 VE
JAK2V617F MRNA HEDEFLİ NANOPARTİKÜL
UYGULAMASININ CGAS-STING YOLAĞINA
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

BERKAY TOKCAN

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. SELÇUK SÖZER TOKDEMİR**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2021

TEZ ONAYI



BEYAN



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin boyunca bana her türlü desteği veren, bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan danışmanım Doç. Dr. Selçuk Sözer Tokdemir'e,

Çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım İlideniz Uslu Bıçak, Cemal Çağıl Koçana, Selin Fulya Toprak ve Büşra Yaşa'ya,

Bizleri yetiştiren, enstitümüzün saygıdeğer hocalarına,

Bana hep destek olan aileme,

Hep yanımda olan dostlarım Tahir Onur Özkoral, Burç Özarı ve Yunus Alper Karaçelik'e

teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37928

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Nükleik Asit Sensörleri ve Sinyal Yolakları.....	3
2.2. cGAS – STING Yolağı	4
2.2.1. Kanser ve cGAS – STING Yolağı İlişkisi	6
2.3. Miyeloproliferatif Neoplaziler	7
2.3.1. JAK – STAT Yolağı	8
2.4. Küresel Nükleik Asit Teknolojisi	11
2.4.1. RNA-Hedefli Küresel Nükleik Asit Partikülleri: Nanoflare.....	13
2.4.2. Küresel Nükleik Asitlerin Kanser ve Gen Anlatım Çalışmalarında Kullanımı	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1. Gereç	15
3.1.1. Hücre Hatları.....	15
3.1.2. RNA Hedefli Altın Nanopartiküller.....	15
3.1.3. Kullanılan Kitler	16
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	16
3.1.5. Kullanılan Kimyasallar	17
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. Hücre Hatlarının Kültürü	17
3.2.2. Altın Nanopartikül Uygulamaları	19

3.2.3. RNA İzolasyonu.....	20
3.2.4. cDNA Sentezlenmesi	21
3.2.5. Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR (rt-qPCR)	21
3.2.6. Gerçek Zamanlı PZR Verilerinin Analizi	23
4. BULGULAR.....	25
4.1. Gen Anlatım Değişimlerinin Değerlendirilmesi	25
4.1.1. cGAS Geni Anlatımının Nanopartikül Uygulamasıyla Periyodik Değişimi	25
4.1.2. <i>STING</i> Geni Anlatımının Partikül Uygulamasıyla Periyodik Değişimi	30
4.1.3. <i>JAK2</i> Geni Anlatımının Partikül Uygulamasıyla Periyodik Değişimi.....	36
4.1.4. <i>IRF3</i> Geni Anlatımının Partikül Uygulamasıyla Periyodik Değişimi	40
4.1.5. <i>TBK1</i> Geni Anlatımının Partikül Uygulamasıyla Periyodik Değişimi	45
4.1.6. <i>TLR9</i> Geni Anlatımının Partikül Uygulamasıyla Periyodik Değişimi.....	50
4.1.7. <i>NFkB1</i> Geni Anlatımının Partikül Uygulamasıyla Periyodik Değişimi	52
4.1.8. <i>STAT1</i> – <i>STAT2</i> Genlerinin Anlatımının Partikül Uygulamasıyla Periyodik Değişimi	54
5. TARTIŞMA	57
KAYNAKLAR	62
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	68
ÖZGEÇMİŞ	69

TABLolar LİSTESİ

Tablo 3-1: Kullanılan hücre hatları ve özellikleri.....	15
Tablo 3-2: Kullanılan kitler	16
Tablo 3-3: Kullanılan Cihazlar	16
Tablo 3-4: Kullanılan kimsayal maddeler	17
Tablo 3-5: Hücre hatlarının kültüründe kullanılan besiyeri içerikleri	18
Tablo 3-6: Thermal cycler cihazı cDNA sentez program ayarları.....	21
Tablo 3-7: Test edilen genler ve gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan primer dizileri	22
Tablo 3-8: Gerçek zamanlı PZR malzemeleri ve miktarları.....	23
Tablo 3-9: LC480 qPZR program ayarları	23

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: cGAS – STING yolağı işleyiş şeması	5
Şekil 2-2: JAK-STAT yolağının çalışma mekanizması.....	9
Şekil 2-3 Çeşitli küresel nükleik asit yapıları	12
Şekil 2-4: Nanoflare çalışma prensibi.....	13
Şekil 4-1: HEL hücre hattında cGAS anlatımının değişimi	25
Şekil 4-2: HEL hücre hattında cGAS geninin Ct değeri değişimi.....	26
Şekil 4-3: SET2 hücre hattında cGAS anlatımının değişimi.....	26
Şekil 4-4: SET2 hücre hattında cGAS Ct değerleri değişimi	27
Şekil 4-5: K562 hücre hattında cGAS anlatımının değişimi	28
Şekil 4-6: K562 hücre hattında cGAS Ct değeri değişimi	29
Şekil 4-7: HEL hücre hattında STING anlatımının değişimi	30
Şekil 4-8: HEL hücre hattında STING geni Ct değeri değişimi.....	31
Şekil 4-9: SET2 hücre hattında STING anlatımının değişimi.....	32
Şekil 4-10: HEL hücre hattında STING geni Ct değeri değişimi.....	33
Şekil 4-11: K562 hücrehattında STING anlatımının değişimi	34
Şekil 4-12: K562 hücrehattında STING geni Ct değeri değişimi.....	35
Şekil 4-13: HEL hücrehattında JAK2 anlatımının değişimi	36
Şekil 4-14: HEL hücrehattında JAK2 geni Ct değeri değişimi	37
Şekil 4-15: SET2 hücrehattında JAK2 anlatımının değişimi	37
Şekil 4-16: SET2 hücrehattında JAK2 geni Ct değeri değişimi.....	38
Şekil 4-17: K562 hücrehattında JAK2 anlatımının değişimi	39
Şekil 4-18: K562 hücrehattında JAK2 geninin Ct değeri değişimi.....	40
Şekil 4-19: HEL hücrehattında IRF3 anlatımının değişimi	41
Şekil 4-20: HEL hücrehattında IRF3 geni Ct değeri değişim.....	42
Şekil 4-21: SET2 hücrehattında IRF3 anlatımının değişimi.....	42
Şekil 4-22: SET2 hücrehattında IRF3 geni Ct değeri değişimi	43
Şekil 4-23: K562 hücrehattında IRF3 anlatımının değişimi	44
Şekil 4-24: K562 hücrehattında IRF3 geni Ct değeri değişimi	45
Şekil 4-25: HEL hücre hattında TBK1 anlatımının değişimi	46
Şekil 4-26: HEL hücre hattında TBK1 geni Ct değeri değişimi	47

Şekil 4-27: SET2 hücre hattında <i>TBK1</i> anlatımının değişimi.....	47
Şekil 4-28: SET2 hücre hattında <i>TBK1</i> geni Ct değeri değişimi	48
Şekil 4-29: K562 hücre hattında <i>TBK1</i> anlatımının değişimi.....	49
Şekil 4-30: K562 hücre hattında <i>TBK1</i> geni Ct değeri değişimi	50
Şekil 4-31: HEL hücre hattında <i>TLR9</i> anlatımının değişimi	51
Şekil 4-32: HEL hücre hattında <i>TLR9</i> geni Ct değeri değişimi.....	52
Şekil 4-33: HEL hücre hattında <i>NFKB1</i> anlatımının değişimi	53
Şekil 4-34: HEL hücre hattında <i>NFKB1</i> geni Ct değeri değişimi.....	54
Şekil 4-35: HEL hücre hattında <i>STAT1</i> anlatımının değişimi	55
Şekil 4-36: HEL hücre hattında <i>STAT2</i> anlatımının değişimi	56



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ATP: Adenozin Trifosfat
CALR: Kalretikulin
cGAMP: Siklik guanozin monofosfat-adenozin monofosfat
cGAS: cGAMP Sentaz
Cy3: Cyanine 3
Cy5: Cyanine 5
DAMP: Hasar ilişkili moleküler desen
DMSO: Dimetil Sülfoksit
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit
ER: Endoplazmik Retikulum
ET: Esansiyel trombositemi
GTP: Guanozin Trifosfat
hTERT: Telomeraz ters transkriptaz
IFNAR: İnterferon Reseptör A
IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IRF3: İnterferon düzenleyici faktör 3
ISG: İnterferon Uyarımlı Genler
JAK2: Janus Kinaz 2
MAPK: Mitojenle Etkinleşen Protein Kinaz
MF: Miyelofibroz
MPL: Trompopoetin Reseptörü
MPN: Miyeloproliferatif Neoplazi
MtDNA: Mitokondriyal DNA
NFKB1: Nükleer Faktör Kappa B
PAMP: Patojen ilişkili moleküler desen
PBS: Fosfat Tamponlu Salin
PRR: Kalıp Tanıma Reseptörü
PV: Polistemia Vera
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RLR: RIG benzeri Reseptör

RNA: Ribo Nükleik Asit

ROS: Reaktif Oksijen Türü

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SNA: Küresel Nükleik Asit

STAT: Sinyal transdüseri ve aktivatörü

STING: İnterferon Genlerinin Uyarıcısı

TBK1: TANK Bağlayıcı Kinaz

TLR: Toll Benzeri Reseptör



ÖZET

Tokcan, B. (2021). Miyeloproliferatif Neoplazilerde JAK2 ve JAK2V617F mRNA Hedefli Nanopartikül Uygulamasının cGAS-STING Yolağına Etkilerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans. İstanbul.

Çalışmada miyeloproliferatif neoplaziler ile özdeşleşmiş JAK2V617F mutasyonu varlığında, bir sitozolik DNA tespit sinyal yolağı olan cGAS-STING yolağının etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla JAK2V617F mutasyonu taşıyan HEL ve SET2 hücre hatları ile yabani tip JAK2'ye sahip K562 hücre hattında, cGAS-STING yolağı, mutant ve yabani tip JAK2 mRNA'sıyla eşleşerek çift zincirli yapıların oluşmasını sağlayan Nanoflare partikülleriyle uyarıldı. Nanopartiküllerle farklı sürelerde muamele edilmiş hücrelerde, cGAS-STING ve JAK-STAT yolaklarıyla ilişkili genlerin anlatımları gerçek zamanlı kantitatif PZR uygulamasıyla test edildi. Çalışmada *cGAS*, *STING*, *TBK1*, *IRF3*, *TLR9*, *JAK2*, *STAT1* ve *STAT2* genlerinin anlatımları her üç hücre hattında incelendi. HEL ve SET2 hücrelerine nanopartiküllerle yapılan uyarım sonucu test edilen genlerin anlatımlarında değişimler gözlemlendi. K562 hücre hattında ise değişimlerin sınırlı olduğu gözlemlendi. Gen anlatımlarının kısa süreli inkübasyonlarda, yarım saatlik dilimlerde değişkenlik gösterdiği gözlemlendi. Genel olarak mutant JAK2 mRNA'sına özgü nanopartiküllerin cGAS-STING yolağındaki genlerin anlatımını yabani tipe göre daha yüksek seviyelere çıkardığı gözlemlendi. Bu sonuçlar nanopartiküller ile mutant JAK2 mRNA'sının bloklanmasının cGAS-STING yolağının aktivasyonunu pozitif yönde etkilediğini göstermiş oldu. Bu durum MPN'lerde sürekli aktif halde olan JAK2 proteinin cGAS-STING yolağında baskılayıcı etkisinin göstergesi olarak yorumlandı.

Anahtar Kelimeler: cGAS-STING, Sitozolik DNA, Nanoflare, Miyeloproliferatif Neoplaziler, JAK2

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37928

ABSTRACT

Tokcan, B. (2021). Effects of JAK2 and JAK2V617F mRNA Targeting Nanoparticle Application on cGAS-STING Pathway in Myeloproliferative Neoplasms . İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics. MSC Thesis. İstanbul.

In this study, it was aimed to investigate the activity of cGAS-STING cytosolic DNA detection pathway in presence of JAK2V617F mutation which is one of the indicator mutations of myeloproliferative neoplasms. With this purpose, HEL and SET2 cell lines carrying JAK2V617F and K562 cell line possessing wild type JAK2, were stimulated with Nanoflare particles that form double stranded structures by matching JAK2 and JAK2V617F mRNAs. The expressions of genes related with cGAS-STING and JAK-STAT pathways were analysed with real time PCR in cell lines which were incubated with Nanoflares for various time. The expressions of *cGAS*, *STING*, *TBK1*, *IRF3*, *TLR9*, *JAK2*, *STAT1* ve *STAT2* genes were investigated all three cell lines. Expression changes were observed for tested genes in HEL and SET2 as result of nanoparticle application. Limited expression change was observed in K562 cell line. In short termed incubations variable expression values were observed with in half hour periods. In general, the expressions of cGAS-STING pathway genes were reached higher values for mutant nanoparticles than wild type ones. This result showed that the blockage of mutant JAK2 mRNA affected cGAS-STING pathway positively. This situation might be the result of suppressive effect of continuously active JAK2 on cGAS-STING pathway.

Key Words: cGAS-STING, Cytosolic DNA, Nanoflare, Myeloproliferative neoplasms, JAK2

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 37928

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sağlıklı bir hücrede, normal şartlar altında sitozolde DNA molekülü bulunmazken, viral enfeksiyon veya genomik stabilitenin kaybedilmesi durumunda sitozolde DNA moleküllerine rastlamak mümkündür (Hopfner ve Hornung 2020). Özellikle kanserlerde gözlenen kontrolsüz bölünme döngüsü ve artmış metabolik aktivite DNA'nın çekirdek dışına geçmesine elverişli bir ortam oluşturur. Bir diğer yandan, ölü hücrelerden hücrelerarası ortama yayılan hücre dışı DNA'lar ve kanserli hücrelerden salgılanan vesiküllerin içindeki nükleik asitler endositotik mekanizmalarla sağlıklı hücrelere girebilir. Bu yolla farklı hücrelere aktarılan DNA ve RNA molekülleri Toll benzeri reseptörler (TLR) aracılığıyla tanınarak hücresel bağışıklık mekanizmalarının uyarılmasını sağlar (Niu ve ark. 2018). cGAS-STING yolağı ise, sitozolde DNA moleküllerini tespit ederek inflamatuvar cevabın tetiklenmesinde sorumludur (Niu ve ark. 2018). cGAS enzimi interferon genlerinin regülasyonundan sorumlu STING proteinini uyararak kanser gelişimini baskılayıcı mekanizmaların devreye girmesini sağlar. cGAS-STING yolağının aktivasyonu tip I interferon salınımını tetikleyerek bağışıklık cevabının oluşmasını sağlar (Kwon ve Bakhom 2019). Kanser baskılayıcı rolüne rağmen çeşitli çalışmalarda bu yolağın kronik aktivasyonunun tümör gelişimini ve metastazı hızlandırılabileceği gösterilmiştir (Khoo ve Chen 2018; Ng ve ark 2018; Kwon ve Bakhom 2019). cGAS-STING yolağının iki yönlü doğası, farklı kanser türlerindeki etkisinin belirlenmesini önemli kılmaktadır.

Miyeloproliferatif neoplaziler (MPN), kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücrelerde meydana gelen mutasyonlar sonucu kan hücrelerinin üretiminin kontrolden çıkmasıyla gelişen kan hastalıklarıdır. Kök hücrelerin kontrolsüzce bölünmesiyle periferik kanda olgunlaşmış kan hücrelerinin sayısında aşırı bir artış gözlenir. MPN'lerin ortaya çıkmasında hücre bölünmesini kontrol eden sinyal yollarında meydana gelen mutasyonlar etkilidir. JAK, MPL ve CALR genleri MPN'lerde mutasyonların gözleendiği genler olarak öne çıkmaktadır. Özellikle JAK2 geninde gözlenen JAK2V617F mutasyonu MPN'lerin büyük kısmında gözlenir (Tremblay ve ark. 2021). Bu mutasyon sonucunda sürekli aktif hale JAK-STAT yolağı hücrelere bölünme sinyalinin dış uyarılarda bağımsız olarak verilmesine sebep

olur. Düzensiz bölünme döngüsü ve artmış metabolik aktivite hücrelerde genom stabilitesinin kaybolmasına sebep olur. Bölünmede meydana gelen hatalar ve artmış reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu çift zincir kırıkları yeni mutasyonların kazanılmasına sebebiyet vererek tümör gelişimini hızlandırıcı etki gösterir (Scott ve Rebel 2012).

Çalışmanın hipotezi: “ JAK2V617F taşıyıcısı kanserli hücre hatlarında cGAS – STING yolağının uyarılmasının, yolak üzerindeki ve ilişkili genlerin anlatımına etkisinin bulunacağıdır”. Bunu test etmek için cGAS-STING yolağı ve TLR reseptörlerinin miyeloproliferatif neoplazilerdeki (MPN) etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla MPN’lerde sıklıkla rastlanan JAK2V617F mutasyonun varlığında cGAS-STING yolağı ve ilgili TLR reseptör genlerinin anlatımı incelenecektir. Bunun için JAK2V617F mutasyonunu biallelik olarak bulunduran HEL, monoallelik olarak bulunduran SET2 ve yabani tip JAK2 bulunduran K562 hücre hatlarından çalışılacaktır. Çalışılmak üzere seçilen *cGAS*, *STING*, *IRF3*, *NFKB1*, *TBK1*, *TLR9*, *STAT1*, *STAT2*, *JAK2* genlerinin anlatımındaki değişimler araştırılacaktır. Çalışmada ilgili yolakların uyarımının sağlanması için dış yüzeyi oligonükleotit zincirleri ile kaplı altın nanopartiküller kullanılacaktır. Nanoflare olarak adlandırılan küresel nükleik asitler olan bu nanopartiküller üzerinde taşıdığı oligonükleotit zincirleri aracılığıyla yabani ve mutant JAK2 mRNA’larıyla eşleşerek cGAS enzimini uyarabilecek çift zincirli yapılar oluşturacaktır. Ayrıca bu partiküller ilgili mRNA’ları tutarak bu proteinlerin sentezinin inhibe edilmesini sağlayacaktır. Böylelikle JAK2 inhibisyonunda cGAS-STING yolağındaki etkiler gözlenerek iki yolak arasındaki ilişki araştırılacaktır.

Literatürde ilk defa altın Nanoflare nanopartiküllerinin, üzerilerindeki oligonükleotitler vasıtasıyla cGAS-STING yolağını etkileme kapasitesi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar ilgili genlerin anlatımında değişimler olduğunu göstermiş ve bu değişimlerin JAK2V617F mutasyonunun farklı allelik durumlarında çeşitlilik gösterdiği saptanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nükleik Asit Sensörleri ve Sinyal Yolakları

Hücreler bulundukları ortam ile sürekli bir etkileşim halindedir. Hücre dışı ortamdan gelen uyarılara ve tehditlere yanıt oluşturabilmek, hücrenin iç dengesinin korunması ve sağ kalımı için gereklidir. Hücreler, özellikle patojenik faktörleri tanımakla görevli doğal bağışıklık sistemi mekanizmaları bulundurur. Bu mekanizmalar, patojene özgü belirli bir yapıyı kalıp tanıma reseptörleri (PRR) aracılığıyla tespit ederek gerekli bağışıklık yanıtını oluşturacak sinyal yolaklarını aktive eder. PRR'ler tarafından tanınan faktörler patojen-ilişkili moleküler desen (PAMP) olarak tanımlanır (Mogensen 2009).

PRR'lar çalışma fonksiyonlarına göre üç temel gruba ayrılırlar. Hücre yüzeyinde bulunan endositotik PRR'lar mikrop ilişkili moleküllerin tanınmasını ve hücre içine alınarak yıkımını sağlar. Opsonin olarak adlandırılan PRR'lar yabancı moleküllere bağlanarak bu faktörleri fagositoz yoluyla eliminasyona duyarlı hale getirir. Son olarak sinyal reseptörleri ligandlarına bağlanmaları durumunda çeşitli hücresel bağışıklık yolaklarını aktive edici sinyaller oluşturarak hücrelerin yabancı moleküllere karşı aktif hale geçmesini sağlar (Jeannin ve ark. 2008).

Nükleik asitler, doğal bağışıklık sistemi tarafından çeşitli mekanizmalar aracılığıyla tanınabilen patojenik moleküllerdendir. Özellikle viral ve bakteriyel enfeksiyonlara karşı evrimleşmiş bu mekanizmalar, patojen ilişkili DNA ve RNA moleküllerini tespit ederek tip I interferonları üretimini ve salınımını tetikler (Gürtler ve Bowie 2013). Enfekte olan hücrelerde üretilen tip I interferonlar, interferon uyarımlı genlerin (ISG) transkripsiyonunu artırır. Sitokin salınımını artmasıyla çevre hücrelerin enflamatuvar yolaklarının aktive olması sağlanır. Ayrıca tip I interferonlar adaptif bağışıklık sisteminin uyarılmasında rol oynar (Ivanhukiv ve Donlin 2014). Enflamatuvar yolakların aktivasyonuna ek olarak nükleik asit sensörleri, apoptoz, piroptoz ve nekroptoz gibi programlı hücre ölümü mekanizmalarını tetikleyerek enfekte olan hücrelerin eliminasyonunu sağlar (Maelfait 2019).

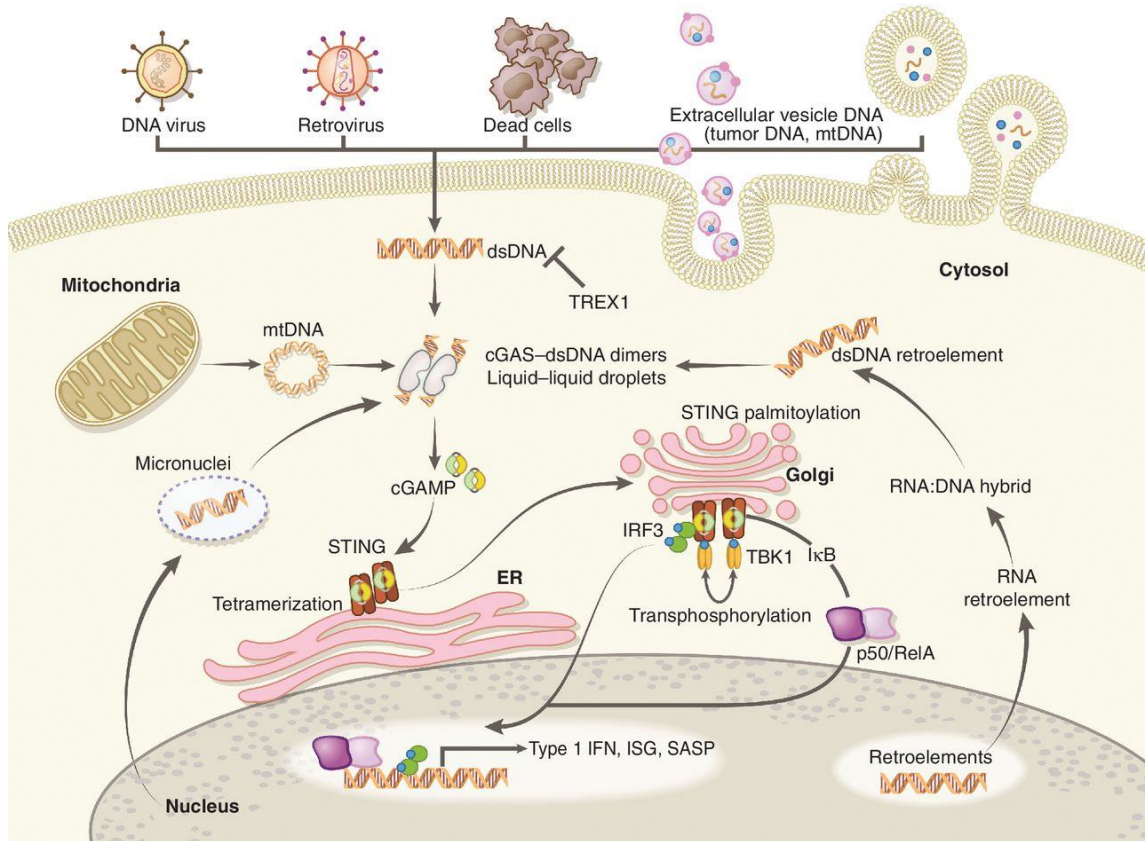
Nükleik asit sensörleri, hücresel lokalizasyonlarına göre endozomal ve sitoplazmik olmak üzere iki temel gruba ayrılır. Endozomal nükleik asit sensörleri hücre yüzeyi, ER zarı ve endozomal zarlarda lokalize olur. Bir kalıp tanıma reseptörü ailesi olan Toll-benzeri reseptörlerin (TLR) bazı üyeleri endozomal nükleik asit sensörü olarak görev yapar (Mogensen 2009). TLR3 viral kaynaklı çift zincirli RNA'ları (dsRNA), TLR8 bakteriyel ve viral RNA'ları, TLR13 bakteriyel 23S rRNA'ları, TLR9 ise metillenmemiş CpG bölgelerince zengin DNA dizilerini tanır (Wu ve Chen 2014). TLR'ler liganlarına bağlanmaları durumunda, MyD88, TRIF, TIRAP ve TRAM gibi adaptör proteinler aracılığıyla sinyal iletiminin oluşmasını sağlar. Tüm TLR'lerin ortak olarak kullandığı MyD88 aracı proteini NF-KB ve MAPK yolaklarının aktivasyonunda rol oynar. Bir diğer TLR aracı proteini olan TRIF, TLR'lardan aldığı sinyali TRAF3 ve TRAF6'ya iletir. TRAF6 üzerinden iletilen sinyaller NF-KB ve MAPK yolağının uyarırken, TRAF3, TBK1 ve IKKi ile birlikte IRF3 fosforilasyonun sağlayarak IRF3 transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Bu yolakların aktivasyonu sitokin üretimini tetikleyerek inflamatuvar cevabın oluşmasını sağlar (Kawasaki ve Kawai 2014).

Sitozole sızmayı başarmış eksojenik nükleik asitlerin tespitinden sorumlu olan çeşitli nükleik asit sensörleri bulunmaktadır. Bu sensörler ligadlarına bağlanmaları durumunda doğal bağışıklık sistemini uyarıcı sinyaller oluşturur. En bilinenlerinden olan cGAS – STING ve AIM2 yolakları çift zincirli DNA (dsDNA) dizilerini tespitinde görevli iken RLR-MAVS yolağı RNA dizilerini tanımakla görevlidir (Iurescia ve ark. 2018; Sharma ve ark. 20019). Yabancı nükleik asitlerin yanı sıra sitozolik sensörler yanlış lokalize olmuş endojenik DNA moleküllerini hasar ilişkili moleküler desen (DAMP) olarak tanır. Bu yolaklar çekirdekte meydana gelen bir hasar sonucu sitozole sızmış veya komşu hücrelerden yayılan DNA moleküllerine karşı inflamatuvar cevabın oluşturulmasında rol oynar (Roers ve ark. 2016).

2.2. cGAS – STING Yolağı

Sitozolik ortamdan faaliyet gösteren cGAS – STING yolağı çift zincirli DNA moleküllerinin tanınmasından sorumludur. Genomik stabilitenin kaybolması, kanser ve viral enfeksiyon gibi durumlar sitozolik DNA'nın kaynağı olarak gösterilebilir. Ayrıca ölü hücrelerden hücrelerarası ortama yayılan DNA zincirleri endositotik yolaklar aracılığıyla diğer hücrelerin sitoplazmalarına girebilir (Asada ve ark. 2018).

İlk olarak, 2008 yılında yapılan çalışmalarda immün uyarıcı DNA moleküllerinin varlığında hücrelerde tip I interferonların üretiminde gözlenen artışın endoplazmik retikulumde bulunan yeni bir tip protein ile ilişkili olduğu keşfedildi (Iskikawa ve Barber 2008). İnterferon genlerinin uyarıcısı olarak adlandırılan STING proteininin, cGAS enzimi tarafından sentezlenen cGAMP sinyal molekülleri tarafından uyarıldığı 2013 yılında ortaya çıkarıldı (Sun ve ark. 2012).



Şekil 2-1: cGAS – STING yolağı işleyiş şeması (Kwon ve Bakhoun 2019).

Sitozolik ortama giren DNA molekülü ilk olarak cGAS enzimi tarafından tanınır. DNA ile birleşmesi üzerine dimerize olan cGAS enzimleri, cGAMP sinyal moleküllerinin üretimini gerçekleştirir. ER'de lokalize halde bulunan STING proteinini cGAMP'lerce uyarılarak golgiye geçiş yapar. Burada kendisine bağlanan TBK1'ler aracılığıyla IRF3 transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunu gerçekleştirir. Dimerize olan IRF3'ler çekirdeğe geçerek gen anlatımını etkiler (Kwon ve Bakhoun 2019).

Bir nükleotidil transferaz enzimi olan cGAS B-tipi çift zincirli DNA molekülüne bağlanarak aktif forma geçer. Şekil 2.1'de gösterildiği üzere cGAS'ın aktif forma geçmesine sebep olan DNA molekülleri hücreye dışarıdan, DNA virüsleri veya hücre-dışı veziküller aracılığıyla aktarılabilir gibi hücrenin çekirdeğinden sitozele sızan

kendi DNA'sı da cGAS'in uyarılmasına sebep olabilir. Aktif cGAS enzimi substratları olan GTP ve ATP moleküllerini kullanarak cGAMP moleküllerinin sentezini gerçekleştirir (Wan ve ark. 2020). cGAMP sinyal molekülleri, ER'de bulunan STING proteinine bağlanarak, STING'in aktivasyonunu sağlar. Aktive olan STING, ER'den golgiye transloke olur. Golgi üzerindeki STING'e, TBK1 veya IKK kinazları bağlanarak STING'i fosforile eder. STING üzerindeki TBK1, IRF3 transkripsiyon faktörünü fosforile ederek aktive ederek dimerizasyonuna sebep olur. Diğer yandan IKK, NF-kB inhibitörünü (I κ Ba) fosforile ederek bu inhibitörün ubiquitinasyonuna neden olur. Ubikütillenen I κ Ba proteozomlarca parçalanmasıyla, NF-kB transkripsiyon faktörü inhibisyonundan kurtularak serbest kalır. Aktive olan IRF3 dimerleri ve NF-kB çekirdeğe geçerek tip I interferonların promotor bölgelerine bağlanır ve bu genlerin anlatımını tetikler (Zitvogel 2015). Tip I interferonlar, antiviral etkili genlerin anlatımını artırır. Ayrıca doğal öldürücü hücreler ve T lenfositler gibi bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu sağlayarak adaptif ve doğal bağışıklık sisteminin etkinliğini sağlar (Wang ve ark. 2017).

2.2.1. Kanser ve cGAS – STING Yolağı İlişkisi

Tümör hücreleri sağlıklı hücrelerin aksine yoğun miktarda sitozolik DNA'ya sahiptir. Bu durumun temel sebebi kanserlerde gözlenen genomik stabilitenin kaybıdır. Kontrolsüz bölünme döngüsü ve artmış metabolik faaliyet hücrenin çekirdeğinden sitozole DNA geçişine sebep olur. Kromozomların ayrılması sırasında meydana gelen hatalar, içinde DNA barındıran mikronükleer yapıları oluşturur. Oldukça hassas olan bu yapılarda meydana gelen yırtılmalar DNA'yı sitozole taşır. Kanserlerde gözlenen artmış sitozolik DNA'nın bir diğer kaynağı da mitokondriyal DNA (mtDNA)'dır. Tümör hücrelerindeki yüksek metabolik aktiviteden dolayı oluşan oksidatif stres mitokondrilerden sitozole DNA geçişine sebep olmaktadır (Asada ve ark. 2018).

Tümör hücrelerinde gözlenen sitozolik DNA ve kromatin parçacıkları, cGAS – STING yolağını aktivasyonunu tetikler (Asada ve ark. 2019). Ayrıca, dentritik hücreler gibi fagositotik hücrelerce yutularak sitoplazmaya alınan tümör hücrelerine ait DNA'nın bir kısmı sitozole geçerek cGAS'in uyarılmasını sağlayabilir (Wang ve ark. 2017). STING aktivasyonu ile stimüle olan tip I interferon üretimi ve hücre yaşlanma ilişkili fenotip (SASP) faktörlerinin salınımı tümör gelişiminin baskılanmasında etkilidir (Yang

ve ark. 2017). Tip I interferonlar tümör hücrelerinin immünojenitesini arttırarak, bu hücrelerin bağışıklık hücreleri tarafından tespitini kolaylaştırır. STING aktivasyonu sonucu artan sitokin salınımı, tümör mikroçevresine daha çok sayıda bağışıklık hücresinin girmesini sağlayarak tümör gelişimini yavaşlatıcı etki gösterir (Schadt ve ark. 2019). cGAS – STING yolağında görevli protein ve genlerin çeşitli kanserlerde baskılandığı ve bu durumun hücrelerin tümör baskılama kapasitelerini azalttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Xia ve ark. 2016; Yang ve ark. 2016; Song ve ark. 2017).

2.3. Miyeloproliferatif Neoplaziler

Miyeloproliferatif neoplaziler (MPN), kan hücrelerinin üretiminden sorumlu hemopoetik kök hücrelerde meydana gelen mutasyonlar sonucu hematopoez dengesinin bozulmasıyla ortaya çıkan kan hastalıklarıdır. Mutasyonlar sonucu, kan hücrelerinin üretimini kontrol eden hücreyel yolaklar dış sinyallerden bağımsız olarak sürekli aktif hale geçer. Bu durum olgunlaşmış kan hücreleri olan lenfosit, eritrosit ve plateletlerin bir ya da birkaçının aşırı üretimine sebep olur (Tremblay ve ark. 2021).

MPN'lerin sınıflandırılmasında kullanılan temel ayrımlardan biri Philadelphiya kromozomunun (Ph) bulunma durumudur. 9. ve 22. kromozomlar arasında gerçekleşen t(9;22)(q34;q11) translokasyonu sonucu oluşan hibrit Philedelphiya kromozomunu varlığında gelişen MPN'ler Ph-pozitif olarak sınıflandırılır. Kronik miyeloid lösemi (KML) Ph-pozitif bir MPN'dir (Van Etten ve ark. 2011). Ph kromozomu üzerindeki BCR-ABL1 füzyon geni KML hastalığının temel moleküler belirteçidir (Ross ve Mgbemena 2014). Ph-negatif MPN'ler olarak sınıflandırılan üç temel hastalık bulunmaktadır. Bunlar polisitemia vera (PV), esansiyel trombositemi (ET) ve miyelofibroz (MF)'dur (Nangali ve Green 2017). PV, eritrositlerin aşırı bir şekilde üretilmesiyle karakterize olan bir hastalıktır. Buna bağlı olarak kanda artmış hematokrit oranı ve yüksek hemoglobin konsantrasyonu gözlenir. ET'lerde, kan pıhtılaşmasında görevli trombosit hücreleri ve megakaryositlerin aşırı üretimi söz konusudur. MF'lerde, kemik iliğinin fibrotik bir yapıya bürünmesi ile beraber anormal megakaryosit ve granülositlerin üretimi gözlenir (Viny ve Levine 2014).

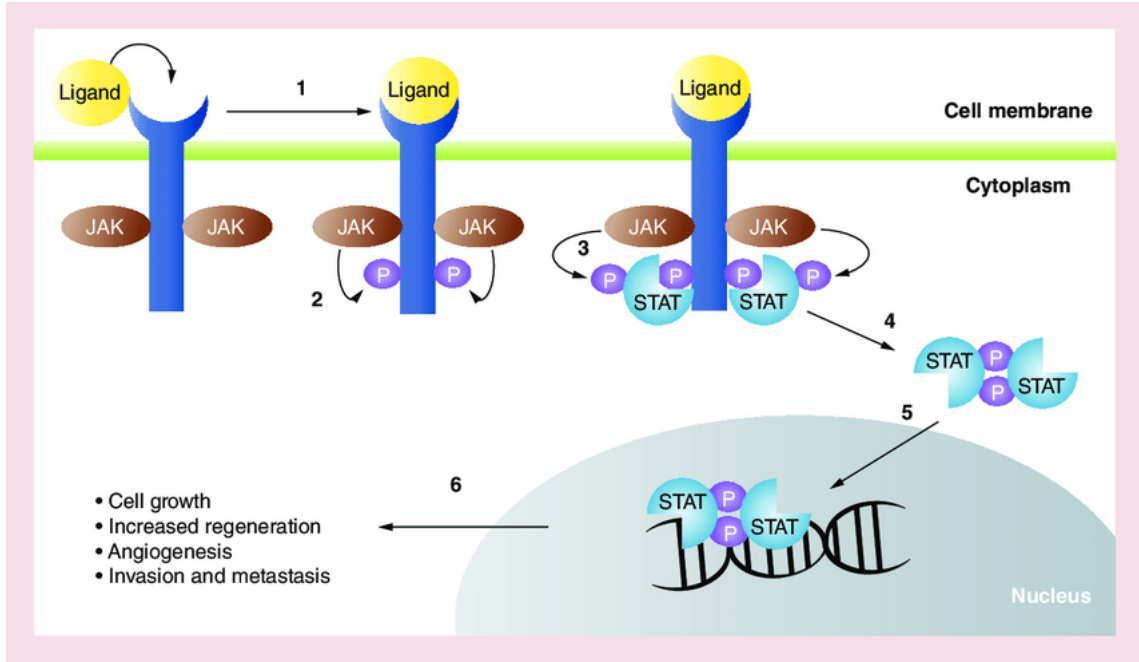
Kemik iliğindeki hemopoetik kök hücrelerde gerçekleşen somatik mutasyonlar MPN'lerin ortaya çıkmasına sebep olur. Ph-negatif MPN'ler karşılaşılan başlıca mutasyonlar *JAK2*, *CALR* ve *MPL* genlerinde gözlenen mutasyonlardır. Karşılaşılan mutasyonları sıklığı farklı tip MPN'lerde değişiklik gösterir. MPN ilişkili

mutasyonlardan en sık karşılaşılanı olan JAK2V617F mutasyonu PV'lerin %95'inde, ET ve MF'lerin ise yaklaşık olarak yarısında gözlenmektedir. Mutasyon sonucu JAK2-STAT yolu sürekli aktif hale gelerek kontrolsüz hücre bölünmesini tetikler (Viny ve Levine 2014). JAK2V617F negatif PV'lerde nadir olarak *JAK2* geninde ekzon 12 mutasyonları gözlenir. ET'lerin, % 50 – 60 'ında JAK2V617F, %30'unda *CALR* ve yaklaşık % 5'inde *MPL* geni mutasyonları görülür. MF'de ise *JAK2* ve *CALR* oranları ET'lerle benzer olup *MPL* geni mutasyonları %8 olarak gözlenir (Grabek ve ark. 2020).

2.3.1. JAK – STAT Yolu

JAK – STAT yolu, hücrenin sitokinler ve büyüme faktörlerini gibi sinyallerin alınmasında ve iletilmesinde sorumlu bir sinyal ileti yoluudur. Hücre bölünmesi, farklılaşma, migrasyon ve apoptoz gibi pekçok önemli hücresel yanıtın oluşumunda rol oynamaktadır (Harrison 2012).

Janus kinaz (JAK) ailesi sitokin aracılı sinyallerin iletiminde görevli reseptör olmayan tirozin kinazlardır. Memelilerde JAK ailesi, JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2 olmak üzere dört adet üyeden oluşur. Sitokin reseptörlerinin sitozolik kısımlarında lokalize olan JAK proteinleri, amino uçlarında bulunan FERM alanları aracılığıyla reseptöre bağlanır. Sitokine reseptörüne ligandın bağlanması durumunda aktive olan JAK'lar, reseptörü fosforile ederek diğer sinyal moleküllerinin reseptöre bağlanması için uygun ortamı oluşturur (Yamaoka ve ark. 2004).



Şekil 2-2: JAK-STAT yolağının çalışma mekanizması (Hin Tang ve ark. 2020)

Ligandın reseptöre bağlanması üzerine aktive olan JAK'lar reseptörü fosforile ederek STAT proteinlerinin bağlanmasını sağlar. Reseptöre bağlanan STAT proteinleri JAK'larca fosforile edilmeleri sonucu dimer oluşturarak çekirdeğe geçiş yapar (Hin Tang ve ark. 2020)

Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) ailesi sitokin sinyal yolaklarında görevli sitozolik transkripsiyon faktörleri olan proteinlerdir. Memelilerde STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b ve 6 olmak üzere yedi adettirler. İnterferon ve interlökin gibi sitokinler, büyüme faktörleri ve hormonlar tarafından çeşitli yolaklar üzerinden aktive edilebilirler (Lim ve Cao 2006)

İnterferonlar, JAK-STAT yolağını aktive eden sitokinlerdendir. Doğal bağışılık sisteminin viral enfeksiyonlara karşı cevap oluşturmasında görev alır. Tip I ve tip II olmak üzere iki temel sınıfa ayrılan interferonların pek çok alt tipi mevcuttur (Majoros ve ark. 2017). Hücre yüzeyinde bulunan interferon reseptörleri (IFNAR) aracılığıyla hücrelerin uyarılmasını sağlarlar. IFNAR'lara bağlanan interferonlar, reseptörlere bağlı bulunan JAK'ların otofosforilasyonunu tetikleyerek JAK-STAT sinyal yolağını uyarılmasını sağlar (Platanias 2005).

Hücre bölünmesi, farklılaşması ve apoptoz gibi hücre için hayati önem taşıyan olayları kontrol etmesi sebebiyle JAK – STAT yolağında karşılaşılan bozulmalar kanser oluşumunu tetiklemeye meyillidir. Yolağın sürekli aktivasyonuna sebep olacak sitokin

üretimindeki bozulmalar, yolak üzerindeki genlerdeki mutasyonlar ve STAT'ları aktive edebilecek diğer onkogenlerdeki mutasyonlar hücre döngüsünün regülasyonunu bozarak tümör gelişimine sebep olabilir. Özellikle JAK kinazlarında görülen aktive edici mutasyonlar hematolojik malignitelerle ilişkilidir (O'shea ve ark. 2015).

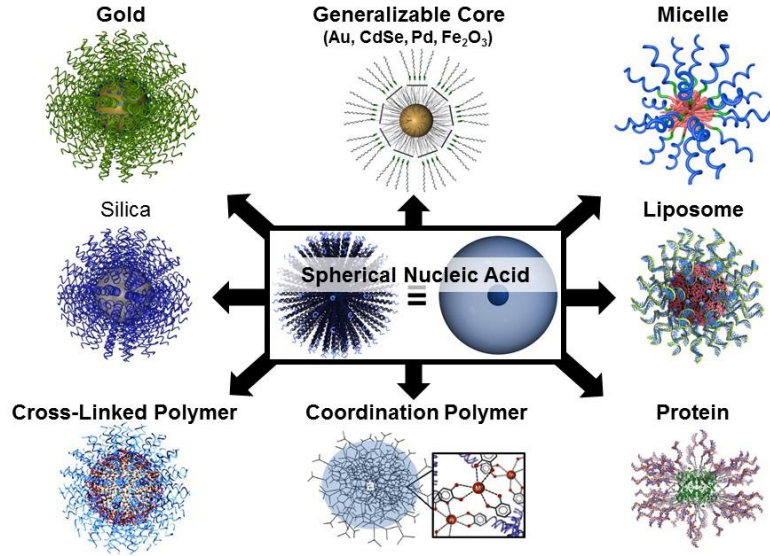
JAK2 geninde ortaya çıkan JAK2V617F mutasyonu Ph-negatif miyeloproliferatif neoplaziler olan polisitemia vera (PV), esansiyel trombositemi (ET) ve miyelofibroz (MF) sıklıkla karşılaşılan bir mutasyondur. JAK2 proteinin otoregülatör görevi gören psödokinaz JH2 alanı ligand bağlı olmadığı durumlarda kinaz özelliğine sahip JH1 alanı ile etkileşerek aktivitesini durdurur. Mutasyon sonucu JAK2 geninin 14. ekzonunda bulunan 1849. nükleotid olan guanin nükleotidinin timine dönüşmesi, 617. aminoasit olan valinin, fenilalanine dönüşmesine sebep olur (Maddali ve ark. 2020). Bu dönüşüm JH2 alanının otoinhibitör etkisini ortadan kaldırır. Bu durumdan dolayı JAK2 proteini ligand bağlanmasından bağımsız olarak sitokin reseptörünü fosforile eder ve yolağın alt kademelerine sinyallerin gönderilmesine sebep olur (McLornan ve ark. 2006).

JAK2'nin sürekli aktif hale gelmesi STAT sinyal iletili proteinlerinin fosforilasyonuna ve bu yolla hücreye sürekli olarak bölünme sinyallerinin gönderilmesine sebep olur. Bu durum hematopoetik kök hücrelerini, eritropoetin ve trombopoetin gibi büyüme faktörlerinden bağımsız olarak yeni kan hücreleri üretir hale getirir. Hızlı ve kontrolsüz bir şekilde gerçekleşen hücre bölünmesi genom bütünlüğünün bozulmasına sebep olur (Scott ve Rebel 2012). Kromozomların anafaz evresinde ayrılmada gecikmesi bölünme sonrası mikronükleus yapılarının oluşmasına sebep olur (Luzhna ve ark. 2013). Bu yapıların yırtılmasıyla sitozole geçen DNA molekülleri, hücre tarafından çeşitli mekanizmalarla tehdit sinyali olarak algılanarak inflamasyonun tetiklenmesine sebep olabilir. Bir diğer yandan hücrelerde gözlenen artmış metabolik aktivite, genomda çift zincir kırıklarına sebep olabilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasına sebebiyet verir. DNA hasarının onarılmaması genomda yeni mutasyonların oluşmasına neden olarak neoplastik gelişimi hızlandırır (Scott ve Rebel 2012).

2.4. Küresel Nükleik Asit Teknolojisi

Yaşamın temel molekülleri olan nükleik asitlerin, kanser ve çeşitli genetik bozuklukların tedavisinde kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Gen anlatımını transkripsiyonel ve translasyonel düzeyde etkileme potansiyeline sahip olan bu moleküller etkin tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde önemli role sahiptir (Kapadia ve ark. 2018). Ancak nükleik asitlerin tedavide kullanımını sınırlandıran bazı faktörler mevcuttur. Çevresel etkenlerden kolaylıkla etkilenebilen moleküller olan nükleik asitlerin, hücrelere etkinlikleri korunmuş bir halde aktarımı aşılması gereken bir engel olarak öne çıkmaktadır (Silva ve ark. 2015). Bu soruna karşı geliştirilen yöntemlerden biri de Chad Mirkin ve meslektaşları tarafından 1996 yılında geliştirilen küresel nükleik asitlerdir (Cutler ve ark. 2012).

Küresel nükleik asitler (SNA), bir çekirdek etrafında sıkı bir şekilde paketlenerek organize edilmiş oligonükleotit dizilerinden oluşan nano yapılarıdır. SNA'ların boyutları 5 – 45 nm civarından çeşitlilik gösterir. Temel olarak çekirdek ve nükleotit kısmı olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadırlar. SNA'larında merkezinde bulunan çekirdek, nükleotit dizilerinin tutunması için bir iskele görevi görür. Nükleotit dizilerinin nükleazlardan korunmasını sağlar (Cutler ve ark. 2012). Genellikle altın ve gümüş gibi soy metallerden üretilir. Metallerin yanı sıra lipid, protein ve sentetik polimerlerin kullanıldığı SNA'lar da mevcuttur (Li ve ark. 2018). SNA'ların nükleotit kısmında ise amaçlanan hedefler doğrultusunda biyolojik aktivite gösterecek şekilde dizayn edilmiş tek veya çift zincirli nükleotit dizileri bulunmaktadır (Cutler ve ark. 2012).



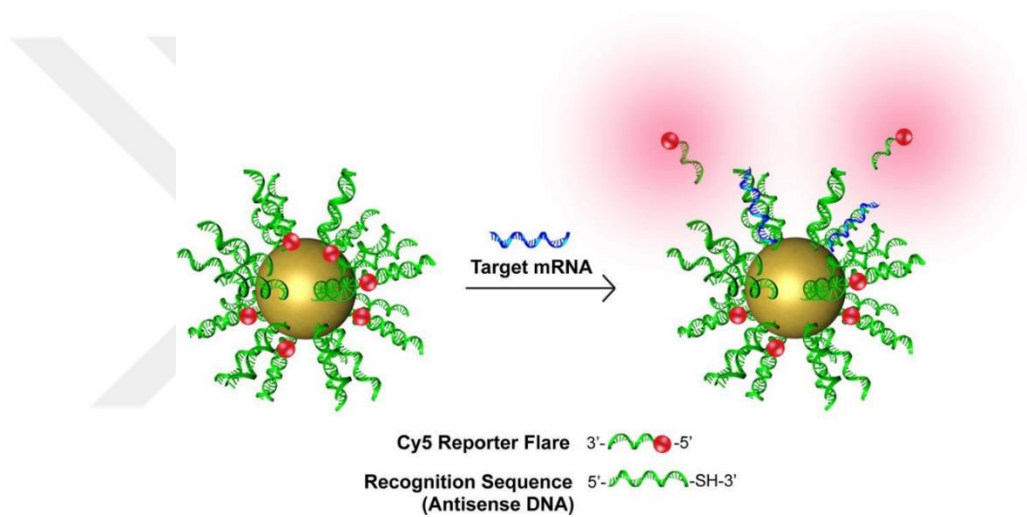
Şekil 2-3 Çeşitli küresel nükleik asit yapıları (Barnaby ve ark. 2015)

Hücre zarı ve biyolojik bariyerleri geçebilme özelliğine sahip olan SNA'lar, gen anlatım çalışmaları, ilaç moleküllerinin aktarımı ve gen terapisi gibi pekçok alanda kullanılmaktadır (Barnaby ve ark. 2015). Doğada bulunan nükleik asit formlarının aksine sahip oldukları üç boyutlu yapı, SNA'lara artmış stabilite ve hücre içine aktarım kolaylığı sağlamaktadır (Cutler ve ark. 2012). Endositoz ile hücre içine alınan SNA'lar, bu özellikleri sayesinde hücrelerin transfekte edilmesi aşamasında yardımcı bir vektör kullanılması zorunluluğunu ortadan kaldırmaktadır (Li ve ark. 2018). Kan-beyin ve kan-tümör gibi biyolojik bariyerlerden geçebilen SNA'lar ilaç moleküllerinin vücudun çeşitli noktalarına taşınmasına olanak verir. Yüksek geçirgenliği, toksik nitelik taşımaması ve immün reaksiyon tetiklememesi SNA'ları etkili bir ilaç taşıma aracı yapmaktadır (Barnaby ve ark. 2015).

Negatif yüklü yapılar olmalarına rağmen hücre zarından kolayca geçebilme özelliğine sahip olan SNA'lar, hücre zarında bulunan A sınıfı scavenger reseptörlerine bağlanarak endositoz yoluyla hücre içine girmektedir. SNA'ların endositozu, hücre zarı üzerindeki lipit raftları adı verilen özelleşmiş bölgelerden gerçekleşmektedir. Endositotik yollarda görevli hücre zarı proteinleri olan caveolinler SNA endositozunda rol oynamaktadır (Choi ve ark. 2013).

2.4.1. RNA-Hedefli Küresel Nükleik Asit Partikülleri: Nanoflare

Nanoflare, sitoplazmada bulunan belirli bir mRNA'yı tespit etmeye olanak sağlayan bir küresel nükleik asittir. Üzerinde bulunan tanımlayıcı nükleotit zincirleri, tespit edilmek istenilen mRNA zinciri ile eşleştiğinde Nanoflare'in yapısında bulunan floresan molekülleri serbest kalarak ışıma yapar. Bu sinyal floresan mikroskobu ve akım sitometri gibi yöntemler ile takip edilerek mRNA'nın hücre içindeki varlığı tespit edilir. Hücrelerin lize edilmesinin gerektiği mRNA tespit yöntemlerinin aksine Nanoflare'ler ile yapılan çalışmalarda hücrelerin canlılığı korunur (Seferos ve ark. 2007).



Şekil 2-4: Nanoflare çalışma prensibi (Seferos ve ark. 2007)

Florasın molekölünü taşıyan mesajcı dizi, tanıma dizisine mRNA'nın bağlanması durumunda ayrılarak ışıma oluşmasını sağlar (Seferos ve ark. 2007).

Nanoflare partiküllerinin boyutları yaklaşık 13 nm'dir. Bir partikül üzerinde yaklaşık 150 – 200 nükleotit zinciri taşıyabilir. Tanımlayıcı nükleotit zincirlerinin uzunlukları 18 – 20 baz çifti kadardır. Bu uzun zincirlere, komplementer kısa mesajcı diziler bağlı olarak durur. Florasın molekülleri, ortamda hedef mRNA molekölü olmadığı durumda altın çekirdeğe yakın konumda bulunurlar. Altın çekirdek, floresan moleküllerini sönümleyerek sinyal oluşumunu engeller. Altın elementinin sönümleyici etkisi standart olarak kullanılan floresan sönümleyici moleküllere göre yüksek olduğundan, Nanoflare'ler daha düşük oran yanlış pozitif sonuç vermektedir (Seferos ve ark. 2007).

Nanoflare'ler etkinliklerini gösterebilmeleri için sitozole geçmelidir. Endositoz ile hücre içine alınan Nanoflare'ler ilk olarak erken endozomların içinde lokalize olur. Nanoflare'lerin endozomdan kaçışı, endozomun olgunlaşması sürecinde meydana gelen yırtılmalar sonucu gerçekleşir. Endozomdan sızarak etkinlik gösterebilen Nanoflare'ler, başlangıçta uygulanan miktarın düşük bir kısmını oluşturur (Wu ve ark. 2014)

2.4.2. Küresel Nükleik Asitlerin Kansere ve Gen Anlatım Çalışmalarında Kullanımı

Küresel nükleik asitlerin ve altın partiküllerin kanser belirteçlerinin tespitinde kullanılması giderek yaygınlaşan bir strateji olarak öne çıkmaktadır. Nanoflareler kanserli hücelere has moleküler belirteçler ile eşleşerek florasan bazlı yöntemler ile bu hücelerin tespitine olanak sağlamaktadır. Sözer ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada miyeloproliferatif neoplazilerin belirteci olan mutant JAK2V617F ve yabancı JAK2 mRNA'sına özgü Nanoflareler kullanılarak kanserli hücelerin tespiti akım ölçer cihazıyla yapılmıştır. Pan ve ark. (2013) TK1, survivin, c-myc and GalNAc-T olmak üzere dört farklı gene özgü dizileri taşıyan Nanoflare partiküllerini kullanarak bu dört genin kanserli hücelerdeki mRNA oranlarını florasan bazlı metotlar ile tespit etmiştir. Altın Nanoflare partiküllerinin kullanıldığı tedavi çalışmaları da mevcuttur. Chenab ve ark. (2019) yaptığı çalışmada mitoksantron ve doksorubisin ilaç molekülleri Nanoflareler aracılığıyla kanserli hücelere aktarımı yapılmıştır.

Küresel nükleik asitler, gen anlatımının düzenlenmesinde kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Sun ve ark. (2019) yaptığı çalışmada, yalnızca kanser hücelerde üretilen ve telomeraz aktivitesini arttırarak tümör gelişimini hızlandıran hTERT enziminin mRNA'sının bloklanmasında SNA'lar kullanılmıştır. hTERT'in bloklanmasıyla sağlanan telomeraz inhibisyonu kanserli hücelerin gelişimini baskıladığı gösterilmiştir. Holmes ve ark. (2020) yaptığı çalışmada SNA'lar cilt çeşitli cilt hastalıklarının tedavisi amacıyla kullanılmıştır. Sedef hastalığıyla ilişkili TNF-alfa ve interlekin-17A reseptörlerine spesifik SNA'lar kullanılarak fare modellerinde bu proteinlerin anlatımının azaltılması sağlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hücre Hatları

Çalışmada kullanılan hücre hatları ve özellikler Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3-1: Kullanılan hücre hatları ve özellikleri.

Hücre Hattı	Organizma	Hücre Tipi	Hastalık	JAK2
HEL	<i>Homo Sapiens</i>	Eritroblast	Eritrolösemi	JAK2V617F (+) Biallelik
SET2	<i>Homo Sapiens</i>	Megakaryoblast	Megakaryoblastic Lösemi	JAK2V617F (+) Monoallelik
K562	<i>Homo Sapiens</i>	Lenfoblast	Kronik Miyeloid Lösemi	JAK2 Yabanıl Tip

3.1.2. RNA Hedefli Altın Nanopartiküller

Çalışmada kullanılan RNA hedefli nanopartiküller ticari olarak satın alınmıştır. İki çeşit partikül kullanılmış olup özellikleri aşağıdaki gibidir.

1. Yabani tip JAK2 mRNA’sı Hedefli Cy5 Boyasıyla Konjuge Nanoflare
2. Mutant tip JAK2V617F mRNA’sı Hedefli Cy3 Boyasıyla Konjuge Nanoflare

3.1.3. Kullanılan Kitler

Çalışmada kullanılan hücre hatları ve özellikler Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3-2: Kullanılan kitler

SCRIPT cDNA Synthesis Kit (Jenna Bioscience)
qPCR SybrMaster (Jenna Bioscience)
Total RNA Purification Kit (Jenna Bioscience)

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada kullanılan hücre hatları ve özellikler Tablo 3.3’de gösterilmiştir.

Tablo 3-3: Kullanılan Cihazlar

Microfuge 16 Centrifuge (Beckman - Coulter)
Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Beckman - Coulter)
Allegra X-15R Centrifuge (Beckman - Coulter)
Light Cycler 480 (Roche)
T100 Thermal Cycler (Bio-rad)

3.1.5. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan hücre hatları ve özellikler Tablo 3.4’de gösterilmiştir.

Tablo 3-4: Kullanılan kimsayal maddeler

IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (Gibco)
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute1640 Medium) (Gibco)
Etil alkol
İzopropanol
PBS (Fosfat Tampon Çözeltisi) (HyClone)
FBS (Fetal Bovine Serum) (HyClone)
DMSO (Dimetil Sülfoksit)
Penisilin/Streptomisin

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Hatlarının Kültürü

Çalışmanın ilerdeki adımları için gerekli olan sayıda canlı hücre elde etmek üzere SET2, HEL ve K562 hücre hatları kültür edilerek çoğaltıldı. Hücre kültürü çalışmalarının tümü Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirildi.

3.2.1.1. Hücre Hatlarının Eritilmesi

Sıvı azot tankında -196°C sıcaklıkta, %10 DMSO içeren dondurma medyası içinde muhafaza edilen hücre hatları eritilerek kültüre başlandı. Eritme aşamasında hücreleri DMSO’nun toksik etkisiden korumak ve ısı stresinden kaynaklı hücre kaybını

en aza indirmek için eritme prosedürünün adımları hızlı bir şekilde gerçekleştirildi. Eritme aşamasında aşağıdaki adımlar izlendi.

- 1) 2 mL'lik cyro tüpler içindeki hücreler 37°C'deki su banyosunda hızlı bir şekilde eritilir.
- 2) Eriyen DMSO'lu dondurma medyası içindeki hücreler 15 mL'lik santrifüj tüpüne aktarılır.
- 3) Hücrelerin üzerine önceden 37 °C'de bekletilmiş 5 mL besi yeri damla damla eklenir. Ekleme sırasında tüp hafifçe sallanarak hücrelerin homojen bir şekilde dağılması sağlanır.
- 4) Tüp 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlanır.
- 5) Üst sıvı atılır.
- 6) Tüpün dibinde kalan pellet ikinci yıkama aşaması için 5 mL besi yerinde tekrardan süspense edilir. 4. ve 5. Adımlar tekrar edilir.
- 7) Pellet yeterli miktarda besi yeri ile süspense edilir.
- 8) Hücreler 6-kuyulu plaklara ekilir.

3.2.1.2. Hücre Hatlarının Büyütülmesi

Hücrelerin büyüme ve canlılıkları günlük olarak ışık mikroskopuyla kontrol edildi. Her 48 saatlik periyotlarda besi yeri değişimi yapıldı. Hücreler 37°C'de %5 CO₂ koşullarında inkübe edildi. Her hücre hattı için kullanılan besi yeri içerikleri Tablo 3.3'de gösterilmiştir.

Tablo 3-5: Hücre hatlarının kültüründe kullanılan besiyeri içerikleri

	SET2	K562	HEL
Kültür Medyası	RPMI-1640	IMDM	RPMI-1640
FBS	%20	%10	%10
Penisilin+Streptomisin	%1	%1	%1

3.2.1.3. Hücre Sayımı

Hücre kültürü çalışmalarında ve deneylerde hücre sayımı işlemi hemositometre aletiyle gerçekleştirildi. Hemositometre ile hücre sayımında aşağıdaki adımlar izlendi.

- 1) Sayımı yapılacak hücre süspansiyonundan alınan 10 µL örnek, besiyeri veya PBS ile %1 oranında seyreltilir.
- 2) Seyreltilen örnek 1:1 oranında olacak şekilde trypan mavisini ile karıştırılarak boyama yapılır.
- 3) Örnek – boya karışımından 10 µL alınarak hemositometreye yüklenir.
- 4) Işık mikroskobu altında sayım yapılır. Trypan mavisini tarafından boyanan hücreler ölü olduğundan sayılmaz.
- 5) $(\text{Sayılan Hücre}/4) \times 2 \times 10^2 \times 10^4$ formülü kullanılarak 1 mL’lik hacimde bulunan hücre sayısı belirlenir.
- 6) Hesaplanan değer sayım yapılan hücre süspansiyonunun hacmi ile çarpılarak toplam hücre sayısı belirlenir.

3.2.2. Altın Nanopartikül Uygulamaları

Üç farklı tip altın nanopartikülü hücreler üzerinde test edildi. Bu amaçla hücreler, 30 dakika, 1, 1.5, 2, 24, 48 ve 72 saat olmak üzere farklı zaman aralıklarında partiküllere maruz bırakıldı. Hücrelerin partiküller ile muamelesinde aşağıdaki adımlar izlendi.

- 1) 24-kuyulu kültür plaklarında her kuyu için 300.000 hücre 500 µL besiyeri içinde ekildi. Her koşul için 3 kuyu hazırlandı.
- 2) JAK2-WT Cy5, JAK2V617F Cy3 ve Scramble nanopartiküller 200 pM konsantrasyonda uygulandı. Bunun için 100 nM konsantrasyondaki ana stok 1:20 oranında PBS ile seyreltilerek 5 nM’a düşürüldü.
- 3) 500 µL besiyeri içindeki hücrelere 5 nM’lık nanopartikül çözeltisinden 20 µL eklenerek 200 pM partikül konsantrasyonu sağlandı.

- 4) Kùltür plakları 37 °C’de % 5 CO₂ ortamında belirtilen sürelerde inkübe edildi.
- 5) İnkübasyon sonunda kuyulardaki hücreler 1.5 mL’lik tüplerde toplandı.
- 6) Hücreler 2500 rpm’da 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Üst sıvı atıldı.

Pellet olarak toplanan hücreler RNA izolasyonunda kullanıldı.

3.2.3. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için Jenna Bioscience Total RNA Purification Kit kullanıldı. İzolasyon kitin kendi prosedüründeki adımlar takip edilerek gerçekleştirildi.

- 1) 1,5 mL’lik eppendorf tüpü içinde pellet halinde bulunan hücrelerin üzerine 500 µL lysis buffer eklendi. Vorteks cihazıyla 10 saniye boyunca karıştırıldı.
- 2) 300 µL isopropanol hücrelere eklendi. Vorteks cihazıyla 10 saniye boyunca karıştırıldı.
- 3) Örnek sayısı kadar toplama tüpünün üzerine izolasyon kolonları yerleştirildi.
- 4) 100 µL kolon aktivasyon solüsyonu kolonlara eklendi.
- 5) Kolonlar 10.000 g’de 30 saniye santrifüj edildi. Alt tüpte toplanan sıvı atıldı.
- 6) Hücre lizatları kolonlara eklendi.
- 7) Kolonlar 10.000 g’de 30 saniye santrifüj edildi. Alt tüpte toplanan sıvı atıldı.
- 8) 700 µL birinci yıkama solüsyonu kolonlara eklendi.
- 9) Kolonlar 10.000 g’de 30 saniye santrifüj edildi. Alt tüpte toplanan sıvı atıldı.
- 10) 700 µL ikinci yıkama solüsyonu kolonlara eklendi.
- 11) Kolonlar 10.000 g’de 30 saniye santrifüj edildi. Alt tüpte toplanan sıvı atıldı.
- 12) Kolonlar 10.000 g’de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Alt tüpte toplanan sıvı atıldı.
- 13) Kolonlar toplama tüplerinden alınarak 1,5 mL’lik eppendorflara yerleştirildi.
- 14) 40 µL elüsyon solüsyonu kolonlara eklenerek 1 dakika bekletildi.
- 15) Kolonlar 10.000 g’de 1 dakika santrifüj edilerek RNA alt kısımdaki eppendorflarda toplandı.

Elde edilen RNA’ların konsantrasyonu Thermo Scientific NanoDrop™ 2000 cihazıyla ölçüldü.

3.2.4. cDNA Sentezlenmesi

Elde edilen RNA'lar üzerinden cDNA sentezlendi. cDNA sentezi için başlangıç RNA miktarı 100 ng olarak belirlendi. cDNA sentezi Jenna Bioscience SCRIPT cDNA Synthesis Kit ile yapıldı. Sentez kitin kendi prosedüründeki adımlar takip edilerek gerçekleştirildi.

- 1) 100 ng RNA içeren hacimde RNA ekstratı, 10 μ L'de 2 μ M olacak şekilde oligo-(dT)20 ve 2 μ M random hexamer primerleri ile karıştırılır.
- 2) Tüpdeki karışımın son hacmi 10 μ L olacak kadar saf su eklenir.
- 3) Karışım thermocycler cihazında 70°C'de 5 dakika inkübe edilir.
- 4) İnkübasyon sırasında cDNA sentez karışımı hazırlanır. 20 μ L reaksiyon hacmi için, 1X SCRIPT RT buffer, 2 mM dNTP mix, 5 mM DTT Stock, 40 birim Rnase Inhibitor, 100 birim SCRIPT Reverse Transcriptase olacak şekilde hazırlanır. Hacim saf su ile 20 μ L'ye tamamlanır.
- 5) Hazırlanan karışım, RNA-primer karışımına eklenir.
- 6) Karışımlar Thermal Cycler cihazında Tablo 3.4'te gösterilen programda inkübe edilir.

Tablo 3-6: Thermal cycler cihazı cDNA sentez program ayarları

Aşama	Süre (dk)	Sıcaklık (°C)
Ön inkübasyon	10	42
Sentez	60	50
Ters Transkriptaz İnaktivasyonu	10	70

3.2.5. Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR (rt-qPCR)

SET2, HEL ve K562 hücre hatları JAK2-Cy5, JAK2V617F-Cy3 ve Scramble partikülleri olmak üzere üç farklı tip nanopartiküle çeşitli inkübasyon sürelerinde maruz bırakıldı. Tüm bu koşullar altında cGAS-STING yolağıyla ilişkili genlerin anlatımındaki değişimler gerçek zamanlı PZR analiz edildi. Çalışılan genler ve primer dizileri Tablo 3.7'de gösterilmiştir. Referans geni olarak *ACTB* geni kullanıldı.

Tablo 3-7: Test edilen genler ve gerçek zamanlı PZR analizinde kullanılan primer dizileri

Genler	Düz Zincir Primer Dizisi (5'-3')	Ters Zincir Primer Dizisi (5'-3')
<i>cGAS</i>	TAA CCC TGG CTT TGG AAT CAA AA	TGG GTA CAA GGT AAA ATG GCT TT
<i>STING</i>	GAG CAG GCC AAA CTC TTC TG	TGC CCA CAG TAA CCT CTT CC
<i>IRF3</i>	TCT GCC CTC AAC CGC AAA GAA G	TAC TGC CTC CAC CAT TGG TGT C
<i>NFKB1</i>	GCA GCA CTA CTT CTT GAC CAC C	TCT GCT CCT GAG CAT TGA CGT C
<i>TBK1</i>	CAA CCT GGA AGC GGC AGA GTT A	ACCTGGAGATAATCTGCTGTCGA
<i>TLR9</i>	TGAGCCACAACCTGCATCTCGA	CAGTCGTGGTAGCTCCGTGAAT
<i>STAT1</i>	ATGGCAGTCTGGCGGCTGAATT	CCAAACCAGGCTGGCACAATTG
<i>STAT2</i>	CAGGTCACAGAGTTGCTACAGC	CGGTGAACTTGCTGCCAGTCTT
<i>JAK2</i>	CCAGATGGAACTGTTCGCTCAG	GAGGTTGGTACATCAGAAACACC
<i>ACTB</i>	CCA ACC GCG AGA AGA TGA	CCA GAG GCG TAC AGG GAT AG

Gerçek zamanlı PZR analizi Jenna Bioscience qPCR SybrMaster kiti kullanıldı. Analizler Roche LightCycler 480 cihazıyla yapıldı. 96-kuyulu PZR plaklarına her kuyuya Tablo 3.6'da gösterilen miktarda malzemeler eklendi. 100 ng RNA ile hazırlanan cDNA'lar Rnaz içermeyen saf su ile 1:10 oranında seyreltilerek kullanıldı. Reaksiyon hacmi 10 µL olarak belirlendi.

Tablo 3-8: Gerçek zamanlı PZR malzemeleri ve miktarları

Malzemeler	Eklenen Hacim	Reaksiyon Konsantrasyonu
Sbyr Master Mix (2X)	5 µL	1X
Düz Zincir Primer (10 µM)	0,5 µL	500 nM
Ters Zincir Primer (10 µM)	0,5 µL	500 nM
cDNA (%10)	2 µL	-
Saf Su	2 µL	-

45 döngü olarak uygulanan PZR koşulları Tablo 3.9’de gösterilmiştir.

Tablo 3-9: LC480 qPZR program ayarları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)
Denatürasyon	95	10
Hibridizasyon	60	10
Uzama	72	10

3.2.6. Gerçek Zamanlı PZR Verilerinin Analizi

Gerçek zamanlı PZR analizlerinde her örnek ve koşul için iki eş kuyu hazırlanarak deneyler gerçekleştirildi. Eş kuyulardan elde edilen ct değerlerinin ortalaması alınarak hesaplamalar yapıldı. Ct değerlerindeki değişim (Δ ct), her bir genin ortalama ct değerinden aynı koşullardaki referans genin ortalama ct değeri çıkarılarak hesaplandı. Relatif gen anlatımının hesaplanmasında $\Delta\Delta$ ct metodundan yararlanıldı. Bunun için her bir gen için elde edilen Δ ct değerinden, o genin herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol grubu hücrelerindeki Δ ct değeri çıkarılarak $\Delta\Delta$ ct değeri hesaplandı. Elde edilen değerler ile $2^{(-\Delta\Delta\text{ct})}$ formülünden yararlanılarak gendeki değişimin kontrole göre kaç katında çıktığı hesaplandı.

Elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi aşamasında ANOVA metodu kullanılmıştır. İstatistiksel analizlerde p değeri %5 olarak baz alınmıştır. İstatistiksel analiz ve grafiklerin oluşturulmasında Prism GraphPad yazılımı kullanılmıştır.

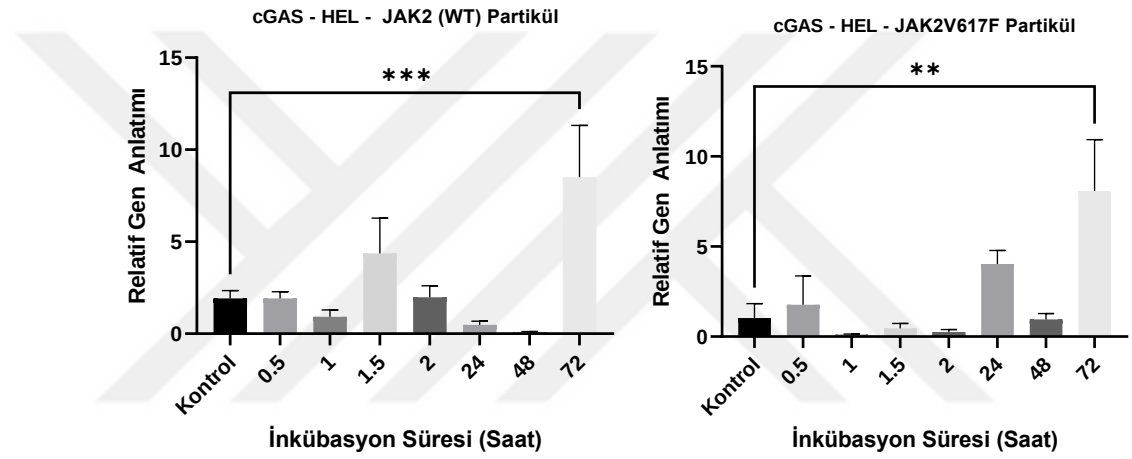


4. BULGULAR

4.1. Gen Anlatım Değişimlerinin Değerlendirilmesi

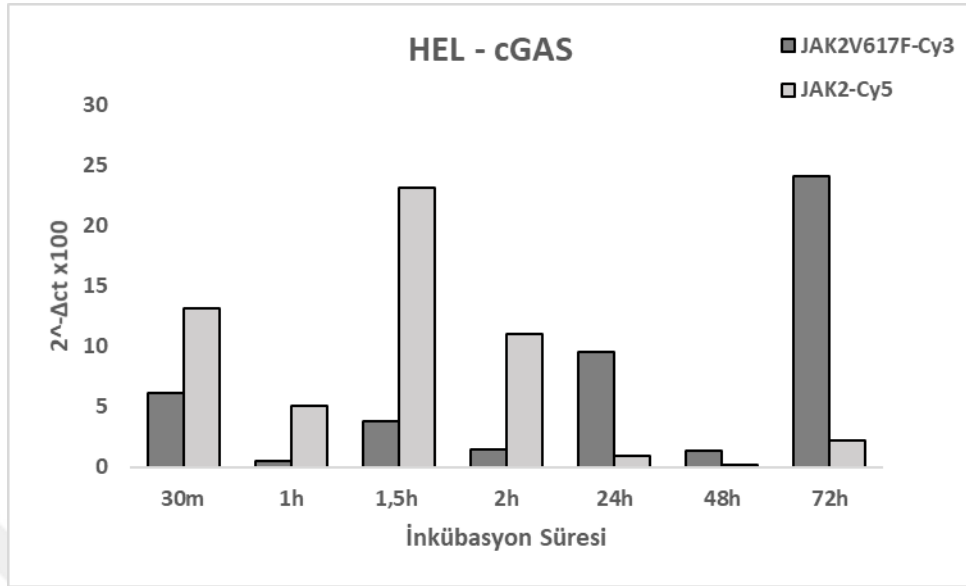
4.1.1. cGAS Geni Anlatımının Nanopartikül Uygulamasıyla Periyodik Değişimi

cGAS geni için gerçek zamanlı PZR sonuçları ve Ct değerlerindeki değişimler aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir. (Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6)



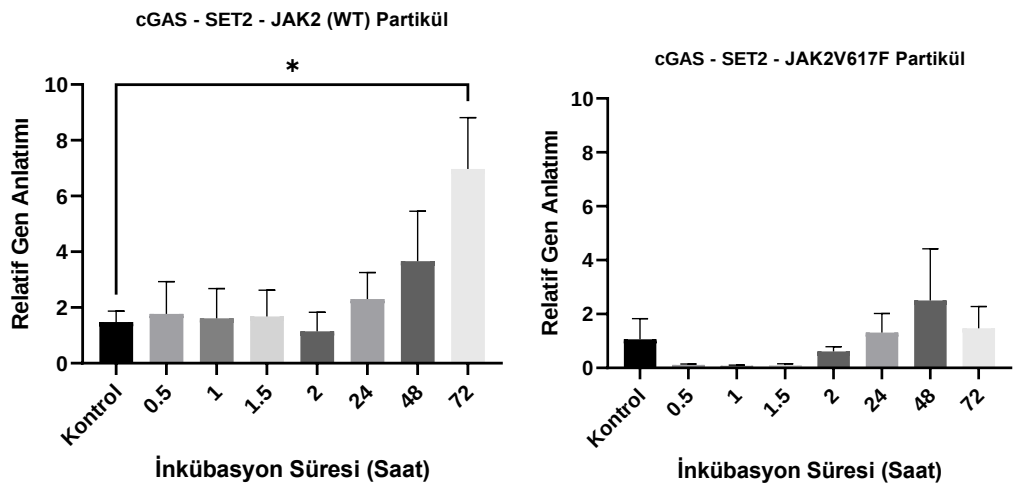
Şekil 4-1: HEL hücre hattında rölatif cGAS anlatımının değişimi

Şekil 4.1’de HEL hücre hattında cGAS geninin relatif gen anlatım değişimi gösterilmiştir. HEL hattı hücreleri JAK2V617F ve yabani tip JAK2 mRNA’larına spesifik nanopartiküllerle 0,5, 1, 1,5, 2, 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Her inkübasyon sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA’lardan elde edilen cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı PZR analizi yapılmıştır. Partiküllerle inkübe edilen hücrelerdeki anlatım değişimi herhangi bir işlem uygulanmamış kontrol grubu hücreleriyle kıyaslanmıştır. Relatif gen anlatımındaki değişim $\Delta\Delta Ct$ metoduyla hesaplanmıştır. İlk iki saatlik yapılan ölçümlerde gen anlatımının yarım saatlik dilimlerde değişkenlik gösterdiği görülmüştür. 72. Saatte her iki partikül için anlamlı artış gözlenmiştir.



Şekil 4-2: HEL hücre hattında *cGAS* geninin ΔC_t değeri değişimi

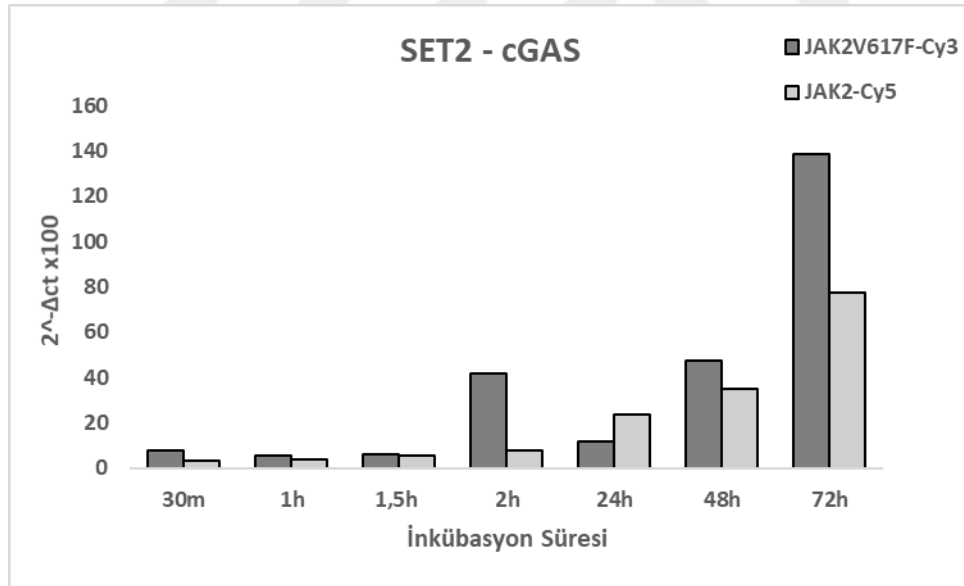
Şekil 4.2’de *cGAS* geninin HEL (JAK2V617F-Biallelik) hücre hattındaki ΔC_t değerlerindeki zamana göre değişimler gösterilmiştir. Şekilde gösterilen değerler *cGAS* geninin referans gen olarak kullanılan *ACTB* genine göre değişimini göstermektedir. Değerler her zaman dilimi için ölçülen *cGAS* geninin C_t değerinden *ACTB*’nin C_t değerlerinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır.



Şekil 4-3: SET2 hücre hattında relatif *cGAS* anlatımının değişimi

Şekil 4.3’de SET2 (JAK2V617F-Monoallelik) hücre hattında *cGAS* geninin relatif gen anlatım değişimi gösterilmiştir. SET2 hattı hücreleri JAK2V617F ve yabani tip JAK2 mRNA’larına spesifik nanopartiküllerle 0,5, 1, 1,5, 2, 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Her inkübasyon sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA’lardan elde edilen cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı PZR analizi yapılmıştır. Partiküllerle inkübe edilen hücrelerdeki anlatım değişimi herhangi bir işlem uygulanmamış kontrol grubu hücreleriyle kıyaslanmıştır. Relatif gen anlatımındaki değişim $\Delta\Delta Ct$ metoduyla hesaplanmıştır.

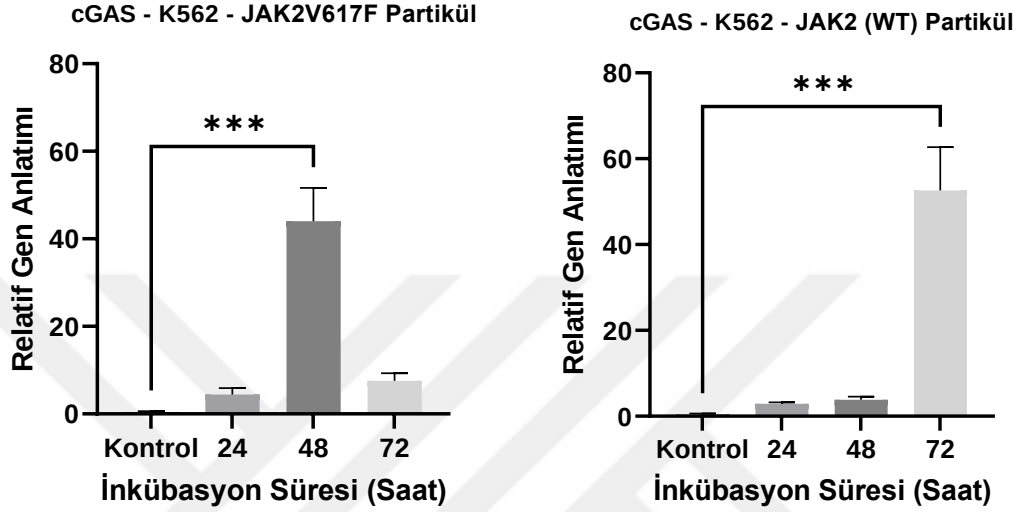
Şekil 4.3’de SET2 hücre hattında *cGAS* anlatımının ilk iki saatlik inkübasyonlarda önemli bir değişim gözlenmemiştir. 72. Saatte yabani tip JAK2 mRNA’sına özgü partikülle yapılan muamelede anlamlı artış gözlenmiştir.



Şekil 4-4: SET2 hücre hattında *cGAS* ΔCt değerleri değişimi

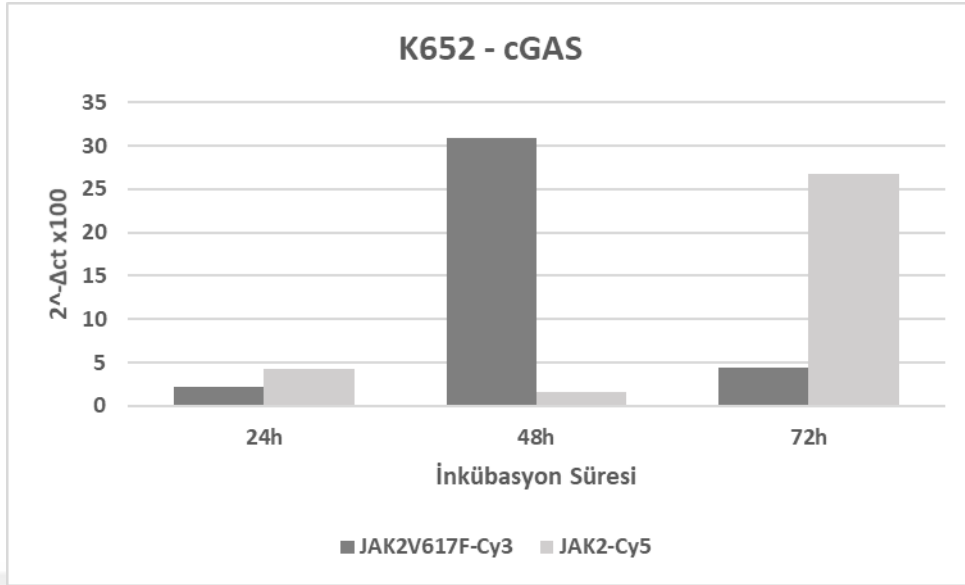
Şekil 4.4’de *cGAS* geninin SET2 (JAK2V617F-Monoallelik) hücre hattındaki ΔCt değerlerindeki zamana göre değişimler gösterilmiştir. Şekilde gösterilen değerler *cGAS* geninin referans gen olarak kullanılan *ACTB* genine göre değişimini

göstermektedir. Değerler her zaman dilimi için ölçülen *cGAS* geninin ct değerinden *ACTB*'nin ct değerlerinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. *cGAS* anlatımının SET2'de zamanlı azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 4-5: K562 hücre hattında *cGAS* anlatımının değişimi

Şekil 4.5’de K562 (JAK2V617F-Negatif) hücre hattında *cGAS* geninin relatif gen anlatım değişimi gösterilmiştir. SET2 hattı hücreleri JAK2V617F ve yabani tip JAK2 mRNA’larına spesifik nanopartiküllerle 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Her inkübasyon sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA’lardan elde edilen cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı PZR analizi yapılmıştır. Partiküllerle inkübe edilen hücrelerdeki anlatım değişimi herhangi bir işlem uygulanmamış kontrol grubu hücreleriyle kıyaslanmıştır. Relatif gen anlatımındaki değişim $\Delta\Delta\text{ct}$ metoduyla hesaplanmıştır. K562 hücrelerinde *cGAS* geninin anlatımında mutant partikül için 48. saatte, yabani tip için ise 72. saatte anlamlı artış gözlenmiştir.

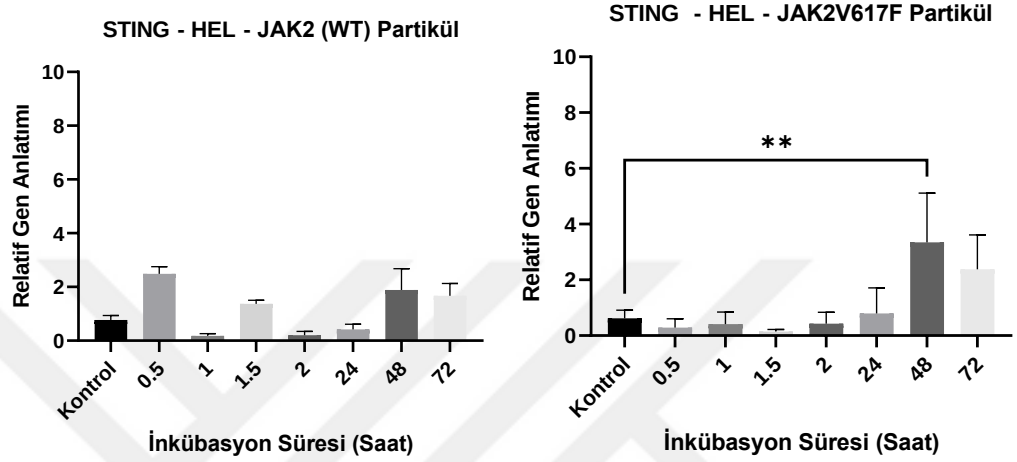


Şekil 4-6: K562 hücre hattında cGAS ΔC_t değeri değişimi

Şekil 4.6'de cGAS geninin K562 (JAK2V617F-Negatif) hücre hattındaki ΔC_t değerlerindeki zamana göre değişimler gösterilmiştir. Şekilde gösterilen değerler cGAS geninin referans gen olarak kullanılan ACTB genine göre değişimini göstermektedir. Değerler her zaman dilimi için ölçülen cGAS geninin ct değerinden ACTB'nin ct değerlerinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır.

4.1.2. *STING* Geni Anlatımının Partikül Uygulamasıyla Periyodik Değişimi

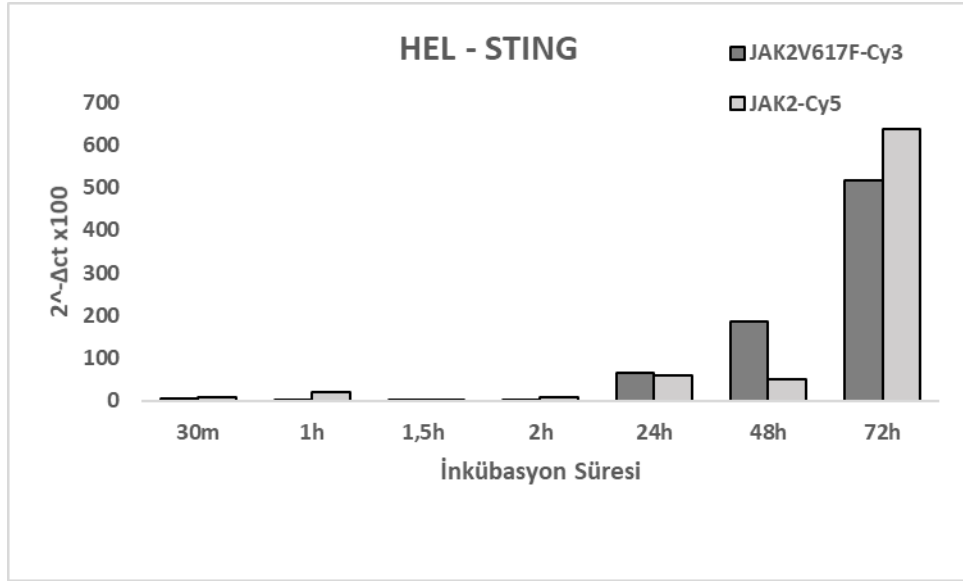
STING geni için gerçek zamanlı PZR sonuçları ve Ct değerlerindeki değişimler aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir. (Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12)



Şekil 4-7: HEL hücre hattında relatif *STING* anlatımının değişimi

Şekil 4.7’de HEL (JAK2V617F-Biallelik) hücre hattında *STING* geninin relatif gen anlatım değişimi gösterilmiştir. HEL hattı hücreleri JAK2V617F ve yabani tip JAK2 mRNA’larına spesifik nanopartiküllerle 0,5, 1, 1,5, 2, 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Her inkübasyon sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA’lardan elde edilen cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı PZR analizi yapılmıştır. Partiküllerle inkübe edilen hücrelerdeki anlatım değişimi herhangi bir işlem uygulanmamış kontrol grubu hücreleriyle kıyaslanmıştır. Relatif gen anlatımındaki değişim $\Delta\Delta\text{Ct}$ metoduyla hesaplanmıştır.

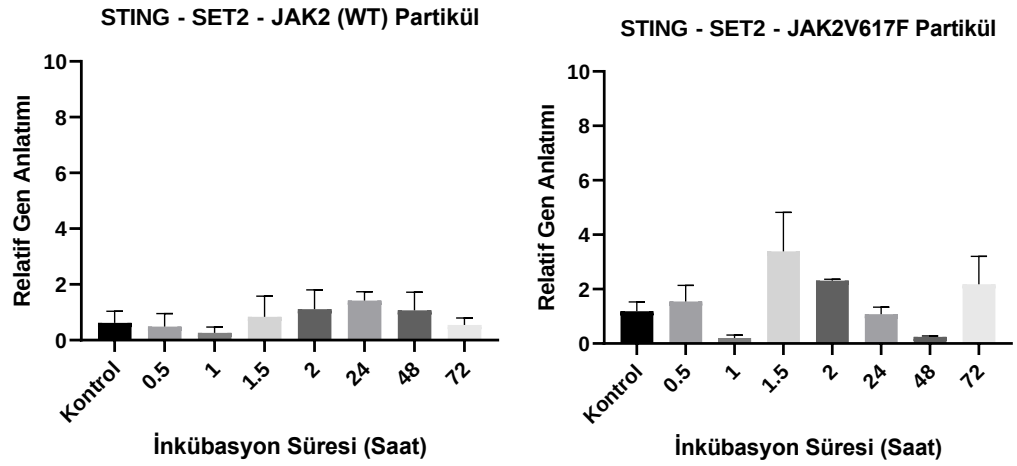
İlk iki saatlik inkübasyon boyunca *STING* geni anlatımında dalgalanmalar gözlenmiştir. Mutant partikül için 48. Saatte anlamlı artış gözlenmiştir.



Şekil 4-8: HEL hücre hattında *STING* geni ΔCt değeri değişimi

Şekil 4.8’de *STING* geninin HEL (JAK2V617F-Biallelik) hücre hattındaki ΔCt değerlerindeki zamana göre değişimler gösterilmiştir. Şekilde gösterilen değerler *STING* geninin referans gen olarak kullanılan *ACTB* genine göre değişimini göstermektedir. Değerler her zaman dilimi için ölçülen *STING* geninin ct değerinden *ACTB*’nin ct değerlerinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır.

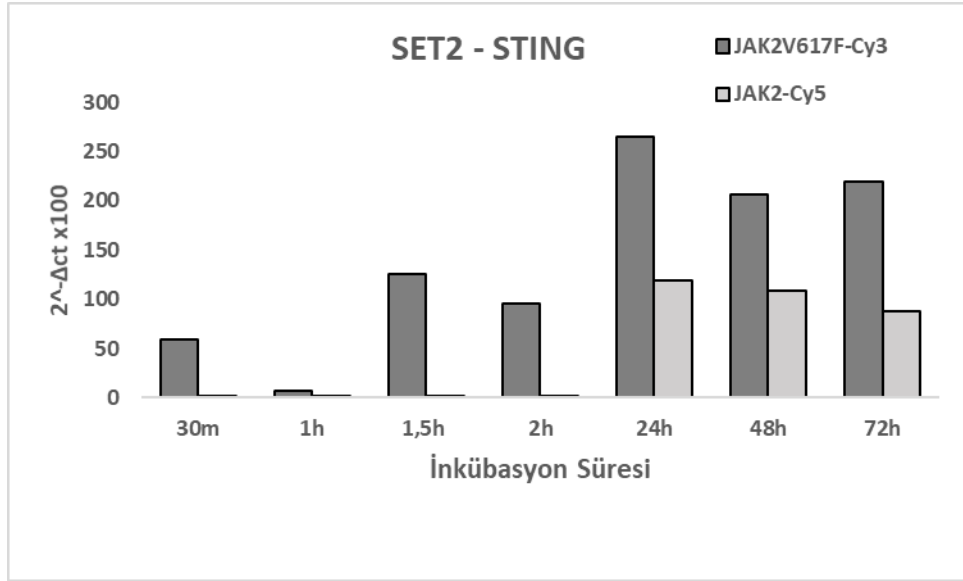
HEL hücre hattında *STING* anlatımının erken evrelerde daha yüksek iken 24 saat ve üstü inkübasyon sürelerinde daha düşük olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4-9: SET2 hücre hattında *STING* anlatımının değişimi

Şekil 4.9’da SET2 (JAK2V617F-Monoallel) hücre hattında *STING* geninin relatif gen anlatım değişimi gösterilmiştir. SET2 hattı hücreleri JAK2V617F ve yabancı tip JAK2 mRNA’larına spesifik nanopartiküllerle 0,5, 1, 1,5, 2, 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Her inkübasyon sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA’lardan elde edilen cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı PZR analizi yapılmıştır. Partiküllerle inkübe edilen hücrelerdeki anlatım değişimi herhangi bir işlem uygulanmamış kontrol grubu hücreleriyle kıyaslanmıştır. Relatif gen anlatımındaki değişim $\Delta\Delta\text{Ct}$ metoduyla hesaplanmıştır.

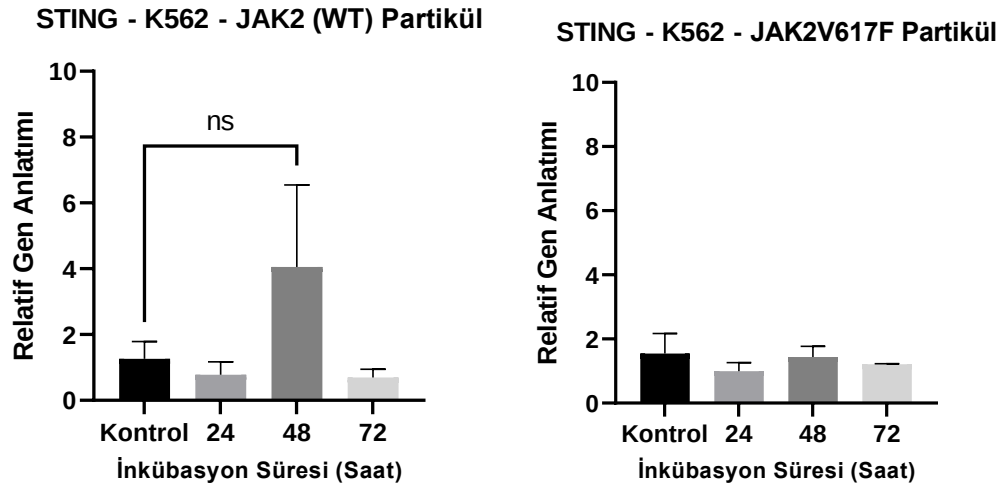
SET2 hücrelerinde yapılan partikül uygulamaları neticesinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir.



Şekil 4-10: SET2 hücre hattında *STING* geni ΔC_t değeri değişimi

Şekil 4.10’da *STING* geninin SET2 (JAK2V617F-Monoallel) hücre hattındaki ΔC_t değerlerindeki zamana göre değişimler gösterilmiştir. Şekilde gösterilen değerler *STING* geninin referans gen olarak kullanılan *ACTB* genine göre değişimini göstermektedir. Değerler her zaman dilimi için ölçülen *STING* geninin C_t değerinden *ACTB*’nin C_t değerlerinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır.

STING geninin ilk iki saat içerisinde yabani tip Nanoflare için yüksek olduğu mutant JAK2’ye özgü partikülle yapılan muamelede ise bu oranın daha düşük kaldığı gözlenmiştir.



Şekil 4-11: K562 hücre hattında *STING* anlatımının değişimi

Şekil 4.11’de K562 (JAK2V617F-Negatif) hücre hattında *STING* geninin relatif gen anlatım değişimi gösterilmiştir. K562 hattı hücreleri JAK2V617F ve yabani tip JAK2 mRNA’larına spesifik nanopartiküllerle 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Her inkübasyon sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA’lardan elde edilen cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı PZR analizi yapılmıştır. Partiküllerle inkübe edilen hücrelerdeki anlatım değişimi herhangi bir işlem uygulanmamış kontrol grubu hücreleriyle kıyaslanmıştır. Relatif gen anlatımındaki değişim $\Delta\Delta\text{Act}$ metoduyla hesaplanmıştır. K562 hücre hattında *STING* geninin anlatımında her iki tip partikül için de anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

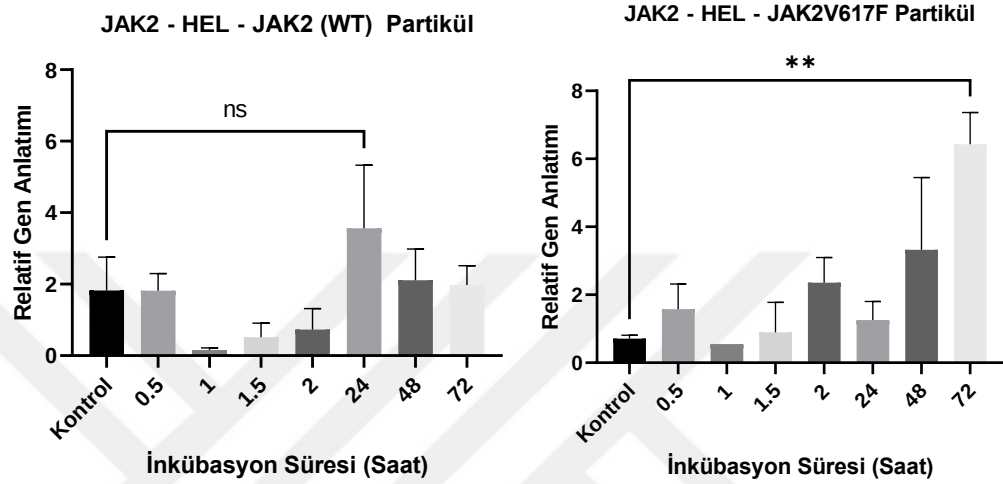


Şekil 4-12: K562 hücre hattında *STING* geni ΔCt değeri değişimi

Şekil 4.12’de *STING* geninin K562 (JAK2V617F-Negatif) hücre hattındaki ΔCt değerlerindeki zamana göre değişimler gösterilmiştir. Şekilde gösterilen değerler *STING* geninin referans gen olarak kullanılan *ACTB* genine göre değişimini göstermektedir. Değerler her zaman dilimi için ölçülen *STING* geninin ct değerinden *ACTB*’nin ct değerlerinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. K562 hücre hattında *STING* geninin anlatımının her iki tip partikül için tüm inkübasyon sürelerinde düşük olduğu gözlenmiştir.

4.1.3. *JAK2* Geni Anlatımının Partikül Uygulamasıyla Periyodik Değişimi

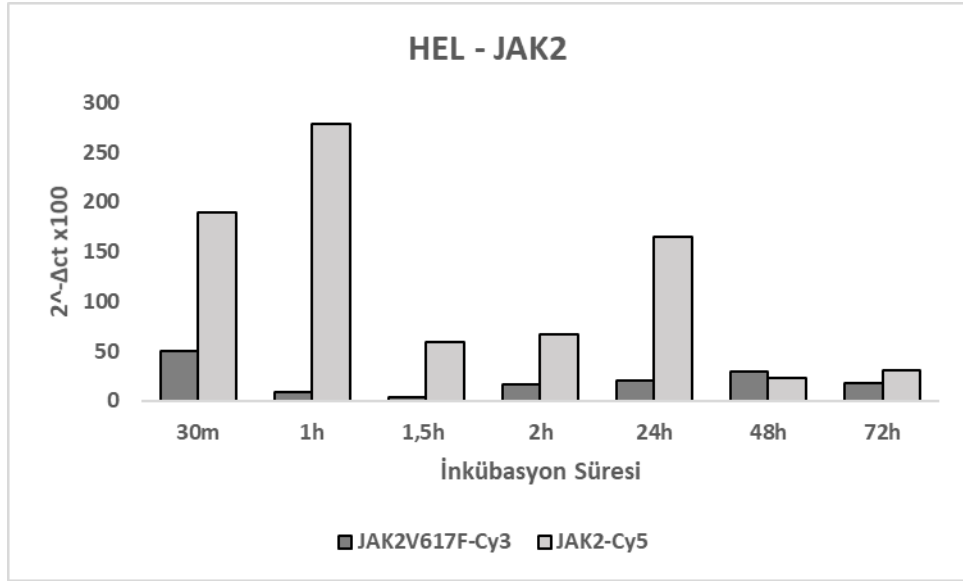
JAK2 geni için gerçek zamanlı PZR sonuçları ve ΔC_t değerlerindeki değişimler aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 4-13: HEL hücre hattında relatif *JAK2* anlatımının değişimi

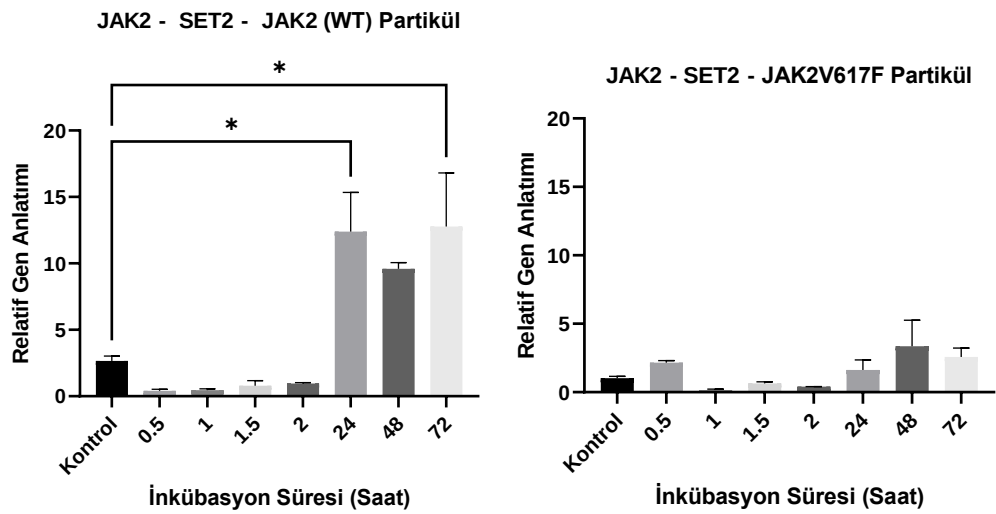
Şekil 4.13’da HEL (JAK2V617F-Biallelik) hücre hattında *JAK2* geninin relatif gen anlatım değişimi gösterilmiştir. HEL hattı hücreleri JAK2V617F ve yabani tip *JAK2* mRNA’larına spesifik nanopartiküllerle 0,5, 1, 1,5, 2, 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Her inkübasyon sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA’lardan elde edilen cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı PZR analizi yapılmıştır. Partiküllerle inkübe edilen hücrelerdeki anlatım değişimi herhangi bir işlem uygulanmamış kontrol grubu hücreleriyle kıyaslanmıştır. Relatif gen anlatımındaki değişim $\Delta\Delta C_t$ metoduyla hesaplanmıştır.

Şekil 4.13’te görüldüğü üzere *JAK2* anlatımında ilk 2 saatlik süreçte önemli bir artış gözlenmemiştir. 72. saatte mutant partikül için *JAK2* geninin anlatımında anlamlı artış gözlenmiştir.



Şekil 4-14: HEL hücre hattında JAK2 geni Ct değeri değişimi

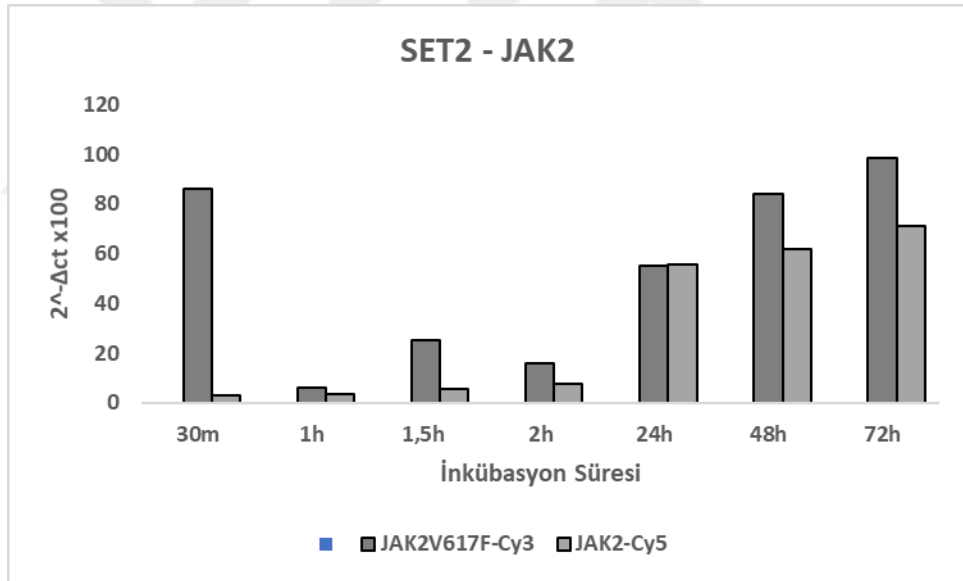
Şekil 4.14’de *JAK2* geninin HEL (JAK2V617F-Biallelik) hücre hattındaki Δ ct değerlerindeki zamana göre değişimler gösterilmiştir. Şekilde gösterilen değerler *JAK2* geninin referans gen olarak kullanılan *ACTB* genine göre değişimini göstermektedir. Değerler her zaman dilimi için ölçülen *JAK2* geninin ct değerinden *ACTB*’nin ct değerlerinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır.



Şekil 4-15: SET2 hücre hattında relatif *JAK2* anlatımının değişimi

Şekil 4.15’da SET2 (JAK2V617F-Monoallelik) hücre hattında *JAK2* geninin relatif gen anlatım değişimi gösterilmiştir. SET2 hattı hücreleri JAK2V617F ve yabancı tip *JAK2* mRNA’larına spesifik nanopartiküllerle 0,5, 1, 1,5, 2, 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Her inkübasyon sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA’lardan elde edilen cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı PZR analizi yapılmıştır. Partiküllerle inkübe edilen hücrelerdeki anlatım değişimi herhangi bir işlem uygulanmamış kontrol grubu hücreleriyle kıyaslanmıştır. Relatif gen anlatımındaki değişim $\Delta\Delta Ct$ metoduyla hesaplanmıştır.

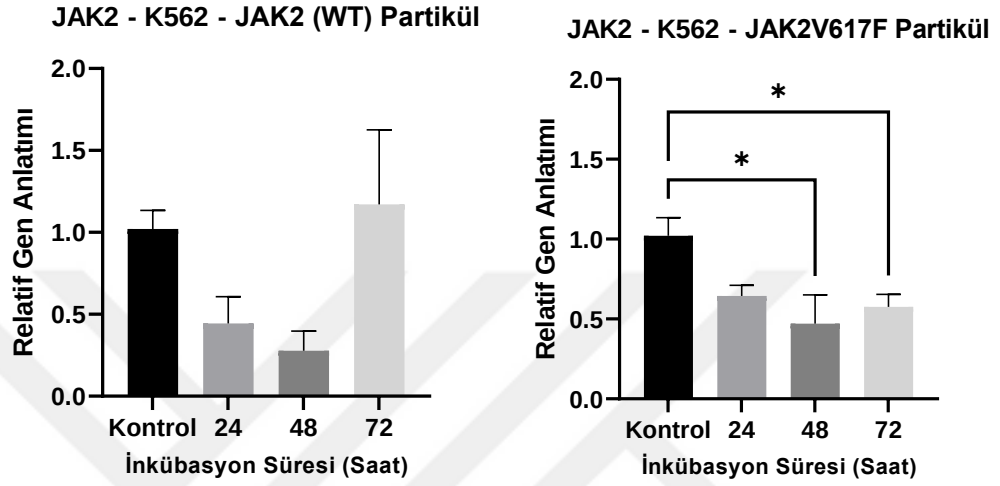
SET2 hücre hattında *JAK2* anlatımında mutant partikül ile yapılan muamelelerde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Yabancı tip *JAK2* mRNA’sına özgü partiküllerle yapılan inkübasyonda 24 ve 72. saatlerde anlamlı artış gözlenmiştir.



Şekil 4-16: SET2 hücre hattında *JAK2* geni ΔCt değeri değişimi

Şekil 4.16’de *JAK2* geninin SET2 (JAK2V617F-Monoallelik) hücre hattındaki ct değerlerindeki zamana göre değişimler gösterilmiştir. Şekilde gösterilen değerler *JAK2* geninin referans gen olarak kullanılan *ACTB* genine göre değişimini göstermektedir. Değerler her zaman dilimi için ölçülen *JAK2* geninin ct değerinden *ACTB*’nin ct değerlerinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. İlk iki saatlik inkübasyonlarda

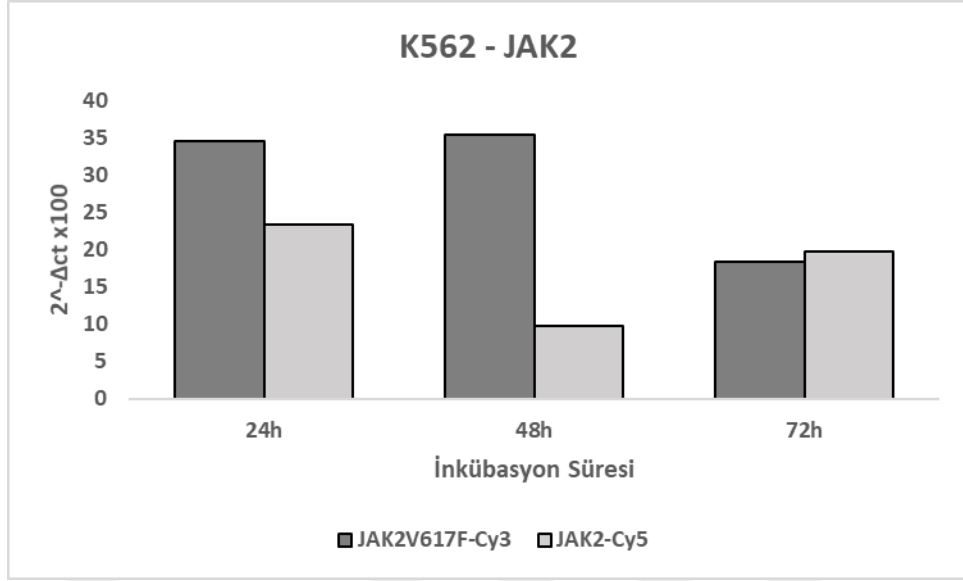
JAK2 anlatımının yabani tip partikül muamelesinde, mutanta göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4-17: K562 hücre hattında relatif *JAK2* anlatımının değişimi

Şekil 4.17’da K652 (*JAK2V617F*-Negatif) hücre hattında *JAK2* geninin relatif gen anlatım değişimi gösterilmiştir. K562 hattı hücreleri *JAK2V617F* ve yabani tip *JAK2* mRNA’larına spesifik nanopartiküllerle 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Her inkübasyon sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA’lardan elde edilen cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı PZR analizi yapılmıştır. Partiküllerle inkübe edilen hücrelerdeki anlatım değişimi herhangi bir işlem uygulanmamış kontrol grubu hücreleriyle kıyaslanmıştır. Relatif gen anlatımındaki değişim $\Delta\Delta\text{ct}$ metoduyla hesaplanmıştır.

K562 hücre hattında *JAK2* anlatımının yabani tip partiküllerde anlamlı değişim olmadığı, mutant partikülde ise 48 ve 72. saatlerde anlamlı ölçüde azaldığı gözlenmiştir.

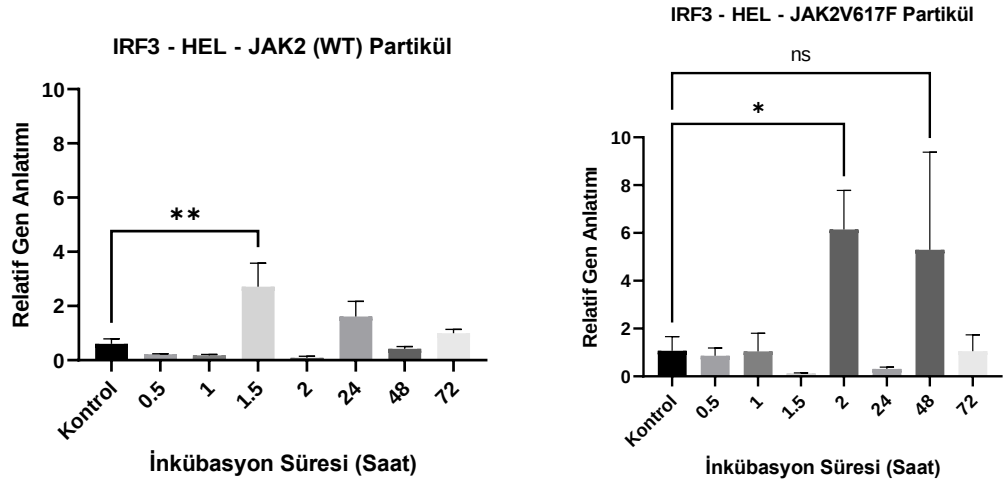


Şekil 4-18: K562 hücrehattında *JAK2* geninin Ct değeri değişimi

Şekil 4.18’de *JAK2* geninin K562 (*JAK2V617F*-Negatif) hücre hattındaki ΔC_t değerlerindeki zamana göre değişimler gösterilmiştir. Şekilde gösterilen değerler *JAK2* geninin referans gen olarak kullanılan *ACTB* genine göre değişimini göstermektedir. Değerler her zaman dilimi için ölçülen *JAK2* geninin C_t değerinden *ACTB*’nin C_t değerlerinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. K562 hücre hattında *JAK2* C_t değerlerinde önemli bir artış gözlenmemiştir.

4.1.4. *IRF3* Geni Anlatımının Partikül Uygulamasıyla Periyodik Değişimi

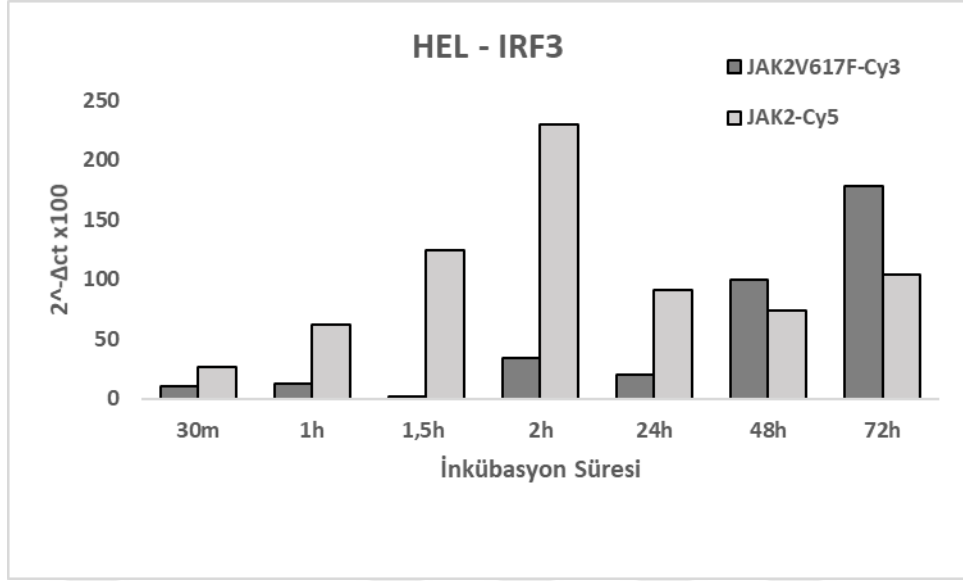
IRF3 geni için gerçek zamanlı PZR sonuçları ve ΔC_t değerlerindeki değişimler aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir. (Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24)



Şekil 4-19: HEL hücre hattında relatif *IRF3* anlatımının değişimi

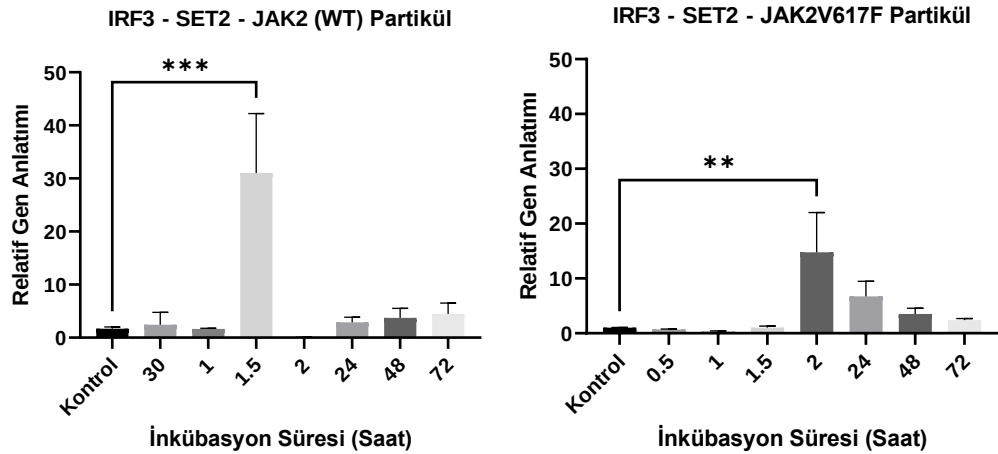
Şekil 4.19’da HEL (JAK2V617F-Biallelik) hücre hattında *IRF3* geninin relatif gen anlatım değişimi gösterilmiştir. HEL hattı hücreleri JAK2V617F ve yabani tip JAK2 mRNA’larına spesifik nanopartiküllerle 0.5, 1, 1.5, 2, 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Her inkübasyon sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA’lardan elde edilen cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı PZR analizi yapılmıştır. Partiküllerle inkübe edilen hücrelerdeki anlatım değişimi herhangi bir işlem uygulanmamış kontrol grubu hücreleriyle kıyaslanmıştır. Relatif gen anlatımındaki değişim $\Delta\Delta\text{Act}$ metoduyla hesaplanmıştır.

HEL hücre hattında yabani tip partiküllerle yapılan uygulamada 1.5 saatlik inkübasyon sonucunda *IRF3* geninin anlatımında anlamlı artış tespit edilmiştir. Mutant partikül ile yapılan uygulamada ise 2. Saatte anlamlı artış gözlenmiştir.



Şekil 4-20: HEL hücre hattında *IRF3* geni ΔC_t değeri değişim

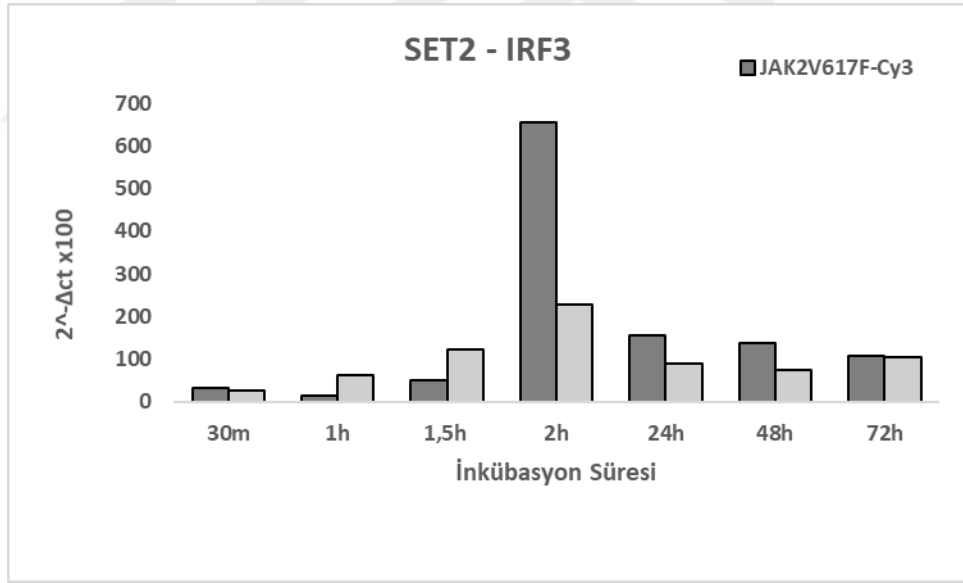
Şekil 4.20’de *IRF3* geninin HEL (JAK2V617F-Biallelik) hücre hattındaki ΔC_t değerlerindeki zamana göre değişimler gösterilmiştir. Şekilde gösterilen değerler *IRF3* geninin referans gen olarak kullanılan *ACTB* genine göre değişimini göstermektedir. Değerler her zaman dilimi için ölçülen *IRF3* geninin C_t değerinden *ACTB*’nin C_t değerlerinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. İlk 2 saatlik inkübasyon sürelerinde mutant JAK2V617F’ye özgü partikül muamelesinde elde edilen *IRF3* C_t değerlerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4-21: SET2 hücre hattında relatif *IRF3* anlatımının değişimi

Şekil 4.21’de SET2 (JAK2V617F-Monoallelık) hücre hattında *IRF3* geninin relatif gen anlatım değışimi gösterilmiştir. SET2 hattı hücreleri JAK2V617F ve yabancı tip JAK2 mRNA’larına spesifik nanopartiküllerle 0,5, 1, 1,5, 2, 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Her inkübasyon sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA’lardan elde edilen cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı PZR analizi yapılmıştır. Partiküllerle inkübe edilen hücrelerdeki anlatım değışimi herhangi bir işlem uygulanmamış kontrol grubu hücreleriyle kıyaslanmıştır. Relatif gen anlatımındaki değışim $\Delta\Delta\text{Ct}$ metoduyla hesaplanmıştır.

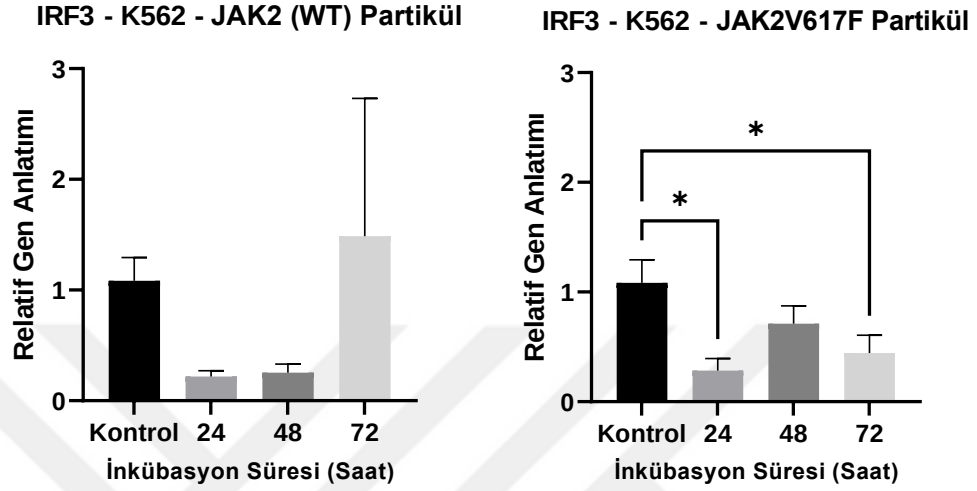
SET2 hücre hattında yabancı tip partiküllerle yapılan uygulamada 1.5 saatlik inkübasyon sonucunda *IRF3* geninin anlatımında anlamlı artış tespit edilmiştir. Mutant partikül ile yapılan uygulamada ise 2. saatte anlamlı artış gözlenmiştir.



Şekil 4-22: SET2 hücrehattında *IRF3* geni ΔCt değeri değışimi

Şekil 4.22’de *IRF3* geninin SET2 (JAK2V617F-Monoallelık) hücre hattındaki ΔCt değeriindeki zamana göre değışimler gösterilmiştir. Şekilde gösterilen değeri *IRF3* geninin referans gen olarak kullanılan *ACTB* genine göre değışimini

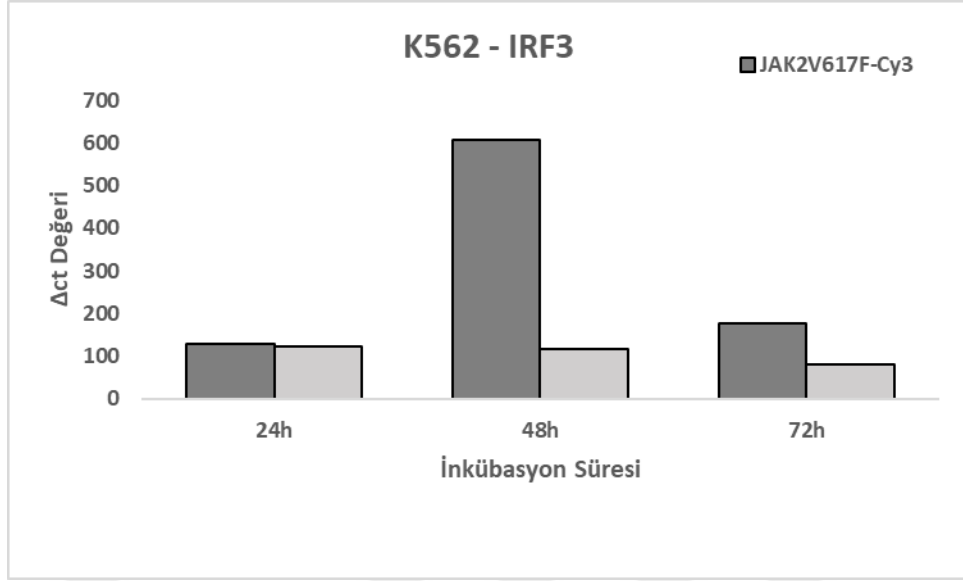
göstermektedir. Değerler her zaman dilimi için ölçülen *IRF3* geninin ct değerinden *ACTB*'nin ct değerlerinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır.



Şekil 4-23: K562 hücre hattında relatif *IRF3* anlatımının değişimi

Şekil 4.23'de K652 (JAK2V617F-Negatif) hücre hattında *IRF3* geninin relatif gen anlatım değişimi gösterilmiştir. K562 hattı hücreleri JAK2V617F ve yabani tip JAK2 mRNA'larına spesifik nanopartiküllerle 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Her inkübasyon sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lardan elde edilen cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı PZR analizi yapılmıştır. Partiküllerle inkübe edilen hücrelerdeki anlatım değişimi herhangi bir işlem uygulanmamış kontrol grubu hücreleriyle kıyaslanmıştır. Relatif gen anlatımındaki değişim $\Delta\Delta\text{ct}$ metoduyla hesaplanmıştır.

K562 hücre hattında *IRF3* geninin anlatımında yabani tip partiküller için anlamlı bir değişim gözlenmezken mutant partiküller ile yapılan uygulamalarda 24. ve 72. saatlerde anlamlı şekilde azaldığı gözlenmiştir.

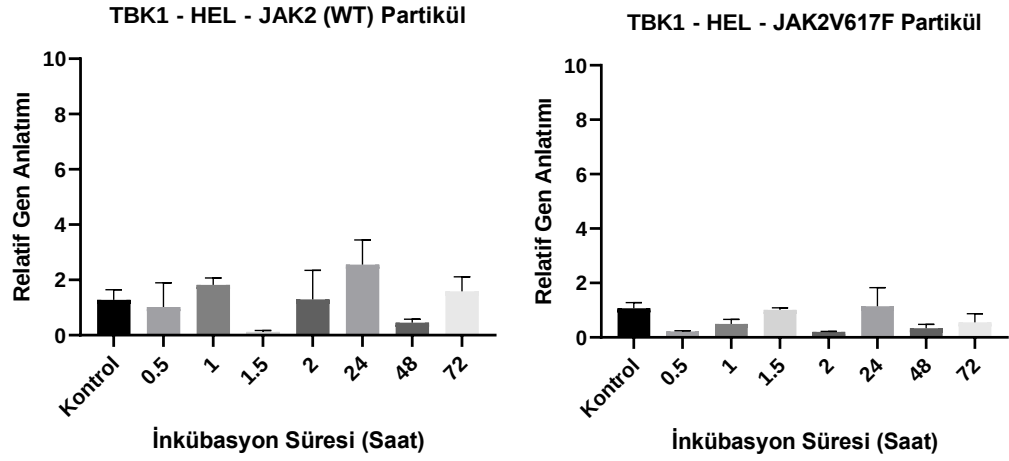


Şekil 4-24: K562 hücrehattında *IRF3* geni Ct değeri değişimi

Şekil 4.24’de *IRF3* geninin K562 (JAK2V617F-Negatif) hücre hattındaki Δ Ct değerlerindeki zamana göre değişimler gösterilmiştir. Şekilde gösterilen değerler *IRF3* geninin referans gen olarak kullanılan *ACTB* genine göre değişimini göstermektedir. Değerler her zaman dilimi için ölçülen *IRF3* geninin ct değerinden *ACTB*’nin ct değerlerinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. K562 hücre hattında *IRF3* ct değerlerinde 48. saatte mutant partikül için gözlenen azalma dışında anlamlı bir değişime rastlanmamıştır.

4.1.5. *TBK1* Geni Anlatımının Partikül Uygulamasıyla Periyodik Değişimi

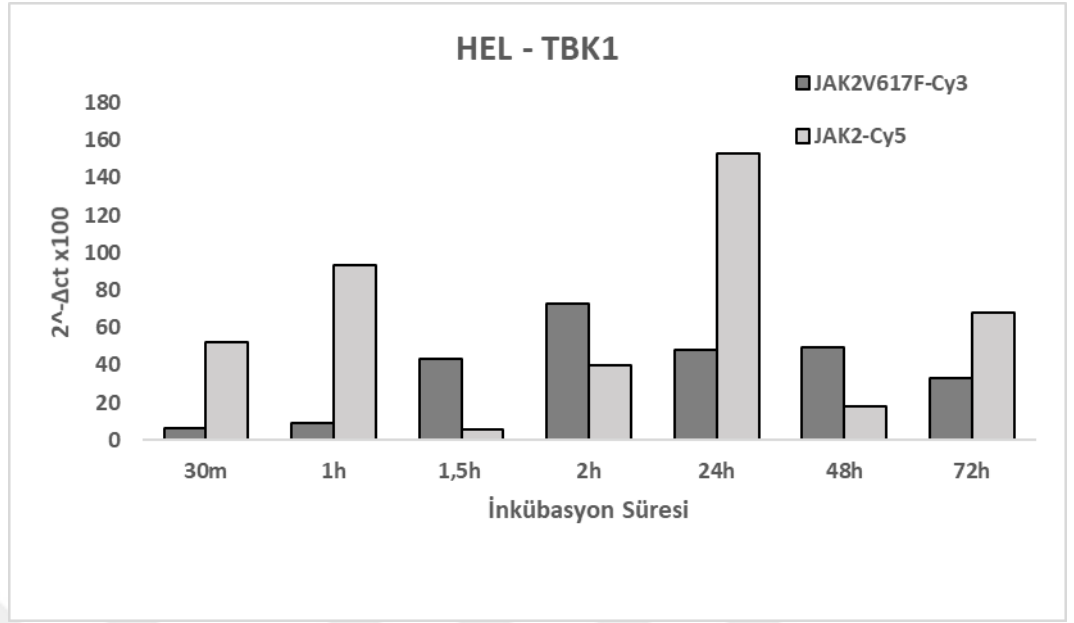
TBK1 geni için gerçek zamanlı PZR sonuçları ve Δ Ct değerlerindeki değişimler aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir. (Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29 ve Şekil 4.30)



Şekil 4-25: HEL hücre hattında relatif *TBK1* anlatımının değişimi

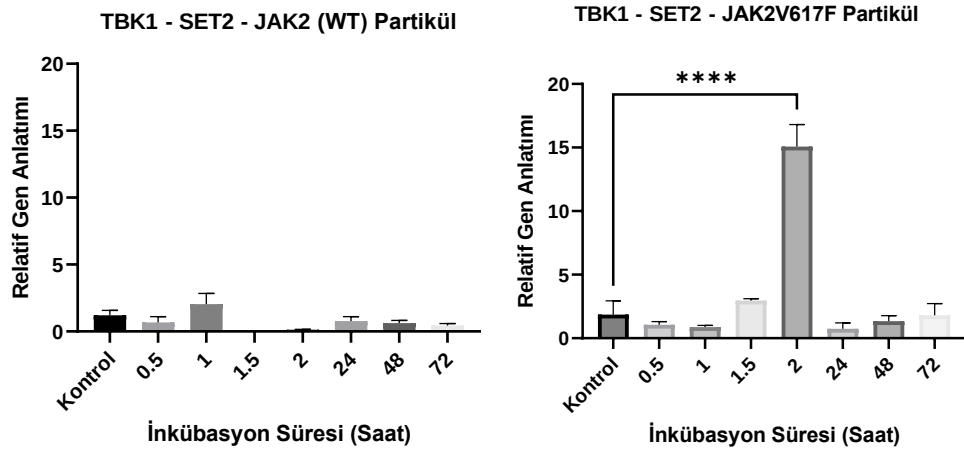
Şekil 4.25’de HEL (JAK2V617F-Biallelik) hücre hattında *TBK1* geninin relatif gen anlatım değişimi gösterilmiştir. HEL hattı hücreleri JAK2V617F ve yabani tip JAK2 mRNA’larına spesifik nanopartiküllerle 0,5, 1, 1,5, 2, 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Her inkübasyon sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA’lardan elde edilen cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı PZR analizi yapılmıştır. Partiküllerle inkübe edilen hücrelerdeki anlatım değişimi herhangi bir işlem uygulanmamış kontrol grubu hücreleriyle kıyaslanmıştır. Relatif gen anlatımındaki değişim $\Delta\Delta\text{ct}$ metoduyla hesaplanmıştır.

HEL hücre hattında *TBK1* geninin anlatımında her iki partikülde de anlamlı bir etki gözlenmemiştir.



Şekil 4-26: HEL hücre hattında *TBK1* geni ΔC_t değeri değişimi

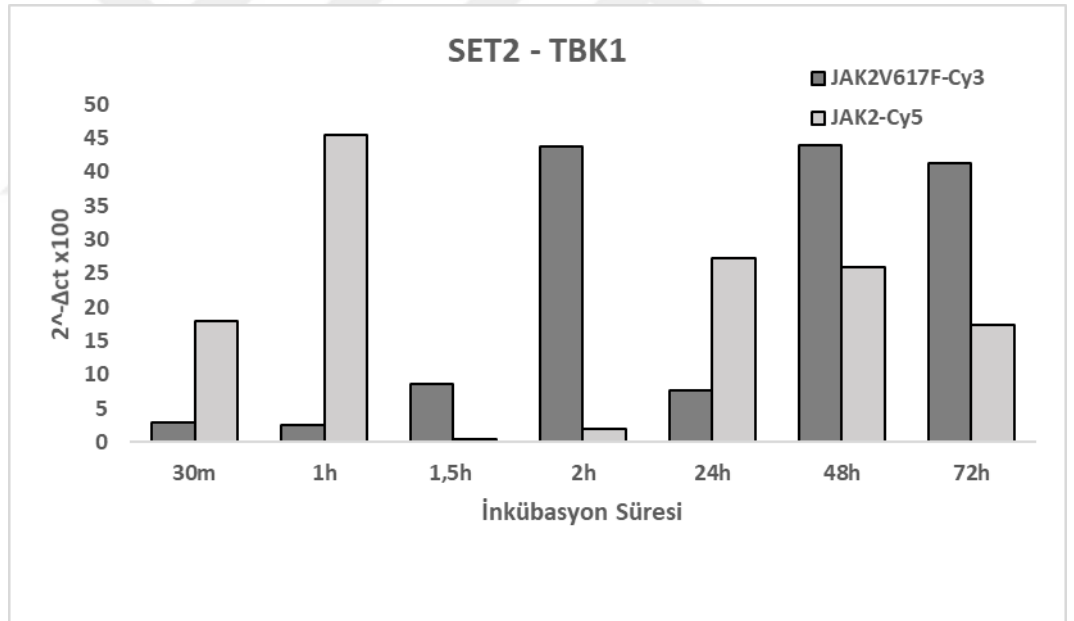
Şekil 4.26’de *TBK1* geninin HEL (JAK2V617F-Biallelik) hücre hattındaki ΔC_t değerlerindeki zamana göre değişimler gösterilmiştir. Şekilde gösterilen değerler *TBK1* geninin referans gen olarak kullanılan *ACTB* genine göre değişimini göstermektedir. Değerler her zaman dilimi için ölçülen *TBK1* geninin C_t değerinden *ACTB*’nin C_t değerlerinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır.



Şekil 4-27: SET2 hücre hattında *TBK1* anlatımının değişimi

Şekil 4.27’de SET2 (JAK2V617F-Monoallelık) hücre hattında *TBK1* geninin relatif gen anlatım değışimi gösterilmiştir. SET2 hattı hücreleri JAK2V617F ve yabancı tip JAK2 mRNA’larına spesifik nanopartiküllerle 0,5, 1, 1,5, 2, 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Her inkübasyon sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA’lardan elde edilen cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı PZR analizi yapılmıştır. Partiküllerle inkübe edilen hücrelerdeki anlatım değışimi herhangi bir işlem uygulanmamış kontrol grubu hücreleriyle kıyaslanmıştır. Relatif gen anlatımındaki değışim $\Delta\Delta\text{Ct}$ metoduyla hesaplanmıştır.

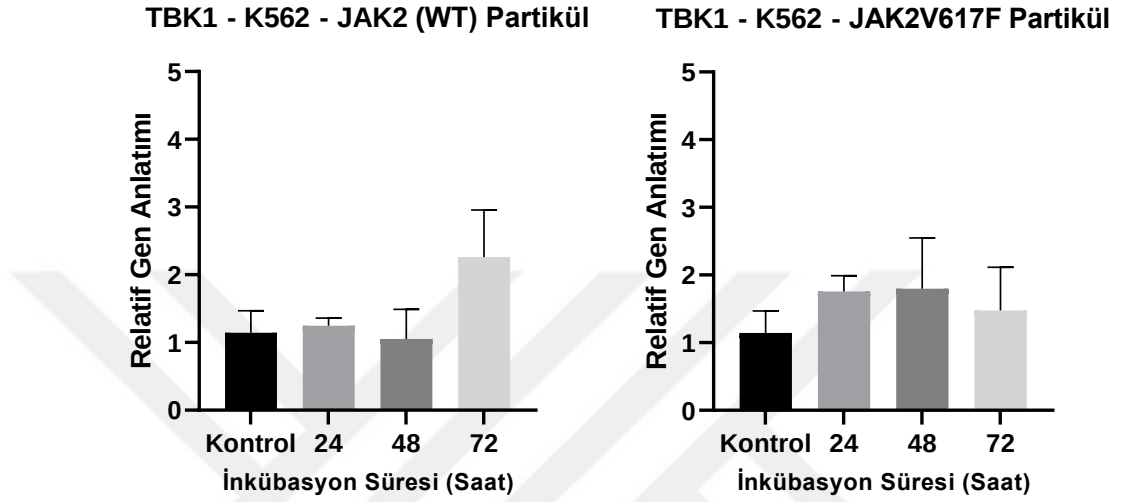
SET2 hücre hattında yabancı tip partiküllerle yapılan uygulamalarda *TBK1* geninin anlatımında önemli bir değışime rastlanmamıştır. Mutant JAK2V617F mRNA’sına özgü partiküllerde 2. saatte anlamlı artış saptanmıştır.



Şekil 4-28: SET2 hücre hattında *TBK1* geni ΔCt değeri değışimi

Şekil 4.28’de *TBK1* geninin SET2 (JAK2V617F-Monoallelık) hücre hattındaki ct değeriindeki zamana göre değışimler gösterilmiştir. Şekilde gösterilen değeri *TBK1* geninin referans gen olarak kullanılan *ACTB* genine göre değışimini

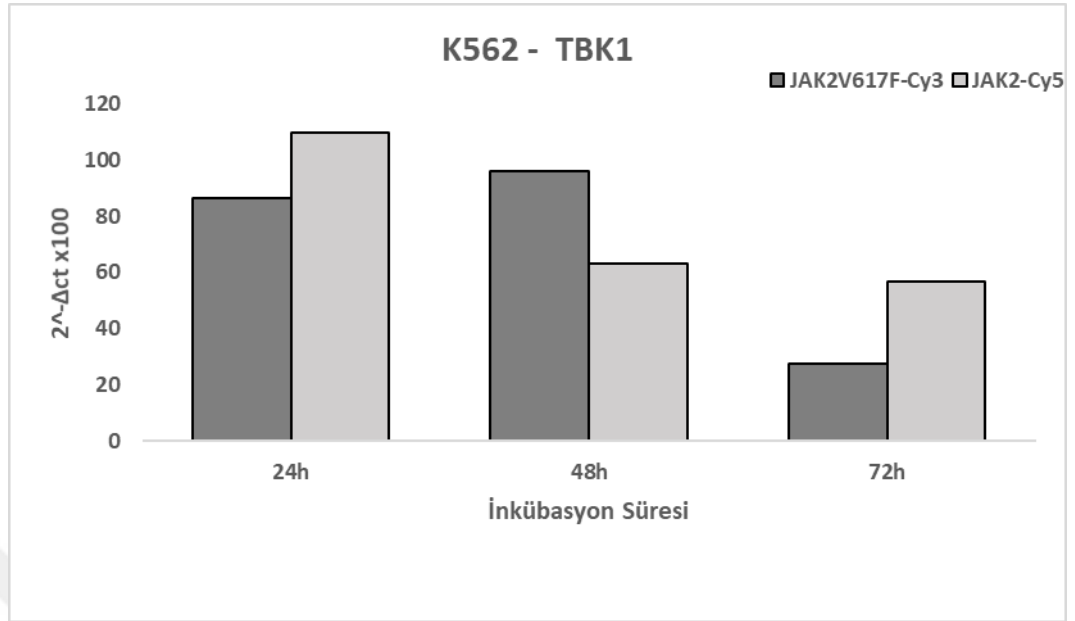
göstermektedir. Değerler her zaman dilimi için ölçülen *TBK1* geninin ct değerinden *ACTB*'nin ct değerlerinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır.



Şekil 4-29: K562 hücre hattında relatif *TBK1* anlatımının değişimi

Şekil 4.29'de K562 (JAK2V617F-Negatif) hücre hattında *TBK1* geninin relatif gen anlatım değişimi gösterilmiştir. K562 hattı hücreleri JAK2V617F ve yabani tip JAK2 mRNA'larına spesifik nanopartiküllerle 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Her inkübasyon sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA'lardan elde edilen cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı PZR analizi yapılmıştır. Partiküllerle inkübe edilen hücrelerdeki anlatım değişimi herhangi bir işlem uygulanmamış kontrol grubu hücreleriyle kıyaslanmıştır. Relatif gen anlatımındaki değişim $\Delta\Delta\text{ct}$ metoduyla hesaplanmıştır.

K562 hücre hattında yapılan partikül muameleleri sonucunda anlamlı bir değişime rastlanılmamıştır.

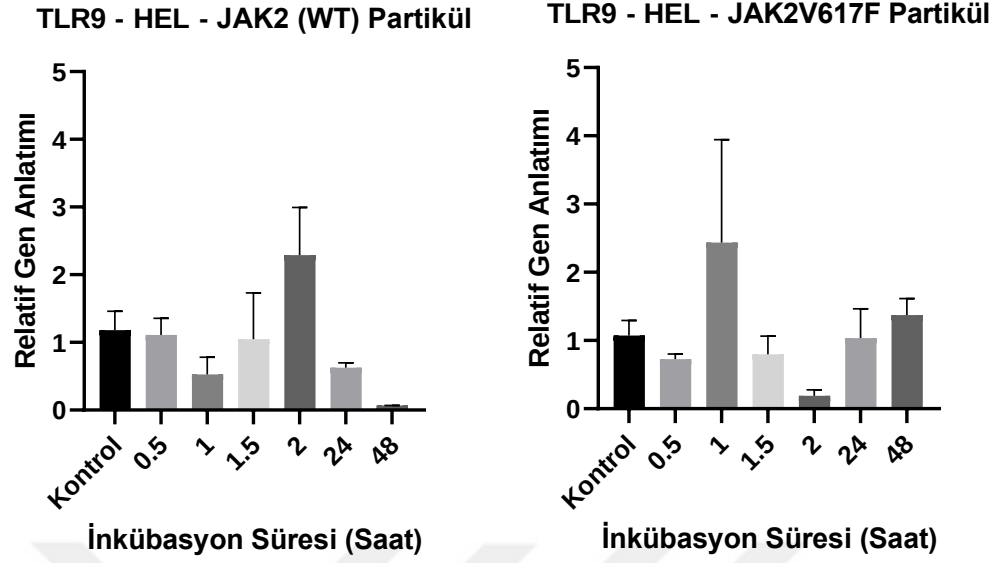


Şekil 4-30: K562 hücre hattında *TBK1* geni ΔC_t değeri değişimi

Şekil 4.30'da *TBK1* geninin K562 (JAK2V617F-Negatif) hücre hattındaki ΔC_t değerlerindeki zamana göre değişimler gösterilmiştir. Şekilde gösterilen değerler *TBK1* geninin referans gen olarak kullanılan *ACTB* genine göre değişimini göstermektedir. Değerler her zaman dilimi için ölçülen *TBK1* geninin C_t değerinden *ACTB*'nin C_t değerlerinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. *TBK1* geninin C_t değerlerinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

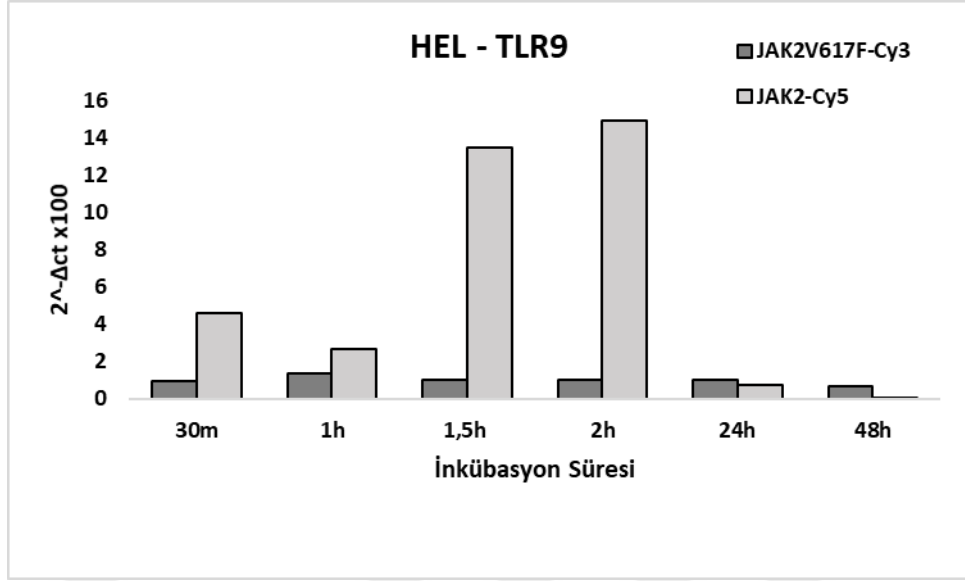
4.1.6. *TLR9* Geni Anlatımının Partikül Uygulamasıyla Periyodik Değişimi

TLR9 geni için gerçek zamanlı PZR sonuçları ve ΔC_t değerlerindeki değişimler aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir. (Şekil 4.31, Şekil 4.32)



Şekil 4-31: HEL hücre hattında relatif *TLR9* anlatımının değişimi

Şekil 4.31’de HEL (JAK2V617F-Biallelik) hücre hattında *TLR9* geninin relatif gen anlatım değişimi gösterilmiştir. HEL hattı hücreleri JAK2V617F ve yabani tip JAK2 mRNA’larına spesifik nanopartiküllerle 0,5, 1, 1,5, 2, 24 VE 48 saat inkübe edilmiştir. Her inkübasyon sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA’lardan elde edilen cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı PZR analizi yapılmıştır. Partiküllerle inkübe edilen hücrelerdeki anlatım değişimi herhangi bir işlem uygulanmamış kontrol grubu hücreleriyle kıyaslanmıştır. Relatif gen anlatımındaki değişim $\Delta\Delta\text{ct}$ metoduyla hesaplanmıştır. HEL hücre hattında *TLR9* geninin anlatımında anlamlı bir değişime rastlanmamıştır.

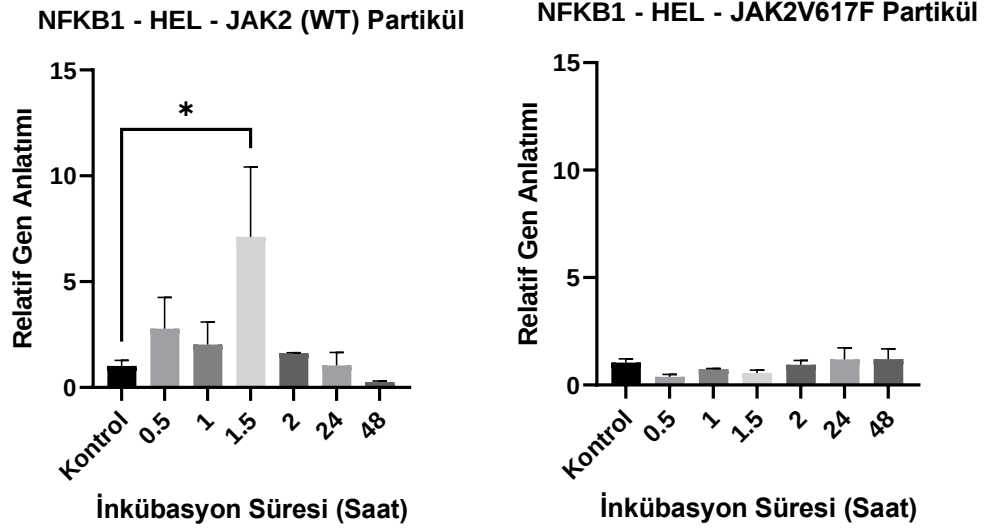


Şekil 4-32: HEL hücre hattında *TLR9* geni ΔC_t değeri değişimi

Şekil 4.32’de *TLR9* geninin HEL (JAK2V617F-Biallelik) hücre hattındaki ΔC_t değerlerindeki zamana göre değişimler gösterilmiştir. Şekilde gösterilen değerler *TLR9* geninin referans gen olarak kullanılan *ACTB* genine göre değişimini göstermektedir. Değerler her zaman dilimi için ölçülen *TLR9* geninin C_t değerinden *ACTB*’nin C_t değerlerinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. *TLR9* geninin C_t değerindeki değişimin mutant JAK2V617F partikülü için sabit kaldığı görülmüştür.

4.1.7. *NFKB1* Geni Anlatımının Partikül Uygulamasıyla Periyodik Değişimi

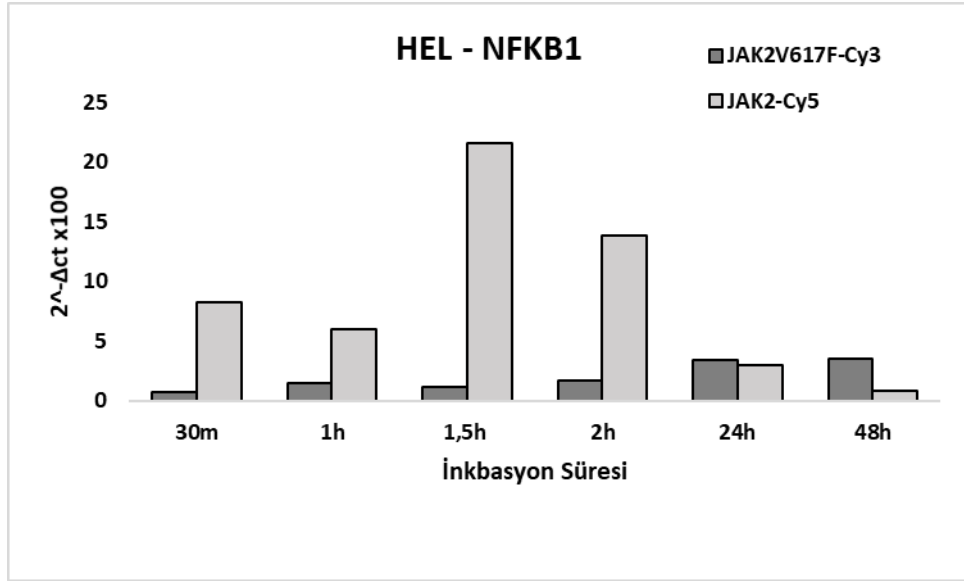
NFKB1 geni için gerçek zamanlı PZR sonuçları ve C_t değerlerindeki değişimler aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir. (Şekil 4.33, Şekil 4.34)



Şekil 4-33: HEL hücre hattında relatif *NFKB1* anlatımının değişimi

Şekil 4.33’de HEL (JAK2V617F-Biallelik) hücre hattında *NFKB1* geninin relatif gen anlatım değişimi gösterilmiştir. HEL hattı hücreleri JAK2V617F ve yabani tip JAK2 mRNA’larına spesifik nanopartiküllerle 0,5, 1, 1,5, 2, 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir. Her inkübasyon sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA’lardan elde edilen cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı PZR analizi yapılmıştır. Partiküllerle inkübe edilen hücrelerdeki anlatım değişimi herhangi bir işlem uygulanmamış kontrol grubu hücreleriyle kıyaslanmıştır. Relatif gen anlatımındaki değişim $\Delta\Delta\text{Act}$ metoduyla hesaplanmıştır.

NFKB1 geninin anlatımında 1.5 saatlik yabani tip partikül inkübasyonunda anlamlı artış gözlenmiştir. Mutant partiküller ile yapılan uygulamalarda anlamlı bir etki gözlenmemiştir.

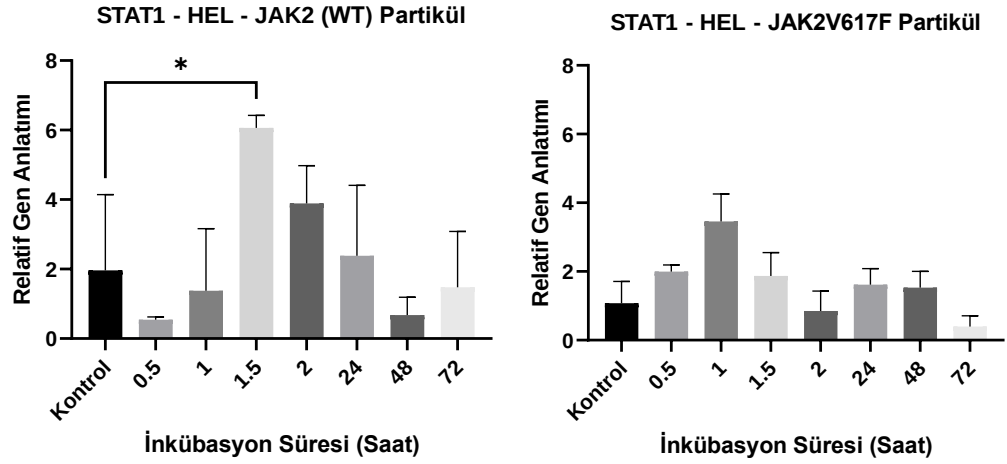


Şekil 4-34: HEL hücre hattında *NFKB1* geni ΔC_t değeri değişimi

Şekil 4.34’de *NFKB1* geninin HEL (JAK2V617F-Biallelik) hücre hattındaki ΔC_t değerlerindeki zamana göre değişimler gösterilmiştir. Şekilde gösterilen değerler *NFKB1* geninin referans gen olarak kullanılan *ACTB* genine göre değişimini göstermektedir. Değerler her zaman dilimi için ölçülen *NFKB1* geninin C_t değerinden *ACTB*’nin C_t değerlerinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır.

4.1.8. *STAT1* – *STAT2* Genlerinin Anlatımının Partikül Uygulamasıyla Periyodik Değişimi

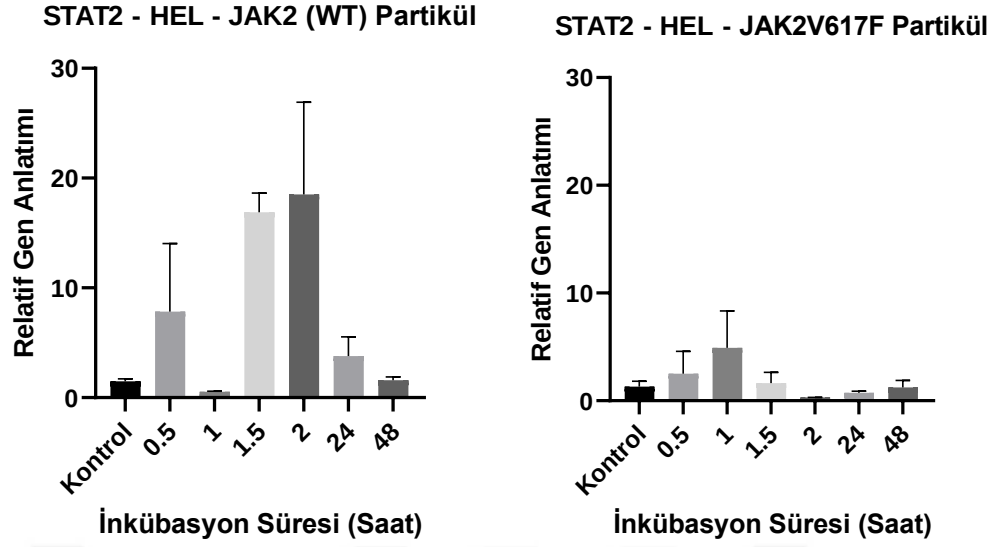
STAT1 ve *STAT2* genleri için gerçek zamanlı PZR sonuçları ve C_t değerlerindeki değişimler aşağıdaki grafiklerde gösterilmiştir. (Şekil 4.35, Şekil 4.36)



Şekil 4-35: HEL hücre hattında relatif *STAT1* anlatımının değişimi

Şekil 4.35’de HEL (JAK2V617F-Biallelik) hücre hattında *STAT1* geninin relatif gen anlatım değişimi gösterilmiştir. HEL hattı hücreleri JAK2V617F ve yabani tip JAK2 mRNA’larına spesifik nanopartiküllerle 0,5, 1, 1,5, 2, 24 VE 48 saat inkübe edilmiştir. Her inkübasyon sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA’lardan elde edilen cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı PZR analizi yapılmıştır. Partiküllerle inkübe edilen hücrelerdeki anlatım değişimi herhangi bir işlem uygulanmamış kontrol grubu hücreleriyle kıyaslanmıştır. Relatif gen anlatımındaki değişim $\Delta\Delta\text{ct}$ metoduyla hesaplanmıştır.

STAT1 geninin anlatımında yabani tip partiküllerle yapılan uygulamalarda 1.5 saatlik inkübasyon neticesinde anlamlı değişime rastlanmıştır. Mutant partiküller ile yapılan uygulamalarda anlamlı bir etki gözlenmemiştir.



Şekil 4-36: HEL hücre hattında relatif *STAT2* anlatımının değişimi

Şekil 4.36’de HEL (JAK2V617F-Biallelik) hücre hattında *STAT2* geninin relatif gen anlatım değişimi gösterilmiştir. HEL hattı hücreleri JAK2V617F ve yabani tip JAK2 mRNA’larına spesifik nanopartiküllerle 0,5, 1, 2, 24 VE 48 saat inkübe edilmiştir. Her inkübasyon sonunda toplanan hücrelerden izole edilen RNA’lardan elde edilen cDNA örnekleri ile gerçek zamanlı PZR analizi yapılmıştır. Partiküllerle inkübe edilen hücrelerdeki anlatım değişimi herhangi bir işlem uygulanmamış kontrol grubu hücreleriyle kıyaslanmıştır. Relatif gen anlatımındaki değişim $\Delta\Delta Ct$ metoduyla hesaplanmıştır. Yapılan uygulamalarda *STAT2* geninin anlatımında anlamlı bir etki gözlenmemiştir.

5. TARTIŞMA

Doğal bağışıklık sisteminin bir parçası olan cGAS – STING yolağı sitozolik DNA molekülleri tespit ederek tip I interferonların salınımını sağlayan önemli bir mekanizmadır. cGAS – STING yolağının kanser gelişimini önleyici etkisi birçok çalışmada gösterilmiştir. Bir diğer yandan yolağın kronik aktivasyonu neticesinde tümör gelişimine uygun ortam oluşmasına sebep olduğunu gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur (Zheng ve ark. 2020). Bu iki yönlü durum cGAS-STING yolağını baz alan tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için, bu yolağın tedavi edilmek istenilen kanser türündeki etkinliğinin anlaşılmasını gerekli kılmaktadır. Bu çalışmada cGAS-STING yolağının miyeloproliferatif neoplazilerdeki rolü hakkında bilgi edinilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla MPN’lerde sıklıkla karşılaşılan JAK2V617F mutasyonunu taşıyan hücre hatlarında, cGAS-STING yolağının aktivasyonu durumdaki gen anlatımı değişimleri incelenmiştir. Çalışmanın hipotezi JAK2V617F taşıyıcısı kanserli hücre hatlarında cGAS – STING yolağının uyarılmasının, yolak üzerindeki ve ilişkili genlerin anlatımına etkisinin bulunacağıdır.

Çalışmanın bir diğer önemli elementi olan Nanoflare partikülleri belirli bir mRNA molekülüyle eşleşebilen oligonükleotit zincirlerini taşıyan küresel nükleik asitlerdir. Nanoflarelerin kullanıldığı RNA bazlı uygulamalar, özellikle kanser hücrelerinin tespit edilmesi ve gen anlatımının düzenlenmesi amacıyla kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır (Sidransky, 1997). Çalışmada mutant JAK2 (JAK2V617F) ve yabani tip JAK2 mRNA’larına özgü olmak üzere iki tip nanopartikülden faydalandı. Nanopartiküller ilgili mRNA’larıyla eşleşmeleri sonucu mutant ve yabani tip JAK2 proteinlerinin sentezini bloklayacağından inhibitör vazifesi göreceği öngörülmüştür.

Nanoflare partiküllerinin üzerinde taşıdığı oligonükleotitlerin mutant ve yabani tip JAK2 mRNA’larıyla eşleşerek oluşturduğu çift zincirli yapılar cGAS – STING yolağının uyarılmasında kullanıldı. Bu yolla yapılan uyarılar sonucunda yolak üzerindeki temel proteinleri sentezleyen genlerden olan *cGAS*, *STING* ve *TBK1* genlerinin anlatımında değişimler gözlemlendi. Yapılan çalışmalarda *STING* ve *TBK1*’in aktivasyonunun, *IRF3* ve *NFKB1* transkripsiyon faktörleri aracılığıyla interferon üretimini tetiklediği gösterilmiştir (Zheng ve ark. 2020). Bu çalışmada da cGAS-STING

yolağının aktivasyonu neticesinde bu iki transkripsiyon faktöründeki değişimler araştırıldı.

Hücre hatları nanopartiküllerle farklı sürelerde muamele edilerek gen anlatımındaki değişimlerin kısa ve uzun vadelerdeki etkileri test edildi. İki saate kadar yarım saat aralıklarla yapılan inkübasyonların temel nedeni hücrelere endositotik yollar aracılığıyla giren nanopartiküllerin hücrelerde aktivite gösterebildikleri yer olan sitozole geçişi için gereken zamanın çeşitlilik göstermesidir. Scavenger tip A reseptörlerine bağlanarak endozom içinde sitoplazmaya geçen nanopartiküller daha sonra endozomdan sızarak sitozolik ortama geçiş yapar (Seferos 2007). 72 saate kadar 24 saatlik aralıklarla yapılan uzun vadeli inkübasyonlarda yolağında kronik aktivasyonundaki etkilerin gözlemlenmesi amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalarda cGAS-STING yolağının kronik aktivasyonunun tümör gelişimini ve metastazı hızlandığı görülmüştür (Bakhoum ve ark. 2018)

Kısa süreli inkübasyonlarda (0,5h, 1h, 1,5h, 2h) SET2 ve HEL hücre hatlarında yapılan gözlemlerde *cGAS*, *STING* ve *TBK1* genlerinin anlatımında dalgalanmalar gözlenmekle beraber belli saat aralıklarında önemli artışlar gözlenmiştir. Bu dalgalanmalara sebep olarak nanopartiküllerin hücre içine giriş oranlarındaki değişkenlikler gösterilebilir. Partiküllerin hücrelere girişinde standart bir düzen olmadığından belli dilimlerde gen anlatımında yüksek anlatım gözlenirken bir kısmında artışın az yada gen anlatımında azalmaların olduğu gözlenmiştir. Zaman aralıklarının kısa olması da bu dalgalanmaların sebebi olarak düşünülebilir.

Uzun süreli inkübasyonlarda (24h, 48h, 72h) gözlenen gen anlatımındaki değişimlerin kısa süreliere göre daha stabil olduğu görüldü. *cGAS* geninin anlatımının her iki tip Nanoflare için HEL 48. saat haricinde tüm şartlar altında anlamlı ölçüde arttığı gözlemlendi. Özellikle JAK2V617F mutasyonu biallelik olarak taşıyan HEL hattı ve monoallelik olarak taşıyan SET2 hattında mutant *JAK2* mRNA'sına özgü nanopartiküller ile yapılan 72 saatlik muamele sonunda *cGAS* geninin anlatımının tepe değere eriştiği görüldü.

STING geni anlatımını HEL hücre hattında dalgalanmalar şeklinde değiştiği gözlenirken SET2 hücre hattında *STING* geninin anlatımının genel olarak arttığı görüldü. Mutant mRNA'ya özgü nanopartikül için SET2 hücre hattında 24. saatte en yüksek değere ulaşan *STING* anlatımının ilerleyen zamanda düzenli olarak azaldığı gözlemlendi. *STING* anlatımının azaldığı bu durumda *cGAS* geninin anlatımında gözlenen

artış cGAS-STING yolağında bulunan otoinhibitör bir mekanizmanın sonucu olarak değerlendirilebilir.

cGAS ve STING geni için elde edilen sonuçlarda, gen anlatımlarının mutant JAK2 mRNA'sına özgü olan nanopartiküllerde, yabani tipe göre daha yüksek olduğu genel olarak gözlenmiştir. Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada JAK2-STAT3 yolağının cGAS-STING yolağını baskılayıcı özelliği olduğu tespit edilmiştir (Zhang ve ark. 2020) JAK2V617F mRNA'sının nanopartiküllerce bloklanmasıyla, sürekli aktif formdaki mutant JAK2 proteininin cGAS-STING yolağı üzerindeki muhtemel baskılayıcı etkisi ortadan kalkabilir. Bu durum cGAS ve STING genlerinin anlatımlarının mutant nanopartikülle yapılan muamelelerde daha yüksek olmasını açıklayabilir. JAK2V617F mutasyonunu taşımayan K562 hücre hattında STING geninin anlatımının partikül muamelesinden etkilenmemesi de bu durumu destekler niteliktedir. STING'in etkilenmediği halde, K562'deki cGAS anlatımının artması ise JAK-STAT yolağının cGAS-STING yolağı üzerindeki inhibitör etkisinin STING proteini üzerinden gerçekleşmekte olduğunu gösterebilir.

cGAS-STING yolağıyla JAK2 arasındaki ilişkinin araştırılması amacıyla JAK2 geninin anlatımındaki değişimler incelendi. Elde edilen sonuçlarda biallelik mutant HEL hücre hattında JAK2 anlatımının ilk iki saat içerisindeki ölçümlerde düzensizlik gösterdiği, 24. saat itibariyle ise her iki nanopartiküller için genel olarak artış eğiliminde olduğu görüldü. Monoallelik SET2 hücre hattında ilk 2 saat içinde yabani tip Cy5 nanopartikülü uygulanan hücrelerde kademeli bir artış gözlenirken uzun süreli inkübasyonlarda gen anlatımının genel olarak azaldığı gözlemlendi. JAK2V617F mutasyonu taşımayan K562' de ise uzun süreli inkübasyonlarda hafif azalmalar gözlemlendi. Mevcut şartlarda JAK2 anlatımını etkileyebilecek üç faktör öne çıkmaktadır. Sürekli aktif mutant JAK2 proteini ve cGAS-STING aktivasyonu sonucu artan interferonların JAK-STAT yolağını uyarması JAK2 anlatımının yükselmesine sebep olurken yabani ve mutant JAK2 mRNA'larının Nanoflare partiküllerince tutulması JAK2 anlatımının azalmış görünmesine sebep olabilir.

JAK2 ile bağlantılı olarak STAT genlerinin anlatımları çalışmada incelendi. STAT'ların aktivasyonu pekçok farklı sitokin çeşidince sağlanmakta olup cGAS-STING uyarılmasıyla üretilen tip I interferonların asıl etkisi STAT1 ve STAT2 üzerinde olduğu belirtilmiştir (Rauch ve ark. 2013). Bu sebeple bu iki genin anlatımı üzerinde cGAS-STING ve JAK-STAT yolaklarının etkinliği araştırıldı. HEL hücre hattında elde

edilen sonuçlarda, *STAT1* ve *STAT2* gen anlatımlarında belli aralıklarda artış ve azalmalar gözlemlendi. Bu gen anlatım verileri ilgili diğer genler olan *JAK2* ve *STING* anlatımlarıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir ilişki gözlemlenemedi. Bu durum *JAK2V617F* mutasyonunu biallelik olarak taşıyan HEL hücrelerinde, *JAK-STAT* yolağının sürekli aktif olmasından doğan düzensizlikten kaynaklandığı düşünülebilir. *STAT* anlatımlarının *JAK-STAT* yolağı normal işleyen bir hücre hattında araştırılması ileride yapılacak çalışmalarda daha net sonuçlar verecektir.

IRF3 ve *NFKB1* transkripsiyon faktörleri *cGAS-STING* yolağı aracılığıyla, *STING*'e bağlanan *TBK1* proteinleri üzerinden aktive olmaktadır (Seoyun ve ark. 2021) Bu sebeple çalışmada bu genlerin anlatımları karşılaştırılmıştır. HEL hücre hattında elde edilen sonuçlarda, 2 saatlik mutant Cy3 partikülleriyle yapılan inkübasyon neticesinde *STING* ve *IRF3* genlerinin anlatımları önemli ölçüde artarken, *NFKB1*'de artışın *STING* ve *IRF3*'e göre daha az olduğu, *TBK1*'de ise anlamlı bir değişimin olmadığı gözlemlendi. SET2 hücre hattında ise *IRF3*'ün yine 2. saatte önemli ölçüde arttığı görüldü. Aynı zamanda HEL'in aksine Cy5 yabancı tip *JAK2* nanopartikülleriyle inkübe koşullarında da *IRF3*'ün, özellikle erken saatlerde, arttığı gözlemlendi. HEL hücre hattında yabancı tip *JAK2* mRNA'sı bulunmadığından, bu durum beklentilerle örtüşmektedir. K562'de ise *IRF3* anlatımının değişmediği ve hatta belli saatlerde azaldığı gözlemlendi. Bu sonuçla K562 hücre hattında *cGAS-STING* aktivasyonu üzerinden *IRF3* anlatımının etkilenmediği sonucuna varıldı. HEL ve SET2'de ise *cGAS-STING* yolağının erken evrelerde aktif olduğu, bu aktivitenin ilerleyen inkübasyon sürelerinde azaldığı gösterildi.

Bu çalışmayla literatürde ilk defa Nanoflare partiküllerinin taşıdıkları oligonükleotitler aracılığıyla *GAS-STING* yolağını aktive etme kapasitesi test edilmiştir. Sonuç olarak nanopartiküller ile yapılan uygulama sonucunda *cGAS-STING* yolağıyla ilişkili genlerin anlatımlarında değişimler gözlemlendi. Yolak genlerinde meydana gelen anlatım değişimlerindeki düzensizlik, Nanoflarelerin hücre içine giriş oranlarındaki farklılıklar sonucu *cGAS-STING* yolağını aktive edici çift zincirli yapıların farklı oranlarda oluşmasına bağlandı. Genel olarak mutant Nanoflareler ile yapılan inkübasyonlarda elde edilen *cGAS* ve *STING* genlerindeki artışın daha yüksek olması sürekli aktif *JAK2* proteinlerin üretiminin, nanopartiküllerce mRNA düzeyinde bloklanmasına bağlandı. Bu durum *JAK-STAT* yolağının *cGAS-STING* üzerindeki baskılayıcı etkisini destekleyici bir sonuç olarak yorumlandı. Literatüre göre

interferonlar tarafından interferon reseptörleri aracılığıyla aktive olan JAK-STAT yolağının, cGAS-STING tarafından üretimi tetiklenmiş interferonlarca olduğunu destekleyici net bir sonuç alınamamıştır. Test edilen hücre hatları değiştirilerek veya hasta ve sağlıklı bireylerden alınan örnekler üzerinden bir karşılaştırma yapılması bu konu hakkında daha kesin verilerin elde edilmesini sağlayacaktır. Bu amaçla ileride yapılacak çalışmalarda hasta bireylerden alınacak örneklerin kullanılması planlanmaktadır. Bu çalışmada elde edilen gen anlatım verilerinin daha anlamlı ve değerli kılacak olması açısından ilerideki çalışmalarda cGAS-STING yolağında görevli elemanların protein düzeyindeki durumlarının araştırılması hedeflenmektedir.



KAYNAKLAR

- Asada, K., Ito, K., Yui, D., Tagaya, H., & Yokota, T. (2018). Cytosolic Genomic DNA functions as a Natural Antisense. *Scientific Reports*, 8(1). doi:10.1038/s41598-018-26487-1
- Bakhoun SF, Ngo B, Laughney AM, Cavallo JA, Murphy CJ, Ly P, Shah P, Sriram RK, Watkins TBK, Taunk NK, Duran M, Pauli C, Shaw C, Chadavada K, Rajasekhar VK, Genovese G, Venkatesan S, Birkbak NJ, McGranahan N, Lundquist M, LaPlant Q, Healey JH, Elemento O, Chung CH, Lee NY, Imielenski M, Nanjangud G, Pe'er D, Cleveland DW, Powell SN, Lammerding J, Swanton C, Cantley LC. Chromosomal instability drives metastasis through a cytosolic DNA response. *Nature*. 2018 Jan 25;553(7689):467-472. doi: 10.1038/nature25432. Epub 2018 Jan 17. PMID: 29342134; PMCID: PMC5785464.
- Barnaby SN, Sita TL, Petrosko SH, Stegh AH, Mirkin CA. Therapeutic applications of spherical nucleic acids. *Cancer Treat Res*. 2015;166:23-50. doi: 10.1007/978-3-319-16555-4_2. PMID: 25895863.
- Chenab, K. K., Eivazzadeh-Keihan, R., Maleki, A., Pashazadeh-Panahi, P., Hamblin, M. R., & Mokhtarzadeh, A. (2019). Biomedical applications of nanoflares: Targeted intracellular fluorescence probes. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 17, 342–358. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.02.006>
- Choi, C. H. J., Hao, L., Narayan, S. P., Auyeung, E., & Mirkin, C. A. (2013). Mechanism for the endocytosis of spherical nucleic acid nanoparticle conjugates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(19), 7625–7630. doi:10.1073/pnas.1305804110
- Cutler, J. I., Auyeung, E., & Mirkin, C. A. (2012). Spherical Nucleic Acids. *Journal of the American Chemical Society*, 134(3), 1376–1391. doi:10.1021/ja209351u
- Grabek, J., Straube, J., Bywater, M., & Lane, S. W. (2020). MPN: The Molecular Drivers of Disease Initiation, Progression and Transformation and their Effect on Treatment. *Cells*, 9(8), 1901. doi:10.3390/cells9081901
- Gürtler, C., & Bowie, A. G. (2013). Innate immune detection of microbial nucleic acids. *Trends in microbiology*, 21(8), 413–420. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.04.004>

- Harrison D. A. (2012). The Jak/STAT pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(3), a011205. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011205>
- Hin Tang, J. J., Hao Thng, D. K., Lim, J. J., & Toh, T. B. (2020). JAK/STAT signaling in hepatocellular carcinoma. *Hepatic Oncology*. doi:10.2217/hep-2020-0001
- Holmes, T. R., & Paller, A. S. (2020). Gene Regulation Using Spherical Nucleic Acids to Treat Skin Disorders. *Pharmaceuticals*, 13(11), 360. doi:10.3390/ph13110360
- Hopfner, K.-P., & Hornung, V. (2020). Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS–STING signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. doi:10.1038/s41580-020-0244-x
- Ishikawa, H., & Barber, G. N. (2008). STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature*, 455(7213), 674–678. doi:10.1038/nature07317
- Iurescia, S., Fioretti, D., & Rinaldi, M. (2018). Targeting Cytosolic Nucleic Acid-Sensing Pathways for Cancer Immunotherapies. *Frontiers in Immunology*, 9. doi:10.3389/fimmu.2018.00711
- Ivashkiv, L. B., & Donlin, L. T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature reviews. Immunology*, 14(1), 36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>
- Jeannin, P., Jaillon, S., & Delneste, Y. (2008). Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells. *Current Opinion in Immunology*, 20(5), 530–537. doi:10.1016/j.coi.2008.04.013
- Kapadia, C. H., Melamed, J. R., & Day, E. S. (2018). Spherical Nucleic Acid Nanoparticles: Therapeutic Potential. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*, 32(4), 297–309. <https://doi.org/10.1007/s40259-018-0290-5>
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology*, 5. doi:10.3389/fimmu.2014.00461
- Khoo, L. T., & Chen, L. (2018). Role of the cGAS–STING pathway in cancer development and oncotherapeutic approaches. *EMBO Reports*, e46935. doi:10.15252/embr.201846935
- Kwon, J., & Bakhoun, S. F. (2019). The Cytosolic DNA-Sensing cGAS–STING Pathway in Cancer. *Cancer Discovery*. doi:10.1158/2159-8290.cd-19-076z

- Li, H., Zhang, B., Lu, X., Tan, X., Jia, F., Xiao, Y., ... Mirkin, C. A. (2018). Molecular spherical nucleic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(17), 4340–4344. doi:10.1073/pnas.1801836115
- Lim, C. P., & Cao, X. (2006). Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Molecular BioSystems*, 2(11), 536. doi:10.1039/b606246f
- Luzhna, L., Kathiria, P., & Kovalchuk, O. (2013). *Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond*. *Frontiers in Genetics*, 4. doi:10.3389/fgene.2013.00131
- Maddali, M., Kulkarni, U. P., Ravindra, N., Jajodia, E., Arunachalam, A. K., Suresh, H., ... Balasubramanian, P. (2020). JAK2 exon 12 mutations in cases with JAK2V617F-negative polycythemia vera and primary myelofibrosis. *Annals of Hematology*. doi:10.1007/s00277-020-04004-7
- Maelfait, J., Liverpool, L., & Rehwinkel, J. (2019). Nucleic Acid Sensors and Programmed Cell Death. *Journal of Molecular Biology*. doi:10.1016/j.jmb.2019.11.016
- Majoros, A., Platanitis, E., Kernbauer-Hölzl, E., Rosebrock, F., Müller, M., & Decker, T. (2017). Canonical and Non-Canonical Aspects of JAK–STAT Signaling: Lessons from Interferons for Cytokine Responses. *Frontiers in Immunology*, 8. doi:10.3389/fimmu.2017.00029
- McLornan, D., Percy, M., & McMullin, M. F. (2006). JAK2 V617F: a single mutation in the myeloproliferative group of disorders. *The Ulster medical journal*, 75(2), 112–119.
- Mogensen T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews*, 22(2), 240–273. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>
- Nangalia, J., & Green, A. R. (2017). Myeloproliferative neoplasms: from origins to outcomes. *Blood*, 130(23), 2475–2483. doi:10.1182/blood-2017-06-782037.
- Ng, K. W., Marshall, E. A., Bell, J. C., & Lam, W. L. (2018). cGAS–STING and Cancer: Dichotomous Roles in Tumor Immunity and Development. *Trends in Immunology*, 39(1), 44–54. doi:10.1016/j.it.2017.07.013
- Niu, Z., Tang, W., Liu, T., Xu, P., Zhu, D., Ji, M., ... Xu, J. (2018). Cell-free DNA derived from cancer cells facilitates tumor malignancy through Toll-like receptor 9 signaling-triggered interleukin-8 secretion in colorectal cancer. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. doi:10.1093/abbs/gmy104

- O'Shea, J. J., Schwartz, D. M., Villarino, A. V., Gadina, M., McInnes, I. B., & Laurence, A. (2015). The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annual review of medicine*, 66, 311–328. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051113-024537>
- Pan W, Zhang T, Yang H, Diao W, Li N, Tang B. Multiplexed detection and imaging of intracellular mRNAs using a four-color nanoprobe. *Anal Chem* 2013;85:10581–8.
- Platanias, L. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5, 375–386 (2005). <https://doi.org/10.1038/nri1604>
- Rauch, I., Müller, M., & Decker, T. (2013). The regulation of inflammation by interferons and their STATs. *JAK-STAT*, 2(1), e23820. <https://doi.org/10.4161/jkst.23820>
- Roers, A., Hiller, B., & Hornung, V. (2016). Recognition of Endogenous Nucleic Acids by the Innate Immune System. *Immunity*, 44(4), 739–754. doi:10.1016/j.immuni.2016.04.002
- Ross, T. S., & Mgbemena, V. E. (2014). Re-evaluating the role of BCR/ABL in chronic myelogenous leukemia. *Molecular & cellular oncology*, 1(3), e963450. <https://doi.org/10.4161/23723548.2014.963450>
- Schadt, L., Sparano, C., Schweiger, N. A., Silina, K., Cecconi, V., Lucchiari, G., ... van den Broek, M. (2019). Cancer-Cell-Intrinsic cGAS Expression Mediates Tumor Immunogenicity. *Cell Reports*, 29(5), 1236–1248.e7. doi:10.1016/j.celrep.2019.09.065
- Scott, L. M., & Rebel, V. I. (2012). JAK2 and genomic instability in the myeloproliferative neoplasms: a case of the chicken or the egg?. *American journal of hematology*, 87(11), 1028–1036. <https://doi.org/10.1002/ajh.23243>
- Seferos, D. S., Giljohann, D. A., Hill, H. D., Prigodich, A. E., & Mirkin, C. A. (2007). Nano-Flares: Probes for Transfection and mRNA Detection in Living Cells. *Journal of the American Chemical Society*, 129(50), 15477–15479. doi:10.1021/ja0776529
- Seoyun Yum, Minghao Li, Yan Fang, Zhijian J. Chen. TBK1 recruitment to STING activates both IRF3 and NF-κB that mediate immune defense against tumors and viral infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Apr 2021, 118 (14) e2100225118; DOI: 10.1073/pnas.2100225118

- Sharma, B. R., Karki, R., & Kanneganti, T. (2019). Role of AIM2 inflammasome in inflammatory diseases, cancer and infection. *European Journal of Immunology*. doi:10.1002/eji.201848070
- Sidransky D. Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. *Science*. 1997 Nov 7;278(5340):1054-9. doi: 10.1126/science.278.5340.1054. PMID: 9353179.
- Silva, A., Lopes, C., Sousa Lobo, J., & Amaral, M. (2015). Nucleic Acids Delivery Systems: A Challenge for Pharmaceutical Technologists. *Current Drug Metabolism*, 16(1), 3–16. doi:10.2174/138920021666615040111
- Song, S., Peng, P., Tang, Z. et al. Decreased expression of STING predicts poor prognosis in patients with gastric cancer. *Sci Rep* 7, 39858 (2017). <https://doi.org/10.1038/srep39858>
- Sozer S, Aptullahoglu E, Shivarov V, Yavuz AS. In situ detection of JAK2V617F within viable hematopoietic cells using gold nanoparticle technology. *Int J Lab Hematol*. 2019 Aug;41(4):e95-e98. doi: 10.1111/ijlh.12991. Epub 2019 Mar 1. PMID: 30825256.
- Sun, H., Hong, M., Yang, Q., Li, C., Zhang, G., Yue, Q., ... Li, C.-Z. (2019). Visualizing the down-regulation of hTERT mRNA expression using gold-nanoflare probes and verifying the correlation with cancer cell apoptosis. *The Analyst*, 144(9), 2994–3004. doi:10.1039/c9an00204a
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., & Chen, Z. J. (2012). Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway. *Science*, 339(6121), 786–791. doi:10.1126/science.1232458
- Tremblay, D., Yacoub, A., & Hoffman, R. (2021). Overview of Myeloproliferative Neoplasms. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 35(2), 159–176. doi:10.1016/j.hoc.2020.12.001
- Van Etten, R. A., Koschmieder, S., Delhommeau, F., Perrotti, D., Holyoake, T., Pardanani, A., Mesa, R., Green, T., Ibrahim, A. R., Mughal, T., Gale, R. P., & Goldman, J. (2011). The Ph-positive and Ph-negative myeloproliferative neoplasms: some topical pre-clinical and clinical issues. *Haematologica*, 96(4), 590–601. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.035675>
- Viny, A. D., & Levine, R. L. (2014). Genetics of myeloproliferative neoplasms. *Cancer journal* (Sudbury, Mass.), 20(1), 61–65. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000013>

- Wan, D., Jiang, W., & Hao, J. (2020). Research Advances in How the cGAS-STING Pathway Controls the Cellular Inflammatory Response. *Frontiers in Immunology*, 11. doi:10.3389/fimmu.2020.00615
- Wang, H., Hu, S., Chen, X., Shi, H., Chen, C., Sun, L., & Chen, Z. J. (2017). cGAS is essential for the antitumor effect of immune checkpoint blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(7), 1637–1642. doi:10.1073/pnas.1621363114
- Wu, J., & Chen, Z. J. (2014). Innate Immune Sensing and Signaling of Cytosolic Nucleic Acids. *Annual Review of Immunology*, 32(1), 461–488. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120156
- Wu, X. A., Choi, C. H., Zhang, C., Hao, L., & Mirkin, C. A. (2014). Intracellular fate of spherical nucleic acid nanoparticle conjugates. *Journal of the American Chemical Society*, 136(21), 7726–7733. <https://doi.org/10.1021/ja503010a>
- Xia, T., Konno, H., Ahn, J., & Barber, G. N. (2016). Deregulation of STING Signaling in Colorectal Carcinoma Constrains DNA Damage Responses and Correlates With Tumorigenesis. *Cell Reports*, 14(2), 282–297. doi:10.1016/j.celrep.2015.12.029
- Yamaoka, K., Saharinen, P., Pesu, M., Holt, V. E., 3rd, Silvennoinen, O., & O'Shea, J. J. (2004). The Janus kinases (Jaks). *Genome biology*, 5(12), 253. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-12-253>
- Yang H, Wang H, Ren J, Chen Q, Chen ZJ. cGAS is essential for cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Jun 6;114(23):E4612-E4620. doi: 10.1073/pnas.1705499114. Epub 2017 May 22. PMID: 28533362; PMCID: PMC5468617.
- Yang, C.-A., Huang, H.-Y., Chang, Y.-S., Lin, C.-L., Lai, I.-L., & Chang, J.-G. (2016). DNA-Sensing and Nuclease Gene Expressions as Markers for Colorectal Cancer Progression. *Oncology*, 92(2), 115–124.
- Zhang, Wendy Y.L. and Suter, Manuel Adrian and Tan, Nikki Y. and Khatoo, Muznah and MacAry, Paul A. and Angeli, Veronique and Gasser, Stephan, cGAS–STING Cytosolic DNA Sensing Pathway Is Suppressed by JAK2-STAT3 in Tumor Cells (3/22/2020). Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3559534> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3559534>
- Zheng, J., Mo, J., Zhu, T. et al. Comprehensive elaboration of the cGAS-STING signaling axis in cancer development and immunotherapy. *Mol Cancer* 19, 133 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01250-1>
- Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, Smyth MJ, Kroemer G. Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol*. 2015 Jul;15(7):405-14. doi: 10.1038/nri3845. Epub 2015 Jun 1. PMID: 26027717.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

MİYELOPROLİFERATİF NEOPLAZİLERDE JAK2 VE JAK2V617F
MRNA HEDEFLİ NANOPARTİKÜL UYGULAMASININ CGAS-STING
YOLAĞINA ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 6	% 6	% 1	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 2
2	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	www.docstoc.com İnternet Kaynağı	% 1
4	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
5	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
7	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
8	Sobhan Ghafourian. "Hth-xre Toxin Antitoxin Loci And Many Unevaluated Toxin Antitoxin Loci In Pseudomonas Aeruginosa B136-33-	<% 1

