



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BMAL1'in BEYİN HASARI SONRASI ROLÜNÜN
PROTEOMİK AÇIDAN İNCELENMESİ**

ELİF ÖZBAY

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üye. MUSTAFA ÇAĞLAR BEKER

İSTANBUL – 2021

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

ELİF ÖZBAY

İTHAF



“Bu tez

ÖZBAY ailesine ithaf edilmiştir...”

TEŞEKKÜR

Ekibine dahil olma onurunu ve minnettarlığını bana bahşeden, zekasına ve bilimsel düşünce yapısına hayran olduğum, hocam olduğu için gurur duyduğum ve inanılmaz mutlu olduğum, başarısından ilham aldığım değerli hocam sayın Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Muazzam bir motivasyon sağlayarak yoluma ışık tutan, eğitim hayatımda eşsiz kapılar aralayarak değerli bilgilere sahip olmamı sağlayan, bana her daim yol gösteren; bilgi, birikim ve tecrübelerini benden esirgemeyen ve değerli vaktini ayırarak bu tezi yazabilmemde en büyük katkıya sahip olan danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üye. Mustafa Çağlar BEKER'e en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca, ekibin bir parçası olmaktan bir gün bile pişmanlık duymadığım Kılıç Lab üyelerine; Dr. Öğr. Üye. Ahmet Burak ÇAĞLAYAN, Dr. Öğr. Üye. Taha KELEŞTEMUR, Dr. Öğr. Üye. Berrak ÇAĞLAYAN, Nilay ATEŞ, Aysun ÇAĞLAYAN, Serdar ALTUNAY, Mehmet Özgen ALTINTAŞ, Zeynep BALÇIKANLI, İrem ÇULHA TAŞKIN ve Elif SERTEL'e en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Proteomik alanındaki bilgilerini bana aktararak bu alanda yetişmemi sağlayan Dr. Melike DİNÇ'e teşekkürlerimi borç bilirim.

Laboratuvarda bana her daim yardımcı olan, birlikte çalışması keyifli partnerim Hayriye Ecem YELKENCİ'ye teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak; sonsuz destekleri ve sevgileri ile ellerindeki her imkânı bana sunarak başarılarımda ve benim bugün olduğum kişi olmamda en büyük paya sahip olan, ne olursa olsun her kararımda arkamda duran sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI FORMU	i
BEYAN	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
TABLolar LİSTESİ	xiii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Sirkadiyen Ritim.....	4
4.1.1. Sirkadiyen ritmin moleküler mekanizması	4
4.1.2. Sirkadiyen ritim ve nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkisi	5
4.1.3. Bmal1'in sirkadiyen ritimde ve nörodejeneratif süreçlerdeki rolü	5
4.1.4. Sirkadiyen ritim ve beyin felci	5
4.2. Beyin Felci.....	6
4.2.1. Beyin felci patofizyolojisi	7
4.2.1.1. Enerji Yetersizliği ve Eksitotoksisite.....	9
4.2.1.2. Oksidatif hasar	10
4.2.1.3. Peri-infarakt depolarizasyonu	10

4.2.1.4. İnflamasyon.....	10
4.2.1.5. Penumbra'da apoptoz.....	11
5. GEREÇ ve YÖNTEM.....	13
5.1. Deney Dizaynı ve Deney Grupları	13
5.1.1. Deney grupları.....	13
5.1.2. Deney dizaynı.....	14
5.2. Lentivirüs Üretimi	16
5.2.1. Hücre hattından total RNA izolasyonu	16
5.2.2. cDNA sentezi	16
5.2.3. Primer dizaynı	17
5.2.4. Bmal1 için polimeraz zincir reaksiyonu.....	18
5.2.5. Jelden Bmal1 izolasyonu.....	22
5.2.6. Lentiviral vektör ve Bmal1 PZR ürünü ikili kesimi.....	22
5.2.7. Bmal1 ve plazmid DNA saflaştırılması.....	23
5.2.8. Ligasyon reaksiyonu.....	24
5.2.9. Kompetent bakteri hazırlama	25
5.2.10. Transformasyon.....	26
5.2.11. Bakteriden düşük ölçekli plazmid izolasyonu.....	26
5.2.12. Kesim enzimleri ile DNA konfirmasyonu.....	27
5.2.13. Lentiviral vektörlerin çoğaltılması	28
5.2.14. Bakteriden yüksek ölçekli plazmid izolasyonu	28
5.2.15. Virüs üretimi ve paketlenmesi.....	29
5.2.16. Titrasyonun belirlenmesi	31

5.3. Beyin içi Enjeksiyon Yöntemiyle Lentivirüs Verilmesi.....	31
5.4. Beyin Felci Metodu.....	32
5.5. Beyinlerin Cryostat Cihazı ile Kesimi ve İşlenmesi.....	33
5.6. NeuN Boyaması ile Nöronal Sağkalım Analizi.....	33
5.7. TUNEL Boyaması ile Apoptoz Tayini.....	33
5.8. Western Blot.....	34
5.9. Eş-İmmünpresipitasyon (co-IP) Yöntemi.....	35
5.10. FASP Protokolü.....	36
5.11. LC-MS/MS Analizi.....	37
5.12. İstatistiksel Analizler.....	38
6. BULGULAR	39
6.1. Lenti-viral Bmal1 Etkileşimi.....	39
6.2. Bmal1 Protein Analizi.....	40
6.3. OSAO Boyunca Lazer Doppler Akış Takibi.....	42
6.4. Nöronal Sağkalım Analizi.....	43
6.5. DNA Fragmantasyon Analizi.....	45
6.6. Eş-immünpresipitasyon analizi.....	47
6.7. Proteomik analizler.....	50
7. TARTIŞMA	52
8. SONUÇ	57
9. KAYNAKLAR.....	59
10. ETİK KURUL ONAYI	65
11. ÖZGEÇMİŞ.....	66

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ACN	Asetonitril
ADP	Adenozin Difosfat
AIF	Apoptoz İndükleyici Faktör
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
APAF-1	Apoptotik Protein Aktive edici Faktör-1
ATP	Adenozin Trifosfat
Bmal1	Brain and Muscle ARNT-Like protein 1
Ca ⁺²	Kalsiyum İyonu
Cl ⁻	Klor İyonu
CLOCK	Circadian Locomoter Output Cycles Protein Kaput
Co-IP	Eş-immünpresipitasyon
CytC	Sitokrom C
DIA	Data Independent Acquisition
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
FA	Formik Asit
FASP	Filtre Yardımlı Örnek Hazırlama Protokolü
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
H ⁺	Hidrojen İyonu
HIF-1	Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör-1
IAA	İyot Asetamid

IL-1 β	Interleukin-1 β
K ⁺	Potasyum İyonu
LC	Sıvı Kromatografisi
LDF	Lazer Doppler Akışmetre
MCAO	Middle Cerebral Artery Occlusion
MS	Kütle Spektrometresi
Na ⁺	Sodyum İyonu
NeuN	Nöron Spesifik Nükleer Antijen
NMDA	N-metil D-aspartat
NO	Nitrik Oksit
NPAS2	Neuronal PAS domain containing protein 2
NF- κ B	Nükleer Faktör Kappa B
OSA	Orta Serebral Arter
OSAO	Orta Serebral Arter Oklüzyonu
PANTHER	Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships
PARP	Adenozin Difosfat (ADP)-Riboz Polimeraz
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PFA	Paraformaldehit
PLGS	ProteinLynx Global Server
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribo Nükleik Asit
RFP	Kırmızı Floresan Proteini
SKN	Supra Kiazmatik Nükleus

SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü- α
TUNEL	Terminal Transferase Biotinylated-dUTP nick end labeling



ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 4.2.1.1. İskemik beyin felci sonrası kor ve penumbra bölgeleri.....	7
Şekil 4.2.1.2. İskemi patofizyolojisi kaskad mekanizmaları	8
Şekil 5.1.2.1. Moleküler klonlama ve lentivirüs üretimi	14-15
Şekil 5.1.2.2..Deney dizaynı	15
Şekil 5.2.3.1. pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vektör bileşenleri.....	18
Şekil 5.2.4.1.Bmal1 jel elektroforez görüntüsü	20
Şekil 5.2.4.2. Amplifikasyon sonrası Bmal1 jel elektroforez görüntüsü.....	21
Şekil 5.2.8.1. Ligasyon reaksiyonu için gereken Bmal1 DNA miktarı hesaplaması. 24	24
Şekil 5.2.8.2. Ligasyon reaksiyonu için gereken DNA miktarı hesaplama formülü...24	24
Şekil 5.2.15.1. psPAX2 paketleme plazmidi	30
Şekil 5.2.15.2. pMD2.G zarf plazmidi.....	30
Şekil 5.4.1. OSAO metodu kullanılarak gerçekleştirilen beyin felci modeli.....	32
Şekil 5.9.1. Eş-immünpresipitasyon (co-IP) analizi yöntem akış şeması	36
Şekil 6.1.1. GFP ve RFP ile işaretlenmiş Bmal1 özellikli hücreler.....	39
Şekil 6.2.1. Lentivirüs transfeksiyonu sonrası Bmal1 protein ifadesi değişimi	40
Şekil 6.2.2. shBmal1 lentiviral vektörlerinin Bmal1 seviyesi üzerine olan etkileri ..	41
Şekil 6.3.1. Serebral kan akımının Lazer Doppler aracılığıyla takibi	42
Şekil 6.4.1. NeuN boyaması ile iskemik striatumda nöronal sağkalım analizi.....	43
Şekil 6.4.2. NeuN boyaması ile iskemik striatumda nöronal sağkalım analizi.....	44
Şekil 6.5.1. TUNEL ile apoptotik hücre ölümü analizi (LvGFP-LvBmal1)	45
Şekil 6.5.2. TUNEL ile apoptotik hücre ölümü analizi (scRNA-shBmal1)	46

Şekil 6.6.1. co-IP analizi ile belirlenmiş Bmal1 ile etkileşimli proteinler listesi...47-48	
Şekil 6.6.2. Bmal1 ile etkileşimli proteinlerin sınıflandırılması..... 49	49
Şekil 6.7.1. LC-MS/MS analizi sonucu belirlenen proteinlerin listesi 50	50
Şekil 6.7.2. LC-MS/MS analizi sonucu belirlenen proteinlerin listesi 51	51



TABLolar LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 5.2.2.1. cDNA sentez tepkimesinde kullanılan içeriklerin miktarları.....	17
Tablo 5.2.2.2. cDNA sentez tepkimesi için sağlanan koşullar	17
Tablo 5.2.4.1. PZR reaksiyon bileşenleri	19
Tablo 5.2.4.2. PZR reaksiyon koşulları	19
Tablo 5.2.4.3. PZR reaksiyon koşulları	20
Tablo 5.2.6.1. İkili kesim reaksiyonu bileşenleri	23
Tablo 5.2.7.1. Bma11 ve vektör konsantrasyonları.....	23
Tablo 5.2.8.1. Ekspresyon plazmidi yapım reaksiyonu için gereken bileşenler.	25
Tablo 5.2.12.1. Konfirmasyon reaksiyonu bileşenleri	27

1. ÖZET

BMAL1'in BEYİN HASARI SONRASI ROLÜNÜN PROTEOMİK AÇIDAN İNCELENMESİ

Sirkadiyen ritim, iç ve dış uyarılara bağlı olarak hemen hemen tüm fizyolojik durumlarımızı kontrol eden önemli bir biyolojik saattir. Bunun yanı sıra, sirkadiyen ritmin özellikle beyin felci gibi nörodejeneratif hastalıkların görülmesinde ve bu hastalıklar sonrasında gelişen patofizyolojik süreçlerde önemli bir rolünün olduğu düşünülmektedir. Beyin felci dünyada ölüm nedenleri bakımından ikinci sırada yer alan ve kısıtlı bir tedavi imkânı bulunan bir hastalıktır. Bu nedenle beyin felci patofizyolojisini etkileyen faktörler ve uygulanabilir tedavi yöntemlerinin araştırılması, günümüzün araştırma konuları arasında yer almaktadır. Bu tez kapsamında; sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde önemli bir rolü bulunan BMAL1 proteininin beyin hasarı sonrası hücre içi sinyal yolları üzerine olan etkisinin proteomik araçlarla araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla BMAL1 protein seviyesini arttırmak veya azaltmak için dizayn edilen lentiviral vektörler beyin içi enjeksiyon yöntemiyle 8-12 haftalık erkek C57BL/6 farelerine uygulanmıştır. Enjeksiyondan 7 gün sonra farelere 30 dakikalık orta serebral arter tıkanmasını takiben 72 saat reperfüzyon uygulanmıştır. Striatum seviyesinden alınan koronal beyin kesitlerden nöronal sağkalım ve DNA fragmentasyonu değerlendirilmiştir. Ayrıca, striatumdan alınan doku örneklerinden sıvı kromatografisi- kütle spektrometresi aracılı proteomik analizler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, BMAL1 protein seviyesinin artmasıyla nöronal sağkalımın değişmediği fakat apoptotik hücre ölümünün baskılandığı; BMAL1 protein seviyesinin baskılanmasıyla nöronal sağkalımın azaldığı ve apoptotik hücre sayısının arttığı gösterilmiştir. Ek olarak, BMAL1 proteinin direkt veya dolaylı olarak etkileşimde bulunan 178 protein belirlenmiştir. Ayrıca BMAL1 protein seviyesinin artmasıyla 19, baskılanmasıyla 32 proteinin istatistiksel olarak anlamlı değiştiği gösterilmiştir. Elde edilen bulguların sirkadiyen ritim ve beyin felci patofizyolojisi arasındaki ilişkinin ve sinyal yollarının aydınlatılmasına katkı sağlaması beklenmektedir.

Anahtar Sözcükler: Beyin Felci, Bmal1, Kütle Spektrometresi, Proteomik, Sirkadiyen Ritim

Bu tez TÜBİTAK 118S306 numaralı proje kapsamında yapılmıştır.

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ROLE OF BMAL1 FOLLOWING BRAIN INJURY USING PROTEOMIC APPROACHES

Circadian rhythm is an essential biological clock that regulates almost all our physiological conditions depending on internal and external stimuli. Also, it may play a critical role in both the triggering of neurodegenerative diseases and the pathophysiological processes that develop after these diseases. Stroke is the second leading cause of death worldwide and has limited treatment options. For this reason, studies on the treatment of cerebral ischemia gain importance. Within this thesis's scope, it aims to investigate the effect of BMAL1 protein, which has a significant role in the regulation of circadian rhythm, on intracellular signaling pathways after brain injury with a proteomic approach. For that purpose, lentiviral vectors were designed and injected intrastrially to 8-12 weeks male C57BL/6 mice to increase or suppress the expression of Bmal1. Seven days after injection, mice were submitted to 30 min of middle cerebral artery occlusion, followed by 72 hours reperfusion. Neuronal survival and DNA fragmentation were evaluated from coronal brain sections taken from the striatum level. In addition, liquid chromatography-mass spectrometry based proteomic analyzes were performed. According to the results, neuronal survival did not change with the increase of BMAL1 protein level, but apoptotic cell death was decreased. Additionally, the inhibition of Bmal1 expression induces apoptotic cell death and reduces neuronal survival. Moreover, 178 proteins were identified, which directly or indirectly interact with BMAL1. Nineteen proteins were significantly altered by Bmal1 overexpression, and 32 proteins were significantly changed by BMAL1 inhibition. It is expected that the data obtained from this thesis will contribute to elucidating the relationship between circadian rhythm signaling and the pathophysiology of cerebral ischemia.

Keywords: Bmal1, Circadian Rhythm, Mass Spectrometry, Proteomics, Stroke

This thesis is funded by TUBITAK 118S306 project.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Sirkadiyen ritim; mevsimsel değişiklikler, aydınlık-karanlık döngüsü gibi dış etkenlerden etkilenebilen ve vücudun uyku-uyanıklık döngüsü, vücut sıcaklığı, hormon salınımları gibi birçok fizyolojik durumumuzu etkileyen endojen ve biyolojik bir saattir (1). Bmal1 ve CLOCK transkripsiyon faktörleri bu biyolojik ritmin düzenlenmesinde rol oynayan başlıca iki önemli faktördür (1, 2). Literatürde yer alan çalışmalarda beyin felci vakalarının görülme sıklığının sirkadiyen ritme bağlı olarak değişim gösterdiği bilinmektedir. 24 saatlik döngü içerisinde beyin felci en çok sabah en az ise gece saatlerinde görülmektedir. Bu gözlemler beyin felcinin tetiklenmesinde hangi faktörlerin görevinin olduğunu araştırmaya yönelik klinik gözleme dayalı yapılan çalışmalardır. Sirkadiyen ritmin beyin felcinin tetiklenmesindeki rolü bilinmeye başladıktan sonra biyolojik ritme bağlı olarak iskemi sonrası gelişen beyin hasarının büyüklüğüne ve nöronal hasara yönelik çalışmalarda ciddi eksiklikler bulunmaktaydı. Buna bağlı olarak sirkadiyen ritmin beyin felci sonrası gelişen hasar mekanizmaları üzerine etkileri ise 2018 yılında yapılan bir çalışmayla gösterilmiştir (3).

Sirkadiyen ritmin hem belirlenmesinde hem de devam ettirilmesinde önemli bir görevi bulunan Bmal1 proteininin beyin felci patofizyolojisinde de önemli bir rolünün olabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla yapmak istediğim yüksek lisans tezimde Bmal1 ifadesi artırılması veya azaltılması amacıyla hazırlanmış lentiviral vektörlerin beyin içi enjeksiyon yöntemi ile farelere verilmesi ve sonrasında OSAO (orta serebral arter oklüzyonu) modeli ile gerçekleştirilecek beyin hasarı sonrası yapılacak olan proteomik analizler ile hücre içi sinyal yolları üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. İskemik dokuda Bmal1 protein artışına veya azalışına bağlı olarak değişen protein profili sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Bu tez kapsamında elde edilen sonuçların sirkadiyen ritim ve beyin felci patofizyolojisi arasındaki ilişkinin aydınlatılmasının yolunu açmak için hedef proteinlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Sirkadiyen Ritim

Sirkadiyen ritim organizmaların iç fizyolojik süreçlerini dış ortamdaki gelen uyarılara bağlı olarak hassas bir şekilde senkronize eden biyolojik bir saattir. Bu biyolojik saat gün içerisindeki aydınlık-karanlık döngüsü, mevsimsel değişiklikler ve beslenme gibi dış uyarılara bağlı olarak kendi ritmini düzenlemektedir (4, 5). Sirkadiyen ritme bağlı olarak gün içerisinde değişen kalp ritmi, hormonal değişim, pıhtılaşma gibi faktörler serebrovasküler hastalıkların tetiklenmesine neden olmaktadır (6). Sirkadiyen ritmin senkronizasyonu; çok sayıda moleküler, fizyolojik, hormonal ve davranışsal süreci içinde barındırır ve bu süreçlerin düzenlenmesi ile ilgilidir. Sirkadiyen ritmin düzenlenmesi, aydınlık ve karanlık döngüsü ile bağlantılı olarak hipotalamusta bulunan supra kiazmatik nükleus (SKN) ve pineal bezin de içinde bulunduğu retinohipotalamik pineal yolak aracılığı ile gerçekleşmektedir (7).

4.1.1. Sirkadiyen ritmin moleküler mekanizması

Sirkadiyen ritim moleküler olarak saat genlerinin aktivasyonu ile kontrol edilen biyolojik bir döngüdür. Sirkadiyen ritmin düzenlenmesinden ve devam ettirilmesinden sorumlu birçok gen ve transkripsiyon faktörü tanımlanmıştır (8).

Sirkadiyen ritmin düzenlenmesi transkripsiyon faktörlerinin geri besleme döngüsü (feedback) ile birbirlerinin seviyelerini etkilemesine dayanmaktadır. Transkripsiyon faktörü BMAL1 (Brain and muscle ARNT-like protein 1) ve heterodimer partneri olarak görev alan CLOCK (Circadian locomotor output cycles kaput) veya NPAS2 (Neuronal PAS domain containing protein 2) moleküler seviyede Period (Per1, Per2, Per3) ve Cryptochrome (Cry1 and Cry2) genlerinin transkripsiyonlarını kontrol etmektedir. PER ve CRY proteinleri negatif feedback döngüsüne bağlı olarak BMAL1/CLOCK protein seviyesini baskılamaktadır. Bu sayede sirkadiyen ritim proteinlerinin ifadeleri ritmik olarak artış ve azalış göstermektedir (9, 10).

4.1.2. Sirkadiyen ritim ve nörodejeneratif hastalıklar ile ilişkisi

Nörodejeneratif hastalıklar sirkadiyen ritmin bozulmasına sebep olmaktadır. Bu bilgi doğrultusunda sirkadiyen ritmin düzenlenmesi ile nörodejeneratif hastalıklar arasında güçlü bir bağ olduğu düşünülmektedir (11). Literatürde, uyku ve uyanıklık durumunun sirkadiyen ritim düzenlenmesi üzerinden; nörotransmitter salınımlarını ve hücre içi sinyal yollarını etkileyerek Alzheimer, Parkinson, Huntington, Multipl skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklara neden olabileceği ile ilgili çalışma mevcuttur (12).

4.1.3. Bmal1'in sirkadiyen ritimde ve nörodejeneratif süreçlerdeki rolü

Bmal1 proteininin moleküler teknikler kullanılarak baskılanmasıyla beyinde çoğu transkripsiyon paterni değişerek; nöropatoloji, davranışsal anomaliler ve sinaptik dejenerasyonlar gibi sonuçlara neden olmuştur (13). Ayrıca, oksidatif stres ve redoks savunma genlerinin düzenlenme mekanizmalarının işlevini yitirdiği gösterilmiştir (14).

Bmal1 protein polimorfizminin Parkinson hastalık riskine katkı sağladığı veya eşlik ettiği düşünülmektedir (15). Bunun yanında sirkadiyen ritim genlerinin depresyon ve Alzheimer gibi nörokognitif hastalıklarda rol oynadığı düşünülen genlerin regülasyonuna da katıldığı düşünülmektedir (16, 17). Ek olarak; beyin felci, Alzheimer, Parkinson ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisinde rol oynamaktadır.

4.1.4. Sirkadiyen ritim ve beyin felci

Sirkadiyen ritme bağlı olarak değişen kan basıncı, kalp atım hızı, vücut sıcaklığı ve trombosit birikimi gibi faktörlerin beyin felcinin tetiklenmesinde önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (18). Buna bağlı olarak beyin felci vakalarının %44'ü gibi büyük bir bölümü sabah saatlerinde görülmektedir. Ayrıca literatürde yapılmış olan bir çalışmada beyin felci sonrası gelişen hasarın sirkadiyen ritim ile bağlantılı olarak değiştiği gösterilmiştir (3). Yapılan bu çalışmada gece (00:00) beyin felci

geçiren farelerde sabah beyin felci geçiren (06:00) farelere göre nöronal sağkalımın arttığı, apoptotik hücre ölümünün ise azaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca sabah beyin felci geçirenlere göre gece beyin felci geçiren farelerde sirkadiyen ritim proteinleri Bmal1, Per1 ve CLOCK proteinlerinin seviyeleri arttığı ve bunlarla beraber nöronal sağkalımın arttığı, apoptotik hücre sayısının ise azaldığı gösterilmiştir (3).

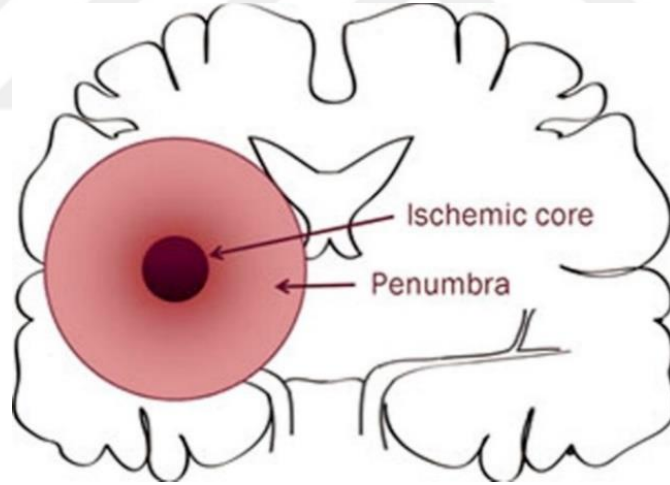
4.2. Beyin Felci

Dünya Sağlık Örgütü (WHO; World Health Organization) son 10 yıl verilerine göre; beyin felci, ölüm oranı bakımından 2. sırada yer almaktadır. WHO ve Amerikan Kalp Vakfı'nın (American Heart Association; AHA) verilerine göre her yıl yaklaşık olarak 6 milyon insan beyin felci ile karşılaşmaktadır (19). TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) 2018 verilerine göre ülkemizde her 14 dakikada 1 kişi beyin felcinden dolayı hayatını kaybetmektedir. Yüksek ölüm oranı ile birlikte, yüksek orandaki hastalık ve engellilik durumları, beyin felcinin insan sağlığını başlıca tehdit eden ciddi bir hastalık olduğunu göstermektedir (20). Dünya popülasyonunda yaşlanmadaki artış ile beyin felci vakalarının artışı beklenen bir sonuçtur. Ayrıca, modern dünyada değişen yaşam koşulları ile birlikte daha genç yaşlarda görülmekle birlikte, yetişkinlerde erken ölüm ve maluliyete neden olmaktadır (21). Üç beyin felci vakasının 1'i ölüm ile sonuçlanırken; hayatta kalanlar ciddi sağlık problemleri ile yaşamını devam ettirmek zorunda kalmaktadır (22). Beyin felci geçiren hastaların önemli bir kısmı, yaşamlarını bağımsız olarak sürdürememekte; tedavi giderleri ve iyileşme çalışmaları ile hem ekonomik hem de toplumsal olarak yük oluşturmaktadırlar.

İskemik beyin felci, beyinde ilgili arterin etkilediği bölgede serebral kan akışının geçici veya kalıcı olarak azalması sonucu oluşur. Kan akışındaki düşüş genellikle serebral arterin kan pıhtısı ile tıkanması (emboli) ya da kan damarlarının bölgesel olarak daralması (tromboz) nedeniyle meydana gelir. Tıkanıklık sonucu oluşan ve iskemik inme olarak adlandırılan vakalar, toplam vakaların %80'ini oluştururken; geri kalan %20'lik kısım beyinde kanama şeklinde (hemorajik felç) meydana gelmektedir (23).

4.2.1. Beyin felci patofizyolojisi

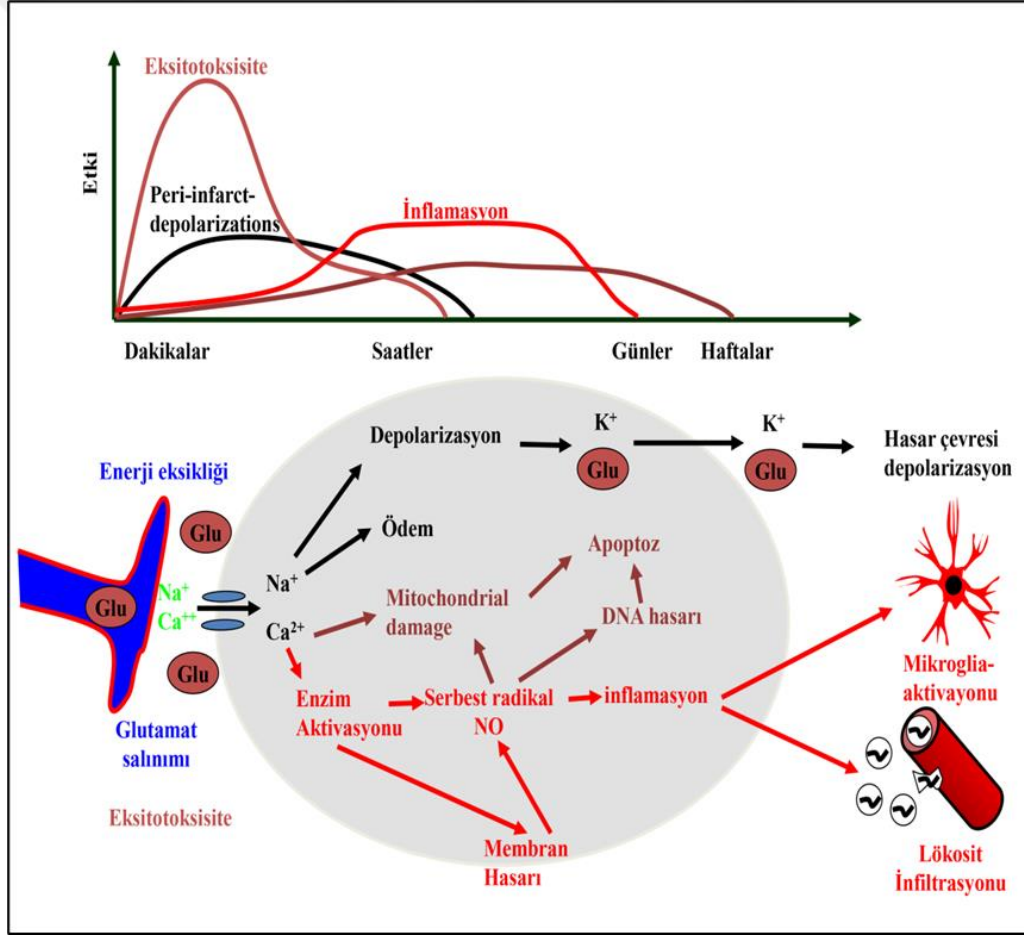
İnsan beyninin, metabolik aktivitelerini yerine getirebilmesi için kesintisiz bir enerji kaynağına ihtiyacı vardır. Bu enerjinin neredeyse tamamı glikoz formunda sağlanır. Beyindeki enerji, iyon hareketliliğini sağlayarak; sinaptik ve aksiyon potansiyeller oluşturmak ve devam ettirilmesini sağlamak amacıyla kullanılır. Bu enerji kullanımı ise, vücudun bazal metabolizması göz önüne alındığında yüzde 20 seviyesindedir. Vücut ağırlığının %2'lik kısmını oluşturduğu halde en çok enerji ihtiyacı olan ve en çok enerji tüketen organ konumundadır (24-26). Beyin, vücudun sağladığı glikozun yaklaşık %80'ini kullanmaktadır. Enerji üretimi tamamen pirüvatın oksidatif fosforilasyonu ile sağlanır. Buradan yola çıkılarak, beyin fizyolojisinde en önemli diğer bir faktör oksijendir. Oksijen yokluğu veya azlığı, beyinde normal işleyişin sekteye uğramasına neden olur. İskemi durumunda meydana gelen oksijen ve glikoz yoksunluğu hasarın ana sebebidir (27-29).



Şekil 4.2.1.1. İskemik beyin felci sonrası kor ve penumbra bölgeleri (34).

İskemi, hücre membranı yapısının bozulmasıyla ve nöronal hücre ölümü ile sona eren; iskemik kaskad adı verilen karmaşık ve art arda meydana gelen hasar mekanizmalarının tetiklenmesine neden olur. Reperfüzyon, diğer bir deyişle bölgeye kan akışının tekrar sağlanması, hasar onarım ve iyileşme yönündeki süreçler için önemli bir yere sahiptir. Diğer yandan; iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarı olarak

adlandırılan ikincil bir hasara neden olur. Hasar sonrası bölge, patofizyolojik olarak iki ana kısma ayrılır: kor bölge ve penumbra (30). Kor bölge; hücelere oksijen ve glikoz taşınmasının tamamen durduğu ve hasardan birincil olarak etkilenen bölgedir. Bundan dolayı nekrotik hücre ölümü (infarkt) çoğunlukla bu bölgede oluşur. İnfarkt alan çevresi penumbra olarak adlandırılır ve kor bölgenin periferinde yer alır. Bu alan, kollateral kan damarları tarafından desteklediği için ani hücre ölümüne karşı korunmaktadır. Penumbra'daki hücreler iskemi sonrası hemen ölmemiş fakat hasar almış hücreler olduğundan; burada nekrotik hücre ölümüne nazaran apoptotik hücre ölümü gözlemlenmektedir. Bu nedenle, beyin felci tedavileri için gerçekleştirilen çalışmalarda penumbra bölgesindeki hücrelerin kurtarılması amaçlanmaktadır (31-33).



Şekil 4.2.1.2 İskemi patofizyolojisi kaskad mekanizmaları. Dirnagl ve ark. 1999 yılındaki çalışmasından uyarlanmıştır (27).

İlgili bölgenin kan damarları ile beslenmesi azaldığında kan-beyin bariyeri bozulması, mikrovasküler hasar ve inflamasyon ile sonuçlanan eksitator ve oksidatif hasar meydana gelir. Hasarın şiddeti; iskeminin süresine ve beynin kendini onarma yeterliliğine göre farklılık gösterir (34).

4.2.1.1. Enerji yetersizliği ve eksitotoksisite

İskemik bölgeye oksijen ve glikoz azalması ile hücreler, enerji yetersizliğinden dolayı iyon konsantrasyon dengesini ve iyon hareketliliğini sağlayamaz duruma gelir ve hücre membran potansiyelleri kaybedilir. Bunun sonucunda glia ve nöron hücreleri depolarize olurlar (35). Presinaptik voltaj kapılı kalsiyum (Ca^{+2}) kanalları aktive olur ve ekstraselüler boşluğa eksitator amino asitlerin salınımı gerçekleşir. Bölgeye enerji sağlanamamasından dolayı eksitator amino asitlerin presinaptik geri alımı gibi enerji gerektiren süreçlerde aksama meydana gelir ve eksitator amino asit olan glutamatın ekstraselüler boşlukta birikimi zamanla artar. Bu durum, glutamat eksitotoksisitesi olarak adlandırılır (36, 37).

Aşırı miktarda Ca^{+2} yüklenmesine bağlı olarak NMDA (N-metil- D-aspartat) ve metabotropik glutamat reseptörleri aktive olur. Glutamat kaynaklı aşırı faaliyet sonucu, tek değerlikli iyon kanalı olan AMPA (a-amino-3-hidroksi-5-metilisoksazol-4 propionik asit) reseptörleri de uyarılarak nöronların içine sodyum (Na^{+}) ve klor (Cl^{-}) iyonlarının akışı gerçekleşir. Hücre içine Na^{+} ve Cl^{-} akışı, NaCl tuzunun oluşumuna sebebiyet vererek suyun da hücre içine çekilmesine ve sitotoksik ödem oluşumuna yol açar. Ödem, beyin felci patofizyolojisinde en erken belirteç olup, intrakraniyal basınç artışına neden olur (27).

Kalsiyum iyonunda ve buna bağlı olarak ikincil haberci moleküllerinde olan artış, aktin ve spektrin gibi hücre iskeleti proteinlerinin ve laminin gibi ekstraselüler matriks proteinlerinin degradasyonuna neden olan proteolitik enzimleri aktive eder; bu durum, hücre membranının hasarlanması ile sonuçlanır. Hücre içi artan Ca^{+2} miktarı aynı zamanda fosfolipaz A_2 ve siklooksigenaz enzimlerinin aktifleşmesine neden olarak serbest radikallerin artışına neden olur (38).

İlerleyen süreçlerde inflamasyonun gerçekleşmesiyle birlikte kan kaynaklı inflamator hücre istilası (lökosit infiltrasyonu) ve mikroglia aktivasyonu gerçekleşmektedir. Aktifleşen mikroglia hücreleri interleukin-1 β (IL-1 β) üreterek beyin hasarının artışına yol açar (39). Hücre içi Ca⁺² artışının diğer bir sonucu olarak Ca⁺² bağımlı enzim olan nitrik oksit sentaz enzimi aktifleşir ve nitrik oksit (NO) üretilerek mitokondri ve DNA hasarına yol açar. Tüm bu ilerleyen süreçler, kaspaz aracılı programlı hücre ölümü (apoptoz) ile sonuçlanmaktadır (37).

4.2.1.2. Oksidatif hasar

Mitokondride, elektron taşınmasından sorumlu proteinlerin oksidasyonu ve serbest radikallerden dolayı mitokondri iç zarının bozulması ile H⁺ iyon hareketi ve ATP (Adenozin Trifosfat) üretiminde bozulmalar meydana gelir ve mitokondri, önemli bir reaktif oksijen türleri kaynağı haline gelir. Mitokondri membranı sızdıran bir yapıya sahip olur; mitokondri şişmesi sonucu SOR (serbest oksijen radikalleri) (40) ve apoptozu tetikleyen Sitokrom C (CytC) ortama yayılır (41).

4.2.1.3. Peri-infarkt depolarizasyonu

Enerji yetersizliği sonucu iskemik nöron ve glia hücreleri depolarize olur; sonrasında hücre dışına K⁺ ve glutamat salınımı gerçekleşir. Kor bölgede bulunan ve etkilenen hücreler, tekrar repolarize olmamak üzere anoksik depolarizasyona uğrar. Kan akımının kısmen sağlanabildiği penumbra bölgesinde hücreler tekrar repolarize olabilirler fakat bu, daha fazla enerji tüketimini gerektirir. Penumbra bölgesindeki hücrelerde, ekstraselüler kısımda K⁺ ve glutamat artışı ya da birikimine bağlı olarak depolarizasyon gerçekleşebilir. Bu alanda tekrarlayan depolarizasyonlara, peri-infarkt depolarizasyonu adı verilir (42).

4.2.1.4. İnflamasyon

Hücre içinde SOR artışı, hipoksi ve Ca⁺² kaynaklı hücre içi ikincil haberci moleküllerin aktifleşmesi ile nükleer faktör kappa B (NF- κ B), hipoksi ile

indüklenebilir faktör-1 (HIF-1), interferon regülatör faktör 1 ve STAT3 gibi transkripsiyon faktörlerin sentezine neden olarak proinflamator genlerin anlatımını tetikler. Böylelikle hasara maruz kalan beyin hücreleri tarafından tümör nekroz faktör α (TNF α) ve IL-1 β gibi yangı araçları üretilir (43). Bunun sonucunda adezyon molekülleri üretilir ve bu moleküller nötrofil reseptörlerine tutunarak beyine doğru nötrofil infiltrasyonu gerçekleştirir. Nötrofilleri monositler ve makrofajlar takip ederek beyine doğru göç ederler; iskemiden sonraki beş ila yedi gün içinde alandaki en baskın hücreler haline gelirler (44).

Patofizyolojik süreçte diğer bir sonuç ise mikroglia aktivasyonu ve lökosit infiltrasyonu sonrası yangının ateşlenmesidir. Hasarlı bölgeye öncelikle mikroglia çağrılır. İskemi sonrası mikroglia artışı 48-72 saatler arası en yüksek seviyeye ulaşır ve haftalar boyunca devam eder. Buna karşılık lökositlerin hasarlı bölgeye ulaşması günler sürebilir (34, 45). İskemi sonrası astrositler de mikroglialar gibi aktifleşerek hasarlı alana doğru göç ederler. Aktifleşen glia hücrelerinde bir takım fonksiyonel ve morfolojik değişiklikler gözlemlenir. Yapısal destek amacıyla uzantılar oluşturularak intermediate filament ve glial fibriller asidik protein (GFAP) anlatımlarını uyarır. Mikroglia ve astrosit hücreleri; hücre koruyucu faktörler, sitotoksinler ve nörotrofik faktörler gibi çok sayıda ve türde maddeler salarak daha sonraki sinyalleri başlatıcı etki gösterirler. İskemiden sonraki ilk günden itibaren astrositler hasarlı bölgenin etrafını sarar “glial yara” oluşturur. Glial yara, hasar alanının genişlemesini önlemek için sınır oluşturur; ayrıca iskemiyi sonrası aksonal uzamayı önleyerek rejenarasyonu sınırlandırır (46).

4.2.1.5. Penumbra’da apoptoz

Beyin hücrelerinde, glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonu ve Ca⁺² iyonlarının fazlalığı nedeniyle; hücre içi apoptoz sinyal yolağı da dahil olmak üzere birçok sinyal yolağının aktivasyonunun gerçekleştiği bilinmektedir (47, 48). Hücre içinde Ca⁺² miktarındaki artışın sonucu olarak kalpainler aktive olur; Bid proteini tBid formuna dönüşür. tBid formu, mitokondri membranında bulunan Bad ve Bax apoptotik proteinleri ile etkileşerek mitokondride bulunan porların açılarak CytC ve apoptoz tetikleyici faktör (AIF) salınımına neden olur. CytC, hücre içinde sitozole

yayılarak prokaspaz-9 ve apoptotik protein aktive edici faktör-1 (Apaf-1) ile birleşerek apoptozom yapısını oluşturur. Apoptozom, kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonuna yol açar. Kaspaz-3, DNA tamir enzimi olan adenozin difosfat (ADP)-riboz polimeraz (PARP) enzimini hedef alarak kırılmasına neden olur ve DNA hasarı ve apoptoza yol açar (48-50). Apoptoza yatkın hücrelerin tayini, terminal transferase biotinylated-dUTP nick end labeling (TUNEL) analizi ile belirlenebilmektedir. TUNEL pozitif hücreler; hücrede kaspaz yolağının aktifleşmiş, apoptotik hücreler olarak tanımlanabilir (51, 52).



5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Deney Dizaynı ve Deney Grupları

Fareler üzerinde yapılan tüm deneysel müdahaleler, İstanbul Medipol Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı (10/06/2020) alınarak gerçekleştirilmiştir.

Bmal1 protein seviyesinin artmasına veya azalmasına bağlı olarak farelerde gerçekleştirilen deneysel beyin felci metodu sonrasında nöronal sağkalım, apoptotik hücre ölümü ve hücre içi sinyal iletim yolları üzerine olan etkilerini araştırabilmek ve proteomik açıdan inceleyebilmek için aşağıda belirtilen 4 deney grubu oluşturulmuştur.

5.1.1. Deney grupları

Lv-Bmal1: Aril Hidrokarbon Reseptör Taşıyıcısı-1 (Bmal-1) protein seviyesini arttırmak için moleküler klonlama teknikleri kullanılarak fare Bmal1 geninin kodlama bölgesi (NCBI referans numarası: NM_007489.4) lentiviral vektöre klonlanmıştır. Beyin felci operasyonlarından 7 gün önce iskeminin indükleneyeceği striatum seviyesine beyin için enjeksiyon ile lentivirüs verilmiş, bu sayede iskemi sırasında Bmal1 protein seviyesinin artırılması sağlanmıştır (n=8).

Lv-GFP: Lv-Bmal1 grubunun kontrolü amacıyla beyin felci operasyonlarından 7 gün önce farelerin striatum seviyesine klonlama bölgesinde herhangi bir gen dizisi içermeyen lentivirüs enjeksiyonu yapılmıştır. Bu sayede lentiviral vektörün veya lentivirüs enjeksiyonunun herhangi bir etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. (n=8).

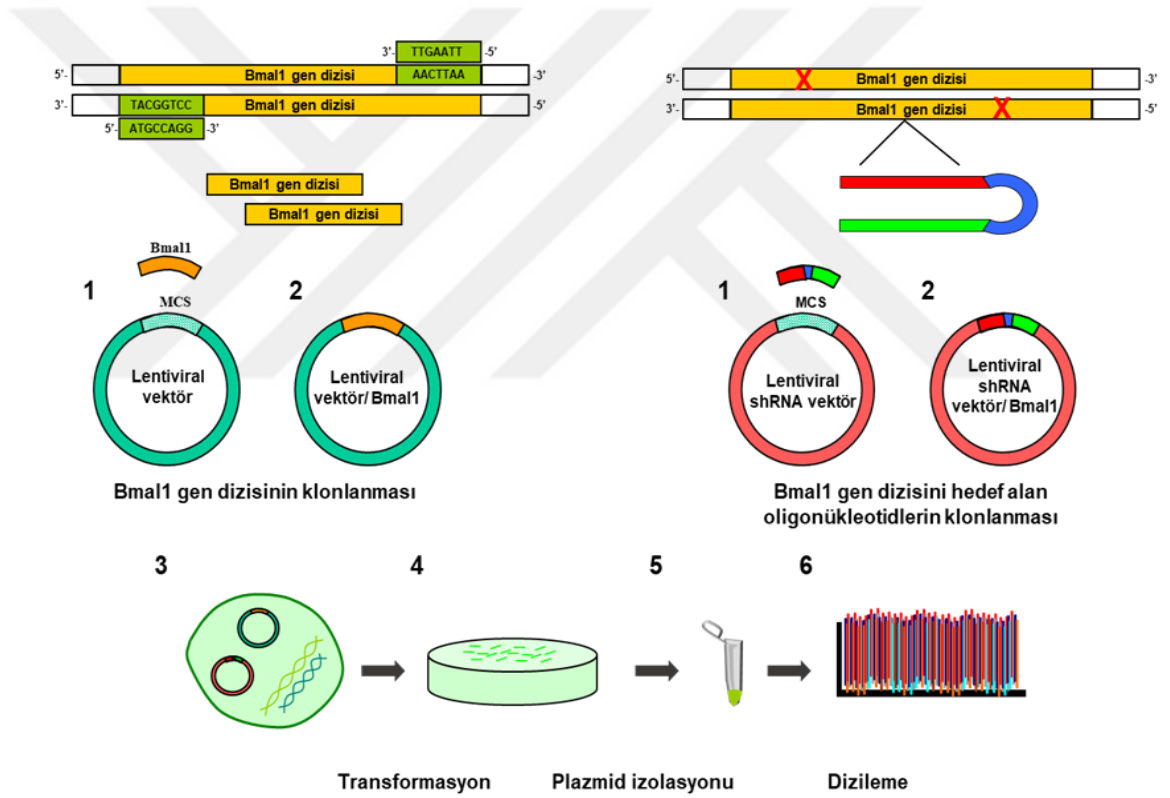
shBmal1: Bmal1 genini hedef alan lentiviral shRNA beyin felci operasyonlarından 7 gün önce iskeminin indükleneyeceği striatum seviyesine beyin içi enjeksiyon ile verilmiş, bu sayede beyin felci sırasında Bmal1 protein ifadesi engellenerek azalması sağlanmıştır (n=8).

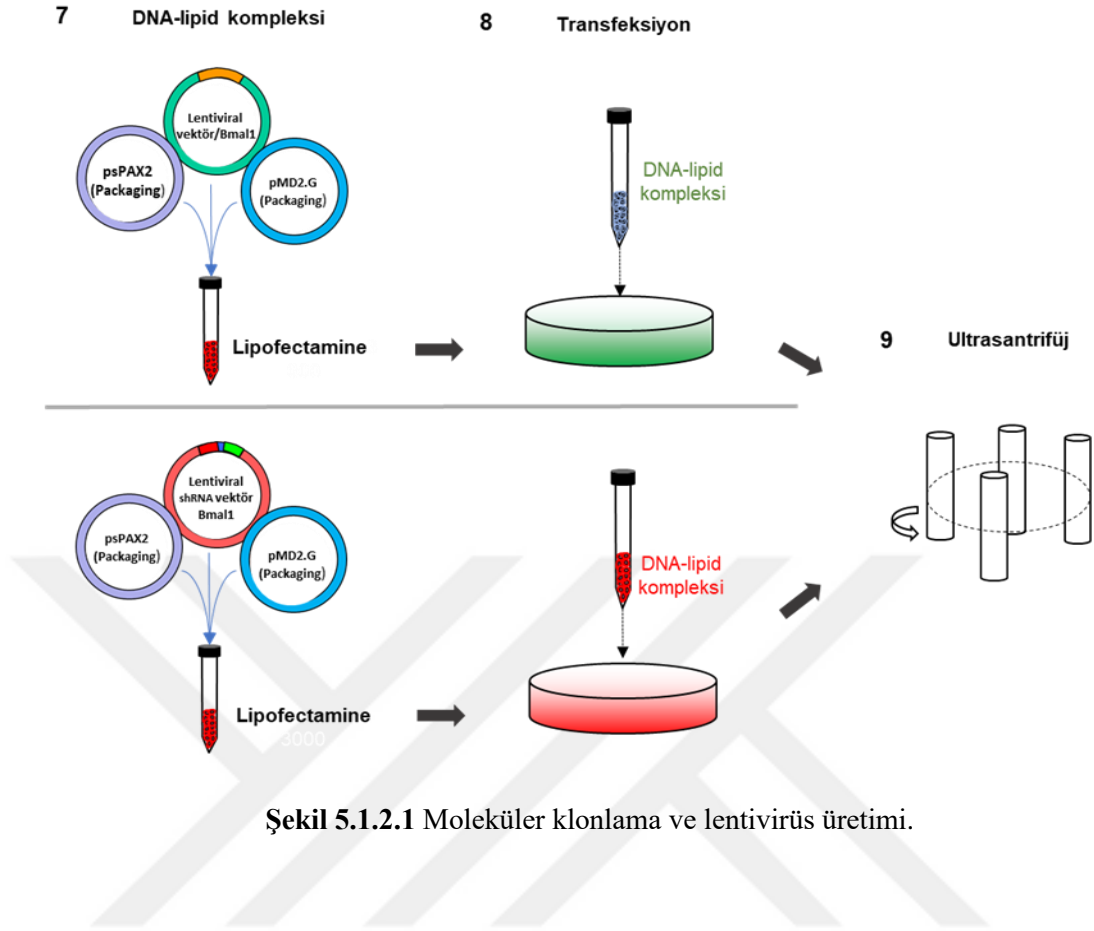
scRNA: Bmal1 shRNA grubunun kontrolü amacıyla; fare genomunda herhangi bir geni hedef almayan oligonükleoid dizisi içeren lentiviral shRNA beyin felci operasyonlarından 7 gün önce beyin içi enjeksiyon tekniği kullanılarak striatum

seviyesine uygulanmıştır. Bu grup ile gen susturma için kullanılan lentiviral vektörün etkisinin olup olmadığı gözlemlenmiştir (n=8).

5.1.2. Deney dizaynı

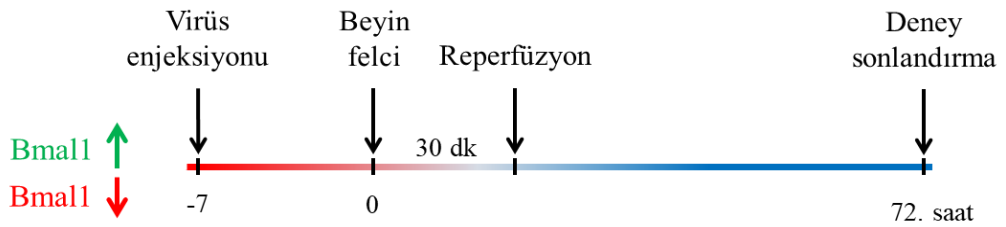
Bmal1 protein seviyesini arttırmak veya azaltmak amacıyla moleküler klonlama çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonrasında lentivirüs partikülleri üretilmiş olup viral partiküller farelere beyin içi enjeksiyon yöntemi ile verilmiştir. Moleküler klonlama ve lentivirüs üretiminin aşamaları Şekil 5.1.2.1’de gösterilmiştir.





Şekil 5.1.2.1 Moleküler klonlama ve lentivirüs üretimi.

Gruplara uygun olarak üretilen lentivirüsler; en yüksek verimliliğin sağlandığı, beyin felci operasyonundan 7 gün önce farelere beyin içi enjeksiyon yöntemiyle verilmiştir. OSAO metodu ile gerçekleştirilen 30 dakikalık beyin felci operasyonu sonucunda reperfüzyon başlatılmıştır. Reperfüzyon başlangıcından 72 saat sonra deney sonlandırılmıştır (Şekil 5.1.2.2).



Şekil 5.1.2.2. Deney dizaynı

5.2. Lentivirüs Üretimi

5.2.1. Hücre hattından total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu için (11828665001; High pure RNA isolation kit, Roche, İsviçre) fare nöroblastoma hücre hattı Neuro2A kullanılmıştır. Yaklaşık 10^6 hücre içeren hücre süspansiyonu, 500 µl TRIzol reaksiyon ajanı (15596026; Thermo Fisher Scientific, ABD) ile karıştırıldıktan sonra hücreler pipetleme yöntemi ile parçalandı. Homojenatın üzerine 500 µl Kloroform (288306; Sigma Aldrich, ABD) eklenmiştir. Solüsyon, güçlü bir şekilde karıştırıldıktan sonra 14.000 rpm ve 4°C sıcaklıkta 15 dk süresince santrifüj edilmiştir. Çözünmüş şekilde olan üst faz, yeni bir tüpe aktarılmıştır ve sonrasında bu tüpün içerisine 600 µl %100 oranında etanol eklenmiştir. Bu karışım, DNA uzaklaştırma kolonlarına yüklenmiş ve 14.000 rpm ve oda sıcaklığında 3 dk boyunca santrifüj edilmiştir.

Yıkama ve santrifüj adımlarından sonra RNA, 100 µl nükleaz içermeyen su ile yıkama yoluyla ayrıştırılmıştır. Elde edilen RNA konsantrasyonu, spektrofotometre (51119200; Multiskan™ go microplate reader, Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazıyla belirlenmiştir ve sonrasında cDNA sentez reaksiyonu için 1 µg RNA kullanılmıştır.

5.2.2. cDNA sentezi

İlk cDNA zincirini elde etmek amacıyla termal döngü cihazında (T100™; Bio-Rad, ABD) RNA örnekleri uygulandı. (04896866001; Roche, İsviçre) Tablo 5.2.2.1’de verildiği üzere reaksiyon karışımı hazırlandı ve Tablo 5.2.2.2’de verilen şartlar altında uygulandı.

Tablo 5.2.2.1. cDNA sentez tepkimesinde kullanılan içeriklerin miktarları

Bileşen	Miktar
ddH ₂ O	10,5 µl
5X Ters transkriptaz tamponu	4,0 µl
RNaz inhibitör	0,5 µl
dNTP karışımı	2,0 µl
Oligo dT primerleri	0,5 µl
Random primerler	1,0 µl
Ters transkriptaz	0,5 µl
RNA (1 µg/ µl)	1,0 µl
Toplam hacim	20,0 µl

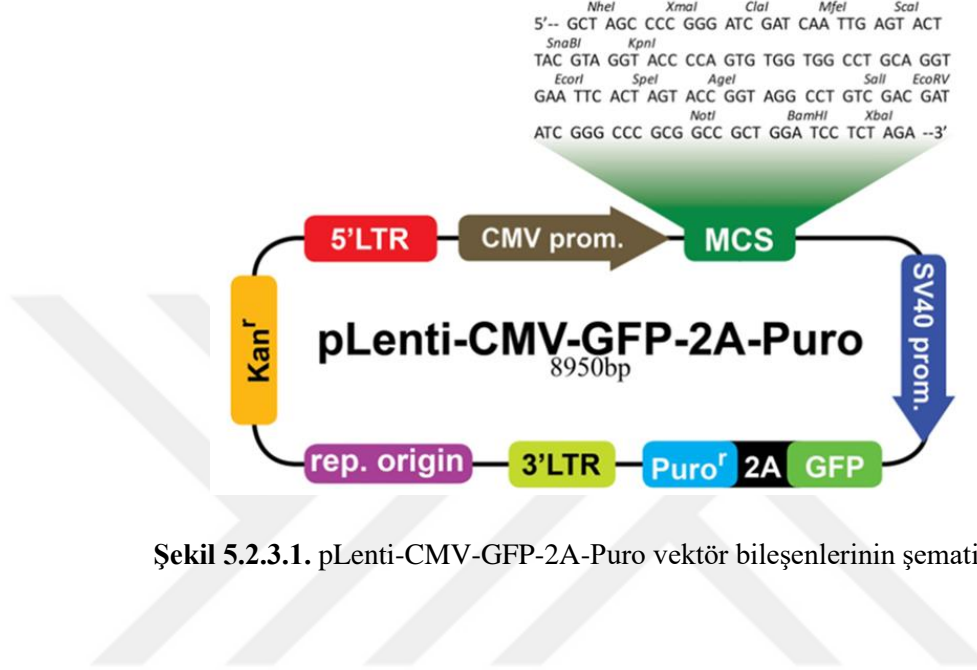
Tablo 5.2.2.2. cDNA sentez tepkimesi için sağlanan koşullar

Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)
50 °C	60 dk
85 °C	5 dk
4 °C	∞

5.2.3. Primer dizaynı

Mus musculus (fare) Aril Hidrokarbon Reseptör Taşıyıcısı olan Bmal1 geninin kodlama bölgesini (NCBI referans dizisi: NM_007489.4) fare nöroblastoma hücresi cDNA'sından kopyalamak amacıyla ileri primer (5' - AGT CAG TCG ACT TCC TTC CAA TGG CGG AC -3') ve geri primer (AGT CAG GAT CCC TAC AGC GGC CAT GGC A -3) dizayn edilmiştir.

Ekspresyon plazmidi olan ve GFP içeren bisistronik vektör (Lenti-CMV-GFP-2A-Puro Vector, ABM) çoklu klonlama bölgesine göre kesim enzimleri olarak Sall (FD0644 Thermo Fisher) ve BamHI (FD0054 Thermo Fisher) seçilmiştir.



Şekil 5.2.3.1. pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vektör bileşenlerinin şematik diyagramı

5.2.4. Bmal1 için polimeraz zincir reaksiyonu

PZR karışımı, iProof High-Fidelity PCR Kit (172-5330, Bio-Rad, ABD) kullanılarak hazırlanmıştır. Tepkime bileşenleri ve şartları Tablo 5.2.4.1’de belirtilmiştir. PZR gerçekleştirmek için termal döngü cihazı (T100TM; Bio-Rad, ABD) kullanılmıştır.

Tablo 5.2.4.1. PZR reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Hacim (µl)
cDNA	2,0
İleri primer	0,4
Geri primer	0,4
iProof DNA Polimeraz	0,2
5X Tampon Solüsyonu	4,0
dNTP karışımı	0,4
H ₂ O	12,6
Total	20,0

Dizayn edilen primerlerin uygun çalışma sıcaklıklarını belirlemek amacıyla iki farklı primer bağlanma sıcaklığını kullanılarak PZR denemesi yapılmıştır. Bu amaçla, primerlerin bağlanma sıcaklıkları 64°C ve 66°C olmak üzere iki reaksiyon hazırlanmış ve Tablo 5.2.4.2 ve Tablo 5.2.4.3'te gösterilen koşullarda PZR gerçekleştirilmiştir.

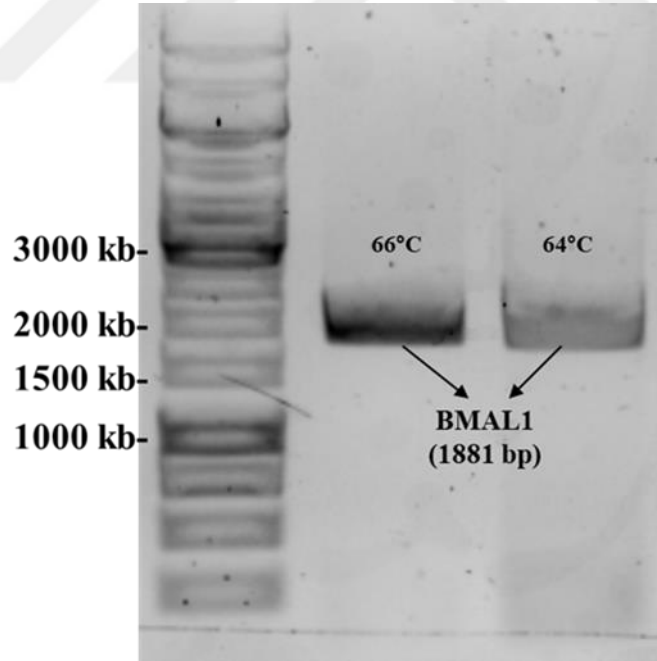
Tablo 5.2.4.2. Primer bağlanma sıcaklığı 66°C olarak belirlenen PZR reaksiyon koşulları

Aşama	Zaman	Sıcaklık
Başlangıç denatürasyon	30 sn	98°C
Denatürasyon	15 sn	98°C
Primer bağlanma sıcaklığı	30 sn	66°C
Polimerizasyon	2 dk	72°C
Bitiş Polimerizasyon	5 dk	72°C
Final	∞	4 °C

Tablo 5.2.4.3. Primer bağlanma sıcaklığı 64°C olarak belirlenen PZR reaksiyon koşulları

Aşama	Zaman	Sıcaklık
Başlangıç denatürasyon	30 sn	98°C
Denatürasyon	15 sn	98°C
Primer bağlanma sıcaklığı	30 sn	64°C
Polimerizasyon	2 dk	72°C
Bitiş Polimerizasyon	5 dk	72°C
Final	∞	4 °C

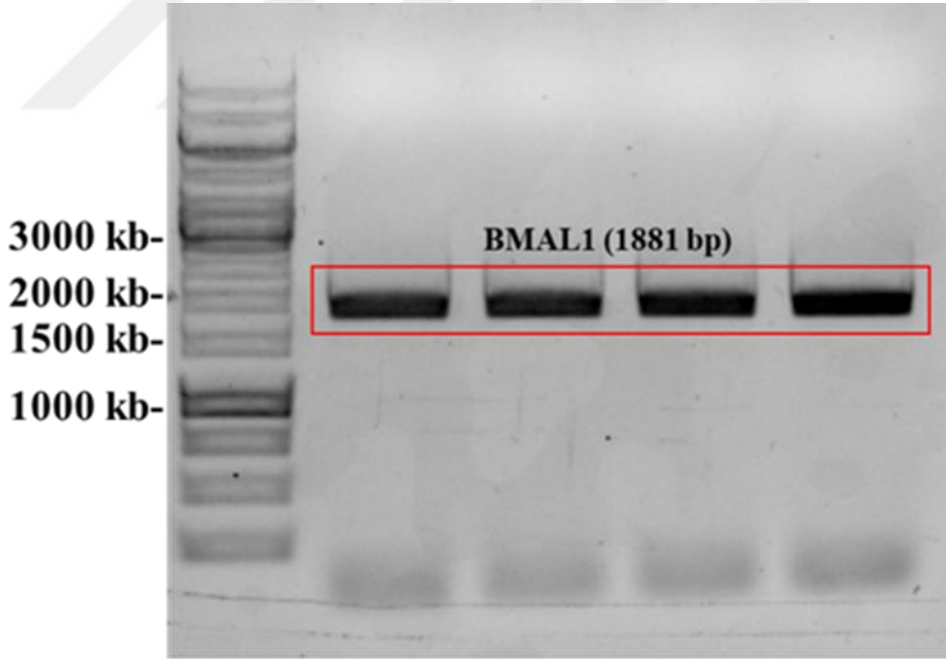
PZR sonrasında elde edilen karışıma 6X yükleme boyası (Orange Dye; R0631, Thermo Fisher Scientific) eklenmiş ve 30 dk süresince 120V’da jel elektroforez işlemi yapılmıştır. Elektroforez sonrasında jel Biorad Chemidoc analiz sistemi (1708280; Biorad Life Sciences Research, ABD) cihazı aracılığıyla görüntülenmiştir.



Şekil 5.2.4.1. Yüksek miktarda Bmal1 gen dizisi eldesi için optimum primer bağlanma sıcaklığı belirlenmesi amacıyla 64°C ve 66°C’de gerçekleştirilen PZR sonrası jel elektroforez görüntüsü.

Sıcaklık optimizasyonu için kullanılan sıcaklıklardan 66°C’de primerlerin daha iyi çalıştığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle tez kapsamında gerçekleştirilen Bma1 genine yönelik tüm PZR’da 66°C kullanılmıştır.

Moleküler klonlama çalışmaları için yüksek miktarda Bma1 gen dizisine ihtiyaç olduğu için Tablo 5.2.4.1’de gösterilen reaksiyonlar hazırlanmış olup Tablo 5.2.4.2’de belirtilen koşullar altında PZR gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon sonunda çoğaltılan Bma1 gen dizisi, 6X loading dye (R0631; Thermo Fisher Scientific, ABD) ile karıştırılarak %1 oranındaki agaroz jele yüklenmiştir. Bma1’e referans olarak DNA marker (1 kb) (SM1173; O’GeneRuller-ready to use, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. Jel, 120V ayarında, boyalı kısım yüzde 70-75 oranında aşağı inene kadar yürütülmüş ve sonrasında Biorad Chemidoc analiz sistemi (1708280; Biorad Life Sciences Research, ABD) ile görüntülenmiştir. 1881 baz çiftine denk gelen kısım BMAL1 olarak tanımlanmıştır (Şekil 5.2.4.2).



Şekil 5.2.4.2. Çoğaltılmış ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüsü.

5.2.5. Jelden Bmal1 izolasyonu

Şekil 5.2.4.2’de Bmal1 olarak belirlenen bantlar kesilerek jelden DNA izolasyonu kiti (PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit, Invitrogen) protokolüne uygun olarak izole edilmiştir.

Jel parçaları tartılmış ve ağırlığa göre jel çözme tamponu (K2100-12; Thermo Fisher, ABD) eklenmiştir. 50°C sıcaklığındaki su banyosu inkübasyonundan sonra karışım ara sıra ters çevrilmiş ve aynı hacimde izopropanol eklenmesi yapılmıştır. Solüsyon, toplama tüplerinde bulunan kolonlara yüklenmiş ve 14.000 g de 1 dk boyunca santrifüj yapılmıştır. Sonrasında kolonlar yıkama tamponu ile yıkanmış ve 14.000 g de 1 dk boyunca iki defa santrifüj yapılmıştır. Son olarak kolona elüsyon tamponu eklenerek 14.000 g de 2 dk santrifüj edilmiş, DNA’nın kolondan ayrılması sağlanmış ve izolasyon tamamlanmıştır.

5.2.6. Lentviral vektör ve Bmal1 PZR ürünü ikili kesimi

Elde edilen BMAL1 PZR ürünü ve pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vektörü, sonradan ligasyona hazırlanmak amacıyla SalI (FD0644 Thermo Fisher) ve BamHI (FD0054 Thermo Fisher) enzimleri kullanılarak ikili kesim uygulanmıştır. Reaksiyon bileşenleri Tablo 5.2.6.1’de verilmiştir. Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra 1 saat süresince 37°C’de inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası 80°C’de 5 dk boyunca ısı inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir.

Tablo 5.2.6.1. İkili kesim reaksiyonu bileşenleri

Ürün	pLenti (µl) 5,0 (1µg/µl)	BMAL1 (µl) 12,0
10X tampon	2,0	2,0
SalI	1,0	1,0
BamHI	1,0	1,0
dH ₂ O	11,0	4,0
Toplam	20,0	20,0

5.2.7. Bmal1 ve plazmid DNA saflaştırılması

Önceki adımlarda kullanılan endonükleaz kesim enzimleri ve reaksiyon tamponlarının uzaklaştırılması sağlandı (K310001; Thermo Fischer, ABD). PZR üzerine, başlangıç hacminin dörtte biri miktarda vektör ürünü ve bağlanma tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 1 dk inkübasyon sonrası, solüsyon filtrelili tüplere eklenerek 14.000 g'de bir dk boyunca santrifüj edildi. Kolonların şartlanması için yıkama tamponu ile sırasıyla bir ve iki dk santrifüj edilerek yıkama işlemleri gerçekleştirildi. Son olarak, ürünlerin elüsyonu için distile su eklenerek 14.000 g'de bir dk boyunca santrifüj uygulandı. Sonraki aşamalar için saflaştırılmış ürünlerin konsantrasyonları NanoPhotometer (P300, Implen, Almanya) cihazı ile ölçülmüştür. Vektör ve Bmal1 konsantrasyonları Tablo 5.2.7.1' de yer almaktadır.

Tablo 5.2.7.1. Bmal1 ve vektör konsantrasyonları

	BMAL1	pLenti
Konsantrasyon	80 ng/µl	120 ng/µl

5.2.8. Ligasyon reaksiyonu

PZR sonrasında elde edilen Bma1 gen dizisi ve pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vektörü restriksiyon enzimleri vasıtasıyla kesildikten sonra T4 DNA ligaz (M0202S; New England Biolabs, İngiltere) aracılığıyla oda sıcaklığında 1 saat süresince bağlanma reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vektörüne yerleştirilecek DNA miktarı, Nebiocalculator (Version 1.12.0; New England Biolabs, İngiltere) (Şekil 5.2.8.1 ve Şekil 5.2.8.2) ile hesaplanmıştır.

Insert DNA length		Required insert DNA mass	
<input type="text" value="1881"/>	<input type="text" value="bp"/>	<input type="text" value="10.51 ng (1:1)"/>	
<input type="text" value="8950"/>	<input type="text" value="bp"/>	<input type="text" value="21.02 ng (2:1)"/>	
<input type="text" value="50"/>	<input type="text" value="ng"/>	<input type="text" value="31.53 ng (3:1)"/>	
		<input type="text" value="52.54 ng (5:1)"/>	
		<input type="text" value="73.56 ng (7:1)"/>	

Şekil 5.2.8.1. Ligasyon reaksiyonu için gereken Bma1 DNA miktarı hesaplaması

$$\text{Required Mass of Insert (g)} = 3 \times \text{Mass of Vector (g)} \times \frac{\text{Insert length}}{\text{Vector length}}$$

Şekil 5.2.8.2. Ligasyon reaksiyonu için gereken DNA miktarı hesaplama formülü

NeBiocalculator'e göre, ligasyon için kullanılan bileşenler Tablo 5.2.8.1'de belirtildiği gibi hazırlanmış ve 22°C sıcaklıkta 5 dk süresince inkübe edilmiştir.

Tablo 5.2.8.1. Ekspresyon plazmidi yapım reaksiyonu için gereken bileşenler

	1:1	2:1	3:1	5:1
pLenti	0,42 µl	0,42 µl	0,42 µl	0,42 µl
Bmal1	0,13 µl	0,26 µl	0,39 µl	0,66 µl
T4 DNA ligaz	0,50 µl	0,50 µl	0,50 µl	0,50 µl
5X tampon	2,00 µl	2,00 µl	2,00 µl	2,00 µl
ddH2O	6,95 µl	6,82 µl	6,69 µl	6,42 µl
Toplam	10,00 µl	10,00 µl	10,00 µl	10,00 µl

5.2.9. Kompetent bakteri hazırlama

Moleküler klonlama çalışmaları sonrasında elde edilen plazmidlerin çoğaltılması amacıyla Stb13 bakteri suşu kullanılmıştır. Bakterilerin ilgili plazmidleri içine alabilmesi amacıyla aşağıda belirtilen işlemler sırasıyla gerçekleştirilmiştir.

-80 °C'den çıkarılan Stb13 bakterilerinin erimesi sağlandıktan sonra antibiyotik içermeyen katı LB agar (A8523, Biomatik, ABD) üzerine yayılmaları sağlanmıştır. Oda sıcaklığında 5 dk inkübasyondan sonra, petri kabı 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde bir gece boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, agar yüzeyi üzerinde oluşan bir koloni seçilmiş ve 5 ml LB broth (A8523, Biomatik, ABD) içine eklenmiştir. Hücreler, 150 rpm hızına ayarlı çalkalayıcı üzerinde 37 °C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün, bu hücre süspansiyonundan 1 ml hacimde alınarak 100 ml taze LB broth içine eklenmiştir ve 150 rpm hızına ayarlı çalkalayıcı üzerinde 37 °C'de 150 dk boyunca inkübe edilmiştir. 600 nm optik yoğunlukta, kabul edilebilir bir değer olan 0.3 değerinde ölçülmüştür. Bakteri süspansiyonu, buzda bekletilmiş 50 ml hacmindeki falkon tüplere paylaştırılmış ve buz üzerinde 5 dk inkübe edilmiştir. Tüpler, 5.000 rpm ayarda 5 dk santrifüj edilmiş ve sonrasında üst faz uzaklaştırılmıştır. Pellet buzda soğutulmuş CaCl₂ (100 mM) ile pipetleme yapılarak tekrar çözünmüş hale getirilmiştir, ardından yeni falkon tüpe aktarılmıştır. Süspansiyon, CaCl₂ (100 mM) ilave edilerek 20 ml'e tamamlanmıştır. Sonrasında bakteri solüsyonu, +4 °C'de bir saat süresince inkübe edilmiştir. Bir saatlik buz

üzerindeki inkübasyon sonrasında bakteri hücre solüsyonu 3000 g'de 5 dk süresince santrifüj edilmiştir. Sonrasında üst faz atılarak hücre pelleti buzda bekletilen taze hazırlanmış 2 ml CaCl₂ (100 mM) ile çözülmüştür.

5.2.10. Transformasyon

50 µl kompetent bakteri solüsyonu ve 1 µl Bma1 ligasyon karışımı, 1.5 ml hacmindeki eppendorf tüplere eklenmiş ve buz üzerinde 30 dk inkübe edilmiştir. Hücreler, 42 °C sıcaklığındaki su banyosunda 60 saniye süresince ısı şokuna maruz bırakılmış; ardından hemen buz üzerine konularak 2 dk boyunca soğuması sağlanmıştır. Süspansiyon üzerine 250 µl LB broth eklenerek 37 °C inkübatörde bir saat süresince çalkalayıcı üzerinde karıştırılması sağlanmıştır. Sonrasında, bakteri süspansiyonu kanamycin (14100; Pan Biotech, Almanya) içeren LB agar üzerine eklenmiş ve 37 °C'de bir gece boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

Ertesi gün, 5 pozitif koloni seçilmiş ve kanamycin içeren 5 ml LB broth içine eklenmiştir. Süspansiyon, bakteri sayısını arttırmak amacıyla bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Sonraki gün, plazmid izolasyon kiti (#11754777001; High pure plasmid isolation kit, Roche, İsviçre) ile bakteriden plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

5.2.11. Bakteriden düşük ölçekli plazmid izolasyonu

Bakterilerden plazmid eldesi için plazmid izolasyon kiti (#11754777001; High pure plasmid isolation kit, Roche, İsviçre) kullanılmıştır. Bakteriler, 5.000 rpm ayarda +4°C'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz atılmış ve pellet 250 µl süspansiyon çözültisi (*suspension buffer*) ile tekrar çözülmüştür. Hücre süspansiyonu üzerine lizis tamponu (*lysis buffer*) eklenmiş ve solüsyon 1,5 ml Eppendorf tüplere aktarılmıştır. Solüsyonun karışmasını sağlamak amacıyla tüplere birkaç defa ters çevirme işlemi uygulanmış ve oda sıcaklığında 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Ardından, hücre solüsyonunun içine 350 µl bağlanma tamponu (*binding buffer*) eklenerek tüp yavaşça çalkalanmış ve buz üzerinde 5 dk inkübe edilmiştir. Solüsyon, 14.000 g ve oda sıcaklığında 10 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen üst faz, toplama tüpleri içinde yer alan kolonlara yüklenmiştir. 1 dk inkübasyondan sonra, 14.000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Tüpte biriken süzöntü

atıldıktan sonra tüpe 500 µl yıkama tamponu 1 (*wash 1 buffer*) eklenmiştir. Bir dk santrifüjün ardından toplama tüpü tekrar temizlenmiş ve yıkama işlemi 700 µl yıkama tamponu 2 (*wash 2 buffer*) ile tekrar edilmiştir. 14.000 rpm 1 dakikalık ilk santrifüjleme adımının ardından toplama tüpü temizlenerek tekrar 14.000 rpm’de 2 dk santrifüj uygulanmıştır. Plazmid DNA bulunan kolonlar yeni temiz Eppendorf tüplere yerleştirilmiş ve 50 µl elüsyon tamponu (*elution buffer*) kolona eklenmiştir. 1 dakikalık inkübasyon sonrası, kolon 14.000 rpm’de 1 dk santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki solüsyon kolona tekrar yüklenerek 14.000 rpm’de 2 dakika süresince santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünde elde edilen solüsyon plazmid DNA içermektedir.

5.2.12. Kesim enzimleri ile DNA doğrulama

pLenti-CMV-GFP-2A-Puro plazmidini içinde yer alan BmaI (*Mus musculus*, transcript variant 1) klonlamasını doğrulamak için, ikili kesim gerçekleştirildi. Tablo 5.2.12.1’de belirtilen 5 örnek için reaksiyon hazırlandı:

Tablo 5.2.12.1. Kesim enzimleri kullanılarak gerçekleştirilen doğrulama reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Hacim (µl)
Plazmid	6,0 µl
SaI	0,5 µl
BamHI	0,5 µl
10X Tampon	2,0 µl
ddH ₂ O	11,0 µl
Toplam	20 µl

Bir saat süren inkübasyon sonrasında örnekler 6X yükleme boyası (loading dye R0631; Thermo Fisher Scientific) ile %1’lik agaroz jele yüklenmiştir. Agaroz jel üzerinde çift sarmal BmaI (transcript variant 1) ve pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vektörüne referans olarak DNA ladder (1 kb) (Thermo Scientific O’GeneRuler-kullanıma hazır) kullanılmıştır. Jel, boyanmış kısımlar %70-75 oranında aşağı inene

kadar 120V'ta yürütülmüştür. Ardından, Biorad Chemidoc analyzing system cihazı (1708280; Biorad Life Sciences Research, ABD) ile jel görüntülemesi yapılmıştır.

5.2.13. Lentiviral vektörlerin çoğaltılması

Moleküler klonlama aşamaları sonrasında yapılan dizileme analizini sonucunda doğruluğu konfirme edilen plazmidlerin virüs üretiminde kullanılmaları için yüksek miktarda üretilmeleri gerekmektedir. Bu amaçla bölüm 5.2.10'da anlatıldığı üzere, plazmidler Stbl3 suşu kompetent bakterilere transformasyon ile verilmiş ve bakteriler uygun antibiyotik (GFP ve Bmal1 ekspresyon plazmidini için kanamycin; shRNA, psPAX ve pMD2.G için ampisilin) içeren sıvı besi yeri içerisinde bir gece süresince çoğaltılmıştır. Ertesi gün bakterilerden yüksek ölçekli ve endotoksin içermeyen plazmid izolasyonu sağlayan bir kit kullanılarak (D4203, MaxiPrep Zymo Research) plazmidlerin izolasyonu yapılmıştır.

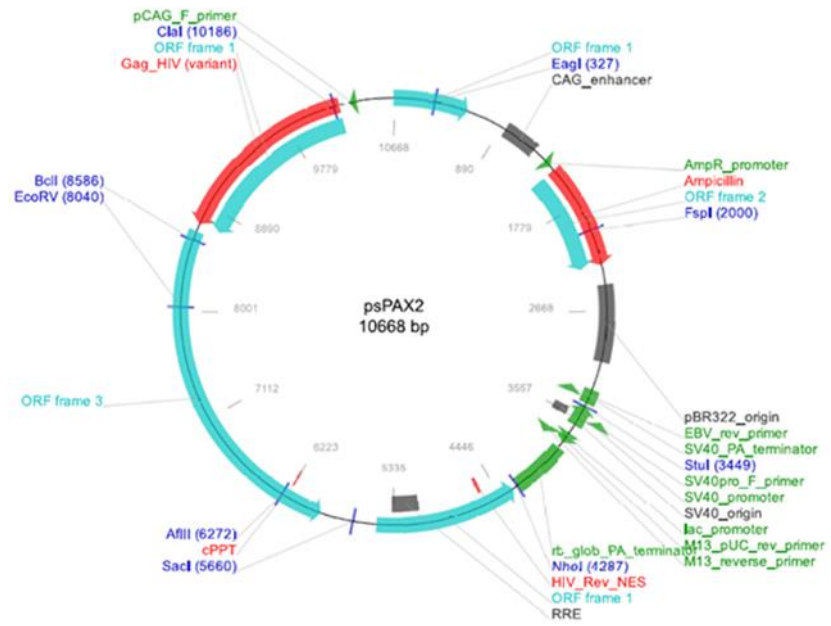
5.2.14. Bakteriden yüksek ölçekli plazmid izolasyonu

150 ml bakteri karışımı 3 farklı 50 ml'lik falkon tüplere bölündükten sonra oda sıcaklığında 10 dk süresince 4.000 g' de santrifüj edilmiştir. Elde edilen pelletin üzerine kit içerisinde çıkan 14 ml P1 solüsyonu eklenmiş ve pellet solüsyon içinde çözülmüştür. Karışımın üzerine 14 ml P2 solüsyonu eklenip, tüpler 6 defa ters çevrildikten sonra 2 dk süresince oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonra 14 ml P3 solüsyonu eklenip çökeltinin rengi sarımtırak olana kadar tüpler birkaç defa ters çevrilerek karıştırılmıştır. Sonrasında elde edilen çökelti kit içerisinde çıkan filtreli şırıngalardan geçirilmiş ve elde edilen sıvıya 14 ml bağlanma tampon solüsyonu (*binding buffer*) eklenmiştir. Solüsyon, kit içeriğinde bulunan Zymo-Spin V-P Column Assembly'e aktarıldıktan sonra vakum aparatına bağlanmıştır. Vakum aracılığıyla karışımda bulunan sıvı kısmın kolondan geçirilmesi sağlanmış ve üzerine sırasıyla 5 ml yıkama tamponu-1 (2 defa) ve 5 ml yıkama tamponu-2 (2 defa) eklenmiştir. Kolon içerisinde bulunan plazmidleri elde edebilmek amacıyla kolona 400 µl ddH₂O ilave edilmiş ve sonrasında 10.000 g'de 1 dk süresince santrifüj edilmiştir.

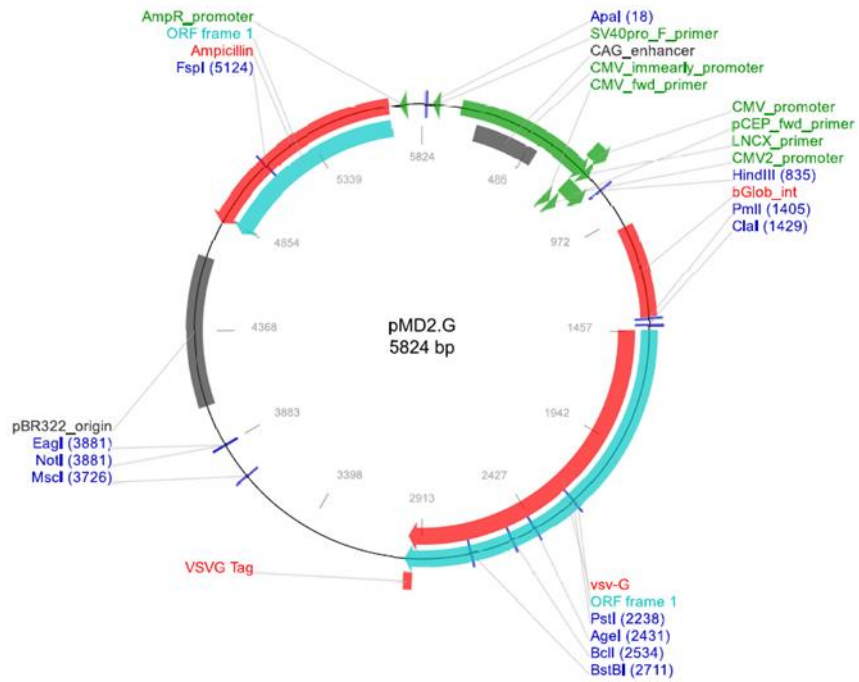
5.2.15. Virüs üretimi ve paketlenmesi

Virüs paketlemesi için HEK293T hücre hattı kullanılmaktadır. Bu hücre hattı virüs üretimi için rutin olarak kullanılan bir hücre hattıdır. Hücre kültürü için besi yeri (DMEM, P04-01158, Pan Biotech) %10 Fetal sığır serumu (FBS; P30-1985, Pan Biotech), esansiyel olmayan amino asitler (P08-32100, Pan Biotech) ve %1 oranında stabil glutamin (Glutamax-I;35050, Gibco) içermektedir. Hücreler %5 CO₂ ve 37°C'ye ayarlı inkübatörde (Heracell 150i, Thermo Fisher) çoğaltılmaktadır ve yaklaşık olarak 3 gün aralıklarla alt kültürler yapılmaktadır.

Virüs üretimi için 10 cm'lik petri kaplarına 7 milyon HEK293T hücresi ekimi yapılmıştır. Ertesi gün 7 µg ekspresyon plazmidini (Bmal1 veya GFP) veya shRNA plazmidini (shBmal1 veya scRNA), 7 µg psPAX (paketleme plazmidini) ve 3.5 µg pMD2.G (zarf plazmidini); Lipofectamin 3000 (L3000015, Thermo Fisher) transfeksiyon kiti kullanılarak hücrelere verilmiştir. Lipofectamine 3000 ile oluşturulan DNA-lipid kompleksi hücrelerin üzerine damla damla eklenerek %5 CO₂ 37°C inkübatörde (Heracell 150i, Thermo Fisher) 6 saat süresince inkübe edilmiştir. 6 saat sonunda hücrelerin kültür ortamı taze kültür ortamı ile değiştirilmiştir. Transfeksiyondan 24 ve 52 saat sonra kültür ortamları toplanarak 2000 rpm'de +4 °C'de 10 dk süresince santrifüj edilmiştir. Sonrasında örnekler 0,45 µm'lik filtrelerden geçirilerek ultrasantrifüj tüplerine (344058, Beckman Coulter) alınmıştır. +4 °C, 100,000 g'de 120 dk süresince santrifüj edilen örneklerden elde edilen pellet dPBS kullanarak çözdürülmüş ve alikotlar halinde -80 °C'de saklanmıştır.



Şekil 5.2.15.1. psPAX2 paketleme plazmidini (#12260, Addgene)



Şekil 5.2.15.2. pMD2.G zarf plazmidini (#12259, Addgene)

5.2.16. Titrasyonun belirlenmesi

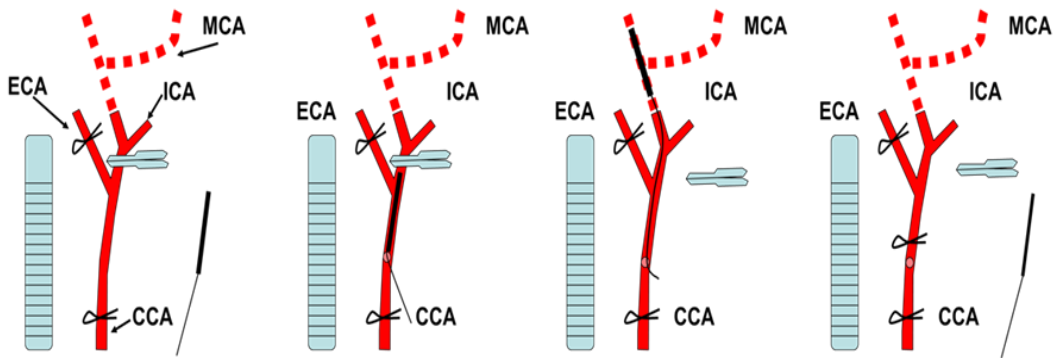
Üretilen virüslerin titrasyonu, akış sitometrisi yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla 6- kuyucuklu hücre plakasına HCT116 hücre hattı ekimi yapılmış ve hücrelerin plaka yüzeyine tutunabilmeleri için %5 CO₂ ve 37°C'ye ayarlı inkübatörde bir gece boyunca bekletilmiştir. Ertesi gün dPBS ile virüslere seri dilüsyonlar uygulanarak hücrelerin üzerine eklenmiştir. Virüs eklendikten 24 saat sonra hücrelerin bulunduğu sıvı besi yeri, taze besi yeri ile değiştirilmiştir. Virüslerin eklenmesinden 72 saat sonra titrasyon belirleme çalışmaları yapılmıştır. Bunun için öncelikle hücrelerin besi yerleri çekilmiş, sonrasında 750 µl dPBS ile yıkanmış ve 200 µl %0,25 tripsin/ EDTA (25200056, Gibco) kullanılarak hücrelerin plakadan ayrılması sağlanmıştır. Enzimatik aktiviteyi durdurmak amacıyla hücrelerin üzerine 750 µl hücre kültürü besi yeri eklenmiştir. Sonrasında 500 g'de 5 dk santrifüj yapılarak hücreler çöktürülmüştür. Çöken hücreler %1 PFA içeren dPBS içinde fikse edilip tekrar çöktürülerek dPBS içinde süspansiyon haline getirilmiştir. Daha sonra, Akış sitometrisi cihazı (Cell Sorter, BD Influx, ABD) kullanılarak GFP pozitif hücreler belirlenmiş ve virüs titrasyonu hesaplanmıştır. Bütün gruplara 1.6 x 10⁷ kadar virüs partikülü 2 µl 0.1 M PBS içinde beyin içi enjeksiyon yöntemi ile striatum seviyesine verilmiştir.

5.3. Beyin içi enjeksiyon yöntemiyle lentivirüs verilmesi

Farelere, beyin içi enjeksiyon yöntemi ile Lv-GFP, Lv-Bmal1, scRNA ve shBmal1 gruplarına uygun lentivirüsler verilmiştir. Bu amaçla deney hayvanları gaz anestezi sistemi ((%1 İzofluran (N0015A09, Adeka) (%30 O₂, kalanı N₂O)) kullanılarak anesteziye alınmış ve stereotaktik çerçeveye (frame) (50260, World Precision Instruments) sabitlenmiştir. Kafatası derisine yapılan küçük bir kesinin ardından, sonradan iskemi yapılması planlanan bölge olan sol hemisferin striatum seviyesine (Bregma 0, lateral 2,5 mm) tur aleti (H37L1, Marathon, Kore) kullanılarak bir delik açılmıştır. Buradan Hamilton enjektörü ile korteks seviyesinden 2,5 mm içeri girilerek lentivirüs enjeksiyonları yapılmıştır. Enjeksiyon sonunda Hamilton enjektörünün iğnesi yavaş bir şekilde, beyne zarar vermeyerek çıkartılmıştır. Son olarak, kesilen deri 5,0 ipek dikiş ipliği (S1165, Doğsan) ile cerrahi olarak dikilmiştir.

5.4. Beyin felci metodu

Deney gruplarında kullanılan fareler gaz anestezi sistemi ((%1 İzofluran (N0015A09, Adeka) (%30 O₂, kalanı N₂O)) kullanılarak anesteziye alınmıştır. Operasyon süresince hayvanların vücut sıcaklıkları homeotermik ısıtma sistemiyle (55-7020, Harvard Apparatus) 36,5-37,0 °C arasında tutulmuştur. OSA'nın beslediği beyin bölgesindeki kan akımı, Laser Doppler akışmetre (LDF) cihazının (Perimed) kafatası kemiği üzerine yerleştirilen (Bregma -2 mm posterior; 6 mm lateral) fiber optik probu sayesinde anlık olarak izlenmiştir. Beyin felci metodu filament tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca; farelerin boyun bölgesine yapılan küçük bir kesi sonrasında karotid arterler izole edilmiştir. Kommon karotid arter ve eksternal karotid artere 6,0 ipek (S1165, Doğsan) ipele düğüm atıldıktan sonra internal karotid arter bir mikrovasküler klips (FE691, Aesculap) yardımıyla geçici olarak kapatılmıştır. Kommon karotid arter üzerine damar makası vasıtasıyla yapılan ufak bir kesi sonrası 7,0 kalınlığındaki monofilament (701934PK5Re, Docol) OSA'in girişine kadar ilerletilmiştir. Direnç hissedilinceye kadar internal karotid arter içerisinde yaklaşık olarak 9 mm distal yönde ilerletilmiştir. 30 dakikalık beyin felci operasyonundan sonra monofilament geri çekilerek reperfüzyon başlatılmıştır. Reperfüzyonun kontrolü amacıyla LDF kayıtları reperfüzyon başlangıcından itibaren 20 dk daha takip edilmiştir.



Şekil 5.4.1 OSAO metodu kullanılarak gerçekleştirilen beyin felci modeli

5.5. Beyinlerin cryostat cihazı ile kesimi ve işlenmesi

Beyin felci operasyonlarından 72 saat sonra fareler yüksek doz anestezi kullanılarak sakrifiye edilmiştir. Farelerin beyinleri hızlı bir şekilde çıkartılarak kuru buz üzerinde dondurulmuştur. Sonrasında, 30 dk OSAO metodu özellikle striatum seviyesinde hasar oluşturduğu için striatum bölgesinden cryostat cihazı (CM1950, Leica) kullanılarak 18 µm kalınlığında koronal kesitler alınmıştır. Ayrıca protein çalışmaları için (Western blot ve co-IP Proteomik) yine striatum seviyesinden doku örnekleri alınmıştır. Kesitler ısıtıcı tabla kullanılarak 40 °C’de fikse edildikten sonra protein örnekleri ile beraber -80 °C dondurucuda muhafaza edilmiştir.

5.6. NeuN Boyaması ile Nöronal Sağkalım Analizi

Striatum seviyesinden alınan beyin kesitleri, oda sıcaklığında %4 PFA ile fikse edildikten sonra PFA artıklarından uzaklaştırmak için 0,1 M PBS ile yıkanmıştır. Bloklama aşaması için 0,1 M PBS içerisinde %0,3 Triton X-100 ve %10 normal keçi serumu (NGS; G9023, Sigma Aldrich) kullanılmıştır. Bloklama solüsyonu beyinlerin üzerine eklendikten sonra örnekler 1 saat süresince oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu aşamadan sonra örnekler tekrardan 0,1 M PBS ile yıkanmış ve bir gece boyunca +4 °C’de Alexa Fluor 488 konjuge monoklonal anti-NeuN (Mab377X, Chemicon) ile inkübe edilmiştir. Bir gecelik inkübasyon sonrasında örnekler oda sıcaklığında yıkanmış ve 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; D9542, Sigma Aldrich) ile çekirdek boyaması yapılarak floresan ışımının solmasını engelleyici kapatma sıvısı (F4680, Sigma Aldrich) kullanılarak lamel ile kapatılmıştır. Örnekler Zeiss LSM 780 (Carl Zeiss, Almanya) mikroskobu kullanılarak görüntülenmiştir. İpsilateral (iskemik) ve kontralateral (iskemik olmayan) striatumdan belirlenen 62.500 µm²'lik 9'ar farklı alandan NeuN ve DAPI pozitif hücreler sayılmıştır.

5.7. TUNEL boyaması ile Apoptoz Tayini

İskemik striatum seviyesinden DNA kırıklarının analizi için terminal transferase biotinylated-dUTP Nick End Labeling (TUNEL; 11684795910, Roche) kiti kullanılmıştır. Kesitler %4 PFA ile fikse edildikten sonra PBS ile yıkanmıştır. Oda

sıcaklığında normal keçi serumu (NGS; G9023, Sigma Aldrich) kullanılarak örneklerle bloklayma işlemi yapılmıştır. İnkübasyon sonunda TUNEL karışımının enzim ve substratı karıştırılarak örneklerin üzerine eklenmiştir. 37 °C’de 70 dk süresince reaksiyon gerçekleştirildikten sonra 0.1 M PBS ile reaksiyon durdurulmuştur. Son olarak hücrelerin çekirdekleri DAPI (D9542, Sigma Aldrich) ile işaretlendikten sonra örnekler floresan ışımının solmasını engelleyici kapatma sıvısı (F4680, Sigma Aldrich) kullanılarak lamel ile kapatılmıştır. Örnekler LSM 780 (Carl Zeiss, Almanya) konfokal mikroskobu kullanılarak görüntülenmiştir. Bu amaçla iskemik striatum seviyesinden belirlenen 62.500 µm²’lik 9’ar farklı alandan TUNEL ve DAPI pozitif hücreler analiz edilmiştir.

5.8. Western blot

Protein izolasyonu için Lv-GFP, Lv-Bmal1, scRNA ve shBmal1 uygulanan hücreler kullanılmıştır. Örnekler proteaz ve fosfataz inhibitör karışımı (5782, Cell Signaling) ilave edilmiş RIPA tampon çözeltisi (R0278-50ML, Sigma Aldrich) eklenerek homojenize edilmiştir. Protein konsantrasyonları Qubit protein analiz kiti (Q33211, Invitrogen Life Technologies) kullanılarak Qubit 3.0 Fluorometer cihazında (Invitrogen Life Technologies) hesaplanmıştır. Her bir örnek için 20 µg total protein lizatu, 10 µl 2X Laemmli tampon solüsyonu (161-0747, Biorad) ve geri kalanı ddH₂O olacak şekilde 20 µl hacimde numuneler hazırlanmış ve 95°C’de 5 dk kaynatıldıktan sonra buz üzerine alınmıştır.

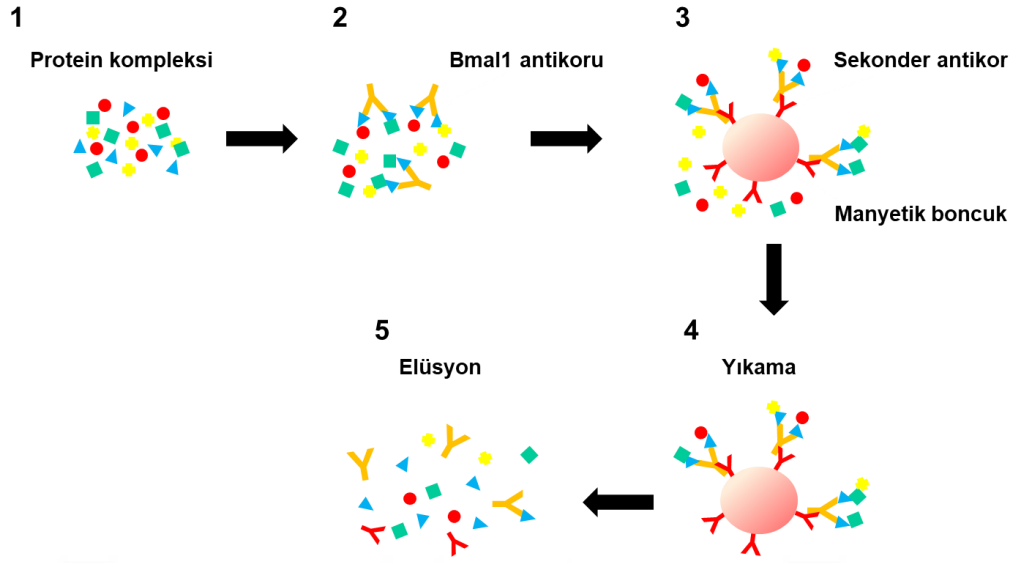
Örnekler ve protein marker (Protein-All-Blue 163-0393, Biorad) hazır Mini-Protean TGX Precast protein jeline (4569033, Biorad) yüklenmiş, PVDF (Poli-viniliden florür) membrana (162-0174, Biorad) Trans-blot turbo transfer cihazı (1704155, Biorad) ile proteinlerin transferi yapılmıştır. PVDF membranlar %0,1 Tween-20 içeren Tris tamponlu salin (TBS-T) ile hazırlanan %5 yağsız süt tozu (sc-2325, Santa Cruz) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. TBS-T ile yıkanan membranlar bir gece Bmal1 (14020, Cell Signaling) antikoruna ile inkübe edilmiştir. Ertesi gün membranlar TBS-T ile üç kere yıkandıktan sonra %5 yağsız süt tozu içerisinde Horseradish Peroksidaz konjuge ikincil antikor (31460, Thermo Scientific) eklenerek oda sıcaklığında bir saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından ECL

Western görüntüleme solüsyonu (1705060, Biorad) ile 5 dakika muamele edilmiş ve Chemidoc MP görüntüleme sistemi (1708280, Biorad) kullanılarak görüntülenmiştir.

Proteinlerin normalizasyonu, metodun kontrolü ve antikorların değerlendirilebilmesi için görüntüleme işlemi tamamlanan membranlar strip solüsyonuna alınarak, birincil ve ikincil antikorların membranlardan sökülmesi sağlanmıştır. Bu amaçla strip solüsyonu ile 50 °C sıcaklıktaki su banyosunda 20 dk boyunca inkübasyona bırakılan membranlar, inkübasyon sonunda 5 defa 10 dk süresince TBS-T ile yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra tekrardan bloklama aşaması yapılmış ve membranlar 2 saat süresince oda sıcaklığında monoklonal β -Aktin (4970, Cell Signaling) antikoruna ile inkübe edilmiştir. Uygun ikincil antikor eklenmesinin ardından görüntüleme cihazı ile β -Aktin görüntüleri alınmıştır. Western Blot sonunda elde edilen membran görüntüleri, bilgisayar programı (Image J; National Institute of Health) yardımıyla yoğunluk farkına göre analiz edilmiştir. Her protein için en az üç tekrar olacak şekilde Western blot yapılmıştır.

5.9. Eş-immünpresipitasyon (co-IP) Yöntemi

Bmal1 ile etkileşime giren proteinlerin proteomik analizini gerçekleştirmek için co-IP (eş-immünpresipitasyon) yöntemi kullanılmıştır. Bmal1 anlatımı arttırılan ve anlatımı susturulan örneklerden total protein izolasyonu Yöntem 5.8'de belirtildiği gibi yapılmıştır. Örneklerin, manyetik boncuklara spesifik olmayan bağlanma ihtimalini ortadan kaldırmak amacıyla protein örneklerine ön temizleme yapılmıştır. Antikor bağlanmamış manyetik boncuklarla (Millipore) 20 dk oda sıcaklığında inkübe edilen hücre lizatları, kullanılana kadar +4 °C'de saklanmıştır. Antikorların (Bmal1, 1:50 oranında) manyetik boncuklara kovalent çapraz bağlantılar oluşturması için 0,2 M Trietanolamin çözeltisi ile yıkamanın ardından dimetil pimelimidat dihidroklorür (DMP, D8388, Sigma) çözeltisi ile inkübasyonu sağlanmıştır. İnkübasyonların ardından PBS ile yıkanan antikor-manyetik boncuk bileşimine önceden temizlenen ve +4 °C'de saklanmış hücre lizatı eklenmiş ve +4 °C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Manyetik boncuklardan düşük pH'lı 0,1 M glisin çözeltisi kullanılarak elüsyon yapılmış örneklerin konsantrasyonu Qubit yöntemiyle saptanmış ve örneklerden alınan 50 μ g numune, takip eden FASP protokolünde kullanılmıştır.



Şekil 5.9.1. Eş-immünpresipitasyon (co-IP) analizi yöntem akış şeması

5.10. FASP Protokolü

Homojenizasyon sonunda örneklerin protein konsantrasyonları Qubit 3.0 Fluorometer cihazı ile belirlenmiştir. Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi (LC-MS/MS) analizi için filtre yardımlı örnek hazırlama (FASP, Expedeon) hazır kiti içinde bulunan protokol takip edilmiştir. Her bir örnek için 50 µg protein alınarak; gerekirse LC-MS kalitesindeki su kullanılarak toplam örnek hacminin 30 µl olması sağlanmıştır. Kit içinde bulunan filtreli tüplerdeki filtrelerin üzerine 200 µl üre çözeltisi (100mM Tris-HCl içerisinde çözdürülmüş) eklendikten sonra 50 µg/30 µl konsantrasyondaki protein örneği filtreye eklenmiştir. 14,000 g'de 15 dk süresince santrifüj edilmiş ve yeniden 200 µl üre eklenerek santrifüj işlemi tekrar edilmiştir. Toplama tüpünde biriken sıvı kısım atıldıktan sonra alkalizasyon işlemi için 10X IAA (iyot asetamid) solüsyonu hazırlanmıştır: Kit içerisindeki tüpte liyofilize halde bulunan IAA, 100 µl üre çözeltisi ile çözülmüştür. Her bir örnek tüpü filtresi üzerine 10 µl IAA solüsyonu ve 90 µl üre çözeltisi eklendikten sonra tüplere 1 dk vorteks yapıp 20 dakika karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra tüpler 14.000 g'de 10 dk santifüj edilmiştir. Tüplere 100 µl üre çözeltisi ilave edilerek 14.000 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir; bu işlem toplamda 3 defa olacak şekilde tekrar edilmiştir. Toplama tüpüne süzülen sıvı kısım atılmıştır. Filtrelere 100 µl 50 mM

amonyum bikarbonat eklenmiş ve sonrasında tüpler 14,000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir; bu işlem toplamda 3 defa olacak şekilde tekrar edilmiştir. Filtreye 75 µl (enzim-protein oranı 1:100 olacak şekilde hesaplanarak amonyum bikarbonat çözeltisi içinde hazırlanan) tripsin enzim solüsyonu eklenmiştir. Buharlaştırmanın önüne geçip filtrenin kurummasını engellemek amacıyla etrafı parafilm kaplanan örnek tüpleri 1 dk süresince düşük ayarda vorteks yapılmıştır. Sonrasında tripsin enziminin proteinleri peptitlere parçalaması için gerekli optimum sıcaklık olan 37°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün filtre yeni bir tüpe alınarak üzerine 40 µl 50 mM amonyum bikarbonat eklenmiş ve sonrasında 14,000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir; bu işlem toplamda iki defa olacak şekilde tekrar edilmiştir. Bu işlemi takiben filtreye 50 µl 0.5 mM sodyum klorür solüsyonu ilave edilerek filtre 14,000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Filtre atılarak, tüpte elde edilen süzüntü liyofilizatör (Labconco FreeZone, ABD) ile liyofilize hale getirildikten sonra ACQUITY UPLC M Class- SYNAPTGSi cihazına enjeksiyonu yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır. Örnekler cihaza verileceği zaman liyofilize haldeki peptitler 20 µl mobil faz A (%0,1 Formik asit (FA) içeren LC-MS sınıfı su) içinde çözülüp, peptit konsantrasyonları 100 ng/µl olacak şekilde ölçüldükten sonra cihaza enjeksiyonları yapılmıştır.

5.11. Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) analizi

Triptik peptitler SYNAPTGSi yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi ile birleştirilmiş ACQUITY UPLC M sınıfına yüklenerek analiz edilmiştir. HDMS^E metodu ile etiketsiz relatif kantifikasyon yöntemi seçilmiştir. Kolonlar %97 mobil faz A (%0,1 FA içeren LC-MS sınıfı su) olacak şekilde önceden şartlanmış ve kolon sıcaklığı 55°C' ye ayarlanmıştır. Peptitlerin ayrımı, enjekte edilen örneğin ilk olarak trap kolondan, ardından da analitik kolondan geçirilmesiyle sağlanmıştır. Bu ayrıştırma işlemi %0,1 FA içeren, gradienti %4'ten %40'a olan ACN ile dakikada 0,400 µl akış hızıyla yapılması sağlanmıştır. MS ve MS/MS taramalarının pozitif iyon modu ile 0,7 saniyelik döngülerle taramalar yapılarak on volt düşük çarpışma enerjisi ve 30V yüksek çarpışma enerjisi olarak ayarlanmıştır. İyonlar, iyon hareketlilik ayrımı ile ayrıştırılmıştır. Dalga hızı, tam IMS döngüsü boyunca 1000'den 55 m/s' ye yükseltilmiştir. Hareket kabiliyeti için serbest bırakma süresi 500 µs, trap yüksekliği

15 V olarak ayarlanmıştır. IMS dalga gecikmesi, kapanın serbest bırakılmasından sonra hareketlilik ayrımı için 1000 μ s idi. Prekürsör iyon ön seçimi olmaksızın, 50-1900 m/z (kütle/yük) aralığındaki tüm iyonların çözünürlük (resolution) modunda parçalanması ve DIA modunda analizi sağlanmıştır. Buna ek olarak, 100 fmol/ μ l Glu-1-fibrino peptit B, 60 saniyede bir aralıkla kilit kütle (lock mass reference) referansı olarak verilmiştir. Organizma spesifik (*Mus musculus*) protein databazı (UniProt ID: UP000000589) kullanılmıştır. Peptitleri tanımlamak ve teşhis etmek amacıyla PLGS (ProteinLynx Global Server 3.0.1. Waters®, ABD) yazılımı ile yine tanımlama ve grup kıyaslaması için Progenesis for Proteomics (Progenesis QI-P 2.0.5556.29015 Nonlinear, Waters®) yazılımı kullanılmıştır (3, 53, 54).

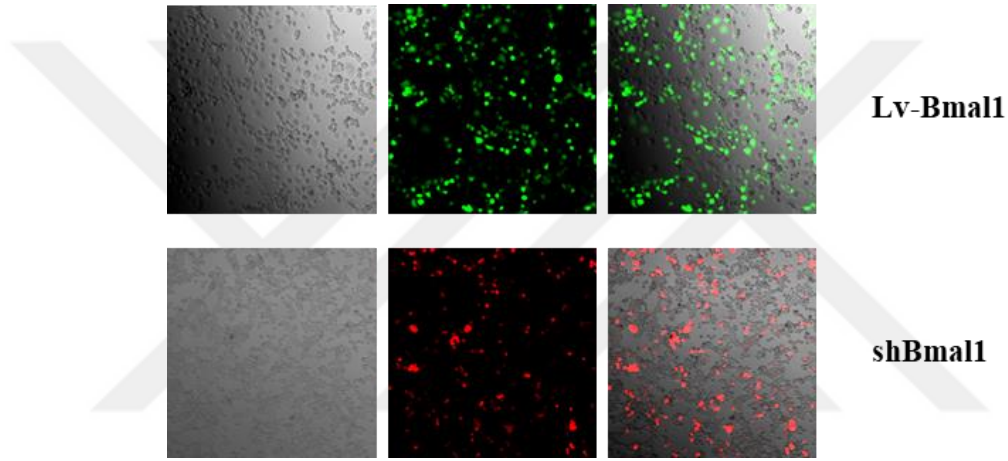
5.12. İstatistiksel analizler

Tez kapsamında gerçekleştirilen tüm istatistiksel analizler programı (Ibm) kullanılarak yapılmıştır. Gruplar (Lv-GFP/ Lv-Bmal1 veya scRNA/ shBmal1) arasındaki istatistiksel değerlendirmeler için bağımsız örneklem t testi (*independent samples t test*) kullanıldı. Bütün bulgular ortalama \pm standart sapma şeklinde sunuldu. P değeri 0.05'ten küçük olanlar veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Lenti-viral Bmal1 Etkileşimi

Moleküler klonlama çalışmalarını takiben üretilen lentivirüslerin fare nöroblastoma hücrelerini (N2a) başarılı bir şekilde enfekte edip etmediklerini öğrenmek amacıyla Lv-GFP, Lv-Bmal1, scRNA, shBmal1-1, shBmal1-2 ve shBmal1-3 N2a hücrelerine uygulanmıştır. Virüs uygulamasından 48 saat sonra floresan mikroskop altında alınan görüntülerden transfeksiyon verimliliği analiz edilmiştir.



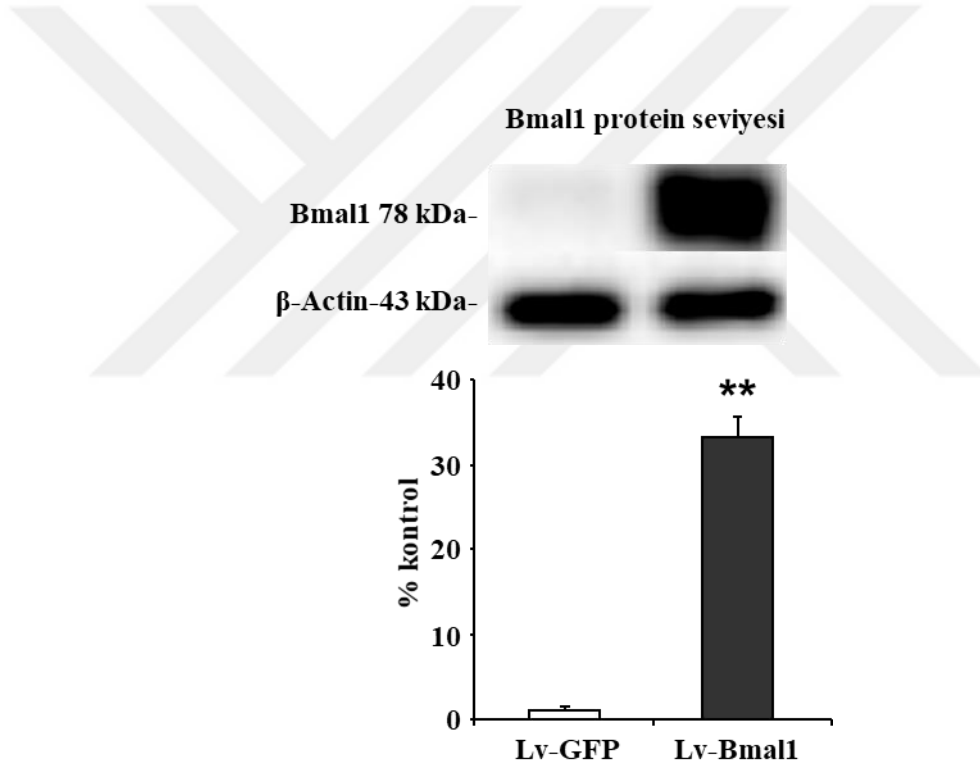
Resim 6.1.1. Bmal1 protein anlatımının artışı belirten yeşil renkli, GFP (*Green Fluorescent Protein*) ile işaretli p-Lenti-CMV-GFP-2A-Puro plazmidine sahip hücreler ile Bmal1 baskılamasını belirten kırmızı renkli, RFP (*Red fluorescent protein*) ile işaretli shBmal1 plazmidini bulunduran hücrelerin görüntülenmesi.

Yapılan çalışmalarda; Bmal1 protein anlatımını arttırmak amacıyla kullanılan p-Lenti-CMV-GFP-2A-Puro plazmidinde bulunan GFP sayesinde enfekte olan hücrelerin takibi kolay bir şekilde yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarında üretilen virüslerin yaklaşık olarak %90 oranında hücreleri enfekte ettiği gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra Bmal1 protein seviyesini baskılama amacıyla kullanılan shBmal1-1, shBmal1-2 shBmal1-3 plazmidlerinin takibi için kırmızı floresan protein (RFP; *Red fluorescent protein*) kullanılmıştır. RFP proteinine sahip shBmal1-1, shBmal1-2 shBmal1-3 ve inhibisyon deney setinin kontrol grubu olan scRNA uygulanan hücrelerden 48 saat sonra yapılan analizler neticesinde ilgili

virüslerin N2a hücrelerini enfekte etme oranının yaklaşık olarak %90 seviyesinde olduğu tespit edilmiştir.

6.2. Bmal1 Protein Analizi

Moleküler klonlama çalışmalarını takiben üretilen lentivirüslerin Bmal1 protein seviyesini başarılı (istatistiksel olarak anlamlı) bir şekilde arttırıp arttırmadığını doğrulamak amacıyla Lv-GFP ve Lv-Bmal1 uygulanan N2a hücrelerinden elde edilen protein örneklerinden Western blot yöntemi aracılığıyla Bmal1 protein seviyesi analizi gerçekleştirilmiştir.

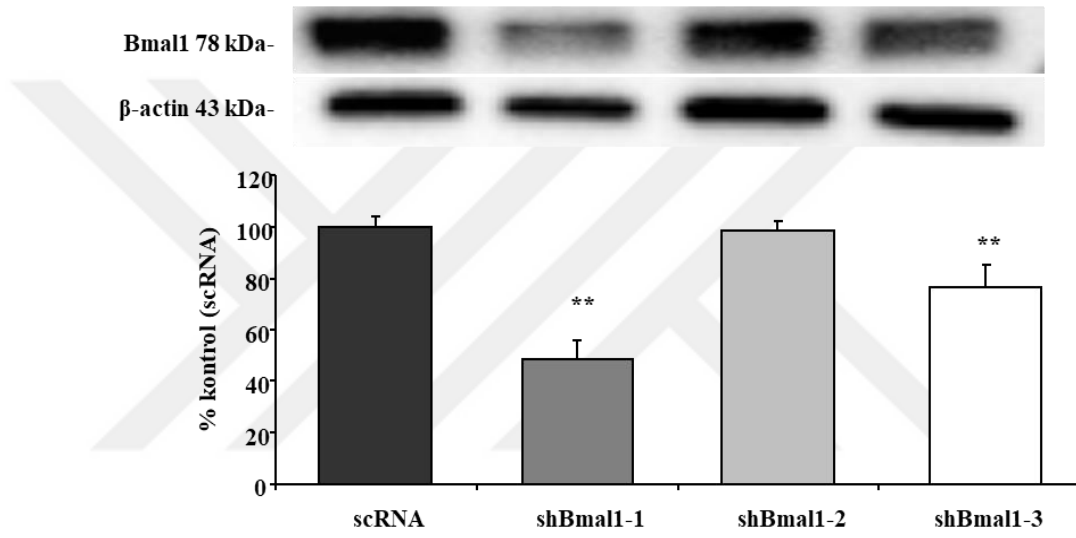


Şekil 6.2.1. Lentivirüs transfeksiyonu sonrası Bmal1 protein ifadesi değişimi. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. ** $p < 0.01$ Lv-GFP grubu ile kıyaslandığında.

Elde edilen bulgulara göre; Lv-Bmal1 grubunda, kontrol grubuna (Lv-GFP) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ($p < 0.01$, bağımsız örneklem t testi (*independent samples t-test*)) Bmal1 protein seviyesinin arttığı görülmüştür (Şekil..2).

Bu veri doğrultusunda, elde edilen virüs partiküllerinin in vivo deneylerde de başarılı bir şekilde kullanılabilirliğini göstermektedir.

Bmal1 protein seviyesini azaltmak amacıyla ticari olarak satılan shRNA kiti kullanılmıştır (SMARTvector Lentiviral Mouse Arntl shRNA, Dharmacon). Bmal1 gen dizisini (NCBI referans dizisi: NM_007489.4) farklı bölgelerden hedef alan üç farklı shRNA kullanılmıştır. Bu amaçla, shBmal1-1, shBmal1-2 ve shBmal1-3 olarak adlandırılan plazmidlerin virüsleri Yöntem 5.2’de belirtildiği gibi üretilmiş olup fare nöroblastoma hücre hattında denenmiştir (Şekil 6.2.2).



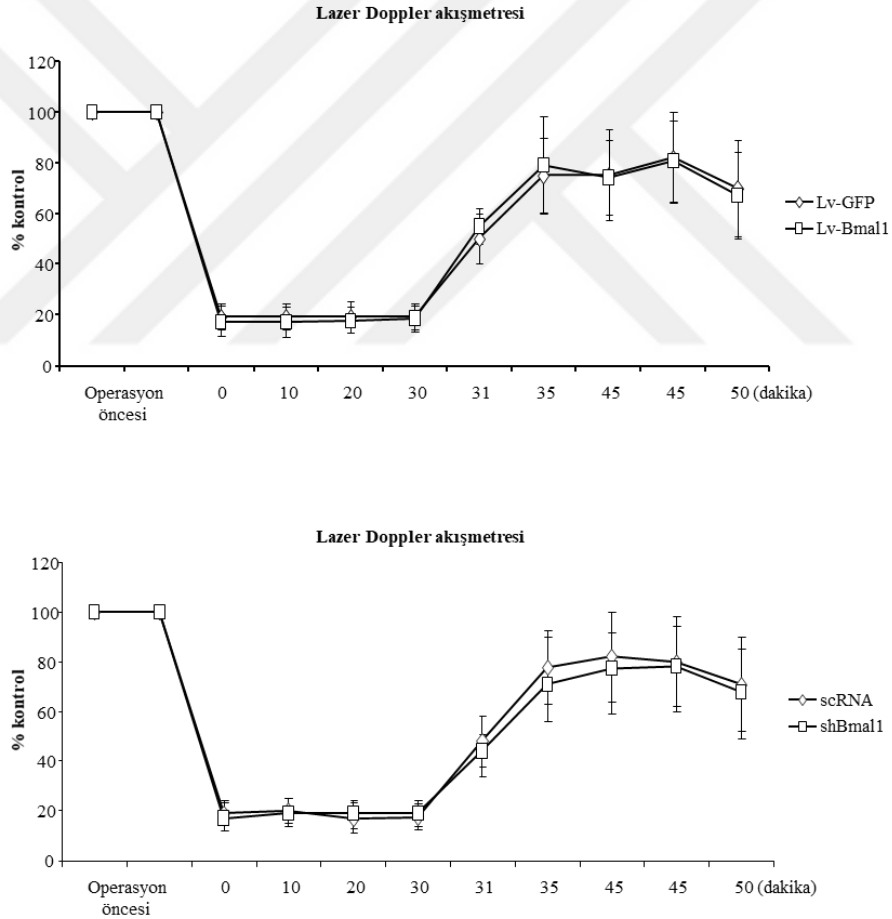
Şekil 6.2.2. Bmal1 protein seviyesini azaltmak amacıyla kullanılan lentiviral vektörlerin Bmal1 protein seviyesi üzerine olan etkileri. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. **<math>p<0.01</math> scRNA grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Elde edilen verilere göre, shBmal-1 uygulanan hücrelerde yaklaşık olarak %55 oranında ($p<0.01$), shBmal1-3 uygulanan hücrelerde %20 oranında ($p<0.01$) Bmal1 protein seviyesinin baskılandığı gözlemlenmiştir. Ayrıca shBmal1-2 ile muamele edilen hücrelerde Bmal1 protein seviyesinde herhangi bir değişikliğin olmadığı görülmüştür.

Bu verilerden yola çıkarak bu tez kapsamında Bmal1 protein seviyesini baskılamak amacıyla yapılan tüm deneylerde shBmal1-1 plazmidini ile elde edilen virüsler kullanılmıştır.

6.3. OSAO Boyunca Lazer Doppler Akış Takibi

Bmal1'in beyin felcindeki rolünü anlayabilmek amacıyla, hazırlanan virüsler farelere beyin içi enjeksiyon yöntemi ile verilmiş ve enjeksiyondan 7 gün sonra beyin felci operasyonu uygulanmıştır. OSAO süresince serebral kan akışı LDF ile kontrol edilmiş ve kayıt altına alınmıştır. Deneysel sürecin başarılı olup olmadığını anlayabilmek ve 30 dakikalık OSAO modelinin tekrar edilebilirliğini doğrulamak için gerçek zamanlı kan akış takibinin yapılması önemlidir. Orta serebral arterin beslediği striatum (Bregma; -2 mm posterior, 6 mm lateral) seviyesinden beyin felci operasyonları süresince ve reperfüzyonun ilk 20 dakikalık kısmında alınan beyin kan akımı Şekil 6.3.1'de gösterilmiştir.

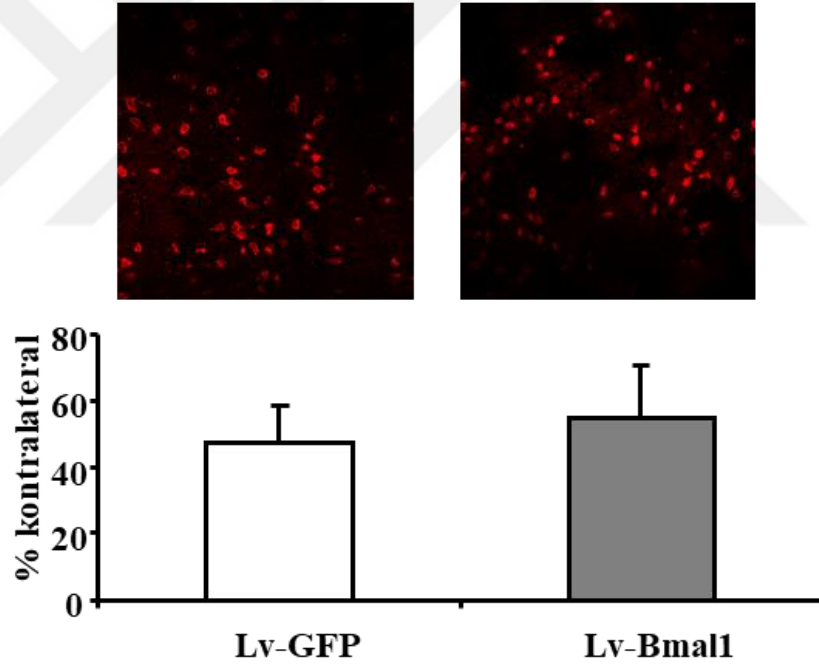


Şekil 6.3.1. Fokal serebral iskemii süresince ve reperfüzyon başlangıcında serebral kan akımının Lazer Doppler aracılığıyla takibi. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

Normal kan akışı %100 olarak baz alındığında, OSA girişinin filament tekniği kullanılarak tıkandığı andan itibaren beyin kan akımının %20 seviyelerine düştüğü gösterilmiştir. Otuz dakikalık iskemi süresince beyin kan akımının sabit kaldığı, 30 dakika sonrasında filamentin geri çekilmesiyle başlatılan reperfüzyon ile beraber beyin kan akımının tekrardan arttığı gösterilmiştir (Şekil 6.3.1).

6.4. Nöronal Sağkalım Analizi

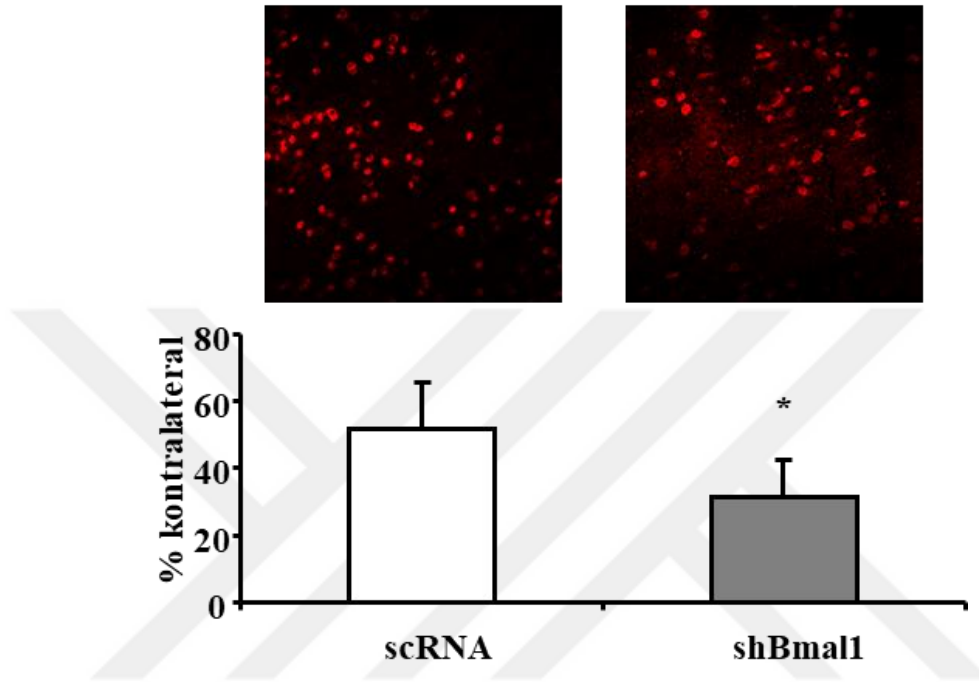
Beyin felci operasyonlarından 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerin striatum seviyesinden alınan koronal kesitlerden nöron spesifik nüklear antijen olarak nitelendirilen NeuN boyamasıyla hücresel sağkalım değerlendirilmiştir.



Şekil 6.4.1. NeuN boyaması ile iskemik striatumda nöronal sağkalım analizi. Lv-Bmal1 grubunda lentivirüs transfeksiyonu ile arttırılmış Bmal1 protein anlatımının Lv-GFP kontrol grubu ile kıyaslandığında serebral iskemi sonrası nöronal sağkalıma etkisi. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

İpsilateral (hasarlı) hemisferden sayılan NeuN pozitif hücrelerin kontralateral (hasarsız) hemisfere oranlanmasıyla elde edilen nöronal sağkalım verilerine

bakıldığında Lv-Bmal1 grubundaki nöronal sağkalımın Lv-GFP grubuna kıyasla az bir miktarda arttığı görülmektedir. Fakat bu değişim istatistiksel olarak bir anlamlılık ($p>0.05$) göstermemektedir.



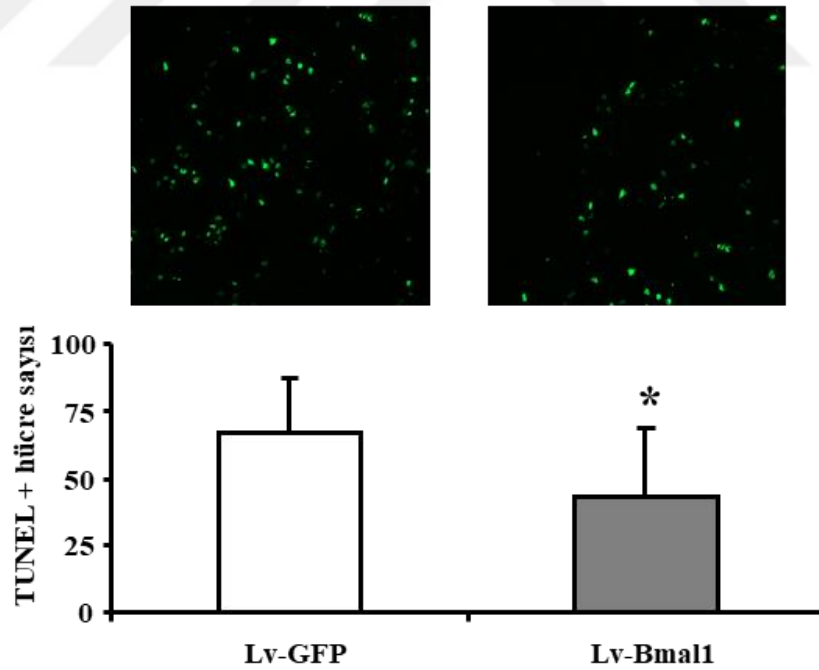
Şekil 6.4.2. NeuN boyaması ile iskemik striatumda nöronal sağkalım analizi. shBmal1 grubunda lentivirüs transfeksiyonu ile azaltılmış Bmal1 protein anlatımının scRNA kontrol grubu ile kıyaslandığında serebral iskemi sonrası nöronal sağkalıma etkisi. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

İpsilateral hemisferden sayılan NeuN pozitif hücrelerin kontralateral hemisfere oranlanmasıyla scRNA ve shBmal1 grupları arasındaki nöronal sağkalım oranları belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında shBmal1 enjeksiyonu yapılmış farelerdeki yaşayan nöron sayısının kontrol grubuna kıyasla (scRNA) istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) bir şekilde azalttığı görülmüştür.

6.5. DNA Fragmantasyon Analizi

İskemi sonrası iyileşme mekanizmalarında en önemli parametrelerden biri, hasarlı bölgede azalan hücre ölüm oranıdır. Apoptotik hücre ölümünün belirteci olan DNA fragmantasyonu ile ilgili bilgi sahibi olabilmek adına TUNEL analizi gerçekleştirilir. TUNEL ile boyanmış hücreler TUNEL (+) olarak nitelendirilir ve DNA fragmantasyonu gerçekleşmiş 3'OH uçları işaretlenmiş apoptotik hücrelerdir.

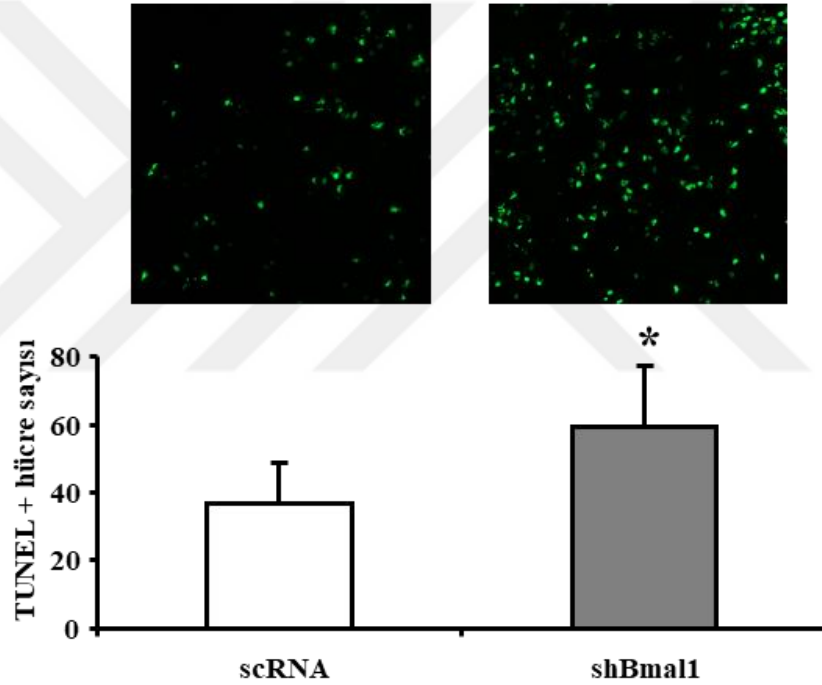
Bmal1 protein seviyesinin artmasına veya azalmasına bağlı olarak beyin felci sonrasındaki DNA fragmantasyon analizi için 30 dakika OSAO operasyonu sonrası 72 saat reperfüzyon yapılan farelerden cryostat cihazı ile alınan 18 µm kalınlığındaki koronal beyin kesitlerine TUNEL boyaması yapılmış olup konfokal mikroskop (LSM 780, Carl Zeiss, Jena, Almanya) aracılığıyla iskemiden etkilenen striatum seviyesinin görüntüleri çekilmiştir. Sonrasında elde edilen beyin görüntülerinden belirlenen ve her biri 62500 µm² olan 9 farklı alandan TUNEL pozitif hücreler sayılmıştır (Şekil 6.5.1).



Şekil 6.5.1. TUNEL boyaması ile iskemik striatum bölgesinden apoptotik hücre ölümü analizi. Veriler ortalama ± standart sapma olarak gösterilmiştir. *p<0.05 Lv-GFP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Lv-GFP veya Lv-Bmal1 gruplarında bulunan koronal kesitler TUNEL boyaması ile analiz edildiğinde Bmal1 protein seviyesinin lentiviral vektörler aracılığıyla arttırılması beyin felci sonrasında oluşan apoptotik hücre sayısını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ($p < 0.05$, bağımsız örneklem t testi (*independent samples t-test*)) azalttığı gösterilmiştir.

Bmal1 protein seviyesini azaltmak amacıyla kullanılan shBmal1 ve kontrol grubu (scRNA) farelerinden elde edilen koronal kesitlere TUNEL boyaması yapılmıştır (Şekil 6.5.2).



Şekil 6.5.2. TUNEL boyaması ile iskemik striatum bölgesinden scRNA-shBmal1 apoptotik hücre ölümü karşılaştırması. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterilmiştir. * $p < 0.05$ scRNA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Lv-GFP ve Lv-Bmal1 gruplarında yapılan analizin aynısı scRNA ve shBmal1 gruplarına da uygulanmış olup Bmal1 protein seviyesinin azaltılmasına bağlı olarak beyin felci sonrasında oluşan apoptotik hücre sayısı istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$, bağımsız örneklem t testi (*independent samples t-test*)) ölçüde arttığı gösterilmiştir.

6.6. Eş-immünpresipitasyon (co-IP) Analizi

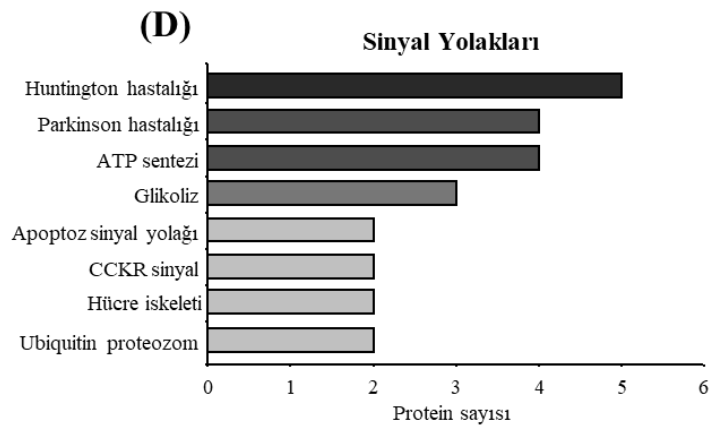
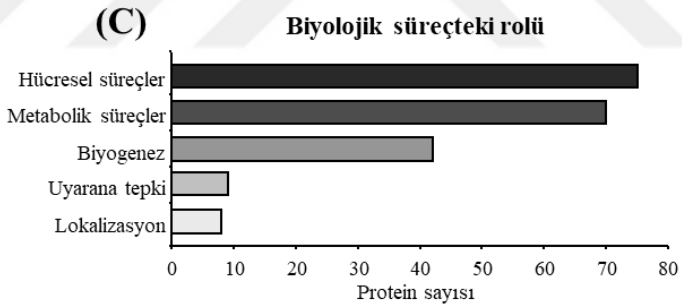
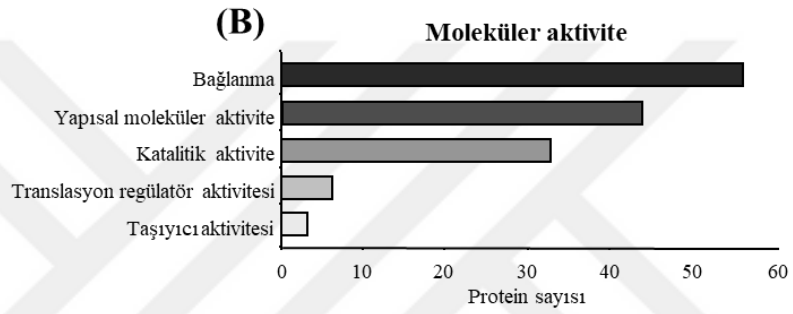
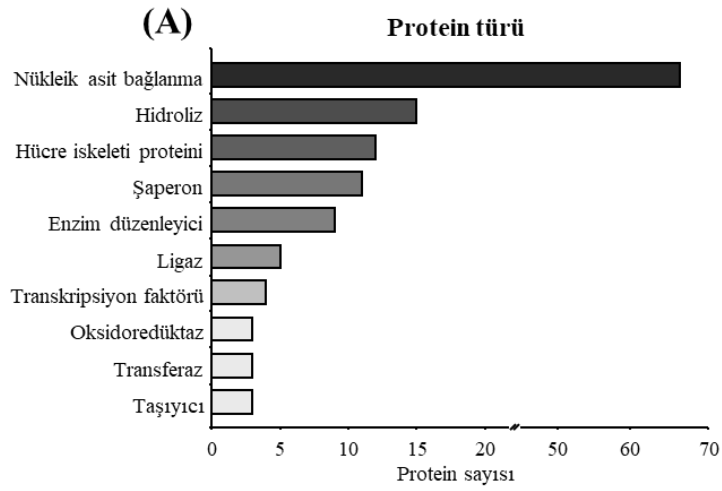
Bmall proteini ile direkt veya dolaylı yollarla etkileşimde olan proteinler eş immünpresipitasyon yöntemi sonrasında yapılan LC-MS/MS yöntemi vasıtasıyla belirlenmiştir.

Ratio	Accession	Symbol	Description	Ratio	Accession	Symbol	Description
	Q8VDM4	PSMD2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2		P08113	ENPL	Endoplasmın
	P62196	PRS8	26S proteasome regulatory subunit 8		P60843	IF4A1	Eukaryotic initiation factor 4A-I
	Q3UHX2	HAP28	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein		P23116	EIF3A	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A
	Q99N96	RM01	39S ribosomal protein L1		Q8JZQ9	EIF3B	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B
	P62281	RS11	40S ribosomal protein S11		Q9QZD9	EIF3I	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I
	P62301	RS13	40S ribosomal protein S13		Q3UGC7	EI3JA	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit J-A
	P62264	RS14	40S ribosomal protein S14		Q6NZJ6	IF4G1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1
	P62245	RS15A	40S ribosomal protein S15a		P16858	G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
	P14131	RS16	40S ribosomal protein S16		O70310	NMT1	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1
	P62270	RS18	40S ribosomal protein S18		P62827	RAN	GTP-binding nuclear protein Ran
	Q9CZX8	RS19	40S ribosomal protein S19		P63017	HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein
	P25444	RS2	40S ribosomal protein S2		Q61699	HS105	Heat shock protein 105 kDa
	P62267	RS23	40S ribosomal protein S23		Q9CQN1	TRAP1	Heat shock protein 75 kDa
	P62849	RS24	40S ribosomal protein S24		P07901	HS90A	Heat shock protein HSP 90-alpha
	P62852	RS25	40S ribosomal protein S25		P11499	HS90B	Heat shock protein HSP 90-beta
	P62908	RS3	40S ribosomal protein S3		Q8BG05	ROA3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
	P97351	RS3A	40S ribosomal protein S3a		Q35737	HNRH1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H
	P62702	RS4X	40S ribosomal protein S4		P61979	HNRPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
	P62754	RS6	40S ribosomal protein S6		Q9D0E1	HNRPM3	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M
	P62082	RS7	40S ribosomal protein S7		Q7TMK9	HNRPQ	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q
	P62242	RS8	40S ribosomal protein S8		O88569	ROA2	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1
	Q6ZWV5	RS9	40S ribosomal protein S9		P63158	HMGB1	High mobility group protein B1
	P14206	RSSA	40S ribosomal protein SA		P30681	HMGB2	High mobility group protein B2
	P63038	CH60	60 kDa heat shock protein		P10922	H10	Histone H1.0
	P14869	RLA0	60S acidic ribosomal protein P0		P43275	H11	Histone H1.1
	P99027	RLA2	60S acidic ribosomal protein P2		P43276	H15	Histone H1.5
	Q6ZWV3	RL10	60S ribosomal protein L10		COHKE1	H2A1B	Histone H2A type 1-B
	P53026	RL10A	60S ribosomal protein L10a		P10853	H2B1F	Histone H2B type 1-F/J/L
	P47963	RL13	60S ribosomal protein L13		P03975	IGEB	IgE-binding protein
	P19253	RL13A	60S ribosomal protein L13a		Q8BU30	SYIC	Isoleucine--tRNA ligase
	P35980	RL18	60S ribosomal protein L18		Q922Q8	LRC59	Leucine-rich repeat-containing protein 59
	P62717	RL18A	60S ribosomal protein L18a		Q8BMJ2	SYLC	Leucine--tRNA ligase
	Q9CR57	RL14	60S ribosomal protein L14		P32067	LA	Lupus La protein homolog
	Q9CZM2	RL15	60S ribosomal protein L15		Q99MN1	SYK	Lysine--tRNA ligase
	Q9CPR4	RL17	60S ribosomal protein L17		Q68FL6	SYMC	Methionine--tRNA ligase
	O09167	RL21	60S ribosomal protein L21		Q9QXZ0	MACF1	Microtubule-actin cross-linking factor 1
	P62830	RL23	60S ribosomal protein L23		P14873	MAP1B	Microtubule-associated protein 1B
	P62751	RL23A	60S ribosomal protein L23a		Q9D880	TIM50	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit
	P61255	RL26	60S ribosomal protein L26		P31230	AIMP1	Multisynthase complex auxiliary component p43
	P61358	RL27	60S ribosomal protein L27		Q7TPV4	MBB1A	Myb-binding protein 1A
	P41105	RL28	60S ribosomal protein L28		O35685	NUDC	Nuclear migration protein nudC
	P47915	RL29	60S ribosomal protein L29		Q9JIK5	DDX21	Nucleolar RNA helicase 2
	P27659	RL3	60S ribosomal protein L3		P09405	NUCL	Nucleolin
	P62889	RL30	60S ribosomal protein L30		Q61937	NPM	Nucleophosmin
	P62900	RL31	60S ribosomal protein L31		A2AAJ9	OBSCN	Obscurin

P62911	RL32	60S ribosomal protein L32	P24369	PIIB	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B
Q9D1R9	RL34	60S ribosomal protein L34	Q62446	FKBP3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP3
Q6ZVW7	RL35	60S ribosomal protein L35	P15331	PERI	Peripherin
O55142	RL35A	60S ribosomal protein L35a	P35700	PRDX1	Peroxiredoxin-1
Q9D8E6	RL4	60S ribosomal protein L4	Q8VEM8	MPCP	Phosphate carrier protein
P47962	RL5	60S ribosomal protein L5	Q9CY58	PAIRB	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein
P47911	RL6	60S ribosomal protein L6	Q9QXS1	PLEC	Plectin
P14148	RL7	60S ribosomal protein L7	P60335	PCBP1	Poly(rC)-binding protein 1
P12970	RL7A	60S ribosomal protein L7a	P29341	PABP1	Polyadenylate-binding protein 1
P62918	RL8	60S ribosomal protein L8	Q61656	DDX5	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5
P20029	GRP78	78 kDa glucose-regulated protein	P67778	PHB	Prohibitin
Q8QZT1	THIL	Acetyl-CoA acetyltransferase	O35129	PHB2	Prohibitin-2
P60710	ACTB	Actin_cytoplasmic 1	P50580	PA2G4	Proliferation-associated protein 2G4
P48962	ADT1	ADP/ATP translocase 1	P52480	KPYM	Pyruvate kinase PKM
P51881	ADT2	ADP/ATP translocase 2	P68040	RACK1	Receptor of activated protein C kinase 1
P17182	ENOA	Alpha-enolase	Q91YQ5	RPN1	Ribophorin I
Q9D019	SYRC	Arginine-tRNA ligase	Q8BVY0	RL1D1	Ribosomal L1 domain-containing protein 1
Q922B2	SYDC	Aspartate-tRNA ligase	Q99PL5	RRBP1	Ribosome-binding protein 1
Q03265	ATPA	ATP synthase subunit alpha	P84099	RL19	RL19_MOUSE 60S ribosomal protein L19
Q9CQQ7	AT5F1	ATP synthase subunit b	Q8BP67	RL24	RL24_MOUSE 60S ribosomal protein L24
P56480	ATPB	ATP synthase subunit beta	Q9D1J3	SARNP	SAP domain-containing ribonucleoprotein
Q9DCX2	ATP5H	ATP synthase subunit d	P42208	SEPT2	Septin-2
Q91VR2	ATPG	ATP synthase subunit gamma	Q80UG5	SEPT9	Septin-9
Q9DB20	ATPO	ATP synthase subunit O	Q8BX10	PGAM5	Serine/threonine-protein phosphatase PGAM5
Q92511	ATAD3	ATPase family AAA domain-containing protein 3	P26638	SYSC	Serine-tRNA ligase_cytoplasmic
Q91VR5	DDX1	ATP-dependent RNA helicase DDX1	P47758	SRPRB	Signal recognition particle receptor subunit beta
Q62167	DDX3X	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	Q8VDN2	AT1A1	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1
Q91YN9	BAG2	BAG family molecular chaperone regulator 2	P16546	SPTN1	Spectrin alpha chain_non-erythrocytic 1
Q8CGC7	SYEP	Bifunctional glutamate/proline-tRNA ligase	Q62261	SPTB2	Spectrin beta chain_non-erythrocytic 1
Q9WTL8	BMAL1	Brain and muscle ARNT-like 1	Q8VIJ6	SFPQ	Splicing factor_proline- and glutamine-rich
O35887	CALU	Calumenin	P38647	GRP75	Stress-70 protein
P18760	COF1	Cofilin-1	Q9CU62	SMC1A	Structural maintenance of chromosomes protein 1A
Q9DB77	QCR2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2	P11983	TCPA	T-complex protein 1 subunit alpha
Q9D0M3	CY1	Cytochrome c1_heme protein	P80314	TCPB	T-complex protein 1 subunit beta
Q9THU4	DYHC1	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	P80315	TCPD	T-complex protein 1 subunit delta
Q61753	SERA	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	P80316	TCPE	T-complex protein 1 subunit epsilon
Q62188	DPYL3	Dihydropyrimidinase-related protein 3	P80318	TCPG	T-complex protein 1 subunit gamma
Q8BW94	DYH3	Dynein heavy chain 3_axonema	P80317	TCPZ	T-complex protein 1 subunit zeta
Q91ZU6	DYST	Dystonin	Q61029	LAP2B	TP beta/delta/epsilon/gamma
P10126	EF1A1	Elongation factor 1-alpha 1	Q62318	TIF1B	Transcription intermediary factor 1-beta
P57776	EF1D	Elongation factor 1-delta	Q99LF4	RTCB	tRNA-splicing ligase RtcB homolog
Q9D8N0	EF1G	Elongation factor 1-gamma	P05213	TBA1B	Tubulin alpha-1B chain
P58252	EF2	Elongation factor 2	Q9Z1Q9	SYVC	Valine-tRNA ligase
Q8BFR5	EFTU	Elongation factor Tu	P20152	VIME	Vimentin

Şekil 6.6.1. Eş-immünpresipitasyon (co-IP) analizi ile belirlenmiş Bmal1 ile etkileşimli olan protein listesi

Şekil 6.6.1’de belirtilen proteinler Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships (PANTHER) programı kullanılarak çeşitli kategorilere ayrılmıştır. Yapılan analizlere göre proteinler; protein türü, moleküler aktivite, biyolojik süreçlerdeki rolü ve sinyal yolları olmak üzere ayrılmış olup Şekil 6.6.2.’de gösterilmiştir.



Şekil 6.6.2. Bmall ile etkileşimli proteinlerin; protein türü (A), moleküler aktivite (B), biyolojik süreçteki rolü (C) ve sinyal yolakları (D) olarak sınıflandırılması.

6.7. Proteomik Analizler

Sirkadiyen ritmin önemli bir parçası olan Bmal1 proteininin OSAO metodu ile gerçekleştirilen beyin felci operasyonu sonrası iskemik striatum bölgesinde lentiviral vektörler aracılığıyla Bmal1 ifadesi arttırımına bağlı ve Bmal1 ifadesi baskılanmasına bağlı olarak değişen protein profillerini araştırmak amacıyla ultra performanslı sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) cihazı (ACQUITY UPLC M Class - SYNAPT G2-Si Mass Spectrometry, Waters, ABD) ile analizi yapılmıştır.

UNIPROT erişim numarası	Anova (p)	Kat değişimi	Maksimum olduğu grup	Protein
Q9CXY6	0,008	1,43	Lv-GFP	Interleukin enhancer-binding factor 2
Q9DBC7	0,020	1,42	Lv-Bmal1	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit
Q5S006	0,021	1,52	Lv-GFP	Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2
Q9Z2H5	0,024	2,54	Lv-GFP	Band 4.1-like protein 1
Q9D880	0,027	2,26	Lv-Bmal1	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM50
Q61941	0,032	2,24	Lv-GFP	NAD(P) transhydrogenase
Q91XL9	0,032	2,40	Lv-GFP	Oxysterol-binding protein-related protein 1
P01837	0,032	1,41	Lv-Bmal1	Immunoglobulin kappa constant
E9Q1U1	0,036	1,94	Lv-Bmal1	Coiled-coil domain-containing protein 171
E9Q1M1	0,037	1,83	Lv-GFP	PDZ domain-containing 2
A0A0R4J171	0,040	4,32	Lv-GFP	Rho GTPase-activating protein 7
Q8BHZ0	0,040	3,07	Lv-GFP	Protein FAM49A
P22599	0,041	1,48	Lv-Bmal1	Alpha-1-antitrypsin 1-2
Q9DBB8	0,043	1,58	Lv-Bmal1	Trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase
Q99L04	0,043	1,46	Lv-Bmal1	Dehydrogenase/reductase SDR family member 1
Q8K3J1	0,043	1,48	Lv-Bmal1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8
Q8VEK3	0,044	1,86	Lv-Bmal1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
Q9R0X4	0,046	1,55	Lv-Bmal1	Acyl-coenzyme A thioesterase 9
Q9JKR6	0,047	1,48	Lv-Bmal1	Hypoxia up-regulated protein 1

Şekil 6.7.1. Lv-Bmal1 ve kontrol grubu (Lv-GFP) arasında $p < 0.05$ ve en az 1.4 kat değişen proteinlerin listesi.

LC-MS/MS sonrasında elde edilen proteinler Lv-Bmal1 ve kontrol grubu olan Lv-GFP arasında Bmal1 protein ifadesinin arttırımına bağlı olarak en az 1.4 kat değişen ve istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) ölçüde değişen 19 protein olduğu gösterilmiştir.

UNIPROT erişim numarası	Anova (p)	Kat değişimi	Maksimum olduğu grup	Protein
P26040	0,001	1,45	shBmal1	Ezrin
Q91VR5	0,013	1,50	shBmal1	ATP-dependent RNA helicase DDX1
Q3LAC4	0,025	1,56	shBmal1	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 2 protein
P28474	0,048	2,94	shBmal1	Alcohol dehydrogenase class-3
P97929	0,000	1,87	shBmal1	Breast cancer type 2 susceptibility protein homolog
Q9EQ06	0,001	1,75	shBmal1	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 11
P61027	0,001	1,41	shBmal1	Ras-related protein Rab-10
Q9CQI6	0,002	2,04	shBmal1	Coactosin-like protein
P02089	0,025	1,55	shBmal1	Hemoglobin subunit beta-2
Q9CR16	0,000	2,87	shBmal1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D
Q9R0Y5	0,006	1,60	shBmal1	Adenylate kinase isoenzyme 1
P35505	0,010	1,87	shBmal1	Fumarylacetoacetase
Q91ZR1	0,011	1,54	scRNA	Ras-related protein Rab-4B
Q62433	0,015	1,45	shBmal1	Protein NDRG1
G5E893	0,025	2,07	shBmal1	Ankyrin repeat domain 12
Q60829	0,033	1,58	scRNA	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 1B
Q91VK4	0,001	1,88	shBmal1	Integral membrane protein 2C
Q6P5H2	0,003	1,63	scRNA	Nestin
Q80TJ1	0,003	1,44	scRNA	Calcium-dependent secretion activator 1
O54941	0,009	3,83	shBmal1	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator
E9Q1Z2	0,012	3,84	shBmal1	ENTH domain-containing 1
Q9JHU9	0,015	1,50	shBmal1	Inositol-3-phosphate synthase 1
P09041	0,017	1,73	shBmal1	Phosphoglycerate kinase 2
Q8BGB7	0,023	1,56	shBmal1	Enolase-phosphatase E1
Q9D1X0	0,025	1,69	shBmal1	Nucleolar protein 3
P02088	0,025	1,51	shBmal1	Hemoglobin subunit beta-1
P60335	0,026	1,47	shBmal1	Poly(rC)-binding protein 1
P61759	0,033	1,63	shBmal1	Prefoldin subunit 3
Q61532	0,037	1,41	shBmal1	Mitogen-activated protein kinase 6
Q91XY4	0,041	1,63	shBmal1	Protocadherin gamma-A4
Q8BMJ2	0,045	1,76	shBmal1	Leucine--tRNA ligase
Q9ES00	0,046	1,46	scRNA	Ubiquitin conjugation factor E4

Şekil 6.7.2. shBmal1 ve kontrol grubu scRNA arasında $p < 0.05$ ve en az 1.4 kat değişen proteinlerin listesi.

shBmal1 ve kontrol grubu scRNA arasında Bmal1 protein ifadesinin baskılanmasına bağlı olarak en az 1.4 kat değişen ve istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) ölçüde değişen 32 proteinin olduğu gösterilmiştir.

7. TARTIŞMA

Sirkadiyen ritme bağlı olarak gün içerisinde değişen kalp ritmi, hormonal değişim, pıhtılaşma gibi faktörler serebrovasküler hastalıkların tetiklenmesine neden olmaktadır (6). Sirkadiyen ritim, organizmaların i fizyolojik süreçlerini dış ortamdan gelen uyarılara bağlı olarak hassas bir Şekilde senkronize eden biyolojik bir saattir. Bu biyolojik saat gün içerisindeki aydınlık-karanlık döngüsü, mevsimsel değişiklikler ve beslenme gibi dış uyarılara bağlı olarak kendi ritmini düzenlemektedir (4, 5). Bunun yanı sıra sirkadiyen ritmin, nörodejeneratif hastalıkların mekanizmalarında da aktif bir Şekilde rol aldığı düşünülmektedir. Buna bağlı olarak, 2018 yılında yayınlanan bir çalışmada sirkadiyen ritmin beyin felci sonrasında gelişen hasar mekanizmaları üzerine olan etkileri gösterilmiştir (3). Ayrıca yine aynı çalışma, sirkadiyen ritmin belirlenmesinde önemli bir rolü bulunan Bmal1'in beyin felci patofizyolojisinde önemli bir rolünün olabileceğine dair kuvvetli bulgular içermektedir.

Bu tez kapsamında lentivirüs aracılığıyla Bmal1 protein seviyesi arttırılmış veya Bmal1 protein seviyesi baskılanmış farelerde OSAO ile gerçekleştirilen beyin felci sonrasında Bmal1'in DNA fragmantasyonu, nöronal sağkalım ve hücre içi sinyal yolakları üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

Son yıllarda lentiviral vektörler aracılığıyla gen transferi yöntemi çeşitli hastalıkların tedavisinde etkin bir Şekilde kullanılabilir (55). Lentiviral vektörler, merkezi sinir sistemi (MSS) hücrelerini kolay bir Şekilde enfekte ederek istikrarlı ve uzun süreli transgen ekspresyonu sağladığından dolayı MSS hastalıklarında önemli ve güvenli bir tedavi stratejisi olarak değerlendirilmektedir (56). Bu bilgiler dahilinde, bu çalışma kapsamında Bmal1 proteinin anlatımını arttırmak veya azaltmak için lentiviral vektörler tercih edilmiştir. Yapılan moleküler klonlama deneylerini takiben üretilen virüs partikülleri (Lv-GFP, Lv-Bmal1, scRNA, shBmal1) fare nöroblastoma hücre hattına uygulanmış ve hücrelerin %90'dan fazlasının enfekte olduğu gösterilmiştir (Şekil 6.1.1). Üretilen virüslerin başarılı bir Şekilde hücreleri enfekte etmesinden sonra yapılan Western blot aracılı protein analiziyle Bmal1 protein seviyesindeki değişimler gözlemlenmiştir. Bu bağlamda Lv-Bmal1 (Bmal1 protein seviyesini arttırmak amacıyla dizayn edilen lentivirüs)

uygulanan hücre hattında Bmal1 protein seviyesinin Lv-GFP (pLenti-CMV-GFP-2A-Puro) grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttırdığı gözlemlenmiştir (Şekil 6.2.1). Ayrıca, scBmal1 uygulanan hücrelerden yapılan Western blot deneyleriyle shBmal1'in, scRNA grubuna kıyasla Bmal1 protein seviyesini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalttığı görülmüştür (Şekil 6.2.2). Bu bilgiler dahilinde, yapılan moleküler klonlama çalışmalarının başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve Bmal1 protein seviyesini etkili ve hedeflenen doğrultuda değiştirdiği gösterilmiştir.

Bmal1 protein seviyesini arttırmak veya azaltmak için üretilen virüslerin etkinlikleri ve güvenilirlikleri gösterildikten sonra virüsler (Lv-GFP, Lv-Bmal1, scRNA, shBmal1) fare beyinlerinde, beyin felcinden birinci derecede etkilenmesi beklenen striatum seviyesine beyin içi enjeksiyon yöntemiyle verilmiştir. Virüs enjeksiyonundan sonra lentivirüslerin istenilen alanı enfekte edebilmesi ve en yüksek verimliliğin sağlanabilmesi için yaklaşık 7 gün beklenmesi gerekmektedir (57). Virüs enjeksiyonundan 7 gün sonra farelere 30 dakikalık OSAO uygulanmıştır.

Beyin felci vakalarının %80'i OSA tıkanması sonucu gerçekleşir. Kliniği en iyi şekilde taklit edebilmek amacıyla farelerde OSAO modeli uygulanmaktadır. Bu kapsamda, farelere 30 dakikalık OSAO operasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha uzun ve dolayısıyla daha büyük çaplı hasar vermek yerine, geri döndürülebilir bir hasar için 30 dakikalık beyin felci metodu uygulanmıştır. Geniş çaplı hasar, çalışmanın amacı olan Bmal1'in beyin felci sonrası etkilerini geçersiz kılabileceği ya da görülmesini engelleyebileceği için, Bmal1'in etkilerini gözlemleyebilmek amacıyla büyük çaplı bir hasardan kaçınılmıştır.

Filament tekniği ile gerçekleştirilen OSAO modelinin başarılı bir şekilde yapıldığını göstermek ve aynı zamanda beyin felci operasyonlarının tekrar edilebilirliğini ve güvenilirliğini göstermek amacıyla orta serebral arterin beslediği striatum (Bregma; -2 mm posterior, 6 mm lateral) seviyesinden beyin felci operasyonları süresince ve reperfüzyon sırasında LDF ile beyin kan akımı takibi yapılmıştır. Filamentin orta serebral arter girişini tıkanmasıyla beraber beyin kan akımının %80 oranında düştüğü, 30 dakika boyunca sabit kaldığı ve filamentin geri

çekilmesiyle birlikte iskemik alana tekrardan kanlanmanın sağlandığı gösterilmiştir (Şekil 6.3.1). Bu veriler, beyin felci operasyonlarının başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir (58). Bmal1 protein seviyesinin artmasına veya azalmasına bağlı olarak beyin felci sırasında veya beyin felci sonrasında gerçekleştirilen reperfüzyon aşamasında beyin kan akımı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir.

Beyin felci hasarı gerçekleştikten sonra, etkilenen bölgenin merkezi olarak adlandırılan kor bölgede hücreler nekrotik hücre ölümü ile kısa zaman içinde kaybedilirken; çevre dokular kor bölgesine kıyasla daha az etkilenmektedir (59). Buna rağmen, büyük miktarda enerji gerekliliğinin karşılanamamasından dolayı enerji yetersizliğine, yüksek Ca^{+2} oranına ve glutamat eksitotoksitesine maruz kalan bu dokularda, bu faktörlere bağlı olarak çeşitli hücre içi sinyal yolları aktifleşmektedir. Penumbra bölgesinde bulunan hücreler iskemi sonrası hemen ölmemiş fakat hasar almış hücreler olduğundan; burada nekrotik hücre ölümüne nazaran apoptotik hücre ölümü gözlemlenmektedir. Bu nedenle, beyin felci tedavileri için gerçekleştirilen çalışmalarda penumbra bölgesindeki hücrelerin kurtarılması amaçlanmaktadır (31-33). Nöronların sağ kalımı ya da apoptoz ile hücre ölümünün gerçekleşmesi, çeşitli iç ve dış etkenlere bağlıdır (34). Bu tez kapsamında, Bmal1 ifadesini artırmanın ya da baskılamanın nöronal sağkalıma etkisini araştırmak adına; beyin felci operasyonundan 72 saat sonra sakrifiye edilen farelerden alınan beyin kesitlerine NeuN analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, Lv-Bmal1 grubunun, kontrol grubu olan Lv-GFP grubuna kıyasla anlamlı bir farklılık göstermediği (Şekil 6.4.1); buna karşılık Bmal1 ifade baskılaması gerçekleştirilen shBmal1 grubunda, kontrol grubu olan scRNA grubuna kıyasla nöronal sağkalımın istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (Şekil 6.4.2).

Beyin felci intrinsik ve ekstrinsik apoptoz sinyal yollarını aktive etmektedir. İntrinsik yolda mitokondriden CytC salınımı gerçekleşerek kaspaz-3'ün uyarılmasına neden olur. Ekstrinsik yolda ise hücre yüzeyi ölüm reseptörleri aktifleşerek, kaspaz-8'in uyarılmasına yol açar (48). Apoptoz sürecindeki hücrelerde DNA hasarı sonucu DNA kırıkları bulunduğu için, bu hücreleri belirlemek amacıyla

TUNEL analizi gerçekleştirilir. TUNEL pozitif hücreler, apoptotik hücreler olarak tanımlanabilir (51, 52). Tez kapsamında yaptığımız çalışmada, Lv-Bmal1 grubunda, kontrol grubu olan Lv-GFP grubuna kıyasla apoptotik hücre sayısında anlamlı olarak azalma gözlenmiştir (Şekil 6.5.1). shBmal1 grubunda ise, kontrol grubu olan scRNA grubuna kıyasla apoptotik hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı ve önemli ölçüde artış gösterilmiştir (Şekil 6.5.2). Bu bulgular neticesinde yapılan değerlendirmede, Bmal1 protein artışının apoptotik hücre ölümünün önüne geçtiği söylenebilir; diğer grupta da Bmal1 ifade baskılanması sonucu artan apoptotik hücre ölümü, bu bilgiyi destekler niteliktedir.

Yaptığımız çalışmada, Bmal1 ile etkileşimi olan proteinleri belirlemek amacıyla eş-immünpresipitasyon analizi gerçekleştirildi. Bmal1 ile direkt ya da dolaylı olarak bağlantılı olan proteinler belirlendi (Şekil 6.6.1). Belirlenen proteinlerin analizi için PANTHER programı kullanılarak sınıflandırılmıştır. Protein sınıfı olarak kategorilendirildiğinde, bu proteinlerin büyük bir kısmının nükleik asit bağlanma proteini olduğu belirlenmiştir. Moleküler aktivite sınıflandırmasında ise bağlanma, yapısal moleküler aktivite ve katalitik aktiviteye sahip proteinlerin çoğunlukta olduğu görülmüştür. Ayrıca biyogenezde, hücreSEL ve metabolik süreçlerde görev alan proteinler olduğu saptanmıştır. Bmal1 ile etkileşimli proteinlerin glikoliz, ATP üretimi, apoptoz sinyal yolağı gibi süreçlerde rol aldığı; ayrıca Huntington ve Parkinson hastalıkları ile ilişkili proteinler olduğu gözlemlenmiştir.

Kütle spektrometresi bazlı proteomik analizler, Western blot gibi antikor ile gerçekleştirilen protein analizlerine iyi bir alternatiftir. Günümüzde modern kütle spektrometresi cihazları, düşük miktarda bulunan ve biyobelirteç adayı olabilecek molekülleri tespit etme konusunda güçlü araçlardır. Veri-bağımsız tanımlama (DIA-data independent acquisition), en son geliştirilen hedefsiz proteomik teknolojisidir. DIA modunda, prekürsör iyonlar dizisel küçük kütle aralıklarına (5-25 Da) ayrılarak; her kütle aralığındaki prekürsör iyon, ürünü tanımlamak amacıyla iyon spektrumuna tanımlanır. DIA, çeşitli teknolojilerin kombinasyonu olup; özgünlük, hassaslık ve proteom kapsamlılık özelliklerini bir araya getirir. Bu teknik ile biyobelirteç araştırmalarında en umut verici araçtır. Bu tez kapsamında yapılan sıvı kromatografisi-

kütle spektrometresi analizleri, çözünürlük (*Resolution*) HDMS^E ve DIA modunda; etiketsiz relatif kantifikasyon yöntemi ile yapılmıştır. Böylece ilgili dokuda tüm proteom görülmek istenmiştir. Organizma spesifik (*Mus musculus*) protein databazı (UniProt ID: UP000000589) kullanılarak biyoinformatik araçlarla protein tanımlaması ve kantifikasyon gerçekleştirilmiştir. PLGS (ProteinLynx Global Server 3.0.1. Waters®, ABD) yazılımı ile her grup için yaklaşık 1400 protein tanımlanmıştır. Progenesis for Proteomics (Progenesis QI-P 2.0.5556.29015 Nonlinear, Waters®) yazılımı ile Lv-Bmal1 grubu, Lv-GFP grubu ile; shBmal1 grubu scRNA grubu ile kıyaslanmıştır. Lv-Bmal1 ve Lv-GFP karşılaştırmasında, istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) ve en az 1.4 kat fark görülen 19 protein seçilmiştir (Şekil 6.7.1). shBmal1 ve scRNA karşılaştırmasında ise istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) ve en az 1.4 kat fark görülen 32 protein seçilmiştir (Şekil 6.7.2). Belirlenen bu proteinler, Bmal1'in etkilediği hücre içi sinyal yolları ve beyin felci patofizyolojisindeki rolünü aydınlatmada yolumuza ışık tutabilecek proteinlerdir.

8. SONUÇ

Nörodejeneratif hastalıkların, spesifik olarak beyin felci patofizyolojisinde hasarın ve sonrasında gerçekleşen iyileşme mekanizmalarının sirkadiyen ritme bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Bu tez kapsamında, sirkadiyen ritimde rol oynayan en önemli proteinlerden biri olan Bmal1'in; hasar sonrası etkileri araştırılmış ve proteomik açıdan incelenmesi hedeflenmiştir. Farelerde Bmal1 protein ifadesini arttırmak ya da baskılamak amacıyla, gen ifadesini değiştirmede etkili ve uygun gen dizilerine sahip lentiviral vektörler Yöntem 5.2'de belirtilen şekilde dizayn edilmiştir (Şekil 5.1.2.1). Hazırlanan lentiviral vektörlerin hücrelerdeki transfeksiyon verimliliğini kontrol etmek amacıyla lentiviral vektörler N2a hücrelerine verilmiş ve transfeksiyonun %90 enfeksiyon oranı ile yüksek verimliliğe sahip olduğu onaylanmıştır (Resim 6.1.1). Lentiviral vektörlerle enfekte edilmiş N2a hücrelerinden izole edilen proteinlere, Bmal1 protein seviyelerindeki değişikliği gözlemek amacıyla Western blot analizi yapılmıştır. Bmal1 anlatımının artırılması amacıyla Lv-Bmal1 plazmidine sahip lentiviral vektörlerle transfekte edilen hücrelerde, kontrol grubuna kıyasla Bmal1 protein seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir (Şekil 6.2.1). Bmal1 anlatımının baskılanması amacıyla shBmal1-1 vektörleri ile transfekte edilen hücrelerde yaklaşık olarak %55 oranında Bmal1 baskılanması gerçekleştiği gösterilmiştir. Etkinliği onaylanan lentiviral vektörler, beyin hasarından 7 gün önce farelere Yöntem 5.3'te belirtilen şekilde beyin içi enjeksiyon yöntemi ile verilmiştir. Beyin felci operasyonu, 30 dakikalık orta serebral arter tıkanması metodu ile gerçekleştirilmiş (Yöntem 5.4) ve operasyonun doğruluğu Lazer Doppler akışmetresi ile metot boyunca ve reperfüzyon sonrası 20 dakika süresince takip edilmiştir (Şekil 6.3.1). Operasyondan 72 saat sonra deney sonlandırılmış ve farelerden alınan koronal beyin kesitlerine nöronal sağkalım ve apoptotik hücre ölümü analizi yapılmıştır. Bmal1 ifade artırımının nöronal sağ kalıma etkisi görülmemekle birlikte (Şekil 6.4.1), Bmal1 ifade baskılamasının nöronlardaki sağkalım oranını istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir (Şekil 6.4.2). Apoptotik hücre ölümü belirteci olan DNA fragmentasyonu, koronal beyin kesitlerine TUNEL boyaması yapılarak incelenmiş; Bmal1 anlatımının artırıldığı grupta apoptotik hücre ölümünün istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 6.5.1). Yapılan TUNEL analizi sonucu, Bmal1 anlatımının

baskılandığı grupta apoptotik hücre ölümünün istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı gösterilmiştir (Şekil 6.5.2). Bmal1 ile doğrudan ya da dolaylı olarak etkileşimde bulunan proteinler eş-immünpresipitasyon (co-IP) analizi ile belirlenmiş (Şekil 6.6.1) ve bu proteinlerin yer aldığı sinyal yolları, protein türü ve moleküler aktiviteleri, biyolojik süreçlerdeki rolleri Şekil 6.6.2'de sınıflandırılmıştır. Bmal1 artırımının ya da baskılamasının beyin hasarı sonrası hangi proteinleri etkilediğini ve seviyelerini değiştirdiğini belirlemek amacıyla kütle spektrometresi kullanılarak proteomik analizleri gerçekleştirilmiştir. Bmal1 ifade artırımını (Şekil 6.7.1) ve Bmal1 ifade baskılaması (Şekil 6.7.2) gerçekleştirilen gruplarda beyin hasarı sonrası, Bmal1 protein seviyesi değişimlerinden en az 1.4 kat değişen ve istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ($p < 0.05$) etkilenen proteinler listelendi. Elde edilen bu proteinlerin, beyin felci ve sirkadiyen ritim arasındaki ilişkiyi aydınlatması; beyin felci patofizyolojisinde sirkadiyen ritme bağlı olarak değişen moleküler mekanizmaların ve sinyal yollarının netleştirilmesinde katkı sağlaması beklenmektedir.

9. KAYNAKLAR

1. Dierickx, P, Van Laake, LW, and Geijsen, N. Circadian clocks: from stem cells to tissue homeostasis and regeneration. *EMBO Rep* 19, 18-28. (2018).
2. Kondratov, RV, Chernov, MV, Kondratova, AA, Gorbacheva, VY, Gudkov, AV, and Antoch, MP. BMAL1-dependent circadian oscillation of nuclear CLOCK: posttranslational events induced by dimerization of transcriptional activators of the mammalian clock system. *Genes Dev* 17, 1921-1932. (2003).
3. Beker, MC, Caglayan, B, Yalcin, E, Caglayan, AB, Turkseven, S, Gurel, B, et al. Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal1 and Survival Kinase AKT. *Mol Neurobiol* 55, 2565-2576. (2018).
4. Duffy, JF, and Czeisler, CA. Effect of Light on Human Circadian Physiology. *Sleep Med Clin* 4, 165-177. (2009).
5. Fisk, AS, Tam, SKE, Brown, LA, Vyazovskiy, VV, Bannerman, DM, and Peirson, SN. Light and Cognition: Roles for Circadian Rhythms, Sleep, and Arousal. *Front Neurol* 9, 56. (2018).
6. Schallner, N, Lieberum, JL, Gallo, D, LeBlanc, RH, 3rd, Fuller, PM, Hanafy, KA, et al. Carbon Monoxide Preserves Circadian Rhythm to Reduce the Severity of Subarachnoid Hemorrhage in Mice. *Stroke* 48, 2565-2573. (2017).
7. Bass, J, and Takahashi, JS. Circadian rhythms: Redox redux. *Nature* 469, 476-478. (2011).
8. Albrecht, A, and Stork, O. Circadian Rhythms in Fear Conditioning: An Overview of Behavioral, Brain System, and Molecular Interactions. *Neural Plast* 2017, 3750307. (2017).
9. Patke, A, Young, MW, and Axelrod, S. Molecular mechanisms and physiological importance of circadian rhythms. *Nature reviews. Molecular cell biology* 21, 67-84. (2020).
10. Young, MW. Life's 24-hour clock: molecular control of circadian rhythms in animal cells. *Trends in biochemical sciences* 25, 601-606. (2000).
11. Uddin, MS, Hoque, MI, Uddin, MK, Kamol, SA, and Chowdhury, RH. Circadian rhythm of onset of stroke - in 50 cases of ischemic stroke. *Mymensingh Med J* 24, 121-126. (2015).

12. Wulff, K, Gatti, S, Wettstein, JG, and Foster, RG. Sleep and circadian rhythm disruption in psychiatric and neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* 11, 589-599. (2010).
13. Anea, CB, Cheng, B, Sharma, S, Kumar, S, Caldwell, RW, Yao, L, et al. Increased superoxide and endothelial NO synthase uncoupling in blood vessels of Bmal1-knockout mice. *Circ Res* 111, 1157-1165. (2012).
14. Goergen, EM, Bagay, LA, Rehm, K, Benton, JL, and Beltz, BS. Circadian control of neurogenesis. *J Neurobiol* 53, 90-95. (2002).
15. Gu, Z, Wang, B, Zhang, YB, Ding, H, Zhang, Y, Yu, J, et al. Association of ARNTL and PER1 genes with Parkinson's disease: a case-control study of Han Chinese. *Sci Rep* 5, 15891. (2015).
16. Ferini-Strambi, L, Galbiati, A, Casoni, F, and Salsone, M. Therapy for Insomnia and Circadian Rhythm Disorder in Alzheimer Disease. *Current treatment options in neurology* 22, 4. (2020).
17. Musiek, ES, Xiong, DD, and Holtzman, DM. Sleep, circadian rhythms, and the pathogenesis of Alzheimer disease. *Experimental & molecular medicine* 47, e148. (2015).
18. Kubota, K, Sakurai, T, Tamura, J, and Shirakura, T. Is the circadian change in hematocrit and blood viscosity a factor triggering cerebral and myocardial infarction? *Stroke* 18, 812-813. (1987).
19. Gorelick, PB. The global burden of stroke: persistent and disabling. *Lancet Neurol* 18, 417-418. (2019).
20. Benjamin, EJ, Muntner, P, Alonso, A, Bittencourt, MS, Callaway, CW, Carson, AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 139, e56-e528. (2019).
21. George, MG, Tong, X, and Bowman, BA. Prevalence of Cardiovascular Risk Factors and Strokes in Younger Adults. *JAMA Neurol* 74, 695-703. (2017).
22. Michaud, CM, Murray, CJ, and Bloom, BR. Burden of disease--implications for future research. *JAMA* 285, 535-539. (2001).
23. Chiang, T, Messing, RO, and Chou, WH. Mouse model of middle cerebral artery occlusion. *J Vis Exp* (2011).

24. Mink, JW, Blumenshine, RJ, and Adams, DB. Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: its constancy and functional basis. *Am J Physiol* 241, R203-212. (1981).
25. Harris, JJ, Jolivet, R, and Attwell, D. Synaptic energy use and supply. *Neuron* 75, 762-777. (2012).
26. Nortley, R, and Attwell, D. Control of brain energy supply by astrocytes. *Curr Opin Neurobiol* 47, 80-85. (2017).
27. Dirnagl, U, Iadecola, C, and Moskowitz, MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences* 22, 391-397. (1999).
28. Klehmet, J, Harms, H, Richter, M, Prass, K, Volk, HD, Dirnagl, U, et al. Stroke-induced immunodepression and post-stroke infections: lessons from the preventive antibacterial therapy in stroke trial. *Neuroscience* 158, 1184-1193. (2009).
29. Kunz, A, Dirnagl, U, and Mergenthaler, P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 24, 495-509. (2010).
30. Nadareishvili, Z, Kelley, D, Luby, M, Simpkins, AN, Leigh, R, Lynch, JK, et al. Molecular signature of penumbra in acute ischemic stroke: a pilot transcriptomics study. *Annals of clinical and translational neurology* 6, 817-820. (2019).
31. Zechariah, A, ElAli, A, Doepfner, TR, Jin, F, Hasan, MR, Helfrich, I, et al. Vascular endothelial growth factor promotes pericyte coverage of brain capillaries, improves cerebral blood flow during subsequent focal cerebral ischemia, and preserves the metabolic penumbra. *Stroke* 44, 1690-1697. (2013).
32. Yao, H, Takasawa, R, Fukuda, K, Shiokawa, D, Sadanaga-Akiyoshi, F, Ibayashi, S, et al. DNA fragmentation in ischemic core and penumbra in focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res Mol Brain Res* 91, 112-118. (2001).
33. Astrup, J, Siesjo, BK, and Symon, L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12, 723-725. (1981).
34. Lakhan, SE, Kirchgessner, A, and Hofer, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med* 7, 97. (2009).
35. Katsura, K, Kristian, T, and Siesjo, BK. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans* 22, 991-996. (1994).

36. Martin, RL, Lloyd, HG, and Cowan, AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* 17, 251-257. (1994).
37. Dirnagl, U, and Endres, M. Found in translation: preclinical stroke research predicts human pathophysiology, clinical phenotypes, and therapeutic outcomes. *Stroke* 45, 1510-1518. (2014).
38. Yamasaki, Y, Matsuo, Y, Matsuura, N, Onodera, H, Itoyama, Y, and Kogure, K. Transient increase of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, in ischemic brain areas after focal ischemia in rats. *Stroke* 26, 318-322; discussion 322-313. (1995).
39. Doyle, KP, Simon, RP, and Stenzel-Poore, MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 55, 310-318. (2008).
40. Kristian, T, and Siesjo, BK. Calcium in ischemic cell death. *Stroke* 29, 705-718. (1998).
41. Fujimura, M, Morita-Fujimura, Y, Murakami, K, Kawase, M, and Chan, PH. Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 18, 1239-1247. (1998).
42. Hossmann, KA. Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 8, 195-208. (1996).
43. Rothwell, NJ, and Hopkins, SJ. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci* 18, 130-136. (1995).
44. Iadecola, C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 20, 132-139. (1997).
45. Letechipia-Vallejo, G, Gonzalez-Burgos, I, and Cervantes, M. Neuroprotective effect of melatonin on brain damage induced by acute global cerebral ischemia in cats. *Arch Med Res* 32, 186-192. (2001).
46. Trendelenburg, G, and Dirnagl, U. Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. *Glia* 50, 307-320. (2005).
47. Mergenthaler, P, Dirnagl, U, and Meisel, A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis* 19, 151-167. (2004).

48. Broughton, BR, Reutens, DC, and Sobey, CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 40, e331-339. (2009).
49. Unal-Cevik, I, Kilinc, M, Can, A, Gursoy-Ozdemir, Y, and Dalkara, T. Apoptotic and necrotic death mechanisms are concomitantly activated in the same cell after cerebral ischemia. *Stroke* 35, 2189-2194. (2004).
50. Zhu, C, Wang, X, Xu, F, Bahr, BA, Shibata, M, Uchiyama, Y, et al. The influence of age on apoptotic and other mechanisms of cell death after cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ* 12, 162-176. (2005).
51. Hara, H, Friedlander, RM, Gagliardini, V, Ayata, C, Fink, K, Huang, Z, et al. Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2007-2012. (1997).
52. Namura, S, Zhu, J, Fink, K, Endres, M, Srinivasan, A, Tomaselli, KJ, et al. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci* 18, 3659-3668. (1998).
53. Beker, MC, Caglayan, B, Caglayan, AB, Kelestemur, T, Yalcin, E, Caglayan, A, et al. Interaction of melatonin and Bmal1 in the regulation of PI3K/AKT pathway components and cellular survival. *Scientific reports* 9, 19082. (2019).
54. Yalcin, E, Beker, MC, Turkseven, S, Caglayan, B, Gurel, B, Kilic, U, et al. Evidence that melatonin downregulates Nedd4-1 E3 ligase and its role in cellular survival. *Toxicology and applied pharmacology* 379, 114686. (2019).
55. Gan, Y, Jing, Z, Stetler, RA, and Cao, G. Gene delivery with viral vectors for cerebrovascular diseases. *Frontiers in bioscience* 5, 188-203. (2013).
56. Naldini, L, Blomer, U, Gally, P, Ory, D, Mulligan, R, Gage, FH, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267. (1996).
57. Beker, M, Caglayan, AB, Beker, MC, Altunay, S, Karacay, R, Dalay, A, et al. Lentivirally administered glial cell line-derived neurotrophic factor promotes post-ischemic neurological recovery, brain remodeling and contralesional pyramidal tract plasticity by regulating axonal growth inhibitors and guidance proteins. *Experimental neurology* 331, 113364. (2020).

58. Ansari, S, Azari, H, McConnell, DJ, Afzal, A, and Mocco, J. Intraluminal middle cerebral artery occlusion (MCAO) model for ischemic stroke with laser doppler flowmetry guidance in mice. *J Vis Exp* (2011).
59. Ginsberg, MD. The new language of cerebral ischemia. *AJNR Am J Neuroradiol* 18, 1435-1445. (1997).



10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
10/06/2020	37		Dr. Öğr. Üye Mustafa Çağlar BEKER

“Bmal1’in beyin hasarı sonrası rolünün proteomik açıdan incelenmesi” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 01.07.2020 – 2 yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Burak ÇAĞLAYAN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Çağlar BEKER	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm. Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Cem GÜNEŞ	
Üye	Burak Sefa DERİBAŞ	

Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikaları/Ödülleri/Diğer

1. Sözlü Sunum- Özbay E, Beker MC, Çağlayan AB, Dinç M, Kılıç E, “Beyin hasarı sonrası Bmal1 proteininin etkilediği sinyal yollarının proteomik analizi” TUPA 3. Ulusal Proteomik Kongresi, İstanbul, 2020.

2. Sertifika- “Neurologic and Psychiatric Disorders: from synapses to networks” SynaNet, Lizbon, 2018.

3. Kongre sunuculuğu ve sertifika - “3rd International GENE-AREL Molecular Biology and Genetics Student Congress” İstanbul, 2015.